

写真 1. McKinney らの開発したスピーカーによる音振動を用いた発生器

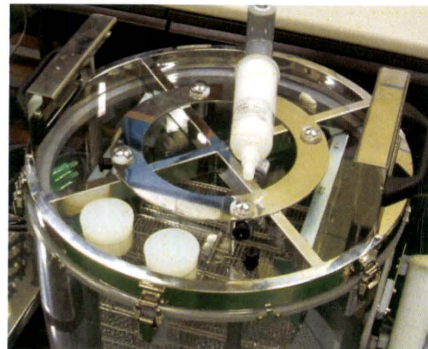


写真 2. 開発製造した、ディスプレイダブル暴露チャンバー(左写真は外筒、右は蓋)

ナノマテリアルの経気道暴露による中期発がん試験法の開発に関する研究

研究分担者 長野嘉介 中央労働災害防止協会日本バイオアッセイ研究センター 副所長
研究協力者 山崎一法 日本バイオアッセイ研究センター 経口試験室室長
鈴木正明 日本バイオアッセイ研究センター 経口試験室室長補佐
加納浩和 日本バイオアッセイ研究センター 生殖発生試験室室長

研究要旨

ナノマテリアルの吸入暴露による中期発がん試験を開発することを目的として、多くのナノマテリアルで共通して標的臓器となる可能性が高い肺を標的とした中期発がん試験法について、多層カーボンナノチューブ（MWCNT、MWNT-7）を用いて検討した。本年度は、DHPNでイニシエーション処置を行ったラットにMWNT-7を気管内投与する中期発がん試験を実施し、その結果、MWNT-7の経気道投与はDHPN処理によるラットの肺の腫瘍発生を修飾する作用がないことがわかった。

A. 研究目的

ナノマテリアルは極めて微細な粒子であり空气中に飛散しやすいため、ナノマテリアルおよびナノマテリアル製品のヒトへの暴露経路として経気道的暴露が重要な位置をしめている。経気道的に暴露されたナノマテリアルは、気道、特に肺に沈着するため、肺に対する影響が問題になる。特に、カーボンナノチューブはその形状がアスベストと類似しているため、長期暴露による肺や胸膜への発がん性が懸念されている。従来動物実験で化学物質の発がん性の有無を調べるためには、動物の寿命に相当する長期間にわたり化学物質を動物に投与することが必要であった。ナノマテリアルは多くの種類があり、さらに、用途や製法により形状や不純物が異なる製品が多数存在している。ナノマテリアルの生体影響は、その形状や不純物などの物理化学的性質が関与していると考えられており、個々のナノマテリアルで発がん性が異なることが予測される。従来行われてきた長期発がん性試験では、多数の動物、莫大な費用、期間がかかる

ため、個々のナノマテリアルについて長期試験を実施することは不可能である。このため、より短期間で多くの物質の発がん性を推定できるスクリーニング手法を開発することが必要である。化学物質の発がん性を推測するスクリーニング手法としては、微生物や培養細胞を用いた短期スクリーニング手法がある。しかし、標的臓器を考慮してナノマテリアルの発がん性を検出するためには、ほ乳動物を用い、腫瘍の発生をエンドポイントとしたスクリーニング手法、すなわち、ナノマテリアルの経気道投与による肺や中皮を標的とした中期発がん試験法を開発する必要がある。

20年度は、ナノマテリアルの吸入暴露による中期発がん試験を開発することを目的として、多くのナノマテリアルで共通して標的臓器となる可能性が高い肺を標的とした中期発がん試験に利用可能なイニシエーション処理と試験プロトコールについて、文献等の情報を基に検討した。肺を標的とした中期発がん試験は、ラットを使用した試験系としてはイニシエーターとし

て N-bis (2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN) や diethylnitrosamine (DEN) を使用した中期発がん試験の報告がある。マウスを使用した中期発がん試験については、イニシエーターとして 3-methylcholanthrene (3-MC)、ウレタン、4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO)、7,12-dimethylbenz[α]anthracene (DMBA) 等を使用した報告がある。ハムスターを使用した中期発がん試験は、N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine (BOP) 等をイニシエーターとして用いた試験の報告がある。また、遺伝子改変動物にイニシエーション処理を行い、より短期間に発がん性を調べる試みが報告されている。これらの文献から、ラットを使用した中期発がん試験では、雌雄 F344 系ラットを使用し、DHPN を腹腔内あるいは飲水投与し、その後、ナノマテリアルを経気道投与する方法をプロトコールの基本とするのが適切と結論された。また、マウスを使用した中期発がん試験では、A/J 系マウスを使用し、イニシエーション処理としてウレタンを腹腔内投与する方法をプロトコールの基本とするのが適切と結論された。平成 21 年度は、ナノマテリアルの経気道投与による中期発がん試験の試験プロトコールについて検討し、実験動物として F344 系ラットを使用し、イニシエーション処理として DHPN を 0.1% の濃度で飲水に混入して 2 週間投与し、2 週間の休業期間の後、MWCNT を 0、2.5、10 および 40 $\mu\text{g}/$ 匹の用量で 1 回/2 週、4 回気管内投与する方法を選択した。

本年度は、代表的なナノマテリアルである多層カーボンナノチューブ (MWCNT) を材料として、平成 21 年度に検討した試験プロトコールを用いて、経気道投与による肺を標的とした中期発がん試験を実施した。

B. 研究方法

B-1 試験材料

MWCNT は、三井物産(株) から提供された MWNT-7 (ロット番号 061220) を材料として使用した。

イニシエーション処理に用いた DHPN (CAS No. 53609-64-6) は、岐阜薬科大学 RI 研究施設で合成した試薬を使用した。DHPN は使用までの間、 -70°C 以下に冷凍して保管した。

また、陽性対照物質としてクリソタイル A (UICC) を使用した。

B-2 動物

動物は、日本チャールス・リバー(株) (厚木飼育センター：神奈川県厚木市下古沢 795) の F344/DuCrIj ラット (SPF) の雄を使用した。168 匹を 6 週齢で導入し、検疫、馴化を各 1 週間実施した後、発育順調で一般状態に異常を認めなかった動物から、体重値の中央値に近い 144 匹 (群構成時体重範囲：170~197g) を選別し、試験に用いた。

B-3 試験プロトコール

試験プロトコールを図 1、試験群の構成を表 1 に示した。

起始物質である DHPN を 1.00g/1000 mL (0.1% 濃度) となるように脱イオン水に溶解し、褐色給水瓶にて 2 週間自由摂取させた。2 週間の休業期間後、MWNT-7 を 2.5 μg 、10 μg または 40 $\mu\text{g}/$ 匹の用量で 2 週間おきに 4 回気管内投与し、20 週間の観察期間をおいた後に解剖した。また、比較のために、無処置群、MWNT-7 を 40 $\mu\text{g}/$ 匹投与しただけの群、DHPN 処置だけの群、および DHPN 処置後にクリソタイル A を 40 $\mu\text{g}/$ 匹の用量で 2 週間おきに 4 回気管内投与した群を設けた。MWNT-7 の投与量は、Aiso ら (2010) の研究に基づいて決定した。クリソタイル A の投与量は、MWNT-7 の最高用量に合わせた。

B-4 MWCNT懸濁液の調製方法

Tween80を0.1%添加したPBSに、各設定濃度となるようにMWNT-7を加え超音波ホモジナイザー（VP-30S、タイテック株）を用いて20分間ソニケーションし、懸濁した。調製は1回に投与2回分（4日分）を調製し、MWCNT懸濁液の調製は試験期間中2回行った。調製したMWCNT懸濁液は投与毎に小分けし、高圧蒸気滅菌したものを使用時まで冷蔵保管した。投与直前に超音波で再拡散して投与に使用した。

B-5 動物の飼育条件

動物は、全飼育期間を通して以下の環境で飼育した。

温度： 23±2℃

湿度： 55±15%

明暗サイクル：

12時間点灯(8:00～20:00)／12時間消灯(20:00～8:00)

換気回数： 15～17回／時

ケージへの動物の収容方法：単飼

ケージの材質・形状・寸法等：

ステンレス製2連網ケージ(170(W)×294(D)×176(H) mm／匹)

飼料は、全飼育期間を通して、オリエンタル酵母工業(株)（千葉工場：千葉県千葉市美浜区新港8-2）のCRF-1（30K Gy- γ 線照射滅菌飼料）固型を使用した。ただし、定期解剖前日の夕方からは飼料を摂取させなかった。

飲水は、検疫期間については市水（神奈川県秦野市水道局供給）をフィルターろ過した後、紫外線照射し、自動給水装置により自由摂取させた。馴化期間については、脱イオン水を給水瓶により自由摂取させた。起始物質投与期間については、0群と1群には脱イオン水のみを、2群～6群については脱イオン水を用いて所定の濃度に調製したDHPN混合飲水を給水瓶により自由摂取させた。起始物質投与終了後の回復期間の1週目は全

ての動物に脱イオン水を給水瓶により自由摂取させた。その後は、フィルターろ過した後、紫外線照射した市水を自動給水装置により自由摂取させた。

B-6 観察・検査項目及び方法

①動物の生死及び一般状態の観察

生死及び瀕死の確認を毎日1回行った。一般状態の詳細な観察は週1回行った。

②体重測定

測定時に生存した全動物について、起始物質の処置期間と回復期間は週1回、それ以降は2週に1回体重測定を行った。

③摂餌量測定

測定時に生存した全動物について、起始物質の処置期間と回復期間は週1回、それ以降は2週に1回給餌量、残餌量を測定し、その値から1匹1日当たりの摂餌量を算出した。

④摂水量測定

起始物質投与期間中及び回復期間の1週目は測定時に生存した全動物について週1回、給水量、残水量を測定し、その値から1匹1日当たりの摂水量を算出した。また、体重、摂水量及び設定濃度よりDHPNの投与量を算出した。

⑤気管支肺胞洗浄液検査

定期解剖時に生存していた採材可能な各群12匹について、剖検直前にソムノペンチル（共立製薬株式会社）麻酔下で放血させ、左気管支を結紮後、気管から生理食塩水5.5mlを右肺に注入（2回右肺を洗浄）した後、注入液を回収した。回収した洗浄液の液量を計量した後、下記の項目について検査を行った。なお、回収した洗浄液は凍結して保存し、解凍後に測定を実施した。

検査項目：LDH、ALP、総蛋白、アルブミン

⑥病理学的検査

全動物について、安楽死させた後、肉眼的に観察を行った。なお、安楽死は麻酔下において腹部大動脈からの放血によって行い、麻酔は気管支肺

胞洗浄検査を行った動物はソムノペンチル、それ以外の動物はエーテルで行った。

また、定期解剖時まで生存していた動物について、肺、肝臓および腎臓の湿重量（臓器実重量）を測定した。また、臓器の湿重量の搬出時体重に対する百分率（臓器重量体重比）を算出した。

全動物について、気管（縦隔リンパ節、胸腺を含む）、肺（右肺に固定液を注入した）、胸郭（横隔膜を含む）、肉眼的に変化のみられた器官及び組織を摘出し、10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定した。肺については、固定後に結節及び白色斑の個数を計数した。

（倫理面への配慮）

本研究は、動物愛護の観点から日本バイオアッセイ研究センターの「動物実験に関する指針」に基づき実施した。

C. 研究結果

C-1 生死状況

投与による影響の死亡はなかった。なお、定期解剖の1日目にDHPN+ MWNT-7(2.5 μ g)群の1匹が死亡し、剖検で肺の退縮不全が認められたが、投与用量に対応した死亡ではないことから、偶発的な死亡と判断した。また、DHPN+ CHRYS(40 μ g)群の1匹が採血時に事故死亡した。

C-2 体重

体重の推移を図2に示した。DHPN処置だけの群、DHPN処置後に2.5 μ g、10 μ gまたは40 μ g/匹の用量でMWNT-7を投与した群、及びDHPN処置後に40 μ g/匹の用量でクリソタイルAを投与した群は、無処置群に比較して体重の低値が認められた。すなわち、DHPN+ MWNT-7(10 μ g)群、DHPN+ MWNT-7(40 μ g)群及びDHPN+ CHRYS(40 μ g)群では、ほぼ全投与期間を通して体重の低値が認められた。また、DHPN処理のみの群とDHPN+ MWNT-7(2.5 μ g)群では、起始物質投与開始から、それぞれ18週と12週まで

体重の低値が認められた。MWNT-7の各用量群およびクリソタイルA投与群ともDHPN処置だけの群との間に体重推移の差がみられないことから、これらの体重への影響は、起始物質であるDHPNの投与による影響と考えられる。

C-3 摂餌量

摂餌量の推移を図3に示した。DHPN処置だけの群、DHPN処置後に2.5 μ g、10 μ gまたは40 μ g/匹の用量でMWNT-7を投与した群、及びDHPN処置後に40 μ g/匹の用量でクリソタイルAを投与した群は、DHPN処置を行っていた期間に摂餌量の低値が認められた。MWNT-7の各用量群およびクリソタイルA投与群ともDHPN処置だけの群との間に摂餌量推移の差がみられないことから、これらの摂餌量への影響は、起始物質であるDHPNの投与による影響と考えられる。

C-4 摂水量

DHPNで処置した群では、DHPNの投与期間を通して摂水量の低値が認められた。DHPNの投与期間の平均一日摂水量は、DHPNで処置しない群：21.3 gに対し、DHPN処理群は18.3 g（DHPNで処置しない群の86%）であった。

体重、摂水量及び設定濃度より算出したDHPNの投与量は、70~120 mg/kg体重/日（平均DHPN摂取量は89 mg/kg体重/日）であった。

C-5 気管支肺胞洗浄液検査

気管支肺胞洗浄液検査の結果を表2に示した。

MWNT-7を40 μ g/匹投与しただけの群は、無処置対照群に比較して、ALP、総蛋白及びアルブミンの高値が認められた。

DHPN処理のみの群は、無処置対照群に比較して、総蛋白とアルブミンの高値が認められた。しかし、増加の程度は無処置対照群に比較して少なかった。

DHPN処置後にMWNT-7を40 μ g/匹投与した群は、DHPN処理のみの群に比較してALP、総蛋白及びアルブミンの高値が認められた。

DHPN処置後にクリソタイルAを40 μ g/匹投与した群は、DHPN処理のみの群に比較してALP、総蛋白及びアルブミンの高値が認められた。

なお、回収した洗浄液は凍結して保存し解凍後に測定を実施したため、LDHの活性が低下していると考えられることから評価から除外したが、ALPと同様に、MWNT-7を40 μ g/匹投与しただけの群とDHPN処置後にMWNT-7を40 μ g/匹投与した群に高値が認められている。

C-6 肺の病理検査

剖検の結果を表4に示した。

DHPN処理のみの群、DHPN処置後にMWNT-7を2.5 μ g、10 μ g および40 μ g/匹投与した群、並びにDHPN処置後にクリソタイルAを40 μ g/匹投与した群は、全ての動物の肺に結節や白色斑が認められた。これに対し、無処置群とMWNT-7を40 μ g/匹投与しただけの群では、いずれの動物も肺に結節や白色斑の発生がなかった。

結節や白色斑の平均発生個数/匹は、DHPN処置だけの群は32.2 \pm 8.4、DHPN処置後にMWNT-7を2.5 μ gの用量で投与した群は32.4 \pm 6.8、10 μ gの用量で投与した群は29.0 \pm 7.3、40 μ gの用量で投与した群は27.7 \pm 6.9、DHPN処置後にクリソタイルAを40 μ g/匹の用量で投与した群は31.3 \pm 7.5であり、これらの群の間には差がみられなかった。

D. 考察

アスベストに類似した形状を持つMWCNTの経気道暴露は、胸膜の中皮腫や肺の腫瘍の発生の原因になることが懸念されている。Polandら(2008)は、MWNT-7をマウスに腹腔内投与しアスベストに類似した反応がみられることを報告した。また、Takagiら(2008)は、雄p53⁺/マウスにMWNT-7を腹腔内投与し、中皮腫が発生

したことを報告している。さらに、Sakamotoら(2009)は、今回の研究に使用したと同様の雄F344ラットの陰嚢内にMWNT-7を投与し、腹膜の中皮腫が発生したことを報告している。

本研究は、MWCNTによる肺腫瘍の発生の可能性に注目し、肺腫瘍の起始物質であるDHPNでイニシエーション処置を行ったラットにこれらの報告で使用されているMWNT-7を気管内投与する中期発がん試験を実施した。すなわち、0.1%の濃度のDHPNを2週間自由摂取させ、2週間の休薬期間後、MWNT-7を2.5 μ g、10 μ g または40 μ g/匹の用量で2週間おきに4回気管内投与し、20週間の観察期間をおいた後に解剖した。また、比較のために、無処置群、MWNT-7を40 μ g/匹投与しただけの群、DHPN処置だけの群、およびDHPN処置後にクリソタイルAを40 μ g/匹の用量で2週間おきに4回気管内投与した群を設けた。

その結果、DHPNのイニシエーション処理により摂餌量の低下や体重の増加抑制がみられたが、各群とも最終解剖まで投与に起因した動物の死亡はなかった。従って、DHPNのイニシエーション処置およびMWNT-7の投与用量は、動物が十分耐える条件であることが確認できた。一方、最終解剖時の剖検観察で、肺の腫瘍性病変による結節や白色斑の発生がDHPN処置により全ての動物でみられ、DHPNによるイニシエーション処置が十分であり、本研究で用いた中期発がん試験法は肺の腫瘍発生への修飾作用を検出する方法として適切であると考えられた。

肺の腫瘍性病変の発生を量的に比較するため、肺の結節と白色斑の発生個数は計数した。その結果、DHPNでイニシエーション処置した後にMWNT-7を投与した群はDHPN処置だけの群と比較して発生個数に差が認められなかった。今回の研究で用いたMWNT-7の最高用量である40 μ g/匹は、Aisoらの研究(2010)で線維化

が発生することが確認されている用量であり、この用量を4回投与した今回の投与条件は、肺に十分に影響を与えることが予想される量である。また、気管支肺胞洗浄液検査の結果でも、MWNT-7を40 μ g/匹の用量で投与しただけの群にもは、ALP、総蛋白及びアルブミンの高値が認められ、組織傷害や炎症が起きていることが裏付けられている。従って、MWNT-7はDHPN処理による肺の腫瘍発生を修飾する作用がないと結論した。

E. 結論

DHPNでイニシエーション処置を行ったラットにMWNT-7を気管内投与する中期発がん試験を実施した。その結果、MWNT-7の経気道投与はDHPN処理による肺の腫瘍発生を修飾する作用がないことがわかった。

参考文献

Aiso, S., Yamazaki, K., Umeda, U. et al. (2010). *Industrial Health* 48: 783 – 795.

Poland, CA., Duffin, R., Kinloch, I. et al. (2008). *Nature Nanotechnology* 3, 423 – 428.

Sakamoto, Y., Nakae, D., Fukumori, N. et al. (2009). *J Toxicol Sci* 34, 65 – 76.

Takagi, A., Hirose, A., Nishimura, T. et al. (2008). *J Toxicol Sci* 33, 105 – 116.

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

○ Aiso, S., Yamazaki, K., Umeda, Y., Asakura, M., Kasai, T., Takaya, M., Toya, T., Koda, S., Nagano, K., Arito, H. and Fukushima, S.: Pulmonary toxicity of intratracheally instilled multiwall carbon nanotubes in male Fischer 344 rats,

Industrial Health, 2010, 48: 783 – 795.

○ Aiso, S., Kubota, H., Umeda, Y., Kasai, T., Takaya, M., Yamazaki, K., Nagano, K., Sasaki, T., Koda, S. and Fukushima, S.: Translocation of Intratracheally Instilled Multiwall Carbon Nanotubes to Lung-Associated Lymph Nodes in Rats, *Industrial Health*, 2011, 48: in press

○ Asakura, M., Sasaki, T., Sugiyama, T., Takaya, M., Koda, S., Nagano, K., Arito, H. and Fukushima, S.: Genotoxicity and cytotoxicity of multi-wall carbon nanotubes in cultured Chinese hamster lung cells in comparison with chrysotile A fibers, *Journal of Occupational Health*, 2010, 52: 155-166.

Nagano, K., Gotoh, K., Kasai, T., Aiso, S., Nishizawa, T., Ohnishi, M., Ikawa, N., Eitaki, Y., Yamada, K., Arito, H. and Fukushima, S.: Two- and 13-week inhalation toxicities of indium-tin oxide and indium oxide in rats, *Journal of Occupational Health*, 2011, 53: 51-63.

Nagano, K., Nishizawa, T., Eitaki, Y., Ohnishi, M., Noguchi, T., Arito, H. and Fukushima, S.: Pulmonary toxicity in mice by 2- and 13-week inhalation exposures to indium-tin oxide and indium oxide aerosols, *Journal of Occupational Health*, 2011: in press.

Nagano, K., Nishizawa, T., Umeda, Y., Kasai, T., Noguchi, T., Gotoh, K., Ikawa, N., Eitaki, Y., Kawasumi, Y., Yamauchi, T., Arito, H. and Fukushima, S.: Inhalation carcinogenicity and chronic toxicity of indium-tin oxide in rats and mice, *Journal of Occupational Health*, 2011: in press.

○ Takaya, M., Serita, F., Yamazaki, K., Aiso, S., Kubota, H., Asakura, M., Ikawa, N., Nagano, K., Arito, H. and Fukushima, S.: Characteristics of multiwall carbon nanotubes for an intratracheal instillation study with rats, *Industrial Health*, 2010, 48:

452-459.

Umeda, Y., Matsumoto, M., Aiso, S., Nishizawa, T, Nagano, k., Arito, H. and Fukushima S.: Inhalation Carcinogenicity and Toxicity of 1,2-Dichloropropane in Rats. Inhalation Toxicology: 2010,22:1116-1126

2. 学会発表

○相磯成敏、梅田ゆみ、山崎一法、長野嘉介、戸谷忠雄、久保田久代、鷹屋光俊、甲田茂樹、有藤平八郎、福島昭治：ラットに単回強制気管内投与した多層カーボンナノチューブの気管支周囲リンパ組織と縦隔部リンパ節への移行と病理組織変化、2010年、第83回日本産業衛生学会

○相磯成敏、斎藤美佐江、妹尾英樹、高信健司、梅田ゆみ、戸谷忠雄、長野嘉介、福島昭治：気管内投与した多層カーボンナノチューブの体内動態：2010年、第25発癌病理研究会

○浅倉眞澄、長野嘉介、有藤平八郎、福島昭治：多層カーボンナノチューブの培養細胞を用いる小核試験及び細胞形質転換試験、2010年、第83回日本産業衛生学会

○浅倉眞澄、長野嘉介、有藤平八郎、福島昭治：多層カーボンナノチューブの遺伝毒性試験および細胞形質転換試験、2010年、第39回日本環境変異原学会

○片桐卓、高信健司、妹尾英樹、梅田ゆみ、相磯成敏、長野嘉介、福島昭治：多層カーボンナノチューブで処理した培養細胞(CHL/IU細胞、BALB/c3T3細胞)の走査電子顕微鏡による観察：2011年、第27回日本毒性病理学会

妹尾英樹、高信健司、梅田ゆみ、片桐卓、相磯成敏、長野嘉介、福島昭治：1-プロモ-3-

クロロプロパンの13週間吸入曝露によるラットとマウスの鼻腔病変：2011年、第27回日本毒性病理学会

○高信健司、相磯成敏、梅田ゆみ、妹尾英樹、片桐卓、長野嘉介、福島昭治：気管内投与による多層カーボンナノチューブの脳内移行：2011年、第27回日本毒性病理学会

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表1 試験群の構成

群番号	群名称	DHPN 処置	MWCNT と CHRYS の投与量 $\mu\text{g}/\text{匹}/\text{回}$ $\times 4$ 回	使用動物数
0	無処置対照群	—	0	12 匹
1	MWNT-7 (40 μg) 群	—	40	12 匹
2	DHPN 処理のみの群	+	0	24 匹
3	DHPN+ MWNT-7 (2.5 μg) 群	+	2.5	24 匹
4	DHPN+ MWNT-7 (10 μg) 群	+	10	24 匹
5	DHPN+ MWNT-7 (40 μg) 群	+	40	24 匹
6	DHPN+ CHRYS 40 μg 群	+	40	24 匹

MWNT-7 : 多層カーボンナノチューブ

DHPN : *N-Bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine*

CHRYS : UICC クリソタイル A

表2 気管支肺胞洗浄液検査

	検査 動物数	ALP	総蛋白	アルブミン
無処置対照群	12	215.8 ± 24.5	74.3 ± 9.4	33.6 ± 4.1
MWNT-7 (40 μg) 群	12	284.1 a ± 13.0	127.0 a ± 9.8	55.4 a ± 3.6
DHPN 処理のみの群	12	244.1 ± 43.3	89.9 a ± 11.0	38.3 a ± 3.7
DHPN+ MWNT-7 (2.5 μg) 群	12	269.9 ± 27.9	89.1 ± 8.5	38.9 ± 3.4
DHPN+ MWNT-7 (10 μg) 群	12	266.9 ± 39.8	94.7 ± 11.9	40.7 ± 4.5
DHPN+ MWNT-7 (40 μg) 群	12	318.3 b ± 31.2	125.2 b ± 14.4	53.5 b ± 5.3
DHPN+ CHRYS 40 μg 群	12	271.3 ± 32.0	103.6 b ± 11.9	48.9 b ± 4.7

MWNT-7 : 多層カーボンナノチューブ

DHPN : *N-Bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine*

CHRYS : UICC クリソタイル A

a : 無処置群に対し $p \leq 0.01$ で有意な差 (t 検定)

b : DHPN 処理のみの群に比較し $p \leq 0.01$ で有意な差 (t 検定)

表3 肺の剖検結果

	検査動物数	結節や白色斑の発生匹数 (%)	結節や白色斑の発生個数 (1匹あたり)
無処置対照群	12	0 (0%)	0
MWNT-7 (40 μ g) 群	12	0 (0%)	0
DHPN 処理のみの群	24	24 (100%)	32.2 \pm 8.4
DHPN+ MWNT-7 (2.5 μ g) 群	23	23 (100%)	32.4 \pm 6.8
DHPN+ MWNT-7 (10 μ g) 群	24	24 (100%)	29.0 \pm 7.3
DHPN+ MWNT-7 (40 μ g) 群	24	24 (100%)	27.7 \pm 6.9
DHPN+ CHRYS 40 μ g 群	23	23 (100%)	31.3 \pm 7.5

MWNT-7 : 多層カーボンナノチューブ

DHPN : *N-Bis*(2-hydroxypropyl)nitrosamine

CHRYS : UICC クリソタイル A

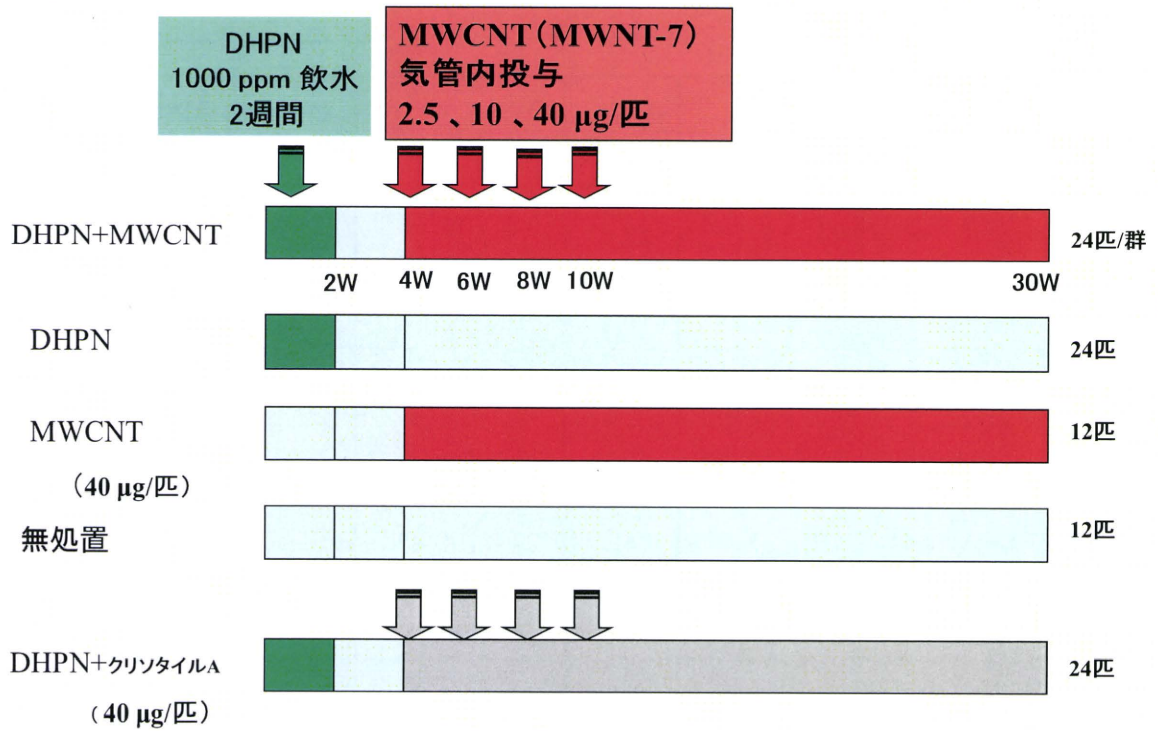


図1 MWCNTの気管内投与によるDHPNイニシエーション処理を用いた肺を標的とした中期発がん試験のプロトコール

MWCNT : 多層カーボンナノチューブ
DHPN : *N-Bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine*

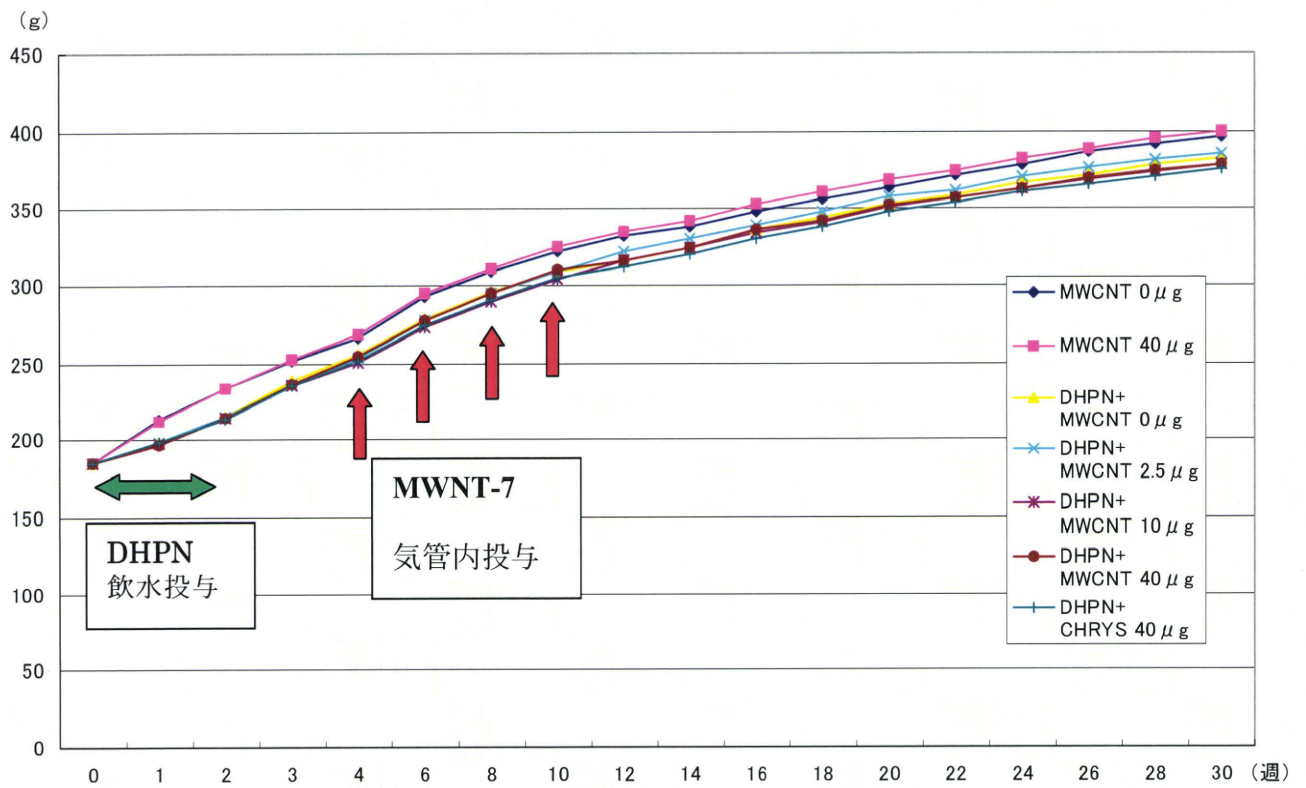


図2 体重の推移

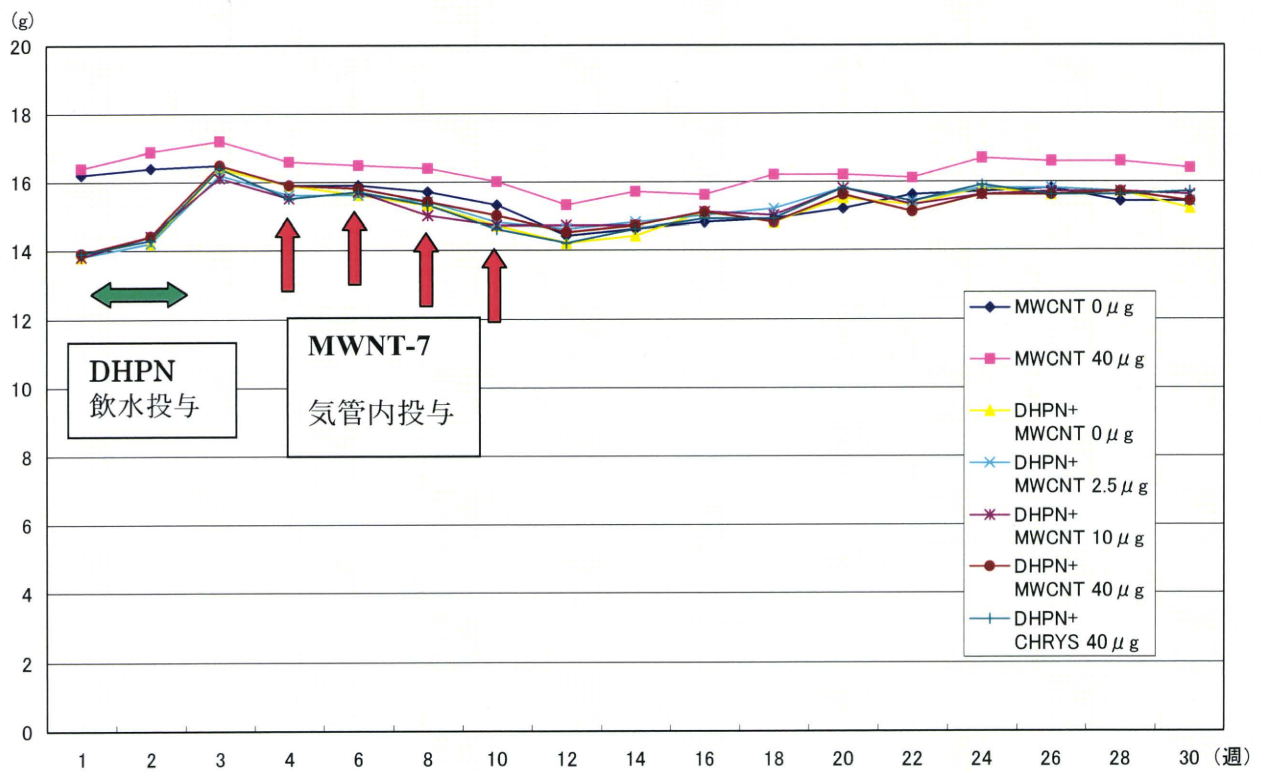


図3 摂餌量の推移

厚生労働科学研究費補助金 (化学物質リスク研究事業、H20-化学-一般-006)
分担研究報告書

ナノマテリアルの発がん性スクリーニングのための *in vitro* 系での
遺伝毒性試験による評価手法に関する研究

分担研究者 浅倉眞澄 日本バイオアッセイ研究センター 病理検査部
培養細胞試験室 室長

研究要旨

近年、種々のナノマテリアルが開発され、広い分野で使用されている。しかし、現在、このようなナノマテリアルの安全性試験の手法が確立されているとは言いがたい。ナノマテリアルの中でも、カーボンナノチューブはその形状が繊維状物質であるという物理的特性から、アスベストと同様の毒性を示す可能性も推測される。本研究では、発がん性スクリーニング法のための *in vitro* 系での遺伝毒性試験及び細胞形質転換試験による評価手法の開発を目的として、試験系の検討を行った。本年度は、多層カーボンナノチューブ(MWCNT)を用いた Balb3T3 細胞による、①2段階細胞形質転換試験、②2段階細胞形質転換試験での2核細胞の生成、③細胞への取り込みの検討を行った。その結果、以下の知見を得た。①MWCNTは細胞形質転換を誘発すること、また、その誘発はイニシエーション処理によりおこるがプロモーション処理では起こらないこと。②MWCNTのイニシエーション処理により2核細胞を誘発すること。③MWCNTは細胞内に取り込まれていて、培養細胞による細胞形質転換試験での評価が適切であることが分かった。これまでの研究から、培養細胞を用いる細胞毒性試験、遺伝毒性および細胞形質転換試験は、がん性スクリーニング法のための *in vitro* 系での遺伝毒性試験及び細胞形質転換試験として、十分に評価に耐える試験系であると考えられる。

A. 研究目的

ナノマテリアルは一般的に大きさが1~100nm程度の超微粒子とされるが、ナノテクノロジーの分野の研究開発が進み、既にナノマテリアルを材料とした化粧品、衣料、医薬品などに盛んに使用されるようになってきた。しかし、その安全性や毒性についての研究はまだ始まっ

たばかりである。特に作業環境や一般生活の環境において、ヒトへの健康影響が懸念されている。ナノマテリアルの中でも、カーボンナノチューブはその形状が繊維状物質であるという物理的特性から、アスベストと同様の毒性を示す可能性も推測される。

本試験は、発がん性スクリーニング法

のための *in vitro* 系での遺伝毒性試験及び細胞形質転換試験による評価手法の開発を目的として、昨年度に続き試験系の検討を行った。

ナノマテリアルの中で MWCNT は水に溶けないことおよび超微粒子であることなどから、通常の安全性の試験ガイドラインに示されているような溶媒および処理方法では、正確な評価が出来ない可能性がある。このため、試験材料として MWCNT を用い、細胞への処理方法の開発、適正な細胞種を選択等を検討したうえで、細胞毒性試験、遺伝毒性試験及び細胞形質転換試験を用いた評価を行うこととした。

B. 研究方法

B-1. 実験材料

三井物産株式会社から提供を受けた多層カーボンナノチューブ(MWNT-7、Lot No. 061220)を使用した。細胞は、昨年度の結果を受けて、Balb/c マウスの全胎児細胞由来の細胞株(Balb3T3)を使用した。培養液は、イーグル MEM+10%牛胎児血清(FBS)及び D-MEM/F-12 + 2%FBS + 1%ITES (insulin, transferrin, ethanolamine, sodium selenite)を使用した。

B-2. 2 段階細胞形質転換試験

60mm ポリエチレンシャーレに Balb3T3 細胞を 1×10^4 個播種し、24 時間培養後に既知のイニシエーターまたは MWCNT を処理した。3 日間培養した後、通常の培養液に戻しさらに 3 日間培養した。その後、MWCNT または既知のプロモーターで 10 日間処理した後、通常の培

養液に戻し 10 日間培養した。エタノール固定・ギムザ染色後に、実体顕微鏡下でフォーカスの観察を行った。試験は、MWCNT をイニシエーションの時期に処理した場合とプロモーションの時期に処理した場合の 2 段階で行った。陰性対照として DMSO を用い、陽性対照としては、3-Methyl-cholanthrene (MCA:200ng/ml、イニシエーター) 及び 12-*O*-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA:100ng/ml、プロモーター) を用いた。培養液は、MWCNT 処理まではイーグル MEM + 10%FBS を用い、以降の培養には D-MEM/F-12 + 2%FBS + 1%ITES (insulin, transferrin, ethanolamine, sodium selenite) を用いた。なお、MWCNT 懸濁液は、昨年度検討した調製方法で作製した。すなわち DMSO(0.5%)/培養液 + 超音波ホモジナイザー(3 分)で MWCNT を均一に分散した。

B-3. 2 核細胞の観察

上記の 2 段階細胞形質転換試験で作製したシャーレを用い、2 核細胞の観察を行った。光学顕微鏡(300 倍)を用い、増殖阻止のかかった細胞を 1000 個(シャーレ当り)を観察し 2 核を持つ細胞の数をカウントした。各用量 2 枚のシャーレを観察した。

B-4. 細胞内への取り込みの検討

60mm ポリエチレンシャーレに 1×10^5 個の Balb3T3 細胞を播種し 24 時間培養した後、培養液を MWCNT 懸濁培養液に交換して 2 日間培養した。その後懸濁培養液を捨て、リン酸緩衝生理食塩液で洗

浄後、1%グルタルアルデヒドで固定し、段階的に100%エタノールに置換後、*tert*-ブタノールに置き換えて凍結乾燥した。Pt コート後に走査型電子顕微鏡(SEM、日立: FE-SEM, SU-8000 型) により観察した。

C. 研究結果

C-1. 2段階細胞形質転換試験

1) イニシエーション試験(表 1)

イニシエーション時期に MWCNT を処理した後、プロモーション時期にプロモーターとして知られる TPA または DMSO を処理した。TPA 処理では、形質転換した細胞のフォカース数が、用量に依存して上昇した。DMSO 処理では、上昇傾向を示した。

2) プロモーション試験(表 2)

イニシエーション時期にイニシエーターとして知られる MCA または DMSO を処理した後、プロモーション時期に MWCNT を処理した。試験の結果、イニシエーター処理後、プロモーション時期に MWCNT を処理しても、形質転換した細胞のフォカース数の上昇は認められなかった。

C-2. 2核細胞

イニシエーション時期に MWCNT を処理後、プロモーション時期に DMSO を処理したものは、2核を持つ細胞の出現率が用量に依存して上昇した(表 3)。プロモーション時期に TPA を処理したものに關しても、2核を持つ細胞の出現率が用量に依存して上昇した。

C-3. 細胞内への取り込みの検討

SEM による細胞像を図 1~4 に示した。MWCNT 繊維が細胞内に入っているのが観察できる。繊維は完全には細胞内に入らず、一部細胞の外に出ている。MWCNT が細胞表面に沿って位置し、その一部が細胞内に取り込まれている(図 1、2)場合と、MWCNT が細胞表面にほぼ垂直な形で取り込まれている(図 3、4)場合の両方が観察できる。昨年度報告したチャイニーズハムスター肺由来の細胞株(CHL/IU)と同様に Balb3T3 細胞でも MWCNT が細胞内に取り込まれることが確認できた。

D. 考察

2段階細胞形質転換試験

2段階細胞形質転換試験の結果から、MWCNT は、イニシエーターとして働き、プロモーターとしては働かないことが分かった。イニシエーション時期つまり細胞が増殖を繰り返している時期に作用して何らかの障害が起こることが示唆される。昨年度の CHL/IU 細胞を用いる遺伝毒性試験の結果、MWCNT 処理により倍数体あるいは多核細胞が誘発することから、細胞分裂時に何らかの作用をすることが推測された。また、本試験で実施した細胞観察でも 2核細胞の誘発が観察されている。Balb3T3 細胞でも、同様の作用が起きて、これが細胞形質転換の引き金になっている可能性が示唆される。染色体の数の異常とがん化の関係は現在、明瞭なメカニズムが解明されているわけではない。しかし、染色体の数の異常(倍数体)が原因となり、異数性の誘発やゲノ

ムの不安定性を引き起こしがん化につながるメカニズムの可能性が考えられる。

何れにしても、MWCNTは培養細胞に作用して細胞形質転換を起すことが分かった。生体においてもがんの生成の可能性が考えられる。がん原性試験等による検証が必要と考える。

2 核細胞の生成

2核細胞の生成数を、プロモーション時期にDMSO及びTPA処理したもので比較すると、その出現率に差がない。2核細胞の出現は、MWCNT処理後の3~4日までの、細胞増殖時期に決定されると考えられるため、両者に差が生じないと考えられる。2核細胞の出現は、昨年度実施したCHL/IU細胞を用いた遺伝毒性試験(小核試験)でも認められている。Balb3T3細胞で生じた2核細胞もCHL/IU細胞同様に、MWCNTを取り込んだ細胞の分裂過程での障害が原因で生成したものと考えられる。

細胞内への取り込みの検討

MWCNTの*in vitro*系での細胞毒性、遺伝毒性及び細胞形質転換試験の評価に当たり、細胞へのMWCNTの取り込みの確認は不可欠な問題である。SEMを用いた観察により、MWCNTがBalb3T3細胞の細胞内に取り込まれていることが確認された。Balb3T3細胞を用いる細胞形質転換試験では、細胞内に取り込まれたMWCNTによりトランスフォーメーションが引き起されたものと考えられる。

E. 結論

本試験は、発がん性スクリーニング法のための*in vitro*系での遺伝毒性試験及び細胞形質転換試験による評価手法の開発を目的として、試験系の検討を行った。今年度は、MWCNTを用いたBalb3T3細胞による、①2段階細胞形質転換試験、②2段階細胞形質転換試験での2核細胞の生成、③細胞への取り込みの検討を行った。その結果、以下の知見を得た。①MWCNTは細胞形質転換を誘発すること、また、その誘発はイニシエーション処理によりおこるがプロモーション処理では起こらないこと。②MWCNTのイニシエーション処理により2核細胞を誘発すること。③MWCNTは細胞内に取り込まれていて、培養細胞による細胞形質転換試験での評価が妥当であることを証明した。

本年度までの結果から以下のことが明らかとなった。①多層カーボンナノチューブは、遺伝子突然変異、染色体構造異常および小核を誘発しないことから、DNAへの直接的な作用はないと考えられる。②倍数体、2核および多核の誘発が観察されることから、細胞の分裂過程に何らかの異常が起こっている可能性が考えられる。③イニシエーション段階で処理することにより細胞形質転換を誘発することから、多核の誘発あるいは染色体の数的異常がゲノムの不安定性を通して形質転換のイニシエーション作用に寄与している可能性が考えられる。

以上より、CHL/IU細胞による細胞毒性、遺伝毒性(染色体異常試験、小核試験、遺伝子突然変異試験)及びBalb3T3細胞による細胞形質転換試験は、がん原性ス

クリーニング法のための *in vitro* 系として、十分に評価に耐える試験系であると考えられる。ただし、試験を実施するには、被験物質の適切な調製方法の選択及び細胞への取込みの確認が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Asakura, M., Sasaki, T., Sugiyama, T., Takaya, M., Koda, S., Nagano, K., Arito, H. and Fukushima, S.: Genotoxicity and cytotoxicity of multi-wall carbon nanotubes in cultured Chinese hamster lung cells in comparison with chrysotile A fibers, *Journal of Occupational Health*, 2010, 52: 155-166.
- 2) Takaya, M., Serita, F., Yamazaki, K., Aiso, S., Kubota, H., Asakura, M., Ikawa, N., Nagano, K., Arito, H. and Fukushima, S.: Characteristics of Multiwall Carbon Nanotubes for an Intratracheal Instillation Study with Rats, *Industrial Health*, 2010, 48 : 452-459.
- 3) Aiso, S., Yamazaki, K., Umeda, U., Asakura, M., Takaya, M., Toya, T., Koda, S., Nagano, K., Arito, H. and Fukushima, S.: Pulmonary toxicity of intratracheally instilled multiwall carbon nanotubes in male Fischer 344 rats, *Industrial Health*, 2010, 48 : 783-795.

2. 学会発表

- 1) 浅倉真澄、長野嘉介、有藤平八郎、福島昭治：多層カーボンナノチューブの

培養細胞を用いる細胞毒性および変異原性－クリソタイルとの比較－、2009年、第82回日本産業衛生学会

- 2) 浅倉真澄、杉山淑江、長野嘉介、有藤平八郎、福島昭治：アスベストによる細胞形質転換と倍数性誘発、2009年、第38回日本環境変異原学会
- 3) 浅倉真澄、長野嘉介、有藤平八郎、福島昭治：多層カーボンナノチューブの培養細胞を用いる小核試験及び細胞形質転換試験、2010年、第83回日本産業衛生学会
- 4) 浅倉真澄、長野嘉介、有藤平八郎、福島昭治：多層カーボンナノチューブの遺伝毒性試験および細胞形質転換試験、2010年、第39回日本環境変異原学会

G. 知的財産権の出願・登録状況

・特許取得・実用新案登録なし。

表1 MWCNTの2段階細胞形質転換試験(イニシエーション試験)

Initiating treatment (μg/ml)	Promoting treatment (μg/ml)	Growth index (%)	Transformation			
			No. of dishes examined	No. of dishes with foci	Total no. of foci	Foci/dish
DMSO (0.5%)	DMSO (0.5%)	100	18	2	2	0.11
MWCNT	0.25 (0.5%)	88	18	2	2	0.11
	0.5 (0.5%)	85	18	1	1	0.06
	1 (0.5%)	78	18	3	3	0.17
	2 (0.5%)	63	18	4	4	0.22
	4 (0.5%)	42	18	3	4	0.22
MCA 0.1	(0.5%)	72	18	15	29	1.61
DMSO (0.5%)	TPA 0.1	100	18	3	4	0.22
MWCNT	0.25 0.1	91	18	5	6	0.33
	0.5 0.1	83	18	5	7	0.39
	1 0.1	76	18	8	11	0.61
	2 0.1	67	18	16	21	1.17
	4 0.1	54	18	13	15	0.83
MCA 0.2	0.1	46	18	18	97	5.39

DMSO: Dimethylsulfoxide

MWCNT: Multi-wall carbon nanotube

MCA: 3-Methylcholanthrene

TPA: 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate

表2 MWCNTの2段階細胞形質転換試験(プロモーション試験)

Initiating treatment (μg/ml)	Promoting treatment (μg/ml)	Growth index (%)	Transformation				
			No. of dishes examined	No. of dishes with foci	Total no. of foci	Foci/dish	
DMSO (0.5%)	DMSO (0.5%)	100	18	2	3	0.17	
(0.5%)	MWCNT	0.13	98	18	2	3	0.17
		0.25	95	18	1	2	0.11
		0.5	92	18	3	4	0.22
		1	85	18	4	5	0.28
		2	76	18	3	3	0.17
	(0.5%)	TPA 0.1	46	18	6	7	0.39
MCA	DMSO	100	18	13	22	1.22	
	0.2 MWCNT 0.13	94	18	11	21	1.17	
	0.2 0.25	91	18	11	19	1.06	
	0.2 0.5	85	18	14	31	1.72	
	0.2 1	77	18	13	26	1.44	
	0.2 2	64	18	12	27	1.50	
	0.2 TPA 0.1	46	18	17	53	2.94	

DMSO: Dimethylsulfoxide

MWCNT: Multi-wall carbon nanotube

MCA: 3-Methylcholanthrene

TPA: 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate

表3 MWCNTの2段階細胞形質転換試験における2核細胞の発生(イニシエーション試験)

Initiating treatment (μg/ml)	Promoting treatment (μg/ml)	Growth index (%)	No. of cells observed	No. of Bi-nucleated cells	Percentage (%) of Bi-nucleated cell
DMSO (0.5%)	DMSO (0.5%)	100	2000	32	1.60
MWCNT	(0.5%)	0.25	2000	39	1.95
		0.5	2000	61	3.05
		1	2000	65	3.25
		2	2000	78	3.90
		4	2000	75	3.75
DMSO (0.5%)	TPA 0.1	100	2000	31	1.55
MWCNT	0.1	0.25	2000	37	1.85
		0.5	2000	59	2.95
		1	2000	62	3.10
		2	2000	80	4.00
		4	2000	73	3.65

DMSO: Dimethylsulfoxide
MCA: 3-Methylcholanthrene

MWCNT: Multi-wall carbon nanotube
TPA: 12-O-tetradecanoylphorbol -13-acetate

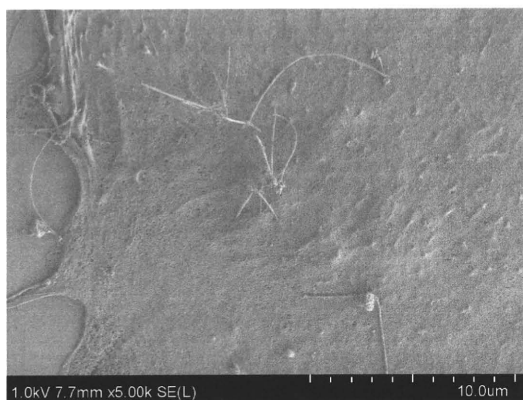


図1 MWCNT 処理細胞(×5000)

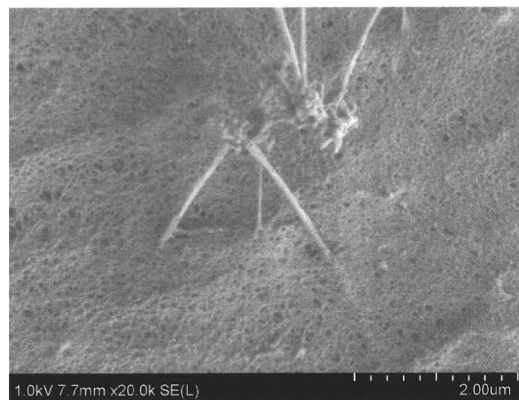


図2 MWCNT 処理細胞(×20000)



図3 MWCNT 処理細胞(×5000)

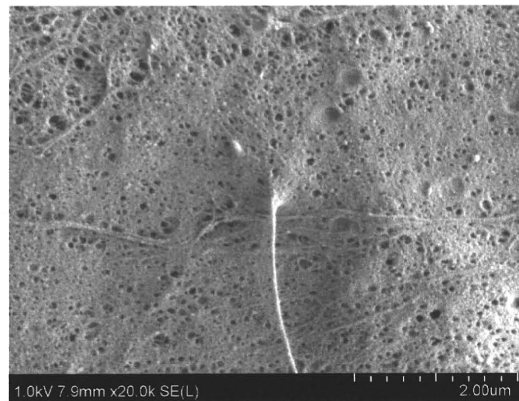


図4 MWCNT 処理細胞(×20000)

分担研究報告書

ナノマテリアルの経気道暴露による発がん性スクリーニングのための *in vivo* 系での
遺伝毒性試験による評価手法に関する研究

分担研究者	野口 忠	日本バイオアッセイ研究センター 病理検査部 微生物試験室 室長
協力研究者	片桐 卓	日本バイオアッセイ研究センター 試験管理部 動物管理室 技術専門役
	上垣外 智之	日本バイオアッセイ研究センター 病理検査部 微生物試験室 室長補佐

研究要旨

カーボンナノチューブは、その形状がヒトに悪性中皮腫を発生させるアスベストと類似していることから安全性が危惧されている。また、アスベストにより発生したヒト悪性中皮腫にホモ接合性の欠失が認められる。現在開発されている *in vivo* 遺伝毒性を調べるトランスジェニック動物の中で *gpt delta* 動物は欠失変異を評価できる点からも最も有効な試験系である。ナノマテリアルの *in vivo* 突然変異誘発性評価の方法を検討する目的で、多層カーボンナノチューブ（MWCNT）を *gpt delta* ラットに気管内投与し、肺における突然変異検出試験を実施した。試験はラットにMWCNTを1匹あたり 40 及び 160 μg またアスベスト（Chrysotile）を 1000 μg の用量で気管内に2週間間隔で4回投与した。MWCNTの初回投与後49日及び90日の肺重量は有意な増加を示したが、*gpt* 突然変異及び *Spi*-欠失変異誘発性は認められなかった。難溶性のナノマテリアルの主要な標的臓器は肺であり、*in vivo* で肺における遺伝毒性を調べることはその毒性を評価する上で重要である。*gpt delta* 動物を用いる *in vivo* 突然変異試験の肺における評価方法の検討及び新に有効な試験系の開発が必要である。

A. 研究目的

ナノマテリアルの健康影響として現在問題になっているのは、難溶解性の微細な粒子状物質であり、結晶性シリカ、酸化チタン、カーボンブラック、ディーゼル排出粒子等の発がん性が指摘されていることによる。さらに近年開発された工業性資材として有用性の高いカーボンナノチューブはその形状がアスベストと類似していることから安全性が危惧されている。アスベストはヒトに悪性中皮腫を発生させ、組織の *CDKN2A* 遺伝子部位にホモ接合性の欠失が認めら

れている。¹⁾

化学物質の *in vivo* 変異原性の評価には、主にげっ歯類動物の骨髄を用い、染色体の構造又は分離の異常により生成する小核を指標とした小核試験が行われている。この試験は、難溶解性の粒子状物質は投与臓器から血液中に取り込まれ骨髄に到達する可能性が低く有効ではなと思われる。

最近、*in vivo* 変異原性試験として大腸菌由来のレポーター遺伝子を組み込んだトランスジェニック動物が開発され、その有用性が示され