

201035007A

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

ナノマテリアルの遺伝毒性及び発がん性に関する研究

(H20 -化学 - 一般 - 007)

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者

戸塚 ゆ加里 (国立がん研究センター研究所)

分担研究者

中江 大 (東京都健康安全研究センター)

川西 優喜 (大阪府立大学)

葛西 宏 (産業医科大学)

渡邊 昌俊 (横浜国立大学大学院)

増田 修一 (静岡県立大学)

平成23 (2011) 年 3月

## 目次

I. 総括研究報告	
ナノマテリアルの遺伝毒性及び発がん性に関する研究	< 1 >
戸塚 ゆ加里	
II. 分担研究報告	
1. ナノマテリアルにより誘発される DNA 損傷に関する研究	< 11 >
戸塚 ゆ加里	
2. ラットにおけるマグネタイトの慢性毒性に関する研究	< 14 >
中江 大	
3. ほ乳類培養細胞におけるナノマテリアルの遺伝毒性機構に関する研究	< 28 >
川西 優喜	
4. ナノマテリアルにより誘発される酸化ストレスおよびジェネティックな 変化の解析	< 31 >
葛西 宏	
5. ナノマテリアルにより誘発されるジェネティックおよびエピジェネティックな 変化を含む細胞傷害に関する研究	< 34 >
渡邊 昌俊	
6. ナノマテリアルにより誘発される毒性および DNA 損傷に関する研究	< 37 >
増田 修一	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	< 40 >
IV. 研究成果の刊行物・別刷	< 45 >

総括研究報告書

ナノマテリアルにより誘発される遺伝毒性の解析

主任研究者 戸塚 ゆ加里 国立がん研究センター研究所 ユニット長

研究要旨 化粧品や商業用品等に用いられている種々のナノマテリアル【フラーレン (C60)、カオリン、マグネタイト、多層カーボンナノチューブ (MWCNT)、金属ナノマテリアル】の遺伝毒性について *in vivo* および *in vitro* 実験系を用いて検討した。マグネタイトをラットに気管内スプレーにより反復投与して慢性毒性試験を行い、その結果、肺の炎症反応・II型肺胞上皮の腫大・肉芽形成・細気管支/肺胞上皮の過形成などが認められ、最大無毒性量 (NOAEL) が雌雄とも 0.2 mg/kg 体重であった。マウスに産地の異なるカオリンを気管内投与し、コメットアッセイを用いて肺における DNA 損傷性を評価した。その結果、JP (韓国産) に比べ、MPSI (米国産) がより高い DNA 損傷性を示した。同一産地で粒子径の異なるカオリンに関しては、損傷性に大きな違いはみられなかった。C60、カオリン、マグネタイト、MWCNT をそれぞれマウスの気管内に投与すると、溶媒対照群と比較して、8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dG)、heptanone etheno-2'-deoxyadenosine (HedA) などの DNA 付加体量がマウスの肺でおよそ 1.5 - 9.0 倍に増加した。また、ナノマテリアル投与群の肺において、3-ニトロチロシンの発現が確認された。さらに、市販の金属ナノマテリアル CuO、Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>、Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、TiO<sub>2</sub>、Ag で、マウス小核の誘発ならびに酸化的 DNA 損傷の誘導がみられた。特に CuO が最も高い小核誘発性、酸化的 DNA 損傷誘導能を示した。ナノマテリアルの遺伝毒性における遺伝子発現の変化の関与について検討した結果、ある種のナノマテリアルではヒト細胞の種類により細胞傷害を与える程度に違いがあった。それには、抗酸化、修復にかかわる遺伝子発現の変化が影響するものと考えられた。チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO) の各種 DNA 修復系欠損株を用いて各種ナノマテリアル投与による増殖阻害試験を実施した結果、塩基除去修復と非相同末端結合欠損株は野性株に比べ MWCNT に感受性であったことから、MWCNT は細胞に塩基損傷や DNA 二重鎖切断を誘発することを示唆した。*In vivo* および *in vitro* 実験の結果から、ナノマテリアルにより遺伝子発現変化をとともなう酸化ストレスおよび炎症反応が惹起され、ROS などの内因性の活性種が DNA 損傷を生じることで遺伝毒性を誘発している可能性を示唆した。

分担研究者

戸塚ゆ加里 国立がん研究センター研究所  
発がんシステム研究分野  
ユニット長

中江 大 東京都健康安全研究センター  
環境保健部 部長

川西 優喜 大阪府立大学  
先端科学イノベーション  
センター 助教

葛西 宏 産業医科大学  
職業性腫瘍学 教授

渡邊 昌俊 横浜国立大学大学院  
工学研究院 教授

増田 修一 静岡県立大学  
食品栄養科学部 准教授

A. 研究目的

ナノマテリアルは、特有の物性を示すことから、様々な分野で広範な活用が見込まれる画期的な新素材として注目され、積極的に研究開発が進められている。一方で近年、粒径 100 nm 以下の超微粒子 (ナノマテリアル) の健康影響に注目が集まっているが、その安全性評価は十分

でなく、ナノマテリアルの生体への影響に関する研究は未だ十分な知見を得ていない。ナノマテリアルが国民の生活の利便性を飛躍的に向上させる可能性を秘めていることを考えれば、そのリスクを十分に把握し、その結果に基づいて適切に利用・管理することは、極めて重要である。本研究グループでは *in vivo* および *in vitro* の系を用い、ナノマテリアルの遺伝毒性について明らかとしてきた。これまでにナノマテリアルを気管内に投与したマウスの肺で、ナノマテリアルの蓄積と、炎症関連細胞の浸潤といった異物曝露に対する非特異的な局所の急性反応が組織学的観察から認められている。そのような傷害の結果、マウスの肺において分子レベルで起きている変化を解析したところ、ナノマテリアル投与群における DNA の酸化損傷、突然変異頻度の上昇が認められた。また、ヒト培養細胞のナノマテリアル処理により 8-oxo-dG の生成やアポトーシスが見出されている。

上記の結果を踏まえ、最終年度である本年度はまず、マグネタイトの慢性曝露における健康影響について検討した。カオリンについては、成分分析および電子顕微鏡による粒子状態の観察を実施した際、カオリン加工会社によって粒子径や表面構造が大きく異なることが見出された。そこで、カオリンが示す遺伝毒性に及ぼすそれらの影響を把握するために、産地や粒子径に基づいて分別したカオリンをマウス気管内に投与し、肺組織における DNA 損傷性を comet assay により検討した。また、マウスの肺において、ナノマテリアルによる酸化ストレスに起因する DNA 付加体の生成および炎症反応に由来するバイオマーカーの変化、そして金属ナノマテリアルによる小核ならびに酸化ストレスの誘導についても検討した。小核の誘発は、染色体異常の一つの指標として、8-oxo-dG は、酸化的 DNA 損傷の代表的なマーカーとして広く用いられており、がん代表される様々な疾病の発症に関わりが深いとされている。 *In vitro* でのナノマテリアルの毒性試験として、本年度は、従来の細胞毒性・遺伝毒性の評価に係る手法を用い

て、ナノマテリアル等の細胞毒性・遺伝毒性を評価し、異なる細胞株、異なるナノマテリアルの組み合わせによる遺伝毒性の誘導機構についてジェネティックおよびエピジェネティックな変化を解析した。さらに、CHO 細胞の各種 DNA 修復系欠損株を用いた増殖阻害試験を行うことで、ナノマテリアルが生成する DNA 損傷の種類を類推した。

## B. 研究方法

研究目的に基づき、本年度は以下の 6 項目について研究を行った。

### ①ラットにおけるマグネタイトの慢性毒性に関する研究：

本研究は、5.0 mg/kg 体重を最高用量とし、公比 5 で、0 (対照群)・0.2・1.0・5.0 mg/kg 体重の 4 群を設定し、雌雄各 80 匹 (各群 20 匹) の F344/DuCrjCrlj シラット (10 週齢) に、マグネタイトをスプレー投与器を用いて 4 週間毎に 1 回気管内投与し、52 週間 (1 年間、投与回数 13 回) 後に血液・血清生化学・尿性状・病理組織学的検索を実施した。

### ②ナノマテリアルにより誘発される毒性および DNA 損傷に関する研究：

産地あるいは粒子径の異なるカオリンをそれぞれ 0.05 及び 0.2 mg/mouse とするよう ICR マウス (7 週齢、雄) の気管内に投与した。投与 3 時間後に両肺を摘出し、得られた肺細胞懸濁液を用いて、comet assay を行った。解析ソフトとして Comet Assay IV を使い、1 スライドにつき 50 個以上の細胞を観察して tail intensity を求めた。また、各カオリンの二次粒子径の測定を行うとともに、SEM 画像解析により表面構造を観察した。

### ③ナノマテリアルにより誘発される DNA 損傷に関する研究：

被検物質 (C60、カオリン、マグネタイト、MWCNT) を 0.2 mg/body の用量で ICR マウス (n=5) に単回気管内投与を行い、3~168 時間後に屠殺解剖して肺を

抽出し、ナノマテリアル投与により誘発される DNA 付加体 (8-oxo-dG、HedG、HedA、HedC) の検出を LC-MS/MS を用いて行った。また、ナノマテリアルを投与されたマウスの肺において、3-ニトロチロシンに対する抗体を用いて、免疫組織化学染色を行った。

④ナノマテリアルにより誘発される酸化ストレスおよびジェネティックな変化の解析：

金属ナノマテリアルとしては、CuO、Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>、Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、TiO<sub>2</sub>、Ag を用いた。マウス小核試験は、ICR マウスに金属ナノマテリアルを腹腔内投与し、一定時間後に末梢血を尾静脈より採取した後、小核を観察した。また、尿中 8-oxo-dG ならびに臓器 DNA 中の 8-oxo-dG レベルを HPLC-ECD 法により測定した。

⑤ナノマテリアルにより誘発されるジェネティックおよびエピジェネティックな変化を含む細胞傷害に関する研究：

ヒト前立腺がん細胞株; DU-145、PC-3、LNCaP、ヒト肺がん細胞株 A549 に対して、マグネタイトを曝露し、曝露の 2 日後、RNA 抽出を行った。cDNA 合成を行い、RT-PCR で *GAPDH* の発現を確認し、Real-time PCR で *hOGG1*、*hMTH*、*SOD1*、*SOD2*、*catalase* の発現量を定量化した。また全体的なメチル化の状態を確認するために RAPD-PCR 解析を行った。

⑥ほ乳類培養細胞におけるナノマテリアルの遺伝毒性機構に関する研究：

CHO 野性株、ヌクレオチド除去修復 (NER) 欠損株、塩基除去修復 (BER) 欠損株、非相同末端結合 (NHEJ) 欠損株、相同組換え (HR) 欠損株を様々な濃度のナノマテリアル 4 種類 (MWCNTs、C60、カオリン、マグネタイト) に曝露した。6 時間後ナノマテリアルを除去し、増殖培地中で培養した。一定時間経過後、生細胞と死細胞を染め分ける蛍光試薬と細胞計数機を用いて生細胞数を計数した。

(倫理面への配慮)

本研究で行った動物実験にあたっては、国立がん研究センターを含む各施設における動物実験に関する指針に則って実施し、可能な限り実験動物の苦痛軽減処置を行った。また、ヒト由来試料を用いて研究する場合は、各研究者の所属施設の倫理委員会の承諾を得た。細胞株は公的細胞バンク由来で規定を遵守した。ナノマテリアルに対する曝露防止等のための予防的対応について (平成 21 年 4 月 21 日 文部科学省からの通知) に遵守した。環境への配慮などは施設内規定に則った。

## C. 研究結果

①ラットにおけるマグネタイトの慢性毒性に関する研究：

雌高用量群では、平均赤血球血色素濃度が減少した。雄低用量群の血糖・高用量群の血糖及び総ビリルビンは減少し、雄低用量群の塩素・高用量群のナトリウム及び塩素・雌低用量群のカルシウム・中用量群のナトリウム及び塩素・高用量群のナトリウムは増加した。雌雄高用量群では、肺の絶対重量及び体重 100g あたりの相対重量が増加した。雄低用量群では甲状腺/上皮小体の絶対重量及び相対重量が減少し、雌中用量群では甲状腺/上皮小体の絶対重量及び相対重量が増加した。雌雄中・高用量群の肺では被験物質と思われる黒色物質の沈着が認められ、雌雄高用量群の肺では軽度な腫大が認められた。中・高用量群の胸腺リンパ節では、軽度な腫大と灰黒色を呈する変化が認められた。肺においては、雌雄全投与群で、マグネタイトを食食した肺胞マクロファージの肺胞腔への浸潤が見られ、用量依存性に増加した。雌雄中用量以上群では、マクロファージの浸潤が間質においても認められた。また、雌雄全投与群において血管周囲、気管周囲あるいは間質への炎症細胞の浸潤が認められ、雄中・高用量群及び雌高用量群では、その発現頻度が増加した。雌雄中・高用量群では、肉芽形成、II 型肺胞上皮の腫大及び肺胞/細気管支上皮の過形成を認めた。これら肉芽形成及び肺胞上皮の変化は、

雌雄低用量群で認められず、雌雄高用量群で全例に認められた。

②ナノマテリアルにより誘発される毒性およびDNA損傷に関する研究：

各カオリンをマウス気管内に投与したところ、いずれも肺に対して用量依存的なDNA損傷を誘発した。産地の異なるMPSI（米国産）およびJP（韓国産）のDNA損傷性を比較したところ、JPに比べMPSIは2～3倍高いDNA損傷性を示した。また、同一産地で粒子径の異なるEH0.2（一次粒子径：0.2 μm）およびEH4.8（一次粒子径：4.8 μm）においてはDNA損傷性に顕著な差はみられなかった。一方、二次粒子径に関しては、いずれのカオリンも平均1300～1500 nmの凝集塊を形成しており、一次粒子径が異なるEH0.2及びEH4.8の間に顕著な差はみられなかった。しかしながら、SEM画像解析を行ったところ、MPSI、EH0.2及びEH4.8は細かい鱗片状粒子が集合した形状をしており、JPとは異なっていた。

③ナノマテリアルにより誘発されるDNA損傷に関する研究：

ナノマテリアル投与群のマウスの肺におけるDNA付加体量を測定したところ、すべてのナノマテリアル投与群において投与時間依存的に8-oxo-dGの増加が観察された。マグネタイト、MWCNT投与群では、コントロール群と比較して、HedG、HedA、HedCが顕著に増加していた。また、肺切片の免疫組織化学染色により、すべてのナノマテリアル投与群に共通して3-ニトロチロシンの発現が見出された。おもに被検物質周辺に染色が観察されたが、それ以外の細胞も陽性を示していた。

④ナノマテリアルにより誘発される酸化ストレスおよびジェネティックな変化の解析：

マウス小核試験において、CuO、Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>を投与したマウスの末梢血小核誘発頻度は、経時的、濃度依存的に増加し、CuO 3 mg投与では、48時間後にcontrolの約2.4倍となった。また、TiO<sub>2</sub>、Agにおい

ても投与48時間後に、controlより高い小核誘発頻度を示した。尿中8-oxo-dGは、CuO投与後24時間の尿で高い値を示した。肝臓DNA中の8-oxo-dGレベルもCuO投与群で高い値を示した。

⑤ナノマテリアルにより誘発されるジェネティックおよびエピジェネティックな変化を含む細胞傷害に関する研究：

ROS生成量に関して、DU-145、PC-3は濃度依存的に有意差を持ち増加し、LNCaP、A549は濃度依存的に増加するも有意差は認めなかった。特にROS生成が著高なDU-145では、*SOD1*、*SOD2*、*catalase*の発現が抑制された。8-OH-dGの生成は、DU-145およびPC-3でマグネタイト曝露1 μg/mlから有意に増加し、10 μg/ml以上において、LNCaP、A549と比較して、有意に増加を認めた。同様に修復酵素遺伝子では、DU-145では*hMTH*、A549では*hOGG1*遺伝子発現の抑制を認めた。メチル化について、RAPD-PCRを用いた解析では、細胞全体に特異的な変化は認めなかった。

⑥ほ乳類培養細胞におけるナノマテリアルの遺伝毒性機構に関する研究：

NHEJ欠損株、BER欠損株において20 μg/mL以上のMWCNTs処理で細胞の増殖が野性株に対して有意に(P<0.05)抑制された。なお、最高処理濃度(200 μg/mL)での増殖率は野性株が23%、NHEJ欠損株が7.3%、BER欠損株は8.1%であった(このときの野性株に対する有意差はいずれもP<0.01)。C60処理ではどの細胞株においても最高処理濃度(200 μg/mL)でも増殖抑制が認められなかった。カオリンとマグネタイトもC60と同様に細胞増殖阻害効果が弱く、本実験条件では野性株・DNA修復欠損株間での細胞増殖の違いは認められなかった。

## D. 考察

①ラットにおけるマグネタイトの慢性毒性に関する研究：

ミクロンサイズのマグネタイトの発がん性に関しては、これまでにSlesinski

らと Steinhoff らが陰性、Pott らが陽性の報告を行っており、未だ明らかにされていない。ナノサイズのマグネタイトを用いた本慢性毒性試験の雌雄中・高用量群のラットでは、肺胞/細気管支上皮の過形成が認められた。肺胞上皮過形成については、腫瘍への進展がない再生性か腺腫及び腺がんに進展する前がん性変化である原発性かの鑑別が重要となる。本試験の過形成は、異物への反応性炎症を伴っていたが、肺胞上皮の壊死を認めなかったため、その前がん性などについて、さらなる検索が必要である。

②ナノマテリアルにより誘発される毒性および DNA 損傷に関する研究：

産地の異なる MPSI と JP の DNA 損傷性を比較したところ、MPSI は有意な DNA 損傷性を示した。二次粒子径においては、MPSI (2.0 mg/mL) : 1488.3 ± 83.7 nm、JP (2.0 mg/mL) : 1390.1 ± 226.3 nm と大きな差はみられなかった。しかしながら、SEM 画像を比較したところ、MPSI は小さな鱗片が重なった形状をしており、生体内に侵入した際、JP に比べ小さな粒子になる可能性が示唆された。一方、同一産地で一時粒子径の異なる EH0.2 と EH4.8 の DNA 損傷性を比較したところ、有意な差は認められなかった。溶媒内での二次粒子径を測定したところ、一次粒子径では差が確認されたが、二次粒子径にはほとんど差がみられなかった。SEM 画像解析では、MPSI 同様、どちらも鱗片状の粒子が集合した形状をしており、二次粒子径よりも、細かな鱗片状の形状がカオリンの DNA 損傷性に寄与していることが示唆された。

③ナノマテリアルにより誘発される DNA 損傷に関する研究：

免疫組織化学染色により 3-ニトロクロシンの生成が見られたことから、G→A の突然変異は、炎症反応により生成された NO が DNA と反応して脱アミノ化を引き起こした結果生じたものと推察された。G→A の変異は、カオリン及びマグネタイトで有意に増加したスペクトルであったことから、これらナノマテリアルの遺伝

毒性に炎症反応の関与が強く疑われた。また、定量した DNA 付加体のうち 8-oxo-dG と HedC の突然変異スペクトルは G→T である。HedG、HedA の突然変異スペクトルは報告されていない。G→T はわずかに増加が認められた突然変異スペクトルであったことより、これら酸化ストレス由来の付加体の遺伝毒性への関与も示唆された。酸化ストレスや炎症反応は、ナノマテリアルを食したマクロファージや好中球により惹起された可能性が考えられた。ナノマテリアルによる遺伝毒性を減弱するためにも、DNA が損傷される分子メカニズムの更なる検討が必要である。

④ナノマテリアルにより誘発される酸化ストレスおよびジェネティックな変化の解析：

今回試験したナノマテリアルの中では、CuO が最も高い小核誘発性を示した。これは、以前に報告されている *in vitro* コメットアッセイの結果とも一致する。投与後 48 時間で最も高い小核の誘発が見られたことから、腹腔内投与したナノマテリアルの影響は、投与後比較的短時間の間に生じると考えられる。さらに肝臓 DNA 中の酸化ストレスマーカー 8-oxo-dG レベルは、投与 24 時間後においても高い値を維持した。CuO ナノマテリアルが肝臓に蓄積している可能性が考えられる。他の金属ナノマテリアル Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>、Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、TiO<sub>2</sub>、Ag は、投与 48 時間後の観察で末梢血小核の有意な増加が見られた。また、尿中の酸化ストレスマーカー 8-oxo-dG レベルの有意な増加が見られ、変異原性の発現に酸化的 DNA 損傷が関わっている可能性がある。

⑤ナノマテリアルにより誘発されるジェネティックおよびエピジェネティックな変化を含む細胞傷害に関する研究：

マグネタイトの曝露により、各種遺伝子発現の抗酸化酵素である SOD、catalase の発現の抑制に細胞差を認めた。マグネタイトの影響で抗酸化システムの機能が低下し、ROS の生成が増加したと考えられる。修復酵素遺伝子の *hOGG1*

は、マグネタイト曝露の影響による発現量の変化はなく、損傷除去酵素遺伝子 *hMTH* は、DU-145 への高濃度曝露で発現量の抑制を認めた。A549 では、高濃度曝露で *hOGG1* 遺伝子発現の抑制を認めた。これら遺伝子発現の抑制により ROS 生成量の増加、加えて *hOGG1* や *hMTH* の発現が誘導されないため、8-oxo-dG の生成が増加したと考えられる。前立腺がん細胞は正常前立腺細胞と比較して、抗酸化酵素遺伝子の発現欠如あるいは低下が報告されている。これらの事より、マグネタイト曝露による ROS 除去経路への影響が示唆される。

⑥ほ乳類培養細胞におけるナノマテリアルの遺伝毒性機構に関する研究：

MWCNT 処理により NHEJ 欠損株、BER 欠損株の増殖が野生株に対して低下した。XRCC7 を欠いた NHEJ 欠損株は DNA 二重鎖切断の、XRCC1 を欠いた BER 欠損株は酸化的 DNA 塩基損傷やアルキル基付加 DNA 塩基の修復が出来ない。従って MWCNT 処理は細胞に DNA 二重鎖切断および DNA 塩基損傷(酸化的塩基損傷など)を与えたことを示唆する。我々はこれまでの研究で、MWCNT が培養細胞に小核を誘導し、その小核誘導頻度が抗酸化剤(N-アセチルシステイン)の添加で減少することを見出している。このことは MWCNT が細胞に活性酸素種を産生することを示唆している。従って今回の MWCNT 処理が酸化的 DNA 塩基損傷を作るという結果と矛盾しない。MWCNT による DNA 二重鎖切断誘発のメカニズムは不明である。今後更なる研究が必要である。

## E. 結論

慢性試験では、雌雄の 5.0 mg/kg 体重群ラットで肺重量が増加し、雌雄の 1.0 mg/kg 体重群以上のラットでマグネタイトの肺への沈着を観察し、組織検索において、用量依存性の炎症反応、肉芽形成、II 型肺胞上皮の腫大及び肺胞/細気管支上皮の過形成が認められた。以上の結果から、本試験条件下におけるマグネタイト

の最大無毒性量 (NOAEL) は、雌雄とも 0.2 mg/kg 体重であるものと推察された。

ナノマテリアルの遺伝毒性について、近年は多くの研究報告がなされているが、同種のナノマテリアルで、産地や粒子径の違いと遺伝毒性の関連性を検討する研究はほとんど行われていない。そこでカオリンの産地毎の成分および材質の違いに着目し、マウス気管内に投与した際に肺で誘発される DNA 損傷性の差と各カオリンの粒子径や形状の関連について分析した。その結果、SEM 画像において鱗片状の粒子が集合した形状をもつカオリンが比較的強い DNA 損傷性を誘発することが明らかとなった。

各種ナノマテリアル投与マウスの肺において、溶媒対象群と比較して、DNA 付加体 8-oxo-dG、HedG、HedA、HedC が顕著に増加していた。また、ナノマテリアル投与群で 3-ニトロチロシンの発現が認められた。ナノマテリアル投与により酸化ストレス関連 DNA 付加体の生成量増加ならびに、炎症反応に関連するマーカーが検出されたことから、ナノマテリアルにより引き起こされたマウス肺の遺伝毒性は、酸化ストレスと炎症により誘発されたものと推察された。金属ナノマテリアルの多くで、マウス小核の誘発や酸化的 DNA 損傷の誘導がみられた。特に CuO が最も高い小核誘発性、酸化的 DNA 損傷誘導能を示した。小核の誘発は染色体異常と密接に関係しており、酸化的 DNA 損傷は発がんに関連することから注目される。酸化的 DNA 損傷誘導作用と小核誘発作用の関連について、今後検討が必要と思われる。

マグネタイト曝露時の前立腺がん細胞株、肺がん細胞株の抗酸化酵素及び修復遺伝子の発現は細胞により異なる事を認めた。マグネタイトは必ずしもフェントン反応のみだけではないが、ROS が産生され、酸化ストレスが生じ毒性が引き起こされる。特にマグネタイトが前立腺がん細胞株に ROS を産生させ、塩基除去修復能や抗酸化能を抑制させるために、前立腺がん細胞に特異的に細胞毒性や遺伝毒性を与えると推測された。マグネタイト自体の毒性評価に関しての論文は少な



く、比較的安全と考えられている。現在、毒性に関する論文が集積し始めている。細胞特異性を加味した評価が必要と考える。

各種 DNA 修復系欠損 CHO 株を用いて MWCNT、C60、カオリン、マグネタイトによる細胞増殖阻害試験を実施した。その結果、塩基除去修復と非相同末端結合欠損株は野性株に比べ MWCNT に感受性であり、MWCNT は細胞に DNA 塩基損傷や DNA 二重鎖切断を誘発することが示唆された。この結果は、我々がこれまで見出した、MWCNT が培養細胞に小核を誘導し、その小核誘導頻度が抗酸化剤の添加で減少することと矛盾しない。MWCNT が細胞に活性酸素種を産生することが示唆される。また現在のところ MWCNT による DNA 二重鎖切断誘発のメカニズムは不明であり、今後更なる研究が必要である。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 荒木里香、三崎盛治、町野由佳、中山茂穂、渡辺昌俊、渡辺典子、成瀬光栄. 長期経過中に多彩な合併症を呈した McCune-Albright syndrome の 1 例. ホルモンと臨床. 春季増刊号 58、192-197、2010.
- 2) 中江 大. ナノ材料の健康影響. 保健医療科学. 59、256-261、2010.
- 3) Murakami, Y., Imai, N., Miura, T., Sugimura, T., Wakabayashi, K., Totsuka, Y., Hada, N., Yokoyama, Y., Suzuki, H., Mitsunaga, K. Chemical confirmation of the structure of a mutagenic aminophenylnorharman, 9-(4'-aminophenyl)-9H-pyrido[3,4-b]indole: an authentic synthesis of 9-(4'-nitrophenyl)-9H-pyrido[3,4-b]indole as its relay compound. Heterocycles. 80, 455-462, 2010.
- 4) Teranishi, M., Toyooka, T., Ohura, T., Masuda, S., Ibuki, Y. Benzo[a]pyrene exposed to solar-simulated light inhibits apoptosis and augments carcinogenicity. Chem Biol Interact. 185, 4-11, 2010.
- 5) Watanabe, M. Editorial Comment on Article (Maspin expression in renal cell carcinoma and its correlation with clinicopathologic parameters). (Invited) Urology. 76, e1, 2010.
- 6) Shiizaki, K., Asai, S., Ebata, S., Kawanishi, M., Yagi, T. Establishment of yeast reporter assay systems to detect ligands of thyroid hormone receptors alpha and beta. Toxicol in Vitro. 24, 638-644, 2010.
- 7) Kawai, K., Li, Y.S., Song, M.F., Kasai, H. DNA methylation by dimethyl sulfoxide and methionine sulfoxide triggered by hydroxyl radical and implications for epigenetic modifications. Bioorg Med Chem Lett. 20, 260-265, 2010.
- 8) Kawai, K., Chou, P. H., Matsuda, T., Inoue, M., Aaltonen, K., Savela, K., Takahashi, Y., Nakamura, H., Kimura, T., Watanabe, T., Sawa, R., Dobashi, K., Li, Y., Kasai, H. DNA modifications by the  $\omega$ -3 lipid peroxidation-derived mutagen 4-oxo-2-hexenal *in vitro* and their analysis in mouse and human DNA. Chem Res Toxicol. 23, 630-636, 2010.
- 9) Chou, P. H., Kageyama, S., Matsuda, S., Kanemoto, K., Sasada, Y., Oka, M., Shinmura, K., Mori, H., Kawai, K., Kasai, H., Sugimura, H., Matsuda, T. Detection of lipid peroxidation-induced DNA adducts caused by 4-oxo-2(E)-nonenal and 4-oxo-2(E)-hexenal in human autopsy tissue. Chem Res Toxicol. 23, 1442-1448, 2010.
- 10) Yasuniwa, Y., Izumi, H., Wang, K. Y., Shimajiri, S., Sasaguri, Y., Kawai, K., Kasai, H., Shimada, T., Kashiwagi, E., Hirano, G., Kidani, A., Akiyama, M., Han, B., Ieiri, I., Higuchi, S., Kohno, K. Circadian disruption accelerates tumor growth and angiostromagenesis through a Wnt signaling pathway. PLoS

ONE. 5, e15330, 1-12, 2010.

- 11) Toyozumi, T., Sekiguchi, H., Takabayashi, F., Deguchi, Y., Masuda, S., Kinae, N.: Induction effect of coadministration of soybean isoflavones and sodium nitrite on DNA damage in mouse stomach. *Food Chem Toxicol.* 48, 2585-2591, 2010.
  - 12) Sekiguchi, H., Takabayashi, F., Deguchi, Y., Masuda, H., Toyozumi, T., Masuda, S. Kinae, N. Leaf extract of *Wasabia japonica* relieved oxidative stress induced by *Helicobacter pylori* infection and stress loading in *Mongolian gerbils*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 74, 1194-1199, 2010.
  - 13) Hori, A., Mizoue, T., Kasai, H., Kawai, K., Matsushita, Y., Nanri, A., Sato, M., Ohta, M. Body iron store as a predictor of oxidative DNA damage in healthy men and women. *Cancer Sci.* 101, 517-522, 2010.
  - 14) Koyama, N., Yasui, M., Oda, Y., Suzuki, S., Satoh, T., Suzuki, T., Matsuda, T., Masuda, S., Kinae, N. Honma, M. Genotoxicity of acrylamide in vitro: Acrylamide is not metabolically activated in standard in vitro systems. *Environ Mol Mutagen.* 2010. *In press.*
  - 15) 一町直樹、栗岡大輔、河井一明、葛西宏、松本幹治、渡邊昌俊. 各種ナノ粒子の細胞への影響: 細胞特異性とその応用. 粉体工学会誌. 48, 145-151, 2011.
  - 16) Wei, M., Wanibuchi, H., Nakae, D., Tsuda, H., Takahashi, S., Hirose, M., Totsuka, Y., Tatematsu, M., Fukushima, S. Low-dose carcinogenicity of 2-amino-3-methylimidazo [4, 5-f]quinoline in rats: Evidence for the existence of no-effect levels and a mechanism involving p21(Cip/WAF1). *Cancer Sci.* 102, 88-94, 2011.
  - 17) Totsuka, Y., Kato, T., Masuda, S., Ishino, K., Matsumoto, Y., Goto, S., Kawanishi, M., Yagi, T., Wakabayashi, K. *In vitro* and *in vivo* genotoxicity induced by fullerene (C60) and kaolin. *Genes Environ.* 33, 14-20, 2011.
  - 18) Kurioka, D., Takagi, A., Yoneda, M., Hirokawa, Y., Shiraiishi, T., Watanabe, M. Multicellular spheroid culture models: Applications in prostate cancer research and therapeutics. *J Cancer Sci Ther.* 3, 60-65, 2011.
  - 19) Kato, K., Yamamura, Y., Kawanishi, M., Yagi, T., Matsuda, T., Sugiyama, A., Uno, Y. Application of the DNA adductome approach to assess the DNA-damaging capability of *in vitro* micronucleus test-positive compounds. *Mutat Res.* 721, 21-26, 2011.
  - 20) Kami, D., Takeda, S., Hatsune, M., Toyoda, M., Itakura, Y., Gojo, S., Kyo, S., Umezawa, A. Watanabe, M. Efficient transfection method using deacylated polyethylenimine-coated magnetic nanoparticles. *J Artif Organs.* 2011. *In press.*
  - 21) Matsubara, S., Takasu, S., Tsukamoto, T., Mutoh, M., Masuda, S., Sugimura, T., Wakabayashi, K., Totsuka, Y. Induction of glandular stomach cancers in *Helicobacter pylori*-infected mongolian gerbils by 1-nitrosoindole-3-acetonitrile. *Int J Cancer.* 2011. *In press.*
2. 学会発表
  - 1) 戸塚ゆ加里. 微粒子により誘発される *in vitro* および *in vivo* 遺伝毒性 第99回日本病理学会総会、東京 (2010年4月)
  - 2) 戸塚ゆ加里. ナノ粒子による突然変異原性 第17回日本がん予防学会、札幌市 (2010年7月)
  - 3) 戸塚ゆ加里. ナノマテリアルにより誘発される遺伝毒性 第20回格子欠陥フォーラム、大阪 (2010年9月)
  - 4) Totsuka, Y., et al. Genotoxicity induced by nanoparticles. 第69回日本癌学会学術総会、大阪 (2010年9月)
  - 5) Kato, T., Totsuka, Y., et al. Increased formation of lipid peroxide (LPO)-derived DNA adducts in obese model mice. 第69回日本癌学会学術総会、大阪 (2010年9月)
  - 6) Yamamoto, M., Totsuka, Y., et al. Anti-cancer activity of DNA ADP-ribosylating protein using mesothelin promoter-mediated gene expression. 第69回日本癌学会学術総会、大阪 (2010年9月)

- 7) 松本陽子, 戸塚ゆ加里ら. ナノ粒子である多層カーボンナノチューブ(MWCNT)及びマグネタイト(MGT)により誘発される *in vivo* 遺伝毒性 第 39 回日本環境変異原学会、つくば (2010 年 11 月)
- 8) 石野孔祐, 戸塚ゆ加里ら. ナノマテリアルにより誘発される DNA 付加体の解析 第 39 回日本環境変異原学会、つくば (2010 年 11 月)
- 9) 越田英史, 戸塚ゆ加里. DNAADP-リボシル化蛋白質、ピエリシン-1 による変異原性と制がん性 第 39 回日本環境変異原学会、つくば (2010 年 11 月)
- 10) Totsuka, Y., Masuda, S., et al. Genotoxicity induced by nanoparticles.、2nd Asian Conference on Environmental Mutagens, Pattaya (2010 年 12 月)
- 11) 戸塚ゆ加里. ナノマテリアルにより誘発される遺伝毒性、レドックス・ライフイノベーション シンポジウム、東京 (2011 年 3 月)
- 12) 渡邊昌俊ら. 前立腺癌に対する磁性体ナノ粒子の併用化学療法の基礎的研究 第 99 回日本病理学会総会、東京 (2010 年 4 月)
- 13) 上大介, 渡邊昌俊ら. 磁性体ナノ粒子を用いた遺伝子導入法の開発・非ウイルス性の iPS 細胞作製を目指して 第 99 回日本病理学会総会、東京 (2010 年 4 月)
- 14) 一町直樹, 渡邊昌俊ら. ドセタキセルによる前立腺癌治療における磁性体ナノ粒子の効果 第 69 回日本癌学会学術総会 大阪 (2010 年 9 月)
- 15) 野口堯悟, 葛西宏, 戸塚ゆ加里, 渡邊昌俊ら. マクロ・ナノ粒子の A549 細胞への影響 第 69 回日本癌学会学術総会 大阪 (2010 年 9 月)
- 16) 渡邊昌俊ら. 炭素代謝に関わる遺伝子多型と前立腺癌のリスクについて 第 69 回日本癌学会学術総会、大阪 (2010 年 9 月)
- 17) 米田操, 渡邊昌俊ら. 前立腺がんスフェロイド形成にかかわる遺伝子の解析 第 69 回日本癌学会学術総会、大阪 (2010 年 9 月)
- 18) 一町直樹, 渡邊昌俊ら. 各種ナノ粒子の細胞への影響・細胞特異性とその応用 第 46 回夏期シンポジウム 粉体工学会、京都 (2010 年 8 月)
- 19) 渡邊昌俊ら. 前立腺癌における 1 炭素単位転移機構関連酵素遺伝子多型の解析 第 57 回日本臨床検査医学会学術集会、東京 (2010 年 9 月)
- 20) 武田祥吾, 渡邊昌俊. 磁性体ナノ粒子を用いた遺伝子導入法の開発とその展開 化学工学会第 42 回秋季大会、京都 (2010 年 9 月)
- 21) 一町直樹, 渡邊昌俊. 磁性体ナノ粒子を用いた前立腺癌治療法の開発 化学工学会第 42 回秋季大会、京都 (2010 年 9 月)
- 22) Kami, D., Watanabe, M., et al. Targeting gene delivery by magnetic force and magnetic nanoparticles. BIT's 1st Annual World Congress of Nanomedicine, Beijing, China (2010 年 10 月)
- 23) 中江 大. 多層カーボンナノチューブの発がんハザードを中心としたナノマテリアルの安全性評価 平成 22 年度日本環境変異原学会公開シンポジウム、東京 (2010 年 5 月)
- 24) 中江 大ら. 多層カーボンナノチューブの発がん性など、ナノ材料の安全性評価の試み 第 25 回発癌病理研究会、宮城 (2010 年 8 月)
- 25) 中江 大. ナノ材料の安全性評価について 第 17 回岐山毒性病理セミナー、岐阜市 (2010 年 10 月)
- 26) 多田幸恵, 中江 大ら. ナノ磁性粒子マグネタイトの気管内反復注入による Fischer 344 ラット肺への影響 第 27 回日本毒性病理学会学術集会、大阪市 (2011 年 1 月)
- 27) 川西優喜. DNA 変異から RNA へ～異常 RNA と RNA サーベイランス機構研究の最前線 日本環境変異原学会第 39 回大会、つくば (2010 年 11 月)
- 28) 加藤杏子, 川西優喜ら. CHL/IU 細胞を用いた *in vitro* 小核試験における DNA アダクトーム解析(第 2 報) 日本環境変異原学会第 39 回大会、つくば (2010 年 11 月)
- 29) 藤川芳宏, 川西優喜ら. ヒト細胞株における 3-ニトロベンズアントロン由来の DNA 付加体の TLS および変異解析 日本環境変異原学会第 39 回大会、つくば

(2010年11月)

- 30) 椎崎一宏、川西優喜ら. ベンゾ[a]ピレンの付加体形成における CYP1 ファミリー酵素の役割 日本環境変異原学会第 39 回大会、つくば (2010 年 11 月)
- 31) 山田りな、川西優喜ら. 核内受容体リガンドアッセイ酵母の樹立と河川水のアッセイ 日本環境変異原学会第 39 回大会、つくば (2010 年 11 月)
- 32) 大西佳奈、川西優喜ら. ミネラルコルチコイド受容体・プロゲステロン受容体発現酵母の樹立 日本環境変異原学会第 39 回大会、つくば (2010 年 11 月)
- 33) 小林沙衣、戸塚ゆ加里、川西優喜ら. メイラード反応生成物ベンゾアゼピノキノリノン誘導体の遺伝毒性評価 日本環境変異原学会第 39 回大会、つくば (2010 年 11 月)
- 34) Fujikawa, Y., Kawanishi, M., et al. Mutation spectra of translesion DNA synthesis produced by a polycyclic aromatic hydrocarbon DNA adducts in human cells 日本分子生物学会第 33 回大会、神戸 (2010 年 12 月)
- 35) 小林沙衣、川西優喜ら. メイラード反応生成物ベンゾアゼピノキノリノン誘導体の遺伝毒性評価 日本薬学会年会、静岡 (2011 年 3 月)
- 36) 河井 一明、葛西 宏ら. 金属ナノ粒子によるマウス末梢血小核誘発と酸化 DNA 損傷 平成22年度日本産業衛生学会九州地方会学会、北九州市 (2010年6月)
- 37) 宋 明芬、葛西 宏ら. 金属ナノ粒子のマウスにおける遺伝毒性と酸化ストレス誘導作用 第 69 回日本癌学会学術総会、大阪市 (2010 年 9 月)
- 38) Kawai, K., Kasai, H., et al. Effects of nanoparticles on urinary 8-OH-dG in rats. Nanotoxicology, イギリス (2010 年 6 月)
- 39) Kawai, K., Kasai, H., et al. Metal nanoparticle induced genotoxicity and oxidative stress in mice. 第 2 回アジア

環境変異原学会、タイ (2010 年 12 月)

- 40) 森上三穂、増田修一. メイラード反応生成物および日常食品の亜硝酸処理による変異原性の発現に関する研究 第 64 回日本栄養・食糧学会大会、徳島 (2010 年 5 月)
- 41) 董 蓓蓓、増田修一ら. 各種食品中のトランス脂肪酸及び脂肪酸エステル類の分析 第 100 回日本食品衛生学会学術講演会、熊本 (2010 年 9 月)
- 42) 加藤竜也、戸塚ゆ加里、増田修一ら. 肥満モデルマウスにおける酸化損傷に関する DNA 付加体生成の増加 日本環境変異原学会 第 39 回大会、つくば (2010 年 11 月)
- 43) 京谷恭弘、増田修一ら. *In vivo* コメットアッセイにおける手法および解析装置間差の検討 日本環境変異原学会 第 39 回大会、つくば (2010 年 11 月)
- 44) Kato, T., Masuda, S., et al. Evaluation of genotoxicity induced by nanoparticles in *in vitro* and *in vivo* systems. The 3rd International Conference on Health and Longevity Sciences, Shizuoka (2010年10月)
- 45) Kato, T., Masuda, S., et al. Increased formation of lipid peroxide (LPO)-derived DNA adducts in obese mice. 2nd Asian Conference on Environmental Mutagens, Pattaya (2010 年 12 月)

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  
出願番号 2011-16671 癌治療用組成物  
発明者 渡邊昌俊, 一町直樹, 博多俊行  
(平成 23 年 1 月 28 日)

分担研究報告書

ナノマテリアルにより誘発される遺伝毒性の解析

分担研究者 戸塚 ゆ加里 国立がん研究センター研究所 ユニット長

**研究要旨** 化粧品や商業用品等に頻繁に用いられている微粒子である、フラーレン、カオリン、マグネタイト、多層カーボンナノチューブ (MWCNT) を、マウスの気管内に投与し、LC-MS/MS を用いて 8-oxo-2'-deoxyguanosine, heptanone etheno-2'-deoxyadenosine などの DNA 付加体量を測定した。その結果、溶媒対照群と比較して、ナノマテリアル投与群でおよそ 1.5・9.0 倍に DNA 付加体量が増加した。また、ナノマテリアル投与群の肺において、3-ニトロチロシンの発現誘導が確認された。ナノマテリアルが誘発する突然変異スペクトルと、活性酸素種 (ROS) と NO により引き起こされる突然変異スペクトルが重なることから、ナノマテリアルの遺伝毒性が酸化ストレスおよび炎症により引き起こされている可能性が示唆された。

A. 研究目的

昨年度までに、化粧品や商業用品等に頻繁に用いられているナノマテリアルである、フラーレン、カオリン、マグネタイトおよび MWCNT を *gpt delta* マウスの気管内に投与したところ、それらナノマテリアルの肺に対する遺伝毒性が認められた。*gpt delta* マウスの肺に観察された突然変異スペクトルから酸化ストレスおよび炎症反応の関連が疑われた。

そこで本年は、ナノマテリアルが遺伝毒性を示す要因を検討するため、ナノマテリアルを投与した ICR マウスの肺を用いて、酸化ストレスに起因する DNA 付加体の生成と炎症反応に由来するバイオマーカーの変化について検討した。

B. 研究方法

被検物質（フラーレン、カオリン、マグネタイト、MWCNT）を 0.05% Tween 80 を含む生理食塩水に懸濁し、0.2 mg/body の用量で ICR マウスに単回気管内投与を行い、3、24、72、168 時間後に屠殺解剖して肺を摘出し、酸化ストレスに起因する DNA 付加体 (8-oxo-dG, HedG, HedA, HedC) の解析を LC-MS/MS を用いて行った。また、炎症反応のマーカーである 3-ニトロチロシンに対す

る抗体を用いて、免疫組織化学染色を行った。

（倫理面への配慮）

本研究で行った動物実験にあたっては、国立がん研究センターにおける動物実験に関する指針に則って実施し、可能な限り実験動物の苦痛軽減処置を行った。

C. 研究結果

ナノマテリアル投与マウスの肺における DNA 付加体量を測定したところ、すべてのナノマテリアル投与群において投与時間依存的に 8-oxo-dG の増加がみられた。またマグネタイト、MWCNT では、コントロール群と比較して、HedG、HedA、HedC が顕著に増加していた。

ナノマテリアル投与マウスの肺における 3-ニトロチロシンの発現を免疫組織化学染色法により観察したところ、投与群の肺において多数の陽性細胞が認められた。おもに、被検物質を食食したマクロファージが染色されていたが、それ以外の細胞も陽性を示していた。

D. 考察

今回、免疫組織化学染色により 3-ニトロチロシンの生成が見られた。このことから、G>A

の突然変異は、炎症反応により生成された NO が DNA と反応し脱アミノ化を引き起こした結果生じたものと推察された。G->A の変異は、カオリン及びマグネタイトで有意に増加したスペクトルであったことから、これらナノマテリアルの遺伝毒性に炎症反応の関与が強く疑われた。

LC-MS/MS を用いて定量した、酸化ストレスに由来する DNA 付加体 8-oxo-dG、HedG、HedA、HedC のナノマテリアル投与後からの時間依存的な増加が認められた。

今回定量した DNA 付加体のうち 8-oxo-dG と HedC の突然変異スペクトルは G->T である。HedG、HedA の突然変異スペクトルは報告されていない。G->T はわずかに増加が認められた突然変異スペクトルであったことより、これら酸化ストレス由来の付加体の関与も示唆された。

一方で、ナノマテリアルを食食したマクロファージや好中球により ROS が産生され、DNA を傷害した可能性も考えられる。ナノマテリアルによる遺伝毒性を減弱するためにも、DNA が損傷されるメカニズムの検討が望まれる。

## E. 結論

ナノマテリアル投与マウスの肺における DNA 付加体、8-oxo-dG、HedG、HedA、HedC が溶媒対象と比較して顕著に増加していた。フラーレン、カオリン、マグネタイトおよび MWCNT 投与マウスの肺における 3-ニトロチロシンの発現が認められた。ナノマテリアル投与群で酸化ストレス関連 DNA 付加体の生成量増加ならびに、炎症反応に由来するマーカーが検出されたことから、ナノマテリアルにより引き起こされたマウス肺の遺伝毒性の一部が酸化ストレスと炎症により誘発されることが示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Totsuka Y, Kato T, Masuda S, Ishino K, Matsumoto Y, Goto S, Kawanishi M, Yagi T, Wei, M., Wanibuchi, H., Nakae, D., Tsuda, H., Takahashi, S., Hirose, M., Totsuka, Y., Tatematsu, M.,

Fukushima, S. Low-dose carcinogenicity of 2-amino-3-methylimidazo [4,5-f] quinoline in rats: Evidence for the existence of no-effect levels and a mechanism involving p21(Cip/WAF1). *Cancer Sci.* 102, 88-94, 2011.

- 2) Totsuka Y, Kato T, Masuda S, Ishino K, Matsumoto Y, Goto S, Kawanishi M, Yagi T, Wakabayashi K. In vitro and in vivo genotoxicity induced by fullerene (C60) and kaolin. *Genes Environ.* 33, 14-20, 2011.
  - 3) Matsubara S, Takasu S, Tsukamoto T, Mutoh M, Masuda S, Sugimura T, Wakabayashi K, Totsuka Y. Induction of Glandular Stomach Cancers in Helicobacter pylori-infected Mongolian Gerbils by 1-Nitrosoindole-3-acetonitrile. *Int J Cancer.* 2011 in press.
  - 4) Murakami, Y., Imai, N., Miura, T., Sugimura, T., Wakabayashi, K., Totsuka, Y., Hada, N., Yokoyama, Y., Suzuki, H., Mitsunaga K. Chemical confirmation of the structure of a mutagenic aminophenylnorharman, 9-(4'-aminophenyl)-9H-pyrido[3,4-b]indole: an authentic synthesis of 9-(4'-nitrophenyl)-9H-pyrido[3,4-b]indole as its relay compound. *Heterocycles* 80, 455-462, 2010.
- ### 2. 学会発表
- 1) 戸塚ゆ加里. 微粒子により誘発される *in vitro* および *in vivo* 遺伝毒性 第 99 回日本病理学会総会、東京 (2010 年 4 月)
  - 2) 戸塚ゆ加里. ナノ粒子による突然変異原性 第 17 回日本がん予防学会、札幌市 (2010 年 7 月)
  - 3) 戸塚ゆ加里. ナノマテリアルにより誘発される遺伝毒性 第 20 回格子欠陥フォーラム、大阪 (2010 年 9 月)
  - 4) Totsuka, Y., et al. Genotoxicity induced by nanoparticles. 第 69 回日本癌学会学術総会、大阪 (2010 年 9 月)
  - 5) Kato, T., Totsuka, Y., et al. Increased formation of lipid peroxide (LPO)-derived DNA adducts in obese model mice. 第 69 回日本癌学会学術総会

- 、大阪 (2010年9月)
- 6) Noguchi, T., Totsuka, Y., et al. Cytotoxic effects of macro-nanoparticles on human lung cancer A549 cells. 第69回日本癌学会学術総会、大阪 (2010年9月)
  - 7) Yamamoto, M., Totsuka, Y., et al. Anti-cancer activity of DNA ADP-ribosylating protein using mesothelin promoter-mediated gene expression. 第69回日本癌学会学術総会、大阪 (2010年9月)
  - 8) 加藤竜也, 戸塚ゆ加里ら. 肥満モデルマウスにおける酸化損傷に関連する DNA 付加体生成の増加 第39回日本環境変異原学会、つくば (2010年11月)
  - 9) 小林沙衣, 戸塚ゆ加里ら. メイラード反応生成物アミノベンゾアゼピノキノリン誘導体の遺伝毒性評価 第39回日本環境変異原学会、つくば (2010年11月)
  - 10) 松本陽子, 戸塚ゆ加里ら. ナノ粒子である多層カーボンナノチューブ(MWCNT)及びマグネタイト(MGT)により誘発される in vivo 遺伝毒性 第39回日本環境変異原学会、つくば (2010年11月)
  - 11) 石野孔祐, 戸塚ゆ加里ら. ナノマテリアルにより誘発される DNA 付加体の解析 第39回日本環境変異原学会、つくば (2010年11月)
  - 12) 越田英史, 戸塚ゆ加里. DNAADP-リボソニル化蛋白質、ピエリシン-1による変異原性と制がん性 第39回日本環境変異原学会、つくば (2010年11月)
  - 13) Totsuka, Y., et al. Genotoxicity induced by nanoparticles., 2nd Asian Conference on Environmental Mutagens, Pattaya (2010年12月)
  - 14) 戸塚ゆ加里. ナノマテリアルにより誘発される遺伝毒性、レドックス・ライフイノベーション シンポジウム、東京 (2011年3月)
- G. 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

分担研究報告書

ナノマテリアルにより誘発される遺伝毒性の解析

分担研究者 中江 大 東京都健康安全研究センター 環境保健部長

**研究要旨** 本研究は、厚生労働科学研究費補助金「化学物質リスク研究事業（ナノマテリアルの遺伝毒性及び発がん性に関する研究）」の一環として、磁性ナノ粒子マグネタイトの慢性毒性の有無を検索する目的で実施した、ラットを用いた気管内スプレー反復投与による慢性毒性試験である。マグネタイトは、化学的に安定で比較的大きな磁性を有することから、磁気記録媒体、磁性流体あるいは磁性トナーなど、様々な用途に広く利用されている。また、現在は、医療やバイオテクノロジーの分野への応用展開が注目されている。しかしながら、マグネタイトについては、安全性に関する情報が限られており、早急に安全性評価を行うことが求められている。試験は、医薬品毒性試験法ガイドラインに準じて実施し、当センターの動物飼育施設内のナノ物質取扱いエリアにおいて、当センターのナノマテリアルの取扱いに関する作業規定及び試験管理マニュアルに従い実施した。

試験は、5.0 mg/kg 体重を最高用量とし、公比 5 で、0（対照群）・0.2・1.0・5.0 mg/kg 体重の 4 群を設定し、雌雄各 80 匹（各群 20 匹）の F344/DuCrI CrIj 系ラット（10 週齢）に、マグネタイトをスプレー投与器を用いて 4 週間毎に 1 回気管内投与し、52 週間（1 年間、投与回数 13 回）後に血液・血清生化学・尿性状・病理組織学的検索を実施した。その結果、血液・血清生化学・尿性状においては、マグネタイト投与による影響を認めなかった。病理学的検索では、雌雄の高濃度群で肺の重量に有意な増加を認めた。解剖時の肉眼観察では、雌雄の投与群ラットの肺にマグネタイトの広汎な沈着がみられ、高濃度群で肺の腫大が認められた。また、雌雄の投与群ラットのリンパ節は、灰色～淡黒色を呈し、マグネタイトのリンパ節への移行が示唆された。病理組織標本の観察においては、雌雄の全投与群ラットの肺で、マグネタイトを貪食した肺胞マクロファージの肺胞腔への浸潤が見られた。雌雄の 1.0 mg/kg 体重以上の群では、用量依存性の炎症反応、II 型肺胞上皮の腫大、肉芽形成及び細気管支/肺胞上皮の過形成などが認められた。肝臓、腎臓、心臓及び脳など呼吸器系以外の器官においては、マグネタイトの投与に伴った変化を認めなかった。

以上の結果より、本試験条件下におけるマグネタイトの最大無毒性量（NOAEL）は、雌雄とも 0.2 mg/kg 体重であると結論した。

#### A. 研究目的

ナノマテリアルは、特有の物性を示すことから、様々な分野で広範な活用が見込まれる画期的な新素材として注目され、積極的な研究開発が進められている。一方で近年、径 100 nm 以下の超微粒子（ナノマテリアル）の健康影響が注目されているが、その安全性の評価は十分でなく、ナノマテリアルの生体影響に関する研究は未だ十分な知見を得ていない。ナノマテリアルが人々の生活利便性を飛躍

的に向上させる可能性を秘めていることを考えれば、そのリスクを十分に評価し、その結果に基づいて適切に利用・管理することは、きわめて重要である。

磁性ナノ粒子マグネタイト（以下マグネタイトとする）は、化学的に安定で比較的大きな磁性を有することから、磁気記録媒体、磁性流体あるいは磁性トナーなど様々な用途に広く利用され、医療やバイオテクノロジーの分野への応用展開が注目されている 1)。現在日本においても、がんの温熱療法 2-4)あるいは



抗がん剤のキャリアー5)にマグネタイトの利用が検討されており、今後さらなる活用が予想される。しかしながら、マグネタイトについては、安全性に関する情報が限られており、早急に安全性評価を行うことが求められている。前年度の化学物質リスク研究事業において、我々は、マグネタイトの急性毒性の有無を検索する目的でラットを用いた気管内スプレー単回投与試験を実施し、結果を報告した。今年度は、マグネタイトの慢性毒性の有無を検索する目的で、ラットを用いた気管内スプレー反復投与試験を実施した。

## B. 研究方法

本研究における試験方法は、可能な限り医薬品毒性試験法ガイドライン(6, 7)に準じて行った。気管内投与方法に関しては、気道の毒性評価のための暴露技術としての気道内注入(8)を参照した。本試験は、当センターの動物飼育施設内のナノ物質取扱いエリアにおいて、当センターのナノマテリアルの取扱いに関する作業規定及び試験管理マニュアルに従い実施し、当センター環境保健部生体影響研究科において、多田幸恵主任研究員の主導下に科員の協力により実施された。

### 1. 被験物質

被験物質は、戸田工業株式会社(広島)より供与された磁性ナノ粒子マグネタイト (Lot.90828, pH10.5; Lot.100316, pH10.0)を用いた。被験物質は、エネルギー分散型 X線分光分析装置 (Energy Dispersive X-ray Spectrometer: EDS) で、鉄及び酸素を検出し、それ以外の不純物(元素)を検出しなかった。

前年度実施した投与試料調製法の検討結果から、投与試料には、マグネタイトスラリーを用い、高圧滅菌済超純水 (Milli-Q, 18.2 MΩ) で必要濃度に希釈後、0.2 M HCl (滅菌済超純水にて調製) にて pH 7.4-7.5 (ラットの組織液 pH) 9) に調整した。調製に用いた容器及びピペットチップは、何れも高圧滅菌済みの物を使用した。なお、調整後に試料を高圧滅菌しなかった理由は、マグネタイトの高温処理による酸化を避けたためである。

### 2. 動物及び飼育条件

動物は、F344/DuCrIj系ラットの雌雄のSPF動物各84匹を、日本チャールス・リバー株式会社(神奈川)より8週齢で入手し、2週間馴化飼育後、発育良好なラットを10週齢で試験に供した。各群の動物数は、雌雄各20匹とし、投与開始日の体重をもとに、体重別層化無作為抽出法により群分けを行った。馴化及び試験期間中、動物は、自動給水装置付きベルト式飼育棚のステンレス製懸垂式ケージに1匹ずつ収容し、基礎飼料(CE-2, 日本クレア株式会社, 東京)と細菌ろ過器を経由させた水道水を自由に摂取させ、バリアーシステム内の飼育室にて、室温  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ・湿度  $55 \pm 10\%$ ・換気回数毎時10回・1日12時間蛍光灯照明の条件下で飼育した。

### 3. 投与用量の設定及び気管内投与

試験群としては、前年度の急性試験の結果から、最高用量を5.0 mg/kg体重とし、公比5で0(対照群)・0.2・1.0 mg/kg体重の4群を設定した。以下では、それぞれの群を0 mg/kg体重(対照群:C群)・0.2 mg/kg体重(低濃度群:L群)・1.0 mg/kg体重(中濃度群:M群)・5.0 mg/kg体重(高濃度群:H群)とする。投与は、10週齢のFischer 344ラットに、エーテル麻酔下で、マグネタイト懸濁液を4週間毎に1回、1年間にわたり計13回、気管内液体噴霧装置 (IA-1B, Penn-Century, Inc., USA) を用いて、気管内スプレー投与した。投与容量は、1 mL/kg体重とした。最終投与終了後においては、4週間後に採血し、以下の検索を行った。

### 4. 検索項目

#### 【一般状態、体重、摂餌量】

全動物の一般状態は毎日観察し、体重及び摂餌量は試験開始後13週まで毎週1回、それ以降は4週間に1回測定した。

#### 【血液学的検索】

全動物は、採血前日の16時より絶食(給水は実施)させた後、解剖時にエーテル麻酔下に開腹し、腹部大動脈より採血して、血液学的及び血清生化学的検索を行った。血液学的検索は、抗凝固剤EDTA-2Kを入れた試験管に血液を採取し、多項目自動血球計数装置 (KX-21NV, シスメックス株式会社, 兵庫) に

て、赤血球数 (RBC)・白血球数 (WBC)・血色素量 (HGB)・ヘマトクリット値 (HCT)・平均赤血球容積 (MCV)・平均赤血球血色素量 (MCH)・平均赤血球血色素濃度 (MCHC)・血小板数 (PLT) を測定した。

#### 【血清生化学的検索】

血清生化学的検索は、血清を用い、自動分析装置 (TBA-120FR, 東芝メディカルシステムズ株式会社, 東京) にて、血清総蛋白濃度 (TP)・アルブミン濃度 (ALB)・アルブミン/グロブリン比 (A/G)・血糖 (GLU)・総コレステロール濃度 (T-CHO)・トリグリセリド濃度 (TG)・総ビリルビン濃度 (T-BIL)・アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ活性 (AST)・アラニンアミノトランスフェラーゼ活性 (ALT)・アルカリフォスファターゼ活性 (ALP)・尿素窒素濃度 (BUN)・クレアチニン濃度 (CRE)・尿酸濃度 (UA)・ナトリウム濃度 (Na)・カリウム濃度 (K)・クロール濃度 (Cl)・カルシウム濃度 (Ca) を測定した。

#### 【尿性状検索】

尿性状については、解剖前に、飼育室において、尿検査試験紙 (N・マルチスティックス, シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス株式会社, 東京) を用い、ウロビリノーゲン・ビリルビン・ケトン体・糖・潜血・蛋白・pH を判定した。

#### 【病理学的検索】

剖検においては、肉眼的な検索を行い、以下に示す組織・器官を採取し、下線を付したものについて重量を測定した後、10%中性緩衝ホルマリン液にて固定した。採取した組織・器官は、脳・下垂体・脊髄 (頸部)・坐骨神経・眼球・ハーダー腺・ジンバル腺・胸腔内大動脈・甲状腺/上皮小体 (固定後重量測定)・鼻腔・気管・肺・胸腺・心臓・脾臓・顎下腺/舌下腺・耳下腺・外涙腺・舌・食道・前胃/腺胃・十二指腸・小腸 (空腸/回腸)・大腸 (盲腸・結腸・直腸)・肝臓・膵臓・副腎・腎臓・膀胱・精巣・精巣上体・精囊/凝固腺・前立腺・包皮腺・卵巣・輸卵管・子宮・膣・陰核腺・皮膚・乳腺・リンパ節 (顎下部・胸腺リンパ節・腸間膜)・大腿筋・胸骨 (骨髄を含む)・横隔膜・大腿骨 (骨髄を含む)・頭蓋骨とそ

他の肉眼的異常部位とした。組織学的検索は、全動物について、採取した組織・器官の固定標本から組織片を切り出し、定法に従いパラフィン包埋し、薄切後にヘマトキシリン・エオジン染色、必要に応じ特殊染色を施して、光学顕微鏡下で観察した。

#### 5. 統計学的解析

体重・摂餌量・血液及び血清生化学的検索結果・器官重量の統計学的解析に当たっては、各群の分散を Bartlett の方法で検定し、等分散の場合に一元配置の分散分析により、不等分散の場合に Kruskal-Wallis の方法により、それぞれ検定を行った。群間に有意差が認められた場合の多重比較は、Dunnett の方法で有意差検定を行った。尿性状及び病理組織学的検索結果については、対照群との間で、Fisher の直接確立検定を行った (10)。統計処理ツールは StatLight (Yukms 株式会社, 東京) を用いた。

#### (倫理面への配慮)

本研究は、当センターの研究調整委員会及び動物実験委員会による事前審査を受け、そのモニター下に、実験動物の適切な扱いに関する国内外の法規・規則・ガイドライン等に準拠して行った。

#### C. 研究結果

##### 1. 一般状態, 体重

各群の生存匹数, 初期体重及び最終体重は、表 1 に示した。試験期間中には、雄において L 群に 3 例、雌において C 群に 3 例、L 群に 1 例、M 群に 2 例、H 群に 4 例、気管内投与時の深麻酔による死亡が認められた。また、餌の嚥下障害による死亡は、雄において M 群に 3 例、雌において C 群に 3 例、L 群に 2 例、M 群に 1 例、H 群に 4 例それぞれ認められた。初期体重及び最終体重は、雌雄とも対照群との比較で有意な差を認めなかった。試験期間中の平均体重の推移は図 1 に、平均摂餌量の推移は図 2 に示した。それらに関しては、雌雄とも対照群との比較で有意な差を認めなかった。

##### 2. 血液学的検索

血液学的検索結果は、表 2 に示した。雌の H

群では、MCHC が対照群と比較し有意に減少した。それ以外の測定項目においては、雌雄とも有意な差を認めなかった。

### 3. 血清生化学的検索

血清生化学的検索結果は、表 3 に示した。雄においては、L 群の GLU、H 群の GLU 及び T-BIL が対照群と比較し有意に減少した。また、雄においては L 群の Cl、H 群の Na 及び Cl、雌においては L 群の Ca、M 群の Na 及び Cl、H 群の Na が有意に増加した。それ以外の測定項目においては、雌雄とも有意な差を認めなかった。

### 4. 尿性状検索結果

尿性状検索結果は、表 4 に示した。雌雄の全投与群においては、対照群との比較で有意な差を認めなかった。

### 5. 病理学的検索

器官重量は、解剖時の体重と共に表 5 に示した。雌雄の H 群では、肺の絶対重量及び体重 100g あたりの相対重量に有意な増加がみられた。雄の L 群では甲状腺/上皮小体の絶対重量及び相対重量が対照群と比較し有意に減少し、雌の M 群では甲状腺/上皮小体の絶対重量及び相対重量が有意に増加した。

解剖時に行った肉眼的検索においては、雌雄の M 及び H 群の肺で被験物質と思われる黒色物質の沈着が認められ、雌雄の H 群の肺では軽度な腫大が認められた (図 3)。M 及び H 群の胸腺リンパ節では、軽度な腫大と灰黒色を呈する変化が認められた。それ以外の器官・組織においては、雌雄の全投与群で対照群との差を認めなかった。

組織学的検索結果は、表 6 に示した。肺においては、雌雄の投与群全例で、マグネタイトを貪食した肺胞マクロファージの肺胞腔への浸潤が見られ、用量依存性に増加した (図 4)。雌雄の 1.0 mg/kg 体重以上の群では、マクロファージの浸潤が間質においても認められた。また、雌雄の全投与群において血管周囲、気管周囲あるいは間質への炎症細胞の浸潤が認められ、雄の M 及び H 群、雌の H 群においては、その発現が有意に高かった。雌雄の M 及び H 群においては、肉芽形成 (図 5, H-a)、II 型肺胞上皮の腫大及び肺胞/細気管支上皮の過形成 (図 5, H-b) が認められた。

これら肉芽形成及び肺胞上皮の変化は、雌雄の L 群で認められず、雌雄とも H 群で全例に認められた。

雌雄の投与群ラットのリンパ節においては、HE 染色で黄褐色、鉄染色 (ベルリン青染色) で青色を呈する顆粒を貪食したマクロファージの浸潤が認められ、特に胸腺リンパ節において出現が顕著であった。同様の染色態度を呈する顆粒を貪食したマクロファージ浸潤は、雌雄の対照群ラットの胸腺リンパ節においても認められた。

肝臓、腎臓、心臓及び脳など呼吸器系以外の器官においては、マグネタイト投与に関連した変化が観察されず、自然発生病変の発生頻度においても投与による影響を認めなかった。

### D. 考察

以上のように、雌雄のラットにマグネタイトを 0・0.2・1.0・5.0 mg/kg 体重の用量で気管内反復投与した慢性毒性試験では、試験途中で、投与時の深麻酔による死亡及び餌の嚥下障害による死亡が対照群、投与群にそれぞれ認められた。気管内投与では気管分岐部での被験物質の噴霧を確実にを行うため麻酔時間を長めに処置したが、雌においてはそのことが呼吸低下による死亡を誘引した。また F344 ラットは喉頭の粘液腺の炎症あるいは咽頭における分泌粘液の減少により餌の嚥下障害を起こし易いが、本試験では咽頭から口腔内に餌を充満させて気道閉塞を起こし死亡するラットが 30 週齢以降、特に雌に多く認められた。このことについては、気管内投与法を用いたため、F344 ラットの嚥下障害が助長されたものと考えられる。

血液学的検索において、雌の H 群で MCHC の有意な減少が認められたが、この変化は、正常値の範囲内 (11) に留まる軽微なもので、用量相関性が明確でなく、血液塗抹標本において赤血球形態に異常が認められなかったことから、マグネタイト投与に関係する毒性影響としての生物学的有意性を持たないものと判断した。

血清生化学的検索において、投与群の雄で GLU 及び T-BIL の有意な減少がみられ、投与群の雌雄で Na、Cl 及び Ca の有意な増加が認められたが、これらの変化は、軽度で正常

値の範囲内 12)であり、用量相関性を示さず、相応する臓器重量の変動や明確な病理組織学的変化がないことから、マグネタイト投与に関連する毒性影響でないものと判断した。

それ以外の項目においては、雌雄の全投与群で有意な変化を認めなかった。

解剖時に行った肉眼観察においては、雌雄のM及びH群の胸腺リンパ節に軽度な腫大と灰色～淡黒色を呈する変化が認められ、マグネタイトのリンパ節への移行が示唆された。組織検索では、投与群ラットの胸腺リンパ節にHE染色で黄褐色、鉄染色で青色を呈する顆粒を貪食した多数のマクロファージの浸潤が認められたが、同様の染色態度を呈する顆粒を貪食したマクロファージが対照群ラットのリンパ節においても認められた。したがって、M及びH群の胸腺リンパ節で見られた顆粒は、マグネタイトばかりでなく、ヘモジデリンも混在するものと考えられた。

病理学的検索においては、雌雄のH群で肺重量の増加が認められ、肉眼観察で雌雄のM及びH群の肺に黒色物質の沈着及び腫大が認められた。組織検索では、雌雄の全投与群の肺で、マグネタイトを貪食したマクロファージの肺胞腔への浸潤が認められた。雌雄のM群以上のラットでは、マグネタイトを貪食したマクロファージの浸潤が肺胞腔に限らず間質においても認められ、炎症細胞の浸潤も有意に多く、さらに肉芽形成、II型肺胞上皮の腫大及び肺泡/細気管支上皮の過形成が認められた。慢性毒性試験における肺胞上皮の過形成は、前がん病変の可能性のある病変として注目され、壊死に引き続き発現する再生性の過形成であるか、原発性の(前がん性)過形成であるかの鑑別が重要となる。再生性の過形成は、通常、炎症や線維化等を伴い、腫瘍への進展がないとされる。一方、原発性の過形成は、腺腫及び腺がんに進展する前がん性変化であるとされている 13)。本試験の雌雄のH群ラットで認められた肺胞上皮の過形成は、炎症反応を伴っていたが、試験条件上避けられない異物への反応性変化であり、再生性過形成に先行して発現することが多い肺胞上皮の壊死を認めなかった。マグネタイトの発がん性に関して、Slesinskiらは、雌雄のWistar Hanラットに写真トナー(45-50%のマグネタイトを含有)を1日5時間、週5日

間で13週間あるいは104週間吸入させた結果、血管周囲及び気管周囲の炎症細胞浸潤、肺胞管の炎症、黒色色素を貪食したマクロファージの存在を観察したが、肺の腫瘍発生が増加しなかったと報告している 14)。また、Steinhoffらは、8週齢のSDラットにマグネタイト(平均直径 $0.5\mu\text{m}$ )を $10\text{-}40\text{ mg/kg}$ 体重の用量で2週間毎に約2年間投与し(総投与量 $1530\text{ mg/kg}$ 体重)、2年6ヵ月齢で病理検索した実験で、マグネタイトに発がん性が認められないと報告している 15)。一方、Pottらは、11週齢のWistarラットに、マグネタイトを $15\text{ mg}$ /ラットの用量で1週間毎に15回投与し(総投与量 $225\text{ mg}$ /ラット)、2年6ヵ月齢で病理検索し、69%のラットに肺の腫瘍が認められたと報告している 16)。これらの報告は相反する結果であり、マグネタイトの吸入あるいは気管内投与による発がん性は未だ明らかにされていない。したがって、本試験の雌雄のH群ラットで観察された肺胞上皮の過形成に関しては、その前がん性などについて、さらなる検索が必要であると思われる。

## E. 結論

本慢性試験では、雌雄の $5.0\text{ mg/kg}$ 体重群ラットで肺重量が増加し、雌雄の $1.0\text{ mg/kg}$ 体重群以上のラットでマグネタイトの肺への沈着を観察し、組織検索において、用量依存性の炎症反応、肉芽形成、II型肺胞上皮の腫大及び肺泡/細気管支上皮の過形成が認められた。以上の結果から、本試験条件下におけるマグネタイトの最大無毒性量(NOEL)は、雌雄とも $0.2\text{ mg/kg}$ 体重であると考えられる。

### (参考文献)

- 1) Hood E, 2004. Nanotechnology: Looking as we leap. *Environ Health Perspect* 112, A740-749.
- 2) Kikumori T, Kobayashi T, Sawaki M, Imai T, 2009. Anti-cancer effect of hyperthermia on breast cancer by magnetite nanoparticle-loaded anti-HER2 immunoliposomes. *Breast Cancer Res Treat* 113, 435-441.
- 3) Kawai N, Futakuchi M, Yoshida T, Ito