

- A, Sato S, Naiki T, Honda H, Shirai T, Kohri K, 2008. Effect of heat therapy using magnetic nanoparticles conjugated with cationic liposomes on prostate tumor in bone. *Prostate* 15, 784-792.
- 4) Jin H, Kang KA, 2007. Application of novel metal nanoparticles as optical/thermal agents in optical mammography and hyperthermic treatment for breast cancer. *Adv Exp Med Biol* 599, 45-52.
 - 5) Lin BL, Shen XD, Cui S, 2007. Application of nanosized Fe₃O₄ in anticancer drug carriers with target-orientation and sustained-release properties. *Biomed Mater* 2, 132-134.
 - 6) 単回及び反復投与毒性試験ガイドラインの改正について, http://www.pmda.go.jp/ich/s/s4_93_8_10.pdf
 - 7) 反復投与毒性試験に係るガイドラインの一部改正について, http://www.pmda.go.jp/ich/s/s4a_99_4_5.pdf
 - 8) Driscoll KE, Costa DL, Hatch G, Henderson R, Oberdorster G, Salem H, Schlesinger RB, 2000. Intratracheal instillation as an exposure technique for the evaluation of respiratory tract toxicity: uses and limitations. *Toxicol Sci* 55, 24-35.
 - 9) Ringler D, Dabich L, 1979. Hematology and clinical biochemistry. In: Baker HJ, Lindsey JR, Weisbroth SH (Eds), *The laboratory rat, 1. Biology and diseases*, Academic Press, New York, pp 105-121
 - 10) Gad SC, Weil CS, 1994. Statistics for toxicologist. In: Hayes AW (Ed), *Principles and methods of toxicology*, 3rd edn., Raven Press, New York, pp. 221-274.
 - 11) Mitruka BM, Rawnsley HM, 1981. Hematological reference values. In: *Clinical Biochemical and hematological reference values in normal experimental animals and normal humans*, Masson Publishing, New York, pp57-130.
 - 12) Mitruka BM, Rawnsley HM, 1981. Clinical biochemical reference values. In: *Clinical Biochemical and hematological reference values in normal experimental animals and normal humans*, Masson Publishing, New York, pp153-314.
 - 13) Boorman GA, Eustis SL, 1990. Lung. In: Boorman GA, Elwell MR, MacKenzie WF, Eustis SL, Montgomery C (Eds), *Pathology of the Fischer Rat*, Academic Press, San Diego, pp339-367.
 - 14) Slesinski RS, Turnbull D, 2008. Chronic inhalation exposure of rats for up to 104 weeks to a non-carbon-based magnetite photocopying toner. *Int J Toxicol* 27, 427-39.
 - 15) Steinhoff D, Mohr U, Hahnemann S, 1991. Carcinogenesis studies with iron oxides. *Exp Pathol* 43, 189-194.
 - 16) Pott F, Ziem U, Reiffer FJ, Huth F, Ernst H, Mohr U, 1987. Carcinogenicity studies on fibres, metal compounds, and some other dusts in rats. *Exp Pathol* 32, 129-152.
- F. 研究発表
1. 論文発表
 - 1) 中江 大. ナノ材料の健康影響. *保健医療科学* 59, 256-261, 2010.
 2. 学会発表
 - 1) 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 (2010 年 5 月, 東京都港区).
 - 2) 中江 大, 坂本義光, 齋藤育江, 前野智和, 多田幸恵, 大山謙一, 保坂三継, 小縣昭夫. 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 (2010 年 8 月, 宮城県宮城郡松島町).

- 3) 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 (2010 年 10 月, 岐阜県岐阜市).
- 4) 多田幸恵, 矢野範男, 高橋 博, 湯澤勝廣, 安藤 弘, 久保喜一, 長澤明道, 大山謙一, 小縣昭夫, 中江 大. 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 (2011 年 1 月, 大阪府, 大阪市).

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

表1. マグネタイトを気管内スプレー反復投与したF344ラットの初期体重及び最終体重

	マグネタイト投与用量 (mg/kg 体重)			
	0 (対照群)	0.2	1.0	5.0
雄				
試験匹数	20	20	20	20
初期体重 (g)	224.1±8.2 ^a	223.5±8.8	224.1±7.9	223.4±7.0
最終匹数	20	17	17	20
最終体重 (g)	383.3±20.3	372.1±20.1	370.0±29.4	374.9±23.0
雌				
試験匹数	20	20	20	20
初期体重 (g)	141.8±4.9	141.4±6.5	142.0±5.5	142.2±5.6
最終匹数	14	17	17	12
最終体重 (g)	203.2±17.8	210.9±19.4	205.2±19.2	202.6±22.1

^a数値は平均値±標準偏差

表2. マグネタイトを気管内スプレー反復投与したF344ラットの血液性状

	マグネタイト投与用量 (mg/kg 体重)			
	0 (対照群)	0.2	1.0	5.0
雄				
試験匹数	20	17	16	19
RBC (x10 ⁴ /μL)	907.3±29.0 ^a	907.2±18.4	900.5±30.2	923.0±21.5
WBC (x10 ² /μL)	32.8±7.3	30.0±7.0	30.0±6.7	37.1±10.7
HGB (g/dL)	15.2±0.4	15.2±0.4	15.2±0.2	15.4±0.4
HCT (%)	45.4±1.5	45.3±0.8	45.1±1.1	46.3±1.1
MCV (fL)	50.1±0.4	49.9±0.6	50.2±0.8	50.2±0.3
MCH (pg)	16.8±0.3	16.7±0.4	16.9±0.6	16.7±0.3
MCHC (g/dL)	33.5±0.6	33.5±0.8	33.6±0.7	33.3±0.6
PLT (x10 ⁴ /μL)	65.7±6.0	62.0±11.0	65.4±4.4	64.2±9.8
雌				
試験匹数	13	16	14	11
RBC (x10 ⁴ /μL)	843.1±27.5	840.8±20.4	848.7±27.6	859.3±17.5
WBC (x10 ² /μL)	21.7±6.1	23.1±6.6	18.1±3.5	21.8±5.4
HGB (g/dL)	15.5±0.4	15.6±0.4	15.6±0.5	15.5±0.2
HCT (%)	45.4±1.7	45.4±1.2	45.8±1.6	46.5±0.9
MCV (fL)	53.9±0.7	54.0±0.4	54.0±0.5	54.1±0.4
MCH (pg)	18.4±0.5	18.5±0.3	18.4±0.4	18.1±0.2
MCHC (g/dL)	34.1±0.8	34.3±0.6	34.0±0.6	33.4±0.3*
PLT (x10 ⁴ /μL)	62.3±4.3	63.0±4.2	59.7±8.0	60.3±8.7

^a数値は平均値±標準偏差, 対照群との比較で有意差あり (*P<0.05, Dunnet)

表3. マグネタイトを気管内スプレー反復投与したF344ラットの血清生化学的検索結果

	マグネタイト投与用量 (mg/kg 体重)			
	0 (対照群)	0.2	1.0	5.0
雄				
試験匹数	20	17	17	20
TP (g/dL)	6.99±0.25 ^a	6.98±0.13	6.96±0.20	7.01±0.31
ALB (g/dL)	4.19±0.09	4.18±0.07	4.18±0.10	4.20±0.14
A/G	1.51±0.09	1.50±0.05	1.51±0.05	1.50±0.06
GLU (mg/dL)	155.1±16.6	142.8±15.5*	144.9±15.5	139.1±13.2*
T-CHO (mg/dL)	79.4±8.0	81.7±19.3	79.1±15.3	72.8±16.3
TG (mg/dL)	56.4±13.3	56.8±13.3	47.5±13.6	50.0±24.1
T-BIL (mg/dL)	0.03±0.01	0.05±0.10	0.02±0.01	0.02±0.01*
AST (U/L)	278.0±81.2	254.7±96.5	252.7±81.3	248.0±73.0
ALT (U/L)	157.0±44.4	143.7±49.1	149.7±40.1	150.1±39.4
ALP (U/L)	416.8±55.6	417.6±67.5	400.2±41.9	406.4±40.8
BUN (mg/dL)	22.0±1.5	21.4±1.7	21.0±1.5	21.3±1.8
CRE (mg/dL)	0.34±0.03	0.33±0.03	0.33±0.03	0.32±0.04
UA (mg/dL)	1.56±0.30	1.49±0.28	1.35±0.29	1.44±0.27
Na (mmol/L)	140.8±1.1	141.3±1.9	141.7±1.7	143.0±1.6*
K (mmol/L)	5.51±0.60	5.68±0.53	5.20±0.82	5.31±0.63
Cl (mmol/L)	104.6±1.3	105.8±0.6*	105.4±0.8	106.8±1.0*
Ca (mg/dL)	10.1±0.2	10.1±0.2	10.1±0.2	9.66±2.21
雌				
試験匹数	13	16	14	12
TP (g/dL)	7.22±0.29	7.40±0.27	7.31±0.32	7.50±0.38
ALB (g/dL)	4.39±0.20	4.54±0.14	4.49±0.19	4.54±0.19
A/G	1.55±0.07	1.59±0.05	1.60±0.08	1.54±0.11
GLU (mg/dL)	124.8±21.2	118.5±10.6	112.4±13.2	118.6±12.1
T-CHO (mg/dL)	92.6±10.0	98.2±12.3	94.7±11.0	99.2±11.6
TG (mg/dL)	30.6±11.4	29.9±11.2	27.4±12.5	22.9±9.2
T-BIL (mg/dL)	0.04±0.02	0.04±0.02	0.03±0.02	0.04±0.02
AST (U/L)	138.5±36.8	125.4±32.2	127.1±33.6	146.5±49.6
ALT (U/L)	71.5±31.9	61.7±14.9	61.0±16.8	73.6±30.8
ALP (U/L)	209.0±35.6	200.9±30.8	194.0±28.7	207.9±30.1
BUN (mg/dL)	22.4±1.9	20.9±2.4	20.8±2.0	21.1±2.0
CRE (mg/dL)	0.32±0.02	0.31±0.02	0.31±0.03	0.31±0.03
UA (mg/dL)	1.46±0.52	1.30±0.35	1.21±0.36	1.26±0.22
Na (mmol/L)	141.4±1.8	142.6±2.0	144.7±1.7*	143.8±1.3*
K (mmol/L)	4.84±0.73	4.54±0.94	4.56±0.86	4.40±0.91
Cl (mmol/L)	105.8±1.7	106.2±2.1	108.2±2.8*	107.7±1.6
Ca (mg/dL)	10.2±0.3	10.5±0.3*	10.4±0.3	10.4±0.3

^a数値は平均値±標準偏差, 対照群との比較で有意差あり (*P<0.05, Dunnett)

表4. マグネタイトを気管内スプレー反復投与したF344ラットの尿性状

		マグネタイト投与用量 (mg/kg 体重)			
		0 (対照群)	0.2	1.0	5.0
雄					
試験匹数		18	17	16	20
ウロビリノーゲン	—	18 ^a	17	16	20
ビリルビン	—	18	17	16	20
ケトン体	—	18	17	16	20
糖	—	18	17	16	20
潜血	—	18	17	16	20
蛋白	—	0	0	0	0
	±	0	1	0	0
	+	2	5	3	10
	++	14	11	13	9
	+++	2	0	0	1
	陽性総数	18	17	16	20
pH	6.0	15	11	9	8
	6.5	3	6	7	11
	7.0	0	0	0	1
雌					
試験匹数		14	17	17	12
ウロビリノーゲン	—	14	17	17	12
ビリルビン	—	14	17	17	12
ケトン体	—	14	17	17	12
糖	—	14	17	17	12
潜血	—	14	17	17	12
蛋白	—	0	0	0	0
	±	7	4	10	7
	+	7	13	6	5
	++	0	0	1	0
	+++	0	0	0	0
	陽性総数	14	17	17	12
pH	6.0	9	13	9	9
	6.5	5	4	8	3

^a数値はラット数

表5. マグネタイトを気管内スプレー反復投与したF344ラットの最終体重及び器官重量

	マグネタイト投与用量 (mg/kg 体重)			
	0 (対照群)	0.2	1.0	5.0
雄				
試験匹数	20	17	17	20
解剖時体重 (g)	365.4±19.1 ^a	352.4±21.5	352.4±30.5	355.6±22.7
絶対重量 (mg)				
脳	2105.8±35.9	2116.8±31.9	2092.0±48.6	2106.2±43.0
甲状腺/上皮小体	21.0±3.5	17.7±2.5*	21.4±5.3	18.6±2.2
副腎	45.6±4.4	43.8±3.4	44.4±5.3	45.0±3.0
心臓	1002.8±56.8	989.1±63.6	989.0±52.2	1000.8±49.6
肺	1017.4±95.0	963.6±57.8	1015.3±60.7	1380.0±82.2*
脾臓	649.3±82.1	636.7±43.7	628.3±45.8	633.0±47.2
肝臓	8434.2±591.4	8342.5±590.3	8057.3±687.6	8127.4±641.9
腎臓	2268.4±109.2	2253.4±109.4	2270.0±141.4	2242.6±99.0
精巣	3033.3±261.7	2937.5±391.5	3121.6±171.5	3063.4±151.0
相対重量 (mg/100g 体重)				
脳	577.6±28.4	602.5±33.4	596.9±42.3	592.7±36.1
甲状腺/上皮小体	5.7±0.8	5.0±0.7*	6.1±1.7	5.2±0.6
副腎	12.5±1.1	12.4±1.0	12.7±2.0	12.7±1.0
心臓	274.6±11.4	281.0±14.5	281.8±17.5	280.9±15.0
肺	278.7±25.3	274.0±17.5	289.8±27.4	387.4±24.1*
脾臓	177.7±20.0	197.5±5.9	178.6±8.6	178.0±6.4
肝臓	2307.3±84.6	2370.6±161.8	2288.8±111.7	2285.9±107.2
腎臓	621.3±22.1	640.4±28.8	646.6±45.2	629.5±29.5
精巣	827.3±57.3	834.0±110.4	890.0±69.1	860.4±55.0
雌				
試験匹数	14	17	17	12
解剖時体重 (g)	191.0±18.5	197.7±20.1	192.5±20.0	195.4±21.4
絶対重量 (mg)				
脳	1931.7±38.1	1944.6±42.1	1918.0±32.3	1954.8±31.7
甲状腺/上皮小体	13.2±3.0	12.6±3.0	15.7±3.1*	13.1±1.9
副腎	56.0±2.3	59.0±4.9	56.0±4.8	56.2±9.7
心臓	645.3±51.4	680.4±70.7	658.5±48.7	675.7±51.3
肺	729.3±50.7	732.3±63.5	722.3±50.7	1086.2±102.8*
脾臓	438.9±70.8	439.3±56.0	414.2±29.2	432.2±33.2
肝臓	4545.4±421.9	4844.2±603.1	4527.6±449.9	4707.0±501.8
腎臓	1427.0±97.6	1464.6±121.6	1425.9±91.0	1459.9±85.9
卵巣	62.3±9.7	64.0±12.7	58.1±5.0	57.2±9.6
子宮	805.4±105.6	825.4±104.2	778.6±104.3	926.8±306.0
相対重量 (mg/100g 体重)				
脳	1019.7±96.5	991.6±85.3	1006.0±98.7	1010.5±99.7
甲状腺/上皮小体	6.9±1.2	6.4±1.4	8.2±1.6*	6.7±0.8
副腎	29.6±3.6	30.0±2.7	29.3±2.7	29.0±5.4
心臓	338.7±17.6	344.8±23.6	343.7±23.2	347.4±19.9
肺	385.1±45.1	372.5±36.7	378.3±40.5	559.0±51.9*
脾臓	231.0±38.5	222.2±16.3	216.4±17.0	222.1±12.5
肝臓	2383.1±118.1	2447.3±129.9	2355.5±112.1	2411.2±91.7
腎臓	750.0±44.1	743.6±47.8	746.7±73.1	751.6±48.4
卵巣	32.7±5.0	32.3±5.3	30.4±3.3	29.3±4.0
子宮	423.8±57.1	420.8±62.6	410.5±80.2	484.1±200.7

^a数値は平均値±標準偏差, 対照群との比較で有意差あり (*P<0.05, dunnett)

甲状腺/上皮小体は固定後の重量

表6. マグネタイトを気管内スプレー反復投与したF344ラットの組織学的検索結果

		マグネタイト投与用量 (mg/kg 体重)			
		0 (対照群)	0.2	1.0	5.0
雄					
観察匹数		20	17	17	19
肺	マグネタイトを貪食したマクロファージの浸潤	0 ^a	17*	17*	19*
	炎症細胞浸潤	0	2	7*	19*
	肉芽形成	0	0	6*	19*
	II型肺胞上皮腫大	0	0	17*	19*
	肺胞/細気管支上皮の過形成	3	0	3	19*
肝臓	細胞浸潤	20	17	17	20
	胆管増生	20	17	17	20
	肝細胞小壊死	6	3	2	5
腎臓	慢性腎症	5	3	1	3
	硬質沈着	2	1	2	3
雌					
観察匹数		14	17	17	12
肺	マグネタイトを貪食したマクロファージの浸潤	0	17*	17*	12*
	炎症細胞浸潤	1	4	5	12*
	肉芽形成	0	0	8*	12*
	II型肺胞上皮腫大	0	0	7*	12*
	肺胞/細気管支上皮の過形成	0	0	1	12*
肝臓	細胞浸潤	13	17	17	12
	胆管増生	7	12	10	8
	肝細胞小壊死	0	1	1	2
腎臓	慢性腎症	0	0	1	0
	硬質沈着	14	17	17	12

^a数値は所見を示したラット数

対照群との比較で有意差あり ($p < 0.05$, Fisherの直接確立検定)

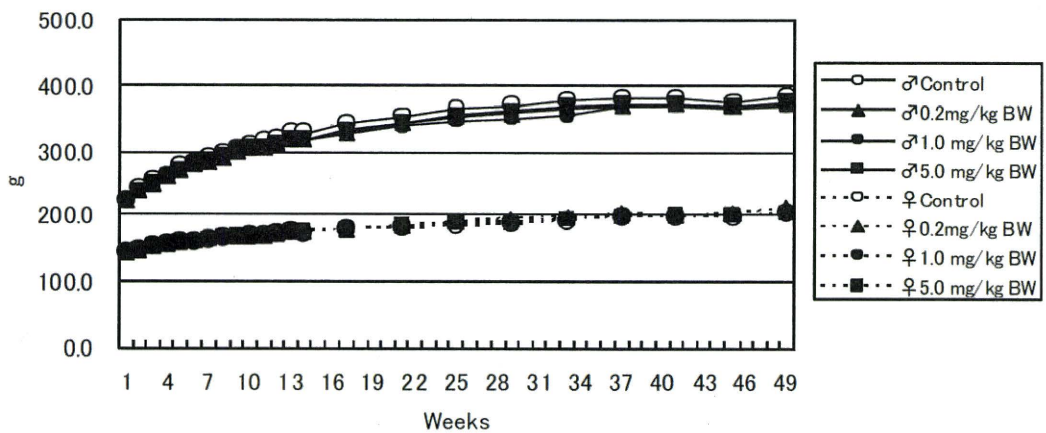


図1. マグネタイトを気管内スプレー反復投与したF344ラットの体重の推移

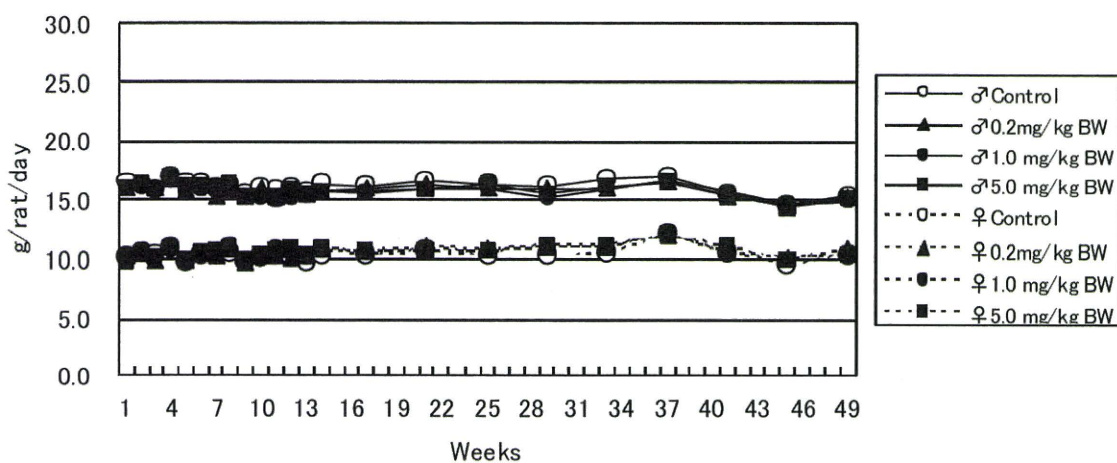


図2. マグネタイトを気管内スプレー反復投与したF344ラットの摂餌量の推移

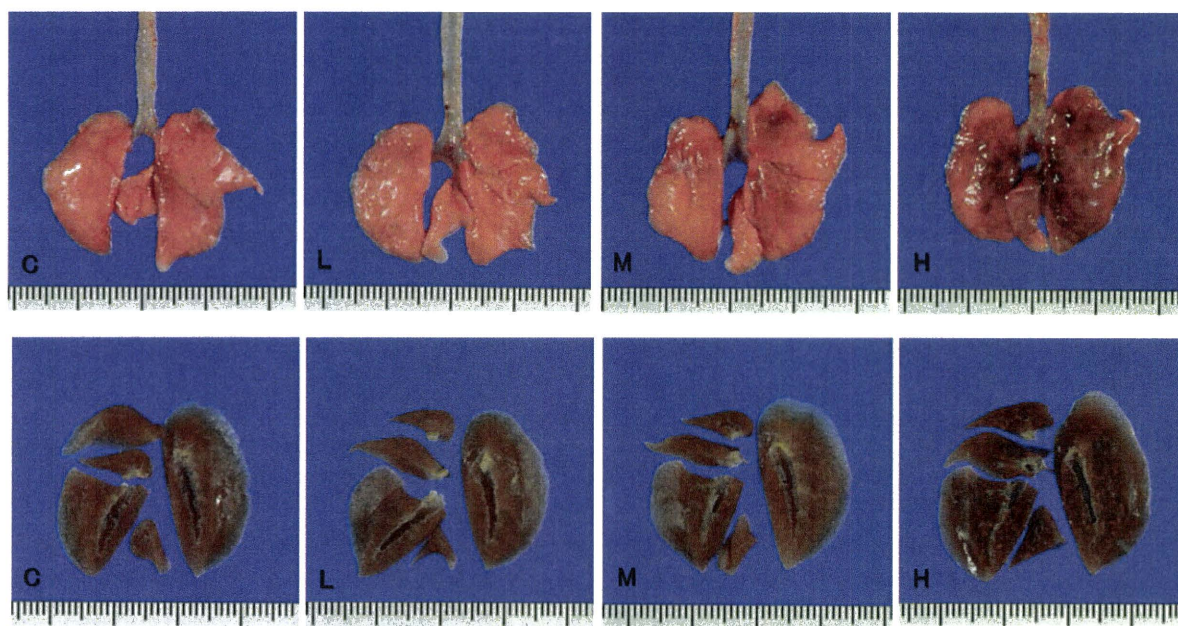


図3. マグネタイトを0(対照群:C), 0.2(低濃度群:L), 1.0(中濃度群:M)及び5.0(高濃度群:H)mg/kg 体重で気管内スプレー反復投与した F344 ラットの肺の肉眼像(上段)及びホルマリン固定後の切り出し像(下段)

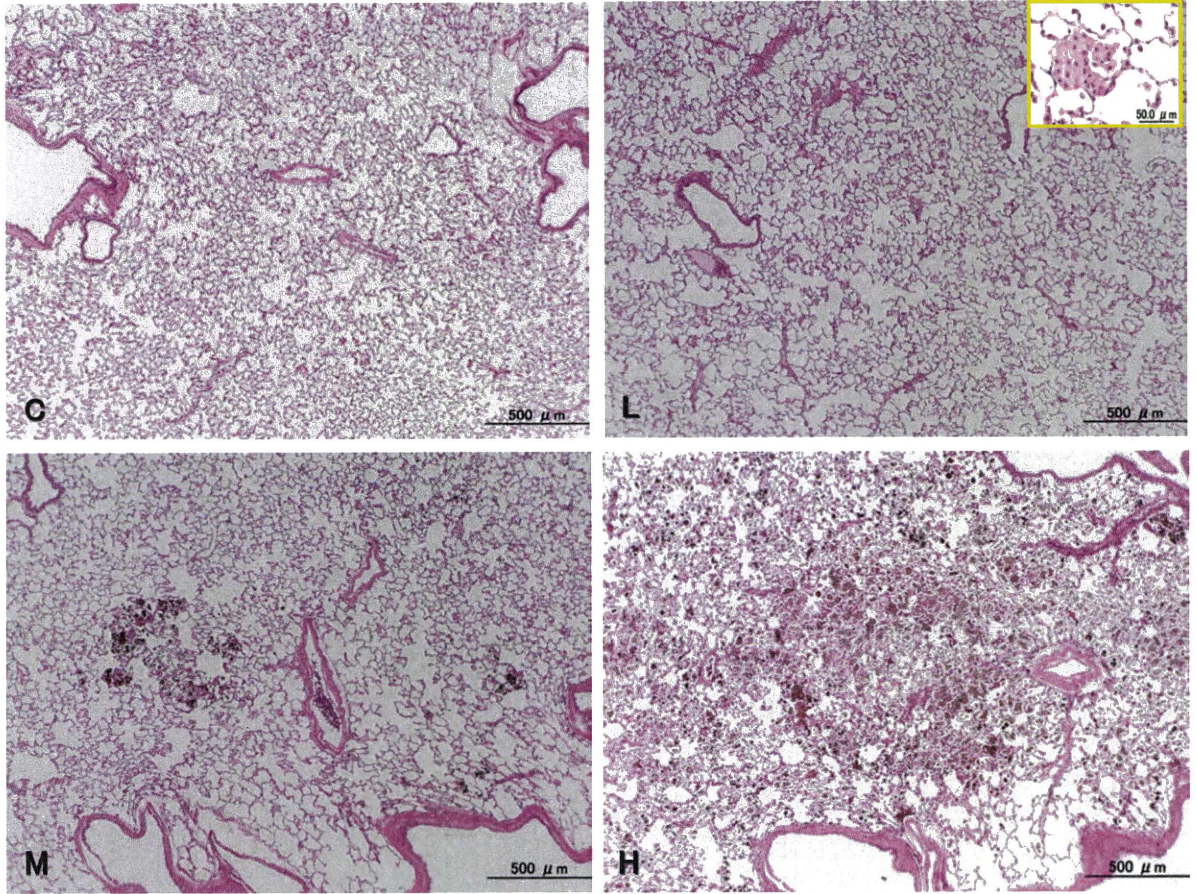


図4. マグネタイトを0(対照群:C), 0.2(低濃度群:L), 1.0(中濃度群:M)及び5.0(高濃度群:H)mg/kg 体重で気管内スプレー反復投与した F344 ラットの肺の組織像 (L 右上枠内: マグネタイトを貪食した大食細胞, HE 染色 x40).

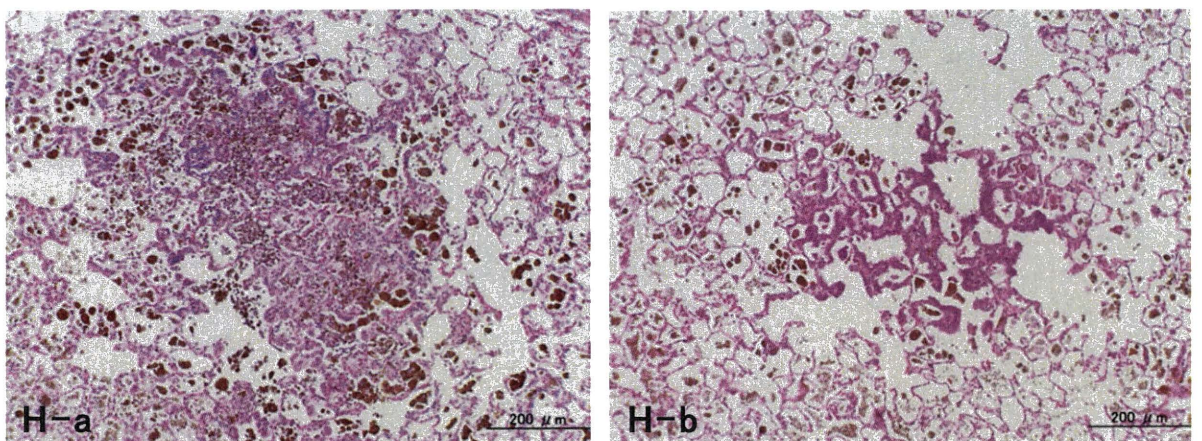


図5. マグネタイトを5.0(高濃度群:H)mg/kg 体重で気管内スプレー反復投与した F344 ラットの肺の組織像 (H-a: 肉芽腫性炎症, H-b: 肺胞上皮過形成, HE 染色 x100).

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 川西 優喜 大阪府立大学 助教

研究要旨 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多層カーボンナノチューブ(MWCNT)に感受性であり、MWCNT は細胞に塩基損傷や DNA 二重鎖切断を誘発することが示唆された。

A. 研究目的

CHO 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、ナノマテリアルが細胞中にどのような DNA 損傷を生じるのか調べた。構造の異なる多種類の DNA 損傷を修復するため、細胞には複数の DNA 修復系が存在する。ナノマテリアルが特定の DNA 損傷を作るならば、その損傷を修復できない株は野性株に比べ感受性が高くなるはずである。株間の感受性の差から、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

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(MWCNT, 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)

細胞株は公的細胞バンク由来で規定を遵守した。環境への配慮などは学内規定に則った。臨床試料の使用、インフォームドコンセントの必要な実験、病原性生

物実験などは該当しない。

C. 研究結果

NHEJ 欠損株、BER 欠損株において 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の MWCNT 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$)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 $\mu\text{g}/\text{mL}$)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

MWCNT 処理により NHEJ 欠損株、BER 欠損株の増殖が野性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。今後研究が必要である。

E. 結論

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. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shiizaki, K., Asai, S., Ebata, S., Kawanishi, M., and Yagi, T. Establishment of yeast reporter assay systems to detect ligands of thyroid hormone receptors alpha and beta. *Toxicology in Vitro*, 24(2): 638-644, 2010
- 2) Kato, K., Yamamura, Y., Kawanishi, M., Yagi, T., Matsuda, T., Sugiyama, A., and Uno, Y. Application of the DNA adductome approach to assess the DNA-damaging capability of in vitro micronucleus test-positive compounds. *Mutation Research*, 721: 21-26, 2011.
- 3) Totsuka, Y., Kato, T., Masuda, S., Ishino, K., Matsumoto, Y., Goto, S., Kawanishi, M., Yagi, T., and Wakabayashi, K. In Vitro and In Vivo

Genotoxicity Induced by Fullerene (C60) and Kaolin. *Genes and Environment*, 33(1): 14-20, 2011.

2. 学会発表

- 1) 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)
- 2) 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
- 3) 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)
- 4) 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)
- 5) 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)
- 6) 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)
- 7) 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、日本環境変異原学会第39回大会、つくば(2010年11月)
- 8) 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)
- 9) 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)

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 葛西 宏 産業医科大学 教授

研究要旨 ナノマテリアルおよびそれを含有する製品の利用が近年急速に拡大しており、ヒトへの健康影響が懸念されている。本研究では、金属ナノマテリアルの毒性試験の一つとしてマウス小核試験、ならびに酸化ストレスの誘導について尿中 8-OH-dG 及び臓器 DNA 中 8-OH-dG レベルの HPLC-ECD 法による定量を行った。金属ナノマテリアルとしては、二酸化チタン、銀、酸化第二銅、酸化第二鉄、四三酸化鉄を用いた。その結果、酸化第二銅、酸化第二鉄は、マウスの末梢血小核誘発頻度を、経時的、濃度依存的に増加した。また、酸化チタン、銀においても投与 48 時間後に、control より高い小核誘発頻度を示した。尿中 8-OH-dG は、酸化第二銅投与後 24 時間の尿で高い値を示した。肝臓 DNA 中の 8-OH-dG レベルも酸化第二銅投与群で高い値を示した。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。

A. 研究目的

近年のナノテクノロジーの発展に伴って、ナノマテリアルの利用が拡大している。特に金属酸化物のナノマテリアルは触媒や色素として用いられている他、銀については抗菌作用が注目され広く利用されている。労働現場や日常生活の中でナノマテリアルのヒトへの曝露が増加していると考えられ、健康影響が懸念されていることから、適確な毒性評価が望まれる。その毒性発現機構については、培養細胞を用いた研究などにより酸化ストレスが大きな要因と考えられている。本研究では金属酸化物と銀のナノマテリアルについて、その遺伝毒性と酸化的 DNA 損傷について *in vivo* の系で検討した。

B. 研究方法

金属ナノマテリアルは、市販の CuO、Fe₃O₄、Fe₂O₃、TiO₂、Ag を用いた。動物は、雌の ICR マウスを用い 7 週齢時にそれぞれの金属ナノマテリアルを腹腔内投与して影響をみた。小核試験は、金属ナノマテリアル投与後、経時的に尾静脈より採血し、アクリジンオレンジを塗布

したスライドガラス上で染色して蛍光顕微鏡を用いて末梢血網状赤血球の小核を観察した。CuO については、投与後の血中濃度変化を原子吸光法により測定した。さらに、肝臓、骨髄 DNA および代謝ケージを用いて採取した尿中の酸化ストレス損傷マーカー 8-ヒドロキシデオキシグアノシン(8-OH-dG)を HPLC-ECD 法により測定した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、産業医科大学動物倫理委員会の規定に従って行った。

C. 研究結果

マウス末梢血網状赤血球の小核はCuO、Fe₃O₄、Fe₂O₃ 投与後経時的に増加し、48 時間後に最も高い値となった(図1)。

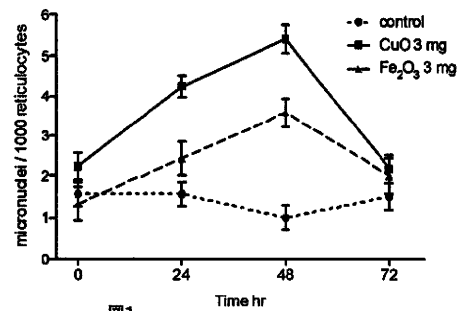


図1

また、1 mg より3 mgの方が多くの小核を誘発した(図2)。

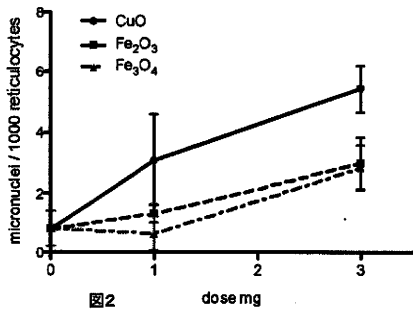


図2

さらに、投与48時間後の小核誘発頻度は、TiO₂、Ag投与においても高い値となった(図3)。

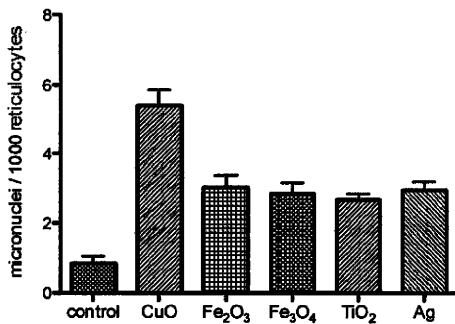


図3

CuO投与による血中Cu濃度は、投与1時間後に最大となり24時間後には、バックグラウンドレベルまで減少した。また尿中8-OH-dGレベルは、CuO投与によって

controlの約1.6倍に増加した。また、他の金属ナノマテリアルにおいても増加傾向がみられた(図4)。

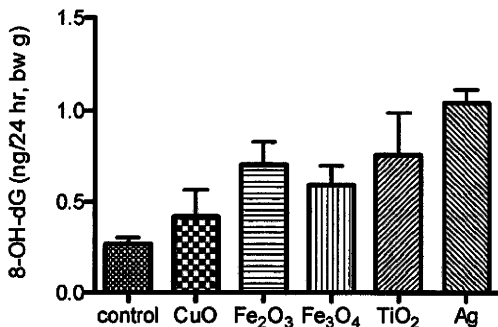


図4

DNA中の8-OH-dGレベルは、骨髄においてCuO投与後1時間でコントロール群に比べて有意な増加が見られ、投与24

時間後においても同様のレベルであった(図5)。

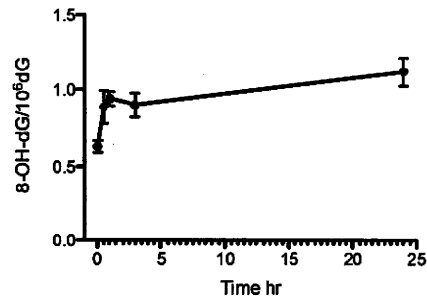


図5

肝臓では、CuO 3 mg投与によって8-OH-dGレベルがコントロールの5倍程度高くなった。これに対して他の金属ナノマテリアルは、8-OH-dGレベルを増加しなかった。

D. 考察

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* コットアッセイの結果とも一致する。小核試験の結果、ナノマテリアル投与後48時間で最も高い小核の誘発が見られた。この結果から、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。実際にCuO投与後の血中Cu濃度を測定したところ、投与後1時間で最も高くなった後速やかな減少が見られたことから、骨髄においても同様な濃度変化が起きていると思われる。これに対して肝臓DNA中の酸化ストレスマーカー8-OH-dGレベルの経時変化は、投与後初期において血中濃度のCu量の変化と同様に速やかな増加が見られた。しかし、24時間後には血中濃度が減少したにもかかわらず、8-OH-dGレベルは高い値を維持していた。肝臓に対しては、CuOナノマテリアルが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Fe₃O₄、Fe₂O₃、TiO₂、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、*in vivo*の試験系で変異原性を示すことが明らかとなった。また、尿中の酸化ストレスマーカー8-OH-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ことが示唆された。

E. 結論

市販の金属ナノマテリアルCuO、Fe₃O₄、Fe₂O₃、TiO₂、Agで、マウス小核の誘発や酸化的DNA損傷の誘導がみられ、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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kawai K, Chou PH, 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 ω -3 Lipid Peroxidation-Derived Mutagen 4-Oxo-2-hexenal *in Vitro* and Their Analysis in Mouse and Human DNA. *Chem. Res. Toxicol.*,23(3), 630-636 2010
- 2) Chou PH, 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(9) 1442-1448, 2010
- 3) Yasuniwa Y, Izumi H, Wang KY, 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 Angio/Stromagenesis through a Wnt Signaling Pathway., *PLoS ONE*, 5(12) e15330,1-12, 2010

2. 学会発表

- 1) 河井 一明・李 云善・宋 明芬・葛西宏：金属ナノ粒子によるマウス末梢血小核誘発と酸化的DNA損傷
- 2) 平成22年度 日本産業衛生学会九州地方会学会
- 3) 北九州市八幡東区 (2010年6月)
- 4) 宋 明芬・河井 一明・李 云善・葛西宏：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
- 5) 第69回日本癌学会学術総会、大阪市 (2010年9月)
- 6) Kawai K, Li Y, Kasai H, Morimoto Y, Myojo T, Ogami A, Oyabu T, Shimada M, Wang WN, Yamamoto K, Fujita K, Endoh S, Uchida K, Kobayashi N, Nakanishi J, Tanaka I. : Effects of nanoparticles on urinary 8-OH-dG in rats.
- 7) *Nanotoxicology 2010*, イギリス (2010年6月)
- 8) Kawai K, Li Y, Song M, Kasai H. : Metal nanoparticle induced genotoxicity and oxidative stress in mice.
- 9) 第2回アジア環境変異原学会、タイ (2010年12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 渡邊 昌俊 横浜国立大学大学院 教授

研究要旨 各種ナノマテリアル曝露の細胞への影響を *in vitro* 系で検討し、ある種のナノマテリアルはヒト細胞の種類により細胞傷害の程度が異なる事が認められた。それは、抗酸化、修復にかかわる遺伝子発現の変化の関与が考えられた。一方細胞全体的なエピジェネティックな変化は認められなかった。

A. 研究目的

本研究では、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細胞・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含めて明らかにする。

B. 研究方法

ヒト前立腺がん細胞株、ヒト肺がん細胞株に対して、マグネタイトを曝露し、曝露の2日後の *hOGG1*, *hMTH*, *SOD1*, *SOD2*, *catalase* 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。

（倫理面への配慮）

ナノマテリアルに対するばく露防止等のための予防的対応について（平成 21 年 4 月 21 日文科科学省からの通知）に遵守。

C. 研究結果

前立腺がん細胞、肺がん細胞において、ナノマテリアル（マグネタイト）曝露による抗酸化酵素、修復遺伝子の発現の抑制など発現の変化を認めた。しかし、メチル化は認めなかった。

D. 考察

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 μ g/ml から有意に増加し、10 μ g/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。

E. 結論

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

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Watanabe M.. Editorial Comment on Article (Maspin expression in renal cell carcinoma and its correlation with clinicopathologic parameters). (Invited) *Urology*, 76: e1, 2010.
 - 2) Kurioka D., Takagi A., Yoneda M., Hirokawa Y., Shiraishi T., and Watanabe M.. Multicellular spheroid culture models: Applications in prostate cancer research and therapeutic *Journal of Cancer Science and Therapy*, 3: 60-65, 2011.
 - 3) Kami D., Takeda S., Hatsune M., Toyoda M., Itakura Y., Gojo S., Kyo S., Umezawa A. and, Watanabe M.. Efficient transfection method using deacylated polyethylenimine coated magnetic nanoparticles. *J. Artif. Organs*, in press, 2011.
 - 4) 荒木里香, 三崎盛治, 町野由佳, 中山茂穂, 渡邊昌俊, 渡邊典子, 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).
 - 5) 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).
- ### 2. 学会発表
- 1) 渡邊昌俊, 上大介, 広川佳史, 白石泰三. 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 (2009年4月)
 - 2) 上大介, 梅澤明弘, 渡邊昌俊. 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 (2009年4月)
 - 3) 一町直樹, 野口堯悟, 米田操, 白石泰三, 渡邊昌俊. 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)

- 4) 野口堯悟, 一町直樹, 米田操, 河井一明, 葛西宏, 市瀬孝道, 戸塚ゆ加里, 渡邊昌俊. 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)
- 5) 渡邊昌俊, 広川佳史, 加藤貴彦, 鈴木啓悦, 市川智彦, 杉村芳樹, 白石泰三. 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)
- 6) 米田操, 渡邊昌俊, 高木陽光, 広川佳史, 白石泰三. 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)
- 7) 一町直樹, 野口堯悟, 渡邊昌俊, 松本幹治. 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)
- 8) 渡邊昌俊, 中野洋, 村田哲也, 白石泰三. 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)
- 9) 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)
- 10) 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)
- 11) Kami D, Takeda S, Makino H., Umezawa A, Watanabe M. Targeting gene delivery by magnetic force and magnetic nanoparticles. BIT's 1st Annual World Congress of Nanomedicine, Beijing, China, 2010.

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

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 増田 修一 静岡県立大学 准教授

研究要旨 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。また、各カオリンの電顕画像や二次粒子径と DNA 損傷性を比較した。

A. 研究目的

近年、ナノマテリアルは各種特徴的性質を持っていることから、様々な分野で製造・利用されている。一方、ナノマテリアルのヒトに対する健康影響、特に遺伝毒性や発がん性が現在、懸念されている。本研究では、ナノマテリアルの一種であるカオリンについて、産地や粒子径の差により遺伝毒性に違いがみられるか検討することを目的として、各カオリンをマウス気管内に投与し、肺組織における DNA 損傷性をコメットアッセイを用いて調べた。

B. 研究方法

各カオリンを 0.05 及び 0.2 mg/mouse となるように 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、コメットアッセイを行った。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。

（倫理面への配慮）

マウス等の実験動物を用いる場合、静岡県立大学動物実験センターの規定に基づいて実験を行った。実験計画書を作成し、目的、方法、その理由、苦痛の軽減方法等を記載して動物実験センターに提

出し、承認を得た。

C. 研究結果

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。

D. 考察

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。

E. 結論

近年、ナノマテリアルの遺伝毒性に関して多くの研究報告がされているが、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を比較した研究はほとんど行われていない。本研究では、ナノマテリアルの一種であるカオリンに着目し、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違いを比較した。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。今後、*in vitro* 試験において、カオリンの細胞内取込み量や粒子表面電位の違いを検討し、遺伝毒性を誘導するカオリンの特徴を明らかにするとともに、粒子表面を置換基で修飾するなど、遺伝毒性の低減化手法の開発を目指す。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Toyoizumi T, Sekiguchi H, Takabayashi F, Deguchi Y, Masuda S, Kinane N.: Induction effect of coadministration of soybean isoflavones and sodium nitrite on DNA damage in mouse stomach., *Food Chem. Toxicol.*, 48(10), 2585-2591 (2010).
- 2) Sekiguchi H, Takabayashi F, Deguchi Y, Masuda H, Toyoizumi T, Masuda S and Kinane N. : Leaf extract of *Wasabia japonica* relieved oxidative stress

induced by *Helicobacter pylori* infection and stress loading in Mongolian gerbils., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74(6), 1194-1199 (2010)

- 3) Koyama N, Yasui M, Oda Y, Suzuki S, Satoh T, Suzuki T, Matsuda T, Masuda S, Kinane N and Honma M.: Genotoxicity of acrylamide in vitro: Acrylamide is not metabolically activated in standard in vitro systems. *Environ. Mol. Mutagen.*, [Epub ahead of print] (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(1), 4-11 (2010)
 - 5) Yukari Totsuka, Tatsuya Kato, Shuichi Masuda, Kousuke Ishino, Yoko Matsumoto, Sumio Goto, Masanobu Kawanishi, Takashi Yagi and Keiji Wakabayashi, In vitro and in vivo genotoxicity induced by Fullerene (C60) and Kaolin, *Gene and Environment*, 33, 14-20 (2011)
2. 学会発表
- 1) 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21-23日
 - 2) 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14-15日
 - 3) 加藤竜也, 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16-17日
 - 4) 京谷恭弘, 増田修一ら: *In vivo* コメン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16-17日
 - 5) 松本陽子, 増田修一ら: 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