

3) *in vitro*発がん機序の検索法

F344 ラットに 6% チオグリコール酸を 0.5ml 肺内噴霧した後 24 時間後に屠殺し肺組織を採取して細かく刻んだ後濾過して 10% FBS 含有 RPMI 1640 に懸濁し、得られた細胞を 6cm のディッシュに播種し 37 度にて 2 時間培養した後、接着しない細胞を取り除き、肺組織から初代培養マクロファージを分離した。この初代培養マクロファージの培養液に最終濃度が 50ug/ml となるように MWCNT-M を加え、24 時間後に培養上清を回収した。このマクロファージの培養上清を、ヒト肺癌培養細胞株 A549 の培養液に加え 72 時間後に細胞数を計測して細胞増殖に対する影響を Cell Counting Kit-8 を用いて測定した。さらにヒト肺線維芽細胞 CCD34 を用いて、も同様に検索した。また、MWCNT-M を貪食したマクロファージから、RNA を抽出し、東レ 3D gene array を用いた microarray 解析を行った。

nZnO

1) 二段階発がんモデルを用いた肺発がんプロモーション作用/発がん性中期検索法

雌ヒトプロト型 c-Ha-ras 遺伝子トランスジェニックラットに DHPN を最初の 2 週間 0.2% の用量で飲水投与した。その 2 週後より nZnO を 250 および 500 μ g/ml の濃度で生理食塩水/0.05% Tween20 に懸濁し、0.5ml を 2 週に 1 回 16 週まで気管内噴霧投与した。肺および全身諸臓器を取り出し、パラホルムアルデヒドで 1 日固定し、病理学的に肺腫瘍性病変の発生頻度・個数の定量解析を行った。

2) 14 日間投与による肺発がん性/毒性発現機序の検索

MWCNT-M と同じ投与方法で、500ppm 検体を 2 日に 1 回計 8 回、肺内に 0.5ml 直接噴霧した。14 日に屠殺剖検し、肺を採取し病理組織学および電顕的に観察した。

3) *in vitro*発がん/毒性発現機序の検索法

MWCNT の場合と同様の方法でラットより初代培養マクロファージを分離し、この培養液に最終濃

度が 50 μ g/ml となるように nZnO を加え、24 時間後に培養上清を回収し、ヒト肺線維芽細胞 CCD34 の細胞増殖に対する影響を Cell Counting Kit-8 を用いて測定した。さらにヒト肺腺癌細胞 A549 およびヒト中皮腫細胞 (Mesol) の細胞増殖に対する影響も併せて検索した。また nZnO を貪食したマクロファージから RNA を抽出し、東レ 3D gene array を用いた microarray 解析を行った。

(倫理面への配慮)

動物の飼育は、名古屋市立大学医学部実験動物教育センターおよび DIMS 医科学研究所で実施された。実験計画書は、名古屋市立大学大学院医学研究科 実験動物教育センターでの動物の愛護と使用のガイドラインに則り、動物運営委員会の承認を経て行った (H22-M19)。DIMS 医科学研究所 (GLP 適合施設) の実験は当該企業の倫理規定に従ったものである。

C. 研究結果

MWCNT-M

1) 二段階発がんモデルを用いた肺発がんプロモーション作用/発がん性中期検索法

単位面積あたりの肺胞過形成および腫瘍 (腺腫と腺癌) の平均発生個数はそれぞれ、7.3 個および 1.6 個、MWCNT-M 125 μ g/ml 噴霧群ではそれぞれ 6.4 個および 1.9 個、250 μ g/ml 群ではそれぞれ 7.3 個および 2.0 個であり、有意な差は見られなかった。MWCNT-M 125 μ g/ml 群では縦隔リンパ節に 88%、250 μ g/ml 群では 100% の頻度で移行していた。DHPN を投与せず 250 μ g/ml 噴霧した群でも 95%、溶媒対照群ではどのリンパ節にも観察されなかった。

2) 9 日間投与による肺発がん機序の検索

肺にはリンパ球主体の軽度の炎症細胞浸潤巣と小型肉芽腫が散見された。肺野に誘導されたマクロファージの数は有意に増加し、その細胞質に貪食された MWCNT-M が観察できたが、肺胞上皮細胞内には見られなかった。電顕では、マクロファージの細胞質内に様々な長さの繊維状、毛玉状の

MWCNT-M が観察され、一部は細胞膜を貫いている像が見られた。肺組織から抽出した DNA を用いて 8-OHdG 値を測定したところ、MWCNT-M 群では対照群との有意差は見なかった。

3) *in vitro* 発がん機序の検索法

MWCNT-M を食食した初代培養マクロファージの培養上清のヒト肺がん細胞 (A549) およびヒト肺線維芽細胞 (CCD34) に対する細胞増殖促進作用を検索した。その結果、A549 の細胞増殖率は対照の 140% に増加したが、CCD34 の細胞増殖率は変化しなかった。この培養上清のマイクロアレイ解析では、ケモカインの CXCL5, CXCL11 および CCL7 の発現が上昇していることが判明した。

nZnO

1) 二段階発がんモデルを用いた肺発がんプロモーション/毒作用中期検索法

肺野の単位面積あたりの肺胞上皮過形成 (alveolar cell hyperplasia, ACH)、終末細気管支 上皮過形成 (terminal bronchiolar epithelium hyperplasia, TBEH) および腺腫 (adenoma, AD) における ACH, TBEH, AD, ACH+TBEH のそれぞれの平均発生個数は、単位面積あたりの肺胞上皮過形成 (alveolar cell hyperplasia, ACH)、終末細気管支上皮過形成 (terminal bronchiolar epithelium hyperplasia, TBEH)、腺腫 (adenoma, AD) および ACH+saline のそれぞれの病理組織標本上の発生個数/sqcm において、DHPN 単独群は、 2.43 ± 1.29 、0、0、 2.43 ± 1.29 DHPN+250ppm 群は、 1.64 ± 1.09 、 $0.86 \pm 0.86^*$ 、 0.12 ± 0.19 、 2.50 ± 1.22 DHPN+500ppm 群は、 1.83 ± 1.05 、 $4.93 \pm 1.95^*$ 、 $0.43 \pm 0.39^*$ 、 $6.77 \pm 2.82^*$ Saline+500ppm 群は、 0.58 ± 0.79 、 $3.91 \pm 1.29^*$ 、0、 $4.49 \pm 1.60^*$

(*は Student t-test, 2-tail で有意)

であり、DHPN+500ppm 群に有意のプロモーション作用、さらに Saline+500ppm 群 (DHPN 非投与) にも TBEH の有意の発生が見られた。

乳腺腫瘍の発生には影響は無かった。

nZnO 投与群では肺胞壁の線維化肥厚を伴う間質性肺炎が観察されたので Azan-Mallory 染色 (膠原線維を青く染出) を行った。イメージアナライザーによる線維化面積定量解析では、肺切片 1cm^2 あたり対照群の 1.7mm^2 に対し、 $250\mu\text{g/ml}$ 群で 5.6mm^2 、 $500\mu\text{g/ml}$ 群で 8.0mm^2 と有意に増加し、用量依存性に面積が増大した。DHPN を投与しない nZnO $500\mu\text{g/ml}$ 単独噴霧群でもほぼ同じ量の 7.6mm^2 の線維化が観察された。

2) 14日間投与による肺発がん/毒性発現機序の検索

肺胞内にはリンパ球主体の軽度の炎症細胞浸潤巣と多数の肺胞マクロファージが散見された。肺胞や肉芽組織におけるマクロファージの数は有意に増加し、そのなかには変性やアポトーシスに陥ったものも数多くみられた。マクロファージの細胞質内には食食物質と思われる直径 1μ 程度のやや明るい泡沫状の物質が充満していた。肺胞上皮には特記すべき変化はほとんど見られなかった。マクロファージの細胞質内の泡沫状の物質は電顕による X 線元素分析を行っても亜鉛元素は検出されなかった。

3) *in vitro* 発がん/毒性発現機序の検索法

nZnO を食食した初代培養肺胞マクロファージの培養上清によるヒト肺線維芽細胞 (CCD34)、ヒト肺がん細胞 (A549) およびヒト中皮腫細胞 (Mesol) に対する細胞増殖促進作用は、CCD34 は対照の 122% であったが、A549 および Mesol の細胞増殖率には変化しなかった。この培養上清中に含まれる線維芽細胞の増殖促進因子を同定する目的でマイクロアレイ解析では、Interleukin 6 (IL-6)、colony stimulating factor 3 (CSF3) および Insulin growth factor binding protein 5 (IGFB5) の発現が上昇していた。

D. 考察

MWCNT-M を p53 ノックアウトマウスおよび F344

ラットの腹腔内に投与すると、中皮腫が発生することが報告されている。p53 ノックアウトマウスは癌の好発系遺伝子改変動物であり、F344 ラットは陰嚢に中皮腫が自然発症することの多い系統で、いずれも中皮腫の感受性が高い系統ではあるが、MWCNT-M には中皮腫を発生する所見はアスベストと共通の現象である。

気管内に噴霧された MWCNT は、ほとんどがマクロファージに貪食されており肺胞上皮細胞内や肺胞には観察されなかった。従って、MWCNT の気管内噴霧による肺癌の発生機序に、TiO₂ の場合と同様に肺胞マクロファージが関与することが示唆された。しかしながら、TiO₂ は凝集塊としてマクロファージ内に見いだされたが、nZnO の場合は全く異なっていてマクロファージ内には泡沫上の淡明な小体が充満していて亜鉛の元素は見いだされなかった。イオン化して血中に流出したのか、タンパクと結合してマクロファージ外に出てしまったのかについてさらに検討する必要がある。

また、nZnO においては、明らかな肺発がんプロモーション作用のみならず、nZnO の 500ppm 投与のみで終末細気管支上皮の過形成性増殖が、炎症巣の中や隣接してみられたことは、炎症随伴病変か腫瘍発生に関連する病変かについて、長期実験で確認する必要がある。現在のところ、酸化亜鉛の発がん性データは得られていない。

肺胞マクロファージの初代培養上清にヒト肺線維芽細胞 (CCD34) の増殖活性が見いだされ、さらにアレイ解析にていくつかの成長因子が抽出されたことから、吸入曝露によって肺線維化を惹起することが明らかとなった。

今回の MWCNT-M の二段階発がんモデルではプロモーション作用では、明らかなプロモーション作用は検出されなかったが、MWCNT-M を貪食したマクロファージでは、IL-6、CSF3 および IGFB5 の発現が上昇していること、またその培養上清は、肺胞上皮由来のヒト肺癌細胞株 A549 の細胞増殖を促進することから、肺胞上皮細胞の増殖が促進される可能性が示唆された。MWCNT-M の肺発がん性

については現状において他の施設からもデータは出されていない。以上の結果より、二段階発がん性試験の結果とマクロファージを介した肺発がん機序の解析との違いについて、詳細に検討する必要がある。

E. 結論

本研究によって、以下のことが明らかとなった。

1) MWCNT-M の二段階発がんモデルを用いた肺発がんプロモーション作用中期検索法では、気管内噴霧による肺発がん促進作用は明らかではなかった。MWCNT-M が縦隔リンパ節へ移行することが観察された。9日間投与による肺発がん機序の検索では、MWCNT-M を貪食したマクロファージが IL-6、CSF3、IGFBP5 などのサイトカインを分泌し、肺胞上皮細胞の増殖を促進する可能性が示唆されたことから、二段階発がんモデルによる検証が必要である。

2) nZnO の肺発がんプロモーション作用/毒性中期検索法では、発がんプロモーション作用さらにこの系で単独で発がん性を示す作用示された。肺胞壁の炎症像と線維化が観察され、炎症の関与が推察される。14日間の *in vitro* 発がん/毒性発現機序の検索法では、nZnO を貪食したマクロファージが CXCL5、CXCL11 および CCL7 などのケモカインを分泌し、肺線維芽細胞の増殖を促進機序見いだされ、プロモーション作用との関連が示唆された。

以上から、二段階肺発がんプロモーション作用中期検索法では、吸入曝露による発がん性以外に線維化等の慢性毒性の検索とその機序の検索にも応用できる。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Xu, J., Sagawa, Y., Futakuchi, M., Fukamachi, K., Alexander, D. B., Furukawa,

F., Ikarashi, Y., Uchino, T., Nishimura, T., Morita, A., et al. (in press). Lack of promoting effect of titanium dioxide particles on ultraviolet B-initiated skin carcinogenesis in rats. Food Chem Toxicol. in press

2) Tsuda H. Risk assesment studies of nanomaterials in Japan and other countries. Asian Pacific J Cancer Prev; 10, DIMS 30th Anniverrrsary Supplement: 11-12, 2010

1. 学会発表

1) 深町勝巳, 二口充, 酒々井眞澄, 徐結苟, 津田洋幸. 単層および多層カーボンナノチューブの肺発がん短期リスク評価. 第27回日本毒性病理学会 2011年1月2)

2) 徐結苟, 佐川容子, 二口充, 深町勝巳, 五十嵐良, 西村哲治, 古川文夫, 内野正, 酒々井眞澄, 森田明理, 津田洋幸, アレキサンダーデイビット. ナノ二酸化チタン粒子の皮膚発がん性修飾作用の欠如—ラットとマウスを用いた検討. 第27回日本毒性病理学会 2011年1月

3) 二口充, 徐結苟, 深町勝巳, 酒々井眞澄, 津田洋幸. ナノサイズ酸化亜鉛の吸入曝露による間質性肺炎の発生. 第27回日本毒性病理学会 2011年1月

4) 津田洋幸, 徐結苟, 二口充, 深町勝巳, 飯郷正明. ナノマテリアルのリスク評価—アスベストから学ぶ—. 第99回日本病理学会総会 東京, 2010年4月

よる発がんリスクマーカーおよびその用途」

出願日:平成21年9月25日

出願番号:PCT/JP2009/004848

発明者 津田洋幸、二口 充、徐 結苟

特許出願人:津田洋幸

発明の名称:国内優先出願「ナノ粒子の吸入曝露による発がんリスクマーカーおよびその用途」

出願日:平成22年3月26日

出願番号:特願2010-58903

発明者 津田洋幸、二口 充、徐 結苟

特許出願人:公立大学法人名古屋市立大学

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得 (出願中)

発明の名称:ナノ粒子の吸入曝露による発がんリスクマーカーおよびその用途

出願日:平成21年3月24日

出願番号:特願2009-071951

発明者 津田洋幸、二口 充、徐 結苟

特許出願人:公立大学法人名古屋市立大学

発明の名称:PCT 出願「ナノ粒子の吸入曝露に

平成 22 年度厚生労働科学研究補助金（化学物質リスク研究事業）
「ナノマテリアルの健康影響評価手法の総合的開発および体内動態を含む基礎的
有害性情報の集積に関する研究」
分担研究報告書

ナノマテリアルの生体内動態解析と短期的スクリーニング評価手法の開発に関する研究

研究分担者	西村 哲治	国立医薬品食品衛生研究所	生活衛生化学部
研究協力者	小縣 昭夫	東京都健康安全研究センター	環境保健部
	坂本 義光	東京都健康安全研究センター	環境保健部
	前野 智和	東京都健康安全研究センター	環境保健部
	杉本 直樹	国立医薬品食品衛生研究所	生活衛生化学部
	久保田 領志	国立医薬品食品衛生研究所	生活衛生化学部
	小林 憲弘	国立医薬品食品衛生研究所	生活衛生化学部
	清水久美子	国立医薬品食品衛生研究所	生活衛生化学部

研究要旨

フラーレン C₆₀/リポソーム溶液を用いて反復尾静脈投与した結果、脳を含む 5 種の臓器において蓄積が確認され、有意な経時的減少傾向を示した。顕著な減少傾向が認められたのは腎臓および脳で、脳においては投与 7 日後、腎臓においては投与 14 日後に、投与 1 日後に比べ有意に低値を示し、その後、脳については定量下限値未満、腎臓については定量下限値付近まで減少した。一方、肺および肝臓については有意な減少傾向は認められるものの、その減少傾向は緩やかで、肺においては投与 14 日後、肝臓においては投与 28 日後で投与 1 日後の群に比べて有意に低値を示した。

多層カーボンナノチューブを投与後 3、7、14、28 日の肝臓、嗅球、脾臓、肺、脳、腎臓について観察したが、カーボンナノチューブは観察されなかった。

多層カーボンナノチューブの腹腔内投与によるラット中皮腫誘発性には、性状の差が本質的な影響を与えない可能性が示された。また、中皮腫は MWCNT-陰嚢群で 0.3mg 群から、MWCNT-腹腔群で 0.1mg 群から認められ、用量に伴って増加した。N-ERC/mesothelin レベルは、MWCNT-陰嚢腔および腹腔群、ともに 0.1 mg 群から用量に比例して増加し、また、中皮腫の発生とその進展に伴いさらに増加した。

A. 研究目的

ヒトにフラーレンやカーボンナノチューブが曝露した場合の、定性・定量分析法、体内動態、健康影響等についての情報は限られており、詳細な検討が求められている。

フラーレンについては、昨年度に報告した、対象臓器を凍結乾燥した後、全量を用いて抽出する手法を用いることにより、臓とがいまだ困難である。そこで、本年度も引き続き、多層カーボンナノチューブ

器当たりの定量下限値を下げるのが可能となった。そこで、これまでよりさらに高感度に定量分析することができる前処理の方法を適用し、ラットへ尾静脈注入したフラーレン C₆₀ の体内分布と臓器中濃度の経時的な変化の再検討を行った。

カーボンナノチューブについては、生体内に取り込まれた本数を正確に定量すること（MWCNT）の定量分析法の改善を進めた。また、健康に及ぼす影響を評価するため、実

験動物を用いて中皮腫誘発に関して検討を行った。

B. 研究方法

フラーレン C₆₀ の投与溶液は、以下の方法でリポソーム懸濁液として調製し、使用した。0.4mg/mL フォスファチジルコリン、0.4mg/mL フォスファチジルセリンおよび0.2mg/mL フォスファチジルグリセロールを含むクロロホルム脂質溶液 1mL をガラスチューブに移し、2.5mg/ml のフラーレン C₆₀ トルエン溶液を 0.4mL 加え、ボルテックスで十分に混和した。窒素ガスでクロロホルムを穏やかに揮発させ、脂質の薄膜を作製した。1mL の PBS(-) を加えボルテックスしてリポソーム懸濁液とした。日本エスエルシー (株) から購入し、3 日間の馴化期間を経た Wistar ラット雄 6 週齢にフラーレン C₆₀/リポソーム溶液を 5mL/kg 体重で 1 日 1 回、週 4 回毎日、尾静脈注入した。投与 1 日後、7 日後、14 日後、28 日後に、それぞれ 5 匹から肝臓、腎臓、脾臓、肺、脳、および血液を採取し、分析まで -80°C で保存した。臓器重量測定後、臓器全量を一晩、凍結乾燥した。乾燥した臓器重量を測定後、粉碎・均一化した。0.2M ドデシル硫酸ナトリウム 1mL、酢酸 1mL を順次添加し、ボルテックスで十分に混和した。これに、内部標準物質としてフラーレン C₇₀ トルエン溶液を 0.5mL およびトルエンを 3.5mL 添加し、遮光して 280rpm/分で、室温、5 時間振とう抽出した。3500rpm で 30 分間遠心し、トルエン層を 1mL 分取し測定溶液とした。乾燥臓器が 1g を超える臓器、例えば肝臓については、乾燥重量が 0.5g の相当倍量のドデシル硫酸ナトリウム、酢酸、トルエンを用いて抽出を行った。液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) を使い、大気圧化学イオン化法 (APCI) のネガティブイオンモードでフラーレン C₆₀ およびフラーレン C₇₀ を定量した。モニターするプレカーサイオン、プロダクトイオンは、C₆₀ ではともに m/z=720、C₇₀ ではともに m/z=840 動物臓器約 1g の溶解液は、これまで一部

で、C₆₀ の HPLC での分離は、C30 系逆相カラムの Deveosil RPFULLERENE で行い、移動相はトルエン：アセトニトリル=70%：30% のアイソクラティック法で、流速 1mL/min で行った。

C. 研究結果

1. フラーレン C₆₀ のラットへの尾静脈投与における体内分布

投与 1 日後、7 日後、14 日後、28 日後の全てのラットにおいて、フラーレン C₆₀ は肝臓、肺、脾臓、腎臓から検出された (Table 1)。また投与 1 日後と 7 日後のそれぞれ 5 個体の脳および、投与 14 日後の 1 個体の脳からも検出されたが、血液についてはすべての個体で定量下限値未満であった。各臓器における検出濃度は、投与 1 日後の個体では、肺で 254±114 μg/g wet wt. (平均値±SD;以下同様)、脾臓で 53.0±18.8 μg/g wet wt.、肝臓で 25.5±5.56 μg/g wet wt.、腎臓で 1.30±0.68 μg/g wet wt.、脳で 0.08±0.01 μg/g wet wt.、投与 7 日後の個体では、肺で 199±88.4 μg/g wet wt.、脾臓で 45.3±10.7 μg/g wet wt.、肝臓で 22.6±9.63 μg/g wet wt.、腎臓で 0.42±0.11 μg/g wet wt.、脳で 0.04±0.01 μg/g wet wt.、投与 14 日後の個体では、肺で 109±51.5 μg/g wet wt.、脾臓で 59.0±14.4 μg/g wet wt.、肝臓で 21.9±4.94 μg/g wet wt.、腎臓で 0.20±0.02 μg/g wet wt.、脳で 0.04 μg/g wet wt. (n=1)、投与 28 日後の個体では、肺で 133±47.5 μg/g wet wt.、脾臓で 70.6±32.0 μg/g wet wt.、肝臓で 14.8±3.00 μg/g wet wt. で、腎臓で 0.16±0.04 μg/g wet wt.、脳では 5 検体すべてで定量下限値未満 (<0.023 μg/g wet wt) であった。

2. 多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の生体内動態

2. 1 カーボンナノチューブ (CNT) 曝露動物臓器からの回収

のみを電子顕微鏡観察用に供していたが、

CNTを検出できる確度が低かった。そこで、CNT曝露動物臓器の溶解・回収に関する改善を行った結果、動物臓器約1gの溶解液全量を回収でき、検出確度が向上した。

2. 2 電子顕微鏡観察の変更

透過型電子顕微鏡(TEM)による観察では、観察視野が狭く見落としが多い、夾雑物による妨害、低操作性による効率の低下など、観察者への負担が大きかった。走査型電子顕微鏡(SEM)観察により、観察視野が広がり効率も向上した。加速電圧を変化させることによりCNT判別が可能となった。また、SEMにより透過画像を得られ、CNT判別に信頼性が付与された。

上記に改善した方法により、6種類の動物臓器(肝臓、嗅球、脾臓、肺、脳、腎臓)について、投与後3、7、14、28日の試料を各2個ずつ処理し、CNTの有無をSEMで観察したが、CNTは観察されなかった。

2. 3 日機装MWCNTでの中皮腫誘発作用の検討

MWCNT(三井社製)の陰嚢内および腹腔内投与によりラットに中皮腫が誘発されたことを報告したが、その他にp53欠損マウスに曝露した例を除いて、中皮腫が誘発された報告がない。その理由のひとつには、繊維サイズなどMWCNTの性状の影響が考えられている。今回、研究班から提供された日機装MWCNT(OECDスタンダード)について正常ラットでの中皮腫誘発性を調べた。その結果、三井社製および日機装社製ともに、程度の差はあるが、全例で腹腔内の腫瘍結節形成が認められ、ほとんどが出血性腹水の貯留を伴っていた。MWCNTの腹腔内投与によるラット中皮腫誘発性には、三井社製・日機装社製の性状の差が本質的な影響を与えない可能性が示された。

2. 4 ラットにおけるMWCNTによる中皮腫の誘発の用量相関性と血清

ERC/mesothelin レベルの増加

MWCNTによるラット中皮腫誘発における用量相関性と投与部位の影響および中皮細胞非腫瘍性増殖性病変から中皮腫への進展に伴う血清N-ERC/mesothelinレベルの変動について検討した。雄F344ラットに0.1、0.3、1.0mg/kg体重のMWCNTを、各12匹、陰嚢腔または腹腔内に単回投与し、中皮腫の発現の程度と血清ERC/mesothelinレベルの推移について調べた。中皮腫はMWCNT-陰嚢群で0.3mg群から、MWCNT-腹腔群で0.1mg群から認められ、用量に伴って増加した。N-ERC/mesothelinレベルは、MWCNT-陰嚢腔および腹腔群、ともに0.1mg群から用量に比例して増加し、また、中皮腫の発生とその進展に伴いさらに増加した。

2. 5 三井製MWCNTの正常ラット腹腔内および気管内投与におけるメソテリンの発現

正常ラットにMWCNT(三井社製)を1年間、1回/月、12回、経気管投与し、その間の腫瘍発生及びその後の経過について飼育観察を行っているが、現在まで腫瘍の発現は観察されていない。

D. 考察

尾静脈投与によるフラーレンC₆₀のラット臓器への分布は、すべて個体の肺、脾臓、肝臓、および腎臓から検出され、その濃度レベルは、投与28日後の腎臓の0.16±0.04 μg/g wet wt. から投与1日後の肺の254±114 μg/g wet wt. の範囲であった。最も高濃度で検出されたのは肺であり、次いで、脾臓、肝臓、腎臓の順であった。一方、脳については、投与1日後(0.08±0.01 μg/g wet wt) および7日後(0.04±0.01 μg/g wet wt.) では全ての個体から検出されていたが、投与14日後では1個体のみを検出、投与28日後ではすべての個体で検出下限値未満であった。また、血液については、すべての個

体で検出下限値未満であった。5種類の臓器において、それぞれの臓器中のフラレン C_{60} 濃度と臓器重量から C_{60} の負荷量を算出し比較した(図1)。5種の臓器において、最も高いフラレン C_{60} 負荷量を示したのは肝臓(47.3~63.6%)であり、5種類の臓器において、それぞれの臓器中のフラレン C_{60} 濃度と臓器重量から C_{60} の負荷量を算出し比較した(図1)。5種の臓器において、最も高いフラレン C_{60} 負荷量を示したのは肝臓(47.3~63.6%)であり、次いで、肺(29.0~47.5%)、脾臓(4.9~11.1%)、腎臓(0.1~0.4%)、脳(0~0.03%)の順であった。肝臓におけるフラレン C_{60} 濃度は肺や脾臓に比べて低濃度であるが、5種類の臓器合計重量中の肝臓重量の割合が67.0%と高割合であることから、フラレン C_{60} 負荷量が高値を示したものと考えられる。一方、脾臓や肺は5種の臓器合計重量における割合はそれぞれ3.2%と6.2%であるが、フラレン C_{60} 負荷量は脾臓が4.9~11.1%、肺が29.0~47.5%と高い割合を示した。これらの3臓器でフラレン C_{60} 負荷量の約100%を占めていることから、フラレン C_{60} は肺、脾臓、肝臓に蓄積することが示唆された。これらの臓器には毛細血管が高密度で分布しており、フラレン C_{60} の蓄積はこれら臓器におけるろ過による可能性も考えられる。

脾臓を除くすべての臓器において、経時的にフラレン C_{60} 濃度の減少傾向が認められた。腎臓と脳においては、フラレン C_{60} 濃度の急激な減少が認められた。腎臓においては、投与後3、7、14、28日の間において有意な差が認められた(Kruskal-Wallis test, $p=0.0007$)。投与1日後に比べ、投与14日後(Scheffe's test, $p=0.0396$)および投与28日後(Scheffe's test, $p=0.0024$)は有意に低値を示した。脳においては、投与7日後は投与1日後に比べ有意に低濃度であった(Student's t-test, $p=0.0002$)。さらに、

統計学上有意ではなかったが、投与14日後と28日後はそれぞれ投与7日後より低濃度であった。

一方、肺と肝臓については、フラレン C_{60} 濃度の減少傾向が腎臓や脳に比べて緩やかであった。肺については、投与後3、7、14、28日の間において有意な差が認められ(Kruskal-Wallis test, $p=0.0007$)、投与14日後の群は投与1日後の群に比べ有意に低値を示した(Mann-Whitney's U-test, $p=0.0163$)。また、肝臓についても投与後3、7、14、28日の間において有意な差が認められ(Kruskal-Wallis test, $p=0.0251$)、投与28日後の群は投与1日後の群に比べ有意に低値を示した(Scheffe's test, $p=0.0298$) (図2)。

以上の結果より、脾臓を除く臓器において、経時的な濃度の減少傾向が認められた。フラレン C_{60} の代謝排泄機構については明らかではないが、肝臓等で酸化・水酸化、抱合等の反応を受け、尿中等に排泄されるという可能性が示唆された。今後は、フラレン C_{60} の代謝物等の探索、代謝排泄経路についても調査する必要がある。

臓器中に蓄積したフラレン C_{60} が殆どの臓器において経時的に減少する傾向が認められ、代謝排泄機構の存在が考えられた。そこで、フラレン C_{60} の生体内代謝排泄機構の評価を目的に、フラレン C_{60} の生体内代謝物として存在する可能性がある水酸化フラレンについて、定量分析のための水酸化フラレンの合成を進めた。

E. 結論

フラレン C_{60} /リポソーム溶液を用いて反復尾静脈投与による体内分布の経時変化を評価した結果、脳を含む5種の臓器において蓄積が確認され、有意な経時的減少傾向を示した。顕著な減少傾向が認められたのは腎臓および脳で、脳においては投与7日後、腎臓においては投与14日後に、投与1日後に比べ有意に低値を示し、その

後、脳については定量下限値未満、腎臓については定量下限値付近まで減少した。一方、肺および肝臓については有意な減少傾向は認められるものの、その減少傾向は緩やかで、肺においては投与14日後、肝臓に

おいては投与28日後で投与1日後の群に比べて有意に低値を示した。これらのことから、C₆₀が肝臓等で酸化・水酸化、抱合等の代謝反応を受け、尿中等に排泄されるという可能性が示唆された。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

西村哲治(2010)ナノテクノロジーと環境リスク, 公衆衛生, 74(4), 305-308.

広瀬明彦, 高木篤也, 西村哲治, 津田洋幸, 坂本義光, 小縣昭夫, 中江大, 樋野興夫, 菅野純(2011)ナノマテリアルの慢性影響研究の重要性, YAKUGAKU ZASSHI, 131(2), 195-201.

2. 学会発表

五十嵐良明, 相場友里恵, 内野正, 西村哲治: 酸化チタンナノ粒子のラット皮膚透過性, 第37回日本トキシコロジー学会学術年会(2010.6.16-18)

山口敦美, 藤谷知子, 大橋則雄, 広瀬明彦, 西村哲治, 中江大, 小縣昭夫: 多層カーボンナノチューブの投与による炎症・免疫系への影響, 第37回日本トキシコロジー学会学術年会(2010.6.16-18)

Ikarashi, Y., Aiba, Y., Takita, Y., Uchino, T., Nishimura, T.: Tissue distribution and toxicity of titanium dioxide nanoparticles in rats after repeated dermal exposure, XII International Congress of Toxicology (2010.7)

Nishimura, T., Kubota, R., Shimizu, K., Tahara, M., Obama, T., Sugimoto, N.,

Knno, J., Hirose, A.: Tissue distribution of fullerene after injected into rat tail vein to mimic the absorption from the digestive tract. XII International Congress of Toxicology (2010.7)

坂本義光, 中江大, 佐藤かな子, 西村哲治, 広瀬明彦, 小縣昭夫: ラットにおける多層カーボンナノチューブ(MWCNT)による中皮腫の誘発の用量相関性と血清ERC/mesothelinレベルの増加, 第69回日本癌学会学術総会(2010.9.22)

Nishimura T. Kubota. Tahara M. Shimizu K. Obama T. Sugimoto N. Hirose A. Ikarashi Y.: Bio-distribution of the fullerenes intravenously administered, 2010 Annual Meeting of the Korea Society of Environmental Health and Toxicity (2010.11)

坂本義光, 中江大, 佐藤かな子, 西村哲治, 広瀬明彦, 大山謙一, 中江大: ラットにおける多層カーボンナノチューブ(MWCNT)による中皮腫の誘発の用量相関性と血清ERC/mesothelinレベルの増加, 第27回日本毒性病理学会学術集会(2011.1)

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. 実用新案特許
なし
3. その他
なし

Table 1. Concentrations of C₆₀ in five tissues and blood of Wistar rats

Group	Concentrations (mean±SD, µg/g wet wt.)					
	Lung	Spleen	Liver	Kidney	Brain	Blood
Day 1	254±114	53.0±18.8	25.5±5.56	1.30±0.68	0.08±0.01	<0.020
Day 7	199±88.4	45.3±10.7	22.6±9.63	0.42±0.11	0.04±0.01	<0.020
Day 14	109±51.5	59.0±14.4	21.9±4.94	0.20±0.02	0.04 (n=1)	<0.020
Day 28	133±47.5	70.6±32.0	14.8±3.00	0.16±0.04	<0.023	<0.020

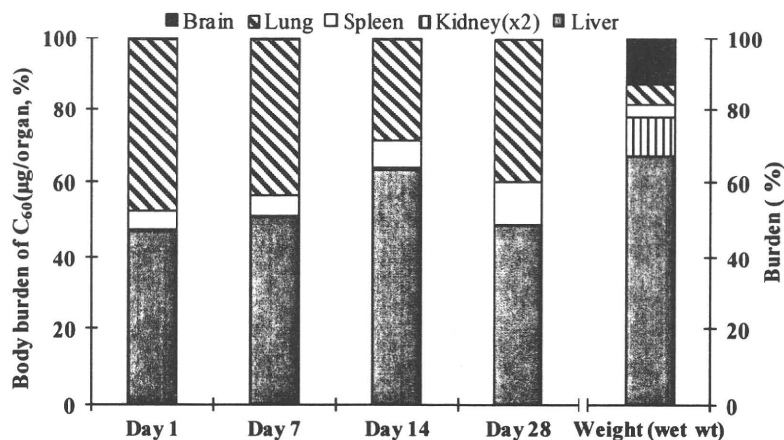


図1 ラットにおける C₆₀ の負荷量分布の比較

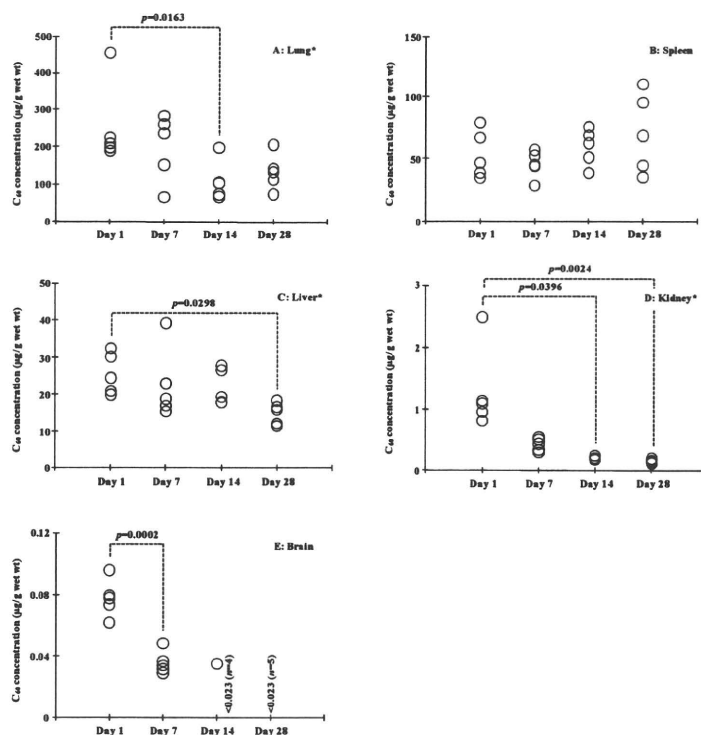


図2 ラットにおける C₆₀ の経時変動の比較

研究課題名: ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法の開発のための有害性評価および体内動態評価に関する基盤研究

分担研究課題名: ナノ粒子の繊維状形態に関わる生体反応マーカーの開発研究

分担研究者: 樋野 興夫 順天堂大学 医学部 病理・腫瘍学 教授

研究要旨

アスベストの長期暴露による中皮腫の発症は慢性的刺激、局所炎症による発がんと考えられることができる。我々はERC/Mesothelin分子に着目し、その発症との関連性・診断的意義に関する研究を行っている。最近、マウス疾患モデル(カーボンナノチューブによる中皮腫発生)の存在が報告された。「ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法の開発のための有害性評価および体内動態評価に関する基盤研究」において、中皮腫マーカーになりうるマウス ELISAの開発は緊急性の課題である。そこで、本研究課題においては、マウス ERC ELISA系 の開発を行った。

A. 研究目的

樋野らは、遺伝性ラット腎がんの進行過程で高発現してくる遺伝子 (Erc) を以前に発見した。このErc遺伝子産物は、血中に分泌され、遺伝性ラット腎がんの血液診断に使用できることが判明した。正常ではラットも、ヒトも胸膜や腹膜の中皮に存在することから、中皮腫になれば同蛋白が増加し、ヒト中皮腫においては腫瘍マーカーになりうる事が予測された。そこで、ELISA系を(株)免疫生物研究所と共同でヒト中皮腫を血液で診断するキットの開発を行ってきた。

ERCは別名 Mesothelin/M P F の総称でもあり、肺、心臓、胃腸、肝臓などの臓器を包む胸膜・腹膜・心膜などの膜の表面をおおっている中皮細胞や、中皮腫、卵巣癌、などのがん細胞が作り出す、糖タンパク質である。このERCタンパク質は、全長622アミノ酸、分子量が約71kDaからなるGPIアンカー型膜タンパク質として発現した後、分解酵素によって、31kDa (N-ERC/mesothelin) と40kDa

(C-ERC/mesothelin) の断片に分解されることが知られている。切断された40kDaのC末側領域はそのC末端にGPIアンカー領域を含むことから細胞膜に結合した形で残るが、一方、N末側の31kDa断片は可溶性タンパク質として細胞外に分泌される。

変異型Ras遺伝子を組み込んだ遺伝子組換えラットにおいて、この遺伝子を活性化させることによりすい臓がんが発生し、このすい臓がん発生ラットの血液中においてERC/Mesothelinが検出され、肉眼では検出できない段階(発症前・早期診断)においても血中のERC/Mesothelin量が増加する

(Fukamachi et al. Biochem. Biophys. Res. Commun, 390:636-641, 2009)。

興味あることに、本遺伝子は種間の相同性が低く、ラットELISAはラットのみ、ヒトELISAはヒトのみにしか適用されない。最近、マウス疾患モデル(カーボンナノチューブによる中皮腫発生)の存在が報告され、マウスELISAの開発は「ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法の開発のための有害性

評価および体内動態評価に関する基盤研究」於いて緊急性の課題である。

本研究においては、天然及び人工繊維状粒子の慢性刺激による中皮腫の発症メカニズムの解明を主たる研究目標とする。さらに、中皮腫誘発動物モデルを用いた新規物質のリスク評価系の確立を目指す。

これらの成果によって、アスベスト代替品を含む天然及び人工繊維状粒子の発がん性の危険性を事前に評価可能なリスク評価システムの構築が可能になる。社会的にも非常に大きなインパクトを与えるものと考えられる。また治療標的因子としての評価・治療用抗体開発による治療薬シーズとしての応用へ資する。

B. 研究計画・方法

31 kDa 断片に着目し、これを検出するマウス ELISA 測定キットの開発を進めた。すなわち、31 kDa 断片に結合する 2 種類の抗体を作製し、いわゆるサンドイッチ ELISA 法に基づいた測定キットの開発を進めた。これは、一方の抗体を試験用マイクロプレートに固定化し、そこへマウス血清などの検体を反応させ、結合した標的分子 (ERC) をさらにもう一方の抗体で挟み込むようにして検出する方法である。さらに 40 kDa に対する特異的な抗体も作製し、それらを用いた ELISA 系も構築する。ナノファイバーを含む人工繊維状粒子の腹腔内投与により発生した中皮腫の血清 ERC/Mesothelin 濃度を観察する。

(倫理面への配慮)

本研究における倫理面への配慮については、倫理審査委員会の承認を得る。

C. 研究結果

Recombinant Mouse ERC の発現確認が終了し、WB 解析を行い N-ERC、C-ERC とともに反応

性する事が判明した。予定通りマウス抗体の作成に成功した。さらにマウス ELISA 系の開発 (マウス N-ERC) にも成功した。

D. 考察&結論

今回作製した ELISA 測定系の検量線作成のための標準物質は大腸菌で発現させた recombinant mouse N-ERC Protein を用いた。しかし、血液検体の測定において、希釈直線性に乖離が認められたため、標準物質をより Native な mouse N-ERC protein に近いものに変えることを検討した。すなわち、CHO 細胞に mouse N-ERC cDNA を強制発現させた安定発現株を作製した。なお、この際、高純度な精製タンパク質を効率よく得るために N 末端にタグ配列 (FLAG 配列) を付加した。この安定発現株を大量培養し、その培養上清から精製を進めた。高精度化した測定系の開発中である。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sakamoto Y., Nakae D., Hagiwara Y., Satoh K., Ohashi N., Fukamachi K., Tsuda H., Hirose A., Nishimura T., Hino O. and Ogata A.: Serum level of expressed in renal carcinoma (ERC)/mesothelin in rats with mesothelial proliferative lesions induced by multi-wall carbon nanotube (MWCNT). The Journal of Toxicological Sciences 35: 265-270, 2010
- 2) Kokubo T., Kakinuma S., Kobayashi T., Watanabe F., Iritani R., Tateno K., Nishimura M., Nishikawa T., Hino O., Shimada Y.: Age dependence of radiation-induced renal cell carcinomas in an Eker rat model. Cancer Sci. 101:

616-623, 2010.

3) Inami K., Abe M., Takeda K., Hagiwara Y., Maeda M., Segawa T., Suyama M., Watanabe S. and Hino O.: Antitumor activity of anti-C-ERC/mesothelin monoclonal antibody in vivo. *Cancer Sci.* 101: 969-974, 2010

4) Yoshida C., Sogawa C., Tsuji A., Sudo H., Sugyo A., Uehara T., Hino O., Yoshii Y., Fujibayashi Y., Fukumura T., Koizumi M., Arano Y. and Saga T.; Development of positron emission tomography imaging by ⁶⁴Cu-labeled Fab for detecting ERC/mesothelin in mesothelioma mouse model. *Nuclear Medicine Communications*, in press.

5) Sudo H., Tsuji A., Sugyo A., Kohda M., Sogawa C., Yoshida C., Harada Y., Hino O. and Saga T.: Knockdown of COPA, identified by loss-of-function screen, induces apoptosis and suppresses tumor

growth in mesothelioma mouse model. *Genomics*, in press.

6) Zhang D., Kobayashi T., Kojima T., Kanenishi K., Hagiwara Y., Abe M., Okura H., Hamano Y., Sun G., Maeda M., Jishage K., Noda T. and Hino O.; Deficiency of the *Erc/mesothelin* gene ameliorates renal carcinogenesis in *Tsc2* knockout mice. *Cancer Science* in press.

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし。
3. その他
該当なし。

平成 22 年度厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
「ナノマテリアルの健康影響評価手法の総合的開発および体内動態を含む基礎的有害性情
報の集積に関する研究」

ナノマテリアルの遺伝毒性影響評価系における基礎的研究

分担研究者：	本間 正充	国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部室長
協力研究者：	堀端 克良	国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部
	山影 康次	(財)食品薬品安全センター秦野研究所
	高橋 俊孝	(財)食品薬品安全センター秦野研究所
	浅田 晋	(財)食品薬品安全センター秦野研究所
	豊泉 友康	(財)食品薬品安全センター秦野研究所
	斉藤 義明	(財)食品薬品安全センター秦野研究所
	熊谷 文明	(財)食品薬品安全センター秦野研究所

研究要旨

ナノマテリアルとして広く知られている多層カーボンナノチューブ (MWCNT) について、2 種類の MWCNT (0601250-01k: ϕ 70~130 nm \times 1~5 μ m および 12127PE: ϕ 10~15 nm \times 0.1~10 μ m) の染色体異常誘発作用を調べるとともに、3 種類の MWCNT (0312TH: ϕ 110~170 nm \times 5~9 μ m、04519DC: ϕ 40~70 nm \times 0.5~2 μ m および 12127PE: ϕ 10~15 nm \times 0.1~10 μ m) の *in vitro* 二段階発がん性試験を実施し、発がんにおけるその作用を検討した。

CHL/IU 細胞 (チャイニーズ・ハムスター肺由来) を 2 種類の MWCNT (0601250-01k、12127PE) で処理した場合、MWCNT (12127PE) は染色体の構造異常および倍数性細胞ともに誘発しなかったが、MWCNT (0601250-01k) は構造異常を誘発しないもののすべての濃度で倍数性細胞を誘発 (出現率: 5.1~12.0%) した。また、発がん過程におけるイニシエーションおよびプロモーション作用を調べるため、Bhas 42 細胞を用いる形質転換試験を実施した 3 種類の MWCNT (0312TH、04519DC、12127PE) は、すべて形質転換巣を誘発しなかった。

これまで実施した 4 種類の MWCNT の染色体異常試験の結果から、外径の長い MWCNT (0312TH: ϕ 110~170 nm \times 5~9 μ m) と MWCNT (0601250-01k: ϕ 70~130 nm \times 1~5 μ m) が倍数性細胞を誘発し、比較的外形が短い MWCNT (04519DC: ϕ 40~70 nm \times 0.5~2 μ m) と MWCNT (12127PE: ϕ 10~15 nm \times 0.1~10 μ m) は倍数性細胞を誘発しないことから、染色体の倍数性誘発には MWCNT の形状、特に太さが関与していると考えられた。また、光学顕微鏡や走査型電子顕微鏡の観察結果からは、チューブ形状を維持した状態で細胞と接触していた MWCNT が染色体の倍数性を誘発しており、これらの結果からも倍数性誘発とチューブ形状と

の関連性が示唆された。

また、本年度よりナノマテリアルの *in vivo* 遺伝毒性を開始し、新規遺伝毒性試験である *Pig-a* 遺伝子突然変異試験を行った。マウスにフラーレン (C₆₀) 3mg/匹を腹腔内投与し、2 週後、8 週後に赤血球中の *Pig-a* 遺伝子突然変異を検討したが、突然変異の誘発は認められなかった。血液細胞はナノ物質の標的とは言えず、さらなる検討が必要である。

キーワード：カーボンナノチューブ (MWCNT)、フラーレン (C₆₀)、遺伝毒性、発がん性

A. 研究目的

ナノ技術が向上し、様々なナノマテリアルが開発されているが、その中のカーボンナノチューブ (CNT) は電子的、化学的にユニークであることから、様々な分野で様々な用途に用いられている。例えば、プラスの電荷を持つ CNT はマイナスの電荷を持つ DNA と結合しやすいという性質を応用し、CNT が DNA のセンサーに応用¹⁾されているが、これは、CNT が DNA と作用し、遺伝的変異を誘発する可能性を示唆している。

また、CNT が酸化ストレスや炎症、線維症、肉芽腫の発生を促進し^{2)、3)、4)、5)、6)、7)、8)}、線維症は CNT が肺のマクロファージに結合することで細胞間の構造を変化させることが原因と考えられている⁹⁾。その他、CNT は青石綿と同様に p53^{+/-}のトランスジェニックマウスに中皮腫を生じさせることが明らかになっている¹⁰⁾。このように CNT は、酸化ストレスや炎症反応により間接的に発がん性に関与し、また、DNA や分裂装置と直接結合することで発がん性を示すと考えられている¹¹⁾。

昨年度我々は、2 種の MWCNT を用いて染色体異常誘発作用を調べるとともに、Bhas42 細胞を用いる形質転換試験を行い、

イニシエーション作用に加えて、そのプロモーション作用を調べた。その結果、染色体の構造異常や *in vitro* 発がん性は示さないが、太くて長い MWCNT は染色体の倍数性を誘発し、MWCNT の形状と染色体の数的異常誘発との関連性が示唆された。

今年度は、さらに 2 種類の MWCNT の染色体異常誘発性を調べるとともに、MWCNT と培養細胞との接触状況を走査型電子顕微鏡により調べた。また、3 種類の MWCNT について昨年の約 25 倍の濃度で処理しそれらの *in vitro* 発がん性を調べた。

また、本年度からはナノマテリアルの *in vivo* 遺伝毒性の検討を開始した。本研究班では以前にフラーレン (C₆₀) の *in vitro* 遺伝毒性試験を行い、同様に染色体の倍数性を観察した。本年度は、新規 *in vivo* 遺伝毒性試験である *Pig-a* 遺伝子突然変異試験により、フラーレン (C₆₀) の遺伝子突然変異誘発性を検討した。

B. 研究方法

(1) カーボンナノチューブ (CNT)

試験には 4 種類の多層カーボンナノチューブ (MWCNT) を使用した。それらの形状等に関する情報を表 1 に示した。

これらのMWCNTを血清（染色体異常試験用のロット番号：4J0214、JRH Biosciences、形質転換試験用のロット番号：29803、HyClone）に懸濁させて凍結保存したものを、解凍後15分間超音波処理し、顕微鏡下で均一性を確認したのち、試験に用いた。染色体異常試験では血清に懸濁したMWCNTを10 vol%添加して処理液（原液）を調製し、それを培養液（同じロットの血清を10 vol%含む）で希釈して処理液を調製した。また、形質転換試験では、血清に懸濁したMWCNTを5 vol%添加して処理液（原液）を調製し、それを培養液（超音波処理した同じロットの血清を5 vol%含む）で希釈して処理液を調製した。

(2) 陽性対照物質

染色体異常試験では、陽性対照物質（既知変異原物質）として、マイトマイシンC（MMC）およびシクロホスファミド（CP）を日局注射用水に溶解して凍結保存した原液（MMC：20 µg/mL、CP：1 mg/mL）を用時解凍して試験に用いた。

形質転換試験では、イニシエーターとして3-メチルコラントレン（MCA）およびプロモーターとしてホルボール12-ミリストート13-アセタート（TPA）をDMSOに溶解して原液（MCA：1 mg/mL、TPA：50 µg/mL、TPAについては凍結保存し用時解凍）を調製し、試験に用いた。

(3) 細胞と培養条件

染色体異常試験には、チャイニーズ・ハムスター肺由来のCHL/IU細胞を用い、仔ウシ血清（CS、ロット番号：4J0214、JRH Biosciences）を10 vol%添加したイーグル

MEM培養液で培養（37°C、5%CO₂）した。

形質転換試験には、接触阻止能を持ち *in vitro* 二段階発がん性試験に用いられているBALB/3T3 A31-1-1（マウス全胎児由来）に *v-Ha-ras* 遺伝子を導入したBhas42細胞^{12）、13）}を用いた。培養には、ウシ胎児血清（FBS、ロット番号：7825120、Moregate）を5 vol%含むDulbecco's modified Eagle's medium/Ham's F12を用い、CO₂インキュベーター（5% CO₂、37°C）内で培養した。

(4) S9 mix

染色体異常試験では、代謝活性化法としてフェノバルビタールと5,6-ベンゾフラボンを投与した7週齢の雄Sprague-Dawley系ラットの肝臓から調製したS9（ロット番号：RAA-600、2009年8月21日製造、キッコマン）と50 mmol/Lグルコース-6-リン酸（G-6-P、Sigma Chemical）、40 mmol/Lβ-ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸（β-NADP⁺、オリエンタル酵母工業）、330 mmol/L KCl、50 mmol/L MgCl₂、20 mmol/L HEPES（pH 7.2）、精製水をそれぞれ3：1：1：1：1：2：1の割合で混合したS9 mixを用いた（各成分の最終濃度：5 vol% S9、0.83 mmol/L G-6-P、0.67 mmol/L β-NADP⁺、0.83 mmol/L MgCl₂、5.5 mmol/L KCl、0.67 mmol/L HEPES）。

(5) 染色体異常試験

CHL/IU細胞をプラスチックディッシュ（直径6 cm）あたり2×10⁴個播種し、培養開始3日目に培養液をMWCNTを含む処理液と交換して短時間処理（6時間）および連続処理（24時間）を行った（図1）。

具体的には、S9 mix非存在下で短時間処

理する場合、3 mL の処理液と交換し、S9 mix 存在下で短時間処理する場合には、2.5 mL の処理液と交換し、さらに S9 mix を 0.5 mL 添加して 6 時間処理した。処理終了後、リン酸緩衝塩類溶液で洗浄し、培養液 (5 mL/ディッシュ) でさらに 18 時間培養した。

連続処理する場合は、5 mL の処理液と交換して 22 時間処理したのち、リン酸緩衝塩類溶液で洗浄し、培養液 (5 mL/ディッシュ) でさらに 2 時間培養した。各群 2 枚のディッシュを用いた。

培養終了の 2 時間前に、コルセミドを最終濃度が 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるように添加し、培養終了後、細胞をはがし、細胞を遠沈管に移した。陽性対照群を除く各群については、0.5 mL の細胞懸濁液を 9 mL の ISOTON® II に加え、コールターカウンターを用いて、細胞数の測定を行った。残りの細胞懸濁液については、遠沈 (1400 rpm、5 分) し、低張液 (0.075 mol/L KCl 水溶液) を加え、約 30 分間低張処理を行った。低張処理後、固定液 [メタノール : 氷酢酸 = 3 : 1 (v/v)] を加え常法に従ってスライド標本作製した。

作製したスライド標本を 70 vol% メタノールに軽く浸漬したのち 3 vol% ギムザ液で 8 分間染色後、水道水ですすいで風乾した。

染色体分析に先立って、分裂指数と標本あたりの分析可能な分裂中期細胞数の分析を行い、観察対象群を決定した。

ディッシュ 1 枚から得られたスライド標本 4 枚を、4 人の観察者がコード化した状態で分析した。1 群あたり 200 個の分裂中期細胞 (染色体数 : 23~27 本) について構造異常の種類と数を、また、1 群あたり 800 個の分裂中期細胞について倍数性細胞 (染

染色体数が 38 本以上) の数を調べた。その結果に基づいて構造異常を持つ細胞と倍数性細胞の出現率を求めた。

ギャップおよび切断については染色分体幅よりも狭い非染色性部位をギャップ、それ以上幅の広いものを切断と定義し、ギャップについては構造異常誘発性の判定には含めないこととした。

(6) 形質転換試験

浅田らの方法¹⁴⁾および大森らの方法¹⁵⁾を参考にイニシエーション試験およびプロモーション試験を実施した (図 2)。

イニシエーション試験では、Bhas42 細胞を 6 ウェルプレートの 1 ウェルあたり 4×10^3 個播種し、播種翌日に培養液を MWCNT を含む処理液に交換して 3 日間処理した。播種 4 日後、播種 7 日後、播種 11 日後、播種 14 日後に新鮮な培養液と交換 (1 ウェルあたり 2 mL) し、播種 21 日後に細胞をメタノール固定・ギムザ染色した。

プロモーション試験では、細胞をウェルあたり 14×10^3 個播種し、播種 4 日後、播種 7 日後、播種 11 日後に MWCNT を含む処理液と交換 (1 ウェルあたり 2 mL) し、10 日間処理を行い、播種 14 日後に新鮮な培養液と交換して、播種 21 日後に細胞をメタノール固定・ギムザ染色した。

各群、形質転換試験用として 6 ウェル用いた。また、同時に細胞増殖試験用として 3 ウェルを用い、同様の方法でイニシエーションおよびプロモーションの処理を行い、播種 7 日後にホルマリン固定し、0.1 w/v% クリスタルバイオレット液で染色した。水洗・風乾後、色素を抽出液 (50% エタノールおよび 0.02 mol/L 塩酸を含む) で抽出し、

相対細胞増殖率（陰性対照群を100%とした時の増殖率）を算出した。

形質転換試験用のウェルについては、大森らの方法¹⁵⁾を参考にし、50個以上の細胞からなる形質転換巣で、紡錘形をなして周囲の細胞とは異なる細胞形態を示し（spindle-shaped）、細胞質が塩基性（濃い紫色）に強く染まり（basophilic）、ランダムな配列で互いに交差し（criss-cross）、積み重なりあった細胞の増殖（piling-up）を示す形質転換巣を陽性形質転換巣として計数した。

各ウェルの陽性形質転換巣数について、陰性（媒体）対照群とCNT処理群間、陰性（媒体）対照群と陽性対照群間および無処理対照群と陰性（媒体）対照群でDunnett検定（ $p < 0.05$ 、上側）を行った。

(6) 走査型電子顕微鏡による観察

染色体異常試験および形質転換試験（イニシエーション試験）と同様の方法で処理した細胞から培養液を除去し、0.01 mol/L リン酸緩衝生理食塩液（PBS）で洗浄後、0.1 mol/L リン酸緩衝 1.25%グルタルアルデヒド固定液により氷冷下（冷蔵）で固定した。次いで、0.1 mol/L リン酸緩衝液で洗浄後、0.1 mol/L リン酸緩衝 1%四酸化オスミウムで後固定した。各試料はエタノール上昇系列で脱水後、 t -ブタノールで置換して凍結乾燥した。各試料（プラスチックシャーレ）は10×10 mm程度に切断して試料台に接着し、金-パラジウム（98:2）によるイオンスパッタリング蒸着後、日立S-3500N形走査電子顕微鏡で観察した。

(7) フラーレン (C_{60})

フロンティアカーボン社のNanom purple SUH（純度>99.9%）を使用した。生理食塩水に懸濁後、オートクレーブをかけ、その後Tween80を加え、0.1%に調整し、さらに超音波処理を行った。最終濃度は6mg/mlに相当する。

(8) *Pig-a* 伝子突然変異試験

9-11週齢のC57BL雄マウス（一群6匹）に C_{60} 3mg/匹（0.5ml/匹）を腹腔内投与した。陽性対象としてENU（40mg/kg）を用いた。投与2週後、4週後に尾静脈より採血し、Miuraらの方法²⁰⁾に従って*Pig-a* 遺伝子突然変異試験を行った。

C. 研究結果

(1) 染色体異常試験

CHL/IU細胞をMWCNTである0601250-01kで処理した場合、その濃度に依存して増殖率が低下し、分析したすべての濃度群で構造異常を有する細胞の統計学的に有意な増加は認められなかったが、倍数性細胞の統計学的に有意な増加が認められた（表2~4）。

一方、12127PEでは、処理可能であった最高濃度においても顕著な細胞増殖抑制作用は認められず、染色体の構造異常も倍数性細胞も誘発しなかった（表5~7）。

また、位相差顕微鏡レベルの観察では0601250-01kおよび12127PEともに凝集した塊が認められ、顕著な差は認められないが、光学顕微鏡および電子顕微鏡レベルでは、0601250-01kはチューブ形状が認められたのに対し、12127PEではほとんどが絡まり合った状態を呈しているように思われた（図3、4）。

(2) 形質転換試験

イニシエーション試験では、増殖期の 3 日間 MWCNT で処理し、細胞を洗浄（播種 4 日後）してさらに 3 日間培養後（播種 7 日後）に増殖率を測定したが、0312TH で処理した場合には 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度では濃度依存的に増殖率が低下した（表 8）。また、昨年実施した 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ までの濃度では 04519DC は増殖阻害作用を示さなかったが、126 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度では 04519DC も濃度依存的に Bhas42 細胞の増殖を阻害した（表 8）。12127PE では、他の MWCNT よりも増殖阻害作用は弱く処理可能であった 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度においても増殖率は 73.3% であった（表 8）。このように 2 種の MWCNT については 50% を越える増殖阻害を示す濃度までイニシエーション試験を実施したが、形質転換巣を誘発しなかった（表 8）。

プロモーション試験では、イニシエーション試験の 3.5 倍の細胞を播種し、増殖期が終了に近い播種 4 日後から 3 日間処理して増殖率を測定（播種 7 日後）したが、0312TH の 31 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度で増殖率の低下が認められた以外は、04519DC および 12127PE とともに最高濃度においても増殖率の低下は認められなかった（表 8）。昨年実施した濃度の約 25 倍高い濃度でプロモーション試験を実施したが、いずれの MWCNT 処理においても形質転換巣の誘発は認められなかった（表 8）。

Bhas42 細胞の場合も CHL/IU 細胞同様、位相差顕微鏡レベルの観察では、3 種の MWCNT とともに凝集した塊が認められ、顕著な差は認められないが、電子顕微鏡レベルでは、0312TH はチューブ形状が認められた（図 5～7）。また、同じ濃度で同じ培養期間で位

相差顕微鏡による写真を撮影したが、明らかにプロモーション試験における MWCNT の量がイニシエーション試験よりも多く、培地交換により処理を繰り返すことにより、MWCNT が蓄積されたことが示唆された（図 5～7）。

(3) *Pig-a* 遺伝子突然変異試験

C_{60} 投与後 2 週、8 週後の *Pig-a* 遺伝子突然変異頻度は溶媒対照群と変化はなかった。また、陽性対象である ENU は突然変異を明らかに誘発した（図 8）。

D. 考察

ナノマテリアルの発がん性は活性酸素や窒素の発生、炎症反応が関与しているとされている^{16), 17), 18)}が、今回試験した MWCNT においても活性酸素で誘発されるような染色体の構造異常誘発は認められなかった。

また、今回実施した MWCNT においても太い MWCNT である 0601250-01k が昨年の結果と同様に倍数性細胞を誘発し、細い MWCNT である 12127PE では倍数性細胞を誘発しなかった。浅倉ら¹⁹⁾はロット番号が異なるが、今回我々が試験に用いた Mitsui 製の MWCNT（外径：88 \pm 5 nm、長さ：5.0 \pm 4.5 μm ）を用いて染色体異常試験を実施し、CHL/IU 細胞で構造異常は誘発されないが、倍数性細胞を誘発することを報告している。これまでに我々が実施した MWCNT で倍数性細胞を誘発した 2 つの MWCNT はどちらも太く、顕微鏡レベルでチューブ形状として観察された MWCNT であり、MWCNT の外径と倍数性細胞の誘発性に関連性のあることが示唆された（表 9、図 3～7）。

染色体の数的異常は発がん性誘発の原因

の一つと考えられている。MWCNT と同様の針状結晶を示し、ヒト肺において中皮腫を誘発するアスベストも染色体の倍数性細胞を誘発する¹⁹⁾。したがって、MWCNT のこの異常誘発作用は、発がん性との関連性が疑われるが、我々が実施した Bhas42 細胞を用いる形質転換試験では、いずれの MWCNT も形質転換層を誘発しなかった。倍数性細胞または染色体の数的異常を誘発するためには、細胞分裂の過程を経る必要がある。Bhas42 細胞の増殖期に処理するイニシエーション試験において、染色体異常試験と同程度ないしやや強い細胞毒性作用を示していることから、4 種類の MWCNT は Bhas42 細胞においても CHL/IU 細胞と同様の作用を示すと考えられるが、今回の我々の結果では、MWCNT による倍数性細胞の誘発は *in vitro* 発がん性には関与していないと考えられる。

C₆₀ をマウスに腹腔内投与したが、*Pig-a* 遺伝子突然変異の誘発は観察されなかった。これまでの報告でも C₆₀ は骨髄小核を誘発しなかったことから、C₆₀ の *in vivo* 遺伝毒性の可能性は低いと考えられる。しかしながら Totsuka ら²¹⁾ は C₆₀ を経気道投与したマウス肺がコメット試験、および *gpt* 遺伝子突然変異試験で陽性を示したことを報告している。一般にナノ物質は気管経路で暴露することから、肺での遺伝毒性の検討が重要と考えられる。

E. 結論

これまで実施した 4 種類の MWCNT の染色体異常試験の結果から、外径の長い MWCNT が倍数性細胞を誘発し、比較的外形が短い MWCNT は倍数性細胞を誘発しないことから、

染色体の倍数性誘発には MWCNT の形状、特に太さが関与していると考えられた。また、光学顕微鏡や走査型電子顕微鏡の観察結果からは、チューブ形状を維持した状態で細胞と接触していた MWCNT が染色体の倍数性を誘発しており、これらの結果からも倍数性誘発とチューブ形状との関連性が示唆された。また、C₆₀ は *in vivo* で赤血球中の *Pig-a* 遺伝子突然変異を誘発しなかったが、標的臓器のさらなる検討が必要と考えられる。

F. 参考文献

- 1) He, P., Bayachou, M., 2005. Layer-by-layer fabrication and characterization of DNA-wrapped single-walled carbon nanotube particles. *Langmuir* 21 (13), 6086–6092
- 2) Lam, C.W., James, J.T., McCluskey, R., Arepalli, S., Hunter, R.L., 2006. A review of carbon nanotube toxicity and assessment of potential occupational and environmental health risks. *Crit. Rev. Toxicol.* 36 (3), 189–217.
- 3) Lam, C.W., James, J.T., McCluskey, R., Hunter, R.L., 2004. Pulmonary toxicity of singlewall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. *Toxicol. Sci.* 77 (1), 126–134.
- 4) Li, J.G., Li, W.X., Xu, J.Y., Cai, X.Q., Liu, R.L., Li, Y.J., Zhao, Q.F., Li, Q.N., 2007a. Comparative study of pathological lesions induced by multiwalled carbon nanotubes in lungs of mice by intratracheal instillation and inhalation. *Environ. Toxicol.* 22 (4), 415–421.