

- 5) Li, Z., Hulderman, T., Salmen, R., Chapman, R., Leonard, S.S., Young, S.H., Shvedova, A., Luster, M.I., Simeonova, P.P., 2007b. Cardiovascular effects of pulmonary exposure to single-wall carbon nanotubes. *Environ. Health Perspect.* 115 (3), 377–382.
- 6) Muller, J., Huaux, F., Moreau, N., Misson, P., Heilier, J.F., Delos, M., Arras, M., Fonseca, A., Nagy, J.B., Lison, D., 2005. Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 207 (3), 221–231.
- 7) Shvedova, A.A., Kisin, E.R., Mercer, R., Murray, A.R., Johnson, V.J., Potapovich, A.I., Tyurina, Y.Y., Gorelik, O., Arepalli, S., Schwegler-Berry, D., Hubbs, A.F., Antonini, J., Evans, D.E., Ku, B.K., Ramsey, D., Maynard, A., Kagan, V.E., Castranova, V., Baron, P., 2005. Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to singlewalled carbon nanotubes in mice. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 289 (5), L698–L708.
- 8) Warheit, D.B., Laurence, B.R., Reed, K.L., Roach, D.H., Reynolds, G.A., Webb, T.R., 2004. Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats. *Toxicol. Sci.* 77 (1), 117–125.
- 9) Mangum, J.B., Turpin, E.A., Antao-Menezes, A., Cesta, M.F., Bermudez, E., Bonner, J.C., 2006. Single-walled carbon nanotube (SWCNT)-induced interstitial fibrosis in the lungs of rats is associated with increased levels of PDGF mRNA and the formation of unique intercellular carbon structures that bridge alveolar macrophages in situ. *Part. Fibre Toxicol.* 3, 15.
- 10) Takagi, A., Hirose, A., Nishimura, T., Fukumori, N., Ogata, A., Ohashi, N., Kitajima, S., Kanno, J., 2008. Induction of mesothelioma in p53^{+/-} mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube. *J. Toxicol. Sci.* 33 (1), 105–116.
- 11) Mouchet, F., Landois, P., Sarremejean, E., Bernard, G., Puech, P., Pinelli, E., Flahaut, E., Gauthier, L., 2008. Characterisation and in vivo ecotoxicity evaluation of doublewall carbon nanotubes in larvae of the amphibian *Xenopus laevis*. *Aquat. Toxicol.* 87 (2), 127–137.
- 12) K. Sasaki, H. Mizusawa, M. Ishidate, 1988. Isolation and characterization of ras-transfected BALB/3T3 clone showing morphological transformation by 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate, *Jpn. J. Cancer Res.* 79, 921–930.
- 13) K. Sasaki, H. Mizusawa, M. Ishidate, N. Tanaka, 1990. Establishment of a highly reproducible transformation assay of a ras-transfected BALB 3T3 clone by treatment with promoters, *Basic Life Sci.* 52, 411–416.
- 14) S. Asada, K. Sasaki, N. Tanaka, K. Takeda, M. Hayashi, M. Umeda, 2005. Detection of initiating as well as promoting activity of chemicals by a novel cell transformation assay using v-Ha-ras-transfected BALB/c 3T3 cells (Bhas 42 cells), *Mutat. Res.* 588, 7–21.

- 15) K. Ohmori, K. Sasaki, S. Asada, N. Tanaka, M. Umeda, 2004. An assay method for the prediction of tumor promoting potential of chemicals by the use of Bhas 42 cells, *Mutat. Res.* 557, 191–202.
- 16) Ayres JG, Borm P, Cassee FR, Castranova V, Donaldson K, Ghio A, et al. 2008. Evaluating the toxicity of airborne particulate matter and nanoparticles by measuring oxidative stress potential – a workshop report and consensus statement. *Inhal Toxicol* 20:75–99.
- 17) Nel A, Xia T, Madler L, Li N. 2006. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 311:622–627.
- 18) Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. 2005. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect* 113:823–839.
- 19) Asakura M, Sakai T, Sugiyama T, Takaya M, Koda S, Nagano K, et al. 2010. Genotoxicity and Cytotoxicity of Multi-wall Carbon Nanotubes in Cultured Chinese hamster lung cells in comparison with chrysotile A fibers. *J Occup Health* 52: 155-166.
- 20) Miura D, Dobrovolsky VN, Kasahara Y, Katsuura Y, Heflich RH. 2008. Development of an in vivo gene mutation assay using the endogenous Pig-A gene: I. Flow cytometric detection of CD59-negative peripheral red blood cells and CD48-negative spleen T-cells from the rat. *Environ Mol Mutagen.* 49: 614-621.
- 21) Totsuka Y, Higuchi T, Imai T, Nishikawa A, Nohmi T, Kato T, Masuda S, Kinae N, Hiyoshi K, Ogo S, Kawanishi M, Yagi T, Ichinose T, Fukumori N, Watanabe M, Sugimura T, Wakabayashi K. 2009. Genotoxicity of nano/microparticles in in vitro micronuclei, in vivo comet and mutation assay systems. *Part Fibre Toxicol.* 6: 23.

G. 健康危機情報

特になし

H. 研究発表

1. 論文発表

Horibata, K., Ukai, A., Koyama, N., Takagi, A., Kanno, J., Kimoto, T., Miura, D., Hirose, A., and Honma, M. Fullerene (C60) is negative in the in vitro pig-A gene mutation assay. *Genes and Environment* 33, 27-31 (2011)

2. 学会発表

本間正充； In vitro 遺伝毒性試験の問題点と将来 第17回HAB研究機構学術年会(2010.5)

本間 正充；遺伝毒性試験とその科学的リレバンス第11回日本トキシコロジー学会生涯教育講演会(2010.6)

本間 正充；リスク評価における in vitro 遺伝毒性試験の役割 第37回日本トキシコロジー学会学術年会(2010.6)

Honma, M., Horibata, K., Takahashi, T., Asada, S., Hara, T., Nakagawa, Y., Ikeda, A., Yamakage, K., Hirose, A.; In vitro chromosome aberration and cell transformation tests on fullerene and

multi-wall carbon nanotubes. European Environmental Mutagen Society 2010, (2010. 9)

Honma, M.; The Principal Approaches to Genotoxic Hazard Assessment of Nanomaterials in Japan. Genotoxicity of Nanomaterials: Refining Strategies and Tests for Hazard Identification Workshop in 41st Annual Meeting of Environmental Mutagen Society (2010・10)

浅田晋, 斉藤義明, 山影康次, 本間正充; Bhas42細胞を用いる形質転換試験による多層カーボンナノチューブの *in vitro* 発がん性の検討: 日本環境変異原学会第 39 回大会(2010.11)

高橋俊孝, 浅田晋, 原巧, 豊泉友康, 斉藤義明, 熊谷文明, 山影康次, 本間正充 多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の CHL/TU 細胞を用いた染色体異常試験: 日本環境変異原学会第 39 回大会(2010.11)

堀端克良, 鶴飼明子, 木本崇文, 三浦大志郎, 本間正充: 内在性遺伝子である Pig-A 遺伝子を標的とした *in vivo* 遺伝子変異試験: 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会 (2010.12)

G. 知的所有権の取得状況

なし

表 1 多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の形状

MWCNT	購入元	ロット番号	直径 (nm)		長さ (μm)	血清中濃度 (mg/mL)	
			外径	内径		染色体用	形質転換用
0312TH	Aldorich-Sigma	0312TH	110~170	Unknown	5~9	5.07	5.03
0601250-01k	Mitsui	0601250-01k	70~130	Unknown	1~5	5.07	5.01
04519DC	Aldorich-Sigma	04519DC	40~70	5~40	0.5~2	5.13	5.05
12127PE	Aldorich-Sigma	12127PE	10~15	2~6	0.1~10	5.13	5.01

表2 多層カーボンナチューブ(0601250-01k)でチャイニーズ・ハムスター培養細胞(CHL/U細胞)を6時間処理(S9 mix非存在下)したときの染色体分析結果

群	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	S9 mix	処理 時間 (hrs)	細胞 増殖率 (%)	分裂 ³⁾ 指数 (%)	分析 細胞数	構造異常の種類と数				合計	その他 ⁵⁾ の異常		傾向性検定 ⁷⁾ 構造 異常						
							gap	ctb	cte	csb		cse	mul ⁴⁾		ギャップを 含む(%)	ギャップを 除く(%)				
陰性対照 ¹⁾	0	-	6-(18)	100	NA	100	0	2	0	2	0	0	4	0	4	(4.0)	4	(4.0)	0	(0.0)
						100	1	1	0	0	0	2	1	2	(2.0)	1	(1.0)	1	(0.3)	
						200	1	3	0	2	0	0	6	1	6	(3.0)	5	(2.5)	1	(0.1)
0601250-01k	8	-	6-(18)	76	NA	観察せず														
0601250-01k	16	-	6-(18)	69	NA	観察せず														
0601250-01k	32	-	6-(18)	57	NA	100	3	0	2	0	0	0	5	2	4	(4.0)	2	(2.0)	40	(10.0)
						100	0	2	2	0	0	0	4	1	4	(4.0)	4	(4.0)	35	(8.8)
						200	3	2	4	0	0	0	9	3	8	(4.0)	6	(3.0)	75	(9.4)
0601250-01k	63	-	6-(18)	45	NA	100	1	2	1	2	0	0	6	0	5	(5.0)	4	(4.0)	31	(7.8)
						100	0	0	0	0	0	0	0	1	0	(0.0)	0	(0.0)	28	(7.0)
						200	1	2	1	2	0	0	6	1	5	(2.5)	4	(2.0)	59	(7.4)
0601250-01k	127	-	6-(18)	36	2.2, 1.8	100	1	2	1	0	1	0	5	2	5	(5.0)	4	(4.0)	31	(9.1)
						100	1	1	0	2	0	0	4	1	3	(3.0)	2	(2.0)	36	(12.4)
						200	2	3	1	2	1	0	9	3	8	(4.0)	6	(3.0)	67	(10.6) ⁸⁾
0601250-01k	254	-	6-(18)	25	1.8, 1.8	標本あたりの分析可能な分裂中期細胞数が少ないことから観察せず														
0601250-01k	507	-	6-(18)	12	1.6, 2.0	標本あたりの分析可能な分裂中期細胞数が少ないことから観察せず														
MMC	0.1	-	6-(18)	NA	NA	100	4	23	53	3	0	0	83	2	52	(52.0)	49	(49.0)	0	(0.0)
						100	3	23	48	1	0	0	75	4	51	(51.0)	51	(51.0)	1	(0.3)
						200	7	46	101	4	0	0	158	6	103	(51.5)	100	(50.0)	1	(0.1)

gap: 染色体型および染色体型のギャップ, ctb: 染色体切断, cte: 染色体切断, cse: 染色体切断, csb: 染色体交換, csc: 染色体交換 (二動原体性染色体および環状染色体), mul: 多染色体異常, MMC: マイトマイシンC, NA: 分析せず.

1) 媒体として培養液を用いた. 2) コールターカウンターにより各ディビジョンにおける細胞数を測定し, 増殖抑制の指標とした. 3) ディンジュあたり500細胞分析した. 4) 1細胞中に10個以上の異常がある場合は異常の数を10とスコアした. 5) アテニエーションおよび未成熟染色体凝縮などであるが, 構造異常からは除外した. 6) 各群800細胞分析した. 7) コ克蘭・アーマーディンジの傾向性検定 ($p < 0.01$, 片側). 8) 631細胞分析した.

*: フィジジャーの直接確率法で有意差あり ($p < 0.01$, 片側).

表3 多層カーボンナノチューブ(0601250-01k)でチャイニーズ・ハムスター培養細胞(CHL/1U細胞)を6時間処理(S9 mix存在下)したときの染色体分析結果

群	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	S9 mix	処理 時間 (hrs)	細胞 ²⁾ 増殖率 (%)	分裂 ³⁾ 指数 (%)	分析 細胞数	構造異常の種類と数			合計	その他 ⁵⁾ の異常	構造異常を有する細胞の数		倍率 ⁶⁾ 細胞の数 (%)	傾向性検定 ⁷⁾ 構造的 異常		
							gap	ctb	cte			csb	cse			mul ⁴⁾	ギャップを 含む(%)
陰性対照 ¹⁾	0	+	6-(18)	100	NA	100	0	3	1	0	0	4	1	4 (4.0)	4 (4.0)	1 (0.3)	
0601250-01k	7	+	6-(18)	90	NA	100	0	2	4	0	0	6	0	1 (1.0)	1 (1.0)	0 (0.0)	
0601250-01k	26	+	6-(18)	81	NA	200	0	5	5	0	0	10	1	5 (2.5)	5 (2.5)	1 (0.1)	
0601250-01k	53	+	6-(18)	75	NA	100	0	0	3	1	0	4	2	2 (2.0)	2 (2.0)	18 (4.5)	
0601250-01k	106	+	6-(18)	60	NA	100	0	2	4	0	1	7	1	5 (5.0)	4 (4.0)	38 (9.5)	
0601250-01k	211	+	6-(18)	50	3.0, 1.4	100	0	3	4	0	0	7	0	4 (4.0)	4 (4.0)	33 (8.3)	
0601250-01k	423	+	6-(18)	40	3.4, 1.6	100	2	2	6	0	0	10	1	6 (6.0)	6 (6.0)	51 (12.8)	NA
CP	10	+	6-(18)	NA	NA	200	2	5	10	0	0	17	1	11 (5.5)	11 (5.5)	96*(12.0)	+

gap: 染色分体型および染色分体のギャップ, ctb: 染色分体切断, cte: 染色分体切断, cse: 染色分体交換, csb: 染色分体交換 (二動原体性染色体および環状染色体), mul: 多染色体異常, CP: シクロホスファミド, NA: 分析せず

1) 媒体として培養液を用いた。 2) コールターカウンターにより各ディンシユにおける細胞数を測定し、増殖抑制の指標とした。 3) ディンシユあたり500細胞分析した。 4) 1細胞中に10個以上の異常がある場合は異常の数を10とスコアした。 5) アデニユエーションおよび未成熟染色体凝縮などであるが、構造異常からは除外した。 6) 各群800細胞分析した。 7) コ克蘭・アーミテイジの傾向性検定 ($p < 0.01$, 片側)を行った。
*: フインシヤ一の直接確率法で有意差あり ($p < 0.01$, 片側)

表4 多層カーボンナノチューブ(0601250-01k)でチャイニーズ・ハムスター培養細胞(CHL/IU細胞)を24時間連続処理(S9 mix非存在下)したときの染色体分析結果

群	濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	処理 時間 (hrs)	細胞 増殖率 (%)	分裂 ³⁾ 指数 (%)	構造異常の種類と数			分析 細胞数	構造異常を有する細胞の数		傾向性検定 ⁷⁾ 構造的 異常				
					gap	ctb	cte		cse	mul ⁴⁾		合計	ギヤップを 含む(%)	ギヤップを 除く(%)	倍率性 ⁶⁾ 細胞の数 (%)
陰性対照 ¹⁾	0	22-(2)	100	NA	100	0	4	0	0	0	4	0	3 (3.0)	3 (3.0)	0 (0.0)
					100	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (0.8)
					200	0	4	0	0	0	4	0	3 (1.5)	3 (1.5)	3 (0.4)
0601250-01k	8	22-(2)	66	NA	100	0	1	0	0	0	1	1	1 (1.0)	1 (1.0)	23 (5.8)
					100	1	2	0	0	0	3	0	3 (3.0)	2 (2.0)	18 (4.5)
					200	1	3	0	0	0	4	1	4 (2.0)	3 (1.5)	41*(5.1)
0601250-01k	16	22-(2)	48	1.6, 1.4	100	1	0	2	0	0	5	0	4 (4.0)	3 (3.0)	15 (3.8)
					100	0	1	2	3	0	6	1	5 (5.0)	5 (5.0)	32 (8.0)
					200	1	1	4	5	0	11	1	9 (4.5)	8 (4.0)	47*(5.9)
0601250-01k	32	22-(2)	40	0.0, 0.0	強い細胞毒性のため観察せず										
0601250-01k	63	22-(2)	33	Tox, Tox	強い細胞毒性のため観察せず										
0601250-01k	127	22-(2)	31	Tox, Tox	強い細胞毒性のため観察せず										
0601250-01k	254	22-(2)	22	Tox, Tox	強い細胞毒性のため観察せず										
0601250-01k	507	22-(2)	18	NA	強い細胞毒性のため原本作製せず										
MMC	0.05	22-(2)	NA	NA	100	3	31	48	4	0	86	3	53 (53.0)	51 (51.0)	0 (0.0)
					100	3	32	46	2	0	83	2	46 (46.0)	45 (45.0)	0 (0.0)
					200	6	63	94	6	0	169	5	99 (49.5)	96*(48.0)	0 (0.0)

gap: 染色体型および染色体型のギヤップ, ctb: 染色体切断, cte: 染色体交換, cse: 染色体交換 (二動原体性染色体および環状染色体), mul: 多染色体異常, MMC: マイトマイシンC, NA: 分析せず。

1) 媒体として培養液を用いた。 2) コールターカウンターにより各デインジューにおける細胞数を測定し、増殖抑制の指標とした。 3) デインジューあたり500細胞分析した。 4) 1細胞中に10個以上の異常がある場合は異常の数を10とスコアした。 5) アテニエーションおよび未成熟染色体凝縮などであるが、構造異常からは除外した。 6) 各群800細胞分析した。 7) コ克蘭・アーミティッジの傾向性検定 ($p < 0.01$, 片側) を行った。

*: フインジャーの直接確率法で有意差あり ($p < 0.01$, 片側)。

表5 多層カーボンナノチューブ(12127PE)でチャイニーズ・ハムスター培養細胞(CHL/IU細胞)を6時間処理(S9 mix非存在下)したときの染色体分析結果

群	濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	S9 mix	処理 時間 (hrs)	細胞 増殖率 (%)	分裂 ³⁾ 指数 (%)	構造異常の種類と数				分析 細胞数	倍 数 性 ⁶⁾ 細胞の数 (%)	傾向性検定 ⁷⁾ 構造 異常				
						gap	ctb	cte	cse				mul ⁴⁾	合計	その他 ⁵⁾ の異常	構造異常を有する細胞の数 ギャップを 含む(%)
陰性対照 ¹⁾	0	-	6-(18)	100	NA	100	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (0.8)		
						100	1	0	0	0	3	0	3 (3.0)	2 (2.0)	4 (1.0)	
						200	1	0	0	0	3	0	3 (1.5)	2 (1.0)	7 (0.9)	
12127PE	8	-	6-(18)	101	NA	観察せず										
12127PE	16	-	6-(18)	92	NA	観察せず										
12127PE	32	-	6-(18)	94	NA	観察せず										
12127PE	64	-	6-(18)	87	NA	観察せず										
12127PE	128	-	6-(18)	88	NA	100	2	0	1	1	0	0	4 (4.0)	2 (2.0)	1 (0.3)	
						100	1	1	0	0	0	2	2 (2.0)	1 (1.0)	0 (0.0)	
						200	3	1	1	1	0	0	6 (3.0)	3 (1.5)	1 (0.1)	
12127PE	256	-	6-(18)	83	NA	100	0	3	0	0	0	3	1 (2.0)	2 (2.0)	0 (0.0)	
						100	0	2	1	2	0	0	4 (4.0)	4 (4.0)	2 (0.5)	
						200	0	5	1	2	0	0	8 (3.0)	6 (3.0)	2 (0.3)	NA
12127PE	513	-	6-(18)	82	2.8, 4.0	100	0	1	0	0	0	1	1 (1.0)	1 (1.0)	1 (0.3)	
						100	0	3	2	3	0	0	8 (6.0)	6 (6.0)	1 (0.3)	
						200	0	4	2	3	0	0	9 (3.5)	7 (3.5)	2 (0.3)	
MMC	0.1	-	6-(18)	NA	NA	100	5	25	57	0	0	10	97 (52.0)	51 (51.0)	2 (0.5)	
						100	2	31	65	4	0	0	102 (52.0)	51 (51.0)	0 (0.0)	
						200	7	56	122	4	0	10	199 (52.0)	102*(51.0)	2 (0.3)	

gap: 染色体型および染色体型のギャップ, ctb: 染色体切断, cte: 染色体交換, cse: 染色体切断, cse: 染色体交換 (二動原体性染色体および環状染色体), mul: 多染色体異常, MMC: マイトマイシンC, NA: 分析せず。

1) 媒体として培養液を用いた。 2) コールターカウンターにより各ディビジョンにおける細胞数を測定し、増殖抑制の指標とした。 3) ディンジュあたり500細胞分析した。 4) 1細胞中に10個以上の異常がある場合は異常の数を10とスコアした。 5) アテニエーションおよび未成熟染色体凝縮などであるが、構造異常からは除外した。 6) 各群800細胞分析した。 7) コクラン・アーミティッジの傾向性検定 ($p < 0.01$, 片側)を行った。

*: フィンジュの直接確率法で有意差あり ($p < 0.01$, 片側)。

表6 多層カーボンナノチューブ(12127PE)でチャイニーズ・ハムスター培養細胞(CHL/IU細胞)を6時間処理(S9 mix存在下)したときの染色体分析結果

群	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	S9 mix	処理 時間 (hrs)	細胞 ²⁾ 増殖率 (%)	分裂 ³⁾ 指数 (%)	分析 細胞数	構造異常の種類と数				その他 ⁵⁾ の異常	構造異常を有する細胞の数		倍 ⁶⁾ 数性 細胞の数 (%)	傾向性検定 ⁷⁾ 構造的 異常		
							gap	ctb	cte	csb		cse	mul ⁴⁾			合計	ギャップを 含む(%)
陰性対照 ¹⁾	0	+	6-(18)	100	NA	100	3	1	2	0	0	6	3	5 (5.0)	2 (2.0)	3 (0.8)	
						100	0	0	0	1	0	1	1	1 (1.0)	1 (1.0)	1 (0.3)	
						200	3	1	2	0	1	0	7	6 (3.0)	3 (1.5)	4 (0.5)	
12127PE	7	+	6-(18)	97	NA		観察せず										
12127PE	13	+	6-(18)	87	NA		観察せず										
12127PE	27	+	6-(18)	83	NA		観察せず										
12127PE	53	+	6-(18)	79	NA		観察せず										
12127PE	107	+	6-(18)	75	NA	100	2	1	3	0	0	6	0	4 (4.0)	2 (2.0)	3 (0.8)	
						100	1	6	1	1	0	9	2	5 (5.0)	5 (5.0)	2 (0.5)	
						200	3	7	4	1	0	15	2	9 (4.5)	7 (3.5)	5 (0.6)	
12127PE	214	+	6-(18)	72	NA	100	1	2	2	0	0	7	1	6 (6.0)	5 (5.0)	0 (0.0)	
						100	1	1	4	0	0	6	2	5 (5.0)	4 (4.0)	4 (1.0)	
						200	2	3	6	2	0	13	3	11 (5.5)	9 (4.5)	4 (0.5)	NA
12127PE	427	+	6-(18)	70	1.6, 2.4	100	0	1	2	1	0	4	0	3 (3.0)	3 (3.0)	0 (0.0)	NA
						100	0	4	3	1	0	8	2	8 (8.0)	8 (8.0)	5 (1.3)	
						200	0	5	5	2	0	12	2	11 (5.5)	11 (5.5)	5 (0.6)	
CP	10	+	6-(18)	NA	NA	100	8	46	225	0	0	299	7	93 (93.0)	93 (93.0)	1 (0.3)	
						100	1	50	247	0	0	318	1	97 (97.0)	97 (97.0)	0 (0.0)	
						200	9	96	472	0	0	617	8	190 (95.0)	190*(95.0)	1 (0.1) ⁸⁾	

gap:染色体型および染色体型のギャップ, ctb:染色体切断, cte:染色体切断, cse:染色体切断, cse:染色体交換(二動原体性染色体および環状染色体), mul:多染色体異常, CP:シクロホスファミド, NA:分析せず。

1) 媒体として培養液を用いた。 2) コールターカウンタールにより各ディンシユにおける細胞数を測定し、増殖抑制の指標とした。 3) ディンシユあたり500細胞分析した。 4) 1細胞中に10個以上の異常がある場合は異常の数を10とスコアした。 5) アネユエーションおよび未成熟染色体凝縮などであるが、構造異常からは除外した。 6) 各群800細胞分析した。 7) コクラン・アミーティツジの傾向性検定($p < 0.01$, 片側)を行った。 8) 792細胞分析した。

*:フイツジヤ一の直接確率法で有意差あり($p < 0.01$, 片側)。

表7 多層カーボンナノチューブ(12127PE)でチャイニーズ・ハムスター培養細胞(CHL/IU細胞)を24時間連続処理(S9 mix 非存在下)したときの染色体分析結果

群	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	処理 時間 (hrs)	細胞 増殖率 (%)	分裂 ³⁾ 指数 (%)	分析 細胞数	構造異常の種類と数			倍率性 ⁶⁾ 細胞の数 (%)	傾向性検定 ⁷⁾ 構造 異常						
						gap	ctb	cte			csb	cse	mul ⁴⁾	合計	その他 ⁵⁾ の異常	構造異常を有する細胞の数を ギャップを 含む(%)
陰性対照 ¹⁾	0	22-(2)	100	NA	100	0	3	0	0	0	3	3 (3.0)	3 (3.0)	0 (0.0)		
					100	0	1	0	0	0	1	1 (1.0)	1 (1.0)	2 (0.5)		
					200	0	4	0	0	0	4	4 (2.0)	4 (2.0)	2 (0.3)		
12127PE	8	22-(2)	94	NA	観察せず											
12127PE	16	22-(2)	92	NA	観察せず											
12127PE	32	22-(2)	94	NA	観察せず											
12127PE	64	22-(2)	89	NA	100	2	2	1	0	0	5	5 (5.0)	3 (3.0)	1 (0.3)		
					100	0	1	2	0	0	3	3 (3.0)	3 (3.0)	1 (0.3)		
					200	2	3	3	0	0	8	8 (4.0)	6 (3.0)	2 (0.3)		
12127PE	128	22-(2)	86	NA	100	2	1	1	0	0	4	4 (4.0)	2 (2.0)	0 (0.0)		
					100	2	1	1	2	0	6	6 (6.0)	4 (4.0)	2 (0.5)		
					200	4	2	2	2	0	10	10 (5.0)	6 (3.0)	2 (0.3)	NA	
12127PE	256	22-(2)	83	2.0, 2.8	100	0	0	2	1	0	3	2 (2.0)	2 (2.0)	1 (0.3)	NA	
					100	1	0	0	0	0	1	1 (1.0)	0 (0.0)	1 (0.3)	NA	
					200	1	0	2	1	0	4	3 (1.5)	2 (1.0)	2 (0.3) ⁸⁾		
12127PE	513	22-(2)	84	3.8, 1.2	標本あたりの分析可能な分裂中期細胞数が少ないことから観察せず											
MMC	0.05	22-(2)	NA	NA	100	4	32	60	8	1	0	105	64 (64.0)	62 (62.0)	0 (0.0)	
					100	2	33	58	3	4	0	100	4	58 (58.0)	57 (57.0)	0 (0.0)
					200	6	65	118	11	5	0	205	4	122 (61.0)	119 *(59.5)	0 (0.0)

gap: 染色体型および染色体型のギャップ, ctb: 染色体切断, cte: 染色体切断, cse: 染色体切断, csb: 染色体交換, csc: 染色体交換 (二動原体染色体および環状染色体), mul: 多染色体異常, MMC: マイトマイシンC, NA: 分析せず。

1) 媒体として培養液を用いた。 2) コールターカウンターにより各ディッシュにおける細胞数を測定し、増殖抑制の指標とした。 3) デイジューあたり500細胞分析した。 4) 1細胞中に10個以上の異常がある場合は異常の数を10とスコアした。 5) アネユエーションおよび未成熟染色体凝縮などであるが、構造異常からは除外した。 6) 各群800細胞分析した。 7) コクラン・アーマーディッシュの傾向性検定 ($p < 0.01$, 片側)を行った。 8) 704細胞分析した。

*: フライッシュの直接確率法で有意差あり ($p < 0.01$, 片側)。

表8 多層カーボンナノチューブ(03121TH, 04519DCおよび12127PE)でBhas 42細胞を処理したのきの形質転換試験結果

物質名	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	イニシエーション試験					プロモーション試験				
		細胞増殖率 ³⁾		陽性形質転換巢			細胞増殖率 ³⁾		陽性形質転換巢		
		ウェル数	(%)	ウェル数	総数	平均 \pm SD ⁴⁾	ウェル数	(%)	ウェル数	総数	平均 \pm SD ⁴⁾
無処理対照 ¹⁾		3	101.9	6	10	1.7 \pm 0.8	3	101.5	6	6	1.0 \pm 0.6
陰性対照 ²⁾	0	3	100.0	6	12	2.0 \pm 0.9	3	100.0	6	13	2.2 \pm 1.5
03121TH	0.12	3	107.1	6	5	0.8 \pm 1.3	3	105.6	6	10	1.7 \pm 1.2
	0.25	3	115.0	6	4	0.7 \pm 1.2	3	105.9	6	10	1.7 \pm 0.8
	0.49	3	112.1	6	5	0.8 \pm 0.8	3	104.0	6	8	1.3 \pm 1.4
	0.98	3	116.9	6	7	1.2 \pm 1.0	3	104.3	6	7	1.2 \pm 1.0
	2.0	3	112.3	6	11	1.8 \pm 0.4	3	104.2	6	7	1.2 \pm 0.8
	3.9	3	107.6	6	5	0.8 \pm 1.0	3	100.9	6	7	1.2 \pm 0.8
	7.9	3	87.9	6	10	1.7 \pm 1.0	3	101.2	6	5	0.8 \pm 0.8
	16	3	53.4	6	10	1.7 \pm 1.2	3	96.4	6	7	1.2 \pm 1.0
	31	3	22.1	6	3	0.5 \pm 0.5	3	56.5	6	12	2.0 \pm 1.7
	63	3	12.7	6	5	0.8 \pm 1.0	3	30.0	6	Tox	
126	3	10.2	6	0	0.0 \pm 0.0	3	32.5	6	Tox		
252	3	12.8	6	0	0.0 \pm 0.0	3	40.7	6	Tox		
04519DC	0.12	3	105.1	6	9	1.5 \pm 0.8	3	107.4	6	11	1.8 \pm 1.2
	0.25	3	107.8	6	9	1.5 \pm 0.8	3	107.9	6	16	2.7 \pm 1.4
	0.49	3	108.4	6	13	2.2 \pm 1.2	3	105.9	6	11	1.8 \pm 1.3
	0.99	3	108.7	6	11	1.8 \pm 1.0	3	108.9	6	5	0.8 \pm 1.0
	2.0	3	108.8	6	13	2.2 \pm 1.0	3	102.2	6	4	0.7 \pm 0.8
	3.9	3	109.8	6	3	0.5 \pm 0.8	3	108.5	6	12	2.0 \pm 1.4
	7.9	3	111.0	6	11	1.8 \pm 1.2	3	105.3	6	10	1.7 \pm 1.0
	16	3	111.7	6	10	1.7 \pm 1.2	3	111.6	6	3	0.5 \pm 0.5
	32	3	102.6	6	9	1.5 \pm 1.0	3	108.6	6	12	2.0 \pm 0.6
	63	3	89.6	6	9	1.5 \pm 0.8	3	116.2	6	5	0.8 \pm 1.0
126	3	49.9	6	6	1.0 \pm 0.9	3	123.5	6	15	2.5 \pm 1.5	
252	3	16.6	6	2	0.3 \pm 0.5	3	139.5	6	12	2.0 \pm 1.4	
12127PE	0.12	3	109.4	6	13	2.2 \pm 1.9	3	101.3	6	8	1.3 \pm 1.0
	0.24	3	113.9	6	9	1.5 \pm 1.0	3	109.1	6	11	1.8 \pm 1.0
	0.49	3	112.1	6	12	2.0 \pm 1.4	3	105.2	6	6	1.0 \pm 0.9
	0.98	3	113.9	6	8	1.3 \pm 0.8	3	108.6	6	5	0.8 \pm 0.8
	2.0	3	113.1	6	9	1.5 \pm 1.4	3	103.7	6	5	0.8 \pm 1.0
	3.9	3	113.7	6	9	1.5 \pm 1.0	3	104.3	6	3	0.5 \pm 0.8
	7.8	3	114.1	6	11	1.8 \pm 1.8	3	106.8	6	2	0.3 \pm 0.5
	16	3	117.2	6	9	1.5 \pm 1.0	3	106.2	6	0	0.0 \pm 0.0
	31	3	112.3	6	10	1.7 \pm 1.6	3	101.0	6	1	0.2 \pm 0.4
	63	3	112.7	6	13	2.2 \pm 1.0	3	107.4	6	3	0.5 \pm 0.8
125	3	96.4	6	9	1.5 \pm 1.0	3	110.7	6	2	0.3 \pm 0.5	
250	3	73.3	6	14	2.3 \pm 1.2	3	118.9	6	7	1.2 \pm 0.8	
MCA	1	3		6	64 *	10.7 \pm 2.8	NT		NT		
TPA	0.05	NT		NT			3	162.5	6	64 *	10.7 \pm 1.2

MCA: 3-メチルコラントレン(イニシエーター)

TPA: ホルボール 12-ミリスタート 13-アセタート(プロモーター)

NT: 実施せず。

Tox: 強い細胞毒性のため、形質転換巢の評価が可能な細胞密度が得られなかった。

1): 培養液交換のみ行った。

2): 超音波処理したウシ血清(FCS)を5 vol%添加した。

3): 細胞をクリスタルバイオレット液で染色し、抽出した色素の吸光度を測定し、陰性対照群を100%とする相対値を算出した。

4): ウェルあたりの平均陽性形質転換巢数を形質転換率とした。

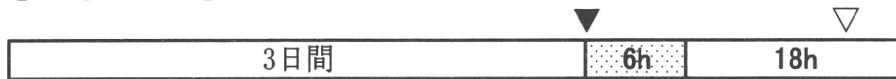
*: Dunnett検定により、陰性対照群と比較して陽性形質転換巢数に有意差($p < 0.05$)あり。

表 9 4 種の多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の形状と染色体異常試験および形質転換試験結果

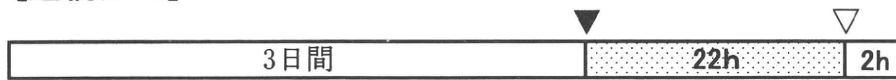
MWCNT	購入元	ロット番号	直径 (nm)		長さ (μm)	細胞接触		試験結果		
			外径	内径		形状	SA	Poly (最大誘発率)	TF	
0312TH	Aldorich-Sigma	0312TH	110~170	Unknown	5~9	チューブ	-	+	(26.8%)	-
0601250-01k	Mitsui	0601250-01k	70~130	Unknown	1~5	チューブ	-	+	(12.0%)	NT
04519DC	Aldorich-Sigma	04519DC	40~70	5~40	0.5~2	集塊	-	-	-	-
12127PE	Aldorich-Sigma	12127PE	10~15	2~6	0.1~10	集塊	-	-	-	-

SA : 染色体の構造異常誘発性、Poly : 倍数性細胞誘発性、TF : 形質転換試験 (*in vitro* 発がん性)、NT : 実施せず

[短時間処理]



[連続処理]



6 cmディッシュあたり 2×10^4 個のCHL/IU細胞を播種

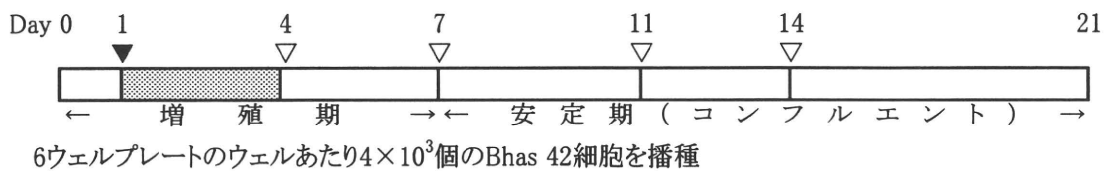
▼: 処理液(被験物質を含む培養液)と交換

■: 処理時間

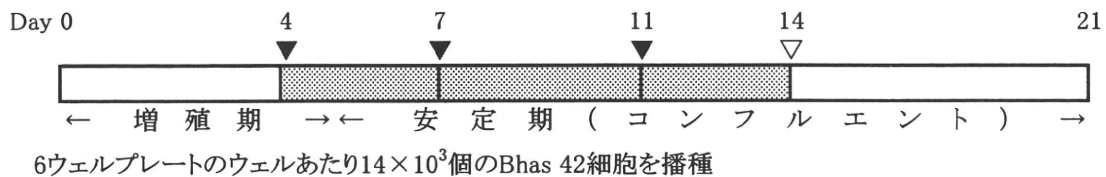
▽: コルセミドを添加

図 1 CHL/IU 細胞を用いる染色体異常試験スケジュール

[イニシエーション試験]



[プロモーション試験]



▼: 処理液(被験物質を含む培養液)と交換

▽: 培養液と交換

図 2 Bhas42 細胞を用いる形質転換試験スケジュール

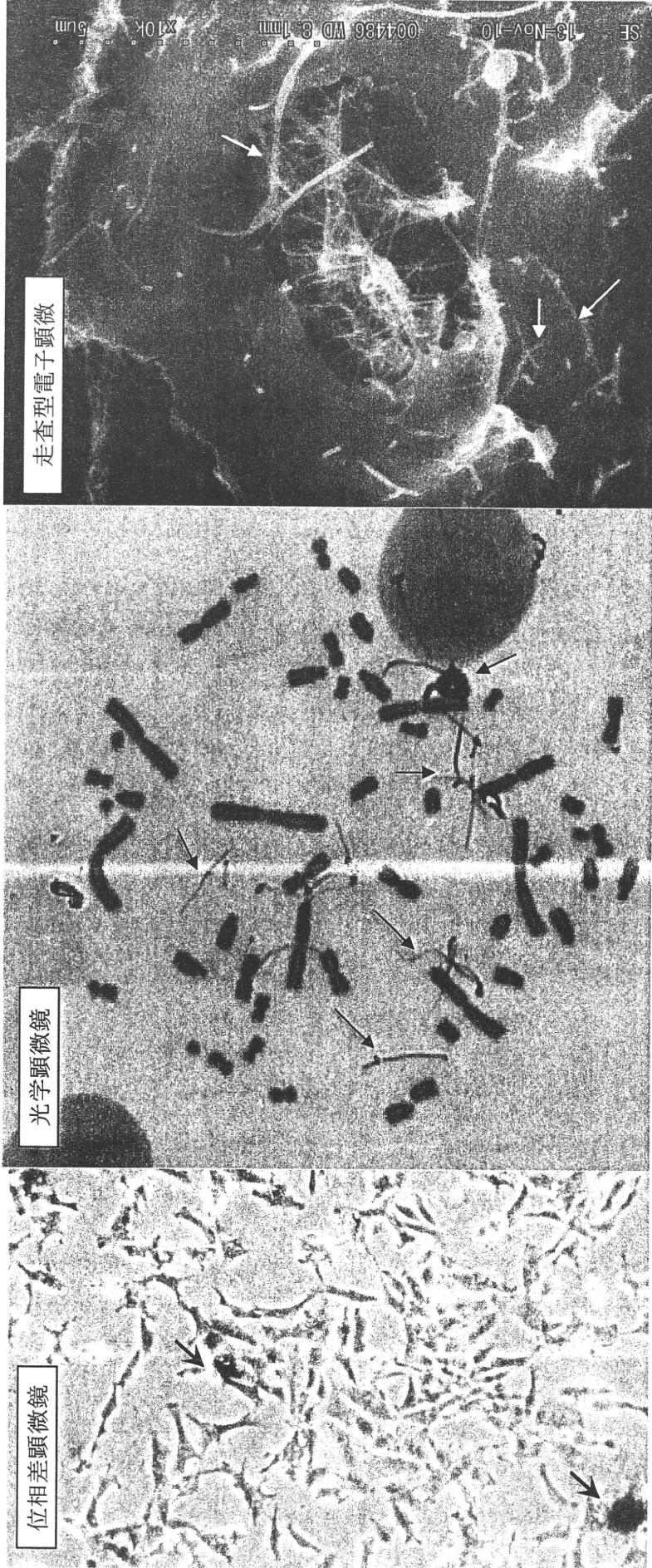
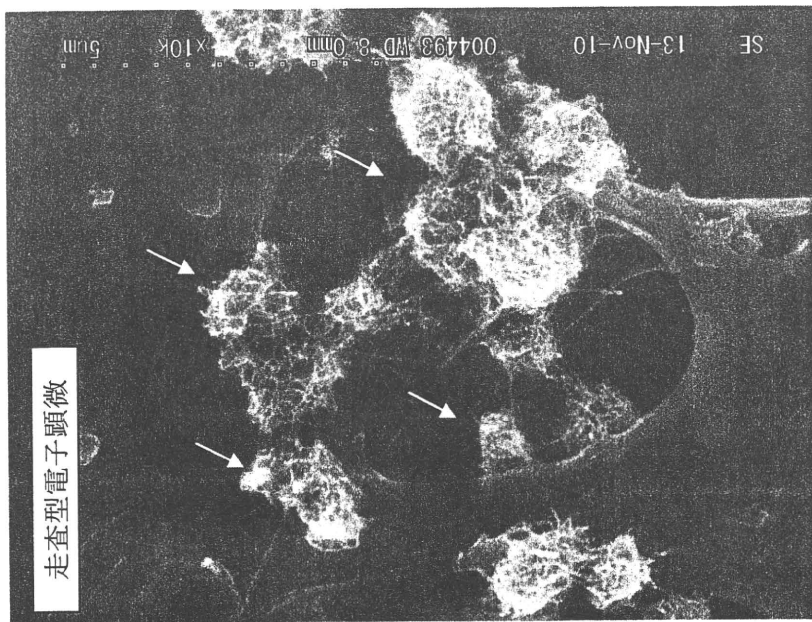
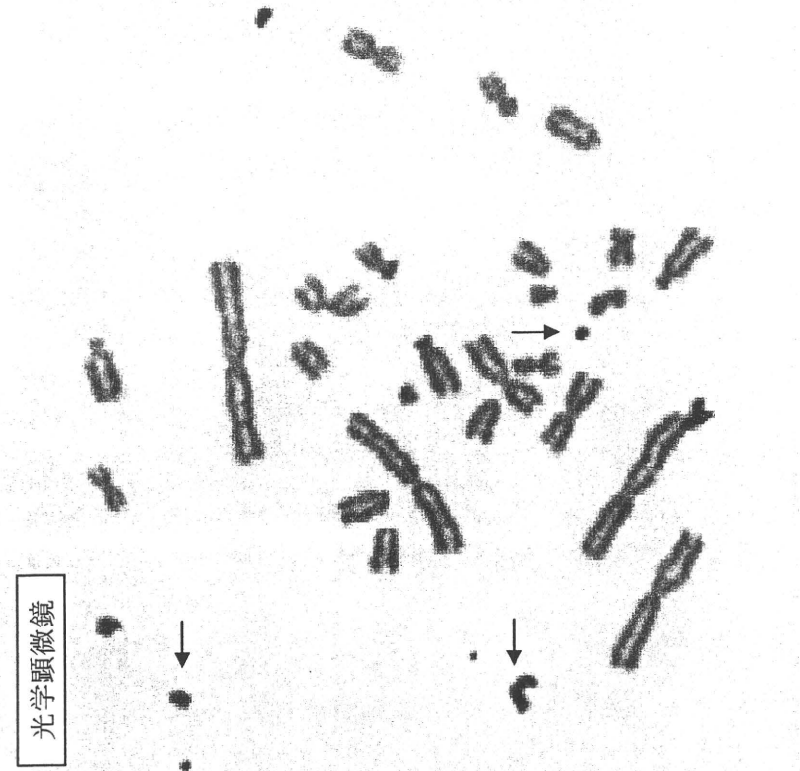


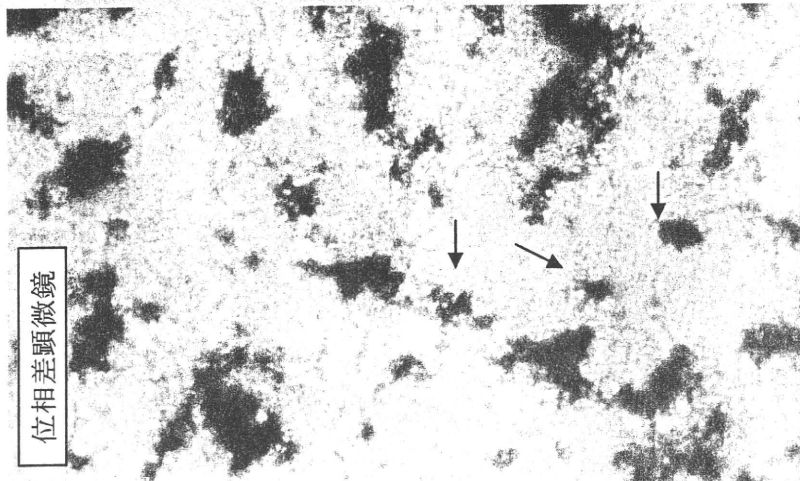
图3 MWCNT (0601250-01k) で22時間連続処理 (16 μg/mL) したCHL/IU細胞の顕微鏡像



走査型電子顕微鏡



光学顕微鏡



位相差顕微鏡

図 4 MWCNT (12127PE) で 22 時間連続処理 (256 $\mu\text{g}/\text{mL}$) した CHL/IU 細胞の顕微鏡像

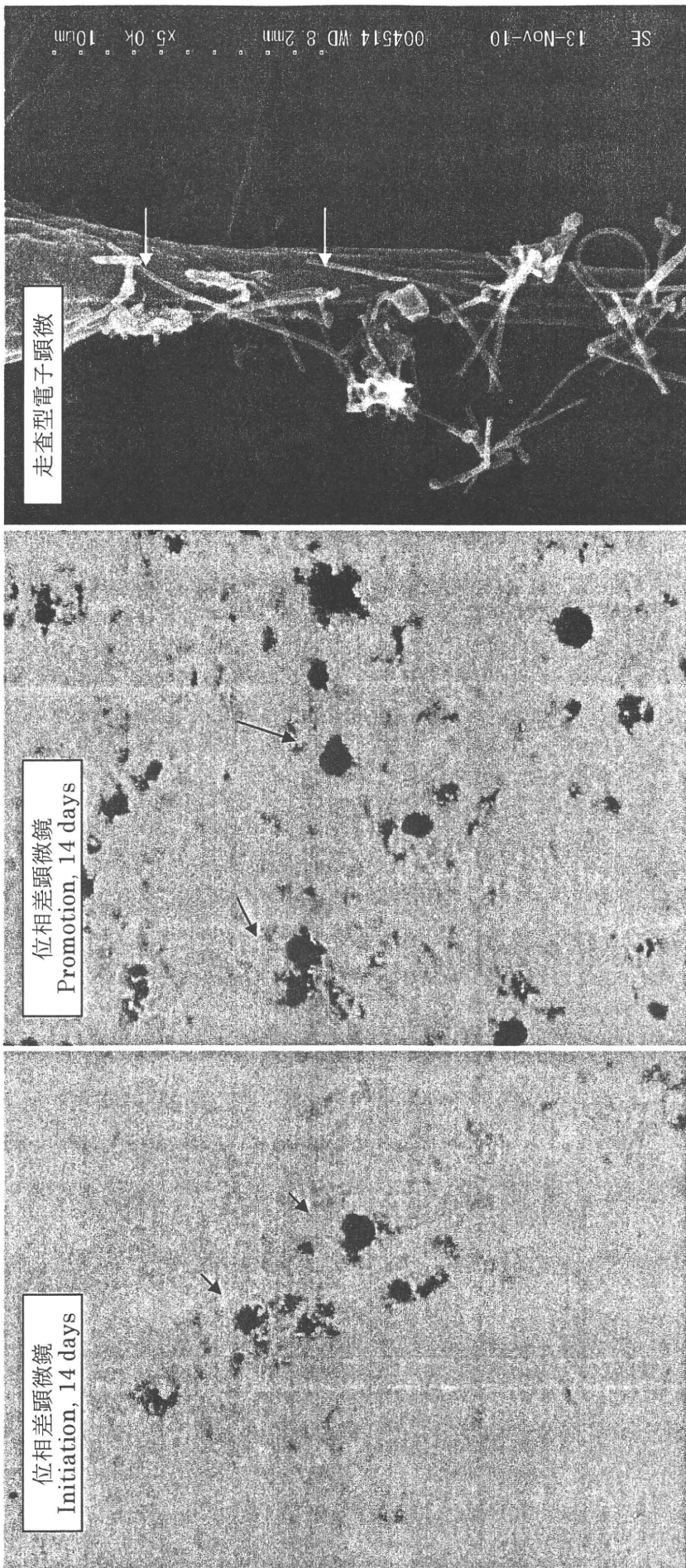


図5 MWCNT (03121TH) で処理 (31 $\mu\text{g}/\text{mL}$) した Bhas42 細胞の顕微鏡像

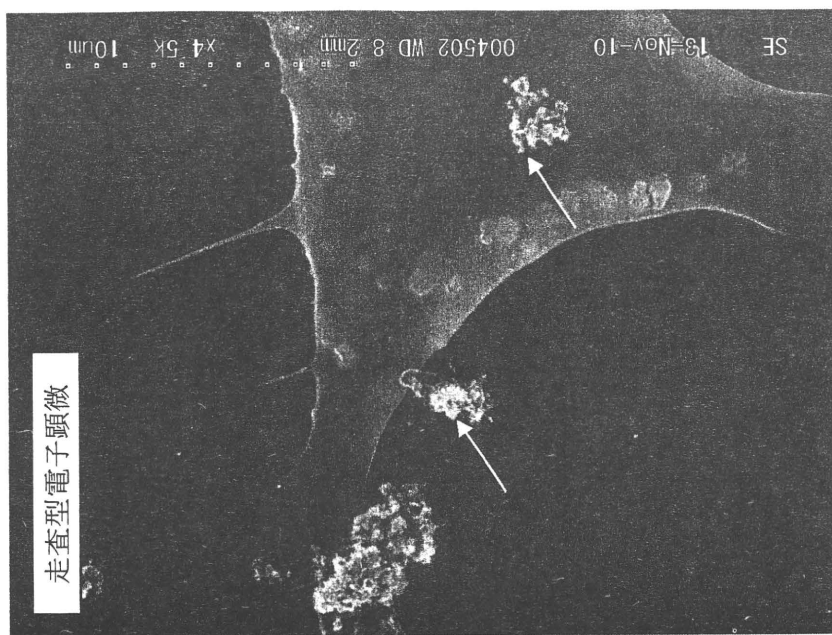
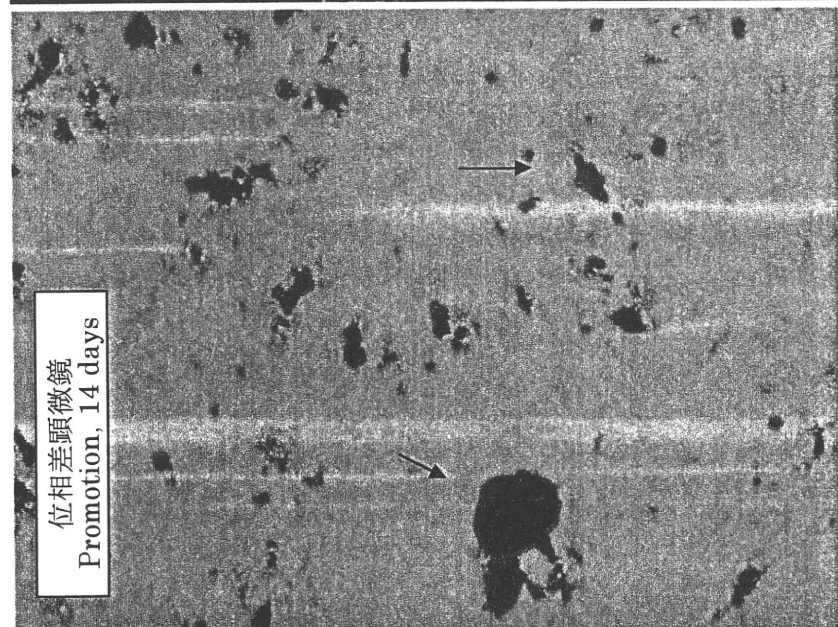
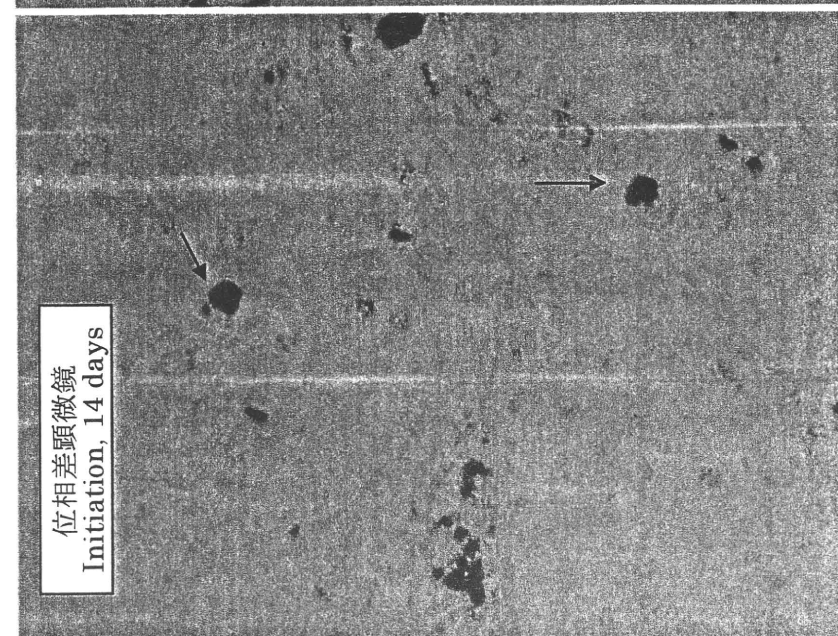
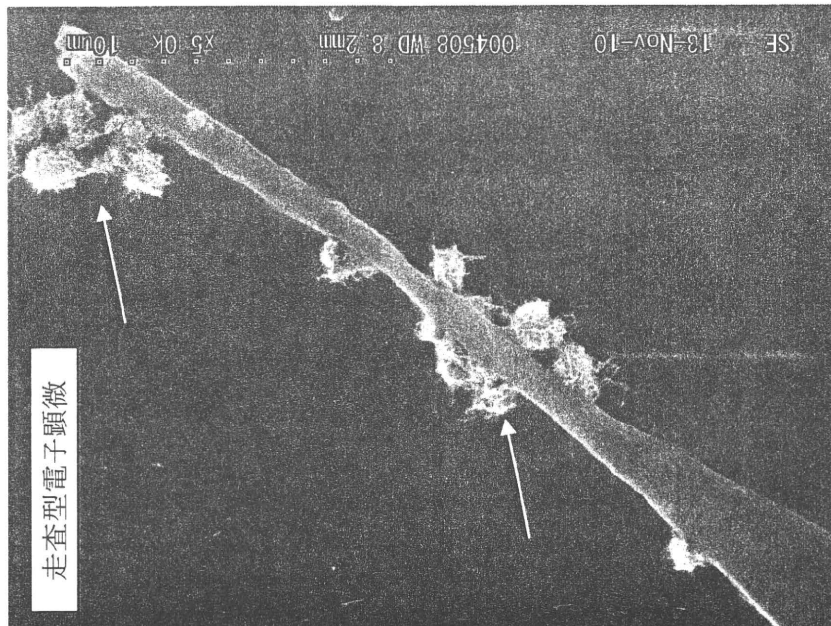
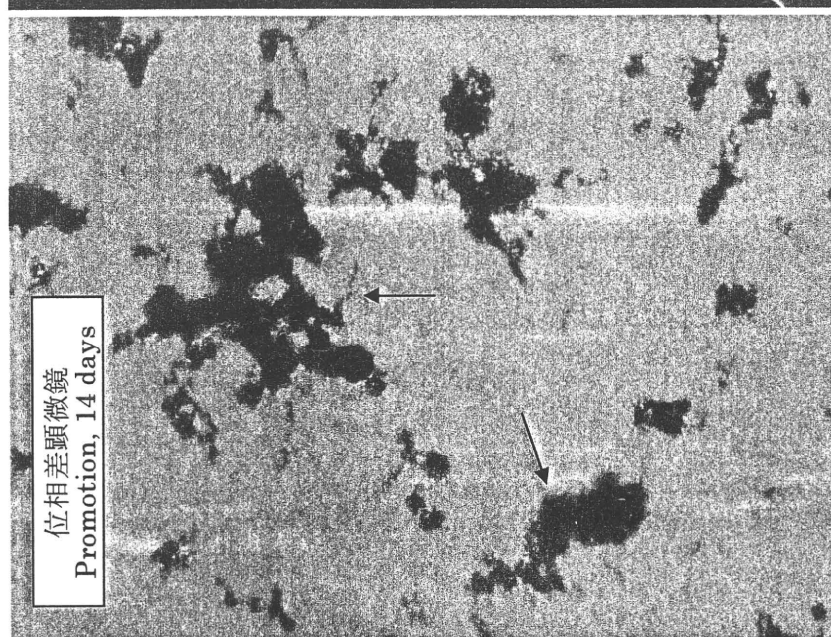


図 6 MWCNT (04519DC) で処理 (63 $\mu\text{g}/\text{mL}$) した Bhas42 細胞の顕微鏡像



走査型電子顕微鏡



位相差顕微鏡
Promotion, 14 days



位相差顕微鏡
Initiation, 14 days

図7 MWCNT (12127PE) で処理 (125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) した Bhas42 細胞の顕微鏡像

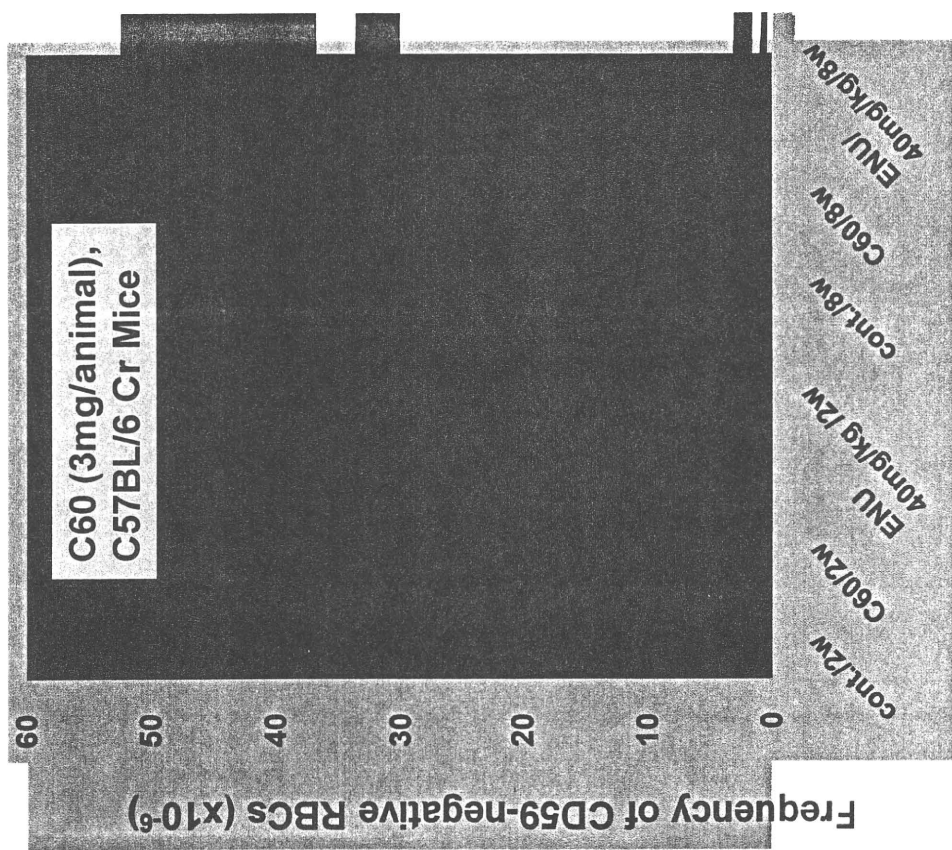


図 8 C60 (3mg/匹) を投与したマウスでの Pig-a 遺伝子突然変異

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)
分担研究報告書

研究課題名: ナノマテリアルの健康影響評価手法の総合的開発及び体内動態を含む
基礎的有害性情報の集積に関する研究

分担研究課題名: ナノマテリアルの神経細胞機能・分化に
与える影響に関する基礎的研究

分担研究者: 佐藤 薫 国立医薬品食品衛生研究所・薬理部第一室長

研究要旨

本研究はナノマテリアルの健康影響評価の一環として、神経細胞機能・分化に与える影響について基礎検討をおこなっている。昨年度、PBS 中カーボンナノチューブ (CNT) の超音波処理上清が神経幹細胞増殖抑制作用、ミクログリア細胞毒性を持つこと、超音波処理上清に金属が溶出していることを明らかにした。本年度はこの中で、神経幹細胞増殖抑制作用、ミクログリア細胞毒性を持つ金属種を明らかにした。CNT の超音波処理上清の作用への金属の関与が強く示唆された。

A. 研究目的

昨年度、CNT 超音波処理上清が神経幹細胞増殖抑制作用(図 1A)、ミクログリア細胞毒性(図 1B)を持つこと、超音波処理上清に金属(Mn, Rb, CS, Tl, Fe)が溶出していることを明らかにした(表 1)。本年度はこれらの金属が単独で神経幹細胞増殖抑制作用

用、ミクログリア細胞毒性を持つかどうか検討し、CNT の超音波処理上清の作用への関与を明らかにする。

B. 研究方法

0. CNT 調整

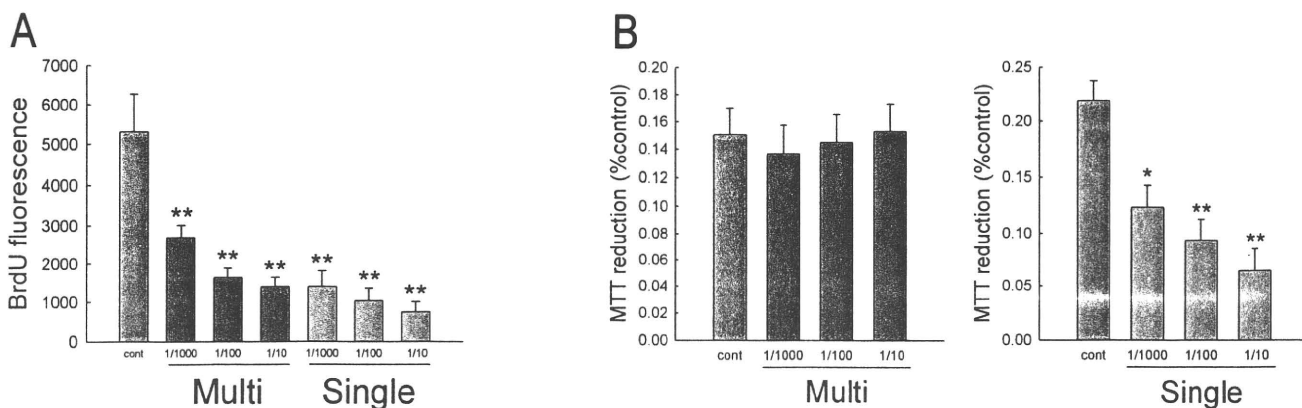


図 1. CNT の神経幹細胞増殖抑制作用およびミクログリア細胞毒性

Multi, single の両サンプルともに 1 mg/ml で PBS に添加し、5 時間超音波処理した上清を 1/10, 1/100, 1/1000 に希釈し 24 時間細胞に添加した。両サンプルともに濃度依存的に神経幹細胞増殖抑制作用を呈した(A)。single のみが濃度依存的にミクログリア細胞毒性を示した(B)。(*:p<0.05, **:p<0.01 vs. control group, Tukey's test following ANOVA, N=6)