

201035026A

# 厚生労働科学研究費補助金研究報告書

## 化学物質リスク研究事業

### カーボンナノマテリアルによる肺障害と 発がん作用の中期評価法とその作用の分子 機序解析法の開発に関する研究

平成22年度

総括・分担研究報告書

研究代表者 津田 洋幸

名古屋市立大学

平成23年(2011年)5月

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

カーボンナノマテリアルによる肺障害と発がん作用の中期評価法と  
その作用の分子機序解析法の開発に関する研究 (H22-化学-一般-005)

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 津田 洋幸

平成 23 年 (2011 年) 5 月

## 目 次

I. 総括研究報告書	1
カーボンナノマテリアルによる肺障害と発がん作用の中期評価法と その作用の分子機序解析法の開発に関する研究 津田 洋幸	2
II. 研究分担報告書	12
1. ナノマテリアルの炎症・免疫修飾作用の解析 五十嵐 良明	13
2. 呼吸器系細胞における細胞障害評価系の確立 今泉 祐治	22
3. 発がんに関与する貪食マクロファージの <i>in vivo</i> および <i>in vitro</i> 作用機序解析 酒々井 眞澄	24
4. C60 フラーレンの肺内噴霧による肺発がんメカニズムの検索 二口 充	29
5. カーボンナノマテリアルによる肺毒性と発がん作用の中期評価法と その分子機序解析法の開発 津田 洋幸	33
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	36
IV. 研究成果の刊行物・別冊	40

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)

I. 総括研究報告書

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）

総括研究報告書

研究課題名：カーボンナノマテリアルによる肺障害と発がん作用の中期評価法とその作用の  
分子機序解析法の開発に関する研究

研究代表者：津田 洋幸 名古屋市立大学津田特任教授研究室 特任教授

研究要旨

1) カーボンナノマテリアルである単層または各社の多層カーボンナノチューブ (SW/MWCNT) およびフラーレン (C60) の肺内噴霧による毒性と発がん性について、以下の結果が得られた。(1) 肺マクロファージ負荷試験において、SWCNT-N (日機装) では神経関連遺伝子、MWCNT-N (日機装) では細胞増殖因子、MWCNT-7 (三井) では炎症性サイトカイン、C60 (フロンティアカーボン) では肺胞上皮増殖因子、アスベスト(crocidolite, CR0, UICC)では IL-1 $\beta$  の明瞭な増加がみられたが、これらに明らかな共通性はなかった。(2)9 日間または 14 日間投与試験では、炎症性変化、肺胞上皮と中皮細胞の増殖性変化と遺伝子・タンパク発現、CNT の肺組織から胸腔内への移行について解析中である。(3)肺発がん二段階試験法は経過中である。2) CNT の炎症反応および免疫/アレルギー反応増強作用の有無についての評価法開発では、夾雑物の S および Fe が多いことから、これらの発がん性への関与について、*in vitro*と動物実験で明らかにするための基礎データを得た。SiO<sub>2</sub>はわずかに IL-8 産生量を増加させ、炎症反応とともに免疫機能に影響を与える可能性が示唆された。3) CNT の呼吸器毒性・発がん機構解明にあたり、ラット気道上皮の繊毛運動の制御機構を解析し、細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度と膜電位は過分極により電位非依存性経路を介した Ca<sup>2+</sup>流入が増大し鞭毛運動に影響することを明らかにした。繊毛上皮障害や機能への影響を検討する上で基礎となる知見を得た。

研究分担者

五十嵐良明	国立医薬品食品衛生研究所 生 活衛生化学部 室長	酒々井眞澄	名古屋市立大学大学院医学研究 科 分子医学講座分子毒性学分 野 教授
今泉祐治	名古屋市立大学大学院薬学研究 科 細胞分子薬効解析学研究室 教授	二口 充	名古屋市立大学大学院医学研 究科 分子医学講座分子毒性学 分野 准教授

## 研究協力者

澤田英士 名古屋市立大学大学院薬学研究  
科 細胞分子薬効解析学研究室  
大羽輝弥 名古屋市立大学大学院薬学研究  
科 細胞分子薬効解析学研究室  
深町勝巳 名古屋市立大学大学院医学研究  
科 分子医学講座分子毒性学分  
野 助教  
徐 結苟 名古屋市立大学大学院医学研究  
科 研究員  
David B. Alexander 名古屋市立大学大学院  
医学研究科 研究員

### A. 研究目的

単層または多層カーボンナノチューブ (SW/MWCNT) および C60 の毒性と発がん性について、いままでに開発してきた、(1) 肺マクロファージ負荷試験、(2) 9日または14日間投与試験 (投与方法として経気管内スプレー法(IPS)を行う) による肺胞上皮と中皮の変化、および (3) 肺2段階発がん試験法による発がんプロモーション作用の分子レベルでの検索による一連の *in vitro-in vivo* 系における評価法の妥当性を検証する (津田・酒々井・二口)。カーボンナノナノマテリアルの炎症反応および免疫、特にアレルギー反応に対する増強作用の有無について、初期反応あるいは全身性の炎症および免疫反応性に注目した評価法を開発する。今年度は、カーボンナノマテリアル中の金属の分析、カーボンブラックの粒子径の測定等を行い、形状以外の影響を調べる。また、ナノマテリアルの曝露による炎症性サイトカインの発現を調べ、基礎

データをとる (五十嵐)。カーボンナノチューブの呼吸器毒性と発がん機構を解明するにあたり、曝露初期における直接的な呼吸器細胞障害機構を解析する目的で、ラット気管上皮や繊毛細胞における生 (異常な分化・増殖はがん化を招く) と死 (毒性発現による細胞死) の分子機構の解明を行い、呼吸器細胞における細胞障害評価系を確立する (今泉)。

### B. 研究方法

単層または多層カーボンナノチューブ (SW/MWCNT) の肺内噴霧による毒性と発がん性について、これまでに開発してきた、1) 肺マクロファージ負荷試験: チオグリコレートを IPS して誘導したマクロファージからの炎症性サイトカインの産生の把握、2) 9日または14日間投与試験: 肺胞上皮と中皮細胞の増殖性変化の有無と程度について検討し、その分子機序を解析した。被検物質は日機装社製単層カーボンナノチューブ (SWCNT-N) と多層カーボンナノチューブ (MWCNT-N)、三井化学社製多層カーボンナノチューブ (MWCNT-7) を用い、陽性対照としてアスベスト (crocidolite, CRO, UICC) を使用した (津田)。

ヒト単球由来細胞株 THP-1 細胞を用いた *in vitro* の系で、エネルギー分散型蛍光 X 線分析装置を用いての金属量を分析した。ナノマテリアル懸濁液の粒度分布は動的光散乱法を原理とするゼータサイザーナノにより測定し、平均粒子径を求めた。ヒト単球由来細胞株 THP-1 細胞に種々の濃度の試験溶液を加えて 24~72 時間培養した後、市販測定キットを用

いて処理し、細胞懸濁液のATP量を測定した。細胞培養上清を回収し、炎症性サイトカイン (IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF, IL-12p70) 産生量を Cytometric Bead Array (CBA) 法により測定した (五十嵐)。

SWCNT-N、MWCNT-N および MWCNT-7 を用い、溶媒コポリマー中における CNT の分散状態の検討と肺内に投与した場合における生体反応の差異について検討を行った。マクロファージが貪食可能な CNT のサイズを考慮し MWCNT-N を篩板 (シーブ) にて濾過し、非濾過 (R)、濾過 (FT)、原液 (W) の3分画に分けて実験に用いた。ラット肺にチオグリコレートを噴霧して誘導した肺マクロファージに CNT を添加曝露後、その上清をヒト肺がん細胞株に曝露して細胞増殖に与える影響を解析した。

CNT に曝露した肺マクロファージにおいて DNA チップにて遺伝子発現に与える影響を解析した。さらに14日間投与試験による CNT およびマクロファージの挙動、肺および胸膜周辺像を観察した (酒々井)。

雌 SD ラットに、C60/氷砂糖懸濁液を用いて9日間投与試験を行い肺を採取した。右肺は炎症の程度および物質が肺内でどの細胞に取り込まれているかについて病理組織学および電顕的に検索した。またラットにおいて、チオグリコレートにて誘導した肺マクロファージ培養液に、C60 を加え培養上清を回収した。培養上清を用いてヒト肺上皮細胞の増殖に与える影響を検索した。さらに C60 を貪食することで肺マクロファージが分泌する因子を検索する目的でマクロファージの microarray 解析を行った (二口)。

ラット気道上皮組織から、コラゲナーゼ処理により細胞を単離し、顕微鏡下にて繊毛細胞にパッチクランプ法を適用し、膜電流を解析した。また蛍光色素 fura2 を用いることにより、細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度を測定した。ラット気道上皮組織から RNA を抽出し、イオンチャネル及びイオントランスポーターの mRNA 発現を real time PCR 法により半定量的に検討した (今泉)。

### C. 研究結果

1) 肺マクロファージ負荷試験: チオグリコレートの IPS により誘導されたマクロファージのアレイ解析において SWCNT-N では神経関連遺伝子、MWCNT-N では細胞増殖因子、MWCNT-7 では炎症性サイトカイン、CRO では IL-1 $\beta$  の増加がみられた。2) 9日間投与試験: SWCNT-N、MWCNT-N、MWCNT-7 の肺組織における炎症性変化、線維化の程度、肺上皮と中皮細胞の増殖性変化と遺伝子、タンパク発現、さらに CNT の肺組織から胸腔内への移行については組織学的に定量解析を実施中であり、平成23年度内に報告出来る予定である (津田)。

SW/MWCNT について残存金属量を分析した結果、製造会社によって異なる量の S、Fe が多く検出された。比較に用いたカーボンブラック (CB) の市販懸濁液は約 140 nm の平均粒子径を示した。酸化チタン (TiO<sub>2</sub>) 懸濁液は平均粒子径 100 nm 以下、シリカ (SiO<sub>2</sub>) 懸濁液は表示通りの平均粒子径を示した。ヒト単球由来細胞株 THP-1 細胞に対する各種ナノマテリアルの毒性を細胞内 ATP 量から判定した結果、SiO<sub>2</sub> および TiO<sub>2</sub> はいずれも 100  $\mu$ g/ml で 80%

以上の細胞生存率を示し、CB は  $\text{SiO}_2$  および  $\text{TiO}_2$  より若干強い細胞毒性を示した。THP-1 細胞に  $\text{TiO}_2$  および  $\text{SiO}_2$  を加えて 24~72 時間培養した時の炎症性サイトカインの産生量を測定した結果、 $\text{TiO}_2$  で処理した時のサイトカイン産生量はコントロールと差を認めないものの、 $\text{SiO}_2$  で処理した時は IL-8 産生量がわずかに増加した (五十嵐)。

MWCNT-N の FT 分画をコポリマー分散液に懸濁させた場合に分散性の良好な懸濁液が得られた。FT 分画を肺内投与したところ、肺胞に若干の炎症細胞浸潤を伴い、マクロファージが CNT を貪食している像を認めた。肺マクロファージに MWCNT-N の各分画を曝露後、その上清をヒト肺がん細胞株に曝露した結果、いずれの分画においてもがん細胞の有意な増殖促進を認めた。肺マクロファージに MWCNT-N の 3 分画と MWCNT-7 を曝露し、DNA チップ (遺伝子数 2 万) 解析を行った結果、増殖シグナル系とサイトカイン系の遺伝子群に固定されたスペクトラムが存在した。現在、タンパク発現と併せて検索を進めている (酒々井)。

C60 においては、1) 肺マクロファージ負荷試験: microarray 解析を行った結果、C60 を貪食させたマクロファージでは細胞増殖性サイトカインなどの発現が上昇していた。その増殖因子はヒト肺がん細胞に対する有意な増殖促進作用を示し、その作用はレセプター阻害剤処置により対照群と同程度にまで抑制された。2) 9 日間投与試験: 肺を病理組織学的に検索すると、C60 投与群でも軽度のリンパ球主体の炎症細胞浸潤巣が散見された。肺野には C60 を貪食したマクロファージの数が増加

していた。電子顕微鏡では、C60 はマクロファージ内に観察されたが、肺胞上皮細胞には見られなかった。肺組織から抽出した DNA を用いて 8-OHdG level を測定した結果、C60 群では対照群に比べ有意に増加していた (二口)。  
繊毛気管上皮の一次培養系の系では、(1) 膜電流を測定したところ、主な成分として内向き整流性  $\text{K}^+$  チャンネル電流を見出した。繊毛細胞だけを微小吸引ピペットで 30 個ほど採取し、主に  $\text{K}^+$  チャンネルに関して網羅的に RT-PCR 解析したところ、上記電流成分に対応した Kir2.1 チャンネルと、それ以外に数種の  $\text{K}^+$  チャンネル mRNA 発現を検出した。特に中コンダクタンス  $\text{Ca}^{2+}$  活性化  $\text{K}^+$  (IK) チャンネルは、Kir2.1 チャンネルとともに、特異的抗体を用いた細胞免疫化学染色によっても細胞膜上のタンパク発現も検出したが、意外なことに IK チャンネル電流は検出限界レベル以下であった。(2) 膜電位と細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の関係を明らかにするために、急性単離した繊毛細胞をパッチクランプ法による電位固定下、パッチピペットから  $\text{Ca}^{2+}$  感受性蛍光色素 fluo3 を細胞内へ導入し、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を測定した。その結果、膜電位を過分極させることにより、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が上昇することを発見した。(3) 繊毛運動を高速ビデオカメラで計測する方法について新たな手法の可能性を検討した (今泉)。

#### D. 考察

チオグリコレートの IPS により誘導したマクロファージのアレイ解析では肺毒性、肺発がんに関与する可能性のあるサイトカインの発現が分かってきた。それらは、SWCNT-N、



MWCNT-N、MWCNT-7においてCROと比較して必ずしも共通の因子は特定出来なかった。さらに、9日間投与試験においても、SWCNT-N、MWCNT-N、MWCNT-7の肺組織における炎症性変化、線維化の程度、肺胞上皮と中皮細胞の増殖性変化および遺伝子、タンパク発現についてもかなり異なっており、これらの変化がそれぞれのCNTの構造に由来するのか、構成成分に由来するのかについては今後の成果に委ねられる。昭和電工社製CNTについては14日間投与試験および肺発がん二段階試験は経過中であり、今年度中に相互の比較検討によって共通の評価手法の開発を目指す(津田)。SWCNTではMWCNTよりもSおよびFeが多く検出された。Feは触媒として用いられており、生体内酸化反応を引き起こし組織に傷害を起こす。カーボン材料中の金属成分はこうした反応によって発がん性に関与すると考えられているが、新たな材料を分析し、動物実験での結果と比較する予定である。SiO<sub>2</sub>懸濁液はほぼ表示どおりの平均粒子径が得られ、ナノサイズの粒子としての影響を見ることができると判断した。50 nm SiO<sub>2</sub>はIL-8を産生した。IL-8は炎症性サイトカインであるのに加え、ケモカインとして分類されることから、カーボンナノ材料が炎症性反応を引き起こすとともに免疫機能に影響を与える可能性があることが示唆された(五十嵐)。

CNTの分散性は、CNTのサイズと懸濁液の物理化学的特性により規定されると考えられた。CNTのサイズの違いがそれを食食するマクロファージの挙動に影響し、結果的に組織像に反映されたと考えられた。CNTの曝露を受け

た肺マクロファージはヒト肺がん細胞株の増殖を促進させる何らかの因子を放出していることが示唆された。肺マクロファージのDNAチップによる遺伝子解析では、増殖およびサイトカイン系の遺伝子群の中から固定した発現スペクトラムが得られた。CNT曝露に伴う増殖シグナルはある特定の遺伝子発現だけに強く依存するか否かを検証する必要がある(酒々井)。

C60を食食したマクロファージの培養上清が細胞増殖促進作用を示す可能性が考えられ、アレイ解析の結果、増殖関連因子の発現が上昇しており、それらの中には肺胞上皮細胞の増殖促進作用を示すものもあった。これから、C60には肺発がん促進作用があることが示唆された。この因子の関与については、経過中の肺発がん二段階試験により検証する(二口)。

繊毛細胞は電位依存性のNa<sup>+</sup>やCa<sup>2+</sup>チャネル発現がない典型的な非興奮性細胞であることが明らかとなった。過分極誘発性Ca<sup>2+</sup>濃度上昇は電位非依存性の非選択性陽イオンチャネルを介した流入によると考えられる。繊毛運動は細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度に依存すると報告されているため、この発見は生理的に重要なのかについて、さらにこの破綻がいかなる毒性発現に至るのかについて今後検討を進める(今泉)。

## E. 結論

チオグリコレートのIPSにより誘導されたマクロファージのアレイ解析では肺毒性、肺発がんに関与する可能性のあるサイトカインの発現が分かって来た。それらは、SWCNT-N、

MWCNT-N、MWCNT-7に必ずしも共通の因子ではなく、CROと比較しても共通のものは無かった。9日間投与試験においても、SWCNT-N、MWCNT-N、MWCNT-7の肺組織における炎症性変化、線維化の程度、肺胞上皮と中皮細胞の増殖性変化、遺伝子およびタンパク発現はかなり異なっていた。このような変化がCNTの立体構造(凝集塊・繊維状構造)、鉄等の夾雑物に由来するのにかについては今後検討が必要である。昭和電工社製CNTを含めた相互の比較検討による共通の評価手法の開発を平成23年度中に目指す(津田)。

カーボンナノマテリアルの金属分析、および懸濁液の粒度分布を行うとともに、それらの細胞毒性および炎症性サイトカイン産生能を比較した。MWCNTには製造会社によって種類や量が異なるものの金属の残存が確認できた。SiO<sub>2</sub>はナノサイズで適用されることが確認でき、そのTHP-1細胞に対する毒性はCBより若干強かった。SiO<sub>2</sub>はわずかにIL-8産生量を増加させ、免疫機能に対する影響が示唆された(五十嵐)。

MWCNT-Nの各分画では物理化学的特性に違いがあり、この違いは個体レベルでの組織像や肺マクロファージの挙動に影響する。CNT曝露により肺胞マクロファージはヒト肺がん細胞株の増殖促進に関与する。CNT曝露により肺マクロファージの遺伝子発現には一定のスペクトラムが存在するが個々の遺伝子発現には幅がある。本研究成果は作用機序解析モデル構築のための基礎的情報になる(酒々井)。二酸化チタニウムの肺内投与による発がんメカニズムと同様に、C60の肺内投与は一定の

サイトカインの発現を惹起した。今後、肺発がん二段階試験を用いてC60の肺発がんプロモーション作用を検索し、C60の肺内投与による発がんリスクを総合的に評価する予定である(二口)。

カーボンナノマテリアルによる繊毛細胞障害性や細胞機能への影響を検討する上で、繊毛運動の制御機構について、十分な知見を得ることがまず必要であり、本成果はその確実な一歩となった(今泉)。

#### 倫理面への配慮

我が国の「動物の保護及び管理に関する法律(昭和48年10月1日、法律第105)並びに「動物の飼育及び保管等に関する基準(昭和53年3月27日、総理府告示第6号)を遵守し、各施設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。

#### F. 健康危機情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Todo, H., Kimura, E., Yasuno, H., Tokudome, Y., Hashimoto, F., Ikarashi, Y., Sugibayashi, K. Permeation pathway of macromolecules and nanospheres through skin. *Biol. Pharm. Bull.*, 33, 1394-1399 (2010)
2. Uchino, T., Ikarashi, Y., Nishimura, T.: Effects of coating materials and size of titanium dioxide particles on their cytotoxicity and penetration into the

- cellular membrane. *J. Toxicol. Sci.*, 36, 95-100 (2011)
3. Xu, J., Saqawa, Y., Futakuchi, M., Kukamachi, K., Alexander, D.A., Furukawa, F., Tamano, S., Ikarashi, Y., Uchino, T., Nishimura, T., Morita, A., Suzui, M., Tsuda, H. Lack of promoting effect of titanium dioxide particles on ultraviolet B-initiated skin carcinogenesis in rats. *Food Chem Toxicol*; in press.
  4. Naoi, K., Sunagawa, N., Morioka, T., Nakashima, M., Ishihara, M., Fukamachi, K., Itoh, Y., Tsuda, H., Yoshimi, N., Suzui, M. Enhancement of tongue carcinogenesis in Hras128 transgenic rats treated with 4-nitroquinoline 1-oxide. *Oncol Rep*; 23: 337-344, 2010.
  5. Masuda, M., Wakasaki, T., Suzui, M., Toh, S., Joe, A.K., Weinstein, I.B. Stat3 orchestrates tumor development and progression: the Achilles' heel of head and neck cancers? *Curr Cancer Drug Targets*; 10: 117-126, 2010.
  6. Ishihara, M., Iihara, H., Okayasu, S., Yasuda, K., Matsuura, K., Suzui, M., Itoh, Y. Pharmaceutical interventions facilitate premedication and prevent opioid-induced constipation and emesis in cancer patients. *Support Care Cancer*; 18: 1531-1538, 2010.
  7. 深町勝巳、酒々井眞澄、徐結苟、津田洋幸. 発がん物質の中期代替検索法. *FFI ジャーナル*; 215: 390-397, 2010.
  8. Sakamoto, Y., Nakae, D., Hagiwara, Y., Satoh, K., Ohashi, N., Fukamachi, K., Tsuda, H., Hirose, A., Nishimura, T., Hino, O., Ogata, A. Serum ERC/mesothelin level in rats with mesothelial proliferative lesions induced by multi-wall carbon nanotube. *Journal of Toxicologic Sciences*. 35: 265-270, 2010.
  9. Tsuda, H., Futakuchi, M., Fukamachi, K., Shirai, T., Imaida, K., Fukushima, S., Tatematsu, M., Furukawa, F., Tamano S., Ito, N. A Medium-Term, Rapid Rat Bioassay Model for the Detection of Carcinogenic Potential of Chemicals. *Toxicol Pathol.* 38:182-187, 2010.
  10. Xu, J., Futakuchi, M., Iigo, M., Fukamachi, K., Alexander, D.B., Shimizu, H., Sakai, Y., Tamano, S., Furukawa, F., Uchino, T., Tokunaga, H., Nishimura, T., Hirose, A., Kanno, J., Tsuda, H. Involvement of macrophage inflammation protein 1  $\alpha$  (MIP1  $\alpha$ ) in promotion of rat lung and mammary carcinogenic activity of nano-scale titanium dioxide particles administered by intra-pulmonary spraying. *Carcinogenesis*. 31:927-935, 2010.
  11. Tsuda, H. Risk Assessment Studies of Nanomaterials in Japan and Other Countries. *Asian Pacific J*

Cancer Prev,10, DIMS 30 th  
Anniversary Supplement. 11-12,  
2010.

2. 学会発表

1. 五十嵐良明、瀧田葉子、相場友里恵、小濱とも子、内野 正、西村哲治. 反復経皮投与したナノサイズ酸化チタンの吸収性及び毒性について. 日本薬学会第130年会. 2010年3月
2. 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 (2010.7)
3. Y. Ikarashi, Y. Aiba, Y. Takita, T. Uchino and T. Nishimura. Tissue distribution and toxicity of titanium dioxide nanoparticles in rats after repeated dermal exposure. XII International Congress of Toxicology (2010.7)
4. Nishimura, T., Kubota, R., Tahara, M., Obama, T., Sugimoto, N., Hirose, A., Ikarashi, Y. Bio-distribution of the fullerenes intravenous administrated. 2010 Annual meeting of the Korean Society of Environmental Health and Toxicology (2010.11)
5. Sawada E, Yamamura H, Ohya S, Imaizumi Y. Functional analysis of ion channels in murine airway ciliated cell. J. Pharmacol. Sci., Vol. 115, Suppl. 1, 80P. (2011) 第84回日本薬理学会抄録 (2011年3月22-24日横浜; 学会自体は震災による影響で開催中止、ただし公式学会発表として抄録上で成立しているとの日本薬理学会の見解)
6. 津田洋幸、二口充、徐結苟、深町勝巳、酒々井眞澄. ナノ粒子の発がんリスク. 第17回日本がん予防学会; 札幌: 2010年7月15日.
7. 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; 大阪: 2011年1月27日.
8. 徐結苟、佐川容子、二口充、深町勝巳、五十嵐良明、西村哲治、古川文夫、内野正、酒々井眞澄、森田明理、津田洋幸. アレクサンダーダビッド. ナノ二酸化チタニウム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; 大阪: 2011年1月27日.
9. 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暴露による間質性肺炎の発生. 第27回日本毒性病理学会; 大阪: 2011年1月27日.
10. 二口充、徐結苟、飯郷正明、深町勝巳、Alexander, D.B., 津田洋幸 (2010). ナノサイズ二酸化チタニウムの肺発がん促進作用のメカニズム. 第99回日本病理学会総会 東京, 4月28日.
11. 二口充、深町勝巳、徐結苟、津田洋幸

- (2010). 肺吸入曝露による発がんメカニズムにおいてナノ粒子の種類により異なる因子の関与. 第26回日本毒性病理学会学術集会 金沢, 2月3日.
12. Tsuda, H. (2010). Toxicologic Pathology of Nanomaterials. 28th International Congress of the International Academy of Pathology October, 10.
13. Tsuda, H., Xu, J., Futakuchi, M., Iigo, M., Fukamachi, K., Alexander, D.B., Nishimura, T., Hirose, A., and Kanno, J. (2010). Possible involvement of Macrophage inflammation protein 1alpha (MIP1alpha) in rat lung and mammary carcinogenesis induced by exposure to nano-scale titanium dioxide. STP/IFSTP 2010 Joint Symposium Chicago IL.
14. 津田洋幸, 二口充, 徐結苟, 深町勝巳, 酒々井真澄 (2010). ナノ粒子の発癌リスク. 第17回日本がん予防学会 札幌, 7月16日.
15. 津田洋幸, 徐結苟, 二口充, 深町勝巳, 飯郷正明 (2010). ナノマテリアルのリスク評価ーアスベストから学ぶー. 第99回日本病理学会総会 東京, 4月27日.
16. 徐結苟, 佐川容子, 二口充, 深町勝巳, 五十嵐良明, 西村哲治, 古川文夫, 内野正, 酒々井真澄, 森田明理, 津田洋幸 (2011). ナノ二酸化チタニウム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 大阪, 1月28日.
- 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  
特になし

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)

Ⅱ. 研究分担報告書

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）  
研究分担報告書

研究課題名：カーボンナノマテリアルによる肺障害と発がん作用の中期評価法とその作用の分子  
機序解析法の開発に関する研究

研究分担課題名：ナノマテリアルの炎症・免疫修飾作用の解析

研究分担者 五十嵐良明 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 室長

### 研究要旨

本研究では、カーボンナノマテリアルの炎症反応及び免疫機能、特にアレルギー反応に対する増強作用の有無及びその作用機構を明らかにする。カーボンナノチューブ（CNT）について残存金属を分析した結果、製造会社によって検出される金属の量や種類が異なるもののいずれも S、Fe が多く検出された。同じカーボンマテリアルとして比較に用いたカーボンブラック（CB）の市販懸濁液は約 140 nm の平均粒子径を示した。酸化チタン（TiO<sub>2</sub>）懸濁液は平均粒子径 100 nm 以下、シリカ（SiO<sub>2</sub>）懸濁液は表示とおりの平均粒子径を示し、いずれもナノマテリアルとして扱うことができた。ヒト単球由来細胞株 THP-1 細胞に対する各種ナノマテリアルの細胞毒性を細胞内 ATP 量から判定した。SiO<sub>2</sub> 及び TiO<sub>2</sub> はいずれも 100 µg/ml で 80% 以上の細胞生存率を示し、CB は SiO<sub>2</sub> 及び TiO<sub>2</sub> より若干強い細胞毒性を示した。THP-1 細胞に TiO<sub>2</sub> 及び SiO<sub>2</sub> を加えて 24～72 時間培養した時の炎症性サイトカインの産生量を測定した。TiO<sub>2</sub> で処理した時のサイトカイン産生量はコントロールと差を認めないものの、SiO<sub>2</sub> で処理した時は IL-8 産生量がわずかに増加した。

### A. 研究目的

ディーゼル排ガス中の微粒子による喘息症状の増悪、建設材料に用いられてきたアスベストの吸入による中皮腫など、材料の大きさや形状等に起因する健康影響が懸念されている。カーボンブラック（CB）及びカーボンナノチューブ（CNT）のような炭素系ナノ材料（カーボンナノマテリアル）は、その特徴的な化学構造及び物理化学的性質により導電性付与剤、パネルディスプレイ材料、電子デバイス、燃料電池、黒色顔料、補強材などとして広く実用化されている。しかし、ラットやマウスに多層カーボンナノチューブ（MWCNT）を吸入すると胸膜まで到達し、

腹腔内投与で中皮腫が発生するなど、アスベストと同様の生体反応が確認されている。CNT にはマウスを用いた実験でアレルギー性反応を増強したとの報告もされている。一方、CB はマクロファージ、気道あるいは肺胞細胞に対して障害を起こすことが示されているが、CB のヒトに対する健康影響については結論が得られていない。同じカーボンマテリアルでありながら障害作用に差が生じるのは、粒子状と線維状という形状が要因になっていると考えられているが、材料中の金属等の不純物の影響も否定できない。

ナノマテリアルの肺障害と肺発がん作用の確認には特殊な実験設備や長期間の試験が必

要であることから、短期かつ簡便な評価法が求められている。そのためには、ナノマテリアルによる発がん作用の分子機序を明らかにする必要がある。発がんの初期反応は局所あるいは全身性の炎症及び免疫反応性の変化であり、ナノマテリアルによるこれらの修飾作用について検討することが重要と考える。本研究では、カーボンナノマテリアルの炎症反応、及び免疫、特にアレルギー反応に対する増強作用の有無を確認する。今年度は、CNT中の金属の分析、酸化チタン ( $\text{TiO}_2$ )、シリカ ( $\text{SiO}_2$ ) 及び CB の粒子径の測定等のキャラクタライゼーションを行い、形状以外に影響を与える要因を調べる。更に、それらナノマテリアルの細胞毒性と炎症性サイトカイン産生能を調べた。

## B. 研究方法

### 1. 試料

多層カーボンナノチューブ (MWCNT) として、日機装 (株) の 30 ナノクラス CNT (MWCNT-NKS)、及び Nano Carbon Technologies 社より CNT パウダー (Lot.No. 060125-01k) (MWCNT-NCT) を入手した。単層カーボンナノチューブ (SWCNT) は日機装 (株) Lot.No. SW1S081030/081031-1F&1D を入手した。カーボンブラック (CB) 懸濁液として、大東化成工業 (株) より WD-CB2 (CB 25%, Lot.No. K-40308) をサンプル品として供与された。CB ナノ粒子は Sigma-Aldrich 社から graphitized carbon black (GCB, <500 nm particle size, >99.95%, Lot.No. MKBF0763V) を購入した。酸化チタン ( $\text{TiO}_2$ ) は、平均一次粒子径 35 nm の表面処理していない  $\text{TiO}_2$ -B をテイカ (株) から入手し、ビーズミル法により 5% の懸濁液を調製した。シリカ ( $\text{SiO}_2$ ) として、Johnson Matthey 社 Alfa Aesar の  $\text{SiO}_2$ -エチレングリコール (EG) 懸濁液 (平均一次粒子径 20、50 及び 100 nm) を用いた。

### 2. 細胞

ヒト単球由来細胞株 THP-1 細胞を ATCC から入手した。培地として、FBS を 10%、2-mercaptoethanol 55 nmol/ml 及び 1% antibiotic-antimycotic mixture (Invitrogen 社) を含有した RPMI-1640 培地 (FBS-RPMI) を用いた。

### 3. 元素分析

エネルギー分散型蛍光 X 線分析装置 (PANalytical 社 Epsilon 5) を用いて分析した。

### 4. 粒度分布の測定

ナノマテリアル懸濁液を、水、生理食塩水、あるいは各種界面活性剤 Tween 80 を 0.1% 添加した溶液でナノマテリアルが 0.1% になるよう希釈した。Vortex mixture で 1 分間攪拌、超音波洗浄器 (出力 200W) で 5 分間処理した後、ゼータサイザーナノ (nano-ZS, Malvern 社) で粒度分布を測定し、平均粒子径 Z-average (d.nm) を求めた。

### 5. 細胞毒性試験

THP-1 細胞浮遊液 ( $2 \times 10^6$  cells/ml) を 500  $\mu\text{l}$  ずつ 24 穴プレートに入れ、種々の濃度の試験溶液を 500  $\mu\text{l}$  ずつ加えた。市販測定キットを用いて 24~72 時間培養した細胞浮遊液について ATP 量を測定した。すなわち、細胞浮遊液 10  $\mu\text{l}$  を採取し PBS で 100 倍希釈した後、そのうち 100  $\mu\text{l}$  を ATP 抽出液 100  $\mu\text{l}$  と混合して 20 秒間静置した。次に発光試薬 100  $\mu\text{l}$  加え、すばやくルミノメーターで 10 秒間の発光量 (RLU) を読みとった。各濃度の試験物質についてコントロールに対する発光量の比を求め、細胞生存率 (%) とした。

### 7. サイトカインの定量

細胞毒性試験と同様に培養した細胞浮遊液を 3000 rpm で 10 分間遠心して上清を得た。上清を BD Cytometric Bead Array (CBA) human inflammatory cytokine kit (BD Biosciences) で処理し、BD FACSArray によって炎症性サイトカイン (IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF, IL-12p70) を測定した。



## C. 研究結果

### 1. カーボンマテリアルの金属分析

CNT を蛍光 X 線分析し炭素以外の元素を同定した (表 1)。CNT の製造元、MWCNT あるいは SWCNT の違いによって同定される元素の種類及び量は異なった。MWCNT-NKS は MWCNT-NCT よりも S 及び Fe が多く検出された。SWCNT でも同様に S 及び Fe の量が多く、MWCNT-NKS の 10 倍以上であった。しかし、Pb、As、Hg などの有害重金属は検出しなかった。

CB 懸濁液については重金属不純物量が販売会社のホームページから情報が得られ、Pb 0~10 ppm、As 0~3 ppm、Hg 0~1 ppm とされている。

### 2. 粒度分布

市販 CB 懸濁液を生理食塩水及び水を用いて CB 濃度として 0.1%になるよう希釈し 1 分間 vortex mixture で攪拌後、粒径を測定した。いずれの媒体を用いた場合でも平均粒子径は 130~142 nm で、100 nm 以下のナノサイズの粒子も認められた (図 1)。GCB 粒子 (<500 nm) に各種媒体を加え攪拌後 5 分間超音波処理した。水に懸濁したときの平均粒子径は 334 nm、Tween 80 の 0.1%溶液では 441 nm であった。生理食塩水に懸濁した場合も水よりは凝集する割合が多くなった (図 2)。

一次粒子径 20 nm、50 nm 及び 100 nm の SiO<sub>2</sub> の懸濁液について測定したところ、ほぼ表示どおりの平均一次粒子径が得られた。TiO<sub>2</sub> 懸濁液の平均粒子径は 75~80 nm と半数以上が 100 nm 以下の粒子として存在した (データ未掲載)。

### 3. 細胞毒性試験

ナノマテリアルの分散に用いる溶剤及び界面活性剤の細胞毒性を調べた。THP-1 細胞を各種濃度の試験溶液と 72 時間し、細胞内 ATP 量を測定した。界面活性剤のうちラウリル硫酸ナトリウム (SLS) の 50%細胞生存率を示

す濃度 (IC50) は約 60 µg/ml、Tween 80 は 5000 µg/ml 以上であり、溶剤のエチレングリコール (EG) は 10000 µg/ml でも毒性を示さなかった (図 3)。

SiO<sub>2</sub> 及び TiO<sub>2</sub> はいずれも 100 µg/ml の濃度で 80%以上の細胞生存率を示した (データ未掲載)。GCB は 1000 µg/ml で 30%、100 µg/ml では約 90%の細胞が生存した (図 4)。CB は 100 µg/ml での生存率が約 60%、25 µg/ml ではほぼ 100%であった。CB については再試験し濃度反応曲線を作成したところ、IC50 は 270 µg/ml となった (図 4)。

### 4. 炎症性サイトカインの産生

SLS を THP-1 細胞と 24 時間培養したときに産生される炎症性サイトカインを BD CBA assay により定量した。定量限界以上で検出されたのは対象とした 6 種のサイトカインのうち IL-8 だけであった。TiO<sub>2</sub> 及び SiO<sub>2</sub> 100 µg/ml を添加して 24~72 時間培養した。TiO<sub>2</sub> についてはコントロールと差は認められないものの、50 nm SiO<sub>2</sub> については 48 及び 72 時間培養時の IL-8 産生量がコントロールに比べてわずかに増加した (図 5)。

## D. 考察

本年度の研究では、カーボンナノマテリアル及び同様のナノマテリアルである CNT、CB、TiO<sub>2</sub> 及び SiO<sub>2</sub> を試験材料として、これらのキャラクタライゼーションを行うとともに、それらの起炎性を免疫担当細胞に対する細胞毒性及び炎症性サイトカインの産生能から評価した。

CNT や CB 等カーボンマテリアルはいずれも構成元素は炭素であるが、マテリアルの形状は CNT が線維状、CB が粒子状と大きく異なっている。化粧品等に用いられている TiO<sub>2</sub> 及び SiO<sub>2</sub> も粒子状であり、CNT と CB、TiO<sub>2</sub> 及び SiO<sub>2</sub> との発がん性の差はこれらマテリアルの形状にあるとされている。しかしながら、同じ CNT でも結果に違いが認められることから、材質や大きさだけでなく材料

中の不純物の影響も残されている。そこでまず、CNTの金属を分析した。MWCNTは製造会社によって検出される金属の種類及び量が異なっていた。SWCNTではMWCNTよりもS及びFeが多く検出された。Feは触媒として用いられており、生体内酸化反応を引き起こし組織に傷害を起こすとされている。MWCNTは現在、他のグループが別の製造会社のものを使って動物実験を進めており、これを今後入手、分析して動物実験での結果と比較するつもりである。CBの不純物についてはメーカーから有害金属のみ一定値以下という情報しか得られておらず、これについてもCNTと同等に分析する必要がある。

ナノマテリアルの生物学的試験では大きさの影響を見るため試験液中での粒度分布等を知り、ナノサイズで良好に分散していることを確認する必要がある。現在CNTの分散法及びサイズ計測が他機関で検討中であるが、線維状のため動的光散乱法等では正確な測定が難しい。CBの一次粒子径は不明であるが、市販懸濁液中の平均粒子径は約140 nmであった。SiO<sub>2</sub>懸濁液はほぼ表示どおりの平均粒子径が得られ、TiO<sub>2</sub>懸濁液も100 nm以下の平均粒子径を示したことから、いずれもナノマテリアルとして扱うことができると判断した。SiO<sub>2</sub>及びTiO<sub>2</sub>は100 µg/mlで80%以上の細胞が生存するのに対し、CBは若干細胞毒性が強く同濃度での生存率は約60%であった。TiO<sub>2</sub>及びSiO<sub>2</sub>存在下でのTHP-1細胞の炎症性サイトカインの産生量を調べた。TiO<sub>2</sub>についてはコントロールと差は認められないものの、50 nm SiO<sub>2</sub>についてはIL-8産生量が増加した。CBについてもこれからいくつかの濃度を設定し検討する予定である。IL-8は炎症性サイトカインであるのに加え、ケモカインとして分類される。THP-1細胞を用いたin vitroの皮膚感作性試験では、感作性物質を暴露するとIL-8が産生されることから、感作性を評価する簡便な指標として採用されている。今回SiO<sub>2</sub>については少量な

がらIL-8産生を増加することから、本マテリアルが炎症性反応を引き起こすとともに免疫機能に影響を与える可能性があることが示唆される。今後、ナノマテリアルを他のアレルギー性物質と併用したときのケモカイン産生について検討し、ナノマテリアルの免疫反応性の増強作用の有無を明らかにする必要がある。

## E. 結論

各種ナノマテリアル中の金属分析、及び懸濁液の粒度分布を行うとともに、それらの細胞毒性及び炎症性サイトカイン産生能を比較した。MWCNTには製造会社によって種類や量が異なるものの金属の残存が確認できた。SWCNTではMWCNTよりも多くの金属が検出された。市販CB懸濁液の平均粒子径は約140 nmで半数が100 nm以下であった。SiO<sub>2</sub>及びTiO<sub>2</sub>懸濁液も同様にナノサイズで適用されることが確認できた。SiO<sub>2</sub>及びTiO<sub>2</sub>よりはCBの方が若干THP-1細胞に対する毒性は強かった。TiO<sub>2</sub>の炎症性サイトカイン産生増強作用は認められなかったが、SiO<sub>2</sub>はわずかにIL-8産生量を増加させ、免疫機能に対する影響が示唆された。

## F. 健康危機情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Todo, H., Kimura, E., Yasuno, H., Tokudome, Y., Hashimoto, F., Ikarashi, Y., Sugibayashi, K. Permeation pathway of macromolecules and nanospheres through skin. *Biol. Pharm. Bull.*, 33, 1394-1399 (2010)
- 2) Uchino, T., Ikarashi, Y., Nishimura, T.: Effects of coating materials and size of titanium dioxide particles on their cytotoxicity and penetration into the cellular membrane. *J. Toxicol. Sci.*, 36,

95-100 (2011)

## 2. 学会発表

1) 五十嵐良明、瀧田葉子、相場友里恵、小濱とも子、内野 正、西村哲治. 反復経皮投与したナノサイズ酸化チタンの吸収性及び毒性について. 日本薬学会第 130 年会. 2010 年 3 月

2) 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. 7)

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

(2010.7)

4) Nishimura, T., Kubota, R., Tahara, M., Obama, T., Sugimoto, N., Hirose, A., Ikarashi, Y. Bio-distribution of the fullerenes intravenous administrated. 2010 Annual meeting of the Korean Society of Environmental Health and Toxicology (2010.11)

## I. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

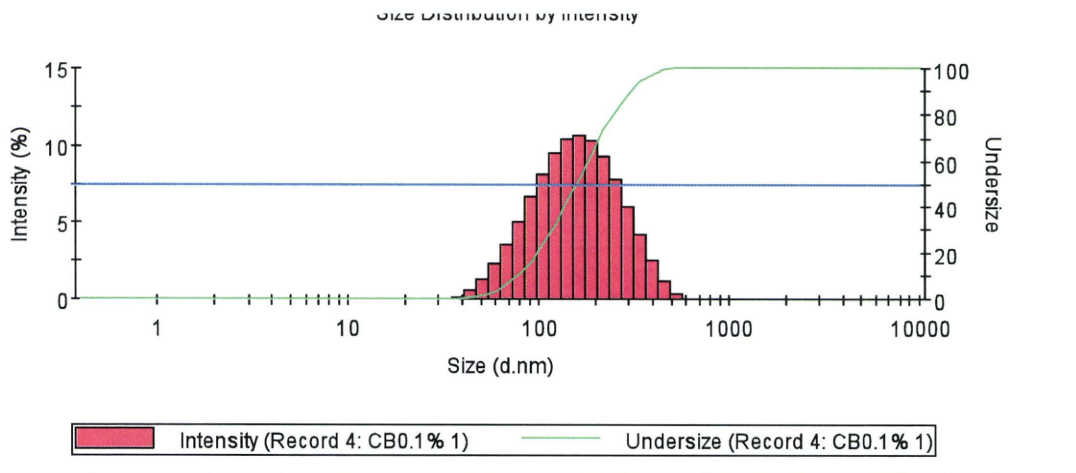
なし

表1. CNT中の金属分析

Element*	Concentration			Unit
	MWCNT-NKS	MWCNT-NCT	SWCNT	
C	99.9	100	97.6	%
Si			1.1	%
S	323		4100	ppm
K			1406	ppm
Fe	350		6780	ppm
W	47	53	202	ppm

\*: 50 ppm以上認められた元素のみ。

(a) in water (142 nm)



(b) in saline (130 nm)



図1. 市販カーボンブラック懸濁液を水及び生理食塩水で希釈したときの粒度分布