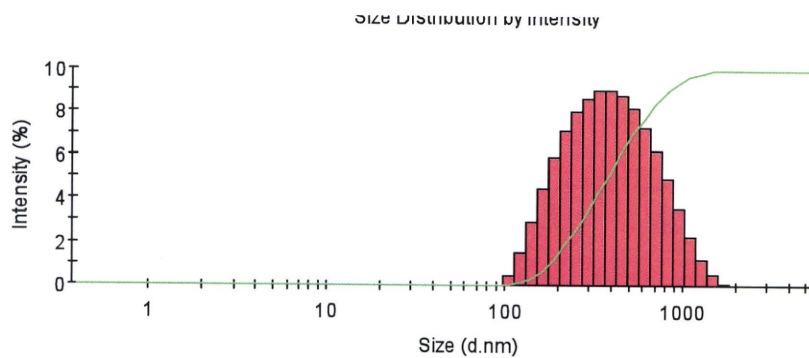


(a) Water (334 nm)



(b) 0.1% Tween 80-water (441 nm)

(c) Saline (390 nm)

図 2. 各種媒体に懸濁したカーボンブラック (平均粒子径 <500 nm) の粒度分布

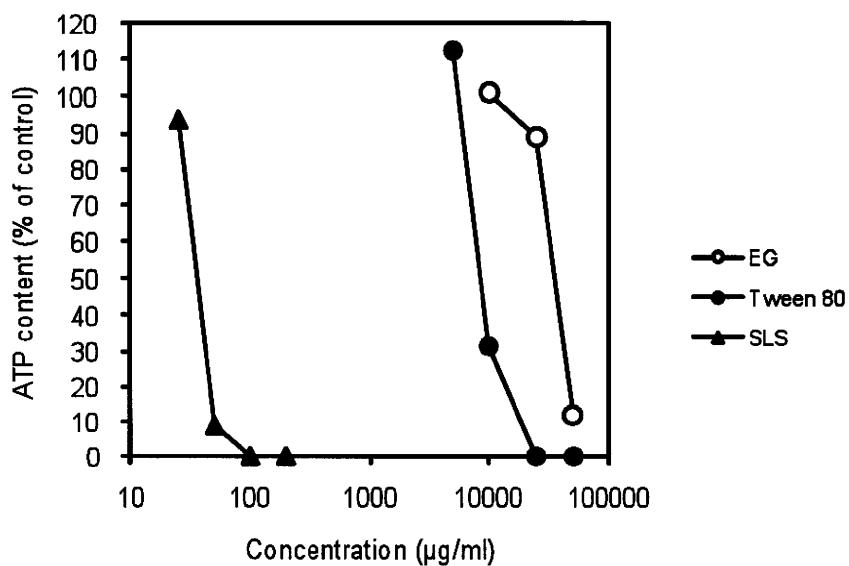


図 3. ナノマテリアルの分散に用いる添加剤及び溶剤の THP-1 細胞に対する毒性

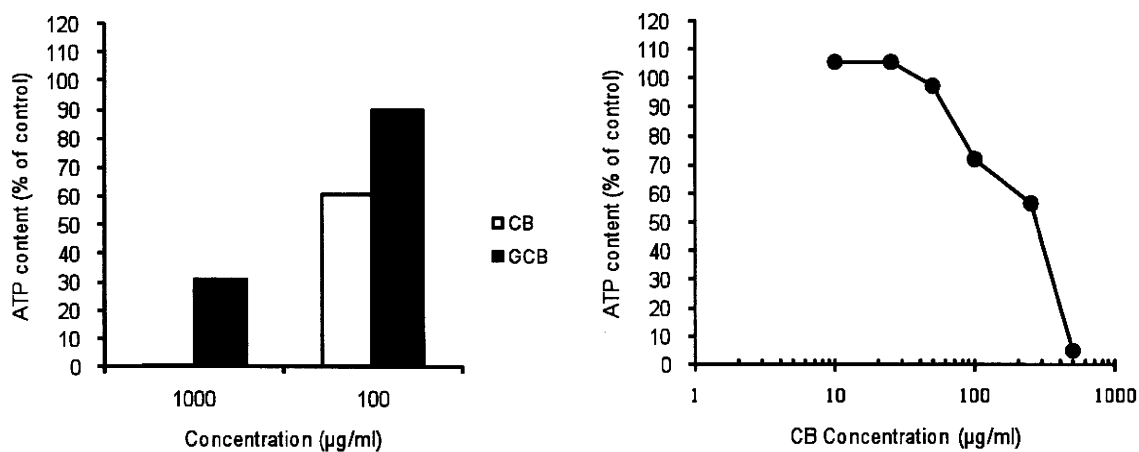
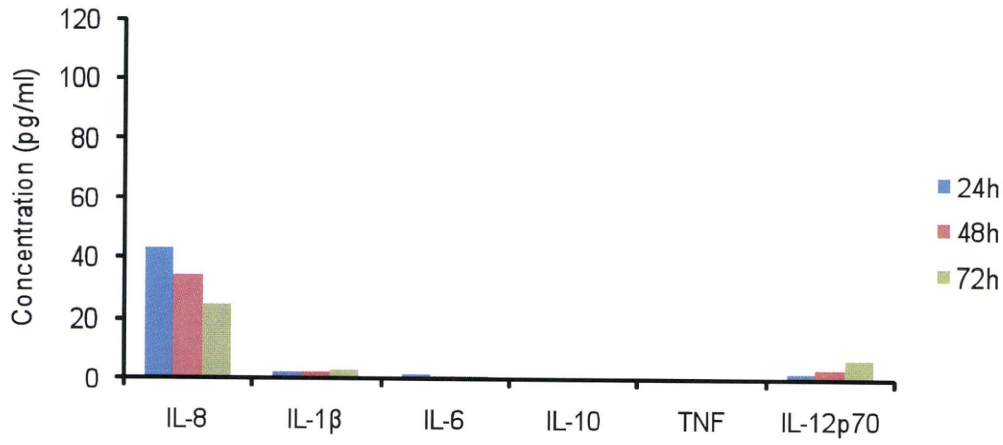


図 4. サイズの異なるカーボンブラックの細胞毒性
懸濁液中の CB の平均粒子径は約 140 nm、GCB は約 330 nm。

(a) Control



(b) SiO₂

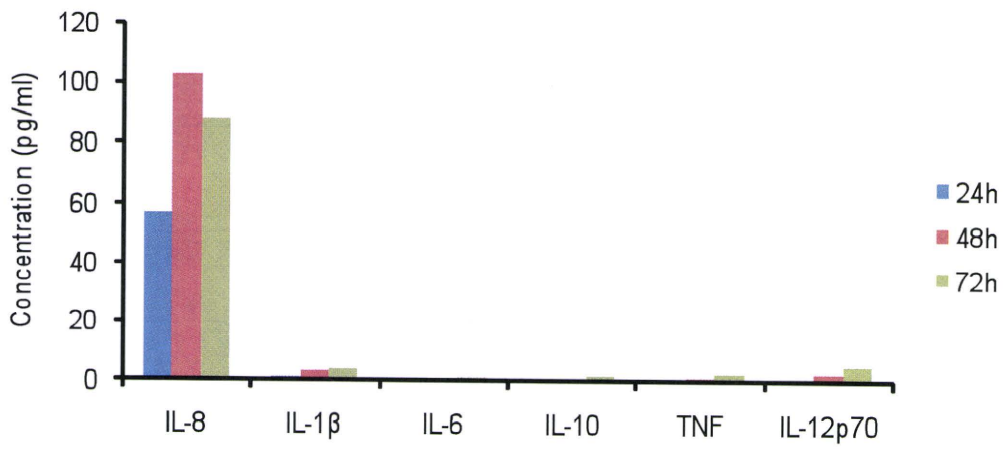


図 5. SiO₂ の存在下 THP-1 細胞から産生される炎症性サイトカイン量の経時変化

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: 呼吸器系細胞における細胞障害評価系の確立

研究分担者 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
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

研究要旨 カーボンナノマテリアルの呼吸器に対する毒性・発ガン機構解明にあたり、被検物暴露のごく初期における直接的な気道上皮細胞や繊毛細胞における細胞障害性とその機構の解明を目指した。ラット気道上皮組織から繊毛細胞を単離し、繊毛運動の制御機構における細胞内 Ca^{2+} 濃度と膜電位の関係を検討し、過分極により電位非依存性経路を介した Ca^{2+} 流入が増大することを明らかにした。また気道上皮細胞のイオン動態を制御するイオンチャネルやトランスポーターの mRNA 発現を上皮組織で解析し、カーボンナノチューブを吸引させることによるその発現変化の解析の準備を行った。

A. 研究目的

各種ナノマテリアル、特にカーボンナノチューブの呼吸器に対する毒性・発ガン機構を解明するにあたり、被検物暴露のごく初期における直接的な呼吸器細胞障害を生化学的・生理学的・薬理学的手法を駆使して解析する。その過程で、呼吸器系器官を構成する上皮細胞や繊毛細胞における生（異常な分化・増殖はガン化を招く）と死（毒性発現による細胞死）の分子機構の解明も目指す。それらの研究成果を基盤として、呼吸器細胞における細胞障害評価系を確立する。

B. 研究方法

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、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^{2+} 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。（倫理面への配慮）実験動物に関する名古屋市立大学の実験倫理指針に従って実験を行った。

C. 研究結果

① ラット呼吸器系器官（気管・気管支）より酵素処理によって急性単離した上皮繊毛細胞から膜電流を測定したところ、主な成分として内向き

整流性 K^+ チャ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 K^+ チャ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 チャネルと、それ以外に数種の K^+ チャネル mRNA 発現を検出した。特に中コンダクタンス Ca^{2+} 活性化 K^+ (IK) チャネルは、Kir2.1 チャネルとともに、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 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 Ca^{2+} 感受性蛍光色素 fluo3 を細胞内へ導入し、細胞内 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 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。

D. 考察 繊毛細胞は電位依存性の Na^+ や Ca^{2+} 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^{2+} 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^{2+} 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と考えられる。

E. 結論 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。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

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)

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

特に無し

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:発がんに関与する食食マクロファージの *in vitro* および *in vivo* 作用機序解析

研究分担者: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
研究協力者: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

研究要旨

カーボンナノマテリアルの吸入毒性試験には莫大な費用を要するため、それに代わる標準的な評価法の確立が要求される。本分担研究ではカーボンナノマテリアルについてヒトへ外挿可能な作用機序解析モデルを構築することを目的とする。具体的にはカーボンナノチューブ(CNT)の培養細胞への曝露による細胞増殖および遺伝子発現への影響解析、ラット経気管内スプレー法(IPS)による肺組織への形態的影響解析を行った。CNTとして、日機装社製の単層カーボンナノチューブ(SWCNT-N)、日機装社製の多層カーボンナノチューブ(MWCNT-N)および三井化学社製の多層カーボンナノチューブ(MWCNT-7)を用いた。MWCNT-Nを篩板(シープ)にて濾過し、非濾過(R)、濾過(FT)、原液(W)の3分画に分け、懸濁液の検討、細胞増殖および遺伝子発現への影響解析、肺および胸膜周辺像の観察を行った結果、以下の所見を得た。①篩板(シープ)にて濾過した分画(FT)をコポリマー含有生理食塩水に分散させた場合に分散性の良好な懸濁液が得られた。②CNTのサイズで分けた各分画では物理化学的特性に違いがあり、この違いはラット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。③CNTの曝露により誘導されたラット肺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。④CNTの曝露により誘導されたラット肺マクロファージの遺伝子発現には固定されたスペクトラムが存在する。本分担研究により見出されたCNT曝露と細胞増殖およびこれに関連した遺伝子発現変化に関する所見はラットを用いた中期発がん試験法における作用機序解析モデル構築のための基礎的エビデンスになると考えられる。

A. 研究目的

本研究ではラットを用いて種々のカーボンナノマテリアルについてヒトへ外挿可能な作用機序解析モデルを構築することを目的とする。本分担研究では研究対象としてカーボンナノチューブ(CNT)を用い細胞株に対する細胞増殖および遺伝子発現への影響解析、ラット経気管内スプレー法(IPS)を用いた肺組織への影響解析を行った。本分担研究では細胞レ

ベルおよび個体レベルでの実験を行うためCNTの安定した曝露状態を維持する必要がある。よって、CNT懸濁液の検討も平行して行った。

B. 研究方法

B-1: 懸濁液の検討

CNTとして、日機装社製の単層カーボンナノチューブ(SWCNT-N)、日機装社製の多層カーボンナノチ

ューブ(MWCNT-N)および三井化学社製の多層カーボンナノチューブ(MWCNT-7)を用いた。まずCNT懸濁液の検討を行った。検討したのは、① Tween20含有生理食塩水、②水砂糖液、③コポリマー含有生理食塩水である。次に、③を用いて懸濁液を作成した。津田特任研のXuらはラットにおいて二酸化チタニウムナノ粒子のIPSにより肺がんプロモーション作用を見出し、機序として肺マクロファージが二酸化チタニウムナノ粒子を取り込むこと(食食)により特定の遺伝子発現を惹起し肺胞上皮細胞を増殖させることを報告した(Carcinogenesis 31: 927-935, 2010)。よって、マクロファージが食食可能なCNTのサイズを考慮しMWCNT-Nを③に懸濁しポリロン粉碎後に篩板(シーブ)にて濾過し、非濾過(R)、濾過(FT)、原液(W)の3分画に分けて実験材料とした。

B-2: CNTの *in vitro* 作用機序解析

B-2-1: 細胞増殖への影響

培養細胞として、ヒト肺腺がん細胞株、ヒト中皮腫細胞株およびヒト肺線維芽細胞株を用いた。Xuらの研究結果にもとづきCNTを肺に噴霧する(IPS)とマクロファージがCNTを食食後何らかの因子を放出し結果的に増殖が促進されると仮説した。この仮説を検証するために以下の実験を行った。10週齢雄F344ラット肺にマクロファージを誘導するため thioglycolate 含有蒸留水を肺内に噴霧した。最終噴霧後にイソフルランにて麻酔し肺を摘出、ホモジナイズした。ホモジネートを2%ウシ胎児血清含有RPMI1640培地にて培養後、上清を取り除いた。トリプシン処理にて1ディッシュ当たり一定数のマクロファージになるように調整し細胞を蒔いた。12時間後に一定濃度に調整した各分画のCNTを細胞に曝露させ一定時間培養した上清をヒト肺腺がん細胞株、ヒト中皮腫細胞株およびヒト肺線維芽細胞株に曝露しMTTアッセイにて細胞増殖に与える影響を評価した。

FT、RおよびW分画を加えた培養液中でのラット肺マクロファージの挙動を24時間タイムラプスイメージ(ニコン・バイオステーション)にて観察した。

B-2-2: 遺伝子発現への影響

上述の実験と同様に thioglycolate 含有蒸留水を10週齢雄F344ラットの肺内に噴霧し、マクロファージを分離し一定濃度に調整した各分画CNTを曝露させ培養した。細胞から全RNAを抽出しRat oligo chip 20k(遺伝子数2万)(東レ)にて遺伝子発現に与える影響を網羅的に解析した。

B-3: CNTの *in vivo* 作用機序解析

B-3-1: 14日間投与試験

肺および胸膜周辺組織に対するCNTの影響を検討するためにOECD試験ガイドライン(急性吸入毒性試験)を参考とした。MWCNT-Nの3分画をそれぞれラットの肺内に噴霧した。実験第14日目に、イソフルランにて麻酔後肺を摘出した。HE標本を作製し、CNTの各分画に依存した肺および胸膜周辺縁、マクロファージの挙動を観察した。

(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、名古屋市立大学動物実験倫理委員会の審査を経て実験を実施した。

C. 研究結果

B-1: 懸濁液の検討

検討した①から③のうち、③(コポリマー含有生理食塩水)は分散性に優れ、培養細胞に対する毒性がなく、炎症反応の惹起が少ないという特性を示したため懸濁液として最適と判断した。FT、RおよびWの3分画のうちFT分画は調整懸濁後長期間経過しても分散性が維持された。RとW分画については懸濁後早期よりコポリマー分散液中で塊状(aggregation)になり、時間経過に伴いCNTと液体部分がほぼ分離した。電子顕微鏡での観察にてFT分画には小径のCNTが多く存在した。RおよびW分画には様々なサイズのCNTと塊状のCNTが存在した。

B-2: CNTの *in vitro* 作用機序解析

B-2-1: 細胞増殖への影響

CNT に対する無処理群 (ネガティブコントロール) を 100% として他の処理群をパーセントで表示した。MTT アッセイはトリPLICATEにて実施し、無処理群と他の処理群との測定値の差を Student-*t* テストにより検定した。MWCNT-N の FT、R および W 分画をマクロファージに曝露し、その培地上清をヒト肺がん細胞株に曝露した場合の増殖率はコントロール (100%) と比較していずれの分画でも有意に増加した ($P < 0.01$)。また、MWCNT-7 および SWCNT-N を曝露した場合の増殖率もコントロールと比較していずれも有意な増加を認めた ($P < 0.01$)。ヒト中皮腫細胞株に対して MWCNT-N の FT、R および W 分画、および SWCNT-N をマクロファージに曝露し、その培地上清をヒト中皮腫細胞株に曝露した場合の増殖率はコントロールと比較して有意な差を認めなかった。一方、MWCNT-7 を曝露した場合の増殖率はコントロールと比較して有意な増加を認めた ($P < 0.01$)。MWCNT-N の FT、R および W 分画をマクロファージに曝露し、その培地上清をヒト肺線維芽細胞株に曝露した場合の増殖率はコントロールと比較して有意な差を認めなかった。SWCNT-N および MWCNT-7 を曝露した場合の増殖率もコントロールと比較して有意な差を認めなかった。24 時間タイムラプス観察では、MWCNT-N の FT、R および W 分画に含まれる CNT をマクロファージは移動しながら胞体から触手を周囲に延ばし、細胞サイズより小さいサイズから同じサイズまでの CNT を検出して貪食し、胞体が CNT で満たされた時点で形質膜 (細胞膜) が破れて細胞死に至る像が観察された。いずれの分画においても貪食→細胞死のプロセスが見られた。

B-2-2: 遺伝子発現への影響

B-2-2-1: 増殖シグナル系

MWCNT-N の各分画と vehicle コントロール (分散液のみで処理した細胞) との発現の比を計算し、値が 1 より大きいものを発現上昇、小さいものを発現減少とした。MWCNT-N の FT、R、W 分画および MWCNT-7 をマクロファージに曝露した場合の遺伝子発現において発現が増加したものについて上位

遺伝子を示す (発現に幅があるため順位は任意)。Inhba (インスリンベータ前駆体)、Igf5 (インスリン様増殖因子結合タンパク)、Nrg1 (pro-neuregulin-1) 1、Socs1 (サイトカインシグナル抑制因子)、Il1r2 (インターロイキン受容体) であり、各分画により遺伝子発現に幅があるため若干順位が異なるが、これらの遺伝子が肺マクロファージへの CNT 曝露に関連する増殖系発現スペクトラムを構成する。発現減少を示した遺伝子では全ての分画に Sepp1 (selenoproteinP) があり、他はほとんどが未知遺伝子であった。

B-2-2-2: サイトカイン系

MWCNT-N の FT、R、W 分画および MWCNT-7 をマクロファージに曝露した場合の遺伝子発現において発現が増加したものについて上位遺伝子を示す (発現に幅があるため順位は任意)。Il17f (インターロイキン)、Il10 (インターロイキン) であり、分画により若干順位が異なるが、これらの遺伝子がマクロファージへの CNT 曝露に関連するサイトカイン系発現スペクトラムを構成する。

B-3: CNT の *in vivo* 作用機序解析

B-3-1: 14 日間投与試験

MWCNT-N の FT 分画では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。R および W 分画では炎症像が増え、CNT を貪食したマクロファージが浸潤し異物肉芽腫の形成が認められた。胸膜に接して存在する肺胞内と胸腔側の胸膜 (臓側胸膜) に MWCNT-N を貪食したマクロファージが見られた。マクロファージは胞体より小さいか同じサイズまでの CNT を貪食していた。

D. 考察

MWCNT-N の分散性に関して各分画において明らかな違いが認められた。篩板 (シーブ) にて濾過した分画 (FT) では分散性の良好な懸濁液が得られた。従って、CNT の分散性は CNT のサイズと懸濁液 (今回はコポリマー含有生理食塩水を使用) の物理化学的特性に規定されると考えられた。14 日投与試験での組織像より FT 分画では炎症細胞浸潤が R や W 分

画を曝露させた場合よりも少ない傾向が見られた。後者ふたつは肉芽腫形成が見られたのに対して FT 分画では認めなかった。つまり、CNT の物理化学的特性の違いがそれを貪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ことが示唆される。発がん過程への各分画の影響の違いがあるかどうかは今のところ不明である。よって、今後の肺発がん二段階試験においてこれを確認する必要がある。14 日間投与試験での初期組織変化と発がん状況がリンクするならばヒトに外挿できる作用機序解析モデル開発の基礎的なエビデンスになると思われる。今回の *in vitro* 実験により CNT の曝露を受けたラット肺マクロファージはヒト肺がん細胞株に対して増殖を促進させるような何らかの因子を放出していることが示唆された。なぜヒト肺がん細胞株だけに増殖シグナルが伝わったかについては今後の解析が必要であるが、他のふたつの細胞株にはなくヒト肺がん細胞株だけに発現する何らかの標的分子が存在するのか検証する必要がある。DNA チップ解析により CNT 曝露により影響を受けるラット肺マクロファージの遺伝子発現では、増殖シグナル系と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 *in vitro* アッセイ系で検証する必要がある。

E. 結論

①篩板(シーブ)にて濾過した分画(FT)をコポリマー含有生理食塩水に分散させた場合に分散性の良好な懸濁液が得られる。②CNT の各分画では物理化学的特性の違いがあり、この違いはラット個体レベルでの組織像や肺胞マクロファージの挙動に影響する。③CNT 曝露によりラット肺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。④CNT 曝露によりラット肺マクロファージの遺伝子発現には固定されたスペクトラムが存在する。

細胞増殖は発がんに必要な因子であり、本分担研究により見出された CNT 曝露と細胞増殖およびこれに関連した遺伝子発現変化に関する所見はラットを用いた中期発がん試験法における作用機序解析モデ

ル構築のための基礎的エビデンスになると考えられる。

F. 健康危機情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.

2. 学会発表

1. 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。
2. 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。
3. 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。
4. 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。

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

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）
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：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

研究分担者 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

研究要旨

我々は吸入曝露肺発がんリスク短期検索法を確立した。この方法は経気管肺内噴霧法を用い、①発がん二段階法を応用した肺発がんプロモーション作用中期検索法を用いた肺発がん性の評価、②被検物質の短期（9日間）肺内噴霧による肺発がんプロモーション機序の検索、および③in vitro 発がんメカニズムの検索、3つのプロトコルを行うことで、吸入曝露による肺発がんリスク評価を短期間で行うことが可能である。これまでに我々は、ナノ粒子二酸化チタニウム（nTiO₂）の肺内噴霧による肺がん促進作用のメカニズムとして、nTiO₂を貪食した肺胞マクロファージから分泌された MIP1 α による、肺胞上皮細胞の増殖促進作用が関与するのを明らかにした。本研究では炭素原子 60 個によるサッカーボール状の構造をもつフラーレン（C60）の吸入曝露による肺発がんリスクを予測する目的で、吸入曝露肺発がんリスク短期検索法の②および③を用いて、nTiO₂と同様のメカニズムが惹起されるかを検索した。②において、C60 噴霧群の肺組織における 8-OHdG level が上昇していた。また、肺内に噴霧された C60 は肺胞マクロファージにより貪食され、肺胞上皮細胞には見られなかった。③において、C60 を貪食した初代培養マクロファージのからは、endothelin-1(ET-1)などが分泌されていた。ET-1 は C60 を貪食したマクロファージが分泌していることが判明した。さらに、ET-1 はヒト肺がん細胞（A549）に対する細胞増殖促進作用を示し、その促進作用は ET-1 のレセプター阻害剤により対照群と同程度にまで抑制された。これらの結果から nTiO₂の気管内噴霧による肺発がんメカニズムと同様のメカニズムが、C60 の気管内噴霧により ET-1 を介して惹起されることが明らかとなった。今後、長期間の吸入曝露動物実験との結果との関連を検討する目的で、①の肺発がん性二段階中期検索法を用いて C60 の肺発がんプロモーション作用を検索し、C60 の吸入曝露による肺発がんリスクを総合的に評価する予定である。

A. 研究目的

ナノマテリアルであるフラーレン (C60) は、炭素原子 60 個からなるサッカーボール状の構造をもち、この内部に金属や遺伝子等の種々の物質を内包可能である。局所へのドラッグデリバリーや遺伝子治療など様々な分野への応用が試みられているが、生体内におけるその安全性については未だに明らかでない。

炭素原子が筒状に並んだ構造をもつ多層カーボンナノチューブは、吸入曝露により肺がん、肺線維症、中皮腫を発症するのではないかと危惧されている。従って、炭素原子のみで構成され、形状の異なるフラーレンの吸入曝露のリスク評価も、強い関心が寄せられている。しかし吸入曝露試験を行うには特殊な設備と膨大なコストを要するため、フラーレンのハザード評価、リスク評価、発がんメカニズムの解析のいずれも未だ十分なデータは得られていない。

我々は、専用の吸入設備を要しない試験法として、簡便で実験者に安全な経気管肺内噴霧法を開発した。この方法は、①二段階発がんモデルを用いたプロモーション作用の評価による肺発がん性中期検索法の開発 (2-step lung carcinogenesis study)、② 9 日間投与による肺発がん機序の検索(9-days in vivo mechanism study)、および ③ in vitro 発がんメカニズムの検索(in vitro mechanism study)を行うことで、ナノマテリアルの吸入曝露による肺発がんリスク評価を短期間で行うことが可能となる。

本研究では、被検物質として、C60 フラーレンを選び、② 9-day in vivo mechanism study および ③ in vitro mechanism study の開発を行い、肺発がんプロモーション作用を引き起こすメカニズムの解析を行った。

B. 研究方法

② 9-day in vivo mechanism study

気管内噴霧投与：C60 を 500 μ g/ml の濃度で氷砂糖に懸濁した。オートクレーブ滅菌後、使用 20 分前まで超音波処理を行った。イソフルレン浅麻酔下で Micro-sprayer を気管内に挿管し、被検物質の懸濁液を 0.5ml 肺内に直接噴霧した。

実験プロトコール：雌 SD ラットに、C60 懸濁液 0.5ml を 2 日に 1 回の割合で合計 5 回、肺内に直接噴霧した。9 日めに屠殺剖検し、肺を採取した。右肺は肺の炎症の程度および被検物質が肺内でどの細胞に取り込まれているか、病理組織学および電顕的に検索した。左肺組織の一部から DNA を抽出し、8-OHdG level 測定キットを用いて、肺組織中の 8-OHdG level を測定し、酸化ストレスの程度を検索した。

③ in vitro mechanism study

SD ラットに 6% チオグリコール酸を 0.5ml 肺内噴霧した。屠殺剖検し肺組織を採取し細かく刻んだ後、10% FBS 含有 RPMI 1640 で懸濁した。6cm のディッシュに細胞を播種し 2 時間培養した後、接着しなかった細胞を取り除き、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 50 μ g/ml となるように C60 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、マクロファージから分泌された培養上清のヒト肺上皮細胞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 C60 を貪食したマクロファージから、RNA を抽出し、microarray 解析をおこない、C60

を貪食することで肺胞マクロファージが分泌する因子を検索した。

(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で行った。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)。

C. 研究結果

② 9-day *in vivo* mechanism study

肺を病理組織学的に検索すると、フラレン噴霧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、フラレンを貪食したマクロファージが観察され、その数は対照群に比べ有為に上昇していた。電顕で観察すると、マクロファージの細胞質に貪食されたフラレンが観察できたが、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為に増加していた。

③ *in vitro* mechanism study

C60 を貪食させた初代培養マクロファージのから RNA を抽出し、microarray 解析を行った結果、albumin, chemokine ligand 3 などの発現が上昇していた。

これらの因子について、ヒト肺がん細胞 (A549) に対する細胞増殖促進作用を検索している。

D. 考察

肺胞マクロファージは、肺に吸入された異物を貪食し除去することが知られている。これまで

に我々は、ナノ粒子二酸化チタン ($n\text{TiO}_2$) の肺内噴霧による肺がん促進作用のメカニズムとして、 $n\text{TiO}_2$ を貪食した肺胞マクロファージが関与することを明らかにした。本研究では、C60 は、肺内噴霧により肺胞マクロファージに貪食されている像が観察された。従って、C60 の吸入曝露による肺発がんメカニズムにも肺胞マクロファージが関与することが示唆された。

異物を貪食したマクロファージは、reactive oxygen species (ROS) を産生し異物を分解/除去するが、この ROS には 8-OHdG を形成し細胞障害や DNA-damage と関連することが報告されている。本研究では、肺組織における 8-OHdG レベルは C60 噴霧群では、対照群と比べ優位に上昇していた。従って酸化ストレスと肺発がん性との関連が示唆された。

これまでに我々は、 $n\text{TiO}_2$ を貪食した初代培養マクロファージの培養上清にはマクロファージから分泌された MIP1 α が含まれ、この培養上清は肺胞上皮細胞の増殖促進作用を示すことを明らかにしてきた。そこで、C60 を貪食したマクロファージの培養上清にも、マクロファージ由来のサイトカイン/ケモカインが含まれ、細胞増殖促進作用を示すと考え、C60 を貪食したマクロファージが分泌する因子を同定する目的で、microarray 等の解析を行っている。

E. 結論

本研究によって、以下の2点が明らかとなった。

(1) C60 を気管内噴霧された肺組織では、8-OHdG の濃度が上昇していた。

(2) 肺を組織学的に解析すると、C60 は肺胞マクロファージに貪食されていた。また、C60 を貪食したマクロファージは、endothelin 1 を分泌し、肺胞上皮の増殖を促進することが明らか

となった。

これらの結果から二酸化チタニウムの気管内噴霧による肺発がんメカニズムと同様のメカニズムがC60の気管内噴霧によりいくつかのサイトカインを介して惹起されることが明らかとなった。今後、長期間の吸入曝露動物実験との結果を反映するかを検討する目的で、①の肺発がん性二段階中期検索法を用いてC60の肺発がんプロモーション作用を検索し、C60の吸入曝露による肺発がんリスクを総合的に評価する予定である。

F. 健康危機情報

なし

G. 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., 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.

2. 学会発表

1. 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.
2. 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.

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）
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：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

研究分担者 津田 洋幸 名古屋市立大学津田特任教授研究室 特任教授

研究協力者 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

研究要旨

ラットにおけるナノマテリアルの曝露による毒性・発がんの作用機序（mode of action）に基づく標準的な中期評価法の開発において、単層または各社の多層カーボンナノチューブ（SW/MWCNT）の毒性と発がんプロモーション作用について、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、被検物質を *in vitro* の系で食食したマクロファージのアレイ解析では、日機装社製単層カーボンナノチューブ（SWCNT-N）では神経関連遺伝子、多層カーボンナノチューブ（MWCNT-N）では細胞増殖因子、三井化学社製多層カーボンナノチューブ（MWCNT-7）では、炎症性サイトカイン遺伝子の発現増加がそれぞれに見られたが、これらには被検物質間に明らかな共通性は観察されなかった。（2）9日間間投与試験では、炎症性変化、肺と中皮細胞の増殖性変化と遺伝子・タンパク発現の状態、SW/MWCNTの肺組織から胸腔内への移行、さらに遠隔臓器への移行について、光学顕微鏡と電子顕微鏡レベルにて詳細に解析中である。（3）これらの物質の肺発がん二段階発がんモデルによるプロモーション作用の検出は経過中である。

A. 研究目的

今までの二酸化チタニウムの肺毒性と発がんプロモーション作用の解析に関する研究(H19-化学-一般-006)より得られた成果

（Carcinogenesis, vol.31, 2010）を参考にして、単層および多層および単層カーボンナノチューブ（SW/MWCNT）による毒性と発がん性に関連する変化について、（1）肺マクロファージ負荷試験、（2）9日間試験による肺組織と中皮の変化、および（3）肺2段階発がんモデルによる発がんプロモーション作用の検出とその機序の分子レベルでの解析、という *in vitro-in vivo* 系における

一連の試験法が SW/MWCNT の評価にも有効かについての妥当性を検証する。

B. 研究方法

S6 週令 F344 雌雄ラットを用い、SW/MWCNT の毒性と発がん性について、1）肺マクロファージ負荷試験：我々が開発したチオグリコレート経気管肺内スプレー法（IPS）によって誘導されたマクロファージを一次培養系に移し、*in vitro* における被検物質曝露による炎症性サイトカインの産生の状態と培養中に上清のヒト細胞に対する細胞障害/細胞増殖作用を検証してその因子を把握す

る。2) 被検物質の9日間の頻回肺内投与 (IPS) 投与によって惹起される肺と中皮細胞炎症性・増殖性変化の有無と程度について検討し、その分子機序について解析した。被検物質は日機装社製 SWCNT-N と MWCNT-N、腹腔内投与で中皮腫を発生させることが見いだされた三井化学社製 MWCNT-7、陽性対照としてアスベスト (crocidolite, CRO) を使用した。3) 6週齢の雄 F344 ラットに肺発がん物質 N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine (DHPN) を最初の2週間 0.2%の用量で飲水投与し、その2週間後より、被検物質を125および250 μ g/ml の濃度で Rock Candy (氷砂糖) または生理食塩水に懸濁し、オートクレーブ滅菌後、使用20分前まで超音波処理を行った投与液を、イソフルレン浅麻酔下で Micro-sprayer (樹DIMS) を気管内に挿管し、被検物質懸濁液 0.5ml を肺内に週に1回、16~24週まで IPS 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、病理学的に肺の腫瘍性病変の発生頻度・個数の定量解析を行った。さらに、毒性作用について全く未知の昭和電工社製 MWCNT についても上記の一連の試験を行う。

C. 研究結果

1) 肺マクロファージ負荷試験: IPSによるチオグリコレート誘導マクロファージからの炎症性サイトカイン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 では炎症サイトカイン、CRO では IL-1 β の増加がみられた。現在それらのタンパクレベルでの発現、ヒト細胞に対する障害作用と細胞増殖作用について解析中である。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、線維化の程度さらに肺胞上皮と胸膜中皮細胞の増殖性変化の有無と程度、それら局所における遺伝子、タンパク発現を解析し、肺胞上皮と中皮の増殖像を観察した。さらに各 CNT の肺組織から胸腔内への移行については形態学的に定量解析を実施中である。病理組織より得た組織の電子顕微鏡による検出法を開発した。これら

は平成23年度内に報告出来る予定である。昭和電工社製 MWCNT については経過中である。

D. 考察

IPSによるチオグリコレート誘導マクロファージの培養液中に分泌された炎症性サイトカインのアレイ解析では、肺毒性、肺発がんに関与する可能性のある遺伝子それぞれにいくつかは明らかになってきた。それらは、SWCNT-N、MWCNT-N、MWCNT-7 の間で、さらに、CRO と比較しても必ずしも共通の因子は見いだされなかった。9日間投与試験においても、SWCNT-N、MWCNT-N、MWCNT-7 投与群では、肺組織における炎症性変化、線維化の程度、肺と中皮細胞の増殖性変化、遺伝子、タンパク発現についても、その程度はかなり異なっていて、それらが三次元構造(線維、凝集塊)に由来するのか、CNT 構成成分に由来するのかについては現在検討している。昭和電工社製 CNT については14日間投与試験および、二段階発がんプロモーション試験は経過中であり、平成23年度中には結果が得られるので、それらの相互の比較検討によって現状の方法が共通の評価手法として有効であるか、そうでなければ改良を加えて、多くのカーボンナノマテリアルの毒性評価に有効な方法の開発を目指す。

E. 結論

チオグリコレート誘導マクロファージからの炎症性サイトカインのアレイ解析では、いくつかの肺毒性、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。興味あることに、それらは、SWCNT-N、MWCNT-N、MWCNT-7 に必ずしも共通に見られるのではなく、CRO と比較しても共通のものは無かった。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、線維化の程度さらに肺と中皮細胞の増殖性変化と遺伝子、タンパク発現について質的、量的にかなり異なっていた。それらが CNT の立体構造(凝集塊・繊維状構造)か、鉄等の CNT 夾雑物に由来するのかについては今後検討が必要である。昭和電工社製 CNT については平

成 23 年度中には結果が得られるので、それらを含めた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。

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

なし

G. 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., 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.
2. 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.
3. 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 α (MIP1 α) 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.
4. Tsuda, H., Risk Assessment Studies of Nanomaterials in Japan and Other

Countries. *Asian Pacific J Cancer Prev*, 10, DIMS 30 th Anniverssary Supplement. 11-12, 2010.

2. 学会発表

1. Tsuda, H. (2010). Toxicologic Pathology of Nanomaterials. 28th International Congress of the International Academy of Pathology October, 10.
2. 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 1 alpha (MIP1 alpha) in rat lung and mammary carcinogenesis induced by exposure to nano-scale titanium dioxide. STP/IFSTP 2010 Joint Symposium Chicago IL.
3. 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.
4. 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.
5. 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 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

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者名	論文タイトル	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版 地	出版年	ページ

雑誌

著者名	論文タイトル	発表誌名	巻 号	ページ	出版 年
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
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
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.	
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
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
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
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	21 5	390-397	2010
Sakamoto, Y., Nakae, D., Hagiwara, Y., Satoh, K., Ohashi, N.,	Serum ERC/mesothelin level in rats with mesothelial proliferative lesions induced by multi-wall	Journal of Toxicologic Sciences.	35	265-270	2010

Fukamachi, K., Tsuda,H., Hirose, A., Nishimura,T., Hino, O., Ogata, A.	carbon nanotube.				
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
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 α (MIP1 α) in promotion of rat lung and mammary carcinogenic activity of nano-scale titanium dioxide particles administered by intra-pulmonary spraying.	Carcinogen esis.	31	927-935	2010
Tsuda, H.	Risk Assessment Studies of Nanomaterials in Japan and Other Countries.	Asian Pacific J Cancer Prev.	10	11-12	2010