

な定量分析が可能であることが明らかとなった。水酸化フラーレン $C_{60}(OH)_2$ についても $1\mu g/L$ の定量下限まで測定可能であることが明らかとなった。

MWCNT の生体への影響を検討した結果、MWCNT 投与群における血清 N-ERC/メソテリン濃度は中皮過形成の発生に伴って増加し、中皮腫の発生と進展に伴いさらに増加した。これらの結果から、N-ERC/メソテリンは、MWCNT によるラット中皮腫モデルにおいても、バイオマーカーとして中皮腫の発性経過や発生メカニズムの解析のための動物実験に利用できることが示された。

また、MWCNT 繊維サイズの違いにより中皮腫誘発性の差異が認められたことから、形態は中皮腫誘発性の重要な因子のひとつと考えられた。

E. 健康機器情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kubota, R., Tahara, M., Shimizu, K., Sugimoto, N., Hirose, A., Nishimura, T. (2011) Time-dependent variation in the biodistribution of C60 in rats determined by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Toxicology Letters*, 206, 172-177.
 - 2) Yamaguchi, A., Fujitani, T., Ohyama, K., Nakae, D., Hirose, A., Nishimura, T., Ogata, A. (2012) Effects of sustained stimulation with multi-wall carbon nanotubes on immune and inflammatory responses in mice. *J. Toxicol. Sci.* Vol.37, No.1, 177-189.
 - 3) Fujitani, T., Ohyama, K., Hirose, A., Nishimura, T., Nakae, D., Ogata, A. (2012) Teratogenicity of multi-wall carbon nanotube (MWCN) in ICR mice. *J. Toxicol. Sci.* Vol.37, No.1, 81-89.
- ### 2. 学会発表
- 1) Kubota, R., Tahara, M., Shimizu, K., Kobayashi, N., Sugimoto, N., Hirose, A., Nishimura, T. (2011) Time-dependent biodistribution of C60 in rat after tail-vein administration, 47th Congress of the European Societies of Toxicology, Paris, France, August, abstracts. 2342.
 - 2) 坂本義光、大山謙一、広瀬明彦、西村哲治、中江大、小縣昭夫：2種の多層カーボンナノチューブ (MWCNT) のラット腹腔内投与による中皮腫の誘発、第38回日本トキシコロジー学会、2011年、7月、横浜.
 - 3) 山口敦美、藤谷智子、大山謙一、広瀬明彦、西村哲治、小縣昭夫、中江大：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(II)、第38回日本トキシコロジー学会、学術年会、2011年、7月、横浜.
 - 4) Sakamoto, Y., Ogata, A., Nishimura, T., Hirose, A., Nakae, D. (2011) Influence of the product level physic-chemical property on the carcinogenicity of multi-wall carbon nanotube in rats. 第70回日本癌学会、2011年、10月、名古屋.
 - 5) 坂本義光、大山謙一、広瀬明彦、西村哲治、中江大、小縣昭夫：ラットにおける多層カーボンナノチューブの発がん性に対して製品レヴェルの物理化学

的性質が及ぼす影響、第 28 回日本毒性
病理学会、2012 年、2 月、東京.

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を
含む）

3. その他
なし

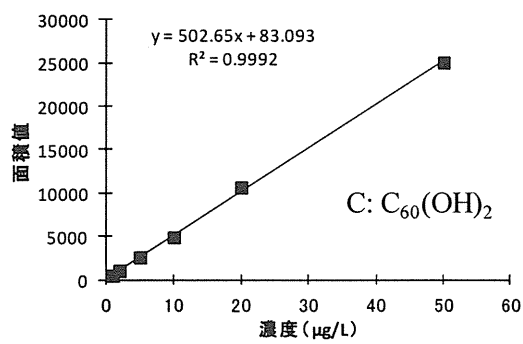
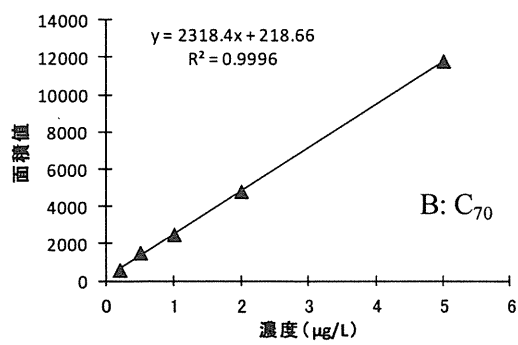
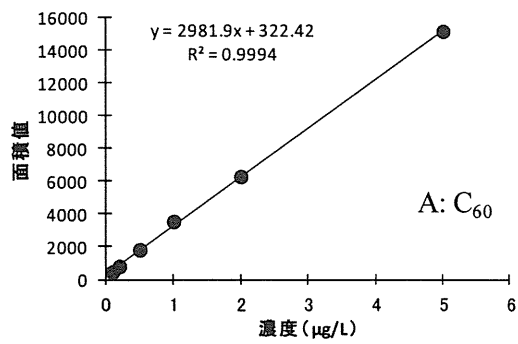


図1 フラーレン C₆₀、フラレン C₇₀ 及び水酸化フラレン C₆₀(OH)₂ の検量線

表 1 MWCNT の中皮腫誘発性における用量相関性及び投与部位による影響の検討

実験群	用量 mg/kg	終了時 ^{a)} 生存率	中皮増殖性病変									
			観察 例数 ^{b)}	変化 なし	肥大	過形成	中皮腫				計	%
							+1	+2	+3	+4		
陰嚢腔内												
対照群	0	5/5	5	10	0	0	0	0	0	0	0	0
Cro	1.0	10/10	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0
MWCNT	0.1	12/12	12	4	7	1	0	0	0	0	0	0
	0.3	12/12	12	1	4	2	2	1	2	0	5/12	42
	1.0	12/12	12	0	0	1	3	4	2	2	11/12	92
腹腔内投与												
対照群	0	5/5	5	10	0	0	0	0	0	0	0	0
Cro	1.0	9/9	9	9	1	1	0	0	0	0	0	0
MWCNT	0.1	10/11	11	0	1	3	2	1	2	2	7/11	64
	0.3	8/12	12	0	0	2	1	0	2	7	10/12	83
	1.0	5/11	11	0	0	1	1	1	0	8	10/11	91

a) 終了時生存率: 生存数/有効動物数, b) 死亡例+生存例+瀕死例
 中皮腫の腹腔内における進展の程度: +1極軽度, +2軽度, +3中等度, +4強度

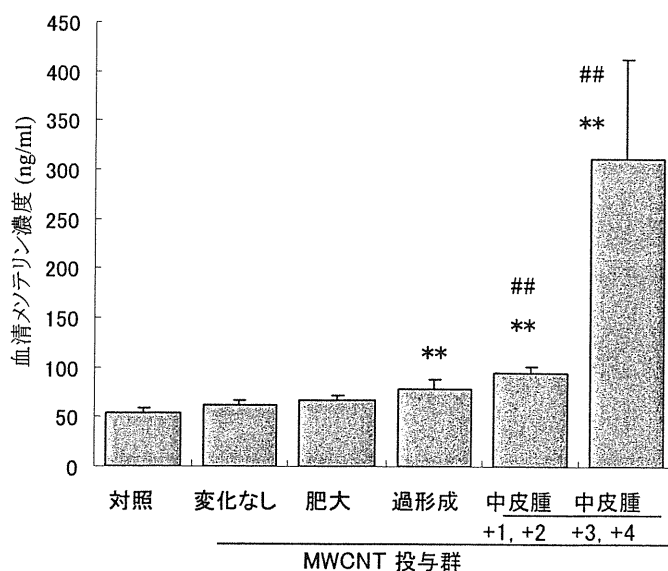


図 2 MWCNT の中皮増殖性病変の進展に伴う
 血清 N-ERC/メソテリン濃度の変動

表2 5種のMWCNTの中皮腫誘発性の比較

実験群	使用動物数	有効動物数	解剖経過			生存率	中皮腫発現率
			死亡	瀕死	終了		
対照群 (2%CMC)	12	10	5	0	0	10/10 (100%)	0/12 (0%)
M	12	12	4	7	1	1/12 (8%)	12/12 (100%)
N	12	10	5	2	3	3/10 (30%)	10/10 (100%)
WL	15	15	4	11	0	0/15 (0%)	15/15* (100%)
WS	15	14	0	0	14	14/14 (100%)	0/14* (0%)
T	15	14	0	0	14	14/14 (100%)	0/14* (0%)

*: 肉眼所見

平成 23 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
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」於いて、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 系の開発を試み成功した。

A. 研究目的

樋野らは、遺伝性ラット腎発がんの進行
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
なりうることが予測された。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
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71 k D a からなるG
P I 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、31 k D a
(N-ERC/mesothelin) と40 k D a
(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31 k D a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」にお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資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える。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。本年度は、具体的にマウス肺がんモデルで血液測定を行い、病理学的に早期病変から血中濃度が高値を示すことが判明した。

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に成功した。実際の担がんマウスの血中濃度の検定に使用出来ることが判明した。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 1) 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* 102: 720-727, 2011.
- 2) Imashimizu K., Shiomi K., Maeda M., Aoki N., Igarashi K., Suzuki F., Koizumi M., Suzuki K. and Hino O.: Feasibility of large-scale screening using N-ERC/mesothelin levels in the blood for the early diagnosis of malignant mesothelioma. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2: 409-411, 2011
- 3) Shiomi K., Shiomi S., Ishinaga Y.,

Sakuraba M., Hagiwara Y., Miyashita K., Maeda M., Suzuki K., Takahashi K. and Hino O.: Impact of renal failure on the tumor markers of mesothelioma, N-ERC/mesothelin and Osteopontin. *Anticancer Research*, 31: 1427-1430, 2011

- 4) Kanamori-Katayama M., Kaiho A., Ishizu Y., Okamura-Oho Y., Hino O., Abe M., Kishimoto T., Sekihara H., Nakamura Y., Suzuki H., Forrest A.R.R., Hayashizaki Y.: LRR4 and UPK3B are markers of primary mesothelial cells. *PLoS One*, 6: e25391-25399, 2011

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 23 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

中江 大 東京都健康安全研究センター

小縣 昭夫 東京都健康安全研究センター

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、*gpt-delta* トランスジェニックラットを用いた *in vivo* 遺伝毒性試験を行った。

MWCNT(0601250-01k：φ70~130 nm×1~5・m) を 1 mg/kg、0.5 mg/kg および 0.25 mg/kg の用量で単回気管内投与した。また、遺伝毒性試験のポジティブコントロールとして、強変異原性物質である ENU (35.6 mg/kg) を腹腔内投与した群を設定した。投与後 28 日後に動物を安楽死させ、末梢血および肺を採取した。採取した末梢血については、近年開発されつつある *Pig-a* 遺伝子 *in vivo* 突然変異試験法により *in vivo* 遺伝毒性を評価した。また、肺については、肺から DNA を抽出し、*gpt* 遺伝子突然変異試験法により *in vivo* 遺伝毒性を評価した。

末梢血を用いた *Pig-a* 遺伝子突然変異試験の結果、ENU 投与群では有意な *Pig-a* 遺伝子変異頻度の上昇が認められたが、MWCNT を気管内投与した投与群すべてで陰性対照群と比較し有意な差は見られなかった。肺由来 DNA を用いた *gpt* 遺伝子突然変異試験では、統計学的な有意差は無いものの ENU 投与群では変異頻度上昇傾向が見られたが、すべての MWCNT 投与群で陰性対照群と比較し全く差は見られなかった。我々が実施した標的臓器の異なる 2 種類の *in vivo* 遺伝毒性試験の結果から、我々が用いた MWCNT は *in vivo* では遺伝毒性を示さないと考えられた。

キーワード：カーボンナノチューブ（MWCNT）、*in vivo* 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、ナノマテリアルの *in vivo* 遺伝毒性試験として、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。マウスにフラレン (C60) 3mg/匹を腹腔内投与し、2 週間後、8 週間後に赤血球中の *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、直接暴露される組織を含めた複数組織での遺伝毒性評価による検討が必要であると考えられた。

今年度は、MWCNT を気管内投与した動物

個体の *in vivo* 遺伝毒性を、直接暴露される肺を含めた複数組織で調べた。

B. 研究方法

(1) MWCNT の気管内投与と組織採取

MWCNT 溶液を溶媒 0.2%CMC 溶液を用いて、投与用量 1 mg/kg, 0.5 mg/kg および 0.25 mg/kg、投与量 1 ml/kg となるように調整した。7 週齢の雄 F344/NS1c-Tg (*gpt-delta*) ラット、各群 6 匹に麻酔 (エチルエーテル) を施した上で調整 MWCNT を特殊シリンジ (ペンセンチュリー) にて気管内に単回投与を行った。陰性対照群は溶媒である 0.2%CMC 溶液のみを気管内に単回投与したものとした。遺伝毒性試験の陽性対照群として ENU を投与用量 35.6 mg/kg となるように PBS を用いて調整し、単回腹腔内投与した。加えて、1 mg/kg の MWCNT 気管内投与と同時に 35.6 mg/kg の ENU を腹腔内投与した投与群も作成した (図 1)。ENU 投与の際は、条件を同一にするために麻酔を施した上で処置した。すべての群において、投与後 4 週間目に麻酔下で採血を行い、安楽死させたあと解剖により肺を採取した。

(2) *Pig-a* 遺伝子突然変異試験

陰性対照群末梢血を PBS に懸濁し、FITC で標識された抗 CD59 抗体およびビオチンで標識された抗赤血球抗体 (HIS49) で血液細胞を 2 重染色した。同時に、それぞれの抗体の単染色および無染色の血液サンプルを作成し、フローサイトメーターのゲート設定のためのサンプルとした。また、各投与群の血液サンプルについては 2 重染色を行った。ビオチンで標識された抗赤

血球抗体 (HIS49) で染色を行った血液サンプルについては、すべて APC で標識された Streptavidin-Allophycocyanin で二次染色を行った。蛍光標識した血液サンプルを用いて、全赤血球中の CD59 陰性頻度を算出し、*Pig-a* 遺伝子変異頻度とした。

(3) *gpt* 遺伝子突然変異試験

肺をダウンス型ホモジナイザーで破碎後、DNA を抽出し、Transpack (Stratagene) を用いてラットゲノム中の λ EG10 フェージを試験管内でパッケージングした。得られたフェージの力価を大腸菌 (YG6020 株) を用いて計測し、50 万以上のタイターをもって試験成立とした。また、*gpt* 変異株を 6TG 耐性の表現型により選択した。*gpt* 遺伝子突然変異頻度は、総コロニー中の 6TG 耐性コロニー数により算出した。なお、*gpt* 遺伝子突然変異試験については、労力が多大であるため、陰性対照群、MWCNT (1 mg/kg) 投与群および ENU 投与群のみ実施した。

C. 研究結果

(1) *Pig-a* 遺伝子突然変異試験

陽性対照群である ENU を投与した群では、非常に強い *Pig-a* 変異頻度の上昇が見られた。一方で、MWCNT を投与した群すべてにおいて、溶媒対照群との *Pig-a* 変異頻度の差は認められなかった。また、ENU 腹腔内投与と MWCNT 気管内投与を同時に施した群では、ENU 単独投与と同程度の *Pig-a* 変異頻度の上昇が見られた (図 2)。

(2) *gpt* 遺伝子突然変異試験

陽性対照である ENU を投与した群では、

統計学的な有意差は認められなかったが、*gpt* 変異頻度の上昇傾向が見られた。一方で、MWCNT を投与した群において、溶媒対照群との *gpt* 変異頻度の差は認められなかった (図 3)。

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おり^{16)、17)、18)}。それらによる酸化的 DNA 損傷により遺伝毒性が誘発される可能性が考えられている。*gpt-delta* トランスジェニックマウスを用いた Kato らの報告では、MWCNT 単回投与や 2 回投与では肺での遺伝毒性は認められないが、4 回の連続投与で有意に遺伝毒性を認める結果が報告された。これらの報告では肺における酸化的 DNA 損傷や過酸化脂質に由来する DNA 付加体の上昇も報告されており、前述のように、MWCNT 投与による酸化的な事象により遺伝毒性を示すのではないかと考えられる¹⁹⁾。しかしながら、今回我々が試験した MWCNT の *in vivo* 遺伝毒性試験では遺伝毒性は認められなかった。我々は、肺での遺伝毒性を MWCNT 気管内単回投与で評価しており、Kato らとは使用した動物種は異なるものの、単回投与では遺伝毒性は認められないという一致した結果となった。その一方で、我々は直接 MWCNT が暴露されない血液細胞での遺伝毒性試験である *Pig-a* 遺伝子突然変異試験を併せて行った。*Pig-a* 遺伝子突然変異試験では、骨髄の造血幹細胞に生じた突然変異が検出される試験系である。例えば、MWCNT により炎症反応が過剰に発生し、それに伴う酸化的な事象に由来して遺伝毒性が検

出されるならば、*Pig-a* 遺伝子突然変異試験でも何らかの遺伝毒性が検出されるのではないかと予測されたが、結果は陰性であった。その理由として、今回の試験では致死量に近い量を投与しているため、投与量の問題というよりも、投与回数に由来するのではないかと考えられる。すなわち、Kato らの報告では、単回投与よりも、複数回投与することでより過剰な炎症反応が慢性的に生じ、それに伴って遺伝毒性が検出されている一方で今回のように単回投与では遺伝毒性を發揮するほど強い炎症反応が起きていないのではないかと、という可能性が指摘できる。

E. 結論

MWCNT を単回で気管内投与し、複数の臓器を用いて *in vivo* 遺伝毒性試験を行った結果、解析を行ったすべての群（陽性対照を除く）で MWCNT による *in vivo* 遺伝毒性は認められなかった。単回気管内投与では遺伝毒性陰性であるが、4 回の連続投与では陽性という結果が最近報告されており、これらを踏まえた上で複数回の投与群での解析の検討が必要であると考えられる。

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.
- 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 PDGFmRNA 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) Kato T, Totsuka Y, Ishino K, Matsumoto Y, Tada Y, Nakae D, Goto S, Masuda S, Ogo S, Kawanishi M, Yagi T, Matsuda T, Watanabe M, Wakabayashi K. 2012. Genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes in both in vitro and in vivo assay systems. *Nanotoxicology*. 2012 Mar 8. [Epub ahead of print]

G. 健康危機情報 特になし

H. 研究発表

1. 論文発表

Zhang, X.*, Horibata, K*, Saijo, M.*,

Ishigami, C., Ukai, A., Kanno, SI., Tahara, H., Neilan, E.G., Honma, M, Nohmi, T., Yasui, A. and Tanaka, K. Mutations in UVSSA cause UV-sensitive syndrome and destabilize ERCC6 in transcription-coupled DNA repair. *Nature Genetics*, *in press* (*these authors contributed equally to this work.)

Kimoto, T., Chikura, S., Suzuki, K., Kobayashi, X., Itano, Y., Horibata, K., Honma, M., Dobrovolsky, V.N., Heflich, R.H., Miura, D. and Kasahara, Y. Further Development of the Rat Pig-a Mutation Assay: Measuring Rat Pig-a Mutant Bone Marrow Erythroids and a High Throughput Assay for Mutant Peripheral Blood Reticulocytes. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 2011, 52:774-783

2. 学会発表

Horibata, K., Ukai, A., Kimoto, T., Suzuki, T., Kamoshita, N., Masumura, K., Nohmi, T. and Masamitsu Honma, M. Evaluation of in vivo genotoxicity induced by N-ethyl-N-nitrosourea, benzo[a]pyrene and 4-nitroquinoline-1-oxide by *Pig-a* and *gpt* assays. Society of Toxicology 51st Annual Meeting, March 2012, San Francisco

Horibata, K., Ukai, A., Masumura, K.,

- Nohmi, T. and Honma, M. In Vitro Genotoxicity Tests Using Primary Hepatocytes. Environmental Mutagen Society 42nd Annual Meeting, October 2011, Montreal
- Kimoto, T., Horibata, K., Muto, S., Sanada, H., Hashimoto, K., Itoh, S., Uno, Y. and Honma, M. A Japanese Collaborative Study on Rat Pig-a Assay; Report on a Transferability of the Assay Method and Interlaboratory Difference. Environmental Mutagen Society 42nd Annual Meeting, October 2011, Montreal
- Kimoto, T., Chikura, S., Suzuki, K., Kobayashi, X., Itano, Y., Horibata, K., Honma, M., Dobrovolsky, V.N., Heflich, R.H., Miura, D. and Kasahara, Y. Further Development of the Rat Pig-a Mutation assay: Measuring Rat Pig-a Mutant Bone Marrow Erythroids and a High Throughput Assay for Mutant Peripheral Blood Reticulocytes. Environmental Mutagen Society 42nd Annual Meeting, October 2011, Montreal
- Zhang, X., Horibata, K., Saijo, M., Ishigami, C., Ukai, A., Kanno, S.I., Neilan, E.G., Tahara, H., Honma, M., Nohmi, T., Yasui, A. and Tanaka, K. Molecular cloning of the gene for UV-Sensitive Syndrome with deficiencies in Transcription-coupled DNA repair. Conference: Response to DNA damage: from molecular mechanism to human disease, April 2011, Egmond aan Zee, Netherlands
- 大波冴子, 曹永晚, 豊田武士, 堀端克良, 本間正充, 能美健彦, 西川秋佳, 小川久美子. glycidol と 3-MCPD 及びこれらのエステル化合物におけるラット 28 日間反復投与試験の影響について. 第 28 回日本毒性病理学会総会, 2012 年 2 月
- Zhang, X., Horibata, K., Saijo, M., Ishigami, C., Ukai, A., Kanno, S.I., Neilan, E.G., Tahara, H., Honma, M., Nohmi, T., Yasui, A. and Tanaka, K. Molecular cloning of the gene for UV-sensitive syndrome with deficiencies in transcription-coupled DNA repair. 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011 年 12 月
- Saijo, M., Zhang, X., Horibata, K., Ishigami, C., Ukai, A., Kanno, S.I., Tahara, H., Neilan, E.G., Honma, M., Nohmi, T., Yasui, A. and Tanaka, K. UVSSA and USP7 cooperate to stabilize CSB in transcription-coupled DNA repair. 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011 年 12 月
- 堀端克良, 鶴飼明子, 木本崇文, 鈴木哲矢, 鴨下渚, 能美健彦, 本間正充. *Pig-a* アッセイとトランスジェニック突然変異試験の組合せに関する研究. 日本環境変異原学会第 40 回大会, 2011 年 11 月

木本崇文, 堀端克良, 武藤重治, 真田尚和,
橋本和之, 伊東悟, 宇野芳文, 本間正
充. ラット末梢血を用いる *Pig-a* アッ
ッセイ共同研究: 測定技術の共有化と施
設間差に関する研究報告. 日本環境変
異原学会第 40 回大会, 2011 年 11 月
堀端克良, 増村健一, 能美健彦, 本間正充.
In vitro genotoxicity assay using
primary hepatocytes derived from *gpt*
delta transgenic mouse. 第 70 回日本
癌学会学術総会, 2011 年 10 月
大波冴子, 曹永暉, 豊田武士, 堀端克良,
本間正充, 能美健彦, 西川秋佳, 小川
久美子. Evaluation of in vivo
genotoxicity of glycidol and 3-MCPD

and associated esters, using *Pig-A*
and micronucleus assays. 第 70 回日
本癌学会学術総会, 2011 年 10 月
木本崇文, 千蔵さつき, 鈴木久美子, 小林
小梅, 板野泰弘, Vasily N. Dobrovolsky,
Robert H. Heflich, 堀端克良, 本間正
充, 三浦大志郎, 笠原義典. 新規 in
vivo 遺伝子突然変異評価系 (*Pig-a* ア
ッセイ) の検討: 骨髄エリスロイド及
び末梢血網状赤血球を用いる *Pig-a* ア
ッセイの開発. 第 38 回日本トキシコ
ロジー学会学術年回, 2011 年 7 月

G. 知的所有権の取得状況

なし

F344/NSIc-Tg (*gpt-delta*)

8W ♂ x 6

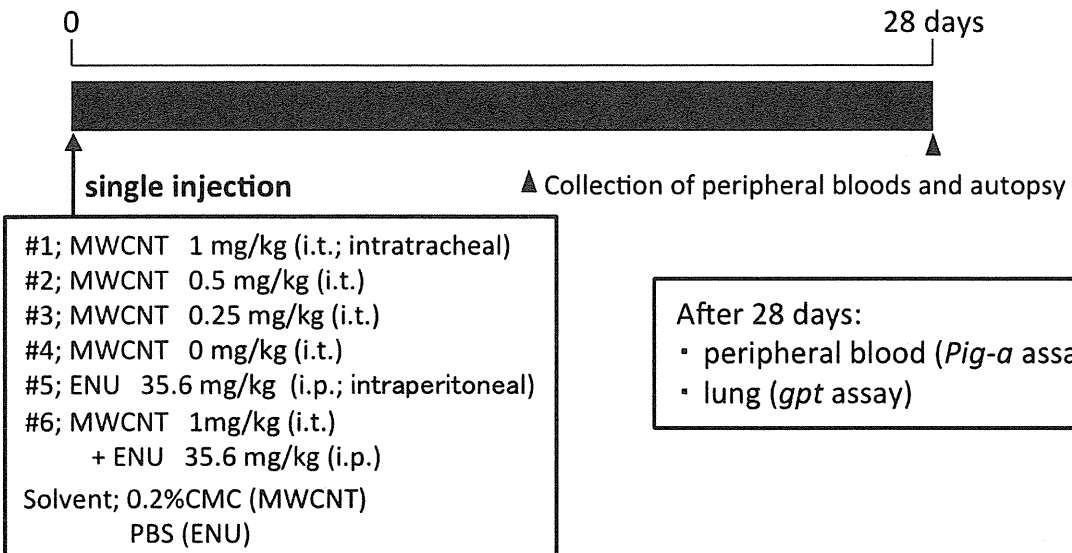


図1. MWCNT 気管内投与 *in vivo* 遺伝毒性試験スケジュール

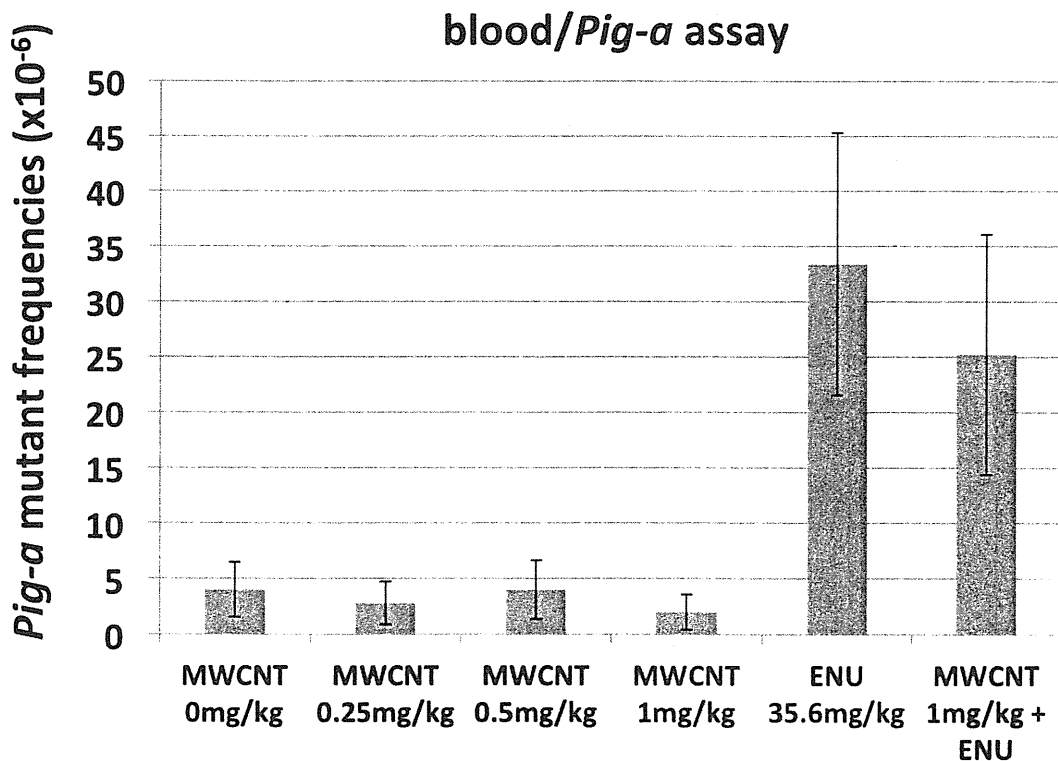


図2. 末梢血 *Pig-a* 遺伝子突然変異試験

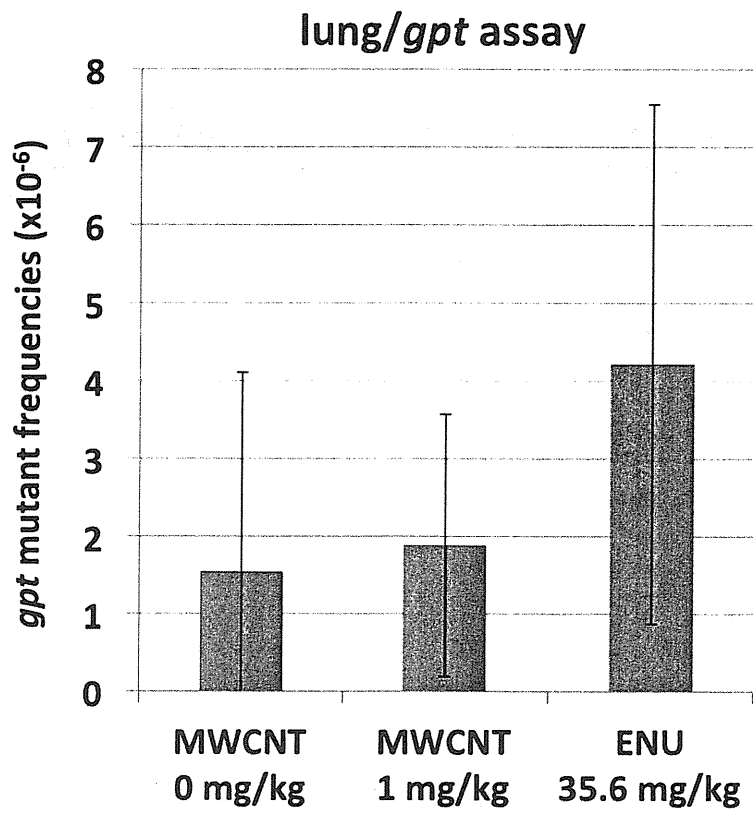


図3. 肺 *gpt* 遺伝子突然変異試験

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

本研究では、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。これまでに、N 社（2 種類）のカーボンナノチューブ（CNT）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を明らかにした。また、CNT 超音波処理上清中に Mn、Fe、Rb、Cs などの金属が溶出しており、そのうち Mn、Fe イオンに Reactive oxygen species(ROS)を介した神経幹細胞増殖抑制作用、ミクログリア細胞毒性があることを明らかにした。本年度は、CNT のメーカー間比較を行うために、複数メーカーの CNT を用い、同様の検討を行った。その結果、ミクログリアの細胞毒性に関して、メーカー間で違いがあることが示唆された。また、その作用は CNT 自体の作用である可能性も示唆された。

A. 研究目的

これまでに、N 社の CNT 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（Mn, Rb, CS, Tl, Fe）が溶出しており、これらの金属が単独で神経幹細胞増殖抑制作用、ミクログリア細胞毒性を有することを明らかにした。本年度はこれらの作用にメーカー間の違いがあるか検討する。N 社、W 社、M 社の複数メーカーの CNT の超音波処理上清を作成し、上清中の金属含有量を測定する。また、

これらの CNT 超音波処理上製の神経幹細胞増殖抑制作用、ミクログリア細胞毒性への関与を明らかにする。

B. 研究方法

0. CNT 調整

CNT は N 社、W 社、M 社より供与された。

- ① N 社 単層カーボンナノチューブ
(Lot. No.
SW1S081016/081029-1F&1D)

(single) , サンプル名 ;
SWCNT(N)

- ② N社 30 ナノクラス CNT (multi) ,
サンプル名 ; MWCNT(N)
- ③ W社 MWCNT (WL) , サンプル
名 ; MWCNT (WL)
- ④ W社 MWCNT (WS) , サンプル名 ;
MWCNT (WS)
- ⑤ M社 MWCNT-7 , サンプル名 ;
MWCNT(M) は 1 mg/ml となるよ
うに PBS に添加し、5 hr ウォー
ターバス超音波処理を行った。こ
の上清を培地で 1/10, 1/100, 1/1000
に希釈した。

1. 金属濃度測定

各 CNT サンプルを 1mg/ml で PBS に添
加し、5 時間超音波処置した上清に含ま
れている金属 Mg, Al, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co,
Ni, Cu, Zn, Ga, As, Se, Rb, Mo, Gd, Sn, Sb,
Cs, Ba, W, Tl, Pb (全 24 元素) に関して測
定を行った。測定は、生活衛生化学部
五十嵐 良明博士に依頼した。

2. 神経幹細胞に対する影響の検討

胎生 16 日齢ラット全脳を培地中でミ
ンスし、EGF, FGF, B27 supplement を添
加した培地により一週間培養した。形成
した Neurosphere を CNT を含むメディウ
ムで 24 時間処理し、BrdU assay

(Promega) により細胞増殖を検討した。

3. ミクログリアに対する影響の検討

哺乳 0-1 日齢ラット全脳をミンスし、
トリプシン処理を行い、75 cm² フラスコ
に播種した。7-10 日後にフラスコを振と
うして回収したミクログリアを 96 穴プ
レートに再播種し、CNT 上清 で 24 時

間処理し、MTT assay (Millipore) により
細胞毒性を検討した。

4. NO 測定

96 穴プレートに播種したミクログリア、
CNT 上清 を 24 時間処理し、培養上清
を回収した。上製中に放出され Nitrate お
よび Nitrite の量を Nitric Oxide Quantitation
Kit (Active Motif) で定量した。

(倫理面への配慮)

動物実験においては国立医薬品食品衛
生研究所「動物実験の適正な実施に関する
規程」に従い、動物愛護の精神に則って実
験を進めた。ウィルスおよび遺伝子組み換
え動物の取り扱い「遺伝子組換え生物等
の使用等の規制による生物の多様性の確
保に関する法律」(所謂カルタヘナ法) お
よび国立医薬品食品衛生研究所「遺伝子組
換え実験安全管理規則」に準拠して取り扱
った。

	試料中濃度 (ppb)							
	PBS	日単	日多	昭V	昭V X	三	前 日単	前 日多
Mg	2.88	76.45	5.11	3.30	26.19	3.07		
Ti	nd	0.182	nd	nd	nd	nd	0.17	0.37
Zn	nd	nd	2.63	0.1	5.14	nd		
V	0.32	0.51	0.35	0.33	0.3	3.16		
Mn	nd	3.6	nd	nd	49	0.08	16.04	0.26
Fe	nd	70.3	0.07	nd	4.6	10.0	7110	nd
Mo	0.03	0.05	0.04	0.03	276.8	0.06		
Rb	3.32	16.91	3.33	3.3	3.48	3.2	13.33	4.61
Al	nd	nd	nd	nd	15.81	nd		
Cs	0.005	0.4	0.02	0.02	0.03	0.01	0.32	0.54

表1. CNT 超音波処理によって溶出した金属
各CNTサンプルを 1 mg/ml で PBS に添加し、5 時間超音波処理した上清に含まれている
金属について元素分析を行った。Mg, Al, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, As, Se, Rb, Mo,
Gd, Sn, Sb, Cs, Ba, W, Tl, Pb(全24元素)に関して測定を行った。
前回の検討では、日単で、7110 ppb もの Fe 金属が確認できたが、今回は7110 ppbしか
確認できなかった。

C. 研究結果

1. 複数メーカーのCNT超音波処理上清中 の金属濃度測定

各CNTサンプルを1 mg/mlでPBSに添加し
、5時間超音波処理した上清に含まれる金