

201133015A

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23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24年(2012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 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 津田 洋幸

平成 24 年 (2012 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	3
II. 研究分担報告書	17
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	19
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	27
3. 発がんに関与する肺マクロファージの <i>in vitro</i> および <i>in vivo</i> 作用機序解析 酒々井 眞澄	29
4. カーボンブラックの肺内噴霧により誘発された肺胞過形成様病変 二口 充	32
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	37
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	43
IV. 研究成果の刊行物・別冊	45

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)

I. 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

多種のナノマテリアルの短期、長期の有害作用検出システムの開発の確立を目的として、以下の研究を基本とする体系的モデルの開発を行った。

①発がん2段階モデルによるプロモーション作用の検討、②ラットへの短期（9～14日）投与による毒性/炎症/免疫反応/増殖性病変の解析、③*in vitro*系による肺胞マクロファージを介する炎症ならびに気管上皮、免疫担当細胞における反応の解析。

④発がんプロモーション試験では、C60は2回の長期実験で弱いプロモーション作用のあることが示された。⑤短期肺内噴霧投与試験において、MWCNT-M（Mitsui社）、MWCNT-N（Nikkiso社）はcrocidolite（青アスベスト）と同様に胸腔内に移行し、臓側中皮の過形成増殖を誘発し、胸膜中皮腫が発生する可能性が示された（投稿中）。⑥MWCNTは凝集体として観察されるが、その大きさと形態の違いが、肺障害や炎症やマクロファージによる貪食や他臓器への移動へ関与するかについて、篩板濾過を行い大きさ（長さ）の違いの影響を検討した。*In vitro*系では篩板を通過したサイズの小さい分画にコロニー刺激因子（Csf3）のmRNA発現量が増大する傾向がみられた。またMWCNT-Mの繊毛への貯留が繊毛運動を含む細胞機能障害、さらには細胞障害を惹起する可能性が示された。試料の成分分析ではSWCNTにはFeが大量に（300～500ppm）、MWCNTには0.3～70ppm程度、Al、V、Co、Ni、Moなどが0.5～2ppm程度に検出され、これらが免疫、炎症反応に関与する可能性が示された。

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

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

二酸化チタニウム、カーボンブラック、酸化亜鉛、銀等のナノマテリアルは広く流通しており、製造者、消費者が曝露されている。また、新規に開発されつつあるフラーレン、炭素ナノチューブ等の炭素ナノマテリアルについては生体における有害作用についての知見は乏しい。主な曝露経路である吸入による毒性試験の実施には、専用設備と莫大な稼働費用が要求され、それを補う中・短期毒性・発がん性の標準的評価法は得られていない。

本研究では、多種のナノマテリアルの短期、長期の有害作用（長期では発がん性）容易に検出可能なシステムの開発を行い、将来標準化を目指すことを目的として、ラットを用いて有害作用の発現機序に基づいた試験法を開発した。被検物質は単層カーボンナノチューブ（SWCNT）（Nikkiso）及び多層カーボンナノチューブ（MWCNT）（Mitsui、Nikkiso、Showadenko社）、フラーレン（C60、フロンティアカーボン社）を用いて解析法の

開発を行った。方法は、① 肺内噴霧法を用いて20～40週程度の中期発がんプロモーション作用、および52週の発がん、慢性毒性作用検出系の開発、② 炎症/増殖病変/免疫毒性/気道への直接障害作用等の解析のための9～14日間の短期試験、③ 初代培養肺胞・気管支上皮、肺胞マクロファージ、不死化単球細胞および不死化がん細胞等に被検物質を曝露させた場合のサイトカイン産生と免疫反応の解析、増殖反応の把握、の探索研究を実施し、データのヒトの毒性・発がん性のリスク評価可能なモデルを確立することにある。この方法を用いて、ナノマテリアル二酸化チタニウムの噴霧曝露による肺胞マクロファージを介する肺発がんプロモーション作用機序を明らかにした（Jiegou, Xu et al. Carcinogenesis, 2010）。この研究でMIP1 α が血清中に検出されることから、ヒトにおける発がん、曝露マーカーとしてのヒト実証研究に発展している。

本研究のために、陽性対照としてMWCNT（Mitsui社、MWCNT-7）、カーボンブラック（WHO/IARC Group 2B）、およびクロシドライト（UICC Grade Asbestos）を用い、SWCNT、MWCNT、C60について、製造時の大きさ・形状の違い、同一MWCNTの篩板濾過によるサイズの違いの生体影響の差異、また含有金属の役割を明らかにし、新規の評価法を確立することを目的とした。

B. 研究方法

①. 発がん2段階モデルによるプロモーションならびに52週の発がん・慢性毒性作用の検

討

雌雄ラットに肺発がん物質

N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine(DHPN)を最初の2週間に、0.2%の用量で飲水投与し、その2週後より、調製した被検物質0.5mlを2週に1回20〜40週までに肺内噴霧投与した。供試したナノマテリアルと懸濁液は以下に示す。

1) MWCNT-M (Mitsui 社) (500ppm、1%氷砂糖溶液懸濁) にて投与した。

2) PF-68に懸濁したMWCNT (Nikkiso) を、篩板(篩目直径25 μ m)に濾過し、濾過前(W)、濾過分画 (FT)、濾過されない残存分画(R)の3分画に分けた。各試料を電子顕微鏡にて撮影後、マップメータを用いて300から500本のMWCNT-Nの長さを測定し、その分布をグラフ化して平均長が異なるかを検討した。250ppm にて8回/4週肺内噴霧した52週の試験は現在32週経過中。上記の研究の進行中に、MWCNT-Nは企業が生産から撤退したために材料の入手が出来なくなり、プロモーション試験は実施出来なかった。

3) MWCNT-S (Showadenko 社) は製造段階で形状の異なる VGCF (針状) および VGCF-X (毛玉状) (PF-68 懸濁)。明肺胞上皮の瀰漫性増殖巣においては明らかなプロモーション作用は無かったため、VGCF (針状) および VGCF-X (250ppm) のみの8回/4週肺内噴霧投与で増殖病変の可逆性観察試験を実施している。現在11週経過中。

4) C60 (フロンティアカーボン社) (1%氷砂糖溶液懸濁) 1%氷砂糖溶液懸濁にて噴霧した。現在病理標本を解析中。

・陽性対照は被検物質と同じ用量 (500ppm) のMNCNT-Mおよびcrocidolite (青アスベスト) (UICC Grade) およびcarbon black (CB) (WHO/IARC Group 2B) とした。

これらについて、肺および全身臓器の腫瘍発生頻度・個数の定量解析を行った。(津田・酒々井・二口)

②.ラットへの短期(9〜14日)投与による毒性/炎症/免疫反応/増殖性病変の解析

1) SWCNT-N、MWCNT-N、MWCNT-M、およびcrocidoliteについて、0.1%Tween含有生食に500ppm懸濁してF344雄ラットに9日間に5回投与した。胸腔洗浄液、肝、腎、脾、脳、リンパ節および全身臓への移動について、パラホルムアルデヒド1日固定後病理組織パラフィンブロックから走査型(SEM)および透過型(TEM)電子顕微鏡標本をつくり、凝集体の偏光顕微鏡による詳細な定量観察を行った(津田)。

2) MWCNT-N(濾過前W、篩板濾過FTおよび篩板残存R)を8回/2週肺内噴霧して得られた肺組織に与える影響を病理組織学的に検討した。ラット肺マクロファージに各分画のMWCNT-Nを一定時間曝露させてtotalRNAを抽出し、RT-PCR法にて各分画の曝露が対象遺伝子発現に与える影響を検討した。さらに、*in vivo* 試験にて得られた肺組織(MWCNT曝露群、PF68曝露群(コントロール)よりtotalRNAを抽出後、同法にて各分画の曝露が対象遺伝子発現に与える影響を検討した。対象遺伝子は前年度に実施したマイクロアレイ解析(遺伝子数2万、東レ)を行った結果、増殖系とサイトカイン系遺伝子群で最も発

現が増加した遺伝子Csf3およびIL6、マクロファージ関連遺伝子で発現が増加した遺伝子Cxcl2およびCcl4とした（酒々井）。

3) 雌 F344 ラットに、CB/氷砂糖懸濁液 (500ppm) を14日に8回、肺内に直接噴霧した。肺内に噴霧されたCBが胸腔へ移行するかを検討する目的で、屠殺時に胸水洗浄液を採取し、洗浄液中の細胞数とその種類を検索した。（二口）

4) 気管上皮毒性を検討するために、マウス気管・気管支より酵素処理によって単離した上皮繊毛細胞における膜電流を測定した（今泉）

③.in vitro系による肺泡マクロファージを介する炎症ならびに気管上皮、免疫担当細胞反応の解析

1) 正常ラットにチオグリコレートを肺内噴霧して肺泡マクロファージを誘導した後に肺を取り出し、細切してマクロファージを濾過採取し、その一定数を RPMI 1640 (10% FBS) 培地に移し、そこに被検物質を *in vivo* と同じ分散状態に調整したものを加えて24時間培養した。被検物質を貪食した培養マクロファージについて炎症性サイトカイン、増殖因子等の産生について遺伝子・蛋白発現の解析を行った。また培養上清を回収してヒト肺癌細胞等をDMEM (10% FBS) 培地に加え、細胞増殖活性を観察した。さらにヒト肺癌培養細胞株A549およびヒト中皮細胞株Mesolの培養液に加え72時間後に細胞数を計測し、肺マクロファージから分泌された因子を含む培養上清の細胞増殖に対する影響を検索した。（津田、酒々井、二口）

2) 気道における障害作用の解析において、マウス気道上皮組織から、コラゲナーゼ処理により繊毛上皮細胞を単離し、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。また細胞内 Ca^{2+} 濃度を Ca^{2+} 蛍光色素 fura2 あるいは fluo3 を用いることにより、膜電位を電位感受性蛍光色素 DiBAC₄(3)を用いることにより、それぞれ測定した。さらに繊毛運動を高速デジタルビデオカメラを用いて取り込み、繊毛運動を定量的に解析した。MWCNT-S (PF-68 に 500 μ g/ml で懸濁し、最終的に 5ppm の灌流液として調整) を単離繊毛細胞へ適用し、画像解析を試みた。マウス気道上皮組織から RNA を抽出し、各種イオンチャンネルの mRNA 発現を real time PCR 法により半定量的に検討した（今泉）。

3) 被検物質に含まれる金属の定量とアレルギーとしての作用」解析については、MWCNT-M または MWCNT-N に種々の分解液（硝酸または硝酸とフッ化水素酸との混液等）を加えマイクロウェーブ分解した後、超純水で一定量としたものを試験溶液とした。別に、試料に一定量の水、生理食塩水、界面活性剤含有溶液または硝酸を加えて超音波処理し、溶出金属の分析用試料とした。それぞれ調製した試料溶液は、ICP-MS を用いて金属の定性及び定量を行った。また、エネルギー分散型蛍光 X 線分析装置を用いて試料中の金属の同定を行った。金属酸化物の懸濁液の粒度分布は動的光散乱法により測定した。ヒト単球由来細胞株 THP-1 細胞に試料懸濁液及び感作性物質を加えて一定期間培養した後、

PI 色素で染色し、フローサイトメーターで生存率を求めた。更に、細胞の免疫活性化の指標として、細胞表面抗原 CD86 または CD54 の発現率を FITC 標識した各抗体で染色した後、フローサイトメーターを用い相対蛍光強度より求めた（五十嵐）。

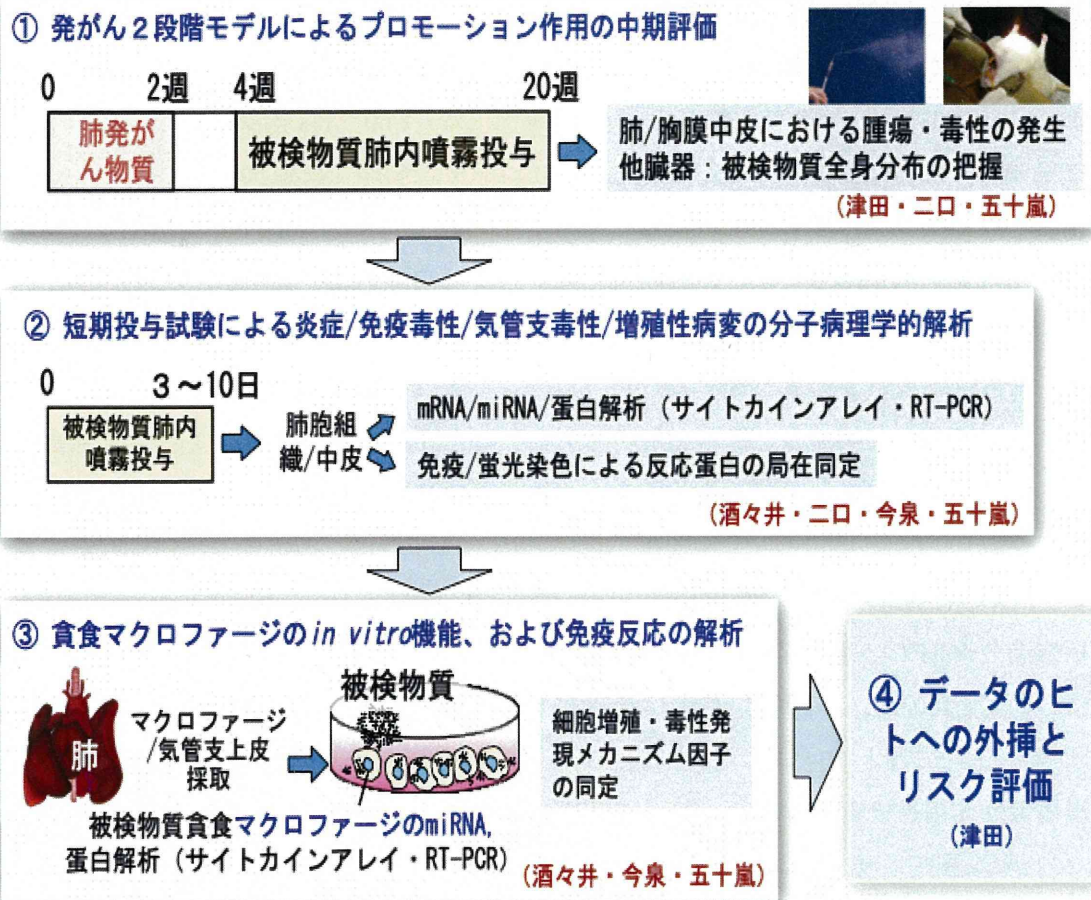
モーション作用の機序に關与する因子をそれぞれの被検物質について解析し、最終的には動物より得られたデータからヒトリスクへの外挿を試みる（津田）。

全体の流れ図を以下に示す。

④.データのヒトへの外挿とリスク評価

以上の実験より、SWCNT、MWCNT、フラーレンについて、陽性対照のアスベストと比較することによって、毒性および発がんプロ

津田班申請提案図（H20年2月）



(倫理面への配慮)

班員は我が国の「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(全員)、また名古屋市立大学医学部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)(津田・酒々井・二口・今泉)。

C. 研究結果

①. 発がん2段階モデルによるプロモーションおよび発がん作用の検討

1) MWCNT-M: 氷砂糖(Rock candy)溶液に懸濁してDHPN投与後に125、250ppmを40週投与した実験では明らかなプロモーション作用は見られなかった。この懸濁液では分散状態は良いが肺毒性が観察されたことから、分散性に優れかつ毒性の少ないPF-68ポリマーに懸濁して実施し、標本を解析している。24年度中にはまとめて論文化できる(津田、二口)。

2) MWCNT-Nについて篩板濾過前(W)、篩板濾過分画(FT)、濾過されない残存分画(R)について、250ppm、1回0.5mlを14日間に8回投与し、52週と104週に屠殺剖検を行い、慢性毒性作用を検索する実験を行っている

(32週経過中)。噴霧終了直後に屠殺した群では、肺胞に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分画の曝露では炎症像がFT分画曝露に比べて増えMWCNT-N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みられた。PF68のみを曝露したコントロール群において若干の炎症細胞浸潤がみられた(酒々井)。

3) MWCNT-S(Showadenko社): VGCF(針状)およびVGCF-X(毛玉状)のPF68懸濁液を250ppmの濃度で24週噴霧した実験では、両者ともDHPN誘発増殖巣においては明らかなプロモーション作用は無かった。両物質により誘発された肺胞上皮の瀰漫性増殖巣が観察されたがVGCF-Xは走査型電子顕微鏡では画像が得られないため、VGCF(針状)のみの8回/4週投与で増殖病変の可逆性観察試験を実施している。現在11週経過中である(津田)。

4) C60(1%氷砂糖溶液懸濁)のプロモーション実験では追試実験の病理標本を解析中である。CBは、DHPNで誘発された肺胞過形成、肺腺腫および肺腺がんとは別の部位に観察された。DHPNで誘発された病変の平均発生個数は、CB噴霧群と対照群で差は見られなかった。肺胞過形成様病変の平均発生個数は、DHPNの処置に関わらずほぼ同数であった。24年度にこの病変の可逆性の解析実験実施する予定である。(二口)。

②. ラットへの短期(9~14日)投与による毒性/炎症/免疫反応/増殖性病変の解析

1) MWCNT-Mのプロモーション試験はプロモーション作用が無かったので確認再実験中である。

2) SWCNT-N、MWCNT-M、MWCNT-N、crocidolite 250ppm(1%Tween含有生食)懸濁液を9日間に5回肺内噴霧投与し、胸腔と全

身臓器の分布を観察した。胸膜洗浄液の炎症細胞数はいずれも有意に増加した。この程度はSWCNTよりもMWCNTにより顕著であった。胸膜生食洗浄液ペレットおよび各臓器の病理標本を偏光顕微鏡およびSEM観察すると、胸腔ではいずれの検体も多くはマクロファージ内に、また縦隔リンパ節、肝、腎、脳にも少量見出された。またいずれの検体においても臓(肺)側胸膜中皮細胞の増殖巣が発生し、中皮8個以上からなる増殖巣はすべての群でPCNA値が有意に増加した。これらの物質は全身に少数見られるがとくに縦隔リンパ節に多く検出されることから、肺胞からリンパ流を介して縦隔に入ったと考えられた。(津田・投稿中)

3) 篩板(篩目直径25 μ m)による篩板濾過前(W)、篩板濾過分画(FT)、濾過されない残存分画(R)の3分画に分けたもの(PF-68懸濁)について、肺内噴霧終了直後に屠殺した群では、肺胞に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分画の曝露では炎症像がFT分画曝露に比べて増えMWCNT-N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みられた。PF68のみを曝露したコントロール群において若干の炎症細胞浸潤がみられた(酒々井)。

③. *in vitro*系による肺胞マクロファージを介する炎症ならびに気管上皮、免疫担当細胞反応の解析

1) 上記のラットにおける短期投与における胸腔内への移行と臓側中皮の増殖変化から、検体を肺より採取したマクロファージ培養

液に検体を加えた上清液をヒト中皮腫細胞に対して増殖活性を示した。(津田)

2) CBを貪食した肺マクロファージの培養上清を添加してもA549およびMeso1のいずれに対しても細胞増殖促進作用はみられなかった。これに対しCBを直接A549およびMeso1の培養上清に加えたところ、いずれの細胞に対しても、CBは2ppm, 10ppm, 50ppmの濃度で有意に細胞増殖を抑制した。(二口)

3) 培養肺マクロファージにおいて、Cxcl2ではRとW分画においてコントロールに比べて有意に発現が増加した。4 遺伝子において分画間で発現量差はみられなかった。肺組織でのCsf3、IL6、Ccl4、Cxcl2遺伝子発現はいずれの分画もコントロールと比べて有意な変化は認めなかった。(酒々井)

4) ①マウス気管・気管支より酵素処理によって単離した上皮絨毛細胞において膜電流を測定したところ、ATP感受性 K^+ (K_{ATP})チャネル開口薬diazoxideで活性化され、阻害薬glibenclamidで抑制される電流成分を検出した。RT-PCR解析により上記電流成分に対応したKir6.2チャネルと修飾分子であるSUR2の発現が見出された。②単離絨毛細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度を電位固定下で測定し、膜電位を過分極させることにより、細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇し、この上昇は外液中の Ca^{2+} 除去により消失することを発見した。さらに膜電位固定化下での過分極時に絨毛運動が増強されることを高速画像解析により明らかにした。③ K_{ATP} チャネル開口薬の適用により絨毛細胞に過分極が生じ、細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇すること、また絨毛運動も増大することを見出した。

これらの知見に基づき、ラットを用いて単離
繊毛細胞をカーボンナノチューブの 500ppm
生食懸濁液で灌流したところ、繊毛へのナノ
チューブの貯留が認められた。一方、直径 1
 μm の蛍光球形ビーズ (Invitrogen; Fluorescent
Microspheres) を同様に適用したところ、顕著
な貯留は認められなかった (今泉)。

5) カーボンナノチューブ (CNT) の残存金
属を効率良く抽出できるマイクロウェーブ分
解条件を検討した。硝酸、フッ化水素酸及び
過酸化水素との混液を分解溶液に用いた場合、
不溶物として残る CNT の量は減少したが、
定量される金属の種類及び量は硝酸単独で分
解した場合とほとんど差がなかった。単層カ
ーボンナノチューブ (SWCNT) には%レベル
の Fe の他 Rb、Cr、Mn などが検出された。各
多層カーボンナノチューブ (MWCNT) に検
出される金属はそれぞれ異なり、Fe が 1%程
度検出される MWCNT がある一方で、定量レ
ベルにないものもあった。Al、V、Co、Ni、
Mo などが比較的高濃度で検出された。CNT
中の金属は界面活性剤を添加した溶液に入れ
超音波処理すると少量ながら溶出した。

THP-1 細胞に対する金属酸化物ナノ粒子 SiO_2
及び Fe_2O_3 の細胞毒性を調べた。 SiO_2 に比べ
 Fe_2O_3 の細胞毒性は強く表れた。 SiO_2 は CD86
の発現量を変化させないものの CD54 の発現
量をわずかに増加させた。 SiO_2 で前処理した
細胞では感作性物質によって増加する CD54
の発現率が、処理していない場合に比べて若
干増加した (五十嵐)。

D. 考察

本研究では、多種のナノマテリアルの短期、
長期の有害作用 (長期では発がん性) の検出
を容易に実施出来るシステムの開発を行い、
将来標準化を目指すことを目的としている。
この研究の実施に当たって難しいところは、
被検物質として扱う炭素ナノマテリアルの
生体作用が明らかではないために、それを明
らかにしつつ評価法の開発を同時に行うこ
とにある。注意しないと、被検物質の作用を
明らかにする探索研究に終わってしまう恐
れがある。そのために、以下の基本的枠組み
を設けて研究を実施している。

1. 発がん 2 段階モデルによるプロモーション
ならびに発がん作用の検討

2. ラットへの短期 (9-14日) 投与による毒
性/炎症/免疫反応/増殖性病変の解析

3. *in vitro*系による肺胞マクロファージを介
する炎症ならびに気管上皮、免疫担当細胞反
応の解析

MWNT-M は現在の所、肺に対する発がん
プロモーション作用は観察されていない。し
かし肺において強い炎症を惹起することは明
らかである。MNCNT-N は試料が入手出来な
いためにプロモーション試験を実施すること
は出来なかったが、MWCNT-M および
MWCNT-N は短期投与実験において、肺胞内
のマクロファージの旺盛な貪食と間質の炎症
反応、さらにリンパ流を介する全身・胸腔内
への移動が明らかになった。さらに重要なこ
とは、胸腔内において臓側胸膜中皮の増殖を
惹起した。このことは、長期曝露によって胸
膜中皮腫の発生に関与する可能性が示された。

この実験等において、分散液中あるいは肺内あるいはリンパ節、胸腔内等でマクロファージに貪食されたものを光学顕微鏡と電子顕微鏡にて観察すると、様々な形態と大きさの凝集塊が認められた。このような形態や大きさの違いが、肺の炎症やマクロファージの動員、他臓器への移動のメカニズムに関与する可能性がある（津田）。その解析の目的で、MWCNT のおよび凝集塊の形態と大きさの関与について、二つの実験を組んだ。一つは濾過による大きさまたは線維の長さの違い、もう一つは製造時より意図的に形態を針状（棒状）線維と毛玉状の形態の違いの影響の把握である。前者では、篩目 25 μ m の篩板を用い、篩板濾過前（W）、篩板濾過分画（FT）、濾過されない残存分画（R）の *in vitro* 系ではコロニー刺激因子（Csf3）の mRNA 発現量は濾過されない残存分画（R）の *in vitro* 系ではコロニー刺激因子（Csf3）の mRNA 発現量はいずれの分画でもコントロールと比べて有意に増加し、Cxcl2 遺伝子では R と W 分画においてコントロールに比べて有意に発現が増加した。FT 分画ではコントロールに比べて有意な変化は認めなかった。すなわち、MWCNT サイズの違いが発現量の違いに影響した。進行中の 52 週と 104 週の投与試験にどのように作用するかについては今後明らかになる（酒々井）。さらに形状の異なる VGCF（針状）と VGCF-X（毛玉状）については、DHPN 誘発増殖巣においては明らかなプロモーション作用は無かった。しかし、VGCF および VGCF-X により誘発された肺胞上皮の慢性増殖巣が観察されたため、VGCF および

VGCF-X の 8 回/4 週投与で増殖病変の可逆性試験を実施中で、今後詳細に検討することになる（津田、二口）。

また、このシステムの妥当性を検証する意味で CB について実験を試みたところ、肺発がん物質 DHPN で誘発された腫瘍性病変とは別の部位に、CB を貪食したマクロファージを取り囲むように肺胞過形成様の病変が観察された。CB 噴霧群では溶媒対照群に比べて病変の発生個数が有意に増加する。C60 についても同様の増殖病変が観察されたので、これらの病変が真に腫瘍性増殖を続けるのかについて可逆性試験によって検討する必要がある（二口）。

繊毛細胞は電位依存性の Na⁺や Ca²⁺チャネル発現がない典型的な非興奮性細胞であり、電位非依存性・非選択性陽イオンチャネルを介した流入と考えられた。繊毛細胞には K_{ATP} チャネルが機能発現していることを初めて明らかにした。K_{ATP} チャネル開口薬を気道閉塞性疾患（喘息や COPD）の治療薬や去痰薬として用いる可能性を示唆する結果を得た。繊毛運動に対するカーボンナノチューブの影響に関する評価系として、*in vitro* 系での確立の端緒が、高速画像解析法の成功により、開けつつある（今泉）。

カーボンマテリアルの製造には触媒金属が用いられ、そのうち Fe は生体内酸化反応を引き起こし発がんに関与しているのではないかと疑われている。今回試験した CNT には Fe の濃度が高いものもあるが、MWCNT 中の量は製品ごとに様々であった。Fe 以外にも Al、V、Co、Ni、Mo が比較的大量に検出された。

今後は Fe₂O₃、Fe 及び検出された金属の塩、更には MWCNT 抽出物について調べ、免疫機能への金属の関与について解析する必要がある（五十嵐）。

E. 結論

多種のナノマテリアルの有害作用の検出システムの開発と標準化モデルの確立を目的として、以下の枠組みによる研究を実施した。このプロジェクト探索研究である。研究は以下の作業仮説に基盤をおいて実施した。提案モデルとして肺内噴霧投与による、 ≥ 16 ～20 週の発がんプロモーション作用/毒作用モデル、 ≤ 14 日以内の短期 *in vivo* モデルにおけるマクロファージを介する毒性・発がんプロモーション作用機序の把握方法、 ≤ 14 日以内の短期 *in vitro* モデルにおける被検物質のマクロファージ/標的細胞への障害作用の分子機序の解析、を実施して下の知見を得た。

MWCNTは肺胞において多くはマクロファージに貪食され、肺胞壁の炎症反応を起こす。MWCNT-Mは、肺に対する発がんプロモーション作用は示さない可能性がある。MWCNT-Nは、短期投与実験において、リンパ流を介して胸腔内への移動し、胸腔内臓側胸膜中皮の過形成性増殖を惹起させた。これはMWCNTが中皮腫を発生させる可能性を示す。これらの生体作用はMWCNTの大きさや形態に依存する可能性が示された。また、気管上皮繊毛細胞の排出機能に対する障害作用をカルシウムイオンポンプの機能によって評価出来る方法を構築している。MWCNTに夾雑する金属では、Feが最も多く、Al、V、

Co、Ni、Moなども確認できこれらの生体機能への影響を勘案する必要がある。以上の研究を進めつつ、H24年度の検索モデルの開発を進める必要がある。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Xu, J., Sagawa, Y., Futakuchi, M., Fukamachi, K., Alexander, D. B., Furukawa, F., Ikarashi, Y., Uchino, T., Nishimura, T., Morita, A., Suzui, M., Tsuda, H. Lack of promoting effect of titanium dioxide particles on ultraviolet B-initiated skin carcinogenesis in rats. Food Chem Toxicol 49, 1298-1302.
- 2) Sadanandam, A., Futakuchi, M., Lyssiotis, C. A., Gibb, W. J., and Singh, R. K. A Cross-Species Analysis of a Mouse Model of Breast Cancer-Specific Osteolysis and Human Bone Metastases using Gene Expression Profiling. BMC Cancer 11, 304.
- 3) Sagawa, Y., Futakuchi, M., Xu, J., Fukamachi, K., Sakai, Y., Ikarashi, Y., Nishimura, T., Suzui, M., Tsuda, H., and Morita, A. Lack of promoting effect of titanium dioxide particles on chemically-induced skin carcinogenesis in rats and mice. The Journal of toxicological sciences 37, 317-327.

- 4) Takagi, A., Hirose, A., Futakuchi, M., Tsuda, H., and Kanno, J. Dose-dependent mesothelioma induction by intraperitoneal administration of multi-wall carbon nanotubes in p53 heterozygous mice. *Cancer Sci.* in press
- 5) Ca^{2+} influx facilitated by membrane hyperpolarization due to ATP-sensitive K^+ channel openers enhances ciliary beating in mouse airway ciliated cells.
投稿準備中
- 6) Xu, J., Futakuchi, M., Shimizu H., Alexander, D.B., Yanagihara, K., Fukamachi, K., Suzui, M., Kanno, J., Hirose, A., Ogata, A., Sakamoto, Y., Nakae, D., Omori, T., and Tsuda, H. Multi-walled Carbon Nanotubes Translocate into the Pleural Cavity and Cause Hyperplastic Visceral Mesothelial Proliferation.
投稿準備中
2. 学会発表
- 1) 五十嵐良明、内野 正、西村哲治. 酸化チタンナノ粒子の皮膚感作性に及ぼす影響. 第38回日本トキシコロジー学会学術年会 (2011. 7)
- 2) 大羽輝弥、澤田英士、鈴木良明、山村寿男、大矢進、今泉祐治 「気管上皮繊維細胞における膜電位と細胞内カルシウム濃度の関係」 第85回日本薬理学会年会 3月16日 京都
- 3) 二口 充, 深町勝巳, 酒々井真澄, 津田洋幸. 乳癌骨転移巣進展における $\text{TGF}\beta$ の役割. 第100回日本病理学会総会 ワークショップ. 横浜, 4月29日.
- 4) 二口 充, 徐結苟, 深町勝巳, 酒々井真澄, 津田洋幸. ナノサイズ酸化亜鉛の気管内噴霧による間質性肺炎の発生. 第38回日本トキシコロジー学会 横浜, 7月11日.
- 5) 深町勝巳, 二口 充, 酒々井真澄, 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マクロファージを介した肺がん細胞増殖促進作用. 第38回日本トキシコロジー学会 横浜, 7月12日.
- 6) 徐結苟, 二口充, アレクサンダー・ダビッド, 深町勝巳, 坂井勇斗, 酒々井真澄, 津田洋幸. ラット肺にカーボンナノチューブ投与による胸腔内粒子の検出および中皮細胞増殖の誘導. 第70回日本癌学会学術総会; 名古屋: 2011年10月3日
- 7) 深町勝巳, 坂井勇斗, 二口充, 津田洋幸, 酒々井真澄. 血清診断可能なラット肺がんモデル. 第70回日本癌学会学術総会; 名古屋: 2011年10月3日
- 8) Futakuchi, M., Fukamachi, K., and Suzui, M. (2011). Soluble RANKL; significance of therapeutic target for tumor growth in the bone microenvironment. 70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association Nagoya.
- 9) 二口 充, 深町勝巳, 酒々井真澄. 可溶性RANKL標的療法による骨微小環境での乳がん細胞の増殖および溶骨性変化の抑制とそのメカニズム. 第20回日本癌転移学会学術集会 浜松, 2011年11月17日.

- 10) Futakuchi, M., Fukamachi, K., and Suzui, M. (2011). Crosstalk between TGFbeta and AKT/PTEN signaling pathway in the bone microenvironment : mechanism for tumor cell proliferation in the bone metastasis of breast cancer. The 16th Japan-Korea Cancer Research Workshop Sapporo.
- 11) 二口 充, 深町勝巳, 津田洋幸, 酒々井眞澄 骨微小環境における乳がん細胞の増殖に対する可溶性RANKLの治療標的分子としての意義. 平成23年度「個体レベルでのがん支援活動」ワークショップ 滋賀, 1月18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)

Ⅱ. 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

分担研究課題名：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

本研究は、カーボンナノマテリアルが炎症及び免疫反応、特にアレルギー反応に対して増強作用を有するかどうか、及びそれらの反応にマテリアルに残存する金属が関係するか明らかにすることを目的とする。各種カーボンナノマテリアル中の金属の分析法について検討し、残存している金属及び各種媒体に溶出する金属を定量した。蛍光 X 線分析はカーボンナノマテリアルに含まれる金属の定性に有効であった。カーボンナノマテリアルに硝酸を加えてマイクロウェーブで分解したものを ICP-MS で分析した。検出された金属は Fe、Al、Mo、Co、V 等で、このうち Fe は比較的多量にほとんどのカーボンナノマテリアルに認められた。試験した中では単層カーボンナノチューブ（SWCNT）に最も多く検出した。残存する金属は、各種媒体を加え超音波処理すると溶出した。界面活性剤入り水溶液での溶出量はカーボンナノマテリアルの種類及び金属によって異なるが、硝酸での量よりもかなり少なかった。酸化鉄及びシリカの化学物質のアレルギー性反応に対する増強効果の有無を細胞表面抗原の発現率を指標として解析した。シリカは CD54 抗原の発現量をわずかに増加させたが、酸化鉄はそうした増加を示さなかった。今後、Fe イオン及び他の金属酸化物での検討を進めるとともに、各種カーボンナノマテリアル懸濁液及び抽出（ろ過）液でも同様の検討を進め、金属の関与の有無を明らかにする。

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 にはまたマウスの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とされているがヒトへの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差が生

じるのは、粒子状と線維状という形状が要因と考えられるが、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り、短期かつ簡便な評価法が求められている。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ることから、ナノマテリアルによるこれらの修飾作用を明らかにすることが必要と思われる。本研究は、カーボンナノマテリアルが炎症及び免疫反応、特にアレルギー反応に対して増強作用を有するかどうか、及びそれらの反応にマテリアルに残存する金属が関係するか明らかにする。

本年度は、各種カーボンナノマテリアル中に残存している金属及び各種媒体に溶出する金属を定量した。また、それらの金属酸化物が化学物質のアレルギー誘発作用に影響するかどうかをヒト単球由来細胞株 THP-1 細胞の活性化に伴う細胞表面抗原の発現率を指標として解析した。

B. 研究方法

1. 試料

多層カーボンナノチューブ (MWCNT) は、三井化学 (株) より MWCNT-M、日機装 (株) より MWCNT-N、昭和電工 (株) より VGCF 及び VGCF-X を供与された。また Sigma-Aldrich 社から販売されている 3 種の MWCNT を試験した。単層カーボンナノチューブ (SWCNT) は日機装 (株) より供与された。カーボンブラック (CB) は Sigma-Aldrich 社の graphitized carbon black (<500 nm particle size, >99.95%) を購入した。Johnson Matthey 社 Alfa Aesar のシリカ (SiO₂) のエチレングリコール懸濁液 (平均一次粒子径 50 nm)、及び Sigma-Aldrich 社が販売する Buhler 社製造の酸化鉄の水懸濁液 (Fe₂O₃, <100 nm (DLS) particle size, <30 nm avg. particle size (APS)) を金属酸化ナノ粒子の試料として用いた。

2. 細胞

ヒト単球由来細胞株 THP-1 細胞は ATCC から入手した。細胞は 10% 牛胎児血清 (FBS)、1% antibiotic-antimycotic 溶液 (Invitrogen 社) 及び 0.055 mmol/ml 2-mercaptoethanol を含有する RPMI-1640 培地 (FBS-RPMI) を用いて培養した。

3. 元素分析

3-1. 蛍光 X 線分析

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

3-2. ICP-MS 分析

試料約 0.01 ~ 0.02 g に種々の分解溶液 5 ml を加えて密栓し、1600W (100%) のマイクロ波を照射して 25 分で 210°C となるようにし、15~30 分間保持した。分解液を回収し水で 20 ml に定容した。メンブランフィルターでろ過し、検量線の範囲内に入るように水で更に希釈したものを試料溶液とした。Al, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, As, Se, Rb, Mo, Cd, Sn, Sb, Cs, Ba, W, Tl, Pb それぞれの市販標準液を混合し、1%硝酸で希釈して混合標準溶液 (0.01~100 ng/ml, ppb) を調製した。これらを He モードの ICP-MS に導入し、各元素の質量数のピーク強度を測定した。検量線を用いて試料溶液の各元素の濃度を求め、試料中の量を算出した。

4. 粒度分布の測定

金属酸化ナノ粒子の懸濁液を、水または生理食塩水で 0.1~1% 濃度になるよう希釈し攪拌後、ゼータサイザーナノ (nano-ZS, Malvern 社) で粒度分布を測定した。

5. 細胞毒性試験

THP-1 細胞浮遊液 (2 × 10⁶ cells/ml) を 500 μl ずつ 24 穴プレートに入れ、培地で調製した SiO₂ または Fe₂O₃ の試験溶液を 500 μl ずつ加えた (最終濃度 1~100 μg/ml)。48 時間培養後細胞を回収、0.1 % 牛血清アルブミン (BSA) 含有 PBS (BSA-PBS) で洗浄し、propidium iodide (PI) 溶液で染色した。フローサイトメーターを用いて生存率 (%) を求

めた。

6. 細胞表面抗原の解析

h-CLAT 法を参考に若干変更して試験した。THP-1 細胞浮遊液及び金属酸化物懸濁液を 24 穴プレートの各穴に入れ 24 時間培養後、アレルゲン (2,4-dinitrochlorobenzene, DNCB) を加えて更に 24 時間培養した。細胞を BSA-PBS で洗浄後、0.01 % globlins-PBS 溶液でブロッキング処理した。次に FITC 標識抗 CD86 抗体、FITC 標識抗 CD54 抗体または FITC 標識マウス IgG1 でそれぞれ染色し、BSA-PBS に再懸濁後、PI 溶液を加えた。フローサイトメーターを用いて細胞生存率 (%) を求め、10000 個の生細胞について CD54 及び CD86 抗原の平均蛍光強度 (mean fluorescence intensity, MFI) を測定し、試験溶液で処理した時のコントロールに対する相対蛍光強度 (%) を求めた。

C. 研究結果

1. カーボンナノチューブ中の金属分析

MWCNT のうち VGCF 及び VGCF-X を蛍光 X 線分析した (表 1)。VGCF については Fe と Cu が検出され、Fe の量は昨年度検討した MWCNT-M よりは少なかった。VGCF-X は VGCF に比べて多種の金属がより多く検出された。Fe 及び Al は 5~6% の割合で、Mo や Mn も認められた。

次に、ICP-MS を用いて定量的に金属を分析した。試料溶液は、カーボンナノチューブに種々の分解溶液を加え、温度制御下でマイクロウェーブ分解して調製した。硝酸、硝酸と過酸化水素混液、硝酸とフッ化水素酸混液、及び硝酸と過酸化水素とフッ化水素酸混液の 4 種を分解溶液として、MWCNT-M、SWCNT 及び CB をマイクロウェーブ処理したときの各材料の状態を観察した。CB については硝酸及び過酸化水素混液では不溶物が残ったものの他の酸混液では溶解し、透明な溶液が得られた。MWCNT-M 及び SWCNT についてはいずれも完全には溶けな

いが残存する材料量は異なった。硝酸で処理した後、過酸化水素とフッ化水素酸を加えて再度処理する 2 段階分解したとき残存量が最も少なくなった。MWCNT-M を各種酸混液で分解し得られた試験溶液の Fe 量を分析した結果、いずれも同レベルの Fe が定量された (図 1)。よって、以下、硝酸を用いて分解処理することとした。

供与されたカーボンナノチューブ 0.01 g 当たりの金属量を表 2 に示した。He モードの ICP-MS での金属標準溶液の定量限界濃度はほとんどが 1~10 ppb であった。この濃度を試料に換算 (試料 0.01 g を 20 ml に調製) すると、試料 0.01 g に 0.1 µg 以上定量されたとき、該当する金属は試料中に存在すると判断した。MWCNT-M では Fe が 56 µg/0.01 g (0.56%) 認められ、V 及び Ni も検出した。MWCNT-N にはいくつか金属は検出されるが定量限界に近いレベルであった。VGCF は更に少なかった。一方 VGCF-X に関しては、0.01 g 当たり Al を 221 µg、Fe を 120 µg 定量し、Mo も多く認められた。市販 MWCNT についても同様に分析したところ、Fe に関しては多いもので MWCNT-M と同程度、少ないもので MWCNT-N と同程度であった。Co の含有量が多く、Zn が検出されたことが供与 MWCNT とは違った。また Rb、Cu 及び Ni も検出された。CB にはほとんど金属が定量されないが、SWCNT には MWCNT と比べて多量の Fe が定量された。

2. カーボンナノチューブからの溶出金属

試料約 0.01 g に各種媒体 5 ml を加えて 30 分間超音波洗浄器で処理した後、水で 20 ml に定容した。市販 MWCNT からは硝酸で Al と Fe が 1 µg、Co と Mo は 0.5~0.7 µg 溶出した。1% Tween 80 溶液ではその 70% 程度が、生理食塩水及び水では更に少量しか溶出しなかった。硝酸を用いて超音波抽出したときに溶出する金属量を表 3 に示した。MWCNT-M に関してはマイクロウェーブ分解と超音波抽出で定量値には著しい差はな