

った。VGCF-に関しては、超音波抽出で溶出する Fe の量はマイクロウェーブ分解での量の 3 分の 1 と大きな差が認められた。

3. 粒度分布

シリカ (SiO₂) 懸濁液 (表示一次粒子径 : 50 nm) を水及び生理食塩水を用いて希釈し粒度分布を測定した。それぞれの希釈液の平均粒子径は 75~77 nm で粒度分布の形も変化なく良好に分散していた。Fe₂O₃ 懸濁液については二次粒子径が < 100 nm と表示されている。これを水で希釈したときの平均粒子径は 90 nm と表示どおりの値が得られた。しかし生理食塩水で希釈すると著しい凝集が起こりナノレベルの粒子がほとんど認められなかった。

4. 細胞毒性

SiO₂ 懸濁液を培地で希釈し最終濃度が 1~100 µg/ml の濃度となるように細胞に加えた。SiO₂ はいずれの濃度においても 90% 以上の細胞生存率を示した (図 2)。一方 Fe₂O₃ は 10 µg/ml で細胞生存率が約 63% に低下し、100 µg/ml ではほとんど細胞が死滅した。

5. 細胞表面抗原発現に及ぼす影響

THP-1 細胞に各金属酸化物を 1~100 µg/ml となるよう添加して 24 時間培養後、DNCB が最終濃度 3.5 µg/ml となるよう加え、更に 24 時間培養した。細胞表面抗原 CD54 及び CD86 の発現量 (MFI) のコントロールに対する相対発現率 (RFI, %) を求めた。SiO₂ は CD86 の MFI には影響しなかったが、CD54 については 100 µg/ml で増加が認められた (表 4)。DNCB により CD54 及び CD86 の RFI 値はそれぞれ 200%、150% 以上の値を示した。このとき SiO₂ が共存すると、CD86 の RFI 値はわずかしき増加しないものの、CD54 の RFI 値は 100 µg/ml で 1020% と、SiO₂ を共存させずに DNCB で処理したときの 4.5 倍となった。

Fe₂O₃ については CD86 及び CD54 の発現量を増加させることはなく、DNCB によるこれらの表面抗原の発現に対しても影響なかった。

D. 考察

CNT はアーク放電法、レーザー蒸発法、化学的気相成長法 (CVD 法) によって製造されており、特に SWCNT の成長には金属触媒 (Fe、Co、Ni、Co など) が大きな役割をしている。こうした金属触媒は製造後酸処理などにより除去されるが、精製が不十分な場合は CNT に残留することがある。このうちほとんどの CNT に残存する Fe は酸化剤として作用しフリーラジカルを生成することが知られている。このフリーラジカルは DNA やタンパク質、および脂質に傷害を与えることから、CNT による生体影響の原因がその形状に起因するだけでなく、残存する Fe も関係するのではないかと疑われている。

蛍光 X 線分析法は、非破壊で簡便に多元素同時分析が可能なることから、試料量が少なく損失ができない場合の測定に有効である。機器メーカーは、特に CNT 中の触媒金属 (Co、Ni、Y、La、Fe、Rh、Pt など) の簡易定量分析、および酸処理による残留 S や Cl の定量分析も可能としている。昨年度に引き続き蛍光 X 線分析によりいくつかの MWCNT 中の元素を分析したところ Fe の他、S、V、Ni などが検出された。本年度は定量的に ICP-MS での分析を行った。ICP-MS で分析するにはカーボンマテリアルの試料溶液を調製する必要があり、材料を溶解する方が含有される全金属を定量するのに良いと考えた。マイクロウェーブ分解条件を検討した結果、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 段階分解法で処理したとき残存量が最も少なかった。しかし、硝酸あるいは他の酸混液を使った 1 段階の分解条件では溶解しないカーボンマテリアルの量は多いものの定量される Fe は同程度であった。必ずしもカーボンマテリアルの完全溶解は必須ではなく、効率的に金属を抽出できれば良いことがわかった。ICP-MS で検出された金属は、Fe、Al、Mo、Co、V 等であった。このうち

Fe は比較的多量に検出された。試験した中では SWCNT の Fe 含有量が最も多く、MWCNT は Fe の他にも Al、Mo、Co の含有量が高いものがあり、製造会社あるいは種類によって大きな差があった。ICP-MS での定量値と蛍光 X 線分析装置での定量値の間には違いが認められた。今回の蛍光 X 線分析装置での値はソフトウェアで予測計算して求めたためと思われる。マトリックスを合わせた標準試料を準備するとより精密な定量分析も可能とされる。一方で定性される金属は ICP-MS 分析とほぼ一致し、蛍光 X 線分析装置は簡便な定性法として有用であった。

CNT に残存する金属は各種媒体を加えて超音波処理すると溶出した。ナノマテリアルは界面活性剤入り水溶液を用いて分散させるのが一般的であるが、こうした調製法で溶出する金属の量はごくわずかであった。この調製液の Fe の量が生体反応に与える影響はほとんど無視できると考えている。

CNT を暴露したマウスでは OVA に対する免疫反応が増強したと報告されている。また *in vitro* の皮膚感作誘導反応に活性酸素種が関与するとの報告がある。CNT による免疫増強作用は、含まれる Fe の酸化作用とフリーラジカルの産生に起因するのではないかと考えた。そこで、化学物質アレルゲンの感作誘導反応に対する Fe の増強作用の有無を検討した。ここでは Fe は酸化物として存在すると仮定し、 Fe_2O_3 ナノ粒子を試験物質として用いた。起炎性が認められる SiO_2 との比較を行った。試験物質の懸濁液を生理食塩水で希釈して粒度分布を測定した結果では、 SiO_2 はナノサイズで細胞に適用されるが、 Fe_2O_3 は著しく凝集した形でしか適用されていないと思われた。 SiO_2 は DNCB による THP-1 細胞の CD86 の発現には影響なかったが、100 $\mu\text{g/ml}$ で CD54 の発現を増加した。また、 SiO_2 で前処理した時 DNCB による CD54 の RFI 値は、 SiO_2 非共存下 DNCB で処理したときの値の 4.5 倍となった。 SiO_2 は少量ながら IL-8

産生を増加させることから免疫機能に何らかの影響を示す可能性がある。一方 Fe_2O_3 は CD86 及び CD54 の発現量を増加させるのではなく、DNCB の反応に対しても影響しなかった。 Fe_2O_3 の酸化能が大きくない可能性もある。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予定である。

E. 結論

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。各種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 ICP-MS で金属を定量した。Fe、Al、Mo、Co、V 等が検出され、このうち Fe は比較的多量にマテリアルに共通して認められた。試験した中では SWCNT に最も多かった。MWCNT には Fe の他に、Al、Mo、Co の含有量が高いものがあった。カーボンマテリアルに残存する金属は、各種媒体を加え超音波処理すると溶出した。溶出量はカーボンナノマテリアルの種類及び金属、あるいは溶出に用いる媒体によっても異なった。シリカは DNCB による THP-1 細胞の CD54 抗原の発現をわずかに増強した。一方酸化鉄にはそうした増強効果を認めなかった。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

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)

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. 多層カーボンナノチューブの蛍光 X 線分析の結果

Element	Concentration	
	VGCF	VGCF-X
Fe	30 ppm	5.8 %
Al		5.9 %
Mo		1674 ppm
Mn		247 ppm
Cu	55 ppm	42 ppm
Se	1.7 ppm	
S		6120 ppm

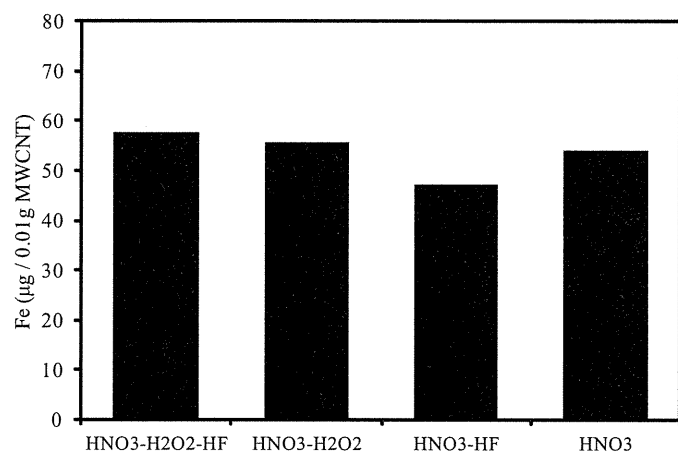


図 1. マイクロウェーブ分解溶液の違いによる鉄の定量値の差

試料約 0.01 に種々の分解溶液 5 ml を加えて、マイクロ波を照射して 25 分で 210°C となるようにし、15 分間保持した。分解液を回収、水で 20 ml に定容したものを試験溶液とし、ICP-MS で分析した。

表 2. カーボンナノマテリアル中の金属量

Element	Concentration (µg/0.01 g)			
	MWCNT-M	MWCNT-N	VGCF	VGCF-X
Al	0.54	0.42		221
V	1.50			
Cr	0.10			0.05
Mn				0.21
Fe	56	0.30		120
Ni	0.49	0.07		0.10
Cu	0.15	0.22	0.04	0.11
Mo				21

表 3. MWCNT に硝酸を加え超音波処理したときの溶出金属

Element	Concentration ($\mu\text{g}/0.01\text{ g}$)	
	MWCNT-M	VGCF-X
Al	0.18	5.4
V	0.98	
Cr	0.04	
Mn		0.13
Fe	42	40
Ni	0.32	
Mo		8.8

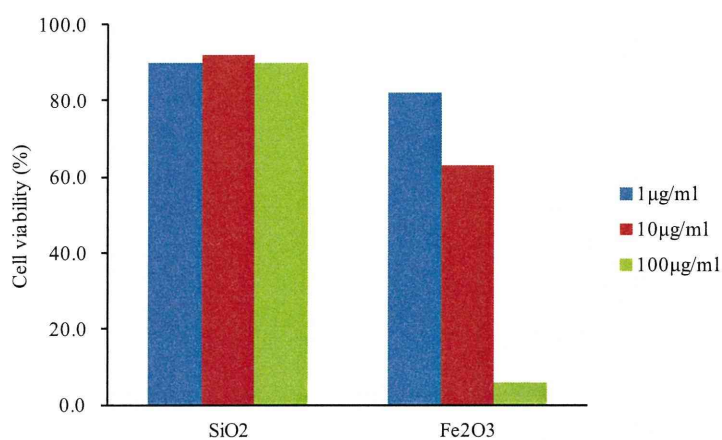


図 2. シリカ及び酸化鉄の細胞毒性

表 4. THP-1 細胞の DNCB に対する細胞表面抗原発現に及ぼすシリカの影響

SiO ₂ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	DNCB	MFI			RFI (%)	
		Isotype control	CD54	CD86	CD54	CD86
0	-	4.3	5.7	11.6		
1	-	4.4	6.0	11.6	112	99
10	-	4.5	5.9	10.9	98	88
100	-	4.8	9.1	9.8	314	68
0	+	4.7	7.9	15.7	226	151
1	+	4.7	8.6	19.0	284	197
10	+	4.9	10.2	17.8	383	178
100	+	5.4	19.5	19.7	1020	197

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：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：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分野 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分野

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。マウス気道上皮組織から繊毛細胞を単離し、細胞内 Ca^{2+} 濃度と膜電位および繊毛運動の関係について、 K^+ チャネル開口薬などによる過分極は電位非依存性 Ca^{2+} 流入が増大し、繊毛運動を増大させることを明らかにした。また単離繊毛細胞へカーボンナノチューブ懸濁液を適用し、繊毛への吸着や繊毛運動への影響を定量的に観察する方法を検討した。

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

マウス気道上皮組織から、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画像として取り込み、繊毛運動を定量的に解析した。カーボンナノチュ

ーブ懸濁液 (VGCF:昭和電工、pF 含有生理食塩水に 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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、各種イオンチャネルの 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 マウス呼吸器系器官（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、ATP 感受性 K^+ (K_{ATP}) チャネル開口薬の diazoxide で活性化され、阻害薬の glibenclamid で抑制される電流成分の存在が明らかとなった。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 Kir6.2 チャネルと修飾分子である SUR2.1 の発現が見出された。

② 膜電位と細胞内 Ca^{2+} 濃度および繊毛運動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繊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} チャンネル開口薬の diazoxide の適用により繊毛細胞に過分極が生じ、細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇すること、また繊毛運動も増大することを見出した。これらは glubenzclamid により抑制された。

④ 単離繊毛細胞をカーボンナノチューブの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 ミクロン程度の蛍光球形ビーズ (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。

D. 考察 繊毛細胞は電位依存性の Na^+ や Ca^{2+} チャンネル発現がない典型的な非興奮性細胞であり、過分

極誘発性 Ca^{2+} 濃度上昇は、電位非依存性・非選択性陽イオンチャンネルを介した流入と考えられた。繊毛細胞には K_{ATP} チャン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} チャンネル開口薬投与は過分極を引き起こし Ca^{2+} 流入増大を介した繊毛運動増強を生じさせたことから、 K_{ATP} チャンネル開口薬を気道閉塞性疾患（喘息や COPD）ののと考えられる。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と考える。ま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* 系での確立の端緒は高速画像解析法の成功により、開けつつあると考える。

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る。本成果は繊毛細胞での繊毛運動の新たな調節機構を明らかにするとともに、気道閉塞性疾患における新たな治療薬ターゲットを提案するものであり、細胞障害評価系の確立に向けて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

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

2. 学会発表

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

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

予定なし

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：発がんに関与する肺マクロファージの *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

本分担研究の目的は多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の肺障害性についてヒトへ外挿可能な作用機序解析モデル構築である。日機装社製多層カーボンナノチューブ (MWCNT-N) を対象物質としてラット肺内スプレー法を用いた 2 週間試験による肺組織への形態的影響解析、培養細胞への CNT 曝露による細胞増殖および遺伝子発現への影響解析を行った。これらの影響が CNT サイズに依存するか否かを検証するために 25 mm 篩板にて MWCNT-N を濾過し、非濾過 (R)、濾過 (FT)、原液 (W) の 3 分画に分けた。各分画をコポリマー含有生理食塩水 (PF68) に分散させて実験に用いた。FT および W 分画の平均長は共に正規分布を示し、それぞれ平均長は 2.6 および 4.2 mm であった。R 分画は著しく塊状となり測定不可であった。培養肺マクロファージでは、Csf3、IL6、Ccl4 遺伝子において、いずれの分画でもコントロールに比べて mRNA 発現が有意に増加した。Cxcl2 遺伝子では R と W 分画において有意に発現が増加した。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。肺組織像に関して FT 分画では肺胞に炎症細胞浸潤を伴いマクロファージが MWCNT-N を貪食している像を認めた。R と W 分画では炎症像が増え MWCNT-N を貪食したマクロファージが浸潤し異物肉芽腫形成がみられた。篩を使った CNT サイズの分画化は可能であり、サイズの違いは培養マクロファージでの Cxcl2 遺伝子発現量の違いに影響した。また、CNT サイズは肺組織での炎症の程度にも影響した。MWCNT-N の *in vitro* および *in vivo* 曝露は細胞増殖や炎症に関連する遺伝子発現を活性化することが示された。MWCNT-N の肺障害性、特に発がん性との関連については長期試験結果の分析が必要である（現在経過中）。本研究結果は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

本研究の目的は多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の肺障害性についてヒトへ外挿可能な作用機序解析モデル構築である。特に MWCNT-N のラット肺内曝露に伴う発がん性との関連を肺マクロファージ挙動、肺組織像、炎症性サイトカイン系遺伝子および増殖系遺伝子発

現などに着目し解析を進めた。形状を考慮すると MWCNT は肺障害を引き起こす可能性があるが、MWCNT サイズと肺障害の程度には一定の結論が出ていない。よって、対象物質として MWCNT-N を用い、マクロファージが貪食可能なサイズを考慮して 25 mm 篩板にて分画化し、コポリマー含有生理食塩水 (PF68) に分散させて各

種影響解析を実施した。

B. 研究方法

B-1: マップメータによる MWCNT-N 平均長測定
MWCNT-N を 25 mm 篩板にて濾過し、各分画の試料を電子顕微鏡にて撮影後、紙に印刷しマップメータを用いて 300 から 500 本の MWCNT-N の長さを測定した。紙上の長さスケールと電顕像上のスケールを換算し MWCNT-N の長さを横軸に、その本数を縦軸にグラフを作成し分布を検討した。

B-2: *In vitro* 作用機序解析

培養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た。肺マクロファージより totalRNA を抽出、RTPCR 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* 2 週間試験にて得られた肺組織 (MWCNT-N 各分画曝露群、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) の結果、増殖系および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。

B-3: *In vivo* 2 週間試験

発がん性との関連については長期試験の結果をみる必要がある。現在経過中の長期試験の一部として 2 週間試験を実施した。雄 F344 ラット肺に 2 週間で計 8 回、各分画を肺内噴霧後 (計 960 mg を曝露) に肺を取り出し、肺組織に与える影響を組織学的に検討した。さらに、肺組織より totalRNA を抽出して mRNA 発現解析に用いた。

(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)。

C. 研究結果

C-1: マップメータによる MWCNT-N 平均長測定
篩板にて分画後の MWCNT-N 平均長は、FT 分画 2.6 ± 1.6 mm、W 分画 4.2 ± 2.9 mm であり

($P < 0.001$)、R 分画は著しく塊状となり測定不可であった。FT 分画および W 分画のサイズ別本数の分布は FT 分画が急峻な立ち上がりを持つ正規分布、W 分画は比較的なだらかなカーブを描く正規分布であった。

C-2: *In vitro* 作用機序解析

培養マクロファージでは、Csf3、IL6、Ccl4 において、いずれの分画もコントロールに比べて mRNA 発現が有意に増加した。Cxcl2 では R 分画と 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。肺組織において 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。

C-3: *In vivo* 2 週間試験

FT 分画の曝露では肺胞に炎症細胞浸潤を伴いマクロファージが MWCNT-N 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た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。無処置群は炎症像を認めなかった。

D. 考察

篩板による MWCNT-N の分画化は可能であり、MWCNT のサイズはそれを貪食するマクロファ

ージの挙動および組織像の違いに影響したと考えられる。培養肺マクロファージにおいて Csf3、IL6、Ccl4 遺伝子発現について FT、R、W 分画は共にコントロールに比べて有意に増加したが分画間では発現量に有意な差は認めなかった。しかし、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。従って、Cxcl2 遺伝子発現については MWCNT サイズの違いが発現量の違いに影響した。一方、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に比べて有意な変化は認めなかったことより、MWCNT サイズの違いはこれら4つの遺伝子発現に影響しないと考えられた。以上の所見より、肺組織は細胞集団が極めてヘテロであるため各分画特異的な発現量の差異が平均化された可能性がある。MWCNT-N の曝露は細胞増殖や炎症に関連する遺伝子発現を促進することが示されたが、肺障害性特に発がん性との関連については長期試験の結果と合わせて考察する必要がある。

E. 結論

①25 mm 篩板での MWCNT 分画化は可能であり、FT および W 分画の平均長は共に正規分布を示す。②培養肺マクロファージにおける Cxcl2 遺伝子発現について MWCNT サイズの違いが発現量の違いに影響する。③肺組織において MWCNT サイズの違いは炎症の程度に影響する。④分画別の MWCNT-N 曝露と発がん性との関連については長期試験の結果を考慮する必要がある。⑤本研究結果は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

Xu, J., Saqawa, Y., Futakuchi, M., Fukamachi, K.,

Alexander, D.B., 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. 49: 1298-1302, 2011.

2. 学会発表

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学術年会; 横浜: 2011年7月12日

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学術年会; 横浜: 2011年7月12日

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、酒々井眞澄、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

深町勝巳、坂井勇斗、二口充、津田洋幸、酒々井眞澄. 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

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）
分担研究報告書

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

分担研究課題名：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

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、簡便で実験者に安全な肺内噴霧法(IPS)を開発した。これまでにこの方法を用いて、フラーレン(C60)を貪食したマクロファージが産生するサイトカインが肺胞上皮の増殖を促進すること、カーボンナノチューブ(CNT)を貪食したマクロファージから分泌された因子は、単層、多層、製造メーカーにより異なることを明らかにした。本年度は、C60と同じ炭素原子で球状のカーボンブラック(CB)に着目し、C60に比べて大きなCBのIPSによりマクロファージを介した肺発がんメカニズムが惹起された結果、発がんに至るかどうかを検討した。① 14日間投与による肺発がん機序の検索(*in vivo short term mechanism study*)において、肺内に噴霧されたCBの大部分はCNTやC60と同様にマクロファージに貪食されていたことから、CBの吸入曝露による発がんメカニズムにマクロファージが関与することが示唆された。また一部は、肺の胸膜を超え胸腔内へ到達することが判明した。② *in vitro* 発がんメカニズムの検索(*in vitro mechanism study*)において、CBを貪食した初代培養肺マクロファージから産生される因子を含む培養上清は、肺胞上皮および中皮細胞の増殖促進作用を示さなかった。またCBは、肺胞上皮および中皮細胞の増殖を直接抑制することが明らかとなった。③二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の検索(2-step lung carcinogenesis study)において、CBを貪食したマクロファージを取り囲むような肺胞過形成様の病変が観察された。この病変は、肺発がん物質で誘発された腫瘍性病変とは別の部位に発生したため、この病変が前がん病変であるかどうか、CBのIPSによる肺発がん性の評価に重要であることが示唆された。今後、CBの中皮細胞への直接障害作用と、マクロファージを介した間接障害作用について検討を続け、CBを貪食したマクロファージの周囲に発生した肺胞過形成様病変が腺腫や腺がんへ進展するかどうかを検討する予定である。

A. 研究目的

ナノテクノロジーにより製造されるナノ材料はエアロゾル形態をとるため、呼吸に伴って吸入曝露される可能性がある。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、ナノ材料のハザード評価、リスク評価も未だ十分なデータは得られていない。我々は、簡便で実験者に安全な肺内噴霧法(IPS)を開発した。この試験法は、① 14日間投与による肺発がん機序の検索(*in vivo short term mechanism study*)、②*in vitro* 発がんメカニズムの検索(*in vitro mechanism study*)、および③二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発がん性の検索(2-step lung carcinogenesis study)を行うことで、ナノマテリアルの吸入曝露による発がんのリスク評価を短期間で行うことが可能となる。この方法を用いて検索した結果、ナノ材料の噴霧曝露による肺がん/肺線維症/中皮腫の発生メカニズムには、肺内に噴霧されたナノ材料を貪食したマクロファージから分泌されたサイトカイン/ケモカインによる、肺胞上皮細胞/肺線維芽細胞/中皮細胞の増殖促進作用が関与することが判明した。また、炭素原子が筒状に並んだ構造をもつカーボンナノチューブ(CNT)の肺内噴霧による肺発がん機構を検索した結果、CNTは肺胞マクロファージを介して肺胞上皮の増殖を促進したが、CNTを貪食したマクロファージから分泌された因子は、単層、多層、製造メーカーにより異なることが示唆された。さらに、炭素原子60個からなる球状の構造をもつフラーレン(C60)を用いた検索では、C60を貪食したマクロファージから分泌された*endothelin-1*が肺胞上皮の増殖を促進することを明らかにした。これらの結果から、同じ原子で構成されたナノ材料であっても形状が異なると、これを貪食したマクロファージが分泌するケモカイン/サイトカインは異なり、その結果誘導される肺発がん作用も異なることが示唆された。

本年度は粒子径の大きさによりマクロファ-

ジの反応が異なるかを検索する目的で、C60と同様に炭素原子が球状に並び、その粒子径が大きいカーボンブラック(CB)を被検物質として選び、① *in vivo short term mechanism study* および ② *in vitro mechanism study* 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を解析し、その後③2-step lung carcinogenesis studyによる肺発がん性を検索した。

B. 研究方法

① *in vivo short term mechanism study*

肺内噴霧(IPS): CBを500 μ g/mlの濃度で氷砂糖溶液に懸濁した。オートクレーブ滅菌後、使用する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F344ラットに、CB懸濁液0.5mlを2日に1回の割合で合計8回、肺内に直接噴霧した。14日目に屠殺剖検し肺を採取した。また肺内に噴霧した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。肺の病理組織標本を作成し、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を検索した。

② *in vitro mechanism study*

初代培養肺マクロファージの作成: F344ラットに6%チオグリコール酸を0.5ml肺内噴霧した。屠殺剖検し採取した肺組織を細かく刻んだ後、10%FBS含有RPMI1640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肺マクロファージを分離した。

細胞増殖促進作用の検索: 初代培養肺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CBを加え、24時間後に培養上清を回収した。この肺マクロファージの培養上清を、ヒト肺がん細胞株A549およびヒト中皮腫細胞株Mesolの培養

液に加え 72 時間後に細胞数を計測し、培養上清に含まれる肺マクロファージから分泌された因子の、細胞増殖に対する影響を検索した。細胞数の計測は Cell Counting Kit-8 を用いた。

③ 2-step lung carcinogenesis study

肺内噴霧(IPS) : CB を 500 μ g/ml の濃度で氷砂糖溶液に懸濁した。オートクレーブ滅菌後、使用する 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 : 雌雄の 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た。2 週間後、被検物質を 2 週に 1 回の割合で 24 週まで IPS 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、病理学的に肺腫瘍性病変の発生頻度・個数の定量解析を行った。

(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

① *in vivo* short term mechanism study

肺を病理組織学的に検索すると、軽度の炎症細胞浸潤巣が散見された。炎症細胞浸潤はリンパ球主体であった。肺野に誘導されたマクロファージの数は有意に増加し、肺マクロファージの細胞質に貪食された CB が観察できた。胸水洗浄液中の細胞数は溶媒噴霧群と CB 噴霧群とで差は見られなかった。出現した細胞はその大部分が ERC 陰性 / CD68 陽性で、中皮細胞ではなくマクロファージであった。CB 噴霧群の胸水洗浄液の色は肉眼的に黒く、顕微鏡による検索では胸水中に検出された CB がマクロファージに貪食されていた。

② *in vitro* mechanism study

CB を貪食させた初代培養肺マクロファージの培養上清を用いて、ヒト肺癌細胞 (A549) および中皮腫細胞 (Meso1) に対する細胞増殖促進作用を検索した。その結果 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 のいずれも、溶媒対照群と細胞数の差は見られなかった。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。以上の結果から、A549 および Meso1 に対して CB は、肺マクロファージを介さず、直接 A549 および Meso1 に対して増殖抑制作用を示すことが示唆された。

③ 2-step lung carcinogenesis study

雌雄いずれも肺内ではリンパ球、好中球など炎症細胞浸潤は軽度であった。肺内に噴霧された CB は肺マクロファージに貪食され、マクロファージの集族像が多数観察された。集族した肺マクロファージ周囲の肺胞上皮細胞は腫大し、肺マクロファージの周囲を取り囲むように肺胞過形成様の病変が観察された。この病変は、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。従って、肺胞過形成様病変の発生個数に DHPN で誘発された腫瘍性病変の発生個数を加えると、CB 噴霧群における病変の発生個数は、溶媒対照群と比べて有意に増加した。これらの結果から、肺マクロファージの周囲に発生した肺胞過形成様病変が腫瘍性病変であるかどうか、CB の IPS による肺発がん性の評価に重要であることが示唆された。

D. 考察

CB は、長期に吸入曝露した場合、ヒトの肺に

障害を起こす報告があり、IARC では Group2B に分類され、ヒトに対する発がん性が示唆されている。今回、③ 2-step lung carcinogenesis study による検索では CB の IPS により、肺発がん物質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。この病変の発生個数に肺発がん物質で誘発された腫瘍性病変を加えると、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。従って、この肺胞過形成様病変が前がん病変であるかどうか、CB の IPS による肺発がん性の評価に重要であり、今後この病変が腺腫や腺がんへ進展するかどうかを検討する予定である。

本研究では、肺内に噴霧した CB が胸腔内へ移行することが明らかとなった。また、胸水洗浄液中に誘導された細胞は、そのほとんどがマクロファージであった。従って肺に到達した CB の一部が、肺の外側を覆う中皮を通過して胸腔へ到達し、マクロファージを主体とする異物反応が胸腔内で起こることが示唆された。CB と同じ炭素原子が筒状になった CNT は、その形状がアスベストと類似しているため、吸入曝露によって肺がん／肺線維症／中皮腫が発生するのではないかと危惧されている。しかし肺内に吸入されたナノ材料が、どのようにして肺の外側にある中皮に到達し、中皮腫を引き起こすのかは不明であった。本研究の結果から、ナノ材料の IPS による中皮腫発生メカニズムとして以下の仮説が考えられる。1) 中皮を通過する際あるいは胸腔に到達したナノ材料が直接中皮細胞に障害を起こす。2) 胸腔に到達したナノ材料がマクロファージに貪食され、このマクロファージから産生された因子により間接的に中皮が障害される。今後、ナノ材料の中皮細胞への直接障害作用と、マクロファージを介した間接障害作用について検討する予定である。

E. 結論

(1) 肺内に噴霧された CB の大部分は CNT や C60 と同様に肺マクロファージに貪食されていた

ことから、CB の IPS による発がんメカニズムに肺マクロファージが関与することが示唆された。また肺内に噴霧された CB の一部は、肺の胸膜を超え胸腔内へ到達することが判明した。

(2) CB を貪食した肺マクロファージから産生される因子は、ヒト肺がん細胞株 A549 およびヒト中皮腫細胞株 Meso1 の増殖を促進しなかった。

(3) 2-step lung carcinogenesis study による検索では、CB を貪食した肺マクロファージを取り囲むような肺胞過形成様の病変が観察された。この病変は、肺発がん物質で誘発された腫瘍性病変とは別の部位に発生したため、この肺胞過形成様病変が腺腫、腺がんへと進展する腫瘍性病変であるか否かが、肺発がん性の評価に重要である。

F. 健康危機情報

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., et al. (2011). Lack of promoting effect of titanium dioxide particles on ultraviolet B-initiated skin carcinogenesis in rats. *Food Chem Toxicol* 49, 1298-1302.
- 2) 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.
- 3) 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.

- 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

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.

2. 学会発表

- 1) 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.
- 2) Xu, J., Futakuchi, M., Alexander, D. B., Fukamachi, K., Sakai, Y., Suzui, M., and Tsuda, H. (2011). Intra-pulmonary sprayed carbon nanotubes reach the pleural cavity and induce proliferation of visceral mesothelial cells. 70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association Nagoya.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 二口 充, 深町勝巳, 酒々井眞澄, 津田洋幸. 乳癌骨転移巣進展におけるTGFβの役割. 第100回日本病理学会総会 ワークショップ.
- 6) 二口 充, 深町勝巳, 酒々井眞澄. 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.
- 7) 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

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

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 結荀 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

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、ラットを用いて当該研究班全体の課題として以下の研究を行った。

①発がん 2 段階モデルによるプロモーションと障害作用の検討、②ラットへの短期（9～14 日）投与による毒性/炎症/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細胞増殖作用の解析した。すなわち、①MWCNT-M（Mitsui 社）、MWCNT-N（Nikkisou 社）、MWCNT-S（Shouwadenko 社）については既に開始して今年度内には結果が得られる。② a) SWCNT、MWCNT-M、MWCNT-N および crocidolite（青石綿）は肺胞内でマクロファージに貪食され、局所の肺炎症を起こした。これらの物質は胸腔内（洗浄液ペレット）と縦隔リンパ節に多くみられ、少数は肝、腎、脳に見いだされた。肺胞からリンパ流れに入り、胸腔および他臓器に達したと考えられた。臓側（肺側）胸膜には炎症局所には中皮の過形成増殖像が観察された。b) 製造時より大きさと形状の異なる MWCNT-S の VGCF（針状）と VGCF-X（毛玉状）について同様の試験を実施した。肺胞内マクロファージ中の各検体の形態は投与前と同じであった。胸腔液の炎症細胞とマクロファージ数は VGCF>VGCF-X であった。現在プロモーション試験を実施中である。以上の研究を進めつつ、広範囲の CNT に有効な検索モデルの確立を進めている。

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まだ得られていない。

本研究では、多種のナノマテリアルの急性、亜急性、慢性の有害作用（慢性では発がん性）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。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、および必要に応じて確認のための52週の発がん作用検出系の開発、② 炎症/増殖病変/障害作用等の解析のための9～14日間の短期投与試験による初期変化の把握と機序解析、③一次培養肺胞マクロファージおよび不死化肺がん、中皮腫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解析、増殖反応の把握の探索研究、の3プロジェクトを実施し、最終的にはヒトに外挿して毒性・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。これまでにこの方法を用いて、ナノマテリアル二酸化チタニウムの肺内噴霧投与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)。さらにMIP1 α が血清中に検出されることから、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。陽性対照としてクロシドライト (UICC Grade Asbestos) を用い、得られた成果の検証をおこない、信頼性の高い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週間後より、氷砂糖溶媒またはPF68分酸液にて調製した被検物質0.5ml (=500ppm) を2週に1回20～40週まで気管内噴霧投与した。52週の発がん試験では同様の方法で検体のみを2週間に8回

(250または500ppm) 投与したのちに観察した
② 短期 (9日) 投与による毒性/炎症/増殖性病変の解析

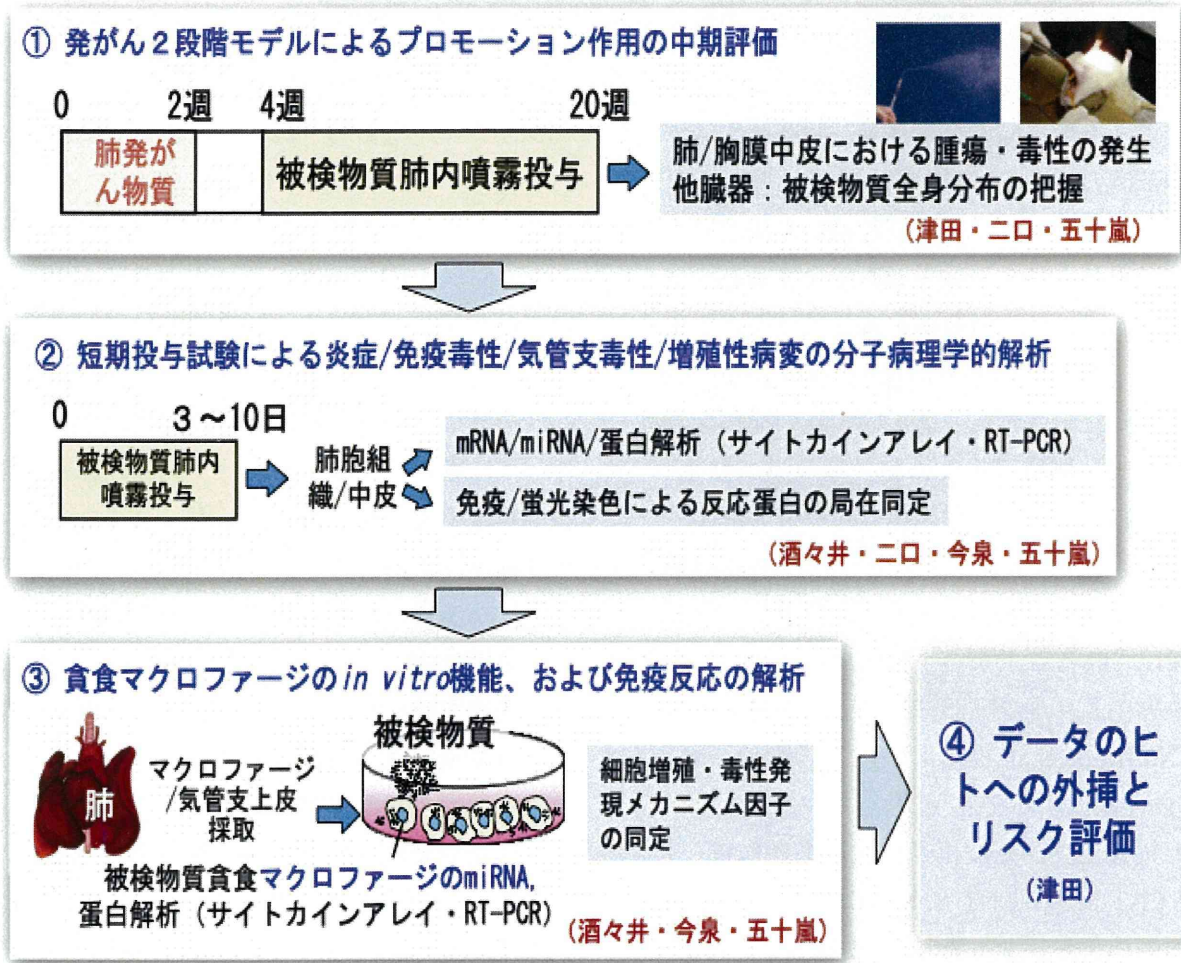
1) SWCNT-N、MWCNT-N、MWCNT-M、およびcrocidoliteについて、0.1%Tween含有生食に500ppm懸濁してF344雄ラットに9日間に5回投与した。胸腔洗浄液、肝、腎、脾、脳、リンパ節および全身臓への移動について、パラホルムアルデヒド1日固定後病理組織パラフィンブロックから走査型 (SEM) および透過型 (TEM) 電子顕微鏡標本をつくり、凝集体の偏光顕微鏡による詳細な定量観察を行った。

1) MWCNT-Nについて、0.1%Tween含有生食に250ppm懸濁してF344雄ラットに投与した。インフルレン麻酔下に腹壁に小切開を入れ横隔膜より胸腔内にRPMI1640 10mlを注入し個体をゆるく震盪後に瀉血死させ胸腔洗浄液を回収した。洗浄液と1500 rpm 5分円沈によるペレットおよび主要各臓器をパラホルムアルデヒドにて1日固定した。胸腔洗浄液、肝、腎、脾、脳、リンパ節の病理標本を作製し、走査型 (SEM) および透過型 (TEM) 電子顕微鏡標本を作成した。標本の偏光顕微鏡による詳細な定量観察とICP-MSによる元素同定を行った (n=3)。病理標本は通常H&E標本を偏光顕微鏡にて観察し、検体の見いだされた部位の電顕標本を作製した。

2) MWCNT-Sの形状の異なるVGCF (針状) およびVGCF-X (毛玉状) について、14日間に8回250ppm (PF-68懸濁) にて投与するための懸濁液の溶媒、用量、凝集会の形成の程度の観察等の条件を設定し、VGCFについて投与実験を開始した。

全体の流れ図を以下に示す。

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)。

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な

らびに52週の発がん・慢性毒性作用の検討

a) MWCNT-Mの1回目の試験でプロモーション作用は無かったため再度同じ試験を実施し、標本を評価中である。b) MWCNT-S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)。肺胞上皮の瀰漫性増殖増は見られるが、病巣の定量値において明らかなプロモーション作用は無かったため、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)のみの下記の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12週を経過中。今年度中には終了して結果が出せる。

② ラットへの短期(9日)投与による毒性/炎症 / 増殖性病変の解析

a) MWCNT-M、SWCNT-N、MWCNT-N、Crocidolite はいずれも肺胞内で種々の程度のマクロファージの誘導と炎症反応を発生させ、胸膜洗浄液の炎症細胞数はいずれも有意に増加した。胸膜生食洗浄液とそのペレット、および各臓器の病理標本を偏光顕微鏡および走査電子顕微鏡にて観察すると、胸腔ではいずれの検体も多くはマクロファージ、縦隔リンパ節に容易に検出された。肝、腎、脳にも少量見出された。またいずれの検体投与群でも臓(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。中皮細胞の誘導能はMWCNT これらの物質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り全身臓器に移動したと考えられた。(Xu, Jiegou et al., 投稿中)

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

a) MWCNT-M、SWCNT-N、MWCNT-N、Crocidolite 投与の個体から採集した胸膜洗浄液はヒト中皮腫細胞Meso-1に対する増殖活性がみられた。

b) 投与した懸濁液は、VGCFは調整後3時間で肉眼的に分離沈殿することが観察されたが、VGCF-Xは12時間後でも均一に懸濁されていた。胸腔内においては、炎症細胞の増殖はVGCF、VGCF-Xいずれにも見られたが、VGCFのほうがより顕著であった(VGCF-Xの1.4~1.5倍)。

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。そのために被検物質の作用

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た。

WCNT-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。MWCNT-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、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と考える。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。さらに形状の異なるVGCF(針状)とVGCF-X(毛玉状)については、短期試験においてVGCF投与群に肺炎症の差異の有無、長期プロモーション実験(標本解析中)について、詳細な検討を実施している。

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、①16~20週の発がんプロモーション/毒作用検出モデル、②14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作用・発がんプロモーション作用機序の把握方法、③*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 crocidilite と同じようにマクロファージに貪食され、肺胞壁の炎症反応を起こす。しかし、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。以上の研究成果を勘案してそれらを高い精度で検出できる検索モデルの確立を行う。

F. 健康危機情報

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) 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.
- 3) 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) 深町勝巳, 二口 充, 酒々井眞澄, 徐結苟, 津田洋幸 (2011). 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.
- 2) 二口 充, 徐結苟, 深町勝巳, 酒々井眞澄, 津田洋幸 (2011). 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.
- 3) Xu, J., Futakuchi, M., Alexander, D. B., Fukamachi, K., Sakai, Y., Suzui, M., and Tsuda, H. (2011). Intra-pulmonary sprayed carbon nanotubes reach the pleural cavity and induce proliferation of visceral mesothelial cells. 70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association Nagoya.

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