

従来の規制手法の応用では限界がある。従って、化学修飾、表面構造、サイズ等の違いがナノマテリアルの遺伝毒性及び発がん性に及ぼす影響に関しては緊急に明らかにする必要がある。従って、本研究では、化学修飾、表面構造、サイズ等の違いがナノマテリアルの遺伝毒性及び発がん性に及ぼす影響に関して検討することを目的とする。更に、分析化学的手法等を用いたナノマテリアルの遺伝毒性メカニズムについても検討を行ない、毒性メカニズムに基づいたナノマテリアルの遺伝毒性低減化方法について検討する。本研究の遂行により、有用ナノマテリアルのメカニズムに基づく遺伝毒性低減化方法が明らかとなれば、より安全なナノマテリアルを製造する上に極めて有効な資料を提供する。

B. 研究方法

研究目的に基づき、本年度は、以下の4項目に関して研究を行った。

① Kaolin の物理化学的性質

本研究には、Kaolin-K (韓国産) 及び Kaolin-U (アメリカ産) の 2 種の Kaolin を試料として使用した。これらカオリンの物理化学的性質 (SEM による表面構造観察、二次粒子径の測定、ゼータ電位の測定) を測定した。

② Kaolin の気管内投与によるマウス肺に対する DNA 損傷性

Kaolin を 0.05 及び 0.2 mg/0.1 ml となるように 0.05% Tween-80 に懸濁した。投与直前に超音波処理により十分に分散させた。

ICR マウスにナノマテリアルを気管内投与し、3 時間後に屠殺・解剖した。得られた肺組織を、ダウンス型ホモジナイザーで静かにホモジナイズし、細胞浮遊液とした。得られた細胞浮遊液

をアガロースゲルと混和しスライドグラスに固定した後、一晚細胞溶解した。アルカリ条件下で DNA を巻き戻した後、電気泳動した。中和、脱水後、CYBRGold で染色し、蛍光顕微鏡で観察した。画像解析ソフト (Comet assay IV) を用いて、1 検体につき 100 個の細胞の Tail intensity (%) を得た。

③ フローサイトメーター (FCM) を用いた細胞内取込み量の解析

In vitro 実験用の試料として、各 Kaolin を 10 mg/ml となるように 0.05% Tween-80 に懸濁したものを冷蔵保存しておき、使用時に所定の濃度になるように MEM 基本培地に懸濁した。曝露直前に超音波処理により十分に分散させた。

所定の濃度に調製した Kaolin をヒト肺胞上皮細胞 A549 及びマウスマクロファージ様細胞 RAW264 に曝露し、一定時間培養後、余剰の Kaolin 除去し、トリプシン処理により細胞を回収した。得られた細胞浮遊液を用いて FCM 解析し、細胞内の複雑さの指標である側方散乱光強度の違いから、各 Kaolin の細胞内への取込み効率を比較した。

④ 活性酸素種 (ROS) 産生細胞の解析

FCM 解析の際、各細胞浮遊液に終濃度 20 μ M となるように ROS 反応性蛍光プローブである 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) を添加し、37 $^{\circ}$ C、遮光下で 30 分間静置した。励起波長 485 nm、蛍光波長 530 nm における蛍光強度を指標に、ROS 産生細胞の解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究で行う動物実験にあたっては、国立がんセンターを含む各施設における動物実験に関する指針に則って実施し、可能な限り実験動物の苦痛軽減処置を行う。

C. 研究結果

① Kaolin の物理化学的性質

SEM を用いて粒子表面の観察を行ったところ、Kaolin-K は塊状の粒子で存在していた。一方、Kaolin-U は、小さな平面上の断片が多数重なった、鱗片上の形で存在していることが明らかとなった(図1)。各 Kaolin を 0.5 及び 2.0 mg/ml となるように懸濁し、1 分間超音波処理した際の二次粒子径(凝集塊の大きさ)を測定した。0.5 及び 2.0 mg/ml での主な粒子径は、Kaolin-K では 827.4 ± 186.2 nm 及び 1390.1 ± 226.3 nm、Kaolin-U では 700.0 ± 128.6 nm 及び 1488.3 ± 83.7 nm であり、両者に顕著な差はみられなかった。また、粒子の分散性に関連する物性として、粒子表面電荷の指標であるゼータ電位を測定した。その結果、Kaolin-K では -8.29 mV、Kaolin-U では -21.73 mV であった。ゼータ電位は、その値の絶対値が大きいほど表面電荷が高く、粒子同士が互いに反発し合い分散しやすいことが知られている。本結果においては、Kaolin-K に比べ Kaolin-U のゼータ電位の絶対値が大きかったことから、Kaolin-U の方が分散しやすいことが推察された。

② Kaolin の気管内投与によるマウス肺に対する DNA 損傷性

In vivo における DNA 損傷性を評価するために、各 Kaolin を 0.05 及び 0.2 mg/mouse で気管内投与し、3 時間後に屠殺・解剖して、肺を用いてコ

メットアッセイを行った。

Kaolin 投与群では、いずれの Kaolin も濃度依存的に DNA 損傷性を示し、0.2 mg/ml 群での Tail intensity は Kaolin-K が 5.50 ± 1.38 、Kaolin-U が 13.74 ± 1.23 であり、Kaolin-K に比べ Kaolin-U がより強い DNA 損傷性を示すことが明らかとなった(図2)。

③ フローサイトメーター (FCM) を用いた細胞内取込み量の解析

ヒト肺胞上皮細胞 A549 に 2 種類の Kaolin を曝露したところ、いずれの Kaolin においても濃度依存的、また処理時間依存的に Kaolin を取込んだ細胞の割合が増加した(図3)。A549 細胞に 100 μ g/ml で 60 分間曝露した際に、Kaolin-K 及び Kaolin-U を取込んだ細胞の割合は、それぞれ 12.4 ± 2.0 及び $28.5 \pm 0.58\%$ であり、Kaolin-K に比べ Kaolin-U の方が効率的に細胞内に取込まれた ($p < 0.01$)。一方マクロファージ様細胞である RAW264 でも同様、濃度依存的及び処理時間依存的に Kaolin を取込んだ細胞の割合が増加した(図3)。100 μ g/ml で 60 分間曝露した際には、それぞれ 39.7 ± 3.9 及び $54.2 \pm 10.6\%$ であり、Kaolin-K に比べ Kaolin-U が効率的に細胞内に取込まれた ($p < 0.01$)。以上の結果から、実質細胞である A549 に比べ、マクロファージ細胞である RAW264 のほうが、Kaolin 粒子をより効率的に細胞内に取り込むことが明らかとなった。また Kaolin-K に比べて Kaolin-U のほうが、細胞内に取り込まれやすい傾向がみられた。

④ 活性酸素種 (ROS) 産生細胞の解析

各 Kaolin を 100 μ g/ml で A549 及び RAW264 に曝露した際の ROS 産生

細胞を、DCFH-DA で蛍光標識し、FCM を用いて確認した。A549 ではいずれの Kaolin においても、曝露時間に関係なく ROS を産生している細胞はほとんどみられなかった (図 4)。一方 RAW264 では、細胞内への Kaolin の取込み量に相関して、ROS を産生している細胞が増加していた (Fig. 53)。Kaolin-K を 180 分間曝露した際には、 $17.6 \pm 4.3\%$ の細胞が ROS を産生していたのに対して、Kaolin-U では $31.5 \pm 3.2\%$ の細胞が ROS を産生していた。このことから、肺の実質細胞である A549 は、細胞内に Kaolin 粒子を取り込みはするが ROS をほとんど産生せず、マクロファージ細胞である RAW264 は Kaolin の取込み量と相関して ROS を産生することが明らかとなった。また、Kaolin-K と Kaolin-U のマウス肺に対する DNA 損傷性の違いは、マクロファージへの取り込みされ易さに起因することが示唆された。

D. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Wei M, Wanibuchi H, Nakae D, Tsuda H, Takahashi S, Hirose M, Totsuka Y, Tatematsu M, Fukushima S. Low-dose carcinogenicity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in rats: Evidence for the existence of no-effect levels and a mechanism involving p21(Cip / WAF1). *Cancer Sci.* 102: 88-94, 2011.
- 2) Totsuka Y, Kato T, Masuda S, Ishino K, Matsumoto Y, Goto S, Kawanishi M, Yagi T, Wakabayashi K., In vitro and in vivo genotoxicity induced by

fullerene (C60) and kaolin. *Genes Environ.* 33: 14-20, 2011.

- 3) Kato T, Totsuka Y, Hasei T, Watanabe T, Wakabayashi K, Kinai N, Masuda S, In vivo examination of the genotoxicity of the urban air and surface soil pollutant, 3,6-dinitrobenzo[e]pyrene, with intraperitoneal and intratracheal administration. *Environ., Mutagen.*, 2012, in press.
- 4) Matsubara S, Takasu S, Tsukamoto T, Mutoh M, Masuda S, Sugimura T, Wakabayashi K, Totsuka Y., Induction of Glandular Stomach Cancers in Helicobacter pylori-infected Mongolian Gerbils by 1-Nitrosoindole-3-acetonitrile., *Int J Cancer*, 130: 259-266, 2012.

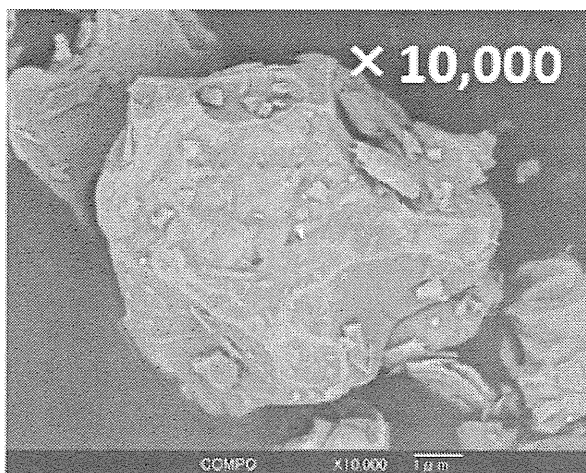
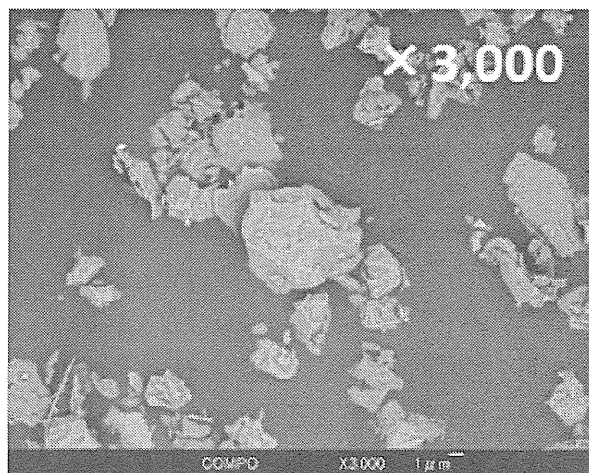
2. 学会発表

- 1) Yukari Totsuka, Tatsuya Kato, Kousuke Ishino, Dai Nakae, Yukie Tada, Kenichi Oyama, Akio Ogata, Masanobu Kawanishi, Takashi Yagi, Masatoshi Watanabe, Keiji Wakabayashi, Hitoshi Nakagama: Genotoxicity induced by nanomaterials, 41th European Environmental Mutagen Society Annual Meeting, (Barcelona, SPAIN, 4-7, July, 2011).
- 2) 戸塚ゆかり; ナノマテリアルにより誘発される遺伝毒性、レドックスシンポジウム (東京、3月10-11日)
- 3) Yukari Totsuka, Tatsuya Kato, Keiji Wakabayashi, Tetsushi Watanabe, Hitoshi Nakagama,; Genotoxicity of aminobenzoazepinoquinolinone derivative formed from tryptophan

- and glucose by Maillard reaction, 日本癌学会第70回大会（名古屋、10月3-5日）
- 4) Tatsuya Kato, Yukari Totsuka, Kousuke Ishino, Masatoshi Watanabe, Keiji Wakabayashi, Hitoshi Nakagama ; Differences in DNA damaging potency of differently-originated kaolins、日本癌学会第70回大会（名古屋、10月3-5日）
- 5) Kousuke Ishino, Yukari Totsuka, Tatsuya Kato, Hitoshi Nakagama ; A comprehensive analysis of DNA adducts in mice exposed to nanomaterials, 日本癌学会第70回大会（名古屋、10月3-5日）
- 6) Ayaka Morohashi, Akiko Sato, Kazuaki Kawai, Hiroshi Kasai, Yukari Totsuka, Masatoshi Watanabe. ; Cytotoxicity and genotoxicity of magnetic nanoparticles in human lung cancer cell line, A549. 日本癌学会第70回大会（名古屋、10月3-5日）
- 7) Kumi Ootsuka, Yukari Totsuka, Keiji Wakabayashi, Tatsuo Nunoshiba, Tetsushi Watanabe, Hitoshi Nakagama ; *In vivo* mutagenicity of aminobenzoazepinoquinolinone derivative (ABAQ) formed from L-tryptophan and glucose by the Maillard reaction, 日本環境変異原学会第40回大会（東京、11月21-22日）
- 8) Kousuke Ishino, Tatsuya Kato, Tomonari Matsuda, Yukari Totsuka, Hitoshi Nakagama ; A comprehensive analysis of DNA adducts in lungs of mice exposed to nanomaterials using nanoLC-QToF MS 日本環境変異原学会第40回大会（東京、11月21-22日）
- 9) Tatsuya Kato, Kousuke Ishino, Tatsushi Toyooka, Yuko Ibuki, Masatoshi Watanabe, Keiji Wakabayashi, Shuichi Masuda, Yukari Totsuka, Hitoshi Nakagama ; Differences in DNA damaging potency and incorporation rate into cultured mammalian cells of differently-originated kaolins 日本環境変異原学会第40回大会（東京、11月21-22日）
- 10) Masanori Yamada, Yuko Shimamura, Yukari Totsuka, Naoyuki Inaba, Souleymane Coulibaly, Yuka Tamura, Tomohiro Hasei, Tetsushi Watanabe, Shuichi Masuda : Formation of a novel mutagen, ABAQ under diabetic condition in vivo. 日本環境変異原学会第40回大会（東京、11月21-22日）
- 11) Miho Ikemoto, Masanobu Kawanishi, Yukari Totsuka, Keiji Wakabayashi, Takashi Yagi, ; Contribution of homologous recombination to nanomaterial-induced micronucleus induction. 日本環境変異原学会第40回大会（東京、11月21-22日）
- E. 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

図1 本研究で使した Kaolin の SEM 写真

Kaolin-K



Kaolin-U

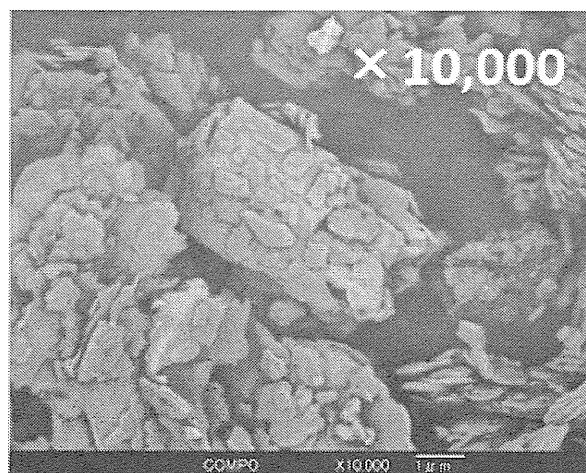
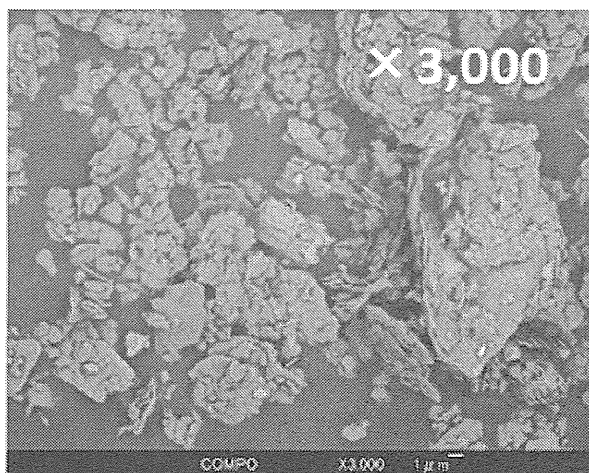
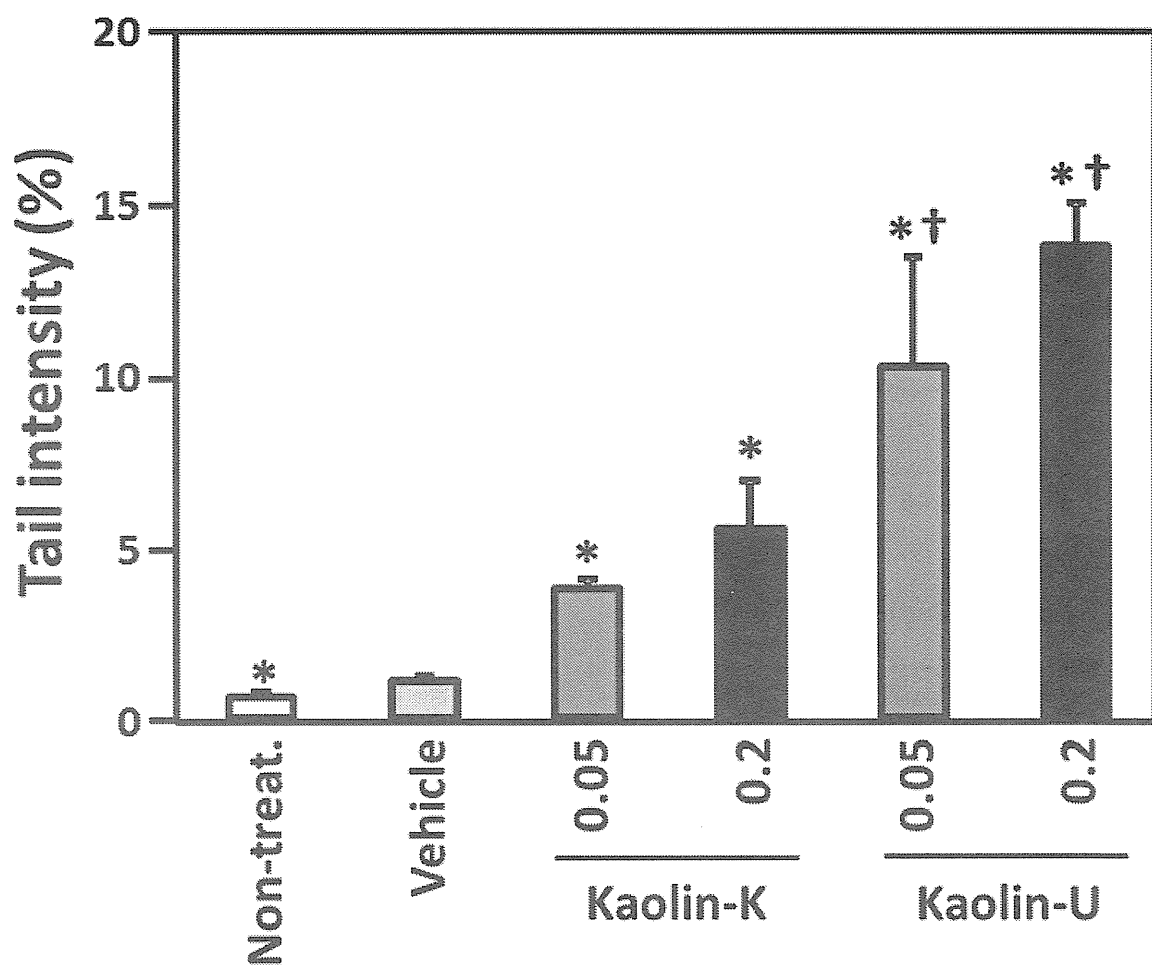


図2 Kaolin の気管内投与によるマウス肺に対する DNA 損傷性



* : $p < 0.01$ (vs Vehicle)

† : $p < 0.01$ (vs same dose of Kaolin-K)

図3 フローサイトメーター (FCM) を用いた細胞内取込み量の解析

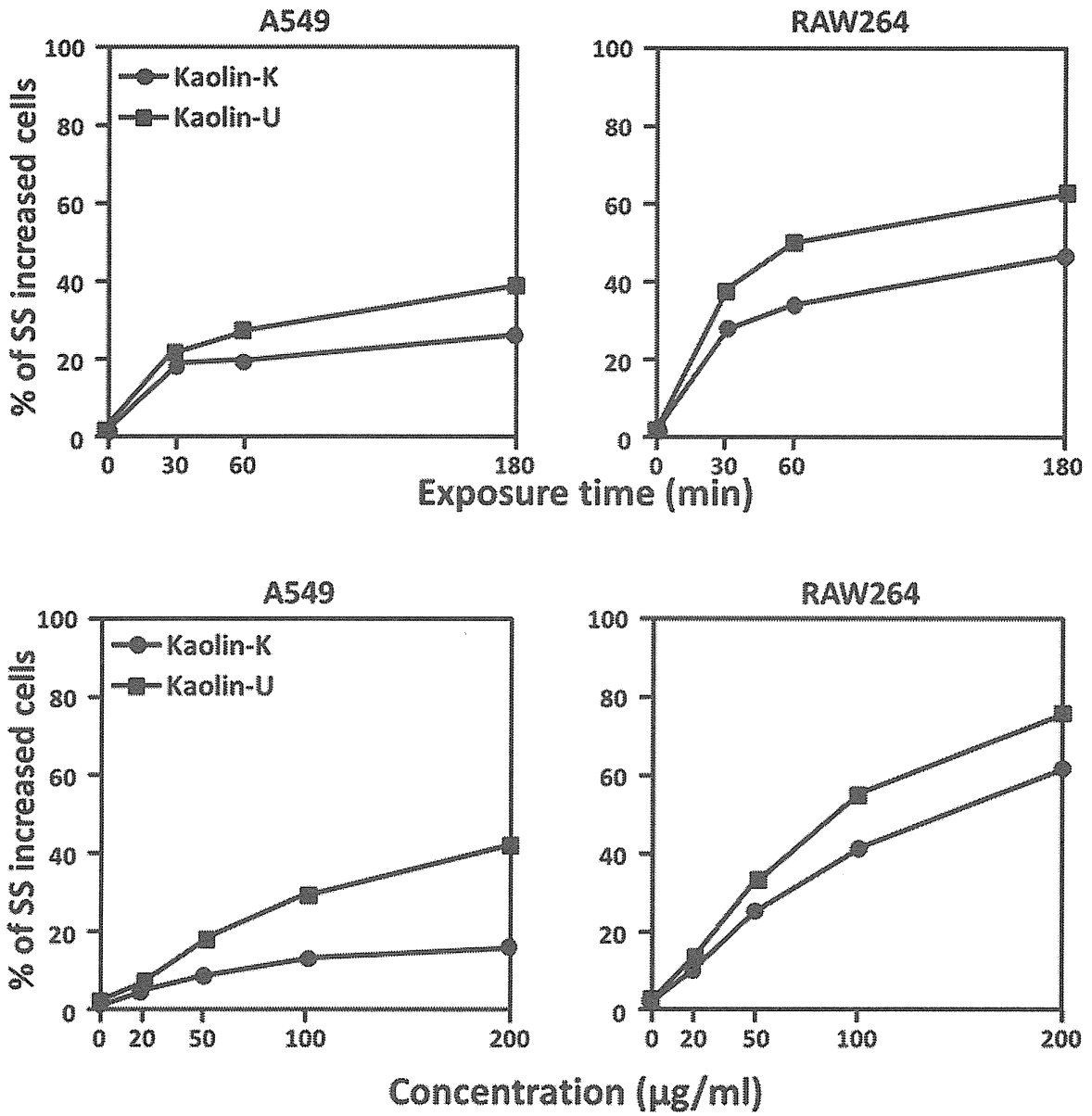
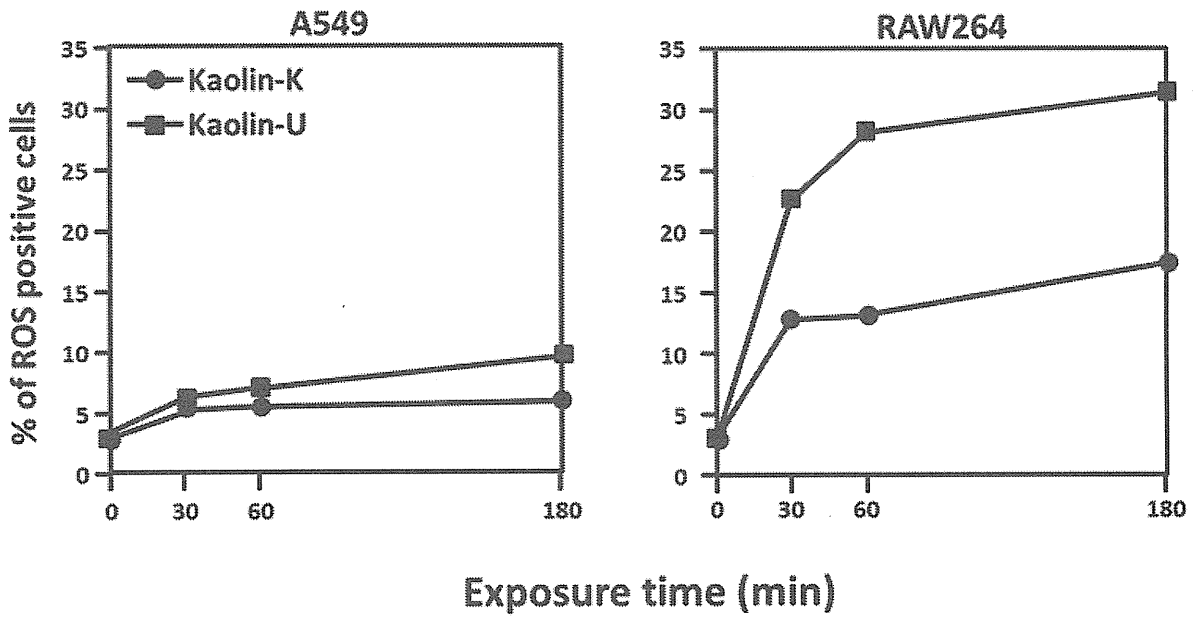


図4 活性酸素種 (ROS) 産生細胞の解析



厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究年度終了報告書

ナノマテリアルの遺伝毒性の低減化の *in vivo* 評価

研究分担者	中江 大	東京都健康安全研究センター	医薬品部 部長
研究協力者	多田 幸恵	東京都健康安全研究センター 生体影響研究科 主任研究員	環境保健部
研究協力者	齋藤 育江	東京都健康安全研究センター 環境衛生研究科 主任研究員	環境保健部
研究協力者	大山 謙一	東京都健康安全研究センター 生体影響研究科 科長	環境保健部
研究協力者	小縣 昭夫	東京都健康安全研究センター	環境保健部 部長

研究要旨：本研究は、ナノマテリアルの遺伝毒性低減化のための *in vivo* 評価を目的として遂行している。磁性ナノ粒子マグネタイトは、化学的に安定で比較的大きな磁性を有することから、広く利用され、さらに医療・バイオテクノロジー分野での応用展開が図られているが、安全性に関する情報が限られており、早急な安全性評価が求められている。本研究の先行研究はマグネタイトの急性及び慢性毒性の評価を行ったが、本年度はマグネタイトの体内動態及び排泄について検索した。試験は、当センター動物飼育施設内のナノ物質取扱いエリアにおいて、当センターのナノマテリアルの取扱いに関する作業規定及び試験管理マニュアルに従って、F344/DuCr1Cr1j系ラット（10週齢）に、マグネタイトを0（対照群）・15.0 mg/kg 体重（投与群）の用量でスプレー投与器により1回気管内投与し、その1・3・7・21・50日後に代謝ケージで24時間尿及び糞を採取し、エーテル麻酔下で採血後、肝・腎・肺・脳を摘出した。試料中のマグネタイト量は、誘導結合プラズマ質量分析装置により分析したマグネタイト由来の鉄の濃度を指標として評価した。肺の鉄濃度は、1日に最高値を検出した後、7日まで比較的速やかに減少し、21-50日にピーク時のほぼ3分の1の濃度でプラトーに推移した。肺でのマグネタイトの生物学的半減期は、ほぼ7日間であると推定された。血液・肝・腎・脳の鉄濃度は、肺よりきわめて低値ながら、1日から50日まで継続して増加する傾向を示した。一方、肉眼観察においては投与群のラットの肺及びリンパ節が灰黒色を呈する変化が見られ、組織病理学的観察によっては当該部位に黄褐色の顆粒を貪食したマクロファージの浸潤及び黄褐色顆粒の沈着が認められた。この顆粒は、マグネタイトの肺への沈着及びリンパ節への移行を示唆する所見であった。マグネタイトの体外への排泄は、尿と比較して糞による経路が主体であり、50日においても排泄が続いていた。

A. 研究目的

本研究は、ナノマテリアルの遺伝毒性低減化のための *in vivo* 評価を目的として遂行している。ナノマテリアルは、特有の物性を示すことから様々な分野で広範な活用が見込まれる画期的な新素材として注目され、積極的な研究開発が進められている。一方で近年、径 100 nm 以下の超微粒子（ナノ粒子）の健康影響が注目されているが、その安全性の評価は十分でなく、ナノマテリアルの生体影響に関する研究は未だ十分な知見を得ていない。ナノマテリアルが人々の生活利便性を飛躍的に向上させる可能性を秘めていることを考えれば、そのリスクを

十分に評価し、その結果に基づいて適切に利用・管理されることは、ナノマテリアルの円滑な普及にとってきわめて重要である。

磁性ナノ粒子マグネタイト（以下マグネタイトとする）は、化学的に安定で比較的大きな磁性を有することから、磁気記録媒体・磁性流体・磁性トナーなど様々な用途に広く利用され、医療やバイオテクノロジーの分野への応用展開が注目されている¹⁾。日本においても、マグネタイトは、現在、がんの温熱療法への応用²⁻⁴⁾や抗がん剤のキャリアーとしての利用⁵⁾が検討されており、今後さらなる活用分野が拡大するものと予想される。しかしながら、マグネタイトの安全性に関する情報は、限られており、早急に安全性評価を行うことが求められている。

それゆえ、我々は、マグネタイトを研究対象に選定し、本研究の先行研究において、その急性及び慢性毒性の評価を行ってきた

一般に、化学物質による毒性発現は生体内の作用部位・毒性標的部位における濃度と密接に関係し、その濃度は当該物質の吸収・体内分布・代謝・排泄(ADME)に依存して決定される。ナノマテリアルの場合は、その特徴的な物理化学的性質から、一般の化学物質に比べ、健康影響評価における ADME 評価がより重要な意味を持つと考えられる⁶⁾。そこで、本年度は、マグネタイトの体内動態及び排泄を検討する目的でラットを用いた ADME 試験を実施した。

B. 試験方法

本研究における試験方法は、可能な限り医薬品非臨床試験ガイドライン⁷⁾に準じて行った。気管内投与法に関しては、気道の毒性評価のための暴露技術としての気管内投与⁸⁾を参照した。本試験は、当センター動物飼育施設内のナノ物質取扱いエリアにおいて、当センターのナノマテリアルの取扱いに関する作業規定及び試験管理マニュアルに従って行った。なお、試験実施に当たっては、当センター環境保健部生体影響研究科において、研究協力者である多田幸恵主任研究員の主導下に、同科員の協力を仰いだ。

1. 被験物質

被験物質は、戸田工業株式会社(広島)より供与された磁性ナノ粒子マグネタイト(Lot.100927, pH 9.1, 粒径 5-15 nm, 比表面積 122 m²/g)を用いた。被験物質は、エネルギー分散型 X 線分光分析装置(Energy Dispersive X-ray Spectrometer: EDS)で、鉄及び酸素を検出し、それ以外の不純物(元素)を検出しなかった。

被験物質の投与懸濁液は、本研究の先行研究において行った検討結果に基づき、マグネタイトスラリー(マグネタイト超微粒子分散液)を高圧滅菌済超純水(Milli-Q, 18.2 MΩ)で必要濃度に希釈後、0.2 M HCl(滅菌済超純水にて調製)にて pH 7.4-7.5(ラットの組織液 pH)⁹⁾に調整した。調製に用いた容器及びピペットチップは、何れも高圧滅菌済みの物を使用した。なお、調整後に試料を高圧滅菌しなかった理由は、マグネタイトの高温処理による酸化を避けたためである。

2. 動物及び飼育条件

動物は、雄の F344/DuCr1Cr1j 系ラット SPF 動物 40 匹を、日本チャールス・リバー株式会社(神奈川)より 8 週齢で入手し、2 週間馴化飼育した後、10 週齢で試験に供した。各群の動物数は 20 匹とし、投与開始日の体重を基に、体重別層化無作為抽出法により群分けを行った。動物は、馴化及び試験期間中、自動給水装置付きベルト式飼育棚のステンレス製懸垂式ケージに 1 匹ずつ収容し、基礎飼料(CE-2, 日本クレア株式会社, 東京)と細菌ろ過器を経由させた水道水を自由に摂取させ、バリアシステム内の飼育室にて、室温 23±2°C・湿度 55±10%・換気回数毎時 10 回・12 時間蛍光灯照明の条件下で飼育した。

3. 投与及び分析法

マグネタイト懸濁液は、10 週齢の Fischer 344 ラットに、エーテル麻酔下で、0(対照群)あるいは 15 mg/kg 体重(投与群)の用量で、気管内液体噴霧装置(IA-1B, Penn-Century, Inc., USA)を用いて 1 回気管内スプレー投与した。投与後 1・3・7・21・50 日のそれぞれ 24 時間前に、各群 3 匹を代謝ケージ(メタボリカ・MC; スギヤマゲン, 東京)に 1 匹ずつ収容し、24 時間尿及び糞を採取した。動物は、上記の計画屠殺日に、エーテル麻酔下で腹大動脈から採血後屠殺解剖し、肝・腎・肺・脳を摘出して重量測定後凍結保存した。

マグネタイト量の検索に当たって、尿については、一定量を採取し、Milli Q 水で 2 回洗浄処理(プラスチック試験管で混和・振盪し、超音波バスで 5 分間処理後遠心分離し、上清を除く)した。血液は、尿と同様に Milli Q 水で 2 回洗浄処理した後、Milli Q 水による洗浄処理をさらに 3 回繰り返した。糞は、40°C で一晩乾燥後重量を測定し、全量を乳鉢で粉碎し均一にした後一定量を採取し、MilliQ 水の代わりに EDTA 液で 2 回洗浄処理した。臓器は、一定量を採取し、ホモジナイズ後 Milli Q 水で 2 回洗浄処理した。洗浄処理した臓器試料は、エタノールで脂質成分を溶出後、水酸化カリウムを加え 10 分間加熱還流し、残渣を Milli Q 水により 2 回洗浄処理し、20%硝酸で加熱分解した。マグネタイト量は、誘導結合プラズマ質量分析装置(ICP-MS; アジレント 7500 ce, アジレント・テクノロジー株式会社, 八王子)により分析したマグネタイト由来の鉄の濃度を指標として評価した。分析は、鉄測定質量数を 56 m/z と

し、内部標準物質にイットリウム（測定質量数 89 m/z）を用い、ヘリウムを使用したコリジョン/リアクション法反応ガスにて測定後、内部標準法で濃度を計算した。

病理学的検索については、分析用のラットそれぞれの解剖時に、各群 1 匹をエーテル麻酔下で放血屠殺後に解剖して肉眼的観察を行い、肺及びリンパ節を 10%中性緩衝ホルマリン液で固定後、定法に従いパラフィン包埋し、薄切後ヘマトキシリン・エオジン染色及び鉄染色し、光学顕微鏡下で観察した。

4. 統計学的解析

統計学的解析は、相応する対照群とマグネタイト投与群間で等分散の検定を行い、等分散の場合は t 検定を、異分散の場合にはアスピノウエルチの t 検定を行った。統計処理ツールは StatLight (Yukms 株式会社, 東京) を用いた。

5. 倫理面への配慮

本研究は、当センターの研究調整委員会及び動物実験委員会による事前審査を受け、そのモニター下に、実験動物の適切な扱いに関する国内外の法規・規則・ガイドライン等に準拠して行った。

C. 結果

表 1 は、各群の初期及び最終体重、投与後 1・3・7・21・50 日の 24 時間尿量・24 時間糞乾燥重量・臓器重量を示す。対照群と比較すると、投与群では、1・3 日の最終体重、1 日の糞乾燥重量・肝重量、3 日の腎重量が減少した。一方、肺重量は、1・3・7・50 日に増加した。

表 2 は、1・3・7・21・50 日の血液・尿・糞・臓器中の鉄濃度を示す。また、図 1 は、それぞれの試料中の鉄濃度の投与群平均値から対照群平均値を差し引いた値を示す。血液では、3 日に高い値を示し、その後減少する傾向を示した。尿では、濃度がほとんど上昇せず、50 日になって、わずかな上昇が認められた。糞では、対照群においても一定濃度の鉄が検出されたが、投与群の 21 日を除いた全時点で、対照群と比べて $5 \mu\text{g/g}$ 以上の上昇を認めた。肝・腎・脳の鉄濃度は肺に比べてきわめて低値ながら 1 日から 50 日まで継続して増加する傾向を示し、脳においては 50 日に対照群と比較して有意な上昇が認められた。肺では、全時点において、投与群で高い鉄濃度を示した。図 2 は、肺にお

ける鉄濃度の経時的な推移を示す。投与群の肺の鉄濃度は、1 日に最高値に達し、その後 7 日まで比較的速やかに減少し、21-50 日にピーク時のほぼ 3 分の 1 の濃度でプラトーに推移した。

解剖時に行った肉眼的検索において、投与群の肺では 1 日から腫大とマグネタイトと思われる黒色物質の沈着が認められ、この変化は 50 日まで全例に認められたが、1 日と比較して 50 日では黒色物質の沈着が少なく腫大も軽度であった (図 3)。胸腺リンパ節は 3 日から灰黒色を呈して腫大し、この変化は 50 日まで継続して認められたが、7 日と比較して 50 日では灰黒色が淡く腫大も軽度であった (図 3)。

肺の組織学的検索において、投与群では、1 日にマグネタイトと思われる黒色顆粒を貪食した肺胞マクロファージの肺胞腔への浸潤が、多数認められた。このマクロファージ浸潤は、50 日においてもみられたが、1 日と比較し軽度であった (図 4)。投与群のリンパ節では、HE 染色で黄褐色の顆粒を貪食したマクロファージの浸潤が多数認められ、特に胸腺リンパ節において顕著であった。これらの顆粒は、ベルリン青染色 (鉄染色) で青色を呈した (図 4)。

D. 考察

気管内投与されたマグネタイトの量は、肺で 1 日に最高値に達した後、7 日まで比較的速やかに減少し、21-50 日にピーク時のほぼ 3 分の 1 の濃度でプラトーに推移した。したがって、肺でのマグネタイトの生物学的半減期は、ほぼ 7 日間であると推定された。Zhu らは、SD ラットの雄にアイソトープで標識した Fe_2O_3 を気管内投与して体内分布及び排泄を観察した試験の肺における Fe_2O_3 の生物学的半減期として、ほぼ 45 日という本試験結果より長い値を報告している¹⁰⁾。Zhu らの用いた Fe_2O_3 は平均粒径が $144 \pm 36 \text{ nm}$ 、比表面積が $53.27 \text{ m}^2/\text{g}$ であるのに対し、本試験で用いたマグネタイトは粒径 5-15 nm、比表面積が $122 \text{ m}^2/\text{g}$ のスラリー (Fe_3O_4 の超微粒子分散液) であった。したがって、本試験のマグネタイト粒子は、非常に微細であり、マクロファージに容易に貪食された結果、Zhu らの実験と比較して短期間で肺から排出されたものと考えられる。

気管内投与されたナノ物質の移行については、[1]肺胞マクロファージにより貪食されリンパ管を介して血流へ、[2]肺胞腔内の微粒子が肺胞上皮・基底膜・血管内皮を経て血流へ、

[3]肺から気道内を上行し喀痰等の嚥下により消化管から血流あるいは糞便中へ、等の経路がある¹¹⁾。Zhuらは、気管内投与した Fe_2O_3 が、肝・腎・脾など単核貪食細胞の多い器官に多く分布したと報告している¹⁰⁾。本試験においても、肝・腎で鉄濃度が1日から50日まで継続して増加する傾向が認められた。したがって、気管内投与されたナノ粒子は、マクロファージに貪食され、他臓器に移行したものと考えられる。

Hubbsらは、ナノ粒子の体内動態に関して、ナノ粒子の血液脳関門通過の決定的要因が粒子の大きさであると述べている¹²⁾。本試験では、脳において50日に対照群と比較して鉄濃度の有意な上昇が認められた。このことは、本試験で用いたマグネタイトが粒径5-15 nmの超微粒子である事実と併せ、マグネタイトが血液脳関門を通過し脳に移行する可能性を示唆する。この点については、今後、詳細な検討が必要である。

本試験の病理組織学的検索においては、投与群の肺及びリンパ組織にマグネタイトを貪食したマクロファージの浸潤が多数認められた。肺の粒子貪食マクロファージは投与後の時間経過に伴って減少し、この組織学的変化の推移は肺の鉄濃度の推移とよく一致していた。したがって、気管内投与されたマグネタイトは、肺胞マクロファージにより貪食され、一定期間肺に停留した後、徐々に肺からリンパ節及び他臓器に移行したと考えられる。一方、体外への排泄は尿と比較して糞に多く、尿中鉄濃度の上昇がわずかであったことから尿路系を介した排泄は少ないと考えられる。

E. 結論

本試験は、ラットに単回スプレー気管内投与したマグネタイトの体内動態及び排泄を検索した。マグネタイトは主要臓器の中で主として肺に分布し、肺内量は1日で最高値に達した後7日まで比較的速やかに減少して21-50日にピーク時のほぼ3分の1値でプラトーに推移した。したがって、肺でのマグネタイトの生物学的半減期は、ほぼ7日間であると推定された。一方、体外への排泄は、尿と比較して糞による経路が主体であることが判明した。

F. 文献

- 1) Hood E, 2004. Nanotechnology: Looking as we leap. *Environ Health Perspect* 112, A740-749.
- 2) Kikumori T, Kobayashi T, Sawaki M, Imai T, 2009. Anti-cancer effect of hyperthermia on breast cancer by magnetite nanoparticle-loaded anti-HER2 immunoliposomes. *Breast Cancer Res Treat* 113, 435-441.
- 3) Kawai N, Futakuchi M, Yoshida T, Ito A, Sato S, Naiki T, Honda H, Shirai T, Kohri K, 2008. Effect of heat therapy using magnetic nanoparticles conjugated with cationic liposomes on prostate tumor in bone. *Prostate* 15, 784-792.
- 4) Jin H, Kang KA, 2007. Application of novel metal nanoparticles as optical/thermal agents in optical mammography and hyperthermic treatment for breast cancer. *Adv Exp Med Biol* 599, 45-52.
- 5) Lin BL, Shen XD, Cui S, 2007. Application of nanosized Fe_3O_4 in anticancer drug carriers with target-orientation and sustained-release properties. *Biomed Mater* 2, 132-134.
- 6) 広瀬明彦, 西村哲治, 菅野純, 2009. 産業用ナノマテリアルの健康影響評価法開発における課題と慢性影響研究の重要性. *Bull Natl Inst Health Sci* 127, 15-25.
- 7) 医薬品非臨床試験ガイドライン研究会編集, 2010: 医薬品非臨床試験ガイドライン解説 2010, 薬事日報社, 東京, pp354-368.
- 8) Driscoll KE, Costa DL, Hatch G, Henderson R, Oberdorster G, Salem H, Schlesinger RB, 2000. Intratracheal instillation as an exposure technique for the evaluation of respiratory tract toxicity: uses and limitations. *Toxicol Sci* 55, 24-35.
- 9) Ringler D, Dabich L, 1979. Hematology and clinical biochemistry. In: Baker HJ, Lindsey JR, Weisbroth SH (Eds), *The laboratory rat, 1. Biology and diseases*, Academic Press, New York, pp 105-121.
- 10) Zhu MT, Feng WY, Wang Y, Wang B, Wang M, Ouyang H, Zhao YL, Chai ZF, 2009. Particokinetics and extrapulmonary translocation of intratracheally

instilled ferric oxide nanoparticles in rats and the potential health risk assessment. *Toxicol Sci* 107, 342-51.

- 11) Rozman KK, Klaassen CD, 2004. Absorption, distribution and excretion of toxicants. In: Klaassen CD (Ed), Casarett and Doull's toxicology 6th ed., Scientist co. Tokyo, 127-154.
- 12) Hubbs AF, Mercer RR, Benkovic SA, Harkema J, Sriram K, Berry DS, Goravanahally MP, Nurkiewicz TR, Castranova V, Sargent LM, 2011. Nanotoxicology-A Pathologist's Perspective. *Toxicologic Pathology*, 39, 301-324.

G. 研究発表

1. 論文発表

広瀬明彦, 高木篤也, 西村哲治, 津田洋幸, 坂本義光, 小縣昭夫, 中江 大, 樋野興夫, 菅野純: ナノマテリアルの慢性影響研究の重要性, 薬学雑誌, 131, 195-201, 2011

Fujitani T, Ohyama K, Hirose A, Nishimura T, Nakae D, Ogata A: Teratogenicity of multi-wall carbon nanotube (MWCNT) in ICR mice, *J Toxicol Sci*, 37, 81-89, 2012

Yamaguchi A, Fujitani T, Ohyama K, Nakae D, Hirose A, Nishimura T, Ogata A: Effects of sustained stimulation with multi-wall carbon nanotube on immune and inflammatory responses in mice, *J Toxicol Sci*, 37, 177-189, 2012

2. 学会発表

Totsuka Y, Kato T, Ishino K, Masuda S, Nakae D, Tada Y, Oyama K, Ogata A, Kawanishi M, Yagi T, Watanabe M, Wakabayashi K, Nakagama H: Genotoxicity induced by nanomaterials, 41st European Environmental Mutagen Society (EEMS) Annual Conference (スペイン王国 Barcelona 市, 2011年7月)

坂本義光, 小縣昭夫, 前野智和, 西村哲治, 広瀬明彦, 大山謙一, 中江 大: 腹腔内投与によるラット中皮腫の誘発性に対して多層カーボ

ンナノチューブ(MWCNT)の性状が及ぼす影響, 第38回日本トキシコロジー学会学術年会(神奈川県横浜市, 2011年7月)

山口敦美, 藤谷知子, 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鉛法免疫系への影響(II), 第38回日本トキシコロジー学会学術年会(神奈川県横浜市, 2011年7月)

高橋 省, 坂本義光, 大山謙一, 小縣昭夫, 中江 大, 広瀬明彦, 西村哲治: 多層カーボンナノチューブ腹腔投与マウスにおける急性の酸化ストレス, 第38回日本トキシコロジー学会学術年会(神奈川県横浜市, 2011年7月)

山本行男, 大貫 文, 坂本義光, 大山謙一, 中江 大, 小縣昭夫: 多層カーボンナノチューブ投与ラットの血清におけるプロテオーム解析, 第84回日本生化学会大会(京都府京都市, 2011年9月)

Sakamoto Y, Ogata A, Nishimura T, Hirose A, Nakae D: Influence of the product level physico-chemical property on the carcinogenicity of multi-wall carbon nanotube in rats, 第70回日本癌学会学術総会(愛知県名古屋市, 2011年10月)

鈴木俊也, 小杉有希, 富士栄聡子, 保坂三継, 中江 大, 小縣昭夫: 水試料中のカーボンナノチューブの分析法, 第48回全国衛生化学技術協議会総会・研究会(長野県長野市, 2011年11月)

富士栄聡子, 鈴木俊也, 小杉有希, 保坂三継, 小縣昭夫, 中江 大: 水試料中のフラーレンの分析法, 第48回全国衛生化学技術協議会総会・研究会(長野県長野市, 2011年11月)

多田幸恵, 齋藤育江, 矢野範男, 高橋 博, 湯澤勝廣, 安藤 弘, 久保喜一, 長澤明道, 大山謙一, 小縣昭夫, 中江 大: 気管内注入による磁性ナノ粒子マグネタイトの体内動態及び排泄について, 第28回日本毒性病理学会年次学術集会(東京都千代田区, 2012年2月)

坂本義光, 小縣昭夫, 前野智和, 西村哲治, 広瀬明彦, 大山謙一, 中江 大: 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ベルの物理化学的特性が及ぼす影響, 第 28 回日本毒性病理学会年次学術集会 (東京都千代田区, 2012 年 2 月)

H. 知的所有権の取得状況

なし

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表1. 初期及び最終体重と、1・3・7・21・50日の尿量・糞乾燥重量・臓器重量

	投与用量 (mg/kg 体重)	投与後期間 (日)				
		1	3	7	21	50
初期体重 (g)	0 (control)	231.7±5.4 ^a	232.9±7.2	229.5±7.3	232.0±10.3	230.8±5.4
	15	226.2±7.2	219.0±5.9	220.3±12.2	222.2±9.5	232.1±7.3
最終体重 (g)	0	232.6±4.9	236.8±9.2	239.7±9.3	266.0±16.1	297.1±5.9
	15	216.1±7.7*	214.5±9.9*	221.8±6.7	244.4±5.8	302.9±15.8
尿量 (mL) ^a	0	10.3±1.5	12.0±2.1	8.8±0.7	9.5±2.3	8.5±1.0
	15	8.3±0.7	8.9±0.7	7.6±0.4	9.5±0.7	8.6±2.3
糞乾燥重量 (g) ^b	0	3.4±0.3	3.4±0.1	3.4±0.3	3.2±0.6	2.8±0.7
	15	2.4±0.4*	2.7±1.0	3.2±0.5	3.7±1.9	3.5±0.7
臓器絶対重量 (mg)						
肝	0	8239.8±265.0	9135.2±192.5	8639.7±436.8	8627.3±1619.3	9751.9±502.0
	15	6787.6±28.0*	8382.0±1007.8	7937.1±681.8	7646.8±1083.2	9719.4±443.3
腎	0	1591.7±28.7	1656.6±65.4	1673.5±86.9	1774.7±116.8	1973.2±225.3
	15	1552.6±51.8	1454.4±54.2*	1574.1±58.2	1629.1±51.7	1915.3±16.3
肺	0	827.4±27.6	784.6±11.8	817.4±53.0	873.3±42.6	840.9±34.5
	15	945.1±33.9*	968.4±42.0*	1033.5±38.8*	898.1±44.1	934.9±24.8*
脳	0	1926.3±10.8	1894.3±15.7	1894.3±15.7	1948.4±51.0	1967.0±23.1
	15	1899.5±15.9	1866.2±26.3	1866.2±26.3	1916.3±22.9	1977.5±11.5

^a24時間尿量, ^b24時間乾燥糞量

^a数値は平均値±標準偏差 (n=3).

*対照群との比較で有意差あり (*P<0.05, t検定)

表2. 1・3・7・21・50日の血液・尿・糞・臓器中の鉄濃度

	投与用量 (mg/kg 体重)	投与後期間 (日)				
		1	3	7	21	50
血液	0 (対照群)	0.189±0.065 ^a	0.348±0.066	0.222±0.028	0.124±0.019	0.140±0.012
	15	0.188±0.075	0.468±0.108	0.261±0.070	0.150±0.030	0.196±0.108
尿	0	0.272±0.281	0.193±0.049	0.273±0.039	0.440±0.089	0.535±0.087
	15	0.154±0.105	0.169±0.066	0.226±0.070	0.396±0.089	0.587±0.026
糞	0	140.7±5.933	158.4±9.708	160.7±11.49	209.2±45.45	222.1±2.697
	15	148.4±2.906	170.0±28.48	175.7±16.75	213.4±20.64	233.7±10.63
肝	0	4.059±1.400	2.823±0.184	2.534±0.488	2.598±0.929	2.951±0.622
	15	4.905±0.996	3.876±0.748	2.783±0.878	1.804±0.631	3.440±0.517
腎	0	3.831±0.162	3.427±0.050	3.322±0.581	3.575±2.132	7.164±1.911
	15	4.022±1.008	4.111±0.930	3.615±0.277	3.364±0.489	7.551±0.957
肺	0	13.25±1.506	11.27±1.305	7.909±1.592	5.069±3.906	9.699±1.305
	15	1564.2±79.01*	956.6±136.4*	723.4±150.5*	453.9±78.69*	461.1±43.23*
脳	0	2.159±2.005	2.309±0.297	1.813±0.313	3.315±0.437	1.974±0.653
	15	2.590±0.479	2.416±0.735	1.613±0.355	2.963±1.350	3.736±0.612*

^a 数値は平均値±標準偏差 (n=3), 血液及び尿 (µg/mL), 糞 (µg/g 乾燥重量), 臓器 (µg/g 湿重量)

*対照群との比較で有意差あり (*P<0.05, t検定)

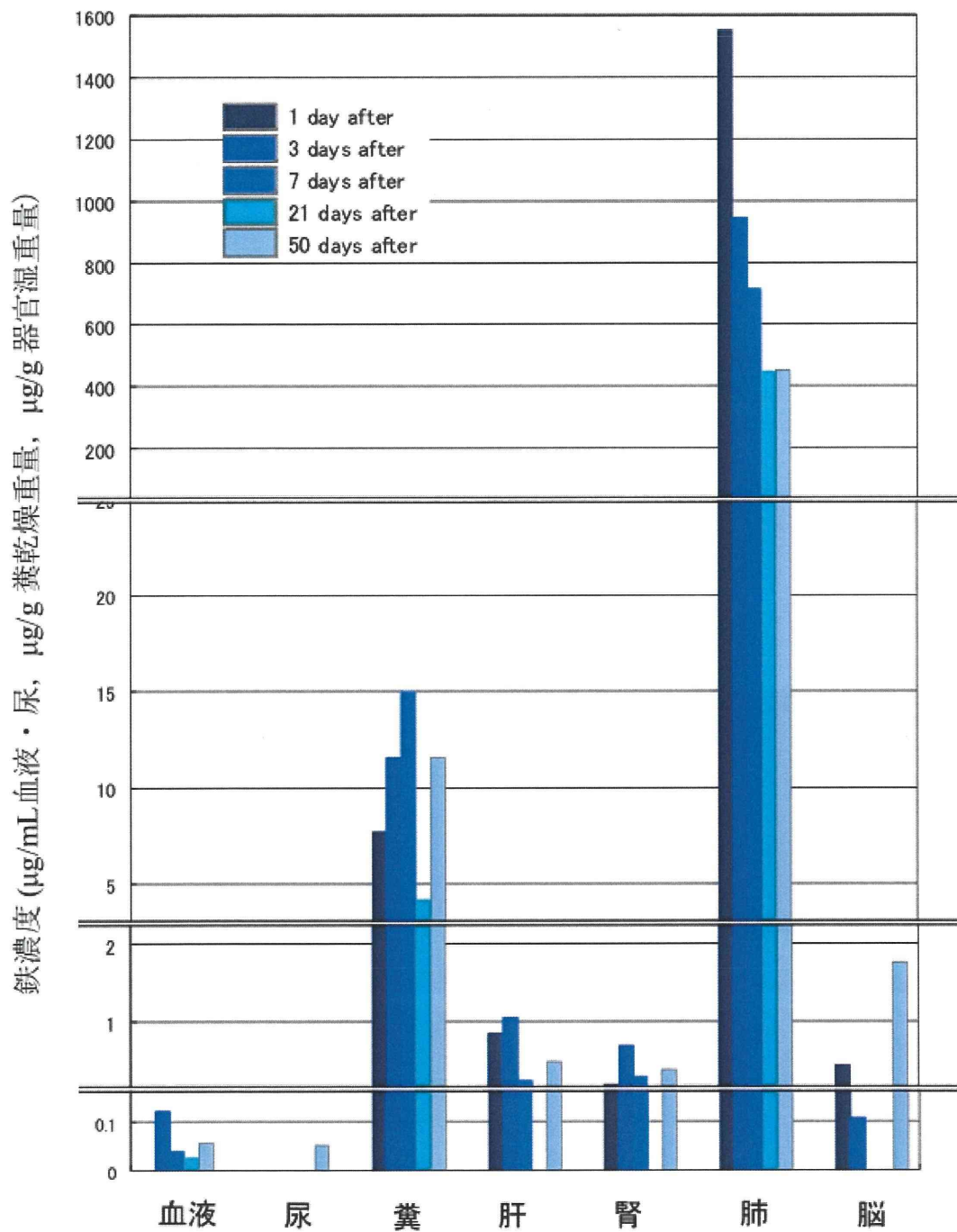


図1. 1・3・7・21・50日の血液・尿・糞・臓器中の鉄濃度
(投与群平均値から対照群平均値を差し引いた値を表示)

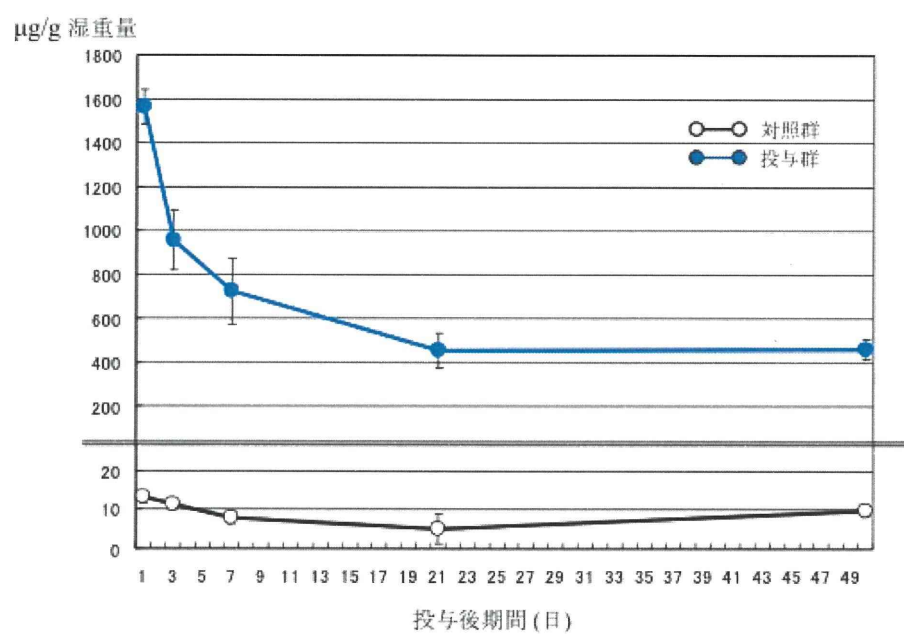


図2. 1・3・7・21・50日の肺の鉄濃度

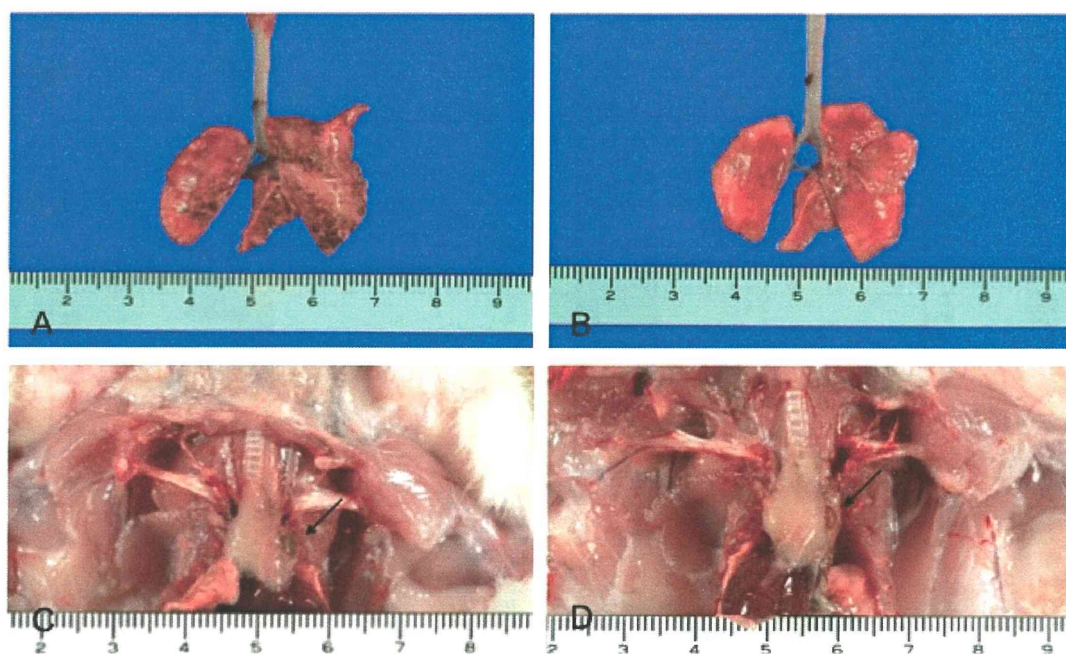


図3. マグネタイトを15.0 mg/kg体重で気管内スプレー投与後、7日 (A, C) 及び50日 (B, D) の肉眼像、肺 (A, B)、胸腺リンパ節 (C, D; 矢印)。

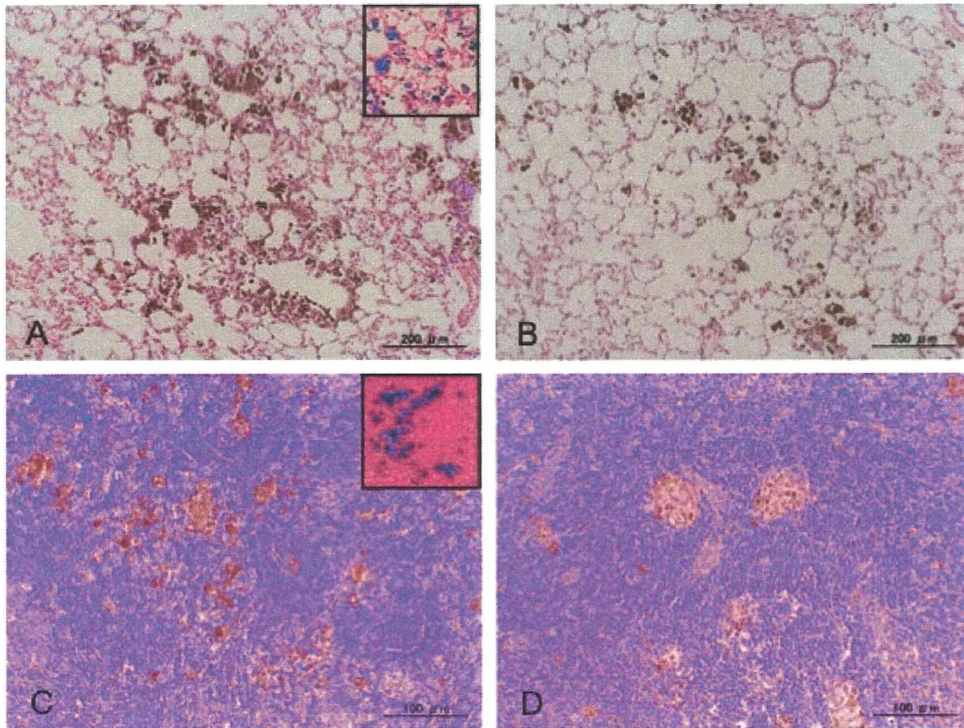


図4. 投与群の7日 (A, C) 及び50日 (B, D) の組織像；肺 (A, B) , 胸腺リンパ節 (C, D) (ヘマトキシリン・エオジン染色；枠内, ベルリンブルー染色) .

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究年度終了報告書

遺伝毒性低減化に目指したナノマテリアルの修飾に関する研究

研究分担者 渡邊 昌俊 横浜国立大学 工学研究院 教授

細胞株を利用した *in vitro* 系での各種ナノ粒子の細胞毒性および遺伝毒性を解析する事によりその機構の解明を目指してきた。同一粒子であっても、細胞株により細胞毒性および遺伝毒性の程度は異なり、それはナノ粒子の種類と細胞種による活性酸素種(ROS)産生、代謝・修復機構の差異によるものと推測された。本研究では、今後の実験に備えて、上記結果について、再評価及び表面修飾ナノ粒子を利用して細胞毒性および遺伝毒性について解析を行った。使用したナノ粒子は Fe_3O_4 ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$) およびカルボキシル基で修飾した $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ を用いて、*in vitro* 系で曝露実験を行った。実験内容は、8-OHdG 生成の測定、細胞生存率、活性酸素種(ROS)の測定、細胞周期および apoptosis の解析である。遺伝毒性の指標として 8-OHdG の測定を行い、表面修飾の無い $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ の曝露濃度依存的に 8-OHdG 生成の増加および細胞腫により異なる事を認めた。さらに表面修飾の無い $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ は濃度依存的に ROS 産生の増加、細胞生存率の低下、apoptosis の誘導が認められた。しかし、細胞の種類によりその程度は変化する、すなわち細胞特異性があると考えられる。その細胞の抗酸化能、修復能が重要な因子と考えられる。一方、カルボキシル基で修飾した $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ の曝露による細胞生存率については、表面修飾の無い $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ ほどの低下は認められなかった。今後さらにその機構を含めて解析を行う予定である。

A. 研究目的

本研究分担者は、細胞株を利用した *in vitro* 系での各種ナノ粒子の細胞毒性、遺伝毒性の解析、およびジェネティクスおよびエピジェネティクスな変化を解析する事によりその機構の解明を目指してきた。同一粒子であっても、細胞株により細胞毒性および遺伝毒性の程度は異なり、それはナノ粒子の種類と細胞種の ROS 産生、代謝・修復機構の差異によるものと推測された。本研究では、今後の実験に備えて、上記結果について、再評価及び分担研究使命“遺伝毒性低減化に目指したナノマテリアルの修飾に関する研究”に基づく修飾ナノマテリ

アルを利用して細胞毒性および遺伝毒性について解析を行った。

B. 研究方法

1) 使用細胞株と細胞培養

本実験ではアンドロゲン非依存性前立腺癌細胞株 DU145、PC-3、アンドロゲン依存性前立腺癌細胞株 LNCaP の細胞株、ヒト肺癌細胞株 A549 を使用した。いずれも ATCC (American Type Culture Collection) より入手した。DU145、PC-3、LNCaP は RPMI 1640 培養液(10 %FBS、1 % penicillin & streptomycin 含有)、A549 は F-12 Nutrient Mixture 培養液(10 %FBS、

1% penicillin & streptomycin 含有)を用いて 37 °C、CO₂濃度 5%加湿インキュベーターで培養した。

2) 使用磁性体ナノ粒子(Fe₃O₄NPs)

磁性体ナノ粒子の一次粒径は約 10 nm であり主成分は Fe₃O₄(マグネタイト)で構成されている。Fe₃O₄ は空気中の酸素によって酸化され粒子表面は γ-Fe₂O₃ へ成分に変化があるがどちらの場合も磁性を示す酸化物である。

磁性体ナノ粒子(Fe₃O₄ NPs)は戸田工業株式会社より購入し、1 μg/ml、10 μg/ml、100 μg/ml で培養液に調整して、超音波破砕機(Ultrasonic homogenizer VP-050、TAITEC社)にて、分散処理を行い、Fe₃O₄ NPs の凝集を取り除き使用した。細胞への Fe₃O₄ NPs 曝露前には、培養液中における Fe₃O₄ NPs の大きさ、粒径の分布を濃厚系粒径アナライザー(Fiber-Optics Particle Analyzer FPAR-1000、大塚電子)にて測定を行った。

3) 8-OH-dG の定量化

各細胞株を control(0 μg/ml)、1 μg/ml、10 μg/ml、100 μg/ml の各濃度で 72 時間磁性体 Fe₃O₄ NPs を曝露した後に細胞を回収した。回収した細胞から DNA Extraction WB Kit (Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Japan)を用いて細胞中 DNA の核分画を採取した。その後、抽出した液体は nuclease P1 処理、alkaline phosphatase 処理を行い、Ultrafree-probind filter でろ過し、そのろ液を、UV、ECD を備えつけた HPLC カラム(32 °C)に注ぎ込んだ。移動相は、8%メタノール 10 mM リン酸緩衝液を用いた。この解析は、産業医科大学 葛西宏教授および河井一明准教授の協力のもとに行われた。

4) Cell viability の測定

生細胞の細胞数の変化を測定するために本実験においては ALAMER BLUE (Alamar Bioscience, Sacramento, California, USA)を

用いた。ALAMER BLUE は酸化還元型の色素で、細胞の代謝活性に対応して、色調の変化を示すことから、動物細胞のほか、バクテリアなどの増殖及び生死の判別に利用されている。ALAMER BLUE が生存細胞のミトコンドリア電子伝達系において還元され、ホルマザンへ変化すると水溶液の呈色も変化するため、特定波長光(570nm と 600nm)の吸収が変化する。生存細胞数にほぼ比例して、ホルマザン形成が増加し比色法によって生細胞数を相対的に測定する。各細胞は 100 mm ディッシュであらかじめ培養した後、細胞密度が 1.0×10^4 cells/well となるように 24 well プレートに播種した。Fe₃O₄ NPs 曝露後に、培養液を取り除き、PBS を用いて細胞上に付着した Fe₃O₄ NPs をウォッシュアウトする。そして、培養液で 10 倍希釈した ALAMER BLUE 溶液を 500 μl/well ずつ添加した。37 °C、5%CO₂ 加湿インキュベーター内で 3 時間培養後、細胞内や細胞に付着した Fe₃O₄ NPs の影響を考慮し、ALAMER BLUE 溶液の上澄みを 450 μl/well ずつ別の 24 well plate に移し替えた。その後、分光光度計(Viento XS、DS Pharma Biomedical Co., Ltd)により 570 nm と 600 nm の波長を測定し、生存率を求めた。抗酸化剤を用いた時の細胞の生存率を測定する場合は、Fe₃O₄ NPs を曝露する 3 時間前に 10mM の抗酸化剤の N-acetylcysteine (NAC)を添加した。

5) 活性酸素種(Reactive Oxygen Species: ROS) の測定

5- (and 6) -chloromethyl-2' , 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate、acetyl ester CM-H₂DCFDA (invitrogen 社)は、生細胞の細胞質で酸化されるまでは、細胞透過性の非蛍光物質で、生細胞に入ると二酢酸基が細胞内エステラーゼによって切断される。ROS が存在すると、還元された色素が酸化され、色素が蛍光を発する。励起光