

図4 RAW264 との共培養による A549 の DNA 損傷性

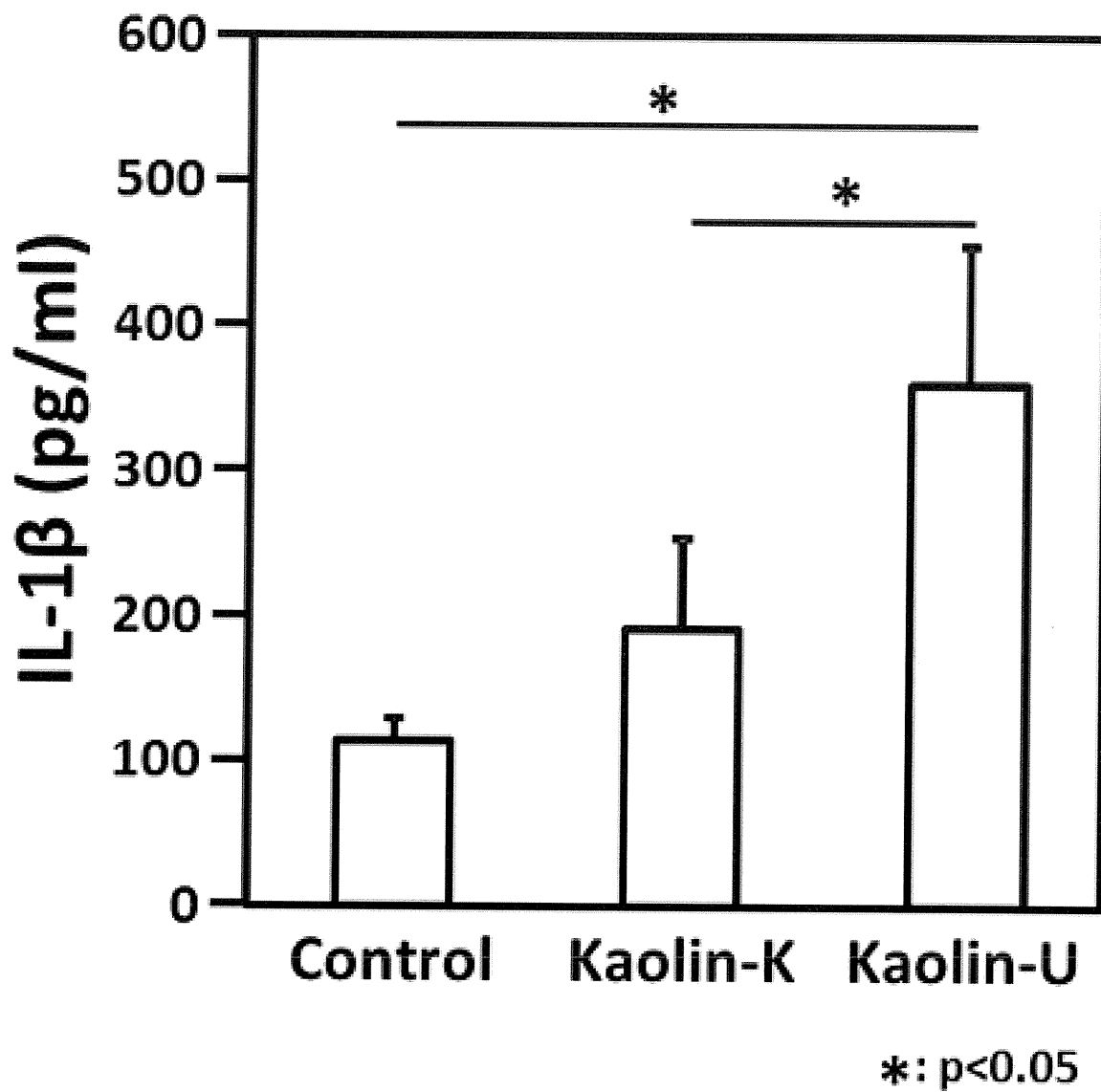


図5 カオリンの曝露により RAW264 培養上清中に分泌される炎症性サイトカイン (IL-1 β) 量

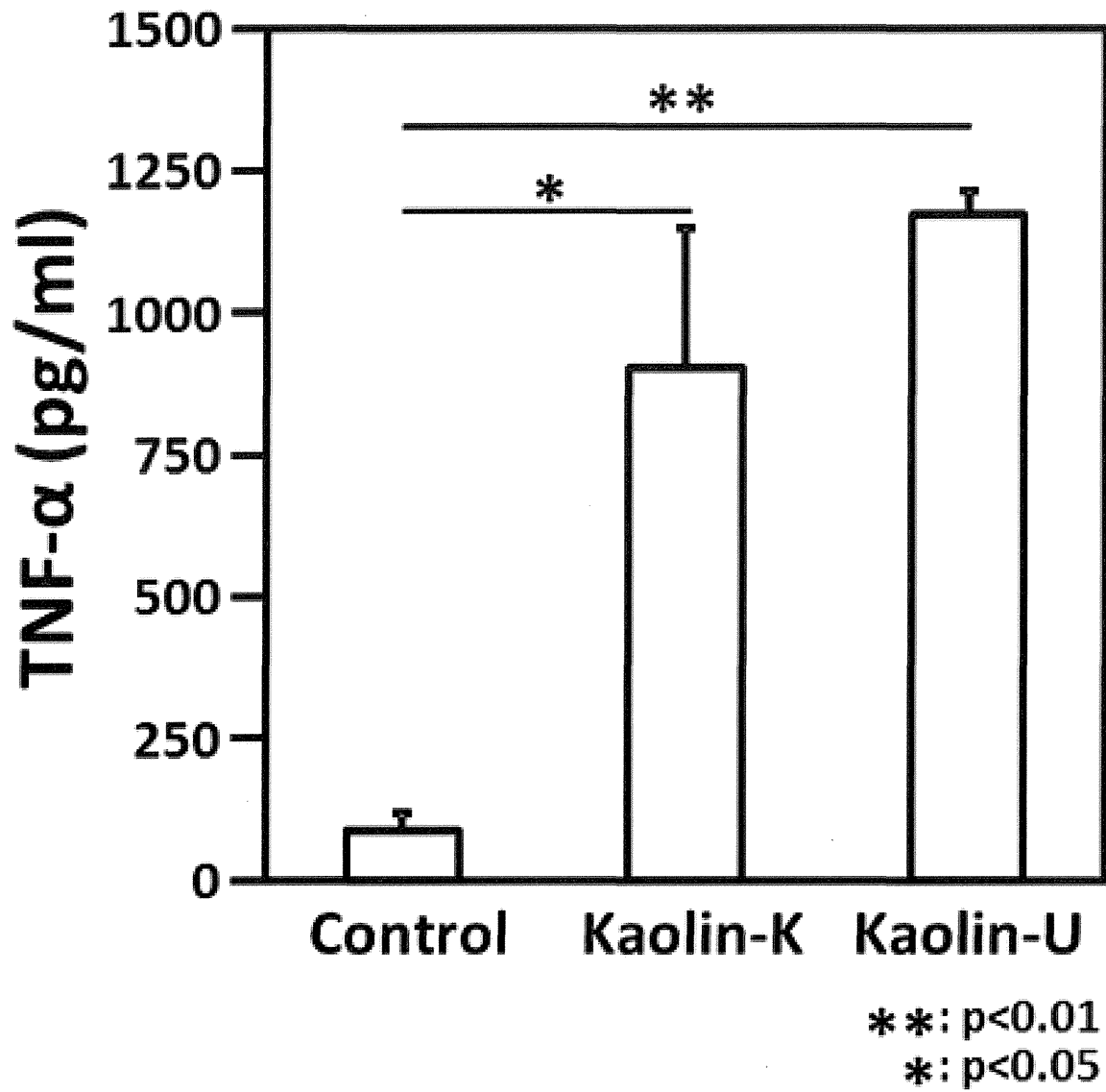


図6 カオリンの曝露により RAW264 培養上清中に分泌される炎症性サイトカイン (TNF- α) 量

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	薬事環境科学部	部長
研究協力者	多田 幸恵	東京都健康安全研究センター	薬事環境化学部	
		生体影響研究科	主任研究員	
研究協力者	猪又 明子	東京都健康安全研究センター	薬事環境科学部	
		生体影響研究科	科長	
研究協力者	小縣 昭夫	東京都健康安全研究センター	薬事環境科学部	参事研究員

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、また、体内動態及び排泄についての評価を行い、その中で肺に対する発がん性を有することが懸念された。本年度は、マグネタイトの肺発がんイニシエータ活性の有無と背景機構を明らかにする目的で、ラット2段階肺発がんモデルを用いた検索を行った。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）・5 mg/kg 体重（投与群）の用量でスプレー投与器により週1回計4回気管内投与した後、 γ -オリザノール（1%混餌）あるいはグリセロール（8%混水）による32週間の肺発がんプロモーション処置を施し、肺における腫瘍性病変の発生を病理組織学的に検索した。その結果、マグネタイト投与群ラットの肺においては、マグネタイトを貪食した肺胞マクロファージの肺胞腔への浸潤・炎症細胞浸潤・II型肺胞上皮の腫大などを認めたが、肺の増殖性病変の発生を認めなかった。 γ -オリザノールあるいはグリセロールは、これらの変化に対して顕著な影響を与えなかった。以上の結果より、マグネタイトは、明らかな肺発がんイニシエータ活性を有しないものと示唆された。

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（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、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。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や抗がん剤のキャリアーとしての利用が検討されており、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。

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、また、体内動態及び排泄について性の評価を行ってきた。ラットを用いた気管内反復投与によるマグネタイトの慢性毒性試験においては、肺で、慢性炎症と共に肺胞上皮の過形成性変化を観察し、肺に対する発がん性を有する可能性が指摘された。マグネタイトは、*in vitro*試験で遺伝毒性を有する可能性が報告¹⁾されていることから、その発がん性について評価することが喫緊の課題である。

以上の状況に鑑み、本年度の研究は、マグネタイトの肺発がんイニシエータ活性の有無と背景機構を明らかにする目的で、ラット2段階肺発がんモデルを用いた検索を行った。

B. 試験方法

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、当センター薬事環境科学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）より購入した磁性ナノ粒子マグネタイトスラリー（マグネタイト超微粒子分散液）（BMS-10, Lot. 111117, pH 10.5, 一次粒子径 5-15 nm, 比表面積 119 m²/g）を用いた。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を高圧滅菌済超純水（Milli Q 水, 18.2 MΩ）で必要濃度に希釈後、0.2 M HCl（滅菌済 Milli Q 水にて調製）にて pH 7.4-7.5（ラットの組織液 pH⁹⁾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。

ラットに対する肺発がんプロモーション処置は、 γ -オリザノール混餌投与あるいはグリセロール混水投与により行った。 γ -オリザノール添加飼料は、CE-2（粉末基礎飼料、日本クレア株式会社、東京）に γ -オリザノール（生化学用）（Lot. CDJ4639, LAP0500, LAF2910；和光純薬工業株式会社、東京）を 1%の濃度で添加してペレットとした後、変質を避けるため低温（70℃）乾燥させたものとして、日本クレアに試験期間中 2 回に分けて製造させた。グリセロール添加水は、細菌ろ過器を経由させた水道水にグリセロール（特級）（Lot. LAJ6260；和光純薬）を 8%の濃度で添加して作成した。

2. 動物及び飼育条件

動物は、雄の F344/DuCr1Cr1j 系ラット SPF 動物 120 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、試験開始日の体重を基に、体重別層化無作為抽出法により 6 群に分けた。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、飼料と飲料水を自由に摂

取させ、バリアシステム内の飼育室にて、室温 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ・湿度 $55 \pm 10\%$ ・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. 動物試験方法

動物試験方法の概略は、図 1 に示した。6 群に分けた動物の 3 群には Milli Q 水を (I・III・V 群)，残り 3 群に Milli Q 水に懸濁させたマグネタイトを 5 mg/kg 体重の用量で (II・IV・VI 群)，いずれも 1 mL/kg 体重の容量で週 1 回計 4 回にわたり、スプレー投与器 (IA-1B、Penn-Century, Inc., USA) を用いて気管内投与した。気管内投与法は、気道の毒性評価のための暴露技術としての気道内投与²⁾を参照した。最終投与の 1 週間後から、I・II 群には CE-2 と細菌ろ過器を経由した水道水を、III・IV 群には 1% γ -オリザノール添加飼料と水道水を、V・VI 群には CE-2 と 8%グリセロール水を、それぞれ 32 週間自由に摂取させた後、ラットをイソフルラン麻酔下で屠殺剖検し、病理学的に検索した。

4. 統計学的解析

体重・摂餌量・摂水量・器官重量の統計学的解析に当たっては、各群の分散を Bartlett の方法で検定し、等分散の場合に一元配置の分散分析により、不等分散の場合に Kruskal-Wallis の方法により、それぞれ検定を行った。群間に有意差が認められた場合の多重比較は、Dunnett の方法で有意差検定を行った。病理組織学的検索結果については、Fisher の直接確立検定を行った³⁾。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

試験期間中の体重の推移は対照群 (I 群) と比較して全群で有意な差がなく (図 2)，いずれの群の一般症状においても異常な所見は観察されなかった。摂餌量は対照群 (I 群) と比較して γ -グリセロール投与群 (V・VI 群) で有意に減少し、摂水量は γ -グリセロール投与群 (V・VI 群) で有意に増加した (図 2)。しかし、I 群対 II 群、III 群対 IV 群、V 群対 VI 群での比較では、マグネタイト投与による摂餌量及び摂水量の有意な変化を認めなかった。

病理学的検索において、臓器重量では、対照群 (I 群) と比較して、マグネタイト投与群 (II・IV・VI 群) の肺重量が増加した (表 1)。解剖時の肉眼観察では、マグネタイト投与群 (II・IV・VI 群) の肺に、軽度な腫大と、暗褐色を呈するマグネタイトの広汎な沈着を認めた (図 3)。病理組織学的観察では、マグネタイト投与群 (II・IV・VI 群) において、マグネタイトを貪食した肺胞マクロファージの肺胞腔への浸潤・炎症性細胞浸潤・II 型肺胞上皮の腫大などを認めた (図 4)。 γ -オリザノールあるいはグリセロールは、これらの変化に対して顕著な影響を与えなかった (表 2)。また、本試験においては、いずれの群においても肺胞上皮及び細気管支上皮の過形成性変化を認めなかった。

肺以外の組織については、マグネタイト投与群 (II・IV・VI 群) のリンパ節において、HE 染色で黄褐色、鉄染色 (ベルリン青染色) で青色を呈する顆粒を貪食したマクロファージの浸潤が認められ、特に胸腺リンパ節において顕著であった。同様の顆粒を貪食したマクロファージの浸潤は、対照群 (I)・ γ -オリザノール単独投与群 (III)・グリセロール単独投与群 (V) ラットの胸腺リンパ節においても認められた。したがって、マグネタイト投与群 (II・IV・VI 群) の胸腺リンパ節で見られた顆粒は、マグネ

タイトばかりでなくヘモジデリンも混在するものと考えられた。肝臓においては胆管増生の発生頻度がグリセロール投与群（V・VI群）で有意に低く、腎臓においてはエオジン好性の円柱を含有する尿細管拡張の発生頻度がグリセロール投与群（V・VI群）で有意に高かった。心臓・脳など呼吸器系以外の器官における自然発生病変の発生頻度に関しては、マグネタイト・ γ -オリザノール・グリセロールのいずれもなんらの影響も与えなかった。

D. 考察

マグネタイトの発がん性に関しては、Slesinski らが、雌雄の Wistar Han ラットに写真トナー（45-50%のマグネタイトを含有）を1日5時間週5日間で13週間あるいは104週間吸入させた結果、肺の腫瘍発生が増加しなかったと報告している⁴⁾。また、Steinhoff らは、8週齢のSDラットにマグネタイト（平均粒径0.5 μ m）を10-40 mg/kg 体重の用量で2週間毎に約2年間投与し（総投与量1530 mg/kg 体重）、2年6ヵ月齢で病理検索した結果、マグネタイトに発がん性が認められなかったと報告している⁵⁾。しかしながら、Pott らは、11週齢のWistar ラットにマグネタイトを15 mg/ラットの用量で1週間毎に15回投与し（総投与量225 mg/ラット）、2年6ヵ月齢で検索した結果、69%のラットに肺の腫瘍が認められたと報告した⁶⁾。したがって、マグネタイトの吸入あるいは気管内投与による発がん性については、未だ相反する報告が共存している状況であり、その有無を明確に判定できないと言わざるを得ない。一方、Könczöl らは、ヒト肺胞上皮由来のA549細胞を用いたコメットアッセイ及び小核試験において、試験した全てのフラクション（0.2-10 μ m, 2-3 μ m, 0.5-1.0 μ m, 20-60 nm）が陽性を示したことから、マグネタイトが遺伝毒性を持つと報告している¹⁾。

本年度の研究結果はマグネタイトが、明らか

な肺発がんイニシエータ活性を有しないことを示唆しているが、そのプロモータ活性の有無については未だ明らかでない。したがって、マグネタイトの発がん性に関しては、さらなる検索が必要である。

E. 結論

本年度は、マグネタイトの肺発がんイニシエータ活性の有無と背景機構を明らかにする目的で、ラット2段階肺発がんモデルを用いた検索を行った。その結果、マグネタイトは、明らかな肺発がんイニシエータ活性を有しないものと示唆された。

F. 文献

- 1) Könczöl M, Ebeling S, Goldenberg E et al.: Cytotoxicity and genotoxicity of size-fractionated iron oxide (magnetite) in A549 human lung epithelial cells: role of ROS, JNK, and NF- κ B, *Chemical Research in Toxicology*, 24, 1460-1475 (2000)
- 2) Driscoll KE, Costa DL, Hatch G, Henderson R, Oberdorster G, Salem H, Schlesinger RB: Intratracheal instillation as an exposure technique for the evaluation of respiratory tract toxicity: uses and limitations, *Toxicological Sciences*, 55, 24-35 (2000)
- 3) Gad SC, Weil CS: Statistics for toxicologist. In: Hayes AW (Ed), *Principles and methods of toxicology*, 3rd edition, Raven Press, New York, pp. 221-274 (1994)
- 4) Slesinski RS, Turnbull D: Chronic inhalation exposure of rats for up to 104 weeks to a non-carbon-based magnetite photocopying toner, *International Journal Toxicology*, 27, 427-39 (2008)

- 5) Steinhoff D, Mohr U, Hahnemann S: Carcinogenesis studies with iron oxides, *Experimental Pathology*, 43, 189-194 (1991)
- 6) Pott F, Ziem U, Reiffer FJ, Huth F, Ernst H, Mohr U: Carcinogenicity studies on fibres, metal compounds, and some other dusts in rats, *Experimental Pathology*, 32, 129-152 (1987)

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Xu J, Futakuchi M, Shimizu H, Alexander DB, Yanagihara K, Fukamachi K, Suzui M, Kanno J, Hirose A, Ogata A, Sakamoto Y, Nakae D, Omori T, Tsuda H: Multi-walled carbon nanotubes translocate into the pleural cavity and induce visceral mesothelial proliferation in rats, *Cancer Science* 103, 2045-2050 (2012)
- 2) Tada Y, Yano N, Takahashi H, Yuzawa K, Ando H, Kubo Y, Nagasawa A, Ogata A, Nakae D: Acute phase pulmonary responses to the single intratracheal spray instillation of magnetite (Fe_3O_4) nanoparticles in Fischer 344 rats, *Journal of Toxicologic Pathology* 25, 233-239 (2012)

2. 学会発表

- 1) 坂本義光, 小縣昭夫, 前野智和, 西村哲治, 広瀬明彦, 小杉有希, 鈴木俊也, 中江 大: ラットによる 5 種の多層カーボンナノチューブの腹腔内中皮腫発生に関する検討, 第 39 回日本毒性学会学術年会 (仙台, 2012.7).
- 2) 藤谷知子, 大山謙一, 広瀬明彦, 西村哲治,

中江 大, 小縣昭夫: マウスにおける多層カーボンナノチューブの催奇形性について, 第 39 回日本毒性学会学術年会 (仙台, 2012.7).

- 3) 坂本義光, 小縣昭夫, 西村哲治, 広瀬明彦, 中江 大: 5 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 71 回日本癌学会学術総会 (札幌, 2012.9).
- 4) 中江 大, 坂本義光, 藤谷知子, 多田幸恵, 齋藤育江, 保坂三継, 猪又明子, 小縣昭夫: ナノマテリアルの発がん性, 日本環境変異原学会第 41 回大会 (静岡, 2012.11).
- 5) 坂本義光, 小縣昭夫, 西村哲治, 広瀬明彦, 猪又明子, 中江 大: ラットにおける多層カーボンナノチューブによる中皮腫誘発性に繊維長が及ぼす影響, 第 29 回日本毒性病理学会 (つくば, 2013.1).
- 6) 多田幸恵, 矢野範男, 高橋 博, 湯澤勝廣, 安藤 弘, 久保喜一, 長澤明道, 猪又明子, 小縣昭夫, 中江 大: γ -オリザノール/グリセロール併用投与が磁性ナノ粒子マグネタイト気管内スプレー投与によるラット肺病変に及ぼす影響, 第 29 回日本毒性病理学会 (つくば, 2013.1).

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

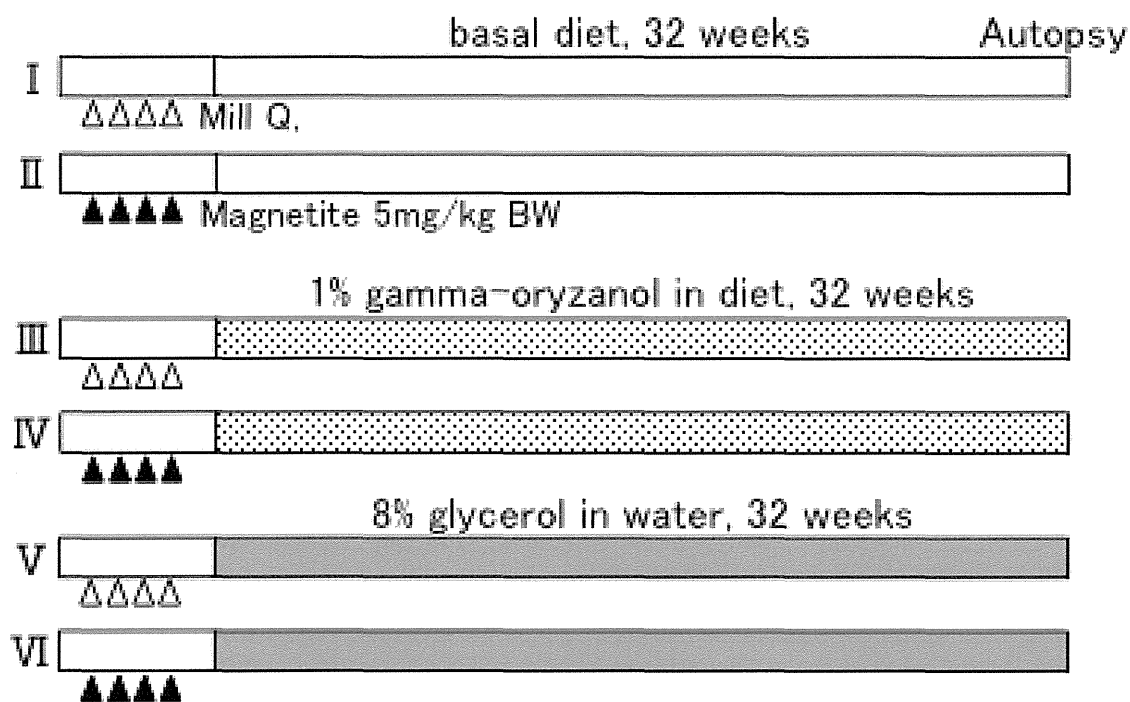


図1. 実験デザイン.

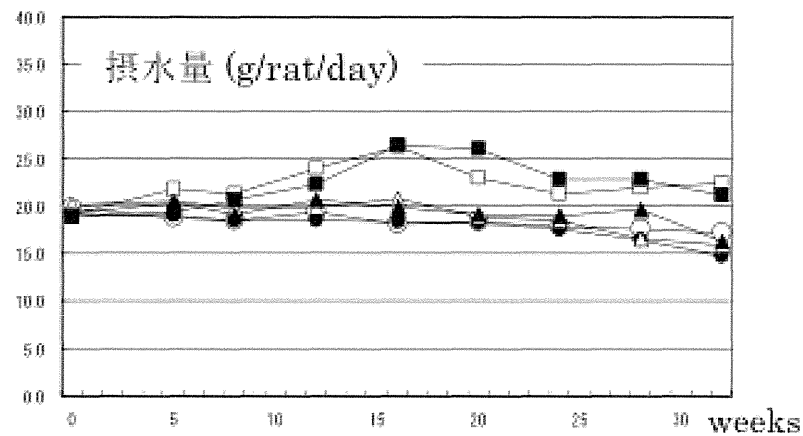
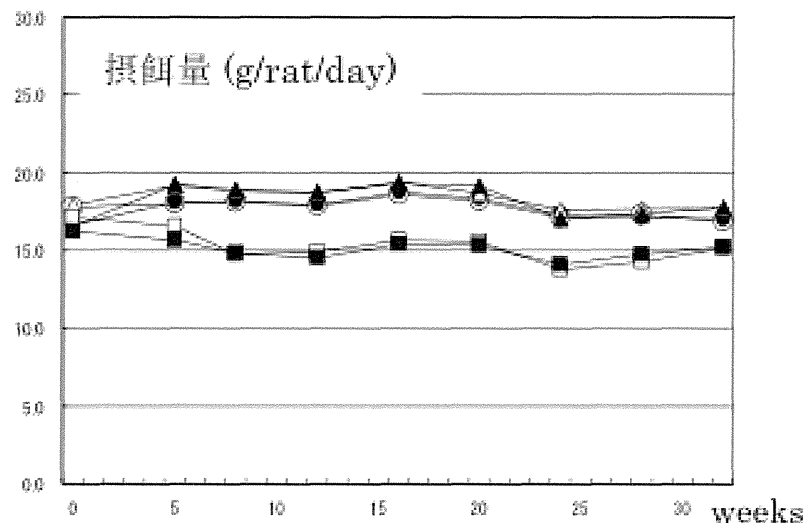
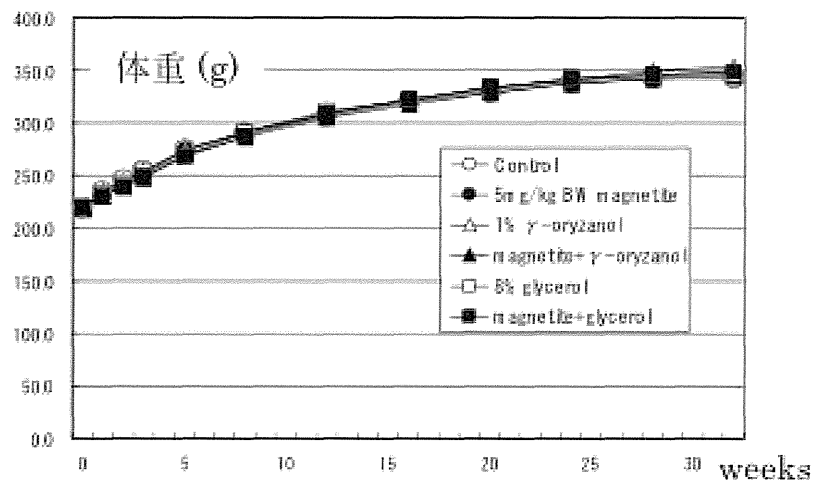


図2. 平均体重・摂餌量・摂水量の推移

表1. 体重及び器官重量

群	I	II	III	VI	V	VI
マグネタイト用量 (mg/kg 体重)	0	5.0	0	5.0	0	5.0
γ-オリザノール(%)	0	0	1.0	1.0	0	0
グリセロール (%)	0	0	0	0	8.0	8.0
実験開始時動物数	20	20	20	20	20	20
初期体重 (g)	218.8±9.5 ^a	219.4±10.3	218.7±9.1	219.4±8.9	218.6±8.8	219.4±9.2
試験匹数	20	20	20	20	20	20
最終体重 (g)	342.9±35.3	349.3±23.8	354.0±28.0	347.4±22.7	342.5±37.4	350.6±25.2
絶対重量 (mg)						
脳	2062.7±38.7	2054.1±67.2	2057.2±52.3	2053.3±39.2	2064.6±59.0	2071.7±40.4
副腎	41.9±4.1	41.1±2.5	41.7±3.8	41.8±4.1	44.8±5.5	41.9±4.4
心臓	932.1±75.1	938.4±55.3	958.9±66.9	922.3±59.3	920.7±58.7	927.2±48.7
肺	968.1±56.5	1087.3±85.9 *†	912.0±79.4	1039.2±62.0 *†	944.3±45.4	1029.5±88.9 †
脾臓	598.1±60.9	616.9±35.8	653.7±92.2	604.7±37.6 †	621.1±62.1	629.8±39.4
肝臓 (g)	10.569±1.387	10.710±1.027	10.792±1.191	10.578±0.787	11.781±1.478 *	12.194±1.170 *
腎臓	2382.4±220.8	2357.8±154.1	2364.4±157.5	2271.0±131.4	2457.2±187.3	2464.6±127.1
精巣	3065.4±178.2	3167.1±113.0	3106.9±395.2	3188.3±123.5	3087.7±360.9	3103.6±490.7 *
相対重量 (mg/100g 体重)						
脳	607.7±64.1	590.3±40.8	584.3±44.6	593.0±32.1	609.6±67.5	593.6±41.8
副腎	12.3±1.7	11.8±1.0	11.8±0.9	12.1±1.2	13.3±3.0	12.0±1.5
心臓	272.7±12.8	269.1±13.3	271.7±19.0	265.6±8.1	270.6±19.1	265.3±18.3
肺	283.3±23.4	311.8±22.5 *†	258.5±24.3 *	299.7±16.5 †	278.9±32.6	294.1±23.1
脾臓	174.6±6.9	177.0±9.4	184.9±23.7	174.2±6.6	181.8±8.9 *	179.9±8.5
肝臓 (g)	3.076±0.146	3.063±0.163	3.047±0.223	3.045±0.127	3.435±0.137 *	3.479±0.232 *
腎臓	696.0±25.5	675.8±32.5 †	669.9±44.3 *	654.2±19.2 *	721.8±51.1	705.0±44.2
精巣	903.1±104.6	910.1±61.0	880.9±122.1	920.0±46.2	913.5±151.8	888.8±153.2

*数値は平均値±標準偏差

* I群との比較で有意差あり (P<0.05, Dunnet's test)

†各群間の比較で有意差あり (I vs II, III vs IV, V vs VI; P<0.05, Aspin-Welch t test)

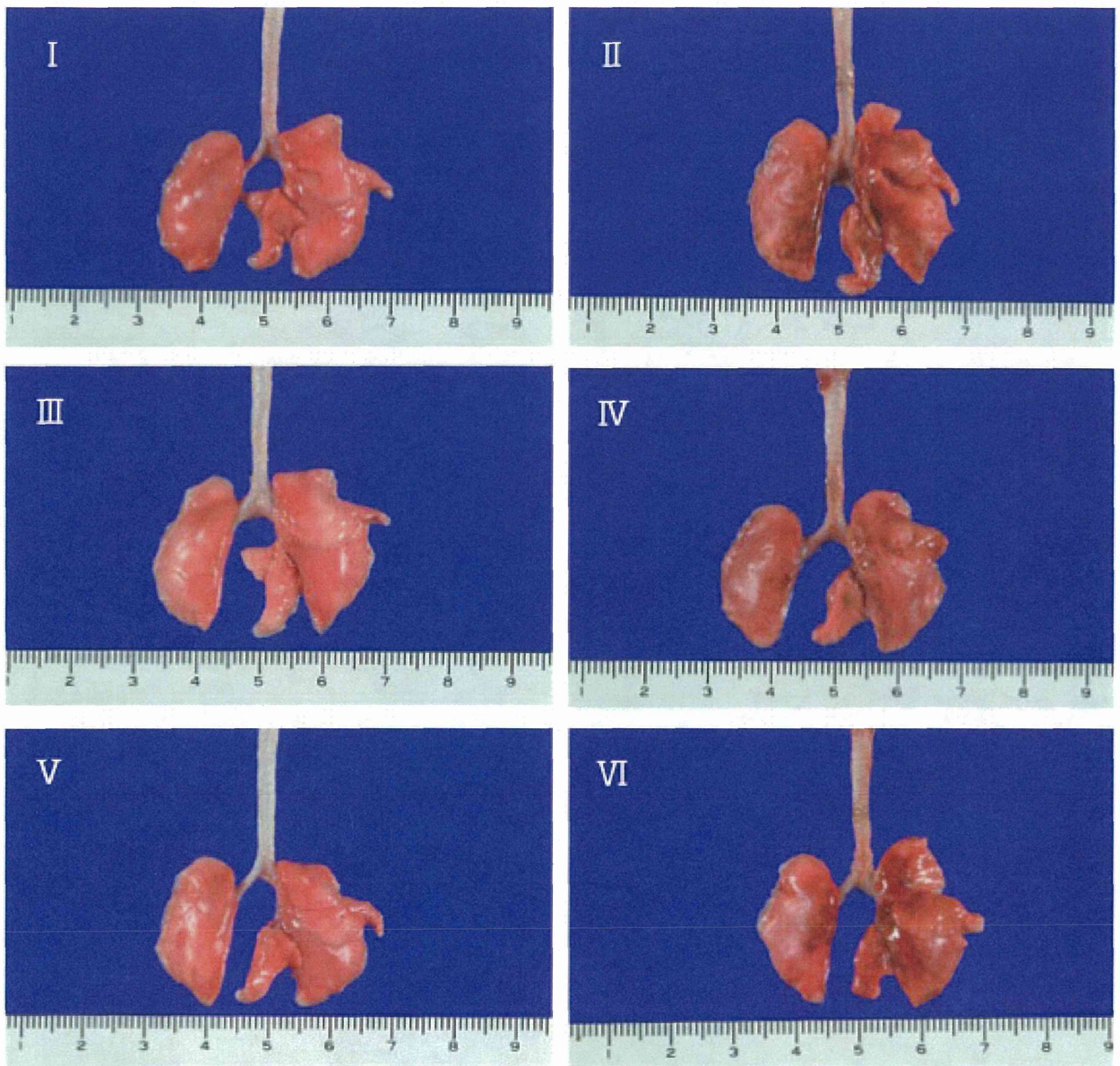


図3. 肺の肉眼像.

I, 対照群; II, マグネタイト5 mg/kg体重投与群;
 III, γ -オリザノール投与群; IV, マグネタイト+ γ -オリザノール投与群;
 V, グリセロール投与群; VI, マグネタイト+グリセロール投与群.

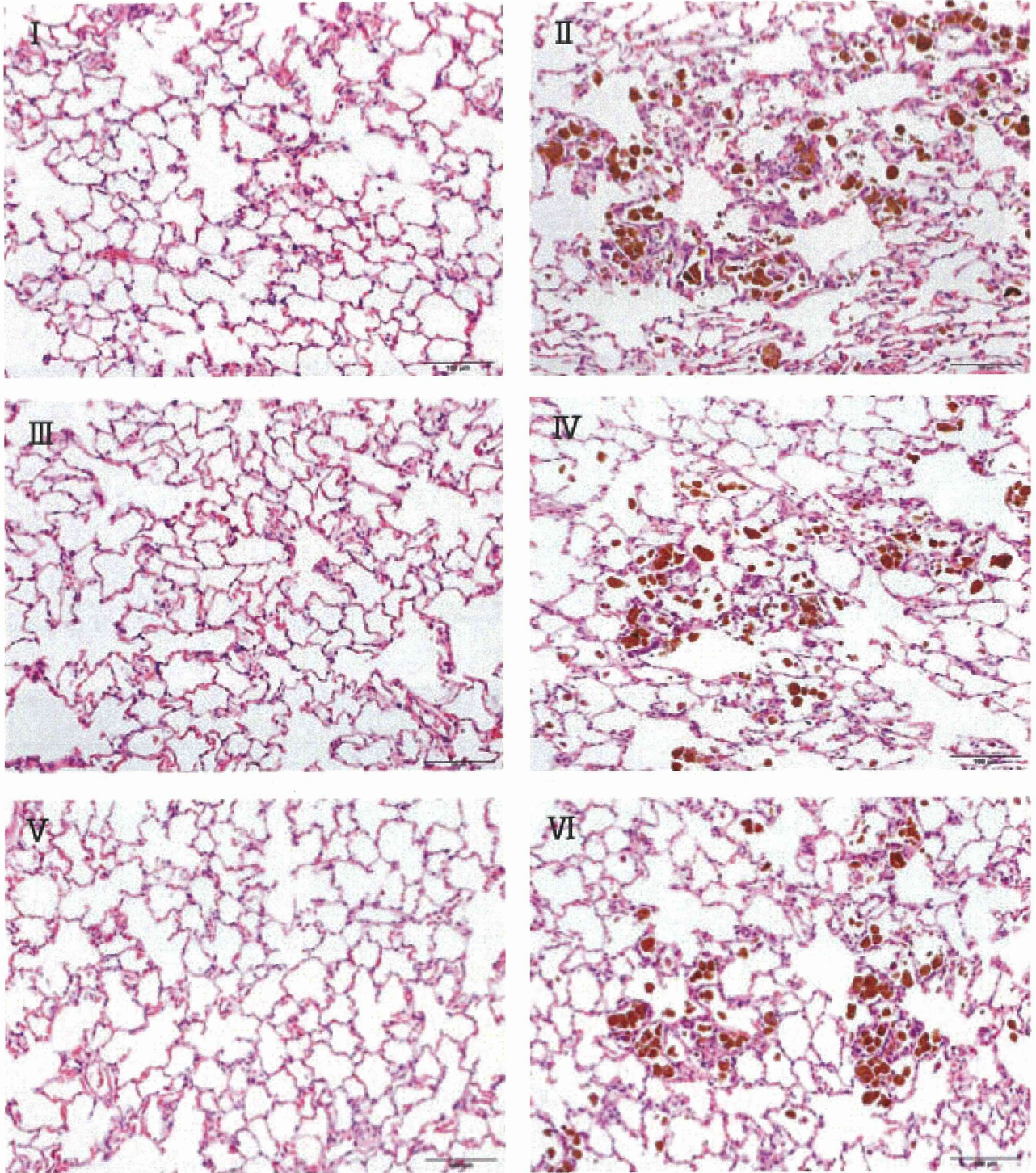


図4. 肺の病理組織像.

- I, 対照群 ; II, マグネタイト5 mg/kg体重投与群 ;
III, γ -オリザノール投与群 ; IV, マグネタイト + γ -オリザノール投与群 ;
V, グリセロール投与群 ; VI, マグネタイト + グリセロール投与群.

表2. 肺・肝・腎の病理組織学的解析結果

群	I	II	III	VI	V	VI
マグネタイト用量 (mg/kg 体重)	0	5.0	0	5.0	0	5.0
γ-オリザノール(%)	0	0	1.0	1.0	0	0
グリセロール (%)	0	0	0	0	8.0	8.0
観察匹数	20	20	20	20	20	20
肺						
マグネタイト貪食マクロファージの浸潤	0 ^a	20*	0	20*†	0	20*†
炎症性細胞浸潤	2	20*	3	20*†	5	20*†
II型肺胞上皮腫大	1	20*	0	20*†	0	20*†
肺胞上皮過形成	0	0	0	0	0	0
肝臓						
炎症性細胞浸潤	20	20	17	19	17	17
微小肉芽	0	0	0	1	1	0
肝細胞巣状壊死	12	11	9	8	9	10
胆管増生	18	19	19	17	8*	9*
腎臓						
炎症性細胞浸潤	3	5	3	4	4	3
尿細管拡張	5	7	8	8	14*	14*
再生尿細管	17	15	12	17	15	18
石灰沈着	6	4	4	3	4	4
虚血性尿細管萎縮	1	0	0	0	1	1
嚢胞	0	1	0	1	2	0

^a数値は所見を示したラット匹数.

* I群との比較で有意差あり ($p < 0.05$, Fisher's exact test) .

† 各群間の比較で有意差あり (I vs II, III vs IV, V vs VI; $p < 0.05$, Fisher's exact test).

他の組織及び器官では対照群との比較で明らかな変化を認めなかった.

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

遺伝毒性低減化を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、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。私用したナノ粒子は Fe_3O_4 ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$) およびカルボキシル基、ポリエチレンイミン、プルロニックで修飾した $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ 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)の測定の解析である。まず、これら表面修飾を行った $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ の溶媒（培養液、PBS、蒸留水）における分散能を検討したところ、表面修飾により分散能の安定性が高まる場合もあるが、溶媒、とくに FBS 等の成分に影響される事が認められた。遺伝毒性の指標としての 8-OHdG 測定を行い、カルボキシル基修飾の $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ は濃度依存的に増加するも、非修飾 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ に比べて明らかに低下している事を認めた。また、カルボキシル基修飾 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ はほとんど ROS を産生しない事を認めた。細胞生存率に関しては、今回新たにポリエチレンイミンおよびプルロニック修飾の場合について解析を行ったが、ポリエチレンイミンが曝露量に依存して細胞生存率が有意に低下する事を認めた。これらの結果より、 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ の表面修飾により細胞毒性、遺伝毒性の低減あるいは増強の可能性が示唆された。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、各種ナノ粒子の生体への影響を探るべく、細胞株を利用した *in vitro* 系での各種ナノ粒子の細胞毒性、遺伝毒性の解析を行ってきた。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“遺伝毒性低減化を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 を使用した。ATCC (American Type Culture Collection)より入手した。DU145 は RPMI 1640 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(Fe_3O_4 NPs)

使用した磁性体ナノ粒子の一次粒径は約 10 nm であり主成分は Fe_3O_4 (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。同時に、カルボキシル基で表面修飾された磁性体ナノ粒子(Fe₃O₄ NPs)を利用した。

これら 2 種類の磁性体ナノ粒子(Fe₃O₄ NPs) は戸田工業株式会社より購入し、1 μ g/ml、10 μ g/ml、100 μ g/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。

また、表面修飾に関しては、プロトコールに従いポリエチレンイミン(PEI)修飾およびプロニック修飾を行った。PEI 修飾は陽イオン性界面活性剤で、遺伝子導入に利用される。また、プルロニック修飾は非イオン性界面活性剤で、ドラッグデリバリーに利用される。

3) 8-OH-dG の定量化

細胞株を control (0 μ g/ml)、1 μ g/ml、10 μ g/ml、100 μ g/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(570 nm と 600 nm)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 μ l/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 μ l/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 10 mM 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 492-495 nm 蛍光波長 517-527 nm の波長で蛍光観察を行った。

6 well plate に細胞濃度が 1.0×10^5 cells/well

になるように播種した。まず、PBS 8.54 ml に CM-H₂DCFDA の試薬を溶かし 10 μM に調整する。6 well plate の培地を吸引して、その well に PBS 1 ml に 10 μM に調整した試薬を 200 μl 加えた。その後 30 分インキュベートを行い、蛍光顕微鏡で観察を行った。

蛍光顕微鏡で撮影した画像を、Imaging Soft(Photoshop Elements 8; Adobe)を用いて、画像の輝度と細胞の接着の面積(Pixel 数)を求めて、定量化を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は既に樹立された細胞株を用いる *in vitro* 実験である。用いる細胞の遺伝子情報を新たに解析する必要がある場合は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成 16 年度文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号)を遵守する。しかしながら、本研究では申請に該当する内容はなかった。また、遺伝子実験において、必要とする場合は本学組換え DNA 実験安全管理規則に従う。ナノマテリアルの取扱いに関して、「ナノマテリアルに対するばく露防止等のための予防的対応について」(基発第 0331013 号)に準じて、*in vitro* 実験を行った。ナノマテリアル保存及び実験等では液相で行われ、気相による実験者の曝露は防止されている。

C. 研究結果

1) 各種表面修飾 Fe₃O₄ NPs と培養液中の粒径分布について

ナノ粒子の溶媒への分散はその表面修飾に大きく依存する。本研究では、ナノマテリアルの一つである Fe₃O₄NPs (ナノ粒子)を、すなわち同一企業から Fe₃O₄NPs とカルボキシル基で表面修飾された Fe₃O₄NPs を対象とした。これらのナノ粒子の 1 次粒子径のサイズは 10 nm である。Fe₃O₄NPs は FBS を含む培養液中では凝集し、その 2 次粒子径は 200 nm 前後となり、Fe₃O₄NPs の濃度を上げる事により分散能は低下した (Fig.1-a)。一方、FBS を含ま

ない培養液においては、同粒子が濃度依存的に凝集する傾向が認められるが、その 2 次粒子径は FBS の含まない培養液の場合に比べて、さらに大きくなる事を認めた (Fig.1-b)。また、PBS においても粒子径分布は同様の傾向を認めた (Fig.1-c)。既に報告されているが、表面修飾のない Fe₃O₄NPs では、その分散能は濃度及び溶媒(この場合では培養液中の FBS)に依存していることが判明した。FBS が存在する場合、タンパク質-Fe₃O₄NPs の相互作用により、逆に凝集に対して安定性がもたらされると考える。

カルボキシル基で修飾した Fe₃O₄NPs は濃度依存的に凝集することなく、2 次粒子径は 100 nm 前後であり、安定に分散されている事が認められた。加えて、FBS の含有や PBS に影響される事無く、安定した分散が保たれている事も認められた (Fig.2-a,b,c)。カルボキシル基は親水性のナノ粒子を作るために、有用されているが、Fe₃O₄NPs の分散安定性を与えていることが確認された。総体的に、表面修飾の有無、生体の組織液にも例えられる培養液中の FBS の有無が Fe₃O₄NPs の分散に影響を与える事を確認した。

加えて、Fe₃O₄NPs のポリエチレンイミン (PEI)修飾およびプロニック修飾を行い、蒸留水および FBS を含まない培養液で、2 次粒子径を測定した。単純にカルボキシル基修飾の有無による結果と比較は出来ないが、ここに示す (Fig.3-a,b,c)。PEI 修飾は蒸留水中では濃度依存的に 2 次粒子径は大きくなるのを認めた。一方、プルロニック修飾では、濃度依存的に変化することなく、分散能は安定性を示していた。しかし、培養液中では、2 次粒子径は大きくなり、分散能は溶媒(培養液等)にかなり影響されることが認められた。

これら実験結果より、*in vivo* 系を想定した *in vitro* 系の環境に考慮すべきであると考えられた。

2) DU-145 前立腺癌細胞株におけるナノ粒子

の表面修飾の 8-OHdG の生成への影響について

DU145 前立腺癌細胞株は $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ 曝露 1 $\mu\text{g/ml}$ から 8-OHdG の生成を有意に認めた (Fig.4-a)。一方、カルボキシル基修飾 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ は 8-OHdG の生成は濃度依存的に増加するが、100 $\mu\text{g/ml}$ で、 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ 1 $\mu\text{g/ml}$ と同程度であり、8-OHdG 生成は抑えられている事を認めた。

3) ROS 生成の測定

DU145 細胞内の ROS の生成量について、定量化した結果を Fig.4-b に示す。ROS の産生量を、control 時を 1.00 [-]として数値化を行った。10 $\mu\text{g/ml}$ 曝露時より ROS 産生が確認された。しかしながら、カルボキシル基修飾 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ では、1-100 $\mu\text{g/ml}$ まで明らかな ROS 産生は認められなかった。これらの結果より、 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}$ は細胞内に ROS 産生を誘導するも、カルボキシル基表面修飾により ROS 産生が抑制された可能性が確認された。

4) 細胞生存率

前立腺癌細胞株 DU145 において、PEI 修飾 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ 曝露量が増えるに従い細胞生存率は低下し、10.0 $\mu\text{g/ml}$ 曝露時には有意に低下した (Fig.5-a)。プロニック修飾 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ 曝露量が増えるに従い、細胞生存率はわずかに低下するが、100 $\mu\text{g/ml}$ において有意差を認めた (Fig.5-b)。

これらの結果より、 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ の表面修飾により細胞毒性、遺伝毒性を低減あるいは増強させる可能性が認められた。

D. 研究発表

1. 論文発表

- (1) T.Kato, Y.Totsuka, K.Ishino, Y.Matsumoto, Y.Toda, D.Nakae, S.Goto, S.Masuda, S.Ogo, M.Kawanishi, T.Yagi, T.Matsuda, M.Watanabe, K.Wakabayashi. Genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes in both in vitro and in vivo assay systems. *Nanotoxicology*, 2012 (in press)
 - (2) A.Sato, N.Itcho, H.Ishiguro, D.Okamoto, N.Kobayashi, K.Kawai, H.Kasai, D.Kurioka, H.Uemura, Y.Kubota, M.Watanabe. Magnetic nanoparticles of Fe_3O_4 enhance docetaxel-induced prostate cancer cell death. *Int J Nanomed.*, 2013 (in press)
 - (3) 渡邊昌俊, 佐藤明子, 岩崎有由美, 深井瑛美, 岡本大樹, 栗岡大輔. 前立腺がん化学療法における磁性体ナノ粒子の効果. 日本磁気学会第 187 回研究会資料, 7-11, 2012.
 - (4) 栗岡大輔, 佐藤明子, 岩崎有由美, 深井瑛美, 岡本大樹, 渡邊昌俊. 前立腺がん化学療法への磁性体ナノ粒子の応用. *化学工業*, 64(3),67-73, 2013.
- ### 2. 学会発表
- (1) A. Sato, D. Kurioka, H. Ishiguro, H. Uemura, Y. Kubota, M. Watanabe. Synergistic effect of magnetic nanoparticles and docetaxel on prostate cancer cells in vitro. No.784 AACR March 31-April 4, 2012 Chicago, IL.
 - (2) Y. Hamanaka, T. Nittami, T.Takezawa, M. Watanabe. Application of a culture model utilizing substrata made of tissue/organ sections for histopathology in cancer behavior diagnosis. No.26 A Symposium on New Technology for Cell-based Drug Assay. Dec. 10, 2012 Tokyo, Japan
 - (3) T. Nittami, L. Speirs, J. Tucci, M. Watanabe, R.J. Seviour. (2012) False positive identification due to FISH probe hybridization to sites with single base deletions may overestimate the abundance of some filamentous Bacterial morphotypes, including those belonging to the candidate division TM7. The 14th International symposium on Microbial Ecology (ISME14), Aug.19-24, Copenhagen, Denmark.

- (4) 渡邊昌俊. 肝臓組織切片共培養における前立腺癌細胞 DU145 の挙動. 2-G-6 第 101 回日本病理学会総会 H24.4.26-28 (京王プラザ)
- (5) 渡邊昌俊, 広川佳史, 白石泰三. ヒト前立腺癌細胞における plk2 遺伝子の機能について. P1-PM-99 第 101 回日本病理学会総会 H24.4.26-28 (京王プラザ).
- (6) 上大介, 高橋慎, 豊田雅士, 関澤隆一, 松原弘明, 渡邊昌俊, 梅澤明弘, 五條理志. iPS 細胞の早期・効率的取得を目指したキャピラリー等電点電気泳動. 10264 第 11 回日本再生医療学会総会 H24(2012)6.12-14 (パシフィコ横浜).
- (7) 濱中祥弘, 竹澤俊明, 渡邊昌俊. 組織切片を利用した培養システムのがん研究への応用. 10264 第 31 回分子病理学研究会-恵那シンポジウム-H24.7.21-22 (恵那峡グランドホテル).
- (8) 濱中祥弘, 竹澤俊明, 渡邊昌俊. 組織切片基質での培養系における前立腺癌細胞の挙動について. J-1056 第 71 回日本癌学会学術総会 H24(2012)9.19-21 (ロイトン札幌他).
- (9) 佐藤明子, 諸橋彩香, 岩崎有由美, 石黒斉, 植村博司, 窪田吉信, 渡邊昌俊. 磁性体ナノ粒子は前立腺癌に対するドセタキセルの効果を増強する. J-1125 第 71 回日本癌学会学術総会 H24(2012)9.19-21 (ロイトン札幌他).
- (10) 岡本大樹, 深井瑛美, 岩崎有由美, 佐藤明子, 白石泰三, 河井伊一明, 葛西宏, 石黒斉, 渡邊昌俊. J-1124 前立腺癌におけるカルボキシル基就職磁性体ナノ粒子とドセタキセルの併用効果. J-1124 第 71 回日本癌学会学術総会 H24(2012)9.19-21 (ロイトン札幌他).
- (11) 諸橋彩香, 佐藤明子, 岩崎有由美, 河井一明, 葛西宏, 石黒斉, 古林直人, 渡邊昌俊. P-1309 磁性体ナノ粒子が曝露したがん細胞における抗酸化酵素遺伝子および活性酸素種酸性の変化について. J-1309 第 71 回日本癌学会学術総会 H24(2012)9.19-21 (ロイトン札幌他).
- (12) 讃良茂浩, 菅原健太郎, 石黒斉, 白石泰三, 高木陽光, 古林直人, 渡邊昌俊. J-2143 前立腺がんの抗癌剤抵抗性への Plk2 遺伝子の関与について. J-2143 第 71 回日本癌学会学術総会 H24(2012)9.19-21 (ロイトン札幌他).
- (13) 工藤祐子, 原田博美, 藤森浩彰, 小泉史明, 田村研治, 渡邊昌俊, 益谷美都子. Dot-blot 法による薬力学的マーカーとしての PARP 活性測定系の基礎的検討. J-2403 第 71 回日本癌学会学術総会 H24(2012)9.19-21 (ロイトン札幌他).
- (14) 小坂俊仁, 芳野純治, 乾和郎, 若林貴夫, 小林隆, 三好広尚, 服部信幸, 友松雄一郎, 山本智支, 成田賢生, 鳥井淑敬, 森智子, 林 繁和, 白石泰三, 山本隆行, 渡邊昌俊. 潰瘍性大腸炎高齢発症例と NQO1 遺伝子多型との関連. 第 51 回日本消化器病学会大会 H.24.10.10-13 (神戸国際会議場他).
- (15) 渡邊昌俊, 中野洋, 白石泰三. 病理組織片を用いた細胞培養法の応用. O-276 第 59 回日本臨床検査医学会学術集会 H24.11.29-12.2 (国立京都国際会館).
- (16) 栗岡大輔, 渡邊昌俊, 横田淳, 中釜斉, 土屋直人. p53 変異大腸がん細胞における NEK9 抑制を介した miR-22 増殖抑制機構. 2P-0289 第 35 回日本分子生物学年会 H.24.12.11-14 (福岡国際会議場他).
- (17) 西田百代, 藤原優子, 渡邊昌俊, 横田淳, 中釜斉, 土屋直人. miR-101 による p53 経路の選択的活性化機構. 2P-0292 第 35 回日本分子生物学年会 H.24.12.11-14 (福岡国際会議場他).

- (18) 渡邊昌俊, 佐藤明子, 岩崎有由美, 深井瑛美, 岡本大機, 栗岡大輔. 前立腺がん化学療法に置ける磁性体ナノ粒子の効果. 日本磁気学会第 187 回研究会 H.24.12.7 (中央大学駿河台記念館)
- (19) 濱中弘, 岡本愛, 渡邊昌俊, 竹澤俊明. コラーゲンビトリゲル膜チャンバー内に再構築したヒト血管内皮組織シートのバリア機能. 29P2-am115 日本薬学会第 133 年会 H.25.3.27-30. (パシフィコ横浜).
- (20) 工藤祐子, 原田博美, 藤森浩彰, 渡邊昌俊, 益谷美都子. 生体試料における poly(ADP-ribose)測定系の検討. 30P2-am138 日本薬学会第 133 年会 H.25.3.27-30. (パシフィコ横浜).

E. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特に無し

2. 実用新案登録

特に無し

3. その他

特に無し