

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

参考文献

- 1) Dhawan A., Sharma V.: Toxicity assessment of nanomaterials: methods and challenges, Anal. Bioanal. Chem., 398, 589-605 (2010)
- 2) Boverhof D.R., David R.M.: Nanomaterial characterization: considerations and needs for hazard assessment and safety evaluation, Anal. Bioanal. Chem., 396, 953-961 (2010)
- 3) 岡畑恵雄：バイオセンシングのための水晶発振子マイクロバランス法—原理から応用例まで、講談社（2013）

表 1 培地中の SiO₂ ナノ粒子及び TiO₂ ナノ粒子の個数分布粒子径 (nm)

		in medium	w/ AlCl ₃	w/ CuCl ₂	w/ ZnCl ₂
SiO ₂	第一ピーク	13.5 ± 1.9	13.0 ± 1.2	8.8 ± 1.1	13.3 ± 1.7
	第二ピーク	80.8 ± 21.0	78.9 ± 19.4	96.6 ± 21.9	52.0 ± 13.5
TiO ₂	第一ピーク	79.2 ± 19.1	81.3 ± 20.2	96.9 ± 22.7	88.1 ± 26.7

表 2 培地中の SiO₂ ナノ粒子及び TiO₂ ナノ粒子のゼータ電位 (mV)

	in medium	w/ AlCl ₃	w/ CuCl ₂	w/ ZnCl ₂
SiO ₂	-9.32	-11.22	-9.97	-9.58
TiO ₂	-12.77	-12.83	-9.92	-9.46

表 3 純水中の SiO₂ ナノ粒子及び TiO₂ ナノ粒子の平均粒子径 (nm)

Nanoparticles	w/o metal chlorides	w/ AlCl ₃	w/ CuCl	w/ CuCl ₂	w/ ZnCl ₂
SiO ₂	133.9±0.6	127.9±3.2	164.4±27.9	130.9±2.5	131.4±0.9
TiO ₂	45.7±2.1	55.9±18.6	56.2±6.2	46.5±2.7	67.7±6.7

表 4 純水中の SiO₂ ナノ粒子及び TiO₂ ナノ粒子のゼータ電位 (mV)

Nanoparticles	w/o metal chlorides	w/ AlCl ₃	w/ CuCl	w/ CuCl ₂	w/ ZnCl ₂
SiO ₂	-38.08±2.42	3.83±0.69**	3.67±0.74**	8.15±0.81**	6.37±0.66**
TiO ₂	33.75±0.20	38.24±2.22*	25.70±0.84**	29.32±2.21*	26.37±0.11**

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$

表 5 SiO₂ ナノ粒子及び TiO₂ ナノ粒子に結合する CuCl₂ の平衡定数

Nanoparticles	K _d (M)	K _a (M ⁻¹)
SiO ₂	6.72E-03	1.49E+02
TiO ₂	7.52E-03	1.33E+02

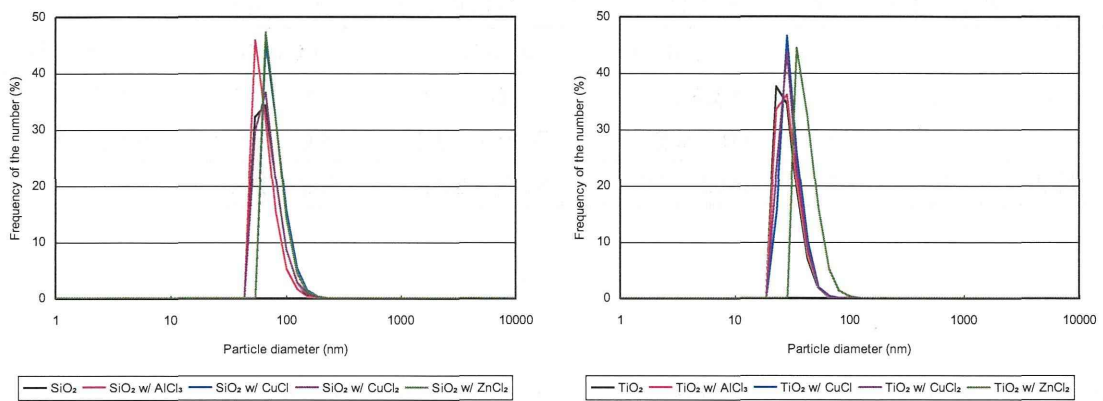


図1 金属塩化物共存下における SiO₂ (左) 及び TiO₂ (右) ナノ粒子の粒子径個数分布

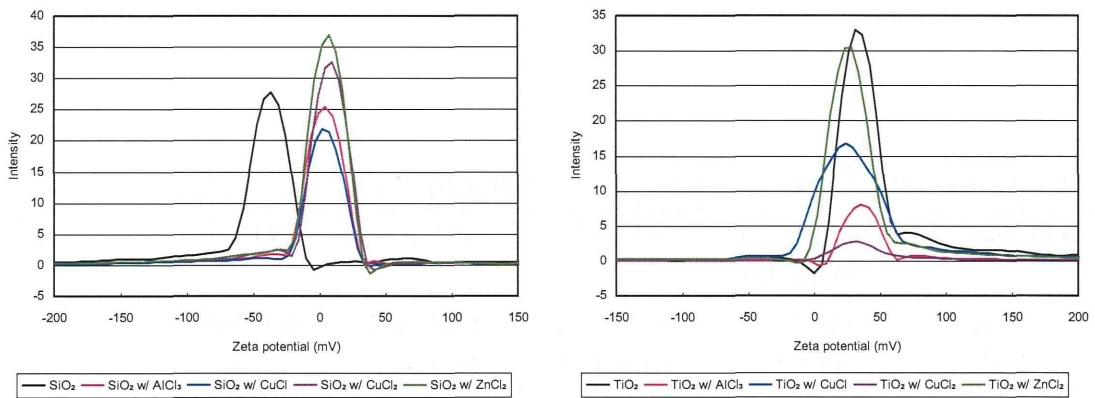


図2 金属塩化物共存下における SiO₂ (左) 及び TiO₂ (右) ナノ粒子のゼータ電位

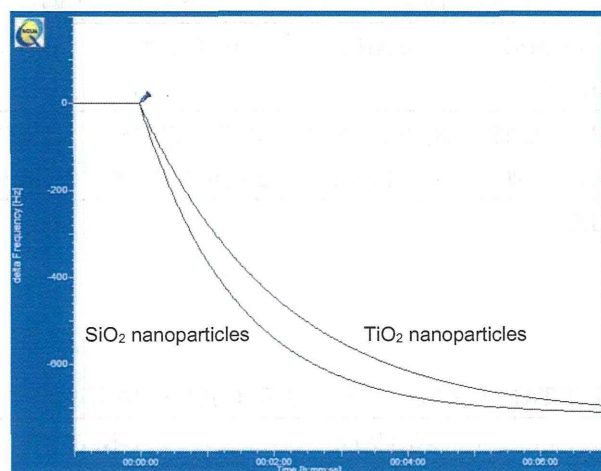


図3 SiO₂ ナノ粒子及び TiO₂ ナノ粒子に CuCl₂ が結合する際の QCM センサーグラム

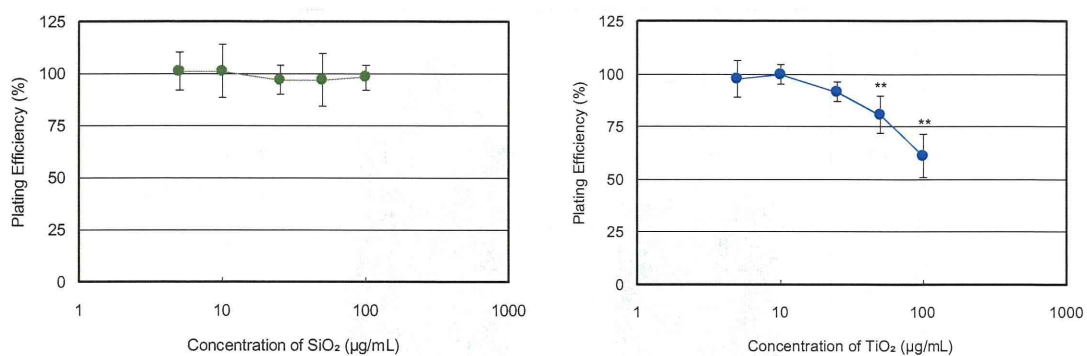


図4 SiO₂ナノ粒子（左）及びTiO₂ナノ粒子（右）のコロニー形成率（**p<0.01）

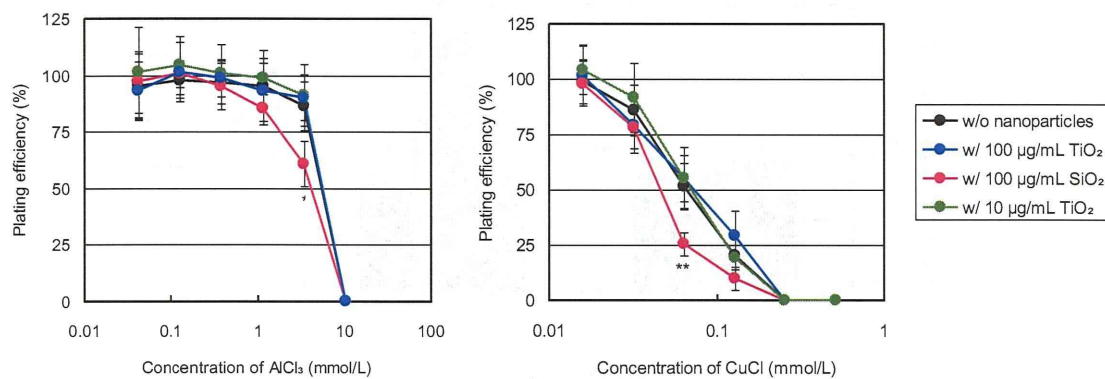


図5 ナノ粒子共存下におけるAlCl₃（左）及びCuCl（右）のコロニー形成率（*p<0.05、**p<0.01）

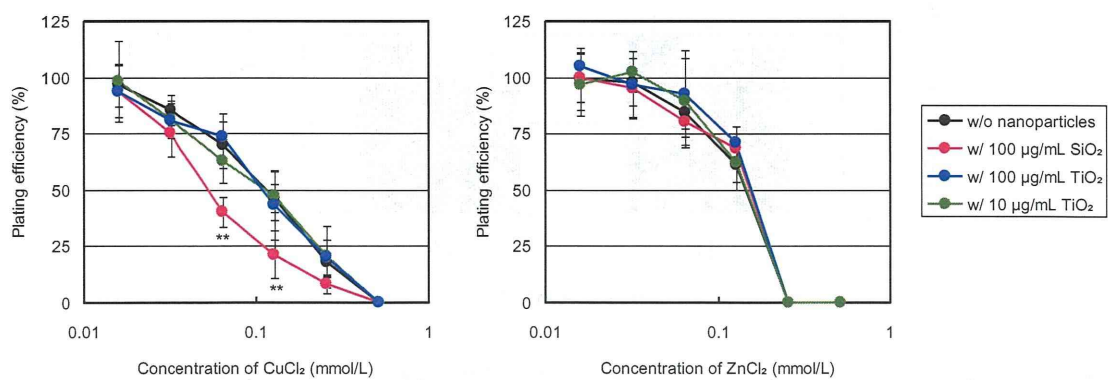


図6 ナノ粒子共存下におけるCuCl₂（左）及びZnCl₂（右）のコロニー形成率（**p<0.01）

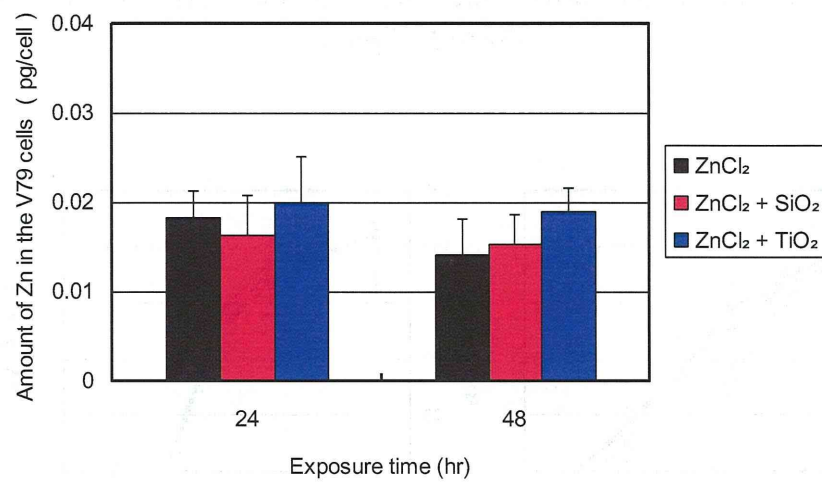
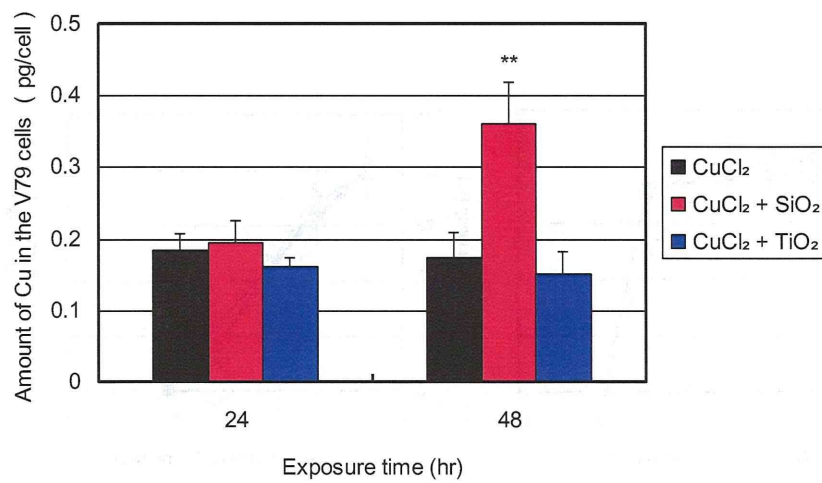
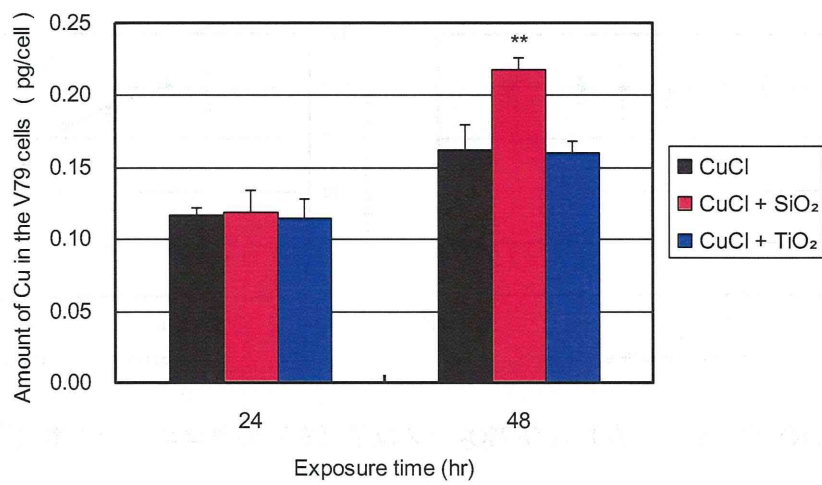


図7 ナノ粒子共存下で CuCl (上)、CuCl₂ (中) 及び ZnCl₂ (下) を曝露した V79 細胞内の銅及び亜鉛濃度 (**p<0.01)

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
平成23～25年度 分担研究総合報告書

（分担研究課題名） ナノマテリアルの遺伝毒性の低減化とそのメカニズムに関する研究

研究分担者 戸塚 ゆ加里 独立行政法人がん研究センター研究所
発がんシステム研究分野 ユニット長

研究要旨：近年、様々な製品にナノマテリアルが多用され、ナノマテリアルのヒトへの健康影響や安全性に高い関心が集まっている。我々はこれまでに、ナノマテリアルが遺伝毒性を誘発することを明らかにし、かつ、これら変異の誘発には酸化ストレスや炎症が寄与していると推測した(1, 2)。しかしながら、これらナノマテリアルにより誘発される遺伝毒性メカニズムについては未だ明らかになっていない。そこで本研究では、DNA 付加体を網羅的に解析する方法（アダクトーム法）を用いて、マグネタイトの気管内投与によりマウス肺に生成する付加体の解析を行なったところ、マグネタイト投与群で付加体の総数がコントロールと比べ上昇したこと、および、それらの複数が酸化反応ならびに炎症反応由来であることが分かった。この結果は、マグネタイトにより誘発される遺伝毒性には、酸化ストレスや炎症が関与する事を裏付けるものとなった。一方、ナノマテリアルの化学的修飾あるいは構造及びサイズ変換、原料の産地やメーカーの違いによってその形状や表面構造等が異なる場合があり、実際には、同じ素材から数種のナノマテリアルが製造されていることになる。本研究では、原料の産地やメーカーの違いによる形状や表面構造が異なる同種異型のナノマテリアルに注目し、これらの違いがナノマテリアルの遺伝毒性に及ぼす影響について明らかにするため、Kaolin-K（韓国産）及びKaolin-U（アメリカ産）の、①物理化学的性質、②in vivo DNA 損傷性、③細胞への取り込み、④ROS 産生能、⑤マクロファージとの共培養による肺上皮細胞への影響、⑥マクロファージからの炎症性サイトカイン分泌について調べた。その結果、物理化学的性質においては、両者の粒子表面構造とゼータ電位に違いがあることがわかった。また、これら Kaolin を気管内投与したマウス肺において、Kaolin-U がより強い DNA 損傷性を示すことが明らかとなった。一方、培養細胞を用いた実験において、Kaolin-K に比べて Kaolin-U のほうが、実質細胞（A549）およびマクロファージ（RAW264）のいずれの細胞内にも取り込まれやすい傾向がみられた。更に、ROS 産生能について検討してみたところ、A549 ではいずれの Kaolin においても ROS を産生している細胞はほとんどみられなかったのに対し、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。また、A549 での ROS 産生および DNA 損傷性は RAW 264 の共存下で上昇した。RAW264 からの炎症性サイトカイン（IL-1 β 及び TNF- α ）の分泌は kaolin を取り込む事により誘導され、その分泌量は Kaolin-K に比べ Kaolin-U の方が高い傾向がみられた。これらのことから、kaolin の遺伝毒性メカニズムとしては kaolin を取り込んだマクロファージが炎症性サイトカインを放出し、それによって近傍の上皮細胞に ROS 産生を促すことで DNA 損傷や変異を誘発していることが示唆された。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。

A. 研究目的

近年、化粧品や医薬品、各種商業用品等にナノマテリアルが多用され、ナノマテリアルのヒトへの健康影響や安全性に高い関心が集まっている。我々はこれまでに、フラーレン (C₆₀)、カオリン、マグネタイト及び、今後、様々な分野における応用が有望視されている MWCNT 等のナノマテリアルの遺伝毒性について *in vitro* 及び *in vivo* の試験系で検討し、これら全てのナノマテリアルが *in vitro* 小核試験、*in vivo* コメットアッセイにおいて陽性を示す事を明らかにした(1)。これらナノマテリアルをトランスジェニックマウスの気管内に投与すると、肺の点突然変異の発生頻度がコントロールの2~3倍に上昇すること、及び誘発された変異スペクトラムから、これら変異の誘発には酸化ストレスや炎症が寄与することが示唆された(1,2)。しかしながら、これらナノマテリアルにより誘発される遺伝毒性メカニズムについては未だ明らかになっていない。また、実用化に向けたナノマテリアルの化学的修飾あるいは構造及びサイズ変換が積極的に行われていることや、原料の産地やメーカーの違いによってその形状や表面構造等が異なる場合があり、実際には、同じ素材から数種のナノマテリアルが製造されていることになる。しかしながら、このような同種異型のナノマテリアルの安全性評価は、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。これらナノマテリアルによって誘発される遺伝毒性のメカニズムを明らかにする事は、有害ナノマテリアルへの曝露レベルまたは安全性の評価等に有用な知見が得られることが期待される。また、ナノマテリアルの毒性を低減化し、より安全なナノマテリアル

を製造する上にも極めて有用な資料を提供する。

B. 研究方法

1. 同種異型のナノマテリアルにより誘発される DNA 損傷性の違いとそのメカニズムの解析

1-1 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。

1-2 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。

1-3 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。

1-4 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 μM 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°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。

1-5 肺胞上皮及びマクロファージ様細胞

の共培養系を用いた細胞間相互作用の解析
あらかじめ肺胞上皮細胞 A549 を播種して 24 時間培養した。そこに ThinCert™ (pore size; 0.4 μm , high density: greiner bio-one) を各 well に入れて、インサート内に 8×10^5 cells/2 ml MEM の RAW264 を播種した後、24 時間培養した (図 2)。Kaolin を曝露させた後にトリプシン処理により A549 を回収し、一部をコメットアッセイに、残りの細胞は ROS 産生細胞の解析に供した。

1-6 肺胞上皮細胞に対する DNA 損傷性の解析 (Fpg 併用コメットアッセイ)

得られた細胞浮遊液を、 8×10^3 cells/ml に調製した。細胞浮遊液 10 μl と 0.5%NMPA 90 μl をピペッティングにより混和し、そのうち 80 μl を高撥水印刷 MAS コートスライドガラス (松浪硝子工業) に塗布した後、チップの腹で均一にのばした。その後、4 °C で 10 分間冷却し、完全にアガロースを固化した。項目②で得られた細胞浮遊液 10 μl と 0.5%NMPA 90 μl をピペッティングにより混和し、そのうち 80 μl を高撥水印刷 MAS コートスライドガラス (松浪硝子工業) に塗布した後、チップの腹で均一に

のばした。その後、4 °C で 10 分間冷却し、完全にアガロースを固化した。スライド標本を染色ビンに並べた後、予め調製して 4 °C で冷却しておいた細胞溶解液に浸した。浸した状態で 4 °C 遮光下で一晩、細胞溶解した。氷上のサブマリン式電気泳動槽に、予め調製して冷却しておいた電気泳動バッファーを注ぎ、その中にスライド標本を浸して 15 分間 DNA の巻き戻しを行った。その後、25 V、300 mA で 15 分間電気泳動した。泳動槽から慎重に取り出したスライドガラスを、0.4 M Tris buffer に 5 分間浸して中和した。スライド標本をエタノールに浸し、脱水固定した。室温で完全に乾燥し、観察時まで保管した。10000 倍希釈した CYBRGold 70 μl をスライド上に塗布し、チップの腹でのばした後、室温遮光下で 10 分間染色した。アガロースが剥がれないように注意しながら、超純水に 10 分間浸し、余剰な CYBRGold を洗浄した。超純水で 3 回洗浄した後、室温遮光下で完全に乾燥させた。スライド標本の解析は、蛍光顕微鏡を用いて、最終倍率 200 倍で行った。1 検体につき 100 個の細胞を解析し、画像解析ソフト (Comet assay IV) を用いて、解析パラメーター (Tail intensity (%)) を自動算出した。

Tail intensity (%): 全体の DNA 量 (%) - 核の DNA 量 (%)

1-7 RAW264 培養上清中の IL-1 β および TNF- α の定量

6 well plate に RAW264 を 2×10^6 cells/well で播種して、24 時間前培養した後、各 well に Kaolin を曝露して、24 時間培養した。次に、Immunoassay Kit, Mouse IL-1 β (BioSource International) および Quantikine® Mouse TNF- α (R&D Systems) を用いて培養上清中 IL-1 β 、TNF- α の定量を行った。

2. マグネタイトを気管内投与したマ

ウス肺における DNA 付加体の網羅的解析

2-1 質量分析機器を用いた DNA 付加体の網羅的な解析

7週齢の雄性 ICR マウスにマグネタイト（戸田工業）を 0.2 mg/body の用量で気管内投与を行い、24時間後に肺を摘出した。摘出した肺からゲノム DNA を抽出し、DNA 分解酵素によりモノヌクレオシドに分解した後、超高速液体クロマトグラフィー-連結飛行時間型質量分析器 (UPLC-TOF MS) に供した。Waters 社が提供するソフトウェア MarkerLynx を用い、分析データから DNA 付加体の候補となりうるピークを抽出した。また、デオキシリボヌクレオシドに特徴的なニュートラルロス - 116.04736 を生じたピークを選択的に抽出することで、ノイズを除去できるように系をデザインした。更に、コントロールである native な ctDNA で検出された DNA 付加体をサンプルの結果から引くことで basal に存在する DNA 付加体を結果から除外した。質量分析の結果得られた各 DNA 付加体の m/z 、保持時間、面積値から DNA 付加体マップを作製した。次に、マグネタイト投与群に特徴的な DNA 付加体をスクリーニングするため、主成分分析 (PCA) を行なった。

2-2 マグネタイト投与マウス肺における炎症マーカー（ニトロチロシン）の解析

gpt delta マウス（10週齢雄）にマグネタイトを 0.2 mg/body の用量で週1回、4回連続気管内投与を行い、最終投与から2ヶ月後にマウスを屠殺・解剖した。肺を摘出し、ホルマリン緩衝液で固定、薄切後、抗ニトロチロシン抗体を用いて免疫染色を行なった。

（倫理面への配慮）

尚、本研究で行った動物実験は、国立が

ん研究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った。

C. 研究結果

1 同種異型のナノマテリアルにより誘発される DNA 損傷性の違いとそのメカニズムの解析

1-1 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。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 の方が分散し易いことが推察された。

1-2 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。

1-3 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。A549 細胞に $100 \mu\text{g/ml}$ 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)。 $100 \mu\text{g/ml}$ 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。

1-4 活性酸素種 (ROS) 産生細胞の解析

各 Kaolin を $100 \mu\text{g/ml}$ 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。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。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。

1-5 共培養による上皮細胞への影響

共培養系の RAW264 のみに各 Kaolin を 24 時間曝露し、その後 A549 のみを回収し、FCM 解析及び Fpg 併用コメットアッセイを行った。SS 強度による細胞内取込みの確認を行ったところ、陰性対照群と変わらなかったことから、RAW264 に曝露した Kaolin が、インサートのメンブレンを通していないことを確認した。一方、RAW264 に Kaolin を曝露すると、陰性対照に対して、A549 における ROS 産生細胞の割合が増加していた。また、Kaolin-K に比べ Kaolin-U を曝露した群において、ROS 陽性細胞の割合が大きかったことから、RAW264 への取込み量と相関していた。一方、このときの A549 における DNA 損傷を確認したところ、陰性対照の Tail intensity (%) が 2.19 ± 0.38 であるのに対し、Kaolin-K では 3.17 ± 0.73 、Kaolin-U では 4.34 ± 0.42 ($p < 0.01$) となり、ROS 産生細胞の結果と一致した。また A549 を単体で培養した時に比べ、RAW264 と共培養した際には、A549 における Tail intensity が増大したことから、免疫系細胞であるマクロファージが共存することで周囲の実質細胞は何らかの影響を受け、さらにそのマクロファージが Kaolin 粒子を取り込むことでその影響が促進するものと推察された。また、この DNA 損傷性は DNA の酸化的損傷を

切断する酵素である Fpg(Formamidopyrimidine [fapy]-DNA glycosylase)処理により上昇していたことから、これらカオリンで誘発された DNA 損傷の一部には酸化ストレスが関与していることが示唆された。

1-6 RAW264 培養上清中の炎症性サイトカイン量

共培養系で A549 にみられた影響が、Kaolin を取込んだ RAW264 から細胞外に放出される炎症性サイトカインによるものと推察した。そこで、RAW264 に Kaolin を 24 時間曝露した培養上清中の IL-18 及び TNF- α を、ELISA 法 (サンドイッチ法) を用いて測定した。

Control での IL-18 及び TNF- α 濃度は 114.5 \pm 14.9 及び 89.0 \pm 31.9 pg/ml だった。一方 Kaolin-K 及び Kaolin-U を曝露したところ、IL-18 濃度は 191.1 \pm 62.2 及び 360.4 \pm 94.8 pg/ml に、TNF- α 濃度は 900.7 \pm 245.3 及び 1167.8 \pm 42.0 pg/ml に増加し、IL-18 濃度は Kaolin-K に比べ Kaolin-U の方が有意に高かった。TNF- α 濃度も、Kaolin-K に比べ Kaolin-U の方が高い傾向がみられた。

2. マグネタイトを気管内投与したマウス肺における DNA 付加体の網羅的解析

2-1 質量分析機器を用いた DNA 付加体の網羅的な解析

マグネタイトをマウスに気管内投与し、投与後 24 時間後に肺を摘出し DNA を抽出後、UPLC-QToF-MS を用いて DNA 付加体を分析した。その結果、vehicle 投与群 (コントロール群、30 個) と比べて、マグネタイト投与群 (42 個) においてより多くの DNA 付加体が生成されていた。これまでに、ナノマテリアルの遺伝毒性に酸化ストレスが関与することを示唆するデ

ータが得られている。そこでマグネタイト投与群において特異的に生成される付加体を同定するために、PCA 解析を行なった。その結果、マグネタイト投与群と vehicle 投与群が奇麗に分離する事が確認出来た。次に、各群で検出された個々の DNA 付加体について網羅的に PCA 解析を行なったところ、マグネタイト投与群に特徴的である複数の付加体(A2, A4, A5, A9, A10, A14, A37) をスクリーニングすることが出来た。スクリーニングされた DNA 付加体の m/z 値を独自に構築した付加体データベースと比較し、同定を試みたところ、マグネタイト投与に特徴的である付加体 A5 [m/z; M+1: 252.11] が既知付加体である ϵ dC (m/z; 251.0984) と、A10 [m/z; M+1: 363.17] が既知付加体である B ϵ dA (m/z; 363.1816) であることが推測された。一方、これら以外の付加体はデータベース内の既知付加体とは一致しなかったが、いくつかは酸化ストレス、炎症由来の未知付加体である可能性が示唆された。

2-2 マグネタイト投与マウス肺における炎症マーカー (ニトロチロシン) の解析

マグネタイトを投与したマウス肺において、ニトロチロシン陽性細胞が観察された。特に、被検物質を貪食したマクロファージにおいて強く染色される傾向があった。

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, Kinae 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.
 5. Kato T, Totsuka Y, Ishino K, Matsumoto Y, Tada Y, Nakae D, Goto S, Masuda S, Ogo S, Kawanishi M, Yagi T, Matsuda T, Watanabe M, Wakabayashi K. Genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes in both in vitro and in vivo assay system. *Nanotoxicology*, 2013 7: 452-61.
 6. Nakano T, Matsushima-Hibiya Y, Yamamoto M, Takahashi-Nakaguchi A, Fukuda H, Ono M, Takamura-Enya T, Kinashi H, Totsuka Y. ADP-ribosylation of guanosine by SCO5461 protein secreted from *Streptomyces coelicolor*, *Toxicon* 2012, in press.
 7. Ishino K, Mutoh M, Totsuka Y, Nakagama H. Metabolic syndrome: A novel high-risk state for colorectal cancer. *Cancer Lett*, 2012, in press.
 8. Lin Y, Totsuka Y, He Y, Kikuchi S, Qiao Y, Ueda J, Wei W, Inoue M, Tanaka H. Comparative epidemiology of esophageal cancer between Japan and China. *J Epidemiol.* 2012, in press.
 9. 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.
 10. Kato T, Totsuka Y, Hasei T, Watanabe T, Wakabayashi K, Kinae 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., Toxicol.*, 2013, 28:588-94
 11. Lin Y, Totsuka Y, He Y, Kikuchi S, Qiao Y, Ueda J, Wei W, Inoue M, Tanaka H. Comparative epidemiology of esophageal cancer between Japan and China. *J Epidemiol.* 2013, 23:233-42.
 12. Kato T, Totsuka Y, Ishino K, Matsumoto Y, Tada Y, Nakae D, Goto S, Masuda S, Ogo S, Kawanishi M, Yagi T, Matsuda T, Watanabe M, Wakabayashi K. Genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes in both in vitro and in vivo assay systems. *Nanotoxicology*, 2013 7: 452-61
 13. Kawanishi M, Ogo S, Ikemoto M, Totsuka Y, Ishino K, Wakabayashi K, Yagi T. Genotoxicity and reactive oxygen species production induced by magnetite

- nanoparticles in mammalian cells. *J Toxicol Sci.* 2013;38(3):503-511.
14. Watanabe M, Yoneda M, Morohashi A, Hori Y, Okamoto D, Sato A, Kurioka D, Nittami T, Hirokawa Y, Shiraishi T, Kawai K, Kasai H, Totsuka Y. Effects of Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles on A549 Cells. *Int J Mol Sci.* 2013, 14:15546-60.
 15. Totsuka Y, Watanabe T, Coulibaly S, Kobayashi S, Nishizaki M, Okazaki M, Hasei T, Wakabayashi K, Nakagama H. In vivo genotoxicity of a novel heterocyclic amine, aminobenzoazepinoquinolinone-derivative (ABAQ), produced by the Maillard reaction between glucose and l-tryptophan. *Mutat Res.* 2014, in press.
 16. Totsuka Y, Ishino K, Kato T, Goto S, Tada Y, Nakae D, Watanabe M, Wakabayashi K. Magnetite Nanoparticles Induce Genotoxicity in the Lung of Mice via Inflammatory Response. *Nanomaterials*, 2014, in press.
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) 戸塚ゆ加里; 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)
- 12) Totsuka Y, Kato T, Ishino K, Nakae D, Tada Y, Oyama K, Ogata A, Kawanishi M, Yagi T, Watanabe M, Wakabayashi K, Nakagama H: Genotoxicity induced by nanomaterials, The 6th International Conference on Environmental Mutagens in Human Populations (ドーハ、カタール、26-29, March, 2012).
- 13) 戸塚ゆかり、石野孔祐、若林敬二、渡辺哲志、中釜 斉 ; メイラード反応生成物、アミノベンゾアゼピノキノリン(ABAQ)の in vivo 変異原性と生体内における生成、第71回日本癌学会学術総会(札幌、9月19-21日)
- 14) 石野孔祐、戸塚ゆかり、武藤倫弘、中釜 斉 ; ヒト白血球を用いた肥満関連DNA付加体の網羅的解析、第71回日本癌学会学術総会(札幌、9月19-21日)
- 15) Ishino K, Sekine A, Goto S, Nakagama H, Totsuka Y ; Analysis of DNA damage induced by nanomaterials using comprehensive analysis of DNA adducts (DNA adductome analysis)、3rd Asian Conference on environmental mutagens (杭州、中国、10月23-26日)
- 16) Totsuka Y, Ishino K, Wakabayashi K, Watanabe T, Masuda S, Nakagama H ; In vivo mutagenicity and formation of a Maillard reaction product, aminobenzoazepinoquinoline derivative (ABAQ), (杭州、中国、10月23-26日)
- 17) 戸塚ゆかり ; ナノマテリアルの遺伝毒性発現メカニズム、第41回大会 日本環境変異原学会(静岡、11月29-30日)
- 18) 戸塚ゆかり、石野孔祐、松島芳隆、中釜 斉 ; ハロゲン系炭化水素由来のDNA付加体の解析、第41回大会 日本環境変異原学会(静岡、11月29-30日)
- 19) 石野孔祐、関根彬弘、後藤純雄、中釜 斉、戸塚ゆかり ; DNA付加体の網羅的解析による新規付加体の探索、第41回大会 日本環境変異原学会(静岡、11月29-30日)
- 20) 堺澤絢、後藤純雄、若林敬二、渡辺徹志、中釜 斉、戸塚ゆかり ; トリプトファンとグルコースのメイラード反応生

- 成物アミノベンゾアゼピノキノリノン誘導体の *in vivo* 変異原性、第 41 回大会 日本環境変異原学会 (静岡、11月29-30日)
- 21) 大野 絢、中野 毅、中釜 斉、松島 芳隆、布柴 達男、戸塚 ゆ加里；ゲノム中に存在する DNA 付加体の免疫沈降法を用いた濃縮法、第 41 回大会 日本環境変異原学会 (静岡、11月29-30日)
- 22) 関根 彬弘、石野 孔祐、後藤 純雄、中釜 斉、戸塚 ゆ加里；マグネタイト (MGT) により誘発される DNA 付加体のアダクトーム解析、第 41 回大会 日本環境変異原学会 (静岡、11月29-30日)
- 23) 石野 孔祐、戸塚 ゆ加里、松島 芳隆、鰐淵 英機、魏 民、山野 荘太郎、中森 正二、柴田 龍弘、土原 一哉、落合 淳志、中釜 斉；職業性胆管がんの原因候補物質であるハロゲン系炭化水素由来の DNA 付加体及び変異原性の解析、第 72 回日本癌学会学術総会 (横浜、10月3-5日)
- 24) 中釜 斉、戸塚 ゆ加里、三牧 幸代、中森 正二、鈴木 穰、柴田 龍弘、落合 淳志、土原 一哉；1,2-DCP, DCM 曝露歴のある印刷工胆管癌に認められた高頻度ゲノム変異、第 72 回日本癌学会学術総会 (横浜、10月3-5日)
- 25) 戸塚 ゆ加里、石野 孔祐、中江 大、渡辺 昌俊、若林 敬二、中釜 斉；マグネタイトナノ粒子は炎症反応を介してマウス肺に遺伝毒性を誘発する、第 72 回日本癌学会学術総会 (横浜、10月3-5日)
- 26) Totsuka Y, Tada Y, Nakae D, Watanabe M, Wakabayashi K.; Mechanisms of genotoxicity in the lungs by nanomaterials, 11th ICEM (ブラジル、11月3-8日)
- 27) Totsuka Y, Tada Y, Nakae D, Watanabe M, Wakabayashi K.; Magnetite nanoparticles induce genotoxicity in the lung of mice via inflammatory response, NanOEH (名古屋、10月28-31日)
- 28) 後藤 正憲、松島 芳隆、中釜 斉、戸塚 ゆ加里；ジクロロメタン由来の DNA 付加体を含むシヤトルプラスミドを用いたヒト細胞内変異原性試験、第 42 回日本環境変異原学会 (岡山、11月29-30日)
- 29) 馬場 明、後藤 純雄、松島 芳隆、中釜 斉、戸塚 ゆ加里；職業性胆管癌の候補物質、ジクロロメタン及び 1,2-ジクロロプロパンの変異原性及び変異スペクトラムの解析、第 42 回日本環境変異原学会 (岡山、11月29-30日)
- 30) 辻田 俊寛、石野 孔祐、加藤 護、柴田 龍弘、後藤 純雄、魏 民、松島 芳隆、中釜 斉、戸塚 ゆ加里；職業性胆管がん発生に関与するハロゲン系炭化水素の DNA 付加体の網羅的な解析 (アダクトーム解析)、第 42 回日本環境変異原学会 (岡山、11月29-30日)
- E. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)
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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究総合報告書

（分担研究課題名）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	薬事環境科学部 生体影響研究科 主任研究員
研究協力者	齋藤 育江	東京都健康安全研究センター	薬事環境科学部 環境衛生研究科 主任研究員
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 生体影響研究科 科長補佐
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	保坂 三継	東京都健康安全研究センター	薬事環境科学部 環境衛生研究科 科長
研究協力者	大山 謙一	東京都健康安全研究センター	環境保健部 生体影響研究科 科長（当時）（平成 23 年度のみ）

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。このことに基づき、本研究の先行研究はラットに気管内投与したマグネタイトの急性及び慢性毒性の評価を行い、本研究は当該先行研究を発展させるものとして遂行した。

平成 23 年度はラットに気管内投与した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、F344/DuCrIj 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 日まで比較的速度やかに減少し、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れば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。

先行研究として行ったマグネタイトの気管内反復投与によるラット慢性毒性試験では、肺における慢性炎症と共に肺胞上皮過形成性の発生が観察され、マグネタイトが肺に対して発がん性を持つ可能性を示した。マグネタイトは *in vitro* 試験において遺伝毒性を持つ可能性を示されていることから、その発がん性の有無に関する評価は喫緊の課題と考えられた。そこで、本研究においては、ラット 2 段階肺発がんモデルを用いた検索を行った。平成 24 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について検索を行った。試験は、F344/DuCrIj 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。

平成25年度は、マグネタイトの肺発がんプロモータ活性の有無について検索を行った。試験は、F344/DuCrIj 雄性ラット(6週齢)に*N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN) (0.1%混水)による2週間の発がんイニシエーション処置を行った後、マグネタイトを0(対照群)・5.0・1.0 mg/kg 体重の用量で4週間に1回、計7回の気管内投与を実施し、試験開始後30週の時点で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、肺の肉眼観察においては、DHPN投与により結節が多発性に観察されたが、マグネタイト5.0 mg 併用群で結節数が減る傾向を示し、径3 mm以上の結節数に関して統計学的に有意な減少を示した。病理組織学的検索においては、DHPN投与により肺胞上皮過形成及び肺の腺腫・腺癌が発生し、マグネタイト併用投与群で、腫瘍の発生頻度と個体当たりの腫瘍数がマグネタイトの用量に依存した減少傾向を示した。特に、マグネタイト5.0 mg 併用群の個体あたりの全腫瘍数は、統計学的に有意に減少した。以上の結果から、マグネタイトは、明らかな肺発がんプロモータ活性を有さず、むしろDHPNの肺発がん性を抑制することが明らかとなった。

以上より、本研究は、ラットに気管内投与したマグネタイトについて、その体内動態と肺に対する発がん性を有さないことを明らかとするに留まらず、肺発がんを抑制する可能性を示した。

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、本研究の先行研究を含め、その安全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、平成23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気管内投与によるADME試験を実施した。

本研究の先行研究においては、マグネタイトの急性及び慢性毒性の評価を行った。マグネタイトの気管内反復投与によるラット慢性毒性試験においては、肺における慢性炎症及び肺胞上皮過形成性を観察し、肺に対する発

がん性を持つ可能性が示した⁷⁾。マグネタイトは *in vitro* 試験において遺伝毒性を持つ可能性を示されている⁸⁾ことから、その発がん性の有無に関する評価は喫緊の課題と考えられた。そこで、本研究はラット 2 段階肺発がんモデルを用いた検索を行い、平成 24 年度はマグネタイトの肺発がんイニシエータ活性、平成 25 年度は、プロモータ活性の有無について検索した。

B. 研究方法

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において、研究協力者である多田幸恵生体影響研究科主任研究員の主導下に、同科員および環境性研究科員の協力を仰いだ。

1. 被験物質など

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）および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 ; Lot.130207, pH 10.2, 一次粒子径 5-15 nm, 比表面積 124 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 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。

イニシエータ試験におけ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。

プロモータ試験におけるラットに対する肺発がんイニシエーション処置は、*N*-bis-(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN)により行った。DHPN 添加水は、投与時に限外濾過装置（KN614-12, 夏目製作所、東京）を経由した水道水に DHPN（Lot. M8P9950, 含量 96.9%, 岐阜薬科大学）を 0.1%の濃度で添加して作成水した。

2. 動物及び飼育条件

ADME 試験とイニシエータ試験における動物は、雄の F344/DuCrI CrIj 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℃・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。

プロモータ試験における動物は、ほぼ上と同様であるが、4 週齢で入手して 6 週齢で試験に供し、馴化から 10 週齢になるまではポリカーボネートケージにて ALPHA-dri 床敷（エルエスシー株式会社、東京）で 5 匹ずつ収容し、10 週齢になった後に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 匹ずつ収容した。

3. 動物試験方法

[ADME 試験]

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。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¹⁰⁾を参照した。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 で一晚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。

[イニシエータ試験]

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 (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、気管内投与した。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。

[プロモータ試験]

動物試験方法の概略は、図 2 に示した。5 群中 2 群 (I・II 群) には限外濾過装置を経由した水道水を、3 群には (III・IV・V 群) に DHPN 含有水を、それぞれ給水ビンで 2 週間自由に摂取させ、その後 2 週間の休薬期間を設けた。その後は、Milli Q 水で懸濁させたマグネタイトを 0 (I 群, III 群)・5.0 (II・IV 群) あるいは 1.0 mg/kg 体重 (V 群) の用量となるように、いずれも 1 mL/kg 体重の容量で 4 週間毎に 1 回、計 7 回にわたり、気管内投与した。動物は、試験開始から 30 週間後に、イソフルラン麻酔下で屠殺し、腹部大動脈より採血し、抗凝固剤 EDTA-2K を入れた試験管に血液を採取し、多項目自動血球計数装置 (KX-21NV, シスメックス株式会社, 兵庫) にて、赤血球数 (RBC)・白血球数 (WBC)・血色素量 (HGB)・ヘマトクリット値 (HCT)・平均赤血球容積 (MCV)・平均赤血球血色素量 (MCH)・平均赤血球血色素濃度 (MCHC)・血小板数 (PLT) を測定した。剖検時には肉眼観察を行い、以下に示す組織・器官を採取し、下線を付したものについては重量を測定した後に 10%中性緩衝ホルマリン液にて固定した。採取した組織・器官は、脳・下垂体・脊髄 (頸部)・坐骨神経・眼球・ハーダー腺・ジンバル腺・胸腔内大動脈・甲状腺/上皮小体・鼻腔・気管・肺・胸腺・心臓・脾臓・顎下腺/舌下腺・耳下腺・外涙腺・舌・食道・前胃/腺胃・十二指腸・小腸 (空腸・回腸)・大腸 (盲腸・結腸・直腸)・肝臓・膵臓・副腎・腎臓・膀胱・精巢・精巢上体・精囊/凝固腺・前立腺・包皮腺・皮膚・乳腺・リンパ節 (顎下部・胸腺リンパ節・腸間膜)・大腿筋・胸骨 (骨髄を含む)・大腿骨 (骨髄を含む) とその他の肉眼的異常部位であった。肺に発生する肉眼的結節の観察は、ホルマリン固定 2 日後、肺の結節が見易くなった時点で、拡大ルーペ下で周

囲の組織から隆起した輪郭が明瞭なものを、径が 3 mm 未満と 3 mm 以上に分けて計数した。病理組織学的検索は、RITA と NACAD グループ提唱の器官サンプリングとトリミングの方法¹¹⁾により切り出しを行い、全動物について定法に従いパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色後、光学顕微鏡下で観察した。

4. 統計学的解析

ADME 試験の統計学的解析は、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ルウエルチの *t* 検定を行った。イニシエータ試験およびプロモータ試験において、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 の直接確率検定を行った。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

[ADME 試験]

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 3 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 µg/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 4 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 5)。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 5)。

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 6)。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 6)。

[イニシエータ試験]

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 7)、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 7)。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