

201329014A

厚生労働科学研究費補助金研究報告書
化学物質リスク研究事業

カーボンおよび金属ナノマテリアルによる肺および
全身臓器障害と発がん作用の機序解析と
それに基づく中期検索法の開発に関する研究

平成 25 年度

総括・分担研究報告書

研究代表者 津田 洋幸

平成 26 年 (2014 年) 5 月

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

カーボンおよび金属ナノマテリアルによる肺および全身臓器障害と
発がん作用の機序解析とそれに基づく中期検索法の開発に関する研究
(H25-化学-一般-004)

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 津田 洋幸

平成 26 年 (2014 年) 5 月

目 次

I. 総括研究報告書	1
カーボンおよび金属ナノマテリアルによる肺および全身臓器障害と 発がん作用の機序解析とそれに基づく中期検索法の開発に関する研究 津田 洋幸	2
II. 研究分担報告書	13
1. ナノマテリアルの <i>in vitro</i> 毒性評価に関する研究 五十嵐 良明	14
2. ナノマテリアル曝露による炎症誘発で生じるがん原性物質の探索 大島 寛史	24
3. 呼吸器系細胞における細胞障害評価系の確立 今泉 祐治	27
4. 発がんに関与する肺マクロファージの <i>in vitro</i> および <i>in vivo</i> 作用機序解析 酒々井 眞澄	30
5. カーボンおよび金属ナノマテリアルによる肺および全身臓器障害と 発がん作用の機序解析とそれに基づく中期検索法の開発に関する研究 津田 洋幸	34
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	39
IV. 研究成果の刊行物・別冊	43

平成 25 年度厚生労働科学研究費補助金
(化学物質リスク研究事業)

I. 総括研究報告書

研究課題名：カーボンおよび金属ナノマテリアルによる肺および全身臓器障害と発がん作用の機序解析
とそれに基づく中期検索法の開発に関する研究

研究代表者：津田 洋幸 名古屋市立大学津田特任教授研究室 特任教授

研究要旨

津田：多層カーボンナノチューブ（MWCNT）について、長期試験に代替可能な、①短期 *in vitro* 試験法、並びにラットを用いた ② 肺内噴霧投与方法（TIPS 法）による短期解析、および、③発癌プロモーション作用検索モデルにおける多臓器の障害と腫瘍病変発生のモデルから構築される一連の試験法の実用性について、MWCNT の生態影響を明らかにしつつ、検証を行なった。今年度は、分散液中の原体の線維径と凝集体長径の異なる MWCNT-L（長径=8 μ m、太さ直径=150nm、針状）と MWCNT-S（長径=3 μ m、太さ=15nm、綿菓子状）（昭和電工社製）（津田、今泉、大島）および針状の MWCNT-N（酒々井）について検証した。

（以下、①②③は上記に示す3つのモデルに関する研究を指す）

その結果、① 両物質を、ラットより採取した肺胞 M ϕ 培養液中に加え飼食させて得られた培養上清は、ヒト中皮腫細胞、ヒト肺がん細胞等に対する毒性は示すがそれらの細胞に対する増殖刺激作用は無かった。③ラットに予め肺発がん物質を2週間飲水投与後、第5週より両物質を分散液に250 μ g/ml 濃度（250ppm）を気管内噴霧（TIPS）週1回24週まで投与し（計20週、計1.625mg/ラット）、最終投与3日後に屠殺した。MWCNT-L と MWCNT-S は肺実質と胸膜の炎症と線維化を発生させたが、MWCNT-L は臓側、壁側中皮細胞の増殖を誘発した。両物質とも肺発がんプロモーション作用は示さなかった。一方、MWCNT-L は肺から胸腔、全身臓器に移動したが、少量であって局所の炎症は殆どなかった。以上の結果と以下の酒々井班員の同様法での中皮腫発生の結果を併せると、①短期 *in vitro* 試験および、③ 20 週の肺発癌プロモーションモデルが有効であると結論された。

（津田）

酒々井：③ の長期試験において、篩板によって分けた長さの異なる多層カーボンナノチューブ（MWCNT）の肺障害性と発がん性を検討した。雄 F344 ラットに MWCNT-N（日機装社）を TIPS 法で2週間に計8回（合計1.0mg）投与後2年経過まで観察し、被検物質のみの群において2.6 μ m 投与群で心嚢、胸膜の中皮腫 10/25 に発生し、発がんまでの平均経過は94週であった。

今泉は、①の *in vitro* 系において、マウス気道上皮組織から単離した繊毛の動きが観察出来る初代培養繊毛細胞を用いて、MWCNT-L と MWCT-S の繊毛運動への関与を解析した。

② の14日間に8回投与する短期試験において、MWCNT-L/-S ラットの直接的な気道上皮繊毛細胞に対する障害性について観察した。TIPS 投与後 MWCNT は気道上皮繊毛細胞の繊毛に付着し、繊毛細胞の機能低下・細胞障害を引き起こすため、排泄されることなく貯留し、他の上皮細胞に糜爛、潰瘍を形成する顕著な障害をもたらすことを明らかにし

た。

大島：ラットにおいて、TIPS 法によって MWCNT-L(直径 150nm、長径 8micro-m)または MWCNT-S(直径 15nm、長径 3micro-m) (昭和電工社) 250 µg/ml 分散液を 0.5ml、14 日に 8 回投与する短期試験投与後、肺内で生成される種々のアルデヒドを含む活性カルボニル化合物 (RCs) について網羅的解析を行った。対照群の vehicle 群と比較して、投与群では、多くの RCs、特に毒性の強い acrolein、glyoxal、crotonaldehyde、2-hexenal や 4-hydroxyhexenal などが有意に増加していることが認められた。これらは、活性酸素による不飽和脂肪酸の過酸化により生成することから、酸化ストレス障害が惹起されることを示した。

五十嵐：白金について細胞毒性機序を解析した。保護剤としてポリアクリル酸を使用した白金ナノコロイド (PtNP-1)、被覆されていない水系白金ナノ分散液 (PtNP-2) について、Macrophage に分化させた THP-1 細胞に対する毒性を比較検討した。PtNP-1 や PtNP-2 は一定数がナノサイズで存在した。PtNP-1 に比べて PtNP-2 の細胞致死毒性が高かった。PtNP-2 では曝露後に活性酸素種の産生亢進および細胞内グルタチオン濃度の減少が観察され、致死毒性に活性酸素種による細胞の酸化的傷害が関与していることが示唆された。

研究分担者

五十嵐 良明 国立医薬品食品衛生研究所
生活衛生化学部 部長
大島 寛史 静岡県立大学大学院 薬食生命科学総合学府 食品栄養環境科学研究院 教授
今泉 祐治 名古屋市立大学大学院薬学研究科 細胞分子薬効解析学分野 教授
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

山村 寿男 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 准教授
鈴木 良明 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 助教
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
山田 茜 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
二口 充 名古屋市立大学大学院医学研究科 分子医学講座分子毒性学分野 准教授

研究協力者

香川 聡子 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部第一室 主任研究官
内野 正 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部第二室 主任研究官
神野 透人 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 第一室室長
秋山 卓美 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 第二室室長
伴野 勤 静岡県立大学大学院 薬食生命科学総合学府 食品栄養環境科学研究院 客員共同研究員

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 講師
飯郷 正明 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 研究員
吉本 恵理 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 技術職員
徐 結苟 名古屋市立大学津田特任教授研究室 研究員
David B. Alexander 名古屋市立大学津田特任教授研究室 研究員

A. 研究目的

津田：ナノマテリアル（NM：短径 100nm 以下の粒子・線維）には金属粒子やフラーレン、単層/多層炭素ナノチューブ（SWCNT/MWCNT）等がある。とくに炭素ナノマテリアル（CNM）は、生体内で分解代謝されることは無く細胞・組織に沈着するために、従来の化学物質による毒性と発癌の概念

（自体が直接または代謝変換されて結果 DNA 障害を起こす物質に変換されるか代謝の過程で ROS を産生する等）では評価できない。津田等はこれまでの研究より、MWCNT -7（三井社製、凝集体長径 50～120nm）は TIPS 投与すると胸腔、脾、リンパ節、肝、腎、脳等へ移行し、胸腔では臓側中皮に顕著な炎症と中皮増殖を誘発することを報告した（Cancer Science, 2012）。本研究では製造設計によって線維の太さと長径の異なる MWCNT

（MWCNT-L、MWCNT-S）について、TIPS 投与によって肺胞と胸膜中皮における毒性、炎症誘発、細胞増殖刺激の有無と程度、その機序について解析し、その手法が長期試験に代替可能な、①短期 *in vitro* 試験並びにラットを用いた② *in vivo* 系における解析、および、③発癌プロモーションモデルにおける多臓器の障害と腫瘍病変発生のモデルとなり得るかについて、検体の有害性とその作用機序を明らかにしつつ評価モデルの開発研究を行った。

酒々井：③のモデルの被検物質のみの群において、多層カーボンナノチューブ（日機装社、MWCNT-N）のラット肺内曝露に伴う発がん性との関連を胸膜および肺組織像、炎症性サイトカイン発現などに着目して解析を進め、MWCNT のサイズと発がん性について、短期と長期の評価を行い、短期の結果との整合性に付いて明らかにしようとした。

今泉は、カーボンナノチューブの呼吸器に対する毒性発現機構を解明する目的で、①と②の方法において、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、マウスとラットにおいて異物の口腔側への輸送を直接的に担っ

ている気道上皮繊毛細胞に対する細胞障害性の評価系の確立を目指した。

大島班員は、MWCNT の肺毒性機序から長期毒性と発がん性を評価することを目的として、経ラット肺内において生成する種々のアルデヒドを含む活性カルボニル化合物（RCs）について網羅的解析を行った。

五十嵐：白金の抗酸化作用を期待して、主にナノコロイドとして化粧品や健康食品に利用されていることから、実際に細胞生存率や活性酸素種の産生、Ca²⁺シグナリングなどに対する影響を検討し、それらを実験するモデルの開発を行った。

B. 研究方法

津田：MWCNT-L（製造時長径=8μm、太さ直径=150nm）と MWCNT-S（同長径=3μm、太さ=15nm）（昭和電工社製）を用いた。検体は 0.5% Pluronic F68（co-polymer、PF68）に分散懸濁して、投与直前に超音波による再分散をおこなった。投与試料の走査電顕像では、溶媒中のサイズ（長径）は MWCNT-L は不規則な針状・棒状の線維が不定形の凝集塊をつくり、その平均長径は 7.33±3.69μm であった。MWCNT-S は屈曲した線維が綿菓子状に絡まった凝集塊を形成し、それらは大小不同で一部ではシート状を成し大きさの計測は出来なかった。

これらについて、今まで検証して来た以下の試験系において、①ラットの肺胞マクロファージ（Mφ）一次培養液（PAM）に検体 MWCNT を加えた上清が主要臓器由来細胞に対する毒性または増殖誘発をおこなうか、さらにその原因サイトカインの把握を行った、②ラットへの TIPS 投与における MWCNT による肺および新たに開発した胸腔洗浄液（PCL）中の MWCNT の証明とマクロファージと炎症細胞の種類、胸膜の炎症、中皮細胞増殖能を検討した。PCL は深麻酔下にて腹腔より横隔膜経由で胸腔に RPMI1640 培養液を注入して 3 分以内に注射筒にて採取して、遠沈後沈査したペレットはパラフィン包埋して病理学的検査、

上清は蛋白アレイ解析を行なった。検体の観察は偏光顕微鏡にて、とくに MWCNT-S は CytoVita HRA (特殊偏光顕微鏡) による観察を行なった。更に発がんプロモーション作用に関しては、③

③ 予め肺発がん物質 N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN) を飲水投与後、被検物質を 250ppm 濃度にて調製して 0.5ml/ラットを 24 週に 13 回 TIPS 投与し (合計 1.625mg/ラット)、肺、胸膜中皮の増殖性変化を観察した。MWCNT を 20 週投与した群において PCL を採取して病理検査と *in vitro* 解析も行なった (1 群 6 匹)。

酒々井：② のモデルにて雄 F344 ラット (5 群を設定、各群 15 匹) を使い、PF68 分散液中の MWCNT-N について、直径 35 μm の篩板による濾過分画をとった。平均長は濾過前分画 4.2 μm 、濾過分画 2.6 μm 、篩板残存分画 2.6 μm 以上の 3 分画を 250ppm 濃度にて調製して 0.5ml/ラットを 2 週間に 8 回 (総投与量 1.0 mg/ラット) を肺内スプレーし以後 96 週目までの間に死亡あるいは瀕死解剖された個体および 109 週目に剖検された個体について胸膜肥厚、炎症像、中皮腫発生を調べた。また、腫瘍組織よりタンパクを抽出し前年度にマイクロアレイ解析にて発現増加の認められたサイトカイン (Csf3, IL6, Cxcl2, Ccl4) の発現を解析した。

今泉：① *in vitro* における MWCNT の気管線毛運動に対する影響の解析。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、絨毛運動の見られる線毛細胞を選びパッチクランプ法により膜電流、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、膜電位は電位感受性蛍光色素 DiBAC₄(3) を用いて測定した。絨毛運動は高速デジタルビデオカメラで画像として取り込み、運動量を定量的に解析した。② ラットにおいて 2 種類のカーボンナノチューブ (MWCNT-L・MWCNT-S) をそれぞれ PF68 分散液に 250ppm 濃度にて調製して 1、4、7 日目に 0.5ml/ラットを TIPS 投与し、最終投与から 24 時間後に気道上皮組織を摘出し非固定のままチャンバー

内でカーボンナノチューブの貯留を観察した。対照は球形シリカマイクロスフェアを投与して気道での異物クリアランス評価法としての確立を目指した。

大島：ラットの肺組織の分析では当研究室において開発した LC/ESI-MS/MS を用いた (各群 n=10) をホモジナイズ後、クロロホルム：メタノール (2:1) 混液によりアルデヒドやケトンなどのカルボニル化合物 (RCs) を含む画分を抽出した。次にこの RCs 画分中の RCs をカルボニル基と特異的に反応する dansyl hydrazine (DH) と反応させ、RCs-DH 誘導体を作製した。この DH 誘導体を LC/ESI-MS/MS で分析すると、誘導体に特徴的なフラグメントイオン (m/z 236.1) が生じるので、これを SRM(selected reaction monitoring) で検出する。この方法により、未知の RCs を含めて、分子量約 700 までの RCs の存在、濃度、極性などの情報が得られる。

五十嵐：ナノシリカおよびナノ白金粒子懸濁液は、水または PBS、RPMI1640 培地および 10% ウシ胎児血清を含む RPMI1640 培地で希釈し、5 分間超音波処理した。直後あるいは 24 時間静置後に動的光散乱法によって粒度分布を測定した。THP-1 細胞を PMA で処理して 20 時間後に培地を除き、種々の濃度の被験物質を添加、所定時間後、WST-8 (Cell Counting Kit-8) を用いて細胞生存率 (%) を算出した。細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定には FLIPR Calcium 6 Assay Kit (Molecular Devices 社) を用いた。細胞内 Caspase 1 および Caspase 3 活性はそれぞれ Caspase-1/ICE Fluorometric Assay kit (Biovision 社)、Caspase-3/ CPP32 Fluorometric Assay kit (Biovision 社) を用いて測定した。細胞内の活性酸素種を Total ROS/Superoxide Detection Kit (Enzo Life Sciences 社) を用いて測定した。N-Acetylcysteine を添加する実験では、被験物質添加 1 時間前に最終濃度 5 mM になるように添加した。細胞内グルタチオン濃度は GSH-GloTM Glutathione Assay (Promega 社) を用いて定量した。

倫理面への配慮

本研究における倫理面への配慮については、各職員は動物実験及び所属施設において、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「実験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)」を遵守するとともに、当該規程に基づく各施設の動物実験倫理委員会の審査を経た上で研究を実施する。ヒト組織から得た材料を用いる実験は実施しない。

C. 研究結果

津田：① ラットの肺胞 PAM 培養液に検体を加えた上清のヒト中皮腫細胞 (TCC-MES01)、ヒト肺がん細胞 (A549) およびヒト肺線維芽細胞 (CCD34) に対する影響においては、MWCNT-L、MWCNT-S とも増殖刺激作用は見られず、MWCNT-S は細胞毒性 (viability の低下) を示した。③ 予め肺発がん物質の DHPN 処置後に MWCNT-L と MWCNT-S を投与する実験では、MWCNT-L と MWCNT-S ともプロモーション作用は無かったが、肺組織における Mφ と肺胞壁肥厚を主体とする炎症肉芽の数は DHPN 投与に関係なく MWCNT-L の方が有意に多かった。壁側、臓側胸膜組織の肥厚、胸膜中皮細胞の PCNA ラベリング値も MWCNT-L の方が有意に高かった。MWCNT-L は胸腔内 PCL と胸壁組織に沈着して観察されたが光顕、電顕とも MWCNT-S は把握が困難であり CytoViva HRA による観察で僅かに検出されたのみであった。PCL の細胞成分は Mφ、好中球、好酸球およびリンパ球が主体であり、Mφ の胞体中には MWCNT-L が検出された、CD68 陽性 Mφ 数は MWCNT-S より MWCNT-L に多く (約 1.3 ~ 1.5 倍) みられた。また PCL 液層成分中の炎症関連サイトカインアレイ解析では MWCNT-L において PF68 群と比較して IP-10 (7.4 倍)、RANTES (1.8 倍)、IL-2 (11.8 倍)、IL-18 (1.6 倍) であって有意の差異 (増加) であった。MWCNT-S ではこれらは増加しているものの MWCNT-L よりは低値であ

って有意では無かった。MWCNT-L は縦隔、顎下、腸間膜リンパ節、肝類洞、腎糸球血管、脾臓 (洞内) にも検出された。

酒々井：③の方法で被検物質のみを投与する実験で、107 週で終了した (MWCNT-N 投与終了後 101 週)。腫瘍は縦隔 (mediastinum) あるいは心外膜原発 (pericardium) であり、発生頻度は 10/39 (25%) であった。他に 2 例は自然発生と考えられる精巣原発 (tunica vaginalis) と考えられた。発がんまでの平均経過は 94 週であった。腫瘍の発生と、篩板分画による大きさとは関連は無かった。無処置群および vehicle control 群 (コポリマー (PF68) 含有生理食塩水) には腫瘍は認めなかった。組織学的検索の結果、TIPS 投与された MWCNT-N は上縦隔リンパ節、肥厚した横隔膜中皮などに存在した。腫瘍は ERC-mesothelin 陽性で、上皮型および肉腫型中皮腫であった。肺実質での肉芽組腫、focal fibrosis、肺胞上皮過形成を認めた。剖検時に得られた中皮腫組織より抽出したタンパクをウェスタンブロット法にて解析した結果、Csf3、IL6、Cxcl2、Ccl4 の発現が対照群と比べて増加していた。

今泉：①線毛の運動脳保持マウス繊毛気管上皮細胞の培養液中に MWCNT-L または -S を加えて数日間培養したところ、vehicle のみを加えた群に比べ、12 時間後には有意に繊毛運動を停止している繊毛細胞の割合が増加し、また 12 時間後に MWCNT-L 投与群において、繊毛細胞の割合が有意に減少した。②ラットに MWCNT-L または -S を TIPS 投与後にその肺と気管を摘出してパラフィン包埋切片を作成した。免疫組織染色を行ったところ、MWCNT-L 群において繊毛細胞の損傷、上皮の糜爛、潰瘍、再生上皮による非線毛上皮への置換が見られた。気管の横断面での全体の長さに対する病変部の長さの割合について検討したところ、MWCNT-L 群と MWCNT-S 群では vehicle 群と比べて有意にその割合が増加した。これらについて、粘膜下の細胞核を染める DAPI 染色と気管表面の繊毛特異的な抗体を用いた免

疫染色の蛍光の比を MWCNT-L 群と MWCNT-S 群について調べたところ、vehicle 群と比べて MWCNT-L 群では有意に減少したが、MWCNT-S では減少傾向にとどまった。肺においては、MWCNT が沈着している部分にはマクロファージや線維化細胞からなる肉芽形成が見られた。この病変の数は MWCNT-L 群、MWCNT-S 群で vehicle 群と比べて有意に増加した。さらに MWCNT-S 群は MWCNT-L 群と比べて有意に病変部の数が増加していた。

大島：MWCNT-L 及び MWCNT-S を 14 日間、TIPS 投与されたラットの肺試料（各 n=10）を用いて、ROS の存在を網羅的に解析した。その結果、PF68 群、MWCNT-L 群、MWCNT-S 群の肺から、既知、未知を含めて、それぞれ、175、169、149 の DH 誘導体由来のピークが確認された。また、vehicle 群と比較して、MWCNT-L および MWCNT-S 投与群では、それぞれ 115 および 82 個にピーク面積の増加が観察された。以上から、MWCNT-L および MWCNT-S 投与群の肺では、多くの ROS の生成が増大していることが明らかになった。これら中でも、毒性の強い acrolein、glyoxal、crotonaldehyde、2-hexenal や 4-hydroxyhexenal など脂質過酸化由来アルデヒド化合物の有意の増加（1.3~2.1 倍）を確認した。これらのアルデヒド化合物は、核酸やタンパク質との反応性が高く、付加体を形成して、突然変異やタンパク質の機能障害を引き起こすことから、酸化ストレスに関連した発がんあるいは疾病の発症において重要な役割を果たしているものと考えられた。

五十嵐：SiO₂-50 nm 懸濁液の二次平均粒子径は媒体の種類に係わらず 80~100 nm であった。PtNP-1 および PtNP-2 を血清添加培地に懸濁した直後の二次平均粒子径はそれぞれ 57 nm、108 nm で、24 時間静置後もほとんど変化なかった。PtNP-1 については細胞生存率の低下は認められなかったが、PtNP-2 では顕著な細胞生存率の低下が観察され、その半数致死濃度は SiO₂-50 nm よりも低かった。いずれの被験物質についても、細胞内 Ca²⁺濃度の有意な増加は観察されなかった。曝露に伴う細胞内 Caspase 1 活性、Caspase 3 活

性の変動は認められなかった。PtNP-2 曝露後、顕著な Total ROS レベルの上昇が認められた。Superoxide 産生量については、PtNP-2 曝露 10 分後にコントロール群の約 2 倍の上昇が認められた。一方、SiO₂-50 nm 曝露によっては Total ROS 並びに Superoxide の産生量上昇は認められなかった。PtNP-2 曝露によって引き起こされる活性酸素種の上昇は、N-Acetylcysteine によって抑制された。PtNP-2 曝露後の細胞内グルタチオン濃度は濃度依存的に約 40%程度減少したが、SiO₂-50 nm では認められなかった。

D. 考察

①ラットの肺胞 PAM に検体を加えた上清のヒト中皮腫細胞（TCC-MES01）ヒト肺がん細胞（A549）およびヒト肺線維芽細胞（CCD34）に対しては、MWCNT-L、MWCNT-S とも毒性が観察され、Mφ から分泌された cytotoxic なサイトカインによるものと考えられ、アレイ解析で検出された IP-10、RANTES、IL-2、IL-18 等が関与している可能性がある。さらに、③の方法で DHPN 投与によるプロモーション作用の検出モデルは、今までに二酸化チタニウム（動物に発がん性あり、IARC Monograph 分類 Group 2）で陽性結果でありその妥当性が証明されている。本実験では、肺胞上皮の過形成、過形成+腺腫+腺がん合計数の肺切片単位面積あたりの数（/cm²）において、DHPN→PF68 群と比較して有意差はなく、MWCNT-L と MWCNT-S には肺発がんプロモーション作用は無いことが示された。一方、③の方法で胸膜組織の肥厚は壁側、臓側とも MWCNT-S よりも MWCNT-L においてより著明であり、胸膜中皮 PCNA ラベリング値も同様に MWCNT-L で PF68 群より顕著であった（PF68 の約 10 倍）。このことは、壁組織中に沈着した MWCNT-L が胸膜炎を惹起したことによるもので、とくに MWCNT-L と MWCNT-S は多くは Mφ に貪食された状態で持続的な炎症反応を起こしたものと考えられる。このことは②の短期試験（通常 2 週）は必ずしも実施しなくても良い可能性を示す。③の検体から得た PCL 検査では、細胞成分は Mφ、好中

球、好酸球およびリンパ球が主体であり、Mφの胞体中にはMWCNT-Lが検出されたが、MWCNT-SはCytoViva HRAにて主としてMφ内にかろうじて少数見出されたのみであった。総白血球数、そのうちのCD68陽性Mφ数はMWCNT-Lに多く(約1.3~1.5倍)みられた。またPCL液層成分の炎症関連サイトカインアレイ解析ではMWCNT-LにおいてPF68群と比較してIP-10、RANTES、IL-2、IL-18が有意の増加であり、MWCNT-Sではこれらは増加しているもののMWCNT-Lよりは低値であったことはMWCNT-LはMWCNT-Sより強い炎症誘導作用が有ると解釈された。この研究から、今年度の提案のひとつである臓器発がんプロモーションモデルは現状では実際的ではなく、むしろ、胸膜中皮腫の発生があることが示唆された(津田)。

以上のことは、酒々井のMWCNT-Nの研究で証明されつつあることになる。すなわち、③のイニシエーション処置無しの方法で途中死亡および剖検時まで生き残った個体数に対する縦隔あるいは心外膜原発の中皮腫の発生頻度は25%であった。精巣原発の中皮腫の発生頻度は5%であった。同系統ラット120から131週までの自然経過で肺腺がんの発生頻度は2%、縦隔原発線維肉腫の発生頻度は2%、腹膜中皮腫の発生頻度は2~4%との報告がある。本研究での縦隔あるいは心外膜原発中皮腫の発生頻度は自然発症腫瘍の6~12倍であった。投与したMWCNT-Nの平均粒子径は2.6 μm以上である。肺内スプレー法で投与されたCNT粒子は気管から肺実質に至り何らかの経路で(マクロファージの取り込み、リンパ流への拡散など)縦隔あるいは心外膜に到達し、中皮腫の発生に至ったと考えられた。2年経過時でも肺実質の炎症像や肺胞上皮過形成はあるが、肺腫瘍の発生は無かった(酒々井)。

気管の上皮の繊毛細胞は第一線の防御機構であり、繊毛の動きによって外来因子を咽頭側へと排出する。繊毛細胞の損傷は粘液繊毛保護作用を損ない、粒子や微生物が炎症を誘発して気管、気管支、肺での細胞増殖と発癌要因として作用する。今回、①の*In vitro*試験においてMWCNTによっ

て繊毛細胞の機能が損なわれたが、これは気道クリアランスを低下させている可能性が示された。

②の短期試験において、MWCNTによって気道の繊毛上皮細胞の広汎な損傷が起こり、気道上皮の反応性再生が惹起されることを見出した。MWCNTのクリアランスの低下によってMWCNT-Nの気道毒性が予測外に顕著であることが明らかになり、今後長期吸入毒性試験の実施において十分に考慮すべき知見を得た。またMWCNT-S肺胞の肉芽形成の増加といった炎症性の変化が著明であることはMWCNTの毒性は臓器親和性の影響を受け、大きさや形状が影響しているとも考えられる。これらの相違の機構を検証するためにさらなる実験が必要である。(今泉)

②の短期試験におけるMWCNT-L、MWCNT-Sによる炎症によって産生される過酸化物の解析では、毒性の強いことで知られているacrolein、glyoxal、crotonaldehyde、2-hexenalや4-hydroxyhexenalなどのアルデヒド類が、対照群に比べて、著しく増加していることが明らかになった。これらのアルデヒド類は、活性酸素による不飽和脂肪酸の過酸化により生成することから、肺内で酸化ストレスが亢進していることを示している。このことは、津田、酒々井等の8-OHdGの産生増加の知見と併せて重要である。今後、MWCNT-L、MWCNT-S投与による酸化ストレス亢進の機構、RCsの生成の差異や発がん性が知られている青石綿曝露との比較、炎症との関連などについて検討していく必要がある。

異物炎症におけるNLRP3 Inflammasomeの活性化とそれに関連するCaspase-1の活性化およびInterleukin-1βの分泌亢進カスケードの解析を試み、細胞障害の分子機序の解明をおこなっている。最近、この活性化に細胞内Ca²⁺の動員が重要な役割を担っていることが明らかにされた。白金ナノ粒子による細胞毒性発現にInflammasomeの活性化が関与する可能性を明らかにする目的で、PMA処理によってMacrophageに分化させたTHP-1細胞を用いて検討したところ、細胞内Ca²⁺濃度の増加やCaspase 1および

Caspase 3 活性の上昇は観察されなかった。したがって、PtNP-2 による細胞死は、Pyroptosis によるものではないと考えられる。粒子表面に保護剤がない白金ナノ分散液 PtNP-2 は、表面を保護剤ポリアクリル酸でコートした白金ナノコロイドに比べて細胞毒性が高かった。PtNP-2 曝露後から Total ROS レベルならびに Superoxide レベルの顕著な上昇が認められ、さらに、PtNP-2 曝露後に細胞内グルタチオン量の低下も観察されたことから、PtNP-2 の細胞毒性発現には活性酸素種の産生による酸化的な傷害が関与しているものと推察された（五十嵐）。

E. 結論

肺内に投与した MWCNT-L と MWCNT-S にはともにラット肺発がんプロモーション作用はなかった。MWCNT-L と MWCNT-S は肺実質と胸膜の炎症と線維化をおこす。胸膜組織と上皮に対する障害と中膜上皮の増殖作用は MWCNT-L のほうが MWCNT-S より顕著であることが分かった。このことは、MWCNT の凝集体の形と大きさが、障害標的臓器の関与することを示す。MWCNT-L は肺から胸腔、全身臓器に移動するが、炎症や障害作用は観察されなかった。移動経路はリンパ流と血流の両方が考えられる。以上の結果は、肺、胸膜に対する作用は、①短期 *in vitro* 試験および、③ 24 週の発癌プロモーションモデルで実施可能であることを示す。また、MWCNT-S は走査電顕では観察出来ない（組織と区別が困難）ので CytoViva HRA による偏光による観察で一部は可視化できるが、すべてについての生体・細胞内で把握することは容易でない（津田）。

MWCNT-N を TIPS 投与しすると肺内から胸腔に移動し胸膜や縦隔中皮を標的に中皮腫を発生させる。このことは上記の津田の研究で見られた中皮増殖作用と関連していると考えられた。本研究では篩板による大きさに関係なく平、凝集体の均粒子径 2.6 mm 以上の MWCNT-N について肺内到達後に 1 年以上経過した場合に中皮腫が発生するので時間経過を十分に考慮する必要がある（津

田、酒々井）。

MWCNT は肺と胸膜中皮以外に気管繊毛細胞に広範な障害を来すことが初めて明らかにされた。繊毛細胞機能への影響や障害性については観察された範囲では物理的な影響が考えられるが、今後その分子機序を検討する必要がある（今泉）。

上記の肺、胸膜中皮への障害作用の機序として、投与物質が何らかの機序、例えば炎症の場や Mφ を介して毒性の強い acrolein、glyoxal、crotonaldehyde、2-hexenal や 4-hydroxyhexenal などを増加させることが明らかとなった。これらの物質は、活性酸素による不飽和脂肪酸の過酸化により生成することから、肺内で酸化ストレスが亢進していることを示している（大島）。また、異物による炎症の分子機序としてナノシリカやナノ白金粒子について Inflammasome の活性化が関与する可能性を想定した研究では、曝露後に活性酸素種産生の亢進および細胞内グルタチオン濃度の減少が認められたことから、活性酸素種の関与が示唆された（五十嵐）。

以上、多層カーボンナノチューブ（MWCNT）について、長期試験に代替可能な、①短期 *in vitro* 試験並びにラットを用いた② 肺内噴霧投与方法（TIPS 法）による短期解析、および、③発癌プロモーション作用検索モデルにおける多臓器の障害と腫瘍病変発生モデルの実用性について検討した結果、①②③の方法によって、機序に基づいて代替が可能であると考えられた。ただし、場合によっては投与期間は長くなるが②の 2 週間投与は③の被検物質のみを 20 週程度投与する方法にて代替できる可能性が示唆された。

F. 健康危機情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Miyoshi N, Iuliano L, Tomono S, Ohshima H
Implications of cholesterol autoxidation

- products in the pathogenesis of inflammatory diseases. *Biochem Biophys Res Commun.* 446:702-708. 2014
2. Ohba T, Sawada E, Suzuki Y, Yamamura, H, Ohya S & Imaizumi Y. *J Pharmacol Exp Ther* 347:145–153, 2013. Enhancement of Ca²⁺ Influx and Ciliary Beating by Membrane Hyperpolarization due to ATP-Sensitive K⁺ Channel Opening in Mouse Airway Epithelial Cells.
 3. Teruya Ohba, Jiegou Xu, David Bedell Alexander, Akane Yamada, Jun Kanno, Akihiko Hirose, Hiroyuki Tsuda, Yuji Imaizumi. *J Toxicological Science* in press, 2014. MWCNT causes extensive damage to the ciliated epithelium of the trachea of rodents
 4. Sakai Y, Fukamachi K, Futakuchi M, Miyoshi I, Tsuda H, Suzui M, Hayashi H. A novel transgenic mouse model carrying human tribbles related protein 3 (TRB3) gene and its site specific phenotype. *Biol Pharm Bull*, in press.
 5. Nunamo T, Xu J, Futakuchi M, Alexander DB, Furukawa F, Kanno J, Hirose A, Tsuda H, Suzui M. Comparative study of toxic effects of anatase and rutile type nanosized titanium dioxide particles in vivo and in vitro. *Asian Pac J Cancer Prev*, 15: 929-935, 2014.
 6. Xu J, Futakuchi M, Alexander DB, Fukamachi K, Numano T, Suzui M, Shimizu H, Omori T, Kanno J, Hirose A, Tsuda H. Nanosized zinc oxide particles do not promote DHPN-induced lung carcinogenesis but cause reversible epithelial hyperplasia of terminal bronchioles. *Arch Toxicol*, 88: 65-75, 2014.
 7. Suzui M, Morioka T, Yoshimi N. Colon preneoplastic lesions in animal models. *J Toxicol Pathol*, 26: 335-341, 2013.
 8. Sakai Y, Fukamachi K, Futakuchi M, Hayashi H, Suzui M. Promotive effects of cell proliferation and chromosomal instability induced tribbles-related protein 3 in mouse mammary tumor cells. *Oncol Rep*, 30: 64-70, 2013.
 9. Fukamachi K, Tanaka H, Sakai Y, Alexander DB, Futakuchi M, Tsuda H, Suzui M. A novel reporter rat strain that express LacZ upon Cre-mediated recombination. *Genesis*, 51: 268-274, 2013.
 10. Yabushita S, Fukamachi K, Tanaka H, Fukuda T, Sumida K, Deguchi Y, Mikata K, Nishioka K, Kawamura S, Uwagawa S, Suzui M, Alexander DB, Tsuda H. Metabolomic and transcriptomic profiling of human K-ras oncogene transgenic rats with pancreatic ductal adenocarcinomas. *Carcinogenesis*, 34: 1251-1259, 2013.
 11. Yabushita S, Fukamachi K, Kikuchi F, Ozaki M, Miyata K, Sukata T, Deguchi Y, Tanaka H, Kakehashi A, Kawamura S, Uwagawa S, Wanibuchi H, Suzui M, Alexander DB, Tsuda H. Twenty-one proteins up-regulated in human H-ras oncogene transgenic rat pancreas cancers are up-regulated in human pancreas cancer. *Pancreas*, 42: 1034-1039, 2013.
 12. Masuda M, Toh S, Wakasaki T, Suzui M, Joe AK. Somatic evolution of head and neck cancer-biological robustness and latent vulnerability. *Mol Oncol*, 7: 14-28, 2013.

2. 学会発表

国内学会

1. 大羽輝弥、澤田英志、鈴木良明、山村寿男、大矢進、今泉裕治「気道上皮細胞での KATP チャンネル開口薬による繊毛運動活性化機構」
2. 大羽輝弥、澤田英志、鈴木良明、山村寿男、大矢進、今泉裕治「K_{ATP} チャンネル活性化による繊毛運動活性化機構の解明」 第 124 回日本薬理学会近畿部会. 2013 年 11 月 1 日 (京都)
3. 大羽輝弥、澤田英志、鈴木良明、山村寿男、大矢進、今泉裕治「蛍光ビーズを用いた気道クリアランス評価系の開発」 第 87 回日本薬理学会年会. 2014 年 3 月 21 日 (仙台)
4. 津田洋幸、徐結苟、David B. Alexander、飯郷正明、徳山猛、宇佐美郁治、林嘉光、小栗鉄也、高橋智、酒々井眞澄、広瀬明彦、菅野純. アスベスト曝露及び悪性中皮腫の血清診断マーカーとしてサイトカイン Mip1 α (CCL3) の有用性. 第 20 回日本がん予防学会; 東京: 2013 年 7 月 5 日
5. 津田洋幸、徐結苟、酒々井眞澄、二口充、深町勝巳、菅野純、広瀬明彦. 多層カーボンナノチューブとアスベストの経気管肺内噴霧投与による胸膜中皮の増殖. 第 40 回日本毒性学会学術年会; 幕張: 2013 年 6 月 17 日
6. 二口充、徐結苟、深町勝巳、津田洋幸、酒々井眞澄. ナノ材料の噴霧暴露後、長期間経過して発生するリスクの背景となる肺組織の検索. 第 40 回日本毒性学会学術年会; 幕張: 2013 年 6 月 18 日
7. 酒々井眞澄、沼野琢旬、深町勝巳、二口充、津田洋幸. 多層カーボンナノチューブのラット肺ばく露に伴う炎症プロファイルと遺

伝子発現特性. 第 40 回日本毒性学会学術年会; 幕張: 2013 年 6 月 18 日

8. 深町勝巳、大嶋浩、二口充、津田洋幸、酒々井眞澄. 血清診断が可能なラット肺がんモデル. 第 40 回日本毒性学会学術年会; 幕張: 2013 年 6 月 18 日
9. 柴田耕治, 辻厚至, 佐賀恒夫, 深町勝巳, 二口充, 津田洋幸, and 酒々井眞澄 (2013). ラット膈管がんモデルに対する小動物用 PET/CT による in vivo イメージング. 第 28 回発癌病理研究会 沖縄, 8 月 26 日-28 日.

国際学会

1. M. Suzui, T. Numano, M. Futakuchi, K. Fukamachi. Evaluation of carcinogenic effect of multiwall carbon nanotubes on the rat lung at 2 and 52 weeks after pulmonary instillation. American Association for Cancer Research Annual Meeting 2013; Washington DC: April 9, 2013.
2. T. Numano, J. Xu, M. Futakuchi, K. Fukamachi, F. Furukawa, M. Suzui, H. Tsuda. Effect of anatase type nanosized titanium dioxide particles on the rat lung and cultured macrophage. American Association for Cancer Research Annual Meeting 2013; Washington DC: April 9, 2013.
3. M. Suzui, S. Ikenaga, Y. Isoda, T. Numano, K. Fukamachi, M. Futakuchi, H. Tsuda. Inflammation profile and gene expression status induced by intratracheal instillation of the multiwall carbon nanotube into rat lung. The XIII International Congress of Toxicology 2013; Seoul: July 3, 2013.

4. Fukamachi, K., Ohshima, Y., Futakuchi, M., Tsuda, H., and Suzui, M. (2013). A rat model of preclinical diagnosis of lung carcinoma. 72nd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association Yokohama, Oct.3 - Oct. 5.

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 25 年度厚生労働科学研究費補助金
(化学物質リスク研究事業)

Ⅱ. 研究分担報告書

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

カーボンおよび金属ナノマテリアルによる肺および全身臓器障害と発がん作用の機序解析と
それに基づく中期検索法の開発に関する研究

ナノマテリアルの *in vitro* 毒性評価に関する研究

研究分担者	五十嵐 良明	国立医薬品食品衛生研究所生活衛生化学部 部長
研究協力者	香川 聡子	国立医薬品食品衛生研究所生活衛生化学部第一室 主任研究官
	内野 正	国立医薬品食品衛生研究所生活衛生化学部第二室 主任研究官
	神野 透人	国立医薬品食品衛生研究所生活衛生化学部第一室 室長
	秋山 卓美	国立医薬品食品衛生研究所生活衛生化学部第二室 室長

研究要旨

白金は”抗酸化作用”を期待して、主にナノコロイドとして化粧品や健康食品に利用されているものの、細胞毒性をはじめとする有害性に関しては限られた情報しか得られていない。そこで、本研究では保護剤としてポリアクリル酸を使用した白金ナノコロイド (PtNP-1)、ならびに保護剤を含まない水系白金ナノ分散液 (PtNP-2) について、各種媒体中での粒度分布を測定するとともに、Macrophage に分化させた THP-1 細胞に対する毒性を比較、検討した。その結果、PtNP-1 や PtNP-2 は細胞培養を想定した条件において、一定量が 100 nm 未満のナノサイズで存在することがわかった。PtNP-1 に比べて、粒子表面が保護剤で被覆されていない PtNP-2 の細胞致死毒性が高いことが明らかになった。24 時間曝露の PtNP-2 の LC₅₀ 値は約 30 µg/ml であった。さらに、致死毒性の発現メカニズムについて検討を行った結果、PtNP-2 曝露後に活性酸素種の産生亢進および細胞内グルタチオン濃度の減少が観察され、水系白金ナノ粒子 PtNP-2 の致死毒性に活性酸素種による細胞の酸化的傷害が関与していることが示唆された。

A. 研究目的

金属ナノマテリアルは化粧品、抗菌・消臭剤などの消費生活用製品から食品に至るまで様々な製品に用いられており、製品の使用や食品の摂取に伴う直接的な曝露に加えて、室内空気・ハウスダストなどの環境媒体を介した曝露が懸念される状況になりつつある。

酸化チタンナノ粒子など、一部の金属ナノマテリアルについてはその健康影響に関して比較的多くの情報が集積されている。一方、白金は”抗酸化作用”を期待して、主にナノコロイドとして化粧品や健康食品に利用されているものの、細胞毒性をはじめとする有害性に関しては限られた情報しか得られていない。そこで、本研究ではナノ白金粒子に着目し、Macrophage に分化させた THP-1 細胞の細胞生存率や活性

酸素種の産生、Ca²⁺シグナリングなどに対する影響を検討した。

さらに、金属ナノマテリアルの毒性試験、特に *in vitro* 細胞毒性試験において Inflammasome など“ナノ粒子の形態”に依存する生体影響を評価するためには、試験懸濁液中での金属ナノマテリアルの分散状態を特徴づけることが必要不可欠であり、本研究ではこの点についても粒度分布の経時的な変化を含めて検討を行った。

B. 研究方法

B-1. 材料及び試薬

平均一次粒子径 20、50 または 100 nm のナノシリカ (SiO₂-20 nm、SiO₂-50 nm、SiO₂-100 nm) のエチレングリコール懸濁液を Alfa Aesar 社か

ら入手した。このうち細胞毒性実験には平均一次粒子径 50 nm のナノシリカ (SiO₂-50 nm; 30% エチレングリコール懸濁液; #43093) を用いた。平均一次粒子径 2 nm の白金ナノコロイド (PtNP-1; 水懸濁液、表面保護剤としてポリアクリル酸で処理) は田中貴金属から、平均一次粒子径 100 nm 未満の水系白金ナノ分散液 (PtNP-2; 50% Ethanol 懸濁液、保護剤なし、四国計測工業製) は関東化学から購入した。

B-2. 粒度分布の測定

ナノシリカをポリプロピレン製試験管にとり、10 mg/ml の濃度になるように水 (H₂O) またはリン酸緩衝液 (PBS) を加え、5 分間超音波洗浄機で処理した。それぞれの懸濁液は水、あるいは PBS、RPMI1640 培地および 10% ウシ胎児血清 (FBS) を含む RPMI1640 培地 (10%FBS-RPMI1640 medium) で 100 µg/ml に希釈し、5 分間超音波処理した。処理後すぐに (0 hr) 動的光散乱法による粒度分布を測定した。これらの希釈懸濁液は 37°C、5%CO₂ インキュベーター内で 24 時間静置した後、再度粒度分布を測定した。

ナノ白金粒子懸濁液は、10%FBS-RPMI1640 medium で 100 µg/ml に希釈した後、5 分間超音波処理し、粒度分布を測定した。また、ナノシリカと同様に 37°C で 24 時間静置後、再度粒度分布を測定した。

B-3. 細胞

ヒト末梢血単球由来の THP-1 細胞 (ヒューマンサイエンス振興財団) を 10% 牛胎ウシ血清 (FBS) を含む RPMI1640 培地 (Gibco Life Technologies 社) で 5% CO₂、95% Air、37°C の条件下で培養した。THP-1 細胞を Macrophage 様細胞に分化誘導させる目的で Phorbol Myristate Acetate (PMA、和光純薬工業) を試験 20 時間前に最終濃度として 200 nM となるように添加した。

B-4. 細胞毒性

THP-1 細胞を 96-well Plate に 10⁵ cells/well の細胞密度で播種し、PMA で処理して 20 時間後に培地を除き、種々の濃度の被験物質溶液 100 µl を添加した。試験は Triplicate で実施した。被験物質を添加して所定時間経過後に培地を交換し、各 Well に WST-8 (Cell Counting Kit-8) 10 µl を添加して 1 時間 CO₂ インキュベーター内で反応させた。マイクロプレートリーダーを用いて測定波長 450 nm における吸光度を測定し、コントロールに対する吸光度の比から細胞生存率 (%) を算出した。

B-5. 細胞内 Ca²⁺濃度

細胞内 Ca²⁺濃度の測定には FLIPR Calcium 6 Assay Kit (Molecular Devices 社) を用いた。96-well Plate に THP-1 細胞を 10⁵ cells/well の細胞密度で播種し、PMA で処理して 24 時間培養後に培地を除去して Calcium Indicator (Calcium 6) を添加した後に 37°C で 1 時間インキュベーションした。FlexStation 3 (Molecular Devices 社) を用いて被検物質添加後の蛍光強度の経時的な変化を励起波長 485 nm、蛍光波長 525 nm で測定した。相対蛍光強度 (Relative fluorescence units) を指標として細胞内 Ca²⁺濃度の増加を評価した。

B-6. 細胞内 Caspase 1 および Caspase 3 活性

細胞内 Caspase 1 および Caspase 3 活性はそれぞれ Caspase-1/ICE Fluorometric Assay kit (Biovision 社)、Caspase-3/CPP32 Fluorometric Assay kit (Biovision 社) を用いて測定した。THP-1 細胞を 35-mm Dish に 2×10⁶ cells/dish の細胞密度で播種し、PMA で処理して 20 時間後に種々の濃度の被験物質を添加した培地 2 ml に交換した。試験は 1 濃度当たり Triplicate で実施した。被験物質を添加して 90 分あるいは 20 時間後に培地を除き、氷冷 PBS で 2 回洗浄した後に氷冷した Cell Lysis Buffer (Biovision 社) 50 µl を添加した。氷上で 10 分間インキュベート

した後に細胞溶解液を回収した。それぞれの検体に 10 mM DTT ならびに Caspase-1 または Caspase-3 の基質 (YVAD-AFC または DEVD-AFC) を含む 2 倍濃縮反応緩衝液 50 μ l を添加し、37 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベーションした後、励起波長 400 nm、蛍光波長 505 nm の蛍光強度を測定した。なお、基質濃度はいずれも最終濃度 50 μ M とした。

B-7. 細胞内活性酸素種

細胞内の活性酸素種を Total ROS/Superoxide Detection Kit (Enzo Life Sciences 社) を用いて測定した。THP-1 細胞を 96-well Plate に 10⁵ cells/well の細胞密度で播種し、PMA で処理して 20 時間後に培地を除き、種々の濃度の被験物質溶液 100 μ l を添加した。試験は 1 濃度当たり Hexaplicate で実施した。被験物質を添加して 10 分後あるいは 30 分後に培地を除き、各 Well に ROS/Superoxide 検出試薬 100 μ l を添加して 37 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートした。FlexStation 3 を用いて励起波長 485 nm、蛍光波長 525 nm の蛍光強度を測定し、Total ROS 産生量の指標とした。また、励起波長 550 nm、蛍光波長 610 nm の条件で Superoxide 産生量を測定した。*N*-Acetylcysteine を添加する実験では、被験物質添加 1 時間前に最終濃度 5 mM になるように添加した。

B-8. 細胞内グルタチオン濃度

細胞内グルタチオン濃度は GSH-GloTM Glutathione Assay (Promega 社) を用いて定量した。THP-1 細胞を 96-well Plate に 10⁵ cells/well の細胞密度で播種し、PMA で処理して 20 時間後に培地を除き種々の濃度の被験物質溶液 100 μ l を添加した。試験は 1 濃度当たり Triplicate で実施した。被験物質を添加して 10 分後に培地を除き、各 Well に発光前駆体基質 Luciferin-NT とグルタチオン S-トランスフェラーゼを含む反応溶液 100 μ l を添加した。室温で 30 分間インキュベーションした後に、Luciferin

検出試薬 100 μ l を添加し室温で 15 分間インキュベーションした。FlexStation 3 を用いて各 well の発光強度を測定し、既知濃度のグルタチオン標準液の発光強度から細胞内グルタチオン量を求めた。

C. 研究結果

C-1. 粒度分布

SiO₂-50 nm、SiO₂-100 nm の懸濁液の二次平均粒子径は、希釈に用いた媒体の種類に係わらず、それぞれ 80~100 nm、および 110~140 nm であった。細胞培養液に懸濁したとき粒度分布が若干大きい方に広がった (図 1, 表 1)。一方、SiO₂-20 nm は他の大きさの粒子と比べると、各種媒体で希釈したときに凝集する割合が大きかった。媒体の中では PBS に希釈したときの分布形状が幅狭く 1 つのピークとなった。しかしいずれにおいても 12%程度は 100 nm 以下の範囲にあった (図 1)。一次粒子径がそれぞれ異なるナノシリカであっても、血清添加培養液に懸濁して 24 時間経過したときの粒度分布はほとんど変わらなくなった (図 2)。他の媒体に希釈して 24 時間インキュベートした後の粒度分布は、インキュベート前とほとんど変化しなかった (図 2, 表 1)。24 時間静置したとき、100 nm 以下の粒子の割合は全体の約 13~33%であった。

PtNP-1 および PtNP-2 を血清添加培地に懸濁した直後の二次平均粒子径はそれぞれ 57 nm、108 nm で、24 時間静置後も 52 nm、111 nm でであった。粒度分布もほとんど変化なく、PtNP-1 は半数、PtNP-2 は約 30%が 100 nm 以下であった (図 3)。

C-2. 細胞毒性

PtNP-1、PtNP-2 および SiO₂-50 nm について、最高濃度 200 μ g/mL から公比 2 で段階希釈した 6 試験濃度を設定し、PMA 処理 THP-1 細胞に対する致死毒性を評価した。各被験物質添加 24 時間後の細胞生存率を図 4 に示した。白金ナノ

コロイド PtNP-1 については今回の試験条件下では添加 24 時間後の細胞生存率の低下は認められなかった。これに対して、水系白金ナノ粒子分散液 PtNP-2 では顕著な細胞生存率の低下が観察され、その半数致死濃度 LC₅₀ 値 (約 30 µg/mL) は同時に評価した SiO₂-50 nm の LC₅₀ 値よりも低い値であった。

C-3. 細胞内 Ca²⁺濃度に対する影響

PtNP-1、PtNP-2 および SiO₂-50 nm について、最高濃度 200 µg/mL (終濃度) から公比 2 で段階希釈した 7 試験濃度を設定し、PMA 処理 THP-1 細胞の細胞内 Ca²⁺濃度に対するナノマテリアルの影響について検討を行った。その結果、いずれの被験物質についても、添加後短時間 (1 分以内) での細胞内 Ca²⁺濃度の有意な増加は観察されなかった (data not shown)。

C-4. 細胞内 Caspase 1 活性および Caspase 3 活性に対する影響

PtNP-1、PtNP-2 および SiO₂-50 nm 添加 30 分後あるいは 20 時間後の PMA 処理 THP-1 細胞内 Caspase 1 活性および Caspase 3 活性を評価した。その結果、今回の試験条件下ではいずれの被験物質についても曝露に伴う細胞内 Caspase 1 活性、Caspase 3 活性の変動は認められなかった (data not shown)。

C-5. 細胞内活性酸素種の産生

PMA 処理 THP-1 細胞において細胞生存率の低下を引き起こすことが判明した PtNP-2 および SiO₂-50 nm について、致死毒性に対する活性酸素種の関与について検討した。細胞生存率の有意な低下が認められる濃度、すなわち PtNP-2 の場合は 25 µg/mL および 200 µg/mL、SiO₂-50 nm の場合は 50 µg/mL および 200 µg/mL の濃度の被験物質を PMA 処理 THP-1 細胞に曝露し、10 分後及び 30 分後に Total ROS 並びに Superoxide の産生量を測定した。その結果、PtNP-2 曝露 10 分後において顕著な Total ROS

レベルの上昇が認められ、曝露濃度 25 µg/mL 時ではコントロール群の約 5 倍、200 µg/mL ではコントロール群の約 50 倍まで増加し、曝露 30 分後においても同レベルの上昇が観察された (図 5)。

Superoxide 産生量については、PtNP-2 曝露 10 分後に 200 µg/mL 曝露群でコントロール群の約 2 倍の上昇が認められ、処理 30 分後においても同レベルであった (図 5)。一方、SiO₂-50 nm 曝露によっては 10 分後及び 30 分後いずれにおいても Total ROS 並びに Superoxide の産生量上昇は認められなかった (図 5)。

PtNP-2 曝露によって引き起こされる PMA 処理 THP-1 細胞の活性酸素種の上昇は、グルタチオンの前駆体でそれ自身も抗酸化作用を有することが知られている *N*-Acetylcysteine 前処理によって 20%ないし 25%抑制された (図 6)。

C-6. 細胞内グルタチオン濃度

PtNP-2 および SiO₂-50 nm の曝露による細胞内グルタチオン濃度の変化を評価した。その結果、PtNP-2 曝露 30 分後の細胞内グルタチオン濃度は PtNP-2 濃度依存的に約 40%程度減少する傾向が認められた (図 7)。これに対して、SiO₂-50 nm 曝露 30 分後においては処理したいずれの濃度においても細胞内グルタチオン濃度の減少は認められなかった (図 7)。

D. 考察

一般に粒子径が小さい粒子は凝集しやすいことが知られている。実際、ナノシリカの場合、SiO₂-20 nm は SiO₂-50 nm や SiO₂-100 nm に比べて、各種媒体中で凝集し、平均二次粒子径が大きくなった。SiO₂-20 nm の粒度分布は、一次粒子径に近い 30 nm 付近と、140 nm 付近の、2つのピークがあり、PBS 中では前者が、水中では後者が主要なピークとなった (図 1)。一方、血清を含む培地に懸濁してしばらくの間は両方のピークが見られるが、24 時間放置後には後者のみになった (図 2)。一次粒子径に加えて媒体の組