

201428008A

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 26 年度

総括・分担研究報告書

研究代表者 津田 洋幸

平成 27 年 (2015 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 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 津田 洋幸

平成 27 年 (2015 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	20
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	23
4. カーボンナノマテリアル肺内投与に伴うサイトカイン発現プロファイル 酒々井 眞澄	26
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	31
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	37
IV. 研究成果の刊行物・別冊	41

平成 26 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

多層カーボンナノチューブ（MWCNT）の毒性と発がん性の評価について、ラットによる長期試験に代替可能なモデルとして、①短期 *in vitro* 試験法、②吸入暴露に替わる 1～2 週肺内噴霧投与（TIPS）による *in vivo* 短期毒性解析法、③ 20 週程度の発癌プロモーション段階に投与する中期検索法からなるナノマテリアルの吸入暴露試験に替わる試験方法の開発と同時に実際の毒性、発がん性を検索してきた。今年度は、③より派生した④イニシエーション処置は行わずに、検体のみを一定期間投与する場合の病変の可逆性と長期（2 年）発がん性の検討を行い提案し、①②③④の妥当性について検討した。

26 年度は以下の①②④のプロトコルを用いて研究を行った。

1) 凝集体が針状/棒状の MWCNT-L（昭和電工）、陽性対照の MWCNT-7（保土谷化学工業、WHO/IARC にて Group 2B--動物発がん十分な証拠）および青アスベストの crocidolite（UICC grade、WHO/IARC にて Group 1--ヒト発がん物質）を PF68 コポリマー分散剤に 500  $\mu\text{g/ml}$  に懸濁して TIPS 法にて 0.5ml (=250  $\mu\text{g}$ ) x 2 回/週にて 4 週間（合計 8 回、2 mg/ラット）投与し、終了後 1 日と 12 週（合計 16 週）における肺と胸膜の病変の可逆性について比較検討した。a) 胸膜の線維性肥厚は、いずれの検体でも増加し、MWCNT-7 群において、最も高値であった ( $P < 0.01$ )。b) 胸膜中皮細胞の増殖率は、すべての投与群において溶媒群の約 4～6 倍に増加し ( $P < 0.001$ )、12 週まで持続した。c) 胸腔洗浄液中の炎症浸出細胞数はすべての検体で 12 週に減少したが、胸腔洗浄液中の検体（繊維）の数および CTGF、IL-2 と IP-10、IL-18 レベルは MWCNT-7 がより高値であった。

2) MWCNT-N（日機装）について篩板(sieve)によって長さが 2.6  $\mu\text{m}$  以下とそれ以上の分画に分けて、PF68 中に 250  $\mu\text{g/ml}$  を懸濁して、0.5ml を 2 週間に 8 回（計 1 mg）肺内 TIPS 投与後、④プロトコルによる 2 年間の長期観察において悪性中皮腫と肺腫瘍（腺腫+腺がん）の発生を確認した。以上から、MWCNT による肺、胸膜腔の異物炎症は長期持続し CTGF、IL-2 と IP-10、IL-18 が関与すること、①②④のプロトコルより胸腔中皮種の発生予測が可能であることが実証された。（酒々井、津田）。

3) MWCNT の気道上皮障害について、①の *in vitro* 系において、マウス気道上皮より単離した初代培養気道上皮の繊毛の動きが観察出来る系を用いて、MWCNT-L と MWCNT-S の繊毛運動への関与を明らかにし、②ラットにおいて MWCNT-L および MWCNT-S を 250  $\mu\text{g}/0.5\text{ml}$  を 7 日間に 3 回 TIPS 投与すると気管、気管支上皮粘膜のびらん、潰瘍が発生した。機序を解析中である（今泉）。

4) 観察された MWCNT による肺と胸膜中皮の障害作用の機序解明の一端として、誘発さ

れた炎症病変に発生する活性酸素による脂肪酸由来のカルボニル化合物の同定と定量を試みた。ラットにおいて、TIPS法によってMWCNT-LおよびMWCNT-Sを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DNA障害性の種々のアルデヒドを含む活性カルボニル化合物（RCs）の産生を確認した（大島）。

5) MWCNTは肺内では凝集体として存在し、観察された所見はナノ粒子によるものかについては明らかではない。そこで白金ナノ粒子による直接細胞毒性について*in vitro*の系で解析した。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（五十嵐）。

以上から、④のプロトコルにおいて、MWCNT-NをTIPS法にて2週間に計8回（合計1.0mg）肺内投与し2年観察した実験において、縦隔の心嚢周囲の悪性中皮腫と肺胞上皮腫瘍（腺腫・腺がん合計）の有意の発生がみられた。この成果によって、少なくともMWCNT-Nの肺内投与によって肺胞上皮と中膜上皮に発がん性を示すことが世界で初めて明らかになった。リスク評価を進める上で極めて重要な成果である。

#### 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  
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  
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  
William T. Alexander 名古屋市立大学津田特任教授研究室 研究員  
徐 結苟 名古屋市立大学特任教授  
David B. Alexander 名古屋市立大学特任教授

## A. 研究目的

ラットを用いた多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の毒性と発がん性の全身暴露長期試験に代替できる経気管肺内噴霧投与方法 (TIPS 法) を用いて長期試験に代替可能なモデルの開発を行った。その内容は、①短期 *in vitro* 毒性、毒性分子機序解析試験、②吸入暴露に替わる 1～2 週肺内噴霧投与方法 (TIPS) による肺、気管における毒性と細胞増殖およびその機序の *in vivo* 短期解析、③ 20 週程度の発癌プロモーション検索法における多臓器の障害と腫瘍病変発生の一連の方法である。今年度からは、③より派生した④イニシエーション処置は行わずに、検体のみを 20 週以上の一定期間投与方法の場合の病変の可逆性とさらに長期 (2 年) 観察の発がん性の検討の追加を提案してきた①②④の一連のプロトコルの妥当性について、それぞれの班員の専門分野を生かした研究を実施した。

## B. 研究方法

多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の毒性と発がん性について、ラットを用いて、長期試験に代替可能な①短期 *in vitro* 試験法、②吸入暴露に替わる TIPS 法による 1～2 週間の *in vivo* 短期解析法、③ 20 週程度の発癌プロモーション検索法における多臓器の障害と腫瘍病変発生モデルを提示してきた。今年度は、④検体のみ投与方法後 12 週間の観察実験において、検体のサイズの違いの影響、および肺胞と胸腔胸膜と中皮病変の可逆性試験、肺と胸腔以外に気管、気管支に対する影響、細胞障害機序の解析、さらに 2 年の長期観察による実際の発がん性の検証、からなる一連の実験による本提案①②③④のプロトコルの代替法として信頼性の検証を行なった。なお、特に胸腔内の炎症と投与方法の局在の把握のための胸腔洗浄液の解析を加えた。MWCNT の媒体には肺毒性が殆どなく、検体の分散性能に優れた界面活性剤 PF68 ポリプロピレンコポリマー (Sigma-Aldrich) を用いた。

④のプロトコルを用いて以下の研究を行った。

1) 原体の長さ直径の異なる 2 種 MWCNT-L (長さ=8  $\mu\text{m}$ 、太さ直径=150nm、針状/棒状凝集体、昭和電工) と MWCNT-S (長さ=3  $\mu\text{m}$ 、太さ=15 nm、綿菓子状凝集体、昭和電工) の肺、胸膜および気道上皮毒性を検索した (今泉)。

2) 検体 2 週間の投与方法: MWCNT-L、および陽性対照の MWCNT-7 (保土谷化学工業、WHO/IARC、Group 2B・腹腔内投与方法で動物に発がん性あり) と青アスベスト (crocidolite、UICC grade、WHO/IARC、Group 1A・ヒトに発がん性あり) を 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  に調製して 0.5ml を 4 週間に 8 回の TIPS 投与方法 (合計 2.0 mg/ラット) 終了 1 日後と 12 週後 (実験開始から 16 週後) に屠殺し、a) 胸膜肥厚、b) 胸膜中皮増殖、および c) 胸腔と肺の炎症病変の可逆性について観察した (津田)。

3) 検体 2 年の投与方法: MWCNT-N (長さ 1～20  $\mu\text{m}$ 、直径 3.5 nm、日機装) について直径 35 ミクロンの孔版篩 (ふるい) によって長さが 2.6  $\mu\text{m}$  以下とそれ以上の分画に分けて、PF68 中に 125  $\mu\text{g}/0.5\text{ml}$  を 2 週間に 8 回 (合計 1mg/ラット) 肺内 TIPS 投与方法後、④のプロトコルに従い 2 年間の長期観察による発がんの有無を確認し、本提案①②③のプロトコルより得た胸腔中膜上皮の過形成による悪性中皮腫の発生予測の妥当性を検証した。とくに②③においては primary (original) (P) 分画、flow through (FT) 分画、remaining (R) 分画に分けて、各分画の腫瘍発生について 2 年間観察した。さらに長期試験における MWCNT の残留量について HPLC による計測を行った。(酒々井、津田)。

4) MWCNT の気道上皮障害について、①の *in vitro* 系において、マウス気道上皮より単離した初代培養気道上皮モデルにおける繊毛の動きを蛍光ビーズを用いて測定した。さらに②ラットにおいて MWCNT-L および MWCNT-S を 250  $\mu\text{g}/0.5\text{ml}$  を 7 日間に 3 回 TIPS 投与方法後に気管、気管支を摘出して上皮への障害の有無と程度について観察解析した (今泉)。

5) 市販の脂肪酸由来のアルデヒド [アセトアル

デヒド (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)、ノナール (C<sub>9</sub>H<sub>18</sub>O)、デカナール (C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O) など] とデオキシグアノシン (dG) を還元剤 (NaBH<sub>3</sub>CN) 存在下で反応させ、付加体標品を合成した。この標品を用いて、LC/ESI-MS/MS による DNA 付加体の網羅的分析法を確立するための最適化を行った。MWCNT (MWCNT-L あるいは MWCNT-S) を 2 週間、TIPS 法投与されたラットおよび対照としての vehicle 群のラット肺 (各 n=10) から、NaBH<sub>3</sub>CN 存在下で核酸を抽出し、各試料からの DNA 10 μg を酵素的にヌクレオシドにまで加水分解し分析試料とした。DNA 付加体は、LC/ESI-MS/MS によりデオキシリボース (m/z 116.047) の開裂損失を起こす化合物を網羅的に検出する方法 (DNA アダクトーム法) で分析した (大島)。

6) ナノ白金粒子懸濁液は、超純水または 10% 牛胎ウシ血清 (FBS) を含む RPMI1640 培地で 100 μg/mL に希釈した後、5 分間超音波処理し、動的光散乱法による粒度分布を測定した。また、このナノ白金粒子懸濁液を、20℃で 50000 rpm (173,000 g)、1 時間超遠心後、上清を採取し、更に 20℃で 173,000g、8 時間の超遠心を 2 回行い、各回で得られた上清の粒度分布を測定した。

上記ナノ白金粒子懸濁液の遠心上清について白金濃度を測定した。1 回超遠心後のサンプルは 100 倍、それ以外は 10 倍希釈して硝酸濃度を 1% に調製後、0.2 μm のフィルターでろ過し、ICP-MS で測定した。さらにヒト末梢血単球由来 THP-1 細胞を PMA で macrophage 様細胞に分化誘導させた。被験物質を添加して所定時間経過後、WST-8 (Cell Counting Kit-8) を用いて細胞生存率 (%) を算出した。(五十嵐)

## 倫理面への配慮

各班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研究は実施しない。(全員)

## C. 研究結果

凝集体が針状/棒状の MWCNT-L と綿菓子状の MWCNT-S の比較では、①ラットより採取した肺胞 Mφ 初代培養液中に 24 時間加え飼食させて得られた培養上清は、ヒト中皮腫細胞、ヒト肺がん細胞等への増殖刺激作用は MWCNT-L は増加傾向 (有意差なし) を見た。④のプロトコルにて、MWCNT-L、MWCNT-7、crocidolite (UICC grade) 投与による a) 胸膜の肥厚、b) 中皮の増殖、および c) 胸腔洗浄液の細胞とサイトカイン組成、における病変の程度と可逆性 (Reversibility) の状態について、溶媒の PF68 群と投与群における投与終了 1 日と 12 週後 (投与開始 16 週後) において比較検討した。a) 臓側 (肺側) と壁側 (胸腔側) 胸膜の線維性肥厚は、いずれの検体群でも PF68 群より投与群に有意に増加した (P<0.001)。検体群間では MWCNT-7 群において、壁側胸膜の 12 週において他の検体よりも最も高値であった (P<0.01)。b) 臓側 (肺側) と壁側 (胸腔側) 胸膜中皮細胞の PCNA ラベル率は、すべての投与群において 1 日と 12 週とも溶媒群の約 4~6 倍に増加し (P<0.001)、それらの値は 12 週まで持続した。c) 胸腔洗浄液中の炎症浸出細胞数 (Mφ、好中球、リンパ球等の合計) はすべての検体で 12 週において 1 週目の値の 70~60% に減少した。MWCNT-M では減少率は他物質より小さく、それらとの比は約 1.5~2 倍であった (有意) であった。胸腔洗浄液中の主として Mφ 中の投与検体 (繊維) の数 (/100,000 個細胞) は、12 週で明らかな減少を示したが、中皮細胞に発がん性の明らかな (腹腔内投与) MWCNT-7 が最も高値を維持した。胸腔洗浄液のサイトカインアレイ解析では IL-2 と IP-10、IL-18 さらに CTGF (Connecting Tissue Growth Factor) が同定され、12 週でいずれも減少したが、検体間では MWCNT-7 がより高値が持続していた。肺の組織変化ではいずれの検体も 12 週では異物肉芽中に被包化されて観察された。(津



田)。

MWCNT-NのTIPS投与後2年間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長さ2.6 $\mu$ m以上(篩板通過分画=2.6 $\pm$ 2.9 $\mu$ m、残存分画>2.6 $\mu$ m)投与群で心嚢、胸膜の悪性中皮腫と肺胞上皮腺腫と腺がんが有意の差にて発生した。発がんまでの経過は90週程度と長期間を要する事が分かった。発生頻度において検体の原体、篩板通過分画、残存分画間の差異はなかった。検体は肺から胸腔、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。日本バイオアッセイ研究センターとの共同研究にて、投与2週目の肺内沈着量(mg/g肺重量)はFT分画で約1/2、P分画では1/4、R分画では1/4に減少していた。

以上から、④の方法を用いると、胸膜中皮腫の発生は20週程度の試験における増殖性病変の診断にて予測できることが分かったが、肺胞上皮腫瘍の発生にさらに長い期間が必要であることが分かった(酒々井、津田)。

気道上皮への障害についてMWCNT-LとMWCNT-SをTIPS法にて投与後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、線毛上皮細胞の消失と糜爛、潰瘍を形成する顕著な障害と、非線毛上皮による置換修復をもたらすことを明らかにしたが、障害機序を初代気道上皮細胞について、MTTアッセイを用いて検討したところ、MWCNT-L群において1日後、7日後の生存率が溶媒群と比べ有意に減少した。しかし、MWCNT-S群に関しては生存率の低下傾向は見られたが有意な差はなかった。肺胞マクロファージの貪食能では400個の細胞の肺胞マクロファージ中で蛍光ビーズを貪食している細胞の割合及び貪食された蛍光ビーズの合計を検討した。MWCNT-L群において蛍光ビーズを貪食している細

胞の割合、及び合計数が溶媒群に比べて有意に減少したが、MWCNT-S群に関しては減少傾向が見られたが、有意な差はなかった(今泉)。

アルデヒド化合物は、核酸塩基のアミノ基と反応して不安定なシッフ塩基を生成すると考えられることから、核酸抽出時に、還元剤(NaBH<sub>3</sub>CN)を使用することにより、不安定なアルデヒド-核酸のシッフ塩基を安定なアルキル-核酸付加体に変換させた。この核酸試料を、DNA付加体の網羅的分析法により、分析したところ、対照のvehicle群の肺DNAからは611、MWCNT-LおよびMWCNT-S曝露の肺DNAからは、それぞれ、676および693の付加体ピークが検出された。LCでの保持時間及び付加体のm/zから、これらの付加体のいくつかは、アセトアルデヒド-dG、ブタナール-dG、ノナナール-dG、デカナール-dG由来の付加体と同一した。以上から、カルボニル化合物は、対照のPF68群と比較して、MWCNT-L投与群では、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が明らかとなった。この結果は2週間*in vivo*試験における肺組織の8-OHdGレベルの高値検出と相関するものと考えられる。

また、vehicle群と比較して、MWCNT-L及びMWCNT-S群で、それぞれ、26及び27の付加体が有意に増加していた。さらに、vehicle群では検出されないが、MWCNT-L群で6、MWCNT-S群で14のピークが新たに検出された。しかし、これらの付加体の多くは、合成したDNA付加体標品の保持時間及びm/zと一致せず構造を同定することはできなかった(大島)。

PtNP-1及びPtNP-2 100 $\mu$ g/mLをFBS含有RPMI1640培地に懸濁した直後の平均粒子径はそれぞれ60nm、150nmであった。PtNP-1は約半数が、PtNP-2は約20%が100nm以下であった。超遠心後の上清は、径の大きな粒子が沈殿して除かれ、20nm以下のサイズの割合が遠心前より増

加した。PtNP-1 の超純水希釈試料における超遠心 2 回目以降の上清、PtNP-1 及び PtNP-2 各懸濁液の 3 回超遠心後の上清については、粒子が少なく正しい平均粒子径が得られなかった。ICP-MS 分析において、白金標準溶液の検量線は 0.01-100 ng/mL の濃度範囲で直線性が見られ、検出限界値は約 0.01 ng/mL、定量下限値は約 0.03 ng/mL であった。ナノ白金粒子懸濁液を超遠心した上清について白金含量を定量した。PtNP-1 の超純水懸濁液については、超遠心を繰り返しても上清には 1~2 µg/mL 程度の白金が定量された。血清添加培地に懸濁したときも超純水に懸濁した場合とほぼ同じ白金量を示した。一方、PtNP-2 については超遠心後の上清中の白金濃度が顕著に低下し、PtNP-1 の 100~1000 分の 1 のレベルであった。PMA 処理 THP-1 細胞に PtNP-1 及び PtNP-2 を添加、24 時間後の細胞生存率を検討した。PtNP-1 については細胞生存率の低下は認められなかった。PtNP-2 では顕著な細胞生存率の低下が観察され、LC50 値は約 30 µg/mL であった。(五十嵐)

#### D. 考察

以上から、MWCNT の特に針状形態を示すもの (MWCNT-7、MWCNT-L) は肺内投与で胸腔と肺に強い炎症を起こし、中皮の増殖線維化を誘発した。この病変は投与終了後も遷延性化して、16 週経過後でも観察された。機序についてはサイトカイン発現解析による Mφ 由来の Mip1α、CTGF、Csf3 および Cxc12 の関与が考えられる。さらに、MWCNT-N を TIPS 法にて 2 週間に計 8 回 (合計 1.0mg) 肺内投与 2 年まで観察後に縦隔の心嚢周囲の悪性中皮腫と肺がんの発生がみられたことは、以下の 4 点において重要な意味を持つ (津田、酒々井、大島)。

- 1) 肺内に投与した MWCNT (この場合は MWCNT-N) によって悪性中皮腫と肺胞上皮腫瘍 (腺腫と腺がん) が発生することを世界で初めて示した。このことは、提案の短期検索プロトコルの妥当性が示されたことと、さらに今後の職場、環境における

リスク評価を進める上で重要な意味を持つ。

- 2) 短期投与による中皮の過形成性増殖は発がんとの相関があると考えられ、今後、前癌病変としての生物学的な意味と信頼性について追求する必要が有る。
- 3) 胸膜悪性中皮腫と肺胞上皮腺腫の発生において、篩板による分画の影響はなかった。
- 4) 2 週目 (投与終了時) と 2 年までの生存ラットの肺内 MWCNT-N の沈着量は初期沈着量に比べて、2 年の時間経過を考慮してもかなりの量 (投与終了時の 1/2~1/4) が沈着していることがわかった。この結果は肺と胸腔における持続的異物炎症が発がんの要因である可能性が高いことを示す。
- 5) 炎症と腫瘍発生の要因として、肺内では炎症反応によって DNA 障害性の acrolein、glyoxal、crotonaldehyde 等が生成され、それらに起因する細胞障害や反応性細胞増殖が発がんに関与する可能性が示唆された。生体試料中の DNA は、多種類のアルデヒド化合物と反応して不安定なアルデヒド-核酸のシッフ塩基として存在する可能性を示唆している。27 年度ではこの LC/ESI-MS/MS による網羅的 DNA 付加体検出法 (DNA アダクトーム法) を用いて、MWCNT 投与により、特異的に生成・増加する DNA 付加体の同定と定量を行い、MWCNT 曝露による炎症誘発、DNA・組織損傷との関連などについて検討を行う必要がある。
- 6) 一方、肺胞上皮腫瘍 (腺腫、がん) の発生には最短 90 週~2 年近い期間が必要である。このことは MWCNT-N の発がんポテンシャルは強くないと考えられ、本研究での初期の提案による 24 週の 2 段階発がんプロモーション法では観察期間では短いことが分かった。今後の改良点である。
- 7) さらに MWCNT は気管、気管支上皮粘膜において、繊毛運動の障害のみならず粘膜の広範な糜爛、潰瘍形成を伴う顕著な毒作用があることが判明した。機序については現在追跡中である (今泉)。

#### E. 結論

以上から、①の *in vitro* 実験および ②の短期

*in vivo* 試験において、MWCNT の特に針状形態を示すもの (MWCNT-7、MWCNT-L) は肺内投与で胸腔と肺に強い異物炎症を起こし、中皮の増殖線維化を誘発した。この病変は投与終了後と遷延性化して長期に観察された。機序は M $\phi$  由来の細胞増殖活性のあるサイトカイン・ケモカインの Mip1 $\alpha$ 、CTGF (Connecting Tissue Growth Factor)、Csf3 および Cxc12 の関与が考えられる。

さらに、重要なことは④において、MWCNT-N を TIPS 法にて 2 週間に計 8 回 (合計 1.0mg) 肺内投与し 2 年観察した実験において、縦隔の心嚢周囲の悪性中皮腫肺胞上皮腫瘍 (腺腫・がん合計) の有意の発生がみられた。この成果によって、少なくとも MWCNT-N の肺内投与によって肺胞上皮と中膜上皮に発がん性を示すことが世界で初めて明らかにした。リスク評価を進める上で重要な結果である。以上から、提案してきた①初代培養肺胞 M $\phi$  を用いた M $\phi$  の反応の *in vitro* 試験、および②の短期 *in vivo* 試験の結果から、④の長期試験の予測が可能となった。これは TIPS 法が、高価な専用の設備と高額な稼働費が必要な吸入暴露試験の代替法として、次々と市場に導入されてくる MWCNT の有害性特に発がん性の短期評価法として有用であると考えられる。

なお発がん短期試験を参考にしたプロモーション試験にはやはりに 1 年以上を要することがわかった。また発がん機序として、肺内の炎症反応に起因する DNA 障害性のアルデヒド化合物によって DNA 付加体を生成する可能性が示唆された。また MWCNT は肺、胸膜中皮ばかりではなく、気管、気管支上皮にも強い障害作用を示すことが明らかとなった。

## F. 健康危機情報

とくになし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Tomono S., Miyoshi N., Ohshima H.  
Comprehensive analysis of the lipophilic reactive carbonyls present in biological specimens by

LC/ESI-MS/MS J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci (2015) 988, 149-156.

2. Miyoshi N, Iuliano L, Tomono S, Ohshima H. Implications of cholesterol autoxidation products in the pathogenesis of inflammatory diseases *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (2014) 446, 702-8.
3. Ohba T., J Xu, Alexander D. B., Yamada A., Kanno J., Hirose A., Tsuda H., Imaizumi Y., MWCNT causes extensive damage to the ciliated epithelium of the trachea of rodents. (Vol.39, No.3, 499-505, 2014, The Journal of Toxicological Sciences)
4. Shibata K, Fukamachi K, Tsuji A, Saga T, Futakuchi M, Nagino M, Tsuda H, Suzui M. *In vivo* <sup>18</sup>F-fluorodeoxyglucose-positron emission tomography/computed tomography imaging of pancreatic tumors in a transgenic rat model carrying the human *Kras*<sup>G12V</sup> oncogene. *Oncol Lett*, 9: 2112-2118, 2015.
5. 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*, 37: 1068-1074, 2014.
6. 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.
7. Fukamachi K, Iigo M, Hagiwara Y, Shibata K, Futakuchi M, Alexander DB, Hino O, Suzui M, Tsuda H. Rat N-ERC/mesothelin as a marker for *in vivo* screening of drugs against pancreas cancer. *PLoS One*, 9: e111481, 2014.
8. Iigo M, Alexander DB, Xu J, Futakuchi M, Suzui M, Kozu T, Akasu T, Saito D, Kakizoe T, Yamauchi K, Abe F, Takase M, Sekine K, Tsuda H. Inhibition of intestinal polyp growth by oral ingestion of bovine lactoferrin and immune cells in the large intestine. *Biometals*, 27: 1017-1029, 2014.
9. Xu J, Alexander DB, Futakuchi M, Numano T, Fukamachi K, Suzui M, Omori T, Kanno J, Hirose A, Tsuda H. Size- and shape-dependent pleural translocation, deposition, fibrogenesis, and mesothelial proliferation by multiwalled carbon nanotubes. *Cancer Sci*, 105: 763-769, 2014.
10. 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.

第 88 回日本薬理学会年会 名古屋

11. Benbrahim-Tallaa L, Lauby-Secretan B, Loomis D, Guyton KZ, Grosse Y, El Ghissassi F, Bouvard V, Guha N, Mattock H, Straif K; International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. Rusyn II, Fritschi L, Sergi CM, Hansen J, Le Curieux F, Bolt HM, Fukushima S, Ichihara G, Kamae K, Kumagai S, Tsuda H, Kjaerheim K, Bartell SM, Cesta MF, Chiu W, Cooper G, DeWitt JC, Friesen M, Lash LH, Steenland K, Cherrie JW. Carcinogenicity of perfluorooctanoic acid, tetrafluoroethylene, dichloromethane, 1,2-dichloropropane, and 1,3-propane sultone. Lancet Oncol. 2014 Aug;15(9):924-5.

12. Grosse Y1, Loomis D1, Guyton KZ1, Lauby-Secretan B1, El Ghissassi F1, Bouvard V1, Benbrahim-Tallaa L1, Guha N1, Scocciati C1, Mattock H1, Straif K1; International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. Kane AB, Debia M, Dion C, Møller P, Savolainen K, Canu IG, Jaurand MC, Comba P, Fubini B, Kobayashi N, Morimoto Y, Tsuda H, Yu IJ, Vermeulen R, Bugge MD, Bateson TF, Kuempel ED, Morgan DL, Pinkerton KE, Sargent LM, Stayner L. Carcinogenicity of fluoro-edenite, silicon carbide fibres and whiskers, and carbon nanotubes. Lancet Oncol. 2014 Dec;15(13):1427-8. doi: 10.1016/S1470-2045(14)71109-X. Epub 2014 Oct 31.

13. Xu J., Alexander DB., Iigo M., Hamano H., Takahashi S., Yokoyama T., Kato M., Usami I., Tokuyama T., Tsutsumi M., Tamura M., Oguri T., Niimi A., Hayashi Y., Yokoyama Y., Tonegawa K., Fukamachi K., Futakuchi M., Sakai Y., Suzui M., Kamijima M., Hisanaga N., Omori T., Hirose A., Kanno J., Nakae D., and Tsuda H. Chemokine (C-C motif) ligand 3 detection in the serum of persons exposed to asbestos: A patient-based study. Cancer Sci., in press, 2015.

## 2. 学会発表

### 国内学会

1. 伴野 勸、三好規之、徐結荀、津田洋行、大島寛史 多層カーボンナノチューブ肺内投与によって生じる活性カルボニル化合物の網羅的解析、第 67 回日本酸化ストレス学会学術集会、2014 年 9 月 4~5 日、京都

2. 多層カーボンナノチューブの気道クリアランスへの影響 山田 茜、大羽 輝弥、徐 結荀、鈴木 良明、山村 寿男、津田 洋幸、今泉 祐治

3. 松本晴年、磯田泰彰、木村和哲、酒々井眞澄. 沖縄県産植物芭蕉 (バショウ, *Musa basjoo*) 抽出物のがん細胞増殖抑制効果. 日本薬学会第 135 年会: 神戸; 2015 年 3 月 28 日

4. 安藤さえこ、佐藤圭悟、磯田泰彰、深町勝巳、二口充、酒々井眞澄. パルミチン酸誘導体の in vivo 抗がん効果. 個体レベルでの癌研究の新展開: 大津; 2015 年 2 月 6 日

5. 加賀志稀、安藤さえこ、佐藤圭悟、深町勝巳、二口充、酒々井眞澄. 多層カーボンナノチューブの長さの違いによる肺障害と遺伝子発現への影響. 個体レベルでの癌研究の新展開: 大津; 2015 年 2 月 6 日

6. 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腫瘍発生プロファイル. 第 31 回日本毒性病理学会総会及び学術集会; 江戸川: 2015 年 1 月 30 日

7. 深町勝巳、二口充、津田洋幸、酒々井眞澄. 血清診断マーカー N-ERC/mesothelin による抗がん剤の治療効果の判定. 第 31 回日本毒性病理学会総会及び学術集会; 江戸川: 2015 年 1 月 30 日

8. 二口充、深町勝巳、酒々井眞澄. 骨転移巣の悪政形質を規定する microRNA の同定とその機序解析. 第 73 回日本癌学会学術総会; 横浜: 2014 年 9 月 27 日

9. 佐藤圭悟、磯田泰彰、深町勝巳、二口充、酒々井眞澄. デセン酸誘導体の抗がん作用機序解析. 第 73 回日本癌学会学術総会; 横浜: 2014 年 9 月 26 日

10. 酒々井眞澄、佐藤圭悟、磯田泰彰、沼野琢旬、二口充、深町勝巳、徐結荀、津田洋幸. ラット肺におけるナノチューブの発がんプロファイル. 第 73

- 回日本癌学会学術総会; 横浜: 2014年9月26日
11. 深町勝巳、二口充、津田洋幸、酒々井真澄. 腓がんモデル動物における血清診断マーカー. 第73回日本癌学会学術総会; 横浜: 2014年9月26日
  12. 佐藤圭悟、磯田泰彰、深町勝巳、二口充、酒々井真澄. 新規デセン酸誘導体はアポトーシス誘導により大腸がんを抑制する. 平成26年度がん若手研究者ワークショップ; 蓼科: 2014年9月6日
  13. Fukamachi K, Yabushita S, Futakuchi M, Tsuda H, Suzui M. Identification of serum tumor marker of pancreas cancer by omics analysis. 第29回発癌病理研究会; いわき: 2014年9月1-3日
  14. Sato K, Isoda Y, Fukamachi K, Futakuchi M, Tsuda H, Suzui M. A novel decenoic acid derivative inhibits colon carcinogens by inducing apoptosis. 第29回発癌病理研究会; いわき: 2014年9月1-3日
  15. 津田洋幸、徐結苟、酒々井真澄、二口充、深町勝巳、広瀬明彦、菅野純. 多層カーボンナノチューブの肺と胸膜組織における有害性と発がん性の *in vitro-in vivo* システム検索法の開発. 第41回日本毒性学会学術年会; 神戸: 2014年7月3日
  16. 津田洋幸、David B. Alexander、藪下晴津子、住田佳代、徐結苟、樋野興夫、辻厚至、佐賀恒夫、柳原五吉、酒々井真澄、二口充、深町勝巳. 活性型 ras コンディショナルトランスジェニックラットを用いた人モデルとしての腓癌. 第41回日本毒性学会学術年会; 神戸: 2014年7月4日
  17. 酒々井真澄、沼野琢旬、深町勝巳、二口充、津田洋幸. カーボンナノチューブの中皮腫瘍がんプロファイル. 第41回日本毒性学会学術年会; 神戸: 2014年7月3日
  18. 深町勝巳、二口充、津田洋幸、酒々井真澄. ラット腓がん血清診断マーカーの有用性の検討. 第41回日本毒性学会学術年会; 神戸: 2014年7月3日
  19. 二口充、徐結苟、井上義之、高月峰夫、津田洋幸、酒々井真澄. カーボンナノチューブおよびカーボンブラックの肺内噴霧により誘発された肺胞過形成様病変. 第41回日本毒性学会学術年会; 神戸: 2014年7月4日
  20. 酒々井真澄、佐藤圭悟、二口充、深町勝巳、磯田泰彰. 蜂産品由来デセン酸誘導体の抗がん効果. 文科省新学術領域研究・がん支援「化学療法基盤支援活動」第3回シンポジウム; 名護: 2014年5月12日
  21. 酒々井真澄、沼野琢旬、深町勝巳、二口充、津田洋幸 (2014) カーボンナノチューブの中皮腫瘍がんプロファイル; 第41回日本毒性学会学術年会 神戸7月2日-4日
  22. Suzui M., Sato K., Isoda Y., Numano T., Futakuchi M., Fukamachi K., Xu J., Tsuda H., (2014) Carcinogenic profile of carbon nanotubes on the rat lung 第73回日本癌学会総会 横浜 9月25-27日
  23. 酒々井真澄、沼野琢旬、深町勝巳。二口充、津田洋幸 (2015) 多層カーボンナノチューブの腫瘍発生プロファイル; 第31回日本毒性病理学会総会 東京 1月29日-30日
  24. 津田洋幸、徐結苟、Alexander D.B.,酒々井真澄、二口充、深町勝巳、広瀬明彦、菅野純 (2015) 多層カーボンナノチューブの発がん標的性組織; 第14回分子予防環境医学研究会大会 大阪, 2月13日-2月14日.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

特許第5597427号、抗がん剤、H26.8.15 登録、特許権者酒々井眞澄、飯沼宗和、発明者酒々井眞澄、飯沼宗和

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

平成 26 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

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

分担研究課題名：ナノマテリアルの *in vitro* 毒性評価に関する研究

分担研究者	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、イオンと粒子の分別定量を試みた。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 に比べて強い細胞致死を示した PtNP-2 の毒性は、分散液に存在するイオンではなく白金粒子自体によるものと示唆された。

#### 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十分な情報が得られていない。そこで、

25 年度の研究ではナノ白金粒子（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、Ca<sup>2+</sup>シグナリングなどに対する影響及び試験懸濁液中での金属ナノマテリアルの分散状態を検討した。

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明らかになった。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。更に致死毒性の発現



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及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。

白金は王水には溶解するものの、水などのほとんどの溶媒に対して不溶であることが知られている。しかし、白金ナノコロイドを水系溶媒に分散させた時の白金イオンの存在の有無についてはほとんど知見がない、そこで本年度は PtNP-1 及び PtNP-2 について、遠心分離によるイオンと粒子の分別定量の検討を行った。Macrophage に分化させた THP-1 細胞に対する毒性を引き続き検討した。

## B. 研究方法

### 1. 材料及び試薬

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。

### 2. 粒度分布の測定

ナノ白金粒子懸濁液は、超純水または 10% 牛胎ウシ血清 (FBS) を含む RPMI1640 培地 (Gibco Life Technologies 社) で 100  $\mu$ g/mL に希釈した後、5 分間超音波処理し、動的光散乱法による粒度分布を測定した。

また、ナノ白金粒子懸濁液を 100  $\mu$ g/mL の濃度に水または血清添加培地で希釈し、20°C で 50000 rpm (173,000 g)、1 時間超遠心後、上清を採取し、更に 20°C で 173,000 g、8 時間の超遠心を 2 回行い、各回で得られた上清の粒度分布を測定した。

### 3. 白金含量の定量

上記ナノ白金粒子懸濁液の遠心上清について白金濃度を測定した。1 回超遠心後のサンプル

は 100 倍、それ以外は 10 倍希釈して硝酸濃度を 1% に調製後、0.2  $\mu$ m のフィルターでろ過し、ICP-MS で測定した。

## 4. 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%FBS を含む RPMI1640 培地で 5% CO<sub>2</sub>、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。

## 5. 細胞毒性試験

THP-1 細胞を 96-well Plate に 105 cells/well の細胞密度で播種し、PMA 処理 20 時間後に培地を除き、種々の濃度の被験物質溶液 100  $\mu$ L 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  $\mu$ L を添加して 1 時間 CO<sub>2</sub> 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。

## C. 研究結果

### 1. 粒度分布

PtNP-1 及び PtNP-2 100  $\mu$ g/mL を FBS 含有 RPMI1640 培地に懸濁した直後の平均粒子径はそれぞれ 60 nm、150 nm であった。PtNP-1 は約半数が、PtNP-2 は約 20% が 100 nm 以下であった (表 1, 図 1)。超純水または血清添加培地に懸濁した PtNP-1 及び PtNP-2 は、2 回目の超遠心まで沈殿が目視された。超遠心 1 回後の上清について粒子分布を測定したところ、平均粒子径はそれぞれ遠心前より小さくなり、2 回後の上清にも同様の粒子径が確認された (表 1)。PtNP-1 の超純水希釈試料に

おける超遠心 2 回目以降の上清、PtNP-1 及び PtNP-2 各懸濁液の 3 回超遠心後の上清については、観察される粒子径の多分散性指数が高いことから、粒子が少なく正しい平均粒子径を示していないと思われた。これら超遠心後の粒度分布像は、血清添加培地のみを遠心した上清で得られた像とほとんど同様であった。各懸濁液の超遠心後の上清は、径の大きな粒子が沈殿して除かれ、20 nm 以下のサイズの割合が遠心前より増加した (図 1)。

## 2. 白金含量の定量

ICP-MS 分析において、白金標準溶液の検量線は 0.01-100 ng/mL の濃度範囲で直線性が見られ、検出限界値は約 0.01 ng/mL、定量下限値は約 0.03 ng/mL であった。

ナノ白金粒子懸濁液を超純水または血清添加培地で 100 µg/mL の濃度に希釈し、超遠心した上清について白金含量を定量した。PtNP-1 の超純水懸濁液については、超遠心を繰り返しても上清には 1~2 µg/mL 程度の白金が定量された。血清添加培地に懸濁したときも超純水に懸濁した場合とほぼ同じ白金量を示した。一方、PtNP-2 については超遠心後の上清中の白金濃度が顕著に低下し、PtNP-1 の 100~1000 分の 1 のレベルであった (表 2)。

## 3. 細胞毒性

PtNP-1 及び PtNP-2 について、最高濃度 200 µg/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 細胞に対する各被験物質添加 24 時間後の細胞生存率を検討した。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、LC50 値は約 30 µg/mL であった (図 2)。

## D. 考察

白金ナノ粒子の細胞毒性が粒子自体の物理

化学的作用によるものか、それとも溶出した白金イオンによる影響なのか明らかにする方法として、超遠心によって粒子とイオンを分離し定量することで可能ではないかと考え、検討した。上清に定量される白金濃度の変化等から、イオンと粒子を分別するには少なくとも 2 回以上は超遠心する必要がある。しかし、超遠心 3 回後にも白金が定量されるように、イオンと粒子を完全に分離しているとまでは言えず、別の方法での確認が必要と思われた。

細胞毒性を示す PtNP-2 について、超遠心した上清の白金濃度は定量下限値程度であった。遠心で沈殿しきれない粒子を検出した可能性もあるが、これまでの知見から白金イオンとして本濃度では細胞毒性を示さないと考えられる。よって、PtNP-2 の毒性はイオン濃度として説明する事は困難であり、白金粒子自体の作用であることが示唆された。

一方、PtNP-1 に関しては超遠心 3 回後の上清にも一定量の白金を定量した。PtNP-2 に比べるとはるかに多く、PtNP-1 に細胞毒性が認められないことからイオンによるものかどうかを明らかにすることができなかった。PtNP-1 は粒子の表面を修飾したコロイドとして調製、分散しており、今回の条件下の超遠心でも沈殿しきれなかった可能性もある。細胞毒性については粒子の表面状態等物理学的性質や粒子サイズも関係する可能性もあり、ICP-MS を用いた白金の定量や粒度分布測定だけで説明することは困難と思われた。

## E. 結論

In vitro 毒性試験を想定し、細胞培養用培地に懸濁した白金ナノ粒子は、100 nm 未満の粒子径のものが一定量存在した。保護剤を含まない白金ナノ分散液 (PtNP-2) については、Macrophage に分化させた THP-1 細胞に対して毒性を示した。PtNP-2 を懸濁した細胞培養液を超遠心した上清中の白金濃度はイオン換

算しても、PtNP-2 の細胞毒性の濃度曲線を説明できるレベルでなかった。よって、PtNP-2 の毒性は、白金イオンではなく白金粒子自体に物理化学的性質によるものと示唆された。

#### **F. 健康危機情報**

なし

#### **F. 研究発表**

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

#### **G. 知的財産権の出願・登録状況**

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

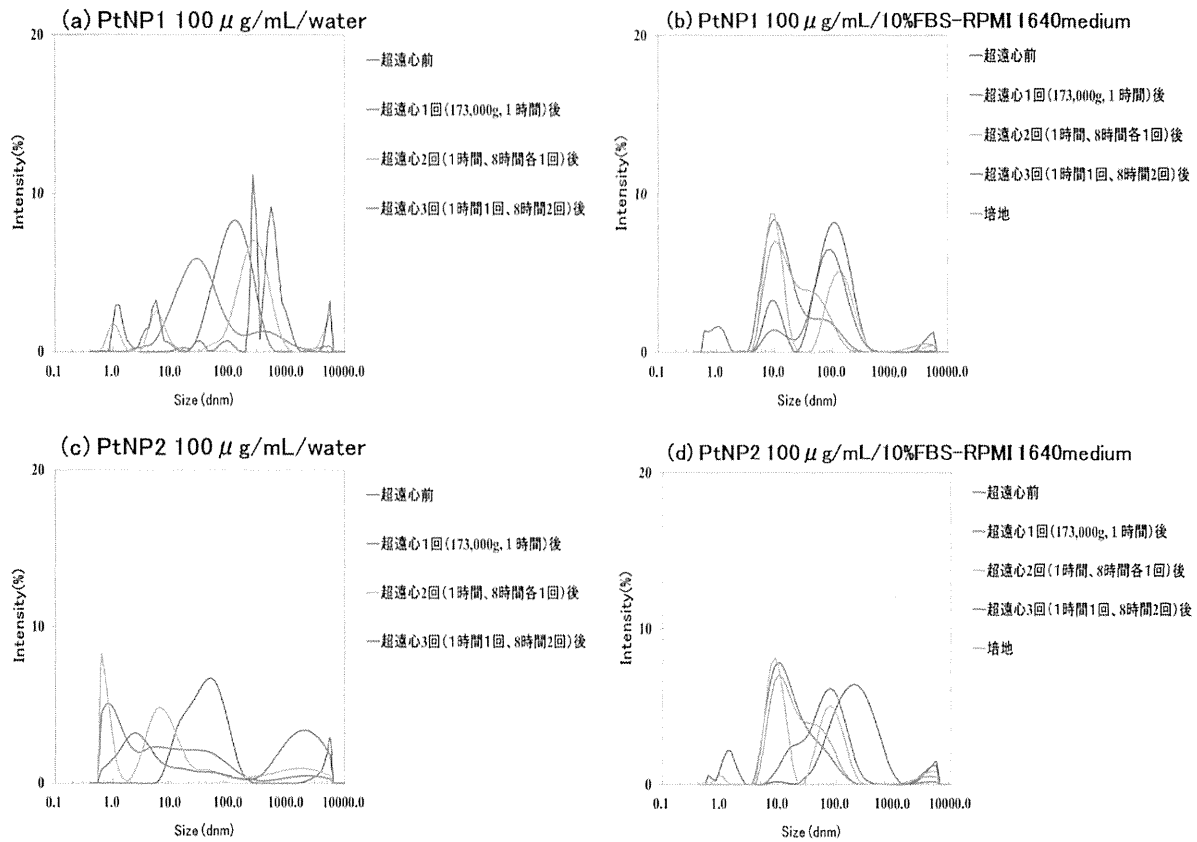


図 1. 白金ナノ粒子懸濁液の粒度分布

PtNP-1 及び PtNP-2 を超純水(water)または培地 (10%FBS-RPMI1640 medium) で 100  $\mu\text{g/mL}$  の濃度に希釈し、本文記載の各条件で 3 回超遠心した。それぞれの上清について動的光散乱法により粒度分布を測定した。

表 1. 白金ナノ粒子懸濁液の超遠心後の上清で観察される平均粒子径

試料	希釈媒体	粒子径 (nm)		
		超遠心前	1 回目超遠心上清	2 回目超遠心上清
PtNP-1	超純水	94	25	分析不能
	培地	60	13	17
PtNP-2	超純水	43	6	9
	培地	150	14	16

図 1 で得られた粒度分布から平均粒子径を求めた。