

201524004A

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 27 年度

総括・分担研究報告書

研究代表者 津田 洋幸

平成 28 年 (2016 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 27 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 津田 洋幸

平成 28 年 (2016 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	12
1. ナノマテリアルの <i>in vitro</i> 毒性評価に関する研究 内野 正	13
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 三好 規之	19
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	22
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	25
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	32
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	40

平成 27 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

ナノサイズの金属粒子、炭素粒子、線維等の生体内で代謝分解されない個体はそのまま細胞・組織に長く沈着するために、従来の ADME の概念では障害作用の評価はできない。カーボンナノチューブ（CNT）等個体ナノマテリアルは急速な研究開発が進められる一方、健康への影響、とくに呼吸器における中・長期毒性と発癌性評価は遅れている。このためには吸入暴露試験が必要であり、実施には高額な専用吸入施設と稼働コストが必要であるためである。

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、長期試験に代替可能な評価プロトコルとして、①短期 *in vitro* 試験法、②吸入暴露に替わる 1～2 週経気管肺内噴霧投与（TIPS）による *in vivo* 短期試験法、②より派生した③2-8 週間短期間投与後 2 年まで放置観察する実験系を構築し有用性を検証した。その結果、①②方法における中皮の過形成所見に基づき発がん性を予測できること、その機序解析手段として胸腔洗浄液が有用であること、②③の結果より、凝集体が針状または棒状の MWCNT と綿菓子状凝集体の MWCNT では、肺と胸膜中皮に対する障害作用・増殖刺激作用の程度に差異があることが示された。②において、MWCNT は気管支上皮に対する強い障害作用を示し、機序として MWCNT の線毛への付着による直接の強い線毛輸送障害が観察された。また、MWCNT による肺と胸膜中皮の障害作用の機序として、肺炎症病巣における脂肪酸由来の DNA 障害性アルデヒド類を含む活性カルボニル化合物（RCs）の産生を確認した。③において肺と胸膜中皮に対する発がん性を予測通り見出し、この一連の評価法の妥当性を得た（Cancer Science, 2016, in press）。

研究分担者

内野 正 国立医薬品食品衛生研究所
生活衛生化学部 主任研究官
三好 規之 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 助教
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

研究協力者

神野 透人 名城大学薬学部 教授
五十嵐 良明 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部第一室 部長
秋山 卓美 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 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

- 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
- 神藤 秀基 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- Mohamed Ahmed Mahmoud Abd El-gied 名古屋
市立大学大学院医学研究科院生
- 飯郷 正明 名古屋市立大学大学院医学研究科
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

A. 研究目的

カーボンナノチューブ等の急速な研究開発が進む一方、その健康影響、とくに呼吸器における中・長期毒性および発癌性の評価は必須であり、それには吸入暴露が望まれている。しかし、吸入暴露試験の実施には高額な専用吸入暴露施設が必要であるために実施は困難である。日本においてはバイオアッセイ研究センターのみで実施が可能であり、現状では世界でただ1種MWCNT-7 (M-H社) について実施され、肺は発がん性が報告されている(報告書 H26年5月26日)。世界では次々と新しいCNTが生産され市場に導入されつつあり、MWCNT-7以外は慢性毒性/発がん性リスク評価がなされていない。

他方、試験管内試験や短期の試験で得られるデータは極めて限定的である。そこで、吸入暴露に代替できる信頼性の高いリスク評価法の開発が不可欠である。本研究では、サイズと形状の異なるMWCNT種を対象に、Mφを介した傷害作用を評価する *in vitro* 短期試験法ならびにラットを用いた経気管肺内噴霧投与 (TIPS) 法を用いて、中期・長期2種の *in vivo* 試験系を開発し、実際のリスク評価に資する機序に基づく信頼性の高い評価法の開発を目指した。

B. 研究方法

① 肺胞Mφの*in vitro*における炎症・細胞増殖作用と機序の解析

1) 10週齢の雌F344ラットにチオグリコレートをTIPS投与して肺胞内にMφを誘導した後に肺を取り出し、メッシュ濾過にてMφを採取(現状で採取細胞の95%)する。一定量のMφ (10⁶個)をRPMI 1640 (10% FBS) 培地に移し、0.1% Tween含有生理食塩水に懸濁した各種のMWCNT (500 μg/ml) を培地に加えて24時間培養した。この上清を採取して、ヒト由来のMet5A(中皮細胞)、MESO-1/2 (中皮腫細胞上皮型/肉腫型)、CCD34 (肺線維芽細胞)、A549 (肺癌)、SNU-475 (肝癌)、Caki-1 (腎癌)、A2780 (卵巣癌)、MCF-7/T47D (乳癌) 等の培地に加えて12時間培養し、これらの細胞に対する増殖活性を観察した。またCNTを貪食した培養Mφが分泌する炎症性サイトカイン、増殖因子等について遺伝子・蛋白発現のアレイ解析を行い、関与する責任サイトカイン遺伝子/蛋白の同定をおこなった (Western/ELISA法、蛋白アレイ解析) (津田・酒々井)。

2) 気管支上皮に対する障害作用の検索は、一次培養気管支上皮細胞の線毛運動に対する影響について、蛍光ビーズ (TetraSpeck Fluorescent Microsphere Standards) の搬送能指標として *in vivo* と *in vitro* で観察できる評価法を検討した (今泉)。

3) ナノマテリアルのMφにおける影響をより直

接的に観察するために、マクロファージ様に分化させたTHP-1細胞に対する白金ナノコロイドPtNP-1（平均一次粒子径2 nm、水懸濁液、白金濃度2%、表面保護剤ポリアクリル酸、田中貴金属製）及び水系白金ナノ分散液PtNP-2（平均一次粒子径100 nm未満、エタノール・水（1:1）懸濁液、白金濃度1%、保護剤なし、四国計測工業製）の影響を比較検討した。ヒト急性単球性白血病由来THP-1細胞を96-well plateに 10^5 cells/wellずつ播種し、Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 200 nMで20時間処理した後に、終濃度として200 μ g/mLから公比2で6段階希釈した試料溶液を加えた。24時間培養後に培地を交換し、各wellにWST-8 (Cell Counting Kit-8) 10 μ Lを添加してCO₂インキュベーター内で1時間静置した。マイクロプレートリーダーを用いて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。細胞内の活性酸素種をTotal ROS/Superoxide Detection Kitを用いて測定した。細胞内グルタチオン濃度をGSH-Glo™ Glutathione Assay を用いて定量した（五十嵐-内野）。

②短期投与試験および短期投与-回復試験における炎症・増殖性病変の解析

1) 被検物質のMWCNT-L (A社) (直径=150 nm、針状凝集体)、MWCNT-7 (直径=80-90 nm、針状凝集体)、Crocidolite (UICC gradeアスベスト) を250および500 μ g/mlを、肺毒性は僅少でMWCNTの分散性能の良いことを確認している0.5% pluronic 68コポリマー分散剤 (PF68) に懸濁して0.5mlを2週間に8回TIPS投与を行い、投与終了後1日と、12週に屠殺して病変発生とその回復の程度を検討した（津田、酒々井）。

2) 同様にMWCNT-LとMWCNT-S (直径=15 nm) (A社) の中期毒性を評価するために、0.5mlを24週間に13回TIPS投与 (1.625mg/ラット) 後に屠殺した。この実験において、通常の肺、胸壁繊維化、中皮細胞の増殖の観察に加え、腹腔から経横隔膜にてRPMI 1640を胸腔内に5ml注入し

て胸腔洗浄液を回収して遠沈して得られた上清の炎症性蛋白の解析、沈渣成分は病理標本を作成して炎症細胞の種類とMWCNTの局在を偏光顕微鏡にて解析した（津田）。

3) MWCNTによる障害・発がん機序の解析のために、形状の異なる2種のMWCNT-LおよびMWCNT-Sを250および500 μ g/mlを0.5%PF68分散剤に懸濁して0.5mlを2週間に8回TIPS投与を行い(計1mg/ラット)、14日後、解剖した肺組織20mgを取り、DNAを抽出し、それを酵素的にヌクレオシドに加水分解した。得られたDNA加水分解物をLC/ESI-MS/MS解析試料とした。それをDNA付加体の分子イオンピーク[M+H]⁺からデオキシリボースの脱離によって生じる[M+H-116]⁺という特徴的なフラグメントを利用したLC/ESI-MS/MS (SRM) により、肺組織中の核酸と結合するアルデヒドやケトン基を有する活性カルボニル化合物 (Reactive carbonyl species; RCs) の生成について、網羅的解析を行った（大島-三好）。

③MWCNTの短期投与後長期観察による発がん性の検索

MWCNT-N (N社) (針状凝集体、長さ3.5 μ m、直径30nm) を250および500 μ g/mlを0.5%PF68分散剤に懸濁して0.5mlを2週間に8回TIPS投与を行い(計1mg/ラット)、投与終了後無処置で2年間観察し、発がん性について検討した（津田、酒々井）。またMWCNT-LとMWCNT-Sについて短期投与後2年間観察する試験は現在標本作成中である（津田）。

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

① 肺胞Mφの*in vitro*における炎症・細胞増殖作用と機序の解析

1) ラットのチオグリコレート誘導MφにMWCNT-7、MWCNT-N及びCrocidoliteを貪食させて得られた培養上清は、ヒト由来のMet5A(中皮細胞)、MESO-1/2(中皮腫細胞上皮型/肉腫型)とA549(肺癌)に対して増殖活性(対照の1.5~2倍)を示したが、CCD34(肺線維芽細胞)、SNU-475(肝癌)、Caki-1(腎癌)、A2780(卵巣癌)、MCF-7/T47D(乳癌)細胞に対する増殖活性はなかった。またCNTを貪食した培養Mφの分泌する炎症性サイトカイン、増殖因子等について遺伝子・蛋白発現のアレイ解析を行い、関与する責任サイトカイン遺伝子/蛋白の同定では、IL2、IL18、CCL2、CCL3、GRP/KC等が増加していた(対照の2~5倍)。これらの発現は肺組織ではMWCNT-Sに、胸腔洗浄液ではMWCNT-Lにそれぞれより高い値を示した(津田・酒々井)。

2) 気管における0.1μm 蛍光ビーズクリアランスはMWCNT-L群とMWCNT-S群でPF68群より増加し、MWCNT-L群でMWCNT-S群よりも有意に減少した。肺では0.1μm、0.5μm、3.0μmの蛍光ビーズで蛍光量が両投与群でPF68群と比較して減少した。(今泉)。

3) PtNP-1はTHP-1細胞の生存率の低下を起さなかったが、PtNP-2は顕著な細胞生存率の低下が観察され、LC50値は約30μg/mLであった。細胞内活性酸素種の産生では、細胞生存率の有意な低下が認められる濃度のPtNP-2(5μg/mLおよび200μg/mL)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の産生量は、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25μg/mL時ではコントロール群の約5倍、200μg/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。Superoxide産生量については、PtNP-2曝露10分後に200μg/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(五十嵐-内野)。

② 短期投与試験および短期投与-回復試験による炎症・増殖性病変の解析

1) MWCNT-L, MWCNT-7 (WHO/IARC Group 2B) および crocidolite (IARC 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変化の程度とそれらの回復 (Reversibility) の状態について、投与終了1日と12週後における回復の程度について検討した。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)。検体群間では壁側胸膜肥厚は12週においてMWCNT-7群が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週まで減少なく維持された。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週の70~60%に減少したが、MWCNT-7では他の約1.5~2倍の高値(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、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、IL-18が検体間ではMWCNT-7がより高値でしかも持続した。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。1日群では一部で特にcrocidoliteで肺胞上皮の過形成増殖を見たが、12週では全く消退していた(津田)。

2) MWCNT-LとMWCNT-Sを24週間に1.625mg/ラットに投与した実験では、肺胞の肉芽形成とMφ

を主とする炎症細胞浸潤はMWCNT-Sにより著名であった。臓側（肺側）胸膜ではPCNAラベルでみる中皮の増殖像はMWCNT-Lのほうがより高値であった。胸膜洗浄液と肺組織の蛋白アレイ解析では、胸膜洗浄液においてMWCNT-LのほうでIP10、RTANTES、IL-2、IL-18が高値を示し、肺組織ではこれとは逆の傾向でMWCNT-SにおいてCCL2、CCL3、IP10、IL1b、IL-18、VEGFがより高値であった（津田）。

3) MWCNT-LとMWCNT-Sについて、肺組織中の核酸と結合するアルデヒドやケトン基を有する活性カルボニル化合物（Reactive carbonyl species; RCs）について、DNA付加体の網羅的解析を行った結果、対照群で611、MWCNT-L、MWCNT-S投与ラットでそれぞれ693、676分画のピークが検出され、そのうちMWCNT-L、MWCNT-S投与ラットで27、26分画のピークが有意に増加していた。そのうち、脂質過酸化由来のアルデヒド化合物である4-hydroxy-2-nonenalのデオキシグアノシン（dG）付加体であるHNE-dGやmalondialdehydeのdG付加体であるM₁-dGが対照群と比較してMWCNT-L、MWCNT-S曝露ラット共に有意に増加していた。また、MWCNT-Sにおいて2-hexenalとdGの付加体である2-HE-dGや4-hydroxy-2-hexenalとdGの付加体であるHHE-dGの有意な増加が確認された。また、acetaldehyde、acrolein、crotonaldehydeや長鎖脂肪酸アルデヒド類などの様々な脂質過酸化由来のアルデヒド化合物とdGとの付加体の存在を確認した。この付加体は対照群と比較して、MWCNT投与ラットにおいて有意差は見られなかったが増加傾向を示した。これらの結果より、脂質過酸化由来の付加反応によって生じるDNA付加体の増加が発がんに関与する可能性が示唆された（大島-三好）。

③ MWCNTの短期投与・長期観察による発がん性の検索法

MWCNT-Nを250および500 μ g/mlを0.5%PF68分散剤に懸濁して0.5mlを2週間に8回TIPS投与を行い（計1mg/ラット）、投与終了後無処置で2

年間観察した実験では、分画による有意差はなく各分画を併せた発生頻度は、対照群（生食とPF68群の合計）では胸膜中皮と肺の腫瘍の発生頻度は0であったのに対し、心嚢、胸膜の悪性中皮腫（6/38, 15.8%）と肺胞上皮腺腫（4例）と腺がん（10例）の両者合計で14/41, 36.8%（ $P < 0.01$ ）であり、肺胞上皮と胸膜中皮に発がん性があることがわかった。これらの発生頻度の分画による差異はなかった。また発がんには65週以上の長期を要することがわかった（Cancer Science, 2016, in press）（酒々井、津田）。MWCNT-LとMWCNT-Sについての同様の試験は現在病理標本作中である。

D. 考察

① における肺胞M ϕ の*in vitro*における炎症・細胞増殖作用と機序の解析において、MWCNTをM ϕ に貪食させて得られた培養液中には肺がん細胞と悪性中皮腫細胞に対する増殖活性を示す因子が存在することが示され、かつ他の臓器由来の細胞にはその作用がないことになる。すなわち発がん性があれば標的細胞は肺と中皮ということを示唆する。さらにその因子にはIL2、IL18、CCL2、CCL3等のサイトカイン群が関与することが明らかとなった。今後これらの暴露、障害マーカーとしての有用性について検討する予定である。

② TIPS法による短期投与（2～4週）による炎症・増殖性病変の*in vivo*-回復状態の解析では、胸膜の肥厚、中皮の増殖は投与中止後でも半年近くでも持続することが明らかとなった。これはMWCNTのような固形物質は体内で代謝分解されることなく沈着局所において炎症反応を惹起して慢性的な組織・細胞損傷が長期間持続することによる。また、胸腔洗浄液の炎症細胞とサイトカインにも同様に持続した。これらのことは慢性毒性・発がん性併合試験を実施する場合に、従来の化学物質の評価のような長期投与は不必要で短期

間投与で結果が得られることを示唆し、今回報告するMWCNT-Nの発がん性結果と一致すると考える。また胸腔洗浄液の細胞とサイトカインに組成およびMWCNTの肺からの移動の評価等における有用性が明らかとなり、実際の短期代替評価法において極めて有用な成果である。

一方、MWCNTには様々なサイズ、形態があつてそれらの細胞・組織障害と発がん性に対する影響については、全く未知である。そこで、2種のMWCNT (MWCNT-L、針状の凝集体)、MWCNT-S (S社) (長さ3 mm, 直径=15 nm, 綿状の凝集体) について、4週間または24週間投与して、比較検討したところ、MWCNT-Lと同様形態のMWCNT-7は胸膜に対して、MWCNT-Sは肺においてより強い障害性を示すことがわかってきた。とくにMWCNT-Lはすでに腹腔内投与にて中皮腫を発生させることわかっているMWCNT-7 (IARC G2B) とサイズと形状の類似点があつて興味深い。さらに、この実験における回復観察では、肺と胸膜中皮の障害作用は投与中止後も長く持続することは、発がん性を考慮する上で重要である。MWCNT-LとMWCNT-Sの短期投与(8週)後より2年間無処置観察実験は現在病理標本を作成中である(津田)。

TIPS法による投与で、MWCNT-Lには気管支上皮に対する強い障害作用があり、多くの粘膜面で糜爛または潰瘍を形成し、その修復は遅延した。この理由はMWCNT-L自体の線毛運動による排出機能が障害されることによると考えられた。障害機序については今後の課題である(今泉)。

MWCNT-7の肺または中皮における発がん性を予測して、MWCNT-LおよびMWCNT-Sについて、肺内における過酸化脂質のDNA付加体の発生について検討したところ、4-hydroxy-2-nonenalのデオキシグアノシン(dG)付加体のHNE-dG、malondialdehydeのdG付加体であるM₁-dGがMWCNT-L、MWCNT-S群に有意に増加していた。これ

らより、脂質過酸化物の付加反応によって生じるDNA付加体の増加が発がんに関与する可能性が示され、細胞障害あるいは発がん機序として重要である可能性が示された(大島-三好)。

③ MWCNTのTIPS法による短期投与後に長期観察による発がん性検索法においては、MWCNT-Nの経気管肺内投与によって肺と胸膜中皮における発がん性が明らかとなった。世界で初めてこれはinternational journalにおいてMWCNTに肺と胸膜中皮に発がん性のあることを見出した報告である。将来このモデルによって吸入暴露施設を使わないで発がん性の評価が可能であることが示されたことになる。今後多種のCNTや線維性物質を用いてvalidationを行うことが必要である。その祭に、今回の経験では発がんの平均発生週は最終発生頻度がかかなり高いにも関わらず95週であることは、今後試験法の短縮を試みる上で注意すべき知見と考える。(酒々井、津田)。

E. 結論

1) *in vitro* において、肺胞MφにMWCNTを貪食させると、その培養上清には肺がん細胞と悪性中皮腫細胞に対する増殖因子が含まれる。同様な細胞増殖作用は、MWCNTを投与したラットの胸膜洗浄液でも観察された。この*in vitro* 試験系はMWCNTによる細胞増殖因子の産生の短期検索法として有用となる。

2) MWCNTの組織・細胞障害、増殖関連因子として主としてMφを介するCCL3、IL-2、IP10、IL-18、VEGF等の関与が示唆される。

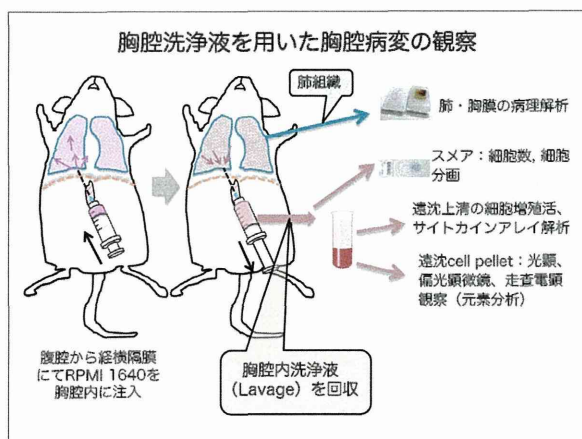
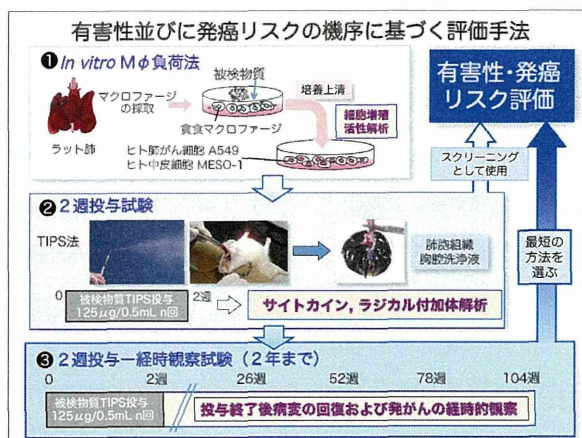
3) ラットを用いた短期回復試験、中期投与試験、および短期投与・長期観察試験の結果より、TIPS法は全身暴露法に代替でき得る。この方法における胸腔洗浄液の解析は胸腔内炎症の解析に有用な手段である。またMWCNTは肺胞以外に気管支上皮の線毛運動に対して強い阻害作用を示し、顕著

な粘膜上皮の損傷を起こす。

4) MWCNTのサイズと形状(直径、針状、綿状)の差異は肺と胸膜中皮に対する炎症と障害作用において異なる可能性がある。

5) MWCNT-Nの肺内投与による肺と胸膜中皮に対する発がん性を予測通り見出し、この一連の評価法の妥当性を得た(Cancer Science, 2016, in press)。

6) 発がん機序として、MWCNT投与ラットの肺にDNA障害性のacrolein、glyoxal、crotonaldehyde等の生成が見出された。



F. 健康危機情報

とくになし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Tomono S, Miyoshi N, Ohshima H, Comprehensive analysis of the lipophilic reactive carbonyls present in biological specimens by LC/ESI-MS/MS. (2015) *J. Chromatogr. B.*, 149-156.
- Futakuchi M, Fukamachi K, Suzui M. Heterogeneity of tumor cells in the bone microenvironment: mechanisms and therapeutic targets for bone metastasis of prostate or breast cancer. *Adv Drug Deliv Rev*, Epub, 2015.
- Tuboly E, Futakuchi M, Varga G, Erces D, Tokes T, Meszaros A, Kaszaki J, Suzui M, Imai M, Okada A, Okada N, Boros M, Okada H. C5a inhibitor protects ischemia/reperfusion injury in rat small intestine. *Microbiol Immunol*, Epub, 2015.
- Shibata K, Fukamachi K, Tsuji A, Saga T, Futakuchi M, Nagino M, Tsuda H, Suzui M. *In vivo* ¹⁸F-fluorodeoxyglucose-positron emission tomography/computed tomography imaging of pancreatic tumors in a transgenic rat model carrying the human *Kras*^{G12V} oncogene. *Oncol Lett*, 9: 2112-2118, 2015.
- Suzui M, Futakuchi M., Fukamachi K., Numano T., Mohamed Abd Elgied, Takahashi S., Ohnishi M., Omori, T., Tsuruoka S., Hirose A., Kanno J., Sakamoto Y., Alexander D.B., Alexander W.T., Xu J, Tsuda H. Multiwalled carbon nanotubes intratracheally instilled into the rat lung induce malignant mesothelioma and lung tumors. *Cancer Science*, 2016 (in press)
- Xu J., Alexander D.B., 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., Nakae D., Hirose A., Kanno J., and Tsuda H. Chemokine (C-C motif) ligand 3 detection in the serum of persons exposed to asbestos: A patient-based study. *Cancer Science.*, 106(7): 825-832, 2015.
- Xu J, Alexander D.B., 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 Science*, 105 (7): 763-769, 2014.

2. 学会発表

国内学会

1. 内野 正, 神野透人, 香川聡子, 秋山卓美, 五十嵐良明:化粧品原料として用いられる白金ナノマテリアル粒子の分散状態とその細胞毒性等への寄与. 第52回全国衛生化学技術協議会年会 (2015.12)
2. 伴野勸, 三好規之, 徐結苟, 津田洋幸, 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. 2014年9月4日~5日 京都
3. 松本晴年, 木村和哲, 酒々井眞澄. 沖縄県産植物芭蕉(バショウ)抽出物のがん細胞増殖抑制効果. 日本薬学会第136年会; 横浜: 2016年3月29日
4. 安藤さえこ, 加賀志稀, 佐藤圭悟, 深町勝巳, 二口充, 酒々井眞澄. Anticancer mechanism of action of palmitoyl piperidinopiperidine. 平成27年度「個体レベルでの癌研究支援活動」ワークショップ; 大津: 2016年2月3日
5. 加賀志稀, 安藤さえこ, 深町勝巳, 二口充, 酒々井眞澄. Relationship between pulmonary lesions induced by intrapulmonary instillation of multiwall carbon nanotubes and expression status of specific cytokines. 平成27年度「個体レベルでの癌研究支援活動」ワークショップ; 大津: 2016年2月3日
6. 松本晴年, 深町勝巳, 二口充, 津田洋幸, 酒々井眞澄. 多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の肺障害性と遺伝子発現への影響. 第32回日本毒性病理学会総会及び学術集会; 高松: 2016年1月28日
7. 松本晴年, 木村和哲, 酒々井眞澄. Growth inhibition of the crude extracts of *Musa basjoo* in human colon cancer cells. 日本病院薬剤師会東海ブロック日本薬学会東海支部合同学術大会 2015; 名古屋: 2015年11月1日
8. 安藤さえこ, 加賀志稀, 佐藤圭吾, 磯田泰彰, 深町勝巳, 二口充, 酒々井眞澄. 新規物質パルミトイルピペリジノピペリジンの抗がん活性の検証. 第74回日本癌学会学術総会; 名古屋: 2015年10月9日
9. 深町勝巳, 二口充, 津田洋幸, 酒々井眞澄. ラット膵がんの治療効果判定に有用な血清マーカー. 第74回日本癌学会学術総会; 名古屋: 2015年10月8日
10. 酒々井眞澄, 安藤さえこ, 加賀志稀, 佐藤圭吾, 深町勝巳, 二口充. 新規大腸がん治療薬パルミトイルピペリジン誘導体の開発. 第74回日本癌学会学術総会; 名古屋: 2015年10月8日
11. 二口充, 深町勝巳, 酒々井眞澄. 骨微小環境におけるがん幹細胞の悪性形質発現のメカニズム. 第74回日本癌学会学術総会; 名古屋: 2015年10月8日
12. 加賀志稀, 安藤さえこ, 深町勝巳, 二口充, 津田洋幸, 酒々井眞澄. 多層カーボンナノチューブによる肺障害性および特異的サイトカイン発現への影響. 平成27年度がん若手研究者ワークショップ; 蓼科: 2015年9月3日
13. 安藤さえこ, 加賀志稀, 佐藤圭吾, 深町勝巳, 二口充, 酒々井眞澄. パルミトイルピペリジノピペリジンの抗がん活性. 平成27年度がん若手研究者ワークショップ; 蓼科: 2015年9月3日
14. Saeko Ando, Shiki Kaga, Katsumi Fukamachi, Mitsuru Futakuchi, Masumi Suzui. Anticancer activity of palmitoyl

- piperidinopiperidine. 第 30 回発癌病理研究会; 小豆島: 2015 年 8 月 28 日
15. 加賀志稀、安藤さえこ、松本晴年、深町勝巳、二口充、酒々井眞澄. **Effecton profiles of specific cytokines and pulmonary injury induced by instillation of multiwall carbon nanotube.** 第 61 回日本薬学会東海支部総会・大会 2015; 名古屋: 2015 年 7 月 4 日
 16. 安藤さえこ、加賀志稀、松本晴年、佐藤圭吾、磯田泰彰、深町勝巳、二口充、酒々井眞澄. **Anticancer activity of a novel compound palmitoyl piperidinopiperidine.** 第 61 回日本薬学会東海支部総会・大会 2015; 名古屋: 2015 年 7 月 4 日
 17. 松本晴年、磯田泰彰、木村和哲、酒々井眞澄. **Growth inhibition of the crude extracts of *Musa basjoo* in human colon cancer cells.** 第 61 回日本薬学会東海支部総会・大会 2015; 名古屋: 2015 年 7 月 4 日
 18. 加賀志稀、深町勝巳、二口充、津田洋幸、酒々井眞澄. **多層カーボンナノチューブの肺障害性と遺伝子発現への影響.** 第 42 回日本毒性学会学術年会; 金沢: 2015 年 6 月 29 日
 19. 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. **新規抗がん物質の個体レベルにおける効果の検証.** がん予防学術大会 2015; 埼玉県さいたま市: 2015 年 6 月 5 日
 20. 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 (*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
 21. 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
 22. 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
 23. 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
 24. 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
 25. 山田茜、大羽輝弥、鈴木良明、山村寿男、今泉祐治. **マウス気道上皮繊毛細胞における繊毛運動制御に対する Cl⁻チャンネル活性の寄与.** 第 89 回日本薬理学会年会, 2016 年 3 月 9 日(横浜).
 26. 酒々井眞澄、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
 27. 津田洋幸、徐結旬、Alexander D. B., 酒々井眞澄、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.
 28. 松本晴年、深町勝巳、二口充、津田洋幸、酒々井眞澄 (2016) **多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の肺障害性と遺伝子発現への影響**; 第 32 回日本毒性病理学会総会 高松 1 月 28 日-29 日

国際学会

1. Shiki Kaga, Saeko Ando, Katsumi Fukamachi, Mitsuru Futakuchi, Hiroyuki Tsuda, Masumi Suzui. Effects of multiwall carbon nanotube on the pulmonary injury and expression status of specific cytokines. The 7th International Congress of Asis society of Toxicology; Jeju Island, Korea: Jun, 25th, 2015.
2. 津田洋幸 (2015) Mechanisms of nanotoxicology: The 7th International Congress of Asian Society of Toxicology 韓国 (済州) 6月 23-26日

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 27 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

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

分担研究者 内野 正 国立医薬品食品衛生研究所生活衛生化学部 主任研究官
研究協力者 神野 透人 名城大学薬学部 教授
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
秋山 卓美 国立医薬品食品衛生研究所生活衛生化学部 室長

研究要旨

シリカ、酸化チタンなどの微粒子の細胞傷害が **NLRP3 Inflammasome** の活性化で生じることが明らかにされつつある。白金ナノマテリアルについても同様のメカニズムが働くのかを明らかにするため、**Inflammasome** 活性化に伴って生じることが知られる **ASC Speck** に着目し、その形成を発現指標とする評価系を構築することを目的とした。**pCMV6-Entry** ベクターに挿入されたヒト ASC (PYCARD) 遺伝子を、C-末端 **mGFP** 融合タンパク質発現ベクター **pCMV6-AC-mGFP** ベクターにサブクローニングし、両鎖の塩基配列が **NM_013258** に一致することを確認した。これをトランスフェクションした細胞では **ASC-m GFP** 融合タンパク質を発現し、**Inflammasome** 活性化評価系に適用できることがわかった。

白金イオンの細胞毒性強度を評価するとともに、白金ナノ粒子分散液を限外ろ過膜で分別してイオン濃度を定量した。白金イオンは試験した最高濃度で細胞毒性を示さず、分散液中に定量されなかったことから、白金ナノ粒子自体が毒性を示すことが改めて明らかとなった。**ASC Speck** タンパク質発現を指標とする評価系を確立し、表面非修飾の白金粒子を用いて試験することにより、白金ナノ粒子の細胞毒性発現機構として **Inflammasome** 活性化の関与について明らかにすることができると考える。

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。酸化チタンナノ粒子など一部の金属ナノマテリアルの健康影響に関しては、比較的多くの情報

が集積されている。一方、白金はナノコロイドとして化粧品や健康食品に利用されており、有害性に関する報告はほとんど認められない。

26 年度までの研究では、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、**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-2 が PtNP-1 に比べて強い細胞毒性を示すことが明らかとなった。

26年度の研究では 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を試み、細胞毒性への関与について検討を行った。PtNP-2 の細胞毒性は、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である可能性が示唆されたものの、イオンと粒子を完全に分離しているとまでは言えず、結論づけることはできなかった。今年度は限外ろ過膜を用いてイオンと粒子を分別し、改めてイオンの有無について調査するとともに、白金イオンの細胞毒性を検討した。

粒子の細胞毒性の発現機構として、シリカ、酸化チタン、Alum などの粒子状物質は Macrophage などの NLRP3(Nod-Like Receptor family Pyrin domain containing 3) Inflammasome を活性化し、それに引き続いて Caspase-1 の活性化及び Interleukin-1 β 分泌の亢進を引き起こすとの報告がある。しかしながらこれを証明する評価系に対しての知見はほとんどない。そこで本年度は Inflammasome 活性化に伴って生じることが知られている ASC の凝集体、すなわち ASC Speck 形成に着目し、これを指標とする Inflammasome 活性化評価系を構築することを目的として、評価系確立に必要なベクターにかかわる基礎的検討を行った。

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、超純水で 100 μ 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、上記希釈懸濁液を 20°C、10,000 g で 30

分間遠心後、上清をナノセップ 3K (分画分子量 3K, 透過分子サイズ 1~2 nm 以下) に入れ、PtNP-2 は 10,000 g で 1 時間の遠心を 1 回、PtNP-1 は 3 回行った後、ろ液の粒度分布を測定した。

3. 白金含量の定量

上記のようにろ過して得た試料溶液を 1%硝酸溶液で希釈し、0.2 μ m のフィルターでろ過した後、ICP-MS で測定した。

4. 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、Phorbol Myristate Acetate (PMA) 200 nM 処理 24 時間後に 10%FBS を含む RPMI1640 培地を除き、種々の濃度の白金イオン (H₂PtCl₆) 溶液 100 μ L を添加した。試験は 1 濃度当たり 6 穴で実施した。被験物質を添加して 24 時間経過後に培地を交換し、各 Well に WST-8 試薬(同仁化学研究所製) 10 μ L を添加して 2 時間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。

5. ASC Speck 遺伝子の THP-1 細胞へのトランスフェクション

pCMV6-Entry に挿入されたヒト ASC(PYCARD)遺伝子を制限酵素 *Sgf* I および *Mlu* I で切り出し、C-末端 mGFP 融合タンパク質発現ベクター pCMV6-AC-mGFP ベクターにサブクローニングした。

Lipofectamine 3000 試薬を用いて THP-1 細胞にトランスフェクションした。トランスフェクションから 24 時間後に細胞を 96-well コラーゲンコートプレートに播き換え、200 nM Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 処理を行った。さらに 24 時間培養したのちに、発現した GFP 融合タンパク質をオールインワン蛍光顕微鏡 BZ-X700 を用いて観察した。

C. 研究結果

1. 粒度分布

PtNP-1 及び PtNP-2 を水で（白金濃度）100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈した直後の平均粒子径はそれぞれ 86 nm 及び 70 nm であった（ $n=3$ の平均）。散乱強度分布でみた場合、PtNP-1 は約 40%が、PtNP-2 は約 80%が 100 nm 以下であった。一方、個数分布で見た場合、ほとんどが 100 nm 以下であった（図 1）。各懸濁液の限外ろ過後のろ液については、測定可能な粒子濃度になかった。

2. 白金イオンの定量と細胞毒性

限外ろ過液の白金濃度を定量した。PtNP-2 については、定量下限値（約 0.03 ng/mL ）以下であった。一方、PtNP-1 については $0.695 \pm 0.021 \mu\text{g}/\text{mL}$ ($n=3$) であった。

白金イオンについては試験した最大濃度 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ までは細胞生存率の有意な減少は認められなかった(図 2)。

3. ASC Speck 遺伝子発現ベクターの構築

pCMV6-Entry ベクターにクローニングされたヒト ASC cDNA を C-末端モノメリック GFP 融合タンパク質発現ベクター pCMV6-AC-mGFP にサブクローニングし、両鎖について CDS のシーケンシングを行い、塩基配列が NM_013258 に一致することを確認した。

得られた発現ベクターを THP-1 細胞にトランスフェクションし、24 時間後に PMA 処理してマクロファージに分化させたところ、ASC-mGFP 融合タンパク質の発現を確認した（図 3）。

D. 考察

白金ナノ粒子の細胞毒性が粒子自体によるものか、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ため、限外ろ過膜を用いてイオンと粒子を分別すると共に、白金イオンの細胞毒性について検討した。PtNP-2 について、限外ろ過したろ液には定量下限値以上の白金は検出されなかった。試験した最高濃度の 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の白金イオンの曝露でも細胞毒性が見られなかったことから、PtNP-2 の毒性は白金粒子自体によるもの

のと思われるが、TEM などでもろ液について粒子の存在の有無を確認する必要がある。

更にこの細胞毒性に Inflammasome 活性化が関与するかを評価するために ASC Speck を指標とする評価系の構築を試みた。遺伝子発現ベクターを構築し、THP-1 細胞へのトランスフェクションしたところ、細胞に ASC-mGFP 融合タンパク質の発現がみられた。

本研究でクローニングされたベクターを用いることによって Inflammasome 活性化評価法の構築が可能であり、表面非修飾の白金粒子を用いることによって、白金ナノ粒子の細胞毒性の発現機構について明らかにすることができると考えられた。

E. 結論

保護剤を含まない白金ナノマテリアルの細胞毒性は粒子自体が関与することが明らかとなった。Inflammasome 活性化の評価指標とする ASC Speck 遺伝子のクローニングを行った。ASC Speck タンパク質発現系と保護剤を含まない表面非修飾白金ナノ粒子懸濁液を用いて試験することにより、白金ナノ粒子の細胞毒性の発現機構を明らかにすることができると思われた。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

内野 正, 神野透人, 香川聡子, 秋山卓美, 五十嵐良明: 化粧品原料として用いられる白金ナノマテリアル粒子の分散状態とその細胞毒性等への寄与. 第 52 回全国衛生化学技術協議会年会 (2015.12)

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

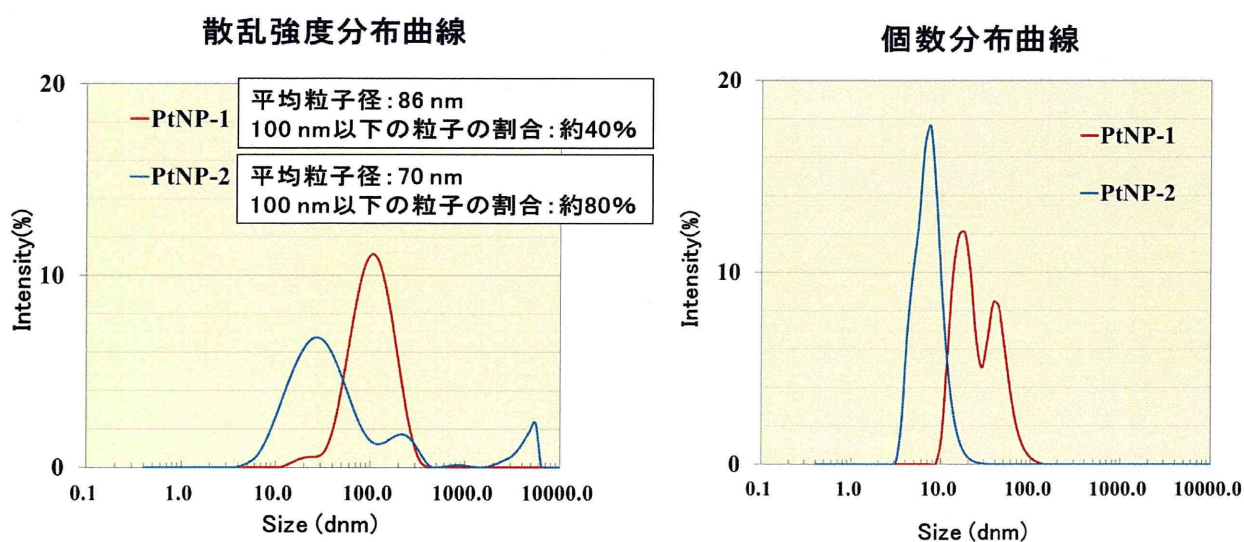


図 1. 白金ナノ粒子懸濁液の粒度分布

白金粒子として 100 として懸濁の濃度になるよう水で希釈して 5 分間超音波処理後、粒度分布を測定した。

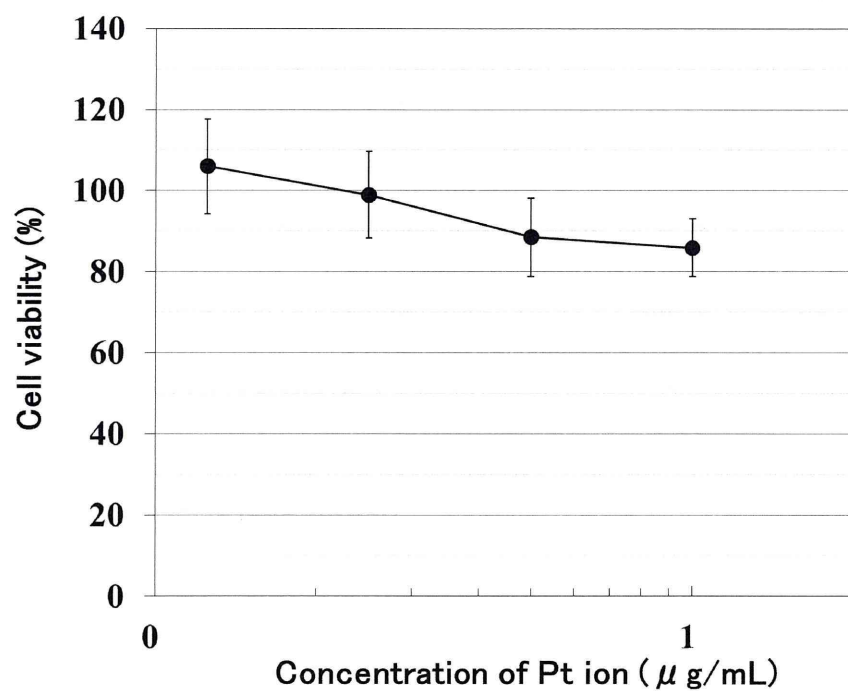


図 2. 白金イオンの細胞毒性

PMA で処理した THP-1 細胞 (10^5 cells/well) に H_2PtCl_6 の溶液を 24 時間曝露したのち生存率を測定した。