

平成28年度厚生労働行政推進調査事業費補助金（化学物質リスク研究事業）  
分担研究報告書

研究課題：ナノマテリアル曝露による慢性及び遅発毒性評価法の開発に関する研究

分担研究課題：ナノマテリアルの遺伝毒性評価に関する研究  
—マウスを用いる肺小核試験の基礎検討試験—

研究分担者：	本間 正充	国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部 部長
研究協力者：	高橋 祐次	国立医薬品食品衛生研究所毒性部 室長
研究協力者：	堀端 克良	国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部 主任研究官
研究協力者：	濱田 修一	株式会社L S I メディエンス
研究協力者：	高沢 博修	株式会社L S I メディエンス
研究協力者：	中川 宗洋	株式会社L S I メディエンス

#### 研究要旨

ナノ物質の中でも、カーボンナノチューブ（CNT）はその物理化学的性状がアスベストに類似しているため、吸入による肺組織での発がん性が懸念されている。本研究では、*in vivo*でのナノ遺伝毒性の評価法を開発するため、マウス肺を用いる小核試験法の確立を試みている。雄性 C57BL/6NcrSlc マウス（投与／暴露開始時 12 週齢）に CNT を目標質量濃度 2.0 mg/m<sup>3</sup> の濃度で 2 時間／日、5 日間全身暴露した（5 回の平均質量濃度は 2.8 mg/m<sup>3</sup>）。対照群には空気を同様に暴露した。また、陽性対照物質として ethyl methanesulfonate (EMS) の 25 mg/kg を 5 日間腹腔内投与した。最終暴露／投与後 5 日目に肺細胞を採取し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 下で 48 時間培養し、小核をもつ細胞の誘発率を調べた。その結果、CNT 暴露群及び EMS 投与群では、それぞれ対照群及び媒体対照群と比較して小核誘発の有意な増加が認められ、CNT 暴露群では陽性対照物質として使用した EMS 投与群と比較しても小核を有する細胞の出現頻度は 2 倍以上の高値を示した。以上の結果から、CNT は *in vivo-in vitro* 法を用いた本試験条件下でマウス肺小核試験で陽性と判定された。

キーワード：ナノマテリアル、小核試験、遺伝毒性、発がん性

#### A. 研究目的

ナノ技術が向上し、様々なナノマテリアルが開発されているが、その中のカーボン

ナノチューブ（CNT）は電子的、化学的にユニークであることから、様々な分野で様々な用途に用いられている。例えば、プ

ラスの電荷を持つ CNT はマイナスの電荷を持つ DNA と結合しやすいという性質を応用し、CNT が DNA のセンサーに応用されているが、これは、CNT が DNA と作用し、遺伝的変異を誘発する可能性を示唆している。

また、CNT が酸化ストレスや炎症、線維症、肉芽腫の発生を促進し、線維症は CNT が肺のマクロファージに結合することで細胞間の構造を変化させることが原因と考えられている。その他、CNT は青石綿と同様に p53 ヘテロ欠損マウス腹腔内投与モデルにおいて中皮腫を生じさせることが明らかになっている。このように CNT は、酸化ストレスや炎症反応により間接的に発がん性に関与し、また、DNA や分裂装置と直接結合することで発がん性を示すと考えられている。

CNT の遺伝毒性に関しては、Kato らが野生型 ICR マウスに MWCNT (幅 70-110nm、長さ 1-4 $\mu$ m) を気管内注入し、肺組織のコメットアッセイ、酸化的 DNA 付加体の定量、そして一酸化窒素合成酵素の免疫組織化学的解析を行ったところ、すべて陽性の結果が得られた。よって MWCNT の遺伝毒性は、過剰な炎症反応による酸化的ストレスが主な原因であるとされている。

しかしながら、他の遺伝毒性エンドポイントでの CNT の評価はほとんど検討されておらず、上記で観察された遺伝毒性と発がん性との関係は不明である。これは、ナノ物質の標的臓器である肺での遺伝毒性試験マーカーがほとんど開発されてこなかったことが原因である。

本研究では、CNT の *in vivo* 遺伝毒性評価のために、マウスを用いる肺小核試験系の開発を試みている。本試験系の特徴は *in vivo* で暴露したマウスの肺を摘出後、肺細胞を培養する *in vivo-in vitro* 法であり、*in vitro* で細胞分裂惹させることにより、小核

を含む分裂細胞を効率よく得ることができる。昨年度、モデル化合物として、ブレオマイシンと EMS を用いた試験を行い、両者とも媒体対照 (生理食塩液) 群と比較して、肺小核誘発の有意な増加が認められたことから、本年度は実際に CNT をマウスに全身暴露させる予備試験を行い、CNT の肺小核誘発性を検討した。

## B. 研究方法

### (1) 被検物質

CNT 検体は MWNT-7 (三井物産、Lot No. 060125-01k) を用いた。Taquann 法処理\*により凝集体・凝固体を除去した高分散検体 (T-CNT) を得、被検物質とした。Ethyl methanesulfonate (EMS, Sigma-Aldrich Corporation, lot#: BCBN1209V) を陽性対照に使用した。

\*Taquahashi Y, Ogawa Y, Takagi A, Tsuji M, Morita K, Kanno J. Improved dispersion method of multi-wall carbon nanotube for inhalation toxicity studies of experimental animals. J Toxicol Sci. 2013;38(4):619-28.

### (2) 動物

日本エスエルシー株式会社より 11 週齢の雄性 C57BL/6NCrSlc (SPF) マウスを購入して試験に用いた。尚、陰性対照群の試験は株式会社 L S I メディエンス (LSIM)、CNT の試験は国立医薬品食品衛生研究所 (NIHS) で毒性部 (暴露) と、LSIM (小核試験) が行った。LSIM では各実験当り 6 匹、計 18 匹を使用した。NIHS では肺細胞採取用に 6 匹を使用した。検疫期間は動物入荷後 5 日間とし、動物入荷時及び検疫終了時に体重を測定した。1 日 1 回一般状態を観察し、検疫期間中には馴化も行った。いずれの動物でも一般状態の異常が認められず、自然な体重増加が認められたことを確認して実験に使用した。

### (3) 投与

① CNT : Taquann 直噴全身曝露吸入システム (ver.2.0、柴田科学株式会社) を用い、2 時間/日、5 日間連続の全身吸入曝露を行った。対照群には HEPA フィルターを通した空気を同様に曝露した。曝露チャンバー内の MWCNT エアロゾル濃度のモニタリングは、相対濃度測定 (CPM; count per minutes) と質量濃度測定 ( $\text{mg}/\text{m}^3$ ) を並行して行った。相対濃度測定は、凝縮粒子計数装置 (Condensation Particle Counter ; CPC、CPC3776、サンプリング流量 : 1.5 L/min、TSI、東京ダイレック株式会社) を用いた。CPC の前段には希釈装置 (Dilution controller、柴田科学) を接続し、サンプルを 15 倍希釈して測定した。質量濃度測定は、ローボリウムサンプラー (080050-155、 $\phi 55$  mm ろ紙ホルダー、柴田科学) にフッ素樹脂処理ガラス繊維フィルター (Model T60A20、 $\phi 55$ mm、捕集効率 (DOP 0.3  $\mu\text{m}$ ) : 96.4%、東京ダイレック株式会社) を装着し、サンプリングポンプ (Asbestos sampling pump AIP-105、柴田科学株式会社) に接続して 1.5 L/min の流量で曝露時間の 2 時間を通してエアロゾルを吸引しフィルターに検体を捕集した。ろ過捕集後のフィルターの重量から予め秤量したフィルターの重量を差し引いた値を検体の重量とし、吸引空気量  $1.5 \text{ L}/\text{min} \times 120 \text{ min} = 180 \text{ L}$  から  $1 \text{ m}^3$  当りの質量濃度を算出した。フィルターの秤量にはマイクロ天秤 (XP26V、METTLER TOLEDO) を使用した。5 回の質量濃度の平均は  $2.8 \text{ mg}/\text{m}^3$ 、相対濃度は  $1,773/\text{cm}^3$  であった (Table 1)。

② EMS : 生理食塩液で調整した EMS を腹腔内投与した。予備実験では初回投与時に  $50 \text{ mg}/\text{kg}$  とし、2 回目投与以降は  $6.25$ 、 $12.5$  及び  $25 \text{ mg}/\text{kg}$  とした。予備再実験以降は  $25 \text{ mg}/\text{kg}$  とした。

### (4) 細胞分離および培養

投与後、72 時間後に Lindberg らの方法を参考に下記の方法で Clara 細胞及び AT-II 細胞を分離、識別した。

- i. マウスをチオペンタールナトリウム (ラボナール、田辺三菱製薬株式会社) 麻酔下で開腹し、腹大動脈を切断・放血して安楽死させた。
- ii. PBS(-)溶液で、気管・肺内を満たした後、0.25% トリプシン溶液で置換した。
- iii. 両肺を 50 mL 遠沈管に入れて、 $37^\circ\text{C}$  温浴中で 30 分間処理した後、気管及び目視できる気管支を除去して肺組織を細切した。
- iv. 肺組織を 50 mL のディスポ遠沈管に回収し、牛胎仔血清 (FBS) と  $250 \mu\text{g}/\text{mL}$  DNase を含む液を加えて、 $37^\circ\text{C}$  温浴中で 10 分間処理した。
- v. ガーゼでろ過した後、 $1500\times\text{g}$ 、10 分間遠心分離して肺細胞 (沈渣) を回収した。
- vi. Percoll の密度勾配 (密度 1.089 と 1.040) により遠心分離 ( $2000\times\text{g}$ 、25 分間、 $20^\circ\text{C}$ ) して、回収した細胞集団を Waymouth 培地で  $37^\circ\text{C}$ 、48 時間培養した。
- vii. 培養後、3% 酢酸添加エタノール固定液で細胞を回収し、スライドガラスに滴下してスライド標本作製した。

#### (ア) 標本作製 (標本染色) 及び標本観察

- i. 上記で作製したスライド標本を DAPI 染色液 ( $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) で染色して、蛍光顕微鏡下 (U 励起) で観察した。
- ii. 肺細胞 2000 個/匹を数え、小核をもつ細胞の割合を算出した。
- iii. 円形から楕円形の比較的大きな細胞を測定対象細胞とした。

### (6) 統計学的解析、試験結果の評価

肺細胞における小核誘発頻度について、媒体対照群と CNT 曝露群あるいは媒体対

照群と EMS 投与群との間で、Kastenbaum と Bowman の方法により有意差検定を行った。媒体対照群と比較して、陽性対照物質 (EMS) により小核をもつ肺細胞が増加することにより、試験法は適切であったと判断し、CNT 暴露群の小核誘発頻度が対照群と比較して有意に増加した場合を陽性と判定した。

### C. 研究結果および考察

#### (1) 肺小核の出現頻度

本実験における小核をもつ肺細胞の出現頻度の結果を Table 2 に、顕微鏡写真を Fig. 1 に示す。

NIHS 及び LSIM で採取された標本について、形態学的に AT-II あるいは Clara 細胞と思われる評価対象肺細胞は、いずれの観察対象標本でも 2000 個/匹を測定可能であった。

NIHS の実験では、CNT 暴露群において対照群と比較して、小核をもつ細胞の有意で明らかな高値が認められた。LSIM の実験でも、陽性対照として使用した EMS 群において媒体対照群と比較して、小核をもつ細胞の有意な高値がみられた。また、CNT 暴露群の小核誘発頻度は EMS 投与群と比較して約 2.6 倍の高値を示し、媒体対照を投与した腹腔内投与群と比較して吸入暴露群の対照群は小核をもつ肺細胞の出現頻度がやや高い傾向がみられた。

#### (2) 特記事項

予備実験において、EMS の 50 mg/kg を腹腔内投与した結果、初回投与翌日に投与した 3 匹全例の死亡を発見した。そのため、媒体 (生理食塩液) を投与した群を使用して用量設定試験を実施した結果、25 mg/kg 以下の用量では死亡及び重篤な毒性症状は認められなかった。

これらの結果に基づいて、EMS の 25

mg/kg の用量を使用して予備再実験を実施した。予備再実験では、エラスターゼを用いて肺細胞を分離後、35 あるいは 60 mm ディッシュで細胞培養したが、細胞回収率が悪く、良好な状態での肺細胞標本は作製できなかった。そのため、標本観察は行わず、ラボテックチャンバー (8 wells) を用いて細胞を培養後、細胞を回収せずに固定する方法を事前検討として実施した。

予備再実験において細胞回収率が悪かった原因として、エラスターゼの効果が期待ほどではなかったことが考えられたため、事前検討ではトリプシン、コラゲナーゼ、エラスターゼの 3 種類の酵素を使用して肺細胞を分離し、細胞培養後に作製した標本の状態を比較した。その結果、作製した標本の状態はトリプシン、エラスターゼ、コラゲナーゼの順に良好であった。これらの結果から、本実験ではトリプシンを使用して肺細胞を分離した。

なお、本試験ではいずれの実験においても細胞培養前に細胞生存率は測定せず、AT-II 及び Clara 細胞の識別も行わなかった。

### D. 結論

カーボンナノチューブ (CNT) による *in vivo* における遺伝毒性を評価するために、マウスを用いる肺小核試験を用いて予備検討を実施した。

雄性 C57BL/6NcrSlc マウス (投与/暴露開始時 12 週齢) に CNT を目標質量濃度 2.0 mg/m<sup>3</sup> の濃度で 2 時間/日、5 日間全身暴露した。対照群には空気を同様に暴露した (5 回の平均質量濃度は 2.8 mg/m<sup>3</sup>)。また、陽性対照物質として ethyl methanesulfonate (EMS) の 25 mg/kg を 5 日間腹腔内投与した。対照群には媒体の生理食塩液を同様に投与した。最終暴露/投与後 5 日目に肺細胞を採取し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 下で 48 時間培養した。培養後、細胞を固定してスライド

標本を作製し、小核をもつ細胞の誘発率を調べた。

その結果、CNT 暴露群及び EMS 投与群では、それぞれ対照群及び媒体対照群と比較して小核誘発の有意な増加が認められ、CNT 暴露群では陽性対照物質として使用した EMS 投与群と比較しても小核を有する細胞の出現頻度は 2 倍以上の高値を示した。

以上の結果から、CNT は *in vivo-in vitro* 法を用いた本試験条件下でマウス肺小核試験で陽性と判定された。

#### **E. 健康危機情報**

特になし

#### **F. 研究発表**

##### **1. 論文発表**

Horibata K, Ukai A, Ogata A, Nakae D, Ando H, Kubo Y, Nagasawa A, Yuzawa K, Honma M. Absence of *in vivo* mutagenicity of multi-walled carbon nanotubes in single intratracheal instillation study using F344 gpt delta rats. *Genes Environ.* 2017, 39:4 doi: 10.1186/s41021-016-0065-5

##### **2. 学会発表**

なし

#### **G. 知的所有権の取得状況**

なし

Table 1: CNT 全身暴露吸入の質量濃度及び相対濃度

	1st	2nd	3rd	4th	5th	Average	SD
<b>MWNT-7 Mass Concentration (mg/m<sup>3</sup>)</b>	<b>2.7</b>	<b>2.6</b>	<b>2.6</b>	<b>3.1</b>	<b>2.9</b>	<b>2.8</b>	<b>0.21</b>
<b>CPC Average(0-120min, #/cm<sup>3</sup>)</b>	<b>1,521</b>	<b>2,189</b>	<b>2,016</b>	<b>1,562</b>	<b>1,577</b>	<b>1773</b>	<b>308</b>
<b>Max.</b>	<b>2,007</b>	<b>3,056</b>	<b>2,750</b>	<b>2,219</b>	<b>2,067</b>		

Table2: 小核試験結果

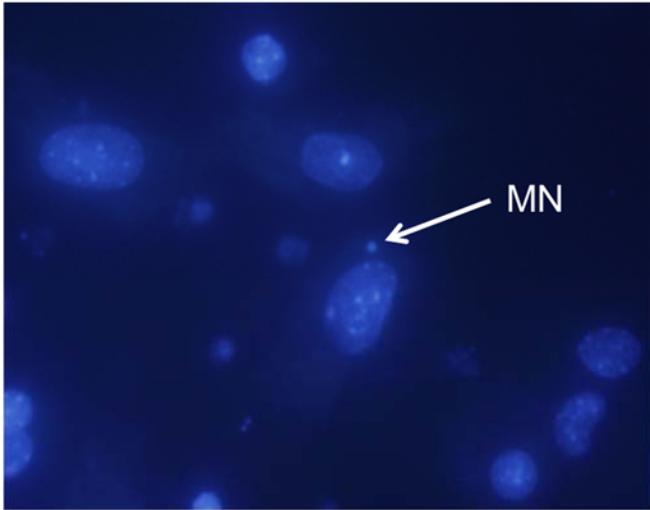
Treatment group	Dose Level Route Frequency	Animal number	Number of cells scored	Number of micronucleated (MN) cells	Incidence of MN cells (%)
Air	0 mg/m <sup>3</sup>	10101	2000	6	0.30
	Inhalation <sup>a)</sup>	10102	2000	4	0.20
	5 days <sup>b)</sup>	10103	2000	7	0.35
Total / Mean ± S.D.			6000	17	0.283 ± 0.076
CNT	2.0 mg/m <sup>3</sup>	10201	2000	42	2.10
	Inhalation <sup>a)</sup>	10202	2000	21	1.05
	5 days <sup>b)</sup>	10203	2000	26	1.30
Total / Mean ± S.D.			6000	89 <sup>##</sup>	1.483 ± 0.548
Physiological saline	0 mg/kg	39001	2000	2	0.10
	ip.	39002	2000	3	0.15
	5 days	39003	2000	4	0.20
Total / Mean ± S.D.			6000	9	0.150 ± 0.050
EMS	25 mg/kg	39004	2000	11	0.55
	ip.	39005	2000	9	0.45
	5 days	39006	2000	14	0.70
Total / Mean ± S.D.			6000	34 <sup>##</sup>	0.567 ± 0.126

CNT: Carbon nanotubes, EMS: Ethyl methanesulfonate

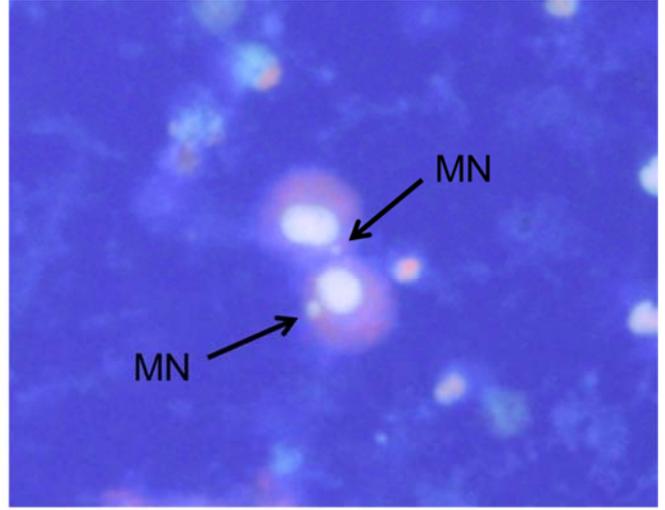
<sup>a)</sup> Whole body inhalation

<sup>b)</sup> For 2 h/day for 5 consecutive days

<sup>##</sup> p<0.01 (Kastenbaum and Bowman's method)



Stained with DAPI alone (EMS, 25 mg/kg/day for 5 days)



Stained with AO-DAPI mixture (CNT, 2.0 mg/m<sup>3</sup>/day for 5 days)

**Fig. 1** Microscopic observation in the mouse lung micronucleus assay