

平成30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）
「ナノマテリアル曝露による慢性影響の効率的評価手法開発に関する研究」

ナノマテリアル曝露による *in vivo* 遺伝毒性評価系の確立に関する研究

研究分担者：	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：	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：	横田 理	国立医薬品食品衛生研究所毒性部 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。我々はこれまでに、マウス肺を標的とする *in vivo-in vitro* 法を用いた小核試験法の確立を試み、それを用いて CNT 全身吸入曝露下での肺遺伝毒性を評価した。その結果、CNT 全身吸入曝露群ではマウス肺小核試験陽性となることを明らかにしている。他方、曝露方法の違いにより CNT 毒性の発現形態が異なる可能性が指摘されている。そこで、今回我々は投与方法による影響を明らかにするため、CNT 気管内投与下における *in vivo-in vitro* 法を用いた肺小核試験の予備試験を実施した。今回の予備試験では、系統差の有無を併せて調べるため、C57BL および ICR の 2 系統のマウスを用いた。各マウスに CNT を 0.1 mg/匹（50 μ L/匹）の用量で単回気管内投与した。陰性対照群には 0.05% Tween 80 を含む生理食塩液を用いた。陽性対照物質として ethyl methanesulfonate (EMS) (C57BL 25 mg/kg、ICR 50 mg/kg) を単回腹腔内投与した。その結果、両系統のマウスにおいて CNT 及び EMS いずれの投与群においても、陰性対照群と比較して小核誘発の有意な増加は認められなかった。以上の結果から、単回投与を行う今回の予備試験条件下では、両系統のマウスともに肺小核試験陰性と結論した。

キーワード：ナノマテリアル、遺伝毒性、全身吸入曝露、気管内投与

A. 研究目的

ナノ技術の向上により、現在では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 のセンサーに应用されているが、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 μ m)を気管内注入し、肺組織のコメットアッセイ、酸化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。

これまで、我々は肺に行けるCNTの*in vivo*遺伝毒性評価のために、マウス肺小核試験系の開発を試みている。この試験系の特徴は*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*で細胞分裂を惹起させることにより、小核を含む分裂細胞を効率よく得ることができる。これまでの研究から、陽性対照を用いた試験によりマウス肺小核試験系の技術基盤を整備し、それを用いてCNT全身吸入暴露によって誘導される遺伝毒性評価を実施した。その結果、CNT全身吸入暴露群ではマウス肺小核試験陽性

となることを明らかにした。他方、CNTの暴露方法の違いにより毒性の発現形態が異なる可能性が指摘されている。そこで、今回我々は投与方法による影響を明らかにするため、CNT気管内投与下における*in vivo-in vitro*法を用いた肺小核予備試験を実施した。

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。Ethylmethanesulfonate(EMS, Sigma-Aldrich Corporation, lot#: BCBS6100V)を陽性対照に使用した。また、0.05% Tween 80を含む生理食塩液を気管内投与の陰性対照とした。

*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、日本チャールス・リバー株式会社より7週齢の雄性Cr1:CD1(ICR)マウスをそれぞれ購入して試験に用いた。両系統とも各群3匹とし、陰性対照群、陽性対照群およびCNT暴露群の合計18匹を使用した。馴化期間は動物入荷後1週間とし、C57BL/6NCrSlc(SPF)マウスは12週齢、Cr1:CD1(ICR)マウスは8週齢の動物を試験に使用した。

(3) 投与

① CNTおよび陰性対照: CNT 3.4 mgをガラス瓶に秤量し、0.05% Tween 80を含む生理食塩液を1.7 mL加えて超音波処理し、よ

く分散させ、2 µg/µL (2 mg/mL) 投与液を調製した。イソフルラン麻酔下でマウス気管内投与用チューブを気管内に挿入し、1 mL のディスポーザブルシリンジを使用して 50 µL/匹 (0.1 mg/匹) となるように投与液を気管内に噴射投与した。陰性対照群には 0.05% Tween 80 を含む生理食塩液を 50 µL/匹となるように気管内に噴射投与した。なお、CNT の用量設定は Kato らが野生型 ICR マウスに CNT を単回気管内注入し、肺組織のコメットアッセイで陽性結果を示した用量 (0.05-0.2 mg/匹) を参考に設定した。

② EMS：生理食塩液 (日本薬局方、株式会社大塚製薬工場) に溶解して、C57BL/6NCrSlc には 2.5 mg/mL 投与液を調製し、25 mg/kg の投与用量で腹腔内投与した。Cr1:CD1(ICR) マウスには、5 mg/mL 投与液を調製し、50 mg/kg の投与用量で腹腔内投与した。腹腔内投与は、二段針を装着した 1 mL のディスポーザブルシリンジを使用した。

(4) 細胞分離培養および標本作製

投与後 5 日目に、Lindberg らの方法を参考に下記の方法で肺細胞 (Clara 細胞及び AT-II 細胞と推定される細胞) を分離した。

- i. マウスを麻酔下で放血して安楽死させた。
- ii. 生理食塩液で気管・肺内を洗浄した後、0.25% トリプシン液で満たした。
- iii. 両肺を 50 mL 遠沈管に入れて、37°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. 牛胎仔血清と 250 µg/mL DNaseI を含む液を加えて、37°C 温浴中で 10 分間処理した。
- v. ガーゼとセルストレーナーでろ過した後、1500×g で 10 分間遠心分離して肺細胞 (沈査) を回収した。

vi. Percoll の密度勾配 (密度 : 1.089 及び 1.040 g/cm³) により遠心分離 (2000×g、常温、25 分間) して、回収した細胞集団を Waymouth 培地で 37°C、48 時間培養した。

vii. 培養後、酢酸-エタノール (1:3) 固定液で細胞を固定してスライド標本を作製した。

(ア) 標本染色および標本観察

- i. 上記で作製したスライド標本をアクリジンオレンジ (AO、500 µg/mL) -4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI、10 µg/mL) 混合液で染色して、蛍光顕微鏡下 (U 励起) で観察した。
- ii. C57BL/6NCrSlc マウスでは 2000 個/匹、Cr1:CD1(ICR) マウスでは 3600~4000 個/匹の肺細胞をそれぞれ数え、小核を有する細胞の誘発率を算出した。

(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、各系統における陰性対照群と CNT 投与群、ならびに陰性対照群と 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。

(倫理面への配慮)

動物を用いた実験は、所属機関における「動物実験の適正な実施に関する規定」、わが国における「動物の保護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼育及び保管等に関する基準」ならびに厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針に準拠して行った。加えて、試験実施機関による動物実験に関する倫理委員会の承認を得るなど、実験動物に対する動物愛護を配慮の上で実施した。

C. 研究結果および考察

一般状態及び体重についての結果をエ
ラー! 参照元が見つかりません。に示した。
C57BL/6NcrSlc マウスの陰性対照群で 1 例
及び CNT 群で 1 例が気管内投与直後に死亡
した。これらは気管内投与により気道が閉
塞されたことによる死亡と考えられた。陰
性対照群の 1 死亡例については余剰動物を
充当したが、CNT 群の 1 死亡例については
欠損となった。死亡動物以外は、観察期間
中に異常所見は認められなかった。体重に
ついては、C57BL/6NcrSlc マウス及び
Cr1:CD1(ICR)マウスともに投与当日から標
本作製(細胞回収)当日にかけて、僅かな
体重変動はみられたが著変は認められな
かった。

C57BL/6NcrSlc マウスでの小核をもつ肺
細胞の出現頻度の結果を Table 2 に、
Cr1:CD1(ICR)マウスでの結果を Table 3 に
示した。C57BL/6NcrSlc マウスでは、陰性
対照群の平均値は $0.067 \pm 0.029\%$ 、CNT 投
与群及び EMS 投与群ではそれぞれ $0.100 \pm$
 0.000% 及び $0.100 \pm 0.050\%$ であり、CNT 投
与群及び EMS 投与群は陰性対照群と比較し
て有意な小核誘発率の増加は認められな
かった(Table 2)。また、いずれの個体の値も
 0.150% 以下であった。同様に Cr1:CD1(ICR)
マウスでは、陰性対照群、CNT 投与群及び
EMS 投与群の平均値はそれぞれ $0.058 \pm$
 0.014% 、 $0.077 \pm 0.023\%$ 及び $0.092 \pm$
 0.014% であり、CNT 投与群及び EMS 投与群
ともに陰性対照群と比較して有意な小核誘
発率の増加は認められなかった(Table 3)。
また、いずれの個体の値も 0.100% 以下であ
った。以上の結果から、今回の予備試験条
件下では CNT 及び EMS ともに肺細胞におい
て有意な小核誘発は認められず、肺小核試
験は陰性と判定された。なお、C57BL/6NcrSl
c マウスでは回収できる肺細胞数が少なく、
肺細胞の観察数は 2000 個/匹を対象とし
たが、Cr1:CD1(ICR)マウスではいずれの動物

でも 3500 個/匹を越える細胞を観察するこ
とができた。これは両系統の標本を比較し
た場合に Cr1:CD1(ICR)マウスから作製した
標本の状態がやや良好であったことに起因
すると考えられた。

D. 結論

CNT をマウスに気管内投与して、*in vivo-in vitro* 法による肺における小核誘
発性を調べるための基礎的検討を実施した。
また、マウスの本検討における系統差の有
無を調べるため、C57BL/6NcrSlc マウスと
Cr1:CD1(ICR) マウスの 2 つの系統を用い
た。雄性 C57BL/6NcrSlc マウス(投与時 12
週齢)及び雄性 Cr1:CD1(ICR) マウス(投
与時 8 週齢)に、CNT を 0.1 mg/匹 ($50 \mu\text{L/}$
 匹)の用量で 1 回気管内投与した。陰性対
照群には各系統に Tween 80 を 0.05% の濃度
で含む生理食塩液を $50 \mu\text{L/匹}$ で同様に気管
内投与した。また、陽性対照物質として EMS
の 25 mg/kg を C57BL/6NcrSlc マウスに 1 回
腹腔内投与し、Cr1:CD1(ICR)マウスには EMS
の 50 mg/kg を 1 回腹腔内投与した。投与後
5 日目に肺細胞を採取し、48 時間培養した
後、細胞を固定して各系統について小核を
もつ細胞の誘発率を調べた。その結果、両
系統のマウスにおいて CNT 及び EMS いずれ
の投与群においても、陰性対照群と比較し
て小核誘発の有意な増加は認められなかつ
た。以上の結果から、単回気管内投与を行
う今回の予備試験条件下では、CNT 及び EMS
とも両系統のマウスにおいて肺小核試験陰
性と結論した。なお、作製した肺小核用標
本は、Cr1:CD1(ICR)マウスから得られたも
のの方が C57BL/6NcrSlc マウスから得られ
たものと比較して観察対象細胞が多く得ら
れ、標本の状態がやや良好であった。この
ことから今回の予備試験条件下で作製され
た標本の状態には系統差があることが示唆
された。

E. 健康危機情報

特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

Chikura S, Kimoto T, Itoh S, Sanada H, Muto S, Horibata K: Standard protocol for the total red blood cell *Pig-a* assay used in the interlaboratory trial organized by the Mammalian Mutagenicity Study Group of the Japanese Environmental Mutagen Society. *Genes Environ.* 41:5 (2019)

2. 学会発表

堀端克良: *Pig-a*/*PIG-A*遺伝子変異試験によるヒトを含めた*in vivo*遺伝毒性モニタリング. 平成30年度日本環境変異原学会公開シンポジウム. 東京 (2018.6)

堀端克良: *Pig-a*試験. 日本環境変異原学会MMS研究会第72回定例会. 静岡 (2018.6)

堀端克良: *Pig-a*アッセイ. 日本環境変異原学会MMS研究会第73回定例会. 京都 (2018.10)

堀端克良: *Pig-a*アッセイの標準化に関する研究:バリデーション研究の推進とヒトへの適用. 日本環境変異原学会第47回大会. 京都 (2018.11)

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

該当なし

Table 1: 一般状態及び体重

Strain	Treatment group	Dose level Route Frequency	Animal number	Initial body weight (g) ^{a)}		Clinical signs							Final body weight (g) ^{b)}	
				Individual	Group mean Mean ± SD	Day 1		Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Individual	Group mean Mean ± SD
						Pre-dose	Post ^{c)} dose							
C57BL/6NgrSlc	Negative control (Vehicle)	50 µL/head i.t. Once	10101	27.75	24.98	-	-	-	-	-	-	-	27.30	25.27
			10102 ^{d)}	23.03	±	-	-	-	-	-	-	-	24.36	±
			10103	24.15	2.47	-	-	-	-	-	-	-	24.15	1.76
	Test article (CNT)	0.1 mg/head i.t. Once	10201	27.32	25.59	-	-	-	-	-	-	-	26.15	25.37
			10202	23.80	±	-	-	-	-	-	-	-	24.59	±
			10203	25.65	1.76	-	Died	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1.10
	Positive control (EMS)	25 mg/kg i.p. Once	10301	27.14	25.60	-	-	-	-	-	-	-	27.26	25.56
			10302	25.89	±	-	-	-	-	-	-	-	25.57	±
			10303	23.78	1.70	-	-	-	-	-	-	-	23.84	1.71
CHCD1(ICR)	Negative control (Vehicle)	50 µL/head i.t. Once	20101	42.11	38.69	-	-	-	-	-	-	-	43.52	40.46
			20102	36.52	±	-	-	-	-	-	-	-	38.97	±
			20103	37.45	3.00	-	-	-	-	-	-	-	38.89	2.65
	Test article (CNT)	0.1 mg/head i.t. Once	20201	39.61	38.76	-	-	-	-	-	-	-	40.46	38.98
			20202	38.74	±	-	-	-	-	-	-	-	38.63	±
			20203	37.92	0.85	-	-	-	-	-	-	-	37.86	1.34
	Positive control (EMS)	50 mg/kg i.p. Once	20301	35.87	36.11	-	-	-	-	-	-	-	39.65	38.59
			20302	37.03	±	-	-	-	-	-	-	-	38.84	±
			20303	35.43	0.83	-	-	-	-	-	-	-	37.28	1.20

Vehicle: 0.05 w/v% Tween 80 in physiological saline, CNT: Carbon nanotubes, EMS: Ethylmethanesulfonate, NA: Not applicable

^{a)} Measured on Day 1

^{b)} Measured on Day 6

^{c)} Observed intermittently for 1 h

^{d)} This animal was replaced with a surplus one since the original one died after dosing. The body weight of the original animal was 24.26 g.

Table 2: C57BL/6NcrSlc マウスにおける小核試験結果

Treatment group	Dose level (mg/head) Route Frequency	Animal number	Number of cells scored	Number of micronucleated (MN) cells	Incidence of MN cells (%)
Vehicle	0 (50 µL/head) i.t. Once ^{a)}	10101	2000	2	0.100
		10102	2000	1	0.050
		10103	2000	1	0.050
	Total / Mean ± S.D.		6000	4	0.067 ± 0.029
CNT	0.1 (50 µL/head) i.t. Once ^{a)}	10201	2000	2	0.100
		10202	2000	2	0.100
		NA	-	-	-
	Total / Mean ± S.D.		4000	4	0.100 ± 0.000
EMS	25 mg/kg i.p. Once ^{a)}	10301	2000	1	0.050
		10302	2000	3	0.150
		10303	2000	2	0.100
	Total / Mean ± S.D.		6000	6	0.100 ± 0.050

Vehicle: 0.05 w/v% Tween 80 in physiological saline, CNT: Carbon nanotubes, EMS: Ethyl methanesulfonate

NA: Not applicable

^{a)} Single administration 5 days before sampling

Table 3: Crl:CD1(ICR)マウスにおける小核試験結果

Treatment group	Dose Level (mg/head) Route Frequency	Animal number	Number of cells scored	Number of micronucleated (MN) cells	Incidence of MN cells (%)
Vehicle	0 (50 µL/head) i.t. Once ^{a)}	20101	4000	2	0.050
		20102	4000	3	0.075
		20103	4000	2	0.050
	Total / Mean ± S.D.		12000	7	0.058 ± 0.014
CNT	0.1 (50 µL/head) i.t. Once ^{a)}	20201	4000	3	0.075
		20202	3658	2	0.055
		20203	4000	4	0.100
	Total / Mean ± S.D.		11658	9	0.077 ± 0.023
EMS	50 mg/kg i.p. Once ^{a)}	20301	4000	3	0.075
		20302	4000	4	0.100
		20303	4000	4	0.100
	Total / Mean ± S.D.		12000	11	0.092 ± 0.014

Vehicle: 0.05 w/v% Tween 80 in physiological saline, CNT: Carbon nanotubes, EMS: Ethyl methanesulfonate

NA: Not applicable

^{a)} Single administration 5 days before sampling