

令和元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」

分担研究課題名：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 気管内投与下における肺小核試験の予備試験の結果、CNT 気管内投与群および陽性対照群において小核誘発の有意な増加は認められなかった。これらの結果は曝露方法の違いにより CNT 遺伝毒性の発現形態が異なる可能性を示唆する一方で、肺小核試験法の最適な試験条件をより詳細に検討する必要があることを示している。そこで、本研究では他の *in vivo* 遺伝毒性試験法等で推奨されている採材時期を参照し、陽性対照の最終投与 3 時間後、24 時間後または 5 日後に肺組織を採材して *in vivo-in vitro* 法を用いた小核試験法を実施し、肺小核試験法における最適な採材タイミングを検証した。その結果、*in vivo-in vitro* 法を用いた小核試験法では最終投与 24 時間後での採材においてのみ明瞭な陽性となることを明らかにした。

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 *in vivo* 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、我々は肺における CNT の *in vivo* 遺伝毒性評価のために、*in vivo-in vitro* 法を用いた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* で曝露したマウスの肺を摘出後、*in vitro* で肺細胞を培養する方法であり、培養により細胞分裂を惹起させ、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検討し、それを用いて CNT 全身吸入曝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た。他方、CNT の曝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、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結果、CNT 気管内投与群および陽性対照群において小核誘発の有意な増加は認められなかった。これらの結果は曝露方法の違いにより CNT 遺伝毒性の発現形態が異なる可能性を示唆する一方で、陽性対照群においても陰性となったことか

ら肺小核試験法の最適な試験条件をより詳細に検証する必要があることを示すものである。

広く用いられている *in vivo* 遺伝毒性試験である *in vivo* 骨髄小核試験や *in vivo* コメットアッセイでは、小核の出現と消失の反応速度や DNA 損傷の修復・残存速度が解析されており、*in vivo* 骨髄小核試験では最終投与後 24-48 時間内で、また *in vivo* コメットアッセイでは終投与後 2-6 時間内での組織採材が推奨されている。一方で、*in vivo-in vitro* 法を用いた肺小核試験については、これまでの報告例はほとんど無く、小核の出現と消失の時間経過による影響についての解析はなされていない(表 1)。

そこで、今回我々は陽性対照である Ethyl methanesulfonate (EMS) を用いて、先行試験、*in vivo* 骨髄小核試験および *in vivo* コメットアッセイに倣い、最終投与 3 時間後、24 時間後および 5 日後に肺組織を採材して *in vivo-in vitro* 法を用いた肺小核試験を実施し、本試験法における最適な採材時期を明らかにすることを研究目的とした。

B. 研究方法

(1) 被検物質

Ethyl methanesulfonate (EMS, Sigma-Aldrich Corporation, lot#: BCBZ8402) を陽性対照に使用した。

(2) 動物

日本エスエルシー株式会社より 7 週齢の雄性 C57BL/6NCrSlc (SPF) マウスを購入して試験に用いた。各群 3 匹とし、陰性対照群および中高の EMS 投与群 (25 mg/kg および 50 mg/kg) の 3 処理群を設定し、最終投与後 3 時間、24 時間または 5 日後に肺組織を採材する 3 つの群構成、すなわち全 9 群合計 27 匹を設定した (表 2)。馴化期間は動物入荷後 1 週間とし、8 週齢の動物を試

験に使用した。

(3) 投与

EMS を使用直前に生理食塩液（日本薬局方、株式会社大塚製薬工場）に溶解して、2.5 mg/mL または 5 mg/mL 投与液を調製し、25 mg/kg または 50 mg/kg の投与用量で腹腔内投与した。投与は 1 日 1 回、2 日連続で実施した。

(4) 細胞分離培養および標本作製

投与後それぞれ 3 時間後、24 時間後または 5 日後に、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（図 1）。

- 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. セルストレーナーでろ過した後、300×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（250×g、常温、20 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作製した。

(5) 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 DAPI 含有封入剤（Antifade Mounting Medium with DAPI、VECTASHIELD 社）で染色して、蛍光顕微鏡下（U 励起）で観察した。
- ii. 1000 個以上/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。
- iii. 1000 個以上/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各 EMS 投与群との間で Fisher の正確検定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

各群における小核をもつ肺細胞の出現頻度の結果を図 2 および表 3 に示した。最終投与 3 時間後に肺を採取した各群において、陰性対照群の平均値は 1.767 ± 0.115%、EMS 25 mg/kg 投与群の平均値は 1.390 ± 0.182%、EMS 50 mg/kg 投与群の平均値は 1.560 ± 0.342% であり、最終投与 3 時間後に肺を採取した 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（図 2）。最終投与 24 時間後に肺を採取した各群においては、陰性対照群の平均値は 1.730 ± 0.214%、EMS 25 mg/kg

投与群の平均値は $3.113 \pm 1.451\%$ ($p=0.0007$)、EMS 50 mg/kg 投与群の平均値は $3.017 \pm 0.575\%$ ($p=0.0014$) であり、最終投与 24 時間後に肺を採取した EMS 投与群は 25 mg/kg 投与群および 50 mg/kg 投与群ともに陰性対照群と比較して十分に有意な小核誘発率の増加が認められた (図 2)。最終投与 5 日後に肺を採取した各群においては、陰性対照群の平均値は $1.763 \pm 0.465\%$ 、EMS 25 mg/kg 投与群の平均値は $2.557 \pm 0.902\%$ ($p=0.0436$)、EMS 50 mg/kg 投与群の平均値は $2.053 \pm 0.255\%$ ($p=0.4572$) であり、最終投与 5 日後に肺を採取した EMS 投与群は 25 mg/kg 投与群においてのみ陰性対照群と比較してわずかに有意な小核誘発率の増加が認められた (図 2)。

以上の結果から、*in vivo-in vitro*法を用いた肺小核試験における適切な採材時期は最終投与 24 時間後であることが明らかになった。最終投与 3 時間後の採材では陽性対照最終投与後の肺曝露時間が十分ではなく、*in vivo-in vitro*法を用いた肺小核試験で検出可能な小核誘発に十分な DNA 損傷が誘導されていない可能性が考えられる。また、最終投与 5 日後の採材では、陽性対照曝露後に DNA 損傷が誘導されてはいるが、EMS は速やかに生体内で代謝・排泄され、誘導された DNA 損傷は 5 日の間に修復される、または DNA 損傷細胞が死滅することで、*in vivo-in vitro*法を用いた肺小核試験において検出可能な小核誘発が十分ではない可能性が考えられる。

先行して実施した CNT 全身吸入曝露試験では、陽性対照群は EMS を 5 日連続腹腔内投与 (25 及び 50mg/kg)、CNT 全身吸入曝露群は 5 日連続曝露であり、両群ともに最終曝露 5 日後に採材している。結果は両群ともに陽性であった。他方、昨年度我々が実施した 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では、CNT 気管内投与群および陽性対照群においても小核誘発の有意な増加は認められなかった。この際の陽性対照群は EMS 単回腹腔内投与 (25 及び 50mg/kg)、CNT 気管内投与群は単回投与であり、先行して実施した全身吸入曝露試験条件に倣い投与 5 日後に肺を採材している (表 1)。CNT 気管内投与群では投与後も CNT が気管内・肺内に残存するため、採材までの期間、気管・肺は CNT に曝露され続けていると考えられる一方で、陽性対照群は単回投与であることに加えて採材時期が不適切であったため、陰性結果の原因となった可能性が考えられる。

D. 結論

陽性対照である EMS を用いて、*in vivo-in vitro*法を用いた肺小核試験における適切な採材時期を解析した。EMS を 25 mg/kg または 50 mg/kg の投与用量でマウスに腹腔内投与した。投与は 1 日 1 回、2 日連続で実施した。各 *in vivo* 遺伝毒性試験法で推奨される採材時期等を勘案し、最終投与 3 時間後、24 時間後または 5 日後に肺組織を採材して *in vivo-in vitro*法を用いた小核試験により小核誘発率を解析した。その結果、最終投与 3 時間後に肺を採取した 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。最終投与 24 時間後に肺を採取した EMS 投与群は 25 mg/kg 投与群および 50 mg/kg 投与群ともに陰性対照群と比較して十分に有意な小核誘発率の増加が認められた。最終投与 5 日後に肺を採取した EMS 投与群は 25 mg/kg 投与群においてのみ陰性対照群と比較してわずかに有意な小核誘発率の増加が認められた。以上のことから、*in vivo-in vitro*法を用いた小核試験法では最終曝露 24 時間後での採材が適切であると結論した。

なし

E. 健康危機情報

特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

Shemansky JM, McDaniel LP, Klimas C, Dertinger SD, Dobrovolsky VN, Kimoto T, Horibata K, Polli JE, Heflich RH: Pig-a gene mutation database. *Environ Mol Mutagen.* 60(8):759-762. (2019)

Horibata K, Sekimoto M, Sugiyama KI: Comprehensive framework between environment and genomic stability: the open symposium of the Japanese Environmental Mutagen Society (JEMS) in 2019. *Genes Environ.* 41:17. (2019)

Kirkland D, Uno Y, Luijten M, Beevers C, van Benthem J, Burlinson B, Dertinger S, Douglas GR, Hamada S, Horibata K, Lovell DP, Manjanatha M, Martus HJ, Mei N, Morita T, Ohyama W, Williams A: In vivo genotoxicity testing strategies: Report from the 7th International workshop on genotoxicity testing (IWGT). *Mutat Res.* 847:403035. (2019)

2. 学会発表

Horibata K, Takasawa H, Taquahashi Y, Yokota S, Hamada S, Honma M: In vivo genotoxicity assessment of multi-wall carbon nanotubes using lung micronucleus assay. The Joint Meeting of The 6th Asian Congress on Environmental Mutagens (ACEM) and the 48th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (JEMS). Tokyo (2019.11)

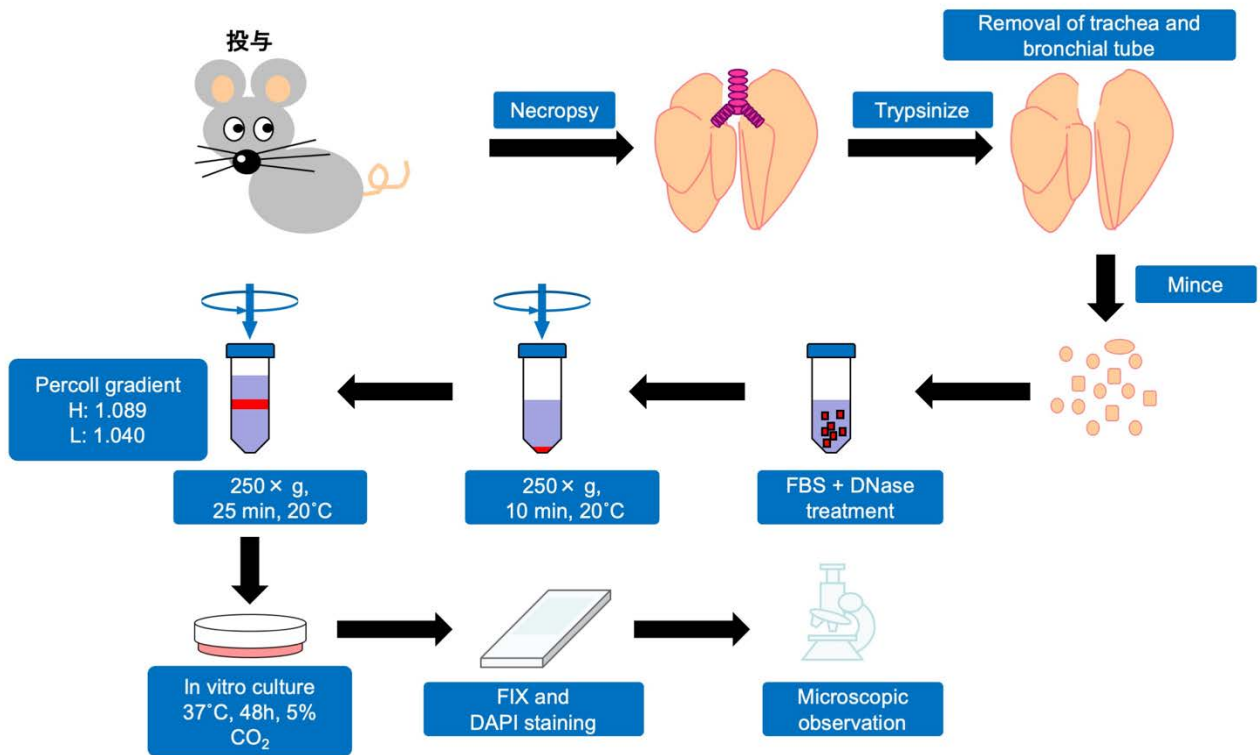
G. 知的所有権の取得状況

表 1: 各 *in vivo* 遺伝毒性試験における試験条件

	<i>in vivo-in vitro</i> 法による肺小核試験の実施例			OECD Tg (<i>in vivo</i> DNA損傷性)	
	全身吸入曝露 (LSIM委託試験)	気管内投与 (LSIM委託試験)	Lindberg, et al. (2010)	<i>in vivo</i> 骨髄小核 (OECD Tg)	<i>in vivo</i> コメット (OECD Tg)
投与回数	5日連続	単回	単回(4h)	単回~2回	>2回
被験物質用量	CNT 2 mg/m ³ を 2時間/日	CNT 0.1 mg/匹 (50 µL/匹)	ethylene oxide 全身吸入曝露	/	/
陽性対照投与経路	腹腔内	腹腔内	/	/	/
陽性対照用量	25 mg/kg 5日連続	25 mg/kg 単回	/	/	/
採材の時期	最終投与後 5日後	最終投与後 5日後	最終投与後 3日後	最終投与後 24-48時間後	最終投与後 2-6時間後

表 2: 群構成

処理群	投与経路/回数	採材時期	動物数
saline	腹腔内 1回/日×2日	最終投与 3時間後	3
EMS 25 mg/kg			3
EMS 50 mg/kg			3
saline		最終投与 24時間後	3
EMS 25 mg/kg			3
EMS 50 mg/kg			3
saline		最終投与 5日後	3
EMS 25 mg/kg			3
EMS 50 mg/kg			3



[Lindberg, et al., *Environ Mol Mutagen*, 51 (2010) 164-172での試験法を改変]

図 1. *in vivo-in vitro* 法を用いた肺小核試験

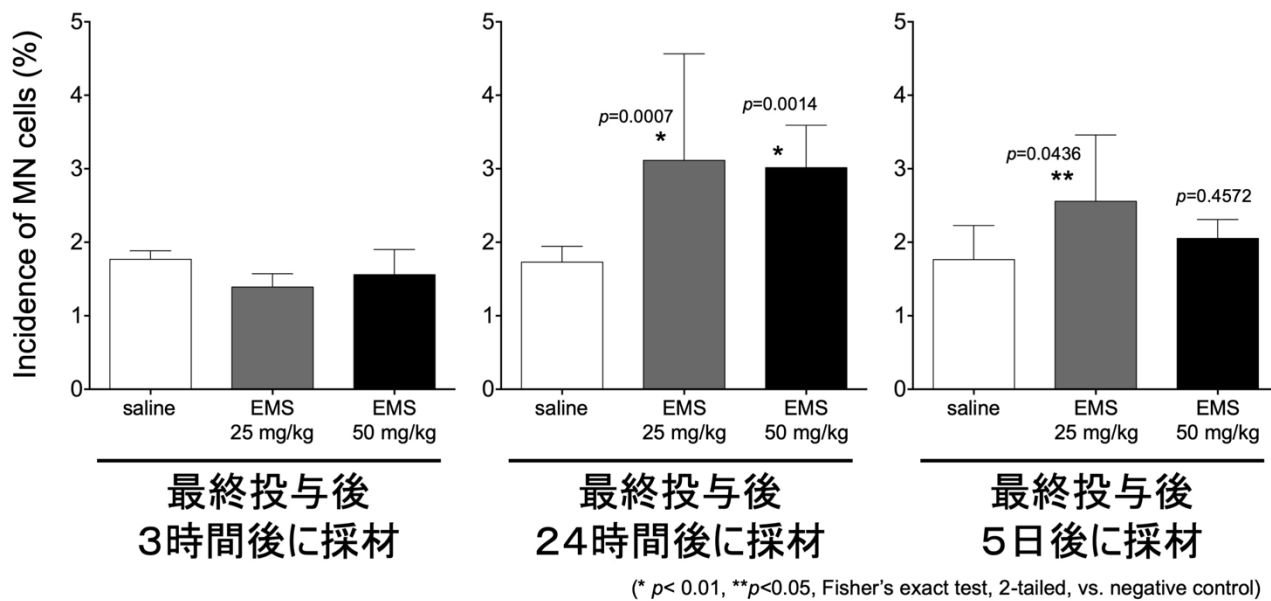


図 2. 各採材時期における *in vivo-in vitro* 法を用いた肺小核試験の小核誘発率

表 3: 各群における小核誘発率

投与群	animal ID	測定細胞数	小核を持つ細胞数	小核誘発率	
2h	saline	LMN 2h 001	1000	17	1.70
		LMN 2h 002	1000	19	1.90
		LMN 2h 003	1002	17	1.70
		Total/ mean ± SD	3002	53	1.77 ± 0.12
	EMS 25 mg/kg	LMN 2h 101	1005	15	1.49
		LMN 2h 102	1020	12	1.18
		LMN 2h 103	1002	15	1.50
		Total/ mean ± SD	3027	42	1.39 ± 0.18
	EMS 50 mg/kg	LMN 2h 201	1000	12	1.20
		LMN 2h 202	1010	19	1.88
		LMN 2h 203	2000	32	1.60
		Total/ mean ± SD	4010	63	1.56 ± 0.34
24h	saline	LMN 24h 001	1000	19	1.90
		LMN 24h 002	1000	18	1.80
		LMN 24h 003	1005	15	1.49
		Total/ mean ± SD	3005	52	1.73 ± 0.21
	EMS 25 mg/kg	LMN 24h 101	1002	17	1.70
		LMN 24h 102	1019	31	3.04
		LMN 24h 103	1000	46	4.60
		Total/ mean ± SD	3021	94	3.11 ± 1.45
	EMS 50 mg/kg	LMN 24h 201	1000	36	3.60
		LMN 24h 202	2000	60	3.00
		LMN 24h 203	2000	49	2.45
		Total/ mean ± SD	5000	145	3.02 ± 0.58
5d	saline	LMN 5d 001	1000	23	2.30
		LMN 5d 002	1001	15	1.50
		LMN 5d 003	1005	15	1.49
		Total/ mean ± SD	3006	53	1.76 ± 0.46
	EMS 25 mg/kg	LMN 5d 101	1004	35	3.49
		LMN 5d 102	1006	25	2.49
		LMN 5d 103	1007	17	1.69
		Total/ mean ± SD	3017	77	2.55 ± 0.90
	EMS 50 mg/kg	LMN 5d 201	1043	24	2.30
		LMN 5d 202	1004	18	1.79
		LMN 5d 203	1015	21	2.07
		Total/ mean ± SD	3062	63	2.05 ± 0.25