

令和2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 第二室長
研究協力者： 北條 幹	東京都健康安全研究センター・薬事環境科学部生体影響研究科・主任研究員
研究協力者： 小林 憲弘	国立医薬品食品衛生研究所生活衛生化学部 第三室長
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： 高橋 祐次	国立医薬品食品衛生研究所毒性部 動物管理室長
研究協力者： 杉山 圭一	国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部 部長

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、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* 法を用いた肺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予備試験では CNT 気管内投与群だけでなく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とから、肺小核試験法における小核の発現と消失の時間軸を勘案して最適化を試みた。最適化した *in vivo-in vitro* 法を用いた肺小核試験法で CNT 気管内投与下における遺伝毒性の再評価を実施した結果、CNT 気管内投与群および陽性対照群ともに陽性となることを明らかにした。これにより、全身吸入曝露および気管内投与での CNT による遺伝毒性の発現形態が同様であることが示された。

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。ナノマテリアルの中でも、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 CNT（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報告されている。よって CNT 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和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。この試験系では *in vivo* で曝露したマウス肺を摘出後、*in vitro* で肺細胞を培養し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初期検討し、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ことから、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。その結果、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、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った。これを踏まえて、我々は小核の出現と時間経過による影響についての解析を行い、*in vivo-in vitro* 法を用いた肺小核試験の採材時期の最適化を行った。

今年度は昨年度までに最適化した試験条件を用いて、CNT をマウスに単回気管内投与し、幼若赤血球 (RET; Reticulocyte) を標的とした小核試験および *in vivo-in vitro* 法を用いたマウス肺小核試験により遺伝毒性を評価した。陽性対照には Ethyl methanesulfonate (EMS) を用いた。

B. 研究方法

(1) 被検物質

CNT 検体は Taquann 処理済みの MWNT-7 (三井物産、Lot No. 060125-01k) を用いた。EMS (Sigma-Aldrich Corporation, lot#: BCBZ8402) を陽性対照に使用した。また、0.1% Tween 80 を含む生理食塩液を気管内投与の陰性対照とした。

(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。陰性対照群および陽性対照群は各群 6 匹とし、CNT 曝露群は 11 匹、合計 23 匹を使用した。CNT 曝露群は解剖後、明らかに CNT に肺が曝露されていることができる個体を、ID の若い順に 6 匹選択して試験に供した。馴化期間は動物入荷後 1 週間とし、12 週齢の動物を試験に使用した (表 1)。

(3) 投与

① CNT および陰性対照 :

CNT は、エンドトキシンや Taquann 処理で使用する tert-ブチルアルコール等のわずかな夾雑物を除去するため、200°C・2 時間の熱処理をした後、0.1% Tween 80 を含む生理食塩液を加えて 0.5 mg/mL 投与液を調製した。投与液は、投与直前まで超音波浴槽を用いて十分に分散させた。イソフルラン麻酔下でマウス気管内投与用ゾンデを気管内に挿入し、100 μ L/匹 (0.05 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 0.1% Tween 80 を含む生理食塩液を 100 μ L/匹となるように気管内に噴射投与した。CNT は投与後 48 時間以上肺内に残存するため、CNT および陰性対照については単回投与とした。

② 陽性対照：

EMS を使用直前に生理食塩液に溶解して、20 mg/mL 投与液を調製し、200 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) 採材

CNT 投与群および陰性対照投与群については単回投与後 48 時間後に、陽性対照群については最終投与後 24 時間後に採材を行った。イソフルラン深麻酔下で腹大動脈より採血を行い、その後、放血により安楽死を施し、肺を採材した。なお、CNT 投与群は明らかに CNT に肺が曝露されていることができる個体を、ID の若い順に 6 匹選択した。血液は抗凝固剤処理済みの採血管に、肺は PBS を入れた遠心管に入れ、全頭解剖終了までの間、氷上で保管した。

(5) 幼若赤血球小核試験

Litron 社の MicroFlow PLUS-M Kit を用いて同 Kit 付属のプロトコルに従い、RET を標的とした小核試験を実施した。血液を極低温下でメタノールを用いて固定した。その後、同 Kit 付属の抗 CD61 抗体 (血小板を染色)、抗 CD71 抗体 (RET を染色) および DNA 染色液等でそれぞれ染色し、フローサイトメーターを用いて 20,000 個程度の RET をそれぞれ測定し、RET 中の小核含有血球細胞を測定し、小核を有する細胞の誘発率を算出した。

(6) *in vivo-in vitro*法を用いたマウス肺小核試験

(6-1) 細胞分離培養および標本作製

採材後の肺を用いて、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. 肺を採材後、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。
- ii. 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。
- iii. 牛胎仔血清と 250 μ g/mL DNaseI を含む液を加えて、37°C 温浴中で 10 分間処理した。
- iv. セルストレーナーでろ過した後、300 \times g で 10 分間遠心分離して肺細胞 (沈査) を回収した。
- v. Percoll の密度勾配 (密度 : 1.089 及び 1.040 g/cm³) により遠心分離 (250 \times 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。
- vi. 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。

(6-2) 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。
- 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。

(7) 統計学的解析、試験結果の評価

RET および肺細胞における小核誘発頻度について、陰性対照群と各群との間で

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 RET の出現頻度の結果を図 2 および表 2 に示した。陰性対照群の平均値は $0.45 \pm 0.06\%$ 、EMS 投与群の平均値は $2.21 \pm 0.32\%$ 、CNT 投与群の平均値は $0.42 \pm 0.03\%$ であり、陽性対照である 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が認められたが、CNT 投与群は有意な小核誘発率の増加は認められなかった(図 2 および表 2)。

各群における小核をもつ肺細胞の出現頻度の結果を図 3 および表 3 に示した。陰性対照群の平均値は $1.40 \pm 0.46\%$ 、EMS 投与群の平均値は $4.35 \pm 0.94\%$ 、CNT 投与群の平均値は $3.52 \pm 0.81\%$ であり、陽性対照である EMS 投与群および CNT 投与群は共に、陰性対照群と比較して有意な小核誘発率の増加が認められた(図 3 および表 3)。

以上の結果から、CNT は造血系では遺伝毒性を有さないが、直接曝露組織である肺では遺伝毒性を有することが明らかになった。これらの結果は、以前に我々が実施した CNT 全身吸入曝露下での *in vivo-in vitro* 法を用いた肺小核試験の結果と同様であったことから、今回の試験条件では全

身吸入曝露および気管内投与での CNT による遺伝毒性の発現形態に大きな差異は無いことが示された。今回の結果は、Kato らによる CNT 気管内注入下での肺組織コメットアッセイによる遺伝毒性評価結果とも矛盾しておらず、CNT は肺において、DNA 損傷性を有すると考えられる。

D. 結論

我々は小核の出現と時間経過による影響を考慮して、投与から採材までの期間を最適化した上で、*in vivo-in vitro* 法を用いた肺小核試験を実施し、CNT 気管内投与における遺伝毒性影響を RET 小核試験および肺細胞を用いた小核試験で評価した。その結果、CNT は造血系では遺伝毒性を示さないが、直接曝露組織である肺では小核を誘発し、遺伝毒性を示すことを明らかにした。これらの結果は、CNT 全身吸入曝露下での結果と矛盾せず、全身吸入曝露および気管内投与での CNT による遺伝毒性の発現形態が同様であることが示された。

E. 健康危機情報

特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

Chen R, You X, Cao Y, Masumura K, Ando T, Hamada S, Horibata K, Wan J, Xi J, Zhang X, Honma M, Luan Y: Benchmark dose analysis of multiple genotoxicity endpoints in gpt delta mice exposed to aristolochic acid I. *Mutagenesis*. geaa034. (2020)

Chikura S, Kimoto T, Itoh S, Sanada H, Muto S, Horibata K: Standard protocol for the PIGRET assay, a high-throughput reticulocyte Pig-a assay with an immunomagnetic separation, used in the

interlaboratory trial organized by the Mammalian Mutagenicity Study Group of the Japanese Environmental Mutagen and Genome Society. *Genes Environ.* 43(1):10. (2021)

Kasamatsu T, Kitazawa A, Tajima S, Kaneko M, Sugiyama K, Yamada M, Yasui M, Masumura K, Horibata K, Honma M: Development of a new quantitative structure-activity relationship model for predicting Ames mutagenicity of food flavor chemicals using StarDrop™ Auto-Modeller™I. *Genes Environ.* in press. (2021)

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. Environmental Mutagenesis and Genomics Society 51st Virtual Annual Meeting. On Line (2020.9)

堀端克良, 曹易懿, 山田雅巳, 増村健一, 能美健彦, 本間正充: 高等真核生物での遺伝情報発現に付随する突然変異誘発機構解析系の開発. 日本環境変異原学会第49回大会. 沼津 (2020.11)

G. 知的所有権の取得状況

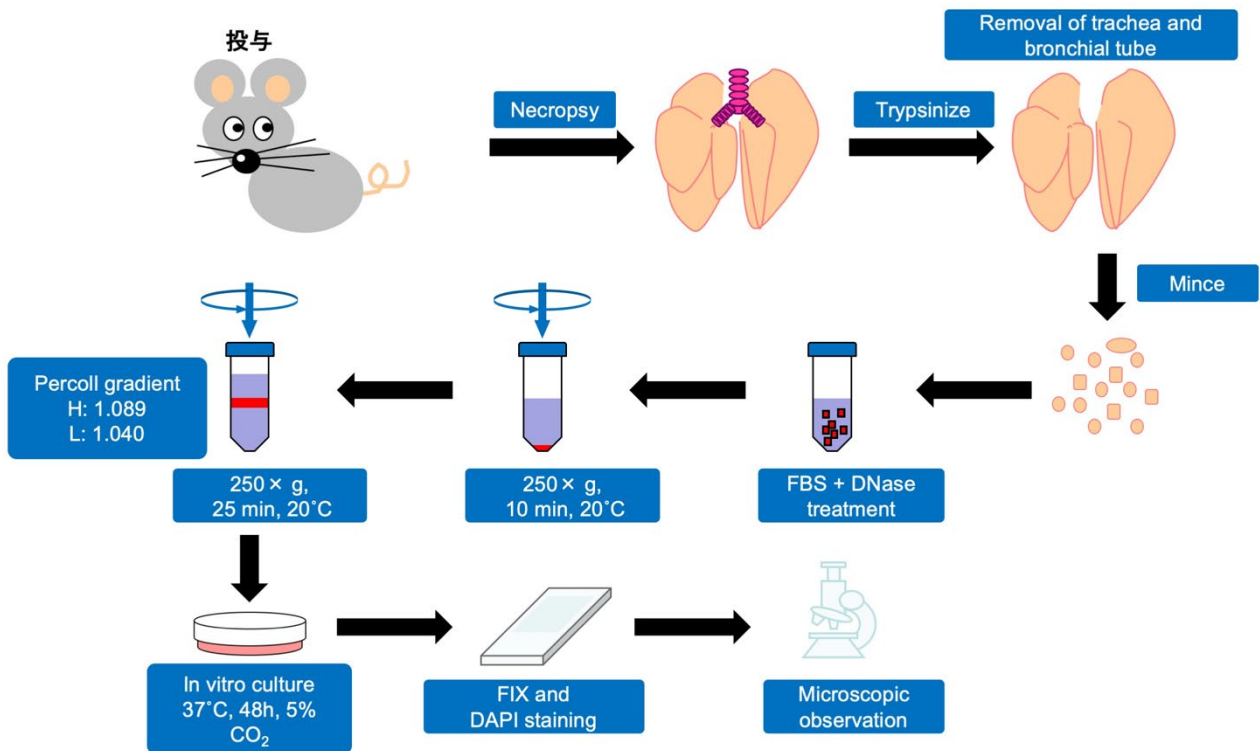
なし

表 1: 群構成

処理群	投与用量	投与経路	投与回数*	動物数
陰性対照 (0.1% Tween-saline)	100 μ L/匹	気管内投与	単回	6
被験物質 (CNT)	0.05 mg/匹 (100 μ L/匹)			11**
陽性対照 (EMS)	200 mg/kg	腹腔内投与	2回 (24時間ごと)	6

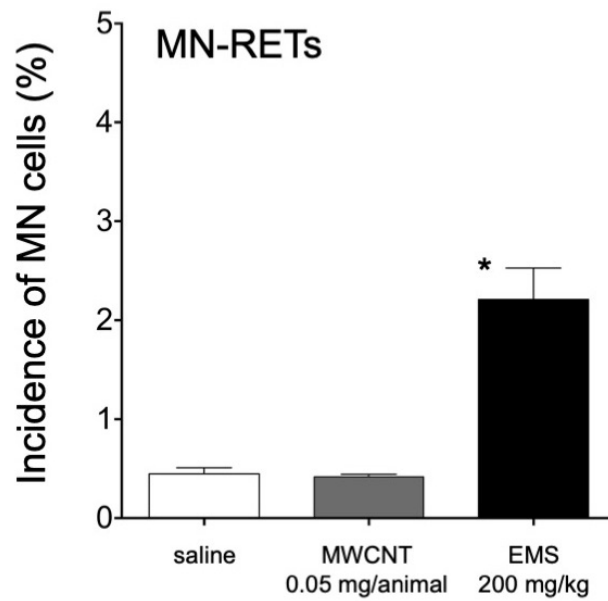
*CNTは体内に残存するため単回投与。陰性対照とCNT群はそれぞれ投与後48時間で採材、陽性対照群は2回目の投与後24時間で採材。

**解剖後、明らかにMWCNTに肺が曝露されていることができる個体を、IDの若い順に6匹選択して試験に供する。



[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



(* $p < 0.01$, Fisher's exact test, 2-tailed, vs. negative control)

図 2. 幼若赤血球における小核誘発率

表 2: 幼若赤血球小核試験の測定細胞数と小核誘発率

投与群	animal ID	測定細胞数	小核を持つ細胞数	小核誘発率
陰性対照	NC_1	20001	90	0.45
	NC_2	20000	98	0.49
	NC_3	20000	88	0.44
	NC_4	20000	75	0.38
	NC_5	20000	77	0.39
	NC_6	20000	108	0.54
	Total/ mean \pm SD	120001	536	0.45 \pm 0.06
CNT投与群	CNT_2	20000	84	0.42
	CNT_3	20000	85	0.43
	CNT_6	20000	78	0.39
	CNT_7	20000	92	0.46
	CNT_9	20000	84	0.42
	CNT_11	20002	78	0.39
	Total/ mean \pm SD	120002	501	0.42 \pm 0.03
陽性対照	PC_1	20000	326	1.63
	PC_2	20000	458	2.29
	PC_3	20000	411	2.06
	PC_4	20001	490	2.45
	PC_5	20000	485	2.43
	PC_6	20000	479	2.40
	Total/ mean \pm SD	120001	2649	2.21 \pm 0.32

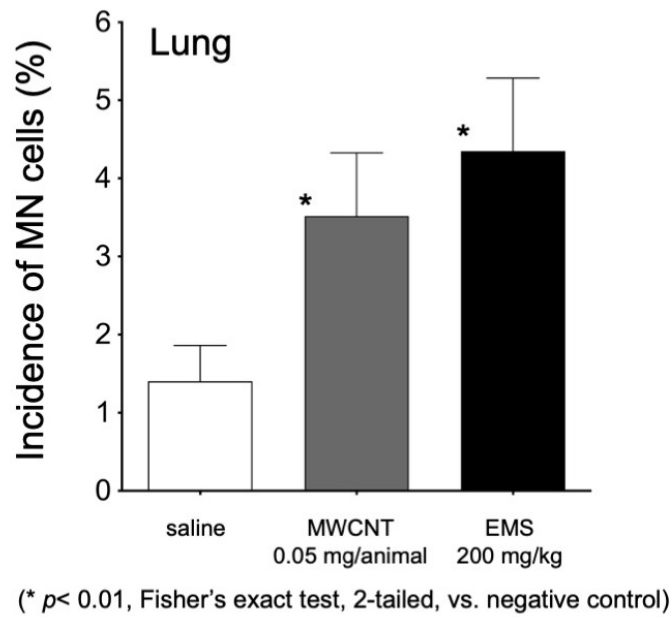


図 3. *in vivo-in vitro* 法を用いた肺小核試験の小核誘発率

表 3. *in vivo-in vitro* 法を用いた肺小核試験の小核試験の測定細胞数と小核誘発率

投与群	animal ID	測定細胞数	小核を持つ細胞数	小核誘発率
陰性対照	NC 1	1004	11	1.10
	NC_2	1014	9	0.89
	NC_3	1002	10	1.00
	NC_4	1002	18	1.80
	NC_5	1004	17	1.69
	NC_6	1029	20	1.94
	Total/ mean \pm SD	6055	85	1.40 \pm 0.46
CNT投与群	CNT 2	1000	23	2.30
	CNT_3	1001	33	3.30
	CNT_6	1000	36	3.60
	CNT_7	1000	40	4.00
	CNT_9	1000	32	3.20
	CNT_11	1000	47	4.70
	Total/ mean \pm SD	6001	211	3.52 \pm 0.81
陽性対照	PC 1	1021	34	3.33
	PC_2	1001	42	4.20
	PC_3	1016	34	3.35
	PC_4	1016	53	5.22
	PC_5	1000	56	5.60
	PC_6	1002	44	4.39
	Total/ mean \pm SD	6056	263	4.35 \pm 0.94