

機関番号：32713

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790562

研究課題名 (和文) アスベストのメカノケミカル処理ナノ粒子の中皮腫発がんに関する研究

研究課題名 (英文) Evaluation the carcinogenicity of nanomaterials from the mechanochemical treatment of asbestos.

研究代表者

高田 礼子 (TAKATA AYAKO)

聖マリアンナ医科大学・医学部・教授

研究者番号：30321897

研究成果の概要 (和文)：メカノケミカル処理は、工業分野で新素材として応用可能なナノ粒子を生成できることから、アスベストの無害化・再資源化処理への応用が注目されている。もっとも大量に使用されたアスベストであるクリソタイルをメカノケミカル処理して生成されたナノ粒子について、吸入試験よりも簡便で感受性が高いとされるラット腹腔内投与実験を実施し、中皮腫発がん性を評価した。クリソタイルのメカノケミカル処理ナノ粒子では、腹腔内投与後の酸化ストレス反応がクリソタイルに比較して軽減された結果、中皮腫の発生が抑制された可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：The mechanochemical treatment of asbestos is expected to decompose asbestos and transform into new nanomaterials. To evaluate the carcinogenicity of nanomaterials produced by the mechanochemical treatment of chrysotile, we administered chrysotile (CH) and the nanomaterial (CH-M) to rats by a single intraperitoneal injection. The incidence of mesothelioma was determined histopathologically during the 1-year study. In addition, we determined urinary levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), a biomarker for oxidative DNA damage, and serum levels of N-ERC/mesothelin, a biomarker for mesothelioma. While mesothelioma was detected in 60% of CH-treated rats, it was not observed in rats treated with CH-M. In the CH group, 8-OHdG and N-ERC/mesothelin levels were elevated after day 180. Levels of 8-OHdG and N-ERC/mesothelin were significantly lower in the CH-M group compared to the CH group. Our results collectively suggested that mechanochemical treatment of CH reduced oxidative stress and carcinogenic potential.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：アスベスト、ナノ粒子、メカノケミカル処理、中皮腫、発がん、酸化的 DNA 損傷

1. 研究開始当初の背景

わが国で最も大量に使用されたアスベストであるクリソタイルの無害化・再資源化処

理として約 1000℃以上での熱処理が推進されている。一方で、産業界では CO₂ 排出などの環境負荷の問題を回避するために、熱処理

以外の無害化処理の開発に取り組んでいる。

メカノケミカル処理は、非加熱の粉碎処理により工業分野で新素材として応用可能なナノ粒子を生成できることから、クリソタイルの無害化・再資源化処理への応用が注目されている。この方法では、クリソタイルにビーズを高加速度で連続して衝突させて機械エネルギーを与えることにより、クリソタイルの結晶構造が破壊された新たなナノ粒子が生成される。しかし、これまでにメカノケミカル処理生成物の生体影響に関する国際的な評価はなされておらず、早急に安全性試験の実施が必要である。

2. 研究の目的

クリソタイルをメカノケミカル処理して生成されたナノ粒子について、吸入試験よりも簡便で感受性が高いとされるラット腹腔内投与による中皮腫発がん実験を実施し、アスベストの発がんに関与する酸化 DNA 損傷などのバイオマーカーや中皮腫関連マーカーを検索し、発がん性の総合的な評価を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 被験試料

クリソタイルのメカノケミカル処理ナノ粒子（以下、CH-M）は、カナダ産クリソタイルを蒸留水に懸濁し、ビーズ・ミルで約3時間粉碎して作製した。CH-Mは非晶質であり、透過型電子顕微鏡（TEM）で観察した一次粒子径約50nmであった。

陽性対照として、北海道産短繊維クリソタイル（以下、CH）を用いた。TEMにより測定したCHの幾何平均長は約180nm、幾何平均径は約40nmであった。

(2) 動物実験

Wistar 雄性ラットに CH または CH-M の懸濁液をラット 1 匹当たり 10mg の用量で一回腹腔内投与した。陰性対照群には蒸留水を一回腹腔内投与した。投与後 12 ヶ月までの中皮腫発生の有無を経過観察した。

観察期間中に各群 5 匹ずつ定期的に尾静脈からの採血および代謝ケージでの採尿を実施した。採血後、常法により血清分離を行った。血清および尿は分析に供するまで -80℃ にて凍結保存した。

(3) 病理組織検査

すべての動物を解剖し、腹膜中皮腫の発生の有無および他の臓器への影響について病理組織学的検索を実施した。腫瘍および胸腔、腹腔内の全臓器、横隔膜、腹膜を採取し、10% リン酸緩衝ホルマリン液で固定した。常法によりパラフィン包埋した後、薄切し、ヘマトキシリン・エオジン(H&E)染色および必要に

応じて特殊染色を実施した。

(4) 酸化ストレス評価

フリーラジカル自動分析装置 FRAS4 (DIACRON)を用いて血清の酸化ストレス度(d-ROMs: derivative of reactive oxygen metabolites)および抗酸化力(BAP: Biological antioxidant potential)を測定し、生体内での酸化反応と抗酸化反応の不均衡を総合的に評価した。

d-ROMs は活性酸素やフリーラジカルにより生じる血中ヒドロペルオキシド濃度をクロモゲン試薬のラジカル陽イオンへの変化として測定する。10μl の血清を酢酸緩衝液と混合した後クロモゲン試薬入りのキュベットへ移し 505nm の吸光度で測定した。一方、BAP は血中抗酸化物質が三価鉄イオン塩とチオシアン酸塩の化合物を還元し、脱色する反応を測定する。着色した反応液に 10μl の血清を混合し、505nm の吸光度の経時的な変化を測定した。

(5) 酸化的 DNA 損傷評価

高速液体クロマトグラフィー電気化学的検出器(HPLC-ECD)法による尿中 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)の測定を行った。尿は解凍後、遠心分離し、超純水で4倍希釈したのち、クロマトディスク（孔径 0.45μm）でろ過し、ツーカラム-HPLC-ECD装置を使って分析した。第一カラムとして、TSK precolumn SW（東ソー）を用い、流量 0.3ml/min、カラム温度 35℃とした。第二カラムとして、CAPCELL PAK C18 MG S5（資生堂）を用い、流量 0.7ml/min、カラム温度 45℃とした。移動相にリン酸-8%メタノール緩衝液を使用した。尿中 8-OHdG 濃度は尿中クレアチニン濃度により補正した。なお、尿中クレアチニン濃度は、クレアチニン-テストワコー（和光純薬）を用いて測定した。

(6) 血清中サイトカイン濃度の測定

BD OptEIA™ Set Rat IL-6 および BD OptEIA™ Set Rat MCP-1 (BD Biosciences)を用いて血清中の IL-6 および MCP-1(monocyte chemoattractant protein-1)濃度を測定した。測定に使用した血清は Assay Diluent により希釈し、その倍率は、IL-6 測定時には 10 倍、MCP-1 測定時には 200 倍とした。

(7) 中皮腫関連マーカー評価

血清中 N-ERC/mesothelin 濃度は、6 μl の血清を EIA buffer(1% BSA, 0.05% Tween20 in PBS)で 40 倍に希釈した後に、Rat N-ERC/mesothelin assay kit (免疫生物研究所)を用いて測定した。

(8) 統計処理

統計解析には SPSS ver.15J を用いた。腹腔内投与後の動物の生存データについて、Kaplan-Meier 法により生存曲線を作成した。また、血清および尿中の測定値について、分散分析および Tukey の検定を行った。

4. 研究成果

(1) 中皮腫発生率

CH 群の投与後 12 ヶ月までの中皮腫発生率は 60% と高率であった。中皮腫死亡の初発は、投与後 286 日であり、50% 生存日数は 358 日 (95% 信頼区間: 316-359 日) であった。

CH 群の中皮腫の組織型は、上皮型と肉腫型のいずれも認められた。なお、腹膜組織の一部で投与粒子の沈着とその周囲の肉芽腫形成が認められた。肉芽腫では線維化が進行していた。またそのほかの部位でも腹膜組織の線維性肥厚が観察された。

一方、CH-M および陰性対照群では、中皮腫の発生は認められなかった。病理組織学的検索の結果、CH 群と異なり、腹膜組織において肉芽腫の形成、線維化も明らかではなかった。また、中皮細胞の過形成も観察されなかった。

(2) 酸化ストレス評価

① 血清中酸化ストレス度の経時的変化

ラットへの CH および CH-M の一回腹腔内投与後 360 日までの血清中 d-ROMs 値の経時的変化を図 1 に示した。

CH 群では血清中 d-ROMs 値が腹腔内投与直後に一過性に上昇し、投与後 14 日目にはほぼ投与前のレベルにまで減少した。その後、血清中 d-ROMs 値は投与後 360 日目までほぼ上昇傾向が続いた。

CH-M 群でも血清中 d-ROMs 値が投与後初期に一過性に上昇したが、CH 群に比較して軽度の上昇であった。その後、血清中 d-ROMs 値は経時的に上昇したが、CH 群より低値の傾向を示していた。すなわち、CH-M 群の酸化ストレスは CH 群よりも軽度であった。

② 血清中抗酸化力の経時的変化

ラットへの CH および CH-M の一回腹腔内投与後 360 日までの血清中 BAP 値の経時的変化を図 2 に示した。

CH 群では血清中 BAP 値が腹腔内投与直後に一過性に上昇し、投与後 14 日目には投与前の値にまで減少した。さらに、血清中 BAP 値は投与後 270 日目まで経時的に減少した。その後、BAP 値の上昇傾向が見られたが、投与前の値に回復しなかった。

CH-M 群でも血清中 BAP 値が投与後初期に一過性に上昇した。その後、血清中 BAP 値は CH 群と同様な減少傾向を示したが、投与後 180 日目以降は減少を認めず、CH 群に比較して高値を示していた。すなわち、CH-M 群で

は、中皮腫発生した CH 群と異なり、長期間にわたり、抗酸化力が維持されていた。

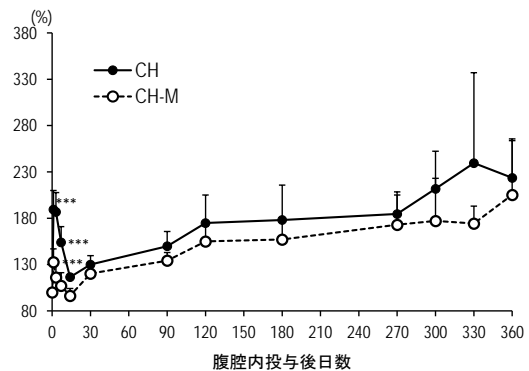


図1 ラット腹腔内投与後の血清中d-ROMs値の変化率
投与前の値を100%として表示した。
CH vs. CH-M; ***, $p < 0.001$

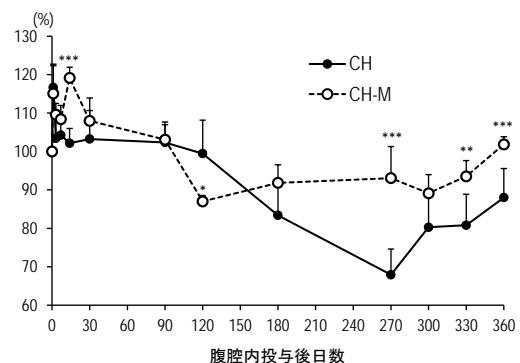


図2 ラット腹腔内投与後の血清中BAP値の変化率
投与前の値を100%として表示した。
CH vs. CH-M; *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$

(3) 尿中 8-OHdG 濃度の経時的変化

ラットへの CH および CH-M の一回腹腔内投与後 360 日までの尿中 8-OHdG 濃度の経時的変化を図 3 に示した。

CH 群では尿中 8-OHdG 濃度が腹腔内投与後初期に一過性に上昇した。さらに、投与後 180 日目以降、中皮腫死亡の発生前から尿中 8-OHdG 濃度の急激な上昇が認められた。尿中 8-OHdG の上昇は血清中抗酸化力 (図 2) の減少が始まった後に認められた。この結果から、抗酸化力の減少に伴い酸化 DNA 損傷が生じやすくなり、結果的に尿中 8-OHdG 濃度が上昇した可能性が考えられた。

一方、CH-M 群では尿中 8-OHdG 濃度の投与後初期の上昇は CH 群に比較して軽度であった。さらに、投与後 180 日目以降に CH 群で認められたような尿中 8-OHdG 濃度の経時的な上昇は認められなかった。すなわち、CH-M 群では、中皮腫発生した CH 群と異なり、酸化 DNA 損傷の程度は軽度であることが示された。さらに、尿中 8-OHdG 濃度の経時的変化は中皮腫発がんのリスクを反映していると考えられた。

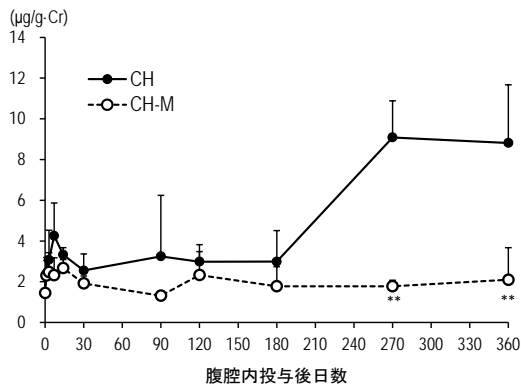


図3 ラット腹腔内投与後の尿中8-OHdG濃度の経時的変化
CH vs. CH-M; *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$

(4) 血清中サイトカイン濃度の経時的変化

① 血清中 IL-6 濃度

CH 群では、血清中 IL-6 濃度が腹腔内投与後初期に一過性に上昇した。さらに、投与後 90 日目以降、血清中 IL-6 濃度の緩やかな上昇傾向が認められた。

CH-M 群では、血清中 IL-6 濃度は全観察期間を通じて大きな変動は認められなかった。

本研究においては、血清中 IL-6 濃度が全体的に低く、被験試料の腹腔内投与後の血清中 IL-6 濃度の変動も他のバイオマーカーに比べて軽度であったことから、生体影響の評価における血清中 IL-6 濃度の有用性は示されなかった。

② 血清中 MCP-1 濃度

ラットへの CH および CH-M の一回腹腔内投与後 360 日までの血清中 MCP-1 濃度の経時的変化を図 4 に示した。

CH 群では、血清中 MCP-1 濃度が腹腔内投与後初期に一過性に顕著な上昇が認められたが、投与後 14 日目にはほぼ投与前の値に回復した。さらに、投与後 180 日目以降、血清中 MCP-1 濃度の上昇が認められ、とくに中皮腫死亡の発生前に急激に上昇していた。

CH-M 群では、投与後初期に血清中 MCP-1 濃度が一過性に上昇したが、CH 群に比較して軽度の上昇であった。さらに、投与後 180 日目以降に CH 群で認められたような血清中 MCP-1 濃度の経時的な上昇は認められなかった。すなわち、CH-M 群では CH 群に比較して MCP-1 を介したマクロファージの炎症反応は軽度であることが示唆された。

さらに、血清中 MCP-1 濃度の経時的変化は腹膜組織における炎症等の病変の推移だけでなく、中皮腫発がんのリスクを反映している可能性が考えられた。

(5) 中皮腫マーカーの経時的変化

ラットへの CH および CH-M の一回腹腔内投与後 360 日までの血清中 N-ERC/mesothelin 濃度の経時的変化を図 5 に示した。

CH 群では、血清中 N-ERC/mesothelin 濃度が腹腔内投与後初期に一過性に上昇した。その後血清中 N-ERC/mesothelin 濃度は減少傾向を示したが、投与前の値まで回復しなかった。さらに、血清中 N-ERC/mesothelin 濃度は投与後 180 日目以降に上昇傾向が認められ、とくに中皮腫死亡の発生前に急激に上昇していた。

一方、CH-M 群では投与後初期に血清中 N-ERC/mesothelin 濃度が一過性に上昇したが、CH 群に比較して軽度の変化であった。さらに、投与後 180 日目以降に CH 群で認められたような血清中 N-ERC/mesothelin 濃度の経時的な上昇は認められなかった。

すなわち、血清中 N-ERC/mesothelin 濃度の変動パターンは、中皮腫発生リスクを反映するものであると推測された。

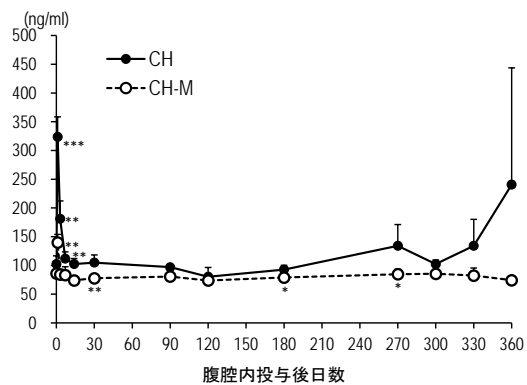


図4 ラット腹腔内投与後の血清中MCP-1濃度の経時的変化
CH vs. CH-M; *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$

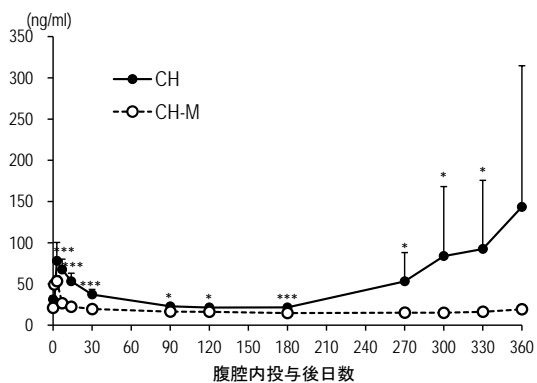


図5 ラット腹腔内投与後の血清中N-ERC/mesothelin濃度の経時的変化
CH vs. CH-M; *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$

(6) 総括

CH および CH をメカノケミカル処理して得られたナノ粒子(CH-M)について、ラットに一回腹腔内投与後の酸化ストレス（血清中 d-ROM 値）、抗酸化力（血清中 BAP 値）、酸化的 DNA 損傷（尿中 8-OHdG 濃度）、サイトカイン（血清中 MCP-1 濃度）の経時的変化および病理組織学的検索結果から発がん性を総合的に評価した。

CH-M は CH に比較して、酸化ストレス反応は軽度で抗酸化力が維持されており、酸化的 DNA 損傷も投与後初期に一過性に認められただけであった。一方、活性酸素種により誘導されることが知られている MCP-1 についても投与後初期の一過性の産生が認められただけであり、CH-M では CH に比較してマクロファージなどによる炎症反応が軽減していたことが示唆された。さらに、炎症反応が軽減されたことにより、発がん過程において重要な酸化的 DNA 損傷も軽減された可能性が考えられた。

以上のことから、CH-M においては、CH に比較して酸化ストレス反応および炎症反応が軽減された結果、中皮腫の発生が抑制された可能性が推測され、本研究結果はクリソタイトの無害化において重要な結果を示唆するものと考えている。

また、本研究結果から、アスベストおよびその無害化処理材料の中皮腫発がん性を評価するバイオマーカーとして、尿中 8-OHdG 濃度、血清中 MCP-1 濃度、血清中 N-ERC/mesothelin 濃度が有用である可能性も示唆された。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 2 件）

①高田礼子（他 8 名、1 番目）. アスベストのメカノケミカル処理ナノ粒子の中皮腫発がんに関する研究. 日衛誌、2011; 66:361. （査読無）

②高田礼子. 線維化・癌化のメカニズム—酸化ストレスの役割. 日本胸部臨床、2009; 68: S63-S72. （査読無）

〔学会発表〕（計 4 件）

①高田礼子（他 9 名）. クリソタイトとその無害化処理ナノ材料の酸化ストレス評価. 第 80 回日本衛生学会学術総会、2010 年 5 月 11 日、仙台国際センター（宮城県）

②高田礼子. クリソタイトの腹腔内投与と中皮腫：早期生体影響の評価. 第 99 回日本病理学会総会、2010 年 4 月 27 日、京王プラザ

ホテル（東京都）.

③高田礼子. アスベストによる中皮腫の誘発・実験的アプローチ. 第 48 回日本臨床細胞学会秋期大会、2009 年 10 月 30 日、JAL リゾートシーホークホテル福岡（福岡県）

④高田礼子（他 3 名）. 活性酸素自動分析装置 (FRAS4) を用いたアスベスト焼成無害化処理品の酸化ストレス評価. 第 68 回日本公衆衛生学会総会、2009 年 10 月 23 日、奈良県文化会館（奈良県）.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高田 礼子 (TAKATA AYAKO)
聖マリアンナ医科大学・医学部・教授
研究者番号：30321897

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし