

機関番号：37104

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20710027

研究課題名 (和文) 分子生物学的手法によるナノ粒子状レアメタルの発癌リスク評価

研究課題名 (英文) Evaluation of carcinogenicity of rare metal nanoparticles using molecular biological methods

研究代表者

長谷川 豪 (HASEGAWA GO)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：80383751

研究成果の概要 (和文)：ナノ粒子状レアメタルの発癌リスクを *in vitro* 発癌試験により検討した。先端産業界で有用なインジウム、ジスプロシウム、タングステン、モリブデンについて Ames 試験を行い、ナノ粒子状酸化ジスプロシウム、酸化インジウム、酸化タングステンに変異原性を見出した。Bhas42 細胞を用いた形質転換試験では、酸化インジウムと酸化ジスプロシウムに形質転換能を認めたが、粒径による活性の差異は認められなかった。

研究成果の概要 (英文)：Mutagenicity and transformation activity of four rare metals, In_2O_3 , Dy_2O_3 , WO_3 and Mo, were evaluated. The Ames test revealed that nano-sized Dy_2O_3 , In_2O_3 and WO_3 possessed mutagenic potential. With the respect to the result of transformation assay, In_2O_3 and Dy_2O_3 also showed potential ability, although particle size of these rare metals did not affect to their transformation activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：公衆衛生学、毒性学、環境学

科研費の分科・細目：環境学・環境影響評価・環境政策

キーワード：ナノ粒子、レアメタル、健康影響、発癌

1. 研究開始当初の背景

希土類やインジウム、ジスプロシウムなどのレアメタル (希少金属) は半導体や液晶導電膜、光磁気メモリ等の電子電気機器に広く使用され、先端産業界でその需要が拡大している。しかし、レアメタルの職業性曝露による健康影響評価やその毒性情報は必ずしも十分ではない。近年、ヒトにおいて酸化インジウムスズの吸入に起因すると考えられる間質性肺炎や肺線維症の発症が報告され (Homma S et al. Eur Respir J 2005; 24:200-204)、レアメタルも他の金属粒子と

同様に強い毒性を示す可能性が高い。また、毒性の中でも、発癌性を評価した論文はほとんど報告されておらず、酸化ニッケル (Nat1 Toxicol Program Tech Rep Ser 1996; 451:1-381) などごく一部の化合物に限られている。

一方、金属ナノ粒子が発癌誘起性を有することが近年示唆されており、二酸化チタンをラットに曝露すると、粒径 $< 2.5 \mu\text{m}$ の粒子に比べ、粒径 $< 0.1 \mu\text{m}$ のナノ粒子の方がより低い曝露濃度で肺癌が発生すると報告されている (Dankovic D et al. Inhal Toxicol

2007; 19(suppl 1):205-212)。ナノ粒子は非常に小さく、生体内の様々な臓器に侵入することや、重量当たりの表面積が極めて大きいことから高い化学反応性を示し、これらの特性が発癌などの有害作用に寄与すると考えられる (Oberdorster G et al. Environ Health Perspect 2005; 113(7):823-839)。レアメタルの中には白金のように触媒活性を有するものも存在し、ナノ粒子状レアメタルが強い毒性を有する可能性が示唆される。そこで、本研究では、ナノサイズのレアメタルに着目し、その発癌リスク評価を行う。

実験的に金属粒子の発癌性を検討する手法として、現在、実験動物に被験物質を投与する発癌試験を行い、発症した癌組織の病理解析が行われてきたが、物質の投与から目視可能な大きさの癌の発症までに1年以上の期間を必要とし、発癌リスクの評価に時間がかかることや、系統差や種差による発癌リスクのヒトへの外挿が困難なことが懸念されている。申請者らはこれまでに種々の癌に特異的に発現する遺伝子を網羅的遺伝子解析により同定してきた (Hayashi E, Hasegawa G et al. Clin Cancer Res 2007; 13(21):6267-6274, Kawakami Y, Hasegawa G et al. Front Biosci 2008; 13(5):1952-1958)。また、粒径 <2.5 μm の粒子を含む被験物質の曝露によりラットの各臓器で種々の遺伝子の発現が変化することを見い出している (Hasegawa G et al. 投稿準備中)。そこで、本研究では、ナノ粒子状レアメタルの発癌リスクを *in vitro* 実験での変異原性、形質転換能の検討により行うと共に、ナノ粒子状レアメタルを投与した動物の担癌組織の遺伝子発現解析を行い、発癌に関与する遺伝子の同定を行う。これにより、ナノ粒子状レアメタルを投与した実験動物の前癌状態を遺伝子レベルで検出する *in vivo* 実験系を確立する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ナノ粒子状レアメタルの健康影響、特に発癌に対するリスクを遺伝子レベルで評価することである。

レアメタルは半導体等の電子電気機器に広く用いられており、先端産業に不可欠な金属素材である。しかし最近、レアメタル化合物の職業性曝露による死亡例が報告され、レアメタルの危険性が示唆され始めたが、現在までのところ、その毒性情報はごく一部の化合物に限られ、レアメタルの生体影響評価は十分でない。また近年、金属ナノ粒子が発癌誘起性を有することが報告されており、レアメタルも同様に、ナノサイズ粒子が発癌性を有する可能性が示唆される。よって、ナノ粒子状レアメタルの発癌性評価が急務と考えられる。

そこで、本研究ではレアメタルの中でも国際がん研究機関 (IARC) で発癌リスクが分類されていない金属で、先端産業界で有用な元素について研究を行う。具体的には、47種のレアメタルのうち、液晶導電膜で使用されているインジウム (In)、高性能磁石や光磁気メモリで使用されているジスプロシウム (Dy)、半導体で使用されているタングステン (W) やモリブデン (Mo) を被験物質として用い、その発癌性を粒径の観点から検証する。その際、発癌性の評価を *in vitro* 実験での変異原性、形質転換能の検討により行う。また、*in vivo* 発癌性の検討を病態遺伝子プロファイル解析により行い、発癌指標となる遺伝子群を同定する。

本研究により、ナノサイズのレアメタルの発癌リスクを明確にすることで、これまでほとんど明らかでなかったレアメタルの危険性を提示し、基礎科学上重要な知見が得られるだけでなく、産業界に有用な新規毒性情報を提供できる。

3. 研究の方法

(1) 各種レアメタルの粒径分布及び物理化学的性質の検討：酸化インジウム (In_2O_3)、酸化ジスプロシウム (Dy_2O_3)、酸化タングステン (WO_3)、モリブデン (Mo) の通常径粒子とナノ粒子は SIGMA-Aldrich Co. (USA) より購入した。各粒子について、ダイナミック光散乱光度計 (DLS; DLS-7000、大塚電子) を用いて溶液中の粒径分布を測定した。また、各金属粒子のゼータ電位をゼータ電位測定装置 (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments Ltd., UK) で測定した。

(2) Ames 試験：各種レアメタル粒子の変異原性を Ames 試験により検討した。サルモネラ菌株 TA98、TA100、TA1535、TA1537、大腸菌株 WP-2 *uvrA* の計5株を用いて、OECD ガイドラインに基づき、直接法と S9 mix を用いた代謝活性化法を行った。変異源の検出感度を高める為、プレインキュベーション時間を20分-24時間の範囲で検討した。予備検討の結果、各種レアメタル粒子を156 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の濃度で菌株と反応させると増殖阻害が認められたことから、各種レアメタル粒子は20、40、80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で菌株と反応させた。各種レアメタル粒子と菌株とのプレインキュベーション後、サルモネラ菌株では0.5 mM L-ヒスチジンと0.5 mM D-ビオチン、大腸菌株では0.5 mM L-トリプトファンを含むトッアガー溶液と混合し、最小グルコース寒天培地 (テスメディア AN、オリエンタル酵母) 上で37°Cで48時間培養した。培養後、復帰変異コロニー数を計測した。判定は被験試料での復帰変異コロニー数が陰性対照の2倍以上でかつ用量に依存して増加した場合に陽性と

判定した。各種陽性対照を用いて各菌株の復帰変異コロニー数を計測し、本実験法が定法と同等であることを確認した。

(3) Bhas 42 形質転換試験：各種レアメタル粒子の形質転換能を Bhas 42 細胞を用いた形質転換試験により検討した。Bhas 42 細胞は 5% ウシ胎児血清を含む DMEM/F12 培地で培養し、day 0 に 6 ウェルプレートに 4×10^4 cells/well となるよう播種した。Day 3、7、10 に被験物質 (0-5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を含む培地と交換し、day 14、17 に被験物質を含まない培地と交換した。Day 21 に細胞をメタノール固定後、ギムザ染色し、形質転換コロニーを計測した。

4. 研究成果

(1) 各種レアメタルの粒径分布及び物理化学的性質の検討： In_2O_3 、 Dy_2O_3 、 WO_3 、Mo の各種レアメタルについて、DLS により溶液中の粒径分布を検討した。各レアメタル粒子のデータシートより、ナノ粒子の大きさは 100 nm 以下 (BET) と記載されていたが、溶液中では In_2O_3 は 85.8 nm-2881.3 nm (平均粒径：391.0 nm)、 Dy_2O_3 は 85.8 nm-1132.3 nm (平均粒径：565.2 nm)、 WO_3 は 106.5 nm-1134.1 nm (平均粒径：545.5 nm)、Mo は 85.8 nm-442.2 nm (平均粒径：213.2 nm) となり、すべての金属で凝集が認められた。通常径粒子では、 Dy_2O_3 及び WO_3 ではごく微量のナノ粒子が検出されたが、 In_2O_3 と Mo はナノ粒子が検出されなかった。

各種ナノ粒子状レアメタルの溶液中での凝集に対する安定性を検討するため、ゼータ電位測定による表面電位解析を行った。各種ナノ粒子状レアメタルのゼータ電位は -54.4 mV-50.6 mV であり、全ての金属ナノ粒子が水溶液中で良好な分散性を示した。

(2) 各種レアメタル粒子の変異原性の検討

① プレインキュベーション時間の検討：変異源の検出感度を高める為、 WO_3 粒子 (40 $\mu\text{g}/\text{plate}$) を用いて Ames 試験における TA98 株とのプレインキュベーション時間を 20 分、1 時間、2 時間、4 時間、8 時間、16 時間、24 時間の範囲で検討した。ナノ粒径 WO_3 は 8 時間までのプレインキュベーションで前培養時間依存的に復帰変異コロニー数が増加した。しかし、8 時間以上のプレインキュベーションでは粒子の毒性が表れて復帰変異コロニー数が減少した。従って、8 時間までのプレインキュベーション時間の延長により、変異源の検出感度を高める可能性が示唆された。また、8 時間までのプレインキュベーション時間の延長による復帰変異コロニー数の増加は直接法と代謝活性化法共に認められた。

② 各種レアメタル粒子の Ames 試験： In_2O_3 、 Dy_2O_3 、 WO_3 、Mo の各種レアメタルについて、プレインキュベーション時間を 20 分と 8 時間に設定し、直接法及び代謝活性化法で Ames 試験を行った。サルモネラ菌株 TA98、TA100、TA1535、TA1537、大腸菌株 WP-2 uvrA の計 5 株を用いて Ames 試験を行った結果、ナノ粒径 Dy_2O_3 では直接法及び代謝活性化法共に全ての菌株で復帰変異コロニー数が濃度依存的に増加した。これに対し、通常径 Dy_2O_3 では TA98 株と TA1535 株で最高濃度の 80 $\mu\text{g}/\text{plate}$ でのみ復帰変異コロニー数の増加が認められた。プレインキュベーション時間 20 分と比べ、8 時間では復帰変異コロニー数がより増加した。

In_2O_3 では、プレインキュベーション時間 20 分では復帰変異コロニー数は増加せず、ナノ粒径 In_2O_3 を TA1537 株と 8 時間プレインキュベーションした際にのみ、復帰変異コロニー数の増加が認められた。代謝活性化法では 80 $\mu\text{g}/\text{plate}$ まで濃度依存的に復帰変異コロニー数が増加したが、直接法では 40 $\mu\text{g}/\text{plate}$ でのみ復帰変異コロニー数が増加したことから、直接法では高濃度 (80 $\mu\text{g}/\text{plate}$) のナノ粒径 In_2O_3 が 8 時間のプレインキュベーションにより毒性を示すことが示唆された。通常径 In_2O_3 では全ての菌株で復帰変異コロニー数は増加しなかった。

WO_3 では In_2O_3 と同様の傾向を示し、プレインキュベーション時間 20 分では復帰変異コロニー数は増加せず、ナノ粒径 WO_3 を TA98 株と 8 時間プレインキュベーションした際にのみ、復帰変異コロニー数の増加が認められた。代謝活性化法では 80 $\mu\text{g}/\text{plate}$ まで濃度依存的に復帰変異コロニー数が増加したが、直接法では 40 $\mu\text{g}/\text{plate}$ まで濃度依存的に復帰変異コロニー数が増加したが、80 $\mu\text{g}/\text{plate}$ では復帰変異コロニー数は減少した。よって、 In_2O_3 と同様に直接法では高濃度 (80 $\mu\text{g}/\text{plate}$) のナノ粒径 WO_3 が 8 時間のプレインキュベーションにより毒性を示すことが示唆された。通常径 WO_3 では全ての菌株で復帰変異コロニー数は増加しなかった。

これに対し、Mo では全ての菌株でナノ粒径 Mo と通常径 Mo 共にプレインキュベーション時間 20 分と 8 時間で直接法及び代謝活性化法でも復帰変異コロニー数は増加しなかった。

(3) 各種レアメタル粒子の形質転換能の検討：各種レアメタル粒子の形質転換能を Bhas 42 細胞を用いた形質転換試験により検討した。ナノ粒径 In_2O_3 では 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上、通常径 In_2O_3 では 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の添加濃度で形質転換コロニー数が有意に増加した。 Dy_2O_3 ではナノ粒径と通常径共に 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の添加濃度で形質転換コロニー数が有意に増加した。

しかし、ナノ粒径 In_2O_3 及びナノ粒径 Dy_2O_3 を $5 \mu\text{g/ml}$ 添加した際には、やや形質転換コロニー数が減少した。予備試験の結果より各種レアメタル粒子を $10 \mu\text{g/ml}$ 添加した際には Bhas 42 細胞の増殖阻害が認められたが、ナノ粒径 In_2O_3 及びナノ粒径 Dy_2O_3 ではより低濃度である $5 \mu\text{g/ml}$ で増殖阻害が認められたことから、これらの金属では通常径粒子と比べてナノ粒子の方が Bhas 42 細胞に対する毒性がやや強いことが示唆された。また、形質転換試験では、ナノ粒子と通常径粒子で形質転換能の強さに差異は認められなかったことから、これらの金属では形質転換能に対する粒径の影響はみられなかった。これに対し、 WO_3 と Mo はナノ粒子と通常径粒子共に $0.01\text{-}5 \mu\text{g/ml}$ の濃度範囲では形質転換能はみとめられなかった。

以上の結果から、ナノ粒径の In_2O_3 と Dy_2O_3 では変異原性と形質転換能が共に認められ、発癌イニシエーション活性とプロモーション活性を有することが示唆された。今後、短期発癌モデルマウスを用いた *in vivo* 発癌性試験やアメタル投与担癌マウスの網羅的遺伝子発現解析によるナノ粒子状レアメタルの発癌性の検討及び発癌機序の解明が望まれる。

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 1 件)

- ① 石原陽子、柴田彰、長谷川豪、微小粒子状物質と心肺疾患、呼吸と循環、査読無、56(8)、817-826、2008

[学会発表] (計 1 件)

- ① Hasegawa G, Shimonaka M, Ishihara Y, Mutagenicity of rare metal and metal oxide nanoparticles: components and particle sizes. Society for Toxicology 2011 Annual Meeting & ToxExpo, Washington DC, USA, March 8, 2011

[図書] (計 1 件)

- ① 石原陽子、長谷川豪、小山哲史、第 2 章 ナノ材料の生体への影響 5. ナノ粒子の体内への取り込み経路、標的となる臓器とその影響、ナノ材料のリスク評価と安全性対策、フロンティア出版、pp. 60-66、2010

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷川 豪 (HASEGAWA GO)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：80383751

(2) 研究分担者
なし。 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者
なし。 ()

研究者番号：