

機関番号 : 13601

研究種目 : 若手研究 (B)

研究期間 : 2009~2010

課題番号 : 21710106

研究課題名 (和文)

新規素材カーボンナノチューブの毒性および発がん性評価

研究課題名 (英文)

Study on the toxicity and carcinogenicity of carbon nanotubes with its properties

研究代表者

藤井 千文 (FUJII CHIFUMI)

信州大学・医学部・助教

研究者番号 : 10361982

研究成果の概要 (和文) :

カーボンナノチューブ (CNTs) の生体に与える影響についての研究は、近年のナノテクノロジーの急速な進歩に伴い、非常に重要であると考えられる。本研究では、CNTs の形状や製造過程の違いにより、急性毒性や発がん性に差があるかどうかを解析し、より生体に安全な CNTs の物性特性を提案することを最終目標とした。in vivo および in vitro での解析から、CNTs の形状や製造過程での処理法の違いにより、生体に対する影響が異なることを示唆する結果を得た。

研究成果の概要 (英文) :

Carbon nanotubes are at the leading edge of the rapidly developing field of nanotechnology. It is necessary to evaluate the intrinsic toxicity of carbon nanotubes for its safety usage. In this study, we suggested that the bio-safety of carbon nanotubes was strongly affected by its physiological and chemical characteristics. These results may shed light on the properties of carbon nanotubes with less harm to human beings.

交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野 : 複合新領域

科研費の分科・細目 : ナノ・マイクロ科学 ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード : ナノ粒子 ナノチューブ 発がん性

## 1. 研究開始当初の背景

近年、先端的素材として、特徴的な  $sp^2$  混成軌道を基にしたカーボンナノチューブ (CNTs) が注目されている。微細なナノサイズと並はずれた物理化学的性質ゆ

えに、ナノ複合体、センサー、ナノ電気装置、電気化学システムさらにはマイクロカテーテルのような医療器具に至るまでの広い範囲において有効に利用または応用の可能性が示されている。今日では、

CVD 法による合成、特に浮遊反応物法により、大量のカーボンナノチューブが入手できるようになっている。このような観点から、CNTs の安全性・毒性について早急に評価する必要があることが、国際的にも提案されてきている。ナノスケールというサイズと高い縦横比（約 100）という特徴から、たとえば従来のカーボンブラックなどのカーボン素材が、人工心臓弁に使用されているという例からもわかるように非常に高い生物学的適合性を持っていることもよく知られている。しかしながら、ナノスケールの CNTs は、マイクロスケール、マクロスケールの物質とは異なる生物学的影響を誘発することが予想される。

しかしながら、CNTs を含むナノサイズの素材の毒性に対する研究は、現在のところ限られている。ことさら、発がん性に関しては、ほとんど報告がないが、2008 年に入って、p53 ヘテロノックアウトマウスを用いた系において、ある種の多層 CNT による中皮腫発症が示唆されるという報告がなされた (J. Toxicol. Sci. 33, 105-116 2008)。この報告を受けるとともに、CNTs とアスベストとの粒子形状の酷似性からも、CNTs の発がん性の評価は、急務であると考えられる。p53 ヘテロノックアウトマウスは、短期間での毒性評価が可能であるという利点もあるが、反面、発がん性に対する感受性が高く、この系での中皮腫発症が、CNTs の発がん性を直接示すものとは言い難い。このため、野生型動物を用いた系で、CNTs の発がん性を評価する必要があると考えられる。

さらに、上記報告では、1 種の多層 CNT のみを用いているが、これまでに我々のグループで行ってきているマウス皮下投与による毒性評価に関する研究では、多種の CNTs を用いており、CNTs の物理特

性によって、生体応答が異なるという結果を得ている。また、CNTs の腹腔内投与時の炎症反応の惹起と CNTs の貪食除去についても、CNTs の物理特性によって差が見られるという報告がなされた (Nat. Nanotechnol. 3, 423-428 2008)。そこで、CNTs の物理特性による発がん性の差違も見られる可能性があるため、この点についての検討も重要な課題であると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、CNTs に関してはほとんど検討のなされていなかった発がん性についての評価を行うことを最終的な目標とした。期間内には以下の内容を明らかにすることを目的とした。

1. マウスモデルによる in vivo での CNTs の発がん性の評価
2. in vitro での CNTs の細胞増殖、細胞周期に与える影響
3. in vitro での CNTs の細胞毒性の評価
4. in vitro での CNTs の DNA に与える影響の解析

以上の解析を行うことが、CNTs の発がん性の評価につながると期待される。

CNTs は、生物医学分野での利用が確実となっている。DNA やタンパク質のセンサー、生体触媒、組織の足場などの数々の応用の可能性がある。しかしながら、現状では、CNTs の生体に与える影響について評価する方法についての国際標準化が、当研究室のデータを基にしながら進行中であった。また、文献的に報告されている CNTs の種類や品質も様々であり、どのような物理特性をもった CNTs にどのような影響があるかなどという統一見解は得られていないのが現状である。このため、限られた物理特性の CNTs のみでなく、CNTs の物理特性の違いによる、毒性・発

がん性の差違を評価することが重要である。

以上の点を基本としながら、その発展的研究として、培養細胞を用いて、すでに確立された種々の方法により、CNTsが生体に与える影響を評価する。この結果は、現場での安全性リスク管理に貢献するものと思われる。培養細胞株を用いたCNTsによる細胞の形質転換等の研究報告例はなく、本研究で用いる方法は独自性に富んだ評価法であるとして提案できるものと思われる。また、アスベストとの粒子形状の酷似性から、中皮腫発症の可能性が考えられるが、この点は、CNTsをマウス腹腔に投与し、腹膜中皮の観察を行うことで評価する。このような評価法については、各国間で議論のあるところではあるが、呼吸器官への暴露に比べ、中皮に直接接触するという利便性があると考えている。以上の材料・方法を用いて研究を行うことにより、より信頼性が高く、独自性のある結果が得られるものと期待される。また、世界にさきがけて本邦から安全性評価に関しての一端を発信することが可能であると考えている。

### 3. 研究の方法

1) マウスを用いた実験系において、CNTsの形状や製造過程での処理法の違いによる急性期および慢性期の生体応答の差について解析を行った。

マウス腹腔内に形状・処理法の異なる種々の多層CNTsを単回投与し、急性期および慢性期の変化の解析を行った。

2) *in vitro*でのCNTsの細胞毒性の評価のため、マウス Balb3T3 cloneA31 株にCNTs 暴露後のコロニー形成能の差を比較することにより、細胞毒性を評価した。また、形成されたコロニーの形態より、形質転換能を評価した。

### 4. 研究成果

はじめに、CNTsの急性期の生体応答を調べるため、マウス腹腔内に形状・処理法の異なる種々の多層CNTsを単回投与し、投与後7日における腹腔浸出全細胞数・好中球・マクロファージの数を比較した。その結果、形状・処理法の異なる13種のCNTsのうち6種で、腹腔浸出細胞数の増加が見られた。

また、同種のCNTsをマウス腹腔内に単回投与後、長期の観察を行ったところ、3種のCNTsで、投与後200日経過後より腹水の貯留が認められた。さらに、この3種のCNTsを含む6種のCNTsの投与により、腹腔内臓器の癒着を伴う死亡が観察された。しかし、上記6種と形状・処理法が異なるCNTsでは、著しい変化は認められなかった。また、この6種は上記急性炎症をより強く惹起するCNTsと一致していた。以上の結果より、CNTsの形状や製造過程での処理法により、生体に対する影響が異なることが示唆された。

上記マウスを用いた実験の結果をもとに、形状や製造過程での処理法の異なる3種のCNTsを用いて、マウス Balb3T3 cloneA31 株にCNTs 暴露後のコロニー形成能の差を比較することにより、*in vitro*での細胞毒性を評価した。その結果、3種中1種のCNTでコロニー形成能の低下が見られた。また、CNTs 暴露後に形成されたコロニーに形質転換体が存在するかどうかを調べたところ、上記コロニー形成能の低下したCNTでは、形質転換体が観察された。この形質転換体の割合を算出したところ、CNT 用量依存性を示した。また、このCNTは、マウスに急性炎症や慢性炎症を惹起したものと一致していた。しかし、他の2種では、このような影響は見られなかった。以上の結果から、今回用いた3種中1種のCNTは、

高濃度で生体に暴露された際には細胞毒性を示す可能性あることが示唆された。これらの結果は、CNTs の形状や製造過程での処理法により、生体に対する影響が異なることを示唆しており、今後、生体にとってより安全な CNTs の物性特性を提案する一助となるものと期待される。

#### 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)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

藤井 千文 (FUJII CHIFUMI)

信州大学・医学部・助教

研究者番号：10361982