

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 26 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22510035

研究課題名（和文）肺線維化と発癌をエンドポイントとしたナノマテリアルの慢性健康影響評価に関する研究

研究課題名（英文）Study of nanomaterials on chronic health effect assessment according to endpoint of carcinogenesis and lung fibrosis

研究代表者

石原 陽子（ISHIHARA YOKO）

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：50203021

研究成果の概要（和文）：ナノマテリアルの慢性影響を適切に評価するために、*in vivo*、*in vitro* 実験を行った。*in vitro* 実験では、細胞毒性、細胞増殖能、変異原性、形質転換の結果に試験試料の物理的・化学的特性が影響した。線維化や発癌をエンドポイントとした *in vivo* 実験では、遺伝子改変動物を用いることなく正常動物への、気管内単回投与、1.6 年の経過観察で  $0.1 \mu\text{g}-1\text{mg}$ /匹でリスク評価が可能であった。*in vivo* と *in vitro* の成績に乖離が見られたことから、研究結果をヒトに外挿する場合には注意が必要である。

研究成果の概要（英文）：Experiments were conducted to evaluate properly the chronic effect of nano-materials *in vivo* and *in vitro*. Results of cytotoxicity, proliferative activity, mutagenicity and transformation were affected by the physical-chemical properties of test materials *in vitro*. The risk assessment at concentration of  $0.1 \mu\text{g}-1\text{mg}$  was performed at the single-dose of tracheal injection in normal animals, and the progress of fibrosis and oncogenesis were observed during 1.6 year in normal animals. Appropriated animal experiment was performed without using genetically modified animals. There were divergence results between *in vitro* and *in vivo* experiments. The research results should be carefully applied to human risk assessment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：複合新領域

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：ナノマテリアル、慢性健康影響、肺線維化、発癌、リスク評価

## 1. 研究開始当初の背景

1990年中頃に欧米から相次いで報告された大気中微小粒子状物質の短期曝露と心不全死亡率の関係は、微小粒子の肺局所のみならず循環器系を介した全身影響評価とこれまで重視されなかったナノ粒子の生体影響評価の必要性を示唆するものであった (Dockery DW & Pope CAIII, Ann Rev Public Health 15: 107-132, 1994, Wichmann HE, et al: HEI report No.96, 2000)。これに端を発し、既存の各種粒子を用いた *in vivo*、*in vitro* 実験が国内外で行われ、粒径が小さいほど肺の炎症反応が強く、粒子濃度と共に粒子表面積、粒子成分など化学的・物理的特性がリスク評価上重要であることが示唆された。大気中ナノ粒子に関する一連の動きは、日欧米のナノマテリアルの健康影響評価の必要性をも提起し、最近では物理的形状が結晶シリカやアスベストに類似しているという理由で肺線維化や発癌性が危惧されている。特に、Takagiらのp53+/-マウスへの多層カーボンナノチューブ腹腔内投与による中皮種発生の報告 (J Toxicol Science, 33:105-116, 2008) は、遺伝子改変動物使用の適否、投与部位・用量の妥当性など諸問題を含んでいるものの発癌の可能性を強く示唆するもので、国内外に大きな反響をもたらした。その結果、欧米のみならず我が国でも労働環境でのナノマテリアルの安全な取り扱い指針が作成され、産官学でのナノテクノロジー、ナノマテリアルの健康影響評価とその体制の構築が緊急課題とされている。

国内外でナノマテリアルの生体影響についての知見が蓄積されつつあるが、主に細胞毒性や急性炎症反応を指標とした研究で、重視すべき慢性影響の肺線維化や発癌性をエンドポイントとした報告は非常に少ない。これまで困難であった純正試料の多量入手も可能となり、産業界でもナノマテリアルの安全性についての情報公開の必要性が認識され始めた。加速されるナノマテリアル開発に向けて、国際的にも通用する新慢性健康影響評価法の開発が必要不可欠であり、その確立には動物種、試料投与部位や方法、用量等の実験条件、線維化と発癌性の適切な指標、*in vitro*、*in vivo*成績の相関性を明確にする必要がある。

## 2. 研究の目的

ナノマテリアル開発戦略の展開は、これまでとは異なった視点での健康影響評価の必要性を強く提起している。ナノマテリアルの形状から肺線維化や発癌性が示唆されているが、現行では細胞毒性の *in vitro* 試験と急性炎症応答を指標とした *in vivo* 試験が主で、投与方法や用量など試験条件の妥当性や、*in vivo* と *in vitro* 試験との乖離や整合性についての詳細な検討もなされていない。そこで、慢性影響である肺線維化と発癌をエンドポイントに、適切な試験条件及び *in vivo*、*in vitro* 成績の相関性について、分子生物学的、生化学的、病理学的視点から包括的に検討し、より安全性が高いナノマテリアル開発に向けての適切且つ迅速な慢性健康影響評価法を行うための問題点を見出す。

## 3. 研究の方法

各種ナノ粒子を被験試料とした *in vitro* 試験により線維化能、細胞毒性及び発癌性を明確にし、正常動物を用いた用量設定試験及び長期発癌性試験を行った。ナノ粒子の変異原性・形質転換能・DNA傷害能・細胞毒性の検討は、変異原性はナノ粒子の発癌イニシエーション活性を、サルモネラ菌及び大腸菌を用いた Ames 試験により検討した。形質転換能は、BALB/3T3 細胞、発癌イニシエーションを既に受けた段階にある Bhas42 細胞を用いて形質転換試験を行い、ナノ粒子の発癌プロモーション活性を検討した。細胞毒性は、肺胞上皮細胞株 (A549)、単球系細胞株 (RAW264, THP-1, J774.1)、線維芽細胞株 (L929) などを用いた MTT 試験により細胞増殖能、乳酸脱水素酵素 (LDH) 漏出試験などにより細胞傷害性について検討した。

*In vivo* での線維化と発癌性は、SPF 雌雄 ICR マウスを用いて、試料を気管内に単回または反復投与による急性実験と、同条件で最長 1.6 年間観察する長期暴露試験を行った。肺線維化と発癌の評価は、肉眼的所見、病理所見、血液及び BAL の細胞・生化学的評価・肺組織 DNA プロファイル分析、Milliplex Map による血清タンパク分析などにより評価した。なお、DNA プロファイルは、正常組織を対象に Whole Mouse Genome オリゴ DNA マイクロアレイ (Agilent 社製) により病態遺伝子プロファイル解析を行った。発現異常を認

めた項目については、その肺組織の RNA を抽出してリアルタイム PCR でマイクロアレイ解析を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) in vitro 実験

①粒状及び繊維状のカーボンナノマテリアルであるフラーレン C<sub>60</sub> とフラーレンナノウイスカ (FNW)、希少金属である酸化インジウム (In)、酸化デスプロジウム (Dy)、酸化タンタム (W)、モリブデン (M) のマイクロ粒子とナノ粒子を用いて、結晶シリカゲル、クロシドライトなどを対照試料として、各種培養細胞を用いて急性細胞毒性と変異原性等について検討した。その結果の一部を表 1-3 と図 1-2 に示した。

表 1. 各種培養細胞の viability に対する C60 と FNW の影響

Cell line	n	Cell Viability (%)			
		C <sub>60</sub>		FNW	
		Day3	Day4	Day3	Day4
RAW264	6	98.8±0.2	98.8±0.5	99.7±0.2	99.7±0.2
THP-1	6	99.5±0.3	99.2±0.5	99.5±0.3	99.2±1.2
J774.1	6	99.5±0.2	99.2±0.3	99.5±0.3	99.2±0.5
L929	6	99.5±0.3	99.5±0.3	99.8±0.2	99.7±0.2
A549	6	98.8±0.5	99.2±0.5	99.2±0.3	99.5±0.2

Concentration: 10µg/ml  
Data are expressed as mean ± SE

10 µg/ml の C60, FNW との 3-4 日間培養では、繊維芽細胞やマクロファージ系培養細胞の viability にはほとんど影響を認めなかった。一方、細胞傷害性と増殖能への影響は、10µg/ml の UICC Crystotile や対照群と比較して 0.1-10µg/ml の濃度範囲では C60, FNW 共に有意な影響は認めなかった(表 2-3)。表には示していないが、ヒト正常中皮細胞を用いた実験では、10µg/ml C60, FNW 添加後に、速やかな細胞内取り込みを認めた。対照群と比較して、FNW は細胞増殖能や細胞傷害性に影響を認めなかったが、C60 は細胞増殖能の低下と LDH release の増加を示した。

表 2. 各種培養細胞からの LDH release への C60 と FNW の影響

Cell line	n	LDH transduction (%)						UICC Crystotile 10 µg/ml
		C <sub>60</sub>			FNW			
		0.1µg/ml	1 µg/ml	10 µg/ml	0.1µg/ml	1 µg/ml	10 µg/ml	
RAW264	5	3.1±2.0	2.4±1.5	1.8±1.3	4.5±2.1	5.4±2.3	7.7±3.6	16.1±1.8*
THP-1	5	2.0±1.7	5.3±3.4	8.0±7.6	1.2±1.0	0.1±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
J774.1	4	1.2±1.0	2.1±1.0	0.1±0.1	2.3±2.4	0.7±0.8	0.0±0.0	2.9±0.9*
L929	4	0.3±0.4	0.4±0.3	0.5±0.3	0.5±0.3	0.1±0.1	0.3±0.4	7.9±1.8*
A549	6	0.2±0.2	0.2±0.1	1.3±0.6	0.4±0.3	0.0±0.0	0.0±0.0	6.4±1.5*

Data are expressed as mean±SE. One datum represents the mean of 4 wells.  
\* P<0.05 vs control \*\* P<0.001 vs control

表 3. 細胞増殖能への C60 と FNW の影響

Cell line	n	Proliferation (%)						UICC Crystotile 10 µg/ml
		C <sub>60</sub>			FNW			
		0.1 µg/ml	1 µg/ml	10 µg/ml	0.1 µg/ml	1 µg/ml	10 µg/ml	
RAW264	7	101.2±8.0	102.4±17.8	92.8±5.0	96.3±4.4	99.6±5.7	95.2±7.3	31.6±8.3**
THP-1	4	127.7±16.2	139.4±16.2	114.4±1.8	75.7±7.1	114.7±18.0	123.4±25.6	206.0±95.5*
J774.1	5	110.9±11.2	111.4±9.6	113.0±5.7	99.8±4.7	113.4±6.2	110.8±6.4	18.5±1.0**
L929	6	116.0±9.3	110.3±4.6	105.0±9.4	100.4±6.5	96.0±6.1	105.7±4.9	150.9±22.3**
A549	4	83.4±12.2	90.7±8.5	85.9±9.4	83.5±10.7	89.1±12.5	85.4±10.4	161.0±21.9**

Data are expressed as mean±SE. One datum represents the mean of 4 wells.  
\*P<0.05 vs control \*\*P<0.001 vs control

##### ②Ames 試験と形質転換試験

変異原性試験では、C60, FNW 共に 0.1~10µg/ml の濃度範囲では、明らかなコロニー数の増加を示さなかった(図 1-2)。また、形質転換試験においても特記すべき所見は認めなかった。

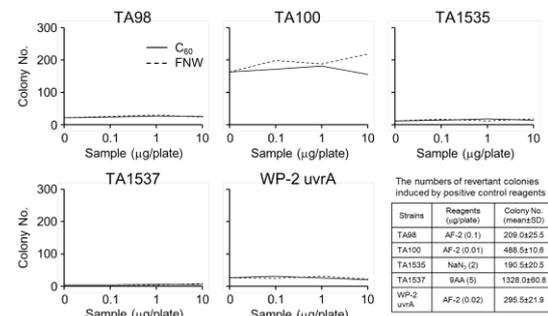


図 1. C60, FNW による細菌の突然変異コロニー数の変動 (代謝活性化無)

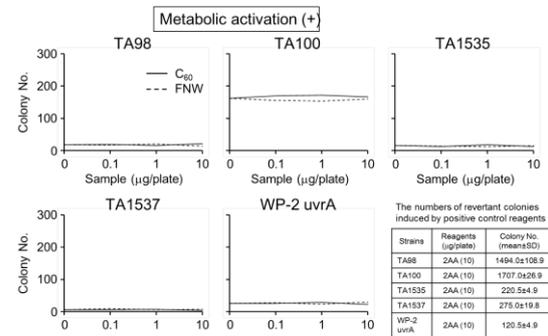


図 2. C60, FNW による細菌の突然変異コロニー数の変動 (代謝活性化有)

##### ③希少金属粒子の変異原性と形質転換能

表 4 に、希少金属粒子の変異原性及び形質転換試験結果をまとめた。マイクロ粒子と比較してナノ粒子で変異原性を示す傾向が強く、試験試料 4 種の中では特に Dy, In に変異原性と形質転換が認められた。

表 4 希少金属の Ames 及び形質転換試験結果

Compounds	Mutagenicity		Transformability	
	Nano-sized particle	Micro-sized particle	Nano-sized particle	Micro-sized particle
Dy <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	++ (5/5)	+(2/5)	+	+
In <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	+(1/5)	-(0/5)	+	+
WO <sub>3</sub>	+(1/5)	-(0/5)	-	-
Mo	-(0/5)	-(0/5)	-	-

Mutagenicity and transformability of rare metals were evaluated by Ames test and Bhas 42 cell transformation assay, respectively. The ratio of bacterial strains with positive response is indicated in parentheses.

④ In vitro 実験のまとめ：粒状と繊維状のカーボンブラック粒子 0.1-10µg/ml の濃度範囲では、cell line の培養細胞を用いた細胞増殖能、細胞毒性、変異原性試験、形質転換試験では、明らかな影響は認めなかった。一方、ヒト中皮細胞の primary cell では、FNW に比較して C60 で細胞毒性や細胞増殖能の低下が観察された。希少金属粒子の変異原性・形質転換試験では、変異原性は粒子径に、形質転換能は粒子径よりもむしろ化学特性と関連性が高いことが示唆された。

(2) in vivo 実験

雄性及び雌性 ICR マウスを用いて、気管内に試験試料の単回投与を行い 1.6 年間継続観察し、慢性影響としての発癌と肺線維化について検討した。

① 生存分析

表 5 に、C60 と FNW の気管内投与マウスでの平均生存日数と死亡時の解剖所見をまとめた。3 群の生存分析では、対照群に比較して試験試料群で平均生存日数は低値を示し、ログラン及び Wilcoxon 検定で対照群と比較して雌雄共に P<0.004 以下で有意差を認めた。しかしながら、濃度依存性は明確ではなかった。気管内単回投与後 1.6 か月間の経過観察中に死亡した動物の剖検時に肉眼的に肺あるいはその他の部位に腫瘍形成を観察した個体数は、雌雄共に FNW 投与群で肺腫瘍を各 2 匹観察したが、C60 群では皆無であった。一方、気管内投与 1.6 年後まで生存した動物の解剖時の病理所見では (表 6)、FNW では肺腫瘍は認めず、C60 10µg で 1 匹認めた。肝腫瘍は、正常マウスで 6 匹中 1 匹認めたのに対して、C60 と FNW 投与群で各 2 例であった。いずれの試験試料も、腫瘍形成個数と試料濃度の間には明確な関係を認めなかった。腫瘍以外の肺異常所見は各群 1 例であった。

表 5 C60 及び FNW 気管内投与マウスの平均生存日数と腫瘍形成個体数

Sex	Group	n *	死亡数	生存数	生存率	平均生存日数 **	腫瘍形成個体数	
							肺	その他の部位
♀	Control	2	0	2	1.0	512	0	0
	Whisker 1 mg	5	0	5	1.0	512	0	0
	Whisker 100µg	5	1	4	0.8	510	1	0
	Whisker 10µg	5	0	5	1.0	512	0	0
	Whisker 1µg	4	2	2	0.5	421	1	0
	Total	19	3	16	0.8	492	2	0
	C60 1 mg	4	0	4	1.0	511	0	0
	C60 100µg	4	1	3	0.8	499	0	0
	C60 10µg	4	0	4	1.0	511	0	0
	C60 1µg	4	1	3	0.8	503	0	0
Total	16	2	14	0.9	506	0	0	
♂	Control	4	0	4	1.0	512	0	0
	Whisker 1 mg	3	1	2	0.7	477	1	0
	Whisker 100µg	4	2	2	0.5	487	0	0
	Whisker 10µg	5	1	4	0.8	462	0	0
	Whisker 1µg	4	4	0	0.0	391	1	1
	Total	16	8	8	0.5	456	2	1
	C60 1 mg	2	1	1	0.5	481	0	0
	C60 100µg	5	1	4	0.8	493	0	1
	C60 10µg	3	1	2	0.7	478	0	1
	C60 1µg	5	0	5	1.0	511	0	0
Total	15	3	12	0.8	494	0	2	

\*: n 数は気管内投与時に死亡した個体、及びマイクロアレイに使用した個体を除く。  
 \*\*: 平均生存日数は、気管内投与処置日からの日数 (最大: 511~512日)、マイクロアレイに使用した個体は打ち切りとして平均生存日数を算出。

表 6. 1.6 年生存した動物の解剖時の肉眼的病理所見

性別	腫瘍形成個体数 匹/全数 (%)			腫瘍以外の肺異常所見
	肺	肝	その他	
♀				
Control	0/6	1/6 (16.7%)	0/6	0/6
FNW				
1mg/匹	0/6	0/6	1/6 (16.7%)	0/6
100µg/匹	0/6	0/6	0/6	1/6 (16.7%)
10µg/匹	0/8	2/8 (25%)	0/8	0/8
1µg/匹	0/2	0/2	0/2	0/2
C60				
1mg/匹	0/5	0/5	0/5	0/5
100µg/匹	0/7	1/7	0/7	1/7 (14.3%)
10µg/匹	1/6 (16.7%)	1/6 (16.7%)	1/6 (16.7%)	0/6
1µg/匹	0/8	1/8 (12.5%)	2/8 (25%)	1/8 (12.5%)

① C60 及び FNW 気管内投与マウスの肺組織での遺伝子発現プロファイル (表 7)

試験試料を気管内投与 1 年後に、対照群 4 匹と 1mg 投与群各 2 匹の肺組織で DNA マイクロアレイ解析を行った。その結果を表 7 に示した。各群 2 匹共に 2 倍以上の発現あるいは発現減少を示し、かつ pseudo gene 及び predicted gene でない遺伝子の数は、増加、減少共に C60, FNW 投与群で 50 前後であった。

表 7. C60 と FNW 投与マウス肺で変化のあった遺伝子数とプローブ数

[発現が増加した遺伝子数]			
投与群	個体	2 倍以上発現が増加した遺伝子数 (プローブ数)	2 匹共に 2 倍以上発現が増加した遺伝子数 (プローブ数) / うち、pseudo gene と predicted gene を除いた遺伝子数 (プローブ数)
FNW	#1	323 (353)	161 (188) / 51 (55)
	#2	313 (380)	
C60	#1	191 (206)	126 (164) / 59 (111)
	#2	586 (713)	
[発現が減少した遺伝子数]			
投与群	個体	2 倍以上発現が減少した遺伝子数 (プローブ数)	2 匹共に 2 倍以上発現が減少した遺伝子数 (プローブ数) / うち、pseudo gene と predicted gene を除いた遺伝子数 (プローブ数)
FNW	#1	343 (411)	88 (270) / 69 (78)
	#2	268 (336)	
C60	#1	171 (199)	58 (160) / 43 (145)
	#2	934 (992)	

使用した Whole Mouse Genome オリゴ DNA マイクロアレイキットには 41,174 プローブ (~20,000 遺伝子) が搭載されていることから、両試験試料の気管内投与で発現が増加、あるいは減少した遺伝子数は少なかった。FNW 群で発現が増加した遺伝子では、CD8 と perforin1 があり、肺組織中の T 細胞が Th1 優位となっている可能性が示唆された。また、がん組織で発現する Wt1 と NK 細胞の細胞傷害性を阻害する Klrb1b の発現が増加していたことから、前癌状態にある可能性が示唆されたが、種々の癌遺伝子の発現量には変化を認めなかった。MMP-3 の 8.1 倍の発現は肺組織傷害の可能性を示していた。加えて、Klra17 の発現抑制と Klrb1b の発現増加は NK 活性の低下を示唆していた。一方、C60 投与肺では IL-4 受容体の発現が約 12.6 倍低下していたが、B 細胞の活性化に関わる遺伝子発現が上昇しており、肺組織での B 細胞の活性化が示唆された。

② C60 と FNW 気管内投与 1.6 年時の Milliplex Map kit による血清蛋白の分析 (表 8)

インターロイキン関連蛋白の変動では、対照群と比較して C60 群と FMW 群共に GM-CSF, IL-17, MIP-1β, RANTES, TNFα の上昇を認め、FNW 群では濃度依存性の増加傾向が認められた。変動したマーカーはマクロファージ、リンパ球などの活性化と関連性が高いことから、慢性炎症が招来されている可能性が示唆された。加えて、線維化の過程で TGF-β と協調的に働くとされる IL-17 の血清中での上昇は、肺での線維化の可能性を示唆する興味ある所見であるが、その増加傾向は C60 よりむしろ FNW 群で明確であった。これらマーカーが上昇した個体では、と殺時に測定した脾リンパ球表面マーカー、特に活性化 B 細胞のマーカーの比率が高い傾向を示した。

表 8. C60 と FNW 気管内投与マウスの血清中の各種蛋白レベルの分析結果

?		GM-CSF	IFNg	IL-6	LIF	LIX	IL-17	MIP-1b	RANTES	TNFa
Cont n=4	mean	55.9	254.8	6.8	1.7	477.7	10.5	148.9	61.9	6.8
	SD	32.6	349.4	1.9	2.5	519.2	4.9	108.9	63.6	3.7
Wiskar 1m n=4	mean	206.9	114.7	13.9	0.5	401.7	29.4	205.0	215.4	51.3
	SD	167.7	96.6	7.2	0.4	529.3	25.6	80.7	147.1	27.2
Wiskar 10 n=4	mean	210.7	41.3	8.0	4.5	350.1	34.8	249.3	114.9	22.0
	SD	96.5	41.6	2.2	4.4	383.3	18.2	138.0	180.6	5.4
Wiskar 10 n=4	mean	153.9	0.0	7.2	0.2	865.0	13.4	152.0	254.5	20.9
	SD	117.5	0.0	0.8	0.1	333.8	1.3	2.8	94.0	15.6
C60 1mg n=4	mean	75.6	175.0	7.8	0.5	929.0	6.7	134.9	120.8	29.0
	SD	33.9	130.2	2.2	0.5	226.4	2.7	40.2	125.4	13.2
C60 100μg n=3	mean	273.0	165.0	12.0	1.0	324.0	41.3	347.0	197.3	17.9
	SD	35.4	233.3	1.5	0.0	210.7	37.2	134.4	180.6	0.5
C60 10μg n=4	mean	291.7	5.7	4.7	0.0	51.4	12.2	380.3	20.4	5.6
	SD	459.2	9.9	3.4	0.1	33.2	12.6	548.6	22.4	5.9

③ 希少金属の気管内投与 1.6 年時の Milliplex Map kit による血清蛋白の分析

32 種のインターロイキンの内、対照群と比較して Ti ではいずれの項目も明確な変動は示さず、ナノとミクロの粒径間で比較しても明確な差は認めなかった。Dy では、IL-1β、TNFα、MCP-1 が増加したが、前 2 項目はミクロ粒子に比べナノ粒子で大であった。M ではナノ粒子に比較してミクロ粒子で変動する項目が観察され、特に IL-6, LIF, MIP-1β が増加した。

(3) in vitro と in vivo 実験からの総括

① in vitro 実験：物理的・化学的特性によって細胞毒性や細胞増殖能に相違がみられた。同一組成で同一濃度であっても、試験細胞が cell line と primary cell では、結果が異なった。発癌の指標として測定した Ames 試験、形質転換試験では、その結果にカーボンフラーレンの形状差は反映されなかったが、金属粒子では粒径と化学的特性が影響した。② in vitro 実験：試料の試験濃度を 0.1-100 μg/ml の範囲で、濃度-反応曲線の線形について検討したが、cell line 細胞を用いた試験では明確な線形を描けなかった。カーボンフラーレンや希少金属粒子ではナノ粒子、ミクロ粒子の粒径差にかかわらず 100 μg/ml 前後で細胞反応を引き起こす試験試料が多かった。線形分析については、さらに詳細な検討が必要である。③ in vivo 実験：正常動物への気管内単回投与により、0.1-1mg/匹の濃度範囲で、発癌性と肺線維化を 1-1.6 年間の経過観察で評価できる可能性が示唆された。この結果は、評価時間短縮や宿主感受性などを考慮した遺伝子改変動物を使用することなく、短期間でリスク評価が可能であることを示唆していた。ナノマテリアルのヒト暴露経路から、最も適切な試験試料の投与部位としては鼻部暴露が妥当と考えられるが、正確な投与量の把握が必要なリスク評価では適切な気管内注入方法が確立されれば気道内投与のほうが手技が容易で、煩雑な暴露よりも妥当と考えられた。投与回数は、単回投与でも 1-1.6 年の経過観察で十分に評価できたことから、低濃度反復投与であってもリスク評価は可能と考えられた。④ in vitro 実験と in vivo 実験の結果に乖離が見られたことは注意すべき点である。ヒトのリスク設定のために、in vivo 実験成績を外挿する際には注意が必要である。本研究から、線維化の指標として IL-17 の有用性が示唆されたが、この点についてはさらに検討する必要がある。今後病理所見などと比較してその有用性を検討する予定である。⑤ ナノマテリアルの形状や物理的・化学的特性から安全性を完全に推定することは、現時点ではかなり困難である。

培養細胞を用いて in vitro 実験で細胞毒性や細胞増殖能を評価する際には、cell line よりも primary cell で、動物由来よりもヒト由来細胞での評価が望まれる。しかしながら、正常細胞は cell line 細胞と比較して細胞増殖能が低く、長期培養には適さない。現時点でのナノマテリアルの安全性評価は、肺での挙動がある程度明確な正常動物で、1-1.6 年程度の経過観察によって多面的に評価することが妥当であるように見える。少なくとも、正常動物を用いた研究では、遺伝子改変動物よりも、得られた結果の解釈が容易である。従って、in vitro, in vivo 実験を両方で得られた結果をヒトに外挿する場合には、これらの点を十分に考慮して安全域などの設定を行う必要性が示唆された。

#### 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 Hasegawa G, Shimonaka M, Ishihara Y. Differential genotoxicity of chemical properties and particle size of rare metal and metal oxide nanoparticles. J Applied Toxicol, 2012, 32, 72-80 (査読有)
- ② Hasegawa G, Hirano M, Ishihara Y. Differential gene expression associated with inflammation and blood pressure regulation induced by concentrated ambient particle exposure. Inhalation Toxicology, 2011, 23, 897-905 (査読有)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 石原陽子、長谷川豪、中尾元幸、山口みどり、健康影響と大気中微小粒子状物質、自動車技術会シンポジウム、2月21日、2012年、東京
- ② Hasegawa G, Shimonaka M, Ishihara Y, Mutagenicity of rare metal and metal oxide nanoparticles: Components and Particles sizes, Anniversary Annual Meeting & ToxExpo, March 6-10, 2011, Washington D.C., USA
- ③ Koyama S, Hasegawa G, Ishihara Y, Safty evaluation of fullerene nanowhisker as a new nanoprodukt-in Vitro experiment, 49th Annual Meeting & ToxExpo, March 7-11, 2010, Salt Lake City, UT, USA

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/pubh/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

石原 陽子 (ISHIHARA YOKO)  
久留米大学・医学部・教授  
研究者番号：50203021

##### (2) 研究分担者

長谷川 豪 (HASEGAWA GO)  
久留米大学・医学部・助教  
研究者番号：80383751  
小山哲史 (KOYAMA SATOSI)  
久留米大学・医学部・助教  
研究者番号：10549637  
中尾元之 (NAKAO MOTUYUKI)  
久留米大学・医学部・助教  
研究者番号：60610566

##### (3) 連携研究者

西川俊郎 (NISHIKAWA TOSHIO)  
東京女子医科大学・医学部・教授  
研究者番号：50120019