

## 論文の内容の要旨

|   |  |
|---|--|
| 論文提出者氏名   | 高 梨 誠 司                                |
| 論文審査担当者   | 主 査 谷 口 俊 一 郎<br>副 査 小 泉 知 展 ・ 菅 野 祐 幸 |
| 論文題目<br>Carcinogenicity evaluation for the application of carbon nanotubes as biomaterials in rasH2 mice<br>(カーボンナノチューブを生体材料に応用するための rasH2 マウスを用いた発がん性評価)   |  |
| <p>&lt;はじめに&gt;</p> <p>Carbon nanotubes (CNTs)は、直径がナノスケール、長さがマイクロスケールの繊維状粒子であり、その特徴的な物理的・化学的性質から、様々な分野で研究開発が進められている。医療の分野でも、CNTs を生体材料に応用する研究が、近年活発に行われるようになり、抗癌剤の drug delivery system や癌細胞のイメージングに利用したり、電磁波の吸収体として癌の温熱療法に用いるなど、癌治療に応用する研究が急速に進められている。また、CNTs は骨再生や神経再生の足場材料 scaffold materials として優れていることが報告されており、その他、強化材として既存の implant と複合することにより、機械的強度や耐久性を高める研究なども進んでいる。</p> <p>このように様々な分野で応用が期待される CNTs は、その生体安全性についても世界的に研究が進められているが、多くが吸入に関するものである。しかし、CNTs を生体材料として用いる場合の安全性は、吸入に対する安全性とは全く異なる評価が必要である。CNTs の生体材料としての安全性試験を行わなければならない。特に、埋植した際の発癌性評価は最も重要な課題の一つである。われわれが調べた範囲では、これまでに CNTs を、遺伝子導入により発癌性を高めた実験動物の体内に埋め込んで評価した報告はない。</p> <p>今回我々は遺伝子導入発癌性モデルである rasH2 マウスを用いて CNTs の発癌性試験を世界で初めて行った。その際、安全性の基準物質として、黒色の刺青に使用されているカーボンブラックを用いた。</p> <p>&lt;対象と方法&gt;</p> <p>使用した CNTs は、Multi-walled CNTs (MWCNTs) で、平均直径 100 nm、平均長さ 10 <math>\mu</math>m、炭素含有率が 99.9 %以上であった。MWCNTs を溶液に分散させるための界面活性剤として、Tween 80 を使用した。黒色の刺青を乾燥して析出した固体成分を、評価のための基準物質とした。走査型電子顕微鏡で形状を観察したところ、直径約 30~50 nm のほぼ均一なカーボンブラック粒子であった。エネルギー分散型 X 線分光法を用いて元素組成分析を行ったところ、C が 99.57 wt%、Na が 0.43 wt% で、その他の元素は検出されなかった。Tween80 を 0.1 vol% の濃度で混合した生理食塩水に、MWCNTs を 3 mg/ml の濃度で加え、超音波分散器を用いて 30 分間 sonication を行い、CNT 浮遊液を作成した。同様の方法により、カーボンブラックの 3 mg/ml の浮遊液を作成した。Tween80 を 0.1 vol% の濃度で混合しただけの生理食塩水を溶媒液とした。組織毒性を有することが既知である MNU を 3 mg/ml で Tween80 入り生理食塩水に混合し、陽性対照液とした。</p> <p>ヒト由来のプロト型癌遺伝子である c-Ha-ras を導入した rasH2 マウスを用いて、CNTs の皮下埋め込み試験を行った。rasH2 マウスは生後 34 週齢まで腫瘍の自然発生は僅少であることから、生後 6 週齢に被験物質を投与し、26 週間で腫瘍の発生を評価することで、発癌リスクを予測した。背部皮下に各被験物質を 550 <math>\mu</math>l/匹(約 75 mg/kg)注入した。各群 10 匹で、合計 40 匹の rasH2 マウスを使用した。</p> |  |

26週後に安楽死させて解剖を行った。26週以内に死亡もしくは極度の衰弱を認めた場合にはその時点で安楽死させ、解剖を行った。解剖の際には、まず肉眼での腫瘍形成の有無を確認し、各臓器に分けて固定、包埋、薄切した。その後 hematoxylin and eosin 染色を行い、プレパラートを作成して、光学顕微鏡で観察した。

#### <結果>

CNT 群は、術後 26 週の時点で全て生存していた。カーボンブラック群では、経過中 1 匹が死亡し、26 週で 9 匹が生存していた。溶媒群は、26 週全てのマウスが生存していた。MNU 群では、経過中に 4 匹が死亡した。

組織学的検査では、CNT 群では 1 匹の脾臓に inflammatory psudotumor が発生した。カーボンブラック群で死亡した 1 匹には新生物が認められず、死因は明らかではなかった。生存した 9 匹中 1 匹で、脾臓に血管腫を認めた。また、別の 1 匹は肺に腺腫が生じた。溶媒群では、いずれの臓器にも新生物形成を認めなかった。MNU 群では、死亡した 4 匹と生存した 6 匹全てに多くの新生物を認めた。

#### <考察と結論>

これまで CNTs の生体材料としての安全性試験がいくつか報告されているが、その評価は難しく、同じ試験でも異なる結果が報告されている。その最大の理由は、生体安全性が確認されているナノ粒子の基準物質がなかったことである。我々は CNTs と同じ炭素からなり、長年にわたりヒトに埋め込まれ、歴史的にその安全性が認められている黒色の刺青がナノサイズのカーボンブラックの粒子であることに着目し、2011 年にこれが CNTs の安全性評価のための最適な基準物質になることを報告した。本研究では、このカーボンブラックを基準物質として、CNTs の発癌性動物への皮下埋め込み試験を世界で初めて行った。その結果、CNTs は発癌性が認められず、カーボンブラックより低い発癌性であった。

今後も本研究で用いたカーボンブラックのような生体安全性が実証されている基準物質と比較した、数多くの発癌性試験の蓄積が必要である。これにより、CNTs を生体材料に応用する研究が大きく進展すれば、癌治療、再生医療、drug delivery system など医学の様々な重要分野が発展することが期待できる。