

平成16年度

厚生労働科学研究費補助金研究報告書

厚生労働科学特別研究事業

ナノマテリアルの安全性確認に必要な生体影響試験に関する

緊急調査

主任研究者 菅野 純

厚生労働科学研究費補助金

厚生労働科学特別研究事業

ナノマテリアルの安全性確認に必要な生体影響試験に関する緊急調査

平成16年度 総括研究報告書

主任研究者 菅野 純

目 次

I. 総括研究報告書	1
ナノマテリアルの安全性確認に必要な生体影響試験に関する緊急調査	2
菅野 純	
II. 分担研究報告書	16
1. 本研究の毒性面からと化学物質総合評価の面からの検討	17
菅野 純、広瀬 明彦	
2. 本研究の病理学的検討	23
広瀬 雅雄	
3. 本研究の遺伝毒性の面からの検討	28
林 真	
4. 本研究の生殖発生毒性関連の検討	33
江馬 眞	
5. 本研究の生体反応分子の側からの蓋然的生体影響の検討	39
井上 達	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	43
IV. 研究成果の刊行物・別冊	46

平成16年度厚生労働科学研究費補助金
(厚生労働科学特別研究事業)

I. 総括研究報告書

平成 16 年度厚生労働科学研究費補助金(厚生労働科学特別研究事業)

総括研究報告書

ナノマテリアルの安全性確認に必要な生体影響試験に関する緊急調査

主任研究者 菅野 純

国立医薬品食品衛生研究所

安全性生物試験研究センター 毒性部長

研究要旨

ナノテクノロジーの中心的な役割を担うナノサイズマテリアルの、生体影響の大枠を明らかにし、ナノテクノロジーの利用が安心して進められるように対応することが求められている。本特別研究の目的は、そのための必要な緊急調査と、あるいは将来に課される必要な詳細検討の要件を明らかにすることにある。調査方法としては、毒性、病理、遺伝毒性、生殖発生毒性、体内動態、生体反応分子からの蓋然的生体影響、および化学物質総合評価の観点からの検討を行った。その結果、フラーレンなどについては、光照射により活性酸素発生などの遺伝毒性に結びつく有害影響を引き起こすことが知られているが、比較的短期間の実験では、それほど有害性を示さないようである。しかし、細胞内への透過性や、長期にわたる組織内での安定性などに関する情報は無く、必ずしも発がん性を否定できない。溶媒や光照射などの実験条件による遺伝毒性や生物活性の違いは、重要な因子になると思われる。また、生殖発生毒性に関する知見はほとんど報告されていないが、肺、腸管および皮膚などのからのナノ粒子の体内への取り込み、免疫システムや体循環、中枢神経系への再分布という知見からは、生殖器官や胎児への再分布も否定はできないと考えられた。病理学的には、気管内投与での肺の炎症反応や皮膚塗布による免疫反応などの知見が得られているものの、実際の暴露量を考慮に入れた評価の必要性や、粒子のサイズ・表面積に基づいた生体内への浸透後の組織細胞との反応についてのメカニズム研究や長期の実験の必要性が検証された。生体反応分子から見たナノ物質の蓋然的生体影響の観点からは、生物学的な応用の展望と、生体の利得の側から見たときに好ましくない影響の発現する可能性が、表裏一体の関係にあり、従って、ナノマテリアル問題は、その表裏の関係に原点を置いて検討されることが必要である。以上、現在までに報告されている断片的な毒性情報の状況からは、まずナノマテリアルの体内動態を様々な暴露経路や状況に応じて把握することが必要であると考えられた。また、実際の暴露量の想定についても、暴露評価の観点からナノマテリアルごとに検討しておく必要がある。さらに、環境中および生体試料中の分析法の開発が必要であると同時に、吸入経路や経皮経路により報告されている組織への影響を考慮すると、神経系細胞への影響や、変異原性および免疫・炎症反応に引き続く発がん性等について、適切な実験条件のもとに検討を行う必要性が高いと考えられた。

分担研究者:

井上 達 国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター長

広瀬雅雄 国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター 病理部長

林 真 国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター 変異遺伝部長

江馬 眞 国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター
総合評価研究室長

広瀬明彦 国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター
総合評価研究室主任研究官

A. 研究目的

近年、ナノサイズの物質・材料の工業的製造と多方面にわたる利用は、いわゆるナノテクノロジーと呼ばれ、電磁光学、構造材料として新しい応用の展望が期待され、薬物輸送を含む医療への展開も期待されている。この様に特定の機能を意図して合成された純粋な単体としてのナノ物質が生体に及ぼす影響については多くの点で未知である。ナノテクノロジーに対する期待が大きいだけに、生体影響の大枠を明らかにし、ナノテクノロジーの利用が安心して進められるように対応することが求められている。本特別研究の目的は、そのための必要な緊急調査と、あるいは将来に課される必要な詳細検討の要件を明らかにすることにある。

B. 研究方法

調査は、毒性、病理、遺伝毒性、生殖発生毒性、体内動態、生体反応分子からの蓋然的生体影響、および化学物質総合評価の観点について分担し、以下に示すような項目を考慮して検討

を試みた。

- ・ ナノマテリアルの開発・製造等の状況及び生体影響の研究動向を把握
- ・ 環境中あるいは生体中のナノマテリアル測定法の開発に関する調査(例えば同位体の利用等)
- ・ in vitro 等の試験系開発に関する調査。
- ・ サイズや物質特性や用途によるリスクの度合いなどの違いに基づいたカテゴライズの必要性に関する検討。
- ・ 評価に必要な試験系の選択・開発(例えば in vivo 系試験の必要性検討等)

C. 研究結果

ナノマテリアルの特性

ナノマテリアルの健康影響評価を行うためには、まずナノマテリアルの定義が規定されていなければならない。様々な技術的基盤に対してナノテクノロジーが応用されつつある現在において、ナノマテリアルも様々な物質でしかも様々な形と大きさで利用されようとしている。現在も開発段階であるテクノロジーであるので、ナノマテリアルの定義も時代と共に変わる可能性があるが、現在国際的あるいは国内的に基準の規格化が進められているところである()。健康影響評価上は必ずしも正確に定義する必要はないかもしれないが、大まかな基準としては、100nm 以下の大きさを持つ物質をナノマテリアルといい、一般環境的な暴露で問題となるナノ粒子(チューブも含む)としては大きさを示す3次元のうち少なくとも2次元は100nm 以下の大きさの物質についてナノ粒子としているようである(Luther ed. 2004)。

ナノマテリアルの触媒活性、光吸収、蛍光性、

融点、磁性、電気的および熱量的伝導性などの物理化学的特徴は、対応する通常のバルク化合物とは典型的に有意に異なった特徴を示す。この特徴から、生物学的に同じ組成の化学物質の通常の影響とは異なる作用が引き起こされると考えられている。

ナノマテリアルの種類

今後も様々な種類の物が開発されていくと思われるので、必ずしも以下の分類が固定したものではないが、いくつかの種類に分類できる(Luther ed. 2004)。

- ・ 酸化金属・金属: 二酸化珪素(SiO_2)、二酸化チタン(TiO_2)、アルミナ(Al_2O_3)、酸化鉄(Fe_3O_4 , Fe_2O_3)、酸化亜鉛(ZnO)、酸化インジウムスズ(ITO)、酸化アンチモンスズ(ATO)など
- ・ 炭素系: フラーレン(C_{60} , C_{70} etc)、カーボンナノチューブ(CNT)
- ・ ナノ粘土: 特殊な層構造を持たせたケイ酸塩
- ・ 有機ナノ粒子: マイクロ化された薬品・化合物(医薬品、ビタミン、色素など)ポリマー、高分子、ミセル、リポソームなど

その他、ナノ粒子やナノチューブは特殊な役割のために構成成分としてポリマーやセラミック、金属マトリックス製品中に再配合されることもある。

ナノマテリアルの分析・検出

ナノマテリアルに特化した分析法はないが、FTIR やラマン散乱測定はナノマテリアルの振動構造の解析に、NMR は水素結合やナノレイヤーの表面構造解析に、X 線、中性子線は、原子構造推定のための電子構造解析に使用できる。ま

た、大きさや形、表面解析のためには、電顕、レーザーや光散乱による粒子測定法などが適用できる。

しかし、ナノ粒子の環境あるいは職業暴露における空気中の存在濃度の測定に容易に適用できる方法はない。CPC(Condensation Particle Counter)、SMPS(Scanning Mobility Particle Sizer)、ELPI(Electric Low Pressure Impactor)などの方法が可能であるが、測定装置は恒常的な測定を行うは大きすぎる欠点がある。

生体試料中の分析はリスク評価において重要なポイントになるが、上記の技術は、気中あるいは固体として物質そのものを測定する技術で、サンプリングに複雑な過程が必要で、しかも水分中での測定が必要な場合もあり、そのまま適用することは困難である。最近の生体試料中のナノマテリアルの検出技術としては、Cryo-TEM や STIM などの電顕を用いたものが報告されている(Pfluckerら 2001;Menzelら 2004)。

活性酸素生成

純粋なフラーレン(C_{60})はマウスとラットの皮膚塗布に対して実質的に炎症性の効果などの免疫応答を引き出さないことが示されている(Nelson,ら 1993)。しかし、フラーレンは、空気から分子酸素を容易に吸着させることができ、光照射により得た余分な励起エネルギーを近くの酸素分子渡し、反応性の高い一重項酸素を生成することが知られている(Science 254(20 Dec.1991);Seraら 1996)。マクロファージの初期の実験では、フラーレンによる活性酸素生成に対する影響はほとんど認められず、光による細胞毒性の増強は認められていないがスズの生成が認められた(Baierlら 1996)。別の実験では、

光照射によりフラーレンが一重項酸素を効率的に生成することが報告されている (Tabata ら 1997)。カーボンナノチューブの光励起は、芳香族アミン溶媒の存在下で認められることが示されている (Sun ら 2001)。一方で、励起状態でないフラーレンは単一酸素分子は生成せず、むしろゆっくりと失活させるほか、その他多くの高反応性化合物を吸収することができる (Science 254(20 Dec.1991))。

細胞内への透過性

フラーレンは容易に電子を取り込み陰性荷電化しやすく、受動的な細胞脂質二重膜の透過に関しては反発しやすいことが想定できる。しかし、フラーレンは同時に高い疎水性を有しており、in vitro 系では、ヒト表皮細胞や線維芽細胞などに細胞毒性や増殖作用を示さないものの、6 時間以内に急速に取り込まれることが報告されている (Scrivens ら 1994)。

遺伝毒性

多くの芳香属環を持つ化合物は DNA にインターカレートされる適当なサイズと形があれば発がん性を示すが、フラーレンは DNA にインターカレートするには大きすぎて球状でありすぎると考えられている (Science 254(20 Dec.1991))。このことは、フラーレンが代謝されない限りにおいては問題にはならないであろうことを示している。また、亜急性までのマウスの皮膚へのフラーレンの塗布において毒性が認められていないこと (Nelson ら 1993) は、このことをサポートしているかもしれない。しかし、現状では評価のためのデータはほとんどなく、遺伝毒性および発がん性に関する研究が待たれる。

Zakharenko ら (1994; 1997) による大腸菌およ

びシヨウジョウバエの体翼細胞を用いる somatic mosaic 法により遺伝毒性を調べた結果、 $0.45 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ のフラーレン濃度では陰性であったが、シヨウジョウバエの体翼細胞での最高濃度である $2.24 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ でわずかな遺伝毒性が認められた。

In vitro における遺伝毒性はこれまで観察されなかったが、非常に高いフラーレン濃度で、弱い遺伝毒性が観察されたとの報告が出された。遺伝子突然変異誘発性に関しては、Miyata らの実験で、可視光線照射時と代謝活性化系存在時でいくつかのサルモネラ菌種で変異原性が示された。これらの研究では、発生した一重項酸素から間接的にラット肝臓ミクロソームにより生成した過酸化脂質が酸化的 DNA を引き起こしたことを示唆した。しかし、溶媒に肝がんを引き起こすポリビニルピロリドンが使われていたことが解釈を困難なものにしている。実際、フラーレンのみを対象とした生物学的実験の多くは、その非水溶性のため生物学的に有害な溶媒を使わざるを得なかった事実もある。

代謝酵素への影響

げっ歯類とヒトの肝臓におけるグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST)、グルタチオンペルオキシダーゼ (GSH-Px) とグルタチオン還元酵素 (GR) 酵素に対するフラーレンの影響を調査した研究において、フラーレンはラット肝臓では trans-4-phenyl-3-buten-2-one へ、マウス肝臓ではエタクリン酸への GST 活性を阻害したが、その他の基質への活性に影響は認められていない。また、ヒト肝臓ではエタクリン酸へ代謝する GST 活性が抑制された他、GSH-Px と GR の中程度の抑制が観察された (Iwata ら 1998)。

肺組織からの吸収

吸入した粒子の肺組織以外での存在は、最近認識された。多くの研究は心脈管系の機能不全を誘発する可能性について焦点を当てている。最近のデータは、自律神経システムが吸入した粒子の有害性のターゲットであるという考えを示唆している。しかし、その生物学的な理由ははっきりしていない。2つの対立的仮説が提唱されている。一つは、肺組織の強い炎症反応により放出されたメディエーターが心臓や血液凝固や他の脈管系への影響を引き起こすというもので、2つめは、肺組織からのナノ粒子の循環系への移動が、直接的あるいは間接的にうっ血や、脈管系へ影響を与えるというものである。

ナノ粒子の体循環系への移動は重大な問題である。超微粒子の肺組織からの血液循環系の移動に関する報告は、限られているが、依然、相互に矛盾したものになっている。Conhaimら(1988)は、肺上皮バリアーは3つの細孔サイズモデルにフィットすることを明らかにした。2%の400nm細孔半径のものとは30%の40nm細孔半径のもの、および68%の1.3nm細孔半径のものからなっている。この通路の正確な解剖学構造の位置は確かめられていない(Hermansら1999)。最近まで、この薬物粒子の通路の可能性は注目されていなかったが、現在では、この概念は吸入による高分子薬物の投与に関して、薬理学的に受け入れられつつある。吸入した^{99m}Tc-カーボン超微粒子の一部は、5分以内と急速に、体循環系に拡散することが示された。著者らは、このことから、粒子の血液への移動は、マクロファージなどの貪食作用だけで説明できないこと結論づけた(Nemmarら2002)。

他方、最近の研究では、テクネチウム(Tc)^{99m}ラベル体エアロゾルのヒトボランティア2時間の沈着と消失を解析した結果、肝臓で有意な放射活性は検出されず、血液からは放射活性そのものも検出されなかった(Brownら2002)。

しかし、Kawakamiら(1990)はNemmerらの報告を支持している。即ち、吸入後すぐに^{99m}Tcの血液中での放射活性を検出している。ヒトでの知見以外に実験動物でも吸入または気管内投与によって、超微粒子の肺組織以外への移動に関する報告がされているが(Kreylingら2002; Lippmann, 1990; Nermmarら2001; Oberdorsterら2002; Takenakaら2001)、微粒子が血液や肺組織以外へ移動する量は、報告によって異なっている。また、1.1 μ mのポリスチレン粒子の鼻腔投与は肺組織以外の体組織への移動が確認されている(Eylesら2001)他、Katoら(2003)は吸入したポリスチレン粒子がおそらく経細胞輸送によって肺胞の毛細管域に移動している形態学的データを最初に報告した。

Oberdorsterら(2001)によって行われた¹³Cラベル・ナノサイズ(25nm)物質を使ったラットの吸入実験では、暴露24時間後に、いくつかの臓器で検出されている。驚くべきことにこの粒子は中枢神経系でも認められた。この現象をより詳細に検討するために、神経細胞に取り込まれた粒子は、細胞内を2.5nm/hourで移動していくことを明らかにした(Oberdorsterら、2002)。

腸管からの吸収

腸管内の粒子は、1926年Kumagaiらによって、貪食細胞であるM細胞を含んだリンパ組織であるパイエル板(PP)への凝集過程を経て、腸管腔から体内に吸収されることが知られている。初期

は、この取り込み過程において粒子のサイズは区別されないと仮定されていたが、現在までに粒子サイズや表面荷電、リガンドの有無、表面コーティングなどにより腸管の部位特異的なターゲティングがなされている可能性が示されている。

Szentkuti (1997)らによれば、陽性に荷電したナノサイズのラテックスは陰性に荷電した粘液にトラップされるが、逆にカルボン酸化されたラテックスは粘液層を拡散することができることが示された。小さい粒子程粘液層を通過して結腸の腸細胞に到達し、直径 14nm で 2 分以内、415nm で 30 分かかり、1000nm では、粘液層を通過することはできなかった。

粘膜下組織へ入った粒子は、リンパや毛細血管に入り、免疫反応を引き起こしたり、別の組織へ輸送されることになる。50nm～3 μ m のポリスチレン粒子を 1.25mg/kg/day で 10 日間ラットに経口投与し、体内分布を調べた実験では、50 と 100nm の粒子は各々 34%、26% 吸収された。300nm 以上の粒子は血中からは検出されず、また、どの粒子も心臓や肺には検出されなかった (Jani ら 1989)。

皮膚からの吸収

5-20nm の二酸化チタンが皮膚を透過し、皮内の免疫系と反応する可能性 (Kreilgaard, 2002) や、0.5 μ m-あるいは 1.0 μ m-のベリリウム粒子が、人の皮膚の角質層に透過し、表皮や真皮にまで到達していること (Tinkle ら 2003) が示されている。また、0.4～0.5 μ m の土壌粒子が真皮に検出された地域性象皮症の知見から、正常なヒトでは、これらの粒子は体内の免疫システムによって取り込まれていることが示唆されている (Blundell ら 1989; Corachan, 1988)。

脳血液関門の通過

組織や細胞特異的ナノマテリアル医薬品のドラッグデリバリー開発においては、受動拡散やキャリアー依存的細胞食作用による脳血液関門の通過が検討されている。たとえば、apoE タンパクをアンカリングしたポリソルベートでコーティングした粒子は、LDL レセプターにより血管内皮細胞に取り込まれ、その後内皮細胞から脳の内部の細胞へ拡散か細胞輸送される可能性がある。あるいは細胞密着帯の修飾や P 糖タンパク質阻害などの経路も考えられる (Kreuter, 2001)。また、ナノ粒子の吸入による嗅覚神経から中枢神経への移動も報告されている (Oberdörster ら 2002)。

生殖発生関連への影響

発生毒性を対象とした研究は現在までのところほとんど無い。生殖器官への影響についても、ラットのフラーレン (C60) の気管内投与により、輸精管と子宮へのアゴニスト誘導反応に対する薬理学的研究を行った結果、4 μ M (\sim 3 μ g/cm³) の用量で影響が認められていないという報告 (Satoh ら 1995) のみであった。

吸入微粒子の肺への影響

球状粒子の場合、直径 2.5 μ m より小さいものは、吸入過程において肺胞まで到達するとされ、空気力学的な直径 100nm 以下の (ナノマテリアルなどの) 超微粒子は、主に肺胞域に沈着すると考えられている。長さ直径の比が少なくとも 3:1 以上の繊維状粒子の場合も、肺への吸入過程は空気力学的な直径で説明でき、小さい直径であっても 20 μ m 以上の長い繊維状粒子の場合は、上位の気道上に吸着される (Lippmann, 1990)。気道の上位に吸着された物質は、主に粘膜絨毛運動により排出されるが、肺胞などの肺の深部に

吸着された物質は、主にマクロファージの貪食作用によって肺からの排出が行われる。この貪食作用は、マクロファージを活性化し、様々なサイトカインや活性酸素などの酸性を誘導し、持続的な炎症反応や、線維化などの組織的障害を引き起こすと考えられている。また、貪食能は、粒子の物理化学的性状に影響を受け、肺胞マクロファージより長い繊維状粒子の排出はかなり遅い。

近年、カーボンナノチューブをラット及びマウスに気管内投与し、肺への影響を検討した実験において、肉芽腫形成と間質性炎症を引き起こすことを明らかにした (Warhaeit ら, 2003; Lam ら, 2003)。Warhaeit らのラットの実験での多発性肉芽腫は、マクロファージ様の多核巨細胞からなり、周りをナノチューブの固まりで覆われおり、また非用量依存的で生体の単なる異物反応と捉えることができ、生理学的関連性を持たないかもしれないと考えられた。また、Lam らのマウスの実験からは、気管内暴露により、慢性暴露で傷害性のあるクーオート粒子より炎症反応の強いことが示された。

また、20nm 以下 (ultrafine) および 200nm 以下 (fine) の二酸化チタン粒子を3ヶ月間吸入暴露した研究では、ultrafine の肺からの除去率の方が遅く、fine に比べて間質組織やリンパ節へより移行する傾向が認められた。同じようなサイズ分布のカーボンブラックでのけん化との比較からは、生物学的影響は粒子の大きさよりも比表面積に相関することが示唆された (Oberdorster ら, 1994)。同様の知見は吸入粒子による催腫瘍効果によっても示唆されている (Driscoll ら 1997; Oberdorster & Yu, 1999)

組織からの除去速度が遅く、組織負荷量が高

く、そして組織内に残存している時間が長い程、有害性のリスクが高くなることはよく知られているが、Stanton ら (1977, 1972) によれば、サイズ調整された 17 のガラス繊維による実験で、ラットでの中皮腫の発生率は $8\mu\text{m}$ 以上あるいは、 $1.3\mu\text{m}$ 以下の長さの繊維の時に高くなっていたことが示された。しかし、 $5\mu\text{m}$ 以下の暴露でもラットに肺腫瘍を引き起こさないことも報告されており (Berman ら 1995)、最近のレビューでは、リスクは繊維の長さに応じて増加し、 $40\mu\text{m}$ 以上で最も高いリスクを示すとも考えられている (Schins, 2002)。

皮膚組織への影響

二酸化チタンは、紫外線の吸収により皮膚組織を保護する目的で、日焼け止め剤の中にしばしば使用される。Lademann ら (1999) の報告によれば、日焼け止め剤中の二酸化チタンが、角質層や毛嚢の中に浸透していることを報告した。しかし、この毛嚢への浸透部分は角質層に覆われている部分のみであるので、生きた皮膚組織細胞中への浸透であるとはされなかった。別の報告でも、二酸化チタンナノ粒子による皮膚への透過性はほとんど示されたいない (Pflucker ら 2001)。

しかし、最近レビューでは、5-20nm というような超微細二酸化チタンが皮膚を透過し、皮内の免疫系と相互作用する可能性が指摘された (Kreilgaard, 2002)。Tinkle ら (2003) はベリリウム粒子の職業暴露による感作性獲得の経路探索として、 $0.5\mu\text{m}$ 以上あるいは $1.0\mu\text{m}$ 以上の粒子が、人の皮膚の角質層に透過し、表皮や真皮にまで到達していることを証明した。著者らの仮説では、この経路により皮内でのランゲルハンス細胞の貪

食による免疫獲得が、感作性獲得の経路であると指摘している。また、下肢のリンパ排出系障害（地域性象皮症など）を持つヒトの真皮には、0.4～0.5 μm の土壌粒子が高頻度に検出されることが報告されている。粒子はマクロファージの Phagosomes や他の細胞の細胞質に認められており、リンパの排出障害によってケイ酸などの粒子が皮内に残留したと考えられた。このことは、正常のヒトでも皮内（あるいは損傷した皮膚）を透過した粒子は免疫システムによって排出されていることを示唆していると考えられた (Blundell ら 1989; Corachan, 1988)。

暴露評価

ナノマテリアルの暴露の機会としては、生産現場における職業暴露と最終製品からの消費暴露が考えられる。職業暴露においては、特にナノ粒子を製造する過程において、減圧、スプレー、濃縮、洗浄などの工程において考えられる。しかし、多くの工程は清浄な空間で行う必要があるため、通常閉鎖系で行われており暴露の機会は少ないと考えられる。しかし、事故の場合や生産装置のセッティング時や生産終了後の製品のハンドリング時や調整、パッケージング時には、暴露の可能性が高くなる。特に製造の最終過程に良く行われる、溶媒へのサスペンションによるナノ粒子の回収工程が最も高い暴露リスクがあると考えられる。

一方消費暴露については、ナノマテリアルの放出は、最終製品へ導入法に依存している。一般的な製品の多くは、医薬品や化粧品などをのぞいては、ナノマテリアル粒子の放出を目的とはしておらず、最終製品中に熱的、構造的に強固

に固定されているので製品からの暴露は少ないと考えられる。

しかし、今まで比較的微量の生産であったナノマテリアルも、技術の改良によりフラーレンやカーボンナノチューブなどで大量生産が行われるようになってきた。また、医薬品などの特殊な目的は別にして、日焼け止めをはじめとした日常的製品にナノマテリアルのリリースを目的とした商品については、今後注意しておく必要があると考えられる。

生体反応分子からの蓋然的生体影響

- 1) 物質のカテゴリ分類: 意図的ナノ物質、非意図的ナノ物質、化学品、化合物、混合物、などに分けて、実体的な暴露態様を文献的情報等を用いて整理することの重要性が明らかとなった。
- 2) マクロ浸襲経路: マクロ浸襲経路としての経口吸収、経皮吸収、腸管吸収、経気道吸収を始め、エラや粘膜を通じた吸収などについての蓋然性情報を収集することの重要性が明らかとなった。
- 3) 生体内分布: 生体内分泌について、脳血液関門などの臓器血液移行、経胎盤移行等の情報について、1. での範疇分類に応じて、情報収集を行なうことの重要性が明らかとなった。
- 4) 細胞内機能移行: 細胞生物学的な食食、食飲などを通じた細胞内浸襲後の細胞内小器官との相互作用について、情報を収集することの重要性が明らかとなった。
- 5) 細胞表面分子との相互作用: 細胞表面分子との相互作用、とくに抗原認識、抗体産生賦活、T細胞機能修飾蓋然性を検討することの重要性が明らかとなった。

毒性評価

ナノサイズの粒子は、肺や腸管を経由して人の体内に入ることができる。いくつかの検討された粒子は、真皮の深くまで浸透する証拠はあるものの、皮膚経由の進入は十分には検討されていない。体内への浸透は、粒子の大きさと表面の性質に依存すると共に、肺、腸管や皮膚などの接触部位の特性にも依存していると考えられる。

体内の分布は、粒子の表面特性に依存しており、粒子の大きさは粒子の自由な移動を制限している様にみえる。

ナノ粒子の標的組織や細胞を調査しておく必要が、特に有害性を持つ可能性のある物質に関しては、ある。In vitro 系での試験系を開発する前に、異なったタイプのナノ粒子に対する体内動態について検討することが必要であると考えられる。また、In vitro 系の試験系の開発には、個々のナノ粒子に適応した溶媒や細胞の種類を検討することが必要であると思われる。

すべてのケースに適合する試験系はなく、個々の粒子に適切な評価が必要である。

線維状ナノ粒子の吸入による健康影響評価は、肺から容易に排出されない線維物質が肺障害を引き起こすという一般概念に沿って、十分な注意を払って検証する必要があると考えられる。

ナノ粒子の尿中からの排泄に関してはほとんど報告がないが、ナノ粒子の体内からの排出半減期と腎機能、殊に糸球体通過性を含めた影響を知る上で重要な検討課題であると思われる。現在まで、体内動態解析は、中枢神経系への分布の他にほとんど検討されていない。今後、生殖器官や胎児への移行に関しても、注意を向ける必要がある。

D. 考察

フラーレンは光照射により、ナノチューブはさらに芳香族アミン系の溶媒の存在下で一重項酸素を発生し、さらなる細胞内の酸化的障害を引き起こす可能性はあるものの、未代謝の通常状態では基本的に反応性は低いことが示されている。発がん性に関しては、亜急性までの皮膚塗布に対しては有害性が認められていないことからもある程度、反応性の低さが支持されているものと考えられる。しかし、細胞内への透過性や、長期にわたる組織内での安定性などに関して情報は無く、必ずしも発がん性を否定することはできない。さらに、フラーレンなどを溶かす溶媒や光照射などの実験条件による遺伝毒性や生物活性の違いは、今後のナノマテリアルの有害性評価においてクリティカルな因子であると思われる。

生殖発生毒性に関する知見はほとんど無いが、フラーレンの気管内投与による輸精管と子宮の薬理学的影響の無かった知見のみが報告されている。しかし、肺、腸管および皮膚などの組織からのナノ粒子の体内への取り込み、その後の免疫システムや体循環への取り込みは知られている。吸入経路からは中枢神経系への取り込みも明らかになっている。これらの取り込み過程は、粒子のサイズや表面の物理化学的性質に大きく依存しており、一概に述べることはできないが、条件がそろえば、生殖器官への再分布や血液-胎盤関門通過の可能性も否定できないと考えられる。まずは、これらの器官や胎児等へのナノマテリアル粒子の分布の可能性についての知見の集積が求められる。

カーボンナノチューブをラット及びマウスに気管内投与し、肺への影響を検討し、肉芽腫や炎症反応惹起が認められた知見については、通常のナノカーボンを扱う作業ではあり得ないような量の粒子を気管内投与して得られた結果であることを慎重に考慮する必要がある。また、繊維状粒子の長さ依存する発がん性の違いについては、未だはっきりとした結論はでていないようで、さらに実際のナノマテリアルが取り込まれた場合は、その高い表面活性から違った傾向が得られるかもしれない。実際の暴露状況を反映し、しかも粒子形状や表面積などの因子を現実の製品等に整合化させた実験および、長期暴露による研究結果などの知見の集積が必要であると考えられる。

断片的な毒性情報の状況から判断される事は、まずナノマテリアルの体内動態を確実に、そして様々な投与経路や状況に対して把握することが必要であるということである。他方、暴露評価の観点からは、どのような暴露が想定されるかについて、ナノマテリアルごとに検討しておく必要があると考えられる。これらのことから、具体的には、まず環境中および生体試料中の分析法の開発が、最初に必要であると考えられた。また、吸入経路や経皮経路により現在までに知られている組織への影響を考慮すると、神経系細胞への影響や、変異原性および免疫・炎症反応に引き続く発がん性について、確認する意味も含めて適切な実験条件のもとに検討を行う必要性が高いと思われる。

E. 結論

体内動態解析や適切な暴露評価のために環

境中および生体試料中の分析法の開発が、最初に必要であると考えられた。さらに、吸入経路や経皮経路による標的組織への影響に関する知見からは、神経系細胞への影響や、変異原性および免疫・炎症反応に引き続く発がん性について、適切な実験条件のもとに検討を行う必要性が高いと考えられた。

F. 健康危惧情報

該当しない

G. 研究発表

1. 論文発表

Takahashi Y, Kitajima S, Inoue T, Kanno J, Saga Y. Differential contribution of Mesp1 and Mesp2 to the epithelialization and rostral-caudal patterning of somites. *Development*, 132, 787-796, 2005

菅野 純、相崎健一、五十嵐勝秀、小野 敦、中津則之、トキシコゲノミクス、ゲノム研究実験ハンドブック、p329-337 実験医学別冊 2004

菅野 純、相崎健一、五十嵐勝秀、小野 敦、中津則之 ゲノム毒性学 形質非依存型トキシコゲノミクスの導入、細胞工学 Vol.23 No.6 2004685-693、株式会社秀潤社

Yamada, K., T. Suzuki, A. Kohara, M. Hayashi, T. Mizutani, and K. Saeki (2004) In vivo mutagenicity of benzo[*f*]quinoline, benzo[*h*]quinoline, and 1,7-phenanthroline using the *lacZ* transgenic mice, *Mutat. Res.*, 559, 83-95.

Zang, Li, H. Sakamoto, M. Sakuraba, D-S Wu,

- L-S Zhang, T. Suzuki, M. Hayashi, M. Honma (2004) Genotoxicity of microcystin-LR in human lymphoblastoid TK6 cells, *Mutat. Res.*, 557, 1-6.
- Suzuki, H., T. Shirotori, and M. Hayashi (2004) A liver micronucleus assay using; young rats exposed to diethylnitrosamine: methodological establishment and evaluation, *Cytogenet. Genome. Res.*, 104, 299-303.
- 林真, 長尾美奈子, 祖父尼俊雄, 森田健, 能美健彦, 本間正充, 宇野芳文, 葛西宏, 佐々木有, 太田敏博, 田中憲穂, 中嶋圓, 布柴達夫 (2004)食品および食品添加物に関する遺伝毒性の検出・評価・解釈に関する臨時委員会の活動中間報告, *Eviron. Mutagen Res.*, 26, 275-283.
- Ema, M., Hara, H., Matsumoto, M., Hirose, A. and Kamata, E. (2005) Evaluation of developmental toxicity of 1-butanol given to rats in drinking water throughout pregnancy. *Food Chem Toxicol.* 43, 325-331
- Ema, M., Hrazono, A., Fujii, S. and Kawashima, K. (2004) Evaluation of developmental toxicity of β -thuyaplicin (hinokitiol) following oral administration during organogenesis in rats. *Food Chem. Toxicol.*, 42, 465-470.
- Hirose A, Hasegawa R, Nishikawa A, Takahashi M and Ema M (2004) Revision and establishment of Japanese drinking water quality guidelines for di(2-ethylhexyl) phthalate, toluene and vinyl chloride - differences from the latest WHO guideline drafts. *J Toxicol Sci.*, 29, 535-539.
- 広瀬明彦, 江馬 眞 (2004) 生殖発生毒性を指標としたダイオキシンの耐容 1 日摂取量 (TDI) 算定の考え方について、国立医薬品食品衛生研究所報告 122: 56-61
- Inoue T. Hormonally active agents and plausible relationships to adverse effects on human health. *Pure Appl. Chem.*, 75: 2555-2561, 2003.
- Inoue T, Igarashi K, Sekizawa J. Health hazards of endocrine-disrupting chemicals on humans as examined from the standpoint of their mechanism of action. *Japan Med Assoc J.*, 46: 97-102, 2003
2. 学会発表
- Jun Kanno, Screening/Testing Scheme for Endocrine Disrupting Chemicals, 19th Scientific Meeting of the Malaysian Society of Pharmacology and Physiology (MSPP), May17-18, 2004, Malaysia
- Jun Kanno, Endocrine Disrupting Chemicals Researches, Current Topics, 19th Scientific Meeting of the Malaysian Society of Pharmacology and Physiology (MSPP), May17-18, 2004, Malaysia
- J Kanno, K Aisaki, A Ono, N Nakatsu, Y Kodama, K Igarashi , Phenotype-Independent toxicogenomics

- using "Percellome" and "Mille-Feuille" data system, 第31回日本トキシコロジー学会学術年会(特別講演)、2004年7月6~8日、大阪
- J Kanno, K Aisaki, A Ono, K Igarashi, Toxicogenomics using "Percellome" and "Mille-Feuille" data system, 10th International Congress of Toxicology, 11-15 July, 2004; Tampere, Finland
- 菅野 純、藤井寿一、菅野 仁、相崎健一、
「解糖系障害で誘導される赤芽球アポトーシスと p53 の関連、p53 involvement in glycolysis disorder-induced apoptosis of erythroid cell」第63回日本癌学会学術総会、2004年9月29日~10月1日、福岡
- Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Katsuhide Igarashi, Noriyuki Nakatsu, Atsushi Ono, Yukio Kodama "Percellome" Analysis of Hormonally Active Compounds. Toxicogenomics International Forum 2004, 12-13 October, 2004
- Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Katsuhide Igarashi, Noriyuki Nakatsu, Atsushi Ono, Yukio Kodama, "Percellome" method application to the analysis of hormonally active compounds and its possible contribution to the ecotoxicogenomics. 環境ホルモン学会第7回研究発表会、2004年12月15日、名古屋
- Hayashi, M. : Newly development of in vivo micronucleus assay. ASIATOX III, Chiang Mai, 2004.
- Hayashi, M. : Strategy for safety assessment of food and related chemicals based on genotoxicity assay data. International Symposium on Risk Assessment Strategy in Genotoxicity of Food and Related Substances, Tokyo, 2004.
- Hayashi, M. : Regulatory perspective on data gaps in Japan, HESI Workshop on DNA Adducts: Biological Consequences and Application to Risk Assessment, Washington DC, 2004.
- 林 真:げっ歯類を用いる小核試験の基礎研究ならびにその行政面への応用, 第33回日本環境変異原学会, 長崎, 2004.
- Ema M, Fukunishi K, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E. "Developmental toxicity study of ultraviolet light absorber 2-(3,5-di-tert-butyl-2-hydroxyphenyl)-5-chloro-2H-benzotriazole in rats." *25th Annual Meeting of The American College of Toxicology*, Palmsprings CA U.S.A, November 7-10, 2004.
- Ema M" Decreased anogenital distance and increased incidence of undescended testes in fetuses of rats given monobenzyl phthalate, a major metabolite of butyl benzyl phthalate." *Congress of the 5th Royan International Research Award*. Iran, September, 2004
- Ema M, Hara H, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E. "Developmental toxicity of 1-butanol given to rats in drinking water throughout pregnancy." *The 44th Annual Meeting of the Society of Toxicology*, New

- Orleans, U.S.A., March 6-11, 2005.
- Hirose A, Takahashi M, Kamata E, Ema M, Hayashi Y. "Development of genotoxicity predicting QSAR system for registered and exiting industrial chemicals in Japan." 11th International Congress of Toxicology, July 11-15, 2004, Tampere, Finland.
- Hirose A, Takagi A, Nishimura T, Kanno J, Ema M. "Review of reproductive and developmental toxicity induced by organotins in aquatic organisms and experimental animals." 24th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs., September 6-10, 2004, Berlin, Germany.
- Inoue T: Views of the state-of-art in inter-ministries and international collaboration of Japanese endocrine disrupter research. Workshop Organized by the European Commission's Research Directorate-General (2005.1.26, Brussels, Belgium)
- Inoue T, Matsushita T, Igarashi K, Kanno J, Hirabayashi Y: Toxicogenomics: A new paradigm in prediction and interpretation of global gene-expression, not to use gene-expression intensity but to focus on gene combination repertoire. 第27回日本分子生物学会年会 (2004.12.9, 神戸)
- 井上 達:「トキシコロジーの国際潮流“Animal Welfare Issue”」動物実験と科学 — 討論の序にかえて—。第27回日本学術会議 トキシコロジー研究連絡委員会シンポジウム (2004.11.25, 東京)
- Inoue T, Matsushita T, Igarashi K, Kanno J, Hirabayashi Y: Toxicogenomics: A new risk assessment paradigm in prediction and interpretation of global gene-expression. Toxicogenomics International Forum 2004 (2004.11.12, Kyoto)
- Inoue T: The Use of Toxicogenomics data in risk assessment— Potential applications of Toxicogenomics in risk assessment—. The 5th Princess Chulabhorn International Science Congress (2004.8.22, Bangkok, Thailand)
- Inoue T: Toxicogenomics as a tool of predictive toxicology. 10th International Congress of Toxicology. (2004.7.13, Tampere, Finland)
- Inoue T: Symposium 5. Pharmaco- & Toxicogenomics Symposium: S5-3. Strategy of predictive Toxicogenomics a reverse toxicogenomics. Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology The 61st Annual Meeting 2004 (2004.5.27, Seoul, Korea)
- Inoue T: Strategy of TOXICIGENOMICS - with respect to toxicologic endpoints, pathodiagnosics and risk assessment -2004 Spring Symposium and Slide Conference on Korean Society of Toxicologic (2004.5.14, Daegu, Korea)

H. 知的財産所有権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

平成 16 年度厚生労働科学研究費補助金
(厚生労働科学特別研究事業)

Ⅱ. 分担研究報告書

平成 16 年度厚生労働科学研究費補助金(厚生労働科学特別研究事業)
ナノマテリアルの安全性確認に必要な生体影響試験に関する緊急調査
分担研究報告書

本研究の毒性面からと化学物質総合評価の面からの検討

主任研究者 菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター 毒性部長
分担研究者 広瀬 明彦 国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター 総合評価研究室 主任研究官

研究要旨 ナノテクノロジーの中心的な役割を担い、且つ今後その利用が広範に使用されていくことになると思われるナノサイズマテリアルが、生体内に侵入し、あるいは有害性を示す可能性を評価するための毒性面からと化学物質総合評価の面からの検討を行った。その結果、断片的な毒性情報の状況からは、まずナノマテリアルの体内動態を確実に、そして様々な投与経路や状況に対して把握することが必要であると考えられた。しかし、どのような暴露が想定されるかについても、暴露評価の観点からナノマテリアルごとに検討しておく必要がある。これらのことから、まず環境中および生体試料中の分析法の開発が、最初に必要である他、吸入経路や経皮経路により現在までに知られている組織への影響を考慮すると、神経系細胞への影響や、変異原性および免疫・炎症反応に引き続く発がん性について、適切な実験条件のもとに検討を行う必要性が高いと考えられた。

A. 研究目的

ナノテクノロジーの中心的な役割を担い、且つ今後その利用が広範に使用されていくことになると思われるナノサイズ物質の健康影響評価に関して、毒性面および化学物質の総合的評価の面からの検討を行うことを目的とする。

B. 研究方法

ナノマテリアルが生体に与える影響に関わる、化学物質の毒性学的観点及び暴露の面から、ナノマテリアルの特性を勘案した重要な因子についてまとめると共に、総合的影響評価上必要な情報の整理を行う。

具体的には、ナノマテリアルの暴露の面からの物理化学的特性や開発・生産法によ