

る暴露様式および可能性の整理を試みた。

#### (倫理面への配慮)

本研究においては調査が主体となるので、倫理面への直接的な配慮は、必要ないものと考えられる。

### 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( $\text{SiO}_2$ )、二酸化チタン( $\text{TiO}_2$ )、アルミナ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ )、酸化鉄( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ )、酸化亜鉛( $\text{ZnO}$ )、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(C60、C70etc)、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)。

#### 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。

#### 毒性評価

ナノサイズの粒子は、肺や腸管を經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、粒子の大きさや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ように見える。

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。

#### 参照文献

Luther Wolfgang ed. (2004) Industrial application of nanomaterials -chance and risks. Technological analysis. Future Technologies Division of DVI Technologiezentrum GmbH, Dusseldorf, Germany, pp. 112.

Pflucker,-F; Wendel,-V; Hohenberg,-H; Gartner,-E; Will,-T; Pfeiffer,-S; Wepf,-R; Gers-Barlag,-H (2001) The human stratum corneum layer: an effective barrier against dermal uptake of different

forms of topically applied micronised titanium dioxide. Skin-Pharmacol-App l-Skin-Physiol. 14 Suppl 1: 92-97.

Menzel, F., Reinert, T., Vogt, Butz, T.: (2004) „Investigations of percutaneous uptake of ultrafine TiO<sub>2</sub> particles at the high energy ion nanoprobe LIPSION“, Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B.

#### D. 考察

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

### 2. 論文発表

Takahashi Y, Kitajima S, Inoue T, Kanno J,

Saga Y. Differential contribution of Mesp1 and Mesp2 to the epithelialization and rostro-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 2004 685-693、株式会社秀潤社

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

### 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), May 17-18, 2004, Malaysia

Jun Kanno, Endocrine Disrupting Chemicals Researches, Current Topics, 19th Scientific Meeting of the Malaysian Society of Pharmacology and Physiology (MSPP), May 17-18, 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

Hirose A, Takahashi M, Kamata E, Ema M,  
Hayashi Y. "Development of genotoxicity  
predicting QSAR system for registered and  
existing 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.

#### H. 知的財産所有権の出願・登録状況

4. 特許取得 なし
5. 実用新案登録 なし
6. 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)  
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

本研究の病理学的検討

分担研究者 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

**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物質が、生体内に侵入し、あるいは有害性を示す可能性やその場合に毒性学的解析における病理学的問題について現在まで知られている知見について、肺への影響や皮膚への影響を中心に検討した。その結果、気管内などへの直接投与などでの炎症反応や皮膚吸収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ベース研究、および長期の実験の必要性が検証された。

**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が、生体内に侵入し、あるいは有害性を示す可能性やその場合に毒性学的解析における病理学的問題について検討することを目的とする。

**B. 研究方法**

ナノマテリアル (100nm 以下) の物質が生体に与える影響の可能性を検討するために、ナノサイズ粒子等ですでに報告されている現象やその病理学的な解析結果

などを文献情報から収集、整理すると共に、病理学的解析において問題となる事項や、今後必要な方策等についての考察を行った。

文献情報の整理としては、ナノマテリアル物質の暴露影響としての危惧とこれまでの研究とのアナロジーから

- 微粒子の吸入暴露による肺への影響
- 化粧品等の成分などの皮膚塗布後の皮膚組織への影響

などについて、現在まで得られている知見についてまとめた。

(倫理面への配慮)

本研究においては調査が主体となるので、倫理面への直接的な配慮は、必要ないものと考えられる。

## C. 研究結果

### 吸入微粒子の肺への影響

球状粒子の場合、直径  $2.5\mu\text{m}$  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  $100\text{nm}$  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。長さとの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  $20\mu\text{m}$  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、 $20\text{nm}$  以下 (ultrafine) および  $200\text{nm}$  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

μm 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 μm 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、角質層や毛囊の中に浸透していることを報告した。しかし、この毛囊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 μm 以上あるいは 1.0 μm 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)。

#### 参考文献

- Lippmann M (1990) Effects of fiber characteristics on lung deposition, retention, and disease. *Environ. Health Perspect.* 88:311-317.
- Lam C.W., James J.T. McCluskey R., Hunter R.L. (2004) Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in Mice 7 and 90 days after intratracheal instillation *Toxicol, Sci.* 77: 126-134.
- Warheit D. B., Laurence B. R., Reed K. L., Roach D. H., Reynolds G. A. M., and Webb T. R. (2004) Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats. *Toxicol, Sci.* 77: 117-125.
- Oberdorster, -G; Ferin, -J; Lehnert, -B-E (1994) Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury. *Environ-Health-Perspect.* 102 Suppl 5: 173-179.

- Driscoll,-K-E; Deyo,-L-C; Carter,-J-M;  
Howard,-B-W; Hassenbein,-D-G;  
Bertram,-T-A (1997) Effects of particle  
exposure and particle-elicited  
inflammatory cells on mutation in rat  
alveolar epithelial cells. *Carcinogenesis*.  
18: 423-430.
- Oberdorster G., Yu C.P., (1999) Lung  
dosimetry-considerations for  
non-inhalation studies. *Exp. Lungs Res.*  
25 1-6.
- Stanton,-M-F; Laynard,-M; Tegeris,-A;  
Miller,-E; May,-M; Kent,-E (1977)  
Carcinogenicity of fibrous glass: pleural  
response in the rat in relation to fiber  
dimension. *J-Natl-Cancer-Inst.* 58:  
587-603.
- Stanton,-M-F; Wrench,-C (1972) Mechanisms  
of mesothelioma induction with asbestos  
and fibrous glass. *J-Natl-Cancer-Inst.*  
48: 797-821.
- Berman,-D-W; Crump,-K-S; Chatfield,-E-J;  
Davis,-J-M; Jones,-A-D (1995) The sizes,  
shapes, and mineralogy of asbestos  
structures that induce lung tumors or  
mesothelioma in AF/HAN rats following  
inhalation. *Risk-Anal.* 15: 181-195.
- Schins,-R-P (2002) Mechanisms of  
genotoxicity of particles and fibers.  
*Inhal-Toxicol.* 14: 57-78.
- Lademann,-J; Weigmann,-H; Rickmeyer,-C;  
Barthelmes,-H; Schaefer,-H; Mueller,-G;  
Sterry,-W (1999) Penetration of titanium  
dioxide microparticles in a sunscreen  
formulation into the horny layer and the  
follicular orifice.  
*Skin-Pharmacol-Appl-Skin-Physiol.* 12:  
247-256.
- Pflucker,-F; Wendel,-V; Hohenberg,-H;  
Gartner,-E; Will,-T; Pfeiffer,-S;  
Wepf,-R; Gers-Barlag,-H (2001) The  
human stratum corneum layer: an effective  
barrier against dermal uptake of different  
forms of topically applied micronised  
titanium dioxide.  
*Skin-Pharmacol-Appl-Skin-Physiol.* 14  
Suppl 1: 92-97.
- Kreilgaard,-M (2002) Influence of  
microemulsions on cutaneous drug  
delivery. *Adv-Drug-Deliv-Rev.* 54 Suppl  
1: S77-98.
- Tinkle, S. S., Antonini, J. M., Rich, B. A.,  
Roberts, J. R., Salmen, R., De Pree, K.,  
Adkins, E. J.: (2003) „Skin as a route of  
exposure and sensitization in chronic  
beryllium disease“, *Environ. Health  
Perspect.* 111, p. 1202-1208.
- Blundell, G., Henderson, W. J., Price, E. W.:  
(1989) „Soil particles in the tissues of the  
foot in endemic elephantiasis of the lower  
legs“, *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 83, p.  
381-385.
- Corachan, M.: (1988) „Endemic non-filarial  
elephantiasis of lower-limbs  
-podoconiosis“, *Medicina Clinica* 91, p.  
97-100.

#### D. 考察

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、通常のコノカーボンを取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 (Baron ら 2002) を慎重に考慮する必要がある。また、繊維状粒子の長さに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た。

また、皮膚へのナノマテリアルの浸透性については、その可能性が示唆されるものの、免疫系やその他の組織細胞との相互作用に関しては、間接的な知見しかなく、メカニズムベースに基づいた今後の研究の進展が必要であると考えられた。

#### E. 結論

ナノマテリアルの安全性確認に必要な病理学的側面における現在までの知見を、肺及び皮膚への影響という観点から検討した結果、気管内などへの直接投与などでの炎症反応や皮膚吸収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ることや、粒子のサイズや表面積、さらに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ベース研究や長期の実験の必要性が確認された。

#### F. 健康危惧情報

該当しない

#### G. 研究発表

##### 3. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産所有権の出願・登録状況

7. 特許取得      なし

8. 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)

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

本研究の遺伝毒性の面からの検討

分担研究者 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

**研究要旨** ナノサイズマテリアルは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わたると考えられる。そこで、ナノサイズマテリアルのヒト健康影響を検討するため、遺伝毒性に関する現在までの知見をまとめた。フラーレンなどのカーボン系ナノマテリアルについては、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、通常の状態では、生物学的に有意と考えられる遺伝毒性は示さないようである。しかし、長期間の組織内での影響や実験条件による大きな結果の違いについては、今後の知見の集積が必要である。

#### 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が、生体内に侵入した場合の有害性を予測・評価する一環として遺伝毒性に関係する情報を収集し、検討することを目的とする。

#### B. 研究方法

ナノマテリアル(100nm 以下)の物質が生体に与える影響の可能性を検討するために、ナノサイズ粒子等ですでに報告されている現象やその病理学的な解析結果などを文

献情報から収集、整理すると共に、遺伝毒性学的解析において問題となる事項や、今後必要な方策等についての考察を行った。

文献情報の整理としては、ナノマテリアル物質の暴露影響としての危惧とこれまでの研究とのアナロジーから

- 活性酸素生成
- 細胞内への透過性
- 遺伝毒性
- 代謝酵素への影響

などについて、現在まで得られている知見についてまとめた。

### (倫理面への配慮)

本研究においては調査が主体となるので、倫理面への直接的な配慮は、必要ないものと考えられる。

## C. 研究結果

### 活性酸素生成

純粋なフラーレン(C60)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)。マクロファージのによる初期の実験では、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オキシ種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ョ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、ショ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した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)。

#### 参考文献

- Nelson M.A., Domann F.E., Bowden G.T., Hooser S.B., Fernando Q., Carter D.E., (1993) "Effects of acute and subchronic exposure of topically applied fullerene extracts on the mouse skin," *Toxicol. Ind. Health* 9:623-630.
- Sera N., Tokiwa H., Miyata N., (1996) "Mutagenicity of the fullerene C60-generated singlet oxygen dependent formation of lipid peroxides," *Carcinogenesis* 17:2163-2169.
- Baierl T., Drosselmeyer E., Seidel A., Hippeli S., (1996) "Comparison of immunological effects of Fullerene C60 and raw soot from Fullerene production on alveolar macrophages and macrophage like cells in vitro," *Exp. Toxicol. Pathol.* 48:508-511.
- Tabata Y., Murakami Y., Ikada Y., (1997) "Photodynamic effect of polyethylene glycolmodified fullerene on tumor," *Jpn. J. Cancer Res.* 88:1108-1116.
- Sun Y., Wilson S.R., Schuster D.I., (2001) "High dissolution and strong light emission of carbon nanotubes in aromatic amine solvents," *J. Am. Chem. Soc.* 123:5348-5349.
- Science 254(20 Dec.1991) "Molecule of the Year. Buckyballs: Wide Open Playing Field for Chemists," *Science* 254:1706-1707.
- Scrivens W.A., Tour J.M., Creek K.E., Pirisi

- L., (1994) "Synthesis of <sup>14</sup>C-Labeled C60 and its Biological Uptake in Human Keratinocytes," in K.M. Kadish, R.S. Ruoff, eds., *Fullerenes: Recent Advances in the Chemistry and Physics of Fullerenes and Related Materials*, Electrochemical Society, Pennington NJ, Vol. 1, 1994, pp. 676-688.
- Scrivens W.A., Tour J.M., Creek K.E., Pirisi L., (1994) "Synthesis of <sup>14</sup>C-labeled C60, Its Suspension in Water, and Its Uptake by Human Keratinocytes," *J. Am. Chem. Soc.* 116:4517-4518.
- Zakharenko L.P., Zakharov I.K., Lunegov S.N., Nikiforov A.A., (1994) "Demonstration of the absence of genotoxicity of fullerene C60 using the somatic mosaic method," *Dokl. Akad. Nauk.* 335:261-262.
- Zakharenko L.P., Zakharov I.K., Vasiunina E.A., Karamysheva T.V., Danilenko A.M., Nikiforov A.A., (1997) "Determination of the genotoxicity of fullerene C60 and fullerol using the method of somatic mosaics on cells of *Drosophila melanogaster* wing and SOSchromotest," *Genetika* 33:405-409.
- Iwata N, Mukai T, Yamakoshi Y.N., Hara S., Yanase T., Shoji M., Endo T., Miyata N., (1998) "Effects of C60, a Fullerene, on the Activities of Glutathione S-Transferase and Glutathione-Related Enzymes in Rodent and Human Livers," *Fullerene Sci. Technol.* 6:213-226.

#### 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ので、生物学的に妥当な評価のための実験手法の整備や他の実験や暴露実体との整合性をとることは、重要な問題になるであろう。

#### E. 結論

ナノマテリアルの安全性確認に必要な遺伝毒性学的側面における現在までの知見をまとめた。フラーレンなどのカーボン系ナノマテリアルについては、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、今まで調べられた比較的短期の暴露状態では、生物

学的にそれほど有害性を示さないようである。しかし、長期間の組織内での影響や実験条件による大きな結果の違いの原因を明らかにするためには、今後の知見の集積が必要である。

## F. 健康危惧情報

該当しない

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Yamada, K., T. Suzuki, A. Kohara, M. Hayashi,

T. Mizutani, and K. Saeki (2004) In vivo mutagenicity of benzo[*a*]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.

### 2. 学会発表

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.

## H. 知的財産所有権の出願・登録状況

9. 特許取得 なし

10. 実用新案登録 なし

11. 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)  
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

本研究の生殖発生毒性関連の検討

分担研究者 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

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生殖発生毒性関連における検討を行った。その結果、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ものの、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、さらには中枢神経系への取り込みの知見からは、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。

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が、生体内に侵入し、あるいは有害性を示す可能性やその場合に生じるかもしれない生殖発生毒性関連における毒性学の問題について検討することを目的とする。

B. 研究方法

ナノマテリアルが生体に与える影響の評価上の検討を行うために、現在までに報告されている現象のうち生殖発生毒性に関わる知見情報の収集・整理を行うと共に、今後の生殖発生毒性学的解析において問題となる事

項や、今後必要な方策等についての考察を行った。

しかし、実際には、ナノマテリアル物質についての生殖発生毒性暴露を検討した報告はほとんど無いのが現状であったので、生殖器系への影響を推察する上で必要な、生体内に取り込まれたあとの動態に関する知見を収集した。知られている取り込み経路としては、肺、腸管および皮膚からの吸収が主に調べられおり、これらの経路からの体循環系への取り込みの知見の蓄積は、今後、生殖器系や母体・胎児への影響を検討するための十分な証拠になるであろうと考えられる。

(倫理面への配慮)

本研究においては調査が主体となるので、倫理面への直接的な配慮は、必要ないものと考えられる。

## C. 研究結果

### 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  $\mu\text{M}$  ( $\sim 3 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ ) 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。

### 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 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -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食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( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ )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 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 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; Nemmar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、 $1.1\mu\text{m}$  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 $^{13}\text{C}$ 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~ $3\mu\text{m}$ 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、 $0.5\mu\text{m}$ -あるいは $1.0\mu\text{m}$ -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、 $0.4\sim 0.5\mu\text{m}$ 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

一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)。

#### 参考文献

- Satoh M., Matsuo K., Takanashi Y., Takayanagi I., (1995) "Effects of acute and short-term repeated application of fullerene C60 on agonist-induced responses in various tissues of guinea pig and rat," *Gen. Pharmacol.* 26:1533-1538.
- Conhaim, R. L., Eaton, A., Staub, N. C., Heath, T. D.: (1988) „Equivalent pore estimate for the alveolar-airway barrier in isolated dog lung“, *J. Appl. Physiol.* 64, p. 1134-1142
- Hermans, C., Knoop, B., Wiedig, M., Arsalane, K., Toubau, G., Falmagne, P., Bernard, A.: (1999) „Clara cell protein as a marker of Clara cell damage and bronchoalveolar blood barrier permeability“, *Eur. Respir. J.* 13, p. 1014-1021
- Nemmar, A. et al.: (2002) „Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans“, *Circulation*, 105:411-414
- Brown, J. S., Zeman, K. L., Bennett, W. D.: (2002) „Ultrafine particle deposition and clearance in the healthy and obstructed lung“, *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 166, 1240-1247
- Kawakami, K., Iwamura, A., Goto, E., Mori, Y., Abe, T., Hirasawa, Y., Ishida, H., Shimada, T., Tominaga, G.: (1990) „Kinetics and clinical application of 99mTc-technegas“, *Kaku Igaku* 27, p. 725-733
- Kreyling, W., Semmler, M., Erbe, F., Mayer, P., Schulz, H., Oberdörster, G., Ziesenis, A.: (2002) „Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from lung epithelium to extrapulmonary organs is size dependent but very low“, *J. Toxicol. Environ. Health A* 65, p. 1513-1530.
- Lippmann, M.: (1990) „Effects of fiber characteristics on lung deposition, retention, and disease“, *Environ. Health Perspect.* 88, p. 311-317
- Nemmar, A., Vanbilloen, H., Hoylaerts, M. F., Hoet, P. H., Verbruggen, A., Nemery, B.: (2001) „Passage of intratracheally instilled ultrafine particles from the lung into the systemic circulation in hamster“, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 164, p. 1665-1668
- Oberdörster, G., Sharp, Z., Atudorei, V., Elder, A., Gelein, R., Lunts, A., Kreyling, W., Cox, C.: (2002)

- „Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particle following whole-body inhalation exposure of rats“, *J. Toxicol. Environ. Health A* 65, p. 1531-1543
- Takenaka, S., Karg, E., Roth, C., Schulz, H., Ziesenis, A., Heinzmann, U., Schramel, P., Heyder, J. (2001) Pulmonary and systemic distribution of inhaled ultrafine silver particles in rats. *Environ. Health Perspect.* 109 Suppl 4, 547-551
- Eyles, J. E., Bramwell, V. W., Williamsson, E. D., Alpar, H. O.: (2001) „Microsphere translocation and immunopotential in systemic tissues following intranasal administration“, *Vaccine* 19, p. 4732-4742.
- Kato, T., Yashiro, T., Murata, Y., Herbert, D. C., Oshikawa, K., Bando, M., Ohno, S., Sugiyama, Y.: (2003) „Evidence that exogenous substances can be phagocytized by alveolar epithelial cells and transported into blood capillaries“, *Acc. Chem. Res.* 311, p. 47-51
- Szentkuti, L. (1997) Light microscopical observations on luminally administered dyes, dextrans, nanospheres and microspheres in the pre-epithelial mucus gel layer of the rat distal colon. *J. Control. Release* 46, 233-242.
- Jani, P., Halbert, G. W., Langridge, J., Florence, A. T.: (1989) „The uptake and translocation of latex nanospheres and microspheres after oral administration to rats“, *J. Pharm. Pharmacol.* 41, p. 809-812.
- Kreilgaard, M (2002) Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. *Adv-Drug-Deliv-Rev.* 54 Suppl 1: S77-98.
- Tinkle, S. S., Antonini, J. M., Rich, B. A., Roberts, J. R., Salmen, R., De Pree, K., Adkins, E. J.: (2003) „Skin as a route of exposure and sensitization in chronic beryllium disease“, *Environ. Health Perspect.* 111, p. 1202-1208.
- Blundell, G., Henderson, W. J., Price, E. W.: (1989) „Soil particles in the tissues of the foot in endemic elephantiasis of the lower legs“, *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 83, p. 381-385.
- Corachan, M.: (1988) „Endemic non-filarial elephantiasis of lower-limbs -podoconiosis“, *Medicina Clinica* 91, p. 97-100.
- Kreuter, J.: (2001) „Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs“, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 47, p. 65-81

#### D. 考察

生殖発生毒性に関する知見はほとんど無く、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