

厚生労働科学研究費補助金研究報告書

化学物質リスク研究事業

ナノマテリアルの安全性確認における健康影響
評価手法の確立に関する研究

平成 17 年度

総括・分担研究報告書

主任研究者 広瀬 明彦

国立医薬品食品衛生研究所

平成 18 年 (2006 年) 年 4 月

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

ナノマテリアルの安全性確認における健康影響評価手法の確立に関する研究
(H17-化学-012)

平成 17 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 広瀬 明彦

平成 18 年 (2006 年) 4 月

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おける健康影響評価手法の確立に関する研究 広瀬 明彦	2
II. 分担研究報告書	8
1. 生体試料中のナノマテリアル測定法の開発に関する研究 徳永 裕司	9
2. ナノマテリアルの(神経)細胞機能影響に対する評価手法の開発に関する研究 中沢 憲一	18
3. ナノマテリアルの遺伝毒性評価系における基礎的検討に関する研究 本間 正充	21
4. ナノマテリアルの投与経路と体内分布における基礎的検討に関する研究 菅野 純	25
5. ナノマテリアルの発がん性評価手法の開発に関する研究 津田 洋幸	28
6. 産業用ナノマテリアルのハザードに関する国内外の動向調査研究 高月 峰夫	31
7. ナノマテリアルの化学物質評価の面からの基礎的調査及び評価法に関する総合的研究 広瀬 明彦	42
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	46
IV. 研究成果の刊行物・別冊	49

平成17年度厚生労働科学研究費補助金
(化学物質リスク研究事業)

I. 総括研究報告書

総括研究報告書

研究課題名：ナノマテリアルの安全性確認における健康影響評価手法の確立に関する研究

主任研究者 広瀬 明彦 国立医薬品食品衛生研究所 総合評価研究室 主任研究官

研究要旨：新機能や優れた特性を持つ物質を作り出す技術ナノテクノロジーの中心的存在であるナノマテリアルの物理化学的性状は、同一組成を持つ、より大きな構造体とは著しく異なり、この違いが産業的に新しい用途への開発として期待されているところであるが、一方で生体影響については多くの点で未知である。その物理化学的性状を考慮した毒性試験法や有害性評価手法の開発の必要性に迫られる中、まず製品としての均一性や生産量を考慮して、フラーレンや酸化チタン粒子などを対象物質として、生体試料中での測定法、*in vitro* 系の生体影響評価法および、*in vivo* 系における投与方法や生体内動態の検討、国際動向調査に関する研究を行った。生体試料での測定方法の検討については、フラーレン・酸化チタンについて LC-MS/MS および ICP-MS を用いての生体試料中での測定法に目処が立ち、*in vivo* 系におけるフラーレンのコーン油溶液での経口投与や氷砂糖溶解液による経気道暴露による体内動態解析、酸化チタンの皮膚投与における吸収性に適用できる体勢が整った。*In vitro* 系においては、 γ -シクロデキストリンや Tween80 などの補助剤の適用により、細胞評価系への適用が可能になり、遺伝毒性試験系では、わずかながら小核誘発能を検出することができたが、さらなる培地へ添加法の模索が必要であると考えられ、フラーレンのコーン油への溶解性を考慮すると、今後は脂質成分との相互作用に注目し、*in vitro* 系への適用や *in vivo* 体内動態の解析を展開する必要があると考えられた。国際動向では、OECD などでの試験法の標準化やその際の基準ナノマテリアル物質の確立に向けた機運が高まりつつあり、これに対応した実験手法の確立が急がれる。フラーレンや酸化チタン粒子などを対象物質として、生体試料中での測定法の検討、*in vitro* 系の生体影響評価法の検討、*in vivo* 系における投与方法や生体内動態の検討、国際動向調査を展開してきて、体内動態解析や補助剤を用いての *in vivo* 系試験系への適用は可能になってきたが、多層型カーボンナノチューブの産業展開の加速や国際的な関心の高まりを受け、吸入暴露も考慮した評価系の確立や、国際的な安全試験法の調和に向けた試験法の確立が早急に必要であると考えられた。

分担研究者

菅野 純	国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 部長	変異遺伝部 室長 高月 峰夫 (財)化学物質評価研究機構 安全性評価技術研究所 所長
徳永 裕司	国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生化学 部長	協力研究者 児玉 幸夫 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 室長
津田 洋幸	名古屋市立大学大学院医学研究科 生体防御総合医学専攻 生体機能分 子医学講座 分子毒性学 教授	五十嵐 勝秀 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 主任研究官
中沢 憲一	医薬品食品衛生研究所 薬理部 部長	西村 哲治 国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生化学部 室長
本間 正充	国立医薬品食品衛生研究所	内野 正 国立医薬品食品衛生研究所

環境衛生化学部 主任研究官

久保田領志 国立医薬品食品衛生研究所

環境衛生化学部 研究員

深町勝巳 名古屋市立大学大学院医学研究科

生体防御総合医学専攻 生体機能分

子医学講座 分子毒性学 助手

David B. Alexander 名古屋市立大学大学院医学研究科

生体防御総合医学専攻 生体機能分

子医学講座 分子毒性学 客員教授

佐藤 薫 国立医薬品食品衛生研究所

薬理部 主任研究官

A. 研究目的

ナノテクノロジーは、その新機能や優れた特性を持つ物質を作り出す技術により国家戦略としてその開発が進められているが、他方、ナノマテリアルの生体影響については、多くの点で未知である。総合科学技術会議の平成17年度の科学技術に関する予算・人材等の資源配分の方針においても、安心・安全な社会の構築に備え、ナノテクノロジーが社会や人間に及ぼす影響・波及効果を把握し、必要な対応を講じるための調査検討に着手すべきとされており、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。近年、神経系や免疫系への影響や DNA 障害などのいくつかの懸念を示す報告がされているが、その物性を適切に考慮した評価研究はほとんど行われていない。また、ナノマテリアルの環境中および生体中の測定法も確立しておらず、生体内への吸収や分布についての情報もほとんど得られていない。そこで、本研究では、まず製品としての均一性や生産量を考慮し、フラーレンや酸化チタン粒子などの高生産量ナノマテリアルを対象物質として、①生体試料中での測定法の検討、②*in vitro*系の生体影響評価法の検討、③*in vivo*系における投与方法や生体内動態の検討④国際動向調査の項目について、今後の評価に対する基礎的知見の収集を目的とした。

B. 研究方法

①: 生体試料での測定方法の検討

フラーレンの生体試料中の分析については、GC-MS/MSを用いた分析条件の確立と定量下限値の検討、組織からの抽出方法の検討を行う。また、酸化チタンの生体内吸収の際の測定法の検討を行う。(徳永)

②: *in vitro*系における生体影響評価法の検討

神経などの細胞機能への影響を評価するための系の開発については、フラーレン(C60)を用いて、評価系への水溶化(分散)方法を検討する。適切な処置方法が見出された場合には、遺伝子の発現系としてよく知られているアフリカツメガエルの卵母細胞を用い、これに神経細胞の機能を司っている受容体、イオン・チャネルを発現させたものを用いる(中沢)。遺伝毒性評価系における基礎的検討については、フラーレンの分散水溶液である nanom(ナノム)分散品(N60-S,水,5% lot#5A9224-B、C60/water = 5wt/wt%, Tween80/water = 2wt/wt%)を用いる。CHLを用いた細胞毒性・小核試験、ヒトリンパ芽球細胞株TK6を用いた細胞毒性・小核・TK遺伝子突然変異試験を行う。さらにTK6細胞と、電気穿孔法を用いた手法も試みる(本間)。酸化チタンの経皮吸収性については、平均粒径の異なるLU-175(20nm)とLU-205(250nm)を用い、CHO細胞に暴露した際の細胞内画分の分布および、3次元培養人皮膚モデルでの透過実験を行う(徳永)。

③: *in vivo*系における生体影響評価法の検討

フラーレンの体内動態を解析する目的で、フラーレンをコーン油に溶解し、マウスに経口投与した後の経時的な体内分布および肝臓における遺伝子発現解析を試みる(菅野)。肺癌がんプロモーション試験としては、通常の吸入装置用い簡易ラット肺内吸入試験法の開発を行い、4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)をイニシエータとして、フラーレン(C60)の肺癌がん・発がんプロモーション作用(30週)の有無を評価する。フラーレンはC60の氷砂糖溶解液(500ppm)を用いる。皮膚発がんプロモーション試験としては、7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA、2.5mg/ml、アセトン溶解)をイニシエータとした皮膚発がん高感受性ヒト正常型 c-Ha-ras 遺伝子トランスジェニックラット(Tg)を用い、二酸化チタン(TiO₂:ルチル型、コーティングなし)の皮膚発がんプロモーション実験(30週)を行う(津田)。

④: 国内外の動向調査および総合評価研究

ナノマテリアルのハザードおよびリスクに関する国内外の動向調査を行う(広瀬、高月)。

本研究では、人を対象とした研究や遺伝子解析、疫学研究を行う予定はない。また、実験動物を用いた研究に関しては、当該研究実施機関による動物実験に関する倫理規定にしたがって、実験動物に対す

る動物愛護の配慮の上で実施する。

C. 研究結果

①:フラーレンの生体試料中の分析:生物試料を対象とするため、選択性の高いC-MS/MSを用い、定性・定量はAPCIによるネガティブイオンモードで、測定質量数は720を用いた。サロゲートとしてのフラーレン(C70)の使用を想定し、分離カラムはC30のDevelosil RPFULLERENE、移動相はトルエン70%、アセトニトリル30%のアイソクラティック法、流速1ml/min、カラムオープン温度30°C、注入量20 μ l、分析時間20分で良好に分析できる条件を得ることができた。この設定された条件での定量下限値は20 μ g/Lであった。生体試料からの抽出に関しては、ホモジナイズの際SDSと回収率補正のためのサロゲートのC70を加え、ホモジネートを遠沈管へ移し、フラーレンをトルエン層に抽出する方法を検討し、肝臓及び脳組織の添加回収において85~95%と良好な結果を得ることができた。酸化チタンの分析法としてはICP-MSを用い、LU1175(20nm)とLU205(250nm)の平均粒径の違う酸化チタンの標準溶液(7%硝酸)を用いて検討した。懸濁液のネブライザーの部分での気化の仕方がLU1175とLU205の粒径の違いにより異なっているために、LU1175とLU205では異なった検量線が作成されたが、濃度と粒子カウント数の間には良好な直線関係が得られた(徳永)。

②:フラーレンの水溶化の検討および神経などの細胞機能への影響を評価するための系の開発:ポリビニルピロリドンを用いる方法だとC60が水相に移行しない可能性があるため、 γ -シクロデキストリンで可溶化することを検討した。近藤法に従いC60を γ -シクロデキストリンと共に乳鉢ですりつぶし、固相反応で生じた錯体を水溶液とした。吸光度の測定により、推定10 μ MのC60水溶液中を得ることができた。この溶液を用い、アフリカツメガエル卵母細胞に処置し、細胞膜の状態を膜抵抗記録により調べたが、2時間までの処置で異常は観察されなかった。また、ディッシュ中に静置した卵母細胞にこのC60を処置した場合、7日目までに外見的な異常は見出されなかった。神経型のATP受容体チャネルを卵母細胞に発現させ、ATPの反応性に対するC60の影響に変化は見出されなかった(中沢)。

遺伝毒性評価系における基礎的検討:CHL細胞(10⁴ cell in 5ml dish)にnanomを添加し、72時間の細胞の増殖性および小核誘発性を検討した実験では、

添加量333 μ lまでは50%以上の細胞増殖率を示し、小核誘発率は、100 μ lと333 μ lで約10/1000と対照群の約2倍に増加していたが有意ではなかった。TK6細胞(1X10⁵/ml, 5ml)にnanomを添加した系では、100 μ l添加で対照群の約2倍の核誘発性を示したが、突然変異頻度には影響は認められなかった。さらに、TK6細胞(5X10⁶)にnanomを添加し、amaxa nucleofectorで電気穿孔を試みた結果、突然変異頻度には影響は認められなかったが、5及び20 μ l添加の電気穿孔処理でわずか(約3倍)ではあるが有意な小核誘発能が示された(本間)。

酸化チタンの経皮吸収性:CHO細胞に対する細胞毒性では、LU175の方がLU205より強い細胞毒性を示すことが示唆され、10000 μ g/well(0.2%)暴露時でLU175、LU205共に約99.5%以上が細胞膜画分に、LU175の約0.4%、LU205の約0.1%がマイクロブーム及びサイトゾール画分に存在していることが示された。3次元培養人皮膚モデル透過実験では、LU175はLU205に比べて2-3倍透過性が大きく、またどちらのサンプルもある一定濃度・時間以上では透過量がプラトーに達することが示唆された(徳永)。

③:フラーレンの体内動態を解析:約200ppmにコーン油に溶解したフラーレンを単回強制経口投与し、投与後24時間まで経時的に臓器を採取し、①の測定系で確立した方法に従って、脳、肝臓、腎臓、肺、及び糞中のフラーレン濃度を測定したところ、血液や各臓器への分布は検出限界以下であった。一方、糞中からは高濃度で検出され、投与したC60量の85.5%が糞から回収された。同時に際した肝臓についてのDNAチップ遺伝子発現解析の結果、予備的な解析結果から投与に伴い発現変動する遺伝子が存在する結果が得られた。現在、肝臓を対象にした網羅的遺伝子発現解析を実施中である(菅野)。

肺発がんプロモーション試験:簡易ラット肺内吸入試験法を確立した。ラットにエーテル麻酔科下に仰臥位とし、キセノンランプにて経胸壁的に胸腔内に光を入れ、声門より気管内にMicro Sprayerにて墨汁を噴霧した結果、肺胞内に広範に送達されたことを確認した。現在NNKの気管内投与を行ったところであり、1週後よりC60の氷砂糖溶解液(500ppm)を週に1回、1ml、30週投与し、30週後に肺発がんプロモーション活性が検討できる予定である(津田)。

皮膚発がんプロモーション試験:現在、皮膚発がん高感受性ヒト正常型c-Ha-ras遺伝子トランスジェニックラット(Tg)を実験数確保のために繁殖中であり、

確保でき次第、実験をスタートし、テトラオクタン酸ペンタエリスリチル(10% W/W)で分散したTiO₂(ルチル型、コーティングなし)の発がんプロモーション活性が検索できる予定である(津田)。

④: 調査研究および総合評価研究: 文献収集・整理した結果では、ナノマテリアルの暴露による毒性や環境影響について検討した実験は限られており、これらの影響を定量化するガイドラインもないのが現状である。ナノマテリアル(ナノ粒子一般、カーボンナノチューブ及びフラーレン)についての環境影響、毒性、体内分布等に関する既存の報告の多くは断片的なものであるとともに、再現性等それらの信頼性を確認する必要あるものも含まれているという状況である(高月)。一方、本研究では生産量の高い物質と言う理由で、酸化チタンやフラーレンを中心に展開してきたが、多層型カーボンナノチューブについても品質的に均一なもので急速な産業展開が行われようとしているという情報を入手した。国際活動では、日本学術会議-英国王立協会共同プロジェクトの「ナノテクノロジーの健康、環境、社会的影響に関するワークショップ」に関する活動や、10月の「第2回ナノテクノロジーと職業衛生に関する国際シンポジウム」で、本研究の実験計画や予備的知見について発表した。また、12月に開かれたOECDの「産業用ナノマテリアルの安全性に関するワークショップ」に参加した。このワークショップの提言としては、OECDの化学物質委員会のジョイントミーティング(JM)に対して、ナノマテリアルのリスク評価に関するWGの設置が求められるという状況になっている(広瀬)。

D. 考察

生体試料での測定方法の検討については、フラーレン・酸化チタンについては、LC-MS/MSおよびICP-MSを用いての生体試料中での測定法に目処が立ち、体内動態の解析を開始できるところまできている。今後、*in vivo*実験において、フラーレンに対するコーン油溶液での経口投与や氷砂糖溶解液による経気道暴露による体内動態、酸化チタンの皮膚投与における吸収性に適用できる体勢が整ったところである。一方、*in vitro*系においては、シクロデキストリンやTween80などの補助剤の適用により、細胞評価系への適用が可能になった。その結果、遺伝毒性試験系では、わずかながら小核誘発能を検出することができた。しかし、補助剤を用いての実験結果解釈や培地中での分散性の確認などに問題は残り、さらな

る培地添加法の模索が必要であると考えられた。コーン油溶解フラーレンの単回経口投与による体内動態解析の結果からは、血液や主要臓器への分布は検出限界以下で、本条件による腸管からの吸収はほとんどないか、あってもかなり少ないと考えられた。しかし、フラーレンのコーン油への溶解性を考慮すると、今後は脂質成分との相互作用に注目し、*in vitro*系への適用や*in vivo*体内動態の解析を展開する必要があると考えられた。さらに、国際動向的には、OECDも含めて試験法の標準化やその際の基準ナノマテリアル物質の確立に向けた気運が高まりつつあり、これに向けた実験手法の開発が急がれる。また、粒子形状がアスベストに近いと考えられている多層型カーボンナノチューブ(MWCNT)の産業的な展開の加速に鑑み、*in vivo*系での生体影響評価手法の開発(特に慢性影響をエンドポイントとしたもの)を中心とした展開を強化することが急務であると考えられた。

E. 結論

製品としての均一性や生産量を考慮して、フラーレンや酸化チタン粒子などを中心的な対象物質として、生体試料中での測定法の検討、*in vitro*系の生体影響評価法の検討、*in vivo*系における投与方法や体内動態の検討、国際動向調査を展開してきた、体内動態解析や補助剤を用いての*in vivo*系試験系への適用は可能になったが、多層型カーボンナノチューブの産業的な展開の加速や国際的な関心の高まりを受け、吸入暴露も考慮した評価系の確立や、国際的な安全試験法の調和に向けた試験法の確立が早急に必要であると考えられた

F. 健康危機情報

該当なし

F. 研究発表

1. 論文発表

Hamamura M, Hirose A, Kamata E, Katoku K, Kuwasaki E, Oshikata T, Nakahara Y, Emma M, Hasegawa R. Semi-quantitative immunohistochemical analysis of male rat-specific alpha(2u)-globulin accumulation for chemical toxicity evaluation. J Toxicol Sci., 31: 35-47, 2006.

高橋美加、松本真理子、川原和三、菅野誠一郎、菅

- 谷芳雄、広瀬明彦、鎌田栄一、江馬 眞、OECD 化学物質対策の動向(第8報)－第16回 OECD 高生産量化学物質初期評価会議(2003年パリ)、化学生物総合管理学会誌(印刷中)
- 高橋美加、平田睦子、松本真理子、広瀬明彦、鎌田栄一、長谷川隆一、江馬 眞、OECD 化学物質対策の動向(第7報)－第15回 OECD 高生産量化学物質初期評価会議(2002年ボストン)、衛研報告、123, 46-52, 2005.
- 松本真理子、高橋美加、平田睦子、広瀬明彦、鎌田栄一、長谷川隆一、江馬 眞、OECD 高生産量化学物質点検プログラム:第18回初期評価会議までの概要、化学生物総合管理学会誌(印刷中)
- Fukushima, S., Wanibuchi, H., Morimura, K., Nakae, D., Tsuda, H., Imaida, K., Shirai, T., Tatematsu M., Tsukamoto, T., Hirose, M. and Furukawa, F. Lack of potential of low dose N-nitrosodimethylamine to induce preneoplastic lesions, glutathione S-transgerase placental form-positive foci, in rat liver. *Cancer Lett.* 222:11-15, 2005.
- Tsuda, H., Fukamachi, K., Ohima, Y., Ueda, S., Matsuoka, Y., Hamaguchi, T., Ohnishi T., Takasuka N. and Naito, A. High susceptibility of human c-Ha-ras protooncogene transgenic rats to carcinogenesis: A cancer-prone animal model. *Cancer Sci.* 96(6): 309-316, 2005.
- Kohno, H., Suzuki, R., Sugie S., Tsuda, H. and Tanaka, T. Dietary Supplementation with silymarin inhibits 3,2'-Dimethyl-4 Aminobiphenyl-induced Prostate Carcinogenesis in Male F344 rats. *Clin Cancer Res.* 11(13): 4962-67, 2005.
- Morimura, K., Kang, J.S., Wei, M., Wanibuchi, H., Tsuda, H. and Fukushima, S. Lack of Urinary Bladder Carcinogenicity of Sodium L-Ascorbate in Human c-Ha-ras Proto-Oncogene Transgenic Rats. *Toxi Path.*, 33:764-767, 2005.
- Nakazawa, K. and Ohno, Y. Characterization of Voltage-dependent Gating of P2X2 Receptor/channel. *Eur. J. Pharmacol.* 508, 23-30 (2005)
- Nakazawa, K., Yamakoshi, Y., Tsuchiya, T. and Ohno, Y. Purification and aqueous phase atomic force microscopic observation of recombinant P2X2 receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 518, 107-110 (2005)
- Honma, M. Generation of loss of heterozygosity and its dependency on p53 status in human lymphoblastoid cells. *Environ. Mol. Mutagen.*, 45, 162-176 (2005)
- Koyama, N., Sakamoto, H., Sakuraba, M., Koizumi, T., Takashima, Y., Hayashi, M., Matsufuji, H., Yamagata, K., Masuda, S., Kinase, N., and Honma, M. Genotoxicity of acrylamide and glycidamide in human lymphoblastoid TK6 cells. *Mutat. Res.*, (in press)
- Matsura-Eisaki, K., Sakamoto, H., Sofuni, T., Hayashi, M. and Honma, M. In vitro genotoxicity of inorganic arsenics and their genotoxic risk through food intake. *Environ. Mutat. Res.*, 27, 153-160 (2005)

2. 学会発表

- Hirose A., Kanno J., Tokunaga H, Nakazawa K, Honma M and Inoue T. Initial investigation on the assessment of nanomaterial safety by the Japanese MHLW. 2nd International Symposium on Nanotechnology and Occupational Health, Oct. 3-6,2005, Minneapolis, USA.
- Hirose A., Required researches from the standpoint of the industrial chemicals' risk assessment. 2nd joint Science Council of Japan -Royal Society workshop on potential health, environmental and societal impacts of nanotechnologies. February, 2006, Tokyo.
- Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Katsuhide Igarashi, Noriyuki Nakatsu, Atsushi Ono, Yukio Kodama, "Per cell" mRNA normalization system for microarrays and quantitative PCR. Gordon Research Conference "Toxicogenomics", Jun 5-10, 2005, NH, USA
- Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Katsuhide Igarashi, Noriyuki Nakatsu, Satoshi Kitajima, Yukio Kodama, Percellome and Mille-Feuille data system for toxicogenomics, 5th World Congress on Alternatives", August 21-25, 2005, Berlin, Germany
- Jun Kanno, Expression Profiling in Mechanistic Toxicology, 9th ICEM Satellite Meeting on Toxicogenomics, August 30 - September 2, 2005, USA

Jun Kanno, Ken-Ichi Aisaki, Katsuhide Igarashi, Noriyuki Nakatsu, Atsushi Ono, Yukio Kodama, "Percellome" mRNA normalization system for microarrays and quantitative PCR. 9th ICEM Satellite Meeting on Toxicogenomics, August 30 - September 2, 2005, USA

菅野 純、ナノマテリアルの安全性確認に関する課題、三菱安全化学研究所講演会、2005年12月1日、東京

Shinya Matsumoto, Kenichi Aisaki, Jun Kanno, Mass Distiributed Clustering : A New Clustering Algorithm for Repeated Measurements in Gene Expression Data, The 16th International Conference on Genome Informatics, Dec 19-21, Yokohama

菅野 純、ナノマテリアルの健康影響評価に関する課題と取り組み、科学技術振興調整費 国際シンポジウム"Exploring the Small World: Role of Public Research Institutes" 2006年2月1日、東京

Tadashi Uchino, Hiroshi Tokunaga. Construction of three-dimensional human skin model consisting of dendritic cells, keratinocytes and fibroblasts. 5th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences. Aug. 21-25. 2005. Berlin, Germany

Tsuda H., Risk Assessment Studies of Nanomaterials in Japn and Other Countries. Joint Royal Society-Science Council of Japan workshop on the potential health, environmental and societal impacts of nanotechnologies. 11 and 12 July 2005

中澤憲一、山越葉子、土屋利江、大野泰雄. 原子間力顕微鏡観察によるP2X2受容体が孔形成タンパク質であることの確認. 第79回日本薬理学会年会(2006年3月)

佐藤薫、大野泰雄、中澤憲一. エストロゲンは歯状回顆粒細胞からのBDNF releaseをPKA依存的に促進する. 第79回日本薬理学会年会(2006年3月)

藤島沙織、井上義之、権藤由紀、関雅範、屋形直明、野坂俊樹、高月峰夫、フラーレンC60の水生環境影響評価に向けた試み、第11回日本環境毒性学会・バイオアッセイ研究会合同研究発表会 2005.

Takatsuki, M., Inoue, Y., Towards Systematic Hazard Analysis of Nanomaterials to The Environmental Safety. Joint Royal Society-Science Council of Japan workshop on the potential health,

environmental and societal impacts of nanotechnologies. 11 and 12 July 2005

G. 知的財産権の出願・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17年度厚生労働科学研究費補助金
(化学物質リスク研究事業)

Ⅱ. 分担研究報告書

研究課題名: ナノマテリアルの安全性確認における健康影響評価手法の確立に関する研究

分担研究課題名: 生体試料中のナノマテリアル測定法の開発に関する研究

—ナノマテリアル(フラーレン、酸化チタン)の生体試料中の
分析および皮膚透過性について—

分担研究者	徳永 裕司	国立医薬品食品衛生研究所	環境衛生化学部	部長
研究協力者	西村 哲治	国立医薬品食品衛生研究所	環境衛生化学部	室長
	内野 正	国立医薬品食品衛生研究所	環境衛生化学部	主任研究官
	久保田 領志	国立医薬品食品衛生研究所	環境衛生化学部	研究員

研究要旨

無修飾の C60 について生体試料を対象試料とした液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法(LC-MS/MS)を用いた高感度分析法および、in vivo 系での投与試験を想定した生体試料からの抽出を含む前処理法を検討した。高感度分析法については LC-MS/MS の APCI ネガティブイオンモードで、分離カラムは Develosil RPFULLERENE、移動相はトルエン、アセトニトリルを用いた条件で分析可能であり、定量下限値 $20 \mu\text{g/L}$ であった。生物試料からの C60 の抽出については、トルエンを用いて振とう抽出することで良好な回収率を得ることができ、さらに C70 をサロゲート物質として用いることで、回収率変化を補正することが可能であった。

粒子径の異なる酸化チタン(LU175: 平均粒径 20 nm、LU205: 平均粒径 250 nm)を CHO 細胞あるいは A431 細胞細胞に暴露して細胞毒性および細胞内への取り込みと 3 次元培養皮膚モデルに粒径の異なる酸化チタンを暴露し、細胞毒性および皮膚透過性を検討した。その結果、LU175 は LU205 に比較して CHO 細胞に対する細胞毒性が強く、細胞内に移行しやすいことが分かった。3 次元培養皮膚モデルに対しては使用された酸化チタンのある程度の皮膚透過性が見られたが、細胞死は観察されなかった。皮膚モデルの表皮の最外層の角層のバリアー機能により皮膚の保護作用が示唆された。

A. 研究目的

ナノテクノロジーは、その新機能や優れた特性を持つ物質を作り出す技術により国家戦略としてその開発が進められているが、他方、ナノマテリアルの生体影響については、多くの点で未知である。環境水、飲料水および生体試料中のナノマテリアルの分析法を開発し、産業用素材としての環境水中に放出されたナノマテリアルの暴露状

況の把握を行うことの重要な課題である。また、化粧品の素材として開発されたナノマテリアルが皮膚に塗布された場合の経皮吸収的な安全性を検討するため、経皮的な吸収試験を実施することは必要であり、皮膚に塗布される新素材の安全性の評価に大いに貢献できる。

そこで、本研究では、環境水中に放出され、飲料水を通じて経口的に摂取される可能性のある

フラーレンに着目して、環境水試料や生体内に存在するフラーレンの測定法を検討する。

更に、化粧品の原料として用いられている微粒子酸化チタン（一次粒子径 100 nm 以下）並びに顔料の酸化チタンを用い、培養細胞に対する細胞毒性および酸化チタンの細胞への取り込みについて検討すると同時に 3 次元培養皮膚モデルに対する酸化チタンの細胞毒性および皮膚透過性を検討する。

B. 研究方法

B-1. 実験材料および試薬・試液

フラーレンは米国の MTR 社製の C60 のフラーレン（純度 99.98 %）および C70 のフラーレン（純度 99.5 %）を購入した。

HPLC 用カラムは、Waters 社製の C18 系カラムの Atlantis dC18（粒径：5 μ m, 4.6 mm i.d.×150 mm）および C30 系カラムの Develosil RP FULLERENE（粒径：5 μ m, 4.6 mm i.d.×150 mm）を用いた。特に、この Develosil RP FULLERENE はフラーレン測定用として銘打たれて開発されたカラムであった。

酸化チタンは、ナノマテリアルとして、超微粒子酸化チタン LU175（平均一次粒子径 20 nm）を用い、比較のため、化粧品の顔料用酸化チタン LU205（平均一次粒子径 250 nm）の両者を石原産業株式会社から提供を受けた。なお、いずれの原料も酸化チタンの表面処理が施されていないものを用いた。テトラカラーワンは生化学工業株式会社より購入した。

CHO 細胞は HS 細胞バンクより、ヒト類上皮癌細胞（A431 細胞）は理研細胞バンクより、3 次元培養皮膚モデル（Vitrolife-skin）はグンゼ株式会社より購入した。

その他の試薬は、試薬特級品を用いた。

C60、C70 の原液：C60 あるいは C70 の 5.0 mg を正確に量り、トルエン 5.0 ml を加え、超音波洗浄機に入れ、超音波を照射しながら懸濁させた。

C60、C70 の試料溶液：C60、C70 の原液の一定量を正確に量り、トルエンで希釈し、トルエン 11 当たり

100 μ g を含む溶液を調製した。

B-2. 測定機器

フラーレンの測定には、Waters 社製 Alliance 2695 型 LC-MS/MS 装置を用いた。酸化チタンの測定には、島津製 LC-10ADVP 型液体クロマトグラフポンプを連結した Agilent 社製 4500 型 ICP/MS 装置を用いた。細胞の疎解には、CEM 社製 MARS 5 型マイクロウェーブオーブンを用いた。

B-3. 生体中フラーレンの測定法

組織（50～150mg）をホモジナイズ管に分取し、0.01M のドデシル硫酸ナトリウム（SDS）試液を 0.5ml 加えてホモジナイズした。ホモジネートを遠沈管に移し、トルエン 5ml、酢酸 0.5ml で洗い込み、遮光して室温で 5 時間振とうした。振とう処理後、3500 rpm で遠心分離し、トルエン層を SPC 受器に分取、窒素気流下で 5 倍濃縮し、測定溶液とした。その液 20 μ l を用いて測定を行った。

HPLC 条件

検出器：Waters 社製 Alliance 2695 型 LC-MS/MS 装置

分離カラム：Deveosil RPFULLERENE（粒径：5 μ m, 4.6 mm i.d.×150 mm）

移動相：トルエン/アセトニトリル混液（7:3）

カラム温度：30°C

流量：1 ml/min

MS/MS 条件

イオン化プローブ：大気圧化学イオン化（APCI）のネガティブイオンモード

コーン電圧：120V

コリジョンエネルギー：60eV

モニターイオン：m/z=720（C60）、m/z=840（C70）

B-4. 酸化チタンの細胞毒性測定法

CHO 細胞（ 5×10^4 cells/ml）を 96 穴マイクロプレート（表面積 0.5 cm²/well）に 0.1 ml ずつ播種し、37°C、2 日間培養後、LU175 および LU205 を分散した培地（RPMI 1640-10% FBS）0.1 ml を添加し

24 時間培養した。培地を除き、培地で 5 倍希釈したテトラカラーワン 0.1 ml を加えて 2 時間培養し、475 nm 付近の吸光度を測定した。

B-5. CHO 細胞あるいは細胞への酸化チタンの取り込み実験

60 mm シャーレ (表面積 25 cm²/well) に CHO 細胞 5×10⁴ cells/ml または A431 細胞 4×10⁴ cells/ml 0.1 ml を播種し、CHO 細胞は 2 日間、A431 細胞は 5 日間培養後、培地 (CHO 細胞は RPMI1640-10%FBS, A431 細胞は DMEM-10%FBS) に分散した LU175 および LU205 5 ml を 24 時間暴露した。PBS 5 ml で 5 回洗浄後、0.25% トリプシン溶液で細胞を剥離させ 1400 rpm, 5 分間遠心して細胞を回収し、1.5 ml の PBS を加えて 5 分間超音波水浴に入れて細胞を破碎した。これを 9000 g, 10 分間遠心して得られた上清を 100,000g, 60 分間遠心した。9000 g で遠心分離して得られた沈殿 (細胞膜画分) および 100,000 g で遠心分離して得られた沈殿 (ミクロソーム画分) に 5 ml の濃硝酸を加え、これをテフロン製分解容器に入れてマイクロウエーブオーブン (MRAS5) で湿式分解 (20 分後に 80 PSI になるよう加圧、2 分間保持) し、PBS で 5 倍希釈し、試料溶液とした。一方、100,000 g で遠心分離して得られた上清 (サイトゾール画分) 0.4 ml に培地 0.24 ml, 濃硝酸 0.16 ml を加えて試料溶液とした。各試料溶液 0.1 ml を Hewlett Packard 株式会社製 HP-4500 型 ICP-MS 装置に注入し、7% 硝酸を含む PBS に分散した LU175 および LU205 を用いて作成した検量線から濃度を求めた。

ICP-MS の条件は以下の通りであった。

RF power: 1450W, RF refraction current: 5W, Plasma gas current: 15 l/min, Carrier gas current: 0.85 l/min, Peri Pump: 0.2 rps, Monitoring mass: m/z 48(Ti), Integrating interval: 0.1 sec., Sampling Period: 0.31 sec.

B-6. 3次元培養皮膚モデルでの酸化チタンの

の透過実験

3次元培養皮膚モデル用培地に懸濁させた LU175 および LU205 液 0.1 ml を皮膚モデルの表皮側に設置されたガラスリング中に加え、receptor 側に培養液 0.5 ml を加え、37°C の炭酸ガスインキュベータ中に入れ、1, 2, 4 および 24 時間後に receptor 側の培養液 0.1 ml を採取した。採取された培養液に濃硝酸を最終濃度 7% になるよう添加して酸化チタンの含量を HP-4500 型 ICP-MS 装置で、細胞毒性を LDH アッセイで測定した。ICP-MS の条件は B-5 の条件と同じであった。

C. 研究結果

C-1. フラーレンの分析法の検討

C-1-2. 高感度分析法の検討

Atlantis dC18 カラムを用いての検討: HPLC の分離カラムに C18 系逆相カラムの、2-プロパノール/トルエン混液 (1:9) と 2-プロパノールあるいはトルエンとアセトニトリルのアイソクラティック法で移動相の比率を変化させて C60、C70 の分離条件および検出器感度を調査した。その結果を図 1 に示した。C60 および C70 の分離については、トルエンの比率が低くなるに従って良好になる傾向が認められた。また、検出器感度については、2-プロパノール/トルエン混液 (1:9) と 2-プロパノールの混合割合、40%:60% で (図 1A)、トルエンとアセトニトリルについては 60%:40% でそれぞれ高感度であった (図 1B)。本研究では、C70 をサロゲート物質として用いることを考えており、C60 と C70 の分離が良好で、ピーク形状がシャープであったトルエンとアセトニトリルを移動相として用いることとした。なお、本研究で用いた条件による C60 の定量下限値は 20 μg/l であった。

移動相にトルエンとアセトニトリルの混液を用い、分離カラムに C18 系のカラムの Atlantis dC18 および C30 系のカラムの Devesoil RPFULLERENE を用いて分離条件を比較した。その結果を図 1 および図 2 に示した。その結果、Atlantis dC18 のカラムを用いた時に良好であった移動相がトルエン:アセ

トニトリルの混合割合が 60%:40%の条件に比べ、Deveosil RPFULLERENE のカラムでは、トルエンとアセトニトリルの混合割合が 70%:30%の条件で、ピーク形状がシャープであり、分離が良好となった。更に、C60 および C70 の保持時間も 20 分以内であった。以上の結果より、本研究では移動相にトルエンとアセトニトリルの混合割合が 70%:30%のアイソクラティック法を用い、分離カラムに Deveosil RPFULLERENE を用いることとした。C60 および C70 の検量線を図 3 に示した。

C-1-3. 生物試料を対象とした前処理法の検討

C60 を投与した実験動物の組織からの抽出を想定し、マウスの肝臓と脳を用いて、C60 の添加回収試験を行った。各組織 50~150mg に C60 のトルエン溶液 (1mg/l) を 0.5ml を 0.01 M-SDS 試液 0.5ml に添加し、ホモジナイズした。ホモジネートを遠沈管に移し、トルエン 5ml で振とう抽出した。図 4 に組織からの C60 の抽出法のフローチャートを示す。脳、肝臓ともに MRM クロマトグラムにおける C60 のピーク形状は良好であり、共雑物質等による妨害ピーク、C60 のピークへの干渉は観察されなかった (図 5)。また、C60 の回収率は、脳では 94.6%、肝臓では 85.2%と良好な結果が得られ、本研究で用いた抽出処理によって C60 は十分組織から抽出できることが明らかとなった。

図 4 に回収率補正のサロゲート物質として用いることを想定している C70 について、C60 と同様に肝臓、脳に添加し、添加回収試験を行った。C70 も良好な回収率 (82.0% (脳)、96.0% (肝臓)) を示し、図 5 に示したように C60 あるいは C70 のピーク形状は良好で共雑物質等による妨害ピークの干渉等は観察されなかった。

C70 をサロゲートとして用いた時も良好な結果が得られたことから、C70 を用いて C60 の回収率を補正した。その結果、脳からの回収率が 115%、肝臓からの回収率が 88.8%となり、本研究で用いた抽出法、測定法で組織中の C60 を十分測定することが可能であることが示唆された。

C-2. 培地中の酸化チタンの存在状態

培地に懸濁させて培養細胞に対する毒性を検討するのであるが、最初に培地中の酸化チタンの存在状態を検討した。

0.2% の LU175 および LU205 を DMEM-10%FBS に分散し、LU175 の微粒子酸化チタンの場合は孔径 100 nm の膜フィルター、LU205 の顔料酸化チタンの場合は孔径 450 nm の膜フィルターでろ過し、得られたろ液の一定量に濃硝酸を最終濃度 7%になるよう添加し、2~3 時間放置した。この段階で粒子状の酸化チタンを溶解させた。この液 100 μ l を用いて溶液中のチタンの含量を測定した。

その結果、LU175 の微粒子酸化チタンの懸濁液では、その懸濁物の約 40%が 100 nm のフィルターを透過しており、ナノサイズであることが分かった。LU205 の顔料酸化チタンの懸濁液では、懸濁物の約 62%が 450 nm のフィルターを透過することが出来なかった。

C-3. 培養細胞に対する酸化チタンの細胞毒性

図 6 に示すように CHO 細胞での IC50 は LU175 の場合が 0.12%、LU205 の場合が 1%以上を示した。また、A431 細胞細胞では LU175 の場合が 0.4%、LU205 の場合が 0.55%であった。

C-4. 培養細胞内への酸化チタンの取り込み量

CHO 細胞内での投与した酸化チタンの局在性について、超音波で細胞膜を破壊した成分の遠心分離での回転数の違いにより得られたペレットあるいは上澄液を用いて検討し、その結果を表 1 に示した。

0.2%の酸化チタンの懸濁液で暴露した時、LU175 の約 70%、LU205 の 99.9%以上が細胞膜画分に、LU175 の約 0.1%、LU205 の 0.01%未満がミクロソーム画分に、LU175 の約 30%、LU205 の 0.1%未満がサイトゾール画分に存在した。

また同様に、A431 細胞細胞についても検討し、その結果を表 2 に示した。0.2%の酸化チタンの懸

濁液で暴露した時、LU175 の約 58.1%、LU205 の約 99.6%が細胞膜画分に、LU175 の約 1.2%、LU205 の約 0.4%がミクロソーム画分に、LU175 の約 40.7%、LU205 の 0.1%未満がサイトゾール画分に存在していた。

C-5. 3次元培養皮膚モデルへの影響

試験に用いた 3次元培養皮膚モデルは表皮の最外層部分に角質層が形成されている。試験した最高濃度 1%までは皮膚モデル細胞の死が観察されず、細胞毒性は酸化チタン 1%の懸濁液の濃度までではないことが分かった。表 3 に示すように LU175 の微粒子酸化チタンは LU205 の顔料酸化チタンに比べて 2~3 倍の高い酸化チタンの透過量を示し、どちらの酸化チタンを用いた場合でも、ある一定時間以上では酸化チタンの透過量がプラトーに達することが示された。

D. 考察

D-1. フラーレンに関する考察

本研究において、C60 および C70 について生体試料を対象試料とした LC-MS/MS 装置を用いた高感度分析法および *in vivo* 系での投与試験を想定した生体試料からの C60 および C70 の抽出等の前処理法を検討した。その結果、高感度分析法については LC-MS/MS 装置の APCI ネガティブイオンモードで、Develosil RPFULLERENE カラム、移動相はトルエンとアセトニトリルの混合割合の 70%:30%のアイソクラティック法、カラム温度 30°C、流速 1ml/min で対象とした C60 および C70 が同時に分析時間 20 分で測定できることが分かった。それらの定量下限は 20 μ g/L であった。

また、生物試料からの C60 および C70 の抽出は、トルエンを用いて振とう抽出することで良好な回収率を得ることができた。更に、C70 をサロゲート物質として用いることで、C60 の回収率の補正に利用できることが明らかになった。

D-2. 酸化チタンに関する考察

粒子径の小さい酸化チタン(LU175)は大きいも

の(LU205)に比較して CHO 細胞に対しては明らかに強い細胞毒性を示した。LU175 が細胞内、特にサイトゾール画分に移行しやすいことが示され、サイトゾール画分への LU175 の分布が CHO 細胞の毒性に関与している可能性が示された。しかし、A431 細胞細胞では、粒子径の小さい酸化チタン(LU175)が細胞内に移行しやすいデータが同様に示されたが、細胞毒性の面からは、CHO 細胞で見られたような顕著な毒性が観察されなかった。これは CHO 細胞と A431 細胞細胞の起源の違いも考えられるため、今後の更なる検討の必要があると考えられる。LU175 の方が細胞内に移行しやすかった理由としては、LU205 の懸濁液は添加した後、数時間以内に LU205 の 60%以上が 450 nm 以上の凝集塊を形成し、細胞膜から透過が妨げられたのに対し、LU175 の懸濁液はその約 40%が 100 nm 以下と非常に小さな凝集塊しか形成せず、細胞膜を通して多くが細胞内に取り込まれて CHO 細胞では細胞死が多く発生したことが考えられた。

3次元培養皮膚モデルに対してはある程度の酸化チタンの透過が見られたが、細胞毒性としての細胞死が見られなかった。3次元培養皮膚モデルの表皮の最外層にある角層が酸化チタンの透過のバリアーとして働き、酸化チタンの皮膚モデルへの透過が妨げられたため、3次元培養皮膚モデル中の細胞死が生じなかったものと考えられた。

E. 結論

E-1. フラーレンに関する結論

本研究により、C60 について生体試料を対象試料とした LC-MS/MS 装置を用いた高感度測定法を確立した。

今後の方向性として、*In vivo* 系で投与した C60 の体内分布を明らかにする必要に迫られるが、臓器組織に分配された C60 の臓器中濃度が低いことが考えられる。そのため、今回は組織する組織重量として、50~150mgを考えたが、組織中の C60 濃度が低い場合には、臓器の全量からの抽出を考え、更に、高

倍率の濃縮操作を行う必要があるであろう。そのような場合、組織中の成分による定量妨害が大きくなることが予想される。今後の方向性としては、それらの対策を踏まえた検討が必要であると考えられる。

E-2. 酸化チタンに関する結論

- ・粒子径がナノサイズの酸化チタン(LU175)は粒子径の大きいもの(LU205)に比較して CHO 細胞に対する細胞毒性が強く、細胞内に移行しやすいことが示唆された。

- ・3次元培養皮膚モデルに対してはある程度の透過性が見られたものの、細胞毒性が見られなかった。その理由として、皮膚モデルの最外層の角層のバリアー機能が考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

Tadashi Uchino, Hiroshi Tokunaga. Construction of three-dimensional human skin model consisting of dendritic cells, keratinocytes and fibroblasts. 5th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences. Aug. 21-25. 2005. Berlin, Germany.

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

- ・特許取得・実用新案登録

なし。

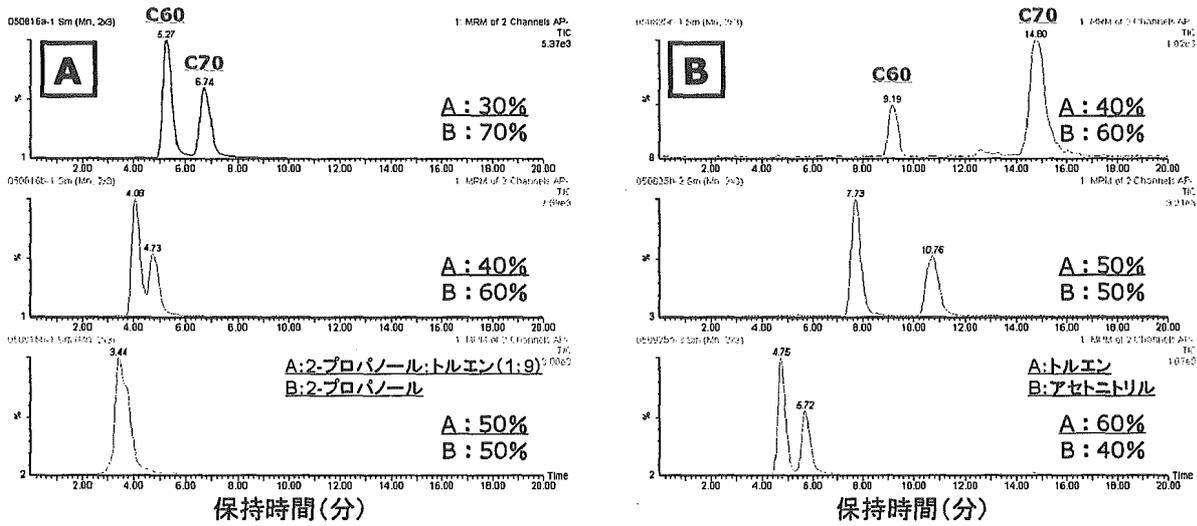


図 1. 2種の移動相によるC60、C70の分離

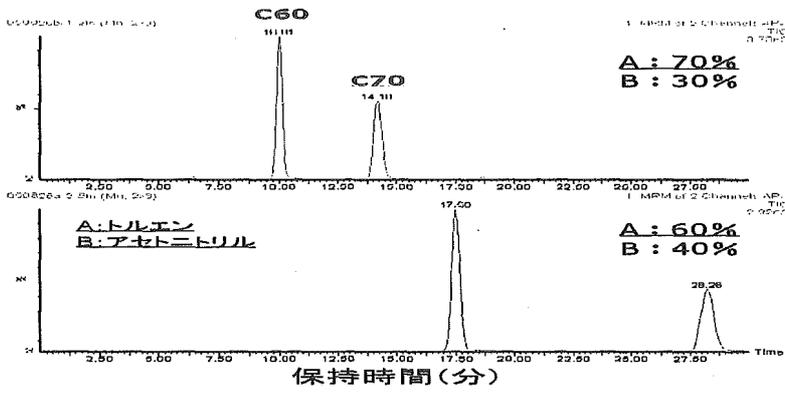


図 2. Devesil RPFULLERENE による C60、C70 の分離状況の比較

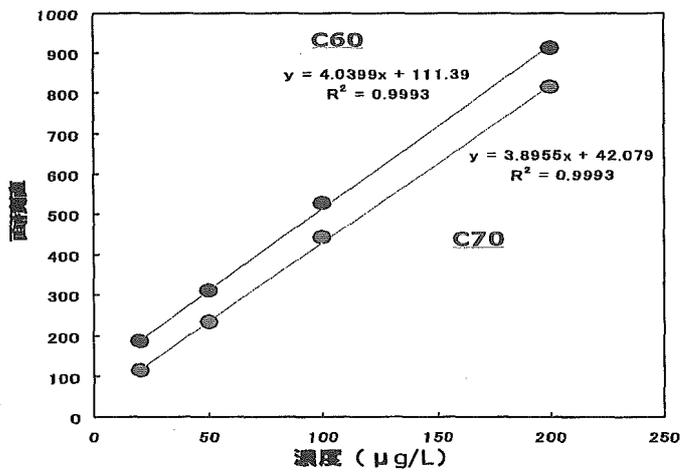


図 3. C60、C70の検量線

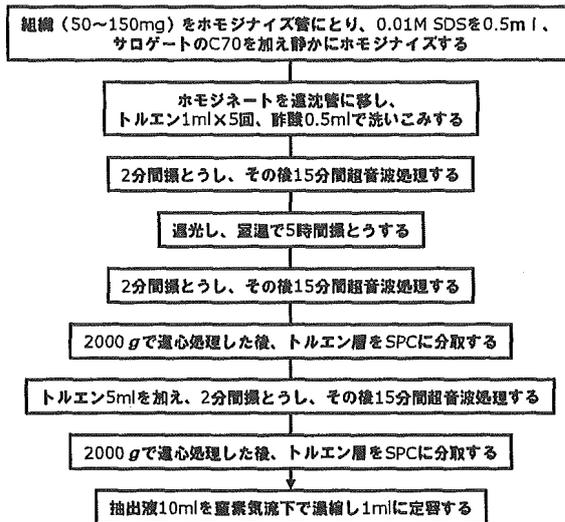


図4 組織からのC60の抽出法のフローチャート

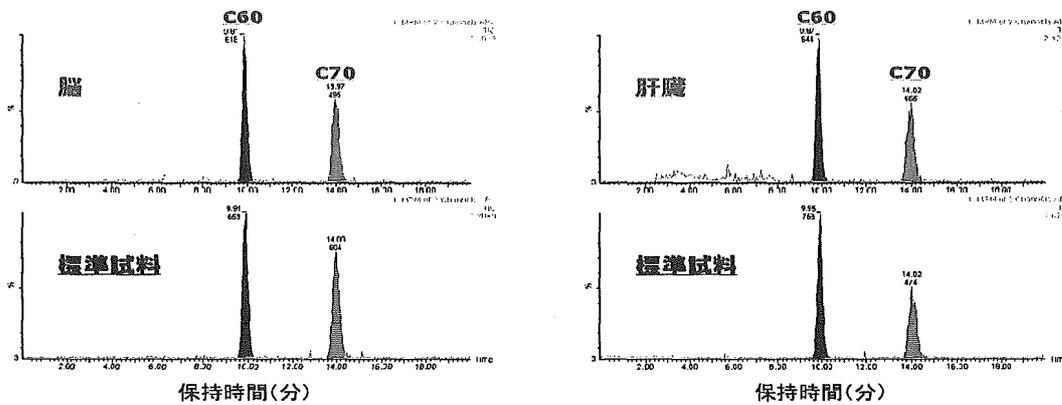


図5 C60、C70のMRMクロマトグラム

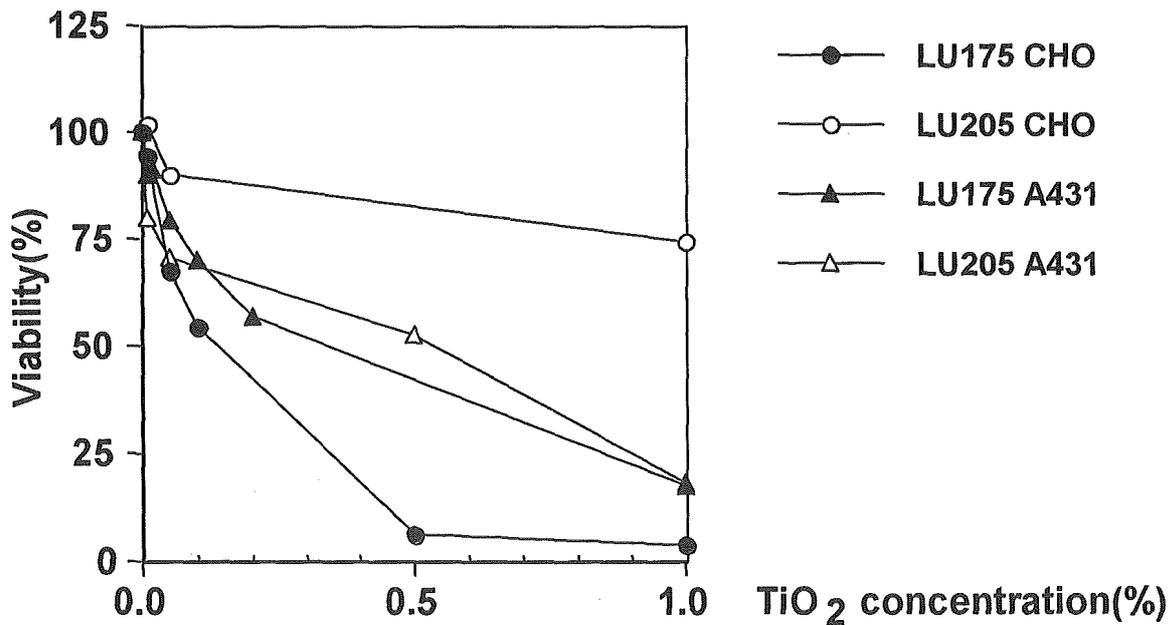


図6. 培養細胞に対する酸化チタンの細胞毒性

表1 CHO細胞への酸化チタンの取り込み量に与える
粒子径の影響

酸化チタン濃度 ($\mu\text{g}/\text{well}$)	LU175	LU205
細胞膜画分	133	5393
ミクロソーム画分	0.27	0.29
サイトゾール画分	57	2.0

酸化チタン存在比 (%)	LU175	LU205
細胞膜画分	69.9	99.96
ミクロソーム画分	0.1	0.005
サイトゾール画分	30.0	0.04

CHO細胞に酸化チタン10000 $\mu\text{g}/\text{well}$ を24時間暴露,
n=3 の平均値

表2 A431への酸化チタンの取り込み量に与える
粒子径の影響

酸化チタン濃度 ($\mu\text{g}/\text{well}$)	LU175	LU205
細胞膜画分	622	1685
ミクロソーム画分	13	6
サイトゾール画分	436	0.7

酸化チタン存在比 (%)	LU175	LU205
細胞膜画分	58.1	99.6
ミクロソーム画分	1.2	0.35
サイトゾール画分	40.7	0.04

A431に酸化チタン10000 $\mu\text{g}/\text{well}$ を24時間暴露,
n=3 の平均値

表3 酸化チタンの3次元培養ヒト皮膚モデルに
対する透過性

	透過量 (ng/cm^2)			
	1 h	2 h	4 h	24 h
LU175 0.1%	269	493	773	1019
LU175 0.2%	509	715	1,123	1,468
LU175 0.5%	719	969	1148	1525
LU175 1%	498	668	876	1091
LU205 0.1%	141	208	249	421
LU205 0.2%	291	383	455	580
LU205 0.5%	200	418	596	790
LU205 1%	168	285	456	633

Vitro-life skin に酸化チタンを24時間暴露, 2回の平均値