

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: 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

分担研究者: 中沢 憲一(国立医薬品食品衛生研究所・薬理部・室長)

研究協力者: 佐藤 薫(国立医薬品食品衛生研究所・薬理部・主任研究官)

研究要旨

ナノマテリアルの神経等の細胞機能に対する影響について評価する方法を検討した。種々の細胞のタンパク質を発現することが可能なアフリカツメガエルの卵母細胞を利用して、フラレーン(C60)の影響の評価に適するかどうか、検討を加えた。C60 は γ -シクロデキストリンで可溶化した。このように調製した C60 溶液は、卵母細胞に発現させた神経型 ATP 受容体チャネルを介するイオン電流を抑制した。しかし、抑制は γ -シクロデキストリンのみでも観察された。また、C60 溶液は 2 時間の処置でも卵母細胞の膜に機能的な損傷を与えず、また 7 日間までの処置でも卵細胞に外見的な変化はみられなかった。以上のことから、この卵母細胞発現系は C60 あるいは他のナノマテリアルの細胞機能への影響評価に利用可能であることが示された。

A. 研究目的

本研究はナノマテリアルの健康影響評価の一環として、神経等の細胞機能に対する影響を評価する系について検討を加えることを目的とする。ナノマテリアルは分子量が大きく、通常の方法では水溶化することが困難である。ナノマテリアルという分子サイズに特徴を持つ物質の特性を活かした水溶化の方法の探索を第一歩とし、探索ののち、細胞を利用した系を用いてその有用性を探る。細胞に発現させるタンパク質としては、神経に存在し、痛覚等に関与することが知られている ATP 受容体チャネルを用いた。

B. 研究方法

ATP 受容体チャネル(P2X2 受容体)をコードする cDNA を Bluescript II SK(-) にサブクローニングした。これを Not I で直鎖化し、鋳型として、RNA をインビトロ合成した。コラゲナーゼ処理により濾胞細胞を除去したアフリカツメガエル卵母細胞に、実体顕微鏡下、

RNA を注入し、18°C で 4-6 日インキュベートすることにより、受容体を発現させた。この卵母細胞に双ガラス電極膜電位固定法を適用し膜電流測定を行なった。

(倫理面への配慮)

特になし。

C. 研究結果

細胞機能に対する影響をみる系としては、培養細胞および発現系が考えられた。培養細胞の利用は目的とする組織の細胞を利用するため、影響を直接的に検討することが可能であるが、反面、種々の細胞に対する影響を調べるためには多大な時間と労力が必要となる。これに対し、発現系を利用すると、目的とする細胞に特徴的なタンパク質を発現させることによって、簡便な検討が可能であり、また、ヒト型タンパク質の cDNA を利用することにより、ヒトに対する影響を予測することもできる。今回の研究では、アフリカツメ

ガエル卵母細胞を発現系とし、この評価系としての適性を検討した。C60をはじめとするナノマテリアルはサイズ(分子量)が通常の化学物質よりかなり大きく、極性のある官能基が特に多くない限りは、水溶性に乏しい。細胞に対する影響を調べるためには、可溶化が必須であるが、工夫が必要となる。これまでに行なわれてきた方法としては、高分子の界面界面活性剤であるポリビニルピロリドンによるC60の可溶化がある。しかし、この方法だと、C60がポリビニルピロリドンに吸着したまま留まり、C60が水相に移行しない可能性がある。他には、糖を用いてこれをC60表面に極性官能基のかわりとなるように吸着させ、可溶化するという方法がある。 γ -シクロデキストリンはそのような糖の1種であるが、この物質は特にC60を2分子で包接することにより可溶化することが知られている。よって、この物質による可溶化を試みた。C60と γ -シクロデキストリンをモル比で1:2となるよう量り取り、近藤の方法に従って、これを乳鉢ですりつぶした。これに水溶液を加え、1,500rpmで10分間遠心し、上清を採取した。この上清を孔径0.8 μm のフィルターで濾過し、ろ液をさらに0.22 μm のフィルターで濾過した。このろ液を吸光度測定したところ、C60とされる259 nmの吸光が認められた。これがC60のモノマー(の錯体)であると仮定するとその濃度は約10 μM であった。なお、C60のみ、あるいは、 γ -シクロデキストリンのみを乳鉢ですりつぶしこれを水溶液とした場合には吸光は全く認められなかった。

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受容体チャンネルを卵母細胞に発現させ、ATPの反応性に対するC60の影響を検討した。C60+ γ -シクロデキストリンにより、ATPで誘発されるイオン電流は抑制された。しかし、この抑制は γ -シクロデキストリン単独でも認められ、C60による抑制を積極的に示すデータは得られなかった。

D. 考察

C60を、これを包接すると予想されている γ -シクロ

デキストリンを用いることにより、可溶化することができた。可溶化されたC60すべてがモノマー(の錯体)となっているとは限らないが、0.22マイクロメートル(220ナノメートル)で濾過しており、これより小さな粒子から成ると考えられる。よって、この水溶液はナノ粒子の影響を調べるのに相応しいと言える。

この水溶液を用いてアフリカツメガエル卵母細胞およびこれに発現させた受容体チャンネルタンパク質に対する影響を検討した。アフリカツメガエル卵母細胞に対する影響は認められず、また、発現させた受容体チャンネルに影響を示すという明確な証拠は得られなかった。このような検討を通じ、この発現系はC60の神経等の細胞機能への影響を評価するのに有用であることが示された。

E. 結論

ナノマテリアルの神経等の細胞機能に対する影響を評価する系について検討を行ない、C60が γ -シクロデキストリンで可溶化され、この水溶液を利用してアフリカツメガエル卵母細胞の発現系で神経型受容体チャンネルへの影響を検討できることを示した。

F. 健康危機情報

なし。

F. 研究発表

1. 論文発表

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)

2. 学会発表

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)

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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: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

分担研究者: 本間正充 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部第一室 室長

研究要旨

フラーレン(C60)の界面活性剤による分散品(nanom)について、その in vitro 遺伝毒性を評価した。Nanom をチャイニーズハムスター由来 CHL 細胞、もしくはヒトリンパ芽球 TK6 細胞で長時間処理したところ、細胞毒性は顕著ではなかった。また、高濃度においてのみ小核の誘発が観察された。細胞内への nanom の取り込みが不十分であることが懸念されたため、電気穿孔法によって TK6 細胞内に強制的に nanom を導入し、その毒性を検討した。細胞毒性、小核誘発とも、導入 nanom の量に依存した反応性を示したが、突然変異頻度の誘発は顕著ではなかった。以上のことから、nanom の in vitro 遺伝毒性を否定はできないが、通常の細胞との接触や、量的なことを考慮すると、その程度は極めて低いものと推定できる。

A. 研究目的

ナノテクノロジーの中心的役割を担い、且つ今後その利用が広範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、その遺伝毒性、細胞毒性に着目して研究をおこなう。今回は、単壁フラーレン(C60)の in vitro 遺伝毒性、細胞毒性を、ほ乳類培養細胞を用いて検討する。

B. 研究方法

1) 試験化合物

フロンティアカーボン社から供与された、nanom 分散品 (lot#5A0224-B) を用いた。本製品は単壁フラーレン C60 を 2%Tween80 で、約 5%に懸濁した分散品である。最終的には 6.40%の有効固形分濃度を持ち、99%が C60 で、0.1%以下の C70

を含む。平均粒子径は 30um であった。

2) 細胞試験系

チャイニーズハムスター由来 CHL 細胞、ヒトリンパ芽球由来 TK6 細胞を用いて試験を行った。CHL 細胞を nanom で 72 時間処理し、処理期間中の細胞増殖と、その後の小核誘発を検討した。TK6 細胞については、48 時間処理し、細胞増殖性、小核誘発性を検討すると同時に、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子をターゲットとした遺伝子突然変異も検討した。

3) 電気穿孔法による nanom の導入

5×10^6 細胞/0.1 ml に調整した TK6 細胞に nanom を添加し、アマクサ社の nucleofector によって、電氣的に nanom を細胞内に取り込ませた。その後、48 時間培養し、細胞増殖性、小核誘発性を検討し、さらに 24 時間培養し、TK 遺伝子突然変異頻度を

検討した。

(倫理面への配慮)

本研究で使用したヒト細胞は米国 American Type Culture Collection (ATCC) に登録済みの株化細胞で、国際的に広く普及している細胞であり、倫理上問題は無い。また、全ての実験は本研究所倫理規定に準拠して行った。

C. 研究結果

10⁴/5ml dish で調整した CHL 細胞に nanom を 33, 100, 333ul 添加し、72 時間培養後、小核誘発性を検討した。また、処理中の細胞増殖性を測定し、細胞毒性の程度を検討した (図 1)。333ul 添加量は 4.2mg/ml の C60 に相当し、in vitro 試験の最高用量 (5mg/ml) とほぼ同程度である。最高用量においても細胞毒性は 50%にとどまった、高用量で小核の誘発が観察されたが、正常の 2 倍程度であった。

2) TK6 細胞を用いた試験

10⁶/5ml flask で調整した TK6 細胞に nanom を 3, 10, 33, 100, 333ul 添加し、48 時間培養後、小核誘発性と TK 遺伝子突然変異を検討した。また、処理中の細胞増殖性を測定し、細胞毒性の程度を検討した。最高用量でのみ顕著な細胞毒性を示した。小核は 100 で 2 倍程度の誘発が観察された。突然変異頻度に変化は無かった。

3) 電気穿孔法による nanom の導入

5X10⁶細胞/0.1ml に調整した TK6 細胞に nanom を 1, 5, 20ul 添加し、アマクサ社の nucleofector を用いて、電氣的に nanom を細胞内に導入した。導入は細胞を遠心し、着色により確認した。48 時間の小核と、細胞増殖性を検討した (図 2)。細胞毒性、小核の誘発は用量依存的に出現した。小核は非導入の 3 倍程度まで増加した。一方、TK 突然変異も同時に試験したが、突然変異の増加は全てにおいて観察されなかった。

D. 考察

ナノマテリアルは、その大きさや形状が、アスベストと類似していることから生体毒性、特に発がん性が懸念されている。しかしながら、ナノマテリアルの多くは不溶性であり、その生体影響に関する試験が極めて困難である。今回用いた、nanom は界面活性剤である Tween 80 により単壁フラーレン C60 を可溶化したサンプルであり、比較的容易に培養細胞を用いた試験に適用できる。繊維芽細胞 (CHL)、血液浮遊細胞 (TK6) を用いて試験したが、両細胞に特に顕著な細胞障害性を示さなかった。また、CHL 細胞の長時間処理によっても、貪食作用による C60 の細胞内への取り込みも認められなかった。一方、高濃度処理での細胞毒性と、小核のわずかな誘発が観察されたが、この作用が、nanom の影響であるのか、界面活性剤の影響であるのかははっきりしない。いずれにせよ、その程度は弱いこと、同時に行った遺伝子突然変異試験では陰性を示したことから、nanom の細胞の自然接触による、細胞毒性、遺伝毒性は極めて弱いものと考えられる。

極めて、わずかと考えられるが、細胞内に取り込まれた nanom の影響を直接評価するため、TK6 細胞に電気穿孔法により直接 nanom を導入し、その影響を調べた。導入 nanom 量に依存して、細胞毒性の増加、小核の誘発が観察されたが、突然変異には影響を与えなかった。

以上の結果から、nanom 化合物が及ぼす in vitro 遺伝毒性に関しては、否定はできないが、あったとしても極めて低レベルと推測される。

ナノマテリアルの細胞毒性に関しては、いくつかの報告があるが、その結論は一定ではない。この原因として、用いるナノマテリアルの形態に依存することが多い。ナノマテリアルの可溶化には今回我々が用いた、乾麺活性剤を用いる方法 (湿式粉砕法)、以外に再結晶法、誘導体化法、配位溶解法などがある。これら可溶化法により、結晶のサイズ、形態、表面の性質などが大きく変化することが多い。米国ライス大学の Colvin らのグループは、テトラヒドロフラン (THF) を用いて再結晶化法によって可溶化した C60 を用いて、細

胞毒性試験等を行い、極めて強い毒性が観察されたことを報告している。しかしながら、この方法では、直径約 50nm のされた C60 粒子の表面が極めて反応性に富む酸化化合物で覆われることが知られており、ここで生じる毒性は C60 本体というよりもその高酸化化合物であるとの見方が強い。これら、酸化化合物が自然にできることも否定できないが、全てを C60 の毒性と判定するには無理があると考えられる。このように、ナノマテリアルの生体毒性を理解するには、化学構造だけでなく、物理的形態や、調整法にも注意し、様々な可能性から評価することが重要であると考えられる。

E. 結論

フラーレン(C60)の界面活性剤による分散品(nanom)について、その in vitro 遺伝毒性を評価した。Nanom 化合物の in vitro 遺伝毒性は否定はできないが、他の遺伝毒性物質と比較するとその程度は極めて弱いものと考えられる。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

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., Kinae, 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)

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

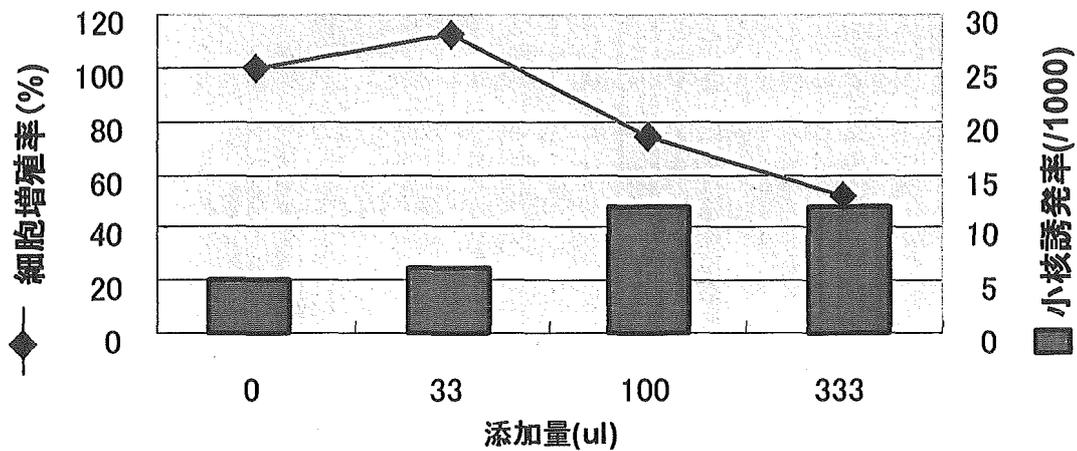
2. 実用新案登録

なし

3. その他

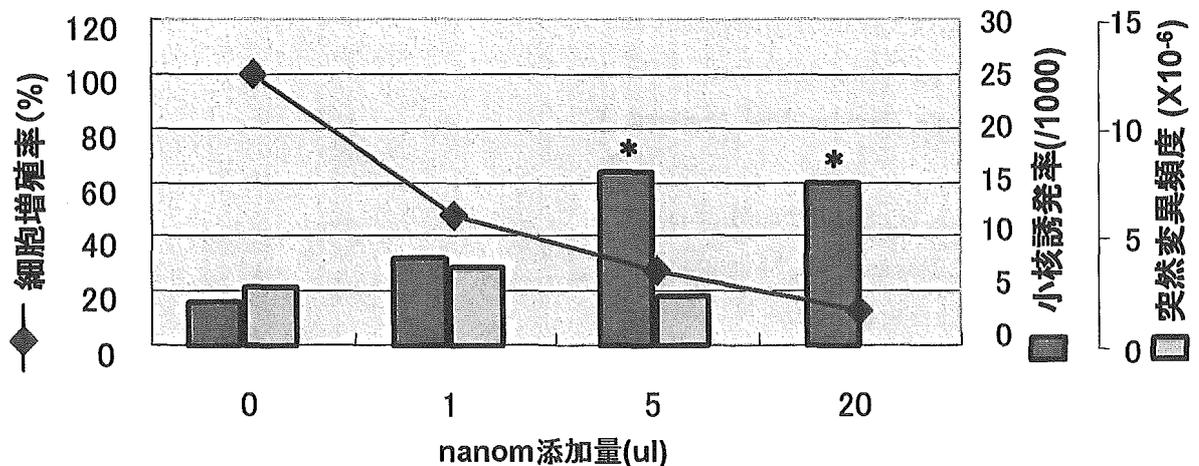
なし

nanom分散品の細胞毒性及び、小核誘発性(I) —CHL細胞—



* CHL細胞 (10^4 cell in 5ml dish) に nanom を添加し、72時間の細胞の増殖性を測定、その後小核標本を作製

nanom分散品の細胞毒性、小核誘発性、遺伝子突然変異誘発性(III) —TK6、電気穿孔法による導入—



* TK6細胞 (5×10^6) に nanom を添加し、amaxa nucleofector で電気穿孔後、48時間の細胞の増殖性を測定、その後小核標本を作製、さらに24時間後にTK突然変異を測定

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：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

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
研究協力者 児玉 幸夫 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 室長
研究協力者 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
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
研究協力者 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

ナノマテリアルの生体影響評価手法の確立に関する基礎的検討課題として、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るが、本研究では製品としての均一性や生産量を考慮して、まずフラーレン (C60) を取り上げ、その体内動態や生体影響を解析することを目的とした。本年度は、本研究班の測定法検討グループで確立された分析手法を用い、経口投与による C60 の体内分布およびその経時的な変化を検討する他、網羅的な生体影響の網羅的解析の取り掛かりとして、まず肝臓の C60 投与による遺伝子発現に対する影響を検討することを計画した。その結果、コーンオイルに溶解した約 200ppm の C60 のマウスへの単回経口投与の 24 時間までは、血液や主要臓器への分布は検出限界以下であった。遺伝子解析では予備的な解析結果の段階ではあるが、投与に伴い発現変動する遺伝子の存在が確認されているが、その生理的意義の解明には今後の検討を要する。

A. 研究目的

ナノテクノロジーは、国家戦略としてその開発が進められている。この中でも、フラーレンやカーボンナノチューブに代表されるナノサイズの新素材であるナノマテリアルは薬物輸送を含む医療への展開を初めとした各種の応用が急速に進んでいる。他方、ナノマテリアルの有害性影響については、多くの点で未知である。近年、神経系や免疫系への影響や DNA 障害などの懸念を示す報告はされているものの、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状況である。また、評価上の問題点として、様々な種類のナノマテリアルやその用途があり、ナ

ノマテリアルの生物学的影響がこれらの多様性に影響されると考えられることから、一様に取り扱うことができないこと、さらに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いないことが挙げられ、平成 16 年度の厚生労働科学特別研究（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）でも、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ところである。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て、フラーレン (C60) を取り上げ、その体内動

態や生体影響を解析することを通して、ナノマテリアルのヒトに与える健康影響のリスクを評価する上で、必要な事項の基礎固めを行うことを目的としている。

B. 研究方法

17年度は、本研究班の測定法検討グループで確立された分析手法を用い、経口投与によるC60の体内分布およびその経時的な変化を検討する他、網羅的な生体影響の網羅的解析の取り掛かりとして、まず肝臓のC60投与による遺伝子発現に対する影響を検討することを計画した。

C60の溶媒はマウスへの影響を考慮し、コーンオイルを用いた。投与前日に、フラーレン粉末3mgを秤量し、15mL容量のガラス容器に移しコーンオイル（和光純薬）10mLを添加した。超音波処理機（タイテック VP-30S）にて、OUTPUT LEVEL 7、30分間の処理を行った。なおこの際、ガラス容器はビニール製サンプルバックで二重に包み、ガラス容器が破損することにより超音波処理機が汚染するのを防ぎ、更にはサンプルバックに水を入れ超音波の伝導を良くした。フラーレンが溶解することにより、コーンオイルは紫色に着色した。溶解しなかったフラーレン粒子を除去するために、5 micro meterのフィルター（ミリポア SLLS025NS 疎水性 PTFE 膜 5 micro meter）を通し、大きい粒子を除去した後、0.2 micro meterのフィルター（ミリポア SLLG025NS 親水性 PTFE 膜 0.2 micro meter）を通し、残存粒子を除去した。投与溶液のC60濃度は、コーンオイル：トルエン=3：7に調整し、紫外・可視吸光度計により312nmの波長で測定した結果、212 μ g/mlであった。

C57BL/6CrSlc 雄 10週齢を日本エスエルシーから購入し、2週間の馴化期間を経て12週齢時に投与実験に用いた。溶媒対象をコーンオイルとし、上記の様に調製したフラーレン溶液を体重1kg当たり10mL強制経口投与した（体重当たりの投与重量は、2.12mg/kgと算出された）。投与後2、4、8、24時間の

時点で解剖した。体内動態検討用に、投与群および対照群各3個体の脳、肺、肝臓、腎臓、血液（心臓採血）、および投与24時間の糞を採取した。採取した臓器は、分析まで-80°Cで保存した。遺伝子発現用に肝を生検様トレパン5mm径で3片採取し、腎を片側採取し、RNA later（アンピオン）に浸し保存した。他は体内動態検討用にドライアイスで速やかに凍結した。

体内動態解析用の臓器（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を0.5ml加え、ホモジナイズした。その後、ホモジネートを遠沈管に移し、トルエン5mL、酢酸0.5mLで順次洗いこみ、遮光して室温で5時間、230min⁻¹で振とう抽出した。振とう後、3500 rpmで遠心し、トルエン層を5ml分取し、窒素気流下で1mlに濃縮した。肝臓、脳の臓器重量が150mgを超えるものについては、各溶液量が、臓器重量が150mgの場合と同じ比率になるように添加した。血液、糞についても同様に行った。

C. 研究結果

今年度は、超音波処理でコーンオイルに溶解する最大量を投与し、体内動態を検討した。投与後24時間までの一般状態には特に特筆すべき点は見あたらなかった。C60を単回強制経口投与し、2、4、8、24時間目に解剖したマウスの脳、肺、肝臓、腎臓、血液、および24時間目の投与群から回収した糞を対象に、C60を調査した。その結果、全ての投与群について、脳、肺、肝臓、腎臓、および血液中C60濃度は定量下限以下であった。一方、糞中からは高濃度で検出され、計算すると、全糞中のC60量は50.7 μ gとなり、体重当たりの投与量は2.12mg/kg（体重は28g）であることから、投与したC60量の85.5%が糞から回収されたことになる。

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、肝を対象にした網羅的遺伝子発現解析を実施中である。

D. 考察

コーンオイルに溶解させた C60 をマウスに単回強制経口投与し、C60 の体内分布の経時的な変化をモニターした。その結果、2、4、8、24 時間目の投与群の脳、肺、肝臓、腎臓の全ての臓器において C60 は検出されなかった。また、血液中からも C60 が検出されず、一方、24 時間目の投与群の糞中から投与量の 85% の C60 が検出されたことから、C60 の腸管から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。

一方、遺伝子解析では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ているが、その生理的意義の解明には今後の検討を要する。

E. 結論

マウスにコーンオイルで溶解させた C60 (212 μ g/ml) を単回経口投与した結果、C60 は血液をはじめ、測定対象としたすべての臓器から検出されなかった。今後は投与方法や投与回数等の検討を行い、C60 の吸収および体内動態についてさらに調査する必要がある。肝を対象にした網羅的遺伝子発現解析での予備的な解析結果では、投与に伴い発現変動する遺伝子の存在が示唆された。

F. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

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 Distributed 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

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.

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

(該当なし)

2. 実用新案登録

(該当なし)

3. その他

(該当なし)

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: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

分担研究者 津田洋幸 名古屋市立大学大学院医学研究科 生体機能分子医学講座 分子毒性学 教授

研究協力者 深町勝巳 名古屋市立大学大学院医学研究科 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 生体機能分子医学講座 分子毒性学
客員教授

研究要旨

C60 や TiO₂ 粒子などの物質は吸入と経皮膚曝露が危惧されるため、専用の吸入設備を要しないラットの肺内投与法を検討し、経気管噴霧法を開発した。さらにラットにおける肺発がんプロモーション作用を検出する実験系を一部立ち上げた。この方法で、ニトロサミンの DHPN による発がんイニシエーション後に C60 を投与してプロモーション作用を検討する実験を開始した。また同様にタバコ煙中の NNK の経気管噴霧による肺発がんイニシエーション法について検討している。また、皮膚発がんプロモーション作用の実験では、既に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) を用いた DMBA-TPA の実験を基盤として、TPA を TiO₂ に置き代えた実験は条件 (予算) が整えば実施出来る。これらの実験は、国際的な安全試験法の確立に大いに貢献出来る。

A. 研究目的

ナノ粒子はその新機能や優れた物理化学的特性から多分野における全く新しい素材として世界中で開発が進められている。しかし、今までに無い素材であるために生体影響についての知見は乏しい。近年、神経系、免疫系への影響や、発がん作用などのいくつかの懸念を示す報告がされているが、リスク評価において信頼性の高いデータは得られていない。また、ナノ粒子の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。本研究では、フラーレンや酸化チタン粒子などの高生産量ナノ粒子を対象物質として、ラットにおける肺と皮膚における発がんプロモーション作用に注目し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) 肺発がんプロモーション試験

通常の吸入装置用いない簡易ラット肺内吸入試験法の開発を行い、フラーレン (C60) の肺発がん・発がんプロモーション作用の有無を評価する事を目的として、既知の肺発がん物質の N-bis(hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN) を選び、0.2%の用量で2週間飲水投与し、投与終了2週間経過後よりフラーレン (C60) の 500ppm 砂糖水分散液溶液 (化学物質評価研究機構作製) を2週に1回1ml/ラットの用量で軽エーテル麻醉科下に素早く経気管肺内投与し全経過40週まで投与・観察する実験を行っている。肺の腫瘍性病変、炎症性の程度・サイトカインの誘導等の解析を行う。またタバコ煙成分発がん物質の 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butane (NNK) (5mg/1ml 生食/肺内投与によるイニシエーション処置の有効性について経時途殺に

よる条件設定の解析を行っている。

2) 皮膚発がんプロモーション試験

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、二酸化チタン粒子 (TiO_2) の皮膚発がんプロモーション作用を検索する。方法は予め

7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA, 2.5mg/ml、アセトン溶解) を1回塗布し (イニシエーション処置)、1週後より TiO_2 (ルチル型、コーティングなし) をテトラオクタン酸ペンタエリスリチルに10% W/W の濃度にて分散させ (検体)、1ml を週1回背部皮膚に塗布し30週にて終了する。皮膚の腫瘍性病変、炎症性の程度、サイトカインの誘導、導入 ras 遺伝子の変異の有無等の解析を行う。現在トランスジェニックラットの生産に入っている。

(倫理面への配慮)

実験は動物保護および倫理指針を遵守し、名古屋市立大学動物実験倫理委員会の審査を経て実験を実施する。

C. 研究結果

1) 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。方法は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 にて墨汁を噴霧して肺胞内に広範に送達されたことを確認した。DMBA-C60 の実験では5週を経過中である。NNK の気管内投与を終了し、5及び10週途殺を終了した。病理標本を作成中である。

2) 皮膚発がんプロモーション試験

Tg は生産中である。

D. 考察

肺吸入試験には高価な設備を要するために、国内ではこれを実施出来る施設は数施設に限られ、それらにおいてナノ粒子の試験を実施出来るかは不明である。国外でも実施出来る施設は少なく、ナノ粒子の吸入毒性試験データは全く不足しているのが現状である。そのために安価に実施出来る方法の開発が望まれていた。我々の開発した方法は被検物質を水溶液の状態ですべて直接肺内に噴霧するもので、墨汁を用いた予備試験では肺胞内に十分送達され、また呼気からの排出は殆どなかった (念のため排気ドラ

フトチャンバー内で実施している)。C60 は化学物質評価機構で水溶分散化に成功しており、共同研究による提供を受けた。DHPN-C60 の実験では肺発がんプロモーションの有無について一定の成果が得られるものとする。また NNK によるイニシエーションの条件を整えばよりヒトに外挿出来る実験が実施出来る。皮膚発がんプロモーション作用の実験では、既に DMBA-TPA の実験で成功しており (Cancer Sci., 2004)、TPA を TiO_2 に置き代えた実験は速やか開始できるものとする。Tg は生産中である。

E. 結論

C60 や TiO_2 粒子などを中心的な対象物質として、専用の設備を要しない肺内投与法を検討し、経気管噴霧法を開発した。これを応用してラットにおける肺発がんプロモーション作用を検出する実験系として、DMBA イニシエーション-C60 プロモーション作用を検討する実験を開始した。また同様にタバコ煙中の NNK の経気管噴霧による肺発がんイニシエーション法について検討している。皮膚発がんプロモーション作用の実験では、既に DMBA-TPA の実験で成功しており (Cancer Sci., 2004)、TPA を TiO_2 に置き代えた実験は、条件 (実施予算) が整えば実施出来る。これらに実験は、国際的な安全試験法の調和に向けた試験法の確立に大いに貢献出来る。

E. 研究発表

1. 論文発表

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-transferase placental form-positive foci, in rat liver. Cancer Lett. 222:11-15, 2005.
Tsuda, H., Fukumachi, 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.

2. 学会発表

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

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。

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: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

分担研究者 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

研究要旨

ナノマテリアルのハザードに関する文献を収集して査読を行い、その信頼性等を評価したうえで整理を行った。

現時点での、これら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があるものもあり、ナノマテリアルのヒトの健康や環境中生物に対する有害性の程度を定量的に把握することは困難である。

今後これらの報告を基に、それぞれのナノマテリアルについて体系的な有害性調査が強く望まれる。

A. 研究目的

21世紀の技術革新を担う新機能材料として、ナノ粒子をはじめとするナノマテリアルへの期待はどんどん大きくなっており、様々な開発が進んでいる。しかしながら、ナノマテリアルの人の健康や環境中の生物への影響については、現時点では不明な点が多い。しかし、ナノマテリアルは、単位表面積が大きくなることから、格段に反応性が高まり、あわせて有害性までもが高まってしまっているのではないかと懸念が上がりつつある。

そこで、ナノマテリアルのヒトに与える健康影響のリスクを評価するに先立って、ナノマテリアルの安全性に関する科学的知見について文献調査を実施した。

B. 研究方法

ナノマテリアルのハザードに関する文献を検索・収集して査読を行い、その信頼性等を評価したうえで整理を行った。なお、意図的に製造

するナノ粒子をはじめとするナノマテリアルを対象とし、非意図的に発生するジゼル排ガスのようなナノ粒子及び自然発生するものは対象外とした。

C. 研究結果

ナノテクノロジー (NT) は急速に発展しており、材料、エレクトロニクス、医学といった種々分野の将来に対し大きな影響を与えると考えられている。科学技術の進歩に対してそれに関係する倫理が立ち遅れ、両者の溝が広がることはしばしば経験することである。NT の発展スピードに対し、その倫理的、法的、社会的なかわり合いについての研究が追いつかなければ、NT が頓挫する危険性もはらんでいる (Mnyusiwalla A. et al 2003)。また、最近ナノマテリアルの商業製品の増加により、NT による利益と環境及び社会的負担についての論争が盛んに行われるようになってきているが、ナノマ

テリアルの直接的ないし間接的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(Colvin V 2003)。

このような状況の下に、現在までに得られているナノマテリアル(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、毒性とその機序、体内分布等に関する報告の概要を示す。

1. ナノ粒子一般

ナノサイズの二酸化チタンとフラーレンの環境下での化学的、生物学的相互作用について検討した報告によれば、これらの物質は水中で凝集し、安定に長期間存在できるサブミクロンで集合体になっており、下等生物への蓄積が促進される可能性があることが示された(Colvin V.L. et al 2004)。

微粒子化された顔料の皮膚吸収は、その表面特性、粒子径、形状等によって影響を受けるが、微粒子化された二酸化チタンは、ヒトの表皮及び真皮では角質層の最外側の表面に堆積するのみで、角質層の深部では検出されなかったとの報告(Schulz J. 2002)がある。吸入されたナノ粒子は、その粒子サイズに従って鼻腔、気管・気管支、肺胞へ拡散し、鼻腔嗅粘膜に蓄積した粒子は、嗅神経に沿って移動して嗅球に達することが示めされた(Oberdorster E. et. al 2004)。同様に、ナノサイズのポリスチレンをラットに吸入暴露し肺及び他の器官への移動を組織学的検査に検討した結果、ナノ物質が肺から離れた種々の器官で確認され、粒子サイズと肺からの移行の間に相関関係が示唆された(Carter J.M. 2004)。更に、生分解性を示すポリソヘキシルシアノアクリレート(PSHA)のナノ粒子と生分解性を示さないポリスチレンのナノ粒子を用いて、ナノ粒子の骨髄及び脾臓での捕獲、局在、保持に関して検討した結果、ナノ粒子は骨髄では内皮細胞を通過後、組織に分散され、あらゆるタイプの食細胞に捕獲され、脾臓ではリンパ濾胞の周辺領域の巨大な捕獲細胞内に局

在することが報告されている(Gibaud S. et al 1996)。また、二酸化チタンの気道内暴露による肺での半減期は、ナノ粒子では微粒子に比べ3倍も長いことが報告されている(Ferin J, et al 1992)。

ナノ粒子の毒性影響については、報告されているほとんどが肺に対するものである。ほとんどのナノ粒子は、同一の化学組成の微細粒子が肺炎を誘発する濃度に相当する濃度で肺炎を誘発することが示されている(Warheit D.B. et al 2004)。また、ポリスチレン粒子の様々なサイズによる炎症誘発性反応を検討した結果、粒子表面積が炎症誘発の1要因であり(Brown D.M. et al 2001)、ナノ粒子はより大きな表面積を有することから、同じ組成、同じ暴露量の大きな粒子に較べより重度の肺炎を引き起こすことが、ニッケルナノ粒子(UFNi)、カーボンブラックナノ粒子(UFCB)及び二酸化チタンのナノ粒子(UFTiO₂)で確認されている(Zhang Q et al 2003, Renwick LC et al 2004, Gilmour PS et al 2004, Driscoll KE, Maurer JK 1991, Baggs RB et al 1997)。この毒性には、表面特性(特に表面積)及び細胞と粒子との相互作用により発生するフリーラジカルが重要な役割を演じていると考えられており(Warheit DB 2004)、UFCBが誘発する前炎症作用と肺胞の透過性亢進には、反応性酸素類(ROS)が関与する血管内皮増殖因子(VEGF)の生成を伴うことが報告されている(Chang C et al 2005)。UFTiO₂による肺炎では、マクロファージによる酸化防止酵素の誘導による対処では不十分であることが示された(Afaq F. et al 1998a)。ナノ粒子による肺毒性の程度には動物や物質による差があり、UFTiO₂による肺炎の程度は、ラット>マウス>ハムスターの順で(Bermudez E et al. 1991, 2-129Bermudez E et al. 2004)、物質間ではUFCB>UFNi>コバルトナノ粒子(UFCo)(Zhang Q et al 1998, Renwick LC et al. 2004)、石綿>UFNiの順(Afaq F et al 1998b)であった。しかし、4種類のナノ粒子(カーボンブラック、コバルト、ニッケル、二酸化チタン)を使用し、ナノ粒子による肺に対する毒性と炎症作用について検討した結果、UFCB及びUFCoの気管内滴下では、好中球の有意な集

簇を惹起したが、UFNi 及びチタンナノ粒子(UFTi) 暴露では好中球の集簇を誘発しなかったとの報告(Dick CA et al 2003)がある。また、ナノ石英粒子とヒト発がん物質に分類される微細石英による肺毒性と微細な TiO₂ 粒子とナノサイズの TiO₂ 棒と粒子による肺毒性について検討した結果、ナノ石英粒子の気管内滴下による肺の炎症と細胞毒性は微細石英によるそれより弱かったが、ナノサイズの TiO₂ 棒と粒子は微細な TiO₂ 粒子と炎症の程度に差がなかったとの報告があり、ナノ粒子による毒性については、表面のコーティングや他の要因が影響するようで、当初の予測より複雑なことが示唆された(Warheit D.B., Webb T.R. et al 2004)。いずれにせよ、吸入されたナノ粒子は、肺に沈着後、大部分が肺胞マクロファージの監視をすり抜け、損傷を受けやすい肺間質に到達することから、限定された毒性のデータベースからの結果からではあるが、全てのナノ粒子が毒性物質となる可能性があることが懸念されている(Warheit DB 2004)。

ナノ粒子の肺以外の器官での微小循環における影響を検討した実験では、UFCB は、肝臓の微細血管への血小板の蓄積を誘発したが、炎症性変化を誘発しなかった(Khandoga A et al 2004)。

また、UFTi は光触媒活性を示し、紫外線の吸収により、DNA 及び RNA を部分的に分解したり(Hidaka, H., Horikoshi, S., et al. 1997)、有機物分子の変形を促進し、皮膚上の生体物質の変化を引き起こす活性物質を誘導するとの報告がある(Picatonotto, T., et al 2001)。

この他、気道下部でのウイルス感染に対する粒子状物質の影響について検討した結果、カーボンブラックがウイルスによる気道感染を増強させたという報告(Lambert A.L et al 2003)、環境中の空気力学的直径 2.5 μm 以下の微粒子状物質(PM_{2.5})中に含まれる金属組成がアレルギー性呼吸器系症状の程度に影響しているという報告(Gavett SH 2003)、ヒドロキシアパタイト(HAP)ナノ粒子が、*in vitro* でヒトヘパトーマ細胞の増殖を抑制し、細胞死(アポトーシス)を惹起するという

報告(Zhi-Su Liu et al 2003)、UF-TiO₂ が、ハムスターの胚細胞において小核及び細胞死(アポトーシス)を誘発し遺伝毒性を示したという報告(Rahman O 2002)がある。

ナノ粒子のマクロファージに対する影響として、UFCB や UFTiO₂ が、*in vitro* において、細胞骨格機能の低下、細胞増殖抑制、細胞死等の細胞毒性を引き越し(Moller W. et al 2002)、UFCB 及び UFTiO₂ が、これらの微細粒子より低用量で食作用を障害したとの報告(Renwick LC et al 2001)、生分解性を示すアルブミンナノ粒子の表面改質により、*in vitro* 条件下、ゼータ電位が 0 に近いアルブミン粒子やゼータ電位を持つナノ粒子が帯電した粒子に比較して食作用能をより低下させるとの報告(Roser M. et al 1998)、ポリイソブチルシアノアクリレート(PIBCA)、ポリイソヘキシルシアノアクリレート(PIHCA)のナノ粒子が、単回暴露においては投与時間と濃度に依存して単核食細胞系の食作用機能を低下させたが、連続暴露ではクッパー細胞の食作用の増強や脾臓のマクロファージの寄与により影響はみられなかったとの報告(Fernandez-Urrusyn R et al 1996)がある。

2. カーボンナノチューブ

単層カーボンナノチューブ(SWCNT)の潜在的な暴露経路について検討した報告では、未精製の SWCNT は十分な攪拌により空気中に放出されるが、その濃度は非常に低く、また、取り扱い時に発生して空気中に浮遊する SWCNT の濃度は、全ての場合で 53 μg/m³ 以下であり、SWCNT の取り扱いによる手袋への付着は、手袋 1 つあたりの濃度は 0.2~6mg と推定された(Maynard A.D. et al 2004)。

SWCNT の毒性影響については、SWCNT による皮膚や肺に対する毒性が報告されている。それによると、SWCNT の実験動物の肺への暴露により、急性影響として外来異物による体内反応と思われる多発性の肉芽腫が惹起されたとする以下の報告がある。すなわち、異化した金属残渣を有する 3 種類の SWCNT をマウス及びラットに暴露

した結果、すべての SWCNT は、カーボンブラックや石英粒子暴露に比べて強い肺毒性を示し、用量依存的に肉芽形成もみられた。肺の組織学的検査から、SWCNT 暴露では進行性肺炎症状を示さずにより多くの肉芽を形成していることが判明し、SWCNT による肉芽形成は石英粒子やシリカのようなダストによる生じる標準的な肺毒性の範疇には入らず、新しい肺毒性の機序が示唆されている(Dreher K.L. 2004)。また、3 種類のカーボンナノチューブ (RNT: Raw nanotubes; PNT: Purified nanotubes; CNT: CarboLex nonotubes)を、マウスに単回気管内投与し、肺への影響を検討した結果、3 種類のカーボンナノチューブのいずれにおいても用量依存的な肉芽腫の誘発がみられ、間質性肺炎を示す例もみられた(Lam CW. et al 2004)。しかし、これらの報告の結果については、問題点も多数あり、慎重に計画された吸入毒性試験を実施することにより、最終的に決定するべきであるとの意見がある(Warheit DB., Laurence BR. et al 2004)。

SWCNT による皮膚及び肺毒性の機序については、SWCNT が、*in vitro* 実験で、ヒト株細胞において細胞周期関連遺伝子、シグナル変換関連遺伝子あるいは接着関連タンパクの発現を減少させて増殖能や接着能を低下させ、細胞死(アポトーシス)を誘発するとの報告(Cui D et al 2005)、SWCNT によりヒトの培養皮膚細胞及び気管上皮細胞に細胞の形態学的変化、細胞死(アポトーシス)、過酸化物の蓄積、抗酸化剤の枯渇が惹起されるとともに酸化ストレス遺伝子の多数に発現の変動がみられ、酸化ストレスによる細胞傷害が示唆されるとの報告(Shvedova A.A et al 2003, 1-34Shvedova A.A et al 2004)があるが、これらの毒性や作用機序については未だ確定されていないのが現状である。一方、皮膚刺激、眼刺激性、アレルギーについては、SWCNT を高濃度を含むフラーレン煤を用いてのヒトボランティアでのパッチテストやウサギを用いた眼刺激試験で陰性を示したという報告(Huczko A. and Lange H 2001)、C60 を高濃度を含んだ煤やカーボンナノチ

ューブ (CNTs)を含有する煤を用いてヒトでのパッチテスト、ウサギを用いた眼刺激試験及びモルモットを用いた肺試験(肺機能検査、気管支肺胞洗浄液を用いた検査)において、いずれの煤においても異常がみられなかったとの報告(Huczko A. et al 2000)もある。

その他、多層カーボンナノチューブをヒト上皮サイトケラチン細胞に暴露した実験では、カーボンナノチューブが細胞内に入り、炎症性サイトカインを放出したとの報告(Monteiro-Riviere NA et al 2005)がある。

3. フラーレン

フラーレンの環境影響としては、nC60 フラーレンをオオミジンコの子虫に 5ppb~2 ppm の濃度範囲で暴露した結果、48 時間 LC₅₀ は 460ppb で、生存したミジンコでは 500 ppb 以上で脱皮と繁殖の遅延がみられたとの報告(1-35Oberdorster E 2004a)、コーティングを施していないフラーレンは、オオクチバスなどの水生生物に酸化的障害や GSH (グルタチオン) の減少を誘発したとの報告(Oberdorster E. 2004b)がある。

フラーレンの吸収や排泄については、ラットでの実験で、水溶性フラーレン誘導体は経口経路ではほとんど吸収されないが、静脈内投与では吸収されて種々の器官に分布することが判明した(Rajagopalan P et al 1996, Yamago S. et al 1995)。吸収後の消失速度や排泄器官は誘導体の種類によって異なり、半減期は 7 時間程度と早いものから(Rajagopalan P et al 1996)、1 週間経過後も大部分や体内に保持されるもの(Yamago S. et al 1995)もあり、また腎臓から排泄されるものと排泄されないものがあるようであった(Rajagopalan P et al 1996, Chen HH et al 1998)。フラーレンマロン酸誘導体 C₆₀C(COOH)₂ の *in vitro* での細胞分布を検討するためヒト及びサル株細胞を使用した実験では、このフラーレン誘導体は細胞膜を通過し、主にミトコンドリアに局在することが確認された(Foley S et al 2002)。

フラーレンの毒性影響については、体系的な

実験はなされていない。水溶性のフラーレン誘導体であるポリアルキルスルホン化 $C_{60}(FC_4S)$ や $C_{60}((CH_2)_4SO_3Na)_{4,6}$ のラットを用いた単回投与毒性試験あるいは反復投与毒性試験が報告されており、これによると、 $C_{60}(FC_4S)$ では、単回投与試験の結果、経口投与では死亡はみられず毒性はないと考えられ、腹腔内試験では、 LD_{50} は約 600 mg/kg/体重と推定された。反復投与試験の結果では、腎臓が主要な標的器官で、 $C_{60}(FC_4S)$ によりネフローゼ(Chen HH et al 1998)、 $((CH_2)_4SO_3Na)_{4,6}$ により尿細管中のファゴソーム傷害伴う腎傷害がみられた(Chen, H.H.C. et al 1997)。ポリ水酸化 C60 誘導体である fulleranol-1 の腹腔内投与によるマウスでの単回投与毒性試験では、 LD_{50} は約 1.2g/kg/体重と推定され、肝臓でのミクロソーム酵素活性の低下がみられた(Ueng TH, et al. 1997)。一方、ベンゼンを媒体とした C60 のマウスでの皮膚適用による単回投与毒性試験あるいは反復投与毒性試験では、毒性はみられなかった(Nelson MA et al 1993)。また、ポリビニールピロリドン(PVP) の存在下で安定化させた C60 の腹腔内投与で胎児中脳部の細胞の増殖と分化を抑制したとの報告(Tschiya T 1996)、水溶性のフラーレン誘導体である樹枝状 C60 付加体はヒト白血病株細胞に対して細胞毒性を示したが、マロン酸 C60 トリス付加体では細胞毒性を示さなかったとの報告(Rancan F, et al 2002)、カルボキシル酸成分を有するフラーレン誘導体がグルタチオン還元酵素の作用を阻害したとの報告(Yamakoshi Y et al 1999, Mashino T et al 2001)がある。

また、フラーレンには光反応性物質としての性質があるようで、これに関する以下の報告がある。すなわち、C60 やポリ(エチレングリコール)で変性させた C60 が、可視光照射下で、マウス細胞株に対して細胞毒性(Nakajima N. 1996)や形質転換作用を示したとの報告(2-39 Sakai A. 1999)、C60 が、PVP 存在下で抗菌作用を示し(Kai, Y. et al 2003, Yamakoshi Y et al 1999)、ラット肝ミクロソーム存在下で、サルモネラ菌に対して変異原性を示したとの報告がある(Sera N. 1996)。この光反応作

用は時間的、濃度依存的に発生する一重項酸素の脂質過酸化反応が原因で(Sera N. 1996, Kamat JP et al 1998)、付加したマレイン酸分子の数が細胞周期への抑制機構に関与していることが示唆されている(Yang XL. Et al 2002)。また、この光反応作用の程度には物質による違いがあり、UVA や UVB 照射下でヒト白血病株細胞に対して細胞毒性を示す水溶性のフラーレン誘導体である樹枝状 C60 付加体とマロン酸 C60 トリス付加体では、後者の方がその作用は強く、この違いは一重項酸素の発生量の違いと考えられた(Rancan F et al 2002)。また、UVA 照射下で C60 のトルエン溶液をマウスの皮膚に反復投与した実験では、紅斑はみられたが、皮膚がんはみられなかった。これについては、生細胞内に C60 が溶解されず、一重項酸素がほとんど生成されなかったことによると考えられた(Moriguchi, T. et al 1999)。しかし、このフラーレン光反応作用が一重項酸素によるものではなく、還元型のオキシラジカル類によるという報告(Yamakoshi Y. 2003, Yamakoshi Y et al 1999, Miyata N et al 2000)もある。また、このフラーレンの光反応作用の利用として、担腫瘍マウスに C60 をポリエチレングリコールで修飾したものを静脈内投与し、腫瘍部位に可視光を照射することによって腫瘍の増殖が抑制されたとの報告(Tabata Y et al 1997)もある。

更に、フラーレンは酸化防止作用やフリーラジカル除去作用を有しているようで、これに関連した報告がある。すなわち、酸化防止作用については、フラーレン誘導体 $C_{60}(OH)_{18}$ (フラレノール)が過酸化水素やクメンヒドロペルオキシドによるラット海馬切片での損傷作用を保護したとの報告(Tsai MC et al 1997)、フラーレン C60 の水溶性誘導体(強力な抗酸化作用のある性質を有する新しい分子)が、細胞培養下で、レボドパによる壊死又はアポトーシスによるクロム親和細胞死を抑制したとの報告がある(Corona-Morales AA et al 2003)。また、水溶性の多水酸基を持つ 2 種類の C_{60} 派生体、 $C_{60}(OH)_{12}$ 及び $C_{60}(OH)_{18-20}O_{3-7}$ ヘミケタール基は、スピン捕捉物質と水酸化ラジカル生

成系の存在下で、優れた抗酸化能を有することが証明された(Dugan LL et al 1996)。この酸化防止作用の強さには物質による違いがあるようで、C60、ビタミンE、C60 誘導体である polar1 及び水溶性の C3C60 及び D3C60 についてその酸化防止作用の強さを検討した実験では、その強さは、脂溶性酸化防止剤としては C60>ビタミンE> polar1、水溶性酸化防止剤としては C3C60> D3C60 の順で、活性部位数、脂質膜中の酸化防止剤の配置及び膜との相互作用の強さが関係していると考えられた(Wang IC, et al.1999)。また、フリーラジカル除去作用としては、フラーレンの水溶性カルボン酸誘導体であるカルボキシフラーレンが、UVB により誘発されるヒトケラチノサイトでの細胞毒性や NMDA(N-メチル-D-アスパレート)、AMPA(α -アミノ-3-ヒドロキシ-5-メチル-4-イソキサゾールプロピオン酸)又は酸素-グルコース欠乏に暴露により引き起こされる培養大脳皮質神経細胞の興奮毒性による細胞死を抑制し、ヒトスーパーオキシドジスムターゼ(SOD1)変異遺伝子を保有したトランスジェニックマウスに対する連続的点滴は、家族性筋萎縮性側索硬化症(家族性 ALS)に起因する死亡と機能的障害を遅延させ (Dugan LL et al 1997)、2-デオキシ-D-リボース (dRib) 及び TNF(腫瘍壊死因子)- α とシクロヘキシイミド暴露によるヒト血液末梢単核細胞でのアポトーシスを抑制したとの報告(Monti D, et al 2000)、神経毒性物質の 1-methyl-4-phenyl-pyridinium(MPP⁺)やクエン酸第一鉄 (2 価鉄)暴露時のカルボキシフラーレンの黒質内への同時注入により、ニューロンの増殖抑制や酸化的損傷が防止されたとの報告(Lin AM et al 1999, Lin AM, et al 2004)がある。また、カルボキシフラーレンの水溶性マロン誘導体が用量依存的にマウスでの大腸菌による血液脳関門透過性及び好中球の浸潤増加を阻害し、死亡を保護したとの報告(Tsao N, et al 1999)、C3 カルボキシフラーレンが 6-ヒドロキシドーパミン(6-OHDA)によるドーパミン作動性ニューロンの神経細胞死を保護したとの報告(Lotharius J et al 1999)もある。しかし、すべてのフラーレン誘導体

がラジカル除去作用を有するのではないようで、3つのエチレングリコール鎖と3つのアンモニウム基を含む官能基が一つ付加された水溶性で多価荷電型のフレロピロリジンC60フラーレンの新規誘導体では、ラジカルにより誘発されるラットの大脳皮質初代培養細胞での神経細胞死に対する保護作用は認められなかった(Cusan, C. et al 2002)。

この他、ヘキサスルフォブチル化したフラーレン誘導体はモルモットの胃の平滑筋を収縮させたが、単一マノン酸 C60 では収縮させなかったとの報告(Huang SS et al 2001)、C60 フラーレン誘導体がアセチルコリン誘導性の動脈弛緩作用を抑制させたとの報告(Satoh M et al 2001)がある。

D. 考察

現時点での、これら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があるものもあり、ナノマテリアルのヒトの健康や環境中生物に対する有害性の程度を定量的に把握することは困難である。

E. 結論

今後これらの報告を基に、それぞれのナノマテリアルについて体系的な有害性調査が強く望まれる。

Afaq F, Abidi P, Matin R, Rahman Q., Activation of alveolar macrophages and peripheral red blood cells in rats exposed to fibers/particles. *Toxicol. Lett.*, 99(3) 175-182 (1998b)

Afaq F, Abidi P, Matin R, Rahman Q., Cytotoxicity, pro-oxidant effects and antioxidant depletion in rat lung alveolar macrophages exposed to ultrafine titanium dioxide. *J. Appl. Toxicol.*, 18(5) 307-312 (1998a)

Baggs RB, Ferin J, Oberdorster G., Regression of pulmonary lesions produced by inhaled

- titanium dioxide in rats. *Vet. Pathol.*, 34(6) 592-597 (1997)
- Bermudez E et al., Long-term pulmonary responses of three laboratory rodent species to subchronic inhalation of pigmentary titanium dioxide particles. *Toxicol. Sci.*, 70(1) 86-97 (2002)
- Bermudez E et al., Pulmonary responses of mice, rats, and hamsters to subchronic inhalation of ultrafine titanium dioxide particles. *Toxicol. Sci.*, 77(2) 347-357 (2004)
- Brown DM., Wilson MR., MacNee W., Stone V., Donaldson K., Size-dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: a role of surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines. *Tox. And Appl. Pharmacology*, 175 191-199 (2001)
- Carter J.M., Use of Fluorescently Labeled Nanoparticles to Determine the Effect of Particle Size on Translocation from the Lung. Abstracts of Papers, 227th ACS National Meeting, Anaheim, CA, United States, March 28-April 1, 2004,pp. IEC-022 (2004)
- Chang C, Chiu H, Wu Y, Li Y, Tsai M, Shen C, Yang C., The induction of vascular endothelial growth factor by ultrafine carbon black contributes to the increase of alveolar-capillary permeability. *Env. Health Perspectives*(on line journal) (2005)
- Chen HH., Ueng TH., Chen S., Chen BJ., Huang KJ., Chiang JY., Acute and subacute toxicity study of water-soluble polyalkylsulfonated C60 in rats. *Toxicol. Pathol.*, 26(1) 143-151 (1998)
- Chen, H.H.C. et al. Renal effects of water-soluble polyarylsulfonated C-60 in rats with an acute toxicity study. *Fullerene Sci. Technol.*, 5(7) 1387-1396 (1997)
- Colvin V. The potential environmental impact of engineered nanomaterials. *Nature Biotechnology*, 21(10) 1166-1170 (2003)
- Colvin V.L., Sayes C.M., Ausman K.D., Fortner J. and Lyons D., Environmental Chemistry and Effects of Engineered Nanostructures. Abstracts of Papers, 227th ACS National Meeting, Anaheim, CA, United States, March 28-April 1, 2004,pp. IEC-018 (2004)
- Corona-Morales AA, Castell A, Escobar A, Drucker-Colin R, Zhang L., Fullerene C60 and ascorbic acid protect cultured chromaffin cells against levodopa toxicity. *J. Neurosci. Res.*, 71(1) 121-126 (2003)
- Cui D, Tian F, Ozkah CS, Wang M, Gao H., Effects of single wall carbon nanotubes on human HEK293 cells. *Toxicol. Lett.*, 155 73-85 (2005)
- Cusan, C. et al., A new multi-charged C-60 derivative: synthesis and biological properties. *Eur. J. Org. Chem.*, 17 2928-2934 (2002)
- Dick CA, Brown DM, Donaldson, The role of free radicals in the toxic and inflammatory effects of four different ultrafine particle types. *Inhal Toxicol.*, 15(1) 39-52 (2003)
- Dreher K.L., Health and Environmental Impact of Nanotechnology: Toxicological Assessment of Manufactured Nanoparticles, *Toxicological Sciences*, 77 3-4 (2004)
- Driscoll KE, Maurer JK., Cytokine and growth factor release by alveolar macrophages: potential biomarkers of pulmonary toxicity. *Toxicol. Pathol.*, 19(4 Pt 1) 398-405 (1991)
- Dugan LL, Gabrielsen JK, Yu SP, Lin TS, Choi DW., Buckminsterfullerenol free radical scavengers reduce excitotoxic and apoptotic death of cultured cortical neurons. *Neurobiol. Dis.*, 3(2) 129-135 (1996)