

平成 18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)
分担研究報告書

研究課題名: ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法の開発のための有害性評価および
体内動態評価に関する基盤研究

分担研究課題名: 高生産量ナノマテリアルの有害性評価指標の開発に関する研究

分担研究者: 菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部長
研究協力者: 高木 篤也 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部室長

研究要旨

高生産量(HPV)ナノマテリアルに対する安全性評価手法の開発検討を優先して行うことを通して、ナノマテリアルの安全性評価に必要な条件を探ることを目的に、ナノマテリアルの短期発がんモデルとして、雄 p53(+/-)マウスに MWCNT、フラーレン、青アスベストをそれぞれ 3mg/animal の用量で単回腹腔内投与し、26 週間観察した。その結果、MWCNT 群で腹腔内に腫瘍が発生し、その程度はアスベストと同程度であることを明らかにした。一方、フラーレン投与では腫瘍発生は観られなかった。以上、p53 ヘテロ欠失マウス実験において、MWCNT により腫瘍発生が認められていることから、現時点では、MWCNT を扱うヒトの暴露を制限することを考慮する慎重さが要求されると考えられた。

A. 研究目的

ナノマテリアルの物理化学的性状は、同一組成を持つ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、一方で生体に対して、特にヒト健康影響に対する有害性評価に対しては、新たな危惧として捉えられる可能性も含んでいる。これまでの通常毒性試験は構造体そのものの大きさに対しては、アスベストや塵肺症原因物質などを除き、特別の考慮はされて来っていないことから、ナノマテリアルの粒径に基づく物理化学的特性を考慮した毒性試験法や有害性評価手法の開発が急務となっている。化審法等これまでの化学物質組成を対象にした安全性評価システムでは、生体内へ吸収されないと考えられる高分子ポリマーを除いて、物質の大きさを意識した評価システムになっておらず、化学物質の行政的申請/認可

体制における産業用ナノマテリアルの安全性評価においても、その大きさに依存した特性を評価するシステムの追加、あるいは新たな枠組みに基づく登録(レジストレーション)システム構築の必要性が想定されている。また、既存化学物質として評価済みの単一元素、或いは組成からできたナノマテリアル、例えば、炭素のみから成るカーボンナノチューブやフラーレンは、現行の化審法などでは新たな審査を必要とせず大量使用可能な状態である。また、酸化チタンなどはすでに化粧品原料としてとして広く使用されており、それらの安全性の評価は急務である。本研究ではこれらの高生産量(HPV)ナノマテリアルに対する安全性評価手法の開発検討を優先して行うことを通して、ナノマテリアルの安全性評価に必要な条件を探ることを目的とする。

B. 研究方法

動物:雄 C57BL/6 を背景にもつ p53 ヘテロ欠失 (p53(+/-))マウス(9-11 週齢、一群 17-19 匹)を実験に使用した。

検体:マルチウォールカーボンナノチューブ (MWCNT)は三井物産より提供された MWCNT サンプルパウダー(三井 LOT No. 060125-01k)を用いた。フラーレンはフロンティアサイエンス社より購入した。陽性対照として青アスベスト(crocidolite)を使用した。検体は 0.5%メチルセルロースに懸濁後、121 度 15 分オートクレーブにて滅菌した。次いで、Tween 80 (シグマ社) (final 1% conc.)を添加し、5 分間超音波で攪拌し、投与に使用した。検体の濃度は各検体とも 3mg/mlとした。

投与方法:投与容量は 1ml/kg 体重とし、マウスに、単回腹腔内投与した。投与量は 3mg/マウスとし、投与後、26W 間観察することとした。対照群には検体を含まずに同様に調整した溶媒を投与した。

病理組織学的検査:死亡動物、途中屠殺動物、最終屠殺動物は、腹腔内及び胸腔内の肉眼的検査を行った後、病巣部位のH&E標本作製し、病理組織学的検査を実施した。

(倫理面への配慮)

使用する動物の屠殺に当たっては、麻酔薬の使用や頸椎脱臼法など苦痛の少ない方法を用いるといった、本研究所の実験動物取り扱い倫理規定に準拠した対応を行っている。ナノマテリアル類及びアスベストの実験に際しては、当研究所の専用特殊実験施設内で、その運用規則に従い実施しており、暴露・漏洩を防止する対策については万全を期して実施している。

C. 研究結果

MWCNT投与群及びアスベスト投与群に、死亡が認められた (Fig.1)。前群では、26週間に90%以上が

死亡した。半数生存期間はMWCNT群で20週、アスベスト群で25週であった。フラーレン投与群で1匹死亡が観られた。対照群に死亡は観られなかった。肉眼的観察から、MWCNT群で強い腹腔内臓器の癒着が観られた。また、アスベスト群でも中程度の腹腔内臓器の癒着が観られた。また、腹腔内に腫瘍がMWCNT群で17匹中14匹(82%)、アスベスト群で18匹中12匹(67%)観られた。一方、フラーレン及び対照群には腹腔内臓器の癒着は観られず、腫瘍も観られなかった。現在、病理組織学的検査を実施中である。

D. 考察

アスベストの短期発がんモデル系として p53(+/-)マウスを用いて、MWCNT の短期発がん試験を実施した。今回の投与経路は、腹腔内投与である。本実験結果は、病理組織学的検査を待たなければならないところであるが、ナノチューブが、中皮細胞と長期間接触することにより、中皮腫を誘発する可能性があることを示唆するものであるが、使用した動物種がP53 ヘテロノックアウトマウスであり、催腫瘍性に鋭敏なマウスであることは、有害性評価上考慮すべき点である。吸入暴露による検証の必要性については、論議の分かれるところであり。齧歯類の吸入暴露手法がいまだ確立していないこともあるが、過去の吸入暴露実験による齧歯類の発癌感受性が人のそれに対して著しく低く、発癌ポテンシャルを過小評価する可能性、そして、むしろ齧歯類における腹腔内投与結果との対応の方が、人における発癌ポテンシャルを正當に評価するのではないかとの指摘がある。何れにせよ、吸入暴露系の確立にはさらに多くの研究リソースを必要とする。さらに手法確立後も慢性影響を検討するために相応の時間が必要な状況である。人における発癌過程には 10 年単位の時間を要する。その為、齧歯類(最長2年程度)で発癌性を発揮するファイバー状物質でも、ガラス繊維の如く体内での変性、分解、或いは排泄が10年単位で進行するものでは、人における発がん性は著しく低下するが殆ど認められない。従って、MWCNT の 10 年単位で見えた場合の生体内運命を明らかにすることが、人における

発がん性を評価する次善の策として考えられる。これには、EC の基準でもある、肺内からの排出半減期を気管内投与方により求めること、及び、生体内変性・分解速度を求める実験の実施が考えられる。

E. 結論

ナノマテリアルの短期発がんモデルとして、雄 p53(+/-)マウスにMWCNTを単回腹腔内投与し、26週間観察した結果、肉眼的所見の結果からは、腹腔内に腫瘍が発生し、その程度は重量ベースではアスベストと同程度であると考えられた。一方、同期間内のフラレン投与では発がん促進性は見られなかった。

F.健康危惧情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表(社会貢献等)

菅野 純、ナノテクノロジー商品化における安全性確認の要諦、ナノテクノロジー商品化調査研究委員会、三井業際研究所(2006.9.8)

H. 知的財産所有権の出願・登録状況(予定も含む)

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: ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法の開発のための有害性評価および
体内動態評価に関する基盤研究

分担研究課題名: ナノマテリアルの発ガン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

徐 結苟 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 研究員

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

TiO₂ 粒子や C60 などの物質は吸入と経皮膚暴露が危惧されるため安全性評価には膨大な設備を要する。専用の吸入設備を要しないラットの肺毒性試験法として、経気管噴霧法を開発し、ナノ粒子の発がんプロモーション作用・発がん性についての簡便で安全な試験システムの開発を行う。この方法で、乳腺発がん高感受性雌ヒト正常型 c-Ha-ras 遺伝子トランスジェニックラット(Tg)を用いたニトロサミンの DHPN による発がんイニシエーション後に TiO₂ 粒子および C60 を投与して肺と乳腺の発がんプロモーション作用を検討した。TiO₂ 粒子については肺内噴霧試験法によって肺において弱い発がんプロモーション作用を示すことが示された。乳腺腫瘍の発生においてもプロモーション作用が示されたが暴露部位と離れておりその機序について検討中である。また、通常ラットにおける C60 の吸入実験は標本作製中である。

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。しかしながらナノ粒子のカーボンブラックと TiO₂ は雌ラットの肺において発がん性を示すことが分かってきた。さらに、神経系、免疫系への影響などのいくつかの懸念を示す報告がされているが、データは十分に得られていないのが現状である。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評価法の基礎的知見の収集を目的とした。

B. 研究方法

通常の吸入装置を用いない簡易ラット肺内噴霧試験法を開発し得た。ラットを軽度麻酔下に気管内に噴霧ノズルを気管内に装入して肺内全体に被検物質を投与するものである。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 Micro Sprayer 気管内に挿入して検体溶液(懸濁液)を噴霧することにより、検体を広範に肺胞内まで投与するものである。インジゴ色素を用いた実験では肺胞内まで充分に送達でき、動物に対する侵襲は軽度であった。この方法にて、TiO₂ の肺発がん・発がんプロモーション作用

の有無を評価し手法の実用性を確認する事を目的として、乳腺発がん高感受性雌ヒト正常型 c-Ha-ras 遺伝子トランスジェニックラット (Tg) に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、TiO₂ (直径 20nm、ルチル型) 500ppm と 250ppm 生食に懸濁して 2 週に 1 回 0.5ml/ラットの用量で肺内投与し全経過 16 週まで投与・観察した。同様にフラレーン (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、F344 雄ラットに DHPN を 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レーン (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/ラットの用量にて肺内投与し全経過 40 週で終了した。肺の腫瘍性病変、炎症性の程度・サイトカインの誘導等の病理学的、生化学的解析を行っている。

(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した。

C. 研究結果

TiO₂ の肺発がん・発がんプロモーション作用実験では、腺腫の頻度と数 (/ラット) は生食群 0%、0 個、250ppm 群 10%、0.1 個、500ppm 群 36%、0.4 個であり 500ppm 群において有意の増加が見られた。肺以外に乳腺においても腫瘍が発生し、投与部位以外にも腫瘍を発生させることも明らかとなった。フラレーン (C60) の肺発がん・発がんプロモーション作用の検索実験では、肺の腫瘍性病変、炎症性の程度・サイトカインの誘導等の病理学的、生化学的解析を行っている。

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。そのために短期で安価に実施出来る in vivo 試験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肺内に噴霧するもので、色素等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)。

TiO₂ は雌ラットの肺に対して発がん性を示すことは既に知られているが、この方法において、雌ラットにおいてプロモーション作用が観察されたことは、過去のデータとこのモデルとの結果の整合性が確認されたと考える。

しかし、今回の実験では DHPN によるバックグラウンドの肺腫瘍が少なかったために用量効果を確認するには至らなかった。また過去の TiO₂ やカーボンブラックについての報告では発生した腫瘍は扁平上皮腫やがんが多いので、次年度にて DHPN の投与量を多くした実験を計画している。また、TiO₂ は肺、肝、卵巣、腎、リンパ節等に蓄積されていることが分かった (徳永班員による)。従って、サテライト実験等を組んで TiO₂ による炎症反応や ROS 産生について解析を進める予定である。また生化学的に肺生体内では凝集体を作ることが知られているため、採取資料から電顕にて形態を観察する予定である。

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考えられる。

E. 結論

TiO₂ 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が検出された。従って過去の報告のように TiO₂ の発がん性を検出するモデルとしては実用化の可能性が示された。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.

2. 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.

3. 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.

4. 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.

5. Suzuki, R., Kohno, H., Suzui, M., Yoshimi, N., Tsuda, H., Wakabayashi, K. and Tanaka, T. An animal model for the rapid induction of tongue neoplasms in human c-ha-ras proto-oncogene transgenic rats by 4-nitroquinoline 1-oxide: its potential use for preclinical chemoprevention studies. *Carcinogenesis.* 27(3): 619-630, 2006.

6. Tsuda, H., Fukamachi, K., Jiegou, X., Sekine, K., Ohkubo, S., Takasuka, N. and Iigo, M. Prevention of carcinogenesis and cancer metastasis by bovine

lactoferrin. *Proc. Jpn. Acad., Ser.B* 82: 208-215, 2006

7. Ueda, S., Fukamachi, K., Matsuoka, Y., Takasuka, N., Takeshita, F., Naito, A., Iigo, M., Alexander, D.B., Moore, M. A., Saito, I., Ochiya, T., and Tsuda, H. Ductal origin of pancreatic adenocarcinomas induced by conditional activation of a human Ha-ras oncogene in rat pancreas. *Carcinogenesis.* 24(12): 2497-2510, 2006

8. Onishi, T., Fukamachi, K., Ohshima, Y., Jiegou, X., Ueda, S., Iigo, U, Takasuka, N., Naito, A., Fujita K., Matsuoka Y., Izumi K., and Tsuda, H. Possible application of human c-Ha-ras proto-oncogene transgenic rats in a medium-term bioassay model for carcinogens. *Tox. Pathol.* 2006, in press.

2. 学会発表

1. 「毒性学からみたアスベスト」、平成18年度日本癌学会シンポジウム「環境発がんについて考える: リスク評価からリスクマネージメントの時代へ」、国立がんセンター国際研究交流会館、2006年7月29日

2. 「夢の素材-ナノ粒子は安全か?」日本学術会議第13回界面シンポジウム「アスベスト問題における理・工学と医学の接点」日本学術会議講堂、2006年9月22日

H. 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。

分担研究報告書

研究課題名: ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法の開発のための有害性評価および体内動態評価に関する基盤研究

分担研究課題名: ナノマテリアルの生体内分析法の確立と体内動態の評価手法に関する研究

分担研究者: 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: 上村 尚 東京都健康安全研究センター環境保健部
小縣 昭夫 東京都健康安全研究センター環境保健部 生体影響研究科
大橋 則雄 東京都健康安全研究センター環境保健部 環境衛生研究科
福原 信隆 東京都健康安全研究センター環境保健部 生体影響研究科
内野 正 国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生化学部
久保田領志 国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生化学部
清水久美子 国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生化学部

研究要旨

ナノマテリアルであるフラーレン類は、様々な産業用材として利用されようとしている。これらのフラーレン類をヒトが経口摂取した場合の健康影響や体内動態等についての情報は極めて少なく、その評価が急務となっている。本年度は、体内への吸収の可能性が高いと想定される腹腔内投与をマウスに対し実施し、組織中からフラーレンを検出するための分析条件の確立と、組織中の濃度を測定し、経口投与研究の評価手法の開発を行った。マウスへの投与溶液として検討した 1-メチル-2-ピロリドン、1-オクタノール、ヘキサンの中で、フラーレンの溶解度は 1-メチル-2-ピロリドンが最も高く、約 800mg/L であった。腹腔内投与で外観的観察による異常や致死作用は認められなかった 1.92 μ l/g body wt の容量で、1-メチル-2-ピロリドンに溶解したフラーレンをマウス C57BL/6CrSlc 雄 8 週齢に、腹腔内投与した結果、投与群の脾臓、肝臓、腎臓からフラーレンが検出され、投与 1 日目のグループについては 5 検体中 4 検体の肝臓、脾臓から、投与 3 日目のグループについては 5 検体中 3 検体の肝臓、腎臓から、また、その中の 1 検体からは腎臓からも検出された。脳、肺、血液からは検出されなかった。検出された三種の臓器では、単位湿重量当たりの濃度は脾臓が最も高く、最高値で 8058 ng/g 湿重当りであった。対照群の全ての個体からは、フラーレンは検出されなかった。測定対象の臓器におけるフラーレンの負荷量分布を算出した結果、肝臓および脾臓が高値を示した。

一方、スクリーニングや生理作用発現メカニズムの解析には、実験動物への投与研究と並行して in vitro 試験系の確立が必要である。そのため、培養細胞へのフラーレン暴露研究のための分散剤の評価を行った。本検討で検討した 9 種の分散剤では、PS、PG、PI、PC および TransFast™ Transfection Reagent が検出可能な濃度でフラーレンを細胞に取り込ませることができ、取り込み・付着量は添加濃度依存的に増加し、TransFast™ Transfection Reagent > PS > PG > PI > PC の順であることが明らかとなった。

また、フラーレンの濃度を変えて暴露した際の TransFast™ Transfection Reagent の取り込

み・付着率は高く、濃度に関わらずほぼ一定であった。その他 4 種のリン脂質の取り込み・付着率は、PS > PG > PI > PC の順で TransFast™ Transfection Reagent に比べ低く、濃度依存性は認められなかった。添加量に対する取り込み・付着効率は、リン脂質の種類に依存することが明らかとなった。したがって、単一成分でリポソームを構成する場合は PS が最もよいと考えられる。PS、PG、PI、PC および TransFast™ Transfection Reagent を分散剤として用いてフラーレンを暴露した結果、全ての分散剤の場合もフラーレンを添加したことによる細胞毒性は認められなかった。

酸化チタンは主に紫外線防御剤として、化粧品中に広く用いられている。本年度は、6 種類の培養細胞を用い、酸化チタンを暴露して細胞毒性および細胞内への取り込みについて検討し、細胞の種類による生体影響の差について基礎的検討を行った。さらに、各種抗酸化剤の酸化チタンが及ぼす細胞毒性に与える影響について検討し、細胞毒性発現メカニズムについて基礎的検討を行った。細胞の種類により細胞毒性に与える影響が異なり、また、粒子径がナノサイズの酸化チタンは粒子径の大きいものに比較して単層培養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。一方、上皮系の細胞ではナノサイズの酸化チタンであっても細胞内への移行は少なく、細胞毒性もほとんど認められないか、弱かった。SOD が最も細胞毒性防御効果が高かったことから、細胞毒性発現にスーパーオキシド等、酸化ストレスの増大が関与している可能性が示唆された

多層カーボンナノチューブ (MWCNT) が呼吸等を介して体内に入った場合の体内運命や体内動態を把握するために、電子顕微鏡による解析方法の開発に向け種々の分散剤を用いた MWCNT の分散方法の検討を行った。さらに、分散状態が良好な分散剤を用いて、電子顕微鏡による MWCNT の形態的特徴を観察し、長さおよび幅の分布を測定した。また、標準物質として使用した MWCNT に含まれている微量元素等についても測定した。MWCNT は繊維状に絡み合い塊となり集合体を形成し、凝集している周囲から突き出た繊維構造は、先端が丸まり中心に中空構造がみられ多層を呈していた。中空構造の部位ではなく繊維の外側に電子密度の高い点状構造が特徴的に散見された。極めて強い電荷を帯びていると考えられた。分散剤として TritonX-100 が検討した分散剤の中で最もよいことが認められた。供試された MWCNT の長さは 1 から 5 μm の分布が多く、10 μm を超える長い MWCNT も散見された (平均長 $4.9 \pm 3.2 \mu\text{m}$)。幅 (直径) は、70nm から 90nm に多く分布している傾向がみられた (平均幅 $100.0 \pm 26.5\text{nm}$)。検出された主な元素は、鉄およびイオウで、塩素およびアルミニウムが合わせて検出された。ICP-MS による、鉄 (質量数 56) の平均濃度は 0.35% であった。イオウの平均値含量は、Lot1 で 455ppm、Lot2 で 486ppm であった。フッ素および臭素は検出限界以下であり、塩素は 20ppm 前後検出された。

A. 研究目的

ナノマテリアルであるフラーレン類は、化学修飾や金属ドーブなどの化学変化体が示す有用な物性のため、様々な産業用材として応用されようとしている。これらのフラーレン類をヒトが経口摂取した場合の健康影響や体内動態等についての情報は極めて少な

く、その評価が急務となっている。しかし、経口摂取したフラーレン (C60) の消化管からの吸収に関する情報は乏しく、健康影響や体内動態等を検討するための評価手法も確立しているとはいえない。そこで、本年度は、体内への吸収の可能性が高いと想定される腹腔内投与をマウスに対し実施し、組織中からフラーレ

ンを検出するための分析条件の確立と、組織中の濃度を測定し、経口投与研究の評価手法の開発を行った。

一方、スクリーニングや生理作用発現メカニズムの解析には、実験動物への投与研究と並行して *in vitro* 試験系の確立が必要である。そのため、培養細胞へのフラーレン暴露研究のための分散剤の評価を行った。

また、ナノマテリアルは近年化粧品分野等への応用が急速に進んでおり、中でも酸化チタンは主に紫外線防御剤として、化粧品中に広く用いられている。UV 照射時の生体影響については比較的多くの報告があるものの、酸化チタンの生体影響については生体中や環境中の測定法も確立していないことなどから不明な点が多くあり、特に一次粒子径の生体への影響については凝集しやすいことなどから報告が少ない。更に複数の培養細胞を用いて生体影響を検討した報告はほとんどない。本年度は、6種類の培養細胞を用い、酸化チタンを暴露して細胞毒性および細胞内への取り込みについて検討し、細胞の種類による生体影響の差について基礎的検討を行った。さらに、各種抗酸化剤の酸化チタンが及ぼす細胞毒性に与える影響について検討し、細胞毒性発現メカニズムについて基礎的検討を行った。

多層カーボンナノチューブ (MWCNT) が呼吸等を介して体内に入った場合の体内運命や体内動態を把握するために、電子顕微鏡による解析方法の開発に向けた基礎検討を行った。生体内での MWCNT の検索を容易に行うため、種々の分散剤を用いた MWCNT の分散方法の検討を行った。さらに、分散状態が良好な分散剤を用いて、電子顕微鏡による MWCNT の形態的特徴を観察し、長さおよび幅の分布を測定した。標準物質として使用した MWCNT に含まれている微量元素等についても測定した。

B. 研究方法

1. フラーレンの Maus への腹腔内投与法の検討および体内分布の評価

Maus への投与溶液の溶剤は、フラーレンの溶解度と既報の LD₅₀ 値を考慮し、1-メチル-2-ピロリドン、

1-オクタノール、ヘキサン の 3 種について検討した。フラーレンは、各溶剤に溶解し、超音波処理後、マグネティックスターラーを用いて一晚攪拌した。溶解した溶液は、投与前に 0.45 μm のフィルターでろ過し、使用した。フラーレンの濃度は、ろ過した溶液の吸光度により算出した。Maus への影響は、各溶媒を Maus の腹腔内に段階的に投与し、外観的な観察と致死により評価した。

C57BL/6CrSlc 雄 8 週齢の Maus を日本エスエルシーから購入し、1 日の馴化期間を経た後、投与実験に用いた。対照群 3 個体、投与群各 5 個体に対しフラーレン 1.92 μl/g body wt の 1-メチル-2-ピロリドン溶液を、腹腔内に単回投与した。投与 1 日後、3 日後に、脳、肺、肝臓、腎臓、脾臓、および血液 (心臓採血) を採取した。採取した臓器は、分析まで -80°C で保存した。

臓器からの C60 の抽出は下記のように行った。50 ~ 150mg の臓器に 0.01M のドデシル硫酸ナトリウムを 0.5ml、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 でホモジネート残渣を遠心管に順次洗いこみ、遮光して室温、5 時間 230rpm/min で振とう抽出した。振とう後、3500rpm で遠心し、分離したトルエン層を分取し、窒素気流下で 1/5 に濃縮した。肝臓、脳等、供試した臓器重量が 150mg を超えるものについては、臓器重量 150mg に相当する比率で各溶液量を増量して添加した。血液についても同様に行った。内部標準物質として C70 トルエン溶液を 0.5ml ホモジネート前に添加し、全抽出操作を通した回収率の補正のために用いた。C60、C70 の定量は液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) を用い、大気圧化学イオン化法 (APCI) のネガティブイオンモードで測定を行った。モニターするプレカーサイオン、プロダクトイオンについては、C60 ではともに m/z=720、C70 ではともに m/z=840 とした。C60 の HPLC での分離は、C30 系逆相カラムの Devesosil RPFULLERENE で行い、移動相にはトルエン:アセトニトリル=70%:30% のアイソクラティック法で、流速 1ml/min で行った。

2. 培養細胞に対するフラーレンの暴露条件の検討

2.1 フラーレン含有リポソームの HepG2 細胞への取

り込み

2.1.1 細胞培養

細胞は、ヒト肝がん由来細胞 HepG2 細胞を用いた。培地は、MEM (MINIMUM ESSENTIAL MEDIUM EAGLE:シグマ社)に、非動化した 10% ウシ胎児血清、1% ペニシリン-ストレプトマイシン溶液(GIBCO 社)、1mMピルビン酸ナトリウム(GIBCO 社)、1% 非必須アミノ酸溶液(GIBCO 社)を添加したものをを用いた。HepG2 細胞は、75cm² 培養フラスコで3~4日毎に 2×10^6 細胞/フラスコの細胞濃度で植え継いだ。

2.2 リポソームの調製

2.2.1 リン脂質の種類

L- α -フォスファチジルコリン(以下 PC), 3-sn-フォスファチジルエタノールアミン(以下 PEA), L- α -フォスファチジル-DL-グリセロール (以下 PG), L- α -フォスファチジルイノシトール (以下 PI), 3-sn-フォスファチジル-L-セリン (以下 PS), (±)- α -トコフェノール、レチノール、エルゴステロール、及び TransFastTM Transfection Reagent(プロメガ社)の 9 種を用いた。TransFastTM Transfection Reagent は、リポソーム調整後、-20°Cに保存し、それ以外の 8 種のリン脂質は、25mg/ml となるようにクロロホルムに溶解して-80°Cで保存した。

2.2.2 リポソームの調製

8 種のリン脂質を任意の濃度となるようにクロロホルムで希釈し、1~0.5ml をガラスチューブに移した。1mg/ml フラーレンのトルエン溶液を任意量加え、攪拌して十分に混和した。窒素ガスでクロロホルムを穏やかにとばして脂質膜を作成した。クロロホルム容量と等量の PBS(-)を加え、攪拌してリポソーム懸濁液とし、培地量の 1/8 容量を細胞に暴露した。約 24 時間、37°C CO₂ インキュベーターで培養し、アッセイまたは細胞の回収を行った。

TransFastTM Transfection Reagent によるリポソームの調製は、キットに添付されたマニュアルにしたがって操作した。

2.2.3 HepG2 細胞に対する細胞傷害性試験

フラーレンを添加していないリポソームもしくはフラーレンを添加したリポソームを HepG2 細胞に暴露し、細胞傷害性の有無を、LDH Cytotoxicity Detection

Kit(タカラ社)もしくは CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay(プロメガ社)を用いて行った。

HepG2 細胞を 96well plate に前述の細胞濃度で植え、約 1 日後にリポソームを暴露し、さらに約 24 時間後に Assay を行った。暴露処理前に、培養用培地のウシ胎児血清濃度を 0.5%に調製した培養液に置換した。37°C、約 24 時間、CO₂ インキュベーターで培養した。LDH アッセイもしくは CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay は、キットに付属するマニュアルにしたがって操作した。490nm の吸光度またはルシフェラーゼ活性を測定し、ネガティブコントロールの吸光度値を 0%とし、ポジティブコントロール値を 100%として各データを算出した。

2.2.4 フラーレン含有リポソームの HepG2 細胞への取り込み・付着量(率)の測定

各リン脂質 8 種において、HepG2 細胞に対してほぼ毒性を示さないリポソーム濃度を求め、そのリポソーム濃度に 5、10、15、20 μ g/ml のフラーレンを添加しフラーレン含有リポソームを使用直前に調製した。HepG2 細胞は、60mm 培養皿に前述の細胞濃度で植え、約 1 日後に培地の 1/8 容量のフラーレン含有リポソーム懸濁液を暴露し、約 24 時間後に回収を行った。回収した細胞は、-20°Cで凍結し、C60 の抽出に用いた。「1. フラーレンのマウスへの腹腔内投与方法の検討および体内分布の評価」の組織と同様の操作でフラーレンを抽出し、液体クロマトグラムタンデム質量分析計を用いて測定した。取り込み・付着率は、60mm 培養皿の細胞に暴露したフラーレン量を 100%として、各データを算出した。

3. 酸化チタンの培養細胞系に対する暴露評価

3.1 試薬

超微粒子酸化チタン (LU175:平均一次粒子径 20 nm ルチル型、表面コーティングなし)および顔料級酸化チタン(LU205:平均一次粒子径 250 nm、ルチル型、表面コーティングなし)は、日本化粧品工業連合会から提供を受けた。テトラカラーワンは、生化学工業株式会社より購入した。グルタチオンペルオキシターゼは、Biogenesis 社より購入した。SOD(細胞生物学用)およびカタラーゼ(生化学用)は、和光純薬株式会社より購入した。その他の試薬は試薬特級を用いた。

3.2 細胞

B16 メラノーマ、CHO 細胞、ラット好塩基球肥満細胞(RBL-2H3 細胞)は HS 細胞バンクより、ヒト類上皮癌細胞(A431)、正常ヒト線維芽細胞(NHSF)は理研細胞バンクより、正常ヒト角化細胞(新生児包皮由来)(NHEK(F))はクラボウ株式会社より、それぞれ購入した。

3.3 培養細胞に対する細胞毒性

96 穴マイクロプレート(表面積 $0.5 \text{ cm}^2/\text{well}$)に B16 メラノーマ、CHO 細胞、NHEK(F)、RBL-2H3 細胞 $1 \times 10^4 \text{ cells/cm}^3$ または A431、NHSF $4 \times 10^4 \text{ cells/mL}$ 0.1 mL を播種し、CHO 細胞は2日間、A431 は5日間、他は3日間培養後、培地(B16メラノーマ、CHO細胞、RBL-2H3細胞は RPMI1640-10%FBS, NHSF は α -MEM-10% FBS, A431、NHEK(F)は Epi-Life-KG2)に分散した 10mg/ml LU175 または 10mg/ml LU205 0.1 mL を 24 時間暴露した。PBS 0.2 mL で5回洗浄後、テトラカラーワン 20 μL と培地 80 μL を加えて 37°C で 2 時間インキュベーションし、マイクロプレートリーダーで 490 nm の吸光度を測定して生存率を求めた。

3.4 培養細胞内への取り込み量の検討

直径 60 mm シャーレ(表面積 $25 \text{ cm}^2/\text{well}$)に B16 メラノーマ、CHO 細胞、NHEK(F)、RBL-2H3 細胞 $2 \times 10^2 \text{ cells/cm}^3$ または A431、NHSF $2 \times 10^2 \text{ cells/cm}^3$ を播種し、CHO 細胞は2日間、A431 は5日間、他は3日間培養後、各々の細胞用の培地に分散した LU175 または LU205 50mg 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 9000xg, 10 分間遠心して得られた上清を 100,000xg, 60 分間遠心した。9000xg で遠心して得られた沈殿(細胞膜画分)および 100,000xg で遠心して得られた沈殿(ミクロソーム画分)に 5 mL の濃硝酸を加え、これをテフロン性分解容器(HP-500)に入れてマイクロウェーブオーブン(MRAS5)で湿式分解(20 分後に 80 PSI になるよう加圧、2分間保持)した。分解溶媒をミリ Q 水で5倍希釈し、試料溶液とした。一方、100,000 g で遠心して得ら

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、上清は7%硝酸を含む PBS に分散した LU175 または LU205 を用いて作製した検量線から濃度を求めた。一方、細胞膜画分及びミクロソーム画分は 5 mL の濃硝酸に添加して湿式分解した後、ミリ Q 水で5倍希釈した LU175 および LU205 を用いて作製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る。

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.

3.5 抗酸化剤の影響

96 穴マイクロプレートに CHO 細胞 $1 \times 10^4 \text{ cells/cm}^3$ を播種し、2日間培養後、培地に分散した 0.1% LU175 0.1 mL を 3 時間暴露した。その後、培地を除き、SOD(0-2000 u/mL)、マンニトール(10 mM)、アスコルビン酸(10 μM)、グルタチオンペルオキシターゼ(20 u/mL) またはカタラーゼ(1 mg/mL)を 21 時間作用させた。PBS 0.2 mL で5回洗浄後、テトラカラーワン 20 μL と培地 80 μL を加えて 37°C で 2 時間培養し、マイクロプレートリーダーで 490nm の吸光度を測定して生存率を求めた。

4. 電子顕微鏡(電顕)による MWCNT の分散および形状分布の検討

4.1 MWCNT の形状観察

用いた電子顕微鏡は、透過電顕(日立 H-7000 型)及び電界放射型走査電顕(日立 S-800 型)である。

透過型電顕用(TEM)には、蒸留水中で 30 分間の超音波処理を行った水懸濁液を、速やかにフォルムバル支持膜を張ったグリッドに載せ、加速電圧 75kV で観察した。走査型電顕用(SEM)には、蒸留水中で 30 分間の超音波処理を行った水懸濁液を、速やかにアルミ支持台に薄く伸展積載した後、白金・パラジウムの金属蒸着を施して加速電圧 15kV で観察を行った。

4.2 分散剤及び分散方法の検討

バイアル瓶中の蒸留水及び分散剤と 5%のドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、TritonX-100 (TX-100) の 5ml に MWCNT を 0.2mg 入れ、270W で 30 分間超音波処理を行い静止して沈殿状態を比較した。

また、Tween-20、アルブミン、カルボキシメチルセルロース (CMC)、高分子化合物、デキストラン、エチルセルロース、コルコート、ポリエルリジン等の分散性を有する薬剤やアセトン、エタノール、メタノール、テトラヒドロフラン (THF) 等の溶媒の各種を用いて目視で沈殿状態を比較した。分散方法は目視で分散状態の良好な分散剤を選択し、MWCNT を超音波で処理した後、ガラス板上に積載して自然乾燥により薄い膜を作製した。その後、電気炉で 480℃、20 分間加熱して分散剤の除去を行った。このガラス板をアルミ支持台に固定して白金・パラジウムの金属蒸着を施し、電界放射型走査電顕で観察した。分散方法の検討に用いた分散剤は、5%濃度の TX-100、Tween-20、アルブミン、高分子化合物、THF に溶解したポリスチレン溶液の 5 種を比較した。

4.3 長さと幅の分布の測定

形状分布の測定は、分散させた CNT を電気炉で熱処理したものを走査型電顕で観察した像を用いた。分散の明瞭な像を写真撮影し、大きく伸ばして CNT 像をマニュアルにて長さ(直径)を計測した。長さは約 400 本、幅は約 100 本の CNT を数えてそれぞれの分布を示した。

4.4 MWCNT 中に混入している微量元素の誘導結合プラズマ質量分析計 (ICP-MS) による鉄の測定

MWCNT を、TFA 製ベッセルに 10~30mg 秤量し、過塩素酸 (60~62%) 20mL および硝酸 (69%) 10mL を加えて分解した。通常、マイクロウェーブ分解装置では安全面から過塩素酸は使用しないが、本分解法を用いても、試料量が少ないことから圧力も急激に上昇せず、残渣は残らず試料は完全に分解した。

マイクロウェーブにより分解した溶液を、TFA 製 50mL メスフラスコで定容とし、その 2mL を採って TFA 製 50mL メスフラスコで定容とし、ICP-MS で測定し

た。

なお、Al の測定値は試料により変動が大きく、原因を検討中である。

4.5 MWCNT 中のイオウの定量分析

イオウの定量は、試料燃焼—吸収—イオンクロマトグラフィーにより行なった。同時に、陰イオン (F、Cl、Br) の測定を行なった。

C. 研究結果

1. フラーレンの Maus への腹腔内投与法の検討および体内分布の評価

Maus への投与溶液は、フルーレンの溶解度と既報の LD₅₀ 値を考慮し、1-メチル-2-ピロリドン、1-オクタノール、ヘキサンの 3 物質について検討した。フルーレンの溶解度は 1-メチル-2-ピロリドンが最も高く、約 800mg/L であった。この結果から、投与溶剤として 1-メチル-2-ピロリドンを選択し、Maus への腹腔内投与による影響を観察した。1.92 μl/g body wt の投与で、外観的観察による異常や致死作用は認められなかった。

Maus C57BL/6CrSlc 雄 8 週齢に、フルーレンの 1-メチル-2-ピロリドン溶液を腹腔内投与した。

フルーレンは、投与群の脾臓、肝臓、腎臓からフルーレンが検出され、投与 1 日目のグループについては 5 検体中 4 検体の肝臓、脾臓から、投与 3 日目のグループについては 5 検体中 3 検体の肝臓、腎臓から、また、その中の 1 検体からは腎臓からも検出された。脳、肺、血液からは検出されなかった。検出された三種の臓器では、単位湿重量当たりの濃度は脾臓が最も高く、最高値で 8058 ng/g 湿重当りであった。対照群の全ての個体からは、フルーレンは検出されなかった。

2. 培養細胞に対するフルーレンの暴露条件の検討

2.1 分散剤の相違によるフルーレンの取り込み効率の比較

本検討で設定した 1mg/ml 以下の暴露条件下では、PS を除き HepG2 細胞への傷害性は認められなかった。したがって、PS 以外のリン脂質は 1mg/ml の濃度を用いた。PS は、15%以下の細胞傷害性が 15%以下となる 0.2mg/ml を用いた。TransFast™ Transfection

Reagent は、キットの組成・含有量が不明のため、フラーレン添加濃度が 1~20 $\mu\text{g/ml}$ 相当にあたる範囲の容量を添加したところ、濃度依存的に細胞傷害性が認められた。したがって、細胞への取り込み効率を考慮し、フラーレン添加濃度が 20 $\mu\text{g/ml}$ 以下となる濃度を用いた。

検討した9種の分散剤を用いて暴露した結果、PS、PG、PI、PC および TransFast™ Transfection Reagent を暴露した細胞からのみフラーレンが検出された。これらの5種の分散剤による取り込み・付着量で比較すると、最も多量に取り込み・付着しているのは TransFast™ Transfection Reagent であり、濃度依存的に取り込み・付着量は増加した。その他の PS、PG、PC、PI の4種のリン脂質を用いて作製したリポソームはどれも濃度依存的に取り込み・付着量は増加し、PS > PG > PI > PC の順であった。

また、フラーレンの濃度を変えて暴露した際の TransFast™ Transfection Reagent の取り込み・付着率は、他のリン脂質を用いて作製したリポソームを分散剤として用いた場合よりも高く、濃度に関わらずほぼ一定(30~35%)であった。その他4種のリン脂質を用いて作製したリポソームを用いた場合の取り込み・付着率は、PS > PG > PI > PC の順であったが、濃度依存性は認められなかった。各リン脂質を用いて作製したリポソームを用いた場合のフラーレン濃度を変化させた取り込み・付着率の差は全て10%以下であり、取り込み・付着効率は成分のリン脂質の種類に依存していた。

2.2 フラーレンによる細胞毒性

PS、PG、PI、PC および TransFast™ Transfection Reagent を分散剤として用いてフラーレンを暴露した結果、全ての分散剤の場合もフラーレンを添加したことによる細胞毒性は認められなかった。

3. 酸化チタンの培養細胞系に対する暴露評価

3.1 培養細胞に対する細胞毒性

LU175 および LU205 の細胞毒性を調べた結果、LU175 の IC50 値は、CHO 細胞では 0.12%、NHSF では 0.02%、RBL-2H3 細胞では 0.2%と、上皮系の細胞(A431(0.4%以上)、B16 メラノーマ(0.9%以上)、NHEK(F)(0.5%以上))に比べ低い値を示し、細胞毒

性が強く表れた。一方、LU205 では6種類全てが0.5%以上を示した。

3.2 培養細胞内への取り込み量の検討

CHO 細胞内の局在性を検討した所、細胞毒性の見られない、0.01%暴露時で LU175 の約 4.6%がサイトゾール画分に存在し、暴露濃度が増えるに従って、サイトゾール画分の存在比は 3.3%(0.05%)、11.3%(0.2%)となり、増加の傾向を示した。ミクロソーム画分には 0.3%未満しか存在しなかった。

一方、LU205 では暴露濃度にかかわらず 99%以上が細胞膜画分に存在した。しかし、サイトゾール画分およびミクロソーム画分にはほとんど分布していなかった。6種類の細胞に 0.01%暴露した後の取り込み量を検討した結果、LU175 では NHSF がサイトゾール画分の局在が 20.9%、ミクロソーム画分の局在が 2.5%と細胞膜を通過して細胞内への移行性が最も高かった。次いで CHO 細胞(4.6%)、A431(3.2%)、16 メラノーマ及び RBL-2H3 細胞(1%)、NHEK(F) (0.1%)、であった。一方、LU205 では6種全ての細胞において 97%以上が細胞膜画分に存在し、サイトゾール画分の存在量は 0.2%以下、ミクロソーム画分の存在量は 2.7%以下であり、細胞膜に局在することが明らかとなった。

3.3 抗酸化剤の影響

SOD、マンニトール、アスコルビン酸、グルタチオンペルオキシターゼ作用時に対照より有意に生存率が増加した。SOD が最も高い細胞毒性発現抑制効果を示し、1000 u/mL 作用時で約 70%の抑制率を示した。なお、カタラーゼ 1 mg/mL 作用時でも細胞毒性発現抑制効果が見られたが、同時に酸化チタン非存在下で細胞毒性を示したので現在検討中である。SOD は 2000 u/mL マンニトールは 10 mM、アスコルビン酸は 10 μM 、グルタチオンペルオキシターゼは 20 u/mL までは酸化チタン非存在下で細胞毒性を示さなかった。

4. 電子顕微鏡(電顕)による MWCNT の分散および形状分布の検討

4.1 CNT の形状観察

透過・走査型の両電顕観察において、MWCNT は繊維状に絡み合い塊となり集合体を形成していた。その凝集している周囲から突き出た繊維構造は、高

倍率の観察で先端が丸まり中心に中空構造がみられ多層を呈していた。これから試料の MWCNT が単層ではなく多層であることが確認された。また、中空構造の部位ではなく繊維の外側に電子密度の高い点状構造が特徴的に散見された。塊状の凝集体は密に絡まっていることと、試料を分取する際にも容器に付着しやすいことから極めて強い電荷を帯びていると考えられる。したがって、MWCNT の性状を検討するには水懸濁液で繊維の長さや幅(直径)の分布を測定することが困難であり、分散剤を用いて塊を崩す必要があった。

4.2 分散剤及び分散方法の検討

バイアル瓶中の蒸留水および分散剤として 5%のドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、TritonX-100(TX-100)、Tween-20、アルブミン、カルボキシメチルセルロース(CMC)、高分子化合物であるデキストラン、エチルセルロース、コルコート、ポリエルリジン等の分散性を有する薬剤やアセトン、エタノール、メタノール、テトラヒドロフラン(THF)等の溶媒の各種を用いて目視で沈殿状態を比較した。

まず、予備的に蒸留水および 5%の SDS あるいは TX-100 の分散剤 5ml に CNT を加えて懸濁させたところ、TX-100 の懸濁状態が良好であった。次に Tween-20、アルブミン、CMC、高分子化合物が比較的良好に分散することができ、SDS はこれらに次いで中程度であった。アセトン、メタノール、エタノール、THF、コルコート、デキストラン、エチルセルロース、ポリエルリジンは水と同様に分散が不良であった。熱処理を行った後の CNT を走査型電顕で確認できた分散剤は、5%の TX-100、Tween-20、アルブミンであり、高分子化合物、THF に溶解したポリスチレン溶液は、CNT が十分に確認できなかった。

以上の観察結果から、TX-100 が検討した分散剤の中で最もよく分散することができると認められた。

4.3 TX-100 の濃度や静置時間が CNT の分散に及ぼす影響

最も分散状態が良好であった TX-100 の濃度の違いによる分散状態について検討した。0.1%および 0.5%、1%、5%の TX-100 の 5ml 溶液に MWCNT を

0.2mg 加え、30 分間の超音波処理を行い、直後および 30 分、1、3、24、48 時間後、目視で分散状態を観察した。更に、直後および 1、24 時間後については支持膜を張ったグリッド上に載せ、透過型電顕を用いて各濃度の時間経過における分散状態の変化を比較した。

TX-100 で分散させた CNT をバイアル瓶内で懸濁状態を濃度および経時的に比較観察すると、1 時間後から凝集が認められる蒸留水と比べて 48 時間後でも懸濁状態は継続していた。48 時間後を注視すると、分散剤の低濃度で若干懸濁が低下する傾向がみられたが、大きな変化ではなかった。透過型電顕で観察すると、分散剤の濃度が高いほど MWCNT の分散が良好である反面、MWCNT に付着あるいは支持膜上に円形の構造を呈したものが散見された。一方、濃度が低い分散剤では MWCNT が絡み合う傾向がみられ、分散状態の不良な像も観察された。超音波処理後の経時変化では顕著な差異を認めないが、24 時間経過で MWCNT の分散が低下する傾向にあった。したがって、MWCNT の形状分布を測定する目的には、5%TX-100 で分散させ、速やかにガラス板上に積載させる必要があることが明らかとなった。

4.4 長さや幅の分布の測定

MWCNT の形状分布を測定するためには、目視による懸濁状態および熱処理による走査型電顕の観察から、5%TX-100 の分散剤を用いたものを使用した。分散の明瞭な像を写真撮影し、大きく伸ばして MWCNT 像をマニュアルにて長さや幅(直径)を計測した。長さは約 400 本、幅は約 100 本の MWCNT を数えてそれぞれの分布を示した。

MWCNT の長さは必ずしも一定ではなく、1 から 5 μm の分布が多く、10 μm を超える長い CNT も散見された(平均長 $4.9 \pm 3.2 \mu\text{m}$)。幅(直径)は、70nm から 90nm に多く分布している傾向がみられた(平均幅 $100.0 \pm 26.5\text{nm}$)。これらの分布から、比較的長い MWCNT が存在していることがわかった。

4.5 多層カーボンナノチューブ中に混入している微量元素の測定

多層カーボンナノチューブの合成過程で使用している金属は、精製により取り除かれているが、微量元

素が残存している可能性があり、生体での炎症作用にこれらが関与するのではと懸念する報告もある。そこで、供された試料について、不純物元素の定性および定量を行なった。

検出された主な元素は、鉄およびイオウで、塩素およびアルミニウムがあわせて検出された。これらの元素は透過型電子顕微鏡に付属したエネルギー分散型 X 線マイクロアナライザーによっても、確認されている。

ICP-MS による、鉄(質量数 56)の平均濃度は 0.35%であった。なお、透過型電子顕微鏡に付属したエネルギー分散型 X 線マイクロアナライザーによる観察では、MWCNT の構造中に鉄およびその他の元素は観察されていない。

4.6 MWCNT 中のイオウの含量

イオウの平均値含量は、Lot1 で 455ppm、Lot2 で 486ppm であった。F 及び Br は検出限界以下であり、塩素は 20ppm 前後検出された。

D. 考察

1. フラーレンのマウスへの腹腔内投与法の検討および体内分布の評価

マウスへの腹腔内投与用溶剤の検討を行い、選択した 1-メチル-2-ピロリドンを用いてフルーレンの腹腔内投与試験を実施した。さらにフルーレンの各臓器への分布を検討した。投与群の脾臓、肝臓、腎臓からフルーレンが検出され、投与 1 日目のグループについては 5 検体中 4 検体の肝臓、脾臓から、投与 3 日目のグループについては 5 検体中 3 検体の肝臓、腎臓から、また、その中の 1 検体からは腎臓からも検出され、検出濃度については脾臓中濃度が高濃度であった。臓器重量と臓器中フルーレン濃度の積から各臓器中のフルーレン量を算出し、測定対象の臓器におけるフルーレンの負荷量分布を調査した。その結果、臓器重量が重く(57.7%)、フルーレンが検出されている肝臓における負荷量が 59.9~85.6%と高値であったのに対し、臓器重量の割合が 2.5%と軽いものの組織中フルーレン濃度が高濃度であった脾臓の負荷量は 13.8%~36.2%と比較的高値を示した。脾臓中のフルーレン濃度が高く、フルーレンの負荷量が

多いことから、体内に取り込まれた C60 が脾臓のマクロファージによって貪食されていることが推測された。今後詳細に検討する予定である。

2. 培養細胞に対するフルーレンの暴露条件の検討

本検討で検討した9種の分散剤を用いて暴露した結果、PS、PG、PI、PC および TransFast™ Transfection Reagent のみが検出可能な濃度でフルーレンを細胞に取り込ませることができると明らかとなった。取り込み・付着量は、添加濃度依存的に増加し、TransFast™ Transfection Reagent > PS > PG > PI > PC の順であることが明らかとなった。

また、フルーレンの濃度を変えて暴露した際の TransFast™ Transfection Reagent の取り込み・付着率は、他のリン脂質を用いて作製したリポソームを分散剤として用いた場合よりも高く、濃度に関わらずほぼ一定(30~35%)であった。その他 4 種のリン脂質を用いて作製したリポソームを用いた場合の取り込み・付着率は、PS > PG > PI > PC の順であったが、濃度依存性は認められなかった。添加量に対する取り込み・付着効率は、リン脂質の種類に依存することが明らかとなった。したがって、リポソームを構成するリン脂質としては PS が最もよいと考えられる。一般的に、PC と PS を濃度比1:1で混合してリポソームを作製することが多く、PC/PS のリポソームによる取り込み量および取り込み率についても検討する予定である。

PS、PG、PI、PC および TransFast™ Transfection Reagent を分散剤として用いてフルーレンを暴露した結果、全ての分散剤の場合もフルーレンを添加したことによる細胞毒性は認められなかった。

3. 酸化チタンの培養細胞系に対する暴露評価

粒子径の小さい酸化チタンは大きいものに比較して NHSF、CHO 細胞 RBL-2H3 細胞に対しては明らかに強い細胞毒性を示し、NHSF に対しては最も強い細胞毒性を示し、サイトゾール画分及びミクロソーム画分への移行性も高かった。一方、NHEK(F)などの上皮系の細胞ではサイトゾール画分及びミクロソーム画分への移行は少なく、細胞毒性もほとんど認められないか、弱かった。NHSF は長軸が 50~100 μm 程度と他の細胞にくらべて細長く、一方、上皮系の細胞

は10~20 μm 程度の円形に近いサイズであることから、これは細胞種及びサイズの違いによるものと思われるが、今後更に検討する必要があると思われる。

一方、粒子径の大きい酸化チタンは細胞の種類によらず細胞毒性をほとんど示さず、サイトゾール画分及びミクロソーム画分への移行は少なかった。これらの結果より細胞内に移行した酸化チタンが細胞毒性に関与している可能性が示唆された。抗酸化剤の影響を検討した所、SOD が最も細胞毒性防御効果が高かったことから、細胞毒性発現にスーパーオキシド等、酸化ストレスの増大が関与している可能性が示唆されたが、細胞毒性試験で暴露される酸化チタンの濃度が%オーダーと非常に高いことから、酸化チタン存在による物理的増殖阻害など他の要因も考えられ、更に検討が必要と思われる。

4. 電子顕微鏡(電顕)によるMWCNTの分散および形状分布の検討

MWCNTは繊維状に絡み合い塊となり集合体を形成していた。その凝集している周囲から突き出た繊維構造は、高倍率の観察で先端が丸まり中心に中空構造がみられ多層を呈していた。これから試料のMWCNTが単層ではなく多層であることが確認された。また、中空構造の部位ではなく繊維の外側に電子密度の高い点状構造が特徴的に散見された。塊状の凝集体は密に絡まっていることと、試料を分取する際にも容器に付着しやすいことから極めて強い電荷を帯びていると考えられる。分散剤として5%のドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、TritonX-100(TX-100)、Tween-20、アルブミン、カルボキシメチルセルロース(CMC)、高分子化合物であるデキストラン、エチルセルロース、コルコート、ポリエリジン等の分散性を有する薬剤やアセトン、エタノール、メタノール、テトラヒドロフラン(THF)等の溶媒の各種を用いて目視で沈殿状態を比較した結果、TX-100が検討した分散剤の中で最もよく分散することができると認められた。長さは約400本、幅は約100本のMWCNTを計測した結果、供試されたMWCNTの長さは1から5 μm の分布が多く、10 μm を超える長いMWCNTも散見された(平均長 $4.9\pm 3.2\mu\text{m}$)。幅(直径)は、70nmから90nmに多く分布している傾向がみられた(平均幅

$100.0\pm 26.5\text{nm}$)。これらの分布から、比較的長いMWCNTが存在していることがわかった。検出された主な元素は、鉄およびイオウで、塩素およびアルミニウムがあわせて検出された。ICP-MSによる、鉄(質量数56)の平均濃度は0.35%であった。イオウの平均値含量は、Lot1で455ppm、Lot2で486ppmであった。フッ素および臭素は検出限界以下であり、塩素は20ppm前後検出された。

E. 結論

1. フラーレンのマウスへの腹腔内投与法の検討および体内分布の評価

マウスへの投与溶液として検討した1-メチル-2-ピロリドン、1-オクタノール、ヘキサンの中で、フラレンの溶解度は1-メチル-2-ピロリドンが最も高く、約800mg/Lであった。腹腔内投与で外観的観察による異常や致死作用は認められなかった1.92 μg /body wtの容量で、1-メチル-2-ピロリドンに溶解したフラレンをマウスC57BL/6CrSlc雄8週齢に、腹腔内投与した結果、投与群の脾臓、肝臓、腎臓からフラレンが検出され、投与1日目のグループについては5検体中4検体の肝臓、脾臓から、投与3日目のグループについては5検体中3検体の肝臓、腎臓から、また、その中の1検体からは腎臓からも検出された。脳、肺、血液からは検出されなかった。検出された三種の臓器では、単位湿重量当たりの濃度は脾臓が最も高く、最高値で8058 ng/g湿重当りであった。対照群の全ての個体からは、フラレンは検出されなかった。測定対象の臓器におけるフラレンの負荷量分布を算出した結果、肝臓および脾臓が高値を示した。体内に取り込まれたフラレンが脾臓のマクロファージによって貪食されていることが考えられたが、腹腔内投与したフラレンが、脾臓の膜表面に吸着している可能性も考えられた。今後は、得られた結果をふまえて、ラットへの経口投与実験を実施し、体内に取り込まれたフラレンの挙動について検討を行う予定である。

2. 培養細胞に対するフラレンの暴露条件の検討

本検討で検討した9種の分散剤では、PS、PG、PI、PCおよびTransFast™ Transfection Reagentが検出

可能な濃度でフラーレンを細胞に取り込ませることができ、取り込み・付着量は添加濃度依存的に増加し、TransFast™ Transfection Reagent > PS > PG > PI > PC の順であることが明らかとなった。

また、フラーレンの濃度を変えて暴露した際の TransFast™ Transfection Reagent の取り込み・付着率は高く、濃度に関わらずほぼ一定であった。その他 4 種のリン脂質の取り込み・付着率は、PS > PG > PI > PC の順で TransFast™ Transfection Reagent に比べ低く、濃度依存性は認められなかった。添加量に対する取り込み・付着効率は、リン脂質の種類に依存することが明らかとなった。したがって、リポソームを構成するリン脂質としては PS が最もよいと考えられる。

PS、PG、PI、PC および TransFast™ Transfection Reagent を分散剤として用いてフラーレンを暴露した結果、全ての分散剤の場合もフラーレンを添加したことによる細胞毒性は認められなかった。

3. 酸化チタンの培養細胞系に対する暴露評価

細胞の種類により細胞毒性に与える影響が異なり、また、粒子径がナノサイズの酸化チタンは粒子径の大きいものに比較して単層培養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。細胞毒性発現にスーパーオキシド等、酸化ストレスの増大が関与している可能性が示唆された。

4. 電子顕微鏡(電顕)による MWCNT の分散および形状分布の検討

MWCNT は繊維状に絡み合い塊となり集合体を形成し、凝集している周囲から突き出た繊維構造は、先端が丸まり中心に中空構造がみられ多層を呈していた。中空構造の部位ではなく繊維の外側に電子密度の高い点状構造が特徴的に散見された。塊状の凝集体は密に絡まっていることと、試料を分取する際にも容器に付着しやすいことから極めて強い電荷を帯びていると考えられた。分散剤として TritonX-100 が検討した分散剤の中で最もよいことが認められた。供試された MWCNT の長さは 1 から 5 μm の分布が多く、10 μm を超える長い MWCNT も散見された(平均長 4.9 ± 3.2 μm)。幅(直径)は、70nm から 90nm に多く分布している傾向がみられた(平均幅 100.0 ±

26.5nm)。検出された主な元素は、鉄およびイオウで、塩素およびアルミニウムがあわせて検出された。ICP-MS による、鉄(質量数 56)の平均濃度は 0.35% であった。イオウの平均値含量は、Lot1 で 455ppm、Lot2 で 486ppm であった。フッ素および臭素は検出限界以下であり、塩素は 20ppm 前後検出された。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 内野 正、五十嵐良明、徳永裕司、広瀬明彦:酸化チタンの培養細胞に対する生体影響評価、第 12 回バイオアッセイ研究会・日本環境毒性学会合同研究発表会 2006.9
- 2) Nishimura T., Kubota R., Tahara M., Nagaoka-Hamano M., Shimizu K., Hirose A. and Tokunaga H. :Biological Effects of Fullerene C60 in Mouse Embryonic Stem Cells. EUROTOX2006/6 CTDC Congress. 2006.9.
- 3) 西村哲治, 清水久美子, 久保田領志, 田原麻衣子, 広瀬明彦, 徳永祐司:培養細胞に対するフラーレン(C60)の影響評価法の検討, フォーラム 2006 衛生薬学・環境トキシコロジー講演要旨集, p270, 2006.10.
- 4) 西村哲治, 清水久美子, 久保田領志, 田原麻衣子, 長岡(浜野)恵, 広瀬明彦, 徳永祐司:フラーレンのマウス幹細胞に対する影響, 第 43 回全国衛生化学技術協議会年会, p155-156, 2006.11.
- 5) Kubota, R., Tahara, M., Shimizu, K., Tokunaga, H., Hirose A., and Nishimura, T. (2006) :Tissue distribution of C60 fullerene in mice after intraperitoneal administration by liquid chromatography - tandem mass spectrometry. 27th Annual Meeting of American College of Toxicology, Indian Wells, USA, November, abstract, 66.
- 6) Nishimura T., Hirose A., Kanno J., Nakazawa K.,

Honma M., Mogami T., Tuda H., Arai H., Takatsuki M., Ichinose F., Yakata N. and Wako K.: The Framework of the Research Projects for Establishment of Health Risk Assessment Methodology of The Manufactured Nanomaterials in Japan NIHS. Twenty-Seventh Annual Meeting of The American College of Toxicology. 2006.11.

- 7) 大村香織, 安達玲子, 西村哲治, 奥直人, 鈴木和博: 化学物質が免疫系食細胞の分化に及ぼす影響について, 日本薬学会第 127 年会要旨集, 2007.03.
- 8) 福森信隆, 大橋則雄, 高畑淳, 高橋博, 安藤弘, 久保喜一, 長澤明道, 小縣昭夫, 西村哲治, 上村尚: 多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の形状および分散に関する検討, 日本薬学会第 127 年会要旨集, 2007.03.

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

平成 18 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)
分担研究報告書

研究課題名: ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法の開発のための有害性評価および
体内動態評価に関する基盤研究

分担研究課題名: ナノマテリアルの吸入暴露手法の開発に関する研究

分担研究者: 一瀬 文雄 (財)化学物質評価研究機構 日田事業所 主任
研究協力者: 辻村 和也 (財)化学物質評価研究機構 日田事業所 副長
後藤 純平 (財)化学物質評価研究機構 日田事業所 研究員
日野 敦史 (財)化学物質評価研究機構 日田事業所 研究員
秦 ユカリ (財)化学物質評価研究機構 日田事業所 研究員

研究要旨

ナノテクノロジーの中心的役割を担うナノマテリアルは、新しい産業用途への開発として期待される一方、生体への影響が危惧されており、特に環境中からの摂取による影響が強く懸念される。今回、カーボンナノチューブの一種であるマルチウォールナノチューブ(MWNT)を用い、ダスト状態での有り姿での吸入暴露法、ミスト状態でのナノレベルでの吸入暴露法を検討した。

その結果、ダスト発生については、粒子の凝集、経時的な安定性や再現性の課題はあるが、暴露濃度として約 0.5~6 mg/m³ での 4 時間の発生が可能であった。ミスト発生については、Tween 20 を界面活性剤として用いることで MWNT をナノ粒子として発生できる可能性が見出された。今回、MWNT 吸入暴露による生体への毒性影響評価に向けた技術的な基盤が構築されたものと考えられた。

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的にその開発が進められている。その中心的役割を担うナノマテリアルは、少なくとも 1 次元の大きさが 100 ナノメートル以下の物質と定義され、近年急速にその種類や生産量が増加しつつある。ナノマテリアルの特徴的な物理化学的性状は、新しい産業用途への開発として期待される一方、生体、特にヒトの健康影響に対する有害性が危惧されている。特に暴露経路を考慮した場合、環境中(労働環境、生活環境)に放出されたナノマテリアルの経気道(吸入)摂取による影響について

の懸念は想像に容易である。これまで多岐にわたるナノマテリアルが開発されてきたが、中でもカーボンナノチューブ(CNT、シングルウォールナノチューブ: CWNT、マルチウォールナノチューブ: MWNT)はその形状(円筒状)が最近社会的問題となっているアスベストに近似していることから、吸入暴露による毒性影響の評価が急務とされている。しかしながら、粒子の分散性の問題などから、今日まで CNT の吸入発生法は確立されておらず、吸入暴露による評価もほとんど皆無である。

したがって、本研究においては、MWNT を被検体とし、原体粉末(ダスト)を用いて可能な限り分散させ

た発生法を検討した(有り姿での発生)。さらに、柴田科学株式会社の協力のもと、MWNT を水性懸濁液とし、液中でMWNTを分散させた状態での発生法を検討した(ミスト状態でのナレベルの発生)。

B. 研究方法

B-1. 実験材料および試薬・試液

マルチウォールナノチューブ(MWNT)は信州大学工学部の厚意により享受した。

Tween 20 は関東化学株式会社より購入した。

ミスト状態の発生において、MWNT の調製には Milli Q (Millipore)で作製した超純水を使用した。

B-2. 暴露チャンバー

MWNT の発生には flow-past 型の鼻部暴露チャンバー(SIS-R36B 型、柴田科学株式会社)(図1)を用い、チャンバー中管(ステンレス鋼電解研磨仕上、内容積:約 1.9 L)及びチャンバー外管(透明アクリル及び硬質塩化ビニル、内容積:約 19 L)で構成される。

B-3. 発生法

ダスト状態及びミスト状態での発生装置の概略図をそれぞれ図2及び図3に示す。

1) ダスト状態での発生(図2)

MWNT の原体粉末約 2~5 g を丸底フラスコに入れ、そこへコンピュータにより制御された清浄圧縮空気(発生給気)を、イオナイザー(Piezonizer Zapp、シンド静電気株式会社)を介して、モーターにより回転させている給気管から導入した。この操作により MWNT がフラスコ内で舞い上がり、図2(a)からフラスコ外へ排出された MWNT を清浄空気(希釈給気)と混合後、2 個のサイクロンを経由して鼻部暴露チャンバーに導入した。発生給気量により暴露濃度を調節し、発生給気と希釈給気之和が 20 L/min になるように設定した。暴露チャンバーは 30 L/min で換気し、MWNT の発生中、暴露チャンバー内の差圧が約-50 Pa 程度の陰圧状態となるよう調整した。また、一つめのサイクロンに給気ライン(回収給気)を設け、堆積した MWNT を(b)からフラスコ内に適宜回収した。なお、発生に使用した流路用のチューブは導電性のチューブを用い、

アースを確保した。

2) ミスト状態での発生(図3)

ミスト状態での発生には MWCNT を噴霧乾燥法により気相中に発生させる手法(広瀬分担研究者 & 三菱コーポレーションによる)を用いた。

400 mL の水に Tween 20 0.2 g を添加し、そこへ MWNT を加え、よく攪拌した後、30 分間以上、超音波照射したものを MWNT 懸濁液として発生に用いた。

MWNT 懸濁液をネブライザーに付属したガラス容器に入れ、ネブライザーにエアコントローラーを介して清浄空気(発生給気)を供給することにより MWNT 懸濁液をミストとして発生させた。発生したミストは清浄空気(希釈給気)と混合した後、加熱器(120°C)により可能な限り水分を揮発させ、ニュートライザー(名称:アルファ線源、核種:アメリシウム 241 (241Am)、社団法人日本アイソトープ協会)を経て暴露チャンバーに導入した。発生及び希釈給気量はそれぞれ 5 及び 15 L/min とした。暴露チャンバーは 30 L/min で換気し、MWNT の発生中、暴露チャンバー内の差圧が約-50 Pa 程度の陰圧状態となるよう調整した。

3) 排気処理

ダスト状態及びミスト状態の発生ともに、暴露チャンバーから排泄された MWNT を含む排気は、サイクロン、界面活性剤(Tween 20)及び消泡剤(ポリシロキサン)を含む水を入れたバブラーで処理した後、活性炭フィルター、ULPA フィルター及び高性能フィルターを介して大気中に放出した。

B-4. 暴露濃度測定

暴露チャンバー内の MWNT 粒子は、暴露操作時の動物の呼吸域(ノズル先端部)付近からパーソナルサンプラー(PS-33、柴田科学株式会社)を用いて PTFE バインダーガラス繊維フィルター(TX40HI-20WW、Pall Corporation、直径 70 mm を直径約 25 mm に成形して使用)に捕集した。サンプリングにはミニポンプ(MP-Σ 300、柴田科学株式会社)を用い、ダスト状態及びミスト状態での発生についてそれぞれ 1 及び 2 L/min の吸引速度でサンプリングした。捕集前のフィルター重量(W1: mg)及び捕集後の