

図1. Caco-2 細胞に対する酸化チタン粒子の細胞毒性

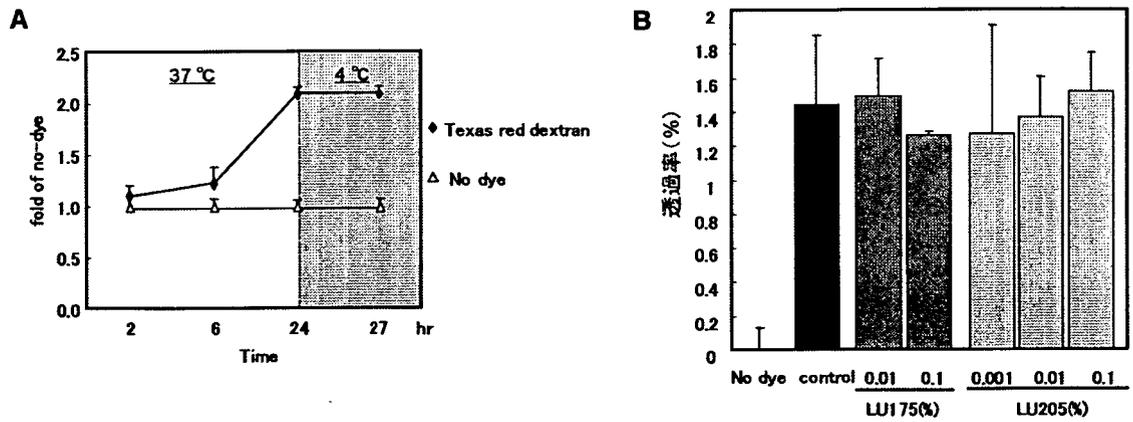
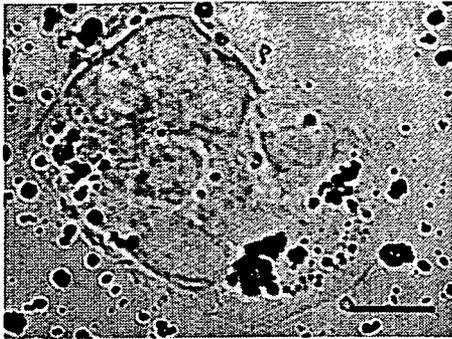


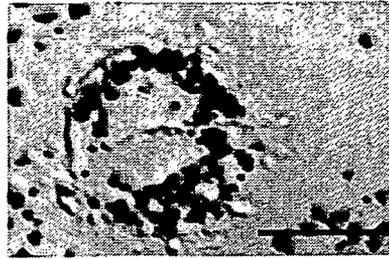
図2. Caco-2細胞単層膜のトランスサイトーシスに及ぼす酸化チタン粒子の影響

- A. 蛍光標識デキストラン透過の経時変化
- B. 蛍光標識デキストランのトランスサイトーシスに及ぼす酸化チタンの影響

LU 175



LU 205



FITC particle (直径 200 nm)

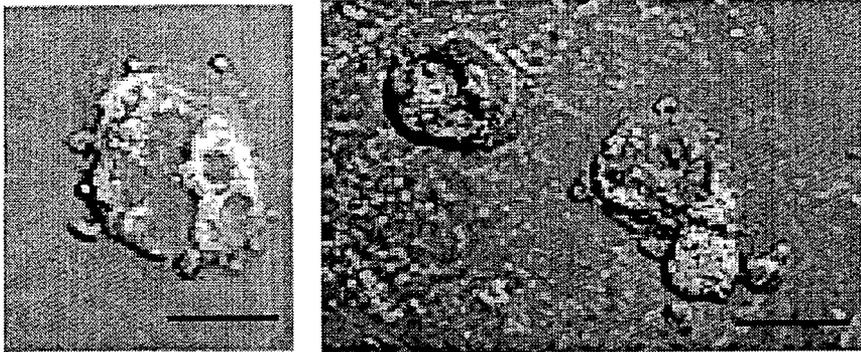


図3 Caco-2細胞におけるチタン粒子および蛍光標識ポリスチレン粒子の取り込み

(スケールバーは10  $\mu$ m)

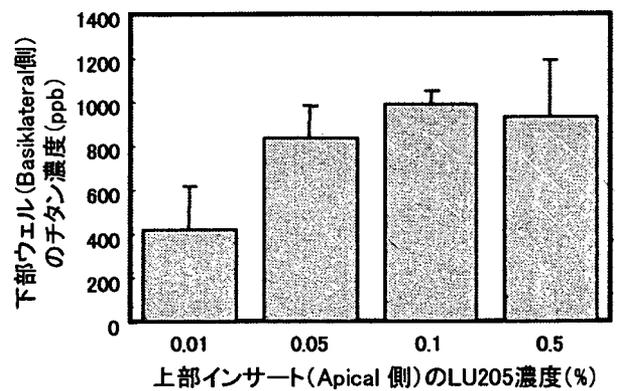
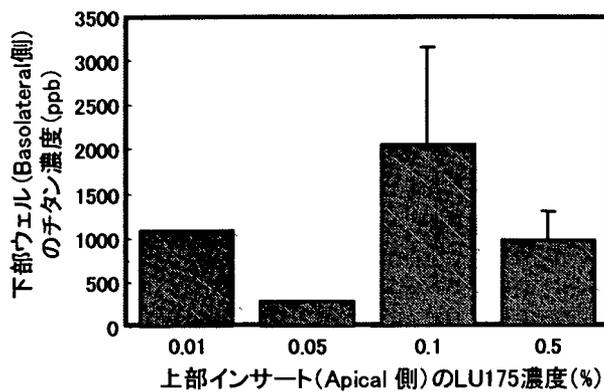


図4 酸化チタン粒子のCaco-2細胞単層膜透過

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: 産業用ナノマテリアルの経気道および粉体暴露手法  
に関する基礎的研究

分担研究者: 涌生聖 (株)三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所 副主任研究員

**研究要旨**

産業用ナノマテリアルである多層カーボンナノチューブ(MWCNT)は、機能性が高く、生産量の増加が予想される物質である。ヒトへは、経皮および経気道による暴露が危惧されている。この物質の経気道暴露についての健康影響に関する調査報告は少なく、さらに MWCNT が有する易凝集性のため、単離した MWCNT の経気道暴露による健康影響評価報告は殆ど見当たらない。本研究では、MWCNT を気管内投与する際、MWCNT が単離した状態となる媒体および調製法の検討を行った。その結果、人造肺サーファクタントを媒体として用いることで懸濁液中の MWCNT 単離状況が改善されることを見出した。さらに乳鉢の使用およびマイクロフィルターによる懸濁液の濾過が MWCNT 単離状況を改善することも判明した。異なる懸濁状態の投与液をラットに気管内投与し、発現する毒性の比較検討を実施中である。

**A. 研究目的**

産業用ナノマテリアルである MCNT はその高機能性から国内における生産量の増加が見込まれているものである。しかし、その健康影響については報告が少なく、標準化された投与液の評価、確認すべき生物学的指標はない。さらに入手可能な報告でも、気管内投与における投与液調製において MWCNT の有する易凝集性から、凝集した MWCNT を気管内投与しており、ナノサイズを有する MWCNT 自体の健康影響を評価した報告は少ない。このため、本研究では MWCNT を単離した繊維として気管内投与するための投与液調製法について検討するとともに、懸濁液中の MWCNT の凝集塊が多い状態および単離した MWCNT が比較的多い状態の MWCNT 懸濁液をそれぞれラットに投与し、発現する生体影響を比較する。さらに評価すべき生物学的指標の選択のため、

候補となる指標について情報を収集する。

**B. 研究方法**

(1) 投与液の調製法

CMC-Na 水溶液、Tween80 水溶液、Tween80 + CMC-Na 水溶液および人造肺サーファクタントであるサーファクテン®にそれぞれ 5 mg/mL の濃度で MCNT を懸濁させた。懸濁時のメノウ乳鉢の使用の有無による MWCNT 単離状況についても確認した。さらに Tween20 を媒体とした懸濁液について、フィルター濾過の効果についても検討した。

(2) 気管内投与実験

5 mg/mL の懸濁液の調製結果が比較的良好であった媒体としてサーファクテン®を選択し、メノウ乳鉢使用の有無による懸濁液中の MWCNT の単離状況が異なる投与液、すなわち懸濁液中の MWCNT の凝

集塊が多い状態および単離した MWCNT が比較的多い状態の MWCNT 懸濁液を SD 系ラットの雌に 5 mg/kg の用量で投与した。陽性対照として結晶性シリカ (Min-U Sil #5)、陰性対照として溶媒のみを投与した。投与日を第 1 日として、第 2 日、第 8 日、第 29 日および第 91 日に気管支肺胞洗浄液 (BALF) を採取するとともに、解剖を行い、健康影響を評価する。一般状態観察および体重測定のほか、BALF については細胞数および細胞構成比の測定、HO-1 遺伝子の発現解析、サイトカイン (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ )、LDH およびタンパク量の測定を行う。解剖時に得られた肺については、病理組織学的検索を行う。

(倫理面への配慮)

特になし

## C. 研究結果

### (1) 投与液の調整法

CMC-Na 水溶液を媒体として使用した場合には、MWCNT と媒体がなじまず、懸濁液の調製は不能であった。Tween80 水溶液を媒体として MWCNT を懸濁した場合には、凝集塊が多く、単離した MWCNT は非常に少ない状態であった。Tween80+CMC-Na 水溶液の場合には、Tween80 のみの場合と比べ、単離した MWCNT が多く認められる状態となることが確認された。さらにサーファクテン®を用いた場合には、MWCNT の単離状況が改善され、単離の状況はメノウ乳鉢で懸濁液を粉砕することでより改善されることが判明した。

さらに Tween20 を媒体とし、メノウ乳鉢で懸濁液を粉砕、この懸濁液を 0.4  $\mu$ m または 0.22  $\mu$ m 孔径のフィルター濾過した。MWCNT の単離状況を確認したところ、フィルター濾過の効果が認められ、凝集塊のない懸濁液であることが確認された。使用したフィルター孔径の差は、明確ではなかった。

### (2) 気管内投与実験

投与後 28 日間を経過した時点までの観察、BALF 採取を終了した。凝固塊の多い MWCNT を投与した群では第 4 日までラッセル音が認められた。体重では第 2 日に陰性対照群と比較して統計学的に有意な

低値が MWCNT を投与した群に認められた。BALF 中の LDH では、第 8 日には MWCNT 群、第 29 日には凝固塊の少ない MWCNT 投与群と陽性対照群に对照群と比較して統計学的に有意な高値が認められた。BALF 中の細胞数および構成比、HO-1 遺伝子発現およびサイトカイン測定については測定中である。また、病理標本を作製中である。

## D. 考察

MWCNT を気管内投与するための投与液調製は、使用する媒体により単離する繊維が異なることが示唆された。また、メノウ乳鉢を用いて懸濁液をすりつぶすことで、単離繊維が増加することも確認された。しかし、MWCNT の易凝集性の強さから、これらの方法においても懸濁液中の凝集塊を取り除くことは不可能であった。光学顕微鏡下で調製した懸濁液を観察した結果、凝集塊はそのサイズが比較的大きいことが判明している。このため、サイズの大きな凝集塊をマイクロレベルのフィルター濾過により取り除くことで単離繊維が多く含有される懸濁液を調製可能であることを今回の研究では明らかにした。ただし、その懸濁液中の MWCNT 濃度が低くなり、文献報告と比較可能な濃度の単離繊維を多く有する懸濁液の調整法については、今後の検討が必要なものと考えられた。

凝集塊の多い懸濁液と単離繊維の多い懸濁液とでは、投与後すぐに発現する短期毒性については凝集塊の多い懸濁液において強く発現する傾向が認められた。これに対し、投与から 4 週間を経過した時点での影響は、単離繊維の多い懸濁液において強く発現する傾向が認められた。凝集塊の多い懸濁液では、凝集塊が大きいことから気道への詰まりが生じやすく、比較的単純な閉塞性の障害が急性期の変化として呼吸器に生じたものと考えられた。単離繊維の多い懸濁液で生じた変化は陽性対照物質と同等の変化であり、少なくとも Min-U Sil #5 と同等の大きさを有する MWCNT に起因した変化である可能性が示唆された。しかし、これらの変化の詳細については、継続して実施する各種検査データにより明らかにするものである。

## E. 結論

MWCNT を気管内投与する際の懸濁液調製において、人造肺サーファクタントであるサーファクテンは MWCNT の易凝集性を軽減することのできる媒体であること、単離 MWCNT 繊維を得るためにはフィルター濾過が有用な方法であることが判明した。今後は、健康影響評価に有効な懸濁液濃度を得るための懸濁液調製法について更なる検討を行う必要があることが示唆された。

MWCNT の凝集塊および単離繊維のバランスが異なる懸濁液を気管内投与した結果、そのバランスが生体に対して異なる影響を及ぼすことが示唆された。単離した繊維のみでの高濃度暴露に対する生体反応の検索について、更なる検討が必要であることが示唆された。

## F. 研究発表

### 論文発表

なし

### 学会発表

なし

## 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)

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: 産業用ナノマテリアルのリスク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。また、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わないかという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**

昨年度に引き続き、ナノマテリアルのハザードに関する文献を平成17年11月から平成18年1月までの範囲で検索するとともに、総説等から必要な文献を確認して収集し、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ー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**

(1) カーボンナノチューブ

単層カーボンナノチューブ(SWCNT)の暴露で生じた肉芽腫がSWCNT凝集体の周囲に存在する一方、この凝集体から離れた箇所でも、肉芽腫とは違う間質性線維症が観察されており、SWCNTの分散との関連が考えられ、この線維症は慢性炎症やアスベストの場合に見られる典型的な肺線維症の発達に伴う肺泡マクロファージの活性化によるものとは別の新知見のメカニズムの可能性が優先すべき内容として示唆されている(Kipen, HM. et al., 2005)。

精製された単層カーボンナノチューブ(SWNT)やフラーレンのin vitroでの単核球に対する炎症性は、黒鉛粒子や未精製の切開したSWNTのものに比べ

低いことが炭素で構成された粒子中に含まれる触媒量や黒鉛量が少ないことから推測されている。黒鉛粒子や未精製の切開した SWNT の高い炎症性は粒子表面上にダングリングしている多くの炭素結合の存在によるもので、それが、高い化学反応性となるためであろうと記述されている (Fiorito, S. et al., 2006)。

3 種の単層ナノチューブ (SWNT) (市販品の AP-NT、精製品の PUR-NT、グルコサミンを官能基として持つ GA-NT) の 3T3 細胞への影響を検討したところ、細胞生存能は SWNT 濃度の増加により低下し、これらの試料の種類によって細胞生存能も代謝活性も異なっていた。その原因は細胞膜の不安定化、水溶性の毒性汚染物質、膜に結合した SWNT による移動物質の制限などの悪影響が考えられるが、官能基の導入によるナノチューブ表面の化学的変更や疎水性変化によって、これらの悪影響が改善される可能性が記載されている (Nimmagadda, A. et al., 2006)。

鉄含量の多い未精製の単層カーボンナノチューブ (SWCNT) と鉄を除去した精製 SWCNT 試料における RAW264.7 マクロファージとの相互作用を検討した結果、いずれでもマクロファージ内においてスーパーオキシドラジカルや硝酸オキンドは生成されないことが確認されたが、未精製 SWCNT は精製 SWCNT よりもスーパーオキシドラジカルをヒドロキシラジカルに変換し、細胞内低分子チオール (GSH) の顕著な低下と脂質ヒドロパーオキシサイドの蓄積を引き起こすことが報告されており、鉄の存在がマクロファージの酸化還元応答に重要な影響を及ぼすという可能性が示された (Kagan, V.E. et al., 2006)。

ヒト皮膚線維芽細胞 (HDF) において、単層カーボンナノチューブ (SWNT) の官能基付加の程度を変化させた試料 (SWNT-phenyl-SO(3)H、SWNT-phenyl-SO(3)Na、SWNT-phenyl-(COOH) それぞれの官能基比を変化) に対しての *in vitro* の細胞毒性試験を実施した結果、側壁への官能基付加量が増加すると、SWNT 試料にほとんど毒性がなくなることが報告されている (Sayes, CM. et al., 2006)。

*In vitro* によるヒト線維芽細胞を用いた毒性試験を単層カーボンナノチューブ (SWNT)、多層カーボンナノチューブ、活性炭、カーボンブラック、黒鉛で実

施したところ、表面積が潜在的な毒性を予測する変数に成りえることと未精製よりも精製した試料の方がより有毒であることが報告されている (Tian, F. et al., 2006)。

ヒトケラチン生成細胞 (HEKs) のプロテオーム (細胞内存在全タンパク質) に対する多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の影響をプロテオミクス解析 (タンパク質機能解析) により検討した結果、32 のタンパク質発現が有意 ( $p < 0.05$ ) に変化しており、タンパク質変性は中間フィラメントの発現 (調節) 異常、細胞サイクル阻害、代謝への影響、リソソーム/メラノソーム生成の増加、小胞輸送/エキソサイトーシス異常、細胞膜骨格タンパク質遺伝子発現の減少を示唆するとの報告がある (Monteiro-Riviere NA et al. 2005)。

SD ラットに多層カーボンナノチューブ (MNCNT) あるいは、すりつぶした MNCNT 0.5、2、5mg を気管支内投与した実験で、投与 60 日後においても肺に初日の投与量と比較してそれぞれ 40%、80% 存在し、炎症性と線維症がみられ、投与 2 ヶ月後 MNCNT により肺の障害として周囲組織での肺胞炎を伴った気管支腔におけるコラーゲンに富む肉腫形成が惹起されたことが報告されている (Muller, J. et al 2005)。

カーボンナノチューブをマウスの咽頭内に滴下したところ、用量依存的な肉芽腫性気管支間質性肺炎、線維化、肺機能の変化がみられた。また、肺洗浄液において用量依存的な炎症と肺障害のバイオマーカー (細胞数、総タンパク質、乳酸脱水素酵素、 $\gamma$ -グルタミン酸転換酵素、TGF- $\beta$ ) の増加がみられた。進行性の線維化と肉芽腫をともなった強い急性の炎症性の肺毒性を示したところが報告されている (Shvedova, AA. et al., 2005)。

カーボンナノチューブ (CNT) を気管内もしくは咽頭内に投与したげっ歯類におけるいくつかの研究から、マウスにおいて SWCNT は石英よりも毒性が強いことが証明されており、ヒトにおいては慢性的に吸入した場合、深刻な職業的健康被害の可能性が述べられている。さらに環境中に存在する粒子状物質 (PM) 中の燃焼由来の多層カーボンナノチューブ (MWCNT; ごく最近、これはメタン、プロパンや天然

ガスの燃焼の中からも発見されている)が、呼吸機能障害、細菌摂取後の細菌除去の遅延、大動脈におけるミトコンドリア DNA の損傷、大動脈プラーク頻度の増加、および心臓の腕頭動脈におけるアテローム硬化性疾患など、大気汚染に関連した心肺疾患において重要で深刻な役割を担っているのではないかと推論が報告されている (Lam, CW. et al., 2006)。

カーボンナノチューブ (CNT) は、間充織細胞を増殖するように刺激し、肉芽腫形成と線維化を引き起こす特性がある上に同質量のカーボンや石英のナノ粒子よりも毒性があることがいくつかの論文からの共通点として述べられている (Donaldson, K. et al., 2006)。

懸濁水中の多層カーボンナノチューブ (MWCNT) からは、過酸化水素やギ酸塩の存在下で酸素のフリーラジカルも炭素中心のフリーラジカルも産生されなかったことが見出され、それどころか MWCNT が非常に大きなラジカルスカベンジャー作用をもつことが外因性発生源による水酸基ラジカルやスーパーオキシドラジカルとの接触させた場合の観察から見出された。この報告で既報の *in vitro* による炎症反応は粒子由来のフリーラジカル産生よりも MWCNT の特質によるものと結論づけられている。(Fenoglio, I. et al., 2006)

官能基付加したカーボンナノチューブ (f-CNT: 1,3-双極子付加環化反応させた f-CNT1 と 2、及び酸化/アミド化処理した f-CNT3 と 4) の *in vitro* で免疫系の細胞における影響を検討したところ、どの f-CNT も細胞生存能に影響を及ぼすことはなく、マクロファージ、Bリンパ球やTリンパ球に貪食されていたことが報告されている。さらに高水溶性の f-CNT1 においては、免疫調節性細胞の機能の活性に影響を与えることもなく、可溶性は高くないが安定した懸濁水を形成できる f-CNT3 においては、マクロファージによる炎症性サイトカイン分泌を引き起こされている間でもリンパ球の機能が保たれていた (Dumortier, H. et al., 2006)。

ヒト T 細胞に対する酸化されていないものと酸化された多層カーボンナノチューブ (MNCNT) の毒性につ

いて比較した結果、酸化されたものの方に強い毒性があり、400  $\mu\text{g/mL}$  (10 ng/細胞、細胞当たり 1000 万個に相当) でアポトーシスによる細胞死を誘発したが、酸化されていないものと疎水性のものは、毒性が弱く、酸化されていないものと酸化されたものとも 1/10 の濃度では毒性はほとんどみられなかったとの報告がある (Bottini, M. et al. 2006)。

マウスマクロファージ細胞株におけるブラックカーボンと市販のカーボンナノチューブとの凝集体試料による短期 (2 日) と長期 (2 週間) の *in vitro* 試験の結果、明らかに細胞毒性が示され、それは温石綿アスベストに匹敵するものであったことが報告されている (Murr, LE. et al., 2006)。

原生単細胞動物 (*Stylonychia mytilus*) と多層カーボンナノチューブ (MWNT) との相互作用を検討した結果、MWNT はよく摂取され、ミトコンドリアに局部的に集中し、1.0  $\mu\text{g/ml}$  以上の濃度で用量依存的な成長阻害と損傷を起こしたことが報告されている (Zhu, Y. et al., 2006)。

多層カーボンナノチューブ、カーボンナノファイバー、カーボンナノ粒子の毒性を *in vitro* の肺腫瘍細胞で検討し、その結果、毒性影響はサイズに依存的であり、さらにその細胞毒性は粒子表面の酸処理後に高められたことが報告されている (Magrez, A. et al., 2006)。

多層カーボンナノチューブ (MWNT) と窒素ドーブ多層カーボン (CNx) ナノチューブにおける毒性影響を検討した結果、MWNT では用量依存的に呼吸困難でマウスが死亡するが、CNx ナノチューブでは全く死亡しないことを報告している (Carrero-Sanchez, JC. et al., 2006)。

## (2) フラーレン

ラットの肝臓ミクロソームを用いて、フルーレン及び水酸化フルーレンの光反応性における膜障害の誘発性を調べた結果、フルーレンは一重項酸素により、水酸化フルーレンはラジカル種により細胞膜への障害を引き起こしており、障害の大きさは、光の照射時間及び添加量に依存しているが、いずれの障害も抗酸化物質によって抑制されることが報告されている (Kamat JP. et al. 2000)。

ヒト肝臓ガン細胞および皮膚線維腫細胞を用いて、無処理フラーレンの凝集体および水酸基およびカルボキシル基等で修飾した 3 種の水溶性誘導体の細胞分化毒性を調べた結果、水溶性が低いものほど高い細胞毒性を示しており、C60 は低濃度 (20ppb) で毒性が見られたが、C60(OH)<sub>24</sub> は水溶解度限界まで毒性が見られなかった (Sayes, C.M. et al. 2004)。

ナノ C60 はヒトの皮膚線維腫細胞、ヒト肝臓がん細胞 (HepG2)、ヒトニューロン星状細胞に対し、50 ppb (LC<sub>50</sub>は 2-50 ppb; 細胞によって異なる)、48 時間暴露の条件で細胞毒性を示したが、酸化防止剤として L-アスコルビン酸を加えると、ナノ C60 による酸化ダメージは完全になくなったことが報告されている (Sayes CM. et al. 2005)。

フラーレンの構造的・物理学的性質、その性質の基づく光増感性、及び光照射下における生物作用発現の重要な役割を果たしている活性酸素種については、総説がある (Yamakoshi, Y. et al. 1999)。

ヒト単球マクロファージがナノ粒子を取り込んだ時、そのナノ粒子の変化を調査したところ、細胞内に C60 を含むいくつかの亜細胞性の区画があることが確認され、それは核膜とその外側に沿って存在し、細胞の核内に最も顕著に存在する第 2 のリゾソームであると報告している (Porter, AE. et al., 2006)。

水溶性フラーレンに関して甲殻類と魚類において急性毒性試験を行ったところ、甲殻類の *Daphnia magna* の顕著な脱皮の遅延と産仔数への影響から、個体数に影響を与える可能性が見られ、一方、魚類においては、mRNA 及びチトクローム p450 アイソザイム CYP1A、CYP2K1 並びに CYP2M1 のいずれにも変化はなかったが、ファットヘッドミノーでのみ、ペルオキシゾーマル脂質輸送タンパク質 PMP70 の顕著な減少があり、アシル CoA 経路に影響を及ぼす可能性を示していると報告されている (Oberdoerster, E., et al., 2006)。

### (3) 金属粒子

豚の皮膚に酸化チタン (長さ 45-150 nm、幅 17-35 nm) を含む製品を 8, 24, 48 時間塗布し、皮膚内部への浸透を高エネルギーイオンプローブで調べた結果、

細胞間を通して顆粒層への浸透は見られたが、その下の有棘層では検出限界以下であり、毛嚢でも検出限界以下であったと報告されている (Menzel F. et al. 2004)。

タイプ II 肺上皮細胞の試験管内モデルを使用し、その細胞の超微細粒子 (二酸化チタン TiO<sub>2</sub>、直径 50 nm) を摂取する能力を評価した結果、TiO<sub>2</sub> は個々の粒子としては細胞内に取り込まれず凝集塊として貪食されており、タイプ II 上皮のモデルは超微細粒子の凝集物を摂取することが可能であることが報告されている (Stearns RC et al. 2001)。

マウス脳のミクログリア細胞 (BV2) に対して、物理化学的な特徴 (例えば分散安定性、粒径分布やゼータ電位) を持つ二酸化チタンのナノマテリアル (Degussa P25) を暴露させて細胞における影響を調べたところ、ミクログリア細胞において、活性酸素の迅速かつ継続的な放出が起こり、「酸化的バースト」の反応だけではなく、ミトコンドリアによるエネルギー生産も妨害され、その際、Degussa P25 の凝集体はミクログリア細胞に貪食され、細胞質内に取り込まれていたことが報告されている。 (Long, TC. Et al. 2006)

金ナノ粒子 (2 nm) の異なる種類の細胞間での毒性の違いを調べた結果は、陽イオン粒子は中等度の毒性であるが、陰イオン粒子は全く毒性がないことを示しており、脂質小胞を使用した色素放出試験で観察された初期の静電結合を介した濃度依存的な小胞の溶解が、陽イオン mixed monolayer protected gold clusters (MMPCs) による毒性の機序と考えられことが報告されている (Catherine M. et al. 2004)。

金や二酸化チタンにおける赤血球内への侵入と分布について検討したところ、食作用やエンドサイトーシス以外の赤血球膜を透過する未知のメカニズムがあり、これは粒子の表面電荷や材質と無関係であることが報告されている。 (Rothen-Rutishauser, BM. et al. 2006)

CdSe と CdSe/ZnS のナノ粒子の細胞毒性は、Cd<sup>2+</sup> の放出に加えて粒子の表面の化学的性質 (特に凝集に関係する) が、その細胞毒性に重要な役割を果たすとの報告がある (Christian Kirchner et al. 2005)。

Phenanthrene (Phen) 付加の有無によるアルミナ

ナノ粒子の植物毒性を根の伸長試験により調べた結果、粒子の表面性状が植物毒性に重要な役割を担うと考えられことが報告されている(Yang, L. and Watts, D.L.2005)

ナノサイズの酸化マグネシウムと通常のサイズの酸化マグネシウムの溶解性と溶解率について検討した。溶媒として脱イオン水、ハンクス液、ダルベッコの改良イーグルイ培養液を使用した。その結果、推定に反し、ナノ粒子の溶解性は、いずれの溶媒中においても通常サイズ粒子に比べ若干大きい程度にすぎなかったことが報告されている(Gakhar et al. ,2005)。

メソ-2, 3-ジメルカプトコハク酸(DMSA)で被覆した磁赤鉄鉱ナノ粒子(NmDMSA)に対する *in vitro* によるヒト真皮線維芽細胞の細胞毒性と遺伝子毒性を検討したところ、弱い細胞障害性はあったが、遺伝子毒性はなかったことが報告されている。このことは、DMSA の被覆がナノ酸化物である赤鉄鉱ナノ粒子と線維芽細胞間の直接の接触のためのバリアとなり、毒性の影響を妨げていると思われると述べている。(Auffan, M. et al. 2006)

#### (4) 量子ドット

メルカプトウンデカン酸量子ドットの大きさや色による細胞の傷害性の差異と細胞の型による障害性の差異を調べた結果、細胞死が生じなくても細胞の生存性を減少させるメルカプトウンデカン酸量子ドットの濃度に幅があることが示されている(Shiohara, A. et al. 2004)

セレン化カドミウムをコアにした半導体量子ドット CdSe-core QDsは、肝臓モデルとして初代肝細胞を用いた試験で、ある条件の下では急性毒性を有することが示され、セレン化カドミウム格子の劣化による Cd<sup>2+</sup> フリーイオンの放出と関連していることが報告されている(Derfus, A.M. et al. 2004)。

CdTe QDs は、10 μg/ml の濃度の長期暴露においてPC12とN9細胞でアポトーシスによる著しい細胞毒性を示し、その程度はより小さい粒径ほど強いことが報告されている。ただし、この細胞死は、酸化防止剤の N-アセチルシステインと、ウシ血清アルブミンによる細胞の前処理により減少することが報告されてい

る(Lovric J. et al. 2005)。

量子ドットの毒性が、物理化学的性質及び環境暴露因子に依存していることがレビューされている(Hardman R., 2006)

#### (5) ナノ粒子一般

ナノマテリアルの生体への影響としては、活性酸素種の生成、酸化ストレス、ミトコンドリアパータベーション、炎症、細胞内皮系による取り込み、タンパク質の変性と分解、核内への侵入、神経組織内への取り込み、粒子の過負荷やメディエーターの放出による食細胞機能のパータベーション、血液凝固の影響による内皮の機能不全、免疫寛容の機能停止による新抗原の生成、細胞周期規則の変化、DNA 損傷が列挙されている(Nel, A. et al., 2006 )。

超微細なカーボンブラック、二酸化チタンやラテックスを使用し、これらが、同濃度の微細なものより 10 倍程度炎症作用が強いことが報告されている(Donaldson, K. et al. 2000)。

ヒトの 9,970 遺伝子を搭載した Coldlink™ マイクロアレーを用いて、ヒト表皮角化細胞 (HEK) をシリカ、酸化チタン及びカーボンブラック 1 mg/mL で処理後 24 時間の遺伝子の発現変化を比較検討した結果、シリカと酸化チタンが比較的好く似た発現パターンを示し、これら 3 物質で同様の発現パターンを示す遺伝子 (例えば、ラミニンなどのいくつかの構造タンパク質) もあったが、リボソームタンパクやサイトカインの遺伝子ファミリーの発現パターンには違いが認められたことが報告されている(Cunningham M. et al. 2005)。

環境中にある微粒子の一構成成分である炭素超微細粒子が、慢性閉塞性肺疾患および他の慢性肺疾患等において組織修復に影響する可能性があるとした仮説を、三次元のコラーゲン収縮モデルを使用して評価した結果、カーボンブラックの超微細粒子は、線維芽細胞を介するコラーゲン収縮を阻害しており、超微細粒子は組織修復作用を変化させる一因として作用することが示唆されている(Huijung Kim et al. 2003)。

ラットの肺マクロファージとヒト血液単球に対す

る超微細粒子(Uf 粒子)の影響について、カルシウムと活性酸素種(ROS)の役割を指標に調べた結果、Uf 粒子が、細胞内カルシウム濃度の調節、転写制御因子の活性化、ROS を介したサイトカイン産生により炎症作用を誘発させることを示唆するとの報告がなされている(Brown D. M. et al. 2004)。

キトサンとキトサンから調製したナノ粒子の細胞内への取り込みと試験管内細胞毒性に対する分子量(Mw)と脱アセチル化度(DD)の影響を評価した結果、キトサンからキトサンナノ粒子を調製することにより、細胞への取り込みのメカニズムが改変されたが、A549 細胞に対する細胞毒性には変化がみられなかった。ゼータポテンシャルへのキトサンナノ粒子の作用により、キトサンナノ粒子の細胞内への取り込みと細胞毒性に対して、キトサンの DD は Mw より大きな影響を示したとの報告がある(Min Huang et al. 2004)。

血液脳関門(BBB)に対する負電荷、中性及び正電荷を有するナノ粒子の影響及びナノ粒子の脳への透過性を調べたところ、中性のナノ粒子と低濃度の負電荷を有するナノ粒子は、有害な影響を与えずに薬物を脳へ輸送するコロイド状のキャリアとして用いることができるが、正電荷を有するナノ粒子は、BBB に対して、瞬時に毒性影響を及ぼすことが報告されている(Paul R. et al. 2004)。

ヨウ素(125)で放射化ラベルした球状のポリスチレン(50 nm ~ 3 μm)を 1.25 mg/kg/day で雌ラット(Sprague Dawley, average wt 200g, 15-20 weeks)に 10 日間ガベージで投与したところ、50 nm および 100 nm の粒子がそれぞれ 34%、26%吸収され、そのうち約 7%(50 nm)、および 4%(100 nm)が肝臓、脾臓、血液、骨髄中に存在したが、100 nm 以上の粒子は骨髄には達せず、また 300 nm 以上の粒子は血液中には存在せず、心臓および肺には粒子は検出されなかったことが報告されている(Jani P. et al. 1990)。

単純な <sup>13</sup>C の超微細粒子(CMD=36nm; GSD=1.66)をラットに 6 時間暴露し、暴露後 1、3、5、7 日目に、肺、大脳、小脳、嗅球を摘出して <sup>13</sup>C の濃度を測定した結果、肺の <sup>13</sup>C 濃度は暴露後 7 日目までに 1.39 ug/g(1 日目)から 0.59 ug/g に減少したが、

1 日目に 0.35 ug/g であった嗅球における <sup>13</sup>C は持続的に有意に増加し、7 日目までに 0.43 ug/g に増加した。嗅球における粒子濃度の増加は、ヒト以外の霊長類やげっ歯類で得られた鼻腔内に滴下した固体超微細粒子が嗅神経の軸索に沿って中枢神経系へと移動するという研究結果と矛盾しないと報告されている(Oberdorster G. et al. 2004)。

超微細炭素粒子(380 μg/m<sup>3</sup>)を Balb/c マウスに 4 ないし 24 時間に吸入暴露した。肺において組織学的変化はみられず、肺胞洗浄液においても多核白血球数の軽微な増加がみられたのみであった。しかし、遺伝子発現レベルでは 24 個の遺伝子で 2 倍以上の発現増加がみられ、6 個の遺伝子で 2 倍以上の発現低下がみられた。オステオポンチンやリポカリン-2 は粒子状物質の吸入による炎症性変化の有益な指標になることが報告されている(Stoeger, et al., 2005)。

げっ歯類において、吸入したナノメートル範囲の超微粒子は肺を介して、体内に分布し、暴露から分単位もしくは日単位以内で、肺の炎症や全身性の炎症を引き起こし、血液凝固を促進することが記述されている(Kipen, HM. et al., 2005)。

ヒト中皮種のデータと実際のいくつかの種類 of ナノ粒子を用いたげっ歯類の線維芽細胞株における in vitro 細胞毒性試験のデータを用いて毒性を検討した。暴露粒子の可溶性が、細胞毒性反応に強く影響することが見出され、さらにジルコニウムやセリアあるいはチタニア処理された試料ではある程度の解毒もしくは回復があったことを報告している。(Brunner, TJ. et al., 2006)

テフロンは不活性で非常に安定であるが、ナノサイズになると状況が異なり、微小になるにつれて比表面積が増え、さらに構造不整を生じて表面にダングリングボンドが多く介在すると推定され、活性度が上昇し、吸引したマウスに害のあることが示されたが記述されている。しかし、これは粒子表面に吸着された不純物による影響との観測もあり、しかも凝集し易く、凝集すれば無害と認められた(釘宮ら、2006)。

RAW264.7 細胞株を用いて、いくつかの環境中の超微細粒子による細胞への影響を比較したところ、

細胞による取り込み、細胞内の局在、活性酸素(ROS)の産生能力は粒子の種類によって様々であり、特に大気中の超微細粒子(UFPs)とナノサイズの陽イオンのポリスチレン試料は、細胞内 ROS 産生を誘導し、グルタチオンを減少させ、毒性を持つ酸化ストレスを誘導した。この毒性は増加したカルシウムの取り込みと細胞小器官の構造の損傷に関連してミトコンドリアの損傷も起こし、後者は炎症とは関係なくミトコンドリアの損傷と細胞死を誘発した。細胞内の組成と粒子の相互作用から酸化ストレスが生ずる可能性を報告している(Xia, T. et al., 2006)。

ポリスチレン、乳酸とグリコール酸のポリ重合体(PLGA)そして、ジエチルアミノプロピルアミンポリビニルアルコール側鎖を持つ乳酸とグリコール酸のポリ重合体(DEAPA-PVAL-g-PLGA)による Balb/c マウス肺における気管内投与による炎症応答の誘発について、気管支肺胞洗浄液中の乳酸脱水素酵素(LDH)の放出、タンパク質濃度、MIP-2-mRNA 発現、多核球(PMN)の増加を測定することで検討したところ、PMN の増加において、ポリスチレンは顕著に増加していたが、その他の生分解性高分子試料は陰性対照の値を超えなかったことを報告している(Dailey, LA. et al., 2006)。

#### ナノ材料における取り組み

米国、ヨーロッパと日本においては、市販アプリケーションのためにナノテクノロジーの利用を促進し、拡大するための計画があり、その重要事項は、ヒトの健康と環境への安全性を確保するためのこれらの材料に対する信頼性の高いリスク評価と安全性評価法の開発である(Thomas, K. et al., 2006)。

#### 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。

- Auffan M, Decome L, Rose J, Orsiere T, De Meo M, Briois V, Chaneac C, Olivi L, Berge-Lefranc JL, Botta A, Wiesner MR, Bottero JY., In vitro interactions between DMSA-coated maghemite nanoparticles and human fibroblasts: A physicochemical and cyto-genotoxic study. *Environ Sci Technol.*, 40(14) 4367-4373 (2006)
- Bottini, M., Bruckner, S., Nika, K., Bottini, N., Bellucci S., Magrini, A., Bergamaschi, A. and Mustelin, T., Multi-walled carbon nanotubes induce T lymphocyte apoptosis. *Toxicology Letterst*, 160, 121 - 126 (2006)
- Brown D. M., K. Donaldson, P. J. Borm, R. P. Schins, M. Dehnhardt, P. Gilmour, L. A. Jimenez, and V. Stone, Calcium and ROS-mediated activation of transcription factors and TNF- $\alpha$  cytokine gene expression in macrophages exposed to ultrafine particles. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 286, 344 - 353 (2004)
- Brunner TJ, Wick P, Manser P, Spohn P, Grass RN, Limbach LK, Bruinink A, Stark WJ., In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility. *Environ Sci Technol.*, 40(14) 4374-4381 (2006)
- Carrero-Sanchez JC, Elias AL, Mancilla R, Arrellin G, Terrones H, Laclette JP, Terrones M., Biocompatibility and toxicological studies of carbon nanotubes doped with nitrogen. *Nano Lett.*, 6(8) 1609-1616 (2006)
- Catherine M. Goodman, Cartherine D. McCusker, Tuna Yilmaz, and Vincent M. Rotello, Toxicity of Gold Nnopaticles Functionalized with Cationic and Anionic Side Chains. *Bioconjugate Chem.*, 15, 897 - 900 (2004)
- Christian Kirchner, Tim Liedl, Stefan Kudera, Teresa Pellegrino, Almudena Munoz Javier, Hermann E. Gaub, Sonja Stolzle, N. Fertig, and Wolfgang J.

- Parak, Cytotoxicity of Colloidal CdSe and CdSe/ZnS Nanoparticles. *Nano Letters*, 5, 331 – 338 (2005)
- Cunningham, M., Magnuson, S.R. and Falduto, M.T., Gene expression profiling of nanoscale materials using a systems biology approach. *Toxicologist*, 84, 9 – 9 (2005)
- Dailey LA, Jekel N, Fink L, Gessier T, Schmehl T, Wittmar M, Kissel T, Seeger W., Investigation of the proinflammatory potential of biodegradable nanoparticle drug delivery systems in the lung. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 215(1) 100–108 (2006)
- Derfus, A.M., Chan, W.C.W. and Bhatia, S.N., Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots. *Nano Lett.*, 4(1), 11 – 18 (2004)
- Donaldson, K., Stone, V., Gilmour, P.S., Brown D.M. and MacNee, W., Ultrafine particles: mechanisms of lung injury. *Phi. Trans. R. Soc. Lond. A*. 358, 2741 – 2749 (2000)
- Donaldson K, Aitken R, Tran L, Stone V, Duffin R, Forrest G, Alexander A., Carbon nanotubes: a review of their properties in relation to pulmonary toxicology and workplace safety. *Toxicol Sci.*, 92(1) 5–22 (2006)
- Dumortier H, Lacotte S, Pastorin G, Marega R, Wu W, Bonifazi D, Briand JP, Prato M, Muller S, Bianco A., Functionalized carbon nanotubes are non-cytotoxic and preserve the functionality of primary immune cells. *Nano Lett.*, 6(7) 1522–1528 (2006)
- Fenoglio I, Tomatis M, Lison D, Muller J, Fonseca A, Nagy JB, Fubini B., Reactivity of carbon nanotubes: free radical generation or scavenging activity? *Free Radic Biol Med*. 40(7) 1227–1233 (2006)
- Fiorito S, Serafino A, Andreola F, Togna A, Togna G., Toxicity and biocompatibility of carbon nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol.*, 6(3) 591–599 (2006)
- Gakhar G, Pickrell JA, Klabunde KJ, Hayden, E, Oehme FW, Erikson LE, Comparative solubility of nanoparticles and bulk oxides of magnesium in water and lung stimulant fluids *Mechanisms of Action of Inhaled Fibers, Particles, and Nanoparticles in Lung and Cardiovascular Disease*, 2005
- Hardma R., A ., Toxicological Review of Quantum Dots: Toxicity Depends on Physi-Chemical and Environmental Factors. *Environ. Health Perspect.* 114, 165 – 172 (2006)
- Huijung Kim, Xiangde Liu, Tetsu Kobayashi, Tadashi Kohyama, Fu-Qiang Wen, Debra J. Romberger, Heather Conner, Peter S. Gilmour, Kenneth Donaldson, William MacNee and Stephen I. Rennard, Ultrafine Carbon Black Particles Inhibit Human Lung Fibroblast-Mediated Collagen Gel Contraction. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 28, 111 – 121 (2003)
- Jani P, Halbert GW, Langridge J, and Florence AT. Nanoparticle uptake by the rat gastrointestinal mucosa: quantitation and particle size dependency. *J. Pharm. Pharmacol.* 42(12), 821 – 826 (1990)
- Kagan, V.E., Y.Y.Tyurina, V.A.Tyurin, N.V.Konduru, A.I. Potapovich, A.N. Osipov, E.R. Kisin, D. Schwegler-Berry, R. Mercer, V.Castranova, A.A. Shevedova., Direct and indirect effects of single walled carbon nanotubes on RAW 264.7 macrophages: Role of iron. *Toxicology Letters.*, 165(1) 88–100 (2006)
- Kamat JP, Devasagayam TPA, Priyadarsini KI, Mohan H. , Reactive oxygen species mediated membrane damage induced by fullerene derivatives and its possible biological implications. *Toxicology*. 155, 55 – 61 (2000)
- Kipen HM, Laskin DL., Smaller is not always better: nanotechnology yields nanotoxicology. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*, 289(5) L696–L697 (2005)
- Lam CW, James JT, McCluskey R, Arepalli S, Hunter RL., A review of carbon nanotube toxicity and

- assessment of potential occupational and environmental health risks. *Crit Rev Toxicol.*, 36(3) 189–217 (2006)
- Long TC, Saleh N, Tilton RD, Lowry GV, Veronesi B., Titanium dioxide (P25) produces reactive oxygen species in immortalized brain microglia (BV2): implications for nanoparticle neurotoxicity. *Environ Sci Technol.*, 40(14) 4346–4352 (2006)
- Lovric J, Bazzi HS, Cuie Y, Fortin GR, Winnik FM, Maysinger D. Differences in subcellular distribution and toxicity of green and red emitting CdTe quantum dots. *J. Mol. Med.*, 83, 377 – 385 (2005)
- Magrez A, Kasas S, Salicio V, Pasquier N, Seo JW, Celio M, Catsicas S, Schwaller B, Forro L., Cellular toxicity of carbon-based nanomaterials. *Nano Lett.*, 6(6) 1121–1125 (2006)
- Monteiro-Riviere, N.A., Wang, Y.Y., Hong, S.M., Inman, A.O., Nemanich, R.J., Tan, J., Witzmann, F.A. and Riviere, J.E., Proteomic analysis of nanoparticle exposure in human keratinocyte cell culture. *The Toxicologist*, 84, 2183 (2005)
- Min Huang, Eugene Khor and Lee-Yong Lim, Uptake and Cytotoxicity of Chitosan Molecules and Nanoparticles: Effects of Molecular Weight and Degree of Deacetylation. *Pharmaceutical Research*, 21(2), 344 – 353 (2004)
- Muller Julie, Francois Huaux , Nicolas Moreaub, Pierre Missona, Jean-Francois Heiliera, Monique Delosc, Moharnmed Atras, Antonio Fonseca, Janos B. Nagy, and Dominique Lison, Respiratory toxicity of multi - wall carbon nanotubes. *Toxicology and Applied pharmacology*. 207, 221 – 231 (2005)
- Murr LE, Soto KF, Garza KM, Guerrero PA, Martinez F, Esquivel EV, Ramirez DA, Shi Y, Bang JJ, Venzor J 3rd. Combustion-generated nanoparticulates in the El Paso, TX, USA / Juarez, Mexico Metroplex: their comparative characterization and potential for adverse health effects. *Int J Environ Res Public Health.*, 3(1) 48–66 (2006)
- Nel A, Xia T, Madler L, Li N., Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science.*, 311(5761) 622–627 (2006)
- Nimmagadda A, Thurston K, Nollert MU, McFetridge PS., Chemical modification of SWNT alters in vitro cell-SWNT interactions. *J Biomed Mater Res A.*, 76(3) 614–625 (2006)
- Oberdorster G., Z. Sharp, V. Atudorei, A. Elder, R. Gelein, W. Kreyling, C. Cox, Translocation of Inhaled Ultrafine Particles to the Brain. *Inhalation toxicology*, 16, 437 – 445 (2004)
- Oberdoerster, Eva; Zhu, Shiqian; Blickley, T. Michelle; McClellan-Green, Patricia; Haasch, Mary L. Ecotoxicology of carbon-based engineered nanoparticles: Effects of fullerene (C60) on aquatic organisms. *Carbon.*, 44(6) 1112–1120 (2006)
- Paul R. Lockman, Joanna A. Koziara, Russell J. Mumper and David D. Allen, Nanoparticles Surface Charge Alter Blood-Brain Barrier Integrity and Permeability. *Journal of Drug Targeting.*, 12, 635 –641 (2004)
- Porter AE, Muller K, Skepper J, Midgley P, Welland M., Uptake of C60 by human monocyte macrophages, its localization and implications for toxicity: studied by high resolution electron microscopy and electron tomography. *Acta Biomater.*, 2(4) 409–419 (2006).
- Rothen-Rutishauser BM, Schurch S, Haenni B, Kapp N, Gehr P., Interaction of fine particles and nanoparticles with red blood cells visualized with advanced microscopic techniques. *Environ Sci Technol.*, 40(14) 4353–4359 (2006)
- Sayes, C.M., Fortner JD, Guo W, Lyon D, Boyd AM, Ausman KD, Tao YJ, Sitharaman B, Wilson LJ, Hughes JB, West JL, Colvin VL. The differential cytotoxicity of water-soluble fullerenes. *Nano Letters*, 4(10), 1881 – 1887 (2004)
- Sayes CM, Gobin AM, Ausman KD, Mendez J, West JL, Colvin VL. Nano-C60 cytotoxicity is due to

- lipid peroxidation. *Biomaterials*, 46, 7587 – 7593 (2005)
- Sayes CM, Liang F, Hudson JL, Mendez J, Guo W, Beach JM, Moore VC, Doyle CD, West JL, Billups WE, Ausman KD, Colvin VL., Functionalization density dependence of single-walled carbon nanotubes cytotoxicity in vitro. *Toxicol Lett.*, 161(2) 135-142 (2006)
- Shiohara, A., Hoshino, A., Hanaki, K., Suzuki, K. and Yamamoto, K. On the cyto-toxicity caused by quantum dots. *Microbiol. Immunol.* 48(9), 669 – 675 (2004)
- Shvedova AA, Kisin ER, Mercer R, Murray AR, Johnson VJ, Potapovich AI, Tyurina YY, Gorelik O, Arepalli S, Schwegler-Berry D, Hubbs AF, Antonini J, Evans DE, Ku BK, Ramsey D, Maynard A, Kagan VE, Castranova V, Baron P., Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single-walled carbon nanotubes in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*,289(5) L698-L708 (2005)
- Stearns RC, Paulauskis JD, Godleski JJ. Endocytosis of ultrafine particles by A549 cells. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 24, 108 – 115 (2001)
- Stoeger T, Andre E, Takenaka S, Reinhard C, Karg E, Schulz H., Inhalation of ultrafine carbon particles induce the expression of atherogenic proteins in the lung of healthy mice. *Mechanisms of Action of Inhaled Fibers, Particles, and Nanoparticles in Lung and Cardiovascular Disease*, 2005
- Thomas K, Aguar P, Kawasaki H, Morris J, Nakanishi J, Savage N., Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, part VIII: International efforts to develop risk-based safety evaluations for nanomaterials. *Toxicol Sci.*, 92(1) 23-32 (2006)
- Tian F, Cui D, Schwarz H, Estrada GG, Kobayashi H., Cytotoxicity of single-wall carbon nanotubes on human fibroblasts. *Toxicol In Vitro.*, 20(7) 1202-1212 (2006)
- Xia T, Kovochich M, Brant J, Hotze M, Sempf J, Oberley T, Sioutas C, Yeh JI, Wiesner MR, Nel AE. Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. *Nano Lett.*, 6(8) 1794-1807 (2006)
- Yamakoshi, Y., Sueyoshi, S. and Miyata, N. , Biological activity of photoexcited fullerene. *Bull. Natl. Health Sci.*, 117, 50-62 (1999)
- Yang, L. and Watts, D.L., Particle surface characteristics may play an important role in phytotoxicity of alumina nanoparticles. *Toxicology Letters*, 158, 122 – 132 (2005)
- Zhu Y, Zhao Q, Li Y, Cai X, Li W., The interaction and toxicity of multi-walled carbon nanotubes with *Stylynychia mytilus*. *J Nanosci Nanotechnol.*, 6(5) 1357-1364 (2006)
- 釘宮 公一、ナノ粒子と健康(日本語)、マテリアルレビュー、19(4) 9-19 (2006)

#### 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

なし

#### 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

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健康影響評価と吸入暴露に関する調査研究

分担研究者: 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

研究協力者: 平田 睦子 国立医薬品食品衛生研究所 総合評価研究室 研究員

研究協力者: 宮林 厚 (株)四ツ菱コーポレーション

#### 研究要旨

本研究では、生体内への暴露、吸収の過程として最も懸念される吸入暴露研究についての調査および検討を行った。対象物質としては多層型カーボンナノチューブ(MWCNT)を選択し、その分散性の確保の観点から、湿式による噴霧乾燥法による MWCNT の発生装置を試作した。その結果、CNT の分散剤として界面活性剤(Tween20)を選定し、ナノ粒子状物質を発生させることが示された。国際動向調査では、国際的な情報の共有化や、研究および評価法に関する調和化が求められている中、OECD 内に設定された産業用ナノマテリアルの作業グループ会合に出席し OECD では、試験法の調和化に向けた動きが具体化し始めていることを確認した。

#### A. 研究目的

ナノテクノロジーは、「ナノメートルサイズのスケールで原子や分子を自由に操作・制御し、物質の構造・配列を制御することで、新機能や優れた特性を持つ物質を作り出す技術」とされ、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、ナノマテリアルの生体影響については、多くの点で未知であり、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

されることが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る。したがって、どの程度の暴露リスクがあるのかについて、用途情報も含めて不足している他、生体内への吸収や分布についての情報も少ない。

本研究では、生体内への暴露、吸収の過程として最も懸念される吸入暴露について、その暴露実験を行うための技術的な検討を目的とする。

#### B. 研究方法

18 年度は、ナノ粒子の吸入暴露実験に対応するナノ粒子の発生、分散方法について情報を収集すると共に、カーボンナノチューブの発生装置を試作し、その性能評価と問題点を検討した。

また、OECD における産業用ナノマテリアルの作業

グループ会合に出席し、安全性評価の国際的調和に関する動向について情報収集した。さらに本研究の研究計画全般について、11月の米国トキシコロジー協会での公表をおこなった。

### C. 研究結果

#### (1) ナノ粒子の発生・分散方法及びナノ粒子の測定方法に関する研究報告に関する調査

18年度に行われた第23回エアロゾル科学・技術研究討論会における以下の資料を入手し、整理した。

「ナノ粒子の生体吸入実験のための粒子分散、供給システムの構築」第23回エアロゾル科学・技術研究討論会 2006年8月8日～10日 発表者：島田 学(広大院工)

「カーボンナノチューブエアロゾルの発生と測定」第23回エアロゾル科学・技術研究討論会 2006年8月8日～10日 発表者：明星 敏彦((独)労働安全衛生総合研究所)

「ナノ粒子の生体へおよぼす影響」第23回エアロゾル科学・技術研究討論会 2006年8月8日～10日 発表者：大藪 貴子(産業医科大学 産業生態科学研究所)

噴霧乾燥法によるカーボンナノチューブの発生装置を試作し、その性能評価と問題点を検討した。実験内容は、カーボンナノチューブ(MWCNT)を噴霧乾燥法により気相中に発生させ、SMPS(Scanning Mobility Particle Sizer)により粒度分布を測定した。

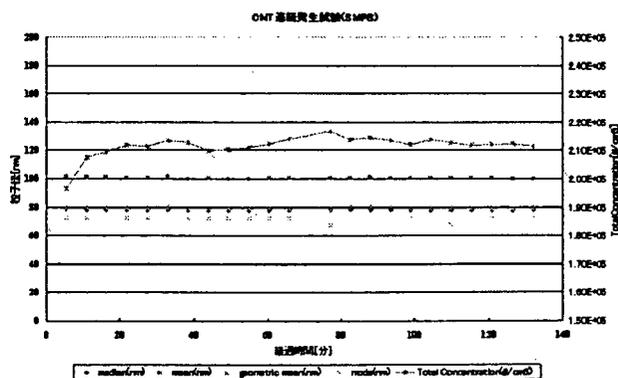
実験装置の構成は、フロー図参照。試料は水懸濁液とし、懸濁には、ミリポア Q フィルタ水を用いた。ただし、そのままでは CNT が疎水性であるため懸濁できなかった為、界面活性材として TWEEN20(関東化学)を添加した。なお、今回は発生に用いてはいないが、エタノールにはかなり容易に懸濁することが可能であった。さらに、溶液中の分散を高めるため、懸濁試料を超音波洗浄器にて20分間程かけた。CNT 発生装置の試料ビンにこの懸濁液を移し、二流体ノズル式噴霧器(NB-S 型、柴田科学)にて噴霧した後、希釈・乾燥を行った。なお噴霧流量は最大 5LPM、希

積流量は最大 20LPM まで可変することができる。今回の実験の際には、噴霧流量と希釈流量の和が 15 LPM となるようにした。これは鼻部暴露実験を行う際に 15LPM 程度の供給量があれば充分であると考えた為である。なお、圧縮エアはミストセパレータ、ファイバードライ(エアドライヤ)およびラインフィルタを通してオイル・ミストおよび水分を取り除き十分な清浄度が確保されたものを使用している。発生粒子は、CNT 発生装置からガラス製サンプリング管(吸入暴露チャンバー)へ供給し、そこから SMPS に導入して粒度分布を測定した。

表1の条件にて懸濁液を作成し、連続発生を行い、SMPS および粉じん計にて濃度分布および濃度を連続測定した。SMPS(DMA MODEL3071 CPC MODEL3022A ,TSI)により測定した個数濃度は平均で  $1.97 \times 10^5$  個/cm<sup>3</sup> となった。粒子径は MODE 径で 73.55 nm、MEAN 径で 100.53 nm となった。粒子径の CV 値は MODE 径は 4.35% とばらついたが、それ以外では 0.5 % を下回っている。個数濃度の CV 値は 2 % を下回っていた。なお、この実験の際には試料タンクと回収タンクを1つのタンクとし還流させて発生を行った。発生条件はキャリア流量 3 LPM、希釈流量 12 LPM、ヒータ温度 120°C である。

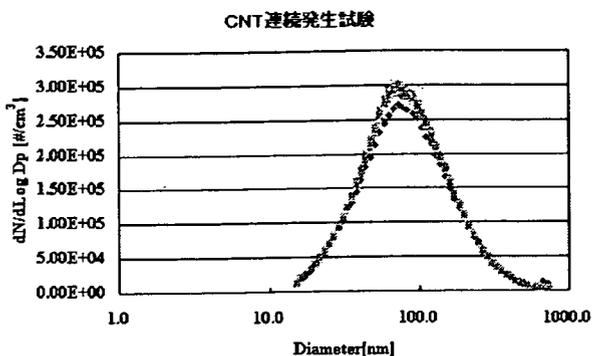
表1 試料作成条件

CNT	0.2162[g]	0.05WT%
TWEEN20	0.1022[g]	0.03WT%
ミリQ水	400[cc]	99.92WT%

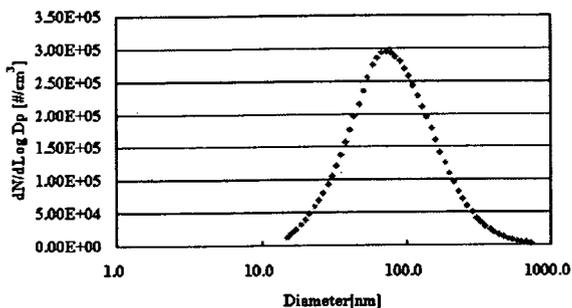


	max	min	average	stdev	cv	N
median (nm)	78.64	77.39	77.99	0.257	0.33%	23
mean (nm)	101.84	89.95	100.53	0.445	0.44%	23
geometric mean (nm)	80.00	78.99	79.53	0.245	0.31%	23
mode (nm)	77.74	67.32	78.55	3.169	4.31%	23
standard deviation	83.78	78.59	78.38	1.048	1.32%	23
Total Concentration[#/cm3]	2.17E+05	1.97E+05	2.12E+05	3.78E+03	1.78%	23

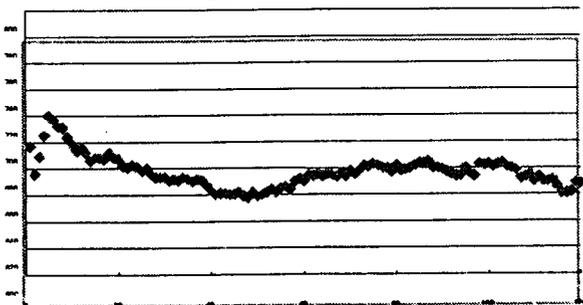
### 粒度分布 (SMPSによる測定)



CNT連続発生試験(平均)



CNT 連続発生試験 (粉じん計)

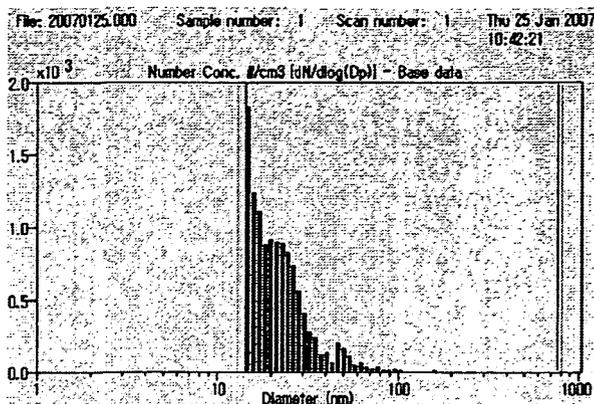


max	min	average	stdev	cv	N
720	658	677.1	11.9617	1.77%	120

### ミリ Q 水の粒子確認試験

CNT 発生装置において、ミリ Q 水のみを発生させた測定データを以下に示す。発生条件はキャリア流量 5LPM、希釈流量 20LPM、ヒータ温度 120°C である。ミストと考えられるが、発生量としては  $3.68 \times 10^2$  個/cc と CNT の発生量より少なく、粒子径も離れている。ただし、水の汚染度や発生部、試料タンクなどの汚染により濃度が増える可能性がある。

### Diameter (SMPS)



median(nm)	20.424
mean(nm)	23.576
geometric mean(nm)	21.872
mode(nm)	14.855
standard deviation	11.377
geo. standard deviation	1.429
skewness	0.766
coeff. of variation(%)	48.259
Total Concentration(#/cm³)	3.68E+02

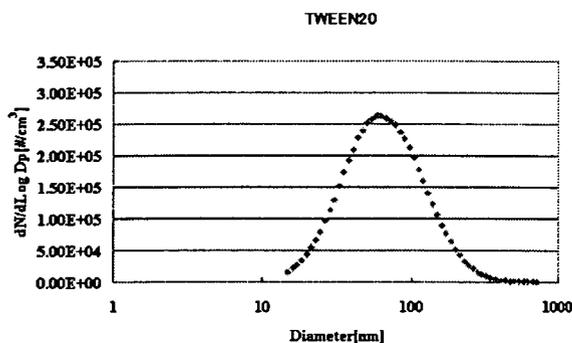
### 界面活性剤の粒子化の検討 (No.1)

400cc のミリ Q 水に TWENN20 を添加し、それを 200cc ずつに分け、一方には CNT を懸濁させそれぞれ発生を行った。発生条件はキャリア流量 2.5 LPM、希釈流量 5 LPM、ヒータ温度 120°C であった。粒子径分布は、CNT を懸濁した試料では TWEEN20 のみの場合に比べて約 4nm 程度粗大になっている。濃度は CNT を懸濁した試料のほうが 1.2 倍程度濃くなった。

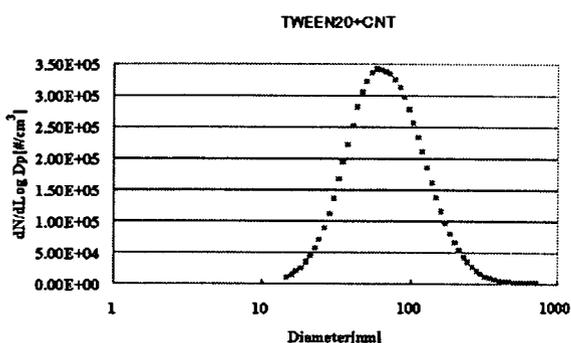
CNT	0.01061 [g]	
TWEEN20	0.00595[g]	0.0015%
ミリ Q 水	400[cc]	99.9985WT%

	TW20のみ	TW20+CNT
median(nm)	64.04	67.06
mean(nm)	78.80	81.71
geometric mean(nm)	65.04	68.48
mode(nm)	59.16	62.77
standard deviation	55.65	56.03
geo. standard deviation	1.84	1.79
skewness	0.35	0.34
coeff. of variation(%)	70.61	68.58
Total Concentration(#/cm³)	1.79E+05	2.20E+05

## 粒度分布 (SMPSによる測定)



界面活性剤のみ



界面活性剤+CNT

## 界面活性剤の粒子化の検討 (No.2)

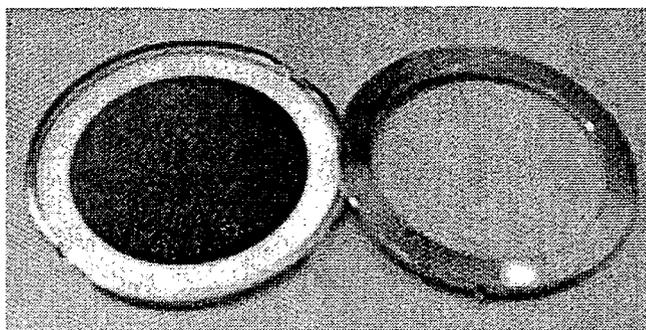
No.1の実験により TWEEN20 自身が粒子化していることが推定された為、実際に CNT が気中に発生しているかどうかをろ紙にサンプリングすることにより確認することにした。

懸濁液は 400cc のミリ Q 水に TWEEN20 を添加し、それを 200cc ずつに分け、一方には CNT を懸濁させそれぞれ発生を行った。発生条件はキャリア流量 3 LPM、希釈流量 12 LPM、ヒータ温度 120°C とした。捕集して質量濃度を計算した結果 TWEEN20 のみの場合に比べて CNT 懸濁液は 0.649 mg/m<sup>3</sup> ほど質量濃度が増加した。

CNT	0.07538 [g]	
TWEEN20	0.4498[g]	0.11%
ミリ Q 水	400[cc]	99.89WT%

	TWEEN20のみ	TWEEN20+CNT 懸濁液
前質量 [g]	0.09241	0.07854
後質量 [g]	0.09355	0.07967
捕集量 [g]	0.00114	0.00113
総吸引量 [m <sup>3</sup> ]	0.42	0.336
質量濃度 [mg/m <sup>3</sup> ]	2.714	3.363

## CNT を捕集したろ紙 (T60A20)



## (2) OECD における産業用ナノマテリアルの安全性に関する取り組み

ナノテクノロジーの安全性は、2004 年 11 月に開催された OECD 化学物質委員会において初めて提起された。その後、以下の 2 つのイベントが開催された。

1. “産業用ナノマテリアルのヒト健康および環境への影響の可能性”に関する特別セッション (2005 年 6 月)
2. 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 (2005 年 12 月)

これらの活動を受け、OECD は産業用ナノマテリアルの安全性に関するプログラムを設立した (2006 年)。

目的としては、ナノマテリアルの厳密な安全性評価手法の開発を支援するために、ヒト健康および環境に対する産業用ナノマテリアルの安全性に関する国際協力を促すことである。

この目的のための作業を管理するための、OECD は、(WPMN: Working Party on Manufactured Nanomaterials) を設立した。WPMN 参加者としては、OECD 加盟国からの化学物質の安全性評価に関与している省庁/機関のメンバーであるが、さらに OECD 加盟国に限らず、環境および健康安全基準を満たす必要のために非加盟経済 (ブラジル、中国、インド、ロシア連邦、南アフリカおよびタイなど) を受け入れている。さらに、欧州委員会、WHO、BIAC (Business and Industry Advisory Committee to the OECD)、環境 NGO、国際標準化機構 (ISO) からの

専門家も受けている。

この WPMN で優先的おこなう事項としては、

2. 定義、用語、特性
3. 環境影響（有害性の確認、有害性および暴露評価法）
4. ヒト健康影響（有害性の確認、有害性および暴露評価法）
5. 規制の枠組み（情報交換）

をあげており、以下の 6 つのプロジェクトが WPMN のサブグループ (SG) に分かれて進行している。

- ・ SG1: EHS Research に関する OECD データベース
- ・ SG2: 産業用ナノマテリアルに関する研究戦略
- ・ SG3: 代表的な産業用ナノマテリアルの安全性試験
- ・ SG4: 産業用ナノマテリアルとテストガイドライン
- ・ SG5: 任意の枠組みおよび規制プログラムの協調
- ・ SG6: リスクアセスメントの協調

SG1: プロジェクト1\_安全性研究に関する OECD データベース

環境およびヒト健康に対する産業用ナノマテリアルの安全性に関わる問題に取り組む研究プロジェクトを認識するための広範囲な情報源を開発する。その情報源には、計画段階の、また、進行中の、そして、終了した研究プロジェクトが含まれる。

SG2: プロジェクト2\_産業用ナノマテリアルに関する研究戦略

情報交換を行い、ヒト健康および環境に対する産業用ナノマテリアルの安全性に関する問題に取り組むための共通の研究ニーズを認識し、そのニーズを満たすための研究に着手する。

SG3: プロジェクト3\_代表的な産業用ナノマテリアルの安全性試験

代表的な産業用ナノマテリアル (MN) を決定し、適切な試験法を用いて試験を実施する。

SG4: プロジェクト4\_産業用ナノマテリアルとテストガイドライン

既存の OECD テストガイドラインが産業用ナノマテリアルを評価するために適切かどうか精査する。新規のテストガイドラインの開発もしくは既存のテスト

ガイドラインの改定が必要かどうか確認する。

SG5: プロジェクト5\_任意の枠組みおよび規制プログラムの協調

現在実施されている、もしくは計画されている、様々な情報収集イニシアティブにおける共通事項を特定する。適切な現行の規制制度、もしくは規制制度案を確認し、また、どのように産業用ナノマテリアルに関する情報要求、有害性の確認、リスクアセスメントおよび暴露軽減/リスクマネージメントに取り組んでいくのかを決定する。実際に、産業用ナノマテリアルへの職業・環境暴露、もしくはその放出を軽減するための、既存のガイダンスドキュメントもしくはガイダンスドキュメント案に関する情報を共有する。

SG6: プロジェクト6\_リスクアセスメントの協調

情報交換を通して、産業用ナノマテリアルのためのリスクアセスメントアプローチを評価し、リスクアセスメント処理能力を強化・促進するための機会を見つける。

各々のプロジェクトはステアリンググループ（メンバー国の代表者およびその他の利害関係者からなる）により管理されており、また、OECD 事務局により支持されている。

各々のプロジェクトの進行状況は、産業用ナノマテリアルに関する各々の Working Party のミーティングで議論される。また、関連活動との連携が WPMN にとって非常に重要である。このことを念頭において、WPMN 内（プロジェクト間）、OECD 内（その他の OECD プログラム）、およびその他の国の国際的なイニシアティブとの間で調整が行われている。

詳細な情報は以下の Web アドレスから得ることができる。

産業用ナノマテリアルの安全性 (Safety of Manufactured Nanomaterials)

[www.oecd.org/env/nanosafety](http://www.oecd.org/env/nanosafety) または  
[www.oecd.org/env/nanosecurite](http://www.oecd.org/env/nanosecurite)

また、11 月に行われた第 27 回の American College of Toxicology 学術年会において、