

20073602/A

厚生労働科学研究費補助金研究報告書

化学物質リスク研究事業

ナノマテリアルの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

平成 19 年度

総括・分担研究報告書

主任研究者 広瀬 明彦

国立医薬品食品衛生研究所

平成 20 年 (2008 年) 4 月

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

ナノマテリアルの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
(H18-化学-一般-007)

平成19年度 総括・分担研究報告書
主任研究者 広瀬 明彦

平成20年(2008年)4月

目 次

I. 総括研究報告書	1
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	
広瀬 明彦	2
II. 分担研究報告書	15
1. 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	
菅野 純	16
2. ナノマテリアルの発がん性評価手法の開発に関する研究	
津田 洋幸	21
3. 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	
西村 哲治	25
4. ナノマテリアルの吸入暴露手法の開発に関する研究	
西沢 共司	32
5. 高生産量ナノマテリアルの環境中での分解代謝等に関する研究	
屋形 直明	46
6. ナノマテリアルの脂質二重膜との相互作用および細胞内導入に関する基礎的研究	
新井 洋由	53
7. ナノマテリアルの遺伝毒性評価系における基礎的研究	
本間 正充	56
8. ナノマテリアルの神経細胞機能影響における基礎的研究	
中澤 憲一	66
9. ナノマテリアルの血漿リポタンパク質や細胞との相互作用に関する基礎的研究	
最上 知子	70
10. 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	
涌生 聖	78
11. 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および高生産量ナノマテリアルの健康影響評価に関する吸入・環境暴露に関する調査研究	
高月 峰夫 広瀬 明彦	84
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	99
IV. 研究成果の刊行物・別冊	103

平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金
(化学物質リスク研究事業)

I. 総括研究報告書

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

主任研究者: 広瀬 明彦 国立医薬品食品衛生研究所 総合評価研究室 室長

研究要旨

産業用ナノマテリアルは新用途への展開が期待されている一方で、未知の生体影響も予測され、その物理化学的特性を考慮した有害性評価手法の開発が急務であり、評価法の確立のための総合的な基盤研究を行うことを目的としている。

高生産量のナノマテリアルを検証物質として選び、*in vivo* 生体影響評価手法の開発、ナノ粒子の吸入毒性評価手法の開発、暴露測定法および動態解析法の開発、*in vitro* 試験系の開発および、国際動向調査の5部門による研究を行っている。

in vivo 試験法では、p53(+/-)マウスに多層カーボンナノチューブ(MWCNT)を腹腔内投与することにより、中皮腫が発生することを確認すると共に、経気管肺内噴霧法を用いた酸化チタンによる c-Ha-ras ラットとフラレーン(C60)による通常ラットへの発がんプロモーション作用を見いだした。吸入試験法では、MWCNTの Tween20 を用いたミスト状態での安定した暴露実験が可能であることを確認した。測定法および動態解析では、C60 のラットへの強制単回経口投与と、MWCNT の気管内投与による生体試料での検出が可能であることを確認した。一方、C60 水分散液では微生物による分解は認められなかった。*in vitro* 試験法の研究においては、リポソーム懸濁 C60 の暴露により、CHL 細胞での小核誘発性、アフリカツメガエル卵母細胞発現系および培養アストロサイト神経細胞機能蛋白質に対する影響、Caco-2 細胞単層膜の安定性や蛍光デキストランのトランスサイトーシス、マクロファージ細胞からのサイトカイン放出に関して、特に影響が見られなかった。一方、長期暴露を想定した HepG2 細胞のコロニー形成率に対して、わずかではあるが C60 を長期暴露した場合にコロニー形成率が低下することが示唆された。国際動向調査においては、米国 EPA や EU において、科学的情報収集に加えてリスク評価や管理に対する議論の枠組み等の検討を始めていることが示された。

MWCNT 腹腔内投与での繊維状粒子として観察された事象や気管内投与による発がんプロモーション作用の結果は、*in vivo* 長期暴露研究の必要性を示すと共に、MWCNT の吸入暴露システムと生体内検出法の基礎的技術を確立することができた。*in vitro* 研究では、リポソーム法での有用性を示すと共に長期暴露を想定した評価法の必要性が示唆された。

分担研究者

菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所
毒性部 部長
津田 洋幸 名古屋市立大学大学院医学研究科
生体防御総合医学専攻 生体機能分

子医学講座 分子毒性学 教授
西村 哲治 国立医薬品食品衛生研究所
環境衛生化学部 部長
西沢 共司 中央労働災害防止協会
日本バイオアッセイ研究センター

試験管理部 部長

屋形 直明 (財)化学物質評価研究機構
久留米事業所 分析化学 課長
新井 洋由 東京大学大学院薬学系研究科・
薬学部・機能薬学・細胞生化学
衛生化学 教授
本間 正充 国立医薬品食品衛生研究所
変異遺伝部 室長
中澤 憲一 国立医薬品食品衛生研究所
薬理部 部長
最上 知子 国立医薬品食品衛生研究所
機能生化学部 室長
涌生 聖 (株)三菱化学安全科学研究所・
鹿島研究所 安全性第1研究部
毒性学 副主任研究員
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

協力研究者

高木 篤也 国立医薬品食品衛生研究所
毒性部 室長
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 結荷 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
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
福森 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 主任研究官
久保田領志 国立医薬品食品衛生研究所
環境衛生化学部 主任研究官
清水久美子 国立医薬品食品衛生研究所
環境衛生化学部
後藤 薫 日本バイオアッセイ研究センター
企画調整部 施設課長
笠井 辰也 日本バイオアッセイ研究センター

試験管理部 吸入試験室 室長補佐

佐々木俊明 日本バイオアッセイ研究センター
試験管理部 吸入試験室 室長補佐
井上 義之 (財)化学物質評価研究機構
久留米事業所 試験第二課 副長
佐藤 薫 国立医薬品食品衛生研究所
薬理部 室長
重本-最上由香里 国立医薬品食品衛生研究所
機能生化学部
奥平 桂一郎 国立医薬品食品衛生研究所
機能生化学部

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おり、少なくとも1次元の大きさが100ナノメートル以下である物質がナノマテリアルと定義され、ナノテクノロジーの中心的な役割を担う新規物質として、近年急速にその種類や生産量が増加しつつある。これら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まれている。

これまでの通常の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。特に、ナノマテリアルの多くが難溶性、難分解性で凝集しやすい性質であることより、その生体影響は同じ物質であっても投与経路および投与形態や使用する分散剤によって異なることが予想され、安全性評価試験の開発にはこれらの因子を考慮する必要がある。これらの物理特性を考慮して、生体内挙動を把握するための分析手法の開発、*in vivo* では、生体内蓄積性を考慮した慢性影響を検出する手法と暴露の懸念に比較的高い吸入暴露手法の開発、生体内に取り込まれたあとの影響のメカニズムやスクリーニング方としての *in vitro* 系の開発、および国際動向の把握をも視野に入れた総合的な評価法の確立のための基盤研究を行うことを目的としている。

B. 研究方法

本研究では、大きく分けて、①*in vivo* 生体影響評価手法の開発、②ナノ粒子の吸入毒性評価手法の開発、③暴露測定法および動態解析法の開発、④*in vitro* 試験系の開発、⑤国際動向調査の5部門体制で研究を行った。

①*in vivo* 生体影響評価手法の開発:

MWCNT およびフラーレンについては、腹腔内投与による発がん試験法を、その感受性が高まるとされる p53 遺伝子ヘテロ欠失マウスと組み合わせ、単回腹腔内投与による中皮腫誘発試験を行った(菅野)。また、ラットへの経気管噴霧法による、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い、c-Ha-ras トラ

ンスジェニックラット(Tg)を用いた DHPN 誘発性の TiO₂ 粒子発がんイニシエーション、および通常ラットにおける C60 投与による肺と乳腺の発がんプロモーション作用を検討した(津田)。

②ナノ粒子の吸入毒性評価手法:

MWCNT を気管内投与する際の媒体および調製法の検討を行った(涌生)。MWCNTの吸入暴露法の開発としては、ダスト状態およびミスト状態でのナノレベルでの吸入暴露法を検討した(広瀬)。

③暴露測定法および動態解析法の開発:

測定法の開発研究としては、MWCNT の電子顕微鏡による解析方法の検討を行った(西村)。C60 の体内挙動解析研究としては、マウスへの腹腔内投与(溶媒:1-メチル-2-ピロリドン)による各臓器からの検出を試みた(西村)。また、C60 の環境残留性の確認と水溶性変化物の検討では、OECD テストガイドライン 301C 試験法の検討を行った(屋形)。

④*in vitro* 試験系の開発:

培養細胞系への C60 暴露研究のための分散剤の検討では、リン脂質や細胞内導入試薬等の検討を行った(西村)。また、腹腔マクロファージを培養し、リポソーム添加による C60 の細胞内導入を試みた(新井)。神経系への影響としては γ -シクロデキストリンで可溶化した C60 を用いて、卵母細胞に発現させたヒトの神経型アセチルコリン受容体チャネルを介するイオン電流に対する検討を行った(中澤)。TiO₂ について6種類の培養細胞を用い、細胞毒性および細胞内への取り込みについて検討した(西村)。腸管吸収評価モデルである Caco-2 細胞単層膜を用いた TiO₂ 粒子の透過に関する検討を行った(最上)。TiO₂ の CHL 細胞およびヒトリンパ芽球 TK6 細胞を用いた遺伝毒性に対する検討を行った(本間)。

⑤国際動向調査:

ナノマテリアルのハザードに関する EU や産業界の取り組み、生体影響に関する文献を収集して査読を行う(高月)と共に、OECD ワーキンググループにおけ

る取り組み状況について情報収集した(広瀬)。

(倫理面への配慮)

実験動物を用いる実験では、動物への苦痛の少ない方法を用いるといった、当該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た。

C. 研究結果

①in vivo 生体影響評価手法の開発:

in vivo 試験法において、p53(+/-)マウスに多層カーボンナノチューブ(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 群および青アスベスト群では腹腔内に中皮腫が発生し、対照群とフラーレン(C60)群では認められなかった。さらに、MWCNT の用量を 1/10、1/100 あるいは 1/1000 に下げて発がん性試験を同様のプロトコールにて実施したところ、実験の途中段階ではあるが、腹腔内腫瘍発生率に用量相関性が窺われた。MWCNT 投与による病理形態学的変化は、凝集塊に対する組織反応も含めて、アスベストのそれと類似していた。

経気管肺内噴霧法により、酸化チタン(TiO₂)では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、C60 では通常の F344 雄ラットを用いて発がんプロモーション作用の評価を行った。Tg において TiO₂ は肺と乳腺腫瘍の発生に、C60 は肺腫瘍の発生にプロモーション作用を示すことが見出された。乳腺腫瘍プロモーション作用は曝露部位と離れておりその機序について検討中である。

②ナノ粒子の吸入毒性評価手法:

SD 系ラットの雌に 5 mg/head の用量で MWCNT の凝集塊が多い懸濁液(未粉碎群)と単離した MWCNT が比較的多い懸濁液(粉碎群)のそれぞれを投与した。陽性対照として結晶性シリカ(Min-U Sil #5)を 5 mg/head の用量で投与し(陽性対照群)、陰性対照として溶媒のみを投与した(対照群)。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、肺に対する影響を評価した。

吸入試験法では、MWNT の Tween20 を用いたミスト状態での吸入暴露法により、鼻部暴露チャンバーを用いてラットへの 2 時間の暴露試験を試みた結果 11 μg/m³ ではあったが、安定して実施できることが確認された。

③暴露測定法および動態解析法の開発:

測定法および動態解析では、様々な溶媒を用いてラットに C60 を強制単回経口投与を実施し、体内分布(肝臓、腎臓、脾臓および腸管リンパ節)の比較検討を行った結果、リポソーム懸濁とコーン油溶液による投与 1 日後の腎臓および腸管リンパ節で検出されたが、その他のほとんどの溶媒では検出されなかった。また、MWCNT の体内運命や体内動態を把握するために、臓器を強アルカリで溶解後、電子顕微鏡で観察による解析方法を設定し、ラットに経気道的に MWCNT を投与したところ投与後 1 日目の肺に加えて肝臓からも有意な量の MWCNT が検出された。

OECD テストガイドライン 301C に準拠した本試験ではフラーレンを水分散させるために、氷砂糖及び HCO-40 を使用した。従って、これら助剤の微生物分解が BOD に影響を与えるため、「フラーレン分解に寄与した真の BOD」を測定することはできなかった。しかしながら、被験物質の定量分析では、フラーレンは理論量残留し、変化物も認められなかったことから、本水分散液中のフラーレンは微生物により分解されないことが示された。

④in vitro 試験系の開発:

環境中での分解能に関して粒子径及び水中存在形態の異なるフラーレン水分散液を用い分解度試験を実施したが、微生物による分解は認められなかった。

in vitro 試験法に関する研究においては、C60 を内包したリポソームを取り込んだマクロファージの TNF α 産生に対する影響は特に見られなかった。C60 を 0.5%カルボキシメチルセルロース溶液で懸濁調整したところ CHL 細胞の染色体の構造異常は観察されなかったが、S9 存在、非存在下の両条件において、

2.5mg/ml 以上で倍数体細胞の有意な増加が観察された。また、PC-PSリポソームに内包した C60 では、CHL 細胞で、48 時間、30ul/ml(調整可能最高濃度)まで処理したが、有意な小核の誘発は認められなかった。同じリポソーム C60 を用いて、アフリカツメガエル卵母細胞発現系および培養アストロサイトを用いて神経細胞機能蛋白質に対する影響を検討したところ C60 が P2X2 受容体、GLAST の機能にほとんど影響を及ぼさないことが示された。しかし、リポソームを用いてナノマテリアルを可溶化する場合にはリポソーム単独作用を除外できる条件を設定する必要があることが示された。腸管吸収評価モデルである Caco-2 細胞単層膜の安定性や蛍光デキストランのトランスサイトーシスへは、PS/PC リポソームに分散、凝集塊を含む懸濁液のどちらの状態でも影響を与えなかった。マクロファージ RAW264 細胞からのサイトカイン放出にも影響は認められなかったが、高濃度の PS/PC リポソーム自体により促進された GM-CSF 産生は、フラレーンがリポソームに含まれることにより抑制された。一方、長期曝露を想定した HepG2 細胞の細胞増殖影響におけるコロニー形成率への影響を検討した結果、わずかではあるが、C60 を継続して曝露した細胞、C60 を曝露した細胞、の順にコロニー形成率が低下した。これまでの検討では短期的な曝露においては細胞増殖や細胞毒性に影響は認められなかったが、長期曝露もしくは長期的に継続維持した後に影響が生じる可能性が示唆された。

⑤国際動向調査:

国際的にみたナノ材料の総合管理についての動向を把握するために、EPA の「ナノテクノロジー白書 (2007 年 2 月)」、欧州委員会の「ナノ物質のリスクを評価するために新規及び既存物質のための技術指針文書に従ったリスク評価方法論の適切性に関する意見 (2007 年 6 月)」及び OECD における 6 つのステアリンググループの活動や加盟各国の安全性研究への取り組み状況について調査した。また、ナノ材料の生態系への影響について文献検索するとともに、総説等から必要な文献を確認して収集して査読を行った。

D. 考察

①アスベスト中皮腫の短期発がんモデル系として知られている p53(+/-)マウスを用いて、ナノマテリアルの短期発がん試験では、MWCNT のバルク検体には形状がアスベストに類似した成分が含まれているため、アスベストと同様に中皮腫が発生することが予測された。病理組織学的検査の結果、MWCNT 群に中皮腫が多発することが示され、その程度は投与検体の重量での比較ではアスベストと同等である明らかとなった。この結果から、ヒトが MWCNT を吸入した場合に、アスベストと同様の発がん性を示す可能性が示唆された。ヒトへの本結果の外挿に際しては、第一に、MWCNT が吸入によりアスベストと同様に肺内の病変誘発部位に到達するか否か、アスベスト同様の体内滞留時間を示すか否か、等の要素を明らかにする必要があり、将来検討すべき課題である。しかし、動物実験で MWCNT により、アスベストと類似したメカニズムにより中皮腫が発生することが示されたことから、新製品開発の際にはこのような特性を十分に考慮することが望まれる。また現時点では、MWCNT を扱うヒトは曝露を最小限にすることが重要であると思われた。

今年度新たに実施した MWCNT の用量反応性試験では各用量群とも用量依存的に中皮腫と思われる腫瘍が腹腔内に認められた。前回の試験での MWCNT の投与量は 3mg/animal (1x10⁹ 本/動物)であったが、今回、0.003mg/kg 群 (1x10⁶ 本/動物)で腹腔内臓器の癒着が肉眼的に認められない動物でも腫瘍発生が認められており、少なくとも腹腔内臓器の癒着が中皮腫発生の必須条件ではないことが示唆された。フラレーンに関しては本実験条件下(観察期間 26 週間)では中皮腫が観られなかったが、貪食細胞が凝集塊の表面を浸蝕し微細な粒子として他部位へ運び出す可能性が形態学的に示唆されたことから、今後、さらに観察期間を延長し、生体に及ぼす影響について調査する予定である。

簡便な肺内投与方法は被検物質を溶媒懸濁あるいは溶解した状態で直接肺内に噴霧するもので、単なる気管内投与 (instillation) と較べて肺胞内にも充分被検物質が送達されていることが確認され、今後

有用な方法になると考えられる。酸化チタン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、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。さらに、TD は肺から、脳、リンパ節、乳腺、肝、卵巣等に移動して蓄積されていることが分かった。この実験において、曝露組織から遠隔の乳腺においてもプロモーション作用が認められたことについての機序については、今後の解析が必要である。また、脳においてかなり多く(肺の約半分量)検出された事は、注目すべき所見で、移動経路の特定と脳組織における有害作用の有無について明らかにする必要がある。

肺内投与方法に用いたフラーレンは((財)化学物質評価機構でシロ糖溶液に分散化する事に成功しており)、共同研究による提供を受けた。C60もTDと同様に、肺胞マクロファージ内に取りこまれ、その周囲には軽度のリンパ球等の集簇をみる炎症性反応がみられた。C60のマクロファージ内における形態については電顕にて観察している。肺の腫瘍病変において癌は腺扁平上皮癌であって、今までTDやカーボンブラックの吸入曝露で雌ラットに見られたものと同様である。一般にげっ歯類における化学物質による肺腫瘍は殆どが腺腫・腺がんであることから、このような扁平上皮癌の発生は異物発がんに共通の現象かも知れない。

②MWCNT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形態学的にも確認された。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。

MWNTのミスト状態での吸入曝露法を検討し、鼻部曝露チャンバーによるラットへの2時間の曝露試験を試みた結果、動物への曝露実験でMWNT懸濁液のミスト発生は安定して実施できた。また、吸入チャンバー内粒子のSMPSによる体積粒径分布やアンダーセンサンプラーによる粒径分布の結果から、吸入チャンバー内にMWNTの1 μ m以下の粒子が存在したと推察されたが、曝露濃度は、11 μ g/m³と低濃度に留まった。ミスト状態での曝露法により、MWNTの粒子による曝露実験をさらに高濃度で実施するためには、分散剤の選択を含めた高濃度のMWNT懸濁液の作製法の検討及び高濃度MWNT懸濁液のミスト化に適したミスト発生器の改良が必要と思われる。また、チャンバー内のMWNTの凝集状態の確認のために、SEM等による形態観察も必要と思われる。

③C₆₀のラットへの経口投与における吸収・体内分布に関する検討においては、C₆₀が検出された臓器の数が少なく、本検討からは吸収の有無もしくは体内分布を明確に結論付けることはできないが、2例での腸管リンパ節からの検出結果は、C₆₀が腸管から吸収され、腸管リンパ節に移送された可能性を示唆していると考えられる。

培養細胞に対するC₆₀の影響に関する検討において長期曝露を想定した細胞増殖影響におけるコロニー形成率への影響を検討した結果、短期的な曝露においては細胞増殖や細胞毒性に影響は認められなかったが、長期に曝露すること、もしくは長期的に継続維持することにより影響が生じる可能性が示唆された。また、取り込まれたC₆₀は核画分に集積する可能性が示唆された。

臓器中のMWCNTの確認方法の確立とMWCNTの経気道投与の検討においては、経気道投与されたMWCNTが肝臓試料から検出され、MWCNTは肺を経由し肝臓に移行することを示唆している。しかし、肝臓への移行については、投与量と移行量の比率、投与後の時間と移行量の変遷、生存期間と肝臓への移行量との関係、コンタミネーションの可能性の否定

についてなど、さらに精査し、再度確認する必要がある。また、開発した臓器中 MWCNT の確認試験法は、MWCNT を、臓器分解物の残渣と共に沈殿として分離、電子顕微鏡での観察を可能にした点で、簡易で有効な手法であると考えられる。

OECD テストガイドライン 301C に準拠した分解度試験において、フラーレン水分散液は、糖類をフラーレンにいったん配位・溶解して再結晶化させることにより、フラーレンの水分散化を可能にしている。従って、粒子径(本水分散液は平均粒径 174 μm)及び水中存在形態の異なるフラーレン溶液が微生物により分解されることが期待されたが、その成果は認められなかった。しかし、更に異なる環境条件での試験を実施し、確認することが望まれると共に、光による変化の有無についても調査する必要があるであろう。

④マウス腹腔マクロファージに対するフラーレンの影響(C60 リポソームによる投与)の検討において、マクロファージ内にフラーレンが取り込まれる様子が観察された。しかしこれらフラーレンを取り込んだマクロファージの TNF α 産生に対する影響は特に見られなかった。泡沫化させたマクロファージを顕微鏡下で観察しても脂肪滴が紫に染まるということは見られず、マクロファージに取り込まれたフラーレンの量が明らかでない。今後 LC-MS などを用いたフラーレンの定量系を構築する必要がある。また、線虫 *C. elegans* に対するフラーレンの影響では、線虫腸内にフラーレン様の物質は観察されなかったが、上述のマクロファージと同様、何らかの定量系が必要である。

遺伝毒性試験に対する検討では今回 0.5%カルボキシメチルセルロース溶液で懸濁調整し、染色体異常試験を行ったが、この C60 懸濁物を CHL 細胞と共に培養すると、用量依存的に細胞毒性が観察された。また、構造異常の誘発は認められなかったが、倍数体細胞の有意な増加が観察された。C60 の倍数性誘発機構として物理的要因による細胞質分裂阻害の可能性が考えられるため、C60 の調整法、分散法により倍数性の誘発の程度が異なるのかもしれない。また、今回、C60 の細胞膜透過性を高めるためリポソ-

ム法を用いた。フォスファチジルコリン(PC)、およびフォスファチジルセリン(PS)により、2 種類の方法(①フィルター非濾過、②フィルター濾過)で C60 リポソームを作成し、その *in vitro* での遺伝毒性を評価したが、両者に有意な小核の誘発は認められなかった。以前我々は電気穿孔法により直接 nanom を細胞内導入し、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。これらのことを考えると、C60 は細胞に取り込まれにくく、仮に取り込まれたとしてもその遺伝毒性は極めて軽微であると考えられる。一方、細胞表面に接触する C60 は細胞質の分裂を阻害し、染色体の倍数性を誘発する可能性が示唆された。この細胞表面反応に対する光の影響が今後の課題である。

神経細胞機能蛋白質に対する影響の検討においては、アフリカツメガエル卵母細胞および培養アストロサイトは、リポソームで可溶化された C60 で 24 時間処理した。これは、リポソームがスカベンジャー受容体を介したエンドサイトーシスによってとりこまれるメカニズムを考慮したためである。しかし、アフリカツメガエル卵母細胞の P2X2 イオン電流はリポソーム単独処理により減少した。よって、リポソームによって可溶化した C60 でアフリカツメガエル卵母細胞を処理する場合は処理時間を 24 時間より短く設定する必要があると考えられる。2 種類の方法で調整した C60 リポソームサンプルは、単独で培養アストロサイトの MTT reduction を減少させる傾向、LDH leakage を増加させる傾向を示した。これらの結果は、使用したリポソームに微弱な細胞毒性がある可能性を示している。よって、培養アストロサイトを評価系に用いる場合も処理時間は 24 時間より短く設定するのが望ましいと考えられる。

腸管吸収評価モデルにおける検討では、PS/PC リポソームに封入したフラーレン、懸濁フラーレンのどちらも Caco-2 細胞単層膜を透過しなかった。また、どちらの分散方法を採用した場合でも、Caco-2 細胞単層膜の安定性には影響せず、トランスサイトーシスによる積極的な物質輸送を抑制することもなかった。また、PS/PC リポソーム単独は 0.33 mM で GM-CSF および TNF α の産生を促進したが、GM-CSF 産生はリ

ポソームに C60 が封入されるとむしろ抑制された。脂肪酸分子種の異なる PS や PC を用いることにより、リポソーム自体の生理活性を抑える改良が可能かもしれない。

⑤国際的にみたナノ材料の総合管理についての動向を把握するために、EPA、欧州委員会及び OECD 等の活動等や、ナノ材料の生態系への影響について文献を行った結果、科学的情報収集に加えて、健康影響や環境影響に関する研究プロジェクトの公募や、いくつかのナノマテリアルに関する実際の試験や計画が実行されつつあることが明らかになると共に、リスク評価や管理に対する議論の枠組みなどの検討も始まっていることが示された

E. 結論

MWCNT 腹腔内投与での繊維状粒子として観察された事象や気管内投与による発がんプロモーション作用の結果は、in vivo 長期暴露研究の必要性を示すと共に、MWCNT の吸入暴露システムと生体内検出法の基礎的技術を確立することができた。in vitro 研究では、リポソーム法での有用性を示すと共に長期暴露を想定した評価法の必要性が示唆された。

F. 健康危機情報

p53(+/-)マウスを用いたMWCNTの単回腹腔内投与試験により、中皮腫の発生が確認されたため、厚生労働省健康危機管理調整官宛に健康危険情報通報(グレードB:情報提供、経過注視)を行った。

F. 研究発表

1. 論文発表

Takagi A, Hirose A, Nishimura T, Fukumori N, Ogata A, Ohashi N, Kitajima S, Kanno J. Induction of mesothelioma in p53+/- mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube. J Toxicol Sci. 2008 Feb;33(1):105-16.
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.35: 436-443, 2007.

Tsuda, H., Iigo, M., Takasuka, N., Ueda, S., Ohshima Y., Fukamachi, K., Shirai, T., Hirano, S., Matsuda, E., and Wakabayashi, K. Possible enhancing activity of diacylglycerol on 4-nitroquinoline 1-oxide induced carcinogenesis of the tongue in human c-Ha-ras proto-oncogene transgenic rats. Food and Chemical Toxicology 45: 1013-1019, 2007.

Iigo, M., Shimamura, M., Hirano, S., Tokutake, S., Alexander, D.B. and Tsuda, H. Tanaka, T., (Editor) Cancer prevention and anti-metastatic effects by oral administration of procyanidins. Cancer: Dose Disease Progression and Chemoprevention, p.p. 277-297, ISBN:81-308-0150-7, 2007.

Naiki-Ito, A., Asamoto, M., Jplaowadp, M., Talajasjo S., Uamashita, H., Tsuda, H., Ogawa, K. and Shirai, T. Gpx2 Is an Overexpressed Gene in Rat Breast Cancers Induced by Three Different Chemical Carcinogens. Cancer Res 67(23): 11353-1138, 2007.

Matsuoka, T., Hamaguchi, T., Fukamachi, K., Yoshida, M., Watanabe G., Taaya, K., Tsuda, H. and Tsubura, A. Molecular analysis of rat mammary carcinogenesis: an approach from carcinogenesis research to cancer prevention. Med Mol Morphol 40: 185-190, 2007.

西村哲治, ナノ粒子の有害性評価とリスク対策p

33-42, 技術情報協会, 平成 19 年 10 月

Burlinson, B., Tice, RR., Speit, G., Agurell, E., Brendler-Schwaab, SY., Collins, AR., Escobar, P., Honma, M., Kumaravel, TS., Nakajima, M., Sasaki, YF., Thybaud, V., Uno, Y., Vasquez, M., and Hartmann, A. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: Results of the in vivo Comet

- assay workgroup *Mutat. Res.*, 627, 31-35 (2007)
- Moore, MM., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, J., Burlinson, B., Cifone, M., Clark, J., Clay, P., Doppalapudi, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, J., Muster, W., Pant, K., Kidd, DA., Lorge, E., Lloyd, M., Myhr, B., O'Donovan, M., Riach, C., Stankowski, Jr. LF., Thakur, AK., and Van Goethem, F. Mouse lymphoma thymidine kinase gene mutation assay: Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Testing, San Francisco, 2005, recommendations for 24-h treatment. *Mutat. Res.*, 627, 36-40 (2007)
- Ku, WW., Bigger, A., Brambilla, G., Glatt, H., Gocke, E., Guzzie, PJ., Hakura, A., Honma, M., Martus, H-J., Obach, RS., and Roberts, R. Strategy for genotoxicity testing—Metabolic considerations *Mutat. Res.*, 627, 59-77 (2007)
- Wang, J., Chen, T., Honma, M., Chen, L., Moore, M. 3'-Azido-3'-deoxythymidine induces deletions in L5178Y mouse lymphoma cells. *Environ. Mol. Mutagen.*, 48, 248-257 (2007)
- Honma, M., Sakuraba, M., Koizumi, T., Takashima, Y., Sakamoto, H., and Hayashi, M. Non-homologous end-joining for repairing I-SceI-induced DNA double strand breaks in human cells. *DNA Repair*, 6, 781-188 (2007)
- Luan Y, Suzuki T, Palanisamy R, Takashima Y, Sakamoto H, Sakuraba M, Koizumi T, Saito M, Matsufuji H, Yamagata K, Yamaguchi T, Hayashi M, Honma M. Potassium bromate treatment predominantly causes large deletions, but not GC>TA transversion in human cells. *Mutat. Res.*, 619, 113-123 (2007)
- Newirth, E., Honma, M., and Grosovsky, A., Interchromosomal crossover in human cell is associated with long gene conversion tracts. *Mol. Cell. Biol.*, 27, 5261-5274 (2007)
- Yatagai, F, Umebayashi, Y., Suzuki, M., Abe, T., Suzuki, H., Shimazu, T., Ishioka, N., Iwaki, M, and Honma, M. Influence of low-dose and low-dose-rate ionizing radiation on mutation induction in human cells. *Advan. Space Res.*, 40, 470-473 (2007)
- Yatagai, F., Umebayashi, Y., Honma, M., Sugasawa, K., Takayama, Y., and Hanaoka, F. Mutagenic radioadaptation in a human lymphoblastoid cell line. *Mutat. Res.*, 638, 48-55 (2008)
- Sato K, Akaishi T, Matsuki N, Ohno Y, Nakazawa K. β -Estradiol induces synaptogenesis in the hippocampus by enhancing brain-derived neurotrophic factor release from dentate gyrus granule cells. *Brain Res.*, 1150 108-120 (2007)
- Sato K, Saito Y, Oka J, Ohwada T, Nakazawa K. Effects of tamoxifen on L-glu transporters of astrocytes. (Submitted)
- Usami, M., Mitsunaga, K. and Nakazawa, K. Two-dimensional electrophoresis of protein from cultured postimplantation rat embryos for developmental toxicity studies. *Toxicol. In Vitro* 21, 521-526 (2007)
- Nakajima, M., Takahashi, H., Nakazawa, K., and Usami, M. Fetal cartilage malformation by intravenous administration of indium trichloride to pregnant rats. *Reproduct. Toxicol.* 24, 409-413 (2007)
- Usami, M., Mitsunaga, K., and Nakazawa, K. Comparative proteome analysis of the embryo proper and yolk sac membrane of day 11.5 cultured embryos. *Birth Defects Res. B* 80, 383-395 (2007)
2. 学会発表
- Akihiko Hirose, Hiroyuki Tsuda, Hiroshi Tokunaga, Tetsuji Nishimura, Jun Kanno: Efforts by the Japanese National Institute of Health Science to develop measures to evaluate the health effects of manufactured nanomaterials. EuroNanOSH2007 Dec. 3-5 2007, Helsinki, Finland.
- 菅野 純、広瀬明彦、高木篤也、ナノマテリアルの毒性試験、毒性評価、日本薬学会第128年会、2008年3月26-28日、横浜

- Tsuda H., Carcinogenicity of nanomaterials, is it specific to nanoscale? Nanomaterials: Evaluating The Benefits And The Risks, Symposium in The 11th International Congress of Toxicology (ICTXI), July 15-19, 2007, Montreal, Canada,
- 津田洋幸 「ナノ粒子の発がん性評価の現状—社会受容は可能か—」日本薬学会第128年会シンポジウム「ナノマテリアルの医薬品への展開とリスク」パシフィコ横浜、2008年3月28日
- 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(2007.3)
- Nishimura, T., Shimizu, K., Kubota, R., Tahara, M., Hirose, A., Tokunaga, H.: Development of dispersion method for the cell culture medium to establish in vitro screening system for fullerene. International Congress of Toxicology(2007.6)
- 西村哲治, 清水久美子, 久保田領志, 田原麻衣子, 徳永裕司, 広瀬明彦: フラーレンの生物学的影響評価のための In Vitro 試験法の検討—培養液への分散方法—, 第 13 回日本環境毒性学会・バオアッセイ研究会合同研究発表会 p22 (2007.9)
- Nishimura, T., Shimizu, K., Kubota, R., Tahara, M., Hirose, A., Tokunaga, H.: Establishment of dispersion methods for in vitro screening system for fullerene. 44th Congress of The European Societies of Toxicology T41 (2007.10)
- Tokunaga, H., Uchino, T., Ikarashi, Y., Nishimura, T.: Studies for cytotoxicity of titanium dioxide as manufactured nanomaterial into the cultured cell lines. SETAC North America 28th Annual Meeting (2007.11)
- Kubota, R., Tahara, M., Shimizu, K., Tokunaga, H., Hirose A., Ema, M., and Nishimura, T. Quantitative determination of C₆₀ fullerene by LC-MS/MS and its tissue distribution following oral administration to rats. 47th Annual Meeting of Society of Toxicology (2008)
- 本間正充: 代謝物の遺伝毒性評価 第 34 回日本トキシコロジー学会学術年会(2007.6)
- Honma M.: DNA double strand breaks inducing genomic instability in human cells. 13th International Congress of Radiation Research (2007.7)
- Yatagai F., Suzuki M., Ishioka N., Ohmori H., and Honma M.: Repair of dsb at a specific site of chromosome: influence of low-dose/low-dose-rate gamma-rays. 13th International Congress of Radiation Research (2007.7)
- Honma M.: Genotoxic assessment of drug metabolite and ICH guideline. Chinese National Conference on Drug Toxicology 2007 (2007.8)
- Honma M.: A multi-endpoints in vitro genotoxicity test system consisting of Comet, micronuclei, and gene mutation assays. 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences (2007.8)
- Honma M., Takashima Y., Yasui M., Koyama N., Koizumi T., Sakuraba M., Sakamoto H., Sugimoto K., and Hayashi M.: Tracing Micronuclei by Fluorescent Live Cell Imaging Analysis. 37th European Environmental Mutagen Society (2007.9)
- Honma M.: Genomic instability caused through breakage-fusion-bridge (BFB) cycle in human cells. The 8th International Symposium on Chromosomal Aberrations (2007.10)
- Suzuki T., Luan Y., Praba D., Kogi M., Honma M., Koizumi T., Tanabe S., Sato Y., Suzuki K., and Yamaguchi T.: CGH and SNP arrays; as new tools for detailed analysis of chromosome. The 8th International Symposium on Chromosomal Aberrations (2007.10)
- Honma M.: The new ICH guideline on Genotoxicity. 2007 Korean National Institute of Toxicological Research International Symposium (2007.10)
- Honma M.: Validation of a humanized in vitro genotoxicity test system. 2007 Korean NTP Workshop (2007.10)
- 安井学, 小山直己, 高島良生, 小泉朋子, 櫻庭真弓、

- 坂本浩子、杉本憲治、林 真、本間正充: ライブセルイメージングを用いた γ 線照射による小核形成と追跡 日本放射線影響学会第 47 回大会 (2007.11)
- 本間正充、櫻庭真弓、林 真: DNA マイクロアレイによる放射線損傷領域のゲノムマッピング 日本放射線影響学会第 47 回大会 (2007.11)
- 谷田貝文夫、鈴木雅雄、本間正充: 低線量・低線量率 γ 線照射によるヒトリンパ芽球細胞での変異誘発 日本放射線影響学会第 47 回大会 (2007.11)
- Koyama N., Yasui M., Sakamoto H., Sakuraba M., Masuda S., Kinai N., Matsuda T, Hayasi M., and Honma M: Genotoxicity of acryamide expressed via metabolic activation in CYP over-expressing human cells. 1st Asian Conference on Environmental Mutagens & 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)
- Yasui M., Suenaga E., Koyama N., Masutani C., Hanaoka F., Gruz P., Shibutani S., Nohmi T., Hayashi M., and Honma M.: Translesion synthesis past 2'-deoxyinosine, a major nitric oxide-induced DNA adduct, by human DNA polymerase η and κ . 1st Asian Conference on Environmental Mutagens & 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)
- Yatagai F., Matsumoto H., Honma M.: A possible involvement of bystander effects in the repression of spontaneous mutation induction. 1st Asian Conference on Environmental Mutagens & 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)
- Saito M., Matsufuji H., Chino M., Hyashi M., Honma M., and Yamagata K. : Antioxidant activity and potential genotoxicity of flavonoid by using human lymphoblastoid TK6 cells. 1st Asian Conference on Environmental Mutagens & 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)
- Arai S., Saito M., Takashima Y., Honma M., and Kojima H.: A new trial for in vitro Comet assay using 3-dimensional human epidermal model. 1st Asian Conference on Environmental Mutagens & 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)
- Kimura A., Sakamoto H., Hayashi M., Saigo K., Tokado H., and Honma M.: Establishment of a robust in vitro Comet protocol using human lymphoblastoid TL6 cells. 1st Asian Conference on Environmental Mutagens & 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)
- Honma M., Yasui M., Koyama N., Koizumi T., Sakuraba M., Sakamoto H., Takashima Y., Sugimoto K., and Honma M.: Visualization of micronuclei by fluorescent cell imaging analysis. 1st Asian Conference on Environmental Mutagens & 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)
- Suzuki T., Koizumi T., Prabha D., Luan Y., Honma M., Hamada S., Nakajima M., Watanabe T., and Furihata C.: Collaborative study on the toxicogenomics in JEMS/MMS II: High-throughput qPCR analysis by TaqMan low density array. 1st Asian Conference on Environmental Mutagens & 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)
- Honma M.: Background issues initiating a revision of the current ICH genotoxicity guidance. 1st Asian Conference on Environmental Mutagens & 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)
- 村田香織、森山英樹、高島良生、本間正充、岡茂範、杉本憲治: マルチカラーライブセルイメージングにより明らかとなった Aurora-B キナーゼ阻害剤 VX-680 の染色体分配ダイナミズムに及ぼす影響 第 30 回日本分子生物学会年会(2007.12)

- Honma M., Yasui M., Koyama N., Koizumi T., Sakuraba M., Sakamoto H., Takashima Y., Sugimoto K., and Hayashi M.: Genotoxic Responses by Live Cell Imaging Analysis International Conference on Toxic Exposure Related Biomarker, Genome and Health Effects (2008. 1)
- Honma M., Takashima Y., Sakuraba M., Koizumi T., Sakamoto H., and Hayashi M. Inter-allelic homologous recombination and target integration induced by DNA double strand break Key Stone Symposium” DNA Repair and Recombination” (2008. 2)
- Sato K, Ventura RE, Goldman JE, Nakazawa, hGFAP プロモーター下流に DsRed をもつレンチウイルスを用いたアストロサイト特異的標識法の確立 第 30 回日本神経科学大会 (2007, 9)
- Sato K, Ventura RE, Goldman JE, Nakazawa K, Astrocyte-specific labeling with a recombinant lentiviral vector carrying DsRed protein driven by a human glial fibrillary acidic protein promoter. 2007 Annual Meeting of Society for Neuroscience (2007. 10)
- 佐藤 薫, Cui Yong-Mei, Sha Yu, 大和田智彦, 中澤憲一, タモキシフェンと類縁化合物のアストロサイトグルタミン酸トランスポーターに対する作用 第 81 回日本薬理学会年会 (2008. 3)
- Sato K, Matsuki N, Nakazawa K, Estrogens inhibit L-glutamate uptake by astrocytes by membrane estrogen receptor alpha. US-Japan joint meeting for glia research (2008. 3)
- Kiyoshi Wako, H. Hiratsuka, M. Sekijima, A. Hirose. Effects of the Preparation Method of MWCNT Suspension for Intratracheal Instillation to Rats for Pulmonary Toxicity Study 11th International Congress of Toxicology (2007.7)
- 小谷百合, 土居卓也, 佐々木啓, 涌生聖, 土谷稔, 広瀬明彦 多層カーボンナノチューブ (Multi-Wall Carbon Nanotubes, MWCNT) のラット気管内投与における投与液の懸濁状態による病理学的変化の違い 第 24 回日本毒性病理学会学術年会 (2008.2)

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
国内特許申請中 (特願 2003-317031、特願 2004-219285)

平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金
(化学物質リスク研究事業)

Ⅱ. 分担研究報告書

研究課題名: ナノマテリアルの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じて、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 群で腹腔内に中皮腫が発生し、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中皮腫は観られなかった。さらに、MWCNT の用量を 1/10、1/100 あるいは 1/1000 に下げて発がん性試験を同様のプロトコールにて実施したところ、実験の途中段階ではあるが、腹腔内腫瘍発生率に用量相関性が観られた。MWCNT 投与による病理形態学的変化は、凝集塊に対する組織反応も含めて、アスベストのそれと類似していた。動物実験で MWCNT で腫瘍発生が認められていることから、これを用いた新製品開発においてはこのような特性を想定することが望まれると共に、現時点では、MWCNT を扱うヒトは暴露を最小限にすることが重要であると思われた。

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。これまでの通常の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. 方法

実験1.18年度実施 p53ヘテロ欠失マウスにおけるナノマテリアル腹腔内投与試験の病理組織学的検査の実施:

動物:雄 C57BL/6 とバッククロスした 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)は工業用のものを入手した(MITSUI MWCNT-7, Lot NO. 060125-01k)。フラーレンはフロンティアカーボン社より購入した(C60, Nanom purple, Frontier Carbon Corporation, Tokyo Japan)。陽性対照として青アスベスト(crocidolite)を使用した(UICC 標品クロシドライト:NIHS 保管品)。

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、腹腔内投与に使用した。検体の濃度は各検体とも 3mg/ml とした。投与量は 3mg/ml/マウス(MWCNT の線維数として 1×10^9 本/animal)とし、投与後、6 ヶ月間観察した。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、内臓の肉眼的検査を行った後、H&E 標本を作製し、病理組織学的検査を実施した。

実験 2. MWCNT の p53(+/-)マウスを用いた腹腔内投与発がん性試験(用量-反応試験)

動物:雄 C57BL/6 とバッククロスした p53ヘテロ欠失(p53(+/-))マウス(9~11 週齢、一群 20 匹)を実験に使用した。

検体及び調整:実験1と同様の検体を同様に調整した。検体の用量は前年度の試験での MWCNT の投与量が 3mg/animal(線維数として 1×10^9 本/animal)であったので、その 1/10 の用量の 0.3mg(1×10^8 本)を最高用量に、以下 10 の公比で、0.03(1×10^7 本)、0.003 mg(1×10^6 本)/animalとし、それぞれ単回腹腔内投与した。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。観察期間は投与後 1 年を目処とした。

(倫理面への配慮)

本実験は国立医薬品食品衛生研究所・動物実験委員会の規則及び承認のもとに人道的に実施された。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

実験1.

雄 p53(+/-)マウスに MWNCT、フラーレン、青石綿を 3mg/animal の用量で単回腹腔内

投与後、6ヶ月間観察し、死亡動物及び最終解剖動物の病理組織学的検査を実施した。その結果、中皮腫がMWCNT及び、青アスベスト群で観られた(発生率;MWCNT 14/16(87.5%)、青アスベスト 14/18(77.8%))。フラーレン及び対照群では中皮腫の発生は観られなかった。組織学的に、MWCNT投与群に観られた腹膜癒着及び線維性肥厚は、MWCNTに対する線維性癒着及び異物肉芽腫の形成によるもので、多核巨細胞を含む食細胞を伴うものであった。この線維肉芽腫性(fibrogranulomatous)病巣に隣接して次のような多様な腹膜中皮腫の病巣が認められた。すなわち、異型中皮腫細胞からなる結節性重層化病変(nodular mesotheliomatous pile-ups)、時に鋸釘状を示し(occasional hobnail appearance)、軽度から中等度の血管を伴った間質形成(vascular stem)を伴う典型的な上皮型中皮腫から、高度異型悪性中皮腫に匹敵し、時に中心壊死を示し、高頻度の分裂像を伴う未分化細胞で構成された直径が2.7 x 1.5cmといった大きな腫瘍まで、多様な腹膜中皮腫が観られた。この大きな腫瘍は腹壁、横隔膜、肝実質及び脾に浸潤し、ときには胸腔にまで及んでいた。なお、遠隔転移は認められなかった。フラーレン投与群では腹膜の病変はわずかであり、小さな暗褐色斑が漿膜表面に認められたのみであった。この暗褐色斑は組織学的には泡沫細胞の薄い層に囲まれた多角形の裂隙(polygonal clefts)ないし裂孔(lacunae)が、線維中隔で隔てられている像を示していた。この裂隙ないし裂孔は投与したフラーレン凝集塊のサイズと形に一致していた。

実験2

MWCNTの発がん性の用量反応性を調べるため、雄p53(+/-)マウスにMWCNTの3用量をそれぞれ単回腹腔内投与した。現時点(2008年3月)で投与開始後、約8ヶ月が経過した。途中死亡動物の肉眼所見から、MWCNTの0.3mg/kg群で強い腹腔内臓器の癒着が観られた。また、MWCNTの0.03mg/kgでも中程度の腹腔内臓器の癒着が観られた。腹腔内に腫瘍が認められた途中死亡動物数は0.003mg/kg群で3/20(15%)、0.03mg/kg群で5/20(25%)、0.3mg/kg群で15/20(75%)であった。なお、対照群にも死亡が2匹観られたが、p53欠失マウスに自然発生することが知られている胸腺腫によるものであり、腹腔内に腫瘍は観られなかった。

D. 考察

本研究では、アスベスト中皮腫の短期発がんモデル系として知られているp53(+/-)マウスを用いて、ナノマテリアルの短期発がん試験を実施した。MWCNTのバルク検体には形状がアスベストに類似した成分が含まれているため、アスベストと同様に中皮腫が発生することが予測された。病理組織学的検査の結果、MWCNT群に中皮腫が多発することが示され、その程度は投与検体の重量での比較ではアスベストと同等である明らかとなった。この結果から、ヒトがMWCNTを吸入した場合に、アスベストと同様の発がん性を示す可能性が示唆された。ヒトへの本結果の外挿に際しては、第一に、MWCNTが吸入によりアスベストと同様に肺内の病変誘発部位に到達するか否か、アスベ