

を添加し 24 時間培養した。培養上清を回収し、Bio-Plex Suspension Array System を用いてサイトカイン濃度の測定を行った。

C. 研究結果

1. Tween 20 および肺サーファクタント脂質 PC/PG を用いた MWCNT の分散

MWCNT は疎水性であり、超音波処理で PBS に懸濁すると凝集塊を形成し、定量的な扱いが困難となる。カーボンナノチューブ類の水系溶液への分散には、界面活性剤である Tween20 や Tween 80 を用いる方法が報告されている。本研究では、細胞を用いた試験系や気管内投与に適用する場合に界面活性剤の毒性を回避するための分散方法として、肺サーファクタントの主要構成脂質である PC と PG を用いる方法を検討した。

PC/PG (7:3) で作成したリポソームは人工肺サーファクタント活性を示すことが報告されている。また、医療用の肺サーファクタント製剤である「サーファクテン」のリン脂質濃度は約 30 mg/ml である。そこで、この濃度の PC/PG (2:1) (リポソーム様) 溶液中に MWCNT を分散することを試みた。しかしながら、脂質のリポソーム様水溶液に直接 MWCNT を懸濁する方法では分散が困難であったことから、Tween 20 を利用して MWCNT を PBS に分散し、続いて PC/PG リポソームと混合する二段階の方法を検討した。

Tween 20 の濃度は、昨年度の本研究課題の西沢らの分担研究報告を参考に、MWCNT と等量を用いた。Tween20 を利用しても MWCNT が高濃度になると大きな凝集塊を形成しやすいことから、MWCNT 濃度の検討を行った。最終的に、0.5% Tween 20 を用いて 5 mg/ml の MWCNT 分散液を調製し、引き続いて 30 mg/ml の PC/PG 溶液で希釈して 0.4 mg/ml の MWCNT 分散液(②、0.04% Tween 20 を含む)とすることとした(図 1)。

調製した PC/PG-MWCNT 分散液を静置すると、数時間で MWCNT が沈殿したが、再度超音波処理することにより再び分散することができた。数日放置しても再分散が可能であった。これ

に対し、PC/PG 溶液の代わりに PBS で希釈した分散液(①、Tween 20 最終濃度は 0.04%)では、数日静置すると不可逆的な凝集塊が生じる傾向があった。

肺サーファクタントの PC は 90% がパルミチン酸を構成脂肪酸とする dipalmitoyl-PC(C16PC)であることが知られている。そこで、C16PC/PG(2:1)を用いた分散液も同様に調製した(③)。卵由来 PC を用いた場合(①)に比較し、C16PC/PG(2:1)溶液は泡立ちやすく、MWCNT の凝集塊がより生じやすい傾向があった。

2. Caco-2 細胞および RAW264 細胞における MWCNT の細胞毒性の検討

PBS (①)、PC/PG (②)、および C16PC/PG (③)で分散した MWCNT が Caco-2 細胞および RAW264 細胞に毒性を及ぼすか否か検討を行った。TetraColor One 試薬は細胞中の脱水素酵素により還元されると青色のホルマゼンを生成し、その濃度は生細胞数の指標となることが知られる。Caco-2 細胞では PBS 懸濁(①)は 33.3 μg/ml まで影響を与えなかった。RAW264 細胞では、PBS 懸濁(①)は 10 μg/ml まで、PC/PG (②)、および C16PC/PG (③)で分散した MWCNT は 6.67 μg/ml の濃度まで検討した。いずれの濃度でも生細胞数を減少させず、明確な毒性を示さなかった。

3. Caco-2 細胞単層膜 (in vitro 腸管膜透過モデル) におけるトランスサイトーシスに及ぼすフラージェン の影響

In vitro 腸管膜透過モデルとなる Caco-2 細胞単層膜を構築し、PBS 懸濁 MWCNT①が単層膜機能に及ぼす影響を検討した。0.3~33.3 μg/ml の PBS 懸濁 MWCNT①を 24、48 時間培地に添加した場合においても、basolateral 側へのフェノールレッド漏出は認められず、MWCNT による単層膜の破状は認められなかった。

そこで腸上皮細胞の機能として、トランスサイトーシスによる物質輸送に及ぼす懸濁 MWCNT の影響を解析した。単層腸上皮細胞トランスサ

イトーシスの指標としてテキサスレッド蛍光デキストラン（分子量 3,000）の apical 側（上部）から basolateral 側（下部）への透過を測定した。図 2 に示すように、37 °C で培養すると、白いカラムで示すコントロールでは蛍光デキストランの basolateral 側（下部）への経時的な透過が認められる。この条件下、PBS 懸濁 MWCNT は蛍光デキストランの透過を抑制せず、33.3 µg/ml では 8 時間後および 48 時間後ではやや促進する傾向を示した。以上の結果より、PBS 懸濁 MWCNT ①は Caco-2 細胞におけるトランスサイトーシス機能を妨害しないことが示された。

4. RAW264 細胞のサイトカイン産生に及ぼす MWCNT の影響

MWCNT がマウスマクロファージ系細胞 RAW264 におけるサイトカイン分泌に及ぼす影響を検討した。RAW264 細胞に PBS 懸濁 MWCNT①を分散した培地を添加し、37°C で 24 時間のサイトカイン分泌量を測定した。図 3 に示すようにサイトカイン IL-1β、IL-2、IL-4、IL-5、IL-10、INF-γ に関しては LPS 刺激で認められるような産生は観察されなかった。しかしながら GM-CSF および TNFα 分泌は 10 µg/ml の懸濁 MWCNT①により促進された。

RAW264 細胞からのサイトカイン分泌を指標に、肺サーファクタント脂質 PC/PG ならびに C16PC/PG を利用した MWCNT 分散方法を評価した。図 4 に示すように、Tween20 のみで分散した MWCNT (①) では 6.67 µg/ml の MWCNT (6.67 µg/ml Tween 20) により GM-CSF および TNFα 分泌の促進が認められた。一方、PC/PG で分散した MWCNT(②)では、どちらのサイトカインも分泌は促進されなかった。しかしながら、C16PC/PG 分散 MWCNT(③)については、GM-CSF は濃度依存的に、TNFα は 6.67 µg/ml において顕著な分泌促進が認められた。

D. 考察

本年度の研究においては、[1] 肺サーファク

タント脂質を用いた MWCNT の分散方法を検討するとともに、[2]腸管吸収モデルである Caco-2 細胞単層膜機能、マクロファージ系細胞 RAW264 でのサイトカイン産生の二つを指標に影響の評価を行った。

肺サーファクタントは肺胞上皮細胞から分泌されるリポタンパク質であり、肺胞の表面を覆い、強力な表面活性により肺胞を押し広げる役割を持っている。したがって、MWCNT の分散に高濃度の界面活性剤を使用すると気管内投与時に毒性を発現する可能性があるが、肺サーファクタントを分散剤として利用できれば、その危険は低減されると期待される。

肺サーファクタントはリン脂質および肺サーファクタント蛋白から構成されている。医療用製剤として、ウシ肺から抽出されたサーファクタントが市販されているが、高価である。また、マウス・ラットには肺サーファクタント蛋白が異種蛋白であることからアレルギー性が問題となる。主要成分であるリン脂質 PC/PG (7:3) で作成したリポソームは人工肺サーファクタント活性を示すことが報告されていることから、本研究においては、脂質成分のみを利用することを検討した。また、肺サーファクタントの PC は 90%が炭素数 16 の飽和脂肪酸であるパルミチン酸からなる dipalmitoyl-PC(C16PC)であることが知られている。一方、卵由来の PC は C16 を 34%含み、C18:1 が 32%、C18:2 が 18%と、ほぼ半量の不飽和脂肪酸を含んでいる。そこで、C16PC と卵由来 PC を用いて分散した場合の比較を行った。

最初に、等量の Tween 20 で分散した MWCNT (PBS 懸濁 MWCNT①)を用いて検討したところ、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と呼ばれるエンドサイトーシス・エキソ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。これに対し、RAW264 細胞でのサイトカイン産生については GM-CSF および TNFα 産生を促進したことから、RAW264 細胞でのサイトカイン産生を指標に肺サーファクタント脂質による分散方法の評価を

行った。

RAW264 細胞において C16PC/PG 分散 MWCNT(③)は、PBS 懸濁 MWCNT①と同様の GM-CSF および TNF α 産生促進を示したのに対し、卵由来 PC/PG で分散した MWCNT(②)は、いずれのサイトカイン産生も促進しなかった。C16PC と卵由来 PC のサイトカイン産生惹起能の差は PC を構成する脂肪酸の生理作用により、もたらされた可能性も考えられる。しかしながら卵由来 PC/PG の方が MWCNT の分散に優れ、凝集塊の生成は低かった。これに対し、調製して 3 日以内の分散液中において、MWCNT の凝集は PBS 懸濁①と C16PC/PG 分散③でほぼ同程度であり、両者ともほぼ同程度の GM-CSF および TNF α 産生促進効果を示した。したがって、卵由来 PC と C16PC の物理化学的性質の違いが MWCNT の分散の程度や形状の違いをもたらし、マクロファージ系細胞に異なる影響を及ぼした可能性が大きいと考えている。ナノマテリアルの安全性評価には、今後 MWCNT の分散の程度を

計測する方法を確立し、脂質の物理化学的性質およびサイトカイン産生能との関係を明らかにすることが必要であると考えられる。

E. 結論

肺サーファクタント脂質である PC および PG を用いて MWCNT を分散する方法を確立し、マクロファージでのサイトカイン産生により評価した。肺サーファクタント主要構成成分の C16PC と卵由来 PC では MWCNT の分散性ならびに GM-CSF・TNF α 産生促進作用に違いが認められた。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

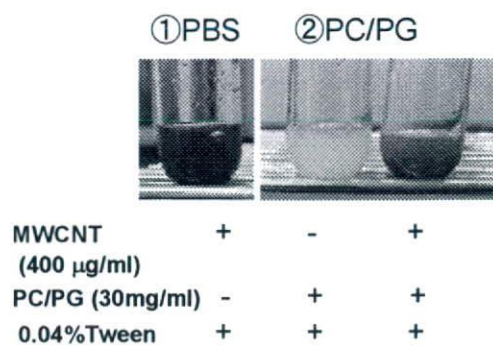


図1. Tween 20および肺サーファクタント脂質PC/PGを用いたMWCNTの分散

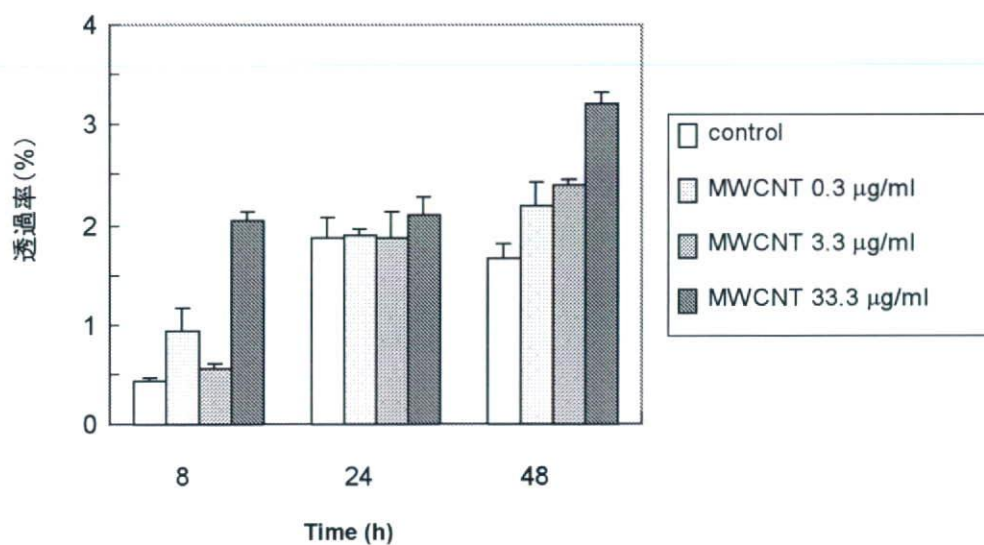


図2. Caco-2細胞単層膜における蛍光デキストランのトランスサイトーシスに及ぼすPBS懸濁MWCNT(①)の影響

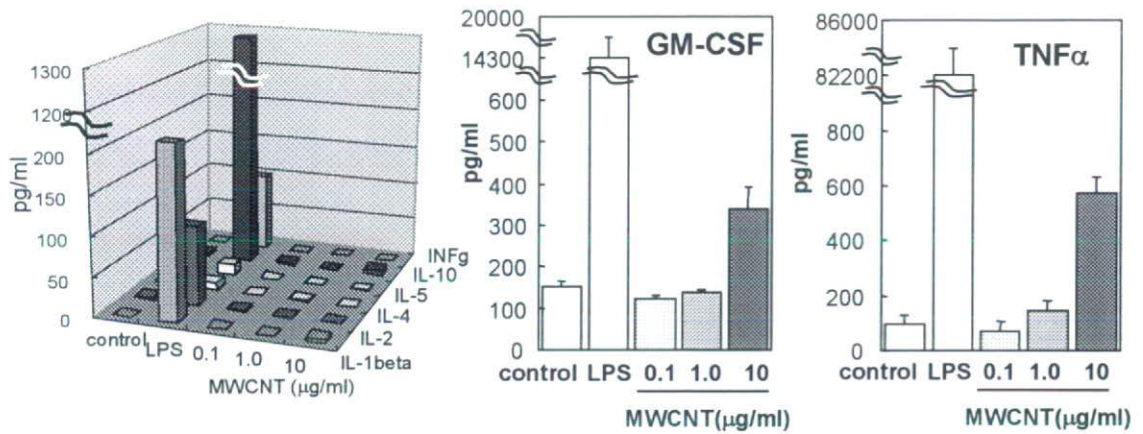


図3. RAW264細胞でのサイトカイン産生に及ぼすPBS懸濁MWCNT(①)の影響

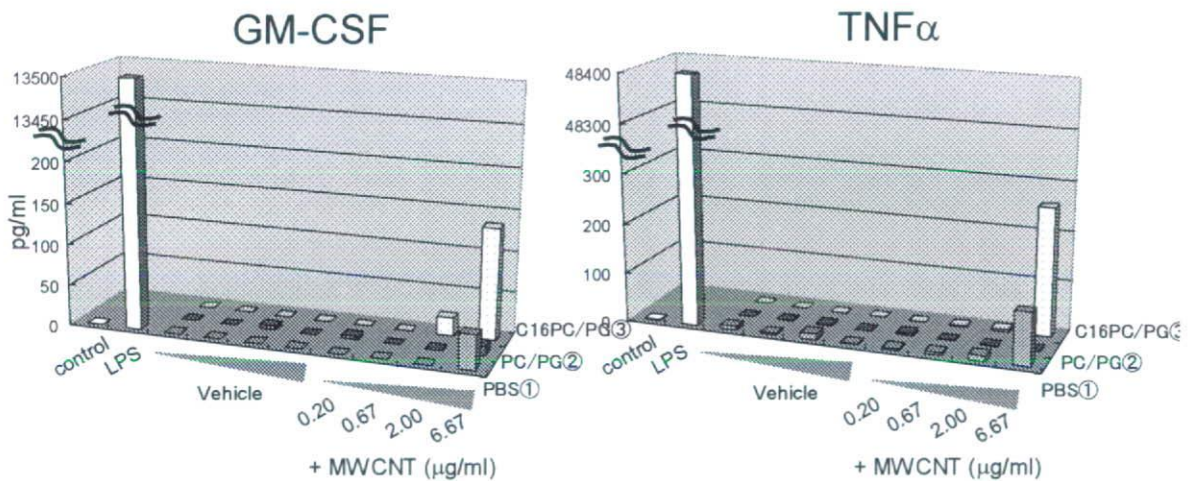


図4. サーファクタント脂質PC/PGで分散したMWCNTのRAW264細胞からのサイトカイン分泌に及ぼす影響

平成 20 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

研究分担課題名：産業用ナノマテリアルの経気道投与および
粉体暴露手法に関する基礎研究

研究分担者：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

多層カーボンナノチューブ（MWCNT）を気管内投与するための懸濁液を調製するため、ラット血清を含有するリン酸緩衝生理食塩液（PBS）を媒体とした MWCNT の懸濁法を検討した。さらに、物性の異なる 3 種類の MWCNT をラットに気管内投与し、MWCNT が肺に及ぼす影響についても検討した。

その結果、1w/v%のラット血清を含む PBS が、有用な懸濁媒体のひとつであることが判明した。ただし、使用した MWCNT の物性により大きな凝集塊が含まれる場合もあり、MWCNT の懸濁液調製法については、更なる検討が必要であると結論した。

3 種類の MWCNT を気管内投与した結果、凝集塊を多く含む MWCNT の投与液では気道閉塞に起因したと考えられる炎症性反応が認められたのに対し、単離した繊維を多く含む MWCNT 投与液では、肺において明らかな炎症性反応は認められず、肺からの異物処理を示唆する変化のみが認められた。これらの結果は、MWCNT の健康影響を推測するためには、凝集を制御した懸濁法を用いることが重要であることを示唆した。

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。MWCNT は、ヒトに経気道暴露されることから、気管内投与により、肺を主体として健康影響を評価することが重要である。本研究班において、人造肺サーファクタントを媒体とし、メノウ乳鉢により粉碎、懸濁した際には、凝集塊の少ない懸濁液を調製できること、凝集塊の量の

違いは肺への影響にも差異を生じることを平成 19 年度までの研究で明らかにした。しかし、人造肺サーファクタントは、牛血清由来の製剤であり、異種動物成分の毒性発現への影響は明らかではない。また、乳鉢による MWCNT の粉碎は、製造時と異なる物性を MWCNT にもたらす懸念があり、製造時の物性での肺への影響を評価する必要性も考えられた。さらに、異なる性状を有する MWCNT の健康影響も明らかではない。本年度の

研究では、異種動物由来成分を用いず、粉碎を伴わない MWCNT の懸濁法を検討するとともに、3 種の異なる物性を有する MWCNT を気管内投与し、その肺への毒性影響を検討した。

B. 研究方法

(1) 供試材料

① MWCNT-7 (本実験中の略称: MWCNT-7)

Lot No. 060125-01k, 図 1 に示す繊維径および長さを有する。

② Carbon nanotube multi-walled (本実験中の略称: MWCNT-2, Cat No.: 636509, Sigma-Aldrich)

Lot No. 12127PE, 下記の物性を有する。

composition carbon content: >95%

O.D. × I.D. × L: 10-30 nm × 5-10 nm × 0.5-50 μm

pore size: 0.8 mL/

g surface area BET surf. area: 40-600 m²/g

mp: 3652-3697 °C(lit.)

density: ~2.1 g/mL at 25 °C(lit.)

bulk density: ~0.1 g/mL

③ Multiwall carbon nanotube (本実験中の略称: MWCNT-3, Cat. No.: 659258, Sigma-Aldrich)

Lot No. 02720JH, 下記の物性を有する。

assay: >90% carbon basis

composition carbon: >90%

diam. × L: 110-170 nm × 5-9 μm

mp: 3652-3697 °C(lit.)

density: 1.7 g/mL at 25 °C ~ 2.1 g/mL at 25 °C(lit.)

(2) 投与液の調製法

Buford ら (2007), Elgrabli ら (2008) および Sager ら (2007) により、カーボン系ナノマテリアルの懸濁にはウシ血清アルブミン (BSA) あるいはウシ胎児血清 (FCS) とリン酸緩衝生理食塩液 (PBS) の混合液を媒体とした際に凝集塊の少ない懸濁液を調製できることが報告されている。これらの報告を参考にし、本研究では、ラット血清を用いた懸濁法を検討した。

8 週齢の雄性 SD 系ラット (CrI:CD(SD)) を日本チャールス・リバー株式会社から購入、1 週間の検疫・馴化後にペントバルビタールナトリウムの腹

腔内投与による麻酔下で、後大静脈から採血した。得られた血液を遠心分離後に得た血清を 65°C で 30 分間、温浴することで不活化した。

この血清を用い、乳鉢による粉碎を実施せずに良好な懸濁状態を得られる PBS に添加する血清の濃度、MWCNT 投入のタイミング等について検討した。

(3) 気管内投与実験

8 週齢の雄性 SD 系ラット (CrI:CD(SD)) を MWCNT-7, MWCNT-2 および MWCNT-3 の各物質について各群 5 匹を用い、上記の検討で得られた懸濁液を 1 mg/kg の用量で気管内投与した。対照群には、媒体のみを投与した。投与液量は、1 mL/kg とした。

投与日を第 1 日として、毎日一般状態を観察するとともに、体重を第 1, 2, 4 および 8 日に測定した。第 8 日の観察終了後、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。BALF については細胞数および細胞構成比の測定、LDH, タンパクおよび ALP を測定した。

(倫理面への配慮)

全ての動物実験は、「動物実験に関する指針 (株式会社三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所)」に基づき、鹿島研究所 動物実験倫理委員会の承認を得て実施した。

C. 研究結果

(1) 投与液の調製法

0.05, 0.1, 0.5 および 1 w/v% のラット血清/PBS 溶液を調製し、これらの各媒体に MWCNT-7 を 0.5, 1 および 5 mg/mL の濃度になるように加え、懸濁状態を観察した。その結果、いずれも MWCNT-7 が大きく凝集し、良好な懸濁状態を得ることができなかった。次いで、5 mg の MWCNT-7 を秤取、ここに 50 mg のラット血清を加えて混和後、PBS の 5 mL を加えて混和したところ、比較的良好的な懸濁液を調製できた (ラット血清濃度: 1 w/v%, MWCNT-7 濃度: 1 mg/mL)。

同様の調製法で、MWCNT-2 および MWCNT-3

についても懸濁液を調製し、計3種の投与液を調製した。投与液を光学顕微鏡により観察した結果を図2および3に示す。MWCNT-7は、平成19年度までの人造肺サーファクタントを媒体とした懸濁液と比較して単離した繊維の増加が認められた。しかし、300 μm 程度の凝集塊も認められた。MWCNT-2では、単離した繊維が殆ど認められず、5~10 μm 程度の凝集体が多く認められ、200 μm 程度の凝集塊も含んでいた。MWCNT-3では、単離したMWCNT繊維が数多く認められ、凝集塊の大きさも50 μm 以下のものが殆どであり、その数も少なかった。

(2) 気管内投与実験

① 症状および体重

各群に死亡例は認められず、一般状態の変化も認められなかった。各群の体重の推移を図4に示す。MWCNT-7群では投与翌日に対照群と比較して統計学的に有意な低値が認められた。

② BALFの検査結果

BALF中の細胞数および構成比の検査結果の一部を図5に、LDH、タンパクおよびALPの測定結果を図6に示す。

BALF中の細胞数および構成比では、MWCNTを投与した各群に対照群との統計学的に有意な差異は認められなかった。ただし、いずれも統計学的に有意ではないものの、MWCNT-7群およびMWCNT-2群では、好中球の増加を主体とする総細胞数の軽微な上昇傾向が認められた。また、MWCNT-3群ではマクロファージの増加を主体とする総細胞数の上昇傾向が特徴的であった。

LDH、タンパクおよびALPを測定した結果、MWCNTを投与した各群に、対照群との統計学的に有意な差異は認められなかった。統計学的に有意ではないものの、全測定パラメータの高値傾向がMWCNT-7群に認められた。

③ 肺重量

BALF採取に用いなかった肺左葉の重量測定の結果、MWCNT-7群では実測値および対体重比、MWCNT-3群では対体重比がそれぞれ対照群と比較して統計学的に有意な高値を示した。

④ 剖検所見

剖検所見の代表的な写真を図7に示す。

各群5例のうち、MWCNT-7群では肺の黒色化が全例、肺門リンパの腫大が4例に認められた。MWCNT-2群では肺の黒色化が全例、肺門リンパの腫大が2例に認められた。MWCNT-3群では肺の黒色化および肺門リンパの腫大が全例、肺門リンパの褐色化が4例に認められた。

D. 考察

ラット血清含有PBSを媒体として、MWCNTの懸濁液を調製すると、MWCNTの有する物性、すなわち本研究で用いた材料で特定可能であった繊維の長さ、直径によっては単離した繊維を多く含む懸濁液を調製可能であることが判明した。しかし、MWCNT-7 (MITSUI MWCNT-7) において、懸濁液中の凝集塊の大きさや数を低減する効果は明らかではなかった。また、同じ媒体を用いた場合であっても、異なる物性を有するMWCNTにおいて、凝集塊の量、大きさに加え、単離した繊維の量に明らかな差異が認められ、MWCNTの有する物性が気管内投与のための懸濁液の状態に大きく影響する要因であることが示唆された。

MWCNT-7群で発現した肺への毒性影響は、平成19年度までの実験、すなわち投与量5 mg/headと比較して質的に大きく異ならなかった。すなわち、BALF中の好中球増加傾向を伴う総細胞数の高値傾向、LDHおよびタンパクの上昇傾向が認められ、肺の重量増加も認められた。これらの変化は、平成19年度までの実験結果と同様に粗大な凝集塊を含む懸濁液を気管内投与したことによる比較的単純な気道の閉塞性の障害に伴う急性期の変化である可能性を否定できなかった。同様にMWCNT-2群で発現した影響も、MWCNT-2群の投与液には単離した繊維が少なく、5~10 μm 程度の凝集体としてMWCNTが存在していたことから、気道閉塞に起因する可能性は否定できなかった。これに対し、MWCNT-3群では、明確な炎症性反応、すなわちBALF中のLDH、タンパクおよびALPの上昇が認められなかった。この群では

肺の対体重比の高値, BALF 中マクロファージの増加傾向が認められ, 肺門リンパ節の褐色化も認められた. MWCNT-3 群では, 単離した繊維が数多く投与液中に確認されたことから, 肺の深部に到達した MWCNT-3 が肺胞マクロファージの遊走を惹起し, 投与された MWCNT がこのマクロファージに貪食され, リンパ節経由の処理過程にある可能性が考えられた. これらのことから, 肺に対する毒性影響は, 投与液中の MWCNT の状態に大きく依存し, 質的, 量的に異なる発現様式となる可能性が強いものと考えられた.

E. 結論

MWCNT を気管内投与する際の懸濁液調製において, 1 w/v% のラット血清を含有する PBS が有用な媒体のひとつであることが判明した. ただし, MWCNT の物性により, 凝集塊が生じることも明らかとなった. MWCNT をナノサイズで気管内投与し, その肺に対する健康影響を評価するためには, 投与液の調製法について更なる検討が必要であることが示唆された.

肺に対する MWCNT の毒性影響は, 凝集塊が多い場合には, 急性期の炎症性反応が惹起されることが, 平成 19 年度までの研究に続いて明らかとなった. MWCNT が単離している場合には, 急性期の炎症反応は顕著ではなく, BALF 中のマクロファージの増加および肺門リンパ節の腫大および褐色化に見られるように, 肺からの排泄処理が速やかに行われる可能性も示唆された. しかし, 肺に到達した MWCNT は, 必ずしも全量が短期に排泄されるのではないことも報告されている (Buford ら, 2007, Elgrabli ら, 2008). このため, 単離した繊維を多く含む懸濁液を用いた中長期の実験が, MWCNT の肺に対する毒性を明らかにするためには必須であると結論した.

F. 参考文献

- Buford MC, Hamilton RF Jr, Holian A., A comparison of dispersing media for various engineered carbon nanoparticles. Part Fibre Toxicol. 2007 Jul 27;4:6.
- Elgrabli D, Floriani M, Abella-Gallart S, Meunier L, Gamez C, Delalain P, Rogerieux F, et al., Biodistribution and clearance of instilled carbon nanotubes in rat lung. Part Fibre Toxicol. 2008 Dec 9;5:20.
- Sager T, Porter D, Robinson V, Lindsley W, Schwegler-Berry D, Castranova V., Improved method to disperse nanoparticles for in vitro and in vivo investigation of toxicity. Nanotoxicol 2007, 1:118-129.

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)

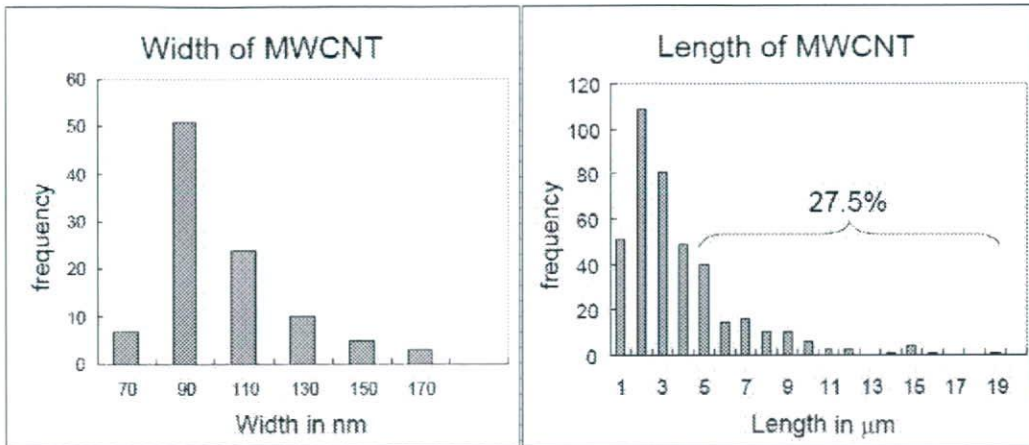


図 1 MWCNT-7 の物性

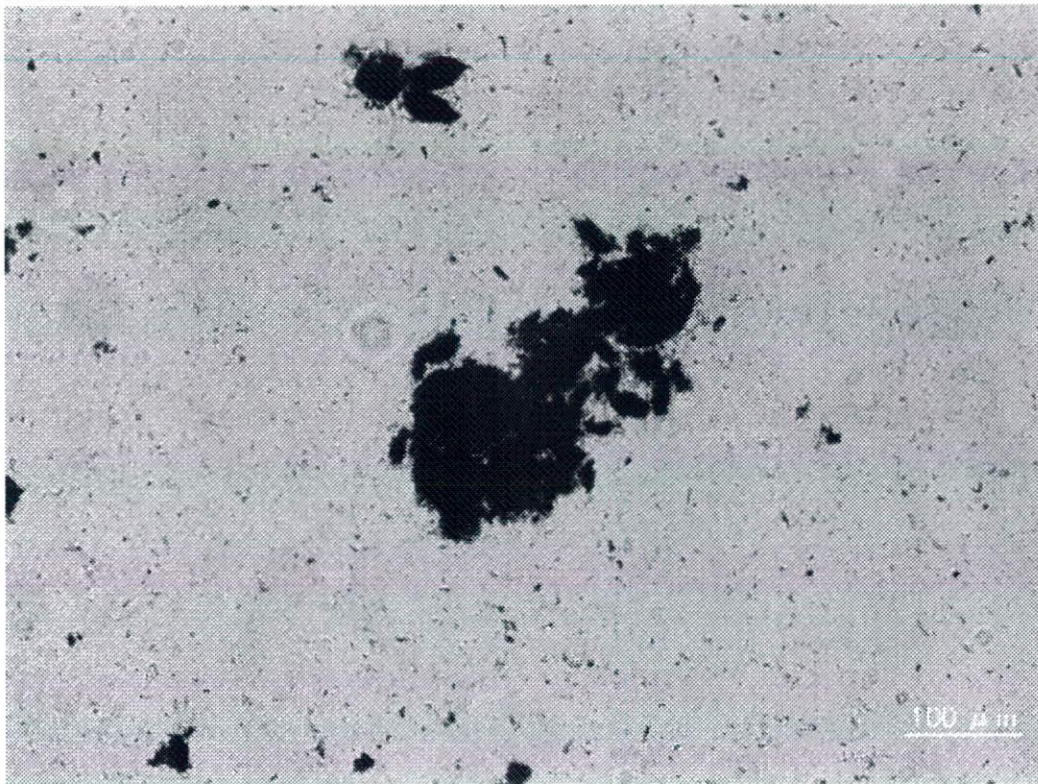


図 2-1 MWCNT-7 の懸濁状態 (対物レンズ×10)

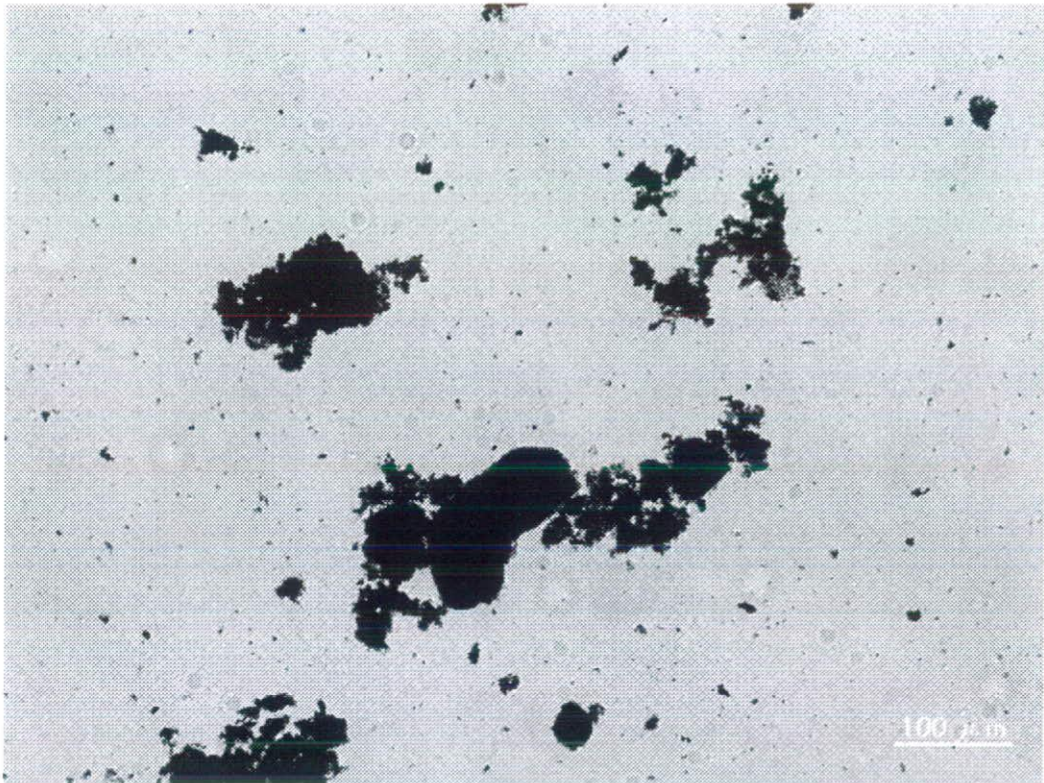


図 2-2 MWCNT-2 の懸濁状態 (対物レンズ×10)

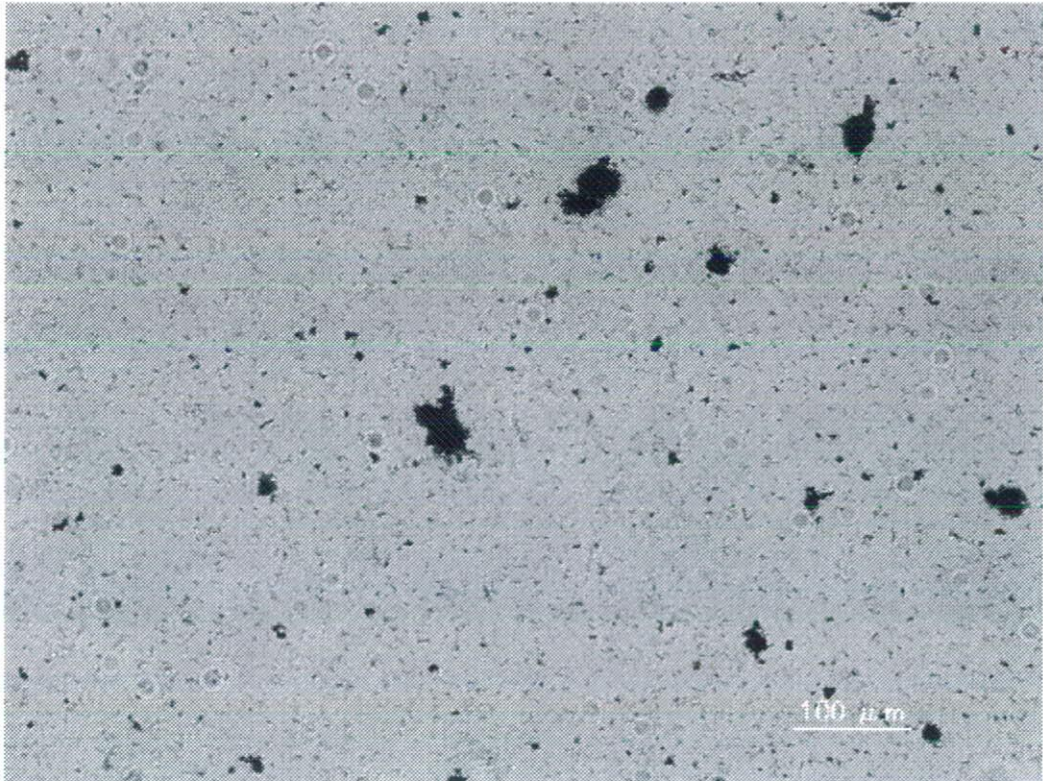


図 2-3 MWCNT-3 の懸濁状態 (対物レンズ×10)

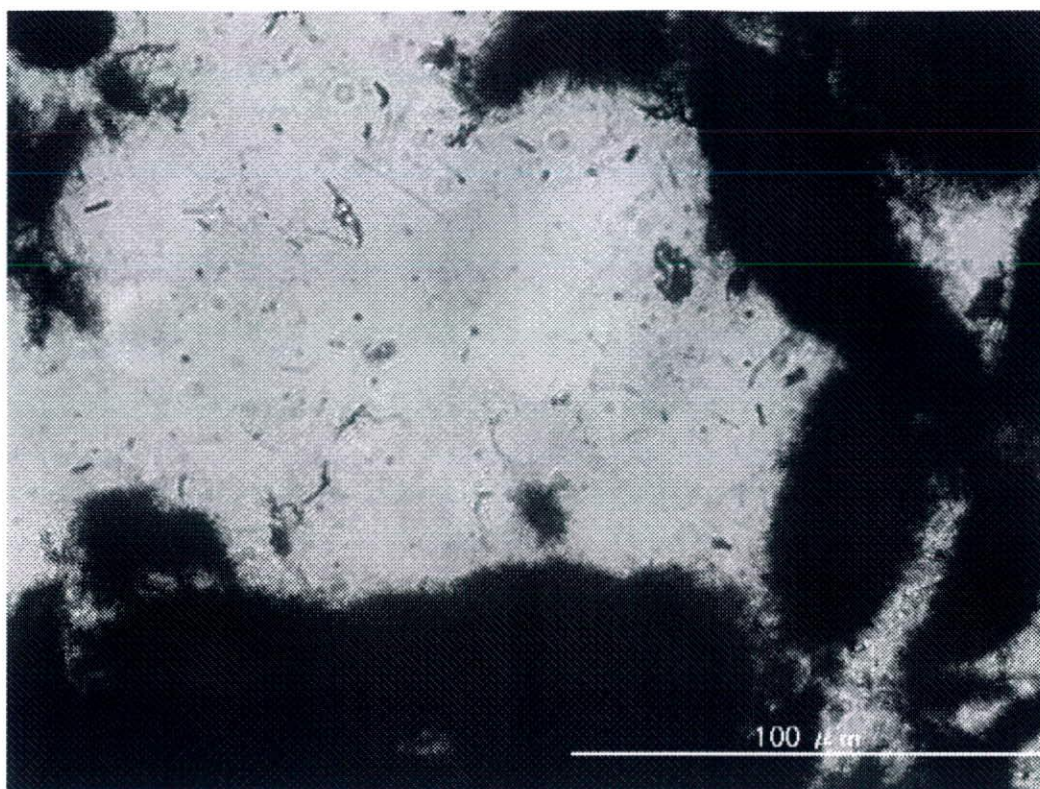


図 3-1 MWCNT-7 の懸濁状態 (対物レンズ×40)

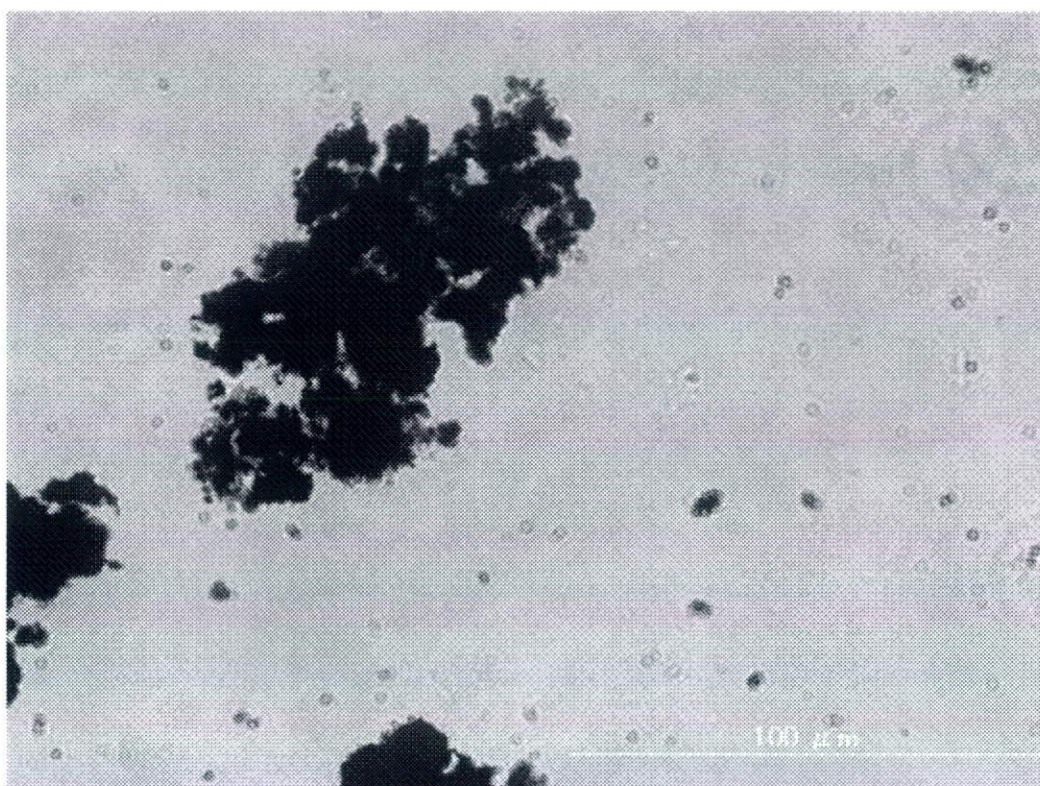


図 3-2 MWCNT-2 の懸濁状態 (対物レンズ×40)

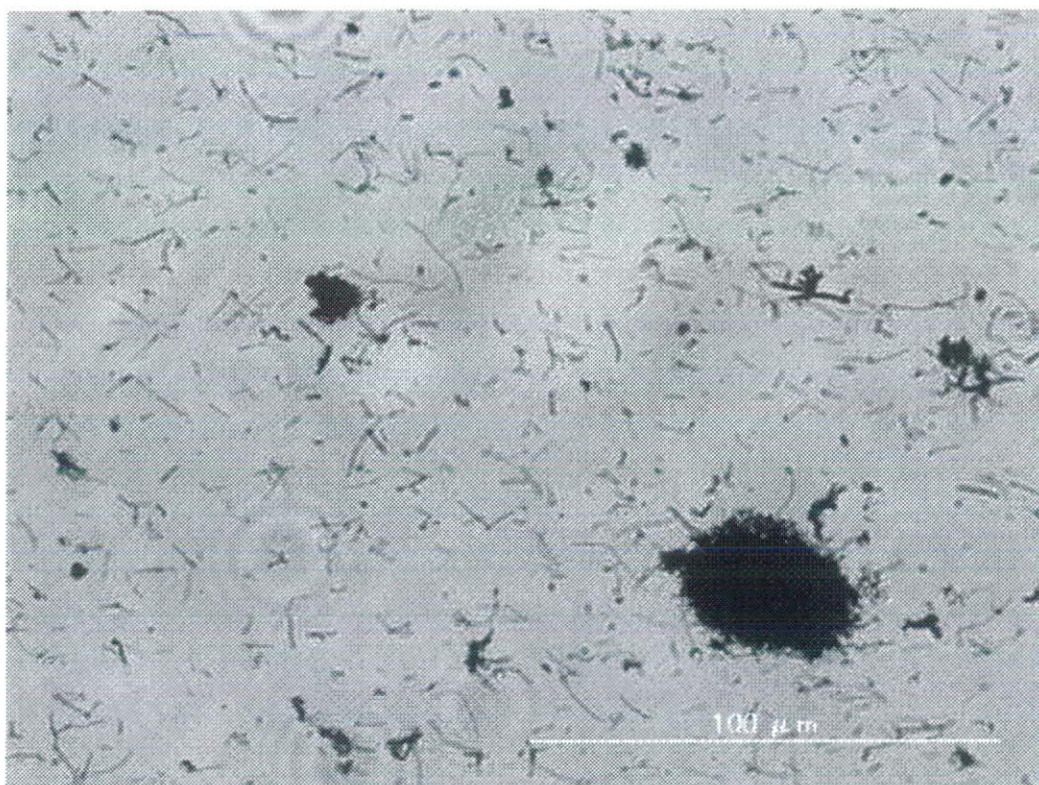


図 3-3 MWCNT-3 の懸濁状態 (対物レンズ×40)

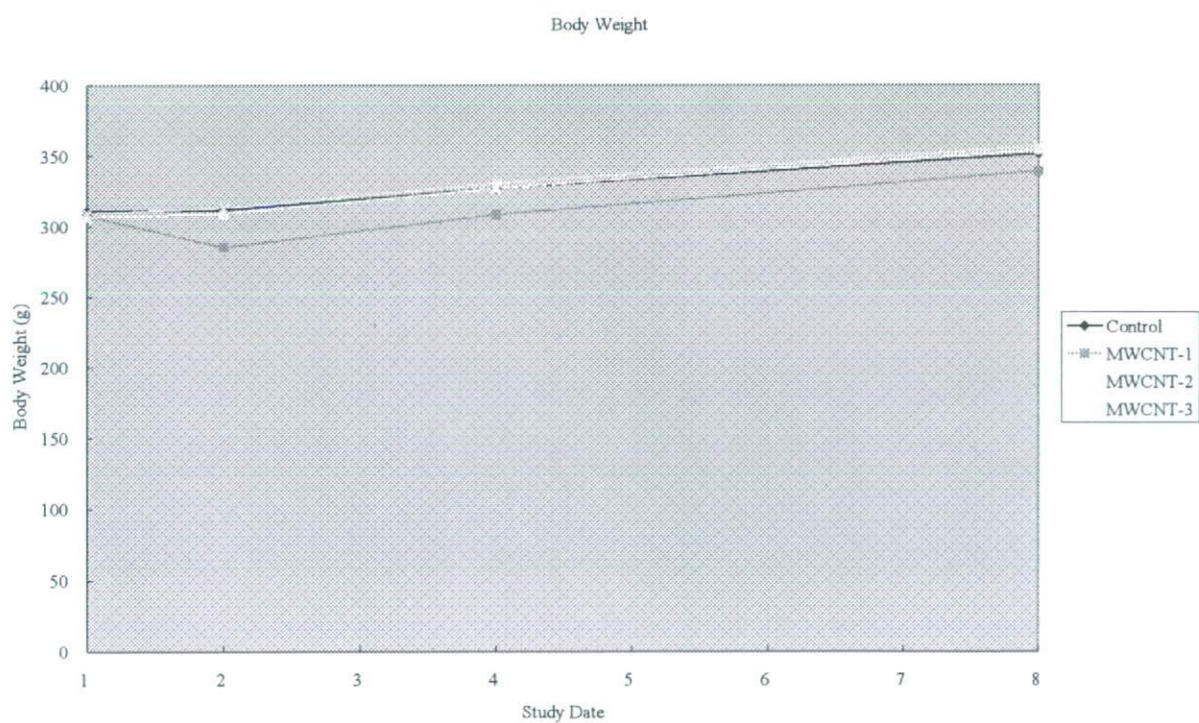


図 4 体重

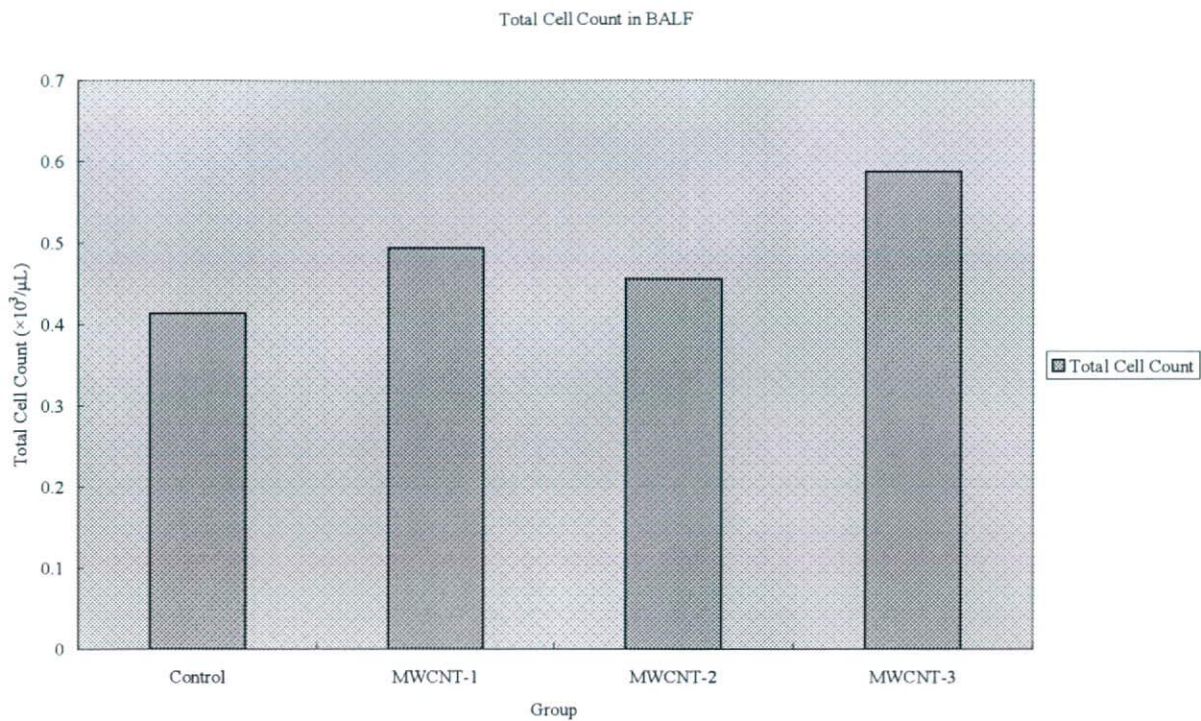


図 6-1 BALF 中の総細胞数

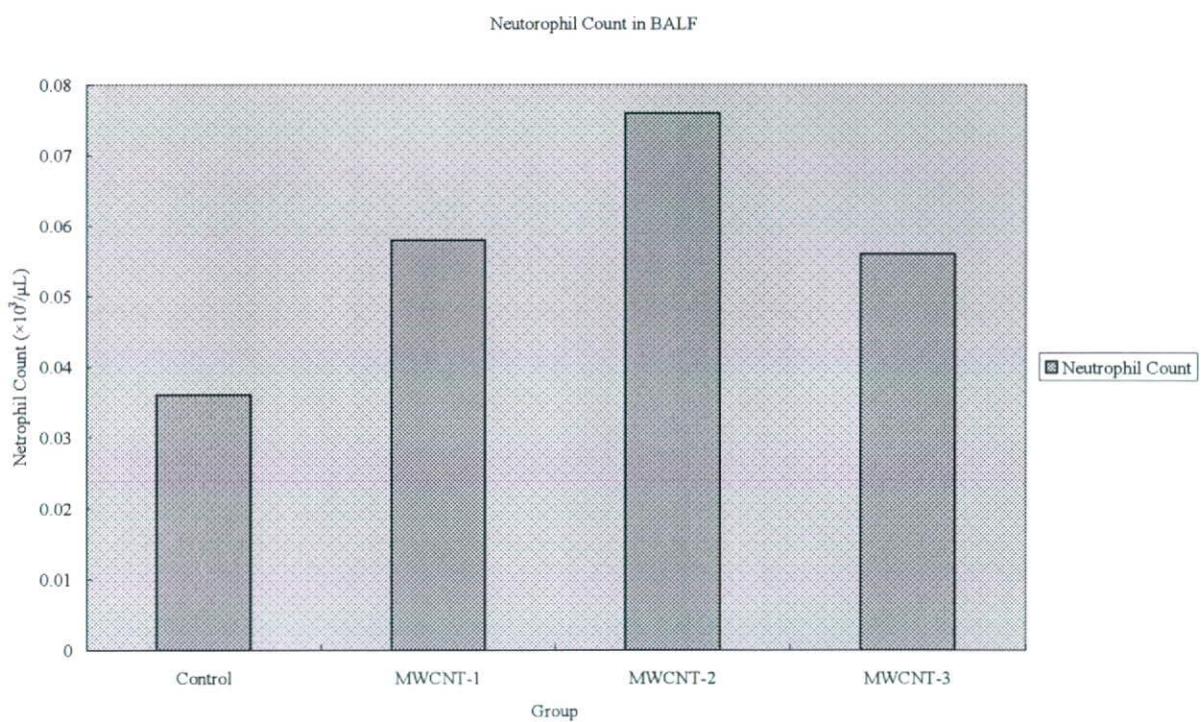


図 6-2 BALF 中の好中球比

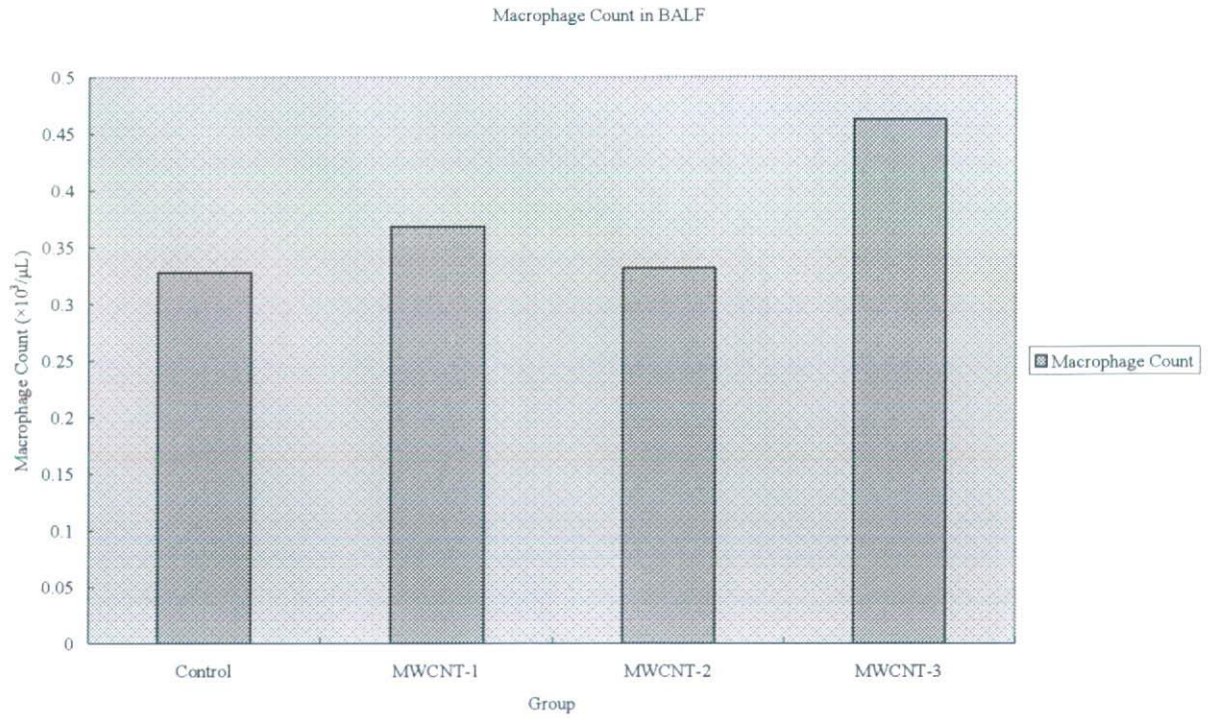


図 6-3 BALF 中のマクロファージ比

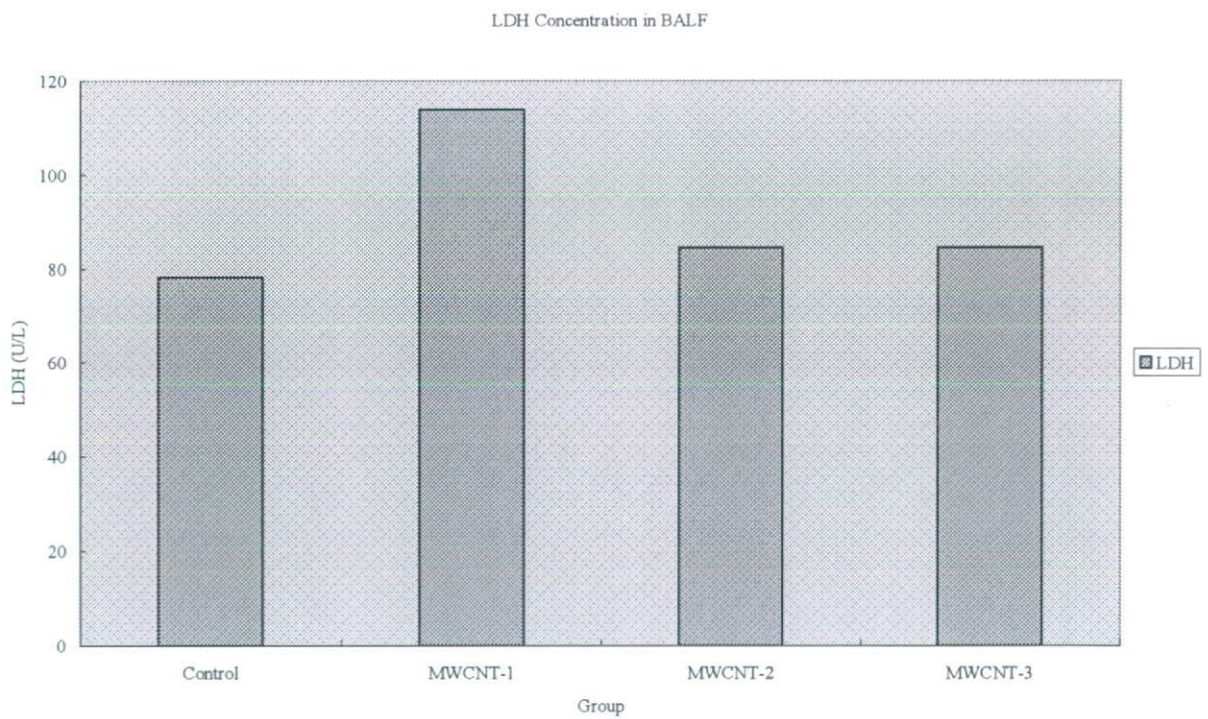


図 7-1 BALF 中 LDH 濃度

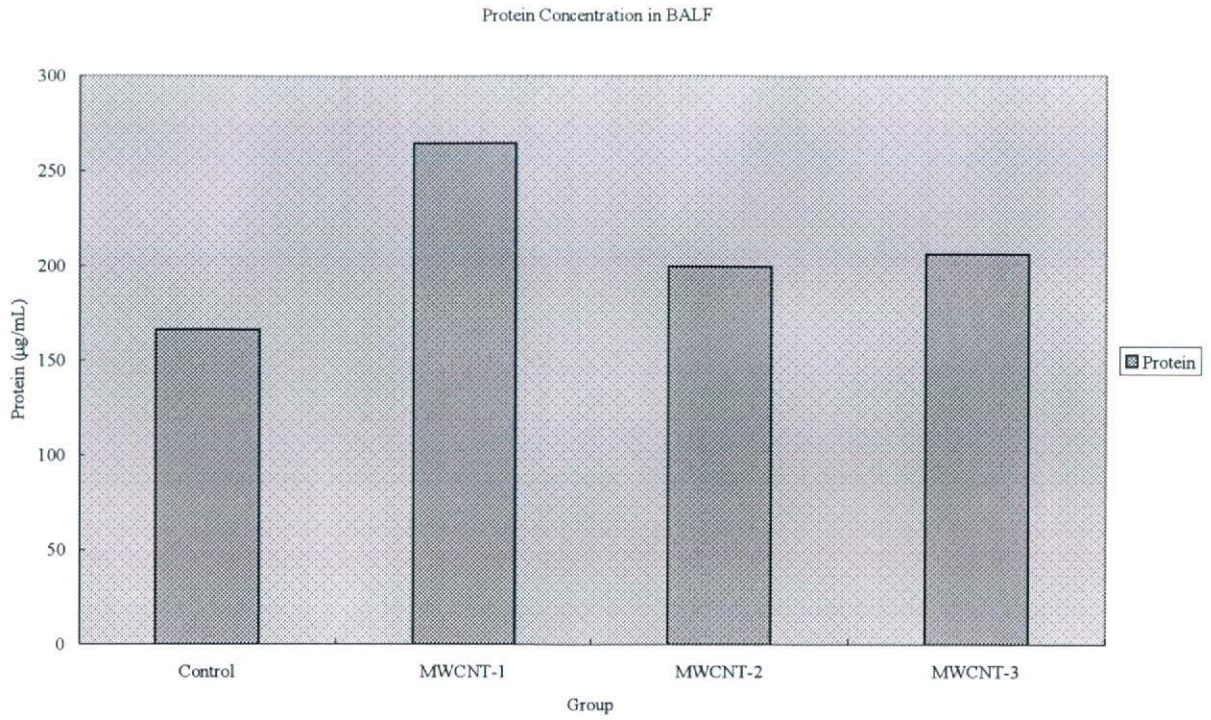


図 7-2 BALF 中タンパク濃度

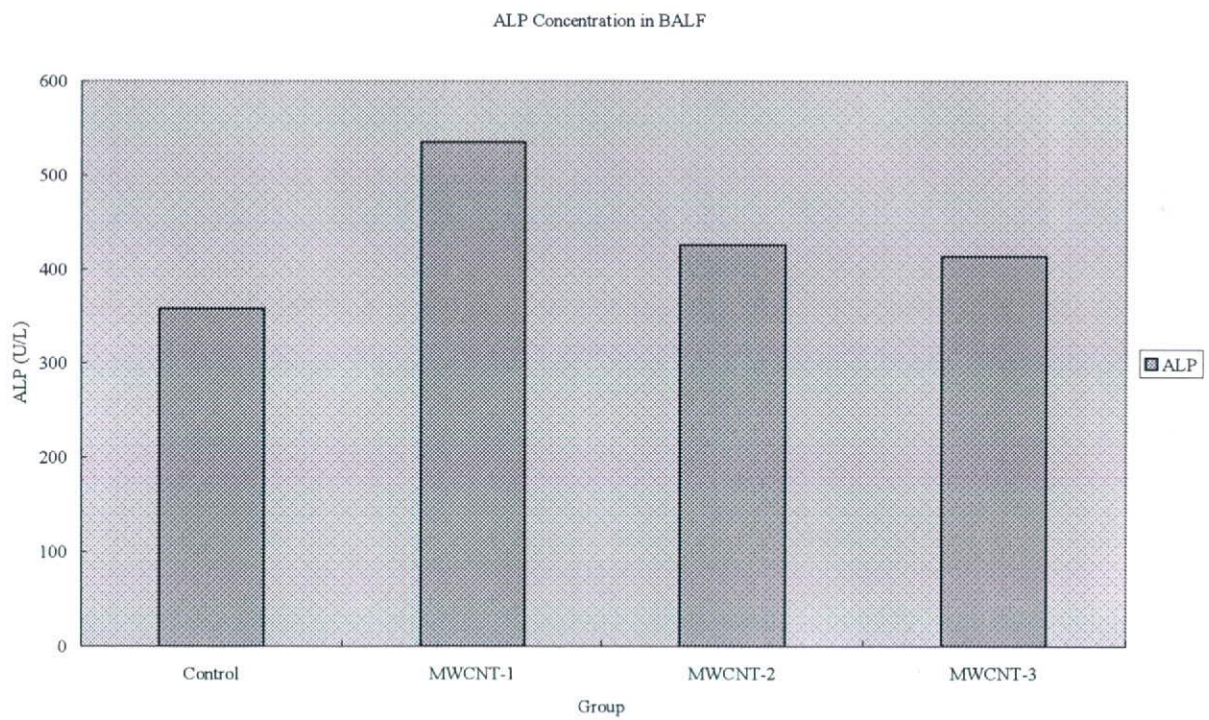
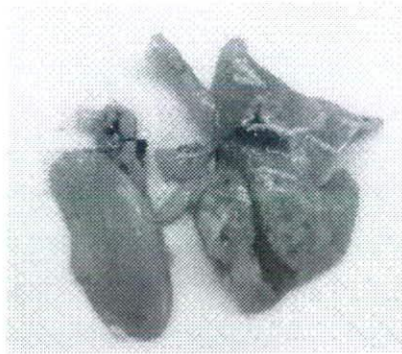


図 7-3 BALF 中 ALP 濃度



MWCNT-7 群
肺の黒色化
肺門リンパ節の腫大



MWCNT-2 群
肺の黒色化



MWCNT-3 群
肺の黒色化
肺門リンパ節の腫大・褐色化

図 8 肺の剖検写真

平成 20 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健康影響評価に関する調査研究

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 室長
研究協力者: 高橋 美加 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: 松本真理子 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: 平田 睦子 国立医薬品食品衛生研究所 総合評価研究室 主任研究員

研究要旨

本研究では、健康影響評価研究の国際動向調査の一環として、OECD の産業用ナノマテリアルの作業グループの最新情報を収集することを目的としている。今年度は、代表的なナノマテリアルを用いた物質を選定して各国が自主的に行うスポンサーシッププログラムの動向について情報収集を行った。我が国は、このスポンサーシッププログラムの中では、フラーレン(C60)とSWCNT(単層カーボンナノチューブ)およびMWCNT(多層カーボンナノチューブ)のリードスポンサーとなることになっており、Dossier 作成計画書(DDP)が作成された。本研究班の成果からは、C60 やMWCNT に関してADME や急性毒性、遺伝毒性を含む *in vitro* 試験等のエンドポイントについて直接および間接的な貢献が期待できるものと考えられた。

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の進展が望まれている。現在では、欧米を初めとして我が国におい

ても、積極的に安全性評価に関する研究が進められているが、国際的な調和を目的とした枠組みとしては、OECD においても産業用ナノマテリアルの作業グループが設置され、具体的な行動が開始されようとしているところである。本研究では、健康影響評価研究の国際動向調査の一環として、この OECD の産業用ナノマテリアルの作業グループの最新情報を収集することを目的としている。

B. 研究方法

20 年度は、OECD における産業用ナノマテリアルの作業グループ、特に SG3 において本格的に開始することとなった代表的なナノマテリアルを用いた物質を選定して各国が自主的に行うスポンサーシッププロ

グラムについて、その動向の情報収集を行うと共に、本研究班の成果を貢献させるための可能性について考察した。

C. 研究結果

(1) 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

- 「産業用ナノ材料試験のためのスポンサーシッププログラムに関するワークショップ」

2008 年 11 月に韓国・釜山で開催され、Dossier 作成計画書(Dossier Development Plans:DDPs)の進捗についての論議とスポンサーシッププログラム用のガイダンスマニュアルに関する検討も行われた。OECD 加盟国、EC、BIAC、中国から約 70 人が参加した。

第 4 回 WPMN (産業用ナノ材料作業部会: Working Party on Manufactured Nanomaterials) 会議において、産業用ナノ材料試験のスポンサー国が、2009 年 3 月の第 5 回 WPMN 会議までに DDP を提示することが確認された。そのフォローアップの一環として、スポンサーシッププログラムで DDP 作成の支援となるように、このワークショップが計画された。DDP には、いつ、どこで、誰が試験し、その試験方法は何か、という具体的詳細が概説されることになっている。特に、このワークショップでは DDP 作成過程で明らかになった問題を特定して解決すべきとされた。

ワークショップはスポンサーシッププログラム用のガイダンスマニュアルの進捗に関する発表や、試料調製法・用量測定法、および代替試験法に関するガイダンスから始まり、産業用ナノ材料のスポンサーが各自のアレンジや DDP 作成状況を示した。そして、各試験ナノマテリアルとエンドポイント間の解明と一貫性について 4 つの課題(1.物理的・化学的性質、2.試料調製と用量測定法のガイダンスと報告書テンプレート、3.コミュニケーション問題、4.代替試験法に関するガイダンス)が選択された。

総合的な成果としては、このワークショップによって DDP の作成が容易になり、DDP に求められることをスポンサーが明確に理解したことであった。こ

れにより、14 ナノマテリアルの試験 DDP の一貫性がより確実に became と考えられる。加えて、このワークショップではスポンサーシッププログラムをサポートする 2 つの小委員会(DDP レビュー委員会とスポンサーシッププログラムにおける代替試験法に関する作業部会)が設置された。

今回のワークショップでは、14 ナノマテリアルのうち 7 物質(フラーレン(C60)、単層カーボンナノチューブ(SWCNT)、多層カーボンナノチューブ(MWCNT)、銀ナノ粒子、二酸化チタン(TiO₂)、酸化亜鉛(ZnO)、酸化セリウム(CeO))の DDP 草案がワークショップに提示された。デンドリマー、二酸化ケイ素、および鉄ナノ粒子については、スポンサーのアレンジ状況などの準備に関する経過報告も示された。スポンサー国はワークショップの討議の結果に基づいて DDP を改訂するよう依頼された。

ガイダンス関係では、まず現行ガイダンスとスポンサー国のニーズ(例えば、complete と address の定義の明確化やエンドポイントに対処する既存情報の使用方法など)とのギャップを特定し、解決策を検討した。スポンサーシッププログラム用のガイダンスマニュアルは本ワークショップでの討議に基づき改訂された。(改訂版のスポンサー用ガイダンスマニュアルは、2008 年 12 月に公開された。)

代替試験法の原案も本ワークショップで議論され、それを完成させるために SG7(ナノ毒性学における代替試験法)で議論することとされた。さらに、14 の代表的ナノマテリアルに関する代替試験法についてスポンサー国の取り組みを支援するため、スポンサーシッププログラムにおける代替試験法の統合に関する作業部会が SG3、SG4、SG7 のサブグループとして設置された。

報告書テンプレートに関しては、その各項目についてスポンサーによる報告の義務はないが、スポンサー国はスポンサーシッププログラム用ガイダンスマニュアルに従うべきことが確認された。

試料調製と用量測定法のガイダンス(Guidance on Sample Preparation and Dosimetry:GSPD)についても議論され、GSPD がスポンサーシッププログラム用ガイダンスマニュアルに参照されるよう指摘

された。

スポンサーシッププログラムにおける代替試験法の統合に関する作業部会においては、スポンサーシッププログラムに直接関与する適切な SG (SG3, SG4, SG7) と連携を取り、スポンサー国による代替試験法の新／追加スポンサーの検討および参加スポンサー間の調整を促進させることを目的とし、スポンサーシッププログラムのフェーズ 1 の範囲で予備的または必須の並列試験を実施することである。この作業部会は以下の項目の保証を目指している。

- ・代替試験法のデータの品質、信頼性、および再現性
- ・代替試験法と、DDP に記載されたエンドポイント／試験戦略へのその貢献／関連のある影響や性質への対処、の一貫性
- ・ナノマテリアルの取り扱い・試料調製・使用媒体中の特性、曝露量や反応基準の定義などに関するスポンサー間の一致
- ・互いに補完して取り組みの重複を最小限に抑える、共同スポンサーの調整

作業部会は第 5 回 WPMN で追加の参加スポンサーを決めることになった。

● スポンサーシッププログラム

スポンサーシッププログラムは、産業用ナノ製品の安全性とその評価方法に関する有益な関連情報が、ヒトの健康や環境保護のエンドポイントを特定するのに適した、代表的産業用ナノ製品の試験から得られるという考えに基づいている。WPMN の決定によると、プログラムの目的は、産業用ナノ製品の理解を深め、可能であれば、種々の産業用ナノ製品や製品のクラス間でどのような情報が一般化されるかを理解するためのデータの開発である。

このプログラムには 2 つのフェーズが含まれる。

フェーズ 1:

フェーズ 1 において WPMN は WPMN の参加者(全ての利害関係者を含む)に代表的産業用ナノ製品リストから 1 つ以上の試験のスポンサーとなるように依頼する。スポンサーは産業用ナノ製品の試験のため

の DDP 作成が依頼され、その DDP は WPMN によってレビューされる。レビュー済み DDP に基づき、スポンサーはナノマテリアルごとに適したエンドポイント (Annex II 参照) に対処することによって、フェーズ 1 を完了する。フェーズ 1 の領域には記載されたエンドポイントに対処することによってデータセットを作成することである。これには必要に応じて、既存の関連情報の活用／新情報の作成／ある情報が必要でない合理的根拠が含まれる。また、ガイダンスマニュアルに定められている場合、対処 (address) という言葉には、確認されているエンドポイント情報が全関係書類に含まれることを示す完了 (completed) という意味が含まれる。

産業用ナノ製品の特性はマテリアルのナノスケールに特有の性質であり、一般に、産業用ナノ製品の特性はナノスケール領域にないマテリアルの粒子や他の特徴では表現されない。“産業用ナノ製品固有”の性質は完全には事前に定義できないので、“産業用ナノ製品固有”という用語ではこのガイダンスの領域を定義できない。したがって、データ開発はナノスケールに特有の性質に限定されずに行われる。一般に、スポンサーシッププログラムのデータ開発はリスト記載のエンドポイントへの産業用ナノ製品の性質に対して行われる。産業用ナノ製品固有の性質への理解はこれらのデータ開発によってより深まる。

あるエンドポイントの試験データの開発が実行不可能または不適切な場合には、試験しないことについて論理的根拠を示さねばならない。必要な試験方法や戦略の開発がフェーズ 1 の間に進展する可能性があるため、事実上フェーズ 1 は予備的である。また、試験方法に関しては、フェーズ 1 試験が SG4 の作業でのテストガイドライン開発に情報を与えるのに役立つはずである。また、可能で適切な場合に限り、完全なデータセットがリスク管理配慮に基づく決定論理から独立して各産業用ナノ製品のために作成されるべきである。フェーズ 1 試験で作成されたデータセットは、開発された方法や経験から得られた知識と共に、産業用ナノ製品のナノスケール特有の性質の理解や、フェーズ 2 試験で開発されるデータの特定に役立つ。