

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 18 年度～20 年度

総合研究報告書

研究代表者 広瀬 明彦

国立医薬品食品衛生研究所

平成 21 年（2009 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18年度～20年度 総合研究報告書
研究代表者 広瀬 明彦

平成21年(2009年)4月

目 次

I. 総合研究報告書	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、菅野 純、津田 洋幸、西村 哲治、樋野 興夫、屋形 直明、 新井 洋由、本間 正充、中澤 憲一、最上 知子、涌生 聖、高月 峰夫 一瀬 文雄	2
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	27
III. 研究成果の刊行物・別冊	31

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

I. 総合研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

総合研究報告書

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

研究代表者： 広瀬 明彦 国立医薬品食品衛生研究所 総合評価研究室長
研究分担者： 菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部長
研究分担者： 津田 洋幸 名古屋市立大学大学院医学研究科 分子医学講座 分子毒性学 教授
研究分担者： 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
研究分担者： 樋野 興夫 順天堂大学 医学部 病理・腫瘍学 教授
研究分担者： 西沢 恭司 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
研究分担者： 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
研究分担者： 一瀬 文雄 (財)化学物質評価研究機構 日田事業所 試験第二課 主任
研究分担者： 屋形 直明 (財)化学物質評価研究機構 久留米事業所 試験第三課 課長
研究分担者： 新井 洋由 東京大学大学院薬学系研究科 衛生化学 教授
研究分担者： 本間 正充 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部第一室 室長
研究分担者： 中澤 憲一 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部
研究分担者： 最上 知子 国立医薬品食品衛生研究所 機能生化学部 室長
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
研究協力者： 佐藤 薫 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部 室長
研究協力者： 後藤 薫 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企画調査部施設課長
研究協力者： 笠井 辰也 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室長補佐
研究協力者： 佐々木俊明 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室長補佐
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
研究協力者： 小縣 昭夫 東京都健康安全研究センター 環境保健部
研究協力者： 大橋 則雄 東京都健康安全研究センター 環境保健部
研究協力者： 福森 信隆 東京都健康安全研究センター 環境保健部
研究協力者： 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
研究協力者： 久保田領志 国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生化学部
研究協力者： 清水久美子 国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生化学部
研究協力者： 山影 康次 (財)食品薬品安全センター秦野研究所
研究協力者： 中川ゆづき (財)食品薬品安全センター秦野研究所
研究協力者： 深町 勝巳 名古屋市立大学大学院医学研究科分子医学講座分子毒性学 助教
研究協力者： 徐 結苟 名古屋市立大学大学院医学研究科分子医学講座分子毒性学 研究員
研究協力者： David B. Alexander 名古屋市立大学大学院医学研究科分子医学講座分子毒性学客員教授
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
研究協力者： 後藤 純平 (財)化学物質評価研究機構 日田事業所 研究員

研究協力者：日野 敦史 (財)化学物質評価研究機構 日田事業所 研究員
研究協力者：秦 ユカリ (財)化学物質評価研究機構 日田事業所 研究員
研究協力者：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
研究協力者：石田 和也 (財)化学物質評価研究機構 久留米事業所 試験第二課
研究協力者：重本-最上由香里 国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部
研究協力者：奥平桂一郎 国立医薬品食品衛生研究所 機能生化学部
研究協力者：崔 紅艶 国立医薬品食品衛生研究所 機能生化学部
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

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。対象ナノマテリアルとして、フラーレン (C60)、多層カーボンナノチューブ (MWCNT)、酸化チタン (TiO₂) を選び、*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* 試験系の開発に関する基盤的研究と国際動向調査を行った。

in vivo 試験法研究では、MWCNT を腹腔内投与することにより、用量依存的に中皮腫が発生することを確認すると共に、バイオマーカーとしてマウスのメソセリン抗体を作成した。一方、C60 の腹腔内投与による慢性的影響として腎臓への瘢痕状萎縮が引き起こされること示した。経気管肺内噴霧法を用いて TiO₂ と C60 に弱い発がんプロモーション作用であることを明らかにした。吸入試験法研究では、MWCNT のミスト暴露システムを開発したことに加え、MWCNT の気管内投与時の分散状態によって毒性発現の様式やマクロファージによる貪食能に差が有ることを示した。リポソーム分散 C60 による単回気管内投与法を開発した。暴露測定法/動態解析研究では、C60 や MWCNT の気管内投与による生体試料での定量的検出法を確立すると共に、体内分布を検討し、C60 の経時的な肺からの消失と、MWCNT が肺以外の肝臓からも検出されることを示した。また、環境中では C60 は微生物や土壌中での生分解性は認められないことが示された。一方 *in vitro* 試験法研究では、遺伝毒性反応の検討や、Caco-2 を用いた TiO₂ の細胞透過性、リポソーム懸濁 C60 暴露法の開発、MWCNT の神経系の細胞機能への影響、リポソーム構成成分による炎症マーカーの差異等について知見を集積することができた。国際動向調査においては、OECD に設置された産業用ナノマテリアルの安全性に関する作業グループに関する情報を中心に収集した。

in vivo 試験法研究の結果より、長期体内残留による慢性影響研究や発現メカニズム研究を行うことが重要な課題であることを示すことができ、標的臓器の予測やメカニズム評価のための基盤的な技術として、体内動態や *in vitro* 試験系等の試験技術において有用な知見を蓄積することができたと考えられる。

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んでいる。

これまでの通常の毒性試験は構造体そのも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曝露する懸念が高いと思われる吸入曝露手法の開発、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、①in 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曝露測定法および動態解析法の開発、④in 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。

①in vivo 生体影響評価手法の開発

MWCNT および C60 について、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。その際に陰性対照群に設定した C60 投与群に腎障害を示唆する所見を認めたため、新たに C57BL/6 マウスに C60 を投与し、腎への慢性影響を確認する実験を実施した。更に MWCNT 投与による用量・反応試験として、長繊維型 MWCNT の p53(+/-) マウスを用いた腹腔内投与中皮腫誘発実験を行った。また、アスベストによる中皮腫誘発メカニズムを明らかにするため、中皮反応モデルとして C57BL/6 マウス腸間膜を対象にマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を行った（菅野）。

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、発がんプロモーションメカニズムの検索を行った（津

田)。

MWCNTによる中皮腫発生の報告をうけ、中皮腫マーカーになりうるマウス ELISA の開発に着手した(樋野)。

②ナノ粒子の吸入毒性評価手法の開発

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 の吸入曝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曝露法を検討した(広瀬、一瀬)。

③曝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、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)により各臓器からの検出を試みた。また、ラットに C60 を異なる分散溶媒を用いて強制単回経口投与し、吸収効率や体内分布(肝臓、腎臓、脾臓および腸管リンパ節)の比較検討を行った。さらに、体内吸収後の体内挙動について検討するため、ラットの尾静脈から C60 を投与し、組織分布を調べた。また、MWCNT の体内動態を解析するための手法として、電子顕微鏡による検出方法の検討を行った。(西村)。

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 試験法で微生物による分解度試験を行った。次に、環境中に放出された C60 の環境動態として、水生貧毛類蓄積性試験を実施し、土壌中の C60 動態及び底生生物であるイトミミズ (*Tubifex tubifex*) への濃縮性の有無を調べた。(屋形)。

④in vitro 試験系の開発

培養細胞系への C60 曝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。また、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。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た(西村)。

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。次に、マウス腹腔マクロファージに食食させた際の効果について解析を行った。最後に、C60 を水分散液として細胞に添加した時の影響を HeLa 細胞ならびにマウス腹腔マクロファージを用いて検証した(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ンネルを介するイオン電流に対する検討を行った。次にリポソームにより可溶化した C60 を用いて、アフリカツメガエル卵母細胞発現系に強制発現させた ATP 受容体 (P2X₂ 受容体) ならびに培養アストロサイトに発現しているグルタミン酸トランスポーター (GLAST) の機能に対する影響の評価を複数の異なるメーカーのサンプルを用いて試みた(中澤)。

腸管からの TiO₂ 粒子や C60 の吸収について、in vitro での評価系である Caco-2 細胞単層膜を用いて検討を行った。また、血漿リポタンパクのモデルとして PS/PC リポソームを用いたナノ粒子の分散方法を検討し、マクロファージ系細胞でのサイトカイン産生に及ぼす影響を調べた。次に、肺サーファクタント脂質を用いて MWCNT の分散を試みるとともに、マクロファージ系細胞でのサイトカイン産生への影響を調べた(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。更に、ルチル型、およびアナテート型 TiO₂ と 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、BALB3T3 細胞を用いて定法に従って光毒性試験を行った(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った(高月)。本研究の研究計画全般について、米国トキシコロジー協会での発表や 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（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. 研究結果及び考察

①in vivo 生体影響評価手法の開発

in vivo 試験法において、p53(+/-)マウスに長繊維型 MWCNT、C60、青アスベストをそれぞれ 3 mg /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たが、対照群と C60 群では認められなかった。続いて、長繊維型 MWCNT の中皮腫誘発能の用量反応性を調べるため、雄 p53(+/-)マウスに 3 用量 (0.3、0.003、0.0003 mg/kg) をそれぞれ単回腹腔内投与した。肉眼的に、0.3 mg/kg 群で強い腹膜の癒着が観察され、0.03 mg/kg 群でも中程度の腹膜癒着が観察された。腹腔内腫瘍の発生頻度は 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。中皮腫の発生は、最低用量の 0.003mg/kg 群にも確認された。しかし、ヒトへの外挿に際しては、第一に、ヒトにおいて 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る、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様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。

一方、C57BL/6 マウスを用いた C60 の単回腹腔内投与試験では、投与 46 週に全ての動物を解剖した結果、C60 投与群の約 2/3 の動物に肉眼的

に明らかな腎の萎縮を認め、腎障害を起こすことが確認された。現時点ではその発症機序は不明であるが、病理組織学的検査から、腎の糸球体障害に起因するものではないことが示唆された。アスベストのマウス腹膜中皮を対象としたマイクロアレイ解析では、細胞増殖、DNA 複製、DNA 障害に関連する遺伝子発現の増加が認められた。今後の解析によりメカニズムの解析が進むものと考えられた（菅野）。

専用の吸入設備を要しない試験法として、経気管肺内噴霧法を開発し、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) を用いて無コーティングルチル型粒径 20nm 二酸化チタン (nTiO₂) の発がんプロモーション作用の評価を行った。また、C60 については F344 雄ラットを用いて、同様の評価を行った。nTiO₂ による腺腫の頻度と数 (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。C60 による肺の腫瘍病変 (腺腫 + 癌) の頻度は、500ppm 投与群 5/10 (50%) ; 250ppm 投与群 5/10 (50%) ; 溶媒群 5/10 (50%) であり、500ppm 群で有意の増加を示した。nTiO₂ 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が、nTiO₂ の乳腺腫瘍プロモーション作用は曝露部位と離れていた。この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・発がん性に関する研究において、nTiO₂ の肺と乳腺に対する発がんプロモーション作用およびその発がんメカニズムを追究した。その結果、肺および乳腺において発がんプロモーション作用を示すことが明らかとなった。そのメカニズムとして、nTiO₂ を貪食した肺胞マクロファージが分泌した MIP1 α が肺の上皮細胞に作用し細胞増殖を促進すること、さらに肺胞マクロファージが分泌した MIP1 α は血中に移行し、乳腺の細胞増殖を促進した結果、乳癌の促進作用も示すことを明らかにし

た。TiO₂ の発がん性に関しては WHO/IARC により pigment grade やアナターゼ 型の TiO₂ に肺発がん性があると報告されており、ヒトに対して発がん性が疑われる group 2B に分類されている。本研究では、ルチル型の TiO₂ の発がん性促進作用を、雌ラットを用いたイニシエーション・プロモーション実験プロトコルを用いて明らかにした。さらに、nTiO₂ の発がん性を示すには、nTiO₂ を食食した肺胞マクロファージが重要であることを示した。しかし、nTiO₂ は非常に安定であるために、肺胞マクロファージは nTiO₂ を完全に消化することができず、“Frustrated”の状態となる。このようなマクロファージは、reactive oxygen species (ROS)の上昇や細胞障害と関連することが報告されており、本研究で観察された 8-OHdG の上昇や、肺発がん性の促進作用との関連が示唆される。また、発現が上昇した MIP1α が、ヒト肺がん細胞 A549 とラット乳腺腫瘍由来の C3 の細胞増殖を促進させることを確認し、MIP1α が肺のみならず、血液を介して乳腺の細胞増殖を促進し、ラット乳腺発がんの促進作用も示したと考えた。長期間の吸入曝露によっても同様のメカニズムが起こっていると考えられ、本研究における nTiO₂ の発がん促進作用は、IARC の結果とも一致する。従って、本研究で用いた気管内噴霧による発がん性試験法は、長期吸入曝露試験の結果を予測することが可能であることが示唆された。(津田)。

がんの進行過程で高発現してくる遺伝子 (ERC) に注目し、中皮腫マーカーになりうるマウス ELISA の開発に着手した。ERC タンパク質 (分子量: 約 71 kDa) は発現した後、分解酵素によって、31 kDa (N-ERC/mesothelin) と 40 kDa (C-ERC/mesothelin) に分解されるが、今回作成したマウス抗体 (5 種) を用いて解析を行った結果、N-ERC、C-ERC とともに反応する事が判明した。予定通りマウス抗体の作成に成功したので、今後、5 種の Recombinant Mouse ERC を使って ELISA 系の組み合わせを構築・開発し、マウスモデルを用いて ELISA 試験を実施することが可能

となった (樋野)。

② ナノ粒子の吸入毒性評価手法の開発

気管内投与における媒体および調製法の検討として、CMC-Na 水溶液または Tween80 水溶液、および Tween80+CMC-Na 水溶液による懸濁を試みたが、牛血清由来のサーファクテン®を用いた場合に、MWCNT の単離状況が改善され、さらに単離の状況はメノウ乳鉢で懸濁液を粉碎することでより改善されることが判明した。そこで、懸濁液の調製結果が比較的良好であったサーファクテン®を媒体として選択し、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)。肺に対する影響を検討した結果、凝集塊の量の違いが肺への影響にも差異を生じさせることが明らかになった。次に、サーファクテン®に含まれる異種タンパクによる免疫反応の発現を回避する観点から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、MWCNT を分散させる媒体のラット血清濃度としては、1 v/w% が適切であることが判明した。所定量を秤取した MWCNT に、最終濃度が 1 w/v% となる量のラット血清を添加・混合した後、所定量の PBS を加えて混和する方法が懸濁液調製の望ましい方法のひとつであった。しかし、2 種の MWCNT で発現した BALF 中の好中球の増加傾向や LDH、タンパクおよび ALP の増加傾向は、粗大な凝集塊が気道を閉塞したことに伴う急性期の炎症性反応である可能性を否定できなかった。単離した繊維が多く含まれていた MWCNT においては、肺の深部に到達した MWCNT 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、リンパ節経由で処理される過程を反映したと考えられる変化も認められた。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(涌生)。

吸入曝露試験法としては、ダスト状態での発生方法で、MWCNTの4時間の連続発生(約0.5~6 mg/m³の濃度範囲)が可能であった。しかし、経時的に濃度が低下していく傾向がみられ、3日間の再現性に関しては良好な結果を得られなかった。一方、MWCNTのTween20を用いたミスト状態での吸入曝露法では、鼻部曝露チャンパーを用いてラットへの2時間の曝露試験を試みた結果、低濃度(11µg/m³)ではあるが、安定して実施できることが確認された。ミスト状態での曝露法により、MWCNT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MWCNT懸濁液の作製法の検討及び高濃度MWCNT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た。また、チャンパー内のMWCNT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た(広瀬、一瀬)。

③曝露測定法および動態解析法の開発

C60の体内挙動解析研究としては、マウスへの腹腔内投与による各臓器からの検出を試みた。まず1-メチル-2-ピロリドン、1-オクタノール、ヘキサンの3溶媒について検討し、最も高い溶解度を示した1-メチル-2-ピロリドンを溶媒として採用した。C60を1.92µl/g body wt腹腔内投与したところ、外観的観察による異常や致死作用は認められなかった。投与群の脾臓、肝臓、腎臓からC60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

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。次に、様々な溶媒を用いてラットにC60を強制単回経口投与し、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。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。

一方、C60の単回尾静脈内投与では、3個体中1個体からそれぞれ肝臓と肺からのみ検出された。腎臓、脾臓、腸管リンパ節、脳および血液からは検出できなかった。フラーレンC60の反復尾静脈内投与では、投与後1日目および4日目の投与個体全て(5/5)の肝臓、肺、脾臓、腎臓から検出された。脳および血液からは検出できなかった。肝臓、肺および脾臓の検出濃度は同程度(7.89~64.5µg/g, wet wt.)であった。腎臓の検出濃度は、他の3臓器に比べ低濃度(0.120~0.944µg/g, wet wt.)であった。脳および血液からは検出できなかった。血液から検出できなかったことから、体内に取り込まれたフラーレンC60の体内循環量は多くはないが、時間とともに肝臓から血中への放出もしくは代謝されて減少していくことが推測された。また、腎臓に一時的に貯留したフラーレンC60は、速やかに尿中排泄されるか、もしくは代謝産物に変化して検出できない濃度に低下していると考えられた。

電子顕微鏡(電顕)によるMWCNTの分散および形状分布の検討では、分散性を有する薬剤や溶媒を用いて目視で沈殿状態を比較したところ、TX-100の懸濁状態が最も良好であり、次にTween-20、アルブミン、CMC、高分子化合物が良好な懸濁状態をしめした。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。MWCNT-7の長さとの幅の分布の測定に関しては、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との幅(直径)

を計測した結果、MWCNT-7の長さは1から5 μ mの分布が多く、10 μ mを超える長いMWCNTも散見され、幅(直径)は、70nmから90nmに多く分布している傾向がみられた。MWCNT-7中に混入している微量元素の測定では、鉄およびイオウが主に検出され、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。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-7の構造中に鉄およびその他の元素は観察されていない。イオウの平均値含量は、455ppm~486ppmで、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。

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。MWCNTを吸入曝露したマウスの肺組織を、透過型電子顕微鏡により観察した結果、曝露3日後では、MWCNTが束状に観察され、短い単繊維のMWCNTも数本観察された。曝露7日後では、MWCNTが数本集合して観察された。MWCNT数は、曝露後3日が7日後より多く観察された。吸入曝露させたマウスの肺組織中のMWCNT存在と挙動について、組織をアルカリ加熱融解することにより、透過型電子顕微鏡を用いることにより検出する手法の開発に成功した。(西村)

C60の環境残留性の確認と水溶性変化物の検討としては、OECDテストガイドライン301C試験法を行った。28日後の分析結果は、(水+被験物質)系、(汚泥+被験物質)系共に被験物質はほぼ理論量残留し、HPLCクロマトグラム上に被験物質以外のピークは認められなかった。よって、変化物は生成しなかったと判断された。次に、凝集体の大きさに基づく微生物にとの接触性による影響を検討するため、粒子径及び水中存在形態

の異なるC60溶液(C60水分散液)を用い、微生物による分解度試験をOECDテストガイドライン301Cに準拠して行った。C60を水分散させるために、氷砂糖及びHCO-40を使用した。これら助剤の微生物分解がBODに影響を与えるため、「C60分解に寄与した真のBOD」を測定することはできなかったが、被験物質の定量分析では、C60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C60は微生物により分解されないことが示された。さらに、環境中に放出されたC60の環境動態として、水生貧毛類蓄積性試験を実施し、土壤中のC60動態及び底生生物であるイトミミズ(*Tubifex tubifex*)への濃縮性の有無を調べた。その結果、土壤中に吸着させたC60は、試験開始前は土壤中に安定に存在したが、試験終了時には濃度低下が認められ、その原因については不明であった。また、土壤中に吸着させたC60の一部は水中に浮遊した。さらに、イトミミズへの取込みが確認されたが、腸管等への土壤の残留が疑われるため、排泄試験等により更なる詳細を調べる必要がある。関らは、C60の水生生物における急性毒性試験を行った結果、藻類試験において、0.051 mg/L以上の濃度区で統計学的に有意な成長速度(0-72時間)の抑制が認められるとしている。その原因の可能性として、試験期間中の照明によって光励起されたC60の影響を考察している。今後、光等の環境要因に対する影響や底質の採取方法及び前処理操作の再現性の確認が必要であると考えられた。(屋形)。

④in vitro 試験系の開発

培養細胞系へのC60曝露研究のための分散剤の検討では、9種の分散剤を用いて曝露した結果、PS、PG、PI、PCおよびTransFast™ Transfection Reagentを曝露した細胞からのみC60が検出された。最も多量に取り込み・付着しているのはTransFast™ Transfection Reagentであり、その他は、PS>PG>PI>PCの順であった。全ての分散剤の場合もC60を添加したことによる細胞毒性は認められなかった。

TiO₂ の培養細胞系に対する曝露評価として、6種類の培養細胞を用い、TiO₂ 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 TiO₂ 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 TiO₂ 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 TiO₂ 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。

一方、C60 の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。(西村)。

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ところ、導入1日後では、1:グルコース溶液のみ、2:C60 のみ、の添加条件では泡沫化は観察されず目立った変化はなかった。一方、3: PC/PS/リポソーム、4:PC/PS/C60 リポソームの添加条件では細胞内に脂質ドロップレットが観察され泡沫化が起っていた。しかし、リポソーム添加後、細胞増殖性に関する急性毒性は認められなかった。また、C60 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。次に、フラーレンの分散方法として氷砂糖と HCO-40 を使用したらいかい法の影響を検討した実験では、

6.8 μ M までの濃度で、形態変化や炎症性サイトカインの放出性において、顕著な影響を及ぼさないことが示された。また、HeLa 細胞に対するフラーレン水分散液(氷砂糖、HCO-40 いかい法)の影響を検討した実験では、フラーレン処理した細胞の顕微鏡像において、2.5%以上の濃度では腫脹した細胞が観察されたことから、界面活性剤による細胞死であることが確認された。溶媒中の界面活性剤の細胞毒性はみられたものの、HeLa 細胞の生存率および形態におけるフラーレン自体の毒性は、少なくとも 1.25%(最終フラーレン濃度: 8.7 μ M) 以下の濃度ではみられなかった(新井)。

神経系への影響としては卵母細胞に神経型アセチルコリン受容体チャンネル(α 3 および β 4 サブユニットの組み合わせ)を発現させ、このチャンネルを介するイオン電流を検討したところ、 γ -シクロデキストリンを用いて可溶化した C60 は、約 10% 減少させた。アセチルコリン受容体チャンネルを抑制する有名な物質 d-ツボクラリン(d-TC) は単独でアセチルコリン受容体チャンネルを介する電流を約 40% 減少させたが、C60 存在下では、d-TC はほとんど抑制作用を示さなかった。また、C60 を ATP 受容体チャンネルの cRNA と共にアフリカツメガエル卵母細胞に注入したところ、C60 存在下では ATP により誘発されるイオン電流の大きさは約半分になったが、卵母細胞間でばらつきが大きく、有意な差ではなかった。次にリポソームにより可溶化した C60 を用いて、アフリカツメガエル卵母細胞発現系に強制発現させた ATP 受容体(P2X₂ 受容体)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(GLAST) に対する影響を検討したところ C60 が P2X₂ 受容体および 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。次に、CNT の GLAST 機能ならびに ATP 受容体(P2X₂ 受容体)機能に対する

影響評価を、複数の異なるメーカーのサンプルを用いて試みた。CNT は培養アストロサイトの MTT reduction を減少させること、一部の CNT がアストロサイトに対し細胞毒性を示すこと、グルタミン酸 (L-glu) トランスポーター (GLAST) 機能を亢進することを見いだした。また、CNT はアフリカツメガエル卵母細胞発現系に強制発現させた ATP 受容体 (P2X2 受容体) を介したイオン電流を抑制する傾向があった。以上の結果より、GLAST 機能評価系ならびに P2X2 受容体機能測定系が CNT の *in vitro* 評価系として使用しうることが示された。CNT は多数の不飽和結合から成り、電子が過密状態であるため、電気的には負の極性を有すると考えられる。もし、CNT が P2X2 受容体のチャンネル孔を塞ぐのであれば、過分極状態では負の極性同士から抑制が减弱されることが予想され、電位依存的抑制はこのような機序が関与している可能性が考えられる。また、ここで検出された CNT の作用と CNT の直径、壁厚、長さとの関連についてはさらなる検討を要すると考えられた (中澤)。

腸管吸収評価モデルである Caco-2 細胞単層膜を用い、TiO₂ 粒子の透過を検討した。Apical 側の培地に TiO₂ 粒子 LU175 (平均一次粒子径 20 nm、ルチル型) あるいは LU205 (平均一次粒子径 250 nm、ルチル型) を分散すると、両粒子とも細胞に凝集して存在する様子が観察された。両粒子ともに、細胞毒性を示さず、単層膜の安定性や、細胞のトランスサイトーシス活性には影響を与えずに、basolateral 側への透過が認められた。透過率は LU175 (0.1 %) の場合に約 0.2 %、LU205 (0.1 %) では 0.1 %であった。次に Caco-2 細胞単層膜モデルに対する C60 の影響について、平均粒子径 280 nm の PS/PC リポソームを調製して検討を行った。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。また、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、C60 がリポソームに含まれることにより抑制された。

次に、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脂質であるホスファチジルコリン(PC)およびホスファチジルグリセロール(PG)を用いて MWCNT を分散する方法を、細胞機能を指標に検討した結果、肺サーファクタント主要成分である C16PC/PG (2:1) で分散した MWCNT は、等量の Tween 20 のみで分散した MWCNT と同様に、マクロファージ系 RAW264 細胞において GM-CSF および TNF α 産生を促進した。これに対し、卵由来 PC/PG を用いた MWCNT は分散性により優れるが、サイトカイン産生を促進しなかった。PC の物理化学的性質の違いが MWCNT の形状を変化させ、細胞影響に違いをもたらした可能性が考えられた。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(最上)。

遺伝毒性に対する検討では、まず、CHL 細胞に TiO₂ 懸濁液を添加し、72 時間培養後、その細胞増殖性と、小核誘発性を検討した。その結果、最低用量の 0.3125mg/ml で細胞毒性が現れ、0.6255mg/ml まで用量依存性のある小核の誘発が観察された。それ以上の濃度では、細胞毒性にため小核頻度は逆に下がった。小核の最大誘発頻度は無処理の約 2 倍程度であった。また、ヒトリンバ芽球 TK6 細胞を用いた検討 (48 時間培養後、生存率、コメット試験による DNA 損傷性、小核誘発性) では、用量依存的な細胞毒性と、DNA 損傷が観察されたが、その程度は軽微であった。また、小核の誘発も観察されたが、その程度は低かった。その後行った TK 突然変異試験においても、用量依存的な突然変異の増加が観察された。最高用量での突然変異の増加は、無処理対照群の約 5 倍であった。

次に、0.5%カルボキシメチルセルロース-C60懸濁液を用いて CHL 細胞に対する細胞毒性および小核誘発性を検討した。その結果、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。C60 の倍数性誘発機構としては、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可能性がある。いずれにせよ細胞表面との接触が何らかの細胞機能を変化させる可能性が指摘された。

TiO₂ に関しては *in vitro* で小核や、姉妹染色体交換、遺伝子突然変異を誘発することが報告されており、本研究のこれまでの結果でも DNA 損傷、小核、突然変異の僅かな誘発を報告しており、弱いながらも TiO₂ は遺伝毒性物質と考えられる。TiO₂ に関して光毒性試験を行った結果、アナテート型 TiO₂ で 0.01~1.0mg/ml の濃度域で用量依存的な光毒性が観察され、IC₅₀ は 0.09mg/ml と計算された。一方、ルチル型 TiO₂、C60 には光毒性作用は観察されなかった。一方、Nanom purple SUH (C60) を用いた光毒性に関する検討では、光の有無にかかわらず C60 は 1.0mg/ml までの濃度で BALB3T3 細胞に対して細胞毒性を示さず、また光毒性作用も観察されなかった。C60 の遺伝毒性に関しては、CHL 細胞において、用量依存的に細胞毒性と、染色体の倍数性細胞の有意な増加が観察したことを報告したが、同じサンプルについて BALB3T3 細胞で *in vitro* 光毒性を検討したが、毒性は観察されず今回の結果は C60 が光毒性を示さないことを支持する結果となった(本間)。

⑤国際動向調査

平成 18 年度時点での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。文献は、

(1) カーボンナノチューブ、(2) フラーレン、(3) 金属粒子、(4) 量子ドット、およびその他の(5) ナノ粒子一般に分けられ、整理された。ナノマテリアルのハザードに関する文献を収集した結果、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、さらなる知見の蓄積が必要であると考えられた。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 で産業用ナノマテリアルに関する作業グループが設置されるなど、国際的に代表的ナノマテリアルでの試験研究や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(高月)。

また、第 27 回の American College of Toxicology 学術年会(2006 年)において、“EVALUATING THE HUMAN HAZARDS FROM EXPOSURE TO NANOMATERIALS”というテーマでシンポジウムが開催され、その中で、当研究班の背景や研究計画と一部の成果について発表する機会を得た。当シンポジウムは、主催者である ILSI-Health & Environmental Sciences Institute (HESI) は現在、国際的なナノマテリアルの評価研究に関するの研究所間コンソーシアムを組織して共同研究を行っており、当研究班との情報共有が、今後の研究進展にとって重要であるという意見交換が行われた。

2006 年には、OECD で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を目的として(WPMN: Working Party on Manufactured Nanomaterials)が設立された。WPNM の優先事項としては、

1. 定義、用語、特性、2. 環境影響(有害性の確認、有害性および曝露評価法)、3. ヒト健康影響

(有害性の確認、有害性および曝露評価法)、4. 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) として進行している。

- ・ 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

各国の関連活動との連携がWPMNにとって非常に重要である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。

2008年からは、SG3の活動の中でスポンサーシッププログラムが本格的に動き出し、各スポンサー国が、2009年3月の第5回WPMN会議までに Dossier 作成計画書 (Dossier Development Plans: DDPs) を提示することが確認された。2008年11月の韓国・釜山で開催されたワークショップでは、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に関する検討も行われた。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およびMWCNTのリードスポンサーになっており、これらのDDPの作成が科せられた。本研究班のWPMNのスポンサーシッププログラムへの貢献としては、まず、C60のADMEに関するデータを提供できると考え、MWCNTのADMEデータの入手の可能性も示唆されている。さらに、C60やMWCNTのin vivo投与のための分散手法に関する研究を進めている観点からは、in vivo (まずはAcute toxicityなど) 試験を行う際の有用な情報を提供できることが可能であると考え

られる。in vitroの試験法開発に関する研究からは、C60の遺伝毒性 (In vitro Genotoxicity) に関する成果や、その他のC60やMWCNTのin vitroデータの提供にも対応可能であると考えられた (広瀬)。

D. 結論

①in vivo 生体影響評価手法の開発

- ナノマテリアルの短期中皮腫発がんモデルとして、雄p53(+/-)マウスに長繊維型MWCNTを単回腹腔内投与した結果、腹膜癒着の発生しない量から用量に依存した腹腔内腫瘍の発生が確認された。
- C60をC57BL/6マウスに単回腹腔内投与した試験で腎障害が確認された。
- アスベストのマウス腸間膜を対象としたマイクロアレイ解析で、細胞増殖、DNA複製、DNA障害に関連する遺伝子発現の増加が認められた。
- 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。
- nTiO₂を気管内に噴霧したイニシエーション・プロモーション実験プロトコールに基づいた中期試験法により、ラットでnTiO₂の肺がん促進作用が確認された。
- 肺発がん促進メカニズムは、nTiO₂を貪食した肺胞マクロファージが分泌したMIP1 α が肺の上皮細胞に作用し、細胞増殖を促進した。
- 肺胞マクロファージが分泌したMIP1 α は血中に移行し、乳腺の細胞増殖を促進した結果、nTiO₂の吸入曝露により乳癌の促進作用も示した。

②ナノ粒子の吸入毒性評価手法の開発

- MWCNTを気管内投与する際の懸濁液調製において、牛血清由来のサーファクテン®が易凝集性を軽減させる良好な媒体であった。
- 異種タンパクによる免疫反応の発現の観点から、ラットを用いた試験ではラット血清を含有するPBSも有用な懸濁媒体のひとつで

あると考えられた。

- 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った。
- 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明らかとなった。
- MWCNTの凝集塊および単離繊維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。
- 吸入暴露装置の開発として、ミスト状態でのMWNT発生法の検討を行った結果、曝露濃度の実測定には至らなかったものの、MWNTがナノ粒子として発生できる可能性が見出された。

③曝露測定法および動態解析法の開発

- C60のマウスへの腹腔内投与の結果、投与群の脾臓、肝臓、腎臓からC60が検出され、単位湿重量当たりの濃度は脾臓が最も高かった。
- C60のラットの反復尾静脈投与の結果、C60は肝臓、肺および脾臓に優先的に蓄積し、腎臓にも蓄積することが分かったが、肝臓や腎臓では経時的な減少が認められ、代謝や排泄の関与が示唆された。
- 電子顕微鏡（電顕）によるMWCNTの分散および形状分布の検討では、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。
- 電顕で確認した結果、MWCNT-7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、幅（直径）は70nmから90nmに多く分布している傾向がみられた。
- 吸入曝露させたマウスの肺組織中のMWCNT存在と挙動について、組織をアルカリ加熱融解することにより、透過型電子顕微鏡を用いることにより検出する手法を開発した。
- OECDテストガイドライン301Cに準拠した試験法による分解性試験ではC60は微生物により分解されず、土壌への吸着や水中に浮

遊することが推測された。さらに、底生生物のフラレンの消化器官への残留も示唆された。

④in vitro 試験系の開発

- TiO_2 の培養細胞系に対する曝露評価では、細胞の種類により細胞毒性に与える影響が異なった。
- ナノサイズの TiO_2 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。
- TiO_2 の細胞毒性について、抗酸化剤の影響を検討した所、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。
- 腸管吸収評価モデルであるCaco-2細胞単層膜を用い、 TiO_2 の透過を検討した結果、Apical側にLU175（平均粒子径20 nm）あるいはLU205（平均粒子径250 nm）を添加すると、basolateral側にチタンが検出されることが判明した。
- TiO_2 は細胞に凝集して存在したが、細胞毒性を示さず、細胞単層膜の安定性や、細胞のトランスサイトシス機能には影響を与えなかった。
- 培養細胞に対するC60の曝露条件の検討で、リポソーム分散剤として使用したC60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。C60を含む平均粒子径280 nmのPS/PCリポソームを調製する方法を確立した。
- C60を内包したリポソームを作成し、培養腹腔マクロファージに添加し、C60の細胞内導入を試みたところ、細胞内に脂質ドロップレットが観察され泡沫化が引き起こされることが示されたが、急性毒性や細胞増殖性やTNF α 産生に対する影響は認められなかった。

- γ -シクロデキストリンで可溶化された C60 がヒトニコチン様アセチルコリン受容体に対して弱い抑制作用を示すこと、ATP 受容体チャネルの発現過程に明確な作用を示さないことが明らかとなった。
- C60 はリポソーム分散状態でも懸濁液の状態でも、Caco-2 細胞単層膜の安定性やトランスサイトシス機能には影響を与えず、basolateral 側への透過も検出されなかった。
- C60 はリポソーム分散状態でも懸濁液の状態でも、マクロファージ RAW264 細胞からのサイトカイン放出に影響しなかった。
- 神経系への影響研究として、グルタミン酸 (L-glu) トランスポーター機能評価系ならびに ATP 受容体受容体機能測定系が CNT の *in vitro* 評価系として利用可能なことが示された。
- CNT は GLAST を有するアストロサイトの機能、および P2X2 受容体などの神経細胞機能に影響を及ぼすことが予想されるが、CNT 分子の直径、壁厚、長さ、分子内極性等の物理的性質との関連についてはさらなる検討を要する。
- 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た。
- マクロファージでのサイトカイン産生を調べた結果、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。
- TiO₂ をチャイニーズハムスター由来 CHL 細胞で 72 時間処理したところ、強い細胞毒性和、小核の誘発が観察された。
- TiO₂ をヒトリンパ芽球 TK6 細胞で 48 時間処理したところ、コメット試験による DNA の損傷と、小核の誘発が観察された後、TK 突然変異の誘発も用量依存的に観察された。
- アナテート型 TiO₂ で用量依存的な光毒性が観察されたが、アナテート型 TiO₂ は光触媒

反応を持ち、活性酸素を発生させることから光毒性作用はこの光触媒作用に関与するものと考えられた。

- ルチル型 TiO₂、C60 には光毒性作用は観察されなかった。
- 中皮腫マーカーになりうるマウス ELISA の開発に着手し、マウス抗体の作成に成功した。

⑤国際動向調査

- ナノマテリアルのハザードに関する文献を収集した結果、現時点 (18 年度) 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、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、2006 年には OECD で産業用ナノマテリアルに関する作業グループ (WPMN) が設置されるなど、国際的に代表的ナノマテリアルでの試験研究や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。
- 2008 年より WPMN の代表的ナノマテリアル安全性試験に関するグループ (SG3) としてスポンサーシッププログラムが本格化してきた。我が国は、C60 と SWCNT および MWCNT のリードスポンサーとなることとなった。
- 本研究班の成果により、WPMN のスポンサーシッププログラムにおける我が国の毒性試験の実施と初期評価文書作成におけるデータ提供に関する作業の一部を支援できる体制が整備されたと考えられる。

E. 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

- Sakamoto Y, Nakae D, Fukumori N, Tayama K, Maekawa A, Imai K, Hirose A, Nishimura T, Ohashi N and Ogata A(2009) Induction of mesothelioma by a single intrascrotal administration of multi-wall carbon nanotube in intact male Fischer 344 rats. *J. Toxicol Sci.*, 34, 65-76.
- 広瀬明彦, 平野靖史郎*: フロンティアレポート ナノ粒子・ナノ材料の健康問題 –その3– 「ナノ粒子の毒性・健康問題」 日本衛生学雑誌, 63, 739-745 (2008)
- 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.
- Tsuda H, Tokunaga H, Hirose A, Kanno J. (2008), Hazard identification of nanomaterials, *Yakugaku Zasshi.* 2008 Dec;128(12): 1727-32.
- Matsuoka, Y., Kawaguchi, H., Yoshida, H., Tsuda, H. and Tsubura, A. Rat mammary preneoplasia and neoplasia: a model for human breast cancer research. *Trends in Cancer Reseach.* 3, 1-13, 2007.
- 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.
- Shiomi K., Hagiwara Y., Sonoue K., Segawa T., Miyashita K., Maeda M., Izumi H., Masuda K., Hirabayashi M., Moroboshi T., Yoshiyama T., Ishida A., Natori Y., Inoue A., Kobayashi M., Sakao Y., Miyamoto H., Takahashi K. and Hino O.: Sensitive and specific new enzyme-linked immunosorbent assay for N-ERC/mesothelin increases its potential as a useful serum tumor marker for mesothelioma. *Clinical Cancer Res.*, 14: 1431-1437, 2008
- Segawa T., Hagiwara Y., Ishikawa K., Aoki N., Maeda M., Shiomi K. and Hino O.: Mesomark kit detects C-ERC/mesothelin, but not SMRP with C-terminus. *BBRC*, 369: 915-918, 2008
- Imamura O., Okada H., Takashima Y., Zhang D., Kobayashi T. and Hino O.: siRNA-mediated *Erc* gene silencing suppresses tumor growth in *Tsc2* mutant renal carcinoma model. *Cancer Letters*, 268: 278-285, 2008
- Inami K., Kajino K., Abe M., Hagiwara Y., Maeda M., Suyama M., Watanabe Su. And Hino O.: Secretion of N-ERC/mesothelin and expression of C-ERC/mesothelin in human pancreatic ductal carcinoma. *Oncology Reports* 20: 1375-1380, 2008
- Hagiwara Y., Hamada Y., Kuwahara M., Maeda M., Segawa T., Ishikawa K. and Hino O.: Establishment of a Novel Specific ELISA system for rat N- and C-ERC/Mesothelin. Rat ERC/Mesothelin in the body fluids of mice bearing mesothelioma. *Cancer Science*, 99:666-670, 2008.
- Ishikawa K., Segawa T., Hagiwara Y., Maeda M., Abe M., Hino O.: Establishment of novel monoclonal antibody to human ERC/mesothelin useful for study and diagnosis of ERC/mesothelin-expressing cancers. *Pathol. Int.* 59:161-166, 2009
- 西村哲治, ナノ粒子の有害性評価とリスク対策 p

2. 学会発表

広瀬明彦, 「カーボンナノチューブ等ナノファイバーと中皮腫」, 第 4 4 回公開講演会 ナノ粒子の健康影響評価の視点と対策, ナノ粒子研究会 (東京) (2008.9)

広瀬明彦, 「産業用ナノ物質の健康影響評価について」, 第 15 回免疫毒性学会シンポジウム 1 「ナノ粒子の生体影響」 (東京) (2008.9)

広瀬明彦, 国立医薬品食品衛生研究所の取り組み (シンポジウム: 先端物質の安全性評価に対応するための連携), 第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会, 2008 年 6 月, 東京

津田洋幸, 徐結荷, 深町勝巳, 井上義之, 高月峰夫, 徳永裕司, 内野 正, 西村哲治, 広瀬明彦, 菅野 純, 発がんプロモーション試験によるナノ粒子のがん原生早期検出の試み, 第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会, 2008 年 6 月 26 日, 東京, 口演

北嶋 聡, 菅野 純, トキシコゲノミクスによる毒性評価法の高精細化, 第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会, 2008 年 6 月 27 日, 東京, 口演

種村健太郎, 五十嵐勝秀, 相崎健一, 北嶋 聡, 菅野 純, 発生期ドーモイ酸暴露によるマウス脳微細構造異常と情動-認知行動障害, 第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会, 2008 年 6 月 27 日, 東京, 口演

平林容子, 李光勲, 尹 秉一, 藤井義明, 金子豊蔵, 黒川雄二, 菅野 純, 井上 達, アリール hidrocarbon 受容体の生物学とトキシコロジー, 第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会, 2008 年 6 月 26 日, 東京, 口演

壺井 功, 平林容子, 原田智紀, 児玉幸夫, 菅野 純, 井上 達, 相澤 信, 加齢に伴う造血微小環境の機能低下は抗癌剤投与後の B 細胞産制を遅延させる, 第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会, 2008 年 6 月 27 日, 東京, 口演

高木篤也, 広瀬明彦, 西村哲治, 福森信隆, 小縣

昭夫, 大橋則雄, 北嶋 聡, 菅野 純, p53+/- マウス腹腔内投与による多層型カーボンナノチューブの中皮腫誘発作用について, 第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会, 2008 年 6 月 26 日, 東京, ポスター

種村健太郎, 五十嵐勝秀, 相崎健一, 北嶋 聡, 菅野 純, エストロゲン受容体 (α 型) ノックダウンマウスの神経行動解析, 第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会, 2008 年 6 月 27 日, 東京, ポスター

今井 清, 坪井 優, 向井大輔, 山下 龍, 関田清司, 高木篤也, 北嶋 聡, 菅野 純, フタル酸エステル DEHP とその活性代謝産物 MEHP の比較毒性学的研究, 第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会, 2008 年 6 月 27 日, 東京, ポスター

北嶋 聡, 相崎健一, 五十嵐勝秀, 児玉幸夫, 高木篤也, 関田清司, 今井 清, 菅野 純, Percellome 手法を用いたフタル酸エステル DEHP とその活性代謝産物 MEHP の腎に及ぼす遺伝子発現変動の比較, 第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会, 2008 年 6 月 28 日, 東京, ポスター

五十嵐勝秀, 小川幸男, 笠井辰也, 長野嘉介, 北嶋 聡, 相崎健一, 菅野 純, シックハウス指針値レベルの経気道暴露による遺伝子発現変化の Percellome 解析, 第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会, 2008 年 6 月 28 日, 東京, ポスター

菅野 純, 多層カーボンナノチューブの p53 ヘテロ欠失マウス腹腔内投与による中皮腫の誘発, ナノ社会受容研究会講演会, 2008 年 8 月 5 日, つくば, 口演

菅野 純, 高木篤也, 広瀬明彦, 西村哲治, 福森信隆, 小縣昭夫, 大橋則雄, 北嶋 聡, 関田清司, 多層カーボンナノチューブの p53 ヘテロ欠失マウス腹腔内投与による中皮腫の誘発, 第 23 回発癌病理研究会, 2008 年 8 月 25 日, 鳥羽, 口演

菅野 純, 高木篤也, 広瀬明彦, 西村哲治, 福森