

Microglia instructs neurogenesis and gliogenesis in the subventricular zone. 第36回国際生理学会世界大会 (IUPS 2009)(2009. 7, 京都)

高木 淳平, 栗脇 淳一, 佐藤 薫, 鈴木 岳, Effects of SSRI on L-glutamate uptake activity of cultured astrocytes. 第32回日本神経科学大会 (2009. 9, 名古屋)

佐藤 薫, James E. Goldman, 大野 泰雄 In vitro risk assessment system for the brain development at an early postnatal stage. 第32回日本神経科学大会 (2009. 9, 名古屋)

佐藤 薫, 高橋 華奈子, 石井一野澤 玲子, 竹内 幸一, 中澤 憲, 大野 泰雄, Two NSAIDs, niflumic acid and diclofenac, inhibit the human glutamate transporter EAAT1 through distinct mechanisms SFN2009 (2009. 10, 米国シカゴ市)

Suzuki T, Takaki J, Kamiya Y, Nakamura Y, Mashino T, Sato K, Nakazawa K, Takahashi T, Haruyama A, Mori K, Iwai T, Oka J-I, Neuropharmacological effects of fullerene derivatives SFN2009 (2009. 10, 米国シカゴ市)

佐藤 薫, 重本一最上 由香里, 大野 泰雄, ミクログリアを介した新たな創薬の可能性—ミクログリアと神経新生・グリア申請との関連 日本薬学会130回年会シンポジウム(2010. 3, 岡山)

佐藤 薫, 重本一最上 由香里, 大野 泰雄, 生後初期脳におけるミクログリアの役割 第83回日本薬理学会(2010. 3, 大阪)

高木 淳平, 栗脇 淳一, 佐藤 薫, 鈴木 岳志, SSRI は培養アストロサイトグルタミン酸トランスポーターの取り込みを促進する. 第83回 第83回 日本薬理学会(2010. 3, 大阪)

H. 知的財産権の出願・登録状況

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |

平成 21 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）
研究分担報告書

研究課題名：ナノマテリアルの健康影響評価手法の総合的開発および体内動態を含む基礎的有害性情報の集積に関する研究

研究分担課題名：ナノマテリアルによる細胞内酸化ストレス評価法の開発に関する研究

研究分担者 奥 直人 静岡県立大学薬学部医薬生命科学教室 教授
研究協力者 清水 広介 静岡県立大学薬学部医薬生命科学教室 助教

カーボンナノチューブ（CNT）暴露によって生じる酸化ストレスに由来するヒトの免疫機能への影響を調べるために、単層 CNT（SWCNT）および多層 CNT（MWCNT）のマクロファージ細胞に対する細胞毒性試験を行ったところ、弱いながらも SWCNT および MWCNT ともに細胞増殖抑制作用を示した。特に、CNT 懸濁液中の浮遊微粒子画分においても細胞増殖抑制作用を示したことから、細胞毒性の本体は微小となった CNT にあることが示唆された。

A. 研究目的

カーボンナノチューブ（CNT）は新たなナノマテリアルとして、今後幅広い分野における使用が期待されているが、ヒトへの健康被害については情報が少なく、またその評価を行うための実験系も統一されていない。今回、その評価系を確立するとともに CNT のヒトへの健康被害を調べるためにヒトの免疫機能に対する影響に焦点を当て、異物の排除において重要な役割を担っているマクロファージ細胞に対する影響について、細胞内酸化ストレス評価を念頭に

置いた基礎的な細胞毒性としての検討を行った。

B. 研究方法

1. CNT 懸濁液の調製

CNT には単層 CNT（30 ナノクラス CNT）と多層 CNT（日機装量産単層 CNT）を用いた。各 CNT 100 mg を電子天秤（AE160, METTLER TOLEDO）にて秤量し、細胞培養用培地 Dulbecco's Modified Eagle Medium（D-MEM, Wako）1 mL にそれぞれ懸濁した。その後プローブ型ソニケーター（Sonifier 250, BRANSON）にて超音波処理（Output 7）

を5分間行い、得られたCNT懸濁液をCNT全画分とした。またCNT全画分中の浮遊微粒子画分を得るために、遠心処理 (CF15RXII, HITACHI) を3500 rpm (1200 x g) の条件にて10分間行い、得られた上清画分をCNT浮遊微粒子画分とした。それぞれのサンプルについてD-MEMにて1, 10, 100希釈(全画分については1000倍希釈も)を行い、その後の実験に用いた。

2. マクロファージ細胞の培養

マウスマクロファージ細胞株であるRAW264細胞およびJ774A.1細胞を実験に用いた。それぞれの細胞はD-MEMにPenicillin G (最終濃度: 100 units/mL, Wako)、Streptomycin (最終濃度 100 mg/mL, Wako) および非働化ウシ胎児血清 (最終濃度: 10%, Japan · Bio serum) を添加した培地中で5%CO₂存在下、37°Cで培養した。

3. 細胞増殖阻害試験

RAW264細胞およびJ774A.1細胞を6 x 10⁴ cells/mLとなるように10%ウシ胎児血清含有D-MEM溶液を用いて調整した。細胞懸濁液200 µLを96 well細胞培養用マイクロテストプレート (BD Falcon) の各wellに加え、CO₂インキュベーター中にて37°Cで一晩培養した。10%ウシ胎児血清含有D-MEM溶液180 µLで置換した後、CNTサンプル溶液20 µLを加え37°Cで24~48時間インキュベートした。リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) にて細胞を2回洗浄した後、5%TetraColor ONE (Seikagaku Biobusiness Corporation) を添加したD-MEM溶液を加え、3時間37°Cでインキュベートした。そ

の後マイクロプレートリーダー (Infinite M200, TECAN) にて吸光度 (測定波長: 450 nm, 対象波長: 630 nm) を測定し、生細胞数の算出を行った。

C. 研究結果

1. RAW264細胞に対するCNTの細胞毒性

マウスマクロファージ由来細胞株RAW264細胞に対するSWCNTおよびMWCNTの細胞毒性作用について検討を行った。細胞毒性の評価はTetraColor ONEを用いたMTT改変法を利用した。

SWCNTの全画分暴露では、今回用いた最も高濃度 (100 mg/mL) においてもほとんど細胞毒性を示さなかったが、浮遊微粒子画分については非常に弱いながらも細胞毒性を示す傾向が見られた。MWCNTの全画分では、10 mg/mLの濃度の暴露によって細胞毒性が見られ、100 mg/mLの濃度においては約60%の細胞生存率であった。またMWCNTの浮遊微粒子画分においてもSWCNTと同様に細胞毒性が観察された。

2. J774A.1細胞に対するCNTの細胞毒性

マウスマクロファージ細胞株J774A.1細胞に対するSWCNTおよびMWCNTの細胞毒性についても同様に検討を行った。細胞毒性の評価はRAW264細胞の際と同様にTetraColor ONEを用いたMTT改変法を利用した。

SWCNTの全画分暴露では、RAW264細胞を用いた検討と同様に最も高濃度 (100

mg/mL) においてもほとんど細胞毒性を示さなかった。これに対し SWCNT の浮遊微粒子画分については原液を暴露した群において細胞毒性を示す傾向が見られた。MWCNT の全画分暴露においても RAW264 細胞の結果と同様に、10 mg/mL の濃度の暴露あたりから細胞毒性が観察され、100 mg/mL の濃度においては約 55% の細胞生存率であった。さらに MWCNT の浮遊微粒子画分については、原液を暴露した群において最も高い細胞毒性が見られ、細胞生存率は約 17% であった。

D. 考察

酸化ストレスの惹起は、免疫機能を含めヒトに健康被害を与える可能性が考えられるため、ナノマテリアル開発において酸化ストレス惹起の有無を調べることは非常に重要である。今回、生体において異物排除の中心的役割を果たしているマクロファージ細胞へのカーボンナノチューブ (SWCNT および MWCNT) 暴露による酸化ストレス惹起の有無を調べるその手段の一つとして、マクロファージ細胞への毒性作用に着目し、その評価系の確立ならびに実際に CNT の免疫担当細胞への毒性を調べることを目的として検討を行った。SWCNT 全画分暴露では、マウスマクロファージ細胞株 RAW264 細胞および J774A.1 細胞ともにほとんど細胞毒性が観察されなかったのに対し、SWCNT 浮遊微粒子画分においては、SWCNT 全画分に比べて全 CNT 濃度が減少しているにもかかわらず、細胞毒性を示す

傾向にあることが示された。このため SWCNT が細胞毒性を示すその本体は、遠心処理によっても沈殿しない微細となった CNT にある可能性が示唆された。SWCNT 全画分において細胞毒性作用が減弱したのは、大きなサイズの SWCNT が微細な SWCNT の細胞への接近を妨害した可能性が考えられた。

MWCNT の全画分暴露では 10 mg/mL の濃度の暴露あたりから細胞毒性作用を示し、100 mg/mL の暴露においてはさらに高い毒性作用を示した。このことから SWCNT に比べて MWCNT の方がマクロファージ細胞に対する毒性作用が強い可能性が示唆された。また SWCNT 暴露の際と同様に、MWCNT 浮遊微粒子画分暴露においてはその毒性作用が高まる傾向が見られたため、その毒性の原因は微細となった MWCNT にあることが考えられた。

E. 結論

本検討において、CNT は弱いながらもマクロファージ細胞に対して毒性を示し、その中でも特に MWCNT の方が SWCNT に比べて強い毒性作用を示すことが示唆された。またこれらの細胞毒性作用は、大きなサイズの CNT ではなく、非常に微細となった CNT によるものであることが考えられた。以上のことから、CNT の暴露は弱いながらも細胞毒性作用を示し、酸化ストレスを惹起する可能性が示唆された。

F. 健康危機情報

なし。

G. 研究発表

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

平成 21 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：ナノマテリアルの健康影響評価手法の総合的開発および体内動態を
含む基礎的有害性情報集積に関する研究

分担研究課題名：ナノマテリアルの血管系へ及ぼす影響に関する基礎的研究

分担研究者：最上 知子 国立医薬品食品衛生研究所 機能生化学部 室長
協力研究者：広瀬 明彦 国立医薬品食品衛生研究所 総合評価研究室長 室長
奥平 桂一郎 国立医薬品食品衛生研究所 機能生化学部 主任研究官

研究要旨

ナノマテリアルの血管系への影響評価として、多層 CNT (MWCNT) を動脈硬化モデルであるアポ E KO マウスに 8 週間気管内投与し、動脈硬化病変の形成への影響を調べた。高脂肪・高コレステロール食投与により、血中 VLDL・LDL コレステロールが著しく上昇し、対照群においても大動脈弁ならびに大動脈内壁に著しい脂質沈着が認められた。しかしながら、MWCNT 投与による影響は認められなかった。炎症は動脈硬化の修飾因子であり、全身性の炎症は病態を増悪する。血中の抑制性サイトカイン IL-10 は低下したが、炎症性サイトカインの有意な上昇は認められなかった。

A. 研究目的

産業用ナノマテリアルは産業用途となる特異な物理化学特性から、同一化学組成を持つ大きな構造体とは異なる生理活性やヒト健康影響に対する懸念をもたらす可能性があり、ナノマテリアル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となっている。本研究では、懸念の高い慢性影響評価系の開発に関して、吸収されたナノマテリアルが体循環等を経由して及ぼす長期的な影響を検討すると共に、分子生物学的な変化を解析し、将来的な評価指標の確立をめざしている。

心血管疾患については、疫学的、実験的な研究から、環境中ナノ粒子 PM_{0.1} (<100 nm) と相関することが示唆されている。また産業用ナノマテ

リアルである単層 CNT (SWCNT) を動脈硬化モデルである apoE KO マウスの気道に滴下すると、動脈硬化促進作用を示すことが報告されている。そこで本研究においては、多層 CNT (MWCNT) の動脈硬化病変への影響を検討した。

B. 研究方法

1. 実験材料および試薬

多層カーボンナノチューブ (MWCNT) はナノカーボンテクノロジーズ社 (MWCNT-7, Lot No. 060125-01k)、phosphatidylcholine (PC) は Avanti 社 (卵由来、#840051P)、phosphatidylglycerol (PG) (卵由来#P8318) は Sigma 社のものを用いた。サイトカイン測定には Bio-Rad 社の Bio-Plex マウスサイトカイン 8-Plex アッセイキ

ットおよび Bio-Plex サイトカインリージェントキットを用いた。ApoE KO (C57BL/6) homo マウスは Taconic 社より、高脂肪食(D12336: 脂肪 35kcal%, 1.25% コレステロール, 0.5% コール酸含有)は Research diets 社より購入した。

2. MWCNT の分散

MWCNT は 0.5% Tween 20 を含む PBS に 5 mg/mL の濃度で懸濁し、1 分間バス型超音波発生装置で処理を行い分散した。この溶液を PC/PG 溶液 (30 mg/mL) を用いて 0.4 mg/mL に希釈した。続いて 5 分間超音波処理を行い、30G の注射針 (O.D.0.31mm) を通してホモジナイズしたのち、PBS で最終濃度 0.2 mg/mL (0.02% Tween 20、PC/PG 15 mg/mL) に希釈した。PC/PG 溶液はあらかじめ以下のように調製した。PC および PG の 100 mg/mL chloroform 溶液をガラス試験管中で 2:1 の割合で混合し、窒素ガスで溶媒を留去する。フィルム状になったリン脂質に PBS を加えリン脂質濃度を 30 mg/mL とし、voltex 後、バス型超音波発生装置で 1 分間処理を行いリポソーム様に分散した。

3. マウスへの MWCNT 投与実験

雄 ApoE KO マウス (9 週齢) は高脂肪・高コレステロール食を与え 8 週間飼育した。MWCNT 分散液は Day 0, Day 14, Day 28 および Day 42 に 25 μ L をペントバルビタール麻酔下、マイクロスプレーヤーを用いて気管内投与した。対照として 0.02% Tween 20 を含む PC/PG (15 mg/mL) 溶液を用いた。8 週間後に採血と臓器摘出を行った。大動脈は、①起始部弁輪部、②起始部直下から腹部大動脈までについて 10 %ホルマリン緩衝液で固定後、それぞれ切片を Oil-Red-O 染色、血管内壁表面を Sudan IV 染色した。

4. 血中リポタンパクおよびサイトカインの測定

血液は EDTA 処理後に遠心して血漿を分離し、TSKgel Lipopropak XL カラムを連結した HPLC システムにより各リポタンパクを分離し、

コレステロールおよびトリグリセリドを測定した。血漿の一部は 235,000xg で 16 時間の超遠心を行ってリポタンパクを浮上させて除去したのち、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. 大動脈弁・内壁への脂質沈着と MWCNT 投与の影響

MWCNT は、肺サーファクタントの脂質成分を用いて懸濁溶液を作成し、気管内投与を行った。これは、界面活性剤使用による肺組織への傷害を減ずるためである。対照として、脂質のみの懸濁液を投与した。MWCNT 懸濁液を 8 週間気管内投与することにより、アポ E KO マウスの体重や臓器 (肺、肝臓、脾臓および腎臓) 重量には、影響は認められなかった。肝臓の相対重量には増加傾向 ($P=0.0841$) が認められた。

血液中のリポタンパクを分析すると総コレステロールは対照群で 2432 ± 448 mg/dL ($n=12$) であった。本実験では、アポ E KO マウスに高脂肪・高コレステロール食を投与しており、この値は正常食投与野生型マウスの約 40 倍に上昇していた。MWCNT 投与群では 2623 ± 429 mg/dL ($n=12$) であり、影響は認められなかった。血中コレステロールのほとんどは VLDL 画分に存在しており、対照群・MWCNT 投与群でそれぞれ 1849 ± 368 mg/dL、 2043 ± 355 mg/dL であった。HDL コレステロールは 41 ± 6 mg/dL、 43 ± 5 mg/dL、血中トリグリセリドはそれぞれ 21 ± 6 mg/dL、 22 ± 4 mg/dL と MWCNT 投与の影響は認められなかった。

大動脈起始部弁輪部の切片を観察すると、対照群においても血管の管腔内に $577,088 \pm 141,506$ μ m² ($n=11$) に達する重篤な脂質沈着が認められた。コレステリルエステルの針状結晶が存在する病変も認められた。MWCNT 群の脂質沈着面積は $546,514 \pm 143,495$ μ m² ($n=12$) であり、投与による影響が認められなかった。

大動脈起始部直下から腹部大動脈までの血管内壁について脂質染色を行ったところ、対照群に

においても血管内壁総面積の $31.5 \pm 10.3\%$ ($n=5$) におよぶ脂質沈着が認められた。一方、投与群でも沈着面積比は $29.1 \pm 9.3\%$ ($n=6$) であり、MWCNT の影響は認められなかった。

2. 血中サイトカインレベルに及ぼす MWCNT の影響

MWCNT の気管内投与がマウス血中サイトカイン IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-10、INF- γ 、GM-CSF および TNF α のレベルに及ぼす影響を検討した。抑制性サイトカインである IL-10 は対照群の 52.4 ± 22.6 pg/mL ($n=12$) から MWCNT 投与により 25.4 ± 21.3 pg/mL ($n=12$) へと有意に低下した ($P=0.006$)。一方、炎症性サイトカイン IL-1 β と TNF α 、ならびに IL-5 については、MWCNT 投与群において平均値の 9-10 倍、30-50 倍の極端な高い値を示す個体が 2 例存在していたが、平均値には有意な差は認められなかった。

D. 考察

環境中ナノ粒子と心血管疾患との関係は以前より示唆され、単層 CNT (SWCNT) を気道に滴下すると動脈硬化が促進されることがアポ E KO マウスを用いて報告されていた (Li Z et al, *Environ Health Perspect*, 2007)。そこで本研究では MWCNT の効果を検証した。アポ E KO マウスに MWCNT を 2 週間毎に 4 回、気管内投与し、8 週間後に大動脈弁ならびに大動脈内壁への脂質沈着を調べたところ、MWCNT 投与による影響は認められなかった。血中の抑制性サイトカイン IL-10 は有意に低下しており、炎症性サイトカインが著しく上昇した個体も認められたが、差は有意でなかった。

野生型マウスでは血管への脂質沈着によるアテローム性動脈硬化の発症がほとんど認められない。この原因の一つが、マウスはヒトと異なり、動脈硬化を促進するコレステロール—いわゆる悪玉コレステロール LDL やその前駆体 VLDL の血中濃度が極めて低く、血中コレステロールのほとんどは抗動脈硬化性の善玉コレステロール

HDL 中に存在することにある。アポ E 欠損マウスでは VLDL の肝への取り込みとクリアランスが低下し、血中 VLDL・LDL 濃度が高まり、アテローム性動脈硬化を自然発症する。したがって、アポ E KO マウスはヒトに近い動脈硬化のモデルとして繁用されている。本研究においては、SWCNT の報告での実験と同じく、アポ E KO マウスに高脂肪・高コレステロール食を投与した。その結果、血中コレステロールは普通食アポ E KO マウスの約 2 倍、野生型マウスの約 40 倍に達し、そのほとんどが VLDL と LDL であった。その結果、短期間に著しい病態の進展が生じた。アポ E KO マウスの大動脈硬化病巣は、普通食で飼育すると 20 週齢の時点でも約 3% に留まり、40 週に約 35% に急増することが知られている。SWCNT の報告での病巣は対照群で約 6% である。これに対し本研究では、対照群で 8 週間後 (17 週齢) に大動脈内壁の約 30% に及ぶ脂質沈着病巣が認められた。血中総コレステロールを対照群と比較すると、SWCNT の報告は本研究の約 60% 程度であった。したがって本研究では、動脈硬化病巣が対照群においても著しく進展したために、増悪因子の影響を観察することが困難であった可能性も考えられる。

なお本研究と SWCNT の報告は、投与方法 (それぞれ噴霧、気道滴下) や分散方法 (肺サーファクタント脂質で分散、PBS 懸濁) が異なっている。肺サーファクタント脂質を用いた分散は、界面活性剤による肺組織への傷害と噴霧投与器具の詰まりを防ぐために採用した。本方法は、昨年度の研究 (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) 「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」) において確立した。また、PBS 懸濁の MWCNT はマクロファージからの炎症性サイトカイン TNF α および分化誘導因子 GM-CSF 産生を促進するが、肺サーファクタント脂質で分散すると、作用は認められないことを報告している。

炎症は動脈硬化の修飾因子であり、局所的な病

巣の炎症のみならず、全身性の炎症性サイトカインレベルの上昇が遠隔臓器での病巣の形成と進展に影響することが知られている。本研究においては、MWCNT 投与により血中の抑制性サイトカイン IL-10 が有意に低下した。IL-10 は単球系細胞に作用して炎症性サイトカインの産生などの免疫機能を抑制することが知られている。しかしながら、血中の炎症性サイトカインレベルが 10-50 倍に著しく上昇した個体が認められ、大動脈内壁の病巣面積も最大であったが、平均値の差は有意ではなかった。

E. 結論

ナノマテリアルの血管系への影響評価のために、MWCNT をアポ E KO マウスに気管内投与し、動脈硬化病変への影響を調べた。大動脈弁ならびに大動脈内壁への脂質沈着に影響は認められなかった。血中の抑制性サイトカイン IL-10 は

低下したが、炎症性サイトカインの有意な上昇は認められなかった。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

1. 最上(西巻)知子: ABCA1 遺伝子の肝型コレステロール応答の分子機構 第 51 回日本脂質生化学会シンポジウム (2009.7)

2. Tomoko Nishimaki-Mogami: Liver X receptor (LXR) modulators: potential therapeutic agents for raising HDL levels and protecting against atherosclerosis 第 41 回日本動脈硬化学会総会シンポジウム (2009.7)

研究課題名: ナノマテリアル健康影響評価手法の総合的開発
および体内動態を含む基礎的有害性情報の集積に関する研究

分担研究課題名: 炭素系ナノマテリアルの生体影響試験における物性測定に関する研究

分担研究者: 宮澤 薫一 独立行政法人物質・材料研究機構 ナノテクノロジー基盤萌芽ラボ
フラーレン工学グループ グループリーダー

研究協力者: 橋島 真一 独立行政法人物質・材料研究機構 ナノテクノロジー基盤萌芽ラボ
フラーレン工学グループ NIMS 研究員

研究要旨

炭素系繊維形状ナノマテリアルの生分解性と長さの生体に及ぼす影響を調べるため、液-液界面析出法により、異なる長さ分布をもつ C₆₀ フラーレンナノウイスキー(C₆₀NW)と、C₆₀NW の熱処理により、難生分解性繊維形状ナノマテリアルを合成した。さらに、マクロファージ様細胞を用いて、未熱処理の C₆₀NW(平均長さ 6.0 μm)の生分解性を確認した。マクロファージ様細胞に未熱処理の C₆₀NW を曝露したところ、時間経過とともに C₆₀NW を取込む細胞数は増え、曝露 48 時間後には 7 割以上の細胞が C₆₀NW を取込んだ。C₆₀NW を曝露したマクロファージ様細胞を長期培養したところ、細胞内に分解した C₆₀NW を確認した。曝露 28 日後、C₆₀NW を回収したところ、短い長さ(< 3 μm)の C₆₀NW の割合が増えた。また、回収した C₆₀NW とともに C₆₀ からなる微結晶を確認した。これは、マクロファージ様細胞により C₆₀NW が分解され、分散した C₆₀ が再結晶化した微結晶であると考えられた。これらの結果から、未熱処理の C₆₀NW は生体内ではマクロファージにより分解されることが示唆され、生分解性繊維形状ナノマテリアルであると考えられた。

A. 研究目的

近年、ナノマテリアルに対する生体影響が懸念され、様々なリスク評価が行われている。なかでも、繊維形状ナノマテリアルについては、ファイバーパラダイムによると、難生分解性の細くて長い物質が有害であると考えられている。このため、繊維形状ナノマテリアルの生分解性やサイズの生体に及ぼす影響について、多くの研究が行われている。しかしながら、例えば、カーボンナノチューブ(CNT)は難生分解性繊維形状ナノマテリアルであるが、CNT を用いた生体影響試験では、合成時に用いた触媒金属の影響を無視することができず、また、CNT の凝集により、本

来の繊維形状由来の生体影響を評価することは難しい。

一方、フラーレンナノウイスキー(FNW)は、フラーレンからなる繊維形状ナノマテリアルであり、構成分子であるフラーレンがファン・デル・ワールス力によって結合し、その構造を維持している。FNW は、金属を含まず、さらに、熱処理することによりフラーレン分子が壊れ、炭素-炭素共有結合からなる難生分解性繊維形状ナノマテリアルになる。そこで、本研究では、未熱処理の FNW と熱処理した FNW を用い、繊維形状ナノマテリアルの生分解性の生体に及ぼす影響を評価し、さらに、サイズ分布の異なる未熱処理の

FNW と熱処理した FNW を用い、炭素繊維形状ナノマテリアルのサイズの生体に及ぼす影響を明らかにする。

B. 研究方法

平成 21 年度は生体影響試験に供する材料の合成と、マクロファージ様細胞を用いて未熱処理の C₆₀NW (平均長さ 6.0 μm) の生分解性を確認した。

1. C₆₀NW の合成と熱処理

C₆₀NW は液-液界面析出法により合成した。C₆₀ を飽和したトルエン溶液に 2-プロパノールを加え、攪拌後、静置した。24 時間後、溶液を濾過し、残渣として C₆₀NW を得た。C₆₀ 飽和トルエン溶液と 2-プロパノールの比率、静置時の温度を変えることにより、異なる長さ分布をもつ C₆₀NW を合成した。C₆₀NW の熱処理は、真空下で 900°C で 1 時間行った。C₆₀NW の長さは、光学顕微鏡と SEM を用いて測定した。

2. マクロファージ様細胞を用いた C₆₀NW の生分解性試験

2.1. マクロファージ様細胞の誘導

マクロファージ様細胞はヒト急性白血病患者の末梢血由来の細胞株 THP-1 から phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) を用いて誘導した。PMA を処理することにより、浮遊細胞である球形の THP-1 細胞は偽足を形成し、接着細胞であるマクロファージ様細胞に分化する。このため、PMA の濃度と誘導時間は、浮遊細胞数の計測と位相差顕微鏡による細胞の形態観察により求めた。

2.2. マクロファージ様細胞への C₆₀NW の曝露と形態観察

C₆₀NW は培養液 (100 units/mL penicillin、100 μg/mL streptomycin、10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS)、RPMI 1640) に懸濁し、最終濃度が 0.1、1、10 μg/mL になるようにマクロファージ様細胞に曝露し、48 時間、位相差顕微鏡を用いて観察した。同時に、観察期間、培養液中の C₆₀NW の分散状態を確認した。

2.3. マクロファージ様細胞による C₆₀NW の貪食実験

マクロファージ様細胞に最終濃度が 10 μg/mL になるように C₆₀NW を曝露し、曝露 1、3、6、12、24、48 時間後に細胞を 4% paraformaldehyde で固定、Hoeschst 33342 と rhodamine-phalloidin で染色し、C₆₀NW を取込んだ細胞の割合を共焦点レーザー顕微鏡を用いて調べた。

2.4. マクロファージ様細胞を用いた C₆₀NW の生分解性実験

マクロファージ様細胞に最終濃度が 10 μg/mL になるように C₆₀NW を曝露し、曝露後 28 日間、位相差顕微鏡を用いて細胞と C₆₀NW の様子を観察した。また、曝露直後、及び 28 日後に proteinase K を用いて細胞を溶かし、C₆₀NW を回収した。対照実験として培養液中に C₆₀NW を添加し、同様に回収した。回収した C₆₀NW を光学顕微鏡と SEM を用いて観察し、対照実験と比較することにより、マクロファージ様細胞による C₆₀NW の形状変化を調べた。

C. 研究結果

1. C₆₀NW の合成と熱処理

C₆₀ を飽和したトルエン溶液 2.25 mL に 2-プロパノール 6.75 mL を加え、攪拌後 15°C で静置し、平均長さ 1.7 μm の短い長さ分布をもつ C₆₀NW を合成した。また、C₆₀ を飽和したトルエン溶液 4 mL に 2-プロパノール 4 mL を加え、攪拌後 20°C で静置することにより、長い長さ分布をもつ C₆₀NW として、平均長さ 10.1 μm の C₆₀NW を合成した。

短い長さ分布の C₆₀NW と長い長さ分布の C₆₀NW をそれぞれ熱処理して、難生分解性繊維形状ナノマテリアルを得た。熱処理後、長さを測定したところ、それぞれの平均長さは 1.3 μm、7.6 μm であった。

2. マクロファージ様細胞を用いた C₆₀NW の生分解性試験

2.1. マクロファージ様細胞の誘導

THP-1 細胞を 10 nM と 100 nM の PMA で処理したところ、浮遊細胞数は徐々に減少し、処理 24 時間後には 9 割以上の細胞が接着細胞になった。一方、

1 nM の PMA で処理したところ、少数の接着細胞は確認されたが、処理 72 時間後には浮遊細胞数は 2 倍に増えた。また、PMA で処理しない場合は、72 時間で浮遊細胞数は 5 倍に増えた。

THP-1 細胞を 10 nM と 100 nM の PMA で処理し、位相差顕微鏡で観察したところ、細胞は徐々に形態を変え、伸長し、偽足を形成した。

10 nM と 100 nM では浮遊細胞数と細胞形態の変化には著しい差がみられなかったことから、10 nM の PMA で 24 時間処理した THP-1 細胞をマクロファージ様細胞として用いた。

2.2. マクロファージ様細胞への C₆₀NW の曝露と形態観察

C₆₀NW は培養液中に良好に分散し、観察期間中、分散を維持した。良好な分散の理由を調べるために、FBS を抜いた培養液中に C₆₀NW の分散を試みたところ、C₆₀NW は分散することなく、C₆₀NW の多くは培養液の表面や容器壁面に凝集した。

マクロファージ様細胞に C₆₀NW を曝露して、位相差顕微鏡を用いて観察したところ、いずれの濃度においても、C₆₀NW を曝露していない細胞と比較して、細胞形態に大きな変化は見られなかった。

2.3. マクロファージ様細胞による C₆₀NW の食食実験

マクロファージ様細胞に C₆₀NW を曝露したところ、時間経過とともに C₆₀NW を取込む細胞の割合は増え、曝露 48 時間後には 7 割以上の細胞が C₆₀NW を取込んだ。

2.4. マクロファージ様細胞による C₆₀NW の生分解性実験

マクロファージ様細胞に C₆₀NW を曝露して 21 日後に、細胞内に分解した C₆₀NW を確認した。また、曝露 28 日後に回収した C₆₀NW は、曝露直後に回収した C₆₀NW や対照実験と比較して、短い長さ (< 3 μm) の C₆₀NW の割合が増えた。また、曝露 28 日後に回収した C₆₀NW とともに、C₆₀ からなる微結晶を確認した。

D. 考察

1. C₆₀NW の合成と熱処理

液-液界面析出法を用いて、C₆₀ 飽和トルエン溶液と 2-プロパノールの比率、静置時の温度を変えることにより、異なる長さ分布をもつ C₆₀NW を合成することができた。また、合成した C₆₀NW を熱処理することにより、難生分解性繊維形状ナノマテリアルを得た。

未熱処理の C₆₀NW と熱処理した C₆₀NW を用いることにより、繊維形状ナノマテリアルの生分解性の生体に及ぼす影響を確認し、異なるサイズ分布をもつ未熱処理の C₆₀NW と熱処理した C₆₀NW を用いることにより、炭素繊維形状ナノマテリアルのサイズの生体に及ぼす影響を明らかにすることができると考えられた。

2. マクロファージ様細胞を用いた C₆₀NW の生分解性試験

C₆₀NW は培養液中に良好に分散し、分散を維持した。FBS を抜いた培養液には、C₆₀NW は分散しなかったことから、分散の理由として、FBS に含まれるタンパク質等の何らかの成分が C₆₀NW に貼り付き、界面活性剤のような働きをしたためではないかと考えられた。この結果から、C₆₀NW は生体内では同様に、タンパク質等の成分の働きにより凝集することなく、良好な分散状態を維持することが見込まれ、繊維形状由来の影響を評価する材料として適していると考えられた。

C₆₀NW を曝露したマクロファージ様細胞の形態観察と食食実験から、C₆₀NW は、細胞の形態に影響を及ぼすことなく、細胞に取り込まれることが明らかになった。

また、C₆₀NW を曝露したマクロファージ様細胞内に分解した C₆₀NW を確認したこと、曝露直後に回収した C₆₀NW や対照実験と比較して、曝露 28 日後に回収した C₆₀NW は短い長さ (< 3 μm) の C₆₀NW の割合が増えたことから、細胞による C₆₀NW の分解の可能性が示唆された。さらに、曝露 28 日後に回収した C₆₀NW とともに、C₆₀ からなる微結晶を確認したが、マクロファージ様細胞が C₆₀NW を分解して、分散した C₆₀ が長期培養中の細胞死、あるいは酵素処理時に

再結晶化した微結晶であると考えられた。

E. 結論

繊維形状ナノマテリアルの生分解性とサイズの生体に及ぼす影響を調べるための材料として、それぞれ異なるサイズ分布をもつ未熱処理の C₆₀NW (平均長さ: 1.7 μm、10.1 μm) と熱処理した C₆₀NW (平均長さ: 1.3 μm、7.6 μm) を合成した。

未熱処理の C₆₀NW の生分解性をマクロファージ様細胞を用いて調べたところ、マクロファージ様細胞による C₆₀NW の分解の可能性を示唆する結果を得た。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

(論文発表)

1. Nudejima S, Miyazawa K, Okuda-Shimazaki J and Taniguchi A (2009) Observation of phagocytosis of fullerene nanowhiskers by PMA-treated THP-1 cells, J. Physics: Conf. Series, 159, 012008.
2. Nudejima S, Miyazawa K, Okuda-Shimazaki J and Taniguchi A (2010) Biodegradation of C₆₀ Fullerene Nanowhiskers by Macrophage-like Cells, Proc. Int'l. Conf. Biochem. Med. Chem., 1, 89-94.

(学会発表)

1. Nudejima S, Miyazawa K, Okuda-Shimazaki J and Taniguchi A. Phagocytosis of FNWs by PMA-treated THP-1 cells, Carbon 2009, June 2009, Biarritz.
2. Nudejima S, Miyazawa K, Okuda-Shimazaki J and Taniguchi A, Interaction between PMA-Treated THP-1 Cells and Fullerene Nanowhiskers, NIMS WEEK 2009, July 2009,

Tsukuba (招待講演).

3. ぬで島真一、宮澤薫一、奥田順子、谷口彰良、マクロファージ様細胞によるフラーレンナノウイスカーの生分解、第 37 回フラーレン・ナノチューブ総合シンポジウム、2009 年 9 月、つくば。
4. Nudejima S, Miyazawa K, Okuda-Shimazaki J, Taniguchi A, Phagocytosis of Fullerene Nanowhiskers by Macrophage-like Cells, 11th Pacific Polymer Conference 2009, Dec. 2009, Cairns.
5. Nudejima S, Miyazawa K, Okuda-Shimazaki J, Taniguchi A, Biodegradation of C₆₀ Fullerene Nanowhiskers by Macrophage-like Cells, Int'l Conf. BIOCHEM. MED. CHEM., Feb. 2010, Cambridge (招待講演).
6. ぬで島真一、宮澤薫一、奥田順子、谷口彰良、マクロファージ様細胞を用いたフラーレンナノウイスカーの生分解性評価、第 38 回フラーレン・ナノチューブ総合シンポジウム、2010 年 3 月、名古屋。
7. ぬで島真一、宮澤薫一、奥田順子、谷口彰良、マクロファージ様細胞を用いたフラーレンナノウイスカーの生分解の研究、日本物理学会 第 65 回年次大会、2010 年 3 月、岡山。

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得(出願中)
発明の名称: 生分解性試験方法及びフラーレンファイバー含有医用材料
発明者氏名: ぬで島真一、宮澤薫一、奥田順子、谷口彰良
出願番号: 特願 2010-035688
出願人: 独立行政法人物質・材料研究機構
出願日: 2010 年 2 月 22 日
2. 実用新案登録
(該当なし)
3. その他
(該当なし)

平成 21 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:ナノマテリアルの健康影響評価手法の総合的開発および体内動態を
含む基礎的有害性情報の集積に関する研究

分担研究課題名:ナノマテリアルの基礎的有害性情報の集積に関する研究

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: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
研究協力者:小野 敦 国立医薬品食品衛生研究所 総合評価研究室 主任研究員
研究協力者:加藤 日奈 国立医薬品食品衛生研究所 総合評価研究室 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作業グループ(WPMN)の最新情報を収集するとともに、各国が自主的に行うおこなうスポンサーシッププログラムへの日本政府の対応としてのデータ提供のサポートを行う目的としている。今年度は、産業用ナノマテリアル作業グループにおける代表的なナノマテリアルによる検証プロジェクト(SG3)と、その中で行われているスポンサーシッププログラムの進捗状況について調査した。また、ナノマテリアルの各種試験の実行において注目すべきナノマテリアルの分散手法に関するガイダンス(SG4 作成)について情報の収集を行った。また、基礎的な毒性試験データ提供として多層型カーボンナノチューブの皮膚刺激性試験(OECD_TG404)を行った。その結果、多層型カーボンナノチューブの皮膚刺激性試験では、塗布方法として、直接塗布およびシリコンオイル懸濁液による塗布のどちらの手法を用いても刺激性は認められ無ことが示された。

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ところであるが、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、国際的にも積極的に

安全性評価に関する研究が進められており、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、国際的にも評価システムの検証作業が進行している。この作業グループの中でも代表的なナノマテリアルを用いた評価検証作業プロジェクト(SG3)において、各国が自主的に行うおこなうスポンサーシッププログラムが行われおり、日本はフラーレンおよび単層・多層カーボンナノチューブについてリード国として初期評価文書の作成を担当している。本研究は、OECD におけるナノマテリアルの評価作業に関する

動向調査と、日本政府のとしてのスポンサーシッププログラムへの対応をサポートする目的で、基礎的な毒性試験データを提供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作業グループの動向調査として、SG3における進捗状況とスポンサープログラムにおける各物質のDDP作成状況、試験を実行する上での重要事項として考えられているナノマテリアルの分散法についてSG4でまとめられたサンプル調整と用量測定に関するガイドランスをフォローした。また、今年度は、多層カーボンナノチューブを用いた皮膚刺激性試験を行うにあたり、皮膚塗布のための分散性の検討とTG404に従った皮膚刺激性試験を行った。さらにこれらの結果を検討して、皮膚感作性試験の試験計画を作成した。

C. 研究結果

1. OECDにおける産業用ナノマテリアル作業グループの動向調査

産業用ナノマテリアル作業部会(WPMN)代表的産業用ナノマテリアルの安全性試験に関するプロジェクト(SG3)の進捗状況

WPMNはOECD Chemicals Committeeの下部組織であり、作業計画の目的は産業用ナノマテリアルに関するヒト健康影響と環境保護という側面について国際協力を促進させることである。WPMN作業計画の一部として代表的産業用ナノマテリアルの安全性試験に関するプロジェクト(SG3)があり、オーストラリア・ベルギー・カナダ・デンマーク・フランス・フィンランド・ドイツ・日本・韓国・オランダ・スウェーデン・スイス・イギリス・アメリカ(共同議長国)・EU(共同議長国)・BIAC(経済産業諮問委員会)・タイ・ISO・複数の環境NGOで構成されている。現在、SG3は2009から2012年までの作業計画を作成している。

SG3作業計画:2009年～2012年の基本方針

SG3によるプロジェクト3の目的は、代表的産業用ナノマテリアルセットについて合意し、スポンサー用

のガイドンスマニュアルに従って試験を行うことであり、定義(第1)ステージと実行(第2)ステージの二つのステージに分かれている。プロジェクト定義ステージは既に完了しているが、実行ステージは現在進行中であり、フェーズ1試験とフェーズ2試験によって選定された物質が試験される。

第1ステージ(2007年～2008年)では、スポンサーシッププログラムにより、フェーズ1試験のナノマテリアル候補リストと予備的エンドポイントが作成された。また、このステージではスポンサー用のガイドンスマニュアルおよび使用するナノマテリアルの実用的定義がWPMNによって作成された。

第2ステージ(2009年～2012年)では、SG3参加者がスポンサーシッププログラムを実施して、Dossier(ドシエ、調査書類一式)を作成する。また、フェーズ2でどのような追加試験が必要かについて検討し、データを収集するナノマテリアルやエンドポイント、アプローチ法に関する勧告も行う。フェーズ2試験は2011年～2012年に開始する予定で、その後に結果概要報告書も作成予定である。

スポンサーシッププログラムの二つのステージにおける成果

第1ステージでは、以下の作業が完了している。短期的作業は2007年4月に完了。

- SG4との共同作業における「産業用ナノマテリアル」という用語の実用的定義

- 既存の商業的MNのリストをBIACに提供するよう要請

- エンドポイント候補リストをDuPontとEnvironmental Defenseに提供するよう要請

短中期的作業は2007年7月に完了。

- FDS-typeのデータが既にあるか現在あるいは近い未来に試験される予定のMNリスト

- 基礎データセットの提案を含む、MN候補の選定および組み合わせ評価基準(量など)の定義。

- 合意された代表的産業用ナノマテリアルの特定。SG4および利用可能な報告書からの情報を含む。

中期的作業は2007年末に完了。

- MNの固有特性の評価に必要なエンドポイントに関する合意

・代表的産業用ナノマテリアルに必要な「初期データセット」の決定

長期的作業は 2008 年末に完了。

・スポンサー用のガイドスマニュアル

・14 物質の MN 中、9 物質にスポンサーを決定

・DDP の初稿の回覧

・サンプル調整と用量測定に関するガイドンス(SG4 から提供)

第 2 ステージの作業

短期的作業で 2009 年 7 月まで終了した項目

・追加スポンサーの決定(依然進行中)

・スポンサー用ガイドスマニュアルに基づいてスポンサーが決定している全 MN の DDP 完成

・スポンサーが決定している MN の測定や試験の開始

短中期的作業として 2010 年中頃までに行う項目

・WPMN 定例会議のための各 MN の経過報告書

・DDP と関連スケジュールの更新

・フェーズ 2 試験に関する最初の討議

中期的作業として 2011 年中頃までに行う項目

・いくつかの MN のドラフト Dossier

・MN の ADME に影響を及ぼす物理化学的特性の最初の確認

・フェーズ 1 試験の概要報告書のための計画と骨組みの作成

・フェーズ 2 試験の初期提案の作成

長期的作業として 2011 年中頃から行う項目

・全 MN のドラフト Dossier

・フェーズ 1 試験の結果概要報告書の作成

・フェーズ 2 試験の実行

長期的作業として 2012 年から行う項目

・フェーズ 2 試験の結果概要報告書の作成

スポンサーシッププログラムの各物質の経過報告

フラーレン(C60)、単層カーボンナノチューブ(SWCNTs)、多層カーボンナノチューブ(MWCNTs)、二酸化チタン(TiO₂)、酸化セリウム(CeO₂)、酸化亜鉛(ZnO)、二酸化ケイ素(SiO₂)に関する経過報告は以下のとおりである。

フラーレン(C60)、単層カーボンナノチューブ

(SWCNTs)、多層カーボンナノチューブ(MWCNTs)の DDP 作成における共通の修正が第 5 回 WPMN での DDP 検討委員会の一般的/専門的コメントを反映することで文書構成に重要な修正が加えられた。以前の「I.序論」は「0.概要」に移動し、「I.序論」には、試験カテゴリごとの「V. Discussion of Status and Test Design for Each Endpoint」での論点要約された。また、「V. Discussion of Status for Each endpoint」と「IV. Test Design」は統合されて「V. Discussion of Status and Test Design for Each Endpoint」となった。この章は DDP の主要部分であり、利用可能な既存データや、既存データがエンドポイントにとって不十分な理由、既存データが read-across に使える理由、新たな試験が必要な場合にはその実施方法(例えば、適用する TG や試料調整法)を示す章となった。

また、3 物質に共通のエンドポイントの取り組み状況としては、いくつかのエンドポイントは現在継続中の国家プログラムに含まれているので、全面的あるいは実際的に取り組まれている。主要物質についてはいくつかのエンドポイントで試験が実施中か終了間際である。一方、Dossier 完成までのタイムスケジュールを示すのは困難であるが、いくつかのエンドポイントにおいては、2011 年前半に完了予定の日本の NEDO プロジェクト 2011 年までに完成予定である。

フラーレン(C60)

物質選定に変更はない。主要なフラーレンが選定され、今のところ代替物質は提案されていない。

試料調整法と試験方法が 2~3 のエンドポイントについて詳述されている(例えば、物理化学的特性や哺乳動物における反復投与毒性)。いくつかのエンドポイントには更なる試験計画の詳細が必要であり、スポンサーによりその試験計画が確定された後、DDP に追加されるよていである。

単層カーボンナノチューブ(SWCNTs)

現在までに主要物質や代替物質の追加はない。以前に記載されていた 1 つの代替物質は試験を行う可能性が疑わしいために外されたが、何らかの試験が行われている場合、その物質の試験結果は補助データとして含まれる。

試料調整法と試験方法が 2~3 のエンドポイントについて詳述されている(例えば、物理化学的特性や哺乳動物における反復投与毒性)。米国 EPA は 3 種の代替物質に関する詳細な物理化学的特性情報を提供し、それらは DDP の新たな付属文書として要約された。いくつかのエンドポイントには更なる試験計画の詳細が必要であり、スポンサーによりその試験計画が確定された後、DDP に追加される。

複層カーボンナノチューブ(MWCNTs)

2 つの代替物質(Baytubes®:ドイツ提案、NANOCYLTM NC7000:Nanocyl S.A.提案)が加えられ、物理化学的特性と試験計画が DDP に追加された。以前に記載されていた代替物質の 1 つは試験を行う可能性が低いために外されたが、何らかの試験が行われている場合、その物質の試験結果を補助データとして含める。

試料調整法と試験方法が 2~3 のエンドポイントについて詳述されている(例えば、物理化学的特性や哺乳動物における反復投与毒性)。US EPA は 3 種の代替物質に関する詳細な物理化学的特性情報を提供し、それらは DDP の新たな付属文書とされた。

いくつかのエンドポイントには詳細な試験計画が必要であり、スポンサーによりその試験計画が確定された後、DDP に追加される。

二酸化チタン(TiO₂)

DDP 文書に関しては、

- ・公式 DDP には P25 と代替物質(評価部分)に対するエンドポイントのみ含む。
- ・公式 DDP にはリードスポンサーの確認を受けた完全なデータのみ含む。
- ・他のデータ(チェックを受けていないデータ、代替物質、他の TiO₂)は内部文書にまとめられ、TiO₂ グループで利用可能とする。

新共同スポンサーとして EC が、新コントリビューターとして英国が参加した。

参照物質とエンドポイントに関しては、P25(Evonik 社)が参照物質に選定された。フェーズ 1・フェーズ 2 用に本物質(P25)が約 110 kg 要求され、研究所ごとの必要量についてはリードスポンサーが集約した。

代替物質と Horizontal 試験として以下の代替物質が

選定された。

- ・PC105(Cristal Global)、20nm、アナターゼ、球状、無皮膜
- ・Tiona AT-1(Cristal Global)、220 nm、アナターゼ、無皮膜、pigment reference
- ・Hombikat UV 100(Sachtleben)、10nm、アナターゼ、球状、無皮膜
- ・UV Titan M212(Sachtleben)、20nm、ルチル、親水性皮膜
- ・UV Titan M262 (Sachtleben)、20nm、ルチル、親水性皮膜

Horizontal 試験の一覧として物理化学的特性、環境中運命、環境毒性、哺乳類毒性のエンドポイントについて示された。研究所ごとに約 50 kg の各代替物質が要求された。代替物質の Horizontal 試験は異なる参加者によってなされるべきである。合意された Horizontal 試験一覧のエンドポイントの他、種々エンドポイントが追加された。環境毒性について、各エンドポイントにに対して全ての代替物質が対処出来たというわけではない。

タイムスケジュールにかんしては、現状はフェーズ 1 およびフェーズ 2 とともに予備試験の最中であり、ギャップをなくすための新たなプロジェクトが開始予定である。例えば、一ドイツ:環境中運命および環境毒性試験が 2011 年中頃~年末までつづき、長期試験(フェーズ 2 のみ)が 2012 年始め頃までつづく予定である。一欧州プロジェクトのナノ遺伝毒性試験がフランス主導で 2009 年末(または 2010 年始め)から 2013 年始めまで継続予定である。このプロジェクトは特性、動態、*in vivo* および *in vitro* 遺伝毒性に関与する。

- ・2010 年中頃にはフェーズ 1 試験が終了予定
 - ・2012 年末から 2013 年始めにフェーズ 2 試験終了
- スポンサー用ガイダンスマニュアルおよびエンドポイント一覧に関する見解として、地表水や土壌におけるシミュレーション試験のような生分解性に重点を置いてた OECD 試験ガイドライン(TG)は環境中の TiO₂ の挙動に重点を置く調査には適さないと考えられる。(TiO₂ は不活性物質なので)。そのため、環境区分中の NP の流動性および輸送挙動を試験するほうが適しており、オーストリアとカナダは TiO₂-NP の流動

性および輸送挙動の試験を水圏と土壌において行った。

両リードスポンサーは TiO₂-DDP のために収集したデータについて、以下の事柄をもとに品質管理を行う。

- ・データ完成度
- ・方法の十分な記載
- ・試料調整法の十分な記載
- ・試験物質の十分な特性測定
- ・結果の考察の妥当性

データを DDP に入力する前には、両リードスポンサーの合意が必要である。合意されないデータは、合意されない理由と共に補足情報として Annex に入れる。Annex に入るか DDP に入るかはケースバイケースであるが、意見に不一致があったこととその理由についてのコメントが必要である。(この過程の目的は適用方法の正当性についての確認ではなく、データ品質の確認である。)

酸化セリウム(CeO₂)

酸化セリウムの DDP は第 5 回 WPMN 以降、大きく修正された。パリでの最終会議後、デンマークがコントリビューターとしてプロジェクトに加わった。

試験物質として全パートナーが必要な試験物質の量が示された。試験物質は製品供給者によって英国国立物理研究所(NPL)に発送された。現在、NPL は各試験物質を 250 g 単位で提供している。

ナノ酸化セリウムに関する文献レビューは英国、米国、およびオランダによって終了している。Journal Nanotoxicology への総説の投稿が計画されている。

関連のあるエンドポイントの全てが取り込まれるか完了しており、プロジェクトのパートナーごとに様々な段階にある。同じ試験エンドポイントに取り組むパートナー間で、試料調整や分散手順の問題に対処したりデータを共有したりするために議論すべきであると決定された。

オーストラリアは 2010 年 12 月末までにエンドポイント完了。ドイツは既にエンドポイント完了。英国は 2011 年 12 月末までにエンドポイント完了。スイスは 2009 年 12 月末までにエンドポイント完了。

酸化亜鉛(ZnO)

酸化亜鉛の DDP は第 5 回 WPMN 以降、大きく修正された。パリでの最終会議後、デンマークがコントリビューターとしてプロジェクトに加わった。

全パートナーが必要な試験物質の量が示され、試験物質が製品供給者によって英国国立物理研究所(NPL)に発送された。現在、NPL は各試験物質を 250 g 単位で提供している。

ナノ酸化亜鉛に関する文献レビューは英国によって終了している。そのレビューは他のプロジェクト・パートナーに回覧されている。年末までにレビューが準備される予定である。

関連のあるエンドポイントの全てが取り込まれるか完了しており、プロジェクトのパートナーごとに様々な段階にある。

オーストラリアは 2010 年 12 月末までにエンドポイント完了。ドイツは既にエンドポイント完了(NanoCare プロジェクト)。英国は 2011 年 12 月末までにエンドポイント完了。

二酸化ケイ素(SiO₂)

DDP の作成における主な問題の一つは Dossier における主要物質の選択である。主要物質の選択を理解しサポートするために、ベルギーのサポートを受けてリードスポンサーは選択のためのバックグラウンドとして SiO₂ の固有の性質に関する情報のための文献検索を行った。スポンサーシッププログラムのための物質の供給に取り組むために OECD は Association of Synthetic Amorphous Silica Producers (ASASP: 合成非晶質シリカ生産者組合) に支援を要請した。結果として、物質提供の交渉により、ASASP*メンバーは試料物質をスポンサーシッププログラムで使えるようにして、2009 年 11 月中旬から要求に応じて供給することとなった。(*ASAP は欧州化学工業連盟(CEFIC)の一部門であり、BIAC グループのメンバーとして SiO₂ の共同スポンサーとして活動している。)

試料が入手できない間は試験は行われないが、リードスポンサーは以下によって得られた情報を含む試験プログラムの計画を進めた。

1. フランスと JRC の内部資料、およびベルギーによる文献研究
2. CEFIC の長期自主研究(LRI)プロジェクト

3. 2010年1月に開始され、11カ国のEU加盟国およびDG SANCOからの関係機関によって共同出資されたナノ遺伝毒性プロジェクトとの協力

これら3項目に基づいて、OECDのスポンサー用ガイドスマニュアルにあるエンドポイント59個のうちの多くが試験で取り組まれるが、多くのエンドポイントは合成非晶質シリカの試験とは関連がないと思われる。

サンプル調整と用量測定に関するガイダンス

スポンサーシッププログラムにおいて、各エンドポイントの試験を行うにあたり、ナノマテリアル分散性が試験結果に与える影響が大きいと想定されているので、サンプル調整や容量測定に関する考慮は重要事項である。そのためのガイダンスがSG4によって作成されており、その中でもヒト健康影響のエンドポイントに関して注目すべき事項が以下の様にまとめられている。環境化学的知識の応用およびストック分散液の生成

粒子の凝集やその結果の生物学的利用に実質的影響を持つ非生物要因のあることが知られており、これらは基本的特性であるので、哺乳動物試験における生理食塩水や他の媒体の準備のために考慮する必要がある。特性評価や、ストック分散液の作成方法に関する正確な情報(体積、超音波処理時間など)を提示すべきである。

試験中の分散液や生理食塩水の測定値

以下の項目は pH や温度などと同様、定期チェックに追加する項目である。

i) 曝露濃度の確認

金属ナノマテリアルを含む水や生理食塩水中の金属濃度が測定されているが、この方法は環境において比較的低い水中濃度を測定するには十分な感度がなく、また、溶存有機炭素の背景レベルが実際の炭素ベースのナノマテリアル濃度より高いかもしれないので、炭素ベースの物質においては問題が多い。また、タンパク質(BSA 等)を含む生理食塩水では、いかなる炭素測定値も無意味となる。

ii) 水/試験培地交換

必要なら曝露濃度を維持するために培地交換(セミスタティック試験法)を行う。培地交換の頻

度は経験的になるが、標的用量は、例えば設定濃度の80%で維持されねばならない。この方法によって廃棄物処理問題が起きる可能性があるが、セミスタティックであることが廃棄物処理の問題と職業曝露リスクを減少させる。特に *in vitro* では細胞の分離と懸濁で増殖した細胞の除去に注意を払う必要がある。

iii) 粒子径の分布および凝集の割合は用量によって変化する。

これは本質的な問題であり(Handy et al., 2008)、試験系の濃度によって凝集と分散が変化する可能性がある。したがって、生物に利用可能な総表面積は試験系の用量ごとに異なる。その総表面積は用量によって数学的に予測することは不可能であるが、用量ごとに起こる凝集と分散によって影響を受ける。用量ごとに動物のリガンド分泌量は異なるので(例えば、粘液産生)、全試験管や生理食塩水においてこの過程を測定するのは困難であり、制御も不可能かもしれない。しかし、一般的な分散を示す簡単な光学的方法(濁度、色など)が、使用された分散の目安になるかもしれない。これは生理食塩水媒体が再循環/再使用され、粘液分泌が必然的に増加するような *in vitro* 哺乳動物試験において特に重要であろう。また、気相曝露や直接放出法を使用する吸入試験においても非常に重要である。

iv) 分散剤と溶媒のコントロール

他の試験と同様、試験にはコントロールを含む必要がある。しかしながら、全処理での分散剤用量の標準化は避けるべきである。過剰な分散剤によって粒子が変形することがあり(Smith et al., 2007)、量が適切かどうか、分散剤コントロールが用量ごとに必要かどうかについて動物愛護の観点からも考慮が必要である。ナノマテリアルを上手く分散できない場合には、投与の直前に超音波処理かミキシングを行うとよいが、ある程度の不確実さは避けられない。

哺乳類試験で使用される生理食塩水に関する特別な配慮

ストック分散液であることに加えて、生理食塩水のイオン強度が高いことが試験物質の即時的凝集のような用量測定に特異的な問題を示す。この塩溶液を使用する理由は気道や腸内のイオン環境に合わせるためであり、生理食塩水の使用は不可欠である。超純水でストック分散液を生成してから、動物への投与用の生理食塩水に分散するのが良いかもしれない。この方法の場合は生理食塩水についても特性評価を行う必要がある。分散剤(Tween や DMSO 等)を生理食塩水に添加することで試験物質の分散性が改善される可能性もある。しかし、分散剤無しでは取り扱いが不可能な理由を十分に示し、分散剤コントロールにも反映し、分散剤がどのように働くか(例えばナノマテリアルの表面をコーティングする)に関する何らかの認識を伴わなければならない。Tween や Triton などの界面活性剤については、汚染物質の影響が最小になるよう最高グレードのものを使用すべきである。さらに、分散剤の高毒性(Zhu et al. 2006、Monteiro-Riviere and Tran, 2007)を避けるために分散剤自体の毒性について留意する必要がある。

哺乳動物細胞や組織を用いる試験で使用される生理食塩水は高濃度の酸素や二酸化炭素(例えば、酸素 95%、二酸化炭素 5%)を含み、温度は体温程度(37°C)であり、このような条件は凝集化学研究や環境コロイド化学では使用されていないことに注意が必要である。現在、これらの条件による化学的性質の変化はないと仮定されている。この仮定はこれらの条件におけるナノマテリアル化学の研究結果が利用可能な場合には修正が必要になる。当面は粒子特性評価が行われたのはガス供給生理食塩水中であるか空気平衡生理食塩水中であるかについてとその温度を報告すべきである。また、投与直前には予熱水槽で生理食塩水をより高い温度に保っている必要がある。

生理食塩水や培地にも試験ごとに特異的な添加物が含まれている。例えば、ADME 試験では免疫活性剤としてリポ多糖類(LPS)の使用や代謝阻害剤の添加が行われる。これらの添加物を加える前後に特性

評価がされたかどうかを示す必要があり、このことが粒子の分散に大きな影響を持たないことを示す何らかのチェックを行うことが望まれる。そのような影響を避けるよう試験プロトコルを調節することも可能である。

哺乳動物試験における生理食塩水中のナノマテリアルの移動経路と分散状態

哺乳動物試験には吸入、経口、経皮曝露があり、曝露経路ごとに試験物質の物理的挙動の検討が必要である。以下の方法が通常採用される。

- i) 生理食塩水の吸引や滴下、空気中や気相でのナノマテリアルへの曝露(吸入試験では生理食塩水にナノ粒子を分散させる必要はないが、出来るだけ凝集を防ぐ低毒性の媒体を用いる)。
- ii. 生理食塩水の強制経口投与(急性経口投与毒性試験、反復経口投与毒性試験)
- iii. 生理食塩水、乳剤、クリームの外用(皮膚試験)
- iv. 生理食塩水の注入(例えば ADME 試験)

気道曝露

粒子毒性に関する従来研究の多くは、気管内への滴下や吸引による肺への試験物質の搬送に食塩水を使用しており、吸入曝露はほとんど採用されなかった(つまり、大気中に分散された粒子の呼吸による吸入)。それにもかかわらず、OECD の試験ガイドラインでは呼気吸入が通常の曝露経路である。吸入は気道にナノ粒子が付着する生理的プロセスであり、投与量のゆるやかな集積と通常のクリアランスプロセスが考慮される。この方法によってのみ浮遊煤塵の大気中濃度の NOEL が決定される。しかし、投与されたナノ粒子の用量の決定は難しく、その推定には、呼吸やエアロゾル特性や組織分析のモニタリングが必要である(SCENIHR, 2007)。吸入試験を行う場合は、空気の特徴を測定して報告(質量濃度、個数濃度、表面積、一次粒子径、移動度、空気力学的粒子径、粒子径分布など)し、その結果がハザードやリスクの評価や特性化に役立つよう表現すべきである。

気相を使用する場合は、ダストの組成(一次粒子径、粒子径分布)を質量濃度や個数濃度と同様に報告すべきである。気体曝露は換気率と換気量の関数である。試験動物の呼吸調節の詳細も必要であり、試