

験動物愛護の関係からも個々の動物について報告すべきである。気相におけるナノマテリアルと麻酔剤との化学反応等は現状では不明なので、麻酔が効いたことを確認する必要がある。加えて、口や鼻経由での曝露が量的に十分に達したかについて何らかの考慮をすべきで、その正確な詳細報告が必要である。いくつかの機構研究ではプレチスモグラフィー (Semmler-Behnke et al., 2007) が利用できる。それにもかかわらず、麻酔による昏睡状態での呼吸は通常とは異なることが知られており、麻酔や麻酔解毒剤の副作用が全身影響の評価に影響を及ぼす可能性がある。さらに、気管挿管の反復は物理的ダメージを引き起こすかも知れない。

動的ノーズオンリー吸入装置(ノーズオンリーという用語には頭だけ・鼻だけ・口先だけを含む)を使用すべきである。各ノーズオンリー吸入装置についてはGD39に記載がある。

粒子径測定は全てのエアロゾルや蒸気に対して行うべきである。ナノ粒子の粒子径は非常に小さいので、エアロゾルの空気力学的粒子径は、空気動力学的中央粒子径(MMAD)に関する大気曝露における現在の推奨値である1~3 $\mu\text{m}$ より小さい可能性があり、幾何学標準偏差は現在の推奨範囲1.5~3.0より高いかもしれない。他の観点としては、ナノ粒子のMMADや空気力学的粒子径は、吸入曝露の場合には測定困難ということが考えられる。

前章で推奨されたように、研究に前もって試験項目の包括的な特性を示すべきである。理想的にはナノマテリアルは無変化で試験されるべきである。適正濃度と粒子径を得るために媒体を使用する場合は、水を優先的に選択すべきである。試験粒子の大気中濃度の不変性と均質性が確保されるべきである。

曝露室やシステムにおける空気の流れは、連続モニターし、曝露ごとに最低1時間ごとに記録して、注意深く制御されるべきである。試験中の大気濃度(あるいは経時的な安定性)は全動的パラメータの積分量であり、全ての関連する動的吸入パラメータを間接的にコントロールする手段である。したがって、リアルタイムで濃度をモニターする場合には気流測定は曝露条件ごとに1回でもよくなる。試験環境中、酸素濃

度は19%以上、二酸化炭素濃度は1%未満とする。この条件を満たしていない場合には、酸素と二酸化炭素の濃度の測定が必要である。曝露初日においてこれらの気体の測定値が適切なレベルにあるなら、再測定の必要はない。

室温は $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ 、試験動物の呼吸域の相対湿度は30-70%が望ましいが、ナノマテリアルが干渉して達成できないか測定不可能かもしれない。

名目濃度は、曝露系を通る空気の全容量に対する試験空気発生間に使用されたナノマテリアルの量である。ナノ粒子試験ではこの名目濃度は動物曝露の特性としては使用されない。したがって、特に分離粒子や空気希釈システムが使用される場合には、名目濃度を計算する必要はない。

有効濃度は、吸入曝露系における試験動物の呼吸域において測定されたナノマテリアルの濃度である。非揮発性で単一成分のナノ粒子では、非特異性重力フィルタ分析によって実際の濃度を求めることができる。多成分のエアロゾルでは重力フィルタ分析によっても測定できる。しかしながら、このことには空中の物質の構成が最初と変わらないことを示す分析データが必要である。曝露濃度の範囲はヒトの予想曝露濃度と関連すべきである。

曝露空気は可能な限り一定に保つべきである。エアロゾル光度計などのモニター装置を、長時間の曝露濃度の安定性を示す際に使用すべきである。有効濃度は定期的な測定が必要である。各濃度測定値の変動は平均室内濃度の20%以内とする。

水以外の媒体を使用する場合には、媒体の大気濃度を適した方法(ガスクロマトグラフィー等)で測定すべきである。

エアロゾルの粒径分布は適した測定法で各濃度の試験の間に少なくとも一度は測定されねばならない。粒径分析で得られた全質量濃度は濃度制御分析で得られた質量濃度の合理的限界内にあるべきである。可視粒径範囲における測定値の分解能を上げるために光学粒子寸法測定器(OPC)の使用が可能である。

吸入大気中にあるフリーナノ粒子をさらに特性化するために微分移動度分析システム(DMAS)を使用すべきである。

他の曝露技術として、液体を気道に直接放出する方法があり、気道内注入や喉頭部吸引のため、あるいは、他の部位、例えば腹腔腔や皮膚や腸への放出のためにナノ粒子を分散する必要がある。培養液中の細胞や組織に使用される生理食塩水の準備に関して、多くのアプローチが公開されている。NIOSHの有力な試験など、いくつかの試験ではCa<sup>2+</sup>とMg<sup>2+</sup>の遊離リン酸緩衝食塩水(PBS)以外の分散剤は使用していない(Shvedova et al., 2005、2008、Warheit et al., 2007)。哺乳類にはアルブミンという、あらゆる部位にあるタンパク質があり、進化の過程でよく保存されている。それゆえ、ウシ血清アルブミン(BSA)における散布がナノチューブの腹腔内投与に使用された(Poland et al., 2008)。正常ラットからの気管支肺胞洗浄液(BALF)にナノ粒子を懸濁させた後、同じラットに注入した試験がある(Sager et al., 2008)。BALFにはリン脂質(DPPC等)やアルブミンや他のタンパク質が含まれており、これは興味深いアプローチである。また、多くの界面活性剤、例えば、Pluronic-F68(Mangum et al., 2006)やTween(Warheit et al., 2004)がナノ粒子を分散させるためにラット肺への注入前に使用された。微細な噴霧の吸引は、噴霧器の閉塞や噴霧の質・量の正確さの達成という点において実用的問題を示す可能性がある。代替手段として、気管支や肺に徐々に投与する生理食塩水滴下(本質的には強制経口投与のような「注入」と同様)が使用される。各直接放出法での肺胞への浸透レベルについては議論があるが、後者の直接放出法における問題はあまり実地的ではなく、比較有害性評価にとってはより実用的かもしれない。

それにもかかわらず、この曝露方法は、通常は非常に高い用量という点において生理学的ではなく、粒子が生理食塩水に懸濁しているため、肺の防御組織に影響を及ぼす可能性のある液体を含む粒子を肺表面は受けることになる。滴下の利点は、ナノ粒子投与量のより正確な管理が可能なことである。咽頭での吸引は滴下の変形であり、高用量で粒子が懸濁して

いるが、この場合、肺に分散する懸濁滴による曝露は単純な滴下より速やかである。しかしながら、非常に高用量での細気管支曝露や細菌のすすぎ洗いによる肺胞の炎症といった影響が咽頭吸入を損なう可能性がある。滴下と咽頭吸入の結果は粒子タイプ間における毒性的比較において類似性がよく、スクリーニング試験や機構研究にとっては咽頭域から無菌の肺胞域まで使用可能である。しかしながら、どちらの方法もNOEL決定には使えない(SCENIHR, 2007)。

#### 経口曝露

急性毒性試験では、通常10または20 ml/kg bwで強制経口投与が行われる。この量は胃拡張や嘔吐反射を起こさずに動物の胃に用量を入れるために設計されている。この量とアプローチがナノ粒子に使用できない理由は無い。上述の生理食塩水や他の媒体において概説された全ての問題が適用される。混餌投与による慢性試験はナノ粒子を飼料に入れて投与することによって実行される。消化管経路やナノ粒子を含む飼料の摂取経路での試験は、ほとんど公表されていないが、ナノ粒子を飼料に入れる場合には凝集についての検討は二次的となることを意味する。しかしながら、飼料の製造技術においては試験成分がよく混ざるよう配合飼料に噴霧したり、飼料のトップコートとして使用された。いずれにせよ、ストック分散が必要で、その目的は飼料ペレットにおける用量の均一な広がりを実証にすることである。可能なら飼料の通常の栄養分析と共に飼料中の用量を測定すべきである。飼料の保存や劣化は特に酸化ナノ粒子の場合問題である。また、ナノ粒子が飼料の生物学的利用能や消化性を減少させることによって二次的な毒性影響を起こす可能性もある。さらに、消化管内の化学的性質についても考慮の必要がある。胃におけるpHの低さがタンパク質のプレ皮膜に影響を与える可能性があり、また、ナノ粒子に関する胃環境の一般的影響として前処理に関係なくナノ粒子を分散したり凝集させたりすることがある。消化管は高イオン強度環境でもあり、粘液や他の可溶性タンパク質や特殊な微生物環境を含んでいる。その化学的性質は非常に複雑であり、理論のみでは簡単に予測できず、

様々な飼料マトリクスにおけるナノ粒子の生物学的利用能に関して観測的試験が必要である。

### 経皮曝露

ナノ粒子の経皮曝露は職業環境や製品(洗浄剤や化粧品など)の使用によって起きる可能性がある。製品においてナノ粒子は通常、グリセロールのような添加剤において分散され、粒子が皮膚に塗布される(Mortensen et al., 2008)。ナノ粒子が高分子量の巨大分子に類似しているとした場合、経皮吸収は生じ難いとの主張がある。この予想は Nanoderm (<http://www.uni-leipzig.de/~nanoderm/>) プロジェクトにおいて、主に TiO<sub>2</sub> の化粧品内ナノ粒子試験において確認された(Gamer et al., 2006)。それにもかかわらず、他のナノマテリアルが皮膚に浸透する可能性は除外できない。実際、化粧品に関する科学委員会(SCCP, 2007)の意見では、例えば、ナノマテリアルの成分が角質層に浸透して、その中で細胞間脂質ラメラを変化させることにより浸透が促進するよう作用する可能性があるとしている。また、ナノマテリアルが皮膚で活性物質を放出し続ける持続性物質として機能する可能性もある。さらに、毛包口は粒子の大きさに合っている。したがって、付属的開口部に留まった粒子が成分の拡散を増加させる可能性があり、サイズに依存した現象の予想は非合理的ではない。さらに、ナノ粒子は皮膚小溝で持続性を増し、標準的な洗浄手順では効果的に取り除けないかもしれない。球体や楕円の量子ドットが角質層に浸透して表皮や皮膚の層に局在していることが示されている。皮膚が高用量のナノ粒子に曝露されれば、そのごく少量の蓄積が二次的な標的器官においては重大になる可能性もある。

皮膚吸収試験法については OECD TG 427 と 428 およびガイダンス文書 28 に示されている。凝集の状態は容易には研究されていない。皮膚試験での一つの仮定は、試験物質は動物の毛皮や毛髪の下の皮膚にかなりよく到達するということである。このことを保証するのは試験者次第である。例えば、試験材料が毛皮の上で凝集して、かなりの量が皮膚に届かないと思われる場合、皮膚を少し削ることでこの問題が解決するか、あるいは、不要な皮膚感作を招くか、とい

う懸念が生じる。いくつかの粒子において既知の上皮組織の炎症を考えると、皮膚感作の問題は重要である。一方、有毛の皮膚を前もって剃ったり、脱毛したりした場合、バリア機能の損傷がさらにナノ粒子の吸収を確実にするという問題を悪化させるような追加リスクがある(SCCP, 2007)。遺伝子組み換えによる無毛動物モデルの使用はこれらの実際的问题を克服するかもしれないが、重要な倫理的問題も生まれる。分散剤や溶剤を試験溶液やクリーム(乳剤)に使用した場合、これらの刺激性作用や皮膚本来の透湿性を変える効力について説明するため、溶剤コントロールを含むべきである。皮膚の厚さや感度は場所によって異なるので、皮膚の正確な位置(例えば、耳、腹部か胸部の正確な部位)を明記すべきである。そして、全ての試験動物で同じ位置を使用しなければならない。

### 直接注入曝露

血液や組織や体腔への注入は一般的には ADME 試験で使用される。通常、注入は生理食塩水に分散して使用され、非常に疎水性な物質の場合にはコーン油のような親油性媒体を用いて使用される。上述の生理食塩水に関する問題に加え、シリンジ内のナノ粒子の挙動も懸案事項である。シリンジ内の微泡が滴水表面として影響するので、投剤技術で気泡の発生を避けることや、シリンジの内表面で微泡が生じる場所にシリンジを長く置かないことも重要である。針の口径はシリンジの閉塞が無く滑らかな注入が可能にすべきである。濃度や粘性に依存してナノマテリアルによってはより大きな口径が必要であり、その場合には動物愛護を最優先にして局所麻酔をすべきである。物質が反応しているので、ナノ粒子の注入が非常に苦痛である可能性を除外してはならない。予防的な局所麻酔も口径によらず勧められる。

### 細胞培養と培地でのナノ粒子の分散

OECD 作業部会の代替法の開発に関する SG7 が準備した文書において、*in vitro* 技術がより詳細に議論された。しかしながら、*in vitro* 試験(変異原性試験、細胞/組織培養スクリーニング試験、免疫毒性試験など)で使用される試験系は多数有り、これらの試験系の大部分は生理食塩水か複雑な培地を使用する。

試験物質が通常の培地(例えば、Vevers and Jha, 2008)で凝集し、試験物質と細胞との直接接触が増すことは不可避である。細胞培養液で分散剤として可溶性ペプチドや他の有機リガンドの使用が可能かもしれない。これはナノマテリアルの分散という点では良い考えかもしれないが、生理学的には問題がある。生物系がこれらの添加剤を抗原として捉えたり、添加剤が攪拌されていない層において細胞表面との相互作用を決定し、または培養皿への細胞の付着を決定する細胞膜の化学的性質を変える可能もある。培地にはタンパク質を含むことが多く、特別な分散剤を加える必要はないかもしれない。例えば、一般にウシ胎児血清(FCS)が細胞培養系に添加されるが、これにはアルブミン(ウシ血清アルブミン:BSA)が含まれる。アルブミンは哺乳動物に偏在するタンパク質なので、血清を含む細胞培養中には高濃度で元から存在している。BSA はかなり刺激の少ないタンパク質として使用されている。その両性イオンの性質のため良い分散剤であり、細胞培養内のタンパク質のバランスをわずかしき変化させない(Bihari et al, 2008, Poland et al., 2008)。BSAのようなタンパク質の分散はナノ粒子表面への培地からの栄養の吸着によって生じる擬陽性の防止に役立つかもしれない(Casey et al., 2008)。BSA が分散するとナノ粒子の表面はブロックされるので、溶液からの栄養となるタンパク質の吸収はほとんどなくなる。

血清や BSA を使うことの問題は、これらの物質は必然的に多くの不明な成分(ペプチド、脂肪酸、糖など)を含み、それらは使った BSA のバッチによって異なる。高純度 BSA や、溶媒の全成分が知られている非動物性原料から製造され、化学的性質が定義されている溶媒の購入が可能である。肺上皮細胞を用いる試験での分散法として、肺被覆液中の界面活性脂肪(通常 BSA や血清の添加物として使用される 1,2-ジパルミトイルフォスファチジルコリン DPPC)が使用される(Herzog et al., 2008, Wallace et al., 2007)。この方法は肺モデルの試験で好まれる。使用した分散剤や方法にかかわらず分散の必要性和 *in vitro* 系での生存率測定値への影響や系の質との間でバランスを得なければならない。一方、実際の体液には無数の

タンパク質やペプチド等が含まれ、培地への血清の添加は *in vivo* で起きることをより反映させているに過ぎないので、血清や DPPC のような組織特有の天然界面活性剤の影響を粒子挙動の一部として受け入れるという主張もある。

#### 参考文献

- Bihari P, Vippola M, Schultes S, Praetner M, Khandoga AG, Reichel CA *et al.*: Optimized dispersion of nanoparticles for biological *in vitro* and *in vivo* studies. *Part Fibre Toxicol* 2008, 5: 14.
- Crane, M., Handy, R. D., Garrod J., and Owen R. (2008) Ecotoxicity test methods and environmental hazard assessment for engineered nanoparticles. *Ecotoxicology* (2008) 17, 421–437.
- Crane, M., Handy, R. D. (2007) An assessment of regulatory testing strategies and methods for characterizing the ecotoxicological hazards of nanomaterials, Report for Defra, London, UK. Available at: <http://randd.defra.gov.uk/Document.aspx?DocumentID=2270/>
- Casey A, Herzog E, Lyng FM, Byrne HJ, Chambers G, Davoren M: Single walled carbon nanotubes induce indirect cytotoxicity by medium depletion in A549 lung cells. *Toxicol Lett* 2008, 179: 78-84.
- Handy, R. D., Kammer, F. v. d., Lead, J. R., Hassellöv, M., Owen, R. and Crane, M. (2008) The ecotoxicology and chemistry of manufactured nanoparticles. *Ecotoxicology*, 17, 287-314.
- Herzog E, Byrne HJ, Casey A, Davoren M, Lenz AG, Maier KL *et al.*: SWCNT suppress inflammatory mediator responses in human lung epithelium *in vitro*. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008.
- Mangum JB, Turpin EA, Antao-Menezes A, Cesta MF, Bermudez E, Bonner JC: Single-walled carbon nanotube (SWCNT)-induced interstitial fibrosis in the lungs of rats is associated with increased levels of PDGF mRNA and the formation of unique intercellular carbon structures that bridge alveolar macrophages *in situ*. *Part Fibre Toxicol* 2006, 3: 15.
- Monteiro-Riviere, N. and Tran, L. *Nanotoxicology: Characterization, Dosing and Health Effects*. 2007; CRC Press, 434pp.
- Mortensen LJ, Oberdorster G, Pentland AP, Delouise LA: *In vivo* skin penetration of quantum dot nanoparticles in the murine model: the effect of UVR. *Nano Lett* 2008, 8: 2779-2787.
- Poland CA, Duffin R, Kinloch I, Maynard A, Wallace WA, Seaton A *et al.*: Carbon

- nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. *Nat Nanotechnol* 2008, 3: 423-428.
- Sager TM, Kommineni C, Castranova V: Pulmonary response to intratracheal instillation of ultrafine versus fine titanium dioxide: role of particle surface area. *Part Fibre Toxicol* 2008, 5: 17.
- Scientific Committee on Consumer Products (SCCP) (2007). Opinion on safety of nanomaterials in cosmetic products, SCCP/1147/07, adopted 18 December 2007.
- Scientific Committee on Emerging and Newly-Identified Health Risks (SCENIHR). Opinion on the Appropriateness of the Risk Assessment Methodology in Accordance with the Technical Guidance Documents for new and Existing Substances for Assessing the Risks of Nanomaterials. Adopted on 21-22 June 2007
- Semmler-Behnke M, Takenaka S, Fertsch S, Wenk A, Seitz J, Mayer P, Oberdörster G, Kreyling WG. (2007) Efficient elimination of inhaled nanoparticles from the alveolar region: evidence for interstitial uptake and subsequent reentrainment onto airways epithelium. *Environ Health Perspect.* 115(5): 728-33.
- Shvedova AA, Kisin ER, Murray AR, Kommineni C, Castranova V, Fadeel B *et al.*: Increased accumulation of neutrophils and decreased fibrosis in the lung of NADPH oxidase-deficient C57BL/6 mice exposed to carbon nanotubes. *Toxicology And Applied Pharmacology* 2008, 231: 235-240.
- Shvedova AA, Kisin ER, Mercer R, Murray AR, Johnson VJ, Potapovich AI *et al.*: Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single-walled carbon nanotubes in mice 1. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005, 289: L698-L708.
- Smith, C. J., Shaw, B. J. and Handy, R. D. (2007) Toxicity of single walled carbon nanotubes on rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): Respiratory toxicity, organ pathologies, and other physiological effects. *Aquatic Toxicology*, 82, 94-109.
- Vevers, W. F. and Jha A. N. (2008). Genotoxic and cytotoxic potential of titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles on fish cells *in vitro*. *Ecotoxicology* 17, 410-420.
- Wallace WE, Keane MJ, Gautman M, Shi X-C, Murray D, Ong TM. Dispersion of nanoparticles in pulmonary surfactants for *in vitro* toxicity studies: lessons from ultrafine diesel exhaust particles and fine mineral dusts. in 'Nanotoxicology: characterization, dosing and health effects'. Eds Monteiro-Riviere, N.A. and Tran, C.L. Informa Healthcare, New York. 153-172. 2007.
- Warheit DB, Laurence BR, Reed KL, Roach DH, Reynolds GA, Webb TR: Comparative Pulmonary Toxicity Assessment of Single-wall Carbon Nanotubes in Rats. *Toxicol Sci* 2004, 77: 117-125.
- Warheit DB, Webb TR, Reed KL, Frerichs S, Sayes CM: Pulmonary toxicity study in rats with three forms of ultrafine-TiO<sub>2</sub> particles: Differential responses related to surface properties. *Toxicology* 2007, 230: 90-104.
- Zhu, S. et al. *Toxicity of an engineered nanoparticle (fullerene, C60) in two aquatic species, Daphnia and fathead minnow.* Marine Environmental Research. 2006; 62(1): S5-S

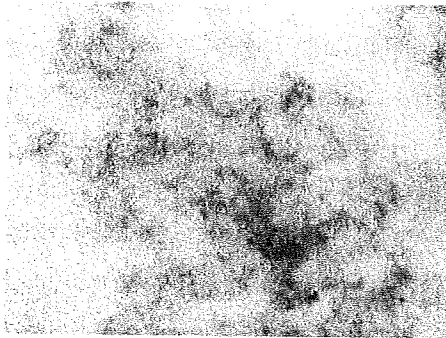
## 2. OECD スポンサーシッププログラム対応試験

今年度は、まず日本政府がリード国として登録している、カーボンナノチューブについて、皮膚刺激性試験および皮膚感作性試験を行うための分散条件について検討した。使用したサンプルは、①単層カーボンナノチューブ (Nikkiso)、②30 ナノクラス CNT (Nikkiso)、③MWCNT パウダーサンプル (MWCNT-7: Mitsui) について、検討した。分散溶媒としては、シリコーンオイル、ペンタラン、アセトン溶媒として用い、被験物質①②③を3種の溶媒にそれぞれ0.1%の濃度で調製し、10分間水浴タイプの超音波発生装置で分散させて検討した。その結果、被験物質①はシリコーンオイル、ペンタラン、アセトンのいずれにおいても全く分散しなかった。被験物質②及び③はアセトンでは全く分散しなかった。シリコーンオイルとペンタランは溶液全体に広がりはするものの、塊があり、肉眼的に見ても分散しているとはいえなかった。ペンタランとシリコーンオイルで比較すると、シリコーンオイルの方が分散の程度はよいように思われた。濃度を下げて0.05% (シリコーンオイル) で再度実施してみたが、結果は0.1%と同じであった。

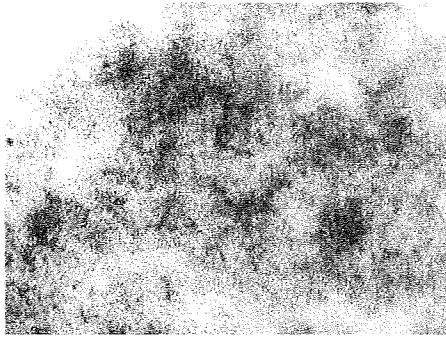
次に、①の分散性を検討するために、メチルセルロース (粘度 400) 0.05% および 0.1% (Tween80 を 1% 添加) および、カルボキシメチルセルロースナトリウム 0.05% および 0.1% (Tween80 を

1%添加)で分散を試みたが、秤量した形状のまま  
で、分散しなかった。また、②及び③について、  
シリコーンオイル中の濃度を 0.01%まで薄めて  
分散性を検討したが、溶液全体に広がりをするも  
の、肉眼的に見ても依然塊が残存しており分散  
しているとはいえなかった。

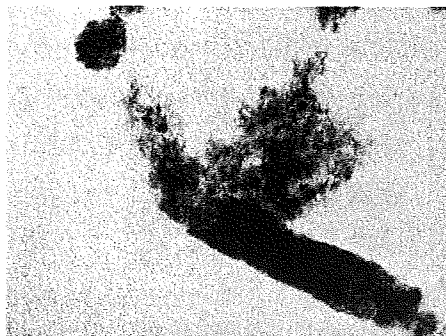
そこで、ポリトロンホモジナイザー  
(POLYTRON PT 10/35, KINEMATICA 製)を  
用い、レベル1で 20 秒間処理してその後、水浴  
式の超音波発生装置で 30 分間処理をして分散性  
の検討を試みた。その結果、超音波処理だけのも  
のよりは、分散性の向上が認められた。



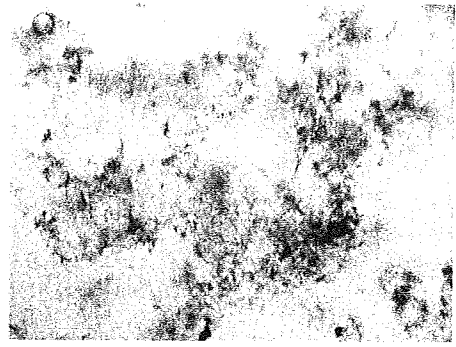
0.05% 30 ナノクラス CNT (超音波のみ)



0.05% 30 ナノクラス CNT (ポリトロン 20 秒+超音波)



0.05%MWCNT パウダーサンプル (超音波のみ)

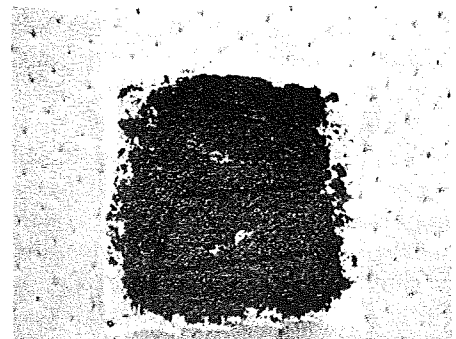


0.05%MWCNT パウダーサンプル (ポリトロン 20 秒+超音波)

一方、肉眼的な分散性の観点からは、分散液の  
濃度は 0.05%あたりが限界であると思われたが、  
ガイドライン上で規定されている適用量からは  
遙かに少ない量しか適用できないので、固体状態  
のままリント布に載せる手法を検討した。まず、  
大きさ(2.5 x 2.5 cm)のリント布を 0.3 mL の  
CMC で湿らせ、その上に被験物質①②③をそれ  
ぞれ 0.005g をのせ、進展させた。被験物質①は  
0.005g でほぼ均一に広がったが、もう少しであれ  
ば被験物質量を増やすことも可能であった。被験  
物質②および③は 2 倍量 (0.01g) くらいであれ  
ば伸展可能と思われた。



②30 ナノクラスCNT



③MWCNT パウダーサンプル

これらの検討結果を考慮して、皮膚刺激性試験は、シリコーンオイルを使用して0.05%の濃度で懸濁して、超音波処理30分処理のみを行ったものと、さらにポリトロンで20秒間処理（レベル6）を追加した2種類の0.5ml懸濁を使用する方法と直接リント布に0.01gを載せて行う方法の3種類の適用手法を用いて行った。被検物質の適用量以外は、OECD\_TG404に準拠したウサギを用いた皮膚刺激性試験として行った。今年度の試験物質としては、スポンサーシッププログラムの中で多層カーボンナノチューブの主要物質として選定されている30ナノクラスCNT(Nikkiso)と代替物質となっているMWCNT-7(Mitsui)を用いて刺激性試験を行った。

その結果を表1(30ナノクラスCNT)と表2(MWCNT-7)に示すが、個体状態で直接塗布した場合に、閉塞塗布(4時間)終了後1時間の観察では、皮膚に黒色の被検物質が残存した状態であったので、結果を評価できなかったものの、塗布終了24時間後から72時間後の観察では、何の影響も認められなかった。他の2つのシリコーンオイル分散液処理群についても、塗布終了1時間後から72時間後までの全ての観察時間において、異常は認められなかった。以上のことから、本実験条件では、多層カーボンナノチューブの30ナノクラスCNT(Nikkiso)およびMWCNTパウダーサンプル(MWCNT-7:Mitsui)については、皮膚刺激性の無いことが示された。

皮膚感作性試験については、上記2種類の多層カーボンナノチューブの皮膚感作性をモルモットを用いてOECD\_TG406のBuehler法により評価することとした。皮膚刺激性試験における分散性の検討と試験結果を考慮して、被検物質液をシリコーンオイルを溶媒として用いて分散液を調製することとした。分散条件は、ホモジナイザーを用いて約20秒間処理後、約30分間超音波処理することとし、得られた分散液は2×2cmにカットしたリント布に分散液0.2mLをのせて馴染ませた後、試験に供することとした。

#### D. 考察

昨年度までの研究班ではOECDの産業用ナノマテリアル作業部会WPNMのスポンサーシッププログラムへの貢献としては、初期評価文書へ記入すべき健康影響に関するエンドポイントのうち、C60などのADMEに関するデータや、遺伝毒性に関するデータを提供するための基盤的な研究を整備してきた。本研究班では、これまでの研究成果を生かして、実際にOECDのスポンサーシッププログラムに提供できるデータの作成を目的の一つとしており、この分担研究では、C60と単層および多層カーボンナノチューブの皮膚刺激性試験と皮膚感作性試験を行うこととしている。両試験については、OECDのガイドラインに沿った実験を行うことを基本とするが、ナノマテリアルの物理学的特性上、実験に供する試験サンプルは通常の化学物質と同じように適用することは困難であった。特にカーボンナノチューブについては、重量あたりの体積かなり大きく、ガイドラインで要求されている0.5gは皮膚に塗布することは不可能で0.01g程度が上限であった。また、分散液を使った手法でも、溶媒に対する分散性も悪く、肉眼的な許容範囲としても0.05%溶液程度までが、適用できる上限の分散液濃度であると考えられた。従って、ガイドライン上の要求量は満たしていないものの、物理的な暴露限界を適用した範囲では、皮膚刺激性の無いことが示された。

OECDの産業用ナノマテリアル作業部会WPNMのスポンサーシッププログラムの進捗状況において、物質によって浸食の違いはあるものの、スポンサーの決まった物質については、概ね2011年中までにフェーズ1のデータが揃う予定で進行している。当研究班の皮膚刺激性や感作性のデータも今年度と来年度に予定しているC60と単層カーボンナノチューブの実験結果を提供することにより、2011年までの予定であるOECD WPNMのスポンサーシッププログラムのフェーズ1の作業を通して、日本政府が担当している初期評価文書の作成に貢献することが可能であると考えられた。

#### E. 結論



OECD におけ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、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いことが示された。

#### F. 研究発表

(論文発表)

Sakamoto Y, Nakae D, Hagiwara Y, Satoh K, Ohashi N, Fukamachi K, Tsuda H, Hirose A, Nishimura T, Hino O and Ogata A(2010) Serum level of expressed in renal carcinoma (ERC)/ mesothelin in rats with mesothelial proliferative lesions induced by multi-wall carbon nanotube (MWCNT) J. Toxicol Sci., 35, 265-270.

Xu J, Futakuchi M, Iigo M, Fukamachi K, Alexander DB, Shimizu H, Sakai Y, Tamano S, Furukawa F, Uchino T, Tokunaga H, Nishimura T, Hirose A, Kanno J, Tsuda H. (2010) Involvement of macrophage inflammatory protein 1alpha (MIP1alpha) in promotion of rat lung and mammary carcinogenic activity of nanoscale titanium dioxide particles administered by intra-pulmonary spraying. Carcinogenesis. 31: 927-935.

(学会発表)

広瀬 明彦, 高木 篤也, 西村 哲治, 菅野 純、ナノマテリアルの慢性影響研究の重要性、第36回日本トキシコロジー学会学術年会、2009年7月、盛岡

津田 洋幸, 徐 結苟, 二口 充, 飯郷 正明, 深町 勝巳, Alexander B. David, 内野 正, 西村 哲治, 徳永 裕司, 広瀬 明彦, 菅野 純広、ナノサイ

ズ二酸化チタニウム投与による肺発がん促進作用とその機序の解析第36回日本トキシコロジー学会学術年会、2009年7月、盛岡

Akihiko Hirose, Importance of long-term studies for health effects evaluation of nanomaterials. NIMS symposium on the social acceptance of nanomaterials in Satellite Symposia of NIMS WEEK09 2009, July. Tsukuba.

Akihiko Hirose, Tetsusji Nishimura, Masamitsu Honnma, Tomoko Mogami, Kaoru Sato, Kun'ichi Miyazawa, Naoto Oku, Okio Hino, Jun Kanno, Hiroyuki Tsuda. Importance of long-term studies for health effects evaluation of nanomaterials. 54th International Conference on Nanotechnology – Occupational and Environmental Health (NanOE2009) 2009, Aug. Helsinki

広瀬明彦、ナノマテリアルの慢性健康影響評価のための研究、ナノマテリアルの環境・健康影響評価および管理技術研究会、2009.10、名古屋

広瀬明彦、衛研の有害性評価研究の取り組み状況、ナノテクセミナー2009 ～みんなで学ぼう リスク管理策～、2009.10、大阪

広瀬明彦、ナノ物質の生体への影響、第2回化学物質リスクマネージメント講座－ナノテク物質の安全性と化学物質管理のマネージメント－、2010年2月、東京

広瀬明彦、高木篤也、西村哲治、津田洋幸、坂本義光、小縣昭夫、中江 大、樋野興夫、菅野 純、ナノマテリアルの慢性影響、日本薬学会第130年会、2010年3月、岡山

#### 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)



表1

 SKIN IRRITATION STUDY OF CARBONNANOTUBE (30 nano-class CNT (Nikkiso)) IN RABBITS  
 THE TEST SITE OBSERVATION DATA

TEST CHEMICAL	Condition	ANIMAL NO.	Findings	Time after removal of the closed patch			
				1h	24h	48h	72h
30ナノクラスC NT (Nikkiso)	Diluted water	10114001	Er. <sup>a</sup>	0	0	0	0
			Ed. <sup>b</sup>	0	0	0	0
		10114002	Er.	0	0	0	0
			Ed.	0	0	0	0
		10114003	Er.	0	0	0	0
			Ed.	0	0	0	0
	30 nano-class CNT (Diluted treatment)	10114001	Er.	- <sup>c</sup>	0	0	0
			Ed.	- <sup>c</sup>	0	0	0
		10114002	Er.	- <sup>c</sup>	0	0	0
			Ed.	- <sup>c</sup>	0	0	0
		10114003	Er.	- <sup>c</sup>	0	0	0
			Ed.	- <sup>c</sup>	0	0	0
	Silicone oil	10114001	Er.	0	0	0	0
			Ed.	0	0	0	0
		10114002	Er.	0	0	0	0
			Ed.	0	0	0	0
		10114003	Er.	0	0	0	0
			Ed.	0	0	0	0
	30 nano-class CNT (0.05% Dispersed fluid)	10114001	Er.	0	0	0	0
			Ed.	0	0	0	0
		10114002	Er.	0	0	0	0
			Ed.	0	0	0	0
		10114003	Er.	0	0	0	0
			Ed.	0	0	0	0
30 nano-class CNT (0.05% Dispersed fluid with homogenate)	10114001	Er.	0	0	0	0	
		Ed.	0	0	0	0	
	10114002	Er.	0	0	0	0	
		Ed.	0	0	0	0	
	10114003	Er.	0	0	0	0	
		Ed.	0	0	0	0	

a : Erythema and eschar formation

0: No erythema

1: Very slight erythema (barely perceptible)

2: Well defined erythema

3: Moderate to severe erythema

4: Severe erythema (beet redness) to eschar formation preventing grading of erythema

b : Edema formation

0: No edema

1: Very slight edema (barely perceptible)

2: Slight edema (edges of area well defined by definite raising)

3: Moderate edema (raised approximately 1 mm)

4: Severe edema (raised more than 1 mm and extending beyond area of exposure)

c : Observation could not determined due to staining related to test chemical.

表2

SKIN IRRITATION STUDY OF CARBONNANOTUBE (MWCNT powder sample (MWCNT-7; Mitsui)) IN RABBITS  
 THE TEST SITE OBSERVATION DATA  
 STUDY NO. 10114

TEST CHEMICAL	Condition	ANIMAL NO.	Findings	Time after removal of the closed patch			
				1h	24h	48h	72h
	Diluted water	10114004	Er. <sup>a</sup>	0	0	0	0
			Ed. <sup>b</sup>	0	0	0	0
		10114005	Er.	0	0	0	0
			Ed.	0	0	0	0
		10114006	Er.	0	0	0	0
			Ed.	0	0	0	0
	MWCNT powder sample (Diluted treatment)	10114004	Er.	- <sup>c</sup>	0	0	0
			Ed.	- <sup>c</sup>	0	0	0
		10114005	Er.	- <sup>c</sup>	0	0	0
			Ed.	- <sup>c</sup>	0	0	0
		10114006	Er.	- <sup>c</sup>	0	0	0
			Ed.	- <sup>c</sup>	0	0	0
MWCNTパウ ダーサンプル (MWCNT-7; Mitsui)	Silicone oil	10114004	Er.	0	0	0	0
			Ed.	0	0	0	0
		10114005	Er.	0	0	0	0
			Ed.	0	0	0	0
		10114006	Er.	0	0	0	0
			Ed.	0	0	0	0
	MWCNT powder sample (0.05% Dispersed fluid)	10114004	Er.	0	0	0	0
			Ed.	0	0	0	0
		10114005	Er.	0	0	0	0
			Ed.	0	0	0	0
		10114006	Er.	0	0	0	0
			Ed.	0	0	0	0
MWCNT powder sample (0.05% Dispersed fluid with homogenate)	10114004	Er.	0	0	0	0	
		Ed.	0	0	0	0	
	10114005	Er.	0	0	0	0	
		Ed.	0	0	0	0	
	10114006	Er.	0	0	0	0	
		Ed.	0	0	0	0	

a : Erythema and eschar formation

0: No erythema

1: Very slight erythema (barely perceptible)

2: Well defined erythema

3: Moderate to severe erythema

4: Severe erythema (beet redness) to eschar formation preventing grading of erythema

b : Edema formation

0: No edema

1: Very slight edema (barely perceptible)

2: Slight edema (edges of area well defined by definite raising)

3: Moderate edema (raised approximately 1 mm)

4: Severe edema (raised more than 1 mm and extending beyond area of exposure)

c : Observation could not determined due to staining related to test chemical.

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者名	論文タイトル	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

著者名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
広瀬明彦, 西村哲治, 菅野純	産業用ナノマテリアルの健康影響評価法開発における課題と慢性影響研究の重要性	国立医薬品食品衛生研究所報告	127	15-25	2009
久保田領志, 田原麻衣子, 清水久美子, 杉本直樹, 広瀬明彦, 西村哲治	高速液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法による生物試料中フラーレンの分析法の開発	国立医薬品食品衛生研究所報告	127	65-68	2009
Sakamoto Y, Nakae D, Hagiwara Y, Satoh K, Ohashi N, Fukamachi K, Tsuda H, Hirose A, Nishimura T, Hino O and Ogata A	Serum level of expressed in renal carcinoma (ERC)/ mesothelin in rats with mesothelial proliferative lesions induced by multi-wall carbon nanotube (MWCNT)	J. Toxicol Sci	35	265-270	2010
Jiegou Xu, Mitsuru Futakuchi, Masaaki Iigo, Katsumi Fukamachi, David B. Alexander, Hideo Shimizu, Yuto Sakai, Seiko Tamano, Fumio Furukawa, Tadashi Uchino, Hiroshi Tokunaga, Tetsuji Nishimura, Akihiko Hirose, Jun Kanno and Hiroyuki Tsuda	Involvement of macrophage inflammation protein 1 (MIP1) in promotion of rat lung and mammary carcinogenic activity of nano-scale titanium dioxide particles administered by intra-pulmonary spraying	Carcinogenesis	31	927-935	2010
Hiroyuki Tsuda, Jiegou Xu, Yuta Sakai, Mitsuru Futakuchi, Katsumi Fukamachi	Toxicology of Engineered Nanomaterials - A review of Carcinogenic Potential	Asian Pacific Journal of Cancer Prevention	10	975-980	2009
Hiroyuki Tsuda	Risk Assessment Studies of Nanomaterials in Japan and Other Countries	Asian Pacific J Cancer Prev	10 (DIMS 30th Anniversary Supplement)	11-12	2010

Hajime Tanaka, Katsumi Fukamachi, Mitsuru Futakuchi, David B. Alexander, Ne Long, Shojiro Tamamushi, Kohtaro Minami, Susumu Seino, Hirotaka Ohara, Takashi Joh and Hiroyuki Tsuda	Mature acinar cells are refractory to carcinoma development by targeted activation of Ras oncogene in adult rats	Cancer Science	101	341-346	2010
Masaaki Iigo, David B. Alexander, Ne Long, Jiegou Xu, Katsumi Fukamachi, Mitsuru Futakuchi, Mitsunori Takase, Hiroyuki Tsuda	Anticarcinogenesis pathways activated by bovine lactoferrin in the murine small intestine	Biochimie	91	86-101	2009
Jianyong Wang, Jeffery R. Sawyer, Ling Chen, Tao Chen, Masamitsu Honma, Nan Mei, and Martha M. Moore	The Mouse Lymphoma Assay Detects Recombination, Deletion, and Aneuploidy	Toxicological Science	109	96-105	2009
Yoshio Takashima, Mayumi Sakuraba, Tomoko Koizumi, Hiroko Sakamoto, Makoto Hayashi, and Masamitsu Honma	Dependence of DNA Double Strand Break Repair Pathways on Cell Cycle Phase in Human Lymphoblastoid Cells	Environment al and Molecular Mutagenesis	50	815-822	2009
Naoki Koyama, Manabu Yasui, Yoshimitsu Oda, Satoshi Suzuki, Tetsuo Satoh, Takuya Suzuki, Tomonari Matsuda, Shuichi Masuda, Naohide Kinae, and Masamitsu Honma	Geneotoxicity of Acrylamide In Vitro: Acrylamide Is Not Metabolically Activated in Standard In Vitro Systems	Environment al and Molecular Mutagenesis		1-8	2010
Fumio YATAGAI, Kaoru SUGASAWA, Shuichi ENOMOTO and Masamitsu HONMA	An Approach to Estimate Radioadaptation from DSB Repair Efficiency	J. Radiat. Res.	50	407-413	2009
Kiyoshi Ishikawa, 1 Tatsuya Segawa, 1 Yoshiaki Hagiwara, 1, 2 Masahiro Maeda, 1 Masaaki Abe <sup>2</sup> and Okio Hino <sup>2</sup>	Establishment of novel mAb to human ERC/mesothelin useful for study and diagnosis of ERC/mesothelin-expressing cancers	<i>Pathology International</i>	59	161-166	2009
Katsumi Fukamachi, Hajime Tanaka, Yoshiaki Hagiwara, Hirotaka Ohara, Takashi Joh, Masaaki Iigo, David B. Alexander,	An animal model of preclinical diagnosis of pancreatic ductal adenocarcinomas	Biochemical and Biophysical Research Communicati	390	636-641	2009

Jiegou Xu, Ne Long, Misato Takigahira, Kazuyoshi Yanagihara, Okio Hino, Izumu Saito, Hiroyuki Tsuda		ons			
Chisato Yoshidaa, Chizuru Sogawa, Atsushi B. Tsuji, Hitomi Sudoa, Aya Sugyo, Tomoya Uehara, Okio Hino, Yukie Yoshii, Yasuhisa Fujibayashi, Toshimitsu Fukumura, Mitsuru Koizumi, Yasushi Arano and Tsuneo Saga	Development of positron emission tomography imaging by <sup>64</sup> Cu-labeled Fab for detecting ERC/mesothelin in a mesothelioma mouse model	Nuclear Medicine Communicati ons			2010
Hitomi Sudo, Atsushi B. Tsuji, Aya Sugyo, Masakazu Kohda, Chizuru Sogawa, Chisato Yoshida, Yoshi-nobu Harada, Okio Hino, Tsuneo Saga	Knockdown of COPA, Identified by Loss-of-Function Screen, Induces Apoptosis and Suppresses Tumor Growth in Mesothelioma Mouse Model	Genomics			2010
KanakoTakhashi, Reiko Ishii-Nozawa, Kouichi Takeuchi, Ken Nakazawa, and Kaoru Sato	Two Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs, Niflumic Acid and Diclofenac, Inhibit the Human Glutamate Transporter EAAT1 Through Different Mechanisms	Journal of Pharmacologi cal Sciences	112	113-117	2010
Shin-ichi Nudejima, Kun'ichi Miyazawa, Junko Okuda-Shimazaki and Akiyoshi Taniguchi	Phagocytosis of Fullerene Nanowhiskers by PMA-treated THP-1 Cells	Annual Conference on Carbon, June 14-19, 2009, Biarits, France /Topic 10		pp.347_ 1-2	2009
K. Miyazawa <sup>1</sup> , T.Tokumitsu, J.Fujii, R.Kato <sup>1</sup> , S.Nudejima, K.Hotta <sup>1</sup> , K.Ide <sup>1</sup> and T.Kizuka	Dispersion of carbon nanotubes and fullerene nanowhiskers by the liquid-jet cavitation method	Annual Conference on Carbon, June 14-19, 2009, Biarits, France /Topic 11		pp.161_ 1-4	2009
宮澤 薫一	フラーレンナノファイバの合成と 成長機構	NEW DIAMOND	25	22-27	2009
S Nudejima, K Miyazawa, J Okuda-Shimazaki and A Taniguchi	Observation of phagocytosis of fullerene nanowhiskers by PMA-treated THP-1 cells	Journal of Physics: Conference Series	159	1-6	2009
SHIN-ICHI NUDEJIMA, KUNICHI MIYAZAWA	Biodegradation of C <sub>60</sub> Fullerene Nanowhiskers by Macrophage-like Cells			89-94	2009

#### IV. 研究成果の刊行物・別冊



## 産業用ナノマテリアルの健康影響評価法開発における課題と慢性影響研究の重要性

広瀬明彦<sup>#</sup>, 西村哲治, 菅野 純

## Research strategy for evaluation methods of the manufactured nanomaterials in NIHS and importance of the chronic health effects studies

Akihiko Hirose<sup>#</sup>, Tetsuji Nishimura, Jun Kanno

Manufactured nanomaterials are one of the most important substances for the nanotechnology. The nanomaterials possess different physicochemical properties from bulk materials. The new properties may lead to novel biological effects and also may or may not cause unknown adverse effects. However, the toxicological evidences are very limited, and there are no standardized evaluation methods at present. Some domestic and international activities are ongoing, in order to share the information or to standardize the methods. In 2005, our institute launched the research on the establishment of health risk assessment methodology of manufactured nanomaterials by funding from the research grants of the Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare. The project contains four themes. The first is development of measurement methods of nanomaterials from biological samples. The second is development of dispersion methods in *in vitro* systems. The third is development of inhalation exposure systems. And the last is development of *in vivo* systems for evaluating long-term health effects. As evaluation materials, fullerene, titanium oxide and multi-walled carbon nanotubes were chosen because of their high production volumes.

In the course of the research project, we revealed that the nanomaterials were competent to cause chronic effects, by analyzing intraperitoneal administration studies and carcinogenic promotion studies. These studies suggested that even aggregated nanomaterials were crumbled into nano-sized particles inside the body during the long-term, and the particles were transferred to other organs. Additionally, long lasting particles/fibers in the particular tissues may cause chronic adverse effects. The physico-chemical properties or toxicity mechanism related with these chronic effects were considered to be different from those properties or mechanism related to acute toxicity. Therefore, we suggested that the toxicological characterization of chronic effects by nanomaterials would be important for the future research. Also, investigations of the toxicokinetic properties and biological interaction with nanomaterials are important to predict the chronically targeted tissues after exposure.

Keywords: manufactured nanomaterials, fullerene, titanium oxide, multi-walled carbon nanotube, chronic effects

## はじめに

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技術開発が進められており、ナノ物質（ナノマテリアル）として定義される新規物質・材料は、このナノテクノロジーの中心的な役割を担っている。産業用として生産されるナノマテリアルは、一般に少なくとも大きさの一次元が100ナノメートル以下である物質として定義されているが、このような化合物は典型的にナノ構造依存的な性状（化学的、機械的、電気的、光学的、磁

氣的、生物学的）を有している。これらの特徴によりナノマテリアルは、商業的あるいは医学的な有益性あるいは効率化の目的のために、電磁光学、構造材料を中心としてとして一般家庭用品から食品にいたるまでの新しい応用の展望が期待され、薬物輸送を含む医療への展開も期待されている。このように様々な分野に応用が見込まれるため、ナノマテリアルも様々な種類のものが開発されてきており、その分類法も様々ではあるが、基となる化学物質の種類から以下のように分類できると考えられる。

- ・酸化金属・金属:二酸化珪素(SiO<sub>2</sub>), 二酸化チタン(TiO<sub>2</sub>), アルミナ(Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), 酸化鉄(Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), 酸化亜鉛(ZnO), 酸化インジウム-スズ (ITO) など
- ・炭素系:フラーレン, カーボンナノチューブ (CNT), カーボンファイバーなど

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed:

Akihiko HIROSE; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya, Tokyo 158-8501, Japan; Tel: 03-3700-9878; Fax: 03-3700-1408; E-mail: hirose@nihs.go.jp

- ・ナノクレイ:特殊な層構造を持たせたケイ酸塩
- ・有機ナノ粒子:ナノ粒子化された薬品・化合物(医薬品, ビタミン, 色素など) ポリマー, 高分子, ミセル, リポソームなど

その他, ナノコンポジットとして, ナノ粒子を特殊な役割のために構成成分としてポリマーやセラミック, 金属マトリックス製品中に再配合することもある。

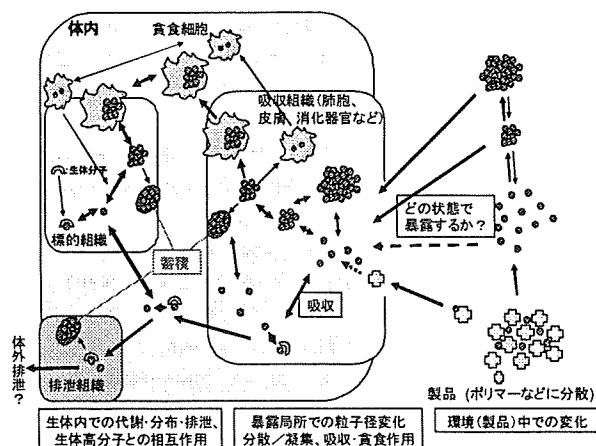
このようなナノマテリアルの多方面にわたる利用拡大は, 我々がこれらの物質に直接, あるいは商品を通して間接的に接する機会が増えてくることを意味している。そうすると, 本来の目的や使用方法以外による接触や暴露も増える可能性が高くなる他, 本来の使用方法でも想定外の長期間暴露, さらに物質, 商品等が廃棄された後の環境経路による暴露の機会も増すことが想定される。しかし, これらの特定の機能を意図して合成された純粋な単体としてのナノ物質が生体に及ぼす影響については多くの点で未知である。従って, ナノマテリアルが本格的にその使用が拡大する前に, ナノマテリアルの有用性だけでなく安全性に関する知見も十分に蓄積し, ナノマテリアルの利用が安心して進められるように対応することが求められている。

#### 体内動態 (ADME) 情報の重要性

一般的に, 化学物質の健康影響評価 (リスクアセスメント) の基本的なフレームは, 有害性評価と暴露評価, および各々の評価内容を比較・統合化する過程のリスク判定のコンポーネントから成り立っている。さらに有害性評価は, 有害性の確認 (hazard identification) と用量反応評価 (dose-response assessment) に分けられる。この基本フレーム自体は, ナノマテリアルの健康影響評価に適用できるものであると考えられる<sup>1-5)</sup>が, ナノマテリアルに特徴的な新たな物理化学的性質を鑑みると, 体内動態 ((吸収absorption, 分布distribution, 代謝metabolism, 排泄excretion) (ADME) 情報は, 一般の化学物質より重要な意味を持つと考えられる。例えば, 粒子サイズの微小化はそれまでその大きさのために生体内に侵入することはないと考えられていた物質が, 生体内に侵入が可能になり生体組織との新たな反応性を示すようになる。重量あるいは1粒子あたりの表面積が増大することにより相対的に増加した表面活性のため, それまで反応性が乏しいために無害であると考えられた粒子であっても, 生理学的反応を示すようになることなどが推測される。また, 用量反応評価や暴露評価においては, 従来使われてきている重量よりも表面積や表面活性の強さなどの別のスケールを用いて記述した方が適切な定量的評価が可能になることも指摘されている。このことは, ナノマテリアルによる生体影響はその構成成分である化学物質特

有の性質として一義的に決定されるものではなく, 粒子の大きさや形状にも依存することを示している。また, 暴露時における暴露環境 (分散状態であるか凝集状態であるか) や暴露経路 (吸入, 経口, 経皮など) との組み合わせによって生体侵入時あるいは侵入後の粒子の体内挙動は異なってくるのが想定され (図1), 有害性影響評価では一般の化学物質に比べて, 粉体毒性を含む多くの要因を考慮しなければならないこと意味している。また, ナノマテリアルの凝集しやすい性質は, 分布される組織によって蓄積性の動態を示すことが予想される。したがって, ナノマテリアルの場合はADMEの性質の違いにより毒性 (生体影響) の質や強さも大きく変える可能性を持っており, これらの情報は, 一般の化学物質より大きな意味合いを持つようになると考えられる。

図 1. 想定される暴露状態と吸収後の体内動態



#### 生体試料中の検出法の開発の必要性

ADME情報を取得するためには, 影響発現部位もしくは作用を及ぼすと想定される部位にナノマテリアルの存在を示すことが必要であり, まず生体試料中で検出, 同定・定量できる方法を確立しなくてはならない。存在の検出には, 存在量を定量する目的と, 生体内の存在状態を同定する目的がある。存在量を定量する目的として, 対象物質を生体試料から分離・単離し, 検出する方法をとることができる。たとえば, 金属ナノ粒子は生体試料を硝酸加熱分解後, 燃焼灰化した試料中の金属元素の量を誘導結合プラズマ-質量分析計で分析する方法を採ることができ, フラワーレンの場合は, 生体試料から抽出後, 液体クロマトグラフィー質量分析計で分析する方法が有用である。しかし, これらの方法では, ナノマテリアルの存在やその量を評価することは可能であるが, 生体内でも実際にナノの状態で存在しているのか, あるいは再凝集などはしていないかなど, 標的組織にお

ける最終的な生体内反応に影響を及ぼすと考えられる実際のナノマテリアルの存在状態を把握することはできない。最終的には、組織標本の電顕などによる確認が必要である。一方、カーボンナノチューブでは、機器による定量測定が困難であり、測定組織を硝酸加熱分解と加熱灰化で処理し、透過型電子顕微鏡で本数や形態を、手動で計測する方法以外に確実に測定する方法はない状況である。将来的には、生体内に取り込んだ後、感度良く、精度高く検出できる方法を開発するために、対象物質に標識を付けて分析する方法の開発も有効であると考えられるが、標識化することによりナノマテリアルの吸収性や生体反応に影響を及ぼす可能性を考慮しなければならない。

### 影響評価法確立の必要性

粒子のナノサイズ化による表面活性の増大は、一般的に粒子の凝集性を増強することが知られており、この凝集性は上記の体内動態を大きく左右する因子であるだけでなく、生体影響を評価するための試験系開発においても重要な制御因子である。*in vitro*試験系では、水系の培養液を用いた試験法になるため、水難溶性で凝集しやすいナノマテリアルを培養液中に凝集することなく、均一に分散させることが最も重要な課題となる。分散剤として、界面活性剤や親水・疎水両領域をもつ媒体となる物質の共存が必要となるが、評価対象の物質以外に共存する物質や溶媒が生体に影響を及ぼす可能性を考慮して、生体影響の少ない物質を使用するか、もしくは影響の出にくい量（濃度）の使用を考えなければならない。例えば、フラーレンはトルエンにある程度まで容易に溶解するが、有機溶媒の毒性や溶媒自身の溶解性のためにトルエン溶液の暴露において量的な制限がかかる。分散剤として有効な界面活性剤も、高濃度では細胞溶解性があるため制限があり、細胞の生理作用や検出する測定系に影響を与えない適切な濃度の選択が必要である。一方、生体成分に近い分散剤としては、血液中脂質やリポタンパク質がある。これらは、細胞毒性等の影響を及ぼす可能性が低く、培養の重要成分として添加されていることから優れた分散剤と言えるが、培養液当たりの添加濃度には制限がある。また、人工脂質二重膜構造のリポソームも有用な分散剤であると考えられるが、リポソーム自身にも使用する細胞によっては毒性を示すことがある。しかし、リポソーム膜と細胞膜の相互作用により、ナノマテリアルを細胞膜中に導入して、評価する手法としては有用性が高いと考えられる。また、水系への分散性をあまり考慮しなくてもよい*in vitro*系として、経皮暴露の三次元皮膚モデルの系が皮膚透過性や細胞内分布、細胞レベルの作用機構を解明するために有力な手段となると

期待される。

最終的な生体影響評価をするためには*in vivo*の実験動物を用いた研究が必要である。しかし、投与時の溶媒や分散状態が吸収性や生体反応にも影響を及ぼすと考えられ、*in vivo*系でも適切に分散した投与方法の検討が必要である。経口暴露媒体としては、消化管系へ過度な刺激を与えることは望ましくないため、可能な限り、通常使用している溶媒を用いての分散が検討される。溶剤の候補として、食品中油脂、スクアラン、膜構成脂質成分、血清中脂質、リポタンパク質、リポソーム、低刺激の有機溶媒等の使用が検討される。水溶液として投与するためには、界面活性剤（Tween20やTriton X-100等）、 $\gamma$ -シクロデキストリン等の包接体を用いて水に分散させる方法もある。フラーレンでは、コーン油に溶解して経口投与することが可能であることが知られている。経皮暴露の場合は、経口暴露の場合と異なり対象が皮膚であるため、溶剤の種類が異なる。溶媒として、揮発性の高いトルエンやキシレン等の有機溶媒と揮発性の低い有機溶媒、もしくは界面活性剤などの分散剤を用いた水溶液が検討されるが、塗布時あるいは塗布後の皮膚表面での凝集性や、ナノマテリアルの残留性や浸透性が変化することを考慮しなくてはならない。

### 吸入暴露試験系の開発の必要性

現在のところ、生体内吸収の観点から最も可能性の高い暴露経路は吸入暴露であると考えられている。これまで、ナノマテリアルに限らず微粒子の吸入暴露研究は、金属、鉍粒子、排ガス粒子などを中心に数多く行われているところであり、生体影響についても、これらの過去の知見が有用であることは明らかである。しかし、実験的検証を行う際には、先に述べたナノマテリアルに特有の凝集しやすい性質をどのように扱うかについての検討が必要となる。特に凝集体が大きいままであると、肺組織中の細気管支等を詰まらせることによる物理的な二次影響を見ることになり、少なくとも肺胞まで到達可能な分散技術は必要であると思われる。実験的暴露方法には、一頭体ずつ暴露する吸引法や気管内投与法と、吸入設備を用いる吸入暴露法がある。どちらを採用するにしても、ナノマテリアルの吸入暴露試験系として、特に凝集しやすい特有の性状のため新たな分散法の開発が必要である。特に吸引・気管内投与の場合には、投与溶媒の選択、エアロゾル化するための技術と分散媒体の選択が必要である。分散媒体としてTween等の界面活性剤や肺サーファクタントの使用が見込まれている。吸入設備の開発においても、粉体をより微細にする方法やエアロゾル化による粒子発生装置の開発が必要である。

一方、繊維状粒子については、これまでアスベストや

アスベスト代替物である人工繊維による研究で蓄積された情報が有益であると考えられる。アスベスト繊維については、肺がんや中皮腫、肺線維症の誘発は重要な影響であり、これらも吸入暴露実験による実験的検証が可能であるが、中皮腫誘発性に関して腹腔内投与による試験も有用で感受性の高い試験であるとされている。その強さを規定している最も重要な因子は、特有の繊維の径と長さに加えて、数〜数十年にわたる生体内における残留性であると考えられている。そのため、現時点では*in vitro*試験系や短期動物試験により実証することが困難であり、長期の動物試験が必須となるが、この問題に関する詳細な議論は後述する。

### ナノマテリアルに関する有害影響情報の現状

非常に多岐にわたる工業用ナノ粒子を一括して生体影響を検討することは実質的には不可能であると考えられ、そのため安全性評価を念頭においた各ナノマテリアルの国際的な標準化作業も進んでいる。将来的には、これらの標準化されたナノマテリアルに関する評価が進んでいくものと考えられるが、現時点では、個別の物質についての断片的な生体影響に関する情報しか得られていない。しかも、生産量や使用量を反映して、二酸化チタンやフラーレン、カーボンナノチューブといった物質に関する情報に限られているというのが状況である。

**二酸化チタン:**酸化チタン自体は、古くから白色顔料として使われてきており、着色の目的で食品添加物としても使用されてきている。顔料としては、一次粒径は2〜300ナノメートルぐらいであるが、通常大きな凝集・集合体を形成している。近年は、紫外線防御や光触媒活性を目的としたより一次粒径の小さいナノ粒子(1.50ナノメートル)が使用されるようになってきた。工業的製品の多くは粒子の形状としてルチル型とアナターゼ型に分類され、アナターゼ型の光触媒作用がより強いと考えられている。顔料としての使用が主流であった1989年のIARCの発がん性評価では、ラットへの吸入実験で高用量群においてのみ肺線維腫の増加が認められる<sup>6)</sup>ものの、経口、皮下、気管内および腹腔内投与のいずれにおいても動物実験において催腫瘍性が認められず、不十分な疫学データのためグループ3に分類された<sup>7)</sup>。しかし、その後、顔料タイプおよびナノ粒子の両方において、吸入および気管内投与によるラットでの肺がん発生率の増加を示す報告を考慮し、2006年2月のIARCの評価では、Group 2Bに変更された<sup>8)</sup>。ナノサイズの粒子(*ultrafine particle*)とサブミクロンサイズの粒子(*fine particle*)の吸入暴露による炎症性を比較した研究からは、ナノサイズ粒子による炎症反応の方が強いとする研究が報告されている<sup>9)</sup><sup>10)</sup>が、二酸化チタンを気管内滴下した研究では、

顔料系のサイズとナノサイズの粒子で炎症反応に違いないことも報告されている<sup>11)</sup>。しかし、ルチル型とアナターゼ型を比較した研究では、粒子サイズが同等でもアナターゼ型の方が、炎症反応が強く、表面活性の違いが重要な因子であることも示唆されている<sup>12)</sup>。一方酸化チタンは、日焼け止め剤の中に紫外線防護の目的で使用され、近年は使用時の透明性を高める等の目的でナノサイズ化されたものが使用されており、ナノサイズ粒子の皮膚暴露による影響は、検討すべき暴露経路の一つである。しかし、局所刺激や感作性、全身影響に関してサイズの違いによる影響を検討した報告はなく、吸収性に関して行われた小数の研究がある。日焼け止め剤中の二酸化チタンが、角質層や毛嚢の中に浸透していることを示した報告があるが、この毛嚢への浸透部分は角質層に覆われている部分のみであった<sup>13)</sup>。また別の報告では、二酸化チタンナノ粒子による皮膚への透過性はほとんど示されていない<sup>14)</sup>。しかし、5-20nmというような超微細二酸化チタンが皮膚を透過し、皮内の免疫系と相互作用する可能性は指摘されており<sup>15)</sup>、今後、慢性暴露による影響を考慮した研究が必要であると考えられる。

**フラーレン:**フラーレンは、空気から分子酸素を容易に吸着させることができ、光照射により得た余分な励起エネルギーを近くの酸素分子に渡し、反応性の高い一重項酸素を生成することが知られている。遺伝子突然変異誘発性に関しては、可視光線照射時と代謝活性化系存在時にいくつかのサルモネラ菌種で変異原性が示された<sup>16)</sup>。発生した一重項酸素から間接的にラット肝臓ミクロゾームの作用により生成した過酸化脂質が酸化的DNAを引き起こしたことが示唆されている。しかし、マクロファージを用いた初期の実験では、フラーレンによる活性酸素生成に対する影響はほとんど認められていない<sup>17)</sup>。フラーレンの毒性に関する報告は、ほとんどが修飾されたフラーレンに関するもので、未修飾のフラーレンに関する情報は少ない。未修飾のフラーレンと水酸化フラーレンの*in vitro*での細胞障害性に関する研究では、未修飾のフラーレンの方が細胞毒性の強いことが示されている<sup>18)</sup><sup>19)</sup>が、両フラーレンに関して3mg/kgまでのラットへ気管内滴下による*in vivo*単回投与実験では、どちらも一過性の炎症反応を示し、その反応性には違いが認められなかった<sup>20)</sup>。経口投与した未修飾のフラーレンの毒性影響を調べた報告はないが、フラーレンはマウスの皮膚塗布に対しての局所炎症作用や発がん促進作用を示さないことが報告されている<sup>21)</sup>。また、UVA照射下でC60フラーレンのトルエン溶液をマウスの皮膚に反復投与した実験では、紅斑はみられたが、皮膚がんはみられなかった<sup>22)</sup>。未修飾フラーレンについては、溶媒や培地への分散化が極めて困難であり、*in vitro*系では使用した

溶媒や分散剤の影響を受ける他、*in vivo*系における情報も少なく、系統だった毒性研究の進展が望まれる。

カーボンナノチューブ(CNT):CNTは単層または複層の形状を持ち、それぞれSWCNTおよびMWCNTとして分類されるが、その製法により層の数や構造、繊維の長さ、使用する触媒金属などが異なる様々な種類が存在する。また、ある種のMWCNTの形状がアスベストに類似していることから、その潜在的な懸念について関心が持たれている。まず、SWCNTについて、ラット及びマウスに気管内投与し、肺への影響を検討した実験において、肉芽腫形成と間質性炎症を引き起こすことが報告された<sup>23, 24)</sup>。Warheitらのラットの実験では多発性肉芽腫が観察され、高倍率の検査によりナノチューブの固まりの周りを覆う単核性の肉芽腫が認められた。この変化は用量非依存的で生体の単なる異物反応と捉えることができ、生理学的関連性を持たないかもしれないと考えられている。また、Lamらのマウスを用いた気管内投与実験では、慢性暴露で傷害性のあるクオーツ粒子より炎症反応の強いことが示された。一方、SWCNTを咽頭吸引によりマウスに暴露させた実験では、BALの炎症細胞、炎症サイトカイン、蛋白質の迅速な増加により、SWCNTが急性炎症反応を起こすことを示したが、SWCNTのマクロファージとの反応性は一過性で、炎症性細胞浸潤を伴わない間質の線維化が認められている<sup>25)</sup>。さらに、咽頭に滴下した実験では、大動脈ミトコンドリアのグルタチオン量、蛋白カルボニル化活性の変化を伴うミトコンドリアDNA障害が示され、ApoE-ノックアウトマウスで、アテローム性動脈硬化症の進行を増強することが示され、体循環に吸収されて、全身影響を示す可能性が示唆されている<sup>26)</sup>。ラットに気管内投与したMWCNTは、投与後60日後にも肺に残存し、濃度依存性の炎症反応を起こしコラーゲンリッチな肉芽腫を形成した。この実験では、平均5.9 $\mu$ mと0.9 $\mu$ mに粉碎したMWCNTの投与による比較研究が行われ、粉碎前のMWCNTの多くが気道に蓄積し炎症を示していたが、粉碎した方は肺胞域に達し肺実質における肉芽腫を形成していた<sup>27)</sup>。マウスにMWCNT (200-400 $\mu$ g)を気管内滴下した実験では、肺の炎症反応は一過性で弱かったが、投与に依存した血小板の活性化と凝固作用の活性化を促進している可能性が示唆された<sup>28)</sup>。一方、アスベストとの形状の類似性から想定される吸入暴露による発がん性や中皮腫の誘発性の懸念については、最近腹腔内投与により中皮腫誘発性を示唆する3つの研究結果が報告された<sup>29-31)</sup>。これらの腹腔内投与による研究は、過去に行われた一連の研究を参考として実施されているが、アスベスト様の繊維状粒子による中皮腫誘発性に特化した評価系であるので、その妥当性や結果の詳細については後述

する。

その他の工業用ナノマテリアルに関する研究は、さらに断片的な研究しか報告されていない。しかし、上記3種のナノマテリアルに関する報告を見る限りにおいても、粒子の大きさや表面積だけでなく、表面活性や形状に依存した毒性研究が必要であることが示されている。

#### 健康影響評価法開発における課題

ナノマテリアルの直接的または間接的な暴露による生体影響や環境に対する研究情報は現在のところ上記のように限られており、影響を定量的に評価する指針も定まっていない。また、評価するための安全性試験法に関して、ナノマテリアルの物理化学的特長を考慮すると、試料の投与方法、投与形態、存在状態の要素がこれまでの化学物質の評価方法に比べて重要性が高いと考えられる他、物性に基づいて基礎的な研究も必要であると思われる。また、ナノマテリアルの定義や応用分野の広さから、今後、対象となる物質は、多種多様の組成と構造を持つことが考えられ、全ての対象について標準的な生体影響試験法を策定することは困難で、実際にはケースバイケースの対応が必要になると考えられる。しかし、ナノマテリアルの物理化学的特長を考慮して、個別の生体影響試験において、その後の影響評価に適切に使用するために予め測定しておくべき項目や、分散法を主とした暴露法などにおける改良点や検討項目について整理しておくことは可能であると考えられ、標準的な毒性手法を適用する場合のガイダンスや最適化手法についての国際的な議論が進みつつある。この点に関しては、後述するようにOECDなど国際機関が中心となって、様々な形で情報共有や共同プロジェクトが進められている。

#### 国立医薬品食品衛生研究所の厚生労働科学研究班における取り組み

このような状況の下、我々が所属する研究班では、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た研究を進めてきた。まずは、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きた。その結果、*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ラットとフラーレン(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なこと