

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

平成 22 年度

総括・分担研究報告書

研究代表者 広瀬 明彦

国立医薬品食品衛生研究所

平成 23 年 (2011 年) 5 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

(H21-化学-一般-008)

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 広瀬 明彦

平成23年(2011年)5月

目 次

I. 総括研究報告書	1
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 広瀬 明彦	2
II. 研究分担報告書	11
1. ナノマテリアルの慢性暴露による有害性評価指標の開発に関する研究 菅野 純	12
2. ナノマテリアルの発がん性評価手法の開発に関する研究 津田 洋幸	16
3. ナノマテリアルの生体内動態解析法と短期的スクリーニング評価手法の 開発に関する研究 西村 哲治	22
4. ナノ粒子の繊維状形態に関わる生体反応マーカーの開発研究 樋野 興夫	28
5. ナノマテリアルの遺伝毒性影響評価系における基礎的研究 本間 正充	31
6. ナノマテリアルの神経細胞機能・分化に与える影響に関する基礎的研究 佐藤 薫	57
7. 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 奥 直人	62
8. 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 最上 知子	69
9. 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 宮澤 薫一	74
10. 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 広瀬 明彦	80
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	91
IV. 研究成果の刊行物・別冊	95

平成22年度厚生労働科学研究費補助金
(化学物質リスク研究事業)

I. 総括研究報告書

研究課題名: ナノマテリアルの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

研究要旨

産業用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国内外で急務となっていることを受け、本研究では慢性影響を標的とした評価法開発研究と、国際貢献としての OECD スポンサーシッププログラムに対応するための基礎的な有害性情報収集の実施を行うことを目的としている。

平成 22 年度は、慢性影響評価研究として、繊維状粒子による中皮腫誘発の用量と形状依存性に関する研究、発がんプロモーション作用に関する研究を行った。基礎的有害性情報の収集としては、C60 の体内動態解析、SWCNT と C60 の皮膚刺激性試験と皮膚感作性試験、MWCNT の遺伝毒性試験を行うと共に、繊維状粒子の *in vitro* 試験系に及ぼす影響について検討を行った。

慢性影響研究としては、中皮腫誘発能の繊維長依存性を検討するために、焼結型の C60 ナノウイスカ (FNW) を作成し、単回腹腔内投与による一年間の慢性試験に着手した。一方、MWCNT の腹腔内投与によるラット中皮腫誘発性には、MitsuiMWCNT-7 と NikkisoMWCNT の性状の差が本質的な影響を与えない可能性が示された。また、メソセリンを検出するマウス ELISA 系 (マウス N-ERC) の開発に成功した。一方、C60 の腹腔内投与による病理学的腎障害については、メチルセルロースとの複合作用の可能性が示され、C60 単独投与による確認試験を継続中である。肺発がんプロモーション作用の中期検索法において MWCNT による明確な発がんプロモーション作用は認められなかったが、nZnO においては間質性肺炎と肺発がん促進作用ならびに単独投与にて終末細気管支過形成がみられた。基礎的有害性情報の収集に関しては、OECD のスポンサーシッププログラムに対応するため SWCNT および C60 について皮膚刺激性試験と皮膚感作性試験を行い、共に陰性の結果を得た。体内動態解析手法研究における C60 の体内動態解析で、腎臓と脳での減少の速度が顕著であることを明らかにした。In vitro 遺伝毒性試験において 4 種類の MWCNT のうち、比較的外径の大きい MWCNT (2 種類) で染色体倍数性の誘発のあることが観察された。In vivo 遺伝毒性試験では C60 は血液細胞での Pig-A 遺伝子突然変異を誘発しなかった。また、CNT 懸濁液の超音波処理上清にはマクロファージや神経系細胞に対して細胞毒性作用のあることが示された。MWCNT 暴露マクロファージでは炎症性サイトカイン IL-1 β の産生が亢進することが示された。

慢性研究では繊維長さ依存する中皮腫誘発性の検証を行える準備が整ったが、その他の慢性影響や急性影響では必ずしも明確な有害影響が検出されていない。in vitro 研究では分散手法による影響の違いや、マクロファージ培養中に放出されるサイトカイン等が慢性影響に重要であることを示唆した。

研究分担者

菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所
毒性部 部長
津田 洋幸 名古屋市立大学大学 特任教授

西村 哲治 国立医薬品食品衛生研究所
生活衛生化学部 部長
本間 正充 国立医薬品食品衛生研究所
変異遺伝部 室長

樋野 興夫 順天堂大学・医学部・病理・腫瘍学
教授
佐藤 薫 国立医薬品食品衛生研究所
薬理部 第一室長
奥 直人 静岡県立大学薬学部 医薬生命科学
教室 教授
最上 知子 国立医薬品食品衛生研究所
機能生化学部 室長
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

高木 篤也 国立医薬品食品衛生研究所
毒性部 室長
酒々井 眞澄 名古屋市立大学大学院医学研究科
分子毒性学 教授
深町 勝巳 名古屋市立大学大学院医学研究科 分
子毒性学 助教
徐 結苟 名古屋市立大学大学院医学研究科
David B. Alexander
名古屋市立大学大学院医学研究科 分
子毒性学 客員教授
小縣 昭夫 東京都健康安全研究センター
環境保健部
坂本 義光 東京都健康安全研究センター
環境保健部
前野 智和 東京都健康安全研究センター
環境保健部
杉本 直樹 国立医薬品食品衛生研究所
生活衛生化学部
久保田領志 国立医薬品食品衛生研究所
生活衛生化学部
小林 憲弘 国立医薬品食品衛生研究所
研究員
清水久美子 国立医薬品食品衛生研究所
生活衛生化学部生活衛生化学部分子
毒性学特任教授研究室
堀端 克良 国立医薬品食品衛生研究所
変異遺伝部
山影 康次 (財)食品薬品安全センター
秦野研究所
高橋 俊孝 (財)食品薬品安全センター
秦野研究所

浅田 晋 (財)食品薬品安全センター
秦野研究所
豊泉 友康 (財)食品薬品安全センター
秦野研究所
斉藤 義明 (財)食品薬品安全センター
秦野研究所
熊谷 文明 (財)食品薬品安全センター
秦野研究所
清水 広介 静岡県立大学薬学部 医薬生命科学
教室 助教
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
加藤 良栄 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
赤坂 夢 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
櫛島 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

A. 研究目的

産業用ナノマテリアルはナノテクノロジーの中心的な新規物質として、近年急速にその種類や生産量が増加しつつあるが、産業用途として期待されている物理化学特性は、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も含んでいる。このような懸念に対して、これまでの通常の毒性試験で検出できるエンドポイントで対応できるかどうかについては今後の検証が必要である共に、少なくとも、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。本問題に関しては、国内外共にナノマテリアルの健康影響問題に注目が高まり、2006年からOECDにおいて産業用ナノマテリアルの安全性に関する国際協力を目的とした特別の作業グループが設置され、国際的な共同作業として、試験法の検討や代表的なナノマテリアルにおける初期評価情報の収集作業(スポンサーシッププログラム)が進められている。

我々は、既に本問題に対処するための *in vitro* と *in vivo* の両方を含めた総合的な評価法に関する研究を進めてきており、懸念される体内吸収性や蓄積性に基づく影響を評価するための、カーボンナノチューブ(CNT)やフラーレン(C60)、酸化チタン(TiO₂)等の体内動態解析法や毒性試験への適用を目的とした分散法を検討してきた。さらに、慢性影響としては、多層CNTが繊維状粒子の吸入影響として懸念される中皮腫形成のポテンシャルを持つことと、体内で再分散したナノマテリアルが再分布して影響を引き起こす可能性を示唆する知見を得た。一方、国内外では短期的な影響の報告例は増えてきているが、慢性的影響を検討した報告はまだ少ない。

本研究ではこれまでの基盤的研究成果を用いてOECD作業グループでの共同作業への直接的な貢献として、CNTやC60の体内挙動の把握も含めた基礎的な有害性情報の収集を行うと共に、中皮腫形成やナノ粒子の体内再分布に伴う慢性影響の発現メカニズムや新たな慢性影響の検索を行う。さらに、得られたエンドポイントを検出するための適切な指標を用いた短期的試験法やスクリーニング系の開発を行うことを目的とする。

B. 研究方法

本研究は、ナノマテリアルの慢性影響に対する評価手法の開発を目標として、ナノマテリアルが長期間各種臓器に蓄積した結果引き起こされる影響を検討しつつ、OECDの産業用ナノマテリアル作業グループにおけるスポンサーシッププログラムへ貢献も念頭に、短期的に収集できる基礎的な有害性情報(体内動態を含む)の収集を行った。

慢性影響評価のための検討:

① MWCNT(Mitsui)による中皮腫誘発能に関して、繊維長の長短による中皮腫誘発性を検証するために、長尺及び短尺の焼結型FNWの合成とそれを用いた、慢性試験を開始した(菅野、宮澤)。また、NikkisoMWCNTについて正常ラットへの腹腔内投与により中皮腫誘発性を調べた(西村)さらに、中皮腫の腫瘍マーカー(メソセリン)となるラットELISA系(ラット及びマウスN-ERC)の開発を行った(樋野)。

長期間の体内滞留性に関する影響に関しては、C60による腎障害誘発能を明らかにするため、単回腹腔内投与したC57BL/6Crマウスの1年間慢性毒性試験を実施した(菅野)。

発がんプロモーション作用に関しては、MWCNTおよび酸化亜鉛に関して、発がん二段階法を応用した肺発がんプロモーション作用中期検索法と短期間投与による毒性機序の検討を行った。また、*in vitro*で被検CNTを食食させた初代培養マクロファージ培養上清の増殖活性促進採用について検討した(津田)。

基礎的な有害性情報の収集:

OECDのスポンサーシッププログラム対応として、単層型カーボンナノチューブ(SWCNT)およびフラーレン(C60)の皮膚刺激性試験(OECD_TG404)と、2種類の多層カーボンナノチューブ(MWCNT)及びSWCNT、C60の皮膚感作性試験(OECD_TG406)を行った。(広瀬)。体内動態解析手法の向上に関しては、リポソーム溶液に分散したC60を尾静脈に4日間連続投与し、主要臓器のC60分布を解析した(西村)。

遺伝毒性試験については4種類のCNTを用いた*in vitro*染色体異常試験とB has42細胞を用いた*in vitro*トランスフォーメーション試験を行った。ラットを用いた*In vivo*試験としては、C60の腹腔内投与によるpig-A遺伝子突然変異の誘発性を検討した(本間)。

標的組織由来の細胞を用いた評価系として、CNTの神経幹細胞の増殖活性への影響と神経幹細胞とミクログリアへの細胞毒性についてCNTの超音波処理上清の作用への関与を検討した(佐藤)。また、CNTのマクロファージへの影響として、細胞傷害性、炎症性サイトカイン発現と酸化ストレスについて検討した(奥、最上)。

OECDナノマテリアル作業グループ会合等の国際動向情報収集を行った(広瀬)。

(倫理面への配慮)

実験動物を用いる実験では、「動物の愛護及び管理に関する法律」等の精神に則り、該当研究所でそれぞれ定められている実験動物取り扱いに関する倫理規定等

の規則に準拠した対応がとられている。

C. 研究結果

慢性影響評価のための検討:

雄 p53(+/-)マウスへの MWCNT 単回腹腔内投与による中皮腫誘発性について、繊維長の影響と鉄依存性を検証するための材料として長尺及び短尺の焼結型 FNW の合成に成功し、p53(+/-)マウスへの MWCNT 単回腹腔内投与 1 年間発がん性試験を開始した。

また、Nikkiso MWCNT(OECD Primary Product) について正常ラットでの中皮腫誘発性を調べた。その結果、Mitsui MWCNT-7 および Nikkiso MWCNT とともに、程度の差はあるが、全例で腹腔内の腫瘍結節形成が認められ、ほとんどが出血性腹水の貯留を伴っていた。

中皮腫の腫瘍マーカーとなるメソセリンを検出する ELISA 系の開発において、マウス N-ERC の作成に成功した。

長期間の体内滞留性に関する影響に関して、雄 C57BL/6 マウスに、溶媒に含まれる MC を除いた C60 の単回腹腔内投与試験では現時点までの検索において腎障害作用を示唆する知見が得られていない。このことから、フラーレン単独では腎障害を起こさないか、微弱である可能性が示唆されたが、現在、1 年間試験の病理検査を実施中であり、最終的な結論を導出中である。

基礎的有害性情報の収集:

OECD のスポンサーシッププログラム対応として行った Nikkiso SWCNT とフロンティカーボン C60 の皮膚刺激性試験と皮膚感作性試験はいずれの物質も皮膚刺激性および皮膚感作性を有しないことを確認した。体内動態解析研究に関して、C60 反復尾静脈投与後の主要臓器の分布を解析した結果、重量当たりの蓄積濃度は、肺、脾臓、肝臓、腎臓、脳の順であり、腎臓と脳では減少の速度が顕著であることが判明した。

遺伝毒性試験では、*in vitro* 試験において、4 種類の MWCNT のうち、比較的外径外径の大きい(60nm 以上)MWCNT の 2 種類で染色体倍数性の誘発が観

察された。*In vivo* 試験では C60 腹腔内投与投与後、2 週、8 週後の *Pig-a* 遺伝子突然変異頻度は溶媒対照群と変化はなく、*Pig-A* 遺伝子突然変異を誘発しなかった。

標的組織由来の細胞を用いた評価系に関する研究では、Nikkiso の MWCNT および SWCNT の分散液の超音波処理した上清に溶出した金属のうち、神経幹細胞増殖抑制作用、ミクログリア細胞毒性を持つ金属種を明らかにした。酸化ストレスに由来するヒトの免疫機能への影響を解明するために、CNT 暴露時のマクロファージ細胞の増殖への影響について調べたところ、CNT 低濃度暴露においては低濃度の過酸化水素存在下で見られるような、マクロファージ細胞の増殖促進作用を示した。一方で高濃度の CNT 暴露においては、細胞増殖抑制作用を示した。また、MWCNT はヒト THP-1 マクロファージから炎症性サイトカイン IL-1 β 分泌を著しく促進した。この応答は細胞の食作用に依存し、*caspase-1* の活性を必要とした。C60 は本効果を示さず、分散が困難な他の MWCNT や SWCNT 製品では効果が低かった。

国際動向調査からは、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)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、リードスポンサーからの報告でにおいて、物理化学特性と哺乳類毒性試験は順調だが環境関連試験の進捗が遅いことが確認され、Phase1 の終了を 2012 年の第 10 回会合を目処にすることが目標とされ低ることが示された。また、SG3 の下で、Phase1 の Dossier を完成させるための追加的なガイダンスの作成に関してタスクグループを設置することとなったことや、ナノ材料の有害性評価という点において、WPMN と OECD 高生産量化学物質プログラムの職評価会議である SIAM 会議の後継である OECD Cooperative Chemicals Assessment Programme(CCAP)との連携について、概ね前向きな方向で検討することとなったことが明らかとなった。

D. 考察

慢性影響評価研究として、繊維状粒子による中

皮腫誘発において形状依存性を明らかにするための FNW を使った実験を開始することができた。一方、Mitsui MWCNT-7 および Nikkiso MWCNT をラットへの腹腔内投与試験では、この両者の差のような程度では、中皮腫誘発性に本質的な影響を与えない可能性が示された。この中皮腫誘発性に関しては、我々の開発したマウスのメソセリンを検出する ELISA 系が確立し、今後の解析有用であることが示された。C60 に関しては腎障害性の可能性を示す結果が得られたが、メチルセルロース (MC) による腎障害性との複合影響が示唆され、現在解析中の病理解析結果を待って総合的に判断する必要があると思われた。MWCNT および酸化亜鉛を用いた肺発がんプロモーション実験では、両物質共に明確な発がんプロモーション作用は認められなかったが、MWCNT 暴露の初代培養マクロファージの培養上清は、肺胞上皮系細胞の増殖を促進し、酸化亜鉛は間質性肺炎を進行させ、さらなる解析が必要であることが示された。

基礎的有害性情報の収集としては、OECD 対応として皮膚刺激性試験、皮膚感作性試験、染色体異常試験を行うと共に、C60 の体内動態解析と、カーボンナノチューブ (CNT) 等のマクロファージや神経系細胞に及ぼす影響について検討を行った。OECD のスポンサーシッププログラムに対しては、MWCNT、SWCNT および C60 の刺激性試験及び感作性試験の結果を、MWCNT については *in vitro* 染色体異常試験の結果を提供することで、今後の Dossier 作成作業へ直接貢献できることが可能となった。体内動態解析法では、C60 の体内動態解析では殆どの臓器において経時的に減少する傾向が認められ、代謝排泄機構の存在が考えられ、フラレン C₆₀ の生体内代謝排泄機構の評価を目的に、水酸化フラレン合成と定量分析のための準備を進めることとした。

標的組織由来の細胞を用いた評価系では、CNT 超音波処理による上清成分に神経幹細胞増殖抑制作用、ミクログリアおよび、マクロファージの細胞毒性毒性作用には、時間経過と共に溶出してくる金属イオンやそれに伴うフリーラジカル産生が関与していることが示唆された。また、マクロファージへの暴露による IL-1 β の産生については、MWCNT-7 は著しく IL-1 β 分泌を促進したが、同濃度の C60 は

MWCNT の 1.4% に相当する効果しか示さなかった。したがって、IL-1 β 分泌促進には MWCNT の形状が重要であることが示された。これらの、*in vitro* 研究の結果からは、分散手法による影響因子の差異や、マクロファージ培養中に放出されるサイトカイン等が慢性影響にも重要な因子であることを示唆した。

E. 結論

慢性影響評価研究として、繊維状粒子による中皮腫誘発の用量と形状依存性に関する研究と動脈硬化促進作用、発がんプロモーション作用に関する研究を行った。基礎的有害性情報の収集としては、体内動態解析の分析感度の向上と皮膚刺激性試験、皮膚感作性試験、遺伝毒性試験を行うと共に、慢性影響が懸念される CNT 等の繊維状粒子のマクロファージや神経系細胞用いた試験系に及ぼす影響について検討を行った。

慢性研究では繊維長さ依存する中皮腫誘発性の検証を行える準備が整った。その他の慢性影響や急性影響では必ずしも明確な有害影響が検出されていないが、*in vitro* 研究では分散手法による影響の違いや、マクロファージ培養中に放出されるサイトカイン等が慢性影響に重要であることを示唆した。

F. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

Wako, K., Kotani, Y., Hirose, A., Doi, T., Hamada, S. (2010) Effects of preparation methods for multi-wall carbon nanotube (MWCNT) suspensions on MWCNT induced rat pulmonary toxicity. *J. Toxicol. Sci.* 35, 437-446.

菅野純、広瀬明彦 (2010) ナノマテリアルの有害性評価とカーボンナノチューブの生体影響、「ナノ材料のリスク評価と安全性対策」、フロンティア出版, pp.11-21.

- 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 (2011) ナノマテリアルの慢性影響研究の重要性. 薬学雑誌, 131, 195-201.
- 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.
- Horibata, K., Ukai, A., Koyama, N., Takagi, A., Kanno, J., Kimoto, T., Miura, D., Hirose, A., and Honma, M. Fullerene (C60) is negative in the in vitro pig-A gene mutation assay. Genes and Environment 33, 27-31 (2011)
- 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. Involvement of macrophage inflammation protein 1{alpha} (MIP1{alpha}) in promotion of rat lung and mammary carcinogenic activity of nano-scale titanium dioxide particles administered by intra-pulmonary spraying. Carcinogenesis. 2010;31(5), 927-35
- Nudejima S, Miyazawa K, Okuda-Shimazaki J and Taniguchi A (2010) Biodegradation of C60 Fullerene Nanowhiskers by Macrophage-like Cells, ADVANCES IN BIOMEDICAL RESEARCH 1, 89-94.
- Tsuda H. Risk assesment studies of nanomaterials in Japan and other countries. Asian Pacific J Cancer Prev; 10, DIMS 30th Anniverrrsary Supplement: 11-12, 2010
- 西村哲治 (2010) ナノテクノロジーと環境リスク, 公衆衛生, 74(4), 305-308.
- Kokubo T., Kakinuma S., Kobayashi T., Watanabe F., Iritani R., Tateno K., Nishimura M., Nishikawa T., Hino O., Shimada Y.: Age dependence of radiation-induced renal cell carcinomas in an Eker rat model. Cancer Sci.101 : 616-623, 2010.
- Inami K., Abe M., Takeda K., Hagiwara Y., Maeda M., Segawa T., Suyama M., Watanabe S. and Hino O.: Antitumor activity of anti-C-ERC/mesothelin monoclonal antibody in vivo. Cancer Sci. 101: 969-974, 2010
- Yoshida C., Sogawa C., Tsuji A., Sudo H., Sugyo A., Uehara T., Hino O., Yoshii Y., Fujibayashi Y., Fukumura T., Koizumi M., Arano Y. and Saga T.; Development of positron emission tomography imaging by 64Cu-labeled Fab for detecting ERC/mesothelin in mesothelioma mouse model. Nuclear Medicine Communications, in press.
- Sudo H., Tsuji A., Sugyo A., Kohda M., Sogawa C., Yoshida C., Harada Y., Hino O. and Saga T.: Knockdown of COPA, identified by loss-of-functiuon screen, induces apoptosis and suppresses tumor growth in mesothelioma mouse model. Genomics, in press.
- Zhang D., Kobayashi T., Kojima T., Kanenishi K., Hagiwara Y., Abe M., Okura H., Hamano Y., Sun G., Maeda M., Jishage K., Noda T. and Hino O.; Deficiency of the *Erc/mesothelin* gene ameliorates renal carcinogenesis in *Tsc2* knockout mice. Cancer Science in press.
- K. Miyazawa and K. Hotta, "The effect of solvent ratio and water on the C₆₀ nanowhiskers", J. Cryst. Growth, 312 (2010) 2764.
- K. Miyazawa and K. Hotta, "The effect of water on the stability of C₆₀ fullerene

nanowhiskers”, Journal of Nanoparticle Research, DOI 10.1007/ s11051-010-0132-y.

R. Kato and K. Miyazawa, “Cross-sectional structural analysis of C₆₀ nanowhiskers by transmission electron microscopy”, Diamond & Related Materials, 20 (2011) 299.

2. 学会発表

Hirose, A. NIHS efforts on nanomaterials health hazard evaluation and Food Safety Commission (FSC) survey report of safety information on nanotechnology application in Japanese food sector. Workshop on Risk Assessment for Nanotechnology-enabled Food Products [英国食料環境研究庁 (fera)、英国・ヨーク、2010. 5. 27]

広瀬明彦、はじめに、第 99 回日本病理学会総会 シンポジウム「環境発がんーアスベスト・ナノを中心としてー」[京王プラザホテル、平成 22 年 4 月 27 日]

深町勝巳、二口充、酒々井眞澄、徐結苟、津田洋幸. 単層および多層カーボンナノチューブの肺発がん短期リスク評価. 第 27 回日本毒性病理学会 2011 年 1 月 2)

徐結苟、佐川容子、二口充、深町勝巳、五十嵐良、西村哲治、古川文夫、内野正、酒々井眞澄、森田明理、津田洋幸、アレキサンダー・デイビット. ナノ二酸化チタニウム粒子の皮膚発がん性修飾作用の欠如ーラットとマウスを用いた検討. 第 27 回日本毒性病理学会 2011 年 1 月

二口充、徐結苟、深町勝巳、酒々井眞澄、津田洋幸. ナノサイズ酸化亜鉛の吸入曝露による間質性肺炎の発生. 第 27 回日本毒性病理学会 2011 年 1 月

津田洋幸、徐結苟、二口充、深町勝巳、飯郷

正明. ナノマテリアルのリスク評価ーアスベストから学ぶ. 第 99 回日本病理学会総会 東京、2010 年 4 月

菅野 純、 μm サイズのカーボンナノチューブの中皮腫誘発作用、第 99 回日本病理学会総会 (2010. 4. 27) (東京)、口演

菅野 純、工業ナノマテリアルの毒性評価、特に慢性毒性について、第 83 回日本産業衛生学会 (2010. 5. 28) (福井)、口演

菅野 純、ナノマテリアルの毒性学、第 51 回日本臨床細胞学会総会 (春期大会) (2010. 5. 30) (横浜)、口演

Jun Kanno, Nanomaterial toxicology - importance of chronic toxicity assessment, XII INTERNATIONAL CONGRESS OF TOXICOLOGY, 2010. 7. 22, Barcelona, Spain, Oral

菅野 純、ナノマテリアルの毒性評価、真空・表面科学合同講演会 第 30 回表面科学学術講演会 第 51 回真空に関する連合講演会 2010 年 11 月 4 日 大阪 招待講演

Jun Kanno, Toxicity assessment of carbon nanotubes and other manufactured nanomaterial. 4th International Workshop on CNT's Toxicology and Safety. 2010. 11. 8 Nagano, Japan

五十嵐良明、相場友里恵、内野正、西村哲治: 酸化チタンナノ粒子のラット皮膚透過性、第 37 回日本トキシコロジー学会学術年会 (2010. 6. 16-18)

山口敦美、藤谷知子、大橋則雄、広瀬明彦、西村哲治、中江大、小縣昭夫: 多層カーボンナノチューブの投与による炎症・免疫系への影響、第 37 回日本トキシコロジー学会学術年会 (2010. 6. 16-18)

Ikarashi, Y., Aiba, Y., Takita, Y., Uchino, T., Nishimura, T. : Tissue distribution and toxicity of titanium dioxide nanoparticles in rats after repeated dermal exposure, XII International Congress of Toxicology (2010. 7)

Nishimura, T., Kubota, R., Shimizu, K., Tahara, M., Obama, T., Sugimoto, N., Kanno,

- J., Hirose, A. : Tissue distribution of fullerene after injected into rat tail vein to mimic the absorption from the digestive tract. XII International Congress of Toxicology (2010.7)
- 坂本義光, 中江大, 佐藤かな子, 西村哲治, 広瀬明彦, 小縣昭夫: ラットにおける多層カーボンナノチューブ (MWCNT) による中皮腫の誘発の用量相関性と血清 ERC/mesothelin レベルの増加, 第 69 回日本癌学会学術総会 (2010.9.22)
- Nishimura T. Kubota. Tahara M. Shimizu K. Obama T. Sugimoto N. Hirose A. Ikarashi Y. : Bio-distribution of the fullerenes intravenous administrated, 2010 Annual Meeting of the Korea Society of Environmental Health and Toxicity (2010.11)
- 坂本義光, 中江 大, 佐藤かな子, 西村哲治, 広瀬明彦, 大山謙一, 中江 大: ラットにおける多層カーボンナノチューブ (MWCNT) による中皮腫の誘発の用量相関性と血 ERC/mesothelin レベルの増加, 第 27 回 日本毒性病理学会学術集会 (2011.1)
- 本間正充; In vitro 遺伝毒性試験の問題点と将来 第 17 回 HAB 研究機構学術年会 (2010. 5)
- 本間 正充; 遺伝毒性試験とその科学的リレバンス 第 11 回日本トキシコロジー学会生涯教育講演会 (2010.6)
- 本間 正充; リスク評価における in vitro 遺伝毒性試験の役割 第 37 回日本トキシコロジー学会学術年会 (2010.6)
- Honma, M., Horibata, K., Takahashi, T., Asada, S., Hara, T., Nakagawa, Y., Ikeda, A., Yamakage, K., Hirose, A. ; In vitro chromosome aberration and cell transformation tests on fulleren and multi-wall carbon nanotubes. European Environmental Mutagen Society 2010, (2010. 9)
- Honma, M. ; The Principal Approaches to Genotoxic Hazard Assessment of Nanomaterials in Japan. Genotoxicity of Nanomaterials: Refining Strategies and Tests for Hazard Identification Workshop in 41st Annual Meeting of Environmental Mutagen Society (2010・10)
- 浅田晋, 斉藤義明, 山影康次, 本間正充; Bhas42 細胞を用いる形質転換試験による多層カーボンナノチューブの in vitro 発がん性の検討: 日本環境変異原学会第 39 回大会 (2010.11)
- 高橋俊孝, 浅田晋, 原巧, 豊泉友康, 斉藤義明, 熊谷文明, 山影康次, 本間正充 多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の CHL/IU 細胞を用いた染色体異常試験: 日本環境変異原学会第 39 回大会 (2010.11)
- 堀端克良, 鶴飼明子, 木本崇文, 三浦大志郎, 本間正充: 内在性遺伝子である Pig-A 遺伝子を標的とした in vivo 遺伝子変異試験: 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会 (2010.12)
- 佐藤 薫, 重本一最上 由香里, 大野泰雄, 関野祐子, ミクログリアは生後初期脳室下帯の神経新生, オリゴデンドロサイト新生を誘導する Neuro2010 (2010. 9, 神戸市)
- 高橋華奈子, 中澤憲一, 石井一野澤 玲子, 竹内 幸一, 関野祐子, 佐藤 薫, ナイフルミック酸によるヒトグルタミン酸トランスポーター EAAT1 substrate-gated conductance の調節 Neuro2010 (2010. 9, 神戸市)
- 佐藤 薫, 重本一最上 由香里, 大野泰雄, 関野祐子, 生後初期脳におけるミクログリアの役割 内藤コンファランス (2010. 10, 神奈川県湘南市)
- 高橋華奈子, 中澤憲一, 石井一野澤 玲子, 竹内 幸一, 関野祐子, 佐藤 薫, ナイフルミック酸によるヒトグルタミン酸トランスポーター EAAT1 コンダクタンスの調節 内藤コンファランス (2010. 10, 神奈川県湘南市)
- 佐藤 薫, 高橋華奈子, 中澤憲一, 石井一野澤 玲子, 竹内 幸一, 関野祐子, ナイフルミック酸によるヒトグルタミン酸トランスポーター EAAT1 の基質依存的な調節 第 84 回日本薬理学会年会 (2011. 3, 横浜市)
- 高木 淳平, 佐藤 薫, 鈴木 岳之, パロキセ

チンはリポポリサッカライドによって引き起こされるグルタミン酸トランスポーター活性の低下を抑制する 第 84 回 日本薬理学会年会 (2011. 3, 横浜市)

佐藤 薫、James E Goldman, 関野 祐子、生後初期脳のリスクアセスメントシステムの構築、日本薬学会第 132 回年会 (2011. 3, 静岡市)

Tomoko Nishimaki-Mogami: Regulation of human hepatic ABCA1 gene expression by sterols 第 42 回日本動脈硬化学会総会シンポジウム (2010. 7)

K. Miyazawa, K. Hotta and Y. Akasaka, "Growth control of C₆₀ fullerene nanowhiskers", Abstract book, X International Conference on Nanostructured Materials, NANO2010, Roma, Italy, September 13-17, P. 131.

R. Kato and K. Miyazawa, "Raman spectroscopy of C₆₀ nanowhiskers under various exposure conditions of laser beam", Abstract book, X International Conference on Nanostructured Materials, NANO2010, Roma, Italy, September 13-17, P. 16.

櫛島真一、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レンナノウィスカーと生体との相互作用の研究", 日衛誌, 65[2] (2010) 338, 第 80 回日本衛生学会学術総会講演集, 2010 年 5 月 9 日 (日) ~ 11 日 (火), 仙台国際センター。

G. 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: ナノ粒子の吸入曝露による発がんリスクマーカーおよびその用途
出願日: 平成 21 年 3 月 24 日
出願番号: 特願 2009-071951
発明者 津田洋幸、二口 充、徐 結苟
特許出願人: 公立大学法人名古屋市立大学
- 発明の名称: PCT 出願「ナノ粒子の吸入曝露による発がんリスクマーカーおよびその用途」

出願日: 平成 21 年 9 月 25 日

出願番号: PCT/JP2009/004848

発明者 津田洋幸、二口 充、徐 結苟

特許出願人: 津田洋幸

- 発明の名称: 国内優先出願「ナノ粒子の吸入曝露による発がんリスクマーカーおよびその用途」

出願日: 平成 22 年 3 月 26 日

出願番号: 特願 2010-58903

発明者 津田洋幸、二口 充、徐 結苟

特許出願人: 公立大学法人名古屋市立大学

- 発明の名称: 生分解性試験方法及びフラレンファイバー含有医用材料

発明者氏名: 櫛島真一、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

なし

3. その他

なし

平成 2 1 年度厚生労働科学研究費補助金
(化学物質リスク研究事業)

Ⅱ. 分担研究報告書

平成 22 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：ナノマテリアルの慢性暴露による有害性評価指標の
開発に関する研究

研究分担者：菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部長

研究協力者：高木 篤也 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部室長

研究要旨

高生産量（HPV）ナノマテリアルに対する安全性評価手法の開発検討を優先して行うことを通して、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に、本年度はフラーレン投与マウスの腎への影響を6ヶ月まで経時的に調べる試験及び1年間の慢性毒性試験を実施した。その結果、6ヶ月試験において明らかな腎障害は確認されなかった。現在、1年間試験の組織学的検査を実施中である。また、繊維状物質の長短と悪性中皮腫誘発能の関係を明らかにすることを目的に、純粋な炭素からなり長さの異なる焼結フラーレンナノウィスカー（FNW）を雄 p53+/-マウスに単回腹腔内投与し、観察期間1年間の発がん性試験を開始した。

A. 研究目的

ナノマテリアルの物理化学的性状は、同一組成を持つ大きな構造体とは著しく異なり、この違いが産業的に新しい用途への開発として期待されているところであるが、一方で生体に対して、特にヒト健康影響に対する有害性評価に対しては、新たな危惧として捉えられる可能性を含んでいる。平成18～20年度の厚生労働科学研究「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」の分担研究課題「高生産量ナノマテリアルの有害性評価指標の開発に関する研究」に於いて多層カーボンナノチューブ（MWCNT）をp53+/-マウスに腹腔内投与すると中皮腫が誘発されることを明らかにした。また、体内で再分散したC₆₀などのナノマテリアルが再分布して影響を引き起こす可能性を示唆する知見を得た。一方、国外ではナノマテリ

アルの短期的影響の報告例は増えてきているが、慢性的影響を検討した報告はまだ少ない。そこで、本研究では中皮腫形成やナノ粒子の体内再分布に伴う慢性影響の発現メカニズムや新たな慢性影響の検索を行う。さらに、得られたエンドポイントを検出するための適切な指標を用いた短期的試験法やスクリーニング系の開発を行うことを目的とする。

B. 方法

実験 1.

マウスを用いたフラーレン腹腔内投与亜慢性・慢性毒性試験

フラーレン腹腔内投与で生じることが示唆された腎障害の発生過程を詳細に調べる目的で、C57BL/6 マウス腹腔内にフラーレンを投与し、経時的に腎への影響を調べる実験を実施した。なお、前年度にメチルセルローズ(MC)の腹腔内投与により腎障害が起こること(ロット差有り)を確認するとともに、その作用とフラーレンの作用が干渉する可能性を見出したことから、本実験では溶媒を生理食塩水系統とした。動物：1群 18 匹の雄 C57BL/6Cr マウス(13 週齢)または p53+/-マウス(16~18 週)を実験に使用した。フラーレンにはフロンティアカーボン社の最高純度の SUH (>99.9%、昇華精製品、Lot no. 7B 0044-A)を用いた。フラーレンは注射用生理食塩水(大塚製薬)に懸濁後、オートクレーブし、最終濃度 0.1%の tween80 を加えソニケーションした。対照群には検体を含まずに同様に調整した溶媒を投与した。フラーレンは 3mg/0.5ml/animal の用量にて単回腹腔内投与した。観察期間は投与後 2 週、8 週、6 ヶ月とし、各時点で 6 匹ずつ解剖を行った。

実験 2.

フラーレン及び graphite のマウスを用いた腹腔内投与慢性毒性試験

先行研究においてフラーレン腹腔内投与で生

じる可能性が示唆された腎障害の再現性を調べる目的で、C57BL/6 マウスにフラーレンを単回投与し 1 年間観察する慢性毒性試験を実施した。なお、陰性対照群として、同じく純炭素からなる graphite (黒鉛) 投与群を設定した。動物：1 群 20 匹の雄 C57BL/6Cr マウス(12 週齢)を実験に使用した。フラーレンにはフロンティアカーボン社の最高純度の SUH (>99.9%、昇華精製品、Lot no. 7B 0044-A)を用いた。Graphite は Alpha Aesar graphite powder, synthetic (conduction grade, -200 mesh, 99.9995%(metal basis)、Lot no. B17U014) (和光純薬工業)を用いた。フラーレンまたは graphite は注射用生理食塩水(大塚製薬)に懸濁後、オートクレーブし、最終濃度 0.1%の tween80 を加えソニケーションした。対照群には検体を含まずに同様に調整した溶媒を投与した。フラーレンまたは graphite は 3mg/0.5ml/animal の用量にて単回腹腔内投与した。観察期間は投与後 1 年とした。

実験 3.

長短のフラーレンナノウィスカーの p53(+/-) マウスを用いた腹腔内投与発がん性試験

繊維状物質の長さが悪性中皮腫誘発へ及ぼす影響を明らかにすることを目的に、純粋な炭素からなり(金属不純物の影響を排除出来る)、長さの異なる二種の焼結フラーレンナノウィスカー(FNW)を用いた発がん試験を以下のとおり実施した。

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

検体及び調整：焼結 FNW-long (長さの平均 7.56 μm 、直径の平均 586nm)、及び、焼結 FNW-short (長さの平均 1.32 μm 、直径の平均 365nm)は独立行政法人物質・材料研究機構の宮澤薫一博士が作成し、供与を受けたものを使用した。投与用量は線維数として各群とも 3×10^7 本/animal

とし、陽性対照群にはMWCNTを用いた。各検体は注射用生理食塩水（大塚製薬）に懸濁後、オートクレーブし、最終濃度0.1%のtween80を加えソニケーションした。対照群には検体を含まずに同様に調整した溶媒を投与した。観察期間は投与後1年とした。

（倫理面への配慮）

本実験は国立医薬品食品衛生研究所・動物実験委員会の規則及び承認のもとに人道的に実施された。ナノマテリアル類の実験に際しては、当研究所の専用特殊実験施設内で、その運用規則に従い実施しており、暴露・漏洩を防止する対策については万全を期して実施している。

C. 研究結果

実験 1.

マウスを用いたフラーレン腹腔内投与亜慢性・慢性毒性試験

各投与群とも死亡は認められず、一般状態、体重に対照群と比較して変化は認められなかった。また、2及び8週目の途中解剖動物及び6ヶ月目の最終解剖動物では病理組織学的検査の結果、腎に明らかな毒性学的変化は認められなかった。

実験 2.

フラーレン及び graphite のマウスを用いた腹腔内投与慢性毒性試験

一般状態、生存率、体重に対照群と比較して変化は認められなかった。投与後12ヶ月の最終解剖動物において肉眼的に明らかな腎への影響は見られなかった。現在、病理組織学的検査を実施している。

実験 3.

長短のフラーレンナノウiskアーの p53(+/-) マウスを用いた腹腔内投与発がん性試験

本試験を2011年3月より開始した。現時点で約2週間が経過し、いずれの群においても死亡は認められていない。

D. 考察

フラーレンに関しては前年度までの実験でマウス単回腹腔内投与の結果、明らかにフラーレン投与群で肉眼的に腎の異常が認められた。組織学的にも尿細管萎縮が認められた。しかし、溶媒に含まれるMCを除いたフラーレンの腹腔内投与試験では現時点までの検索において腎障害作用を示唆する知見が得られていない。このことから、フラーレン単独では腎障害を起こさないか、微弱である可能性が示唆されたが、現在、1年間試験の病理検査を実施中であり、最終的な結論を導出中である。MCの標的は糸球体であることが報告されているが、先行実験での腎障害は尿細管～集合管障害が中心であり、2剤の複合的作用の結果（糸球体透過性更新によるフラーレンの尿細管到達量の増加、等）を考慮する必要がある可能性が示唆された。

これまでの先行研究により、アスベスト中皮腫の短期発がんモデル系として知られているp53(+/-)マウスを用いて、MWCNTの発がん性の用量反応試験を実施した結果、最低用量の0.003mg/animal投与から用量に依存して中皮腫が発生することが明らかとなった。焼結FNWは形状がカーボンナノチューブに似ているが、遷移金属を全く含まない炭素繊維である。今回、5マイクロメートルより長いFNWと短FNWを比較することにより、鉄によるフェントン反応などの交絡要因を排した条件下で、もっぱら繊維の長さによる中皮腫誘発能の比較が可能となる。これにより繊維発がんのメカニズムの解釈が一段容易になることが期待される。

E. 結論

1. 腎障害作用を有するMCを除いた溶媒を用いたフラーレンの6ヶ月及び1年間の実験を完了した。6ヶ月の試験では腎への明らかな影

響は認められなかった。1年試験の最終判定中である。

2. 長短の焼結FNWの1年間の中皮腫発がん実験を開始した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Hirose A, Takagi A, Nishimura T, Tsuda H, Sakamoto Y, Ogata A, Nakae D, Hino O, Kanno J., Importance of researches on chronic effects by manufactured nanomaterials., *Yakugaku Zasshi*. 2011;131(2), 195-201.

Horibata, K, Ukai A, Koyama N, Takagi A, Kanno J, Kimoto T, Miura D, Hirose A, Honma M, Fullerene (C60) is negative in the *in vivo pig-A* gene mutation assay, *Genes and Environment*, 33, 27-31, 2011.

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. Involvement of macrophage inflammation protein 1{alpha} (MIP1{alpha}) in promotion of rat lung and mammary carcinogenic activity of nano-scale titanium dioxide particles administered by intra-pulmonary spraying. *Carcinogenesis*. 2010;31(5), 927-35

2. 学会発表

菅野 純、 μm サイズのカーボンナノチューブの中皮腫誘発作用、第99回日本病理学会総会 (2010.4.27) (東京)、口演

菅野 純、工業ナノマテリアルの毒性評価、特に慢性毒性について、第83回日本産業衛生

学会 (2010.5.28) (福井)、口演

菅野 純、ナノマテリアルの毒性学、第51回日本臨床細胞学会総会 (春期大会) (2010.5.30) (横浜)、口演

Jun Kanno, Nanomaterial toxicology - importance of chronic toxicity assessment, XII INTERNATIONAL CONGRESS OF TOXICOLOGY, 2010.7.22, Barcelona, Spain, Oral

菅野 純、ナノマテリアルの毒性評価、真空・表面科学合同講演会 第30回表面科学学術講演会 第51回真空に関する連合講演会 2010年11月4日 大阪 招待講演

Jun Kanno, Toxicity assessment of carbon nanotubes and other nanomaterial. 4th International Workshop on CNT's Toxicology and Safety. 2010.11.8 Nagano, Japan

H. 知的財産所有権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

平成 22 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の評価手法の開発のための有害性評価および体内動態評価に関する基盤研究

分担研究課題名：ナノマテリアルの発がん性評価手法の開発に関する研究

研究分担者：津田 洋幸 名古屋市立大学 特任教授

研究協力者：酒々井 眞澄 名古屋市立大学大学院医学研究科 分子毒性学 教授

深町 勝巳 名古屋市立大学大学院医学研究科 分子毒性学 助教

徐 結苟 名古屋市立大学大学院医学研究科 分子毒性学 研究員

David B. Alexander 名古屋市立大学大学院医学研究科分子毒性学 客員教授

研究要旨

吸入曝露肺発がんリスク短期検索法を確立した。この方法は我々が開発した経気管肺内噴霧法を用い、1) 発がん二段階法を応用した肺内噴霧発がんプロモーション作用中期検索法を用いた肺発がん性の評価、2) 被検物質の短期（9または14日間）肺内噴霧による肺発がんプロモーション発現機序の検索、および3) 肺胞マクロファージ等を用いたプロモーション/毒作用の解析を実施して、吸入曝露による肺発がんリスク評価が短期間で可能となる方法を開発した。本研究では、この吸入曝露肺発がんリスク短期検索法の検証をする目的で、被検物質として、三井化学（株）社製多層カーボンナノチューブ（MWCNT-M）およびナノサイズ酸化亜鉛粒子（nZnO、テイカ社製、非コーティング MZ-500、作成時粒径 20-30nm、投与時生食液中の平均粒径 10.4 μm、80%が 3.76 - 26.7 μm に分布）を被検物質として選び、1) ~ 3) の方法によって吸入曝露による発がんリスクおよび毒性を検索した。MWCNT-M においては、1) において明らか肺発がん促進作用は見られなかった。2) と 3) においては、MWCNT を貪食したマクロファージが IL-6, CSF3, IGFBP5 などのサイトカインを分泌し、肺胞上皮（ヒト肺癌細胞）の増殖を促進することが示された。nZnO においては、1) において間質性肺炎と肺発がん促進作用ならびに単独投与にて終末細気管支過形成がみられた。2) および、3) において、nZnO を貪食したマクロファージが CXCL5, CXCL11 および CCL7 などのケモカインを分泌し、肺胞壁線維芽細胞の増殖を促進することが示された。以上から、MWCNT-M の発がん促進作用、nZnO の発がん作用についてはさら検証をする必要があるが、1) ~ 3) の一連の試験系によって、発がん性および毒性への関与とその機序について 40 週以内で評価出来る系を開発した。

A. 研究目的

ナノマテリアルは、人類に大きな貢献をもたらす新素材として期待されているが、製造、パッキング現場さらに使用にあたって、エアロゾル形態をとる場合に吸入曝露される可能性がある。一方、吸入曝露試験を行うには特殊な設備と膨大なコストを要するため、長期の試験期間が必要な発がん性と慢性毒性については未だデータは得られていない。

我々は、専用の吸入曝露設備を要しない試験法として、簡便で実験者に安全な経気管肺内噴霧法を開発した。この方法を用いて、1) 二段階発がんモデルを用いた肺発がんプロモーションと慢性毒性中期検索法の開発、2) 9日～14日間投与による肺発がんおよび毒性発現機序の検索、および、3) *in vitro* の機序解析法を開発することによって、肺発がんリスクおよび毒性評価が短期間で可能とする方法を開発してきた。

これまでに、この方法を用いて二酸化チタニウム (nTiO₂) の噴霧曝露による肺発がんリスクとその機序を検索し、肺内に噴霧投与された nTiO₂ は肺胞マクロファージに貪食され、このマクロファージから分泌されたケモカインの MIP1 α が、肺胞上皮細胞の増殖を促進させることを見だし、肺発がんプロモーション作用機序の一端を明らかにした (Jiegou, Xu et al. Carcinogenesis, 2010)。さらに MIP1 α が血清中に検出されることから、発がん、曝露マーカーとしての実証研究に発展している。

カーボンナノチューブ (CNT) は、軽量、高強度、かつしなやかな弾性力をもつが、その形態がアスベストと類似していることから、異物として作用して中皮腫を発生させることが危惧されていた。最近、多層 CNT (MWCNT-M) は、マウスおよびラットの腹腔内投与によって中皮腫が発生させることが分ってきた。ナノサイズ酸化亜鉛粒子 (nZnO) は、化粧品、白色顔料、医薬品、電子部品などに用いられているが、ヒト皮膚表皮細胞の DNA 損傷やバクテリアに毒性を示す報告があり、吸入曝露の場合にもリスク評価が求められている。

本研究では、被検物質として、MWCNT-M およびナノサイズ酸化亜鉛粒子 (nZnO) (テイカ社製、非コーティング MZ-500、作成粒径 20-30nm、溶液中の平均粒径 10.4 μ m、median 11.1 μ m、80%が 3.76~26.7 μ m に分布) を被検物質として選び、1) 二段階発がんモデルを用いた肺発がんプロモーション/毒作用中期検索法の開発、2) 9日または14日間投与による肺発がんプロモーション/発がん性ならびに毒性発現機序の検索、および、3) *in vitro* 発がん毒性発現機序の検索法によって、肺発がん/毒性リスク中期評価法の実用に向けての検証を行った。

B. 研究方法

MWCNT-M

1) 二段階発がんモデルを用いた肺発がんプロモーション作用/発がん性中期検索法

6週齢の雄 F344 ラットに肺発がん物質 N-nitrosobis (2-hydroxypropyl) amine (DHPN) を最初の2週間 0.2%の用量で飲水投与した。その2週間後より、MWCNT-M を 125 および 250 μ g/ml の濃度で Rock Candy (氷砂糖) Solution に懸濁し、オートクレーブ滅菌後、使用 20 分前まで超音波処理を行った投与液を、イソフルレン浅麻醉下で Micro-sprayer (楸DIMS) を気管内に挿管し、被検物質懸濁液を 0.5ml 肺内に週に1回、44週まで気管内噴霧した。肺および全身諸臓器を取り出し、パラホルムアルデヒドで1日固定し、病理学的に肺腫瘍性病変の発生頻度・個数の定量解析を行った。

2) 9日間投与による肺発がん機序の検索

MWCNT-M を上記1)と同じ方法で懸濁し、250ppm 懸濁液 0.5ml を2日に1回計5回、肺内に噴霧した。14日目に屠殺剖検し、肺を病理組織学のおよび電顕的に観察した。左肺組織の一部から DNA を抽出し、8-OHdG level 測定キットを用いて、肺組織中の 8-OHdG レベルを測定し、酸化ストレスの程度を検索した。