

Fig. 2. Light microscopic view of administered MWCNT suspension: A) Ground MWCNT suspension, sizes of agglomerates were smaller than non-ground MWCNT suspension and finely dispersed fibers were seen. B) Non-ground MWCNT suspension, large agglomerates and small number of dispersed fibers were seen. Original magnifications were $\times 400$.

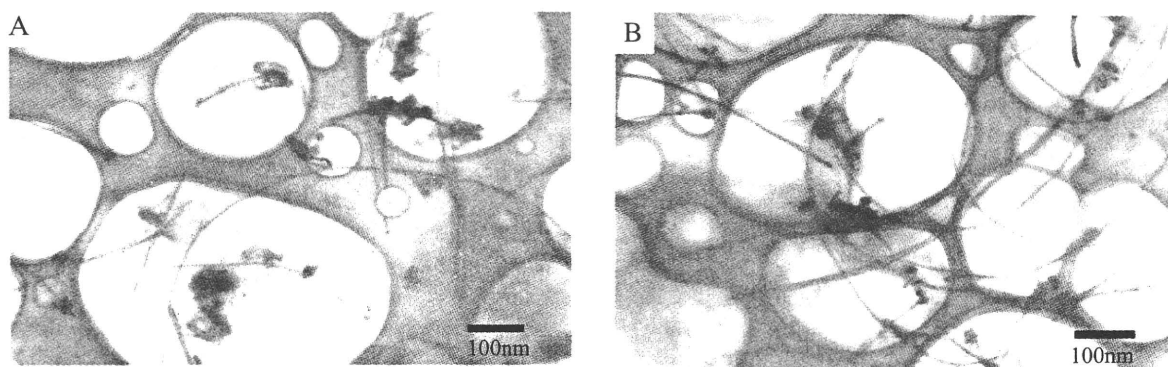


Fig. 3. Transmission electron microscopic view of administered MWCNT suspension: A) Ground MWCNT suspension, short fibers were seen. B) Non-ground MWCNT suspension, long fibers were seen.

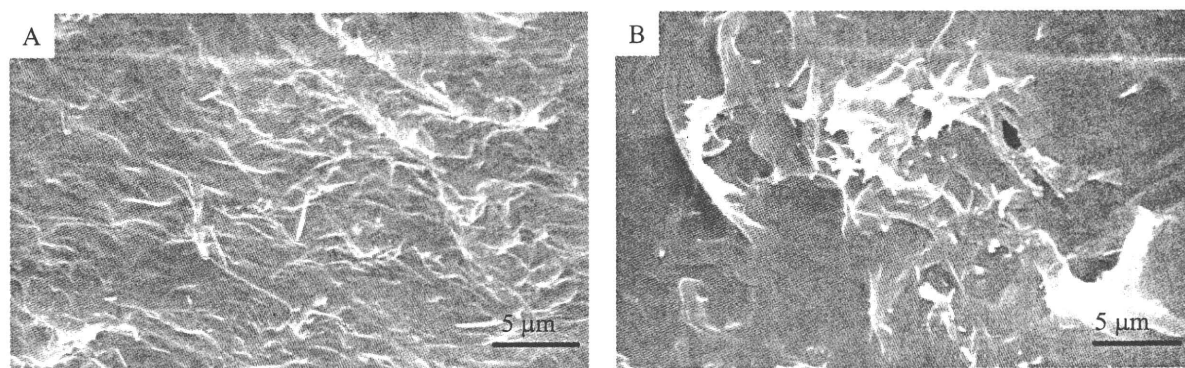


Fig. 4. Scanning electron microscopic view of administered MWCNT suspension: A) Ground MWCNT suspension, uniform suspended condition was seen with small size of fibers. B) Non-ground MWCNT suspension, non-uniform suspended condition and agglomerates were seen.

Effects of MWCNT suspension preparation method to pulmonary toxicity

the non-ground MWCNT and ground MWCNT on Day 8, ground MWCNT and Min-U-Sil on Day 29, as well as Min-U-Sil on Day 91. Higher protein levels in BALF were observed in all treated rats on Day 91 (Fig. 6). There were no remarkable differences in these parameters between rats given the non-ground and ground MWCNT.

Histological examination

Tables 1 and 2 summarized histopathological findings. Black patches in the lung and blackish change of the bronchiolar lymph nodes were macroscopically observed in rats given the non-ground and ground MWCNT. MWCNT, which was "blackish" in color, and was microscopically observed in the alveolar region of rats given the ground MWCNT on Day 2. In rats given the non-ground MWCNT, MWCNT was slightly observed in the bronchial region. On Day 8 or later, focal infiltration of MWCNT-laden macrophages were observed in the interstitium of the lung of rats given the non-ground MWCNT, compared to rats given the ground MWCNT, where macrophages were observed mainly in the alveolus. Ultrastruc-

turally, the macrophages in the alveolus of rats given the ground MWCNT had well-developed lysosomes (Figs. 7 and 9). In the bronchiolar lymph nodes of rats given the non-ground and ground MWCNT, there were black colored macrophage infiltrations, which were thought to be phagocytosed MWCNT. The severity of the black colored macrophage infiltrations in the bronchiolar lymph nodes progressively increased after Day 29 in rats given the ground MWCNT (Fig. 8). Focal inflammatory cell infiltration in the lungs was observed in rats given the non-ground and ground MWCNT on Day 2 only, however, it was observed in rats given Min-U-Sil not only on Day 2 but also on Day 92. In rats given Min-U-Sil, granuloma in the bronchiolar lymph nodes was observed on Day 92.

DISCUSSION

This study led to a conclusion that the ALS is one of the most suitable vehicle media to suspend MWCNT for intratracheal instillation. Buford *et al.* (2007) reported that the vehicle containing some protein, lipid or protein/

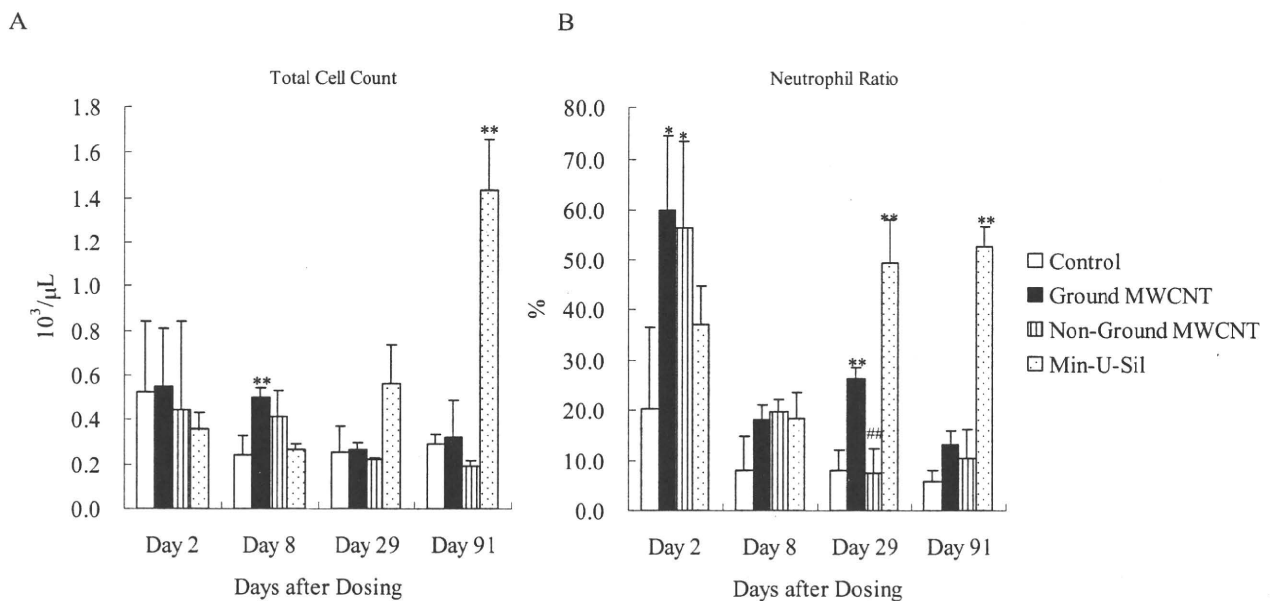


Fig. 5. A) Total cell count in broncho-alveolar lavage fluids (BALF) from rats exposed to non-ground and ground MWCNT, and corresponding controls on days 2, 8, 29, and 91 (day of dosing designated as day 1). Values are mean \pm S.D. Ground MWCNT induced significantly increasing of total cell count in BALF on day 8, $^{***}p < 0.01$. Min-U-Sil induced significantly increasing of total cell count in BALF on day 91, $^{***}p < 0.01$.

B) Neutrophil ratio in BALF from rats exposed to ground, non-ground MWCNT and corresponding controls on days 2, 8, 29, and 91. Values are mean \pm S.D. Ground and non-ground MWCNT induced higher neutrophil ratio in BALF on days 2, $^{*}p < 0.05$, and ground MWCNT induced the higher neutrophil ratio on day 29, $^{***}p < 0.01$. Neutrophil ratio in non-ground MWCNT on day 29 significantly lower than ground MWCNT, $^{###}p < 0.05$. Min-U-Sil induced higher neutrophil ratio on days 29 and 91, $^{*}p < 0.01$.

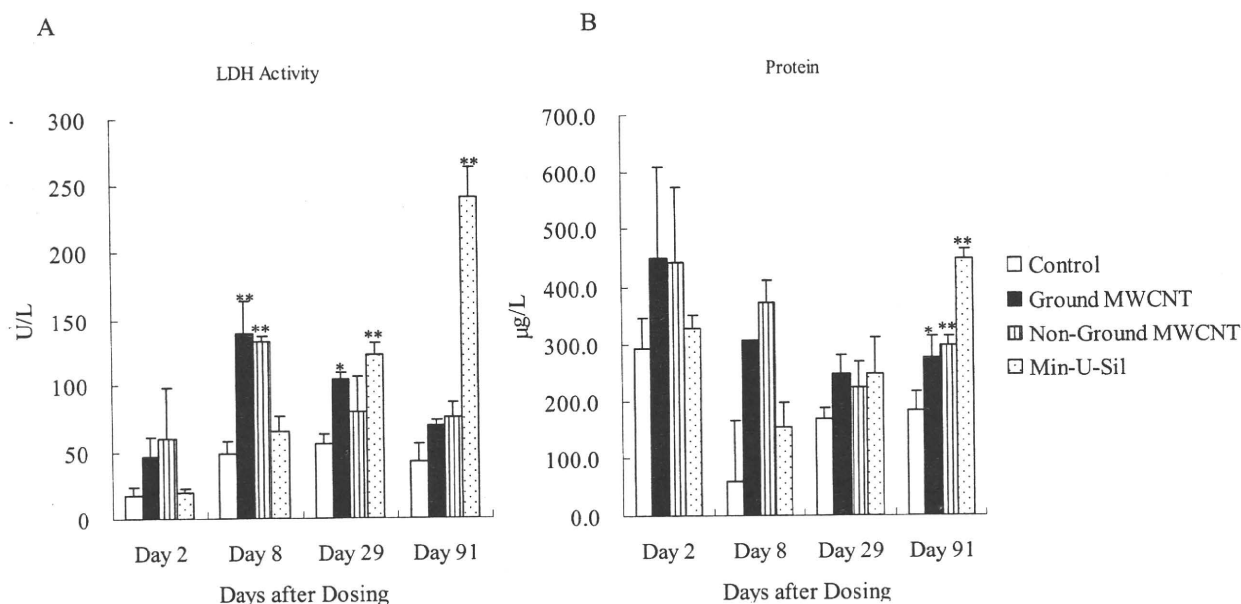


Fig. 6. A) LDH activity in BALF from rats exposed to non-ground and ground MWCNT, and corresponding controls on days 2, 8, 29, and 91 (day of dosing designated as day 1). Values are mean \pm S.D. Ground MWCNT induced significantly increasing of LDH activity on days 8 and 29, non-ground MWCNT induced higher LDH activity on day 8 only, * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$. Min-U-Sil induced higher LDH activity on days 29 and 91, ** $p < 0.01$. B) Total protein concentration in BALF from rats exposed to ground, non-ground MWCNT and corresponding controls on days 2, 8, 29, and 91. Values are mean \pm S.D. Ground and non-ground MWCNT, and Min-U-Sil induced higher protein level in BALF on day 91, * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

lipid component could disperse carbon nanotubes appropriately. Since the ALS used in this study is an extraction from bovine lung, which includes phospholipids, free fatty acids, and triglyceride, the results of this study did not contradict their report (Buford *et al.*, 2007). Additionally, although no remarkable adverse effects were noted by dosing of the xenogeneic media, the possible pulmonary toxicity of MWCNT may have to be evaluated by removing the influence of the xenogeneic agent. It is considered that the suspension preparation method recently reported (Buford *et al.*, 2007; Sager *et al.*, 2007) is suitable for this purpose.

The results of this study suggested that the wet-grinding in an agate mortar was useful to prepare uniform dispersed suspension, because it was confirmed that the grinding reduced the number and the size of the agglomerates in the suspensions. Since grinding with a mortar is a simple procedure, it was concluded that this method is appropriate for preparation of any other CNT suspensions for intratracheal instillation. Furthermore, this method reduced generation of MWCNT aerosol when conducted under wet conditions. This suggested that the possibility of inhalation of aerosolized MWCNT to human could be

reduced with this method.

There were remarkable differences between the ground MWCNT and non-ground MWCNT in the BALF chemistry analysis on Day 29. Higher neutrophil ratios and LDH levels in the BALF were observed in rats given the ground MWCNT on Day 29. In contrast, such changes were not noted in rats given the non-ground MWCNT. There were remarkable differences in histological changes of the lungs between rats given the ground and non-ground MWCNT. In rats given the ground MWCNT, remarkable macrophage infiltration in the alveolus was observed, but in the interstitium it was relatively weak. In contrast, there was predominant macrophage infiltration in the interstitium of rats given the non-ground MWCNT.

Muller *et al.* (2005) reported that ground MWCNT led the pulmonary lesion characterized by the interstitial fibrosis in the lungs. MWCNT-laden macrophage infiltration in the alveolus was considered to be attributable to the relatively short fiber, which was generated by grinding. The acceleration of phagocytic activity, which was demonstrated as an increase of developed lysosomes supported our speculation.

There were no inflammatory responses in the bronchi-

Table 2. Numbers of rats indicating the histopathological lesions in the lung of rats given ground or non-ground multiwall carbon nanotube, Min-U-Sil, or artificial lung surfactant

Organ	Findings	Group name											
		Control			Ground MWCNT			Non-Ground MWCNT			Min-U-Sil		
		Grade	Day:	2 8 29 92	2 8 29 92	2 8 29 92	2 8 29 92	2 8 29 92	2 8 29 92	2 8 29 92	2 8 29 92		
Lung (and bronchus)													
	Accumulation, administered substance, alveolus	1		0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	3 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0
		2		0 0 0 0	2 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0
		3		0 0 0 0	1 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0
	Accumulation, administered substance, bronchus	1		0 0 0 0	2 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0
		2		0 0 0 0	1 0 0 0	0 0 0 0	2 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0
		3		0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	1 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0
	Atelectasis, focal	1		0 0 0 0	1 0 0 0	0 0 0 0	2 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0
		2		0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	1 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0
	Cell infiltration, inflammatory, focal	1		0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	2 0 2 3	0 0 0 0	0 0 0 0
		2		0 0 0 0	3 0 0 0	0 0 0 0	2 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0
		3		0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	1 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0
	Cell infiltration, macrophage, alveolus, focal	1		0 0 0 0	3 1 1 0	0 3 1 1	0 3 1 1	0 3 1 1	0 3 1 1	0 3 1 1	0 1 1 0	0 1 1 0	0 1 1 0
		2		0 0 0 0	0 2 2 3	0 2 2 3	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 3
	Cell infiltration, macrophage, interstitium, focal	1		0 0 0 0	0 3 3 3	0 3 3 3	0 0 1 0	0 0 1 0	0 0 1 0	0 0 1 0	0 0 1 2	0 0 1 2	0 0 1 2
		2		0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 3 1 3	0 3 1 3	0 3 1 3	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0
	Erosion, bronchus	1		0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	2 0 0 0	2 0 0 0	2 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0
	Hyperplasia, lymphoid tissue	1		0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	1 0 0 0	1 0 0 0	1 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0
	Hypertrophy, alveolar epithelium, focal	1		0 0 0 0	3 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0
	Hypertrophy, bronchial epithelium	1		0 0 0 0	3 1 0 0	3 1 0 0	2 1 0 0	2 1 0 0	2 1 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0

Note: values indicate number of animals indicating lesion.
Grade: 1 = minimal, 2 = mild, 3 = moderate. Day: day of intratracheal instillation designated as Day 1.

Effects of MWCNT suspension preparation method to pulmonary toxicity

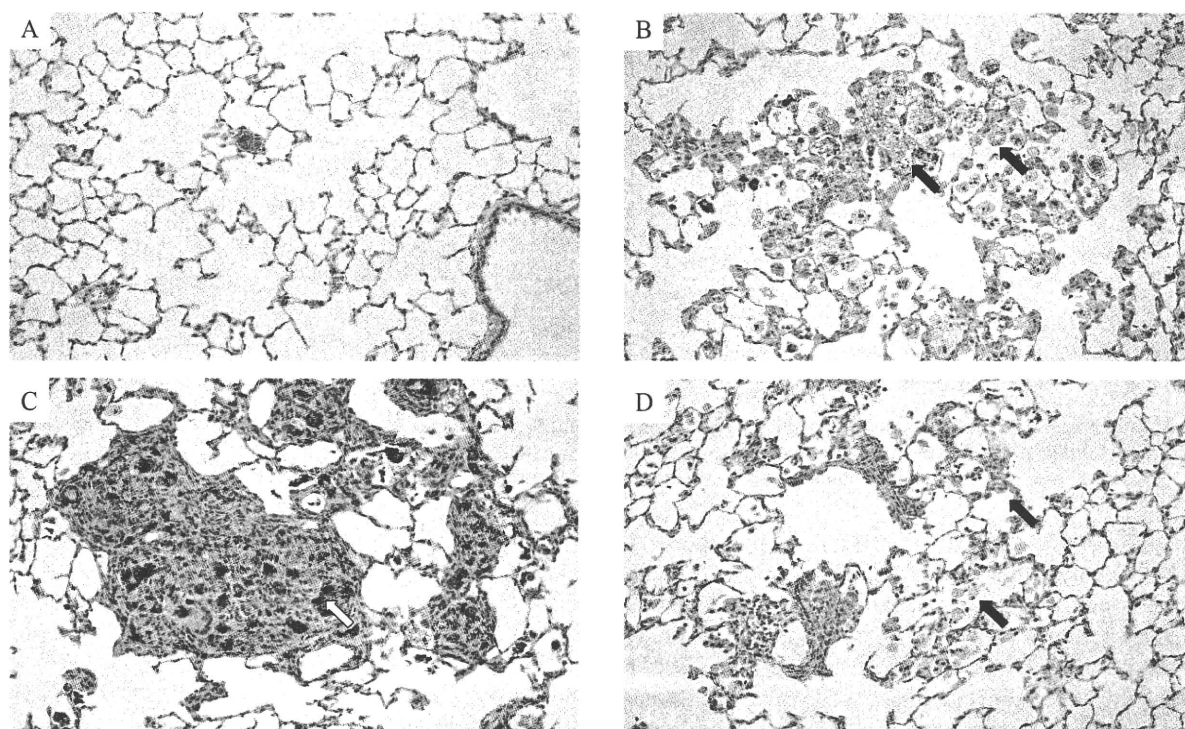


Fig. 7. Light microscopy of the lungs of rats exposed to non-ground and ground MWCNT, and corresponding controls on day 29. A) Control, no remarkable change. B) Ground MWCNT, foamy macrophage infiltration in alveolus. C) non-ground MWCNT, macrophage infiltration in interstitium. D) Min-U-Sil, foamy macrophage infiltration in alveolus.

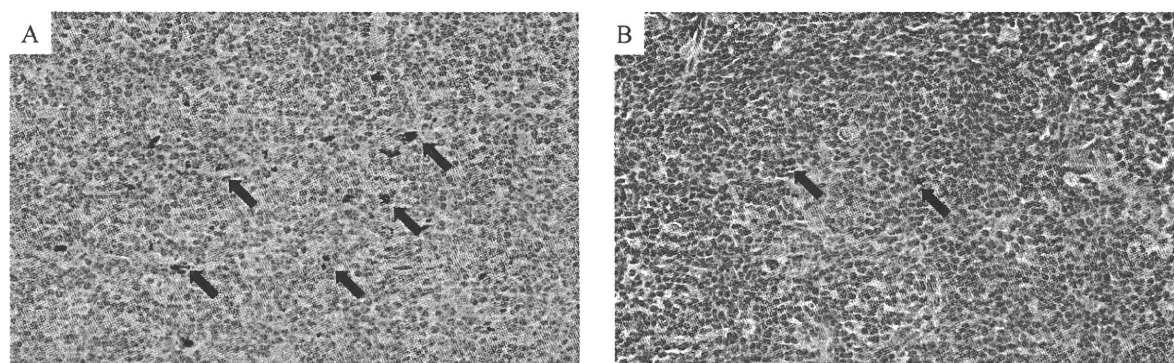


Fig. 8. Light microscopic view of bronchiolar lymph node of rats exposed to non-ground or ground MWCNT on day 29. A) Ground MWCNT: remarkable infiltration of macrophage including MWCNT without any inflammatory reactions than non-ground MWCNT. B) Non-ground MWCNT: infiltration of macrophage including MWCNT without any inflammatory reactions.

olar lymph nodes of rats given MWCNT. Since inflammatory change in the bronchiolar lymph nodes was observed in rats given Min-U-Sil, the biological activity on the discharge process of foreign body from the respiratory tract is considered to be remarkably different between MWC-

NT and Min-U-Sil.

It is estimated that the aerodynamic sizes of MWCNT become smaller than their original size, because MWCNT is widely used after the grinding process (Liu *et al.*, 2004). In fact, it is expected that MWCNT, which has

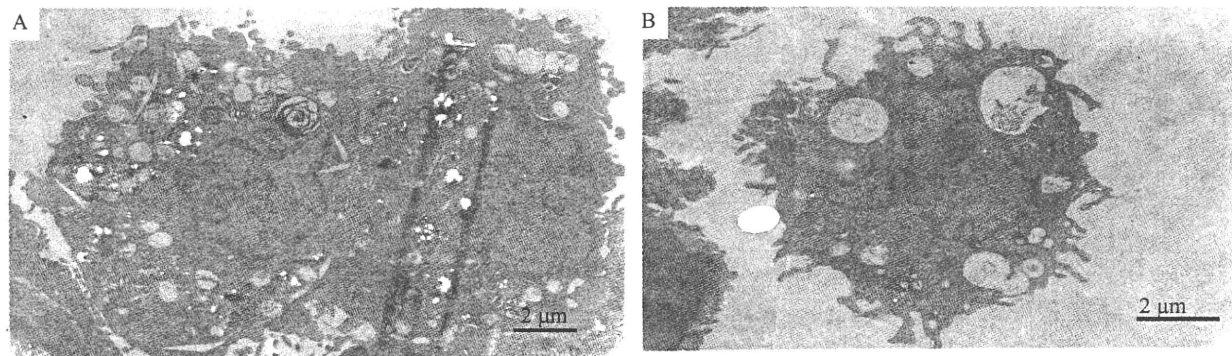


Fig. 9. Transmission electron microscopic view of macrophage in alveolus of rat exposed to non-ground or ground MWCNT. A) Ground MWCNT: macrophage in alveolus had lysosomes which developed remarkably. B) Non-ground MWCNT: macrophage in alveolus on day 29, there were no remarkable lysosomes.

small aerodynamic diameter due to the grinding, reaches deep into the lung in an occupational environment. The pulmonary toxicity of MWCNT obtained in this study was different from the recent report (Muller *et al.*, 2005). Consequently, it is considered that the available information on MWCNT induced pulmonary toxicity is not sufficient to evaluate the effects on human health. Since both of the above-mentioned studies did not have characterization data of the instilled suspensions, the pulmonary toxicity could not be compared between the studies. Therefore, the fibers in the suspensions must be characterized, at least for their length, diameter, and dispersion conditions in order to make a comparison with recent reports. Furthermore, the present study indicated that the different pulmonary toxicity occurred depending on the size of the particles in the suspension. These results suggested that the proper evaluation of the pulmonary toxicity of nanomaterial must include characterization of the instilled suspensions, even if it was only a single material.

There were no inflammatory reactions in the lung or bronchiolar lymph nodes in the rats given MWCNT 3 months after instillation. However, higher protein concentrations in BALF were observed in rats given MWCNT. Moreover, the long term effect of MWCNT on the lungs caused by grinding or non-grinding remained unclear in this study. These findings lead us to conclude that additional studies, such as examination of the fate of MWCNT in the lung and its long term effects on the lung are necessary.

ACKNOWLEDGMENT

This study was supported by Health Sciences Research Grants H18-kagaku-ippan-007 from the ministry of

Health, Labor, and Welfare, Japan.

REFERENCES

- Buford, M.C., Hamilton, R.F. and Holian, A. (2007): A comparison of dispersing media for various engineered carbon nanoparticles. Part. Fibre Toxicol., **4**, 6.
- Donaldson, K., Aitken, R., Tran, L., Stone, V., Duffin, R., Forrest, G. and Alexander, A. (2006): Carbon nanotubes: A review of their properties in relation to pulmonary toxicology and workplace safety. Toxicol. Sci., **92**, 5-22.
- Lam, C.W., James, J.T., McCluskey, R., Arepalli, S. and Hunter, R.L. (2006): A review of carbon nanotube toxicity and assessment of potential occupational and environmental health risks. Crit. Rev. Toxicol., **36**, 189-217.
- Liu, C.H., Huang, H., Wu, Y. and Fan, S.S. (2004): Thermal conductivity improvement of silicone elastomer with carbon nanotube loading. Appl. Phys. Lett., **84**, 4248-4250.
- Muller, J., Huaux, F., Moreau, N., Misson, P., Heilier, J., Delos, M., Arras, M., Fonseca, A., Nagy, J.B. and Lison, D. (2005): Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes. Toxicol. Appl. Pharmacol., **207**, 221-231.
- Poland, C.A., Duffin, R., Kinloch, I., Maynard, A., Wallace, W.A.H., Seaton, A., Stone, V., Brown, S., Macnee, W. and Donaldson, K. (2008): Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. Nat. Nanotechnol., **3**, 423-428.
- Sager, T.M., Porter, D.W., Robinson, V.A., Lindsley, W.G., Schwegler-Berry, D.E. and Castranova, V. (2007): Improved method to disperse nanoparticles for *in vitro* and *in vivo* investigation of toxicity. Nanotoxicology, **1**, 118-129.
- Takagi, A., Hirose, A., Nishimura, T., Fukumori, N., Ogata, A., Ohashi, N., Kitajima, S. and Kanno, J. (2008): Induction of mesothelioma in p53^{+/-} mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube. J. Toxicol. Sci., **33**, 105-116.

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

国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター

菅野 純
広瀬 明彦

『ナノ材料のリスク評価と安全性対策』

2010年6月 フロンティア出版刊 抜刷

第1章 有害性評価研究とナノ材料

1 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

菅野 純*¹, 広瀬 明彦*²

1.1 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、このナノテクノロジーの中心的な役割を担う新規物質としてのナノマテリアルは、少なくとも1次元の大きさが100ナノメートル以下である物質として定義され、近年急速にその種類や生産量が増加してきている。これらナノマテリアルの物理化学的性状は、同一組成を持つ従来のバルク体のような大きな構造体で得られる性状とは著しく異なることが示されており、この新たな物理化学的性状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。しかし、この物理化学的性状は、一方で生体とのこれまでに知られていなかった新たな相互作用を引き起こす可能性を内包していると想定され、特にヒト健康影響に対する安全性評価を行う際には、新たな危惧として捉えられる可能性も含んでいる。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する他、長期間の暴露や廃棄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。従って、ナノマテリアルの使用が本格的に拡大する前に、そ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。

健康影響に対する化学物質の安全性評価に関して、これまで通常の毒性評価は、基本的に対象物質の化学組成と重量に基づいて行われている。したがって、構造体そのものの大きさに対しては、アスベストや塵肺症原因物質などを除き、特別の考慮はされてきていないことから、ナノマテリアルのナノサイズ効果に基づく物理化学的的特性を考慮した毒性試験法や有害性評価手法の開発が急務となっている。行政的な見地に立っても、化審法等これまでの法令に基づく化学物質組成を対象にした安全管理システムでは、生体内へ吸収されないと考えられる高分子ポリマーを除いて、物質の大きさを意識した管理システムになっておらず、化学物質の行政

* 1 Jun KANNO 国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 毒性部 部長

* 2 Akihiko HIROSE 国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 総合評価研究室 室長

的申請／認可体制における産業用ナノマテリアルの安全性評価においても、その大きさに依存した特性を評価し、管理するシステムの追加、あるいは全く新たな枠組みに基づく登録システム等の構築が必要とされる。また、化審法に限れば、既存化学物質として評価済みの組成、或いは単一元素からできたナノマテリアル、例えば、炭素のみから成るカーボンナノチューブやフラーレンは、現行の化審法上では審査を必要とされていない。また、酸化チタンなどはすでに化粧品原料として広く使用されており、これらの物質の安全性の評価は急務である。

本稿では、これらの新たな基準のもとに評価される必要のあるナノマテリアルの安全性評価手法を検討するうえで、考慮すべき観点を概説する。特に、ナノマテリアルの多くが持つ難溶性、難分解性で凝集しやすい性質は、安全性試験法の開発において重要な因子であると共に、一旦吸収された後は、生体内での長期の蓄積性(残留性)とそれに基づく慢性影響の有無に大きく関連すると考えられる。ところで、この生体内残留性と関連する慢性影響(催腫瘍性)に関して、我々はすでにアスベストがその代表的な例の一つであることを知っている。そして、ナノマテリアルとして代表的なカーボンナノチューブの中でもその形状がアスベストに類似しているものが腹腔内投与により中皮腫を引き起こすことが最近示された。本稿の後半では、新たな評価手法の確立とは別に、すでに適用可能な知見としてのアスベスト様サイズの繊維状粒子による催腫瘍性研究の解説とナノチューブ安全性研究への適用性と新たな課題について概説する。

1.2 リスクアセスメントにおける課題

1.2.1 体内動態の重要性

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・統合化する過程である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¹⁻⁵⁾が、ナノマテリアルに特徴的な新たな物理化学的性質に鑑みると、体内動態(吸収 absorption, 分布 distribution, 代謝 metabolism, 排泄 excretion)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ている。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粒子状物質が、生体内に侵入が可能なサイズにまで小さくなることを意味しているかも知れない。その結果は、生体組織との間にこれまで起こらなかった新たな反応を引き起こす可能性を示す。また、重量あたり、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は、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。一方、暴露する物質と生体反応性の

相関性を解析するような用量反応評価や暴露評価の段階においては、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用量依存的な定量評価が可能になることも指摘されている。これらのことは、ナノマテリアルによる生体影響はその化学構成成分に対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した生体反応であ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ことも想定される。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を意味している。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体内動態の性質の違いにより毒性(生体影響)の質や強さが大きく変わ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。

このような体内動態情報を取得するためには、まず生体試料中でナノマテリアルを検出、同定・定量できる方法を確立しなくてはならない。ナノマテリアルの存在量を定量する手法としては、測定対象物質を生体試料から分離・単離し、測定することが常套手段となる。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定量可能である。しかし、これらの方法では、ナノマテリアルの存在量を評価することは可能であるが、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(ナノサイズなのか、凝集しているのか等)を把握することはできない。最終的には、組織標本の電子顕微鏡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、特定の分析機器による定量測定が困難であり、電子顕微鏡で本数や形態を手動で計測する以外に確実に測定する方法はない。代替手段としては、対象物質に標識をつ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。

1.2.2 影響評価のための試験系確立の必要性

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、この凝集性は体内動態に対して重要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、界面活性剤など、親水・疎水両領域を持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が、リポソーム自身の細胞への影響に注意する必要がある。

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、オリーブ油などの食品用油脂、膜構成脂質成分、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)、 γ -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、数百 ppm ま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。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が、ナノマテリアルの残留性や浸透性に影響を与えることを考慮しなくてはならない。

現在のところ、生体内吸収の観点から最も健康影響に対する懸念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、産業用ナノマテリアルに限らず微粒子の吸入暴露研究は、金属、鉱物粒子、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化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方法と、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。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。分散媒体としては Tween 等の界面活性剤や肺サーファクタントなどの使用が検討されている。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。これらアスベスト様繊維については、肺がんや中皮腫、肺線維症の誘発は重要な影響であり、特に中皮腫誘発性に関しては、腹腔内投与による試験系が古くから感受性の高い試験であるとされており、次項ではその適用性と最新の知見について解説する。

1.3 カーボンナノチューブの安全性

1.3.1 アスベスト様繊維状粒子による過去の知見

カーボンナノチューブは単層または多層の形状を持ち、それぞれ単層カーボンナノチューブ(SWCNT)および多層カーボンナノチューブ(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の異なる様々な種類が存在する。一方、ある種の MWCNT の形状や大きさはアスベストに類似していることに、潜在的な懸念としての関心が持たれていた。アスベスト様繊維による催腫瘍性の強さを規定している最も重要な因子は、特徴的な繊維径と繊維長に加えて、数年から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、現時点でも *in vitro* 実験や短期の動物試験により催腫瘍性を実証することが困難であり、長期の動物試験による確認が必要とされている。Davis(1989)ら⁶⁾のラットを使った吸入実験では、20 μm 以上の繊維数の多い chrysotile でアスベスト線維症と発がん性が強くなる傾向が示唆されている。このように、アスベスト様繊維による催腫瘍性は吸入暴露された際の肺への長期間の沈着により確認されるものであるが、吸入暴露による長期の動物試験は、特殊な実験設備を長期間維持する必要がある、膨大な手間と経費がかかることが知られている。

一方、アスベストによる実験動物の中皮腫の誘発は、Wanger らにより、ラットの胸腔内へのアスベスト埋入実験によっても再現されることが示されている。さらに、Stanton(1981)ら⁷⁾による様々な径と長さの分布を持つアスベストを含む鉱物系繊維を胸膜に埋入した実験により、径が 15 μm 以下で、長さが 4 μm 以上の繊維の割合が多いものが、発がん性の強いことが示唆されている。これらの様々な知見をもとに Pott(1978)⁸⁾は、繊維径と繊維長を関数とし

て発がんポテンシャルの強さを示す仮説を提唱した(図1)。WHO(1986)⁹⁾では、繊維長、径および化学組成は体内での沈着性に重要な因子であり、胸腔内あるいは腹腔内へ直接投与して中皮腫を誘発させる一連の研究結果からは、繊維長と径が主要な因子であるとした。その結果、WHOでは、PCOM サンプラーでカウント可能な、繊維長

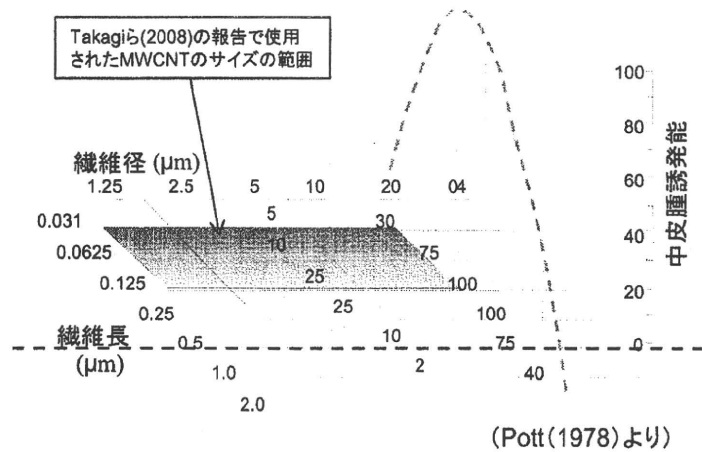


図1 繊維粒子サイズと中皮腫誘発能の関係

5 μm 以上で、繊維径が3 μm 以下で且つ、繊維長:繊維径のアスペクト比3:1以上の粒子(WHO fiber)を、職域環境でのモニター粒子として推奨してきた。

この様な、形状に依存した繊維性粒子の催腫瘍性の強さは、肺胞内への到達性と肺の中での長期残留性に関連していると考えられている。これは、繊毛のある気道を通り抜けて、肺胞まで到達できる(respirable)繊維状粒子は、空気力学的な解析によって繊維径が5~10 μm 以下の繊維とされているが、その際の繊維長は空気力学的に肺胞への到達性に影響を与えないことを示している^{10,11)}。一方、5 μm 以上の大きさの繊維は、肺胞内で異物を除去するために機能するマクロファージで除去するには大きすぎるために、長期間肺胞内に残留する、あるいは、胸膜までの到達を許すことになる

考えられている。しかもこの残留した除去不可能な繊維に対して、生体はマクロファージによる除去活動を長期に亘って継続することになり、その結果、長期間の自浄作用による酸化ストレスが結果的に、肺の上皮細胞や胸膜の中皮細胞に対する発がん性の原因になっていると推定されている。つまり、特徴的な繊維状粒子の形状が、肺胞・胸膜域への到達性と生理学的な難除去性と結びつき、慢性的な生体影響の結果としての催腫瘍性の強さと

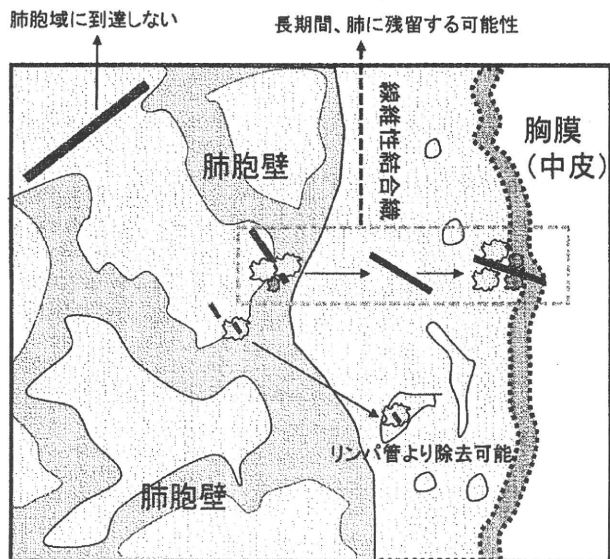


図2 繊維状粒子の肺胞域への到達性と生理学的難除去性

関連していると考えられている(図2)。

また、アスベストや鉍物系の繊維以外の人工的なガラス質繊維を用いた試験でも、繊維長に依存した発がんポテンシャルを示す結果が得られている。しかし、同じ形状を持つ繊維でもその化学組成の違いで、発がん・慢性影響に違いがあることが示されている¹²⁾。構成する化学組成の内、鉄原子が活性酸素発生に強く関わっており、発がん機序の一つと考えられているが、鉄原子の混在量や酸化状態と発がん性の強さとの関係は依然明らかになっておらず¹³⁾、鉄含量は中皮腫誘発の増強要因であるが、絶対要因であるとは考えられていない。また、赤血球由来の鉄成分が、繊維に吸着する機序も想定されている。一方、化学組成に基づく繊維の体内での耐久性(durability)は、体内残量性に関係しており、繊維状粒子の形状(繊維長と径)以外に発がん性の強さに関わる重要な因子であると認識されている¹⁴⁾。形状的には、体内残留性が高いと思われる形状の物質でも、長期間体内に残留している間に、粒子表面の修飾や侵食などにより、繊維が分解されたり短くなったりするような成分で構成されている繊維は、時間をかけて肺胞内から除去されていく可能性が示唆されている。実際、肺内からの繊維の排出半減期(特に繊維長の長い(20 μm 以上)繊維の)の長さが、肺への障害性と相関していることが、人工ガラス質繊維を用いた研究で示されている¹⁵⁾。1997年のECのガラス性繊維の有害性物質の分類、包装、表示に関する指定(EC Commission directive 97/69/EC)¹⁶⁾の中では、既述のような知見を受けて、腹腔内投与あるいは吸入試験での発がん性試験に加えて、20 μm 以上の繊維の肺からの消失半減期(吸入の場合10日、気管内投与の場合、40日より短い場合は発がん物質としての表示から除外している)を表示の基準として採用している。

以上のようにこれまで繊維状粒子と中皮腫誘発能に関しては、繊維の径と長さ、構成成分、生体内半減期等様々な因子を用いた数多くの研究がなされてきており、合成有機繊維やカーボンナノチューブ等の新しい素材の繊維性粒子に関しても、これらの知見が当てはまるかどうかについて確認の必要性が提言されていた¹⁷⁾。そこで、筆者らの研究班では、炭素原子が主成分であるが、アスベストと同様の形状を持つカーボンナノチューブについて、その形状(繊維長や径)から予想される中皮腫誘発能を検証する研究に取りかかった。

1.3.2 繊維長の長いタイプのMWCNTの腹腔内投与試験の結果

我々の研究で使用したMWCNTについて、その繊維径と長さを測定したところその大きさは、アスベストを用いて提唱された催腫瘍性を示す大きさのレンジと重なることが示された(図1)。最も懸念される暴露経路を考慮すると吸入暴露による実験が適切であると考えられるが、カーボンナノチューブは凝集しやすい性質を持っており、研究を開始した直後においては適切に分散して投与/吸入暴露を行う手法が確立していなかった。そこで、アスベストにおいて良

く検討されている実験系として、腹腔内投与による実験を先行して行うこととした。しかし、最も催腫瘍性の強いアスベストであるクロシドライトを用いた腹腔内投与研究でも、中皮腫の誘発には1年以上の期間が必要であることが知られていたため、より短期間での中皮腫の発生を検出できる動物種として、P53(+/-)ヘテロノックアウトマウスを使用することとした^{18,19)}。

P53(+/-)マウスを用いたオリジナルの手法^{18,19)}では、200 μg (5.8×10^8 fibers)を週に1回35週間腹腔内投与しているが、複数回投与による繊維長非依存的な毒性を回避するために筆者らの研究では3mg (1×10^9 fibers)/miceを単回投与で行うこととした。1回の投与量としては多いものであるが、1997年にEuropean Chemical Bureau合同研究センターで作成されたMan Made Mineral Fibres(MMMF)試験法のドラフト案²⁰⁾では、 1×10^9 WHO fibers/ratの単回投与を標準としている他、Rollerら(1997)²¹⁾の様々な繊維粒子を腹腔内投与した際の用量(繊維数)依存性からは、 10^9 fiber/animal程度を投与すれば、様々な繊維での中皮腫の発生を捉えることが示されていることから、最初の実験としては妥当なものであると考えている。その結果、p53のヘテロノックアウトマウスに3mg/miceを腹腔内単回投与し、投与後半年までの間にほとんどのマウスに中皮腫の発生が認められた²²⁾(なお、現在解析中の投与量を1000分の一まで下げた追加試験でも、3 μg /miceの腹腔内投与で中皮腫の発生することを確認している)。筆者らとほぼ同時期に発表された別の研究では、長さの違う4種類のMWCNTを50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量で腹腔内単回投与して、7日後の中皮細胞の増殖性を検証したところ、長いタイプの2種類について腹腔側に肉芽の形成を認めている²³⁾。さらに、我々が用いた長いタイプのMWCNTは、野生型のラットを用いた腹腔(陰嚢腔)内投与研究によっても、中皮腫を誘発する能力を持つことが明らかにされた²⁴⁾。一方、最近繊維長の平均が1 μm 以下の短いMWCNTを2または20mg/animalでラットに単回腹腔内投与した研究では、2年後に有意な中皮腫の発生を認めていない²⁵⁾。これらの結果は、MWCNTについてもアスベストと同様に繊維の長さに依存して中皮腫を誘発する能力に違いがあるという筆者らの仮説を支持するものである²⁶⁾。

ところで、この腹腔内等による中皮腫誘発試験に関しては、実際の暴露経路で行われたものでなく、リスク評価として検証するためには吸入暴露試験が必要であるとの意見もあるが、実験動物を用いた吸入暴露試験をリスク評価に使用する妥当性についても論議のあるところである。アスベストを用いた吸入暴露試験によるげっ歯類の発がん感受性がヒトの感受性に対して著しく低いことが知られている。これには、呼吸器や肺の病理学的形状や大きさがヒトとげっ歯類とで異なるために、ヒトの方がより長い繊維状粒子が肺胞域まで到達しやすいことによるという説もあるが、正確な原因はまだ明らかでない。つまり、げっ歯類を用いた吸入試験による結果は、ヒトに対する発がんポテンシャルを過小評価する可能性のあることが指摘されてい

る。最近になって、カーボンナノチューブを3ヶ月間まで吸入暴露した試験がいくつか報告されてきている^{27~30)}が、まだ発がん性が検証できるまでの長期の吸入暴露試験結果は報告されていない。一方、吸入暴露に替わる手法としては、分散剤を用いた分散溶液を気管内投与する手法や咽頭吸引させる手法が知られているが、単回投与による一過性の急性影響等を解析したものがほとんどである。

それらの中で注目すべき研究として、最近、分散剤で分散させたMWCNT(最高80 μg まで)をマウスに吸引させた研究やMWCNT:30mg/m³を6時間マウスに単回吸入暴露した研究において、暴露後7~8週間目にMWCNTが胸膜に到達していることを確認したものが挙げられる^{31,32)}。これらの研究結果は、高用量の暴露による短期間の結果ではあるが、呼吸器を経由した暴露においてもMWCNTは胸膜(中皮)まで到達することを示唆しており、腹腔内投与による中皮腫誘発性の証拠と合わせると、リスク評価の上でも重要な知見であると考えられる。今後の定量的なリスク評価のためには、低用量まで暴露量を設定した長期間の観察を行う研究が遂行されることが望まれる。

1.3.3 慢性影響研究の重要性

腹腔内投与による中皮腫誘発能は、繊維状粒子による催腫瘍性のみを検出する系であり、短いタイプやその他様々な形状のMWCNTにおける慢性毒性は別途検証する必要がある。実際、筆者らの行った腹腔内投与試験では、小さいサイズのナノチューブ繊維を含んだ細胞が腹膜の病変部のみならず肝類洞内又は肝葉間や腸間膜リンパ節の中にも認められ、体内に再分布することが示唆された。

繊維径としてはMWCNTより小さいSWCNTを咽頭吸引によりマウスに暴露させた実験では、一過性のマクロファージとの反応による急性症状の後に、炎症性細胞浸潤を伴わない間質の繊維化が認められている³³⁾。さらに、ApoE-/-トランスジェニックマウスを用いた実験では、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、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、体循環に入り込んだSWCNTが全身影響を示す可能性が示唆されている³⁴⁾。また、マウスにMWCNT(200~400 μg)を気管内滴下した実験では、一過性の肺の炎症反応に加えて、投与量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ている³⁵⁾。最近の報告では、MWCNTやSWCNTを気管内投与や経鼻投与することにより、アレルギー反応を増強することが報告されている^{36~38)}。これらの結果は、カーボンナノチューブが直接体内循環に侵入することを示すものではないが、少なくとも免疫細胞との接触を通して生体内の免疫系に影響を及ぼしていることを示している。

ナノサイズとはいっても、低分子の化学物質から見ればはるかに大きな粒子であり、凝集しやすい点も考慮すれば、体内(細胞)への吸収性は化学物質ほど高いものではないと想定できる。そうかといって全く吸収されないとも言い難い粒子の大きさであることを考慮すると、細胞の食作用などの機能により、長期間にわたって少しずつ体内に吸収される一方、排泄が進まないことから、生体内安定性の高いものは場合によっては恒久的な蓄積が引き起こされると考えられる。そう考えると、蓄積作用によってもたらされる慢性的な影響が現時点で最も懸念される健康影響として想定できる。多くの点で未確定の部分が多いナノマテリアルの健康影響評価において、様々なアプローチが必要であることに異論の余地はないところである。しかし、闇雲にあらゆるエンドポイントやスクリーニング手法の検証を進めることより、回り道のようにみえるかもしれないが、想定される重要な *in vivo* 影響、特に慢性影響を同定し、その影響の発現メカニズムや検出マーカーを検索しながら評価手法を整備していくことの方が、より早く評価手法の確立に繋がるのではないかと考えている。

文 献

- 1) SCENIHR (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks), The appropriateness of existing methodologies to assess the potential risks with engineered and adventitious products of nanotechnologies. Adopted during the 10th plenary 26 March 2006 after public consultation. SCENIHR 002/05 (2006).
- 2) 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 during the 19th plenary 21-22 June 2007 after public consultation (2007).
- 3) FSA (Food Safety Authority of Ireland), The Relevance for Food Safety of Applications of Nanotechnology in Food and Feed (2008).
- 4) COT, UK Committees on toxicity, mutagenicity and carcinogenicity of chemicals in food, consumer products and the environment (COT, COM, COC). Joint statement on nanomaterial toxicology (2005).
- 5) COT, UK Committee on toxicity, of chemicals in food, consumer products and the environment. COT Addendum to joint statement of the Committees on toxicity, mutagenicity and carcinogenicity of nanomaterial toxicology. COT Statement 2007/01, March 2007 (2007).
- 6) J.M. Davis, *IARC Sci Publ*, 33-45 (1989).
- 7) M.F. Stanton *et al.*, *J Natl Cancer Inst*, **67**, 965-75 (1981).

- 8) F. Pott, *Staub, Reinhaltung der Luft*, **38**, 486-490(1978).
- 9) WHO. ASBESTOS AND OTHER NATURAL MINERAL FIBRES(ENVIRONMENTAL HEALTH CRITERIA 53) (1986).
- 10) V. Timbrell, *J. Occup. Health Soc. Aust.* **3**, 3-12(1983).
- 11) HSE. An inventory of fibres to classify their potential hazard and risk(2006).
- 12) D.M. Bernstein *et al.*, *Inhal Toxicol.* **15**, 1247-74(2003).
- 13) WHO. Consensus report of 'IARC Scientific publication No.140' (1999).
- 14) J. Bignon *et al.*, *Environ Health Perspect.* **102** Suppl **5**, 3-5(1994).
- 15) T.W. Hesterberg *et al.*, *Toxicol Appl Pharmacol.* **151**, 262-75(1998).
- 16) EC, *Official Journal of the European Communities*, (1997).
- 17) K. Donaldson and C.L. Tran, *Mutat Res.* **553**, 5-9(2004).
- 18) J.M. Marsella *et al.*, *Environ Health Perspect.* **105** Suppl **5**, 1069-72(1997).
- 19) C.A. Vaslet *et al.*, *Toxicol Sci.* **68**, 331-8(2002).
- 20) ECB. METHODS FOR THE DETERMINATION OF THE HAZARDOUS PROPERTIES FOR HUMAN HEALTH OF MAN MADE MINERAL FIBRES(MMMF) (1999).
- 21) M. Roller *et al.*, *Environ Health Perspect.* **105** Suppl **5**, 1253-6(1997).
- 22) A. Takagi *et al.*, *J Toxicol Sci.* **33**, 105-16(2008).
- 23) C.A. Poland *et al.*, *Nat Nanotechnol.* **3**, 423-8(2008).
- 24) Y. Sakamoto *et al.*, *J Toxicol Sci.* **34**, 65-76(2009).
- 25) J. Muller *et al.*, *Toxicol Sci.* **110**, 442-8(2009).
- 26) A.B. Kane and R.H. Hurt, *Nat Nanotechnol.* **3**, 378-9(2008).
- 27) L. Ma-Hock *et al.*, *Toxicol Sci.* **112**, 468-81(2009).
- 28) J. Pauluhn, *Toxicol Sci.* **113**, 226-42
- 29) H. Ellinger-Ziegelbauer and J. Pauluhn, *Toxicology.* **266**, 16-29(2009).
- 30) J.G. Li *et al.*, *J Nanosci Nanotechnol.* **9**, 1384-7(2009).
- 31) D.W. Porter *et al.*, *Toxicology.*(2009).
- 32) J.P. Ryman-Rasmussen *et al.*, *Nat Nanotechnol.* **4**, 747-51(2009).
- 33) A.A. Shvedova *et al.*, *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology.* **289**, L698-708(2005).
- 34) Z. Li *et al.*, *Environmental health perspectives.* **115**, 377-382(2007).
- 35) A. Nemmar *et al.*, *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH.* **5**, 1217-1226(2007).
- 36) E.J. Park *et al.*, *Toxicology.* **259**, 113-21(2009).
- 37) U.C. Nygaard *et al.*, *Toxicol Sci.* **109**, 113-23(2009).
- 38) K. Inoue *et al.*, *Toxicol Appl Pharmacol.* **237**, 306-16(2009).

ナノマテリアルの慢性影響研究の重要性

広瀬明彦,^{*,a} 高木篤也,^a 西村哲治,^a 津田洋幸,^b 坂本義光,^c
小縣昭夫,^c 中江 大,^c 樋野興夫,^d 菅野 純^a

Importance of Researches on Chronic Effects by Manufactured Nanomaterials

Akihiko HIROSE,^{*,a} Atsuya TAKAGI,^a Tetsuji NISHIMURA,^a
Hiroyuki TSUDA,^b Yoshimitsu SAKAMOTO,^c Akio OGATA,^c
Dai NAKAE,^c Okio HINO,^d and Jun KANNO^a

^aDivision of Risk Assessment, National Institute of Health Sciences, Kamiyoga 1-18-1, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan, ^bNagoya City of University, 1 Kawasumi Mizuho-cho, Mizuho-ku, Nagoya 467-8601, Japan, ^cTokyo Metropolitan Institute of Public Health, 3-24-1 Hyakunin-cho, Shinjyuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan, and ^dJuntendo University School of Medicine, 2-1-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8421, Japan

(Received September 3, 2010)

Manufactured nanomaterials are the most important substances for the nanotechnology. The nanomaterials possess different physico-chemical properties from bulk materials. The new properties may lead to biologically beneficial effects and/or adverse effects. However, there are no standardized evaluation methods at present. Some domestic research projects and international OECD programs are ongoing, in order to share the health impact information of nanomaterials or to standardize the evaluation methods. From 2005, our institutes have been conducting the research on the establishment of health risk assessment methodology of manufactured nanomaterials. In the course of the research project, we revealed that the nanomaterials were competent to cause chronic effects, by analyzing the 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. Also investigations of the toxicokinetic properties of nanomaterials after exposure are important to predict the chronically targeted tissues. The long lasting particles/fibers in the particular tissues may cause chronic adverse effects. Therefore, focusing on the toxicological characterization of chronic effects was considered to be most appropriate approach for establishing the risk assessment methods of nanomaterials.

Key words—chronic toxicity; multi-wall carbon nanotube (MWCNT); fullerene

1. はじめに

近年、ナノテクノロジーの中心的な役割を担う物質としての産業用ナノマテリアルは、急速にその種類や生産量が増加しつつあるところであるが、新たに期待されているナノマテリアルの物理化学特性については、有効的な生理活性等に使用され得る特性

を持つ反面、ヒト健康影響に対する懸念についても検証されるべきであると考えられている。つまり、ナノマテリアルを用いた技術や製品を社会的に受容するためには、安全性の検証を行うことが不可欠であると思われる。しかし、従来の一一般的な化学物質とは異なる物理化学的特性は、その毒性評価においても従来とは異なる考え方を取り入れることも必要とされている。それゆえ、ナノマテリアルの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。また、国際的な枠組みにおいても、ナノマテリアルの安全性確認は、重要な問題として認識されており、OECD や ISO 等を中心として評価手法の国際的標準化に向けた取り組みが進行しているところでもある。本稿では、ナノマテリアルの安全性評価

^a国立医薬品食品衛生研究所（〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1）、^b名古屋市立大学（〒467-8601 名古屋市瑞穂区瑞穂町字川澄 1）、^c東京都健康安全研究センター（〒169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1）、^d順天堂大学医学部（〒113-8421 東京都文京区本郷 2-1-1）

*e-mail: hirose@nihs.go.jp

本総説は、日本薬学会第 130 年会シンポジウム S18 で発表したものを中心に記述したものである。