



した場合においても、単分子として存在する割合は低く、平均 689 nm (分散中央の径：778 nm) の凝集した塊の粒径分布を示した(五十嵐, 私信)。

この結果から、提供された製品中のナノ材料の初期粒子径がナノサイズであっても、環境中に放出された後には凝集状態で挙動する可能性が高いと推測される。

一方、有害影響を考える場合は、凝集塊を形成していても、単分子もしくは数分子のナノサイズの粒子が接触、吸収される可能性、吸収後に単分子として体内循環をする可能性も考慮に入れておかななくてはならない。これらのことをどのように考えるかについて、国際的な共通認識はまだできていないと思われるが、われわれは、できるだけ提供された状態を尊重した上で、ナノ粒子としての影響を評価するために、ナノサイズの分散系を作製して検討を進めることとしている。

2. ナノ材料の安定性

ナノ材料と言っても、その素材は金属類、炭素、鉱物類のほか、リポソーム類のような生体成分により構成されているものもあり、安定性に大きな差がある。リポソームはリン脂質で構成された人工膜でできた球状をしており、体内に取り込まれたとしても長期間安定して存在することは考えにくい。また、環境中においても同様に、比較的短期間に分解されることが予想される。

一方、金属類、炭素、鉱物類については単体の構成成分自体の安定性は高く、体内や環境中における半減期は長いものが多いと考えて良いであろう。鉱物を素材とするものは、元来天然の素材であることから、天然に存在する粒径よりも微小な粒子が大量に放出されて影響を及ぼすことに注意を払う必要がある。金属類では、環境中でイオンになることも考慮に入れなくてはならない。また、炭素素材のナノ物質は、高温でないと分解しにくいものが多い。

このように、ナノ物質と総称される中には素材や形態により安定性が大きく異なっているものが混在していることを理解し、使用方法なり環境中における循環に、十分な配慮をしなくてはならない。

環境中に放出された後、また体内に吸収された後、ナノ材料がどのような挙動をとるか推定することが次の課題である。前述したように、単分子として存在するよりも、複数の単体が凝集した状態で標的器官に貯留・蓄積していることも考えなくてはならない。

環境からの曝露

環境リスクを評価するためには、対象とするナノ物質の特性と使用範囲、ヒトおよび環境の到達点にいたる経路を理解する必要がある。

曝露の発生源は、ナノ物質を製造、使用する作業環境からの放出・曝露がある。また、ナノ物質が使用されている製品からの放出・曝露も考えられる。例えば、化粧品に含まれるナノ物質は意図的に使用され、洗浄した結果、水環境への排出がある。さらに、それらの一般家庭用品を廃棄した廃棄物処理場からの放出も考慮しなければならないであろう。

排出されたナノ材料は、空気、水、土壌を經由して環境中を移動し、環境中に存在する様々な物質と相互作用を及ぼし合いながら、最終到達点に集積していくであろう。環境中の挙動については、化学物質やゼーゼル排出微粒子のこれまで蓄積された情報により推定できる所はあるであろう。しかし、凝集状態や、水や土壌中の天然に存在する物質等との相互作用については、十分な情報を得ることも課題である。

生態系生物に対する影響は、前述したようなナノ物質の物理化学的な特性に加え、環境中の残留性、生物蓄積性に依存することはこれまでの化学物質の研究から推測されるが、現在のところ個体に対する影響に関するデータが十分でない。環境中における挙動と最終到達点を明らかにすることにより、いずれの環境媒体に汚染が進むかを理解し、リスクを受ける可能性の高い生物種集団に対する影響を検討することが必要である。人間も生態系生物であり、生態系生物の均衡と恵みにより、直接・間接的に影響を受けることを考慮しなくてはならない。

曝露評価

1. 検出法

環境リスク評価を行う際、有害影響評価と対をなす曝露評価が重要である。そのためにも、環境中および生物試料中のナノ物質を同定・定量するための分析方法の確立が緊急の課題である。粒径や溶解性により、環境の 대기、水、土壌から効率よく抽出できる適切な前処理方法の確立も検討すべき課題がある。

対象のナノ材料が、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存在することを示すことが必要である。例えば、金属ナノ粒子は、組織を硝酸加熱分解後、燃焼灰化した試料中から溶解した金属元素の量を機器分析により同定・定量する方法がある。酸化チタンの場合、対象臓器0.1 gを裁断し、硝酸/過酸化水素水(3:1)5 mlと精製水2 mlを加え、600 W、圧力80 PSIで20分間マイクロ波照射し、2分間保持した後、20 mlに定溶して試料溶液とする。誘導結合プラズマ質量分析計(ICP-MS)に注入して得られるピーク面積を測定し、チタン標準液を用いて作成した検量線から試料溶液中のチタン濃度(ppb, ng/ml)を求め、酸化チタン量に換算し、臓器中の酸化チタン量(mg/g)を求めている。金属類に関しては、同様な手法で測定はできるが、炭素を成分とするフラーレンC60やカーボンナノチューブではICP/MSを用いることはできない。フラーレンC60は水に溶けにくく、トルエンやキシレンなどの限られた有機溶媒にのみ溶解する物質である。

そこで、われわれは、対象組織をドデシル硫酸ナトリウム(SDS)で溶解した後、トルエンで抽出し、液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計で測定する方法を採っている¹⁾。試料の相違による抽出効率を評価するために、同様の挙動をとるフラーレンC70を抽出に加えて、抽出効率補正に使用している。しかし、これらの方法では、ナノ材料の存在や量を評価することは可能であるが、実際にナノの状態で存在しているのか、あるいは凝集しているのか、別の形態で存在しているのか

を把握することはできない。最終的には、多くのナノ材料は凝集塊を形成するため、電子顕微鏡による生体組織中の存在の確認が必要となってくる。しかし、電子顕微鏡で見ることが困難なサイズ状態のナノ材料の存在については証拠は得られない。

これを補う方法として、対象物質に標識で修飾する方法が採用されている。例えば、放射性同位元素の使用、蛍光物質の修飾などがあるが、製造や同定に制限があること、付点や、修飾することによる挙動の変化の有無を否定できない点が課題となっている。一方、カーボンナノチューブについては、機器による定量分析が困難であり、前処理後の試料を透過型電子顕微鏡により、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がない状況である。今後、感度良く、精度の高い検出方法を確立しなくてはならないであろう。

2. 空気媒介の曝露

ヒトへの吸入曝露は空気を媒体とするのが、現在のところ最も可能性が高い曝露経路である。一般的な生活環境における吸入曝露の可能性はあまりないと考えられるが、ナノ物質の製造・加工・使用する作業場において、曝露される可能性が大きいことが推測される。作業環境における空気経由のほか、皮膚経由の職業曝露と健康影響も配慮されなければならない。曝露を減少させる技術開発と利用は重要な課題である。

これまで、金属、鉱物、排ガス粒子などの微粒子の吸入曝露研究は数多く行われてきており、過去の知見はナノ物質の影響を検討するために有用である。しかし、実際に影響を検証しようとする際には、ナノ物質の特性である凝集しやすい性質から凝集塊を形成した結果生じる、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という課題が残されており、現在のところナノ物質の影響に対する知見は限られている。繊維状粒子については、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知見が有益であろう。



3. 水および土壌媒介の曝露

水もしくは土壌を介してナノ物質に曝露することに直接的な証拠はほとんどなく、また、水環境中の挙動は不明なことが多い。ナノ物質を実験動物もしくは *in vitro* 試験で界面活性物質や媒体に結合させて投与溶液を調製していることから、浄水処理が施されている飲料水などによる直接的な曝露は少ないと考えられる。魚介類や土壌中生物類により取り込まれる可能性、それを摂食することによる経口曝露が考えられるが、知見はほとんどない。

4. 意図的な曝露

ナノ材料は一般家庭用品、化粧品や食品に使用されている。これらから経口もしくは経皮曝露する可能性がある。われわれの検討結果では、化粧品に使用されている粒径の酸化チタン(ルチル型)をラットの健全な皮膚へ反復塗布した後の皮膚の電子顕微鏡観察において、酸化チタンナノ粒子は角質層にとどまり、毛包部分を含め表皮、真皮層にまで透過するような像は認められなかった。また、一般状態、体重および摂餌量は対照群と試験群間で変化はなく、臓器重量についても群間で有意な差は認められなかった。血液および病理的検討においても、肝臓、腎臓、脾臓等各臓器のチタン濃度は、酸化チタン塗布群と対照群とでほとんど差は認められなかった。

一方、コーン油に溶解したフラーレン C60 を強制経口投与した結果、糞便から投与の 85% 以上に当たるフラーレンが検出され、経口による吸収率が悪いことが示唆された。水溶性の ¹⁴C-水

溶性フラーレンを経口投与した結果、大部分は糞便中に排泄されたとの報告もある²⁾。

これらの結果は、限られた情報であるが、実際上使用される形態のナノ粒子は吸収されにくいことを示していると言えるであろう。しかし、今後、様々な形態や曝露状態を想定した評価情報を蓄積していくことが重要である。

おわりに

ナノ物質はナノテクノロジーの中心的新規開発物質として、急速に種類と生産量が増加しつつあり、われわれの生活空間での使用が多岐に亘り見込まれている。基本的な評価に関して、従来の化学物質と同様であると考えられるが、ナノ物質としての特有の性状から、これまでのリスク評価で用いられてきた技術や手法だけでは十分に評価しきれない可能性が指摘されている。

本稿で述べたように、情報の集積に努めなくてはならない課題もあり、今後、科学的な取り組みの上に、十分な議論と適正なリスクコミュニケーションを行っていくことが必要であろう。

文 献

- 1) 久保田領志, 他: 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
- 2) Yamago S: *In vivo* biological behavior of a water-miscible fullerene; ¹⁴C labeling, absorption, distribution, excretion and acute toxicity, et al. Chem Biol 2(6): 385-389, 1995

MEDICAL BOOK INFORMATION

医学書院

イギリスの医療は問いかける

「良きバランス」へ向けた戦略

森臨太郎

●A5 頁184 2009年
定価2,940円(本体2,800円+税5%)
[ISBN978-4-260-00710-8]

ブレア政権時に保健医療改革が行われた英国。その渦中で周産期・小児医療の臨床医として、また政策担当者として英国医療に携わった経験をもつ著者が、感じたこと、考えたことを率直に綴った。特に英国の診療ガイドラインの作成過程にみられる方法論や医療者と国民の関係は、今後の医療のあり方を考える上で参考になる。最終章では、日本の医療を改善するための具体策を提言する。

308 (48)

公衆衛生 vol.74 No.4 2010年4月

MINI-REVIEW

Toxicology of Engineered Nanomaterials - A review of Carcinogenic Potential

Hiroyuki Tsuda^{1,2*}, Jiegou Xu², Yuta Sakai³, Mitsuru Futakuchi², Katsumi Fukamachi²

Abstract

Nanotechnology has considerable socioeconomic potential. Benefits afforded by engineered nanoparticles (NP: defined as being less than 100 nm in diameter) are expected to be significant in fields such as plastics, energy, electronics, aerospace and medicine. However, NPs are being introduced into the market without adequate assessment of their potential toxicities. It is urgently important to conduct risk assessment of commercial NPs and establish a framework enabling risk management which is not subordinate to their commercial production. An overview of currently available carcinogenicity risk evaluation results of NP materials raises serious questions as to their safety. NP sized titanium dioxide (nTiO₂) and carbon black (nCB) are carcinogenic to the lung of female rats, and the tumors preferentially include squamous cell morphology. Carbon nanotubes (CNT) induce mesotheliomas when applied intraperitoneally in rats and mice. Data for Fullerenes are insufficient to evaluate carcinogenic risk. Sub-chronic toxicity data indicate that, in general, NPs form aggregates and agglomerates and cause foreign body reactions at their applied sites with inflammatory cell, including macrophage, infiltration. These findings are similar to the biological effects of asbestos, a potent carcinogen, and indicate that careful assessment of NPs is indispensable.

Key words: Nanoparticles - toxicology - carcinogenicity - titanium dioxide - carbon black

Asian Pacific J Cancer Prev, 10, 975-980

Principles of Safety

The safety of our living environment can be secured by the balanced function of three elements: risk assessment, risk management and risk communication (Figure 1). The first of these elements, risk assessment, must be addressed first, since without reliable risk assessment, risk communication and risk management can not function. Importantly, for reliable risk assessment long-term animal studies are indispensable.

These principles, of course, hold true for engineered nanoparticles. Unfortunately, the risk assessment data for engineered nanoparticles are rather fragmentary. However, the available findings do present a disturbing picture of potential carcinogens entering the market place. Engineered nanoparticles included in this review include nano-size titanium dioxide (nTiO₂), carbon black (nCB), single-walled carbon nanotubes (SWCNT), multiple-walled carbon nanotubes (MWCNT) and fullerenes (C60).

Metals and Metal-derived Nanoparticles: Titanium dioxide (nTiO₂)

In an inhalation study, female rats were exposed to air containing nTiO₂ (28nm in diameter) at a concentration of



Figure 1. Principles of Safety of the Living Environment. Safety of the living environment can be secured by the balanced function of three elements: risk assessment, risk management and risk communication

7.5 mg/m³ for 4 months, then at a concentration of 15 mg/m³ for 4 months, and finally at a concentration of 10 mg/m³ for 16 months, then killed at month 30. The incidence of lung tumors (19%), benign and malignant squamous and alveolar cell tumors combined, was significantly increased compared to the clean air control group (0.5%) (Heinrich et al., 1995).

¹Nanotoxicology Project, ²Department of Molecular Toxicology, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences, ³Department of Drug Metabolism and Disposition, Nagoya City University Graduate School of Pharmacological Sciences, Nagoya, Japan *For correspondence: htsuda@med.nagoya-cu.ac.jp

In another study, female rats were administered nTiO₂ by intratracheal instillation. In this study, several dosing strategies were used. Hydrophilic nano-sized nTiO₂ (21-25 nm in diameter) was applied in 5 doses of 3 mg each, 5 doses of 6 mg each, or 10 doses of 6 mg each. Hydrophobic nano-sized nTiO₂ (21 nm in diameter) was applied in 15 doses of 0.5 mg each or 30 doses of 0.5 mg each. Hydrophilic anatase nTiO₂ (200 nm in diameter) was applied in 10 doses of 6 mg each or 20 doses of 6 mg each. The nTiO₂, hydrophilic and hydrophobic nTiO₂ and hydrophilic anatase nTiO₂, was suspended in PBS with 0.5% Tween 80. The instillation was done once weekly. The animals were observed for up to 30 weeks. The incidences of lung tumors (52-69.6%), adenomas/carcinomas and squamous cell epitheliomas/carcinomas combined, in rats receiving hydrophilic nTiO₂ were significantly increased over untreated controls (0%). Anatase nTiO₂ also induced significant incidences of lung tumors (29.5-63.6%), and these tumors were similar to those induced by hydrophilic nTiO₂. The incidences of benign and malignant lung tumors in the hydrophobic nTiO₂ groups (6.7%) was not significant (Pott and Roller, 2005).

In another inhalation study, female rats were treated with TiO₂ (size, not indicated) at a concentration of 11.3mg/m³ for 24 months followed by observation for 6 months. Incidences of cystic keratinizing epitheliomas (11.7%) and squamous cell carcinomas (4.8%) were significantly greater than the control group (0.5%) (Rittinghausen et al., 1997). nTiO₂ is not carcinogenic to the skin because it does not penetrate the dermal tissue (Newman et al., 2009). Based on the studies outlined here, nTiO₂ is evaluated by WHO/IARC as a Group 2B compound (possibly carcinogenic to humans) (Baan, 2007).

Carbon-derived Nanoparticles

1. Carbon black (nCB)

Because of its long history of production and consumption, the highest number of reports concerning the carcinogenicity of carbon-derived nanomaterials are about nCB.

a) Rat studies. In an inhalation study, female rats were exposed to nCB (Printex90, 14 nm in diameter) at a concentration of 7.5 mg/m³ for 4 months and then at a concentration of 12 mg/m³ for 20 months followed by clean air for 6 months. The incidence of lung tumors (39%), benign and malignant squamous cell tumors and bronchio-alveolar cell tumors combined, was significantly increased as compared to the clean air group (0.5%) (Heinrich et al., 1995).

In another study, nCB (Printex90, 14 nm in diameter and Lamp Black101, 98nm in diameter) was administered to female Wistar rats by intratracheal instillation. Printex90 was washed in boiling toluene and suspended in saline containing 0.25% Tween 80, then administered once per week for 3 weeks at a dose of 0.66 mg per rat for 3 weeks then once per week for 13 weeks at a dose of 1.0 mg per rat. Animals were observed for up to 800 days from the beginning of the study. The incidence of cystic keratinizing

epitheliomas and bronchio-alveolar cell tumors combined in Printex90 treated rats (21%) was similar to that observed in rats treated with benzo[a]pyrene and diesel emission particles and significantly elevated compared to the vehicle control group (0%). Lamp Black 101 treated rats also showed a significant increase in lung tumors compared to the control group (Dasenbrock et al., 1996).

In a second inhalation study, female Wistar rats were exposed to nCB (Printex90, 14 nm in diameter) at a concentration of 11.3 mg/m³ for four months and then at a concentration of 12.2 mg/m³ for the following 20 months. The incidence of cystic keratinizing tumors (20%), epitheliomas and carcinomas combined, was significantly increased compared to the clean air control group (0%) (Rittinghausen et al., 1997).

In the same series of experiments as the one outlined above, Printex90 was administered to female Wistar rats by intratracheal instillation. Printex90 was suspended in saline with 0.25% Tween 80 and administered 16-17 times (total dose 15 mg per animal). Animals were observed for up to 24 months. In rats receiving Printex90, the incidence of cystic keratinizing epitheliomas (19%) was significantly increased compared to saline treated animals (0%). Rats were also treated with purified Lamp Black: the treatment regimen was the same as for Printex90. Tumor incidence in these rats (6.3%) was not significantly elevated (Rittinghausen et al., 1997).

In a fifth study, nCB (Printex90, 14 nm in diameter and Lamp Black 101, 98nm in diameter; Degussa) was administered to female Wistar rats by intratracheal instillation. Printex90 was washed in boiling toluene and suspended in saline containing 0.25% Tween 80. The Printex90 was applied once per week for 3 weeks at a dose of 0.66 mg per rat for 3 weeks then once per week for 13 weeks at a dose of 1.0 mg per rat. Animals were observed for up to 800 days from the beginning of the study. The incidence of cystic keratinizing epitheliomas and bronchio-alveolar cell tumors combined in Printex90 treated rats (21%) was similar to that observed in rats treated with benzo[a]pyrene and diesel emission particles and significantly elevated compared to the vehicle control group (0%). Lamp Black101 treated rats also showed a significant increase in lung tumors compared to the control group (Dasenbrock et al., 1996).

In a sixth study, nCB (Printex90 or purified Lamp Black 101) was administered to female SPF Wistar rats intratracheal instillation. Animals were observed for up to 30 months. Several dosing strategies were used: animals were treated from 5 to 20 times with 1.5 to 6 mg nCB. Total lung tumor incidence for each treatment regimen (Printex90, 56% to over 80%; Lamp Black, 44% to 70%) was significantly elevated compared to the control group (2%) (Pott and Roller, 2005).

Based on the studies outlined here, nCB is evaluated by WHO/IARC as a Group 2B compound (possibly carcinogenic to humans) (Baan, 2007).

b) Mouse and Hamster Studies. No data are available as to carcinogenicity and related studies in mice and hamsters.

c) Summary. nCB is carcinogenic to the female rat

inducing cystic keratinizing epitheliomas and bronchio-alveolar cell lung tumors. Mechanisms to explain why cystic squamous cell tumors were induced exclusively in female rats have not yet been elucidated. No data for carcinogenicity of nCB in mice and hamsters are available.

2. Carbon nanotubes

There are two types of carbon nanotubes: SWCNT are tube structures with a diameter of close to 1 nanometer and composed of a one-atom-thick layer of graphite (Figure 2, left), and MWCNT are tube structures with a diameter of close to 1 nanometer and composed of two or more layers of graphite atoms (Figure 2, right).

A) SWCNT: a) Rat studies. In a short to medium-term (6 months or less) study, SWCNT (diameter 1.4 nm, length more than 1 mm agglomerate at use) was administered to male CrI:CD(SD)IGS BR rats intratracheal instillation. The SWCNT particles were suspended in PBS with 1% Tween 80 and administered one time at 1 or 5 mg/kg. Animals were observed up to 12 weeks. Multifocal small granulation tissue with deposition of aggregates of SWCNT were observed in the lung. Inflammatory cell counts of bronchoalveolar lavage (BAL) did not clearly correlate with the degree of the inflammatory reaction. Similar inflammatory changes were also observed in rats which received quartz particles (crystalline, diameter 1-3 nm). No tumors were found in any of the groups (Warheit et al., 2004).

b) Mouse studies. In a short to medium-term (6 months or less) study, SWCNT (diameter 0.8-2.2 nm, length not indicated) and cup-stacked CNT (mean diameter 80 nm, length not more than 100 nm) were administered to female BALB/c mice by subcutaneous injection. The SWCNT and CNT particles were suspended in saline and animals were injected at 2 mg per animal then observed for up to 12 weeks. The iron content of these materials was 3.5-5.0% (weight). Although inflammatory lesions in the injected site were observed, no tumors were found (Koyama et al., 2006).

In another short to medium-term (6 months or less) study, SWCNT (iron content, 26.9% weight) was administered to male B6C3F1 mice by intratracheal instillation. Unpurified SWCNT and purified (polycyclic aromatic hydrocarbon-free) SWCNT suspended in heat-inactivated mouse serum at a concentration of 2 mg/ml was administered one time at 0.1 or 0.5 ml/mouse. The animals were then observed for 7 or 90 days. Granulation tissue formation with epithelioid cell reaction was observed in the bronchioles, respiratory ducts and alveoli. The inflammatory reaction in animals given SWCNT was more

prominent than animals treated with carbon black. Neoplastic lesion development was not observed (Lam et al., 2004).

B) MWCNT: a) Rat studies. In a short to medium-term (6 months or less) study, MWCNT (average 15 carbon layers, approximate inner diameter 5 nm, outer diameter 9-10 nm) was administered to female SD rats by intratracheal instillation. The MWCNT particles were suspended in saline with 1% Tween 80 and administered one time at doses of 0.5, 2.0 and 5 mg/rat in 0.5 ml saline. The rats were killed on day 60. Small granulation tissue with deposition of MWCNT was observed in the bronchi, bronchio-alveolar space and some alveoli. No tumors were found (Muller et al., 2005).

In another study, MWCNT (MUTSUI MWCNT-7, 3500 ppm iron content; diameter 70-100 nm; approximate length 1-4 μ m) was administered to male F344/DuCrIj rats by a single intrascrotal injection. The MWCNT particles were suspended in 0.5% methyl cellulose with 1.0% Tween 80 and administered at a dose of 20 mg/mouse. The animals were then observed until week 104. Another group of mice were treated with crocidolite (UICC grade asbestos). The incidence of disseminated mesothelioma in the peritoneal cavity was 86% in MWCNT and 0% in crocidolite groups (Sakamoto et al., 2009).

In a third study, MWCNT (11.3 nm in mean diameter, approximate length 0.7 μ m) was administered to three groups of male Wistar rats by a single intraperitoneal injection. MWCNT with structural defects was suspended in PBS and administered at a dose of 2 or 20 mg/rat and MWCNT without structural defects was suspended in PBS and administered at a dose of 20 mg/rat. The animals were then observed for up to 104 weeks. Another group of rats was treated with 2 mg crocidolite (UICC grade asbestos) per rat. The incidence of mesothelioma in the group administered crocidolite was 34.6%, but the incidence of mesothelioma in the MWCNT groups (up to 6%) was not statistically higher than the incidence (3.8%) in the vehicle control group (Muller et al., 2009).

b) Mouse studies. In a short to medium-term (6 months or less) study, MWNT (diameter 20-150 nm, length 10-20 nm) was administered to female BALB/c mice by a single subcutaneous injection. The nano-particles were suspended in saline administered at 2 mg per mouse. The animals were then observed for up to 12 weeks. The iron content of these materials was 3.5-5.0% (weight). Although inflammatory lesions at the injected site were observed, no tumors were found (Koyama et al., 2006).

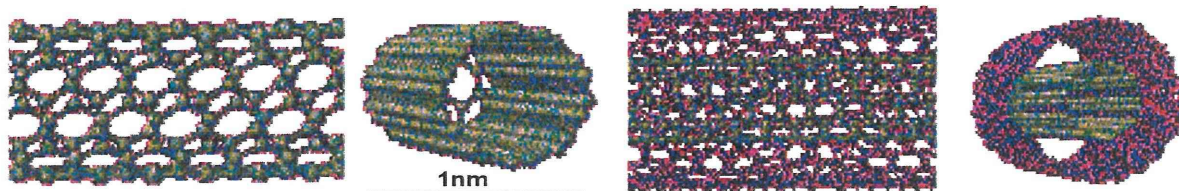


Figure 2. Structure of a Single-walled Carbon Nanotube (SWCNT) and a Multiple-walled Carbon Nanotube (MWCNT). (Courtesy of Dr. M. Atai; National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Japan)

In another short to medium-term (6 months or less) study, two types of MWCNT, pure MWCNT and N-doped (nitrogen attached on the surface) MWCNT (approximately 30-50 nm in diameter and 100-300 nm in length) were administered intranasally, intratracheally, orally or intraperitoneally to male CD1 mice. The MWCNT particles were suspended in phosphate buffered saline (PBS) and administered one time at doses of 1, 2.5 or 5 mg/mouse. The animals were killed after 30 days. Intratracheal administration of MWCNT resulted in inflammatory lesions surrounding aggregates of MWCNT and hyperplastic change of the bronchial epithelium in a dose dependent manner. These changes were less intense in N-doped MWCNT. No obvious clinical symptoms were noted in mice treated through other routes (Carrero-Sanchez et al., 2006).

In a third study, MWCNT (MUTSUI MWCNT-7, 3500 ppm iron content; diameter 100 nm; approximate length 1-5 μm) was administered to male p53 (+/-) mice with a C57BL/6 background by intraperitoneal injection. The MWCNT was suspended in 0.5% methyl cellulose with 1.0% Tween 80 and administered one time at a dose of 3 mg/mouse. The animals were then observed for 25 weeks. Other groups of mice were treated with C60 and crocidolite

(UICC grade asbestos) at a dose of 3 mg/mouse. The incidence of mesothelioma in the peritoneal cavity was 14/16 (87.5%) in the MWCNT group and 0% in the C60 group and 14/18 (77.8%) in the crocidolite group (Takagi et al., 2008).

c) Summary. Apparently contradictory results are reported in the rat studies. In one study, intrascrotal injection of MWCNT (approximate length 1-4 μm) resulted in mesothelioma in the peritoneal cavity, but intrascrotal injection of crocidolite did not induce tumor formation; in another study, mesothelioma was induced by intraperitoneal injection of crocidolite but intraperitoneal injection of MWCNT (approximate length 0.7 μm) did not induce tumor formation. Obviously, further studies to confirm carcinogenic potential of MWCNT, especially MWCNT of different lengths, in rats is required. SWCNT and MWCNT induced a small amount of granulation tissue formation in the bronchioles and bronchio-alveolar area in mice. In a critical study, MWCNT was found to induce mesothelioma in p53-/+ mice. Data pertaining to the carcinogenicity of SWCNT were negative in both rats and mice.

3) Fullerenes (C60/70)

Fullerene was named after Richard Buckminster Fuller, an architect who popularized the geodesic dome which resembles a spherical fullerene in appearance. C60 is composed of 60 carbons arranged at the corners of each hexagon and a bond along each edge resembling a soccer ball (Fig. 3). C70 is composed of 70 carbons (Fig. 3) and is similar in structure to C60. C60 has photocatalytic activity releasing reactive oxygen species in the presence of light.

a) Rat studies. No data is available as to carcinogenicity and related studies in rats.

b) Mouse studies. Fullerene was tested for skin tumor promotion. Female CD-1 mice were initially painted with 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA): 20 nmol DMBA dissolved in 200 mL acetone was applied one time to shaved dorsal skin. 1 week later, a C60/C70 mixture (6:1) dissolved in benzene was applied twice a week for 25 weeks. No tumors were found in the skin. Another group of mice was treated with 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) (5mg in 200 mL acetone), a known skin tumor promoter. The incidence of tumor development in the TPA treated mice (100%) was significantly greater than in the acetone treated controls (0%). In a co-occurrent experiment ornithine decarboxylase (ODC) activity and DNA synthesis, measured by 3H-thymidine incorporation, were also increased by TPA treatment but not by C60/C70 (Nelson et al., 1993).

c) In vitro studies related to carcinogenesis. Fullerene C60 was treated with polyvinylpyrrolidone (PVP) and then dissolved in water. In the presence of rat liver microsomes, treated C60 was mutagenic for Salmonella strains TA102, TA104 and YG3003, but only when exposed to visible light and not in the absence of light. Mutagenicity was

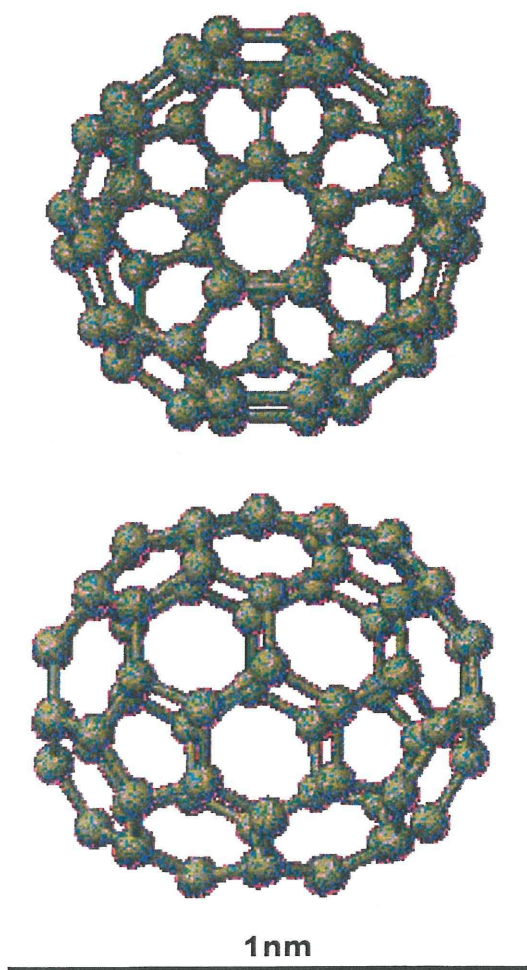


Figure 3. Structure of Fullerene 60 (C60) and Fullerene 70 (C70). (Courtesy of Dr. M. Ata; National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Japan)

reduced in the presence of antioxidants. The results suggest that singlet molecular oxygen radicals were generated by irradiating C60 with visible light. Further experiments indicated that the mutagenicity was due to oxidized phospholipids in the rat liver microsomes, in particular those present in the HPLC isolated linoleate fraction (Sera et al., 1996). Similarly, C60 induced peroxidation of lipids which caused oxidative liver cell injury in the presence of microsomes from hepatocytes (Kamat et al., 1998).

d) **Summary.** *In vitro*, C60 caused DNA damage when irradiated with visible light. In one *in vivo* study using mice, C60/70 did not show skin tumor promotion activity in a 26-week initiation-promotion protocol. No long-term carcinogenicity studies were reported.

Overall Evaluation and Proposal for the Future

During the development and marketing of nanomaterials, risk assessment of these new products has been perfunctory at best. While nanomaterials have undeniable benefits, their use also has undeniable potential risk. This risk must be addressed in an unbiased and thorough manner. Only after the toxicity of the various nanomaterials is understood can their true benefits be realized.

In rodent studies, nTiO₂ whether administered by inhalation or intratracheal instillation was shown to induce lung tumors with characteristic squamous cell morphology in female rats. These nanomaterials did not induce lung tumors in male rats. Our own studies have also shown that instillation of nTiO₂ into the lungs of female rats showed tumor promoting activity and resulted in elevated ROS-mediated damage and production of inflammatory cytokines. It is reasonable to assume that other metal-derived nanoparticles, such as aluminium and copper nanoparticles, and metal containing nanoparticles, for example nCB-metal mixtures and SWCNT and MWCNT preparations, are also capable of producing these effects. Nanoparticles such as nTiO₂, nCB, SWCNT and MWCNT when intratracheally administered, were detected by light microscope as aggregates or agglomerates and these forms

are reported to induce foreign body granulation tissue with various degree of inflammatory reaction. Although the relevance of foreign body-induced chronic inflammation to carcinogenesis is not clearly established, it is possible that reactive oxygen species (ROS) produced by macrophages attempting to destroy the foreign material in the inflammation site may cause DNA damage associated with carcinogenesis. Another possible contributing factor is metal, for example from metal-derived nanoparticles such as TiO₂ or from metal contaminants: these metals could also be involved in ROS production. Thus, it is possible that the observed carcinogenic effect is not specific to nanoparticles but rather associated with their ability to induce persistent foreign body-induced chronic inflammation and/or introduce metals into susceptible sites. For example, TiO₂ and carbon blacks larger than 100nm in diameter are known to induce lung tumors including similar squamous cell morphology (Nikula, 2000); (Pott and Roller, 2005) and both of these materials (larger than nano size) are classified as into group 2B (possibly carcinogenic to humans) by WHO/IARC.

Mechanisms for mesothelioma induction by MWCNT in mice and rats have not been elucidated yet. A possible contributing factor is metal: Transition metals, such as iron, are commonly used as a catalytic center in the formation of CNTs, and contaminating metal in SWCNT and MWCNT particles could catalyze the formation of ROS by the Fenton reaction (Liu and Okada, 1994). One example of this type of toxicity is that human keratinocytes exposed to SWCNT were killed by ROS in the media (Shvedova et al., 2003). Another possible contributing factor is the length of the MWCNT (Pott and Roller, 2005; Muller et al., 2009; Sakamoto et al., 2009).

As noted at the beginning of this review, for reliable risk assessment long-term animal studies are indispensable. This is particularly true for risk assessment of potential carcinogens. The standard for the evaluation of the carcinogenic potential of a test chemical is testing in two rodent species, generally rats and mice, of each sex, at 3 doses (0, low and high) of the test chemical for up to two years. In the studies conducted to date concerning the carcinogenic risk presented by nanoparticles, there is a noticeable lack of long term testing: No long-term tests of any type have been reported for either SWCNT or fullerenes. Importantly, the primary goal of risk assessment is not to simply ban a product from the market place, but rather to determine product safety and establish guidelines lines for its production and use and promote consumer confidence. Given the known ability of many nanomaterials to induce mechanisms which are active in humans that are risk factors for carcinogenesis, for example ROS and inflammatory cytokine production, the continued introduction of these materials into the market is alarming. Establishing the safety of these materials is urgently needed.

In this short review, available *in vivo* data concerning the carcinogenic effects of nTiO₂, nCB, SWCNT and MWCNT, and Fullerenes is outlined. Of these, nTiO₂ and nCB are classified as possibly carcinogenic to humans. Testing of the carcinogenic activity of MWCNT produced

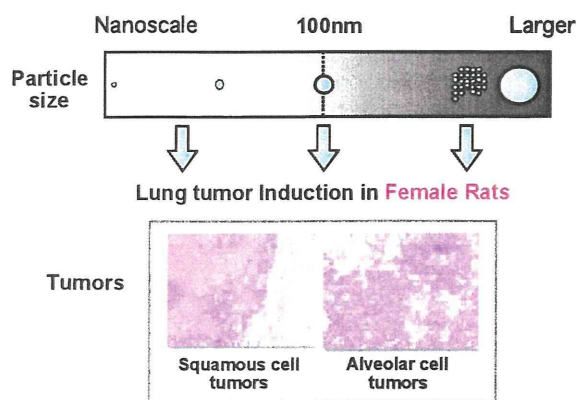


Figure 4. Schematic Presentation of Carcinogenic Effects of TiO₂, Carbon Black. Carcinogenic effects were elicited by both nano-scale and larger sized particles

mixed results. SWCNT and fullerenes have no carcinogenic activity in the studies conducted to date, however, toxicity testing of these materials has been quite limited and both of these materials have the potential to produce ROS. The observations noted here may apply to possible carcinogenic risk of other nanoparticles because of shared mechanisms of induction of inflammatory lesions and ROS generation. Our conclusions are that nanoparticles are clearly potentially toxic/carcinogenic to humans and their toxicity must be assessed, and their production and use managed appropriately.

Acknowledgements

The authors express gratitude to Dr David B Alexander for assistance in preparation of the manuscript. The collection of the references was supported by Health and Labour Sciences Research Grant (Research on Risk of Chemical Substance 21340601, H18-kagaku-ippan-007) from the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan.

References

- Baan RA (2007). Carcinogenic hazards from inhaled carbon black, titanium dioxide, and talc not containing asbestos or asbestiform fibers: recent evaluations by an IARC Monographs Working Group. *Inhal Toxicol*, **19 Suppl 1**, 213-28.
- Carrero-Sanchez JC, Elias AL, Mancilla R, et al (2006). Biocompatibility and toxicological studies of carbon nanotubes doped with nitrogen. *Nano Lett*, **6**, 1609-16.
- Dasenbrock C, Peters L, Creutzenberg O, Heinrich U (1996). The carcinogenic potency of carbon particles with and without PAH after repeated intratracheal administration in the rat. *Toxicol Lett*, **88**, 15-21.
- Emerich DF, Thanos CG (2003). Nanotechnology and medicine. *Expert Opin Biol Ther*, **3**, 655-63.
- Heinrich U, Fuhst R, Rittinghausen S, et al (1995). Chronic inhalation exposure of Wistar rats and two different strains of mice to diesel engine exhaust, carbon black, and titanium dioxide. *Inhal Toxicol*, **7**, 533-56.
- Kamat JP, Devasagayam TP, Priyadarsini KI, Mohan H, Mittal JP (1998). Oxidative damage induced by the fullerene C60 on photosensitization in rat liver microsomes. *Chem Biol Interact*, **114**, 145-59.
- Koyama S, Endo M, Kim YA, et al (2006). Role of systemic T-cells and histopathological aspects after subcutaneous implantation of various carbon nanotubes in mice. *Carbon*, **44**, 1079-92.
- Lam CW, James JT, McCluskey R, Hunter RL (2004). Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. *Toxicol Sci*, **77**, 126-34.
- Liu M, Okada S (1994). Induction of free radicals and tumors in the kidneys of Wistar rats by ferric ethylenediamine-N,N'-diacetate. *Carcinogenesis*, **15**, 2817-21.
- Muller J, Delos M, Panin N, et al (2009). Absence of carcinogenic response to multiwall carbon nanotubes in a 2-year bioassay in the peritoneal cavity of the rat. *Toxicol Sci*, **110**, 442-8.
- Muller J, Huaux F, Moreau N, et al (2005). Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes. *Toxicol Appl Pharmacol*, **207**, 221-31.
- Nelson MA, Domann FE, Bowden GT, et al (1993). Effects of acute and subchronic exposure of topically applied fullerene extracts on the mouse skin. *Toxicol Ind Health*, **9**, 623-30.
- Newman MD, Stotland M and Ellis JI (2009). The safety of nanosized particles in titanium dioxide- and zinc oxide-based sunscreens. *J Am Acad Dermatol*, **61**, 685-92.
- Nikula KJ (2000). Rat lung tumors induced by exposure to selected poorly soluble nonfibrous particles. *Inhal Toxicol*, **12**, 97-119.
- Pott F, Roller M (2005). Carcinogenicity study with nineteen granular dusts in rats. *Eur J Oncol*, **10**, 249.
- Rittinghausen S, Mohr U, Dungworth DL (1997). Pulmonary cystic keratinizing squamous cell lesions of rats after inhalation/instillation of different particles. *Exp Toxicol Pathol*, **49**, 433-46.
- Roco MC (2003). Nanotechnology: convergence with modern biology and medicine. *Curr Opin Biotechnol*, **14**, 337-46.
- Sakamoto Y, Nakae D, Fukumori N, et al (2009). Induction of mesothelioma by a single intrascrotal administration of multi-wall carbon nanotube in intact male Fischer 344 rats. *J Toxicol Sci*, **34**, 65-76.
- Sera N, Tokiwa H, Miyata N (1996). Mutagenicity of the fullerene C60-generated singlet oxygen dependent formation of lipid peroxides. *Carcinogenesis*, **17**, 2163-9.
- Shvedova AA, Castranova V, Kisin ER, et al (2003). Exposure to carbon nanotube material: assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells. *J Toxicol Environ Health A*, **66**, 1909-26.
- Takagi A, Hirose A, Nishimura T, et al (2008). Induction of mesothelioma in p53[±] mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube. *J Toxicol Sci*, **33**, 105-16.
- Warheit DB, Laurence BR, Reed KL, et al (2004). Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats. *Toxicol Sci*, **77**, 117-25.

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[#], 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[#], 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(SiO₂), 二酸化チタン(TiO₂), アルミナ(Al₂O₃), 酸化鉄(Fe₃O₄, Fe₂O₃), 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

[#] 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。

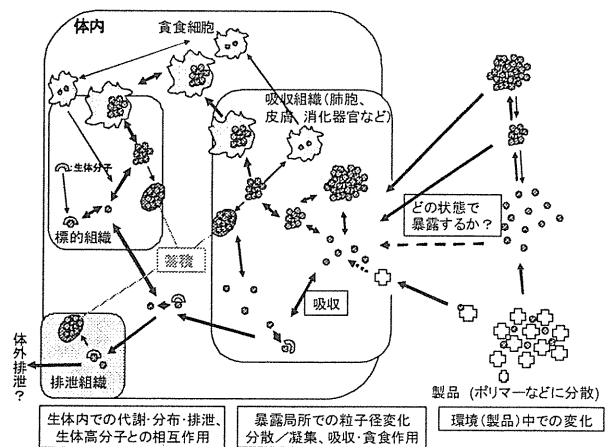
このようなナノマテリアルの多方面にわたる利用拡大は, 我々がこれらの物質に直接, あるいは商品を通して間接的に接する機会が増えてくることを意味している。そうすると, 本来の目的や使用方法以外による接触や暴露も増える可能性が高くなる他, 本来の使用方法でも想定外の長期間暴露, さらに物質, 商品等が廃棄された後の環境経路による暴露の機会も増すことが想定される。しかし, これらの特定の機能を意図して合成された純粋な単体としてのナノ物質が生体に及ぼす影響については多くの点で未知である。従って, ナノマテリアルが本格的にその使用が拡大する前に, ナノマテリアルの有用性だけでなく安全性に関する知見も十分に蓄積し, 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めている。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には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）、 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、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。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、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⁶⁾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⁷⁾。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、Group2Bに変更された⁸⁾。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^{9, 10)}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のないことも報告されている¹¹⁾。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¹²⁾。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、局所刺激や感受性、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¹³⁾。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¹⁴⁾。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¹⁵⁾、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¹⁶⁾。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¹⁷⁾。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^{18, 19)}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²⁰⁾。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²¹⁾。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²²⁾。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^{23, 24)}。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²⁵⁾。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-/-トランスジェニックマウスで、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²⁶⁾。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 μ mと0.9 μ 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²⁷⁾。マウスにMWCNT (200-400 μ 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²⁸⁾。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²⁹⁻³¹⁾。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

を確認した。暴露測定法および動態解析では、フラーレンのラットへの強制単回経口投与と、MWCNTの気管内投与による生体試料での定量的な検出が可能であることを確認した。*in vitro*試験法の研究においては、リボソーム懸濁フラーレンの暴露により、小核誘発性、神経細胞機能蛋白質に対する影響、Caco-2細胞を使った細胞透過性、マクロファージ細胞からのサイトカイン放出に関して、特に強い影響が見られなかったことを確認してきた。国際動向調査においては、OECDに設置されたワーキンググループ内での討議で、加盟各国でのボランタリーな初期評価研究を進めることが合意されており、本研究班の成果も積極的に取り入れていくべきことが示された。

これらの研究成果をとおして、MWCNTの吸入暴露システムや生体内検出法や*in vitro*試験法のための基礎的技術を確認することを可能にすると共に、MWCNT腹腔内投与での繊維状粒子として観察された事象や気管内投与による発がんプロモーション作用の結果により、*in vivo*長期暴露研究の必要性を強く示すことができたと考えている。

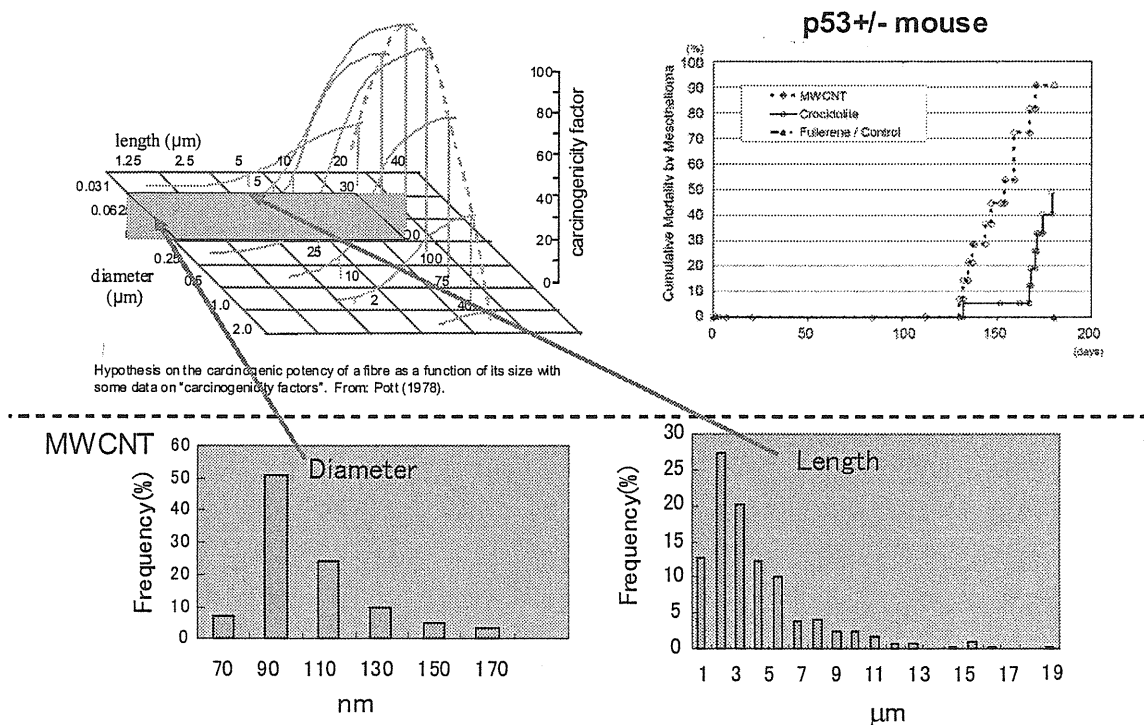
アスベスト様サイズの繊維状粒子の腹腔内投与試験の妥当性

我々のMWCNT腹腔内投与研究を含めて、最近報告されている様々な長さを持つカーボンナノチューブ類の中皮腫誘発性研究については、アスベスト様の繊維状粒子

に関する過去の研究を参考としてデザインされている。ここでは、これらの研究が行われた理由を説明するために、まず過去の経緯についての概説を行う。

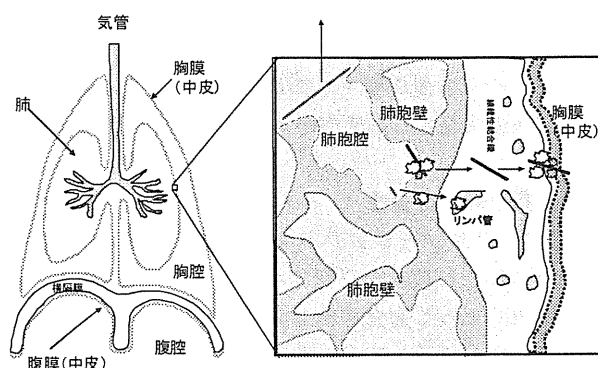
アスベストなどの繊維状粒子の吸入暴露による肺発がん性ポテンシャルは、繊維径と長さおよび体内残留性に依存することが知られている。Davis(1989)ら³²⁾のラットを使った吸入実験では、20 μ m以上の繊維数の多いクリソタイルでアスベスト線維症と発がん性が強くなる傾向が示唆された。それまでの様々な治験をもとにPott(1978)³³⁾は、繊維系と繊維長を関数として発がんポテンシャルの強さを示す仮説を提唱した(図2)。一方、アスベストによる実験動物による中皮腫の誘発は、最初にラットへの胸腔内へのアスベスト埋入実験によって、Wangerによって証明された。さらに、Stanton(1981)ら³⁴⁾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1.5 μ m以下で、長さが4 μ m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。これらの知見をもとに、WHO(1986)³⁵⁾では、繊維長、径および化学組成は体内での沈着、クリアランス、移動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。

図 2. 腹腔内投与による中皮腫誘発作用の検討



この形状に依存した繊維性粒子の発がん性などの慢性影響は、肺の中での体内残留性に関連していると考えられている。WHOでは、PCOMサンプラーでカウント可能な、繊維長 $5\mu\text{m}$ 以上で、繊維径が $3\mu\text{m}$ 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。これは、繊毛のある気道を通り抜けて、胚胞まで到達できる粒子 (respirable)は空気力学的な繊維径が $5\sim 10\mu\text{m}$ 以下とされているが、繊維長は空気力学的な繊維径に影響を与えないことが示されている^{36, 37)}ことや、 $5\mu\text{m}$ 以上の大きさの繊維は、マクロファージで除去するには大きすぎることによるものであると解釈されている。その結果、これらの繊維状粒子の肺胞域への到達性と、生理学的な難除去性が、繊維長の長い繊維の有害性を示す根拠の一つであると考えられている (図3)。

図3. 繊維状粒子の肺胞域への到達性と生理学的難除去性



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た。また、アスベストの一種クリソタイル(白石綿)も不純物の少ないものは、クロシドライトやアモサイトよりも、繊維数あたりの催腫瘍性が弱いことが知られている³⁸⁾。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、発がん機序の因子と考えられている。実際、クリソタイルを含めたアスベストや人工ガラス質繊維の不純物としても混在している。しかし、その混在量は、同じ物質でもサンプルごとに異なるほか、どのタイプの鉄原子が発がん性に関わっているかは依然不明であり、鉄の混在量と活性酸素の発生量に明らかな相関関係は認められていない³⁹⁾。鉄含量は中皮腫誘発の増強要因であるが、絶対要因ではない。

一方、体内残留性は慢性影響に関して、形状因子(線維長と径)の以外に他に最も重要であると認識されてい

る因子としては、化学組成に基づく繊維の体内での耐久性 (durability) が知られている⁴⁰⁾。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、粒子表面の収縮や侵食などにより、繊維が分解されたり短くなったりすることにより、物質の組成によっては、肺胞内から除去されていくメカニズムのあることが示唆されている。実際、肺内からの繊維(特に繊維長の長い($20\mu\text{m}$ 以上)繊維)の排出半減期の長さが、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⁴¹⁾。一方、腹腔内投与による中皮腫の誘発の強さも、繊維長の長い繊維の肺からの排出半減期の長さとよく相関していることが示されている⁴²⁾。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)⁴³⁾の中では、上記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での知見に加えて、 $20\mu\text{m}$ 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)を基準として採用している。

最近のアスベスト代替繊維の評価に関するWHO/IPCSの2005年のワークショップ (WHO Workshop on Mechanisms of Fibre Carcinogenesis and Assessment of Chrysotile Asbestos Substitutes. 8-12 November, 2005, Lyon, France)でもサマリーレポートのなかで、

「物理化学的性質として、化学組成は、繊維の構造と物理化学的性質(表面積や表面活性)を決定する主要因子であり、繊維粒子成分から発生するフリーラジカルはDNA障害や変異原性を引き起こす。また、繊維表面の物理化学的性質は炎症反応を決定する因子となる。また、繊維の半径・長さや蓄積性に関しては、繊維の長さに依存して生体内残留性が大きくなれば、繊維粒子による発がん性が強くなる傾向にあるとされているが、これはガラス製の繊維によって確認されている事項であり、他の種類の繊維状粒子でも証明されている訳ではない。」

という有害性評価に関するコメントが参加者によるコンセンサスとしてまとめられている。

以上のようにこれまで繊維状粒子と中皮腫の誘発能に関しては、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、アスベストとガラス性繊維に関してはある程度のコンセンサスが得られているものの、繊維性粒子全体の評価としては、依然、明確な国際的コンセンサスは確立していない状況である。しかし、frustrated phagocytosisを仮説とし、組成に関わらず粒子のサイズと形状を重視する考

えも否定されていない。

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は、上記のような知見が当てはまるかどうかについては確認の必要性が提言されていた⁴⁴⁾。そこで、我々の研究班では、炭素原子が主成分である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こととした。

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多層カーボンナノチューブ(MWCNT)について、その繊維径と長さを測定したところ図2の結果を得ている。これらの大きさは、初期に提唱された発がんポテンシャルを示す大きさのレンジと重なることが示された。その発がん性を評価するにあたり、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は考えられたが、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、研究班がスタートした直後においては、液体等に分散するなどして気管内投与を行うことを念頭においても、適切に分散して投与/吸入暴露を行う手法が存在していなかった。また吸入暴露による検証の必要性についても、論議の分かれるところであり、過去の吸入暴露実験による齧歯類の発がん感受性が人のそれに対して著しく低く、発がんポテンシャルを過小評価する可能性、そして、むしろ齧歯類における腹腔内投与結果との対応の方が、人における発がんポテンシャルを正當に評価するのではないかと指摘もあるため、上述した腹腔内投与法の妥当性に鑑み、最初の試験の暴露経路として検出力の高い腹腔内暴露を選定した。しかし、最も発がんポテンシャルの強いアスベスト(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、より短期間での検出法を検討した。その結果、P53(+/-)ヘテロノックアウトマウスを使った腹腔内投与手法により、アスベストによる中皮腫誘発を約半年まで短縮できる研究が報告⁴⁵⁾、⁴⁶⁾されており、この手法を用いてナノチューブとフラーレンを検討することとした。P53(+/-)マウスを用いたオリジナルの手法では、200 μ g(5.8 \times 10⁸ fibre)を週に一回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単回投与で行うこととした。また、未だ最終化はされていないが、1997年にECのEuropean Chemical Bureauの合同研究センター(Joint Research Center)で作成されたManMadeMineralFibres(MMMF)試験法のドラフト案⁴⁷⁾では、繊維数として1 \times 10⁹ WHO fiber/ratの単回投与を標準としている。また、Rollerら(1997)⁴⁸⁾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、10⁹ 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得ることができていることが示されている。研究結果としては、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た場合に、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³⁰⁾。(尚、現在解析中の追加試験では、1000分の一の用量である3 μ g/mouseの腹腔内投与でも、中皮腫の発生することを確認している)。同時に投与したクロシドライト(3mg/mice)においても、ほとんどのマウスに中皮腫を誘発したが、未修飾フラーレンを同用量(3mg/mouse)投与した場合は、対象群と同様に中皮腫の発生を認めなかった。

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 μ g/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CNTを取り込んだ群においてのみ細胞が集めた肉芽の形成が認められた²⁹⁾。この結果は、我々の結果を支持する結果である⁴⁹⁾。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³¹⁾。尚、短いタイプやその他の様々な形状のMWCNTにおける慢性毒性は別途検証する必要がある。

慢性影響研究の重要性

p53のヘテロノックアウトマウスにナノマテリアルを腹腔内投与した我々の研究では、分散したMWCNT繊維が食細胞によって貪食された像として認められ、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の線維性中隔に沿って及び腸間膜リンパ節の中にも認められることが示されている。また、中皮腫誘発性を示さなかったフラーレンについては、腹膜において小さな暗褐色斑を漿膜表面に認めるのみであったが、この暗褐色斑は投与したフラーレン凝集塊のサイズと形が一致しており、その裂隙の辺縁が褐色に染まった像が捕らえられている。これは、食細胞によるフラーレン粒子の表面の生体による細分散の可能性を示唆しているものと推定された。この実験を再解析した結果、フラーレン投与群において、体重増加抑制、腎の巣状萎縮、組織学的に尿細管上皮の空胞変性(PAS染色陰性、脂肪染色陰性)～尿細管の萎縮と円柱形成によるネフロン萎縮ないし脱落が誘発されていることが示唆され、現在、追試による確認を進めている。少なくともフラーレン凝集体が貪食細胞等により細粒化され、全身に再分布して影響を引き起こした可能性が示唆された。

以上のことは、アスベスト様の繊維状粒子の慢性暴露による中皮腫誘発性だけではなく、体内に取り込まれ得るサイズのナノマテリアルの長期体内残留とそれに対

する生体反応の様式が、慢性的に身体に大きく影響することを示唆しており、ナノマテリアルの未知の生体影響を検索していくための慢性影響研究は、より重要な研究テーマとして取り上げるべきであると考えられる。

おわりに

産業用ナノマテリアルはナノテクノロジーの中心的新規物質として、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を含んでいる。このような懸念に対して、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と評価の実施が急務となっており、我々は、本問題に対処するための体内動態モニタリング法、*in vitro*及び*in vivo*の評価法開発の為に基礎的研究を進めてきたところである。ナノマテリアルによる健康影響評価法について論点の整理では、基本的な評価概念については、従来の化学物質と同様であると考えられるものの、ナノマテリアル特有の物理化学的性状のため、特に分散法や体内蓄積性といった観点で新しい技術の導入や手法開発が必要であることが示された。一方、ナノマテリアルの想定された体内動態に従い最も懸念された慢性影響として、繊維状粒子による中皮腫形成について、アスベスト同様の大きさや形の繊維を含むカーボンナノチューブが腹腔内投与試験よりそのポテンシャルを持つことを明らかにしてきた。加えて、この研究は短い繊維状のナノチューブやフラーレンが、細胞による貪食作用等を介して体内に再分布する可能性を示唆した。これらのことは、ナノマテリアルの長期体内残留とそれに対する生体反応の様式が、慢性影響に大きく影響することを示唆すると共に、表面活性の高いナノマテリアルと体内成分（細胞を含む）との基礎的な相互作用、体内残留様式、及び慢性有害性影響の同定が、ナノマテリアルの健康影響評価研究の中で最も重要な検討事項であることを示したものであると考えている。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、*in vitro*及び*in vivo*の評価などの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。

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 (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks), 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) Lee, K.P. Trochimowicz, H.J. and Reinhardt, C.F.:Toxicol. Appl. Pharmacol. 79, 179-92 (1985)
- 7) IARC:IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. 46, 1-458 (1989)
- 8) IARC. Summaries and Evaluation. Carbon Black, Titanium Dioxide and Non-Asbestiform Talc. 2006; Available from: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Meetings/93-titaniumdioxide.pdf>.
- 9) Donaldson, K. Stone, V. Clouter, A. Renwick, L. and MacNee, W.:Occup. Environ. Med. 58, 211-6, 199 (2001)
- 10) Oberdorster, G. Maynard, A. Donaldson, K. Castranova, V. Fitzpatrick, J. Ausman, K. Carter, J. Karn, B. Kreyling, W. Lai, D. Olin, S. Monteiro-Riviere, N. Warheit, D. and Yang, H.:Part Fibre Toxicol. 2, 8 (2005)
- 11) Warheit, D.B. Webb, T.R. Sayes, C.M. Colvin, V.L. and Reed, K.L.:Toxicol. Sci. 91, 227-36 (2006)
- 12) Warheit, D.B. Webb, T.R. Reed, K.L. Frerichs, S. and Sayes, C.M.:Toxicology. 230, 90-104 (2007)
- 13) Lademann, J. Weigmann, H. Rickmeyer, C.

- Barthelmes, H. Schaefer, H. Mueller, G. and Sterry, W.:*Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 12, 247-56 (1999)
- 14) Pflucker, F. Wendel, V. Hohenberg, H. Gartner, E. Will, T. Pfeiffer, S. Wepf, R. and Gers-Barlag, H.:*Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 14 Suppl. 1, 92-7 (2001)
- 15) Kreilgaard, M.:*Adv Drug Deliv Rev.* 54 Suppl. 1, S77-98 (2002)
- 16) Sera, N. Tokiwa, H. and Miyata, N.:*Carcinogenesis.* 17, 2163-9 (1996)
- 17) Baierl, T. Drosselmeyer, E. Seidel, A. and Hippeli, S.:*Exp Toxicol. Pathol.* 48, 508-11 (1996)
- 18) Sayes, C. Fortner, J. Guo, W. Lyon, D. Boyd, A. Ausman, K. Tao, Y. Sitharaman, B. Wilson, L. Hughes, J. West, J. and Colvin, V.:*Nano Lett.* 4, 1881-1887 (2004)
- 19) Isakovic, A. Markovic, Z. Todorovic-Markovic, B. Nikolic, N. Vranjes-Djuric, S. Mirkovic, M. Dramicanin, M. Harhaji, L. Raicevic, N. Nikolic, Z. and Trajkovic, V.:*Toxicol. Sci.* 91, 173-83 (2006)
- 20) Sayes, C.M. Marchione, A.A. Reed, K.L. and Warheit, D.B.:*Nano Lett.* 7, 2399-406 (2007)
- 21) Moriguchi, T. Yano, K. Hokari, S. and Sonoda, M.:*Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures.* 7, 195 - 209 (1999)
- 22) Moriguchi, T. Yano, K. Hokar, S. and Sonda, M.:*Fullerene Science and Technology.* 7, 195-209 (1999)
- 23) Warheit, D.B. Laurence, B.R. Reed K, L. Roach, D.H. Reynolds, G.A.M. and Webb, T.R.:*Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology.* 77, 117-125 (2004)
- 24) Lam, C.-W. James, J.T. McCluskey, R. and Hunter, R.L.:*Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology.* 77, 126-134 (2004)
- 25) Shvedova, A.A. Kisin, E.R. Mercer, R. Murray, A.R. Johnson, V.J. Potapovich, A.I. Tyurina, Y.Y. Gorelik, O. Arepalli, S. Schwegler-Berry, D. Hubbs, A.F. Antonini, J. Evans, D.E. Ku, B.-K. Ramsey, D. Maynard, A. Kagan, V.E. Castranova, V. and Baron, P.:*American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology.* 289, L698-708 (2005)
- 26) Li, Z. Hulderman, T. Salmen, R. Chapman, R. Leonard, S.S. Young, S.-H. Shvedova, A. Luster, M.I. and Simeonova, P.P.:*Environmental health perspectives.* 115, 377-382 (2007)
- 27) Muller, J. Huaux, F. Moreau, N. Misson, P. Heilier, J.-F. Delos, M. Arras, M. Fonseca, A. Nagy, J.B. and Lison, D.:*Toxicology and applied pharmacology.* 207, 221-231 (2005)
- 28) Nemmar, A. Hoet, P.H.M. Vandervoort, P. Dinsdale, D. Nemery, B. and Hoylaerts, M.F.:*Journal of thrombosis and haemostasis : JTH.* 5, 1217-1226 (2007)
- 29) Poland, C.A. Duffin, R. Kinloch, I. Maynard, A. Wallace, W.A. Seaton, A. Stone, V. Brown, S. Macnee, W. and Donaldson, K.:*Nat Nanotechnol.* 3, 423-8 (2008)
- 30) Takagi, A. Hirose, A. Nishimura, T. Fukumori, N. Ogata, A. Ohashi, N. Kitajima, S. and Kanno, J.:*J Toxicol. Sci.* 33, 105-16 (2008)
- 31) Sakamoto, Y. Nakae, D. Fukumori, N. Tayama, K. Maekawa, A. Imai, K. Hirose, A. Nishimura, T. Ohashi, N. and Ogata, A.:*J Toxicol. Sci.* 34, 65-76 (2009)
- 32) Davis, J.M.:*IARC Sci Publ.* 33-45 (1989)
- 33) Pott, F.:*Staub, Reinhaltung der Luft.* 38, 486-490 (1978)
- 34) Stanton, M.F. Layard, M. Tegeris, A. Miller, E. May, M. Morgan, E. and Smith, A.:*J Natl Cancer Inst.* 67, 965-75 (1981)
- 35) WHO, ASBESTOS AND OTHER NATURAL MINERAL FIBRES (ENVIRONMENTAL HEALTH CRITERIA 53) (1986).
- 36) Timbrell, V.:*J. Occup. Health Soc. Aust.* 3, 3-12 (1983)
- 37) HSE, An inventory of fibres to classify their potential hazard and risk (2006).
- 38) Bernstein, D.M. Rogers, R. and Smith, P.:*Inhal. Toxicol.* 15, 1247-74 (2003)
- 39) WHO, Consensus report of 'IARC Scientific publication No.140' (1999).
- 40) Bignon, J. Saracci, R. and Touray, J.C.:*Environ Health Perspect.* 102 Suppl. 5, 3-5 (1994)
- 41) Hesterberg, T.W. Chase, G. Axten, C. Miller, W.C. Musselman, R.P. Kamstrup, O. Hadley, J. Morscheidt, C. Bernstein, D.M. and Thevenaz, P.:*Toxicol. Appl. Pharmacol.* 151, 262-75 (1998)
- 42) Bernstein, D.M. Riego Sintes, J.M. Ersboell, B.K. and Kunert, J.:*Inhal. Toxicol.* 13, 823-49 (2001)
- 43) EC:Official Journal of the European Communities, (1997)
- 44) Donaldson, K. and Tran, C.L.:*Mutat Res.* 553, 5-9 (2004)

- 45) Marsella, J.M. Liu, B.L. Vaslet, C.A. and Kane, A.B.:*Environ. Health Perspect.* 105 Suppl 5, 1069-72 (1997)
- 46) Vaslet, C.A. Messier, N.J. and Kane, A.B.:*Toxicol. Sci.* 68, 331-8 (2002)
- 47) ECB, METHODS FOR THE DETERMINATION OF THE HAZARDOUS PROPERTIES FOR HUMAN HEALTH OF MAN MADE MINERAL FIBRES (MMMMF) (1999).
- 48) Roller, M. Pott, F. Kamino, K. Althoff, G.H. and Bellmann, B.:*Environ. Health Perspect.* 105 Suppl. 5, 1253-6 (1997)
- 49) Kane, A.B. and Hurt, R.H.:*Nat. Nanotechnol.* 3, 378-9 (2008)