

## ナノマテリアルの有害性評価（毒性評価）

津田洋幸,<sup>a</sup> 徳永裕司,<sup>b</sup> 広瀬明彦,<sup>c</sup> 菅野 純<sup>\*,d</sup>

## Hazard Identification of Nanomaterials

Hiroyuki TSUDA,<sup>a</sup> Hiroshi TOKUNAGA,<sup>b</sup> Akihiko HIROSE,<sup>c</sup> and Jun KANNO<sup>\*,d</sup>

<sup>a</sup>Department of Molecular Toxicology, Graduate School of Medical Sciences, Nagoya City University, 1 Kawasumi, Mizuho-cho, Mizuho-ku, Nagoya 467-8601, Japan, <sup>b</sup>Division of Environmental Chemistry, <sup>c</sup>Division of Risk Assessment, Biological Safety Research Center, and <sup>d</sup>Division of Cellular and Molecular Toxicology, Biological Safety Research Center, National Institute of Health Sciences, 1-18-1, Kamiyoga, Setagayaku, Tokyo 158-8501, Japan

(Received July 15, 2008)

It is considered that the materials with new properties may lead to novel biological effects or unknown adverse health effects. To gather proper hazard information, it is important to develop both experimental protocols and detection/measurement methods for nanomaterials in the body, in parallel. Since 2005, we are running research projects to develop methods to monitor health risk effects for the assessment of manufactured nanomaterials funded by the Ministry of Health, Labour and Welfare. For the experimental protocols, these projects focus on the development of 1) *in vitro* experimental systems, 2) *in vivo* experimental systems (mainly focusing on long-term health implication, especially carcinogenesis), and 3) proper inhalation system. Firstly, fullerene (C60), titanium dioxide and multi-walled carbon nanotube were chosen to be tested because of their high production volume. Safety issues for new materials such as nanoparticles is a new paradigm. The key is that the full scale exposure to the public has not been started yet. Therefore, there is a good chance that information from hazard identification studies can be directly fed back to the product development plan. Manufacturers can produce safer products without risking themselves waiting for the toxicology studies to be finished after their products are widely marketed.

**Key words**—toxicity; titanium dioxide, multi-wall carbon nanotube (MWCNT); asbestos; fullerene; Absorption, Digestion, Metabolism and Excretion (ADME); carcinogenesis

ナノマテリアルは、今後の産業の新たな発展にとっての重要な新素材である。これらは、従来の素材とは異なった様々な特性を有していること、及びその有害性についても新しい問題が提起されるとの予測がなり立つことから、国民の関心を呼んでいる。しかし、これらの有害性についての研究が始まったばかりであることから、情報は少ない。Figure 1

に、最近の動向を示す。2004年に産業技術総合研究所が公開フォーラムを開催し、2005年初頭に経済産業・文部科学・環境・厚生労働の4省庁関連研究所と産学が集まり「ナノテクノロジーと社会」([http://www.aist.go.jp/aist\\_j/research/honkaku/symposium/nanotech\\_society/050201/sdata.html](http://www.aist.go.jp/aist_j/research/honkaku/symposium/nanotech_society/050201/sdata.html))を開催した。これが、しばらくの間、関係各機関の連絡の場となった。

<sup>a</sup>名古屋市立大学大学院医学研究科・分子毒性学分野(分子医学講座生体防御・総合医学専攻)(〒467-8601名古屋市瑞穂区瑞穂町字川澄1), <sup>b</sup>国立医薬品食品衛生研究所環境衛生化学部(〒158-8501東京都世田谷区上用賀1-18-1), 現、医薬品医療機器総合機構品質管理部基準課(〒100-0013東京都千代田区霞が関3-3-2), <sup>c</sup>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, <sup>d</sup>同毒性部(〒158-8501東京都世田谷区上用賀1-18-1)

\*e-mail: kanno@nihs.go.jp

本総説は、日本薬学会第128年会シンポジウムS32で発表したものを中心に記述したものである。

Figure 2に、現在進行中のプロジェクトを示す。厚生労働省は厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)を基に、国立医薬品食品衛生研究所を中心とした研究を開始した。Figure 3に示すごとく、2004年より系統的な研究を行っている。意図的に生産されるナノマテリアルについて、人及び環境に対する有害影響の同定(有害性評価)のための研究を開始した。2004年の情報収集と研究方針出しに続き、2005年からのフラーレンや二酸化チ

- In 2004, the Technology Information Department of AIST launched an open forum entitled "**Nanotechnology and Society**."
- The first symposium (Feb. 2005) was organized by the four national research institutes with four different ministries.  
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, **AIST**  
National Institute for Materials Science, **NIMS**  
National Institute for Environmental Studies, **NIES**  
National Institute of Health Sciences, **NIHS**

### Importance of multidiscipline network

- In 2005, the survey project of "**Research Project on Facilitation of Public Acceptance of Nanotechnology**" was conducted by the above four institutes and universities. (funded by MEXT)

#### ⇒ Political Proposals

In 2006, the second project of "The multidisciplinary experts panel for nanotechnology implication"  
(MEXT: Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology)

Fig. 1. Importance of Multidiscipline Network

### Research programmes or strategies designed to address human health and/ or environmental safety aspects of nanomaterials;

- **Ministry of Economy, Trade and Industry** : (2006-2010) project  
The **NEDO** project: "Evaluation of the Potential Risks of Manufactured Nanomaterials based on Toxicity Tests with Precise Characterization."  
The project focuses on toxicity test protocols (mainly an inhalation test) and a risk assessment methodology of manufactured nanomaterials.
- **Ministry of the Environment** : National Institute of Environmental Sciences (**NIES**) has started a nanotoxicology programme
  - interaction of nano-fibers including CNT with cell membranes,
  - transepithelial and transpulmonary migration of nanoparticles,
  - *in vitro* and *in vivo* toxicity assay of nanomaterials
 NIES has been investigating inhalation effects of atmospheric nanoparticles for the last 3 years
- **Ministry of Health, Labour and Welfare** : The National Institute of Occupational Safety and Health (**JNIOSH**) will start a new research on possible health issues in April 2007, due to exposure to nanomaterials in the workplace.
- **MHLW the Office of Chemical Safety**: **NIHS**

Fig. 2. Research Programmes and Strategies Designed to Address Human Health and/ or Environmental Safety Aspects of Nanomaterials

### Recent research activities in NIHS granted by the "Health and Labour Sciences Research Grants" of the Office of Chemical Safety, MHLW (Ministry of Health, Labour and Welfare)

Fiscal year	Research activities
2004	Survey research of public information about health implication of nanomaterials
2005	The initial research on methodology of health risk assessment of manufactured nanomaterials started
2006 (to 2008)	Restating the project of "Research on the hazard characterization and toxicokinetic analysis of manufactured nanomaterials for the establishment of health risk assessment methodology", as the expanded project,
2007 (to 2009)	"Research on the dermal toxicity evaluation methodology of the manufactured nanomaterials"

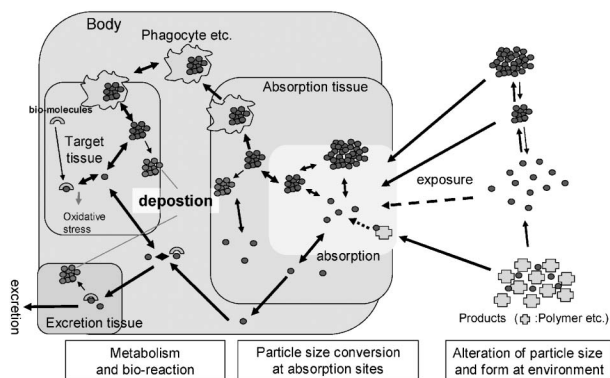
Fig. 3. Recent Research Activities in NIHS Granted by the "Health and Labour Sciences Research Grants" of the Office of Chemical Safety, MHLW

タンを例とした測定法と有害性評価法の検討, 2006年からのMWCNTを加えた長期毒性とトキシコキネティクス, ADME検討法の確立, *in vitro*法の検討, さらに, 2007年からの皮膚毒性, 経皮毒性, 経気道毒性を加えて, 長期毒性に焦点を当てた総合的な有害性評価を開始している。

現在, 手元にある意図的生産品としてのナノマテリアルは, 凝集体として, あるいは, それ個々のサイズ分布の広範性により (サイズによる厳密な分画が行われていないバルク剤), マイクロメーターの次元を持つ粒子から, ナノメーターの次元を持つ粒子までが混在したものが一般的である。フラーレンはその溶媒の条件により, 数百マイクロメーター大の粒子から, 完全な単分子状態, さらに, 溶解条件の変動により, 石英状の柱状-アスベスト様の棒状の凝集体 (ウィスカー) に再凝集する性質がある。このような, 溶解環境の変化は, 生体内では親水性 (気管・気管支内, 内消化管内, 血液内), 親油性 (細胞膜など, 脂質二重膜内), あるいは酸化的環境 (炎症細胞による攻撃), その他, 酵素的な環境を含め, 複雑であることから, Fig. 4に示すごとく, 体内への吸収と分布, 蓄積と再分解, 再分布といった複雑な動態が予測される。蓄積場所についても, 血行性, リンパ行性といった移動媒体を使って脳をはじめとする全身臓器に運ばれることが想定され, または報告されている。主な排出経路としては腸管と腎が想定されるが, 胆汁への移行, 腎糸球体の基底膜親和性・透過性など, 不明なことが多い。

実験に用いたMWCNTについては, 東京都健康安全研究センターとの共同で電子顕微鏡によるサイズ, 及びICP-MS等による金属等の元素含有量の測定を行った (Fig. 5)。径は約100 nmが中心で, 長さは5 μm以上のものが約1/4を占めているMWCNTであった。鉄の含有量は3,500 ppmであり, 以下ハロゲンや硫黄が認められた。

*In vivo* 毒性試験として, いくつかの試みを実施しているので, それらについて簡単に述べる。まず二酸化チタンの皮膚発がんプロモーション作用について, ヒトc-Ha-ras導入ラットを用いた検討を紹介する (Fig. 6)。ジメチルベンツアントラセン (DMBA) を1回塗布し, 30週間, 二酸化チタンを塗布した。陽性対象には皮膚発がん促進作用の知られるフォルボールエステル (TPA)<sup>1)</sup> を, 陰性対象



**Predicted exposure and ADME**  
The major health concern may be caused by long-term deposition

Fig. 4. Predicted Exposure and ADME

### Detection and measurement (2)

- Development of CNT detection method in the biological samples (e.g. Electron microprobe analysis)

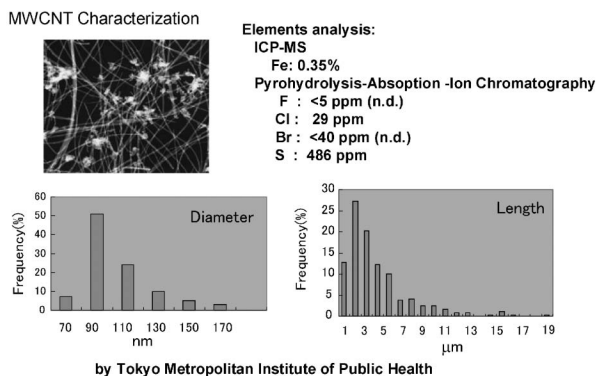


Fig. 5. Development of CNT Detection Method in the Biological Samples

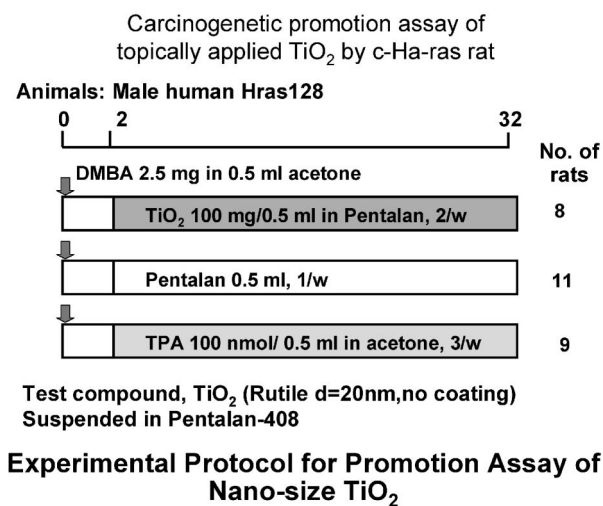


Fig. 6. Carcinogenetic Promotion Assay of Topically Applied TiO<sub>2</sub> by c-Ha-ras Rat

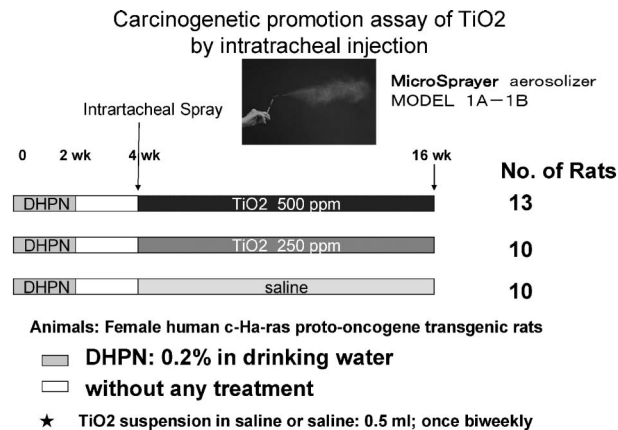


Fig. 7. Carcinogenetic Promotion Assay of TiO<sub>2</sub> by Intratracheal Injection

には懸濁溶媒 (Pentalan) を用いた。その結果、二酸化チタンは皮膚乳頭腫の発生を促進する結果を得ている (投稿準備中)。

次に、気管内投与による肺発がん促進作用を同様のラットを用いて検討した (Fig. 7)。ジヒドロキシプロピルニトロサミン (DHPN) を2週間飲水投与したのち、隔週で二酸化チタンの懸濁液を気管内スプレーにて、12週間投与した。その結果、肺の過形成病変 (前駆病変と考えられる) 及び肺腺腫の発がん促進が認められた (投稿準備中)。フラレンについても同様の実験が進行中である。

最後に、p53 ヘテロ欠失マウスの腹腔内投与モデルを用いての MWCNT のアスベスト様中皮腫発がん性を検討した実験を示す。陽性対象には青アスベスト (Crocidolite) を用いた。フラレンを非ファイバー状炭素系材料としての対照に置いた (Fig. 8)。まず、腹腔内投与法の位置付けであるが、アスベスト及び代替繊維、特にグラスファイバーを用いた 1970-80 年代頃の多くの研究<sup>2-4)</sup>の結果から Fig. 9 に示すごとく、2005 年の WHO 会合<sup>5)</sup>においてもその有効性が認められている。われわれが毒性影響を検討している MWCNT は、前述のごとく、5 μm よりも長い繊維状あるいは棒状の粒子を含んでいる。これは、もしも十分に頑丈で生体内に長期に渡り分解されずに残留した場合、1978 年の Pott<sup>6)</sup> の「繊維の発がん因子」に当てはめると、Fig. 10 の上段左の灰色で示した長方形の領域に当たる繊維をこの MWCNT が含んでいることが分り、当然の帰結として、アスベスト様発がん作用

を有していることが予測される。上段右に示すように、アスベストの p53 ヘテロ欠失マウスの腹腔内投与は、野生型マウスにおける中皮腫発がんの期間を短縮することが Kane らのグループにより示されている。<sup>7)8)</sup>

用量の設定については、M. Roller らの論文<sup>9)</sup>にあるように (Fig. 11) 中皮腫発がん性の弱い繊維の検出が可能な腹腔内投与量が  $10^9 \sim 10^{10}$  本であることを参考に設定した。この本数で陰性であれば問題ないことになるとの考えである。この実験の結果

Asbestos-like fiber carcinogenesis assay of MWCNT by intraperitoneal administration to p53+/- mouse

Experimental Design	
• animal	: p53+/- mouse (C57BL/6 back, 9 - 11weeks age) 4 groups (18 - 19 per group)
• administration	: single intraperitoneal administration
	1. MWCNT 3mg/animal = $1 \times 10^9$ f/animal
	2. furellene 3mg/animal
	3. crocidolite 3mg/animal = $1 \times 10^{10}$ f/animal
	4. vehicle
• sample preparation:	suspended in 0.5%CMC solution, autoclaved, added tween 80 (1%), and sonicated

Fig. 8. Asbestos-like Fiber Carcinogenesis Assay of MWCNT by Intraperitoneal Administration to p53+/- Mouse

は Fig. 12 に示すように、MWCNT が青アスベストと同等の中皮腫発がん性を持つことが示された<sup>10)</sup>。なお、体内滞留時間が長いチタン酸カリウムウィスカー、炭化ケイ素ウィスカー、酸化チタンウィスカーはいずれもラット腹腔内投与による中皮腫発がんが知られている。<sup>11)</sup>

ナノマテリアルの有害性評価は、ヒトへの大掛かりな暴露が始まっていない現在、製造者側への安全な製品開発に必要な情報提供としての意味合いが大

**WHO Workshop on Mechanisms of Fibre Carcinogenesis and Assessment of Chrysotile Asbestos Substitutes**  
8-12 November 2005, Lyon, France "SUMMARY CONSENSUS REPORT"

• **Methodological Aspects**

Epidemiologic studies

a clear advantage, but does not always override contrary findings from toxicological studies.

In vivo animal studies.

- carcinogenic response (lung cancer, mesothelioma) and fibrosis were considered to be the key effects;
- epithelial cell proliferation; and inflammation were not regarded to be equally important indicators
- the sensitivity of lung tumors in the rat is clearly lower than that in humans. (reason is still unclear)
- **testing of fibres by intraperitoneal injection represents a useful and sensitive assay.**

Fig. 9. WHO Workshop on Mechanisms of Fibre Carcinogenesis and Assessment of Chrysotile Asbestos Substitutes

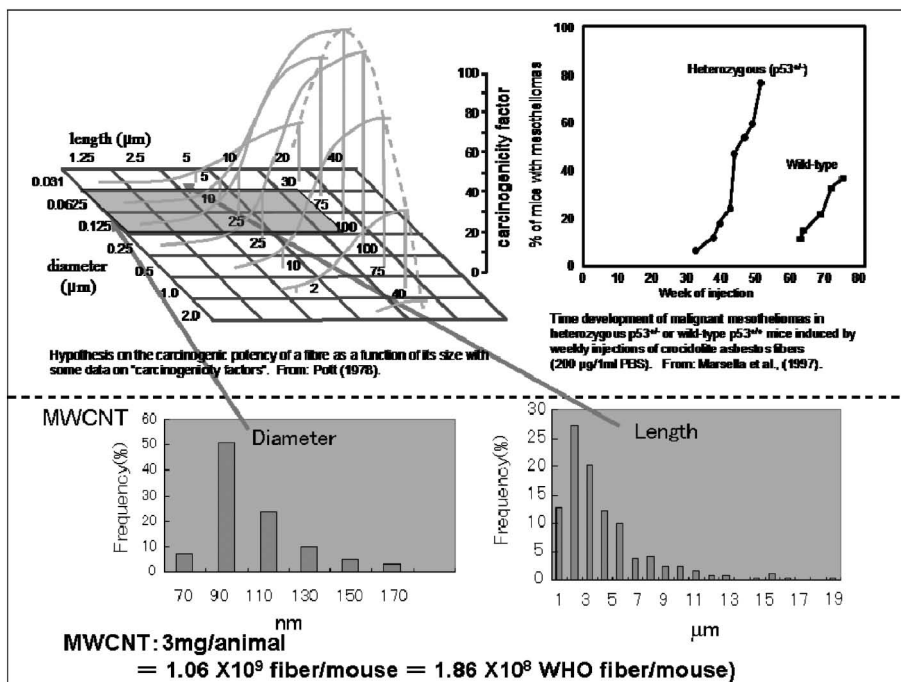


Fig. 10. MWCNT, Its Size and Property

きい。今までの新素材の中には、慢性毒性情報の乏しいことが「低毒性」であることと誤解され、数十年の歳月を掛けて国民の人体実験の結果として中皮腫発がんが顕在化した例がある。国を挙げての新技术開発を担うナノマテリアルは、少なくとも既知の科学的根拠に依拠した有害性によって未来に汚点を残すことだけは、その中長期的経済発展の観点からも、国民の安全の立場からも、避けなければならない。

MWCNT の中皮腫誘発性の問題は、これから検

討されるべきナノサイズの粒子の有害性同定（毒性評価）とは別のものである<sup>12-17)</sup>。言い換えると、本当のナノサイズの粒子そのものの有害性同定は始まったばかりであり、毒性学の今後の大きな課題である。細胞内の酵素などのタンパク質分子とほとんど同じサイズのナノマテリアルの毒性メカニズムは、今までの毒性学の常識では同定・解析できない可能性もある。最先端の分子毒性学との連携が必須の要因となることが想定される。今後の安全性確保体制の強化には、不足する毒性学研究者の補充と育成も急務である。

REFERENCES

- 1) Park C. B., Fukamachi K., Takasuka N., Han B. S., Kim C. K., Hamaguchi T, Fujita K, Ueda S, Tsuda H., *Cancer Sci. Mar.*, **95**(3): 205–210 (2004).
- 2) World Health Organization “Environmental Health Criteria 53. Asbestos and Other Natural Mineral Fibres.” World Health Organization, Geneva (1986).
- 3) World Health Organization “Environmental Health Criteria 203. Chrysotile Asbestos.” World Health Organization, Geneva (1986).
- 4) World Health Organization “Man-made vitreous fibres. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans.,” Vol. 81, IARC Lyon (2002).

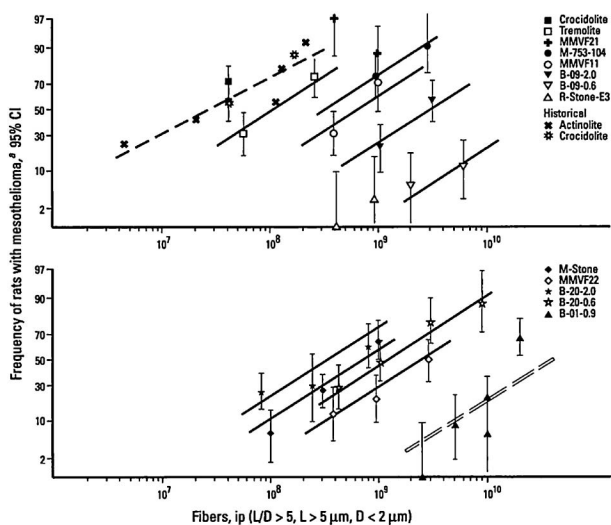


Fig. 11. Fiber Mesotheliomagenesis, Comparative Data among Various Fibrous Amterials

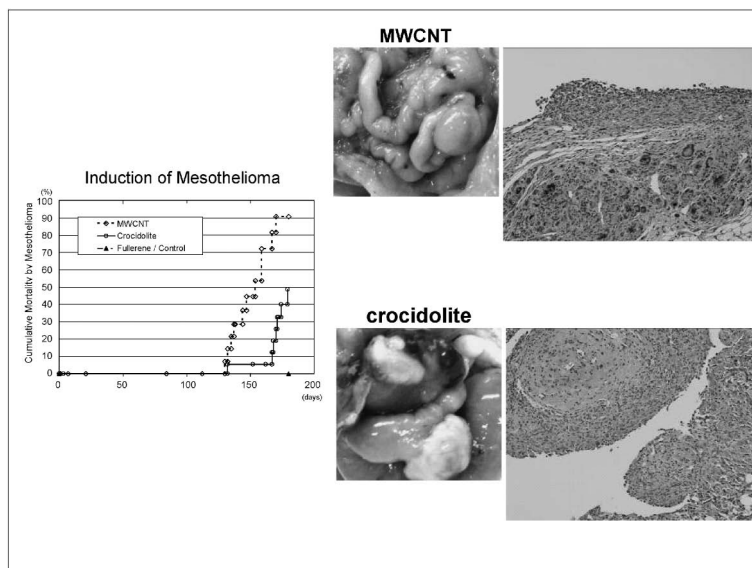


Fig. 12. Induction of Mesothelioma in p53 +/- Mouse by Intraperitoneal Application of Multi-wall Carbon Nanotube

- 5) [http://www.who.int/ipcs/publications/new\\_issues/summary\\_report.pdf](http://www.who.int/ipcs/publications/new_issues/summary_report.pdf)
- 6) Pott F., Staub-Reinhalt. Luft, **38**, 486–490 (1978).
- 7) Marsella J. M., Liu B. L., Vaslet C. A., Kane A. B., *Health Perspect.*, **105** (Suppl. 5), 1069–1072 (1997).
- 8) Vaslet C. A., Messier N. J., Kane A. B., *Toxicol. Sci.*, **68**, 331–338 (2002).
- 9) Roller M., Pott F., Kamino K., Althoff G. H., Bellmann, B., *Environ. Health Perspect.*, **105** (Suppl. 5), 1253–1256 (1997).
- 10) Takagi A, Hirose A, Nishimura T, Fukumori N, Ogata A, Ohashi N, Kitajima S, Kanno J., *J. Toxicol. Sci.*, **33**(1), 105–116 (2008).
- 11) Adachi S., Kawamura K., Takemoto K., *Ind. Health*, **39**, 168–174 (2001).
- 12) Gulumian M., van Wyk J. A., *Chem. Biol. Interact.*, **62**, 89–97 (1987).
- 13) Moalli P. A., MacDonald J. L., Goodglick L. A., Kane A. B., *Am. J. Pathol.*, **128**, 426–445 (1987).
- 14) Lippmann M., *Environ. Health Perspect.*, **88**, 311–317 (1990).
- 15) Pott F., Roller M., Kamino K., Bellmann B., *Environ. Health Perspect.*, **102**, (Suppl. 5), 145–150 (1994).
- 16) Bernstein D. M., Riego Sintes J. M., *European Chemicals Bureau*, 44–45 (1999).
- 17) Hei T. K., Xu A., Huang S. X., Zhao Y., *Inhal. Toxicol.*, **18**, 985–990 (2006).