

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。

の確立に向けたこれらの取り組みに貢献してきたわれわれの研究成果の一部と、それらの研究結果から帰納的に導き出された慢性影響評価研究の重要性について論ずる。

2. ナノマテリアルのリスク評価法の確立における課題

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、有害性評価と曝露評価、及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ステップから成り立っている。この基本的なフレーム自体は、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⁾しかし、ナノマテリアルに特徴的な新たな物理化学的性質、特にサイズが生体内高分子と近いことや、高い表面活性のために凝集し易い性質を考慮すると、よりサイズの大きい通常のバルク化合物や完全に溶解した単一分子化合物とは、生体内挙動が異なることが予想され、同じ化学組成の化合物であってもその毒性発現部位や発現様式は異なることが予想される。つまり、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。

そこで、生体内での挙動を把握するためには、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。一般にナノマテリアルの開発段階において、その性質を把握するための物理化学的測定法も同時に開発されているはずであるが、それらの手法は生体試料中に存在するナノマテリアルにそのまま適用できないことも多い。さらに、機器分析法による生体試料中での検出や定量が可能になったとしても、生体内で実際にナノの状態が存在しているのか、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ためには、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となる。

一方、体内動態に影響を与える因子として、投与方法を検討する必要もある。単独では凝集し易いナノマテリアルをそのまま曝露するという事は、物理的に巨大となった粒子は体への吸収性が低く、ナノマテリアル自体の体内動態や懸念される有害性を検出することが困難になると考えられるためである。

そのために曝露実験時におけるナノマテリアルの分散手法の開発が必要となる。職業曝露などの比較的大量のナノマテリアル曝露の安全性を評価するという観点からは、凝集したままの曝露にも意義があるかもしれないが、製品中への混入や環境中への排出を経由した、分散された曝露も想定されることは考慮すべきであると考えられる。

Figure 1は、凝集したナノマテリアルが、生体に取り込まれた場合に想定される体内動態を模式図化したものである。ナノマテリアルの使用用途にも依存するが、製品中のナノマテリアルはポリマー等の他の高分子化合物等と混合された状態、あるいはナノマテリアルだけが単独で製品から解離していく状態を考慮しても、この凝集性のために、大きな粒子として曝露する可能性が高いものと想定される。急性的には、このサイズの大きくなった物質は生体に取り込まれることはほとんどなく、局所的な刺激を起こすような変化を除いては、生体内で有害性が惹起される可能性は低いものと考えられる。しかし、仮に凝集したナノマテリアルが長期間に渡って、吸収部位である肺胞や消化管、損傷皮膚などの局所に滞留したり、慢性的に曝露したりするケースを想定すると、時間経過とともに小さくなった凝集体の粒子を除去するために、マクロファージなどの食細胞による取り込みや、表面活性の高いナノマテリアル分子と生体成分との結合作用による侵食作用により、生体に少しずつ取り込まれることが想定される。もしも生体内に取り込まれたナノマテリアルと生体内成分との結合性が高い場合には、容易に生体外に排出されることはなく、特定の組織等へ蓄積し易くなり、慢性影響の可能性を検討する必要が出てくると想定できる。

3. 国立医薬品食品衛生研究所における取り組みの成果の概要

以上のナノマテリアル固有の検討課題を考慮して、われわれは2005年より厚生労働科学研究の化学物質リスク研究事業の枠組みの中で、ナノマテリアルの健康影響評価手法の開発に係わる研究を推し進めてきたところである。われわれは、これらの検討課題を解決するために、Fig. 2に示すように4つの項目を中心に研究を行ってきた。これらの項目の中で、*in vivo* 研究については、比較的研究初期の段階から中心的に取り組んできた。その中で、繊維

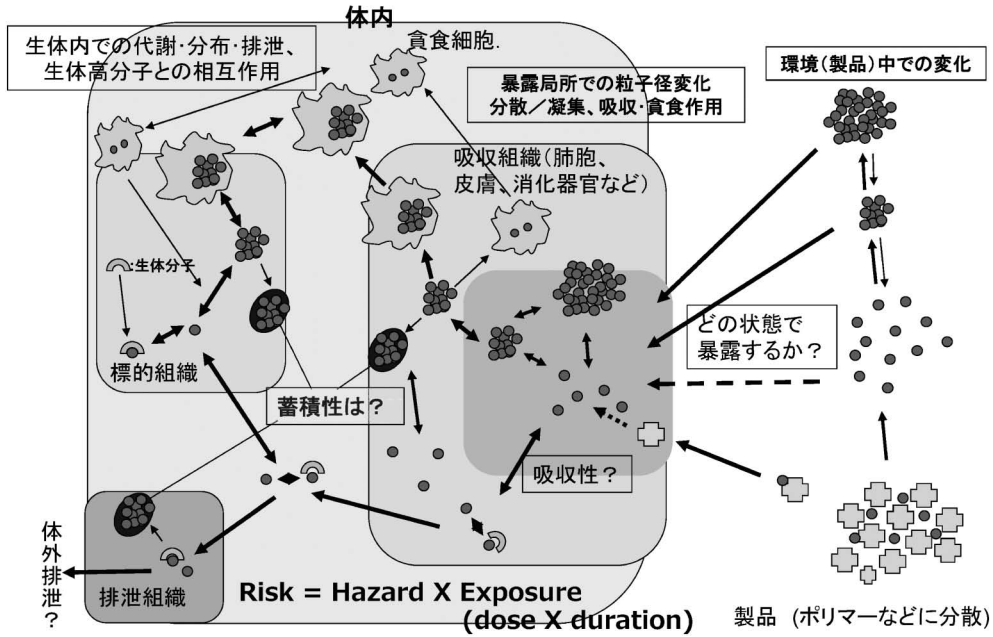


Fig. 1. The Estimated ADME Schema of Nanomaterials

in vivo試験法研究

MWCNTのP53ヘテロ欠失マウスへのi.p.投与による中皮腫誘発性を確認
 バイオマーカーとしてマウスのメソセリン抗体の作成
 一方、C60の腹腔内投与による慢性的影響として腎臓への影響を示唆
 TiO₂とC60の気管内投与による発がんプロモーション作用の示唆

吸入試験法研究

MWCNTのミスト暴露システムを開発
 気管内投与時の分散性依存の発現様式差異を確認
 リポソーム分散C60による気管内投与法を開発。

暴露測定法/動態解析研究

生体試料でのC60の定量的検出法との確立
 静注後のC60の組織からの経時的消失検討
 気管内投与後のMWCNTの肺及び肝臓での検出

in vitro試験法研究

細胞培養系でのリポソーム等を用いた分散法の確立
 →C60やTiO₂の遺伝毒性、細胞透過性、
 神経系の細胞機能への影響、などへの適用

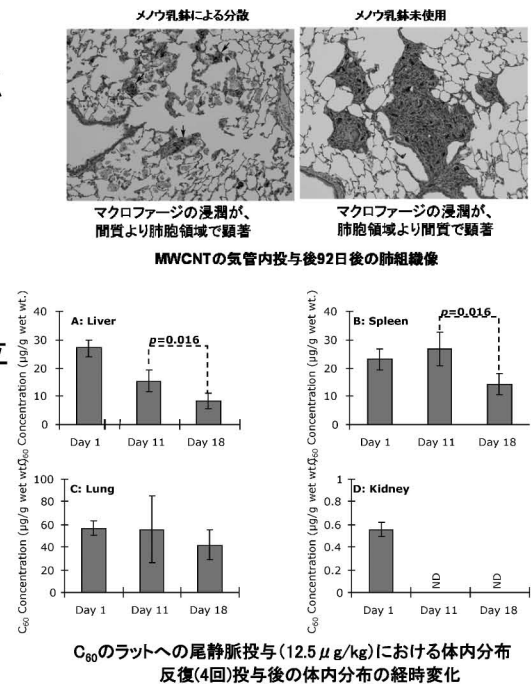
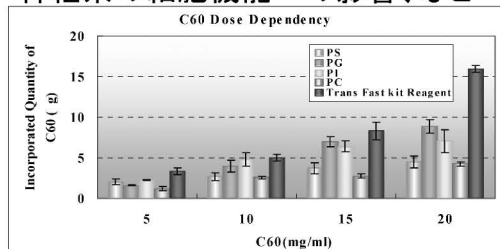


Fig. 2. The Overall Results of NIHS Projects for Nanomaterial Safety

長の長いタイプの多層型カーボンナノチューブ (MWCNT) が、中皮腫を誘発する可能性を持つことを確認した。⁶⁾ 上記の体内動態の重要性を考慮した概念からは、吸収性や体内分布について検証したのちに、慢性影響の可能性を検討することが論理的であるが、研究開始当時から、大量生産可能であった、酸化チタン (TiO₂) やフラーレン (C60)、MWCNT については、*in vivo* の慢性影響を先行して検討しておくべきであると判断した。特にその形状がアスベストに似ていた MWCNT については、吸入曝露による有害影響が懸念されたが、MWCNT についての吸入曝露法が確立していない段階では、アスベストでも検証に使用されていた腹腔内投与による中皮腫誘発試験を行うこととした。

われわれの最初の実験は、アスベストで中皮腫の誘発時期が早くなることが知られている p53 ヘテロノックアウトマウスへの腹腔内へ 3 mg/mouse という高用量を投与することによって確認されたものであり、動物種の特異性や投与量の多さについて異論も指摘された。しかしその後の研究で、野生型の動物種である F344 ラットに対しても、同じ MWCNT が中皮腫の誘発作用を持つことが確認された⁷⁾ ほか、投与量を 1000 分の 1 にまで少なくした実験においても中皮腫の起きることが示されている (投稿中)。

酸化チタンについては、雌ラットへの吸入曝露により発がん性のあることが示されているが、ナノサイズ化による発がん性の検証のために、気管内投与による肺がんのプロモーション作用の検討を行った。その結果、酸化チタンは、肺腺腫や乳腺腫に対してプロモーション作用を示し、その作用は、マクロファージから放出される炎症性因子である MIP1 α を介したものであることが示唆された。⁸⁾ 現在 C60 や MWCNT を用いたプロモーション作用の検討が進行中である。

一方、曝露手法の開発においては、ミスト法や粉体法による MWCNT の吸入曝露システムの開発研究を進めているが、より簡易な手法として気管内投与のための適切な分散法の検討を行った。その結果、分散法の違いが肺の有害性発現様式に違いを引き起こすことを確認した。⁹⁾

体内動態解析のために、生体試料中の C60 や TiO₂ の分析手法の開発や改良を行い、経口投与や

気管内投与による体内吸収性について検討を行っている。現在のところ投与部位である消化管や肺以外で有意な検出量を確認できておらず、感度の向上に向けた研究を進めている。しかし、体内への吸収を前提にした解析として、C60 の静脈内投与による解析を行ったところ、肝臓や脾臓、肺などへの分布を確認したが、腎臓への分布は極めて低いことが示された (投稿中)。その他、遺伝毒性や標的臓器などの毒性をスクリーニングするための *in vitro* 試験における培地等への分散法も検討対象としており、リポソームを用いた C60 の分散法を確立した。

4. 慢性影響研究の重要性

ナノマテリアルの生体影響に関する情報はここ数年の活発な研究状況を反映して多くなりつつあるが、慢性影響に関する報告は依然その数が少ない状況である。一般の化学物質の有害性評価の常套手段として、変異原性試験や短期試験から情報を収集していくことは、必要なステップであり、OECD におけるナノマテリアル作業グループの活動におけるスポンサーシッププログラムにおいても、加盟各国からの毒性試験情報として、短期試験を中心に収集されてきている。われわれの研究グループにおいても、これらの枠組みに対して、短期的な試験情報を中心に提供し始めている段階である。しかし MWCNT に関しては、研究初期から、短期毒性より長期毒性の方が懸念の強いことが、物性等の情報から推測されたところでもあり、その推定に基づいて、腹腔内投与の研究を最初にスタートさせた。腹腔内投与は、リスク評価の観点からは、曝露経路 (吸入曝露) に伴う定量的な評価に問題のあるところであるが、最近の注目すべき研究として、分散剤で分散させた MWCNT (最高 80 μ g まで) をマウスに吸引させた研究や、MWCNT: 30 mg/m³ をマウスに単回吸入曝露した研究において、曝露後 7-8 週間目に MWCNT が胸膜に到達していたことが報告されている。^{10,11)} これらの研究結果は高用量の曝露による短期間の結果ではあるが、呼吸器を経由した曝露においても MWCNT は胸膜 (中皮) まで到達することを示唆しており、われわれの腹腔内投与による結果と合わせると、リスク評価の上でも重要な知見であると考えられる。

これらの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

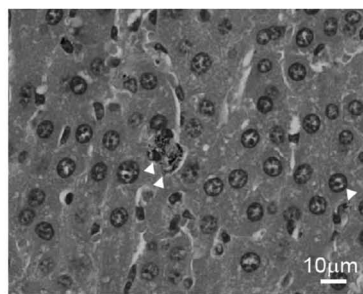
いタイプやその他様々な形状の MWCNT における慢性毒性は別途検証する必要がある。実際、われわれの行った腹腔内投与試験では、小さいサイズのナノチューブ繊維を含んだ細胞が腹膜の病変部のみならず、肝類洞内、又は肝葉間や腸間膜リンパ節の中にも認められ、体内に再分布することが示唆された (Fig. 3).⁶⁾ さらに、SWCNT をマウスへ咽頭吸引させた実験では、一過性の急性症状の後に、炎症性細胞浸潤を伴わない間質の繊維化が認められている。¹²⁾ また、ApoE ノックアウトマウスを用いた実験では、タンパクカルボニル化活性の変化を伴うミトコンドリア DNA 障害と、アテローム性動脈硬化症の進行を増強することが示された。¹³⁾ MWCNT に関しても、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、投与量に依存した血小板の活性化と凝固作用の活性化の促進が示唆されている。¹⁴⁾ また、MWCNT や SWCNT の気管内投与や経鼻投与により、アレルギー反応の増強反応が報告されている。¹⁵⁻¹⁷⁾ これらの結果が、カーボンナノチューブが直接体内循環に侵入した結果であるか、免疫細胞との接触を介した反応であるかを区別することは難し

いが、曝露局所に留まらない全身作用の可能性を示している。われわれの酸化チタンの気管内投与による発がんプロモーション作用が、炎症因子により介在されたことは、これらの知見と同様の作用様式を示すものととらえることもできる。

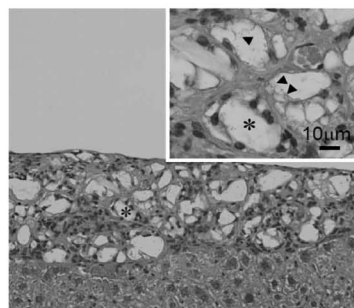
以上の知見は、短期の試験だけでは検証することは困難であり、ナノマテリアルの有害性を確認するためには、長期の体内動態予測や慢性影響に関する研究が、重要なステップであることを示している。Figure 4 にスクリーニング試験や確定試験を開発するための手順についてまとめた。通常の化学物質については、その長い歴史の中で明らかとなった有害性に対して、それぞれの毒性発現様式に応じてスクリーニング試験が開発され、現在まで運用されてきている。特に変異原性試験は発がん性を予測する試験としての重要な役割を担っている。しかし、現時点ではナノマテリアルによる有害性影響が、これまでの研究経験の中で明らかとなった影響だけに留まるのかについては、まだ誰も判定できない状況である。これまでの一般化学物質に対応する有害性とスクリーニング試験を活用して進めていくと同時に、未知の影響を見極める最初のステップとして、少な

腹腔内投与によるナノサイズ粒子の体内再分布

肝臓内類洞 (MWCNT)



腹膜の漿膜 (fullerene)



A. Takagi et al., *J. Toxicol. Sci.*, **33**,105-116. (2008)

SWCNTやMWCNTによる全身性影響の示唆

- アテローム性動脈硬化症の進行の増強の可能性 (ApoE^{-/-}マウス)
Z. Li et al., *Environmental health perspectives*. **115**, 377-382 (2007)
- 血小板の活性化と凝固作用の活性化 (MWCNT気管内滴下)
A. Nemmar et al., *J. Thrombosis, Haemostasis* **5**: 1217-1226 (2007)
- アレルギー反応の増強 (MWCNT・SWCNT、気管内・経鼻投与)
E.J. Park et al., *Toxicology*. **259**, 113-21 (2009)
U.C. Nygaard et al., *Toxicol Sci*. **109**, 113-23 (2009)
K. Inoue et al., *Toxicol Appl Pharmacol*. **237**, 306-16 (2009)

Fig. 3. The Suggestive Evidences for Systemic Toxicities by Nanomaterials

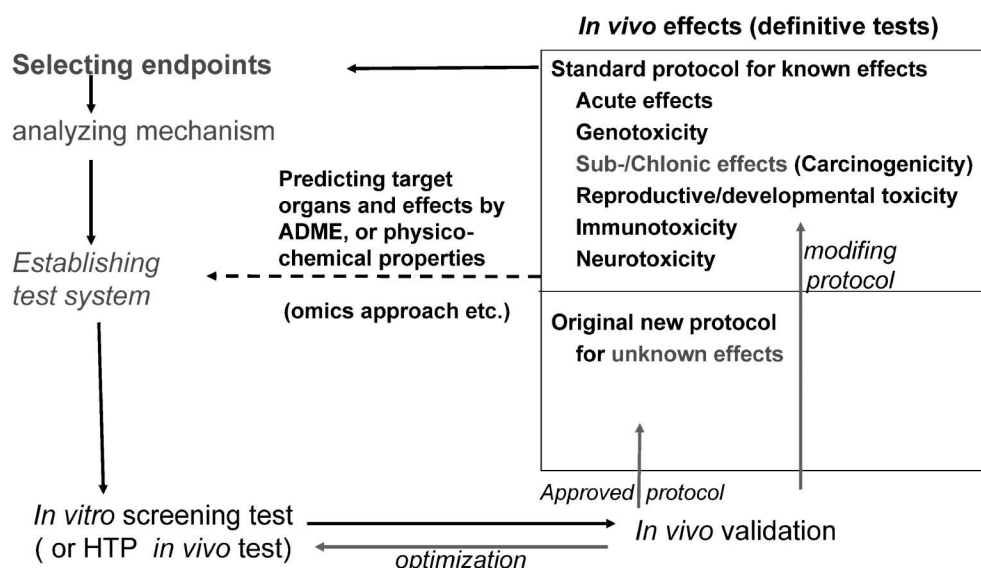


Fig. 4. The Schematic Development of Screening Tests and Definitive Tests

くとも代表的なナノ材料による *in vivo* の慢性影響研究や、その影響を推定するためのナノ材料と生体成分との分子レベルでの相互作用や体内残留性様式の解析を進めていくべきであると考えられる。

謝辞 本稿で解説した研究成果の一部は、厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）H17-化学-012、H18-化学-一般-007 及び H21-化学-一般-008 の助成によって行われたものです。

REFERENCES

- 1) Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks, SCENIHR: http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scenih/docs/scenih_r_o_003b.pdf, European Commission Web, cited 14 November, 2010.
- 2) Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks, SCENIHR: http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scenih/docs/scenih_r_o_010.pdf, European Commission Web, cited 14 November, 2010.
- 3) Food Safety Authority of Ireland, FSA, "The Relevance for Food Safety of Applications of Nanotechnology in Food and Feed Industries," Dublin, 2008.
- 4) UK Committees on Toxicity, Mutagenicity and Carcinogenicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment (COT, COM, COC): <http://cot.food.gov.uk/pdfs/cotstatements2005nanomats.pdf>, COT Web, cited 14 November, 2010.
- 5) The Committee on Toxicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment: <http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/cotstatementnanomats200701.pdf>, cited 14 November, 2010.
- 6) Takagi A., Hirose A., Nishimura T., Fukumori N., Ogata A., Ohashi N., Kitajima S., Kanno J., *J. Toxicol. Sci.*, **33**, 105-116 (2008).
- 7) Sakamoto Y., Nakae D., Fukumori N., Tayama K., Maekawa A., Imai K., Hirose A., Nishimura T., Ohashi N., Ogata A., *J. Toxicol. Sci.*, **34**, 65-76 (2009).
- 8) Xu J., Futakuchi M., Iigo M., Fukamachi K., Alexander D. B., Shimizu H., Sakai Y., Tamano S., Furukawa F., Uchino T., Tokunaga H., Nishimura T., Hirose A., Kanno J., Tsuda H., *Carcinogenesis*, **31**, 927-935 (2010).
- 9) Wako K., Kotani Y., Hirose A., Doi T., Hamada S., *J. Toxicol. Sci.*, **35**, 437-446 (2010).
- 10) Nurkiewicz T. R., Porter D. W., Hubbs A. F., Stone S., Chen B. T., Frazer D. G., Boegehold M. A., Castranova V., *Toxicol. Sci.*, **110**, 191-203 (2009).
- 11) Ryman-Rasmussen J. P., Cesta M. F., Brody

- A. R., Shipley-Phillips J. K., Everitt J. I., Tewksbury E. W., Moss O.R., Wrong B. A., Dodd D. F., Andersen M. E., Bonner J. C., *Nat. Nanotechnol.*, **4**, 747–751 (2009).
- 12) Shvedova A. A., Kishin 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., Baron P., *Am. J. Physiol. Lung cell. mol. physiol.*, **289**, L698–L708 (2005).
- 13) Li Z., Hulderman T., Salmen R., Chapman R., Leonars S. S., Young S. H., Shvedova A., Luster M. I., Simeonove P. P., *Environ. Health Perspect.*, **115**, 377–382 (2007).
- 14) Nemmar A., Hoet P. H., Vandervoort P., Dinsdale D., Nemery B., Hoylaerts M. F., *J. Thromb. Haemost.*, **5**, 1217–1226 (2007).
- 15) Park E. J., Cho W. S., Jeong J., Yi J., Choi K., Park K., *Toxicology*, **259**, 113–121 (2009).
- 16) Nygaard U. C., Hansen J. S., Samuelsen M., Alberg T., Marioara C. D., Løvik M., *Toxicol. Sci.*, **109**, 113–123 (2009).
- 17) Inoue K., Koike E., Yanagisawa R., Hirano S., Nishikwa M., Takano H., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **237**, 306–316 (2009).