

ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法の開発のための 有害性評価および体内動態評価に関する基盤研究

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
総合評価研究室長 広瀬明彦

ナノ物質とは：

明確な基準は確定していないが、3次元のうち少なくとも1次元は、100ナノメートル以下の粒子（あるいは針状、シート状の）物質であり、化学物質の単分子よりは大きく、ポリマーなどの高分子や従来の結晶よりは小さい物質

- 無機ナノクリスタル
- ナノガラス（光波制御、高輝度発光ガラス）
- ナノ金属（ナノ結晶金属、アモルファス合金など）
- ナノ半導体
- ナノ高分子（ラテックス、高分子液晶など）
- 炭素系（フラーレン、ナノチューブなど）
- ナノバイオマテリアル（生体材料、診断チップなど）
-

100ナノメートル以下になると重量(あるいは一粒子)あたりの表面積が格段に大きくなり、従来の微粒子であるマイクロメートルレベルの粒子よりも表面活性が高くなり、光学・電気学に異なった、物理特性を持った物質になる

新たな物質・材料としてその応用発展が期待される

ナノマテリアル(含有)製品

塗料・コーティング剤(ガラスや外壁など)、化粧品
(紫外線遮断、抗菌、抗酸化などの目的)

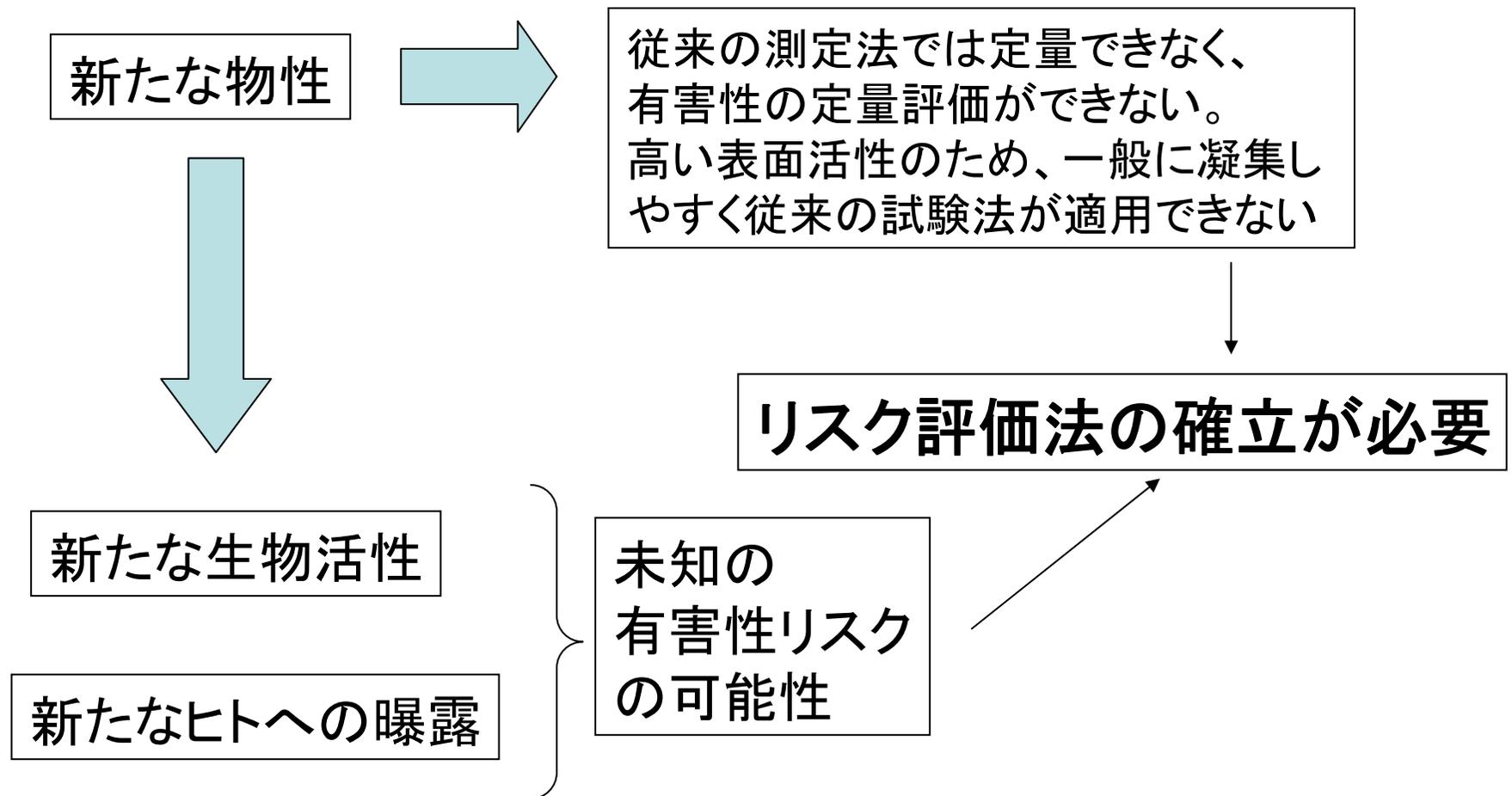
車体部品やその他のプラスチック等への練り込み
(通電性の向上や、耐久性の向上の目的)

半導体材料

医薬品や診断薬への応用*

その他、多くの分野(構造材料や電池、電磁波吸収、環境浄化など)への適用開発が進行中

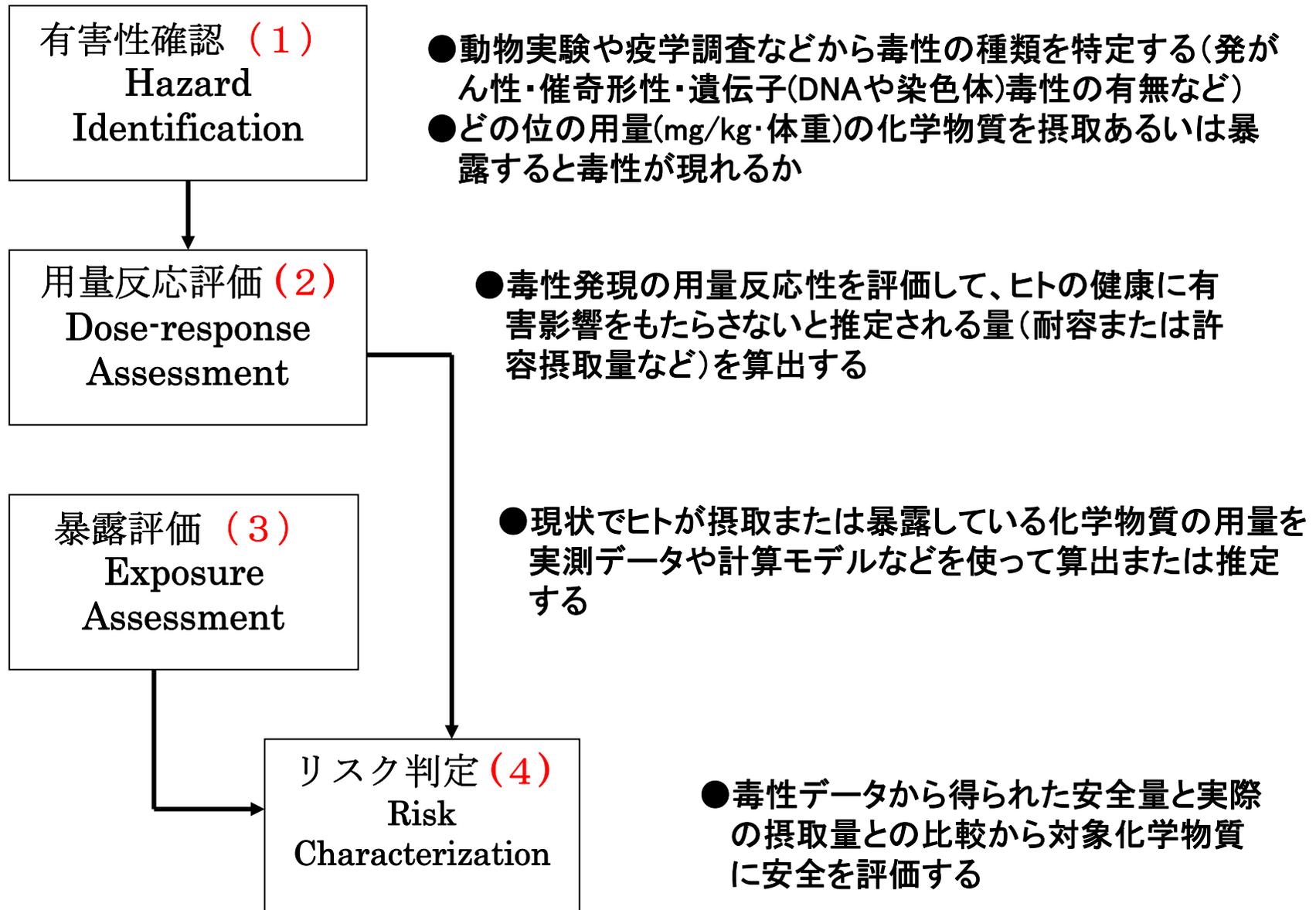
100ナノメートル以下になると重量(あるいは一粒子)あたりの表面積が格段に大きくなり、従来の微粒子であるマイクロメートルレベルの粒子よりも表面活性が高くなり、光学・電気学に異なった、物理特性を持った物質になる



これまでの化学物質管理システムで管理可能か？

- 多くの規制・法律は、化学物質名称（化学組成）で管理されている。→粒子としての大きさの違いに対してほとんど考慮されていない
- 元素のみの物質は、重金属等を除いて対象外（炭素だけからなるフラーレンやカーボンナノチューブなど）
- 既存の利用方法で許可されている物質が超微粒子化して新たな（それまでの利用法とは異なる）機能を持ったときにも、その管理方法は有効か（顔料としての酸化チタン→光触媒機能）

化学物質のリスクアセスメントの手順



有害性評価

各種の毒性試験の評価および整理：

収集した情報に基づいて発現した毒性の種類、発がん性の有無、生殖・発生毒性の有無、遺伝毒性の有無などを判定する。

- ・体内動態： 吸収、分布、代謝、排泄速度の測定、PBPKモデル等による解析など
 - ・一般毒性： 単回投与毒性試験、反復投与毒性試験(短期、長期)など
 - ・発がん性： 発がん性試験、2段階発がん性試験、トランスジェニック動物による試験など
 - ・生殖発生毒性： 生殖発生毒性試験、簡易生殖毒性試験、REPROTOX、in vitro試験など
 - ・神経毒性： FOB試験、自発運動量検査、神経病理学的検査
発生神経毒性試験、スケジュール制御されたオペラント行動検査など
 - ・免疫毒性： 血球系の検査、免疫系臓器の検査、体液性免疫にかんする検査、細胞性免疫に関する検査、非特異的免疫に関する検査、宿主抵抗性に関する検査など
 - ・遺伝毒性： Ames試験、染色体異常試験、小核試験、DNA修復試験、不定期DNA合成試験、in vivo変異原性試験(ビックブルーマウスetc)など
- 内分泌かく乱作用： 子宮肥大試験、Hershberger試験、enhanced OECD TG407 など)

スクリーニング試験

In vivo effects

Acute effects Sub-/Clonic effects (Carcinogenicity) Carcinogenicity Reproductive/developmental toxicity Immunotoxicity Neurotoxicity ADME
--

Unknown effects

In vivo の影響とよく相関する、
あるいは発現メカニズムをよく
説明する *in vitro* 系 (細胞系、
バイオマーカー) の開発・適用

ADME (or 物理化学性状)
で標的組織や反応を予想

(genomics or proteomics approach等)

スクリーニング試験

陽性 or
高感受性

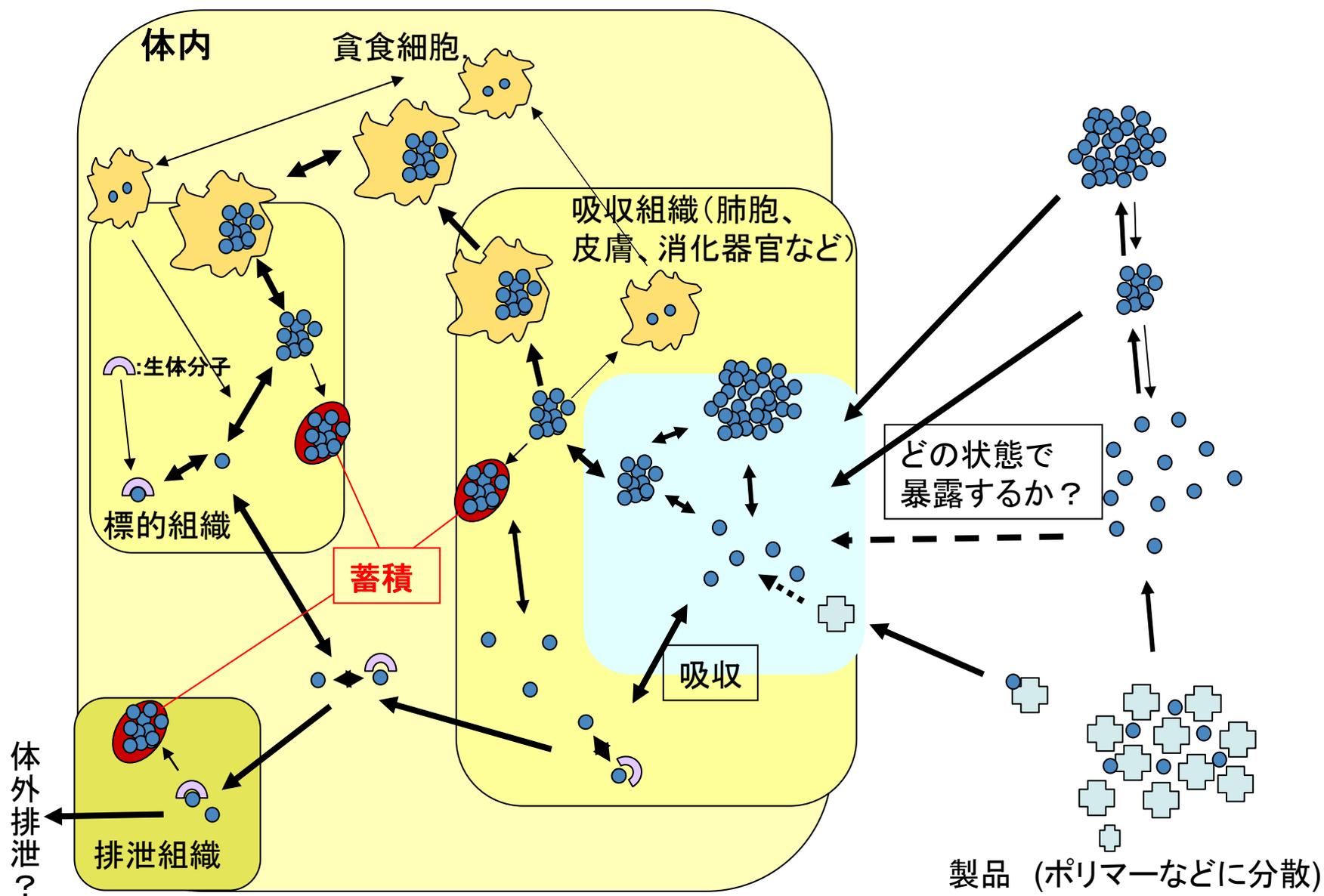
In vivo試験で検証

リスク評価を行う上で考慮すべきこと(1)

ADME情報の必要性

- 吸収(A) --- 化学物質として特性の他に粒子サイズや媒体に依存する
- 分布(D) --- 物理化学的特性の他にマクロファージなどによる貪食作用による体内動態も考慮する
血液-組織、脳-血液、胎盤関門を通過する可能性
特定の臓器や細胞内への滞留・蓄積性
- 代謝(M) --- 生物学的活性体へ代謝される可能性、
生体内高分子／外来化学物質・生物との相互作用
- 排泄(E) --- (一般に水溶性が増加すれば、体外に排泄されるが)
排泄系器官(腎臓、膀胱など)での蓄積の可能性
(特定の条件での集合化／凝集化する可能性)

想定される暴露状態と吸収後の体内動態



生体内での代謝・分布・排泄、
生体高分子との相互作用

暴露局所での粒子径変化
分散/凝集、吸収・貪食作用

環境(製品)中での変化

リスク評価を行う上で考慮すべきこと(1)

毒性試験

暴露・投与(分散)方法のコントロール

(生物試験用の媒体にほとんど溶けず且つ凝集してうまく分散しない)

投与時の粒子の大きさ (*in vivo*)、培地への溶解・分散性(*in vitro*)
は結果に重要な影響を与える可能性

ナノサイズでの分散は必ず必要か？

現実的にあり得る状況での暴露条件と、体内に存在している状態に近い *in vitro* 試験条件も重要

ADME実験の結果あるいは物質の性状から明らかに蓄積する可能性が疑われ、且つある程度の量が暴露される可能性のある場合には、*in vivo*の慢性試験が必要になると考えられる

用量反応評価 (Dose-Response Assessment)

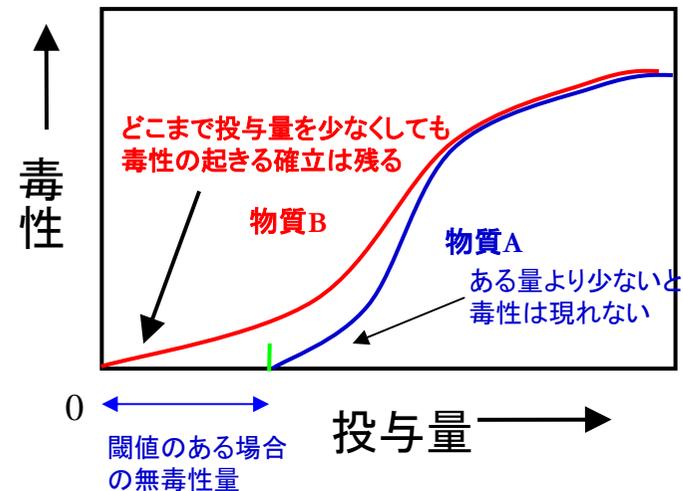
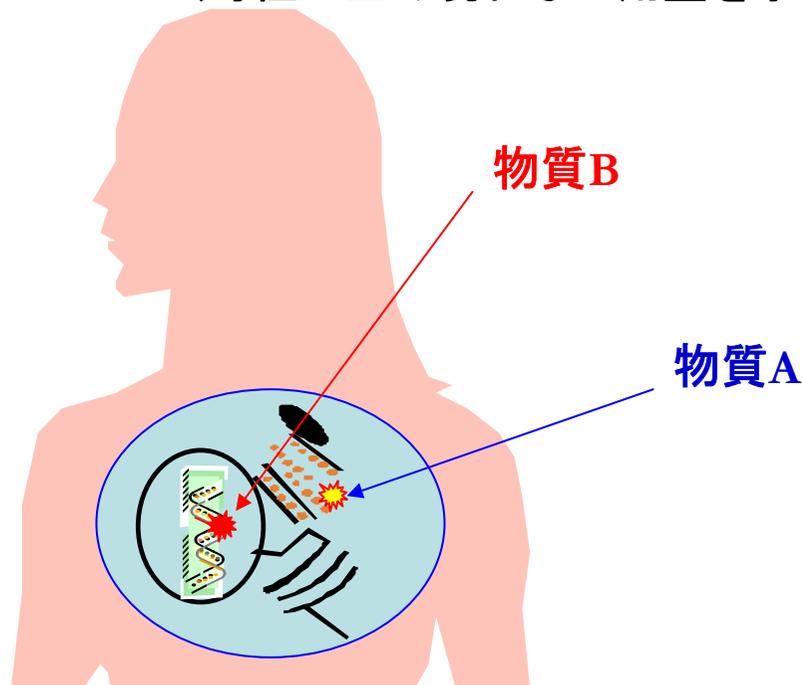
ヒトの健康に有害影響をもたらさないと推定される量(耐容または許容摂取量)や実質安全量を算出するが、毒性発現メカニズムの違いから評価方法は大きく以下の二つに分けられる

遺伝子 (DNA) 障害を引き起こさない場合 :

→ある値 (閾値) を境にしてそれより低い量では毒性が現れない

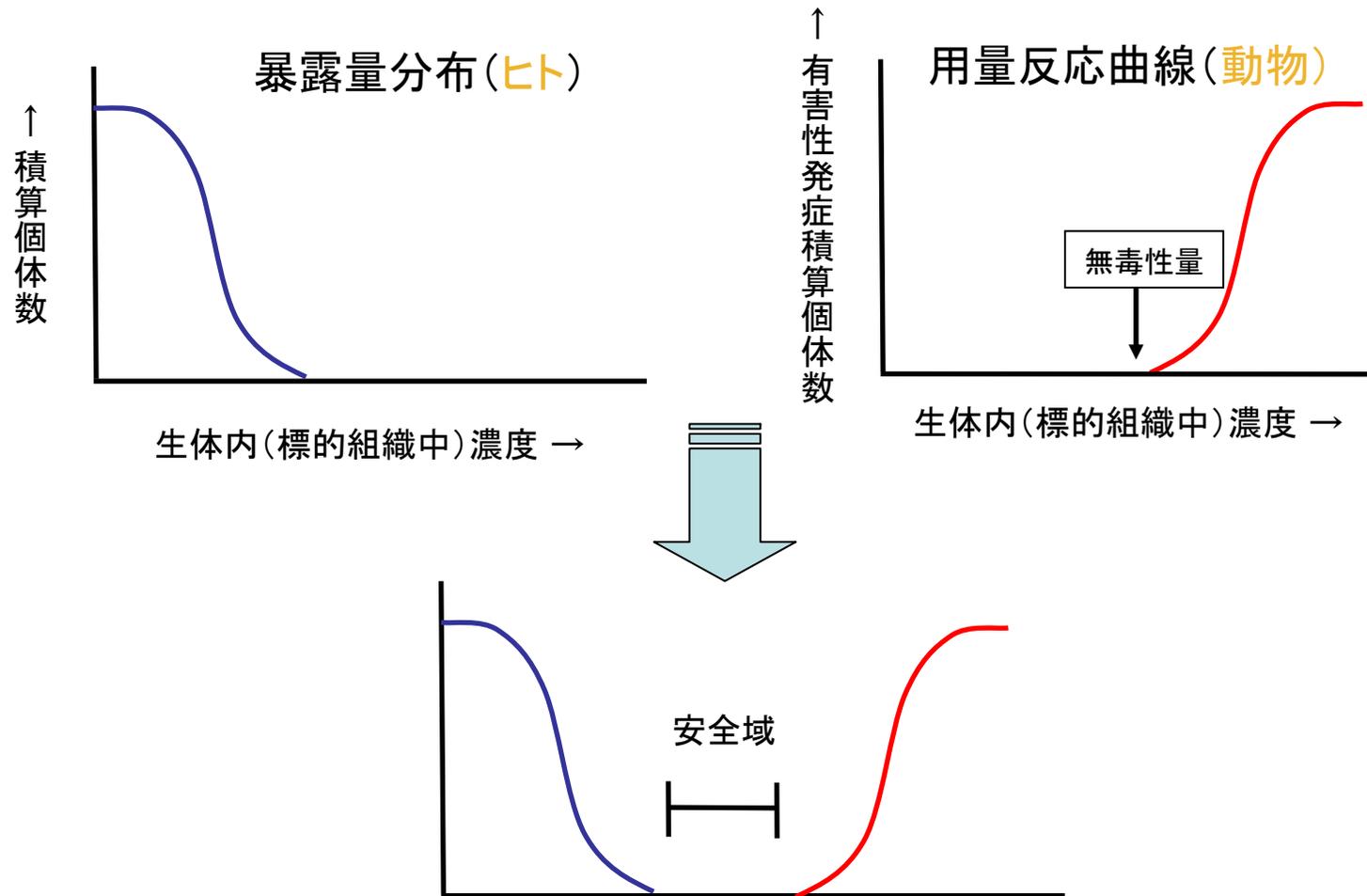
遺伝子 (DNA) 障害性を引き起こす場合 :

→投与量が0 (ゼロ) になるまで、ある確率で毒性が現れる
(毒性が全く現れない用量を求めることができない : 閾値がない)



化学物質の健康影響リスク評価

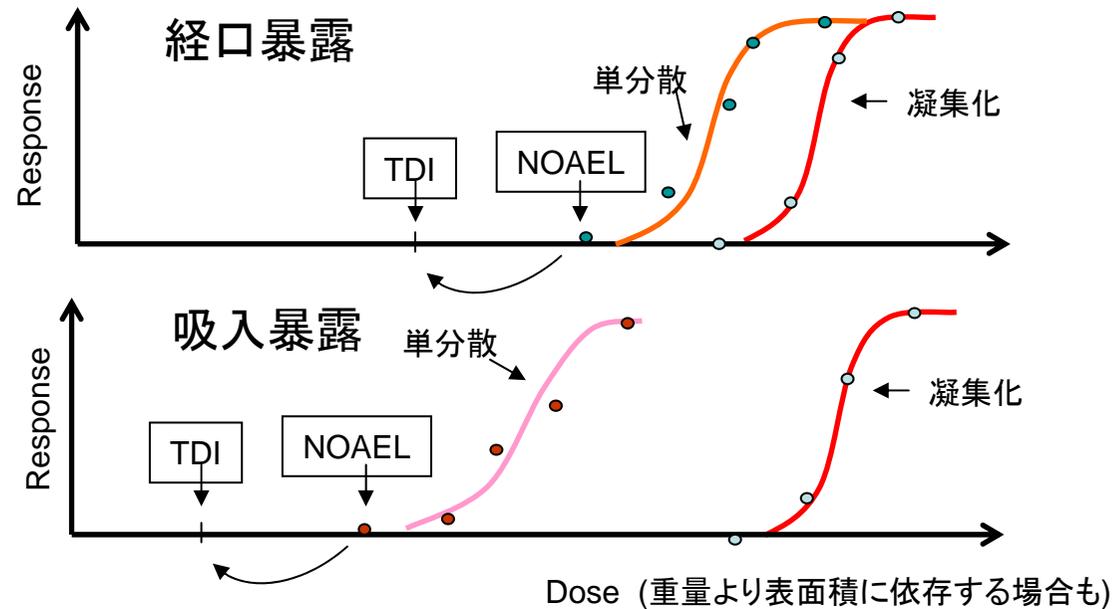
- 有害性用量反応と暴露量分布の比較



リスク評価を行う上で考慮すべきこと(2)

用量反応性評価

同じ物質でも、分散状態や暴露経路でクリティカルなエンドポイントが変わる可能性



リスク評価を行う上で考慮すべきこと(3)

暴露評価

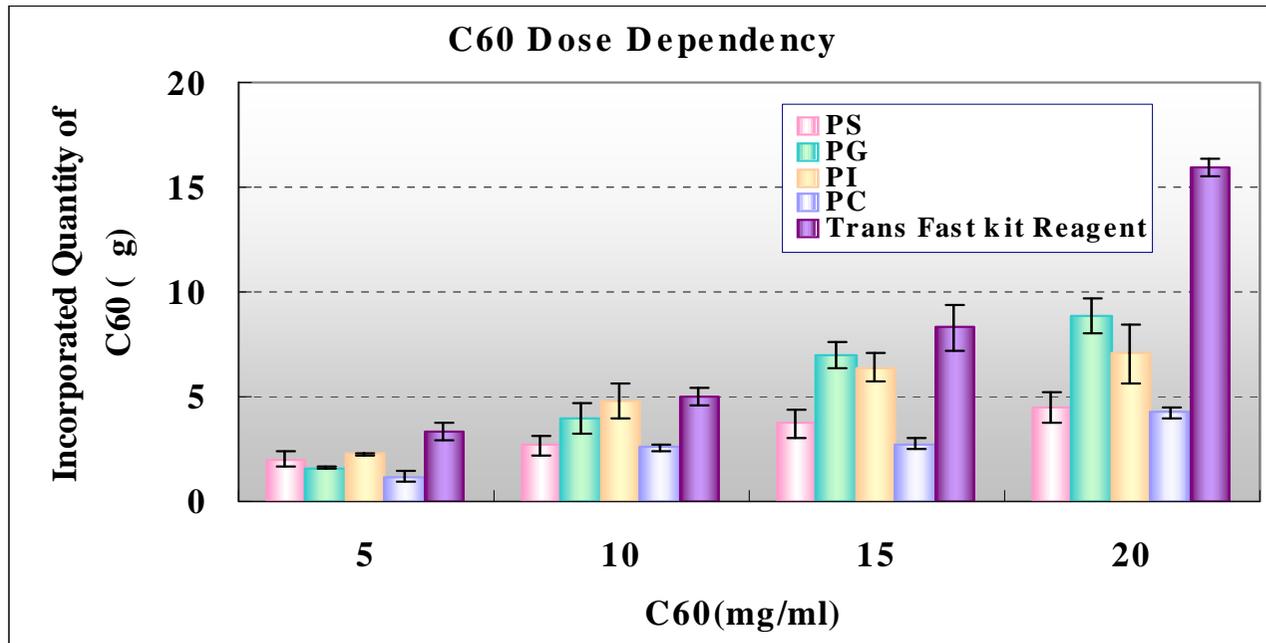
- 暴露時の粒子サイズ、濃度、表面積等を同定する
- 暴露状態は物理化学的性質、濃度、媒体に依存する(環境経由の暴露については、さらに、環境中での分解、代謝も考慮する必要がある: Life cycle assessmentの必要性)
- また、多くのナノマテリアルは単体で使われることは少なく、ポリマーやプラスチックなどに混合されており、それらの物質も同時に暴露される可能性がある。
。

ナノマテリアルの健康影響評価研究 の優先課題

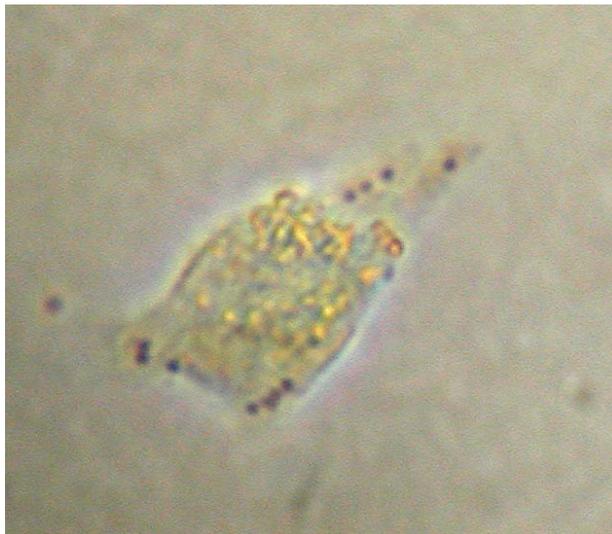
- ① 生体試料中での測定法の検討 (ADMEの必要性)
 - ② in vitro系の生体影響評価法の検討
(神経細胞系、遺伝毒性、分散法の検討)
 - ③ 吸入暴露方法の開発
 - ④ in vivo系慢性影響の検出法の検討
- 製品としての均一性や生産量を考慮して、まず酸化チタン、フラーレン、MWCNTを用いて、安全性評価手法の検討をスタート

－厚生労働科学研究－
ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法の開発のための
有害性評価および体内動態評価に関する基盤研究

- ① **暴露測定法および動態解析法の開発に関する基盤研究**
TiO₂およびC₆₀の分析法 (IPC-MSおよびLC-MS/MS) の確立
MWCNTの電顕による分析、生体内蓄積定量 (強アルカリ性で加熱溶解→電顕)
リポソーム分散C₆₀の経口投与による吸収、体内分布、微生物による分解度試験
- ② **in vitro試験系の開発に関する基盤研究**
神経系受容体発現への影響、小核、コメット試験、TK突然変異試験
Caco2を用いた細胞透過試験、リポソーム法による共同試験
- ③ **吸入暴露法の開発に関する基盤研究**
MWCNTの気管内投与の分散方法 (人工肺サーファクタント) の検討
ミスト法による吸入発生装置の開発、単回暴露試験 (進行中)
- ④ **in vivo試験系の開発に関する基盤研究**
p53ヘテロ欠失マウスでのMWCNTの中皮腫誘発試験
TiO₂およびC₆₀の肺発がんプロモーション作用試験
MWCNT腹腔内投与による中皮腫誘発作用



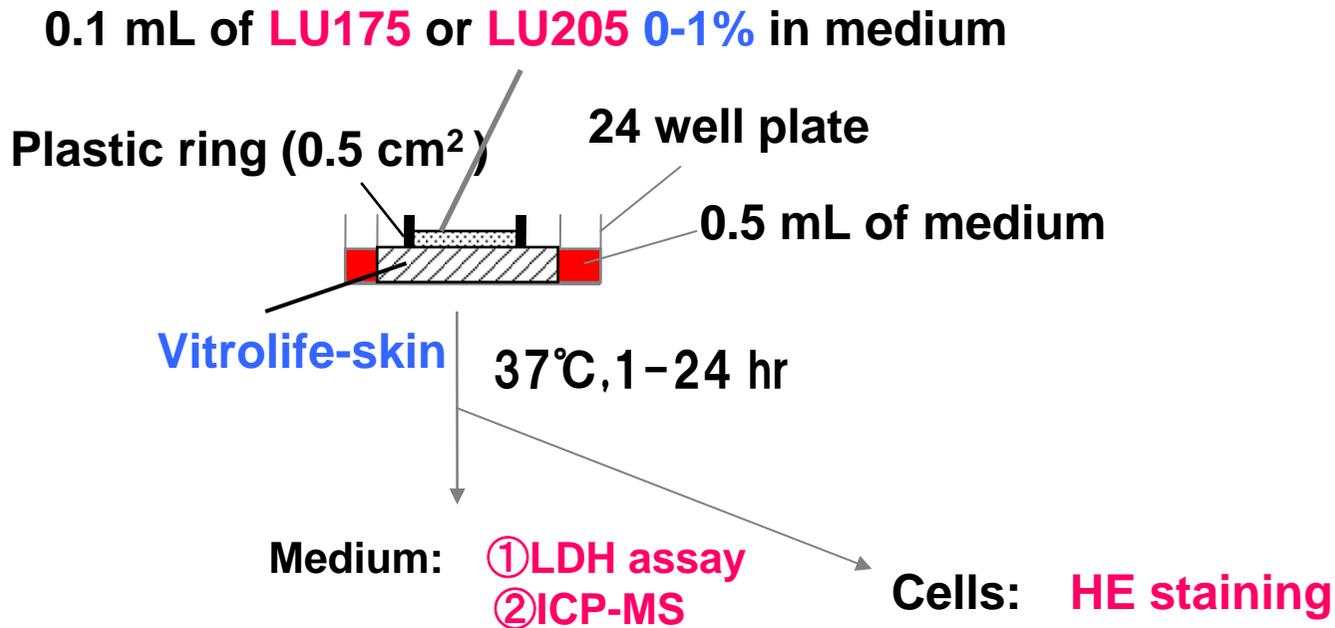
ベシクルの材料の違いによるC60の取り込みの違いを比較



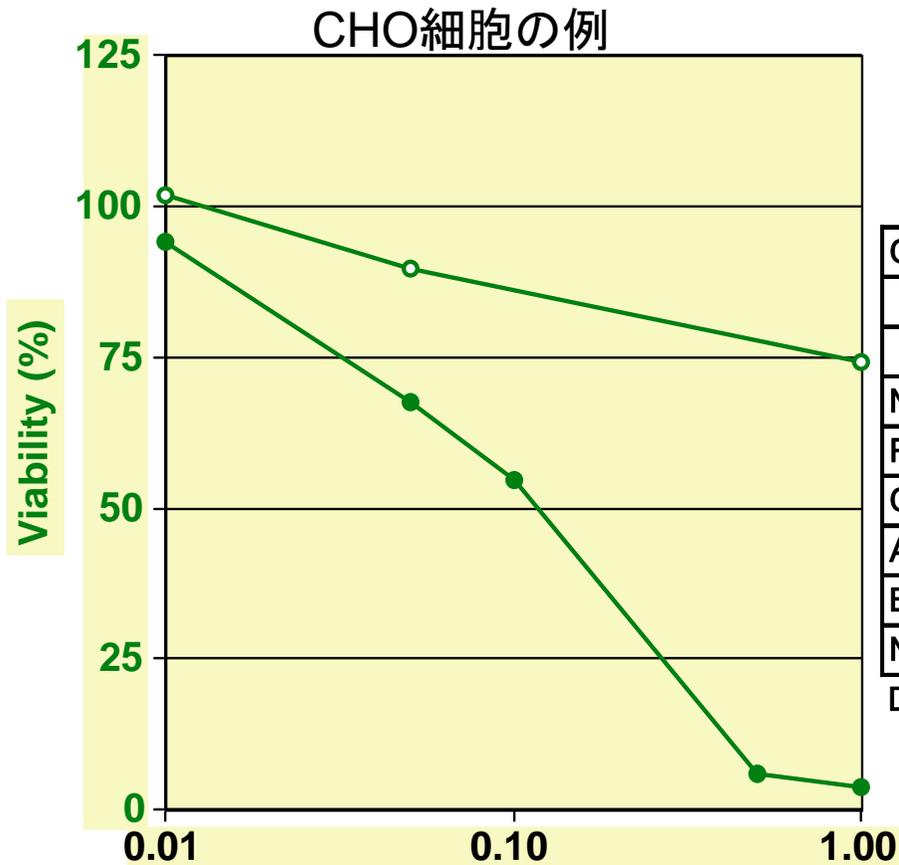
PC/PS/フラーレンリポソームを添加
1日後のM ϕ を撮影したもの

酸化チタンの経皮吸収について

3次元培養ヒト皮膚モデルでの透過実験



TiO₂の細胞毒性の比較



● LU175
○ LU205

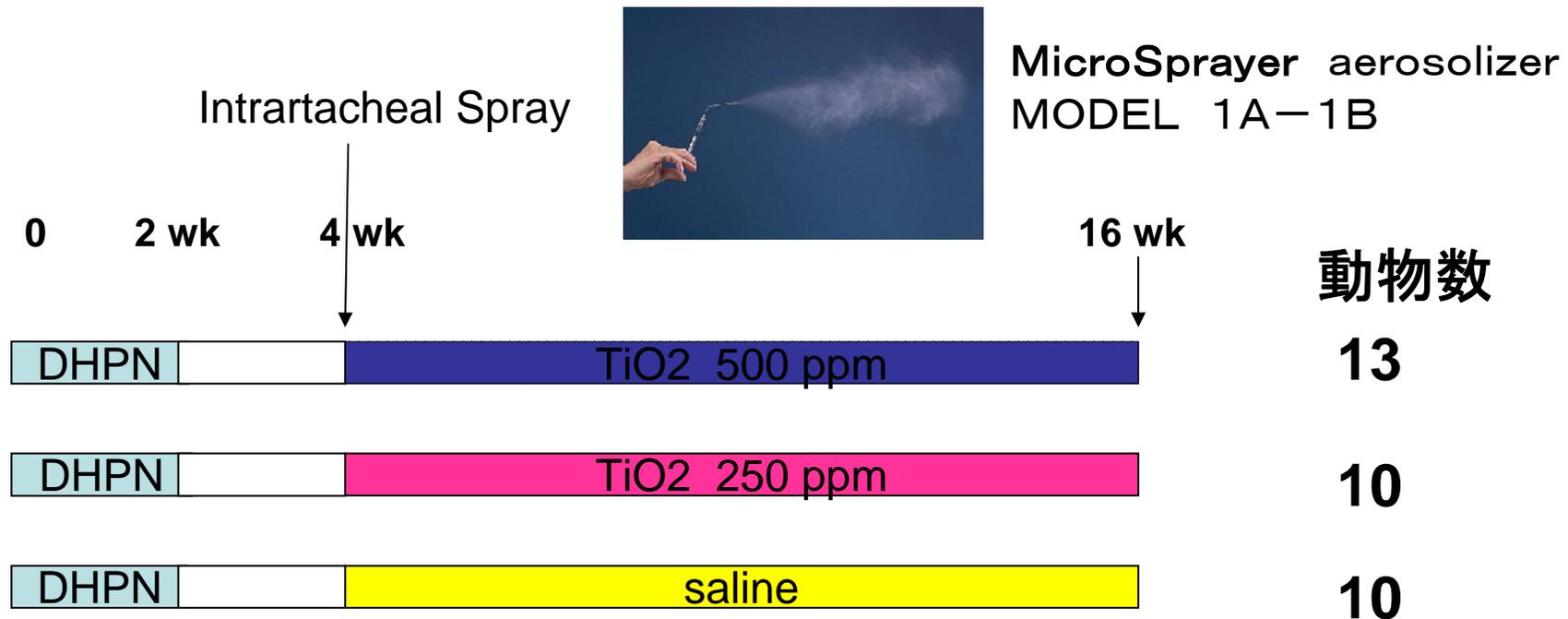
Cytotoxicity of LU175 and LU205 against cultured cells		
IC50 (mg/ml)		
	LU175	LU205
NHSF	0.5 ± 0.2	>10
RBL-2H3	1.4 ± 1.0	8.6 ± 1.2
CHO	1.3 ± 0.3	>10
A431	8.3 ± 2.9	7.0 ± 2.6
B16 melanoma	>10	>10
NHEK(F)	>10	>10

Data are means ± S.D. of three experiments.

TiO₂ concentration(%)

(LU175: rutile, non-coated, ave.20nm)
(LU205: rutile, non-coated, ave,250nm)

in vivo 気管内投与による発がんプロモーション試験 (c-Ha-ras rat) by TiO₂



Animals: Female human c-Ha-ras proto-oncogene transgenic rats

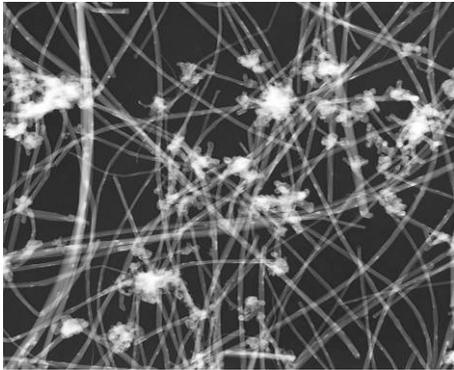
■ DHPN: 0.2% in drinking water

□ without any treatment

★ TiO₂ を生理食塩水に懸濁、0.5 mlを2週に一回投与

カーボンナノチューブの生体試料を対象とした分析法の確立

まずMWCNTそのものの分析



Elements analysis:

ICP-MS

Fe: 0.35%

Pyrohydrolysis-Absoption -Ion Chromatography

F : <5 ppm (n.d.)

Cl : 29 ppm

Br : <40 ppm (n.d.)

S : 486 ppm

