

第3回ヒトに対する有害性が明らかでない化学物質に対する労働者ばく露の予防的対策に関する検討会、第3回ナノマテリアルの安全対策に関する検討会
(第3回合同会合)

議事録

日時 平成20年5月2日(金)
15:00～

場所 中央合同庁舎第5号館18階
専用第22会議室

○化学物質対策課企画官

定刻になりましたので、ただいまから「第 3 回ヒトに対する有害性が明らかでない化学物質に対する労働者ばく露の予防的対策に関する検討会」及び「第 3 回ナノマテリアルの安全対策に関する検討会」の合同会合を開催いたします。本日の検討会は公開で行いたいと考えておりますので、よろしく願いいたします。

また、本日の議題に関係する専門家といたしまして、国立医薬品食品衛生研究所の広瀬様、名古屋市立大学大学院医学研究科の津田様にご出席いただいております。

まず、配付資料の確認をさせていただきます。いちばん上にあります座席表ですが、席の配置の関係から 90 度ずれておりますので、お含みおきいただきたいと思っております。

次に資料のほうにまいりまして、議事次第がまずあります。配付資料が資料 1 から資料 4 まで、参考資料が 1 から 4 まであります。資料 1 が「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」。資料の 2 が「ナノ粒子の発がん性評価の現状」。資料 3 が「NEDO プロジェクト『ナノ粒子特性評価手法の研究開発』の概容紹介」。資料 4 が「ナノマテリアルの健康影響に関する文献調査について」です。

参考資料のほうにまいりまして、参考資料の 1 が「第 2 回合同会合の概要」。参考資料 2 が「ヒトに対する有害性が明らかでない化学物質に対する労働者ばく露の予防的対策に関する検討会開催要綱」。参考資料の 3 が「ナノマテリアルの安全対策に関する検討会開催要綱。参考資料 4 が「合同会合委員名簿」です。参考資料の 3 と 4 ですが、板倉先生の所属が「国民生活センター総務企画部調査役」となっておりますが、「消費生活アナリスト」と変更になっておりまして、訂正していただきたいと思っております。資料の説明は以上です。

なお、本会合の開催案内にも記載させていただいているとおり、会議中に写真撮影、ビデオ撮影及び録音することは禁止させていただいておりますので、ご協力のほどよろしく願いいたします。では以降の議事の進行につきましては、座長をお願いしたいと思います。どうぞよろしく願いいたします。

○福島座長

それではこれから私が進行を務めさせていただきます。まず初めに議題 (1) の「ナノマテリアルの健康影響について」、審議していただきます。事務局から説明をお願いします。

○医薬食品局

この議題におきましては、3名の方から順番にナノマテリアルの健康影響に関する研究について、プレゼンテーションを行っていただきたいと考えております。まず、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室室長の広瀬様。次に名古屋市立大学大学院医学研究科教授の津田様。産業技術総合研究所の本検討会の委員の蒲生委員の順に研究内容を紹介していただきたいと思っております。なお、広瀬室長と津田教授は厚生労働科学研究費補助金化学物質リスク研究事業において採択された、研究課題の主任研究者でいらっしゃいます。

皆様に発表をいただく前に、昨年度厚生労働省が実施した事業の一環として、ナノマテリアルの健康影響に関する文献調査を行っておりますので、その結果を参考として紹介させていただきたいと思っております。

資料4をご覧ください。こちらが「ナノマテリアルの健康影響に関する文献調査について」の資料です。この調査結果は、平成19年度厚生労働省「ナノマテリアル安全対策調査業務」といたしまして、東レリサーチセンターが行った調査結果より作成した資料です。

文献調査の方法ですが、文献はそこに示している4つの商用データを用いて検索を行っております。検索をした範囲、時期ですが、他省庁などで実施をしている文献レビューとの重複を少なくすることも考えて、2004年1月～2007年11月までの間の文献を調査しております。

検索の方法ですが、2、3、4頁の表1に示しておりますキーワード概念に相当する、各データベースの辞書に登録されているキーワードを用いて検索を行っております。表1の1～18からなる固まりを仮にL1といたしまして、19～44のものをL2、45～70のものをL3と分けて構成をしております。L1はナノマテリアル関係のキーワード、L2は毒性という健康影響という観点からのキーワード、この最後の45番以降のものがいわゆるADME、即ち吸収、分布、代謝、排泄に関係するようなキーワードとなっておりまして、L1かつL2という検索、あるいはL1かつL3という検索方法で文献調査をいたしました。

その後、検索した文献の中から単なるレビューであるとか、会議録、討論の結果、ドラッグデリバリーシステムなどの医薬品の開発、大気汚染物質に関する文献、ミジンコや魚類など生態影響試験に関するものなどを除去して、できるだけこの健康影響とナノマテリアルの健康影響に関する元文献に絞り込むことをいたしました。その結果検索された103件の文献について、概要一覧を作成していただいております。5頁に検索された文献の書誌事項一覧が記載されております。この文献のナンバーは3番目の文献概要に記載されている文献ナン

バーとリンクをしております。

次に 16 頁から文献の概要を示しております。まとめ方といたしましては、ナノマテリアルごとに分けております。例えばいちばん最初 17 頁ではカーボンブラック・カーボンファイバーといった関係の論文をまとめておまして、その次にフラーレンでまとめさせていただいている状況です。項目立てといたしましては、試験物質、試料の詳細、試料調製方法、ばく露前における試料の観察方法、*in vitro* なのか *in vivo* なのか。*in vivo* については投与経路について分かりやすくまとめております。その後実験方法、結果と並んでおまして、選ばれた文献の結果の中で ADME に関係するような記載があった場合には、抜き出すという形で取りまとめております。

こちらは、本日ひとつひとつ議論するということで配付しているというよりは、このサマリー等参考にしていただきながら、必要な場合には元文献を見ていただくという形になろうかと思っておりますので、適宜参考にしていただければと考えております。以上でございます。

○福島座長

はい、ありがとうございます。文献調査をまとめたものを冊子として作っていただきました。それをさらにサマリーとして書いてあります。これについて何かご質問ございますか。これは皆様方のいろいろな参考になると思います。是非参考にしていただきたいと思っております。よろしいでしょうか。当然のことながら、有害事象の検証としてさっと見ていただきましても *in vitro* のデータに比べると *in vivo* のデータは少ない。特に ADME になると、もうほとんどないという現在の状況だということです。よろしいでしょうか。

今日は有害事象のことで 3 人の先生方に発表をしていただきます。お一人方約 15 分発表をしていただいて、そのあと 10 分から 15 分ぐらいディスカッション、合計長くても 30 分という予定をしております。そのようなことでお願いしたいと思います。前回まではナノマテリアルとか、ナノマテリアルの開発状況その他、こんな言い方をしておかしいですけれども、基礎的なことについてこの検討会で討議してもらいました。今回はそれをベースにして有害事象、いわゆるリスク評価にかかわるところを検討してもらいます。その初めとしまして、現在有害事象としてはどこまで分かっているのかについて、3 人の先生の持っておられる資料等から発表してもらうことにしております。

そういう意味からすると、このナノマテリアルの有害事象というのをいままでの一般の化学物質、物性いわゆるファイバー等そういうものと同じような考え方でいいのか、またもしそうでないとしたら、どこをきちんと押さえてから有害事象について検証すべきか、そういうことを頭に入れながら、これから先

生方の内容をお聞きし議論していきたいと思います。

もう 1 つはお願いですが、先ほど事務局の方からカメラなど撮影は禁止とありましたけれども、私も年よりですので、くどいですからもう一度申し上げますけれども、今日 3 人の先生方から発表される内容の中に、まだ論文にしていなとかそういうものがおそらくあると思います。従いまして撮影は絶対にしないでいただきたい。これはくれぐれもお願いしておきます。よろしいでしょうか。最初に国立医薬品食品衛生研究所の広瀬先生にプレゼンテーションをお願いします。

○広瀬参考人（国立医薬品食品衛生研究所）

ただいまご紹介にあずかりました国立医薬品食品衛生研究所総合評価研究室の広瀬です。本日は最初に会の冒頭で説明がありましたように、厚生労働科学研究費の補助金を受けまして、私に取りまとめを行っているナノマテリアルの評価手法開発のための基礎的、あるいは体内動態のための基礎的な研究というものの成果に関して、どういった経緯でこの研究を行ったかという目的と、どういったことをやっているか、また、いくらかの結果についてお話をさせていただきたいと思っております。

これはたぶん前回、前々回の検討会で出てきていると思いますが、我々が対象としている物質はどんな物質か。私は物質の専門家ではないので、これが必ずしも当たっているかどうかは分かりませんが、少なくとも 3 次元のうち 1 つは 100nm 以下の粒子というものを、ナノ物質と捉えていると考えております。そういった物質の、下の枠に書いてあるものは、こういった方向へのアプリケーションがいま考えられていると聞いております。

そこで我々がその生体影響を考える上で、まず最初に考えることとしたしましては、100nm 以下になると物質性が変わって新たな応用が期待されていると聞いておりますけれども、新たな物質性があるということは、すなわち生体に入った場合には新たな物理反応を起こすということでもあります。そうすると推量、推測的には新たな生物活性があるかも知れないといったことで、リスクをほかに考えなければいけないと考えました。

ただ一方で、そういうナノ物質の測定は従来の方法ではなかなかできない。そうすると、このあとで説明をいたしますけれども、定量的な評価をする上においては、そういった定量法というものも同時にやっていかなければいけないこともあります。そういった二重の意味があることを理解してやらなければいけない、そういう意味で新しいリスク評価法の確立が必要ではないかと思い、研究を始めていっております。

もう 1 つは、化学物質に限らないわけですが、いろいろな安全性の管

理は、現在多くの場合は化学物質の組成で規制されていると考えております。そういった意味で、今回のナノマテリアルに関しては同じ組成でも新たな性質ができていることは、従来の化学物質の名前だけでの管理でいいのかということも、1つとして考えられるのではないかと考えているところであります。

こういったナノマテリアルに関してはどういったことに注意をしなければいけないかを説明をするために、従来の化学物質はどういったリスクアセスメントが行われているかについて、いくつかスライドを作りました。

化学物質はもう皆さんご存じかも知れませんが、有害性の確認。どういった影響がどういった用量で起きるか、それがどのくらいまでヒトに安全か。一方で、ばく露評価でどのくらいばく露をしているか。この両方のデータを合わせて、実際にいまリスクがあるか、どこまでの基準値を作れば安全なものとして使用することができるか、といったことをするのが大きな流れになっております。

ただそういった有害性評価をすることにおきましては、実は先ほど福島座長も言われましたけれども、多くは生体を用いた *in vivo* の試験、基本的には疫学のヒトの試験もありますけれども、化学物質の多くの場合は直接ヒトに投与する実験はできませんので、基本的には動物の試験を基本としたもので評価を行っていくことになります。

資料の7ページ目に出ているように一般毒性の投与試験とか、発がん性試験、生殖試験等々の試験で行います。ただ1つ遺伝毒性という試験評価ではありますけれども、これはある意味では実はスクリーニング試験の1つと位置づけられると考えております。基本的にはエンドポイントとしては発がん性ですけれども、それを効率よくメカニズムを追って簡単な細胞の系で評価できるといった系として変異原性の、もちろん変異原性でも動物実験で使う試験はあるのですが、この中の細胞系を使うような試験はそういった経緯で出てきております。

今回の化学物質の評価、その延長上と考えるかは別といたしまして、ナノマテリアルのそういった有害性の情報がない中でいきなり動物実験はという考え方もあります。あるとは思いますが、やはり動物実験でどういった影響が出るかということ、あらかじめおさえた上でマーカーを見ておかないと、何がマーカーになるかという問題があると思います。そういった意味で動物実験ができないうちからもしマーカーを探すとすれば、この真ん中にありますけれども、ADME 情報とか物性情報をある程度参考にすれば、そういったところで系を作れるかもしれないと考えているところであります。

そういったことを考えますと、まずいちばん最初に評価をする上で重要なのは、我々のほうでは ADME 情報が重要ではないかと考えました。ADME 情報というのは吸収、分布、代謝、排泄、体内に入った物質が体内でどういった移

動をするか。どこで代謝されてどこに蓄積するかを、まずあらかじめ押さえておく必要があるのではないかと。

我々が想定をしたナノマテリアルのばく露を資料の10ページ目では模式図で示しております。よく影響で問題になるものは、ナノマテリアルは凝集しやすく、その凝集の中で、凝集すれば分子が大きくなりますので当然体には吸収されないで局所的なところで炎症が起きるかも知れませんが、そういったことを除けば、長期的にはこういったものがどうなるかがいちばん重要ではないかと。

我々がいくつかのナノマテリアルでその生体の反応を見ている中では、生体の成分タンパクとかそういったものに少しずつ溶けているような知見が得られています。そうするとやはり、ローカルで吸収しないで溜まったものでも、少しずつ体の中で取り込まれていってどこかで吸収するのではないかと。そうするとこういった蓄積というものの影響を見ることが重要ではないかと。そういった意味で次の観点としては、もしそういったADMEの研究でどこかで溜まったことがわかれば、それに対しての長期の実験というものをやっていくことも重要であると考えて、研究を行ってきています。

あと1つはこういった実験を行うときにやはり *in vitro* の実験に特になんですけれども、培地とかそういった溶解・分散がナノマテリアルの場合は、凝集しやすいという性質のために試験が難しい。凝集すると、細胞に与えても分散しないので、何の影響も出ないというネガティブな結果を出す可能性があります。それではよくないだろうと。長期的な影響を考慮すると、体内に分散した状態でどういったことが起きるかをスクリーニング系として考えるとすれば、現実的に近い状態で分散した *in vitro* の系の開発というものが必要であると。資料の11ページ目の下にも書いてありますけれども、ある程度蓄積する可能性があるとしたら、それは *in vivo* の慢性試験が必要であるといったことで考えております。

そういう意味でもばく露というのが実はナノの場合は特殊ですので、ばく露量と影響量との比較でリスク評価を行わなければ、いろいろ知見が溜まったら、資料の15ページ目に記載されているようなことをしなければいけない、といったこともあります。測定法も難しいということもありましたけれども、やはりばく露評価でもどういった濃度でばく露をしているかどうかということが、経口ばく露と吸入ばく露でいわゆる影響が違うといったことが、後々のリスク評価では重要なポイントになると考えます。この件に関しましてはまだこの研究班では扱っていないので、将来的な問題と考えております。

少し前置きが長くなりましたけれども、こういった観点から我々の研究班は実は4つの大きな柱を立てて研究を行ってきています。まずADMEの必要性は

あるのですが、実際に生体内でのナノマテリアルを測定しないと、どのくらい吸収しているか、どこに蓄積する可能性があるかを調べられないので、そういった測定法をまず開発する。2番目は先ほど言いましたように *in vitro* で上手く分散する方法を中心に研究をする。3番目はナノマテリアルでもっとも懸念が高いと思われる吸入経路の研究法です。凝集しやすいという性質から、肺の奥まで入るかどうかということもありますけれども、実際にその健康影響を評価する上では、ばく露実験をできるシステムを作っていかななくてはならないだろうとのことで、そういった研究。4番目は *in vivo* で何が起きるか。特に最初に考えておかななくてはならないのは、低用量の慢性ばく露でどういったことが起きるかということだと思いますし、これはやはり時間がかかるので、少し前倒しになりますけれども早くからやっておいたほうがいいだろうと考えて研究を始めました。

ただ、どういった物質を使うかはやはり難しいところです。当研究班は厚生労働科学研究費補助金化学物質リスク研究事業で行っているわけですが、本検討会の事務局である厚生労働省化学物質安全対策室で主に所管しているのは化審法で、その中では化学物質の高生産量の物質の点検も行っております。そういった観点もありまして、なるべく生産量が多いナノマテリアルから順番にやって行こうと考えました。そういった意味でその時点でそんなに深く調査を行ったわけではありませんけれども、酸化チタン、フラーレン、多層ナノチューブが比較的大量に作られているだろうということを考慮しまして、こういった物質を中心に研究をスタートさせました。

資料の17ページ目は、もう少し細かいレベルで実際にどういったことをやっているかを説明したものです。ばく露方法については、酸化チタンとかマルチウォールの電顕での分析法、リポソームによる C60、フラーレンの経口投与による吸収実験を①のプロジェクトでやっています。②のプロジェクトは、こういった研究をする初期の段階において、神経系の影響とか、変異原性の影響が懸念されておりましたので、その辺の細胞系の影響からまず始めた研究を行ってきています。

③としては、まだ分散方法がなかなか分からない手探りの状況で2、3年前から始めているわけですが、そういった分散しにくい、特にあとで申し上げますけれども、その形状がアスベストに似ていると言われているマルチウォールのカーボンナノチューブについてまず分散方法の検討、その実験法の初期的な開発実験を始めました。④としては、慢性的な影響として最後にお話をしますけれども、ヘテロの P53 のノックアウトマウスを用いた腹腔内投与試験というものを1つ行っています。それ以外にもこのあと共同研究をしております津田先生のほうからお話があると思いますけれども、そういった発がん影響

の実験というものを行ってきております。

細かい話をたくさんしても、込み入った話になりますので、簡単にやっている内容をお話しします。フラーレンについては分散剤としていろいろ検討をしたのですが、実際にはリボソーム系を用いるとマクロファージは取り込められやすく、そういった用いた経路を作っていくのではないかと検討をしています。

酸化チタンについては、その使用形態等を考慮して皮膚での吸収があるかどうか。まずは *in vitro* での研究というものを、最初に 3 次元培養ヒト皮膚モデルでの検討というものを行ってみました。これは立体的に細胞を組み上げたところで、上に物質を乗せてその浸透を見るといった系です。酸化チタンについては、いくつかの細胞毒性の研究をしまして、この中からは大きな酸化チタンよりも小さなほうが、細胞毒性といったエンドポイントだけから見ると、少し感受性が高いといった結果が出てきております。これはこのあとの津田先生の研究グループのほうで説明をされますけれども、酸化チタン等を気管内に投与した発がんプロモーション研究をやっております。

もう 1 つは分析法といたしまして、マルチウォールのナノチューブがアスベストに近いと言われていましたけれども、実際どのくらいに近いのかを確認する必要があるということで、我々がやったサンプルについてちょっと解析を試みる。そうすると径の太さは 10nm 前後で長さとしては 1~10 数 μm までということが分かっています。

吸入実験についても、最初はそのまま固体として発生をさせていたのですが、凝集して反応の濃度がなかなか一定にならないので、現在はミストとして溶媒で分散してそのあと熱を掛けて溶媒を飛ばしてばく露するという系を検討しております。

17 年度には小さな研究班から始めまして、18 年度からは本格的に始めたわけですがけれども、やはりかなり多方面にわたって研究をしておりますので、なかなか 1 つの研究班で行うのは大変だとのことで、いろいろな研究者の方々と協力関係をつくりまして、19 年度からは皮膚を中心とした研究班というもの、あるいは今年度からは吸入ばく露を中心とした研究班というものと相互に連絡を取りながら、これからは進めて行こうと。こういった研究の分担を行いながらやっていこうと今は考えているところです。

こちらの皮膚の研究班のほうはすでに 1 年スタートをしているわけですがけれども、こちらのほうは先ほどの想定されるばく露経路と同じですがけれども、やはり皮膚から入ったものがこちらの場合はリンパ球等によって、右側に示しますけれども、そういった免疫系への影響があるかも知れないということを基本的なターゲットの 1 つとしています。

もう1つは吸収するかどうかで、先ほどは *in vitro* の系がありましたけれども、やはり本格的な皮膚の研究をするためには、動物への吸収実験というものをやらなければいけないことを考えまして、ラットの4週間の反復投与試験、経皮反復投与試験を行いまして現在はその蓄積性を解析している途中です。まだ確定した結果はいまのところ実は出ていませんけれども、これをいま解析中です。もう1つは、こういったものが免疫系に与える影響、局所のリンパ節にもし吸収されれば取り込まれることも想定されますので、そこでの免疫反応を見る研究を行っています。

最後になりますけれども、ナノマテリアルの中でも実は先ほどから言いましたけれども、マルチウォールナノチューブというものの中にアスベストと似ている形状がある。これが古くから懸念はされてきたわけですがけれども、その懸念が本当にそうかどうかという検証をやっているということで研究を始めました。あとで理由は説明をしますけれども、P53 のノックアウトマウスを使いまして、投与量は実はかなり多いのですけれども3mgを1匹当りに投与して研究をスタートさせました。

この研究をなぜしたかということについては、腹腔内膜に対してアスベストが発がんのポテンシャルがある、しかもそれが長さとか体内残留性に依存するということが知られています。実は胸膜に対しても、前に説明した直接投与実験でも再現できること。それもそういった長さとか直径が大きな寄与を示していることが従来から知られています。資料28 ページ目の右側の図はよく知られている図ですがけれども、だいたい径が200nm、つまりサブミクロンから数百 μm の径で、長さが10 μm 以上ぐらいのもので、その発がんの感受性、発がん活性が高いことが知られております。この感受性そのものは胸膜に直接投与した実験で得られたもので、必ずしも吸入実験で得られた結果ではありませんけれども。

同じような結果が腹膜でも得られることが知られています。それはなぜかという、資料の29 ページ目の左側が解剖の模式図ですがけれども、肺胞の表面とか肺の内側、肺の表面、横隔膜の表面とか、この下に臓器は書いてありませんけれども、肝臓とか腸の表面には1層の薄い、発生学的には中皮由来の細胞が1枚のシート状でずっと覆っているわけです。これを中皮といいまして、実はこの1枚の薄い中皮由来の細胞というものが、アスベストで起きる特異的な中皮腫を起こす細胞の元なわけです。

資料29 ページ目の右側の図は、これはまだ仮説ではありますがけれども、肺胞に入ったアスベストが何十年という時間を通しておそらく中皮側に出て行って、そこで反応が起きて中皮腫が起きる。肺がんが起きるメカニズムとはまた別のメカニズムで、おそらく中皮腫が起きると考えられておりますけれども、そう

いったことを直接中皮と反応させるという意味で、腹腔内に投与すると、こういった系を再現できることが昔から知られているわけです。

もちろんこの結果が本当に吸入ばく露の結果を反映しているかどうかは、実は学会の中でも意見が別れているのですけれども、資料の 30 ページ目は 2005 年 12 月に行われた、アスベストの代替物のメカニズムを考えるワークショップでのサマリーレポートになります。その中でも疫学データが重要になりますけれども、実験データとして実はラットよりヒトのほうが肺がんの感受性が高い。つまりヒトよりも感受性がラットのほうが低いこともあります。それでも腹腔内試験は感受性が高い系であることは、出席者の統一の認識として示されています。こういった経緯の中で我々は実験を行ってきています。

ただ一番下にも示してありますけれども、この生体内への残留性、残留性はその形と大きさと決まると考えられておりますけれども、そういったものと、発がん性の強さの相関性は実はガラス繊維でしか確認されていないので、これ以外の繊維についてはまだ証明されているわけではない。形と大きさだけではなく粒子繊維の化学組成にも依存しますけれども、ナノチューブがもし同じ大きさであればどういったことが起きるかは、もっと調べなければいけない問題として認識されていると考えております。

実際に先ほど示しましたけれども、我々が入手して使ってみたそのナノチューブの大きさというのは、先ほどの胸腔内での発がんポテンシャルではどのくらいの位置に示されているかというのを、これは簡単に模式図に示しておりますけれども、いくらかの部分はおよそその懸念されている大きさにオーバーラップをしていると考えられます。

もう 1 つは P53 のノックアウトマウスを使ったわけですが、右側になぜ使ったかという元の文献のデータがあります。資料 31 ページ目の右側の図は、アスベストを投与して中皮腫が何週目で起きるかを示した図です。右側が通常マウスですと 60 週以上、1 年間以上たないと腹腔に投与しても発生しないわけですが、P53 のヘテロのマウスを使うとそれが 30 週すぎたところで検出できる。この結果から 1 年、2 年かかる実験を半年で見ることができないかと考えて、この系を作りました。

その系で実際半年ぐらいやった結果が資料の 32 ページ目です。この結果は 2 月に論文を発表させていただきましたけれども、そのとき、アスベストと同様の病理組織像、あるいは解剖学的にも同様の所見を得ることができたと発表しました。これは我々の論文発表のときと同じ時期に東京都のほうでも、厚労省内への要望を行うという主旨の下に、東京都で行ってきた実験結果を発表されました。そこでのデータは実は P53 のマウスではなく通常ラットで、体重 1 kg 当り 1mg 投与して 1 年間観察していると中皮腫の形成を確認することがで

きたといった結果を示しています。

ただ腹腔にできたからそのまま中皮腫ができるかどうかということは、もう 1 つ別のことを考えなければいけません。資料の 34 ページ目は IARC の Monograph V.81 から少し抜き出してきました表ですけれども、アスベストの代替繊維というものが国際がん研究機関のほうでグループ分けされているわけです。Group 1 というのは発がん性あり。2B では可能性あり、3 は特定できないと分類されています。その中で 1 番上と 2 番目はアスベストですけれども、2、3、4 番目につきましては少し懸念がある。その下は一応 Group 3 と分類をされています。

ここにあるいちばん下の物質を除きまして腹腔投与では中皮腫を発生させることは知られているわけですが、吸入試験ではいくつか、特に下の物質は発がん性を確認できておりません。その違いといいますのは、先ほども言いましたけれども、肺での残存期間がどのくらいあるかに対してよく関連していることが知られています。左側にいくつかの指標が示してありますが、 $20\mu\text{m}$ 以上の長さの繊維が肺にどのくらいの期間残存しているかについて、肺からの排出半減期を示しています。アスベストはすごく長くて 1000 日から、400 日以上半減期を示すわけですが、その他発がん性を示さない物質は数十日で肺から出ていってしまう。

こういった体内での残存期間がかなり重要なファクターだということが分かっています。そういった意味でこれは繊維粒子の肺への影響研究の権威であります Ken Donaldson 博士が提唱しているパラダイムですが、急性においては表面活性とか大きさとかコンポジション、つまり化学組成がその有害性事象のポテンシャルに影響をしているだろう。ただ慢性的については、これにプラス biopersistence (生体内残存性) というものが重要な因子であると考えております。

今回の我々の結果は、基本的には炭素を主成分とする繊維についても、これまでの繊維粒子で得られた発がん性を考慮しなければいけないことを示しています。我々の実験は高用量だったので、現在は 1000 分の 1 から 10 分の 1 の用量実験を追加実験で行っております。もう 1 つはこれらの結果は 2 年間あるいは半年の間に検出できた結果ですが、基本的にはヒトにどのくらい残存するかが重要なわけです。つまり長期間の生体内運命の研究が必要であろうと。

もう 1 つ、今回は少ししかお話をしておりませんが、実際に投与した病理像を見ますと、少し分かりにくいかも知れませんが、この白く抜けているところは実はフラーレンなりの粒子が残っていたところです。右側の図ですが、それがスライド標本を作る過程で溶けて白く抜けることになるわけですが、一部細胞側のほうに少し茶色で残っている。要するに大きな固ま

りで組織の中に入っていますけれども、その端のほうから少しずつ浸食して細胞が食べている。その結果として、マクロファージであると思われる細胞が肝臓の中のほうにももって行って再分布することになることを示しています。こういったこともナノマテリアルの場合は繊維の影響とは別に考慮しなければいけないと今は考えております。

少し長くなりましたけれども、こういったことを行って、今後はまた長期の影響、あるいは吸入の影響を中心に展開していくと考えております。以上です。ありがとうございました。

○福島座長

はい、ありがとうございました。少し時間が押しておりますが、5分ぐらい質問をお受けしたいと思えます。

広瀬先生、私から最初に中皮腫の実験についてお聞きします。腹腔中に入れたということですが、先生は、最初のほうでキャラクターゼーションの問題を言われていましたが、その溶液のキャラクターゼーションというのは、どの程度までやって実験に入られたのか。特に分散状態ですが。

○広瀬参考人

正直言いまして、研究初期に実験を開始したので、完全な分散というところまではできておりません。ただ、部分的にはこのような、それでも端が分散しておりますので、そういったところと、あとはお見せしましたが、体内で部分的に少しずつ細胞が侵食して分散しているということはありません。ただ、実験開始当時にできる範囲で分散を行いました。

○福島座長

もう一点ですが、先生、「我々が行ったのは高用量であるが」と言われましたが、一般にトキシコロジストはそうだと思うのですが実験的には、高用量の実験を行い、その高用量のデータを低用量のほうに外挿するのが一般的なのです。そういう面で、別に「高用量の実験ですが」というような、むしろへりくだる必要はないのではないかと思います。もう一点お聞きしたいのは、先生のほうはたしか3 mgですね。スライドを見ましたら、都衛研のほうは1 mgですね。

○広瀬参考人

都衛研のデータは、1 mg/kgですが、しかもラットですので体重当たりに比較すると、我々の100分の1ぐらいの量に、体重当たりにするととなります。ただ、最初に高用量で影響が出るか出ないかということをやった理由は、自分たちに

とっては最初の実験であったことによるものです。もちろん高いと言っている用量でも、それまでに行われたアスベストとかの実験の繊維数のいちばん上限を使っています。ただ、何回も実験をできませんので、とりあえずそこからスタートしました。しかし、結果を確認したあとですぐに、用量の低いところの実験を始めました。

○福島座長

はい、ありがとうございました。

○庄野委員

いま広瀬先生からプレゼンテーションがありましたように、我々も、このナノ全般の毒性プロファイルを把握するうえで、ADMEは非常に重要な要素であると考えます。特にADMEの場合でもDermal（経皮ルート）などは特に重要で、いろいろな意味でナノマテリアルのADMEに関する知見集約にご努力をいただきたいと思っています。

私は、今日伺っていてちょっと気になりましたのは、先ほどの東京都でやられた試験ですが、これは投与方法が陰嚢腔でやられていると思いますが、このアッセイ系はノックアウトのマウスではないラットの試験系ですね。これは、ある意味では、オーソライズされた試験系として考えてよろしいのでしょうか。これを見ていますと、かなりラットとマウスの差が実はあるのではないかなという気がしないでもないデータなのですが。その辺、お考えが何かありましたら教えていただければと思います。

○広瀬参考人

確かにおっしゃったように、陰嚢腔に投与するのは一般的な方法ではないと思います。ただ、中皮としては陰嚢腔まで全部つながっていますので、同じ所と言えます。この系を行った理由は、使ったラットの系がやはり感受性が高いし、投与しない状態でもある程度出るような系統を選んではいます。この実験系では、陰嚢腔に投与したのですが、結果的にはそれは結局、身体の中で広がってしまって、一部胸腔まで達していることが示されています。

○庄野委員

ということは、結局、気中へ入ったことをある程度シュミレーションできるような試験系統と考えられるのでしょうか。

○広瀬参考人

それは肺胞から中皮腫まで壁があるので、そこはこの系では出ません。あくまで中皮に到達したとしたら。

○庄野委員

という仮定がそこに入るのですか。

○広瀬参考人

もちろんです。だから、次にやらなければならないのは残留性と、中皮までいくかどうかの可能性を検証する必要があると考えます。

○福島座長

庄野先生、私の全くの想像ですが、ラットの陰嚢腔と、腹腔はつながっていますね。ラットに中皮腫、特にフィッシャー系は自然発生でよくできるのです。そのできる部位が陰嚢。ですから、おそらく、その自然発生を狙ってやられたのではないかと、発生しやすい標的性を考えてやられたのではないかなど、私の想像ですが。

○庄野委員

やはり、それは検出することを念頭に置かれたアプローチですか。

○福島座長

そうだと思いますね。

○庄野委員

そうですね。

○福島座長

有害性をあくまで見ようということだと思います。

○庄野委員

ただ、ヒトへのその外挿という観点から考えていった場合に、また別の議論があると思います。

○塩原委員

私は杏林大学の皮膚科の塩原と申します。経皮吸収のことでちょっとお伺いしたいのです。皮膚に投与した場合、「リンパ球に乗って」と先ほど先生はおつ

しゃいでしたが、リンパ球にはそういう機能はないと思いますが。

○広瀬参考人

まだ、それは確認しておりません。想定です。皮膚ではないですが。

○塩原委員

どうしてそう想定されるのでしょうか。

○菅野委員

一緒にやっている菅野と申します。ある大きさより小さくなると、ランゲルハンス細胞が抗原として認識して取り込み、所属リンパ節までもっていく可能性があるのではないかと考えています。

○塩原委員

表皮にあるランゲルハンス細胞が抗原を捕捉してリンパ節に運ぶということですね。

○菅野委員

皮膚のランゲルハンスです。

○塩原委員

どういうふうに皮膚に塗られているのでしょうか。どういう性状のものを、単回投与しているのか、それとも繰り返し投与しているのか、お聞きしたいのですが。

○菅野委員

おそらく津田先生から詳しいお話があると思いますが、化粧品に使われる普通の油性の溶媒に溶いて塗付すると。

○塩原委員

どの部位に塗布されているのでしょうか。

○菅野委員

動物の場合ですと、自分でなめたりするのをコントロールするので、おそらく毛を刈って、背中のだこかいちばん手足の届かない所とか、それは実験的に工夫する場面だと思います。

○高田委員

貴重なご発表ありがとうございました。1つお伺いしたいのです。今回の腹腔内投与の系ですが、ディスカッションを聞いていますと、凝集している形状のファイバー数で見えていますけれども、今後議論していくときに、凝集体のほうがいけないのか、それともナノ粒子の方なのかというところは、やはり最後議論になると思うのですが、その点は、先生は現時点でどのようにお考えなのでしょうか。

○広瀬参考人

それは、用量を低くして分散した状態で再現の実験を行っています。それは腹腔の実験だけでは済まない問題なので、吸入の実験も分散した形で投与するといったことも考えています。

○菅野委員

凝集というのには2種類あるようでして、光学顕微鏡で見て、大きな糸くずの玉のものは、うまく分散するとどんどんほつれていくのです。我々がやったような大量投与をしますと、大きな糸玉はそのまま繊維性の肉芽組織内に被包化されるので、細かい単体の繊維として、中皮腫の発がんの方にあまりかかわってない可能性があります。投与した懸濁液の中には、ほぼばらばらになった繊維が多数浮遊しておりますので、そちらがメインで発癌に働いたろうと想定されます。

もう1つは、一度かなり小さくしたのが水溶液中で10 μ m程度の大きさに棒状に再度集まるという現象もどうもあるらしいのです。小さいものが寄り集まって顕微鏡で見える大きさまで成長してくる過程と、高濃度のものを攪拌して分散しようとしたときに、毛玉のようになったのが生体内でそのまま沈んでしまう場合と、その様なものの表面からほつれる場合と、最初から分散しているものと3通りのものがどうも起こっているようなのです。そこは、低濃度にしていくと、分散したものが増えるということで、いま追試しています。

○福島座長

まだまだあると思いますが、時間が押していますので、この広瀬先生の報告については終わりたいと思います。どうもありがとうございました。

次に、名古屋市立大学大学院医学研究科の津田先生に発表をお願いします。

○津田参考人（名古屋市立大学大学院医学研究科）

私は、いま広瀬先生からプロジェクトについてご紹介いただきましたが、当初スタートしたときは広瀬班の班員として気管内注入試験を実施し、2年目からは皮膚に対する影響の研究における主任研究者として、始めてちょうど1年経ったところです。まだすべてのデータが出揃っているわけではありませんし、進行中の研究です。したがって、皆さんにお配りのした中にはないスライドも出てくることをご容赦願います。

毒性学教室としては医学部で初めてです。ナノ粒子は以前よりちょっと気になっており、異物発がんという立場からお話をします。

一般的に化学物質の生活環境における安全三原則についてご紹介し、それから考えてナノ粒子がどういう条件になるか、実際の実験結果、今後についてどう考え、メカニズムをどうするかについて簡単にご説明いたします。

まず、化学物質の管理はリスクアセスメント、毒性学のサイエンスとして我々のやるべきことです。リスクマネジメントは行政です。リスクコミュニケーションは、アカデミックと行政との両方がきちんとした科学的な情報のやり取りをして消費者、国民にそれを正しく知らせる。この3つがバランスよく行われて初めてうまくいくというふうに考えております。

ナノ粒子の発がん性のデータを論文から探すと、先ほど福島座長が日本ではデータが少ないということを紹介されましたが、この青いのはR&Dでヨーロッパ、日本、アメリカ、北アメリカですが、で日、米、欧がそれぞれ大体数千億円から1兆円ぐらいの金が毎年使われているという統計があります。それに対して、この円がそのまま当てはまりませんが、アメリカ、EU等では1割程度が安全性試験、あるいは多くのin vivo試験、動物における先ほど見たADMEなどに使われているということです。残念ながら、日本では見たとおりまだ小さくて、特に発がん性試験は日本の場合はまだインビジブルな状態です。お金の換算してそのぐらい少ない。ある意味では、開発は非常に進んでおりますが、安全性についてはまだまだとてもビハインドのところがあるということです。

実際には、長期発がん試験を、PubMed データより掲載で探してみました。そうしますと、ここに書いてあるように、二酸化チタニウムについては4つほど、2年物のきちんとしたデータがあります。CNTに関して1というのは、実は、国立医薬品食品衛生試験所からの論文です。最近刊行されましたので慌てて1ということに入れました。フラーレンについては、あまり長い試験はない。カーボンブラックについてはよく知られておまして、それらより多くあります。しかし、合計して10ぐらいしかないというのが現状です。

それで、IARC、先ほど広瀬先生が紹介されましたが、国際がん研究機構という、WHOの研究機関がリヨンにあります。そこでオレンジブックと称するモノグラフでありまして、いろいろな発がん物質、例えばいちばん右にあるのがシ

リカ、コールダスト、パラアラミド・ファイバースという異物ですが、発がんについて評価をしています。

実は、2年前になりますが、モノグラフの、今年中には出ると思いますが、Volume93におけるカーボンブラック、チタニウム、タルクについての発がん性の評価会議がありまして、出席しました。集めた論文から10日かかって評価していくわけですが、ナノも含まれていますが、カーボンブラック、二酸化チタニウム、タルクの3つの物質について病理部門を受け持ってレポートを書きました。そのレポートはそれぐらいの厚さになります。それと比較すると、ナノ物質のデータはわずかです。いかに少ないかということです。総合管理三原則といいますと、まだ色が薄い。即ちデータが少ないということです。

それから、現在研究費をいただいて実施している仕事について報告をまとめてさせていただきます。まずは、二酸化チタニウムですが、皮膚と肺で試験をしておりますが、皮膚発がんについてお話しします。使ったのはルチル型の非コーティング、径が20nmです。それをPentalanというオイルで分散させてラットの背中に塗ったわけです。期間を短くするために発がん物質をあらかじめ皮膚に塗っておきまして、その後、発がんをプロモーションするかということを見ました。弱いポテンシャルの発がん物質をスクリーニングするには非常にいい方法で、すでに化学発がんでは一般によく知られていることです。

方法でHras128という、ヒトがん遺伝子を入れた皮膚発がんが少し亢進したラットで、発がん性をプロモートした可能性があると考えておりまして、現在、再現実験を同じ方法でやっています。

もう1つは肺のほうですが、肺を標的とした発がん物質をラットに投与しました。同じHras遺伝子が入った雌のラットを使いました。

肺内ではAggregatesをつくり、肺胞内のマクロファージにきれいに取り込まれています。お掃除された状態です。実際にそれは何をしているかというメカニズムを見る必要があるので、解析中です。

臓器分布ですが、これは国立衛研の徳永先生のグループに測っていただきました。肺ですから当然ありますが、意外に脳にも見つかる。リンパ節、乳腺、肝臓等に見えるようになります。個体差があるので有意差は出にくいのですが、肺以外でも少し高いという印象があります。

IARCの分類ではカーボンブラック、二酸化チタニウムは、ナノ物質も含めてGroup2Bという評価です。私が申し上げたいのは、ナノでやらないとわからないといういろいろな意見があります。私自身としてはありすがたでまずやって、ハザードを見つけるということです。これはナノよりも大きい粒子のカーボンブラック、チタニウムを見ていただければ、すでに2年間の吸入試験でラットの雌に肺腫瘍をつくっているがん原物質です。すなわち、ナノであってもナノ

でなくても結果は一緒なのです。

もう1つ、なぜこういう異物発がんが大事かということをお述べます。WHOの国際がん研究機構がすでに1973年、1977年、1987年にアスベストについてがん原物質であるということを出しているのです。3回出しているのです。そして、1973年、1977年、1987年に、ヒトに対する発がん物質でいちばん低い、いわゆる安全量は見つけれないということまで言っております。ただし、Group1には喫煙とかアルコール摂取がありますので、何ともないということが現れるかもしれませんが、喫煙やアルコールは自分で好きに取るものであるが、アスベストを好きに取る人はいないので、ここが違うわけです。これで見ると確実にリスク評価はあったということです。

それで、私、観察者の立場から言うと、クロシドライトというのはいちばん強力な発がん物質ですが、鉄の含量が多いということがよく知られております。それを顧みると、多層ナノチューブは鉄が3,000ppmぐらい入っている。今、それを飛ばすようにいろいろ技術を凝らしていますが、完全に無にすることは難しいということです。この結晶を作るときはどうしても金属が要る。

それで見ると、向こう側がアスベストで、こちら側がCNTですが、あまり変わらない。Ken Donaldsonという、先ほど紹介されましたイギリスの学者ですが、その人の図を借りました。要するにCNTには発がん性がある可能性を示しているわけです。

ということで、まとめますと、普通のいろいろな市場に入るときはまずリスク評価をして、その後でリスク伝達、リスク管理ということが行われるのが普通ですが、ナノについてはこれらが同時進行の状態です。というのは、開発競争が激しいためにこういうことが起こっているわけですが、リスク評価はまだ追い付いていない。当然、社会受容も同時にいろいろなプログラムが動いていますが、実際にリスク評価に使うデータはあまり多くないというのが現状です。したがって、リスク管理はその後追いになっている。仕方がないから、既存のいろいろな管理法令で今のところ縛りをかけていくということになっているのではないかと考えております。

研究をまとめますと、カーボンブラックはナノ粒子でも雌ラットに明らかに発がん性があるということで、Group2Bです。生体内では、やるときにいろいろな形がありますが、人が吸うときに本当にナノであるかどうかという確証はないわけですし、同じようなことで、ありすがたとしてやっていけばハザード評価できる。沈着すれば、マクロファージを介する異物反応が必ず起こる。ROS産生や鉄が入っていればFenton反応が起こって、DNAの障害を起こすということになります。フラーレンについては、現在は非常に情報が乏しいと考えています。以上をまとめると、動物実験をきちんと粛々と進めていく必要がある

というふうに考えております。

実は、これは、タバコですが、ここに何か関係あるのかと思われる方があると思いますが、タバコを吸うと、火が燃えるときにはナノ粒子がいっぱい出るわけですし、発がん性ニトロサミンとナノ粒子を同時に吸って、先ほど広瀬先生は人ではやることができないと言われましたが、自らお金を出してボランティアとしてやっている方が世の中にたくさんいるということです。どうもありがとうございました。

○福島座長

時間が押しておりますので、質問を1、2お受けしたいと思います。

○蒲生委員

発表ありがとうございました。確認というか、教えていただきたいところがあります。チタニアとカーボンブラックに関しては、そのサイズにかかわらず発がん性の疑いが強いというようなことをおっしゃられたと思うのですが、この場合の「サイズにかかわらず」というのは、「もともとの粒子が大きくても小さくても」という意味でおっしゃられているのか、それとも、「小さいものが分散していても凝集していても」という意味でおっしゃられているのでしょうか。

もう1つは、2Bとか2Aとか、そういう評価は、ある種、情報の確かさというような観点の評価であって、必ずしも発がん性の強さというものを表わしているわけではないというふうに私は理解しているのですが、サイズにかかわりなくというご説明は、情報の確からしきとしては同じぐらいとしても、強さとしてもほぼ同等というように理解されているのか、というあたりをお願いしたいです。

○津田参考人

IARCの評価ですね。リスク評価ではありませんので、発がん性有り無しということですが。それについて、それを受けて各国はリスク評価をする、あるいは行政に持っていくということでありまして、要するに有りか無しかだけです。強さについては言いません。ですから、アルコール・ドリンキング・ハビットというのはGroup1です。アスベストも同じくGroup1ということですが。

それから、この評価の基になったカーボンブラックのナノの二酸化チタニウムはドイツの吸入センターのデータが基になっておりまして、一応、データではナノの状態です。ただ、肺の中に入ったら、あくまでもナノかどうかについてはまでは分かっていません。吸う空気の中にナノの状態であるということが示唆されています。

おそらく、私は、肺の中に入ってもナノかどうかというのは調べようがないし、見えないわけですから、全臓器を切って電子顕微鏡で見るといっても、1つの肺を見るだけで5年ぐらいかかってしまいますから、おそらく、見る者はないと思います。そういう意味で、果たしてナノかどうかについてはなかなか難しい問題である、いわゆる化学的に難しい問題だと思います。

○菅野委員

発がんメカニズムの件なのですが、チラッとおっしゃったと思うのですが、確認なのですが、アスベストは閾値がないかもしれないというところまで踏み込んだドキュメントが出ているのでしょうか。

○津田参考人

出ています。

○菅野委員

ということは、ちょうどよい大きさのものが1本入れば確率論的には出るという考え方。

○津田参考人

IARCはそういうところまで見てなくて、発がん報告があったところまで調べて、かなり低容量ばく露のところまで発がん性の報告があるということです。IARCではハザード評価だけなのです。

○福島座長

まだまだあると思いますが、時間が押しておりますので次に移りたいと思います。津田先生、どうもありがとうございました。それでは、蒲生委員にプレゼンテーションをお願いします。

○蒲生委員

産業技術研究所安全課科学研究部門の蒲生と申します。今日はこのような機会をいただきましてありがとうございます。私どもの研究所が中心になって進めているNEDOプロジェクト、「ナノ粒子特性評価手法の研究開発」について概要紹介をさせていただきます。ここにいらっしゃる方々の結構な数の方がご参加されたと思うのですが、先月の23日にニッショーホールで行った国際シンポジウムの発表のスライドの寄せ集めというか、ダイジェストという形で、主に有害性評価、その中でも特に調整とキャラクタライズのところに重きを置い

て紹介いたします。

まず、我々のプロジェクトの全体像のところから入りたいと思いますが、2006年から2011年までの5年間、トータルで約20億円という予算で走っております。これはNEDOさんからいただいている研究ファンドです。その先行研究としましては、我々のプロジェクトに入らせていただいている広島大学の奥山先生の所で行われたナノ粒子の吸入ばく露の予備調査研究、あるいは産総研内部のファンドで行われた研究などがあり、そういったものを先行研究として、このNEDOプロジェクトが始まっているところです。

本日は、試料調整のところから有害性のこの辺りのところを主にお話するわけですが、このプロジェクト自体はリスク評価、さらにはリスクマネジメントというところまで視野に置いて、ばく露評価、あるいは社会的影響といったところまで議論しています。アウトプットとしましては、リスク評価、マネジメントというところまで含むということで、こういう新しい技術の規制の枠組みに関するガイダンスのようなものの策定とか、フラーレン、カーボンナノチューブ、二酸化チタンについてのリスク評価書。あと、ナノ特有の有害性試験、試料調整のマニュアル、計測法のマニュアル策定というようなことをアウトプットとして考えているところです。

我々のところが中心になってという言い方をしましたが、参加している組織としましては、産総研の中でもいくつものセクションがありまして、ナノ材料の研究開発自体をやっているところ、計測を主にやっているところ、リスク評価をやっているところが相互に連携しながら、さらには外部に産業医科大学、広島大学、鳥取大学、金沢大学、信州大学といったところのそれぞれの強味を生かしながら連携して実施しているという状況にあります。

我々のところの有害性評価は、最終的にはリスク評価につなげていくためのものなのですが、我々のところで二軸アプローチと呼んでいるアプローチをとっております。リスク評価のためには、理想的には吸入試験などの非常に詳細な試験をやった上で、用量、反応関係や無影響量といったものを定めていく必要があるわけなのですが、必ずしも多くの物質についてそういう試験を行う時間的、予算的余裕がないということもありまして、詳細な試験のラインにつきましてはカーボンナノチューブ、フラーレン、ニッケルオキシドといったところを、ニッケルオキシドについてはややポジティブコントロールという側面もありますが、実施していく。それが1つ目の横軸となる *in vivo* の試験系の軸です。

もう一方の縦軸に *in vitro* 系があります。実は、ここに書かれている気管内投与試験というのは、肺にナノ材料の分散液を注入する *in vivo* 試験なのですが、やや縦軸の広がりを持つ簡易な方法という位置づけになっています。こうい

ったもので物質の数を稼ぎながら物質間の相対比較をしていく。このようにしてトータルで 50 物質ほどについて試験の網をかけていく。そのようなアプローチであります。

今日お話する内容は、我々の所での試験の流れに沿って言うと、まずは液中の分散試料を作る。それを用いて *in vitro* や気管内注入といった試験を行う。また、液中の分散試料というのは、さらに気中分散させて、それを吸入ばく露試験に使う。そのような流れになっておりまして、この順番にお話していくこととなります。

まず、液中分散として、プロジェクトが始まって 2 年ちょっとですが、これは、現時点までで達成された分散試料一覧です。その前に申し上げておく必要があると思うのは、我々はこの分散試料の調整、そのキャラクタライズに非常に重きを置いて実施しているということです。あるナノ材料製品の試験ということであれば、そのもの自身の評価ということで、そのまま試験をすることもあり得ると思うのですが、我々が当初このプロジェクトを始めたときの文献サーベイでは、多くの文献にその材料がどういう状態にあるかということの記述がないということに気づき、危機感を覚えました。

というのは、要はナノであるからして有害性があるのではないかという問題意識に答えられていない。先ほどの津田先生の話では、必ずしもサイズによらないという知見もあるようではありますが、社会の懸念としてはサイズによる何かがあるのではないかというときに、そのサイズがそもそも計測されていない、サイズが揃えられていないというような試験では、結果をどう解釈しているのかわからないのです。そのようなところがそもそもの問題意識であったために、非常に丁寧に分散試料を作り、特に粒子サイズというものについては緻密な計測を行うということにしております。

ここに挙がっておりますのは、酸化ニッケル、二酸化チタンというようなもので、その一次粒子径がいろいろ違えるとか、二次粒子径をいろいろ変えてみるとか、そういうコントロールをして、気管内注入試験や吸入試験に使っております。

これは酸化金属の例ですが、炭素系についても今実施中でありまして、これは粒子という言い方がいいのかわからないのですが、直径が $32\mu\text{m}$ のマルチウォール、あるいは 3nm のシングルウォールの CNT を、多少の分散剤を用いて、超音波、その他のいろいろな方法を適用した上で、安定した分散溶液を作っています。それらを用いた気管内投与や吸入試験ということで、フラレンについてはすでに投与自体は済んでおりまして、現在経過を観察中ということになっております。

一次粒子径、二次粒子径をいろいろに作り分ける技術を開発してきたわけで

すが、これはその例です。そもそも、この試験には、一次粒子径が異なるナノ材料は有害性が異なるだろうか、という問題意識がありまして、5nm、23nm、154nm という市販の二酸化チタンの粒子を購入しまして、それを最大限分散したわけです。この図は、粒径分布で大きいものから小さいものまでこういう幅があるというグラフですが、それを電子顕微鏡で見た像はこういうものです。

これはちょっと似ているのですが、一次粒径は5nm という非常に細かいものです。その凝集の程度をコントロールすることによって、18nm、65nm、約300nm というような二次粒子径の粒子をつくり分けて、それを気管内に注入しまして、現在結果を観察しつつあるところです。

それで、少し先取りして話してしまったので戻りますと、*in vitro* 試験については、先ほど二酸化チタンで例示しましたように、いろいろな金属酸化物のナノ材料について、粒子サイズがナノサイズになっているような安定した分散液を作成しまして試験を行いました。一方、先ほど実施しましたと言った気管内注入試験につきましては、ここに示しましたようなプロトコルでして、使った試料は、先ほど述べました5nm の一次粒径のもの、凝集状態が異なるもの、また、陽性対象としてシリカを加えて、投与直後から3カ月までの観察を行っています。

その観察項目としては、1つには肺での炎症ということではいろいろなバイオマーカーを見ることと、各種臓器の組織病理学的検査をやっています。すでに結果が出ている部分もあるのですが、この限られた時間で断片的な結果をお見せするのもちょっとミスリーディングかなということもあって、こういうことをやっているという紹介に止どめさせていただいております。

一方、そういう液中分散がうまくできるようになりつつあるところをベースに、気中分散試料を作ることも進んでいます。加圧式噴霧装置というのを使います。ナノ材料粒子の分散液の霧を出して、その液体の部分は蒸発させてしまいます。先ほどの広瀬先生が言われていたのと基本的には同じ原理ではないかと思うのですが、このような発生装置は、広島大学のほうですでに相当経験があるものをさらに発展させたものと言えます。

こういうふうにして、ナノ材料の分散液を加圧式噴霧装置で噴霧します。そうすると、試験の期間としてはおよそ4週間を考えているわけですが、その試験期間にわたって平均粒径、個数濃度を質量濃度という観点から安定的に供給できるということを確認しています。ここでの日数が4週間に足りないのは、実際の試験では、週5日与えるという計算で19日になっているのではないかと思います。これはフラーレンの粒子の例ですが、平均粒径がおよそ100nm という辺りで安定的に供給できているということが分かります。

そういう気中分散試料を用いまして、実際に吸入ばく露試験を行うための装

置、これは産業医科大学のほうの装置ですが、は、このようなものです。動物をばく露するチャンバーには、実際にどんな粒子が供給されているかをモニターする装置が組み合わされています。すでに、いくつかの材料をやっているのですが、いちばん最近のところでは、フラーレンについて吸入ばく露試験を行いました。先ほど安定的に供給できているという話をしましたその粒子のエアロゾルを導入して、ポジティブコントロールとして酸化ニッケルを用いまして、このような各群 40 匹という形でやっております。

現状では、3 日時点での解剖の結果および炎症のバイオマーカーの観察結果から、フラーレンに関しては特に影響が見られてないという暫定的な結果が得られているように聞いております。今後 3 カ月という比較的長期の観察で、より確定的な判断をしていくということになります。

観察項目としては、肺に関するものを中心として、肺湿重量、炎症を見るための気管支肺胞洗浄液、血液、酸化ストレス関連遺伝子、肺病理、さらにその他の臓器の所見も組み合わせております。

最後になりますが、生物試料中のカーボン系ナノ材料の電子顕微鏡による観察についてです。ばく露したナノ材料が体内で一体どうなっているのかという話というのは非常に気になるところであるのですが、もともと、体内には、カーボンというのは体を構成する非常に重要な原素の 1 つなので、体内には豊富に存在するわけです。その中に埋もれているカーボン系ナノ材料を高解像度で観察するのは、電子顕微鏡の専門家にとっても非常にチャレンジングな課題だそうです。プロジェクトに参加している山本さんという方が、電顕のスペシャリストなのですが、マクロファージの中に取り込まれたマルチウォールカーボンナノチューブを観察しました。ここはマルチウォールの筋が見えているところです。あと、肺胞マクロファージに取り込まれた C60、フラーレンの様子ですが、これも見る人が見ればという感じもするのですが、この縞々がフラーレンの結晶の格子に相当するということだそうです。生体試料の中のカーボン系のナノ粒子を観察する、そういったような技術開発もやっているという紹介です。

まとめになりますが、有害性試験については二軸アプローチをとっているということで、少数の代表的材料について吸入試験を行い、多くの材料について *in vitro* 試験、あるいは一部気管内注入試験といったものを組み合わせて、面的に評価していく。それから、調整とキャラクタライズということについて非常に重きを置いてやっている。簡単ですが、以上です。

○福島座長

それでは、ご質問を受けたいと思います。

○土屋委員

私は臨床のほうなので、実験の装置のことを伺いたいです。ナノ粒子の分散と計測システムというところで、フラーレンその他のナノ粒子の懸濁液を用いて、それを加圧式の噴霧装置でやるということですね。そうすると、これは水の表面張力などがかなり影響してくるということですか。

○蒲生委員

おそらく、おっしゃるとおりだと思います。

○土屋委員

私は詳しいことはわからないのですが、エアロゾルではなくて、実際の粉状というか、粉末状のものをそのまま使うということはできないのですか。

○蒲生委員

乾式で飛ばすということもありえなくありません。いくつかのアプローチがあって、1つはそのナノ粒子を合成しながら直接吸入試験に供するというアプローチです。ただ、それだと不純物や性状のコントロールが難しいようなことがあって、それは却下ということです。ナノ材料を乾燥した状態で機械的に切る方法もあるでしょうけれど、ナノサイズに揃ったものをうまく飛ばせるかという、それも物によっては相当難しいのではないかと思います。結果的に、液中に丁寧に均一に分散したものを飛ばすほうが、むしろ、安定して狙ったものに行くのではないかと。あと、これを担当している広島大学に非常にノウハウがあるということもあって、選んでいるということになります。

それで、表面張力のようなことに関しましては、噴霧機のいろいろなコンディションの調整とかを、実際に飛んでいる粒子のサイズとか、個数濃度とか、そういうものを見ながら調整しているというふうに聞いております。表面張力がいちばん支配的なファクターかどうかは私にはよくわからないのですが、総合的に我々がいちばん狙っているものが得られるような条件を探しながら決めているというふうに伺っております。

○土屋委員

臨床のほうのアスベストでいろいろ観察した立場からすると、むしろ、粒子は大から小までいろいろ混ざっていても、同じ条件で噴霧されると小さい粒子ほど奥のほうまで到達して、到達部位によってかなり発がん性が変わってくるのではないかという気がするのです。先ほど津田先生は、アデノーマまででき

たけれどもがんはまだできていないと。だから、その辺の到達部位によって影響がかなりあるのかなと思ったものですから、お聞きしたのです。

○蒲生委員

そういう意味では、いろいろなサイズが混ざった広い分布のものを与えることで得られる情報もあるのかなとは思いますが、我々のところでは、まずはナノの影響だということ、極力そのナノスケールの粒子に揃ったものを送るということにフォーカスしてやっているという状況です。

○福島座長

細かいことをお聞きしますが、全身ばく露で、フラールだったですかね、濃度を数字上では18日間という、要するにこれは1日に何回測定するのですか。何回測定した値が出ているのか、そこら辺はわかりませんか。

○蒲生委員

申し訳ないです。これは確かに1日の平均濃度になっていますが、1日中測つての平均濃度なのか、何回か測つての平均濃度なのかはちょっと把握していないのでわかりません。この粒子計測をやっている装置自体は、リアルタイムで数字が出てくるような装置ではないにしても、1日何回かは十分測れると思います。ただ、長期で安定しているということからは、日内変動もそんなにはないのではないかと思うのですが、そこはちょっとわかりません。

○福島座長

わかりました。

○明星委員

測った人間としてお答えしますが、質量濃度は各日ごとの平均になります。毎日1回ずつ測っていますから、図の各点が1日の平均ということです。粒度分布は、いま蒲生先生が言われたとおりで1日数回は測るのでその平均ということです。

○塩原委員

これはこの種の実験をやられている方の常識なのかもしれませんが、先生が吸入ばく露試験で使われているのは雄のラットですね。先ほどの資料では、雌のラットが腫瘍を生じやすいという話だったのですが、雌雄差というのは我々がマウスで実験をやっているかなり大きいのです。吸入実験は雄でやり、

腫瘍の発生は雌でやるというのは、何かのデータに基づいて意図されてやられたことなのでしょうか。

○蒲生委員

私自身は、この毒性学のところは全く素人として、その辺りの問題意識はこのプロジェクト内で共有してみたいと思います。すみません、いまお答えは持ち合わせておりません。

○津田参考人

文献で見る限りは、吸入試験はほとんど雌が使われています。

○塩原委員

いまやられているのは雄ですね。普通は雌がやられているということですか。

○津田参考人

文献で見る限りはほとんど雌です。というのは、先ほど申しあげましたカーボンブラックとチタニウムについては雌にしか発がんしないという。メカニズムは全くわかりませんが、同じことをやっても雄には発がんしないというデータがあります。それから、その2つの物質についてハムスターやマウスでやっても発がんしない。雌のラットにしか出ないのです。ただ、その理由はよくわかっていません。

○塩原委員

それは例えばホルモンとは関係ないのですか。

○津田参考人

そこまではまだきちんとしたデータがありません。

○塩原委員

そうすると、蒲生先生が雄でやられたというのは。

○蒲生委員

私自身がやっているわけではないということで、持ち帰ってまた今後検討したいと思います。

○福島座長

確かに雌には出ますが、津田先生は雌にしか行われていないと言われましたが、私の記憶だと雄も使われていると思います。ただ、出るのは雌によく出るということで理解しているのですが、違うのですか。

○津田参考人

きちんとやったのは雄もありますが、ドイツの吸入センターの論文を見ると、雌のほうのみが記載してあります。雌のほうがセンシティブだから、雌で出なければ雄でも出ないという過去のデータに基づいてやらなくなっているのではないかと思います。

○塩原委員

化学物質を皮膚に塗ってかぶれの実験をやると、雄のほうははるかに出やすいのです。ですから、何かその辺がわかっていることがあればと思ったのです。

○津田参考人

アメリカのある研究者で、この吸入実験の結果について雌だけに出るので、特殊な例であるから一般には当てはまらない、という説を展開しているグループもあります。

○福島座長

いまはかぶれのことを言われましたが、例えば肝臓発がんを見ると、肝臓発がんは雄のほうにセンシティブな傾向が高いのです。だから、オーガン・ディペンデンシー（臓器依存性）があるのではないかなと私は思っています。ただ、その理由というか、肺のほうもなぜ雌なのかというのは私は知りません。

○蒲生委員

産業医科大学のこのグループは、アスベスト代替物の評価を研究してきていますので、これは単なる私の考えなのですが、そういう文脈で使われてきたものという理由で選んでいるのではないかと思うのですが、これもちょっと確認いたします。

○福島座長

それでは、どうもありがとうございました。今日は3人の先生方について発表していただきました。予定ではフリートークでもう一度おさらいの意味も含めて質問を受け、先生方に答えていただくことを予定していましたが、時間がまいりましたのでそのことについては割愛をします。また、先生方、何か

疑問点がありましたら、それぞれの先生と個々に連絡を取りあって、その点を解決していただきたいと思います。よろしく願いいたします。事務局から何かありましたら、どうぞ。

○化学物質対策課企画官

本日はどうもありがとうございました。本日の会議の議事録ですが、後ほどまた委員の先生方にご確認していただいた上、公開させていただきますのでよろしく願いいたします。

それから、合同会合ですが、合同会合は本日で終わりということですので、次回からは 2 つの検討会を別々に開催させていただくことになります。次回の開催日ですが、「ヒトに対する有害性が明らかでない化学物質に対する労働者ばく露の予防的対策に関する検討会」につきましては 5 月 30 日金曜日の 10 時から 12 時に、本日と同じこの会議室で開催を予定しておりますので、よろしく願いいたします。「ナノマテリアルの安全対策に関する検討会」の開催日及び場所につきましては追って調整させていただきたいと思いますので、よろしく願いいたします。事務局からは以上でございます。

○福島座長

本日の検討会はこれで終了いたします。どうもありがとうございました。