

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)

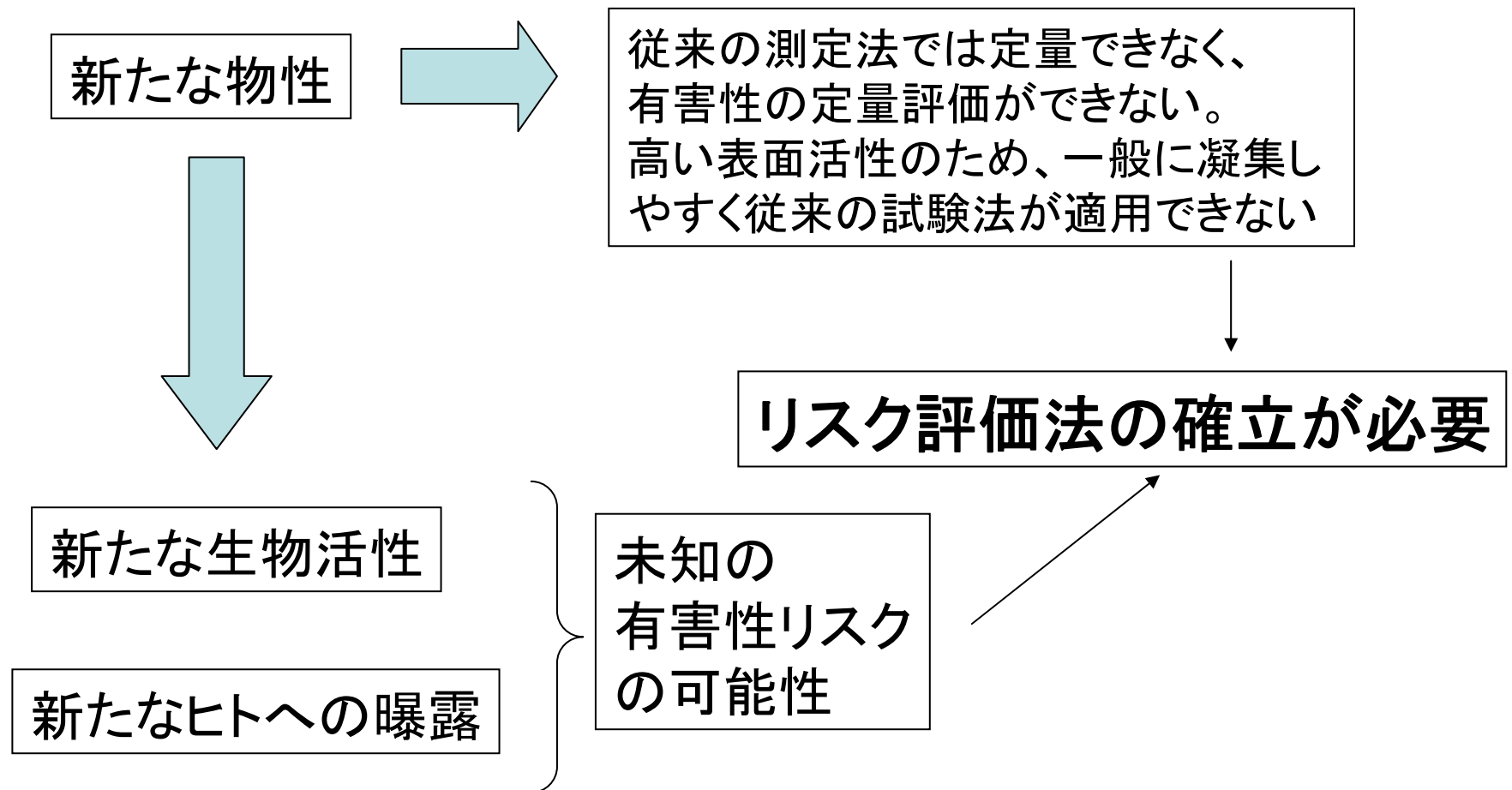
車体部品やその他のプラスチック等への練り込み
(通電性の向上や、耐久性の向上の目的)

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

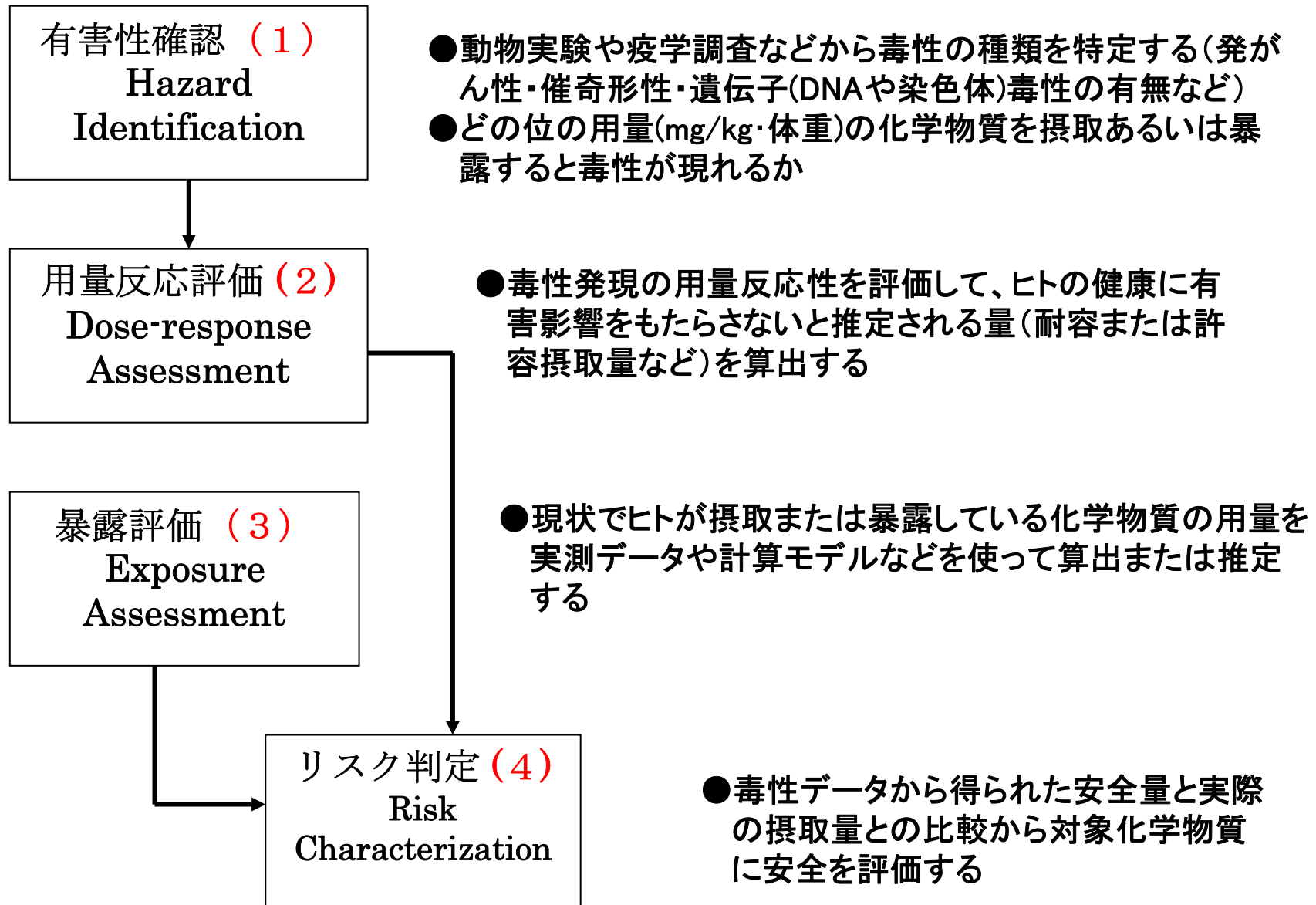
100ナノメートル以下になると重量(あるいは一粒子)あたりの表面積が格段に大きくなり、従来の微粒子であるマイクロメートルレベルの粒子よりも表面活性が高くなり、光学・電気学に異なった、物理特性を持った物質になる



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



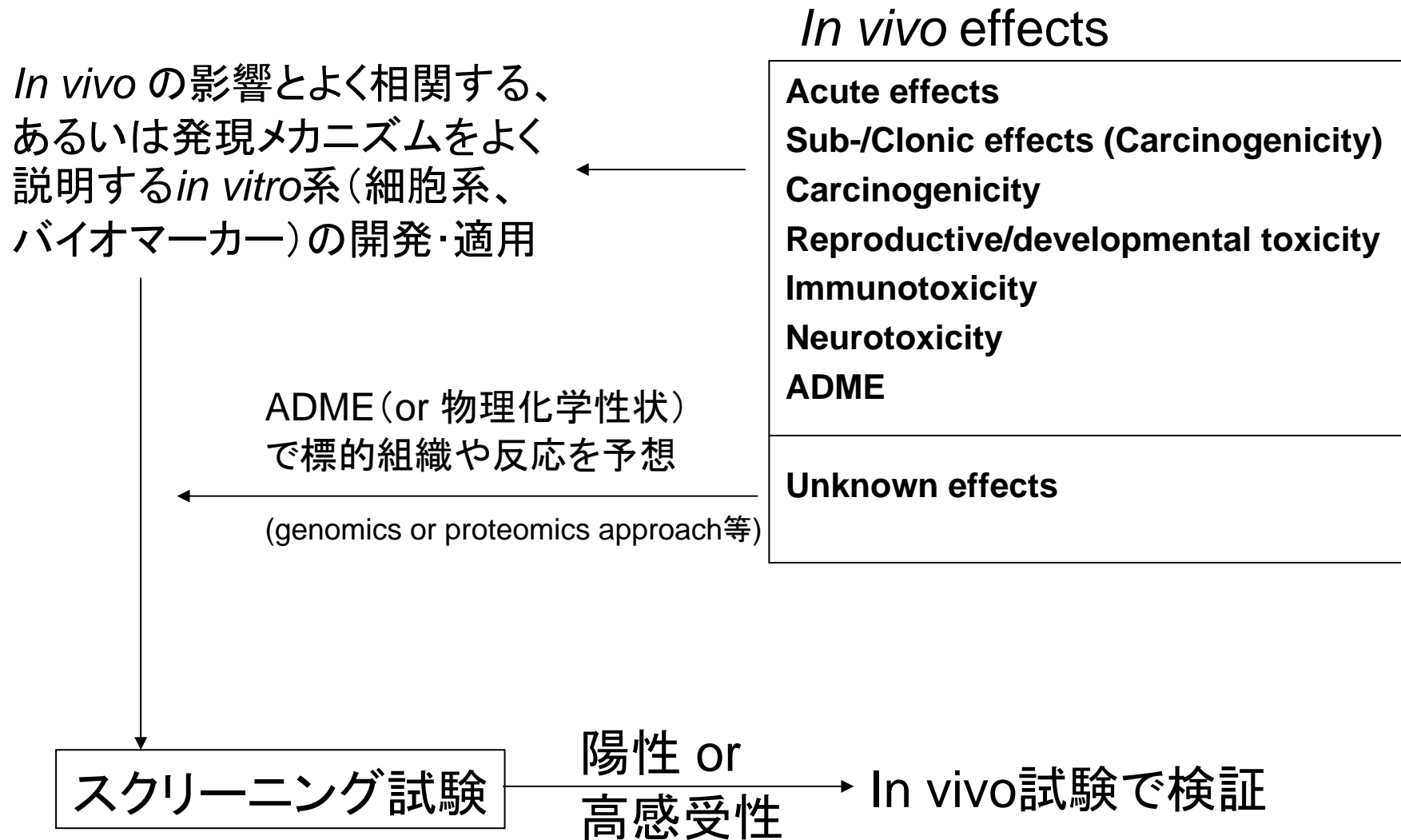
有害性評価

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

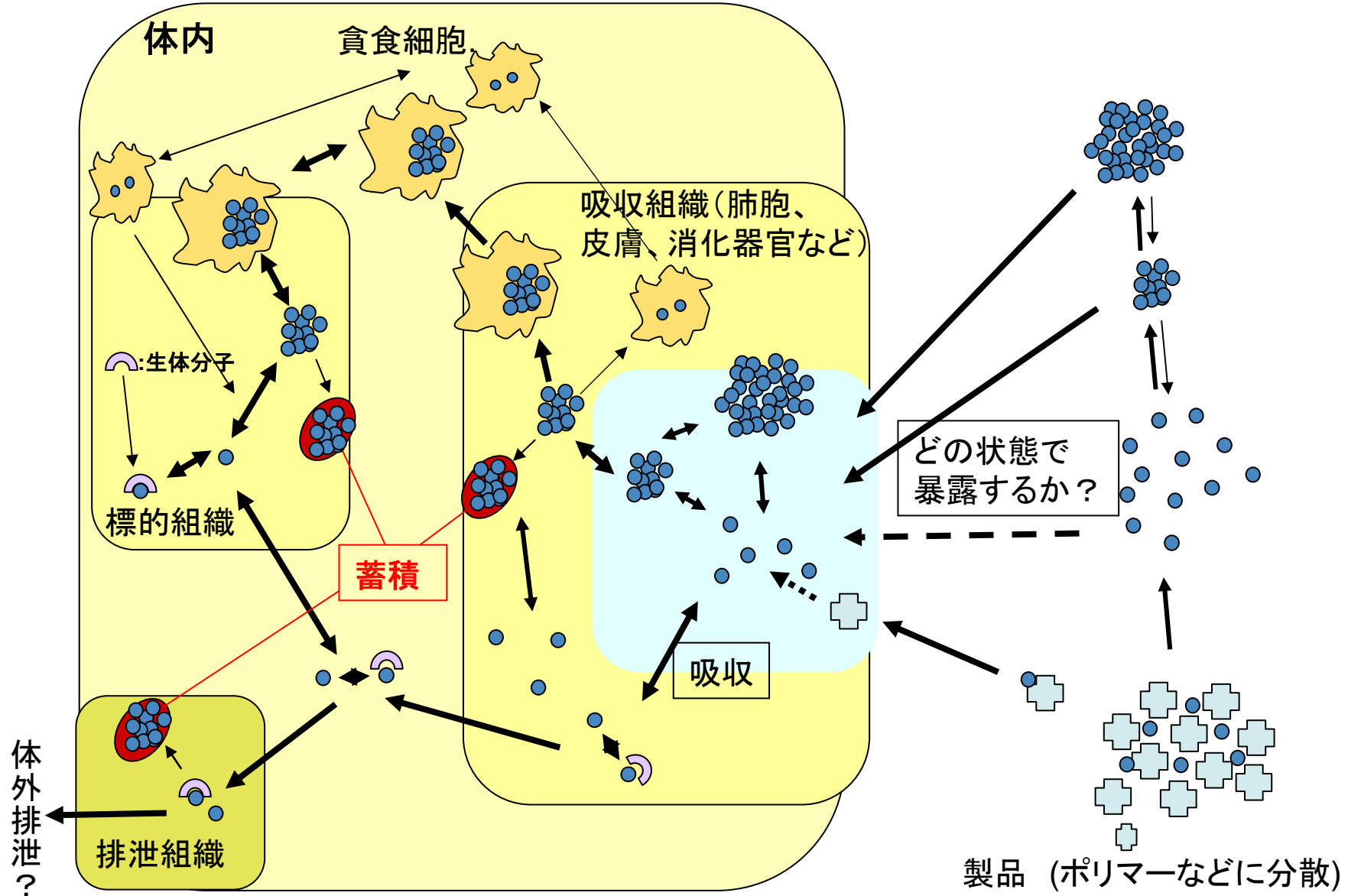


リスク評価を行う上で考慮すべきこと(1)

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)

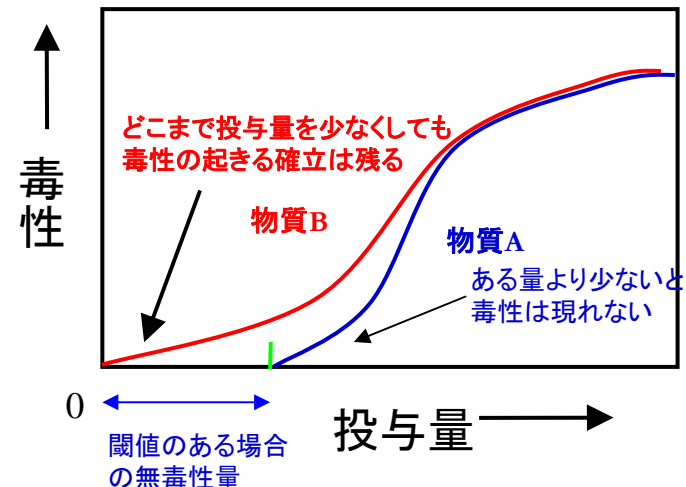
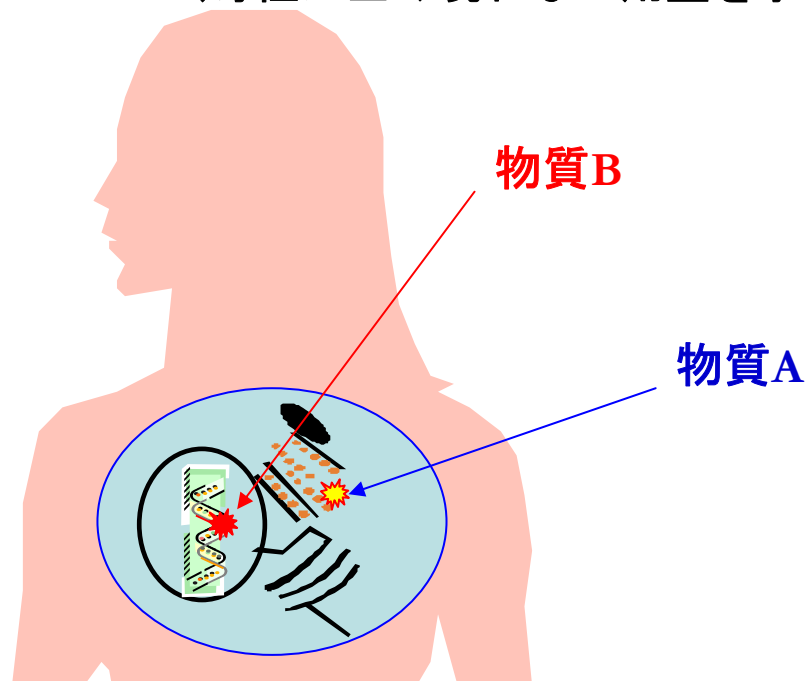
ヒトの健康に有害影響をもたらさないと推定される量(耐容または許容摂取量)や実質安全量を算出するが、毒性発現メカニズムの違いから評価方法は大きく以下の二つに分けられる

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

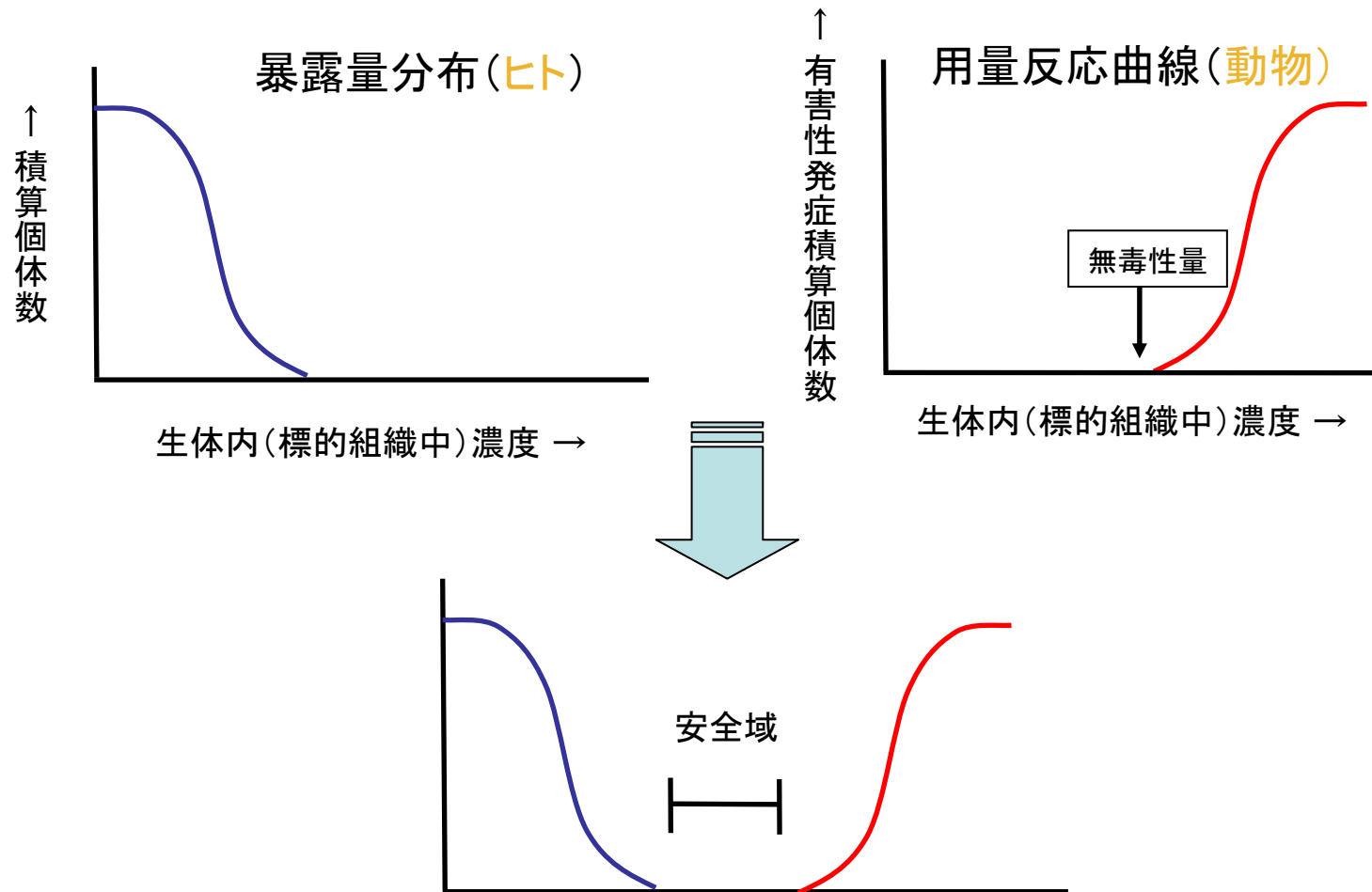
遺伝子 (DNA) 障害性を引き起こす場合 :

→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

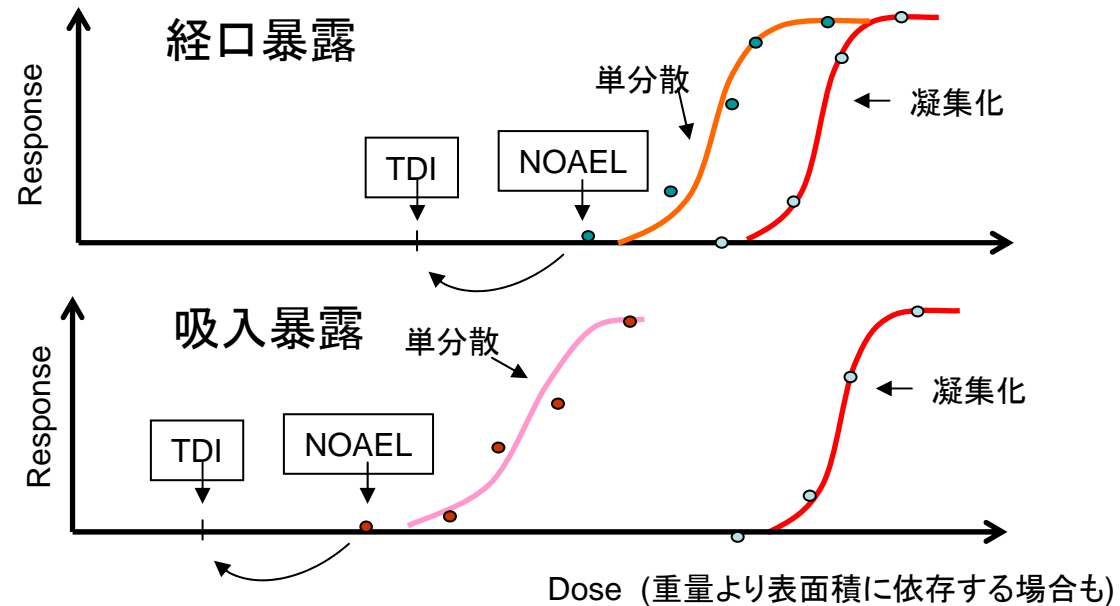
- 有害性用量反応と暴露量分布の比較



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

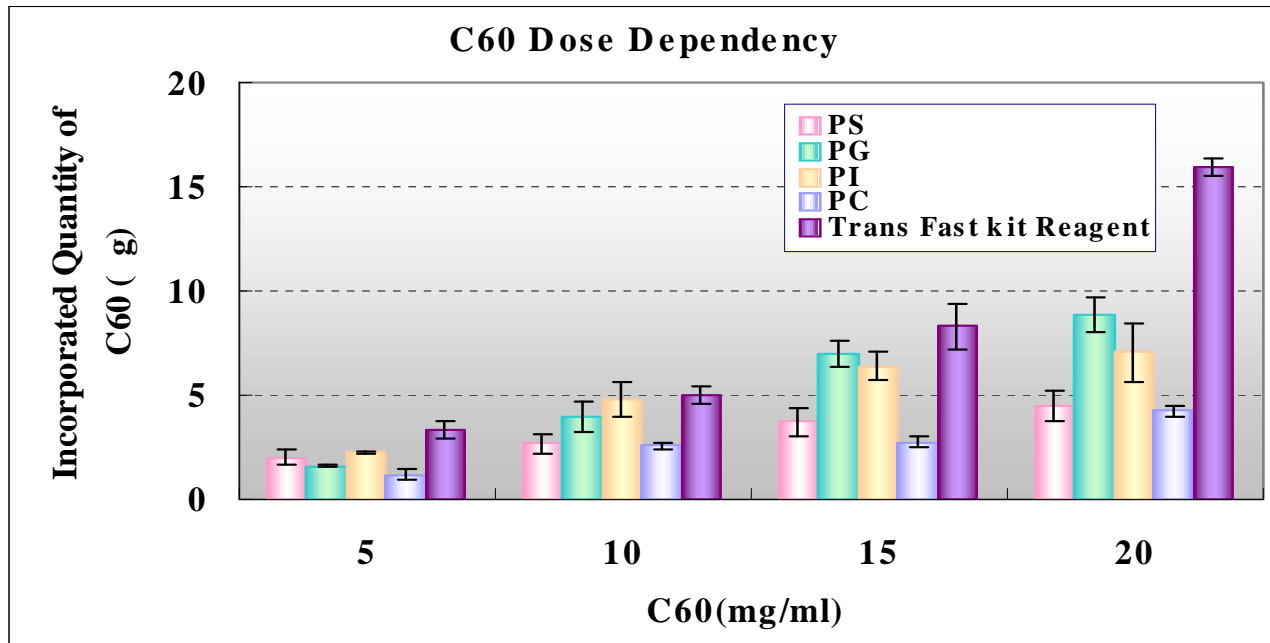
ミスト法による吸入発生装置の開発、単回暴露試験 (進行中)

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



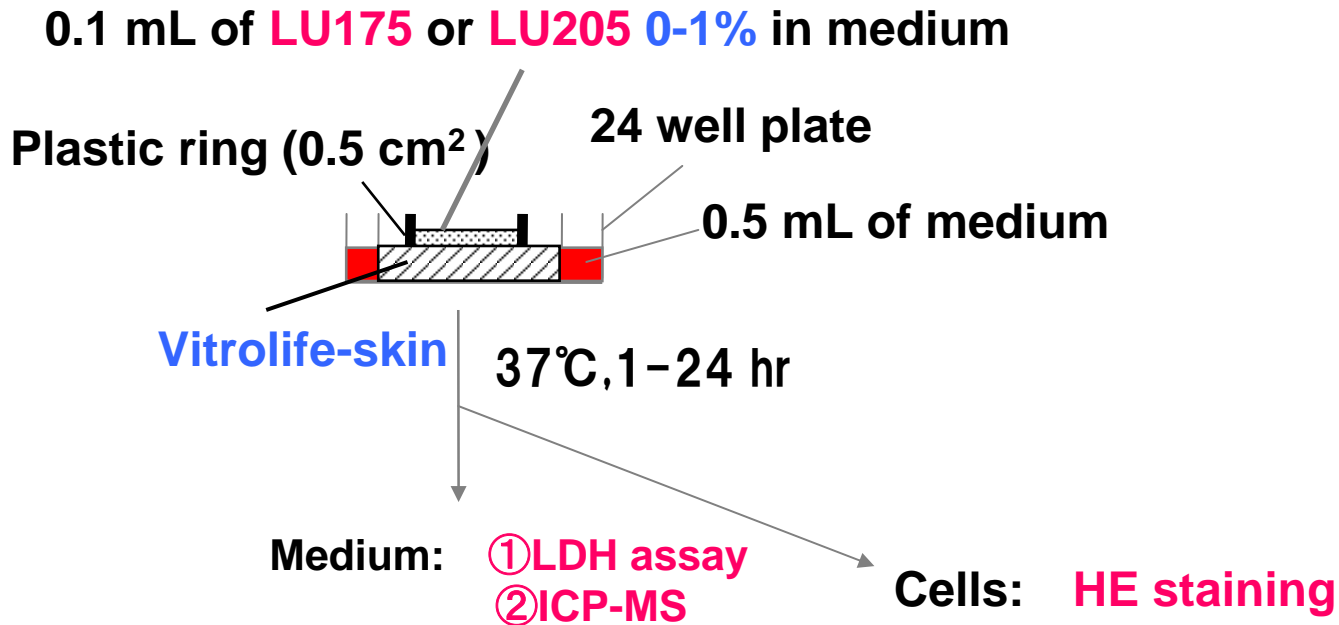
ベシクルの材料の違いによるC60の取り込みの違いを比較



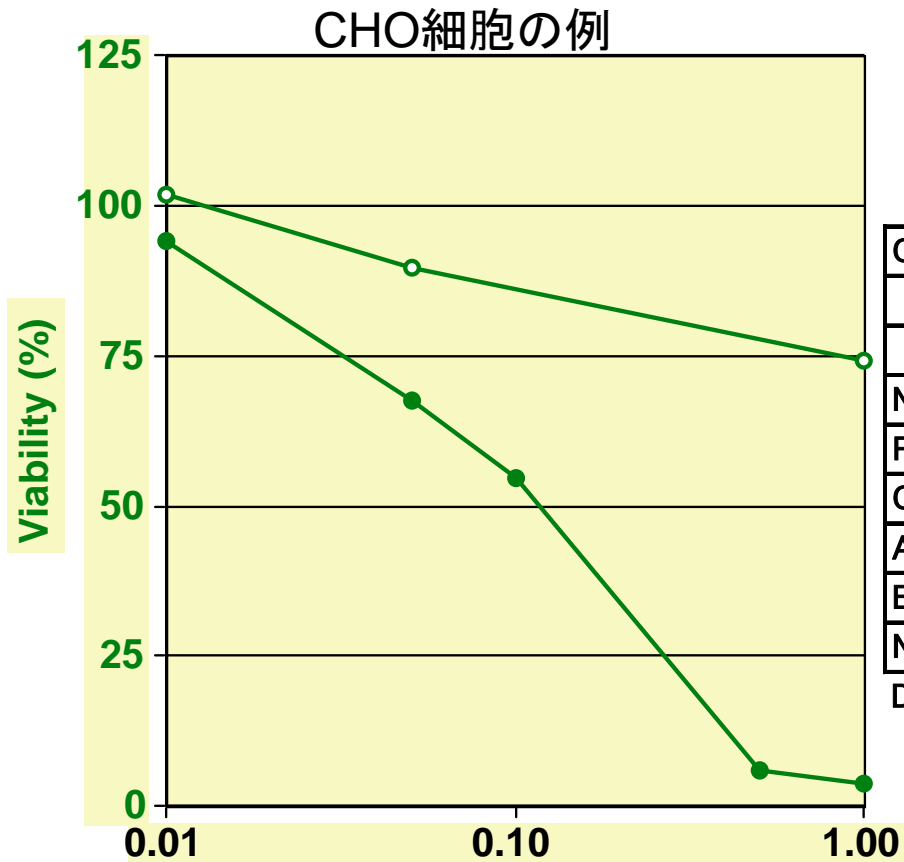
PC/PS/フラーレンリポソームを添加
1日後のM ϕ を撮影したもの

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

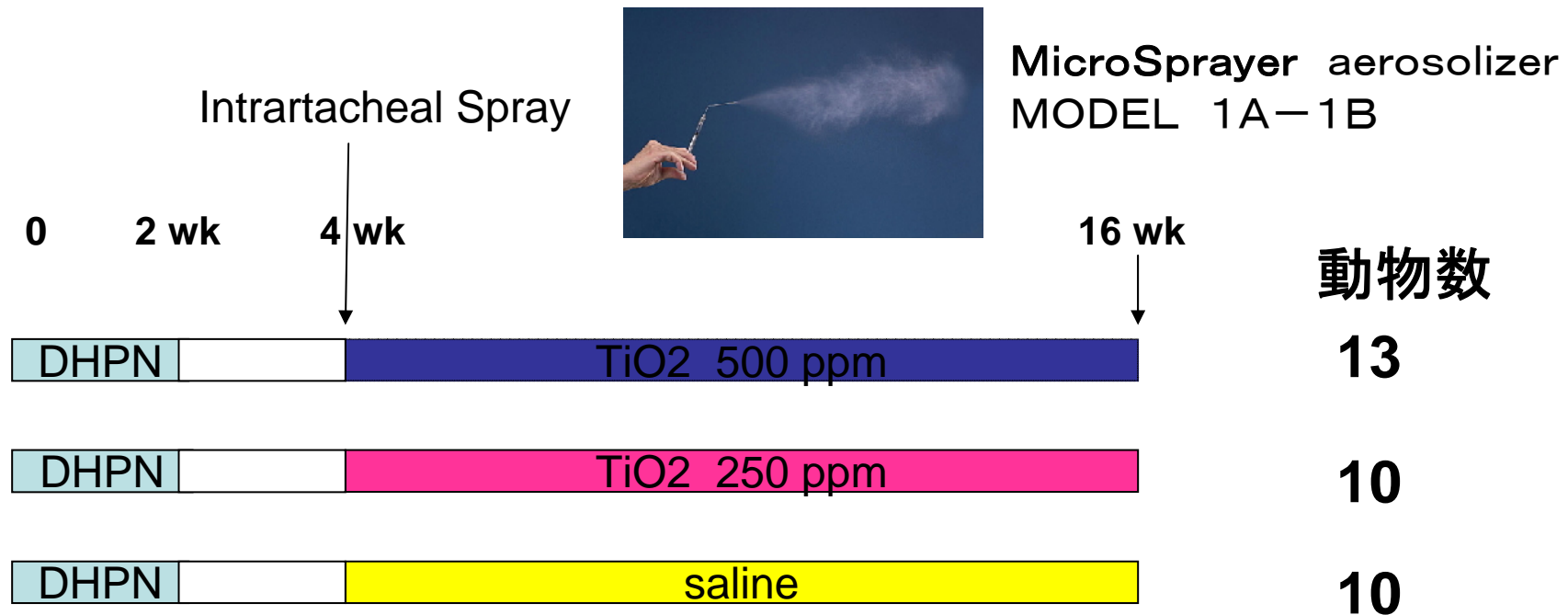
Cytotoxicity of LU175 and LU205 against cultured cells		
IC50 (mg/ml)		
	LU175	LU205
NHSF	0.5 ± 0.2	>10
RBL-2H3	1.4 ± 1.0	8.6 ± 1.2
CHO	1.3 ± 0.3	>10
A431	8.3 ± 2.9	7.0 ± 2.6
B16 melanoma	>10	>10
NHEK(F)	>10	>10

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

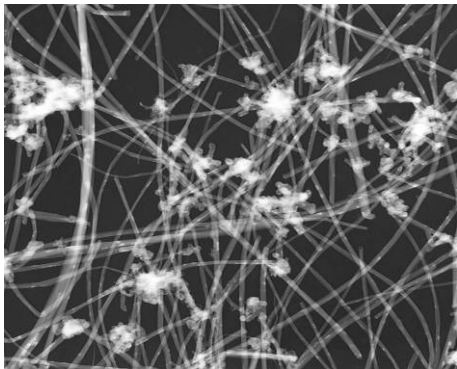
■ DHPN: 0.2% in drinking water

□ 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%

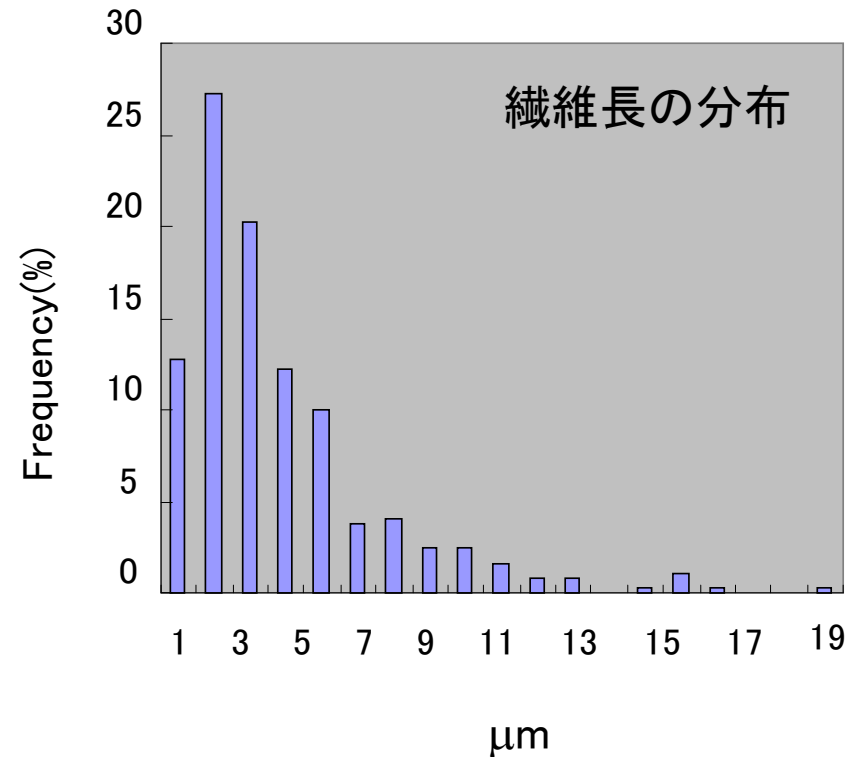
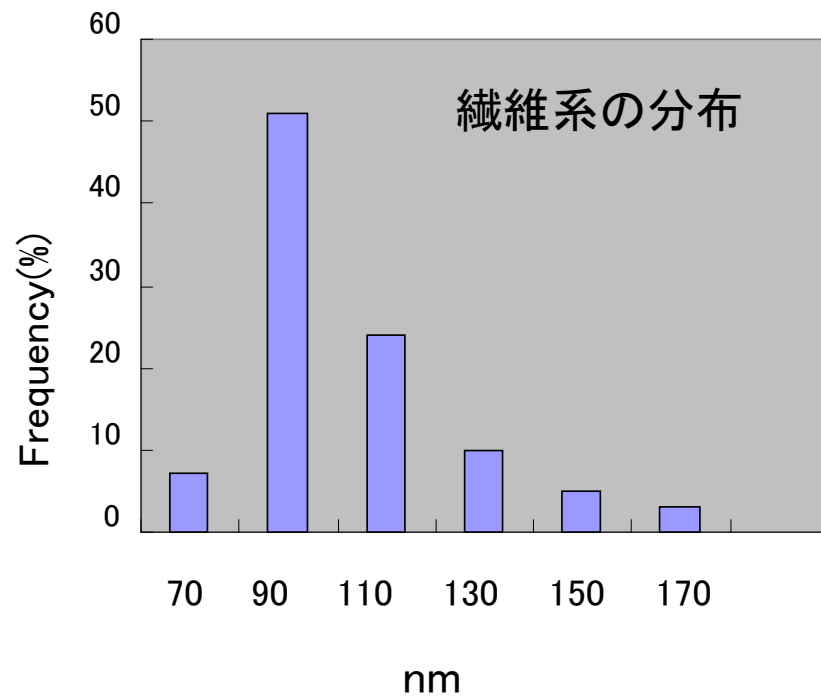
Pyrohydrolysis-Adsorption-Ion Chromatography

F : <5 ppm (n.d.)

Cl : 29 ppm

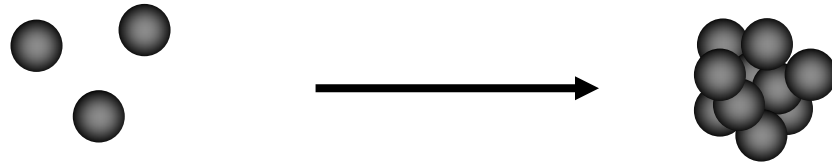
Br : <40 ppm (n.d.)

S : 486 ppm

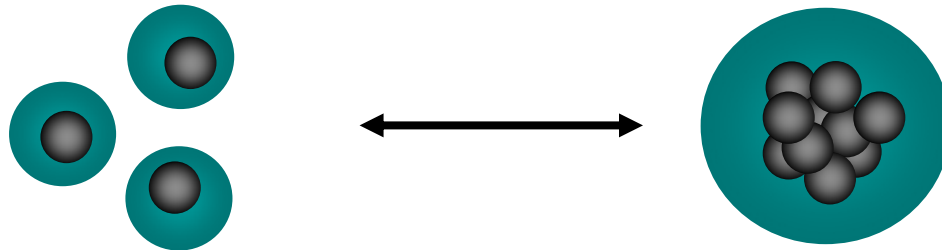


ナノマテリアル吸入暴露手法における課題

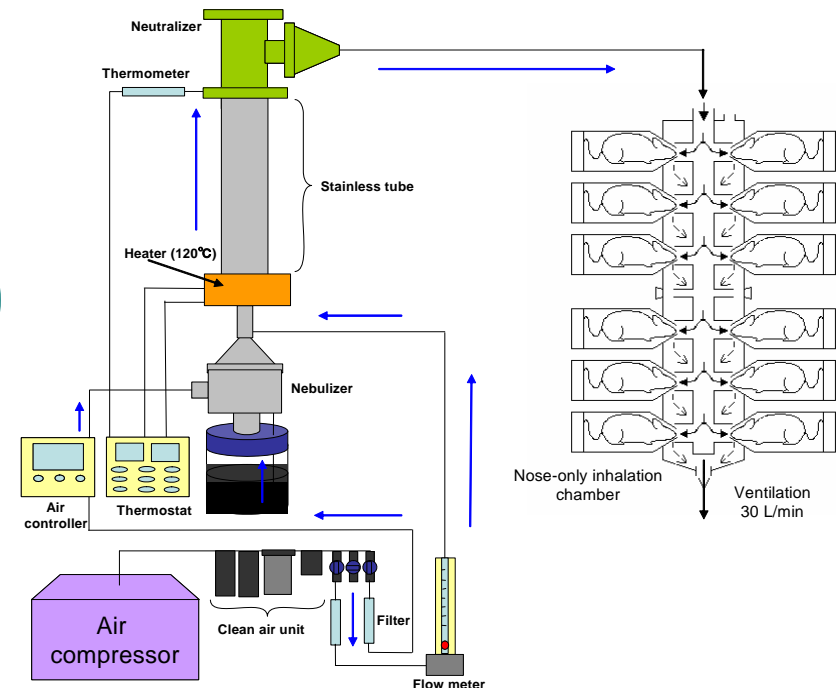
- ダスト Dust
 - 発生前および発生中(空气中)での凝集



- ミスト Mist
 - 溶媒の選択
 - 溶媒中での凝集



→ ナノ粒子としての発生



H17年度

H18年度

H19年度

H20年度

H21年度

ナノマテリアルの安全性確認における健康影響評価手法の確立に関する研究

②: フラーレンの水溶性の検討およびin vitro系の影響:
(酸化チタン粒子の3次元培養人皮膚モデル透過実験、補助剤による分散、神経細胞、変異原性)

③: フラーレンの体内動態およびin vivo系への影響:
(経口投与→動態解析、TiO2皮膚塗布プロモーション)

①: 生体試料中の分析法の確立

④: 調査研究

フルーレン、TiO2

高生産量ナノマテリアルを中心に展開

多層ナノチューブ (H18より)

皮膚特異的な組織構造や吸収性に関する専門知識の導入

日用、家庭用品等で使用されるナノ粒子

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
C60測定法の高感度化および経口投与による動態解析、MWCNT測定法開発、環境中での分解、代謝
- ② in vitro試験系の開発
タンパクや脂質等を分散剤と用いた系の確立
上記の系を用いた神経細胞、変異原性、
- ③ in vivo試験系
慢性影響(腹腔内投与)、
発がん性(気管内投与)(津田)
- ④ 吸入暴露法の開発
- ⑤ 国際動向調査、調和

ナノマテリアルの経皮毒性に関する評価手法開発に関する研究

① 経皮吸収と生体内処理に関する因子の解析 (ADMEの解析)

- ナノ粒子の経皮塗布による吸収と組織分布
- 損傷皮膚での吸収性
- 炎症による修飾

② 反復投与による亜急性、慢性毒性評価手法の検討

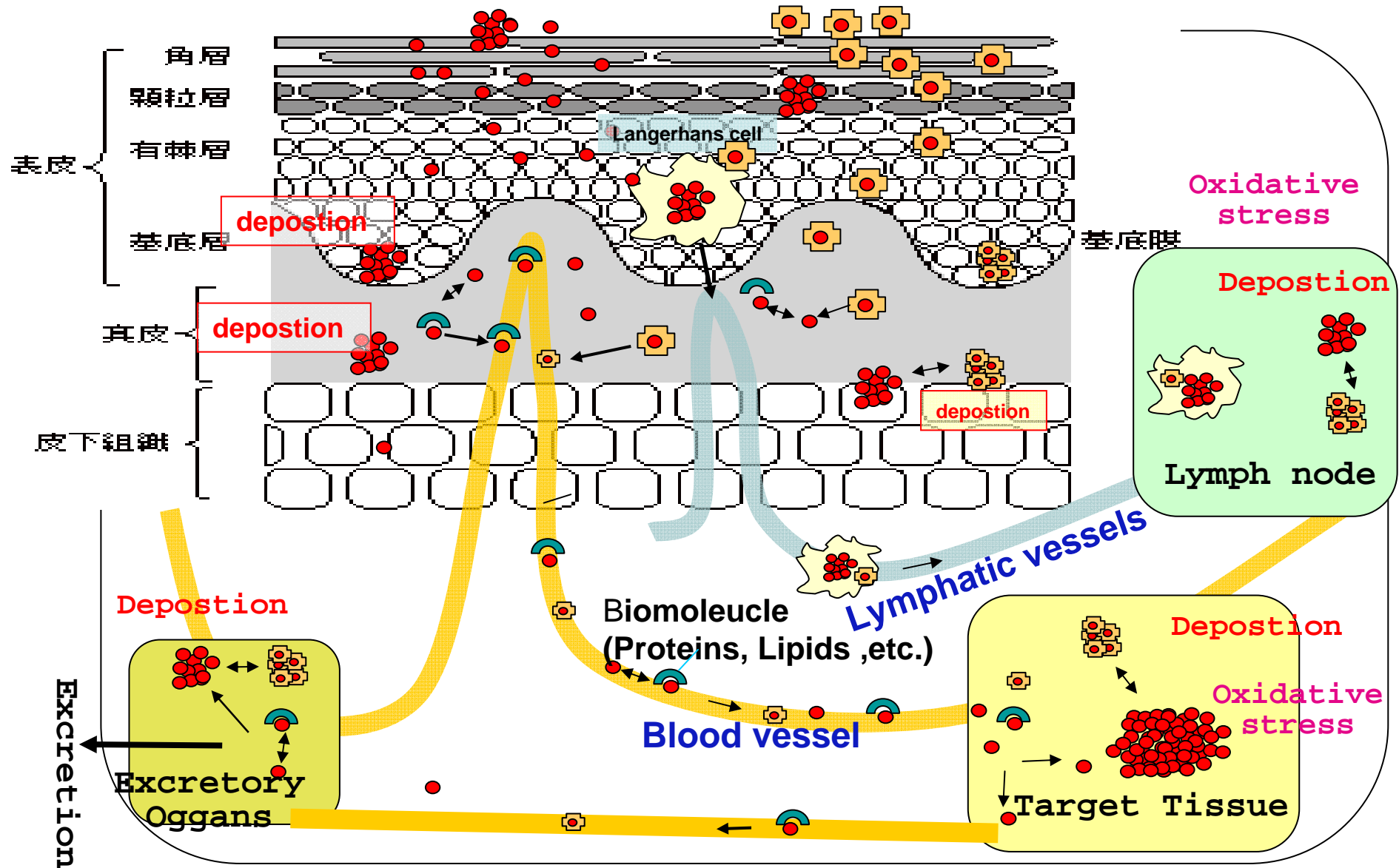
- 反復投与による吸収性
- 皮膚、皮下への沈着
- リンパ・血液を介する移動と臓器分布
- 局所と遠隔臓器の免疫系への影響
- 慢性影響と発がんへの関与

ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法に関する総合研究 (吸入暴露研究)

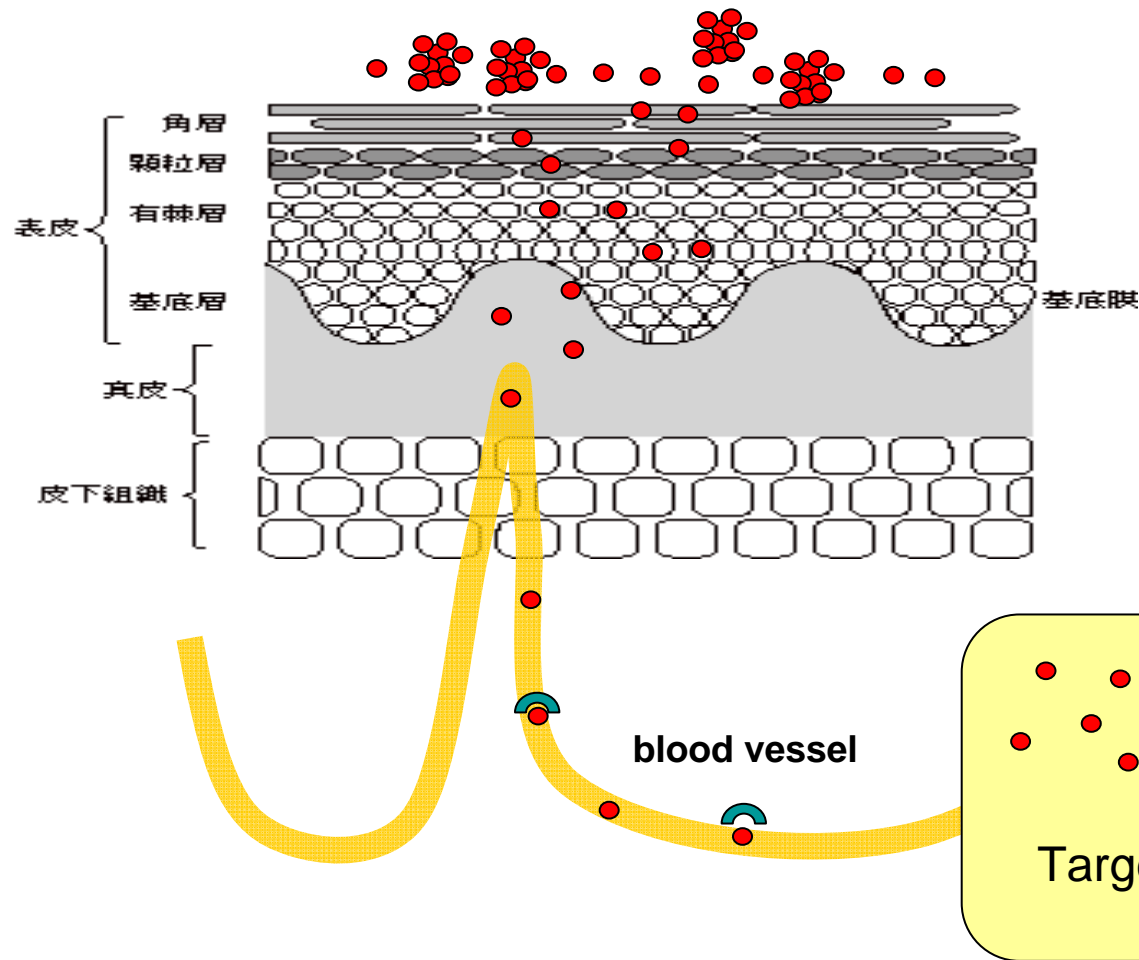
- ① ナノマテリアルの実験動物への吸入暴露法の開発
- ② 発がん等の長期毒性を視野に置いた生体影響の評価手法の開発 (呼吸器を中心に)
酸化ストレス、cDNAマイクロアレイ解析
中期発がん試験法など

懸念されるナノマテリアルの皮膚吸収—分布—蓄積

Nanoparticles Hybrid Nanoparticles
(皮膚吸収は想定されていない物質) (意図的に経皮吸収性を高めたもの)



酸化チタンの経皮反復投与による各臓器への蓄積性



ラットへの4週間の経皮反復投与試験による各種臓器への蓄積性を検討する

臓器に取り込まれた測定は硝酸で疎解した後、ICP/MSで測定する。

in vivo 腹腔内投与による中皮腫誘発作用の検討 (p53 knockout mice) by MWCNT

実験方法

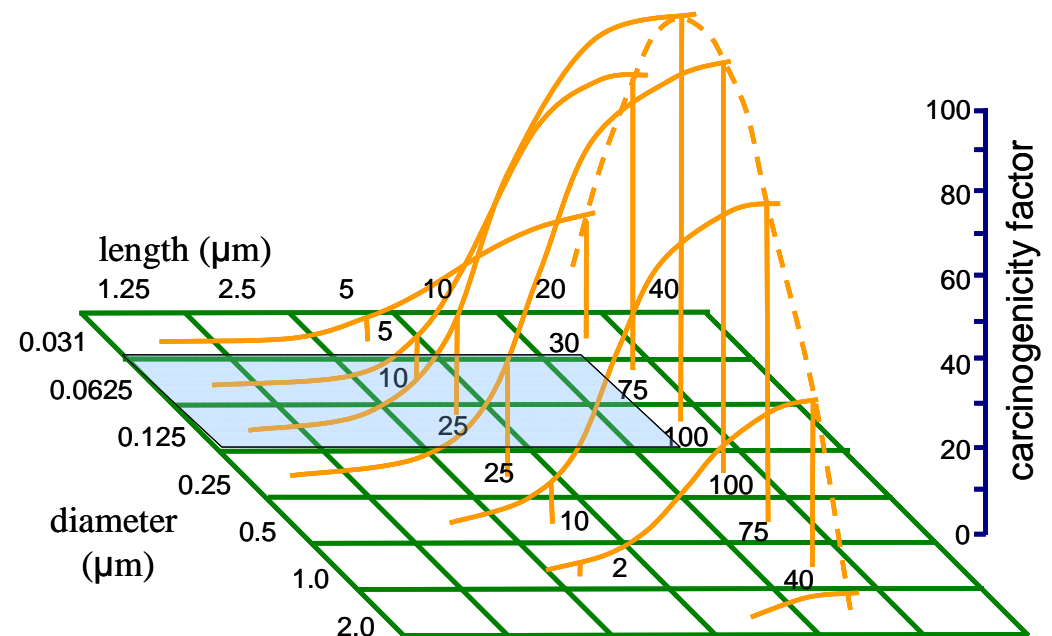
- ・実験動物 : **p53+/- mouse** (C57BL/6 back, 9 - 11weeks age)
4 群 (18 - 19 匹/群)
- ・投与量 : 単回腹腔内投与
 1. 多層CNT 3mg/animal
 2. フラーレン 3mg/animal
 3. クロシドライト 3mg/animal
 4. 溶媒のみ
- ・試料調整: 0.5%CMC 水溶液に懸濁, オートクレーブ,
Tween 80 (1%)添加後、超音波処理

アスベスト様サイズの粒子の吸入曝露による慢性影響・発がんポテンシャルの検討

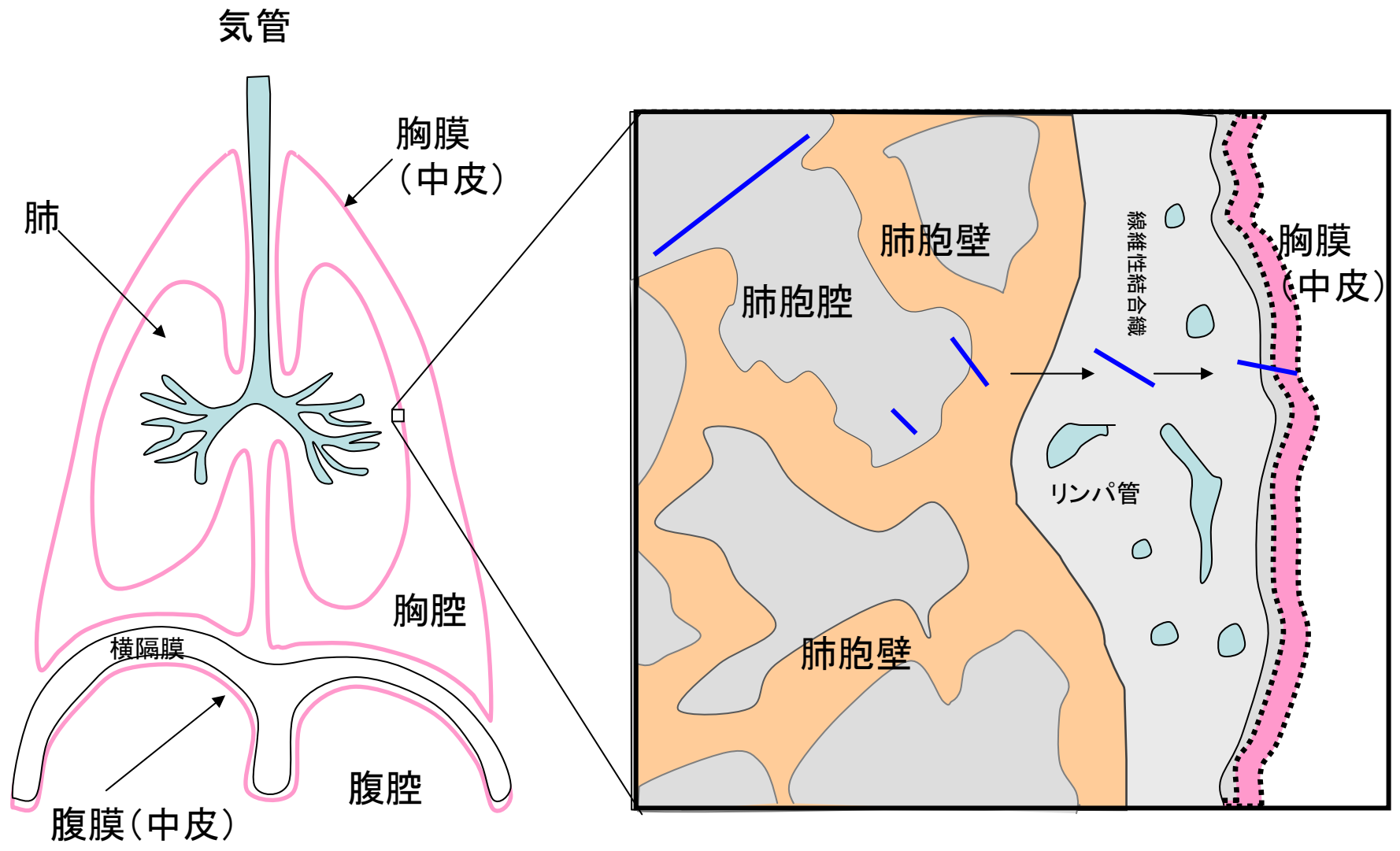
- アスベストなどの繊維状粒子の吸入曝露による肺発がん性ポテンシャルは、繊維径と長さおよび体内残留性に依存することが知られている。
- 様々な径と長さの分布を持つ鉱物系繊維を胸膜に埋入した実験により、直径が $1.5\ \mu\text{m}$ 以下で、長さが $4\ \mu\text{m}$ 以上の繊維の割合が多いものが、発がん性の強いことが示されている。

Correlation coefficients of logit of tumour probability with common logarithm of number of particles per microgram in different dimensional ranges ^a			
Fibre diameter (μm)	Fibre length (μm)		
	(≤ 4)	(> 4 - 8)	(> 8)
> 4	-	-0.28	-0.30
> 1.5 - 4	-0.45	-0.24	0.13
> 0.25 - 1.5	0.01	0.45	0.68
≤ 0.25	0.20	0.63	0.80

^a From: Stanton et al. (1981).



Hypothesis on the carcinogenic potency of a fibre as a function of its size with some data on "carcinogenicity factors". From: Pott (1978).



アスベスト代替物の線維性による発がん性のメカニズムとアセスメントWHOワークショップ
8-12 November, 2005, Lyon, France
"SUMMARY CONSENSUS REPORT"

疫学データ

疫学データは有用性が最も高いが、毒性実験から得られたデータの解釈の矛盾をいつも解決できるとは限らない。

実験動物データ

肺がんや中皮腫、肺線維症の誘発は重要な影響である。上皮細胞増殖、炎症反応は必ずしも等価に重要な指標であるとは限らない。原因は依然はっきりしないが、ラットの肺がんの感受性は、明らかにヒトよりも感受性が低い。腹腔内投与試験は有用で感受性の高い試験である。

遺伝毒性の可能性

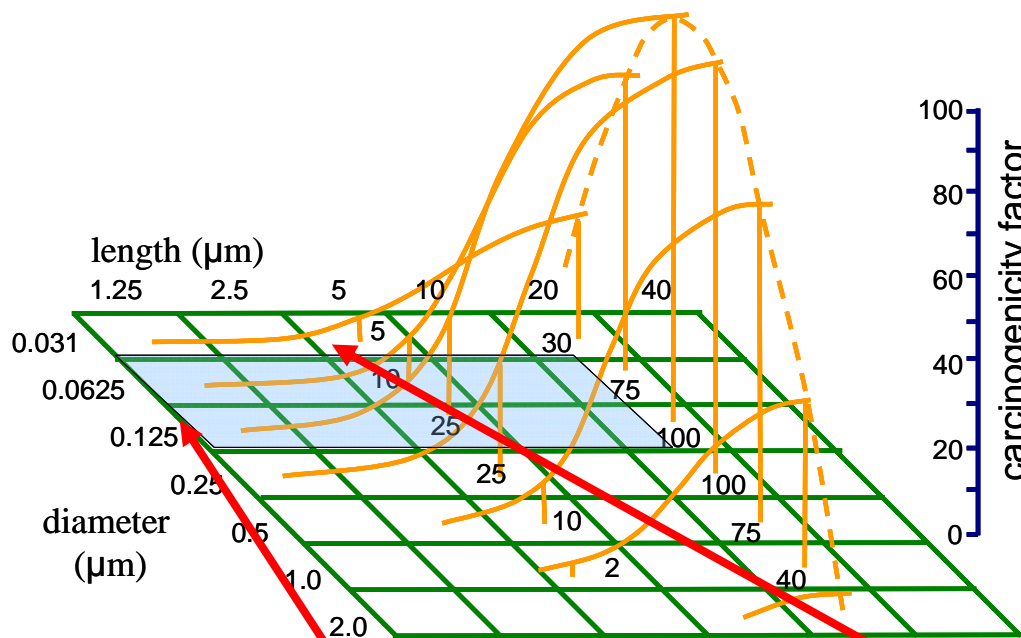
繊維粒子そのものは、基本的におそらく発がん過程の全てにかかわっていると考えられる
しかし、以下の指標は、通常の遺伝毒性試験では検出できない

- 繊維の残留性 (持続的で不完全な貪食作用)
- 活性酸素種による二次的な遺伝毒性
- 活性窒素化合物
- マクロファージや炎症精細胞による細胞分裂促進因子の放出

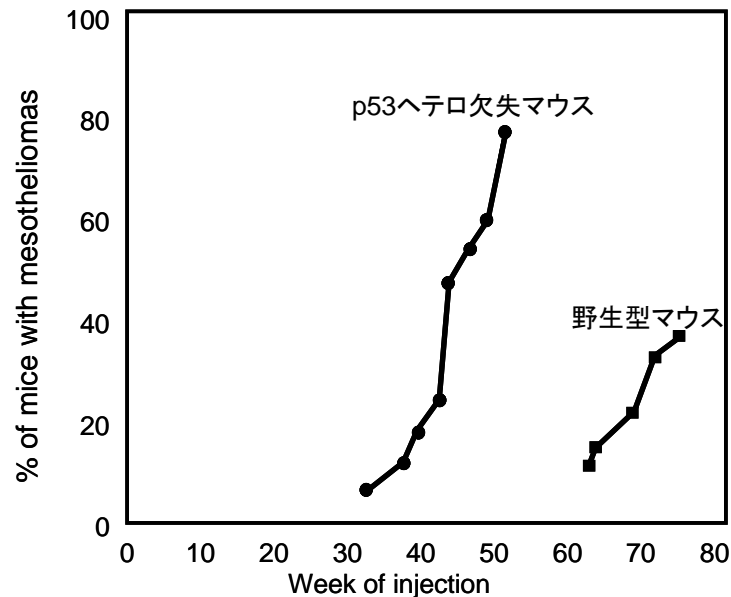
物理化学的因子

繊維の長さに依存して発がん性の強さが連続的に変わるという知見がまとめられている
→ 生体内残留性が大きくなれば、繊維粒子による毒性が強くなる傾向にある

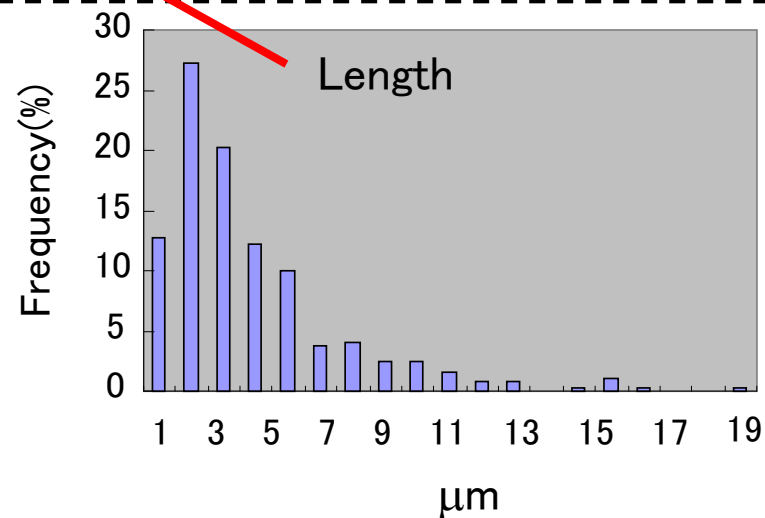
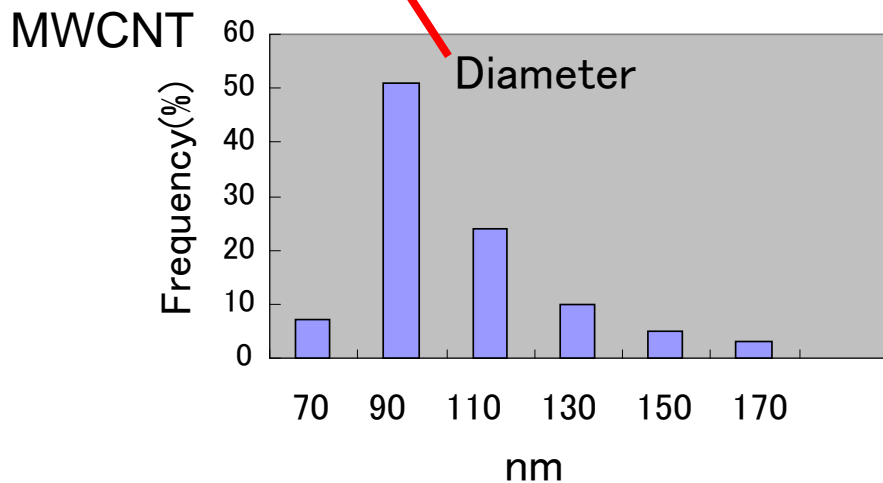
(但し、生体内残留性と発がん性の強さの相関性については、ガラス製の繊維によって確認されている事項であるが、これは、他の種類の繊維状粒子でも証明されている訳ではない。)



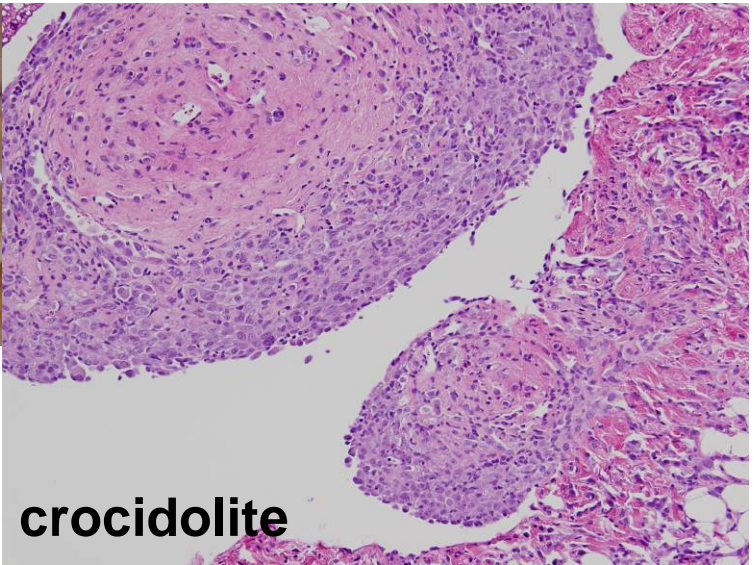
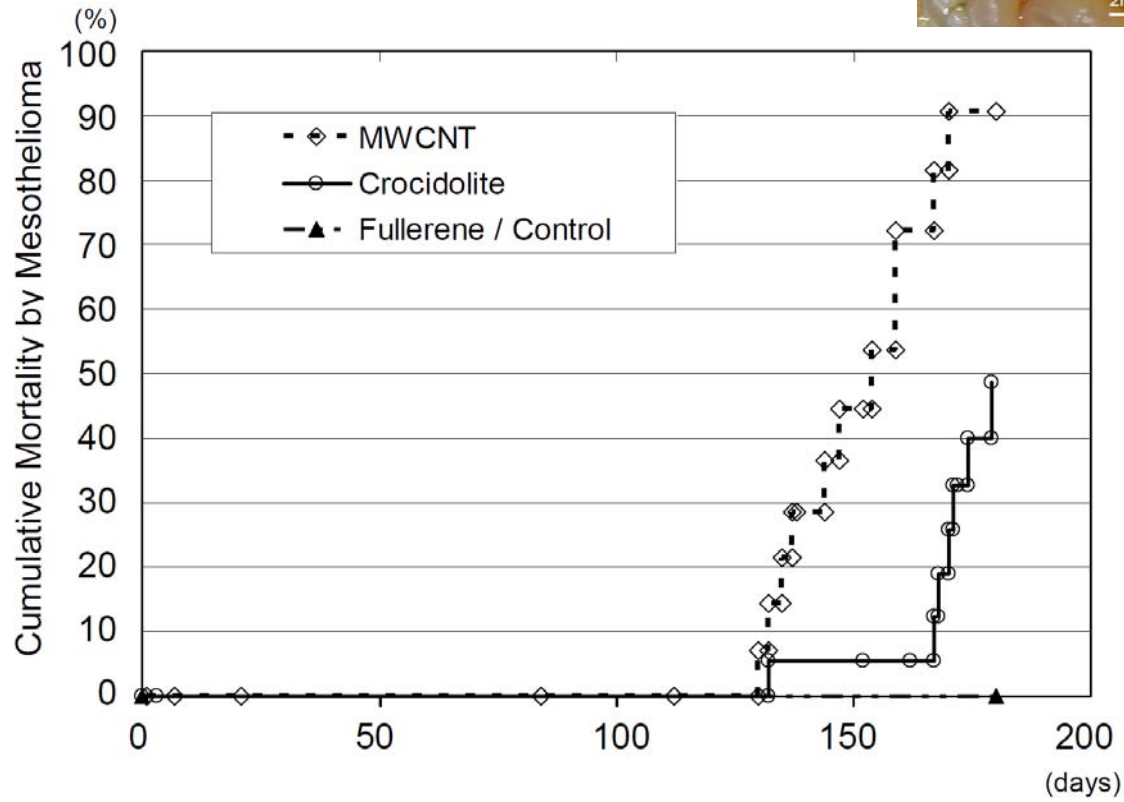
Hypothesis on the carcinogenic potency of a fibre as a function of its size with some data on "carcinogenicity factors". From: Pott (1978).



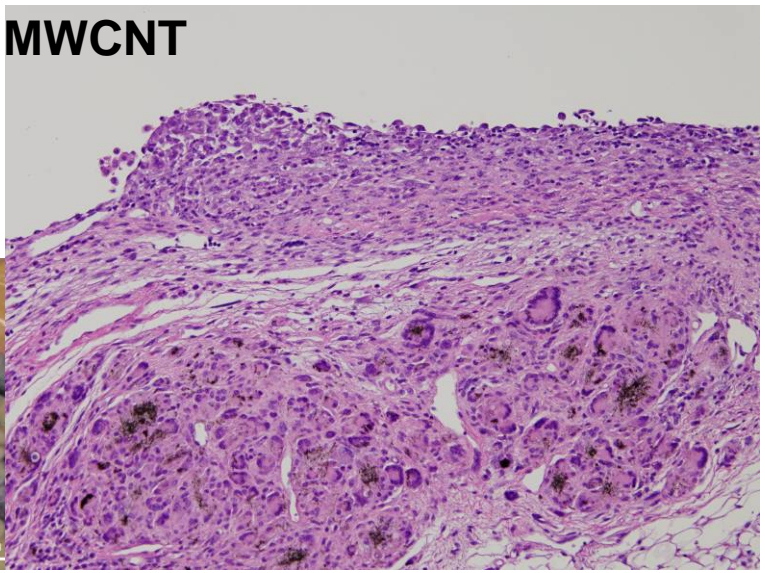
Time development of malignant mesotheliomas in heterozygous p53^{+/-} or wild-type p53^{+/+} mice induced by weekly injections of crocidolite asbestos fibers (200 μg/1ml PBS). From: Marsella et al., (1997).



MWCNT: 3mg/animal
= 1.06 X10⁹ fiber/mouse = 0.293 X10⁹ WHO fiber/mouse)



crocidolite



MWCNT

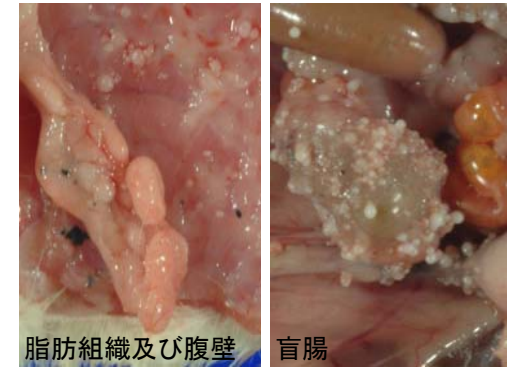
Takagi et al., The Journal of Toxicological Sciences Vol. 33. (1),105-116. (2008),

ラットにおける多層カーボンナノチューブ(MWCNT) の陰嚢腔内投与による 中皮腫の誘発 (東京都健康安全研究センター)

実験デザイン

実験群	用量	動物数
実験 1		
対照群(2%CMC)		5
クロシドライト(Cro)	2mg/kg体重	10
MWCNT	1mg/kg体重	7
実験 2		
MWCNT	2mg/kg体重	7

溶媒 2%CMC, 投与液量:0.2ml/100g 体重
MWCNT: 多層カーボンナノチューブ

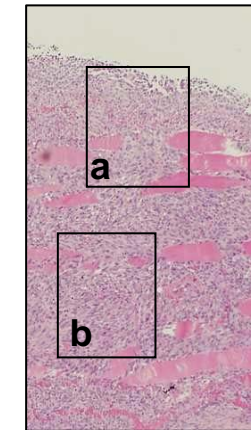


2mg / kg体重 26週屠殺例 肉眼像

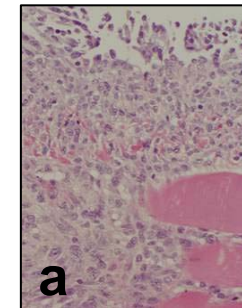
実件結果

実験群	動物数	投与後経過週								組織所見	
		26	27	30	37	39	40	50	52	中皮腫過形成	
実験 1											
対照群	5								○(5)	0	0
Cro	10								○(10)	0	0
MWCNT	7				●★	●★	●★ ●★ ○★	○★	○★	6	1
実験 2											
MWCNT	7	○★	○★ ○★ ○★	○★ ○★ ○★						3	4

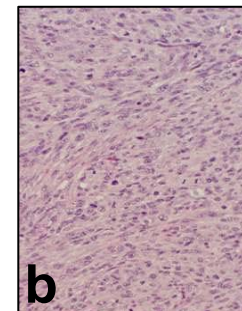
○;屠殺例、●;死亡例、★;中皮腫、☆;中皮細胞過形成
[実験 1] 対照群;異常なし、Cro群;異常なし



横隔膜～肝;腫瘍結節



表層部:
中皮様細胞の増殖



深部:肉腫様細胞の増殖

**Lung biopersistence, in-vitro dissolution and pathogenicity
of selected fibres from inhalation studies in rats**

Fibre		Biopersistence: fibres > 20 µm in length; lung clearance rates			In-vitro dissolution (k _{dis}) at pH 7.4 (pH 4.5)*	Pathogenicity (chronic inhalation)		intraperitoneal mesothelioma	IARC Cancer Classification
		Slower pool (T _{1/2})	WT _{1/2} (days)	90% clearance (T90, days)		Lung fibrosis	Thoracic		
Amosite	Asbestos	1160	418	2095	<1	+	+	+	Group 1
Crocidolite ^d	Asbestos	0	817	2770	<1	+	+	+	Group 1
MMVF32	E Glass wool	179	79	371	9(7)	+	+	+	Group 2B
RCFla ^a	Refractory ceramic	88	55	227	3	+	+	+	Group 2B
MMVF33	475 Glass wool	155	49	240	12(13)	+	+/-		Group 2B
MMVF21	Rock (stone) wool (96)	613	91	206	20(72)	+	-	+	Group 3
MMVF21	Rock (stone) wool (98)	95	67	264				+	Group 3
MMVF10 ^d	901 Glass wool (96)	0	37	123	300(329)	-	-	+	Group 3
MMVF10.1 ^c	901 Glass wool (96)	30	14.5	69		-	-		Group 3
NNVF11	Glass wool	31	9	38	100(25)	-	-	+	Group 3
NNVF22	Slag wool	35	9	37	400(459)	-	-	+	Group 3
MMVF34	HT Stone wool	24	6	19	59(620)	-	-	-	

A paradigm of particle toxicity based on biologically effective dose (BED)

- **Surface attribute** = surface area **X** specific surface reactivity
(i.e., reactivity per unit SA) **X** surface availability
- **Dimension attribute** = length + diameter (mainly length if greater than a critical length)
- **Composition attribute** = Volume **X** specific volumetric reactivity (i.e., the toxic material per unit volume) **X** availability (= release rate i.e., amount per unit time)

For acute effects

BED is related to the Potency (which can be best described as sum of above)

$$\text{Potency} = \text{Surface attribute} + \text{Dimension attribute} \\ + \text{Composition attribute}$$

For chronic effects

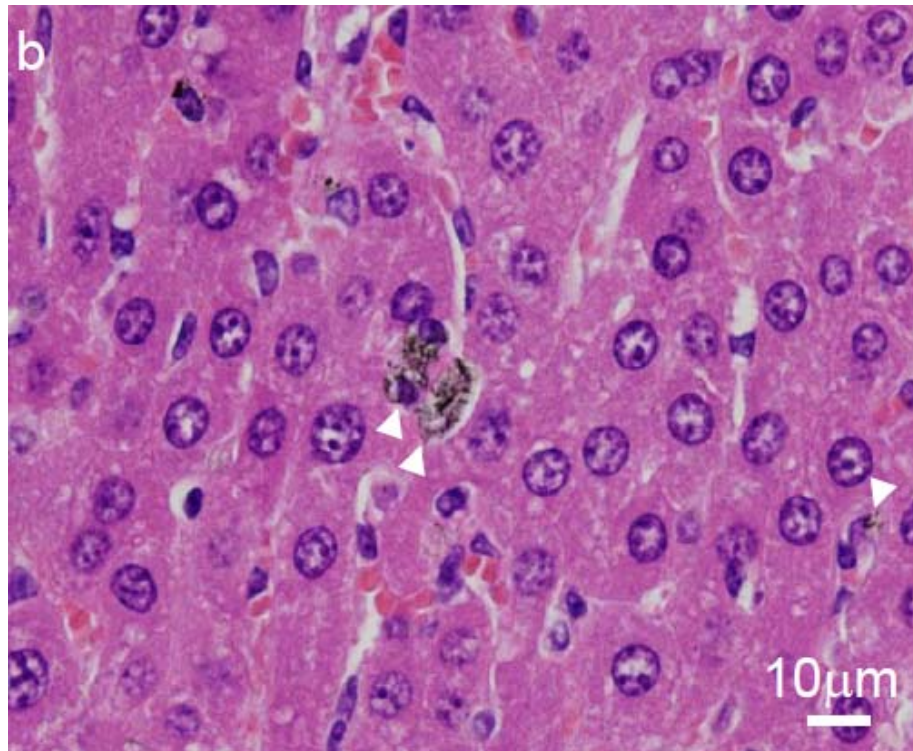
the biopersistancy play a dominant role

$$\text{BED} = \text{Bio-persistancy} \times \text{Potency}$$

腹腔内投与による研究結果の意義

- 本実験結果は、過去のアスベストやガラス繊維で認められた形状と大きさに基づく知見の法則性が、炭素を主成分とする繊維にも適用され得る可能性を示している。なお、今回の投与量は、これまでに繊維状粒子の発がん性を調べた報告で投与された繊維数の範囲の上限にあたる。現在、用量依存性実験(1/1000~1/10)を追加実施中である。
- 本結果のヒトへ外挿を検討する際に注意すべき点として、齧歯類(最長2年程度)で発がん性を発揮する繊維状粒子物質でも、ガラス繊維の如く体内での変性、分解、或いは排泄が、アスベストと比較して相対的に早いものでは、ヒトにおける発がん性は著しく低いか、殆ど認められないと報告されていることが挙げられる(ヒトで発がん性を発揮するには20年~30年以上、繊維状粒子として残存する必要があるとされる)。従って10年単位の長期間生体内運命を明らかにすることも重要な研究である。
- 尚、今回の実験条件では中皮腫発生等の影響が強いことから、バルク検体に含まれる短い繊維状粒子やさらに小さいナノサイズ微粒子成分による影響に関しては、その影響の有無を把握するに至らず判断できない。必要に応じて、ナノサイズ微粒子のみから成る検体等について別途検討することが推奨される。

**Hepatic sinusoids 肝臓内類洞
(MWCNT)**



Serosa 腹膜の漿膜 (fullerene)

