

カーボンナノチューブ等ナノ物質の健康影響に関する調査研究

小縣 昭夫^a, 木村 圭介^b, 藤原 卓士^b, 齋藤 育江^a, 大貫 文^a, 大久保 智子^a, 小杉 有希^a, 富士栄 聡子^a, 鈴木 俊也^a, 前野 智和^a, 坂本 義光^a, 高橋 省^a, 不破 達^a, 藤谷 知子^a, 山本 行男^a, 中川 好男^a, 田山 寿美子^a, 田山 邦昭^a, 田中 豊人^a, 多田 幸恵^a, 吉田 誠二^a, 安藤 弘^a, 久保 喜一^a, 長澤 明道^a, 湯澤 勝廣^a, 高橋 博^a, 矢野 範男^a, 植松 洋子^b, 牛山 博文^b, 栗田 雅行^c, 猪又 明子^a, 保坂 三継^a, 中江 大^a

本重点研究は、開発とその応用が急速に進んでいるが、未だ生体への有害性評価が明らかでないナノ物質に対して、分析技術の開発とその開発した技術を用いて生活環境中の実態調査を行い、ナノ物質の存在実態を調べることで、また、実験動物や培養細胞を用いてナノ物質の生体に対する有害性情報を集積することで、生活環境中でのナノ物質のリスクを総合的に評価することを目指した先行的調査研究である。

食品や化粧品に含まれているナノ物質の実態調査と分析法の開発及び環境中（大気、室内、水）に存在するナノ物質の分析法の開発と実態調査、さらにナノ物質の生体への影響を実験動物や培養細胞を用いて検討した。開発した分析法を用いてナノ物質の存在実態を調査したが、現時点では、ナノ物質が生活環境中に多量に存在していることはなかった。一方、ナノ物質の生体影響については、多層カーボンナノチューブ（MWCNT）の中皮腫誘発作用や催奇形性などを明らかにした。

キーワード：ナノ物質、食品、化粧品、大気環境、室内環境、水環境、生体影響、実験動物、培養細胞

はじめに

物質がナノサイズ化されることにより顕れる特性を利用・応用した我が国のナノテクノロジー研究の技術開発は、欧米を凌ぐものがある。一方、ナノ物質がそのような特性を持つことによって健康や環境等、社会に及ぼしうる影響に関する我が国の研究は、欧米に比べ遅れており、ようやく緒についたところである。ナノ物質の中には、既に、化粧品、健康食品、スポーツ用品等、暮らしの中で使用されているものもあり、健康への影響を懸念する声も出ている^{1,2)}。

当センターは、「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」に関し国と研究協力する過程で、ナノ物質の一つである多層カーボンナノチューブ（MWCNT）がラットに中皮腫を誘発することを発見し報告した³⁻⁵⁾。その際、平成20年度に環境保健部の課題研究として「カーボンナノチューブ等ナノ物質の環境実態調査及び生体影響に関する調査研究」を立ち上げたが、食品・医薬品・化粧品等各分野でナノ物質を利用した生活関連の製品はその後年々増加している。以上の状況に鑑み、センターの役割である都民の安全・安心を科学的根拠に基いて担保することを果すためには、生活の中で既に使用されているナノ物質につ

てその安全性を総合的に評価することが必要と考え、食品および医薬品分野と協力し、平成21-23年度にかけて、重点研究として新たに研究計画を作成した。今回は、重点研究の終了に伴い、これまでに得られた成果について報告する。

本研究は、(1)製品中（化粧品、食品等）に含まれるナノ物質の存在状態や含有量についての定量分析法の検討、(2)環境中（大気、室内、水）に存在するナノ物質の測定法の検討と実態調査、(3)カーボンナノチューブ（CNT）等ナノ物質の生体内挙動および生体影響の特定・確認の3つに分類して行った。なお、本報告書では、各実験の主な結果を中心にその成果の概要を記述することとし、各試験方法や詳細な実験結果については発表実績として掲載した。

成 果

1. 製品中（化粧品、食品等）に含まれるナノ物質の存在状態や含有量についての定量分析法の検討

ある種のナノ物質は、すでに化粧品や健康食品等、製品として流通しているが、それらのナノ物質が製品中にどのように用いられ、どのような状態で存在しているのか（ナノサイズ化しているのか）、また、どの位の量が使用されているのか等の情報がほとんど明らかとされていない。こ

^a 東京都健康安全研究センター薬事環境科学部
169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

^b 東京都健康安全研究センター食品化学部
169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

^c 東京都健康安全研究センター企画調整部健康危機管理情報課
169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

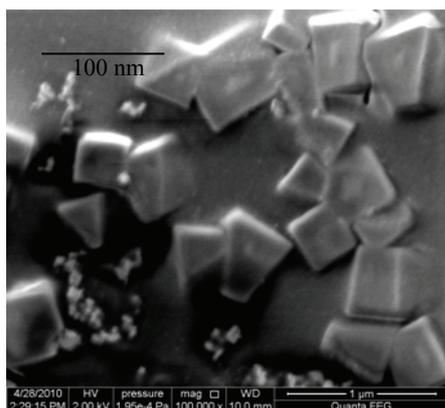


Fig.1 走査電子顕微鏡によるナノサイズ化白金の確認

ここでは、製品中に含まれるナノ物質の存在状態や含有量について、電子顕微鏡による観察および定量分析法の検討を行った。

1) 食品中のナノ物質の実態調査と分析法の開発

店頭やネット通販などで販売されている健康食品のうち、ナノ物質を含有していると思われる食品をリストアップし、含有されているナノ物質の種類、食品の種類、使用形態などの調査を行った。

その結果、市販健康食品には、ナノサイズ化したプラチナ（白金）や金、カルシウム等をコロイドもしくは微細粒子として含有していることが推察された。また、食品の種類別では、カプセル剤や錠剤、顆粒等の形状をした健康補助食品（サプリメント）が多く、清涼飲料水様の飲料も若干市販されていた。これらのナノ物質の使用形態は、単独、もしくはヒアルロン酸やグルコサミン等他の成分とともに用いられていた。

調査の結果、ナノサイズ化した白金を含んでいると標榜している健康食品が大多数を占めていたことから、ここでは白金の分析法について電子顕微鏡による定性分析と元素分析装置（ICP）を用いた定量分析について検討することとした。

(1) 電子顕微鏡による定性分析

標準物質としてナノサイズ化した白金を購入し、高真空

タイプの走査型電子顕微鏡を用い、標準物質の白金の形状の観察や元素分析装置による元素組成の確認法について検討した。形状の確認では100 nm程度の粒子が観察された（Fig.1）。

(2) 元素分析装置（ICP）による定性・定量法の開発

ICPによる元素分析では、測定対象位置のずれにより、標準物質と異なる元素組成となる現象が認められた。そこで、機器の調整を精密に行った後、測定したところ、白金を確認することができた。

市販ナノ物質含有健康食品のうち、ナノサイズ化した白金を使用したものを中心に、15品目の健康食品を購入した。購入した15品目のうち、ナノサイズ化した白金を使用していると表示されている飲料水や軟カプセル剤など11品目について、ICPを用いて白金の含有量を測定した。その結果、11品目中、5品目から白金を検出した。その検出量は0.02～0.49 $\mu\text{g/g}$ で、この検出量は表示に対して26～54%であった。これらの結果、表示量より低めではあるが、健康食品中の白金を分析することは可能となった。なお、23年度に再度ナノサイズ化した白金を含有した健康食品について流通状況を調査したところ、1品目のみ販売されており、市中ではナノ白金含有食品の流通が激減していることが判明した。

2) 化粧品に使われるナノ物質の生体試料中からの分析法の検討

機能性向上を目的とした化粧品へのナノテクノロジーの応用として、超微細粒子化した酸化チタンや酸化亜鉛等のナノ物質が、紫外線遮蔽のほか、肌の美白化や透明感向上の目的で日焼け止めやファンデーション等の化粧品に配合されている。一方、超微細粒子化したことで、ナノ物質が皮膚から吸収され、毒性を発現する可能性を危惧する報告もあり、安全性についての評価は定まっていない。ここでは、化粧品原料としてのナノ物質の使用実態を調査するとともに、化粧品に含有されるナノ物質の定量法並びに存在状態の観察手法の検討及び生体試料中からのナノ物質の分析法について検討することとした。

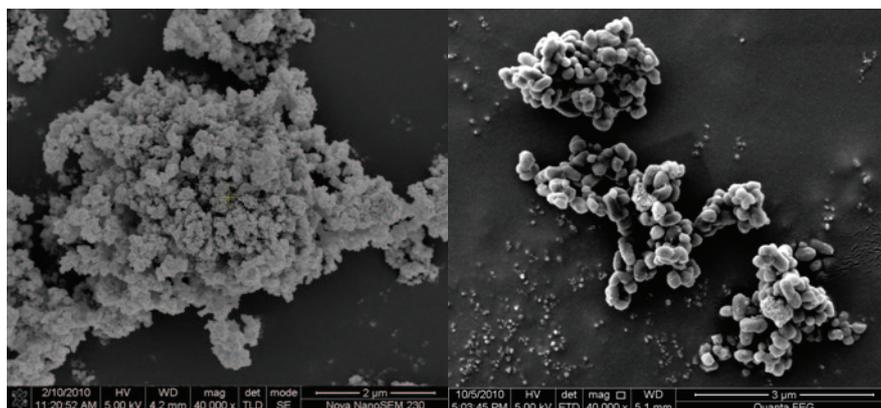


Fig 2 走査電子顕微鏡によるナノサイズ化酸化亜鉛（写真左）と酸化チタン（写真右）の確認

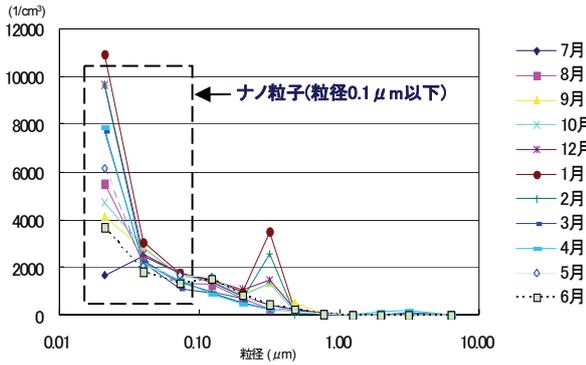


Fig.3 大気浮遊粒子の月別変動
(大気中浮遊粒子はナノサイズのものが多く)

(1) 電子顕微鏡による観察手法の検討

酸化亜鉛, 酸化チタンのナノ物質について, 走査型電子顕微鏡による観察手法の検討を行った. 被験物質の物性変化を抑えるため, 観察条件はその表面を金など導電性物質で覆わない手法(ノンコート)とし, 電子顕微鏡の操作パラメータを模索しながら観察を行ったところ, 1次粒子は十数nmの粒径で測定出来, 凝集して出来る2次粒子の形状に差異があることがわかった (Fig.2).

(2) 生体試料中ナノ物質の微量分析

化粧品に含まれるナノ物質の皮膚透過の有無あるいはその状況をあきらかにするため, 皮膚透過試験を想定した ICP/MSによる血液中の酸化チタンの微量分析を検討した.

チタンの標準溶液の分析において, ICPによる検出ではほぼ1 μg/mL程度のレベルを検出できていたが, ICP/MSの利用により, 1 ng/mL程度までの微量のチタンを検出することができた. 酸化チタンはICP/MS分析に通常使われる硝酸だけでは不溶であるため, 溶解方法を検討した. 直径20 nmの酸化チタンナノ粒子に硝酸および水素酸を加え,

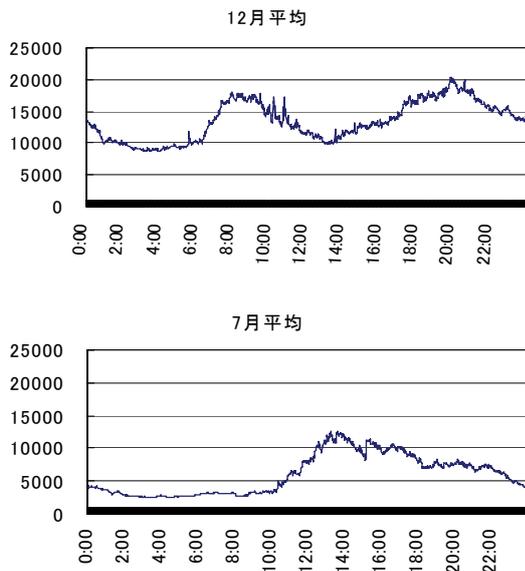


Fig.4 大気中ナノ粒子の日内変動
(日内変動は冬季(二峰性)夏季(一峰性)で異なる)

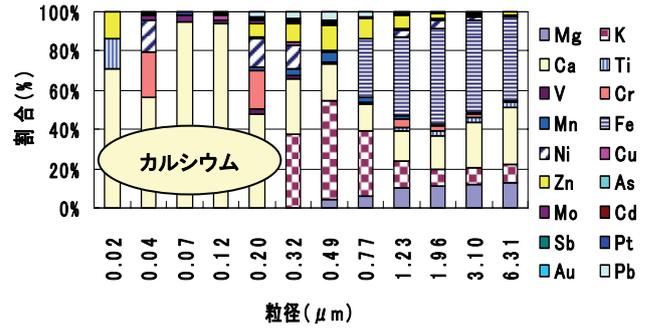


Fig.5 大気浮遊粒子に含まれる金属成分の分析
(ナノ粒子と最も相関の高い金属はカルシウム)

200°Cで加熱溶解して濃縮を行った後, 硝酸で希釈して測定することで, 良い回収率が得られた. 次に, ラット血液に同じ酸化チタンナノ粒子を添加し, 前処理法の検討を行った. 皮膚透過試験に適用するには, 正常ラット血液中にバックグラウンドとして存在するチタンの影響を抑える必要がある. 検討の結果, 塩酸処理法が, 簡便で回収率が良いことがわかった

2. 環境中(大気, 室内, 水)に存在するナノ物質の測定法の検討と実態調査

1) 大気環境中ナノ粒子の濃度, 粒径分布等の測定

年間を通して毎月2週間, 大気中浮遊粒子の粒径分布を調査したところ, ナノ粒子の個数濃度は全体の65~85%を占めていることがわかった (Fig.3). また, 季節別では, ナノ粒子の個数濃度は夏期よりも冬期に高く, 日内変動については, 夏期は日中13時半頃に高い1峰性, 冬期は8時及び20時ころに高い2峰性の変動パターンを示した (Fig.4). 粒子中の金属成分を測定したところ, ナノ粒子中の含有割合が最も高かった金属はカルシウムであった (Fig.5). さらに, 大気中フラーレン測定法を確立し, 調査したところ, 年間を通してフラーレン濃度は定量下限値 (C60 : 2.5 pg/m3, C70 : 10 pg/m3) 未満であった⁶⁻⁸⁾.

2) 室内環境中のナノ粒子等について

チタン, 銀等を含有する化粧品等について, 使用時に発生する粒子を調査したところ, 個数濃度では, スプレー製品(制汗スプレー等4種)は粉状製品(ベビーパウダー等4種)よりも平均で約6千倍濃度が高かった. 粒径分布では, 粉状製品は粒径2.4 μm以上の粒子が全体の68~90%であったのに対し, スプレー製品は粒径0.26 μm以下の粒子が全体の67~92%を占めていた (Fig.6).

粒径別の成分分析結果では, スプレー製品に含まれる金属は, 粒径1 μm以上の粒子に98%以上が分布しており, 個数濃度の高かった0.26 μm以下の粒子では, SEMを用いたX線分析の結果, 炭素, 酸素, ケイ素を含むオイル等が主な成分と考えられた⁹⁾.

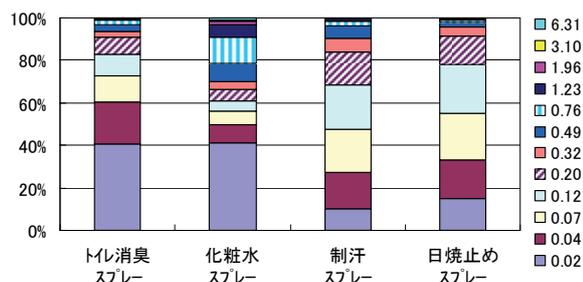


Fig.6 室内環境のナノ粒子
(ナノ粒子含有製品使用時の粒子の割合)

Table 1. ICP/MSの分析条件

ICP-MS	Agilent 7500ce
RFパワー	1500W
プラズマガス流量	15L/min
補助ガス流量	0.9L/min
キャリアガス流量	0.8L/min
メイクアップガス流量	0.22L/min
リアクションガス (水素)	4L/min
測定質量数	47(Ti)、89(Y)

3) 水環境中ナノ物質の存在実態

ここでは、(1)酸化チタン等の金属性ナノ物質について、イオン交換樹脂、フィルター、超遠心分離機等を用いた濃縮法、及びICP-MSによる水環境中の当該金属のスクリーニング法について検討し、分析法を確立すること、(2)有機系ナノ物質であるフラーレンについて、固相や溶媒抽出による濃縮法を用いLC-MS法で定量する方法を検討すること、(3)カーボンナノチューブなどについて、電子顕微鏡や光学的分析機器による測定法を検討するとともに、水中からの濃縮法について検討することとした。さらに、それらの確立した分析法を用いてナノ物質の混入が疑われる水を対象に実態調査を実施した。

(1) 酸化チタン

分析法の検討は、酸化チタンの溶解、キレート樹脂による抽出・クリーンアップ、ICP-MSによる分析条件の3項目について行った。ICP-MSの分析条件について、チタン質量数を47、コリジョン・リアクションガスは水素を使用した分析が最も適していることがわかった。酸化チタンの溶解は硫酸で行うこととし、酸化チタン1mgを使用した場合の溶解率は78-90%と良好な結果が得られた (Table 1)。

キレート抽出・クリーンアップについて、pH4-5で良好な回収率が得られ、この条件下で妨害物質も効率よく除去できることがわかった。本法での定量下限値は $0.1 \mu\text{g/L}$ 、回収率は超純水及び河川水では93%及び74%で安定していた。

ただし、水道水及びプール水ではバラツキが大きく、更に検討を重ねることが必要と考えられた¹⁰⁾。

開発したスクリーニング法を用いて、多摩川流域河川水のチタン濃度存在実態調査を行った (Fig.7)。1年に4回、多摩川本流5地点、多摩川に流入する支川4地点について調

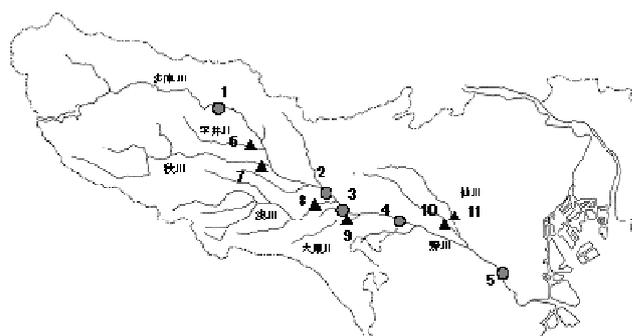


Fig.7 採水地点

○：多摩川本川 (1 羽村堰、2 日野橋、3 関戸橋、4 多摩川原橋、5 田園調布堰上)

▲：多摩川に流入する支川 (6 平井川、7 秋川、8 浅川、9 大栗川、10 野川、11 仙川)

査した結果、いずれの採水月においても下流に行くほどチタン濃度が増加する傾向にあった。また、チタン存在量が最も高いのは8月であった (Fig.8)¹¹⁾。

(2) フラーレン (C60)

水環境中のC60の分析法について検討し、¹³C-C60をサロゲート物質に用い、n-ヘキサンを抽出溶媒とした液-液抽出法とLC/MSで分離定量することにより、ng/Lレベルを精度良く分析可能な方法を確立できた。確立した水試料中のフラーレンの高感度な分析法を用い、センター水道水及び多摩川流域河川水の実態調査を行った結果、いずれの水試料においても、フラーレンは検出限界 (50 ng/L) 未満であった¹²⁾。

(3) カーボンナノチューブ (CNT)

水試料からの分別定量法として、フィルターによるろ過の後に電子顕微鏡により確認・定量する方法を確立した (Fig.9)。水道水にCNTを添加して観察を行ったところ、CNTと珪藻類や藍藻類との分別は十分に可能であることがわかった。また、この方法によりセンター水道水を調査した結果、CNTは検出されなかった¹³⁾。

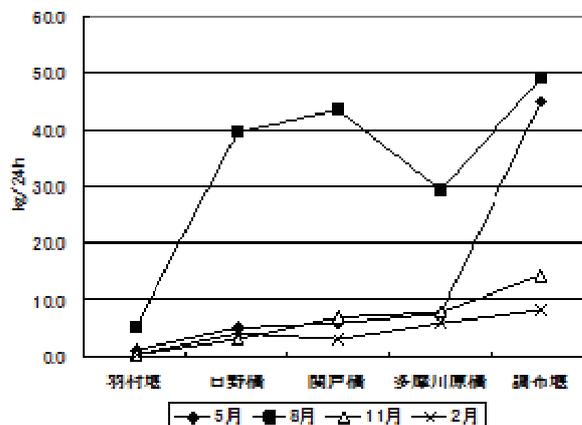


Fig.8 多摩川本川におけるチタン存在量

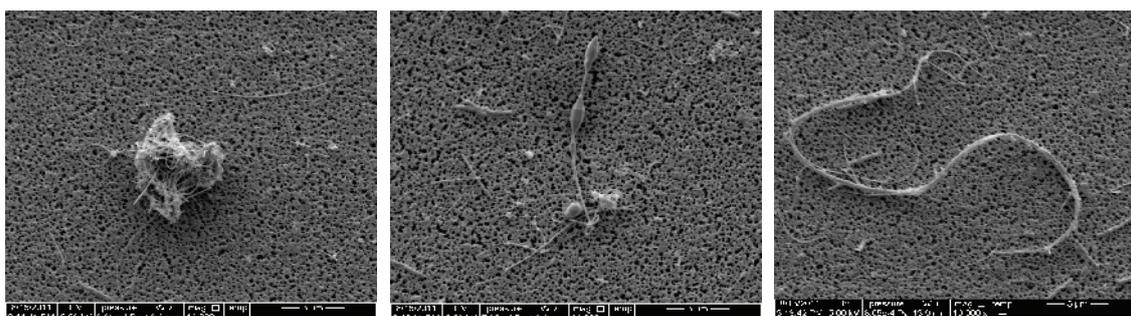


Fig.9 MWCNTを添加した水道水のSEM画像

Table 2. 個体別中皮腫増殖病変の組織所見

Treatment	Animal number	Autopsy status*	Timing of autopsy (week after commencement)	Mesothelial hyperplasia	Mesothelioma**		
					Development	Invasion	Osteoid change
Vehicle	V1-V5	all S	all 52	-	-	-	-
Crocidolite	C1-C10	all S	all 52	-	-	-	-
MWCNT	M1	M	50	+	+	+	+
	M2	D	37	+	+	+	-
	M3	D	40	+	+	+	+
	M4	D	39	+	+	+	+
	M5	S	52	+	-	-	-
	M6	M	40	+	+	+	-
	M7	D	40	+	+	+	+

*S, scheduled sacrifice; D, sacrifice after death; and M, moribund sacrifice.

**The overall incidence of mesothelioma in rats treated with MWCNT was 6 out of 7 (86%), significantly higher than those in rats treated with vehicle (0 out of 5, 0%) or crocidolite (0 out of 10, 0%) ($p < 0.05$).

Table 3. WCNTの中皮腫誘発作用と用量反応

実験群	用量 mg/kg	終了時生存率	中皮増殖性病変										
			観察例数 ^{a)}	なし	肥大	過形成	中皮腫					計	%
							+1	+2	+3	+4			
陰嚢腔内													
対照群	0	5/5	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	
Cro	1.0	10/10	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0	
MWCNT- L	0.1	12/12	12	4	7	1	0	0	0	0	0	0	
MWCNT- M	0.3	12/12	12	1	4	2	2	1	2	0	5/12	42	
MWCNT- H	1.0	12/12	12	0	0	1	3	4	2	2	11/12	92	
腹腔内投与													
対照群	0	5/5	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	
Cro	1.0	9/9	9	7	1	1	0	0	0	0	0	0	
MWCNT- L	0.1	10/11	11	0	1	3	2	1	2	2	7/11	64	
MWCNT- M	0.3	8/12	12	0	0	2	1	0	2	7	10/12	83	
MWCNT- H	1.0	5/11	11	0	0	1	1	1	0	8	10/11	91	

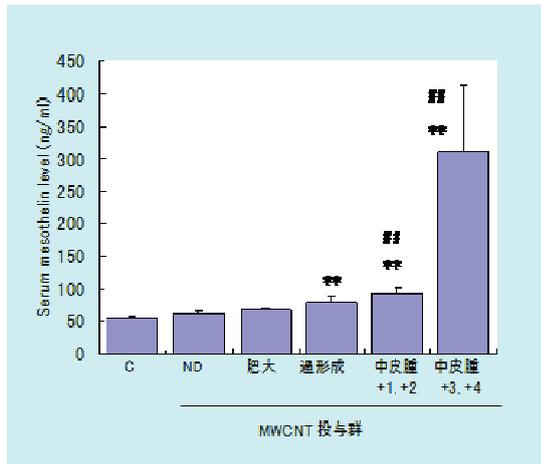


Fig.10 MWCNTにより誘発された中皮腫増殖性病変と血清メソテリン量の変化

3. ナノ物質の生体影響に関わる検討

1) 多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の生体影響

(1) MWCNTの中皮腫誘発作用

MWCNTはその形状がアスベストに類似していることから、ヒトでの健康影響が懸念されている。我々は、MWCNTの有害性評価の情報集積の始めとして、MWCNTを正常ラット腹腔内投与したときの影響について検討した。MWCNT2mg/kg及び同量のクロシドライト（アスベスト）をラット腹腔内に1回投与し、観察を行った。その結果、MWCNTはラットに中皮腫を誘発することが確認された³⁻⁵⁾。アスベストを投与したラットでは中皮腫は誘発されなかった（Table 2）。これらの結果を受けて、MWCNTの中皮腫誘発作用について用量相関性の有無の検討及び中皮腫のバイオマーカーであるERC/メソテリンの中皮増殖性病変における発現の推移について検討した。その結果、MWCNTの中皮腫誘発作用はMWCNTの用量に比例して増加することが確認され、MWCNTは中皮腫誘発作用を有することが明らかとなった（Table 3）。さらにバイオマーカーであるN-ERC/メソテリンの発現は早期の中皮増殖性病変の進展に伴って増加することがわかり、中皮腫例の早期診断及び進行判定に有用である可能性が示唆された（Fig.10）¹⁴⁻²¹⁾。

一方、MWCNTの中皮腫誘発作用は、MWCNTのサイズ（長さ）の違い、あるいはMWCNTに含まれる鉄の含有量による、などの報告がなされている。我々は性状の異なる（長さ）と鉄含有量）5種のMWCNTについて中皮腫発現の差異について検討した。その結果、中皮腫の発現には、一定のサイズの繊維の存在が関連していると考えられた。また、鉄含有量は、一定の長さのある繊維どうしでは、中皮腫発現に関連する可能性も示唆され、その一方で、鉄含有量が一定程度あっても、サイズが短い粒子状の場合、中皮腫の発現にはつながらないものと考えられた²²⁻²⁵⁾。

ここまで述べてきた実験の成果は、いずれも正常ラットの腹腔内投与において得られたものである。MWCNTのヒトでのばく露経路を考えたとき、最も可能性のあるばく露経



Fig.11 肝臓溶解後に認めたMWCNT

路は吸入によるばく露であると想定される。そこで、我々は、MWCNTのラット経気管投与実験を行っている。この結果については、まだ報告の段階でないため、ここでは省略する。

(2) MWCNTの体内動態

生体内に入ったMWCNTがどのような挙動をとるのかについては良く知られていない。我々は、ラットに気管内投与したMWCNTの生体内挙動について、電子顕微鏡を用いて検討することにした。肺におけるMWCNTの沈着はもちろんであるが、胸部リンパ節でのMWCNTの沈着が目立って認められた。また、肝を細切、強アルカリにて溶解、その残渣について透過型電子顕微鏡にて観察したところ数は少ないがMWCNTの存在を認めた（Fig.11）。このことは、肺に入ったMWCNTがリンパ行性に体内に取り込まれ、その後、血流を介して肝まで到達していることを示唆している。従って、MWCNTは血流を介して、体内をめぐっていることが考えられた。上記の電顕観察は透過型電子顕微鏡を用いたものであるが、透過型電子顕微鏡による観察は、観察視野が狭く、時間が掛かり、効率が悪い。一方、走査型電子顕微鏡は、観察視野が広く、観察確度も高い。また、操作性も容易であることから、多くの試料を効率良く観察することが可能である。今回、新たに導入した走査型電子顕微鏡を用いて、他臓器においてMWCNTを吸入ばく露させたマウスから摘出した臓器6種（肝臓、嗅球、脾臓、肺、脳、腎臓）について調べた結果からは、各臓器におけるMWCNTは観察できなかった^{1,26)}。

(3) MWCNTの中皮腫誘発作用発現機序

ここではMWCNTの中皮腫誘発作用の発現機序解明に向けた、免疫学的、生化学的、分子生物学的手法を用いた生体影響について検討した。

a. 免疫学的検討

2%CMCNaに懸濁した2 mg/kg MWCNTをICRマウス腹腔内に単回投与し、2日、1, 2, 4, 20週間後に血中の白血球、リンパ球、単球、顆粒球を測定した。対照としてCMCNaのみ、カーボンブラック（CB）、クロシドライト（Cro：アスベスト）を投与した。また、同時に活性化されると発

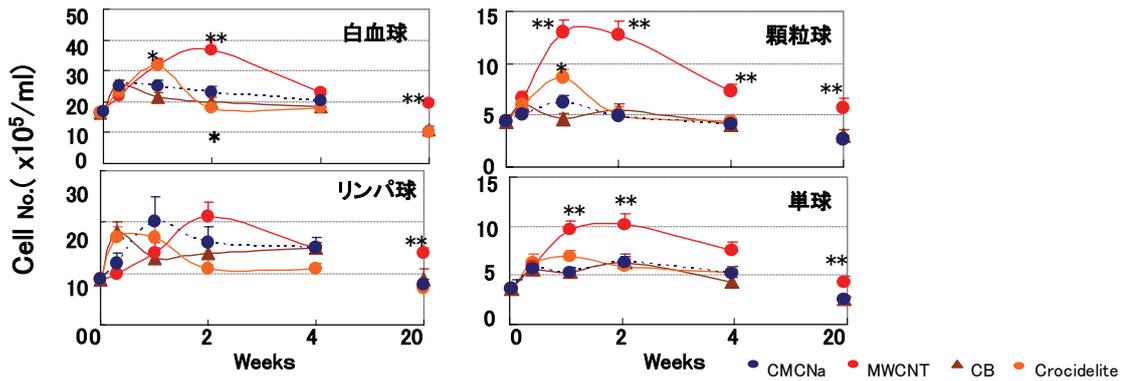


Fig.12 MWCNT, CB, Crocidelite (2 mg/kg) 投与後の血中の白血球, 単球, 顆粒球, リンパ球数

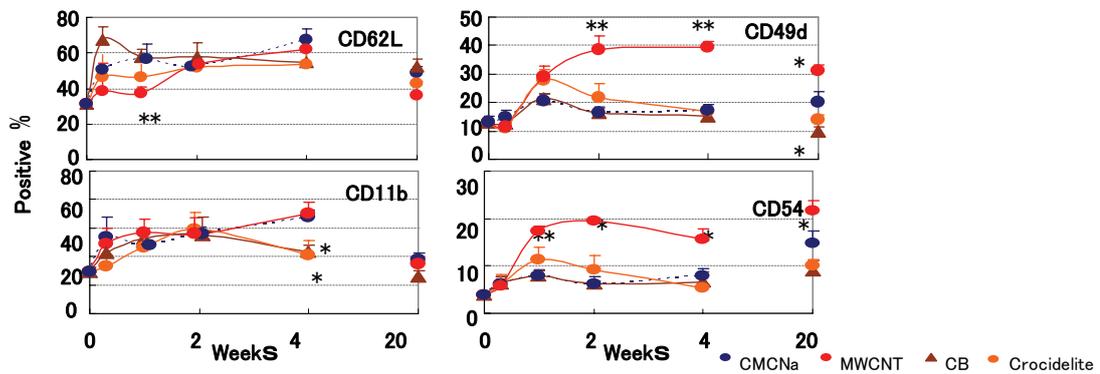


Fig.13 顆粒球上の接着性蛋白の発現量 (MWCNT, CB, Crocidelite (2 mg/kg) 投与後)

現する白血球上の接着分子を測定した。MWCNT投与後、白血球、単球、顆粒球とも1週から増加し、20週後もCMCNaより有意に増加していた (Fig.12)。接着分子は顆粒球のCD49dが1-20週で増加、CD54が1-2週で増加していた。CBでは変化は少なく、Croでは1週間後に白血球、単球、顆粒球が増加したがその後低下した。MWCNTは生体内に入った時には炎症・免疫系への影響が、CBやCroよりも強く、その影響は長く持続することが示唆された (Fig.13)。

MWCNTが抗体産性能に及ぼす影響について、検討した。T細胞依存性のIgMとIgG抗体産生は増加したことから、MWCNTがT細胞を介した免疫機能を亢進していることが示唆された。腹腔細胞中のいくつかのサイトカイン・ケモカイン・mRNAも著しく増加した。Th2サイトカイン：IL4 (2-20週で)、IL5, IL13 (2-20週で)、Th17サイトカイン：IL17と炎症性サイトカイン：IL1b, IL33MCP-1は2-34週で、Th1サイトカイン：IL2, IFN γ , は遅れて10-34週で増加していた。MWCNTはマクロファージなどに貪食されて、自然免疫系を活性化、炎症反応を促進するIL1bやIL33を分泌し、分泌されたIL1bやIL33はTh2 cell, mast cell, 顆粒球に働きTh2サイトカイン産生促進、Th2サイトカインは抗体産生を誘導、単球・顆粒球の分化と遊走を促進して、免疫・炎症反応を亢進させていることが考えられた。生体内に入ったMWCNTは、貪食されるが排出・隔離・封じ込ま

れないため、免疫・炎症系への亢進が長期にわたって継続することが示唆された²⁷⁻²⁹⁾。

b. 生化学的検討

MWCNTによる過酸化水素からのヒドロキシルラジカル発生能を測定した。MWCNTは対照の2.6倍のヒドロキシルラジカルを発生させた。一方、フラーレンの発生能は対照と同等であった。この反応は鉄のキレート剤により完全に阻害されたので、MWCNTに少量混在する鉄によって行われていることが示唆された。MWCNTをマウスに腹腔投与すると腹腔洗浄液中の過酸化脂質濃度が急性的に上昇し急性炎症も惹起した (Fig.14)。この作用は、MWCNTに混在するレベルと同量の鉄のみの投与によっては惹起されなかった。

MWCNTをマウスに5mg/kgの用量で腹腔内投与して死亡した動物では中皮腫はないが肉腫等が多く認められた。MWCNTを雌ラットに0.5 mg/kgの用量で腹腔投与すると中皮腫が発生した。同時投与した酸化防止剤は中皮腫発生率に影響がなかった³⁰⁾。

c. 分子生物学的検討

MWCNT投与後20週において採取したラット血清中の蛋白質をコントロールと比較検討した。

①コントロールに対して、幾つかの特異スポットを検出した。また、各グループ間 (A社製, B社製) のサンプルにおいて、発現量が変化しているスポットを検出した。

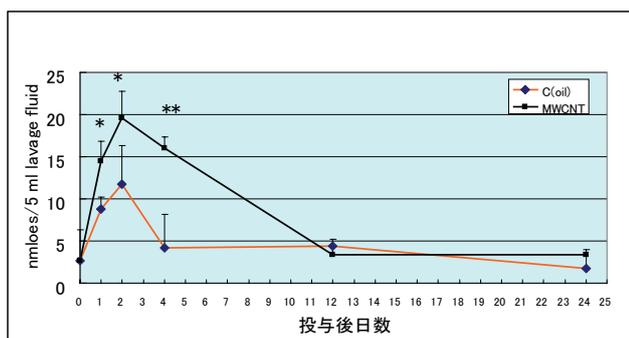


Fig.14 腹腔内過酸化脂質量

②液体クロマトグラフィー/質量分析 (nanoLC/MS) により、ナノ粒子による影響生体物質として、いくつかの蛋白質 (C reactive protein, Ubiquitin carboxyl terminal hydrolase (EC 3.1.2), Apolipoprotein A1, Urotensin II receptor (URIIR), G protein coupled) が候補物質として同定された。MWCNT腹腔内投与後、中皮腫発現が顕著でなかった20週目の血清では、特定蛋白質の変動は認められなかった。中皮腫の発現及び進展の程度が顕著であった投与後40-44週目では、抗酸化作用、物質輸送、蛋白質分解酵素調節、炎症調節等に関与している蛋白質の変動を認めた (Fig.15) ^{31,32}。

(4) MWCNTの催奇形性作用

MWCNTの発がん性以外の生体影響を調べることを目的として、妊娠動物への影響について検討した。

妊娠9日目の雌マウスにMWCNTを2-5 mg/kgの用量で腹

腔内投与すると、周産期の胎仔に四肢減形成や短尾・無尾などの奇形が観察された。そこで、ヒトでのばく露が想定される気管内投与を行った。マウスに3-5 mg/kgの用量でマ気管内投与すると、腹腔内投与で認めたと同じ四肢減形成や肋骨・脊椎の癒合などの催奇形性が認められた

(Fig.16)。しかし、気管内投与では、腹腔内投与時と比べ、奇形発現頻度は低値であった。中皮腫誘発作用はサイズの異なるMWCNTで差があったため、催奇形性についてもサイズの違いにより誘発の有無に差があるのか調べるため、繊維長の短いMWCNTを腹腔内投与で比較したところ、催奇形性が認められたが、奇形発現頻度は弱いことが判明した。さらに、アスベストと類似の形状をしているところから、アスベストについても腹腔内投与で催奇形性について調べた。MWCNTで奇形を誘発すると同量の各種アスベスト (クロシドライト、クリソタイル、アモサイト) を投与したが、催奇形性は認められなかった^{33,34}。

(5) MWCNTの染色体異常誘発性

MWCNT 0.25-5 mg/kgの間に5段階の用量をチャイニーズハムスターに腹腔投与後、経時的に骨髓細胞を採取し、染色体異常誘発性を調べたが、いずれの用量および処理時間においても異常は認められなかった。

SLC系ラットにMWCNT 0.25, 0.5, 1.0 mg/kgを気管内1回投与し、24時間後に大腿骨より染色体標本を作製、染色体分析を行った。結果は、いずれの用量においても染色体異常細胞の増加は見られず、本実験条件下においては染色体異常誘発性は無いものと思われた。

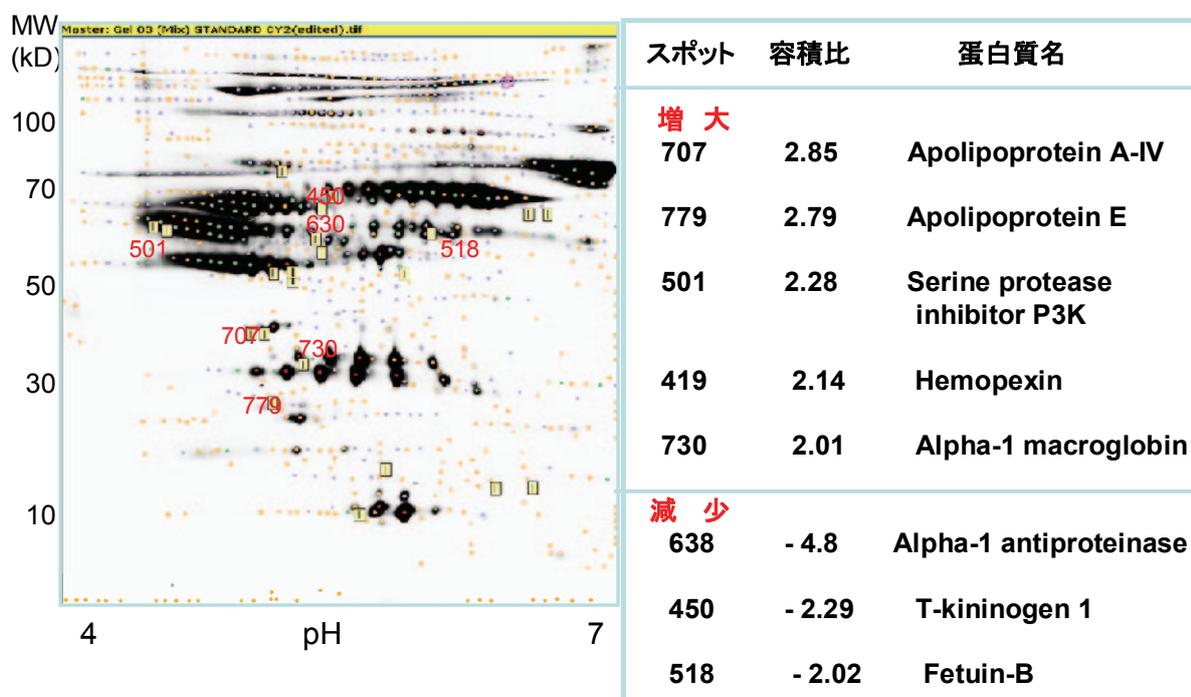


Fig.15 MWCNT投与によるラット血清中の発現変動蛋白質の同定

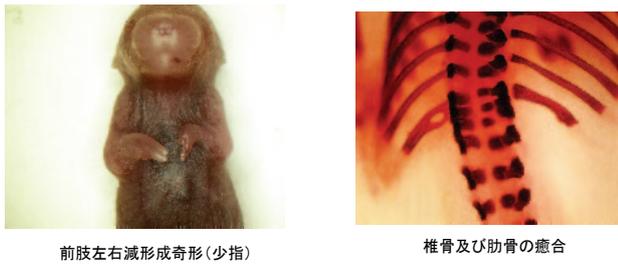


Fig.16 MWCNT4mg/Kg 妊娠9日 単回気管内投与

2) ナノチューブ以外のナノ物質の生体影響

(1) フラーレン (C60) の生体影響

フルラーレン (C60) は、最小の構造が多数の炭素原子で構成される集団の総称で、C60は最初に発見されたフルラーレンで炭素原子60個を持つサッカーボール状の構造をしている。電子材料、医薬、化粧品、潤滑剤などへの応用が考えられている。ここでは、C60及びその水酸化誘導体のラット肝細胞に及ぼす影響をin vitro実験系で調べた。

C60水酸化誘導体はC60より毒性が強く、濃度及び時間に依存した細胞傷害を惹起した。細胞死はミトコンドリア機能の低下、活性酸素種の産生、グルタチオンの枯渇及び脂質過酸化などを伴っていた。C60及びその水酸化誘導体 [C60(OH)12, C60(OH)24] のラット遊離肝細胞に対する毒性を比較すると、その作用は水酸基の数が多いほど増強した (Fig.17)。その発現機序として、標的部であるミトコンドリアの機能障害や細胞内における酸化ストレスの誘導が考察された³⁵⁾。

(2) 白金ナノコロイド (C-Pt) の生体影響

白金ナノコロイド (C-Pt) は、我々が行った実態調査で健康食品に利用されていることがわかっている。ここでは、C-PtのCHO-K1細胞に対する染色体異常誘発性および姉妹染色分体交換誘発性を調べた。C-Ptは200 μ Mの濃度で統計学的に有意な姉妹染色分体交換を誘発したが、DNA断片化及び染色体異常は誘発しなかった。また、C-Ptは、過酸化水素による細胞毒性および染色体異常誘発を完全に抑制したが、過酸化水素による姉妹染色分体交換誘発に対する効果は認められなかった。さらに一部のフェノール性化合物による細胞毒性やDNA断片化を増強することがわかった。そこでフェノール性化合物との増強及び抑制作用について検討を行った。その結果、C-Ptは0.5-2.5%の濃度で、濃度依存性にオルト及びパラアミノフェノールのDNA断片化作用を強めた。しかしメタアミノフェノール及びフェニレンジアミン類にはその作用は見られなかった。

総 括

今回、3年間という与えられた研究期間内では多くのナノ物質について検討することはできなかったが、分析法の開発や実態調査については、当初、考えていたほどナノ物質が生活環境中に多く存在しているという事実は確認できなかった。しかしながら、ナノ物質製造者等の作業環境

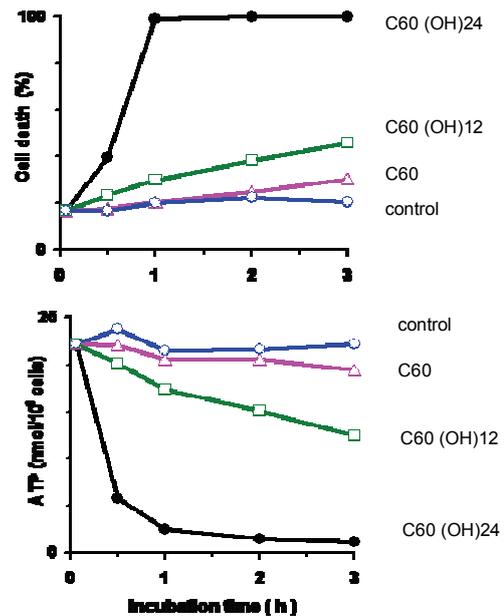


Fig.17 フラーレン (C60) 及びその水酸化誘導体のラット肝細胞に及ぼす影響

中のばく露に関しては、調査ができず、今後のリスク評価を行うためには必要な検討課題の一つと考えられる。一方、中皮腫を誘発する多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の生体影響に関しては、一定の成果を得たと考えている。我々が得た結果からは、MWCNTの中皮腫誘発性の問題は長期体内残留による慢性影響研究の重要性を示すとともにリスク評価を行うためのその発現メカニズム解明の必要性や上述したように、職業ばく露による実態調査が必要であることが本研究成果から考えられた。MWCNTの中皮腫誘発性に関しては多くの情報が集積されつつあるが、今回初めて報告した催奇形性の報告のように、発がん性以外のMWCNTの有害性についての情報は不十分であり、取分けMWCNTの生殖毒性や神経系への影響に関する情報が今後集積していかなければならない課題として残っている。

また、MWCNT以外のナノサイズ化された物質の有害性同定は始まったばかりであり、今後の大きな課題である。ナノサイズ化された物質の毒性メカニズムはこれまでの毒性学的手法だけでは同定・解析できない可能性を含んでいる。分子毒性学など最先端の研究手法を取り入れていくことが必須の要因となることも想定される。

国は我々のMWCNTの催奇形性が発表された後、ナノ材料の安全性について調査することを発表した。国との連携も取りながら、更なるナノ物質の有害性情報を集積していくことが必要と考える。

一方、近年「フードナノテクノロジー」や「ナノフード」といった言葉が欧米で生み出されている。これは微細加工技術や微粒化技術を用いることによって、より少ない量で高い栄養価を得る技術の開発や、長期保存や輸送の観点で重要となる包装材の高いバリア性能や、センサ技術による味や匂い、有害成分の検出技術などのナノテクノロジー

の応用を期待したものであるが、その安全性についての対策もこれからの課題と考える。

発表実績

- 1) 小縣昭夫：ナノマテリアルとナノテクノロジー 都薬雑誌, **31**(1), 29-34 2009
- 2) 広瀬明彦, 他：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 平成18年度～20年度 総合研究報告書 厚生労働省 化学物質リスク研究事業
- 3) Y. Sakamoto, D. Nakae, N. Fukumori et al.: Induction of mesothelioma by a single intrascrotal administration of multi-wall carbon nanotube in intact male Fischer 344 rats. *J.Toxicol.Sci.* **34**(1), 65-76, 2009
- 4) 坂本義光, 福森信隆, 上原眞一, 他：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 第35回日本トキシコロジー学会学術年会要旨集 2008年6月, 東京
- 5) 坂本義光, 中江 大, 福森信隆, 他：ラットにおける多層カーボンナノチューブによる中皮腫の誘発 第25回日本毒性病理学会講演要旨集, 2009年1月 浜松
- 6) 齋藤育江, 大貫 文, 栗田雅行, 他：大気中ナノ粒子の季節変動及び日内変動, 第50回大気環境学会年会講演要旨集, 横浜, 2009年9月
- 7) 齋藤育江, 大貫 文, 栗田雅行, 他：大気浮遊粒子中の粒径別 (7 nm～10 um) 金属濃度 第50回大気環境学会年会講演要旨集, 横浜, 2009年9月
- 8) 大貫 文, 齋藤育江, 保坂三継, 他：大気中フラーレンC60の測定 東京都健安研セ年報, 61, 227-232, 2011.
- 9) 齋藤育江, 大貫 文, 前野智和, 他：スプレー製品から発生する粒子の粒径及び成分の分布 平成23年度室内環境学会学術大会講演要旨集, 2011年,
- 10) 小杉有希, 鈴木俊也, 富士栄聡子, 他：ICP-MSによる水中の酸化チタンの分析, 日本薬学会第129回年, 京都市, 2009年3月
- 11) 小杉有希, 鈴木俊也, 富士栄聡子, 他：多摩川流域における水中チタンの存在実態, 第48回全国衛生科学技術協議会年会要旨集 長野市, 2011年
- 12) 富士栄聡子, 小杉有希, 鈴木俊也, 他：水試料中のフラーレンの分析法, 第48回全国衛生科学技術協議会年会要旨集, 長野市, 2011年
- 13) 鈴木俊也, 前野智和, 小杉有希, 他：水環境中のカーボンナノチューブの分析法, 第48回全国衛生科学技術協議会年会要旨集, 長野市, 2011年
- 14) Sakamoto, Y., Nakae D., Ogata A., et al : Serum ERC/mesothelin level in rats with mesothelial proliferative lesions induced by multi-wall carbon nanotube. *J.Toxicol.Sci.*, **35**, 265-270, 2010
- 15) 坂本義光, 中江 大, 佐藤かな子, 他：多層カーボンナノチューブ (MWCNT) で誘発したラット中皮増殖性病変におけるERC/mesothelinの発現, 第36回日本トキシコロジー学会学術年会講演要旨集, 盛岡, 2009年7月
- 16) 坂本義光, 中江 大, 小縣昭夫, 他：多層カーボンナノチューブで誘発したラット中皮増殖性病変におけるERC/mesothelinの発現, 第68回日本癌学会学術年会要旨集, 横浜, 2009年10月
- 17) 坂本義光, 中江 大, 小縣昭夫, 他：無処置ラットにおける血清N-ERC/mesothelinレベルの系統差, 性差及び年齢差, 第26回日本毒性病理学会学術講演要旨集, 金沢, 2010年2月
- 18) 坂本義光, 中江 大, 佐藤かな子, 他：ラットにおける多層カーボンナノチューブ (MWCNT) による中皮腫の誘発の用量相関性と血清ERC/mesothelinレベルの増加, 第37回日本トキシコロジー学会学術年会要旨集, 沖縄, 2010年6月
- 19) 中江 大, 坂本義光, 小縣昭夫, 他：多層カーボンナノチューブの発がん性など, ナノ材料の安全性評価の試み (第25回発癌病理学会, 宮城, 2010年8月)
- 20) 坂本義光, 中江 大, 佐藤かな子, 他：ラットにおける多層カーボンナノチューブ (MWCNT) による中皮腫の誘発の用量相関性と血清ERC/mesothelinレベルの増加, 第69回日本癌学会学術講演会要旨集, 大阪, 2010年9月
- 21) 坂本義光, 中江 大, 小縣昭夫, 他：ラットにおける多層カーボンナノチューブ (MWCNT) による中皮腫の誘発の用量相関性と血清ERC/mesothelinレベルの増加, 第27回日本毒性病理学会学術講演要旨集, 大阪, 2011年1月
- 22) 坂本義光, 小縣昭夫, 前野智和, 他：2種の多層カーボンナノチューブ (MWCNT) のラット腹腔内投与による中皮腫の誘発 (第38回日本トキシコロジー学会学術年会要旨集, 2011年7月, 横浜)
- 23) 坂本義光, 小縣昭夫, 中江 大, 他：ラットにおける多層カーボンナノチューブの発がん性に対して製品レベルの物理化学的性質が及ぼす影響, 第70回日本癌学会学術総会講演要旨集, 2011年10月, 名古屋
- 24) 坂本義光, 小縣昭夫, 前野智和, 他：ラットのよる5種の多層カーボンナノチューブの腹腔内中皮腫誘発性に関する検討 第39回日本毒性学会学術集会抄録集 2012年7月 仙台
- 25) 坂本義光, 小縣昭夫, 西村哲治, 他：5種のカーボンナノチューブ (MWCNT) のラット腹腔内投与による中皮腫誘発 第71回日本癌学会学術集会抄録集 2012年9月 札幌
- 26) 広瀬明彦, 他：ナノマテリアルの健康影響評価手法の総合的開発および体内動態を含む基礎的有害性情報の集積に関する研究 平成22年度研究報告書 厚生労働省 化学物質リスク研究事業

- 27) 多層カーボンナノチューブの投与による炎症・免疫系への影響 (第37回 日本トキシコロジー学会 沖縄, 2010年6月)
- 28) 山口敦美, 藤谷知子, 大山謙一, 他: 多層カーボンナノチューブの投与による炎症・免疫系への影響 (II), 第38回日本トキシコロジー学会学術年会要旨集, 横浜, 2011年7月
- 29) Yamaguchi, A., Fujitani, T., Ohyama, K., et al.: Effects of Sustained Stimulation with Multi-wall Carbon Nanotubes on Immune and Inflammatory Responses in Mice. *J. Toxicol. Sci.* **37**(1), 177-189, 2012
- 30) 高橋 省, 大山謙一, 中江 大, 他: 多層カーボンナノチューブ腹腔投与マウスにおける急性酸化ストレス, 第38回日本トキシコロジー学会学術年会講演要旨集, 横浜 2011年7月
- 31) 山本行男, 大貫 文, 坂本義光, 他: 多層カーボンナノチューブ投与ラットの血清におけるプロテオーム解析 第84回日本生化学会講演要旨集 京都 2011年9月
- 32) 山本行男, 坂本義光, 大貫 文, 他: 多層カーボンナノチューブ投与により誘発したラット中皮腫におけるプロテオーム解析 第85回日本生化学会大会講演要旨集 福岡 2012年12月
- 33) Fujitani, T., Nakae D, Ogata A., et al: Teratogenicity of Multi-Wall Carbon Nanotube (MWCN) in ICR Mice. *J. Toxicol. Sci.* **37**(1), 81-89, 2012
- 34) 藤谷知子, 大山謙一, 中江 大, 他: マウスにおける多層カーボンナノチューブの催奇形性について 第39回日本毒性学会学術集会講演要旨集 仙台 2012年7月
- 35) Nakagawa Y, Nakae D, Ogata A., et al: Cytotoxic effects of hydroxylated fullerenes on isolated rat hepatocytes via mitochondrial dysfunction, *Arch. Toxicol.*, **85**, 1429-1440, 2011.

Research into the Health Effects of Nanomaterials such as Multi-Wall Carbon Nanotubes

Akio OGATA^a, Keisuke KIMURA^a, Takashi FUJIWARA^a, Ikue SAITO^a, Aya ONUKI^a, Tomoko OKUBO^a, Yuki KOSUGI^a, Satoko FUJIE^a, Toshinari SUZUKI^a, Tomokazu MAENO^a, Yoshimitsu SAKAMOTO^a, Osamu TAKAHASHI^a, Tatsu FUWA^a, Tomoko FUJITANI^a, Yukio YAMAMOTO^a, Yoshio NAKAGAWA^a, Sumiko TAYAMA^a, Kuniaki TAYAMA^a, Toyohito TANAKA^a, Yukie TADA^a, Seiji YOSHIDA^a, Hiroshi ANDO^a, Yoshikazu KUBO^a, Akemichi NAGASAWA^a, Katsuhiro YUZAWA^a, Hiroshi TAKAHASHI^a, Norio YANO^a, Yoko UEMATSU^a, Hirofumi USHIYAMA^a, Masayuki KURITA^a, Akiko INOMATA^a, Mitsugu HOSAKA^a and Dai NAKAE^a

Manufactured nanomaterials are important substances in nanotechnology, and the potential human and environmental risks need to be investigated for risk assessment and management. This study involved precedent research that aimed to evaluate the general risk of the nanomaterials in the living environment.

We conducted marketing research of nanomaterial use in food and cosmetics and subsequently examined those analytical procedure. We developed and used an analytical procedure to investigate the occurrence of nanomaterials in the environment (the atmosphere, room, water). In parallel with these above investigations, we investigated the toxic potential of nanomaterials using laboratory animals and cell cultures.

The marketing research and analytical procedure did not demonstrate that a large amount of nanomaterials exists in our living environment at present. However, the toxicologic approach demonstrated the presence of multi-wall carbon nanotubes, a nanomaterial that, other than inducing mesothelioma, has harmful effects such as the teratogenic action.

Keywords: nanomaterial, risk, food, cosmetics, environment, fact-finding, toxicology, rat, mouse, cell-culture

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan