

毒性試験と評価に関する新たな課題へのアプローチ - 厚生労働省ナノマテリアル研究の展開 -

菅野 純

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
毒性部 部長

項目

- イントロダクション
- Fiber Carcinogenesis (繊維による発がん)
- Systemic effects (全身影響)
- Fullerene (フラーレン: C₆₀)
 - Fullerene nanowhisker
- Whole body inhalation (WBI) (全身吸入暴露)
 - Taquann method
- Carcinogenesis (発がん性: 津田班)
 - Mesothelin assay
- まとめ
- 今後の物質

Nanoparticles tested by MHLW*

1. 非意図的粒子

- Diesel exhaust
- Others

2. 意図的粒子

- Carbon nanotube (Multiwall: MWCNT)
- Titanium dioxide
- Fullerene
- 他

*Ministry of Health Labour and Welfare Research grants
on Risk of Chemical Substances

毒性医学的な背景

Medico-toxicological Background (4)

- 粒子状物質による人身事故例 3例

- (1) アスベスト発がん(線維状物質発がん)

- 悪性中皮腫 frustrated phagocytosis
 - 肺腺癌: メカニズム???? 中皮腫の数倍
 - **★閾値が設定できない (threshold is not known to exist)**
 - アスベストの全身分布による有害影響(他臓器発がん・免疫異常)
 - Asbestos travels through out the body

- (2) トロトラスト Thorotrast (thorium dioxide, ThO₂) 大戦中に用いられたレントゲン造影剤

- 細網内皮系(肝、脾、リンパ節など)に補足される Trapped by RES*
system (liver, spleen, LN, etc)
 - **★人体半減期 Half life = 22 years**
 - 3~10 nm の粒子である 3~10 nm emulsion**

* reticuloendothelial system

** thanks to Dr. Hakan Wallin for the size info

毒性医学的な背景

Medico-toxicological Background (4)

- 粒子状物質による人身事故例 3例

- (1) アスベスト発がん(線維状物質発がん)

- 悪性中皮腫 frustrated phagocytosis
- 肺腺癌: メカニズム???? 中皮腫の数倍
- ★閾値が設定できない (threshold is not known to exist)
- アスベストの全身分布による有害影響(他臓器発がん・免疫異常)
 - Asbestos travels through out the body

難分解性・高蓄積性

- 大戦中に用いられたレントゲン造影剤に補足される Trapped by RES*
 細網内皮系(肝、脾、リンパ)即ちここに補足される
 system (liver, spleen, LN, etc)
- ★人体半減期 Half life = 22 years
- 3~10 nm の粒子である 3~10 nm emulsion**

* reticuloendothelial system

** thanks to Dr. Hakan Wallin for the size info

毒性医学的な背景

Medico-toxicological Background (5)

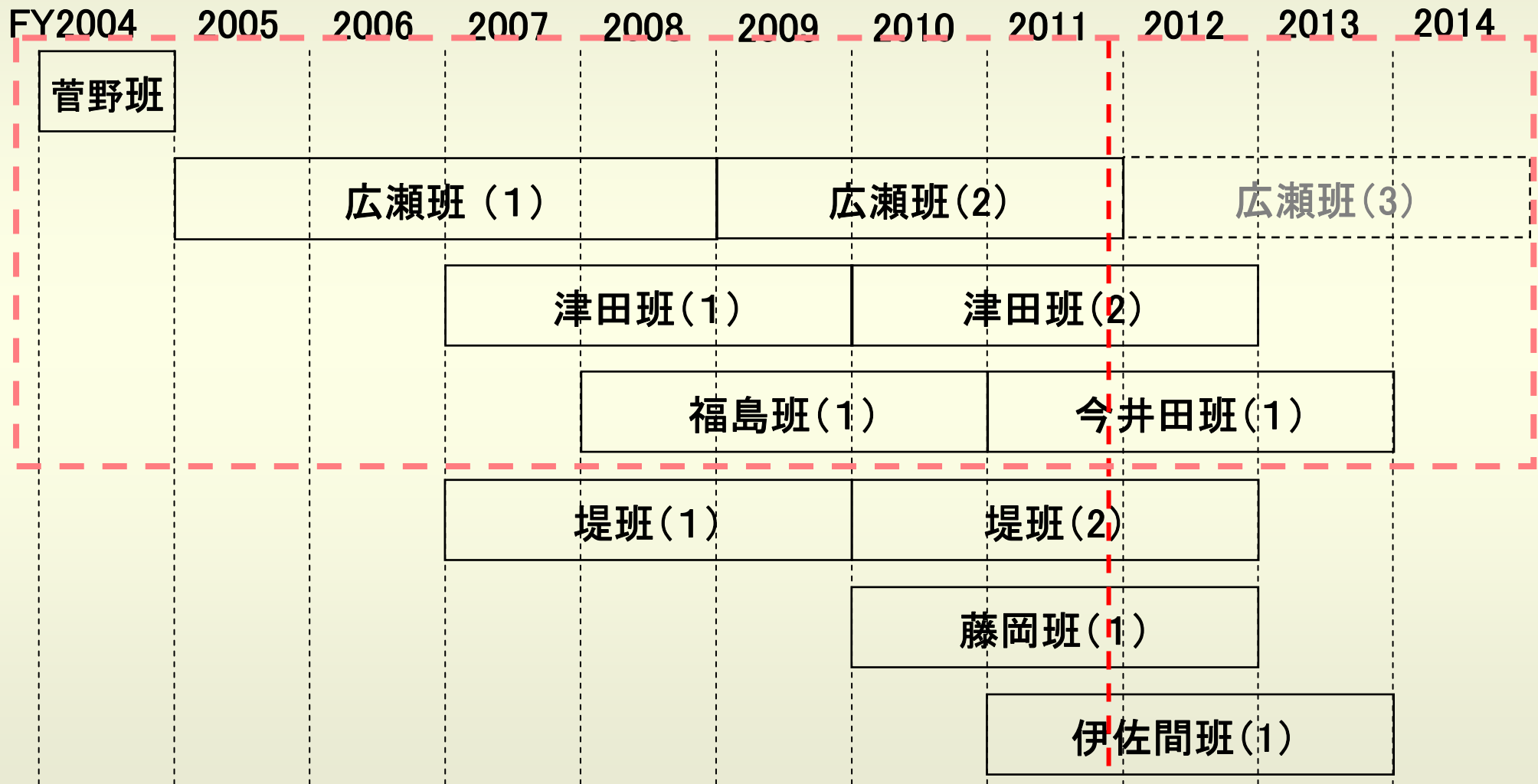
(3) 溶接工等、フュームによる心筋梗塞・脳梗塞の増加 (疫学)

Exposure to metal welding fume particles and risk for cardiovascular disease in Denmark: a prospective cohort study.

Ibfelt E, Bonde JP, Hansen J.
Occup Environ Med. 2010 Nov;67(11):772-7.

CONCLUSIONS: This study supports the hypothesis that exposure to welding processed particles increases the risk for cardiovascular disease.

ナノ物質のヒト健康影響に関する研究
厚生労働科学研究費補助金【化学物質リスク研究事業】研究班



広瀬班

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集積に関する研究

- 慢性影響 in vivo
 - アスベスト様繊維:長尺及び短尺の焼結型フラレンウイスキー(FW)単回腹腔内投与一年間慢性試験
 - C₆₀の腹腔内投与による腎影響の解析
 - ナノ酸化亜鉛の間質性肺炎の発生機序解明
 - アナターゼ型酸化チタンによる肺線維芽細胞等へ影響解析
- 基礎的有害性情報収集
 - C60の体内代謝解析
 - サイズの異なるMWCNTの気管内投与による体内動態解析手法の開発
 - 遺伝毒性
 - CNTのBhas細胞を用いたトランスフォーメーション試験
 - 肺でのTG遺伝子突然変異、およびDNA付加体の検出
 - in vitro試験系開発研究
 - 神経幹細胞増殖抑制作用、ミクログリア細胞毒性における金属イオンの関与やサイズの異なるCNTについての影響を比較検討、
 - マクロファージの反応としての活性酸素量やペルオキシダーゼ活性、
 - 脂質過酸化量測定による細胞障害性メカニズムの検証と、
 - IL-1 β 産生促進作用における大きさや形状による細胞応答の違いを明らかにする。

津田班

カーボンナノマテリアルによる肺障害と発がん作用の中期評価法とその作用の分子機序解析法の開発に関する研究

- 吸入毒性試験に代わる標準的評価法の確立（下記1～4のシステム構築）
- ラットを用いて種々の炭素ナノマテリアルについて
 - 肺内噴霧法
 - 単層及および多層カーボンナノチューブ
 1. 20週の中期毒性・発がんプロモーション試験
 2. 炎症/増殖病変解析のための14日間の短期試験
 3. 初代培養肺胞マクロファージおよび気管支上皮培養系によるサイトカインの細胞増殖、炎症、免疫反応への関与の評価
 4. 結果のヒトリスク評価への外挿法を確立する
- 陽性対照
 - 中皮腫発がん: MITSUI (MWCNT -7)、クロシドライト (UICC Grade Asbest)
 - 肺発がん: カーボンブラック

今井田班（先行福島班の継承）

ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法に関する研究

- 全身暴露吸入による肺を主標的とした毒性評価研究 -

NMの全身暴露吸入試験を実施し、用量作用関係を含む有害性情報及びその詳細な病態の解析

- 音響式ダスト発生装置(米国NIOSH考案)の基本概念を導入
 - 独自の暴露チャンバー
 - 1群最大16匹、3群の実験
- 気管内暴露(並行実施:比較)
- 急性期反応及び慢性反応(背景、経過、要因を経時的に解析)
 - 病理組織学的評価(光顕、電顕、免疫染色、他)
 - 腫瘍性病変
 - 非腫瘍性病変。

まとめ

1. 人(や動物で)の過去の知見から想定される毒性影響を基盤とした試験法開発と評価
 - ・繊維発がん: 腹腔内投与(モデル系)
 - ・全身分布による影響: 腹腔内投与≒フィルタ付き静脈注射
2. 人(や動物で)の過去の知見がない場合
 - 人に想定される暴露経路(*)による動物実験

→ハザード同定
→メカニズム同定(推定)
→実験動物における用量作用関係

人に対する毒性と用量作用関係の想定

*: 吸入(全身、気管内)、経皮、経口

- Fiber Carcinogenesis (繊維による発がん)
 - Mesothelioma (中皮腫)
 - Lung adenocarcinoma (肺腺癌)

Original Article

Induction of mesothelioma in p53+/- mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube

**Atsuya Takagi¹, Akihiko Hirose², Tetsuji Nishimura³, Nobutaka Fukumori⁴,
Akio Ogata⁴, Norio Ohashi⁴, Satoshi Kitajima¹ and Jun Kanno¹**

*¹Division of Cellular and Molecular Toxicology,
Biological Safety Research Center, National Institute of Health Sciences,
1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan*

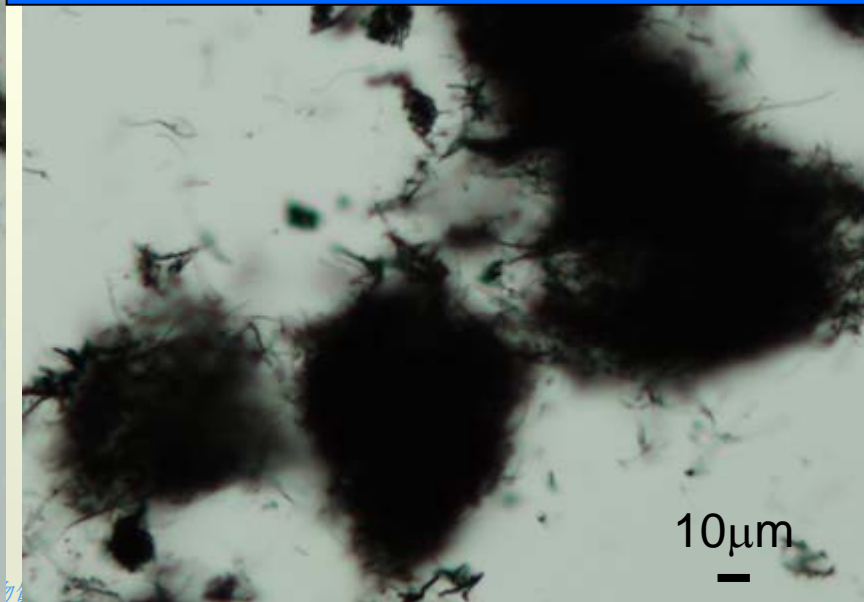
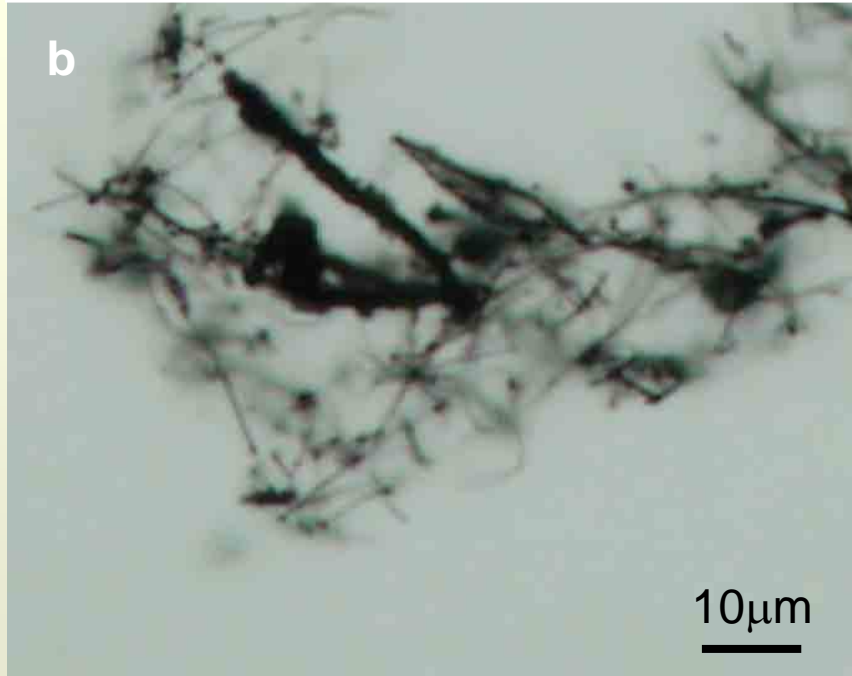
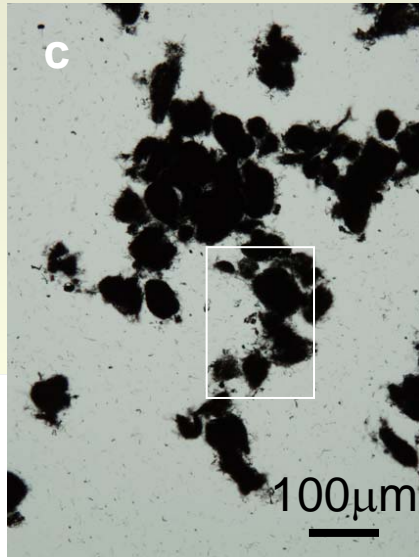
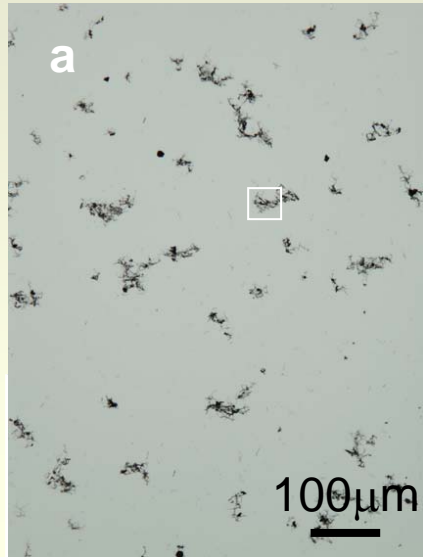
*²Division of Risk Assessment,
Biological Safety Research Center, National Institute of Health Sciences,
1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan*

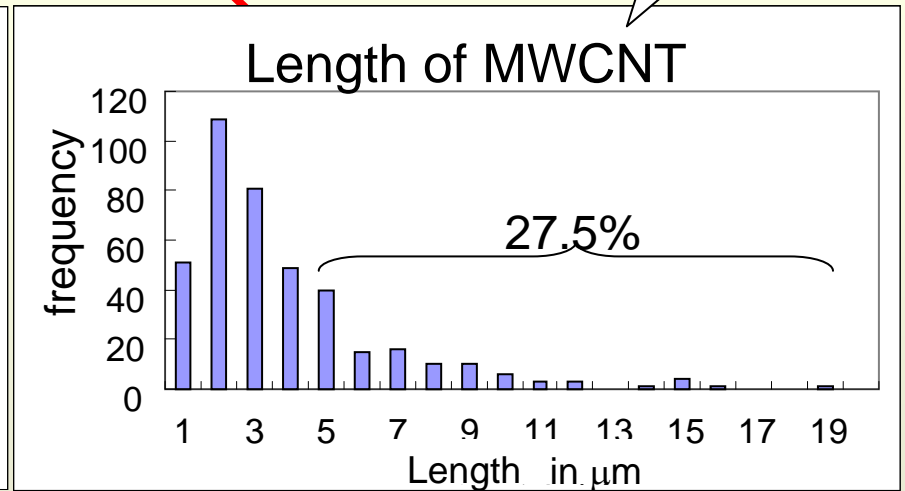
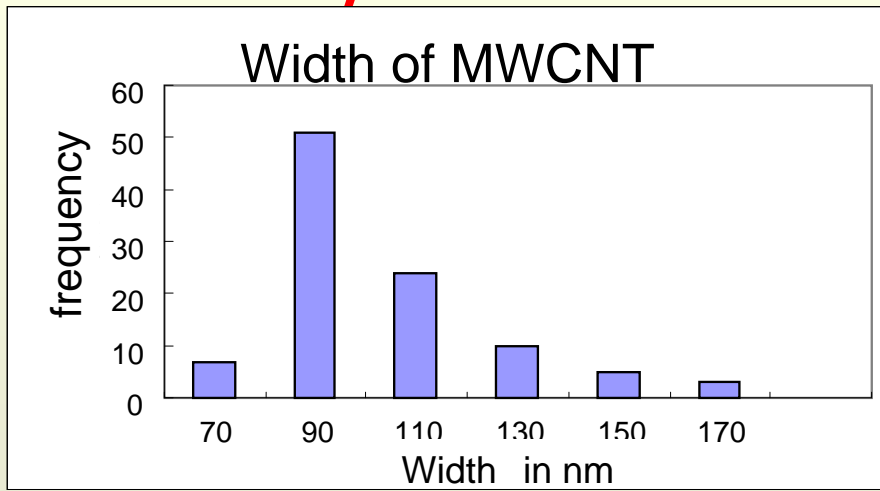
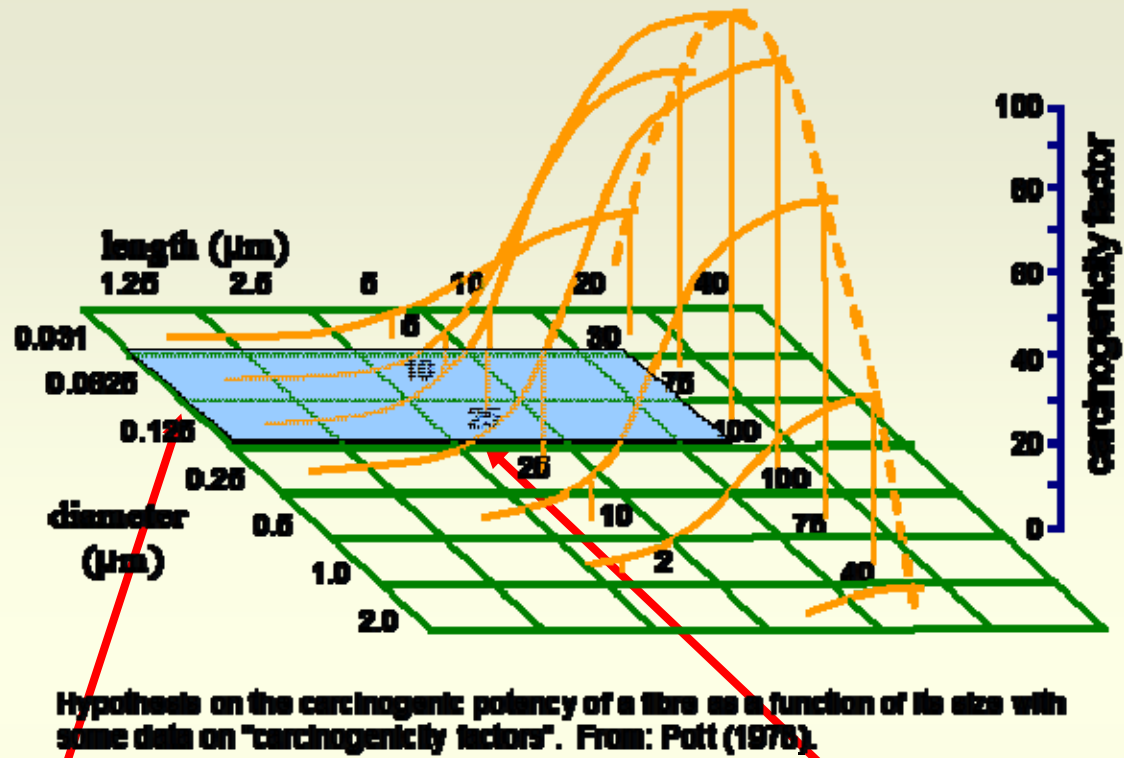
*³Division of Environmental Chemistry, National Institute of Health Sciences,
1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan*

*⁴Department of Environmental Health and Toxicology,
Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,
3-24-1 Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan*

(Received November 20, 2007; Accepted December 9, 2007)

MWCNT (Mitsui)





MWCNT : 3mg/animal
 = 1.06 X10⁹ fiber/mouse = 1.86 X10⁸ WHO fiber/mouse)

Mesotheliomagenesis

- Morphology のみからの推論
 - 散在性のFiber 貪食Macrophageによる局所炎症が重要(CD45陰性)
 - 類上皮細胞肉芽腫(及びその線維化瘢痕)は直接的には関係しない
 - 肉芽腫形成は中皮腫形成回避に働くのではないか？

- Systemic effects (全身影響)
 - Asbestos (アスベスト)
 - Cancer (発がん)
 - Immune disorder (免疫疾患)

Original Article

Teratogenicity of multi-wall carbon nanotube (MWCNT) in ICR mice

Tomoko Fujitani¹, Ken-ichi Ohyama¹, Akihiko Hirose³, Tetsuji Nishimura⁴, Dai Nakae²
and Akio Ogata¹

¹*Departments of Environmental Health and Toxicology and* ²*Departments of Pharmaceutical Sciences,
Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, 3-24-1, Hyakamincho, Shinjuku, Tokyo 169-0073, Japan*
³*Divisions of Risk Assessment, Biological Safety Research Center and* ⁴*Divisions of Environmental Chemistry,
National Institute of Health Sciences, 1-18-1, Kamiyohga, Setagaya, Tokyo 158-8501, Japan*

(Received July 21, 2011; Accepted November 8, 2011)

実験材料及び方法

1) 腹腔内投与試験

実験動物: Crj:CD-1(ICR)マウス

被検物質: 多層カーボンナノチューブ (MWCNT), 三井製
0, 2, 3, 4, 5mg/kg 2%CMC懸濁

投与方法: 妊娠9日1回投与
妊娠18日開腹, 胎児観察

2) 気管内投与試験

実験動物: Crj:CD-1(ICR)マウス

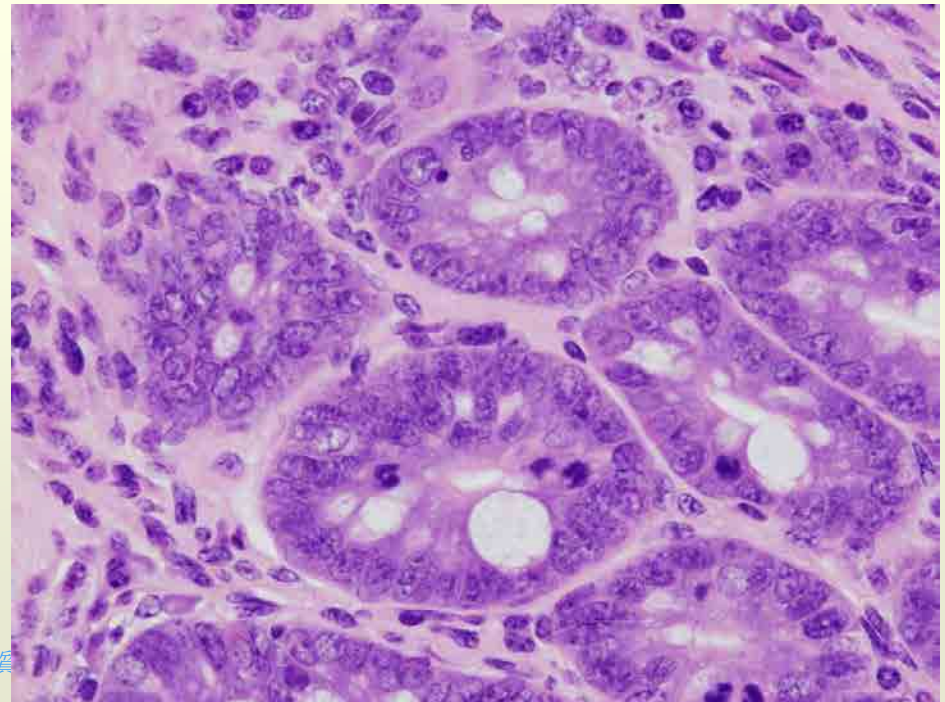
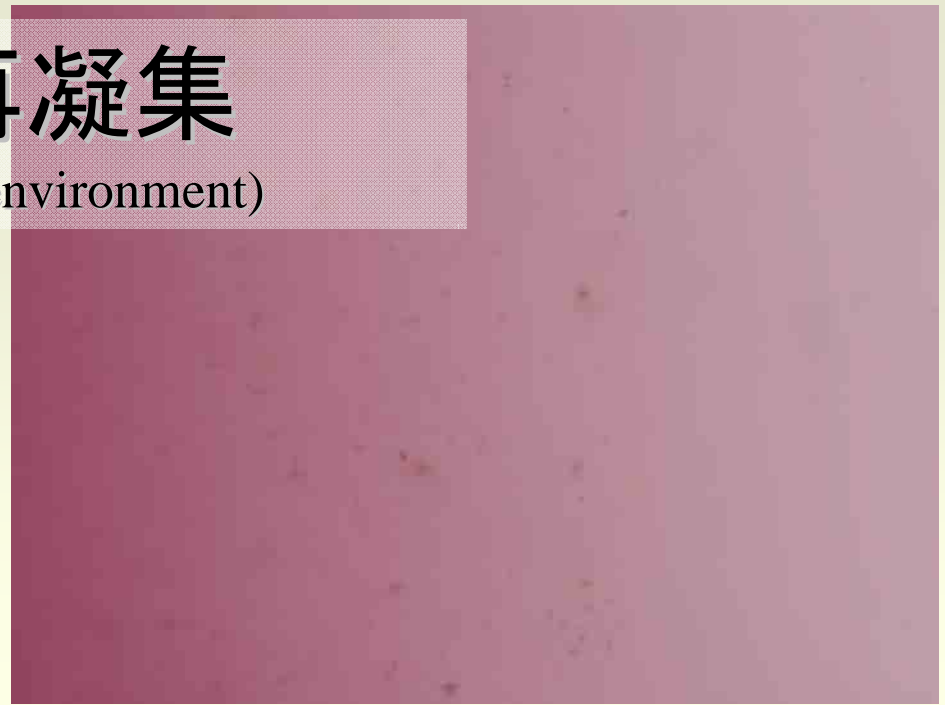
被検物質: 多層カーボンナノチューブ (MWCNT), 三井製
0, 3, 4, 5mg/kg 2%CMC懸濁

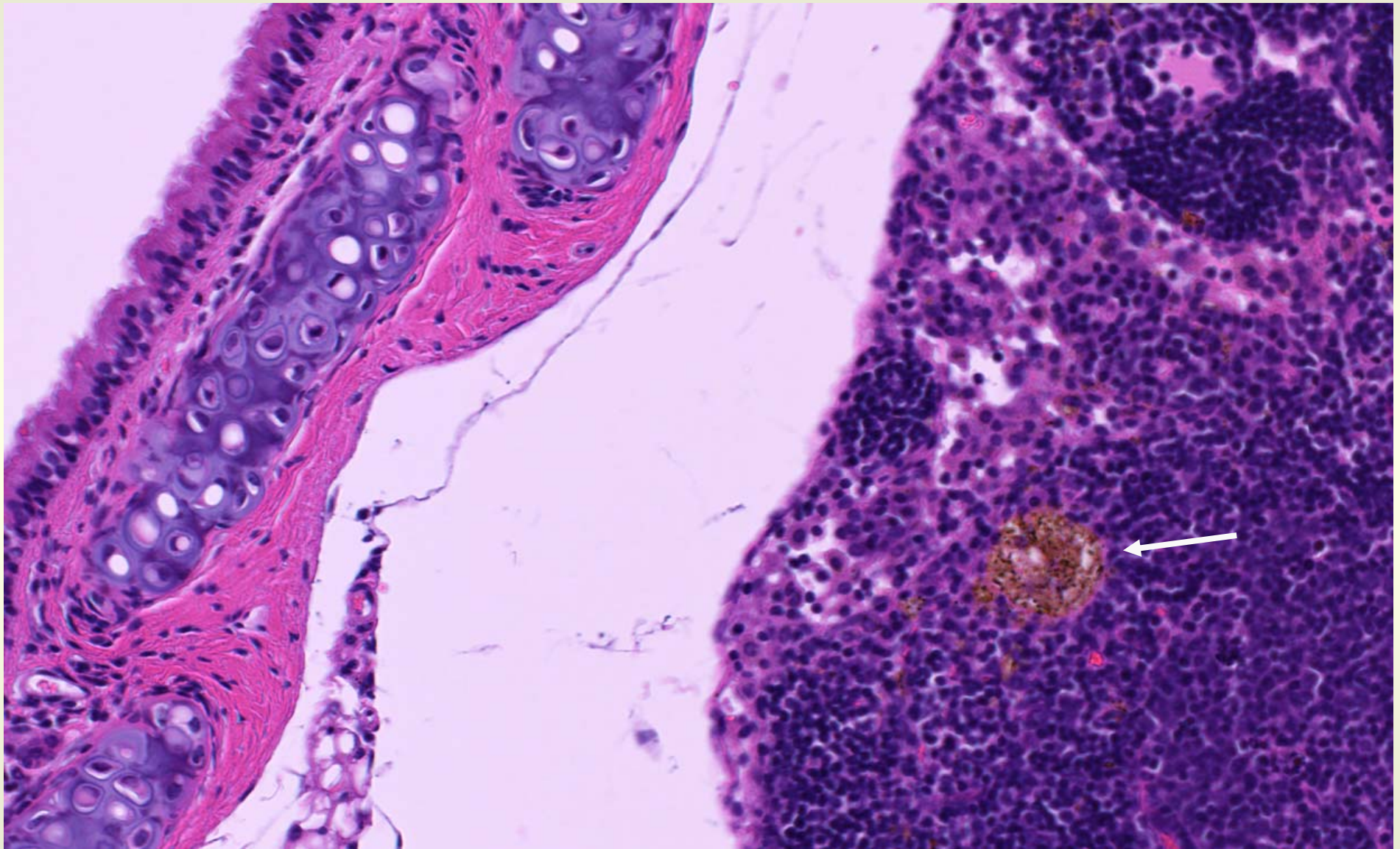
投与方法: 妊娠9日1回投与
妊娠18日開腹, 胎児観察

- Fullerene (フラーレン: C_{60})
 - Chronic toxicity
 - Systemic distribution
 - Modification of aggregates by phagocytes

C_{60} 再凝集

(in xylene environment)



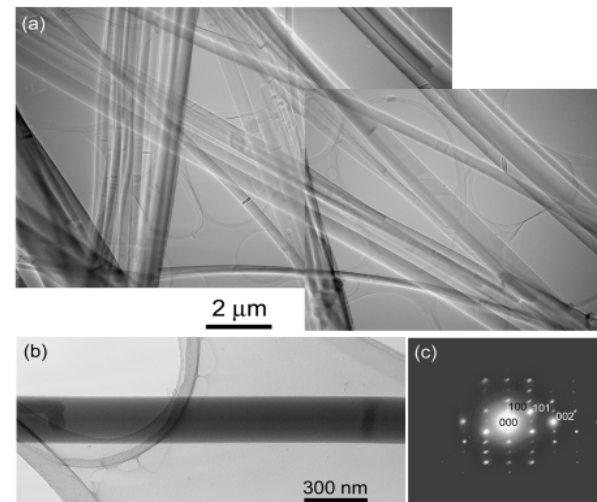
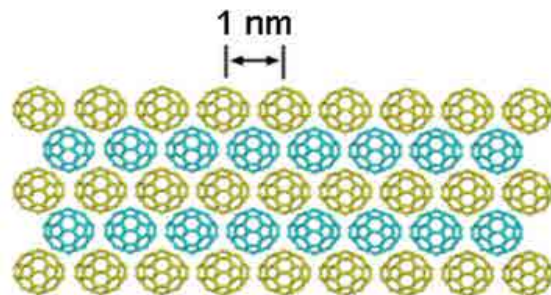
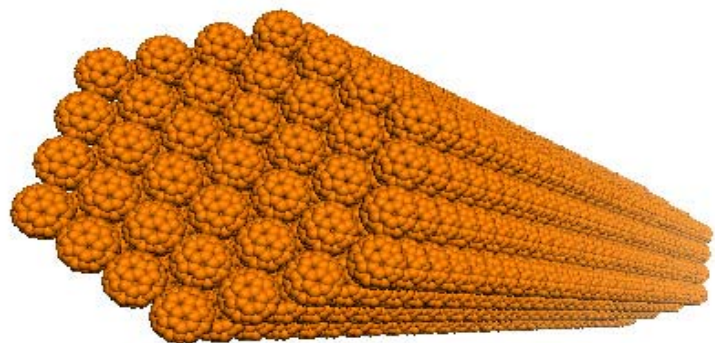


- Fullerene nanowhisker (ナノウィスカー)
- Fullerene sintered NW (焼結ナノウィスカー)
 - 非晶質化——不完全である可能性あり
- Luminescent polymer (光ポリマー)

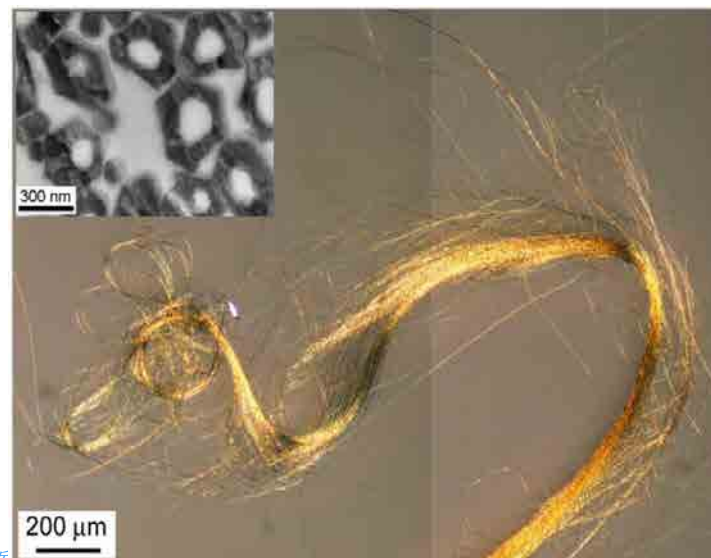
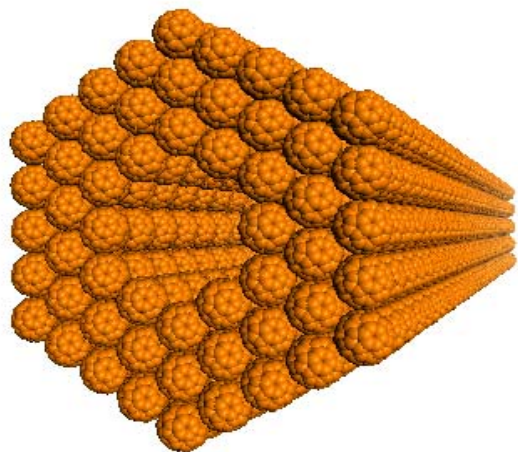


独立行政法人物質・材料研究機構
先端材料プロセスユニット
フラーレン工学グループ
宮澤 薫一・加藤良栄・平田千佳

フラーレンナノウィスカーとフラーレンナノチューブ



C₆₀(フラーレン)ナノウィスカー

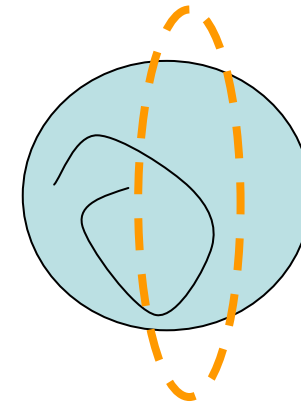
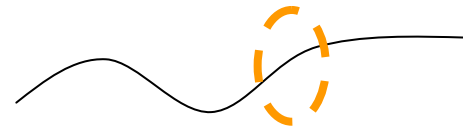


C₆₀(フラーレン)ナノチューブ

- Whole body inhalation (WBI) (全身吸入暴露)
 - Aerodynamic diameter (空気動力的直径)
 - Intratracheal installation (気管内投与)の限界
- Technology for WBI
 - NIOSH type generator (音響式発生器)
 - Original Disposable Chamber (ディスポーザブル・チャンバー)
 - Taquann method for dispersion (Taquann 検体分散法)

Aerodynamic diameter (○)

- やわらかい繊維状粒子
- エアロゾル: 水滴中の状態
 - 表面張力による球体化



- 気相中:
 - 自然な繊維状を維持



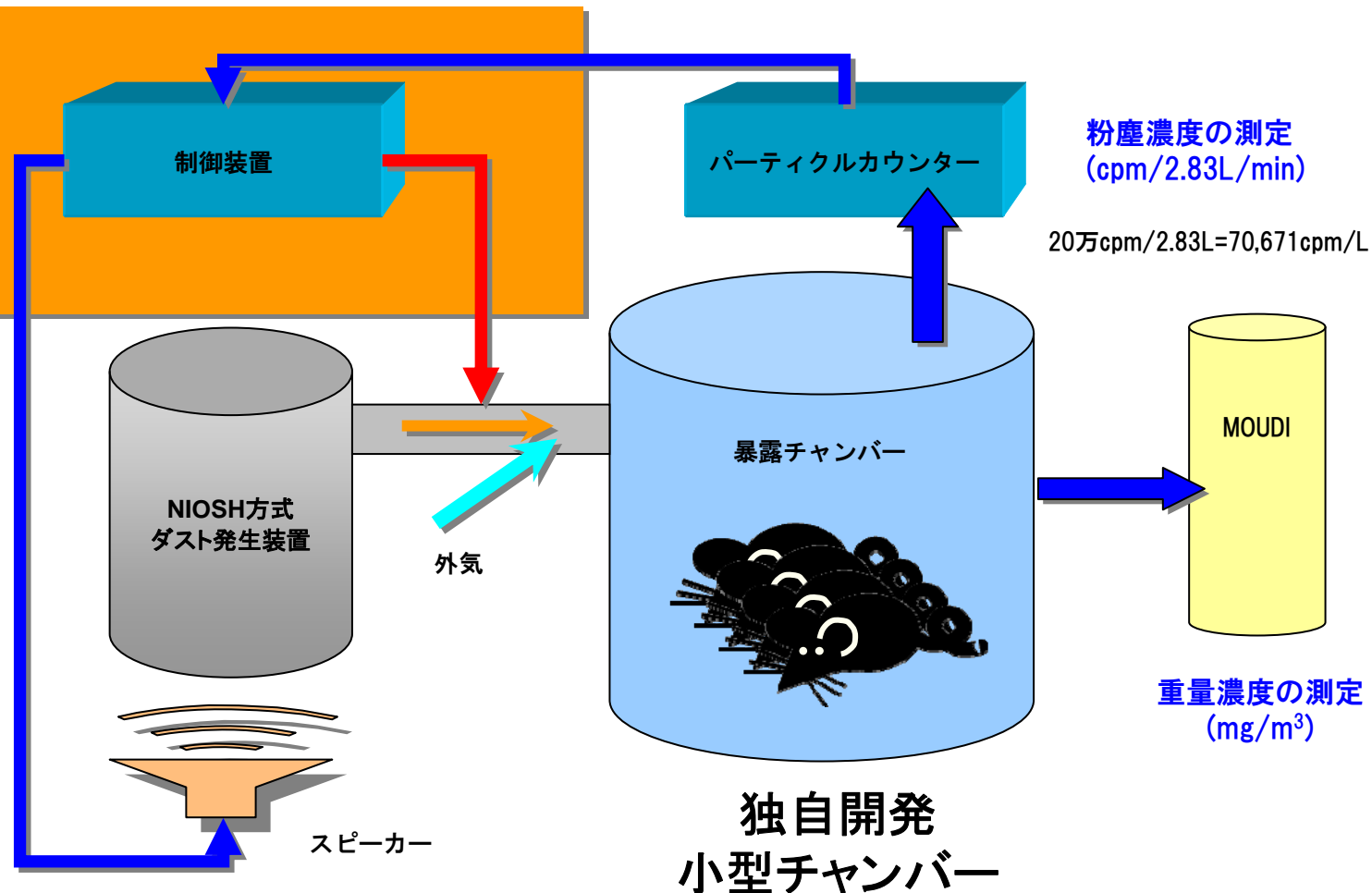
全身暴露吸入装置の概略(NIOSH方式)

制御パラメーターの設定

1. 音響エネルギー

- 周波数 (10~30Hz)
- スピーカー電圧 (0~1V)
- PID制御定数 (比例、積分、微分)

2. 流量 (~20L/min)

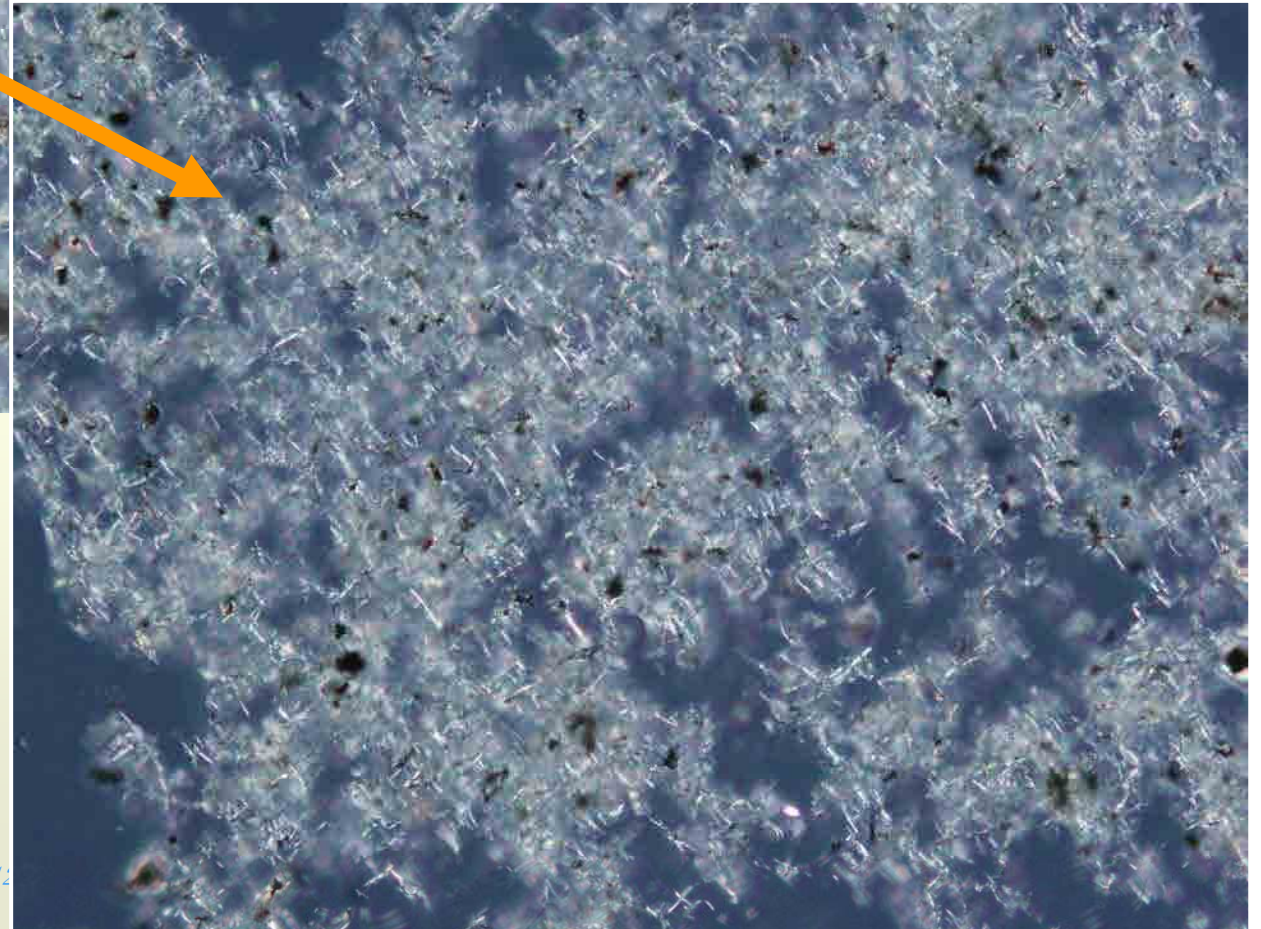
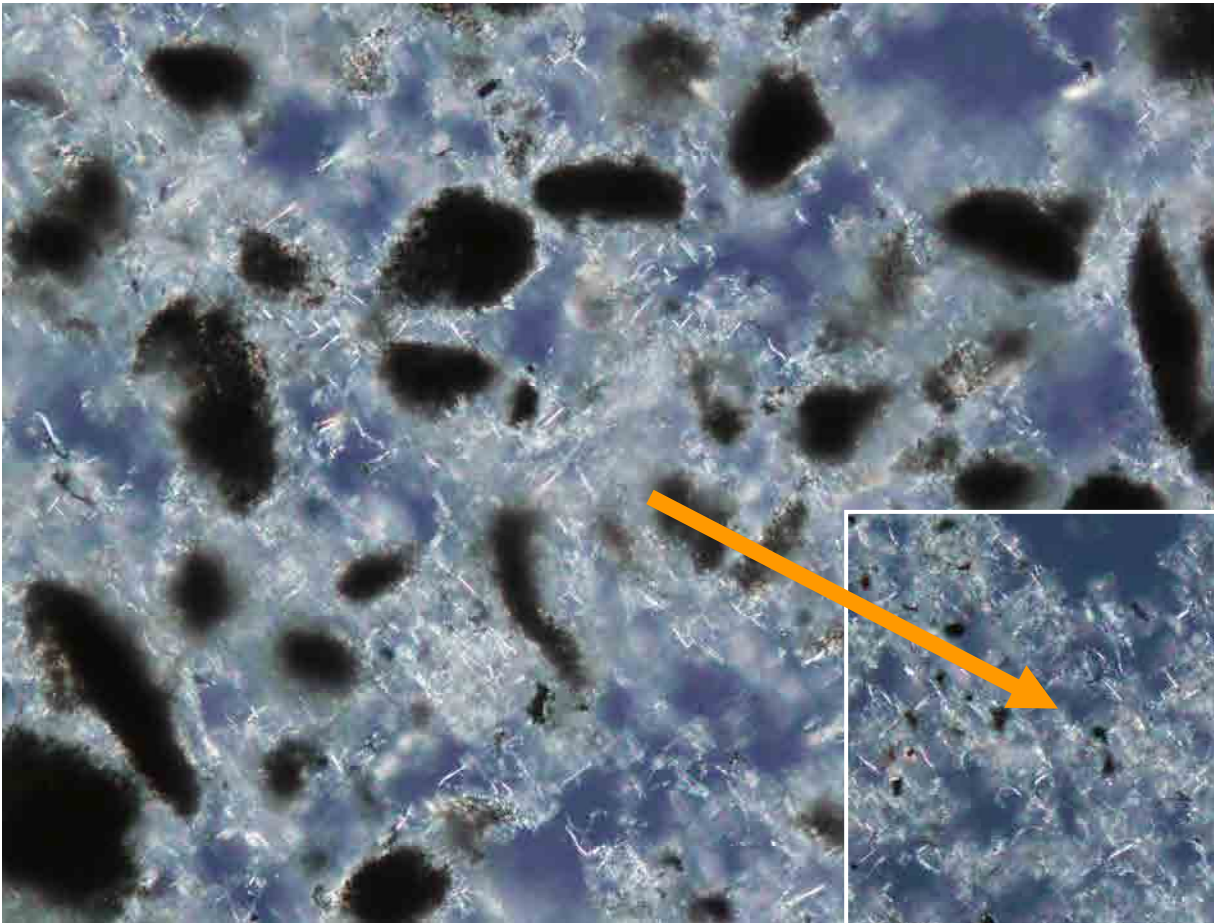


全身吸入の為の検体調整手法開発

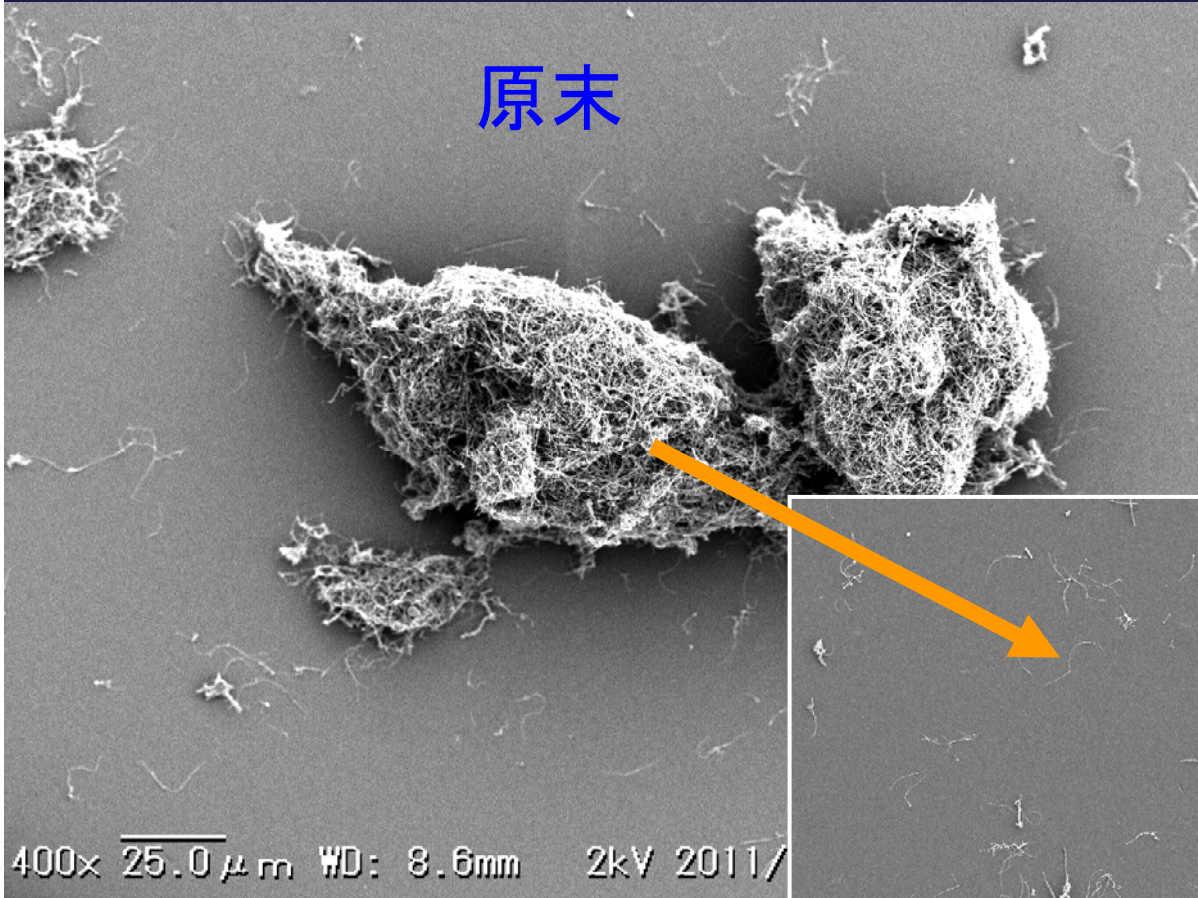
- Sample dispersion (分散法)

Taquann method

Taquann method

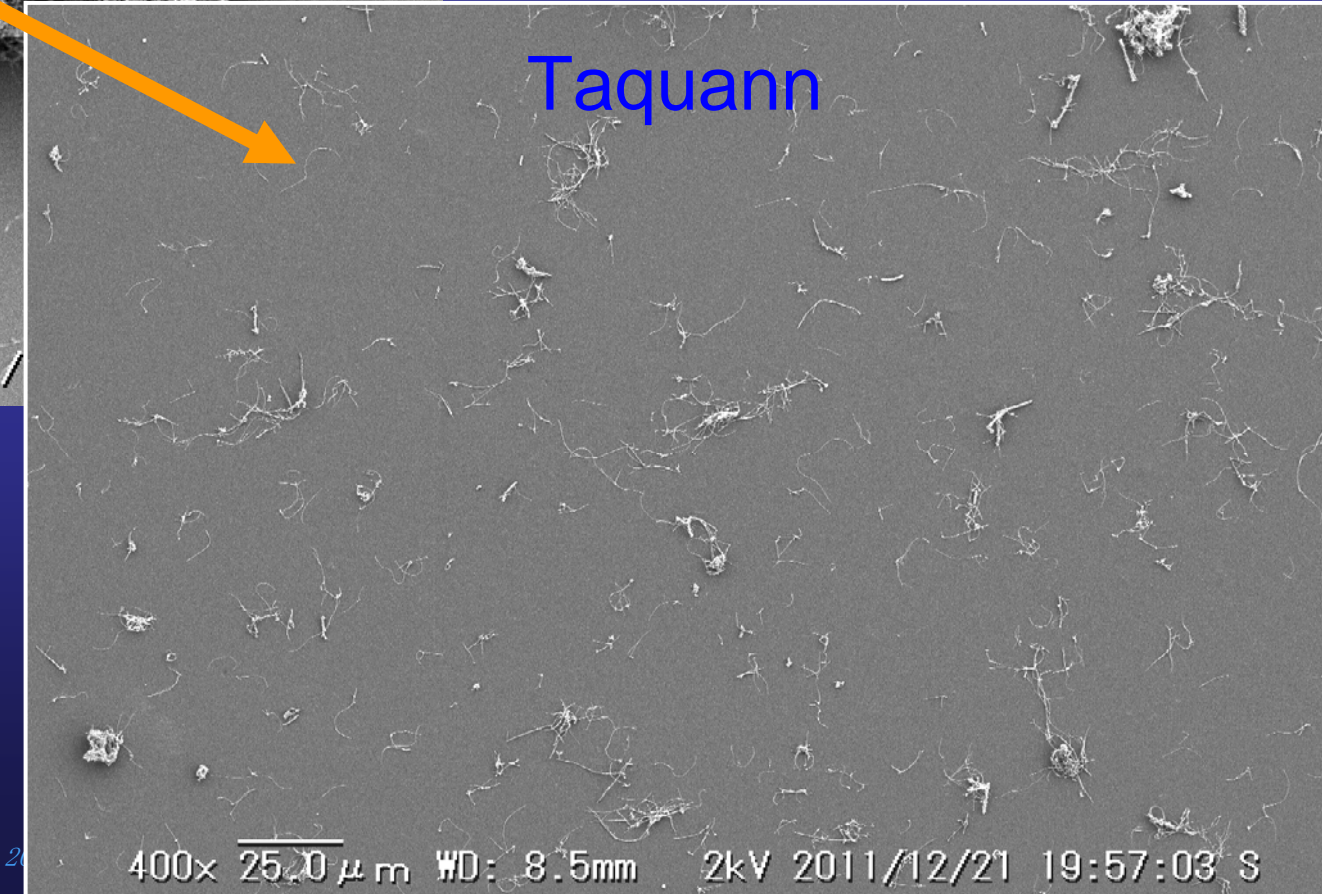


原末

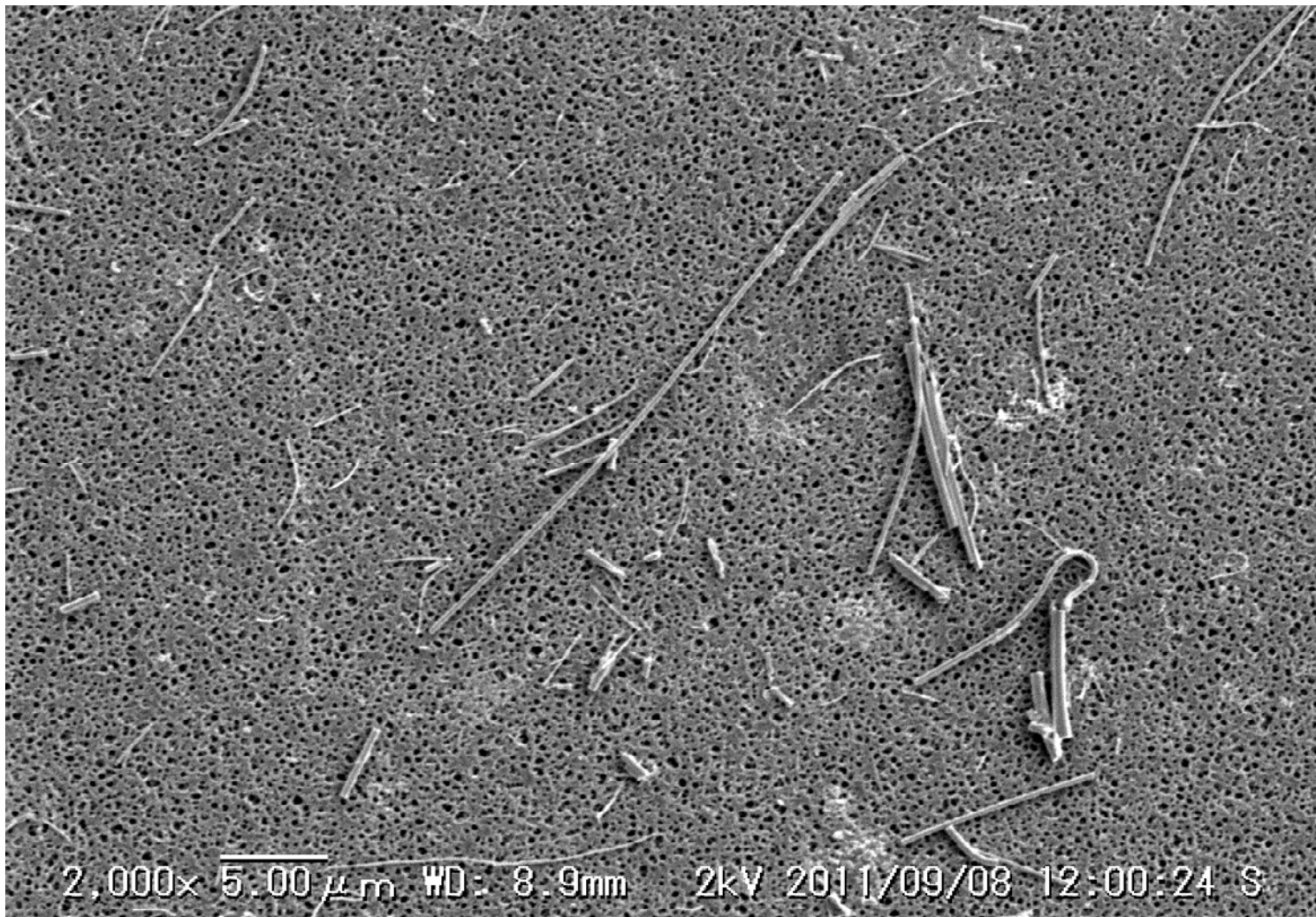


Taquann法は
再懸濁性に
優れている

Taquann



Taquann処理MWCNT 全身吸入マウスの肺から回収したMWCNT像

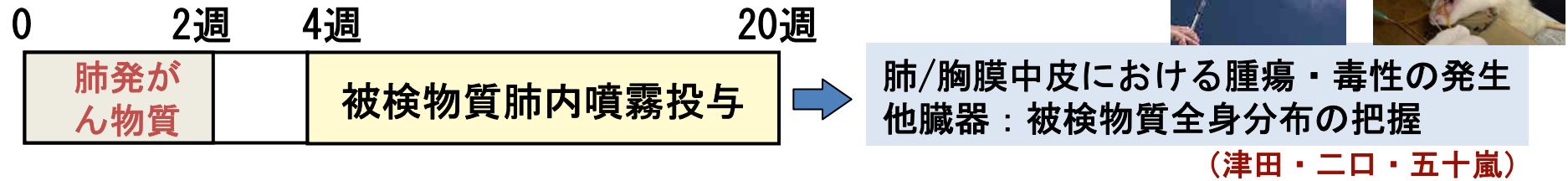


津田班

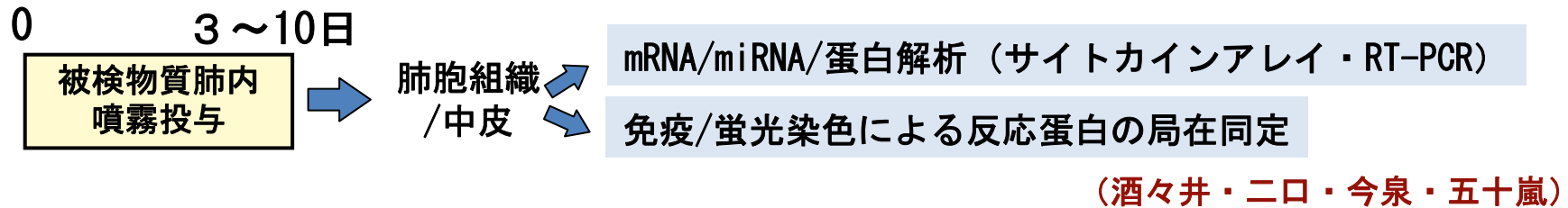
- Carcinogenesis (発がん性)
in vivo → *in vitro*

津田班申請提案図 (H20年2月)

① 発がん2段階モデルによるプロモーション作用の中期評価



② 短期投与試験による炎症/免疫毒性/気管支毒性/増殖性病変の分子病理学的解析

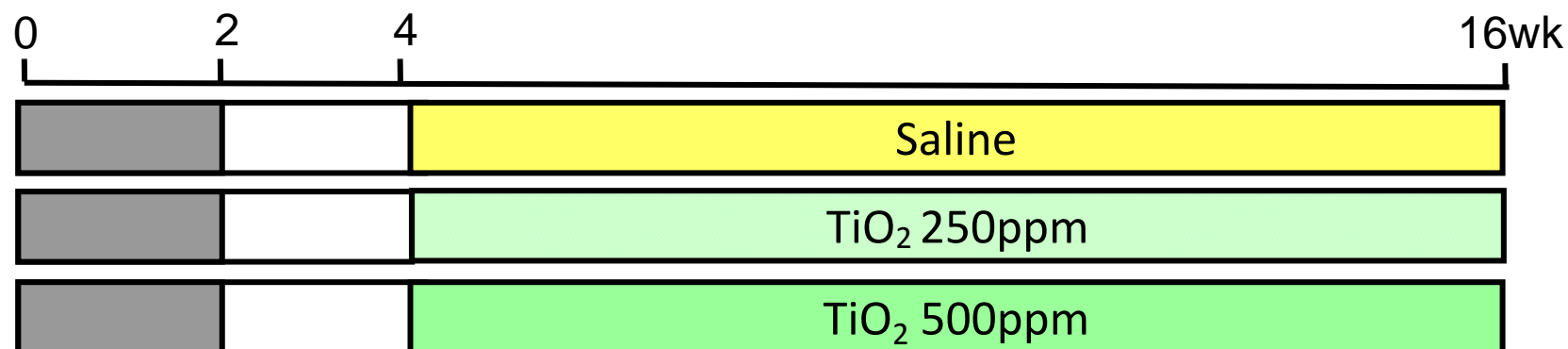


③ 貪食マクロファージの *in vitro* 機能、および免疫反応の解析




TiO₂

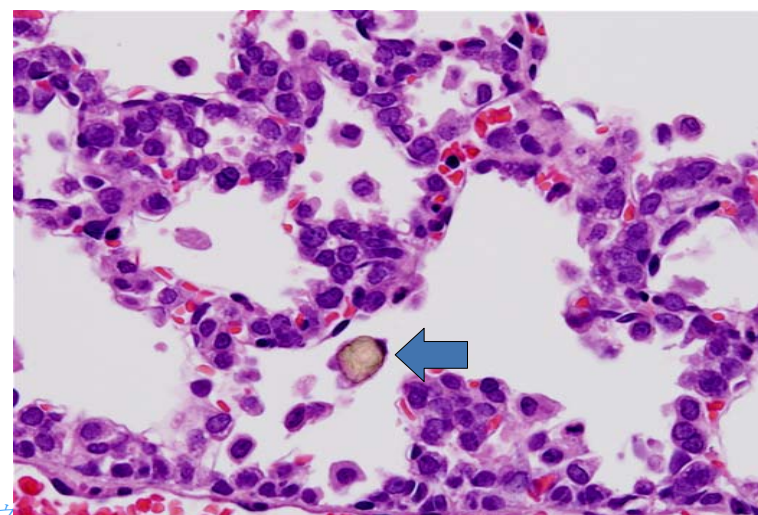
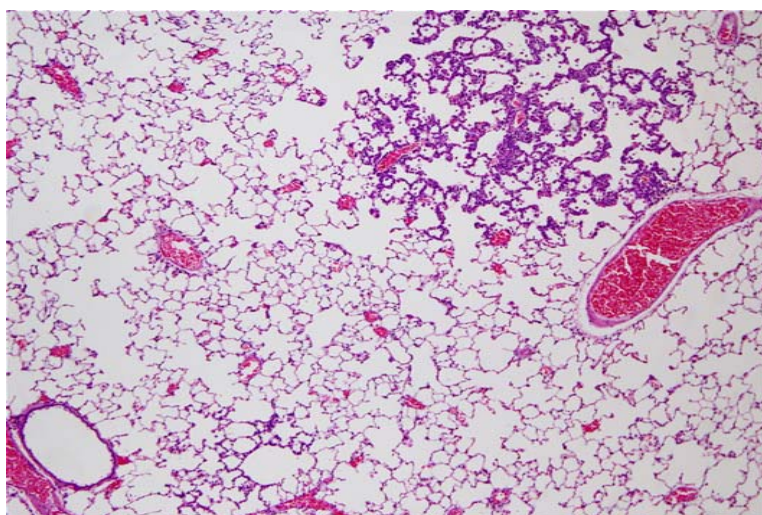
Lung tumor promotion study

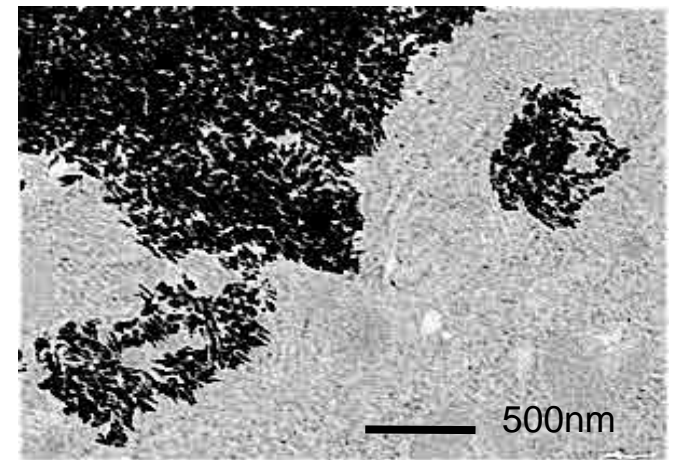
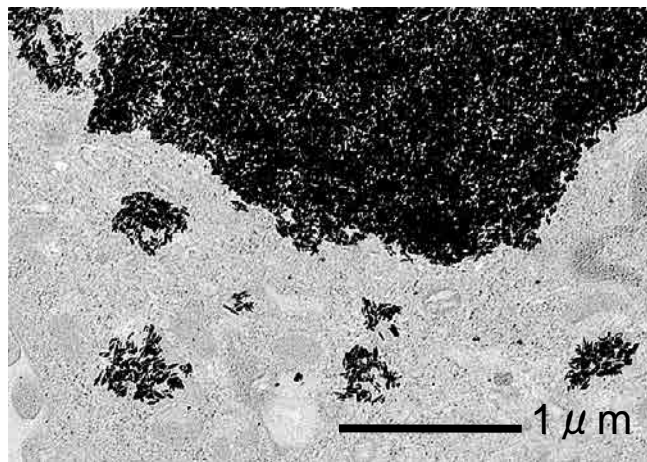
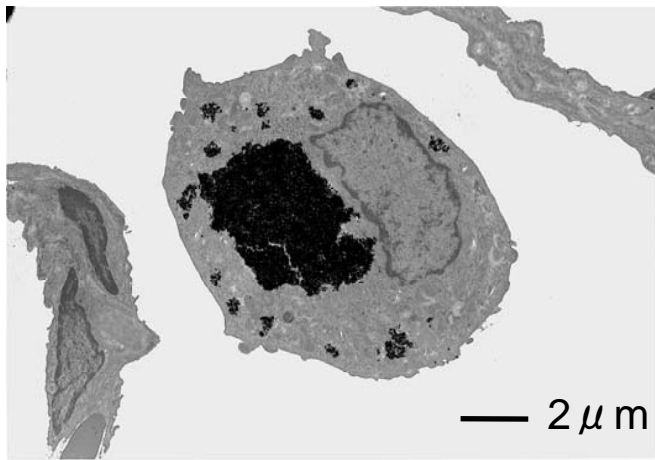
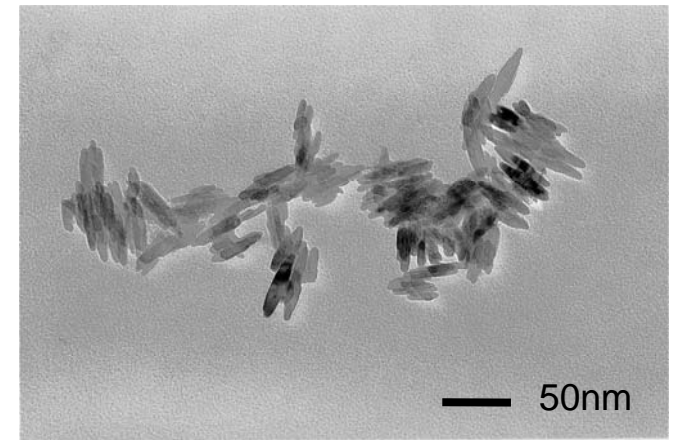
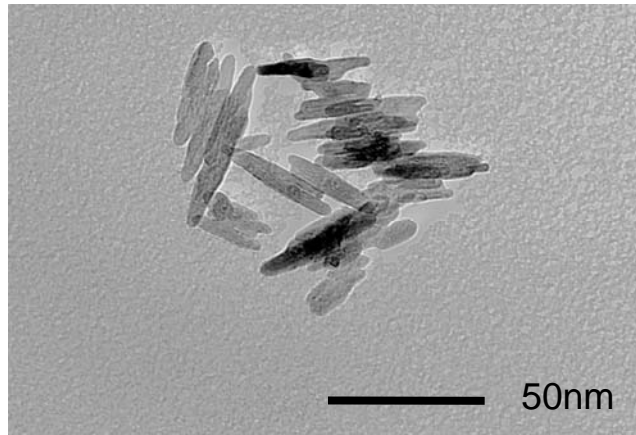
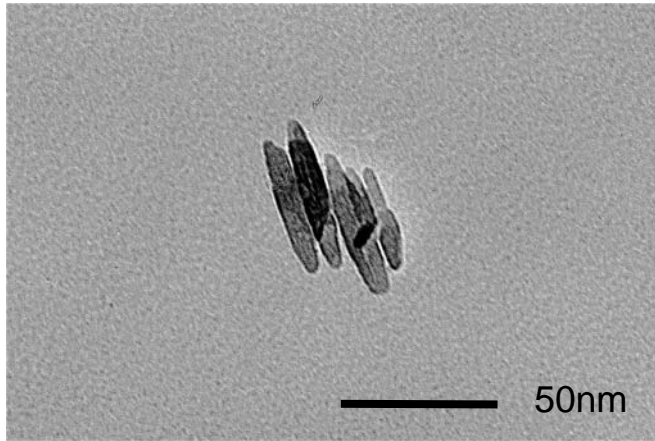


Animals : Female human c-Ha-ras proto-oncogene transgenic rats

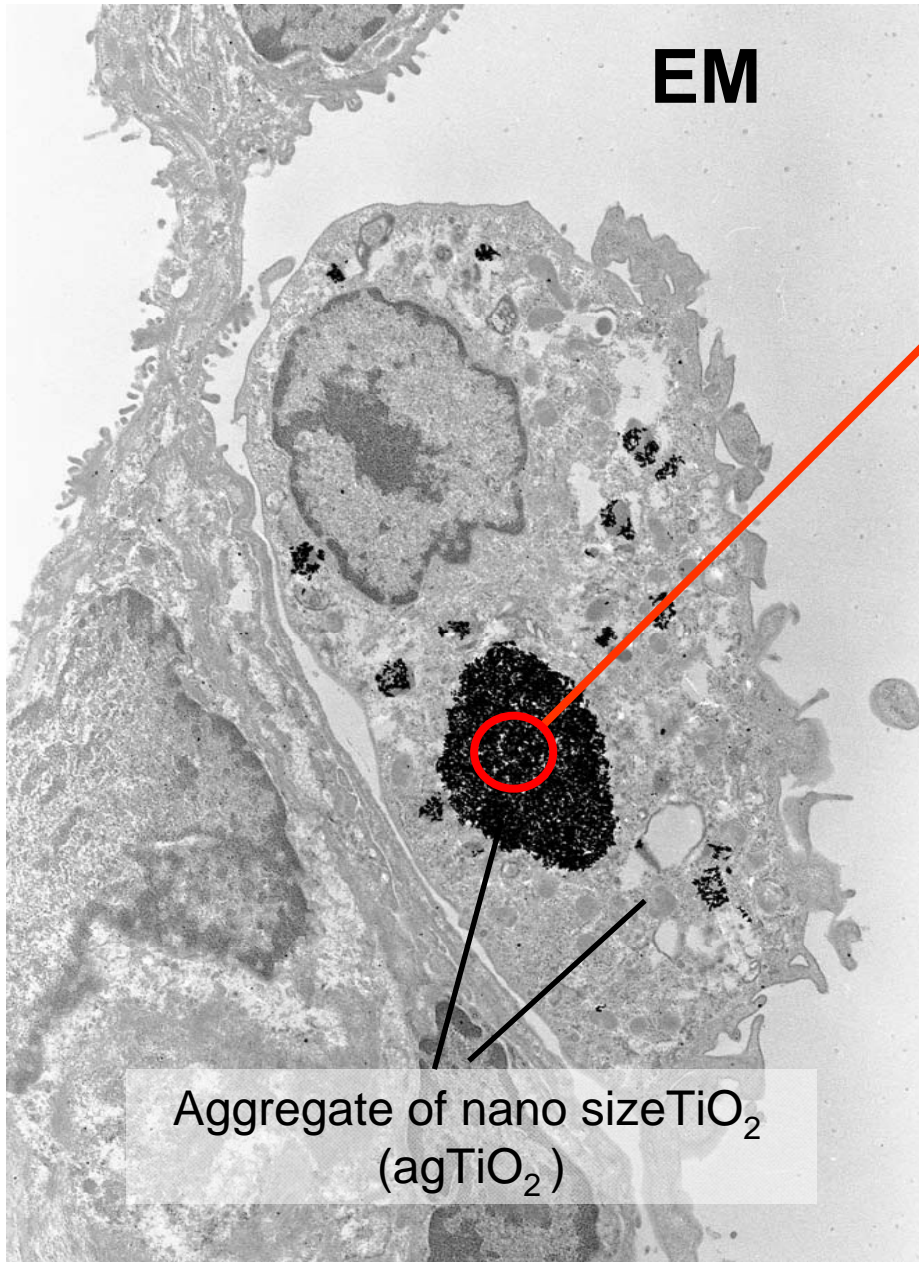
 : DHPN: 0.2% in drinking water

Treatment : nano-size TiO₂, rutile type, non-coating, 20nm in diameter,
Intra-tracheal spraying, 0.5ml once/two weeks (Total 7 times)

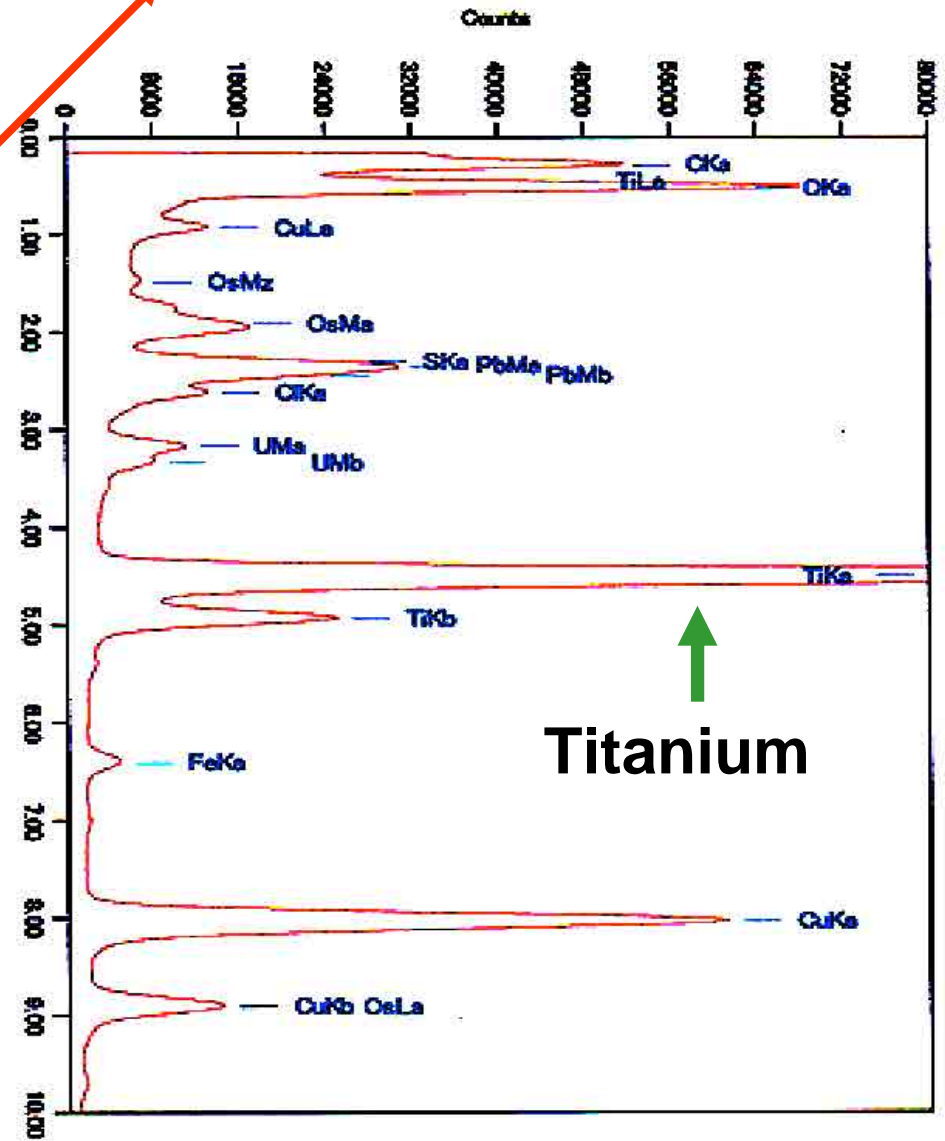




TiO₂ in alveolar macrophages



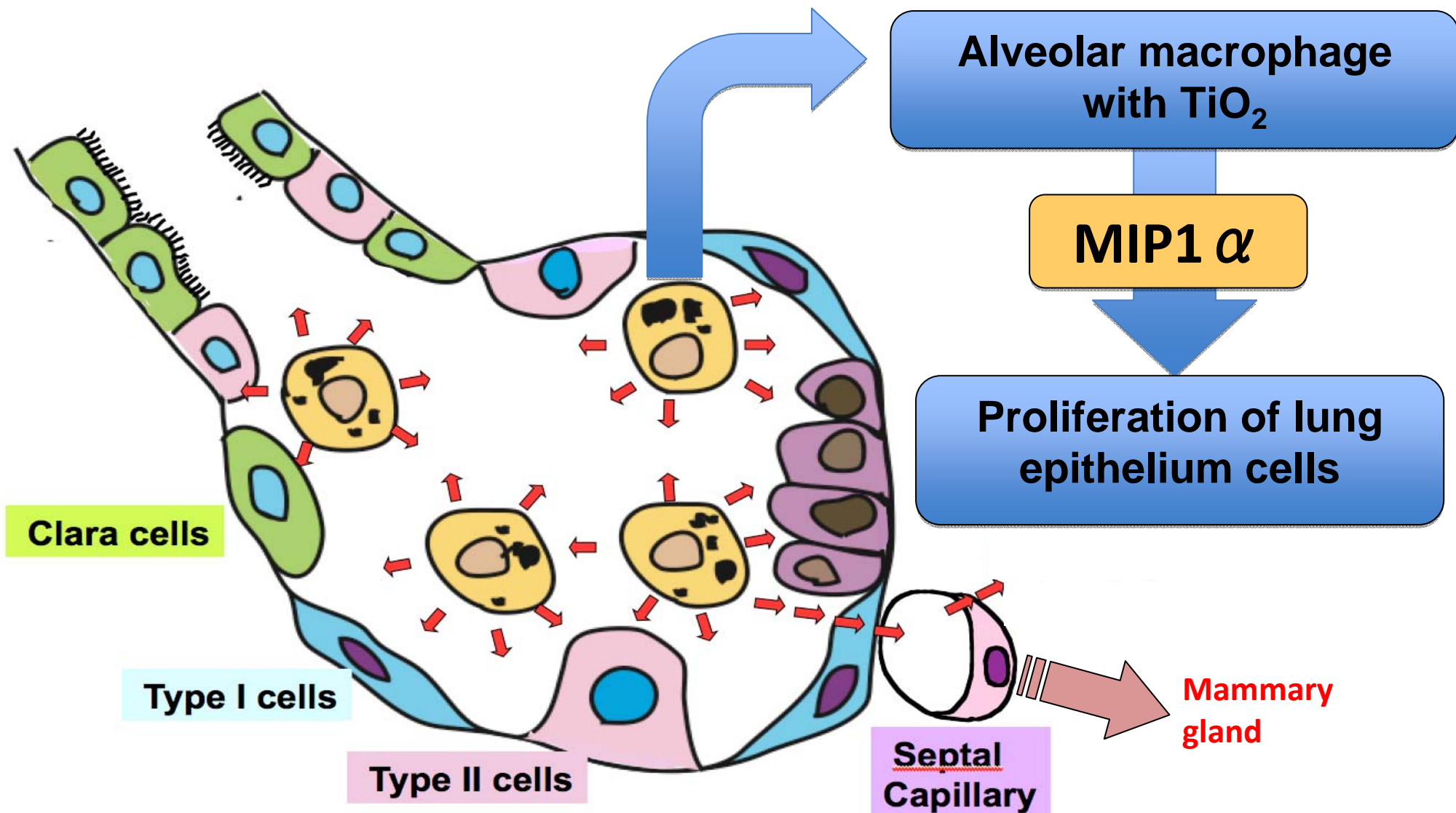
Element analysis



TiO_2 is Phagocytosed by Alveolar Macrophages

2012-02-17 化学物質シンポジウム @ 三井ビル
Tsuda Project & Dept. Mol. Toxicol., Nagoya City Univ. Grad. Sch. Med. Sci.





MIP1 α secreted by alveolar macrophage causes proliferation of lung alveolar and mammary epithelium

2012-02-17 化学物質シンポジウム @ 三田 氏

Xu ...and Tsuda. *Carcinogenesis* 31, p927, 2010



Tsuda Project & Dept. Mol. Toxicol., Nagoya City Univ. Grad. Sch. Med. Sci.

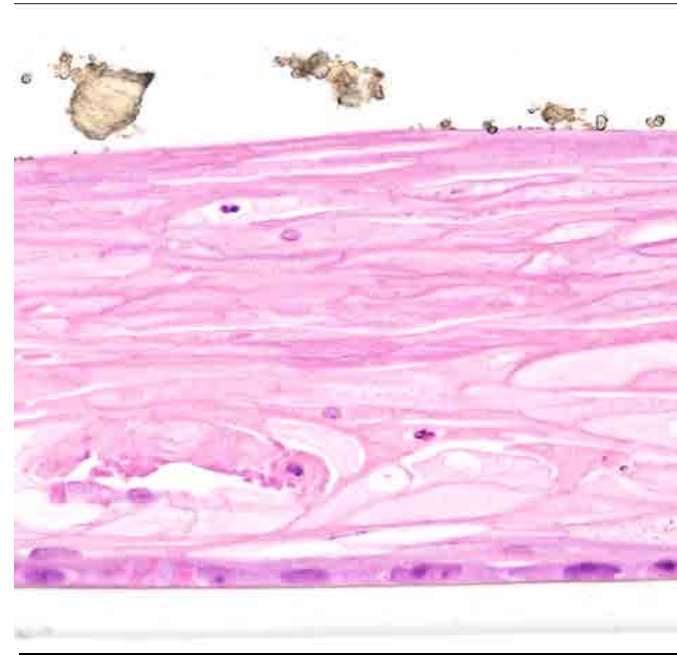
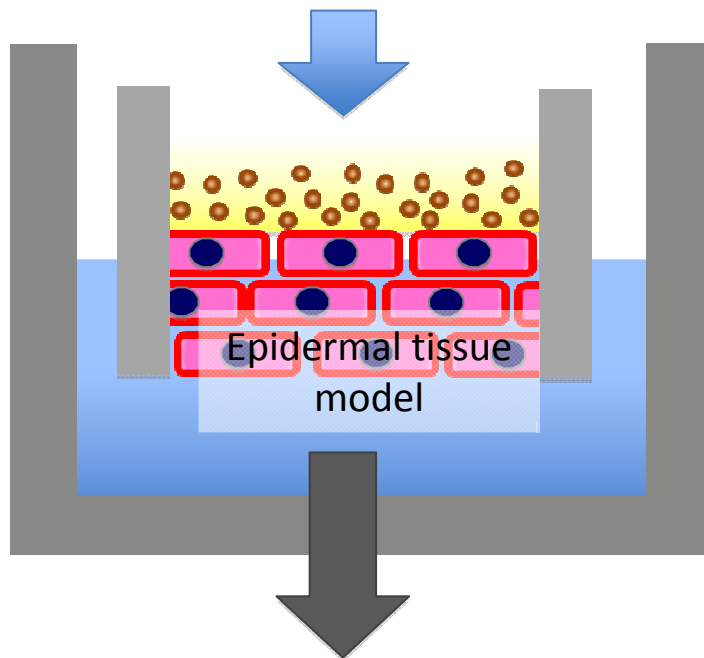


TiO₂ penetration test *in vitro*

43.6 μ L of vehicle, 250ppm or 500ppm TiO₂ is applied on the model for 12 hours.

➔ ICP analysis of Ti element

TiO₂ (Non coat/pentalan)

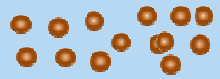


Detection of TiO₂

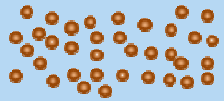
2012-02-17 化学物質シンポジウム @ 三田 jk



TiO₂ Skin painting Studies

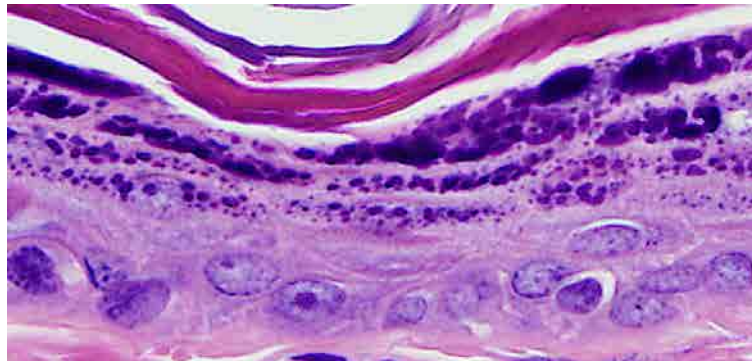


Rutile
Coating (-)

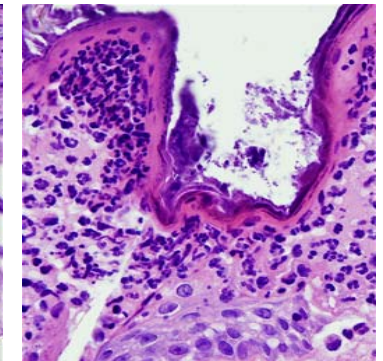
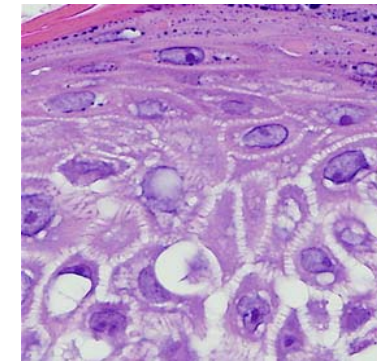


Rutile
Silicone coated
Silicone containig
vehicle

Normal



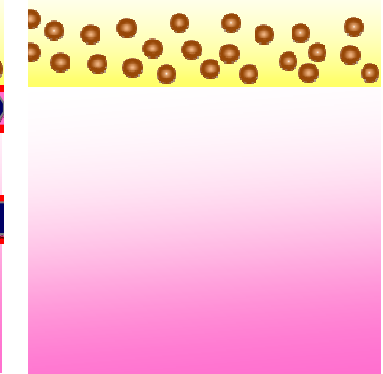
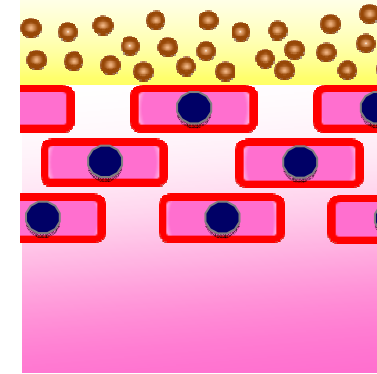
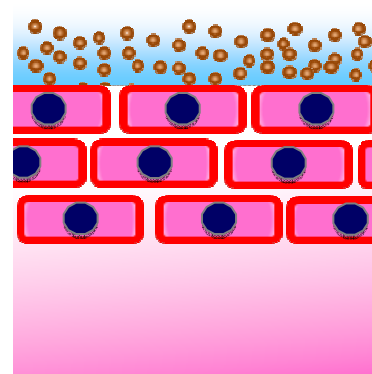
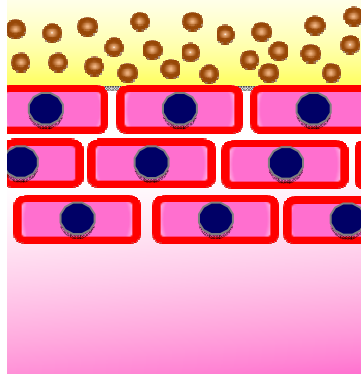
Damaged



rTiO₂

Epidermis

Subcutaneous
tissue



Penetration

No

No

No

No

Carcino-genesis

No

No

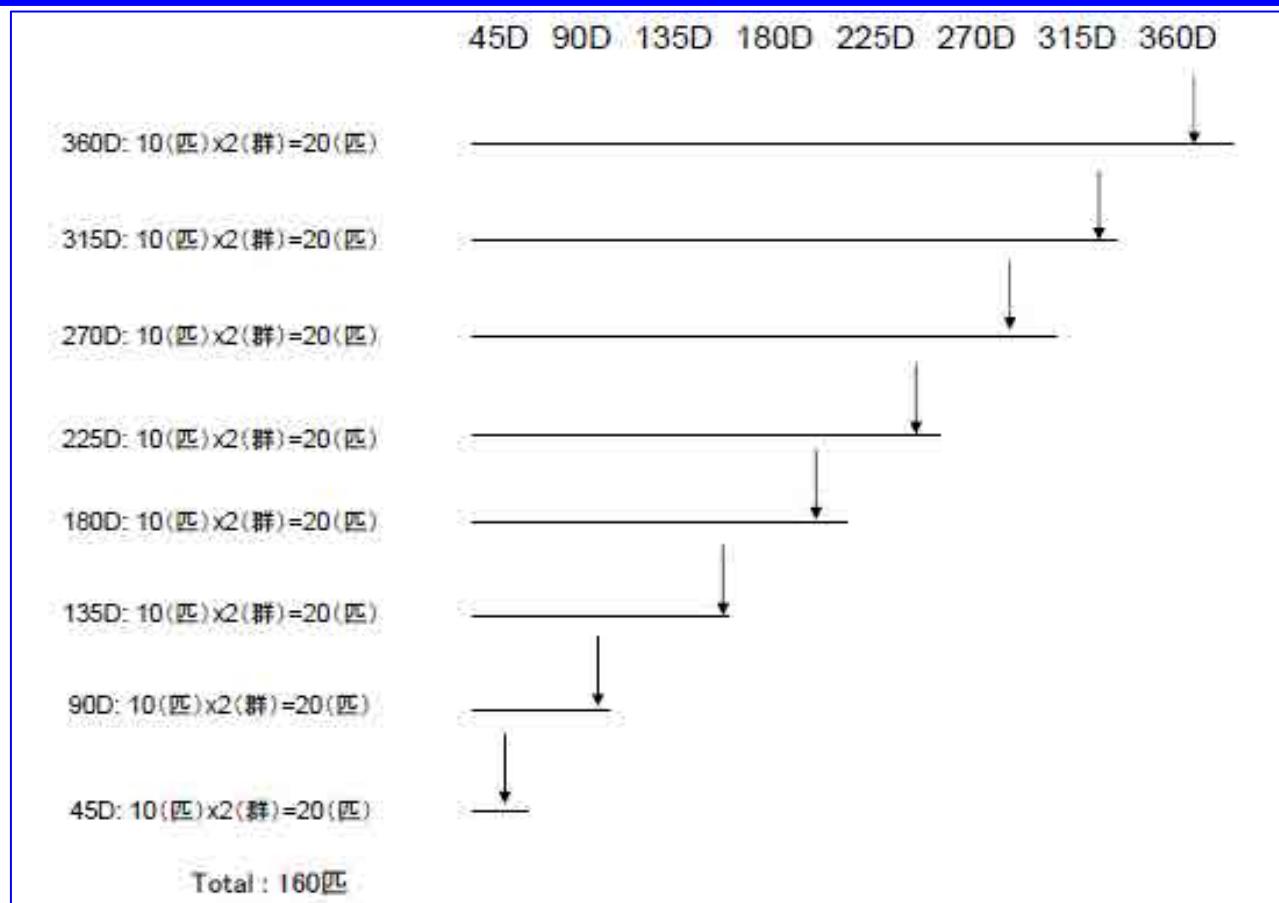
No

No

- Mesothelin assay study
 - Mesothelin assay kit
 - Serum
 - ELISA kit for Human/ Rat/ Mouse
 - Developed by Dr. Okio Hino
- Animal study (one year, p53+/- mice)
 - by Division of Cellular and Molecular Toxicology, NIOSH

マウスmesothelin測定実験@NIHS/Tox

- ・動物 : 雄C57BL/6 backのp53+/- マウス、10匹/群で8群構成
- ・投与 : MWCNT(10 μ g/animal) Taquann法 & Vehicle control 各単回腹腔内投与
: 生食注に懸濁、オートクレーブ、最終濃度0.1% のtween 80を添加後、sonicationする。
- ・解剖 : 投与後45日間隔で1年まで
- ・採取-測定 : 血清mesothelin測定、病理組織学的検査



まとめ

1. 人(や動物で)の過去の知見から想定される毒性影響を基盤とした試験法開発と評価
 - ・繊維発がん: 腹腔内投与(モデル系)
 - ・全身分布による影響: 腹腔内投与≒フィルタ付き静脈注射
2. 人(や動物で)の過去の知見がない場合
 - 人に想定される暴露経路(*)による動物実験

→ハザード同定
→メカニズム同定(推定)
→実験動物における用量作用関係

人に対する毒性と用量作用関係の想定

*: 吸入(全身、気管内)、経皮、経口

μm -MWCNT
Fullerene whiskers

まとめ

μm -MWCNT
 C_{60}
etc

試験法

1. 人(や動物で)の過去の知見から想定される暴露経路による
開発と評価

- ・繊維発がん: 腹腔内投与(モデル系)
- ・全身分布による影響: 腹腔内投与ニフィルタ付き静脈注射

2. 人(や動物で)の過去の知見がない場合

- 人に想定される暴露経路(*)による動物実験

TiO_2
 ZnO
 μm -MWCNT
Shorter MWCNT
Other CNT
Nano Metals
Fullerene whiskers
Etc.

- ハザード同定
- メカニズム同定(推定)
- 実験動物における用量作用関係

人に対する毒性と用量作用関係の想定

*: 吸入(全身、気管内)、経皮、経口

今後の物質

今後の物質

- CNTs
- TiO₂
- ZnO
- Ag, An, Zn
- Graphen
- Nano-Cellulose
- others

- NM with Specific Affinity
 - DNA/RNA
 - Protein
 - = enzyme inhibition
 - = antibody-like
 - = amyloid/ prion-like

Aptamer-conjugated

END