

研究開発項目③
「工業ナノ粒子の有害性評価手法の開発」

生体影響プロファイルの作成・評価手法の開発
(in vitro試験・OMICS解析)

実施体制
(独)産業技術総合研究所
健康工学研究部門

生体影響プロファイルの作成・評価手法の開発

研究開発項目		実施機関	
①工業ナノ粒子のキャラクターゼーション手法の開発	(1)工業ナノ粒子の調製技術の開発	ア) 気中分散系調製技術開発	広島大学 大学院 工学研究院
		イ) 液中分散系調製技術開発	産総研-環境管理技術研究部門 産総研-ナノシステム研究部門 北海道大学 大学院 地球環境科学院
		ウ) 工業ナノ粒子のフィルタ捕集効率の評価手法の開発と評価	金沢大学 大学院自然科学研究科
	(2)媒体中における工業ナノ粒子のキャラクターゼーション手法の開発	ア) 気中粒子計測技術開発	産総研-計測標準研究部門 産総研-先進製造プロセス研究部門 金沢大学 大学院自然科学研究科
		イ) 液中粒子計測技術開発	産総研-計測標準研究部門
		ウ) 電子顕微鏡によるナノ粒子のキャラクターゼーション技術開発	産総研-計測フロンティア研究部門
		エ) 微量試料に対する化学分析技術開発とナノ粒子の体内分布の測定	産総研-環境管理技術研究部門
	②工業ナノ粒子の暴露評価手法の開発	(1) 排出シナリオの構築	産総研-安全科学研究部門
(2) 環境中挙動モデルの構築		産総研-環境管理技術研究部門	
(3) 暴露評価技術の開発		産総研-安全科学研究部門	
③工業ナノ粒子の有害性評価手法の開発	(1)工業ナノ粒子有害性評価試験の開発	ア) 吸入暴露試験法の開発と試験の実施	産業医科大学 産業生態科学研究所
		イ) 経皮暴露による皮膚形態学的影響の評価	鳥取大学医学部
		ウ) 生体影響プロファイルの作成・評価手法の開発	産総研-健康工学研究部門
		エ) ESRイメージング技術による生体内酸化還元能への影響評価手法の開発	産総研-計測フロンティア研究部門
	オ) ナノ粒子の全身影響の観点からの有害性影響評価法の開発	信州大学医学部	
	(2) 吸入暴露試験装置の開発	広島大学 大学院工学研究院	
(3) 有害性評価試験結果の外挿に関する研究	産総研-安全科学研究部門		
④工業ナノ粒子のリスク評価及び適正管理の考え方の構築	(1) 工業ナノ粒子の詳細リスク評価	産総研-安全科学研究部門	
	(2) ナノテクノロジーの社会的受容性に関する研究	産総研-安全科学研究部門	

紹介する項目の目標達成状況

研究開発項目	目標	達成度
(③ (1) ウ) 生体影響プロファイルの作成・評価手法の開発	生体影響プロファイルの作成・評価手法の開発のために、in vitro試験、in vivo試験共に、選定された工業ナノ粒子について、生物学的特徴、酸化ストレスマーカー、網羅的遺伝子発現解析等をまとめる。また、プロファイルの作成を通して、生体影響メカニズムの検討を行い、さらに、生体影響プロファイルをまとめるために必要であった操作手順を取りまとめて、評価手順マニュアルを完成させる。	○

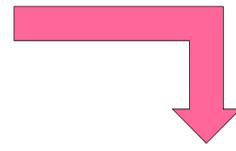
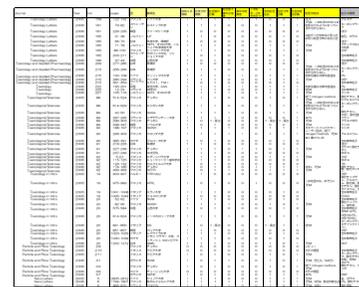
in vitro 試験においては、ナノ粒子の培地分散液の安定性が重要である。ナノ粒子、分散培地中特性の不確実性を克服した上での影響評価を実施する。

評価項目における先入観の排除(網羅的解析)。従来の評価法に加えてゲノミクス解析で網羅的に解析する。

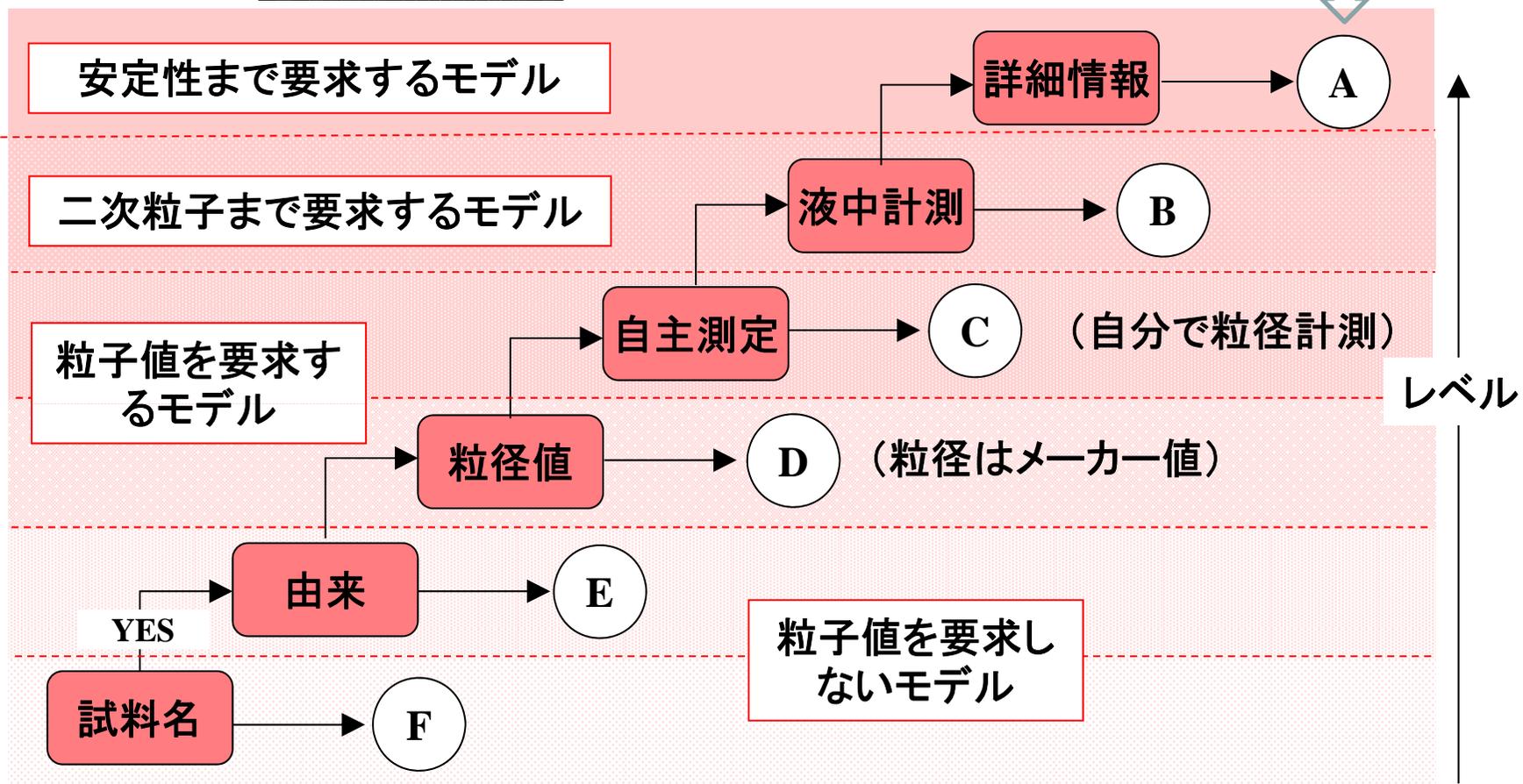
***in vitro* 試験と*in vivo* 試験の結果は一致するのか？**

不確実性を克服(既報論文を精査)

既報論文

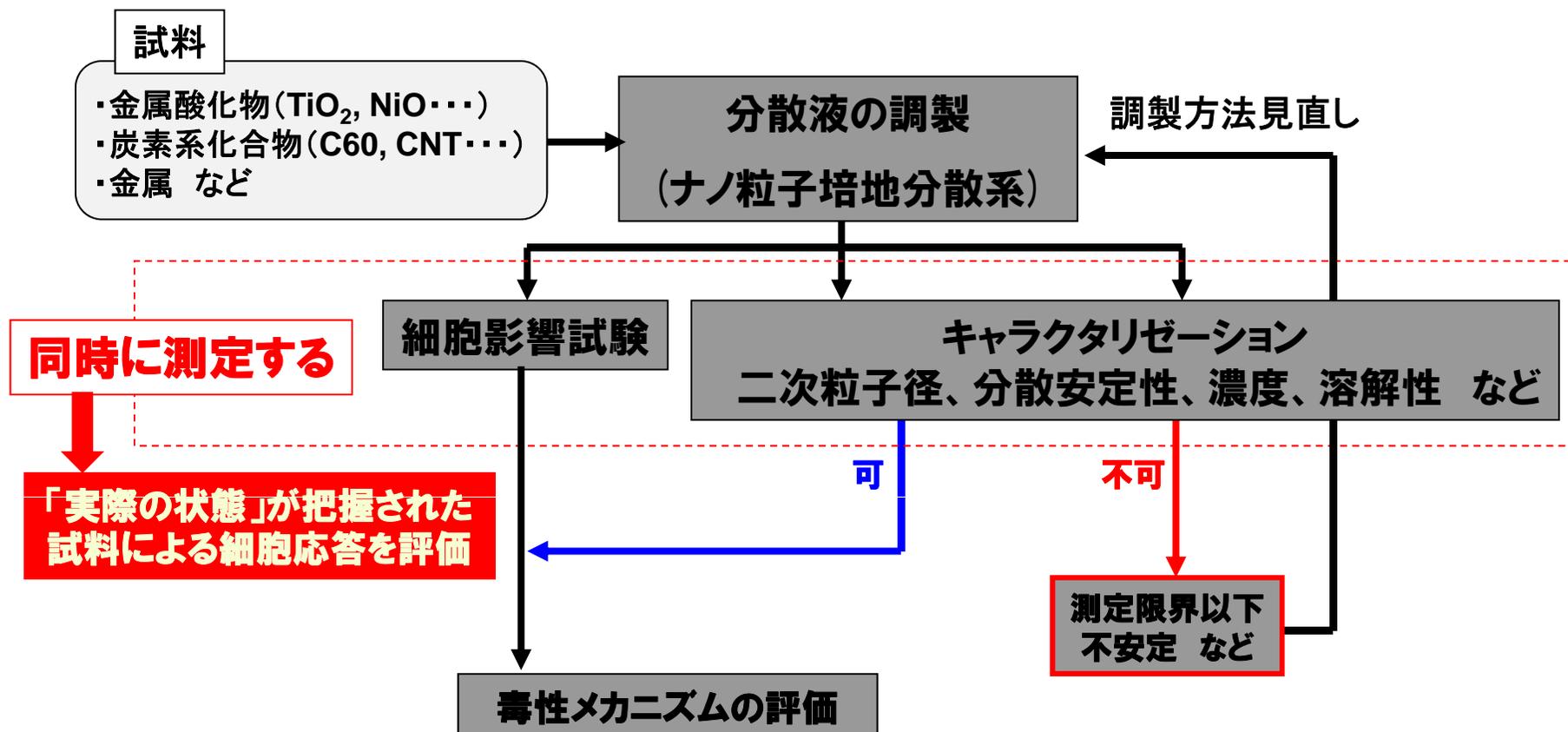


衣笠スタンダード



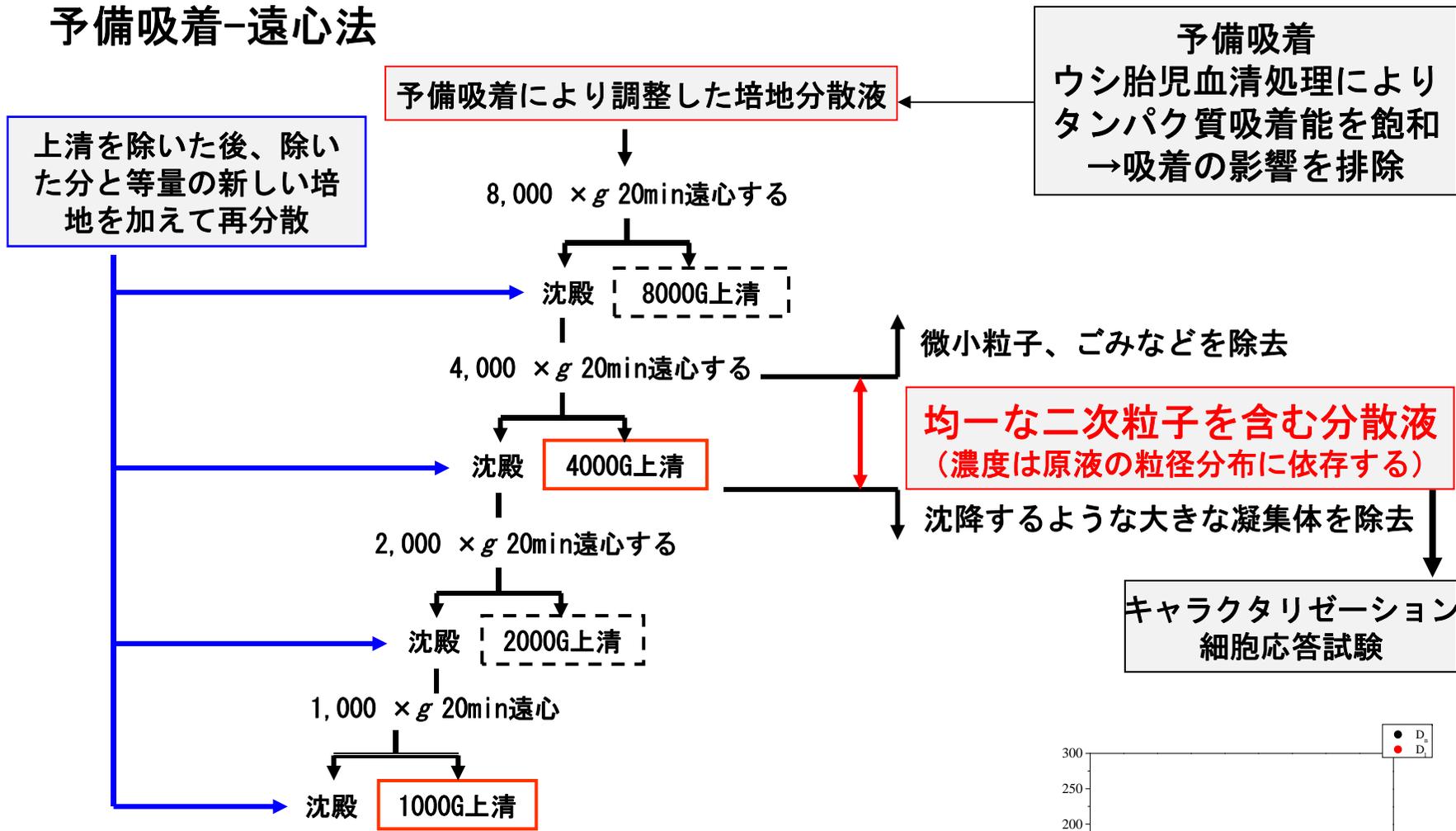
in vitro 試験の方法

キャラクタリゼーションと細胞試験を同期する

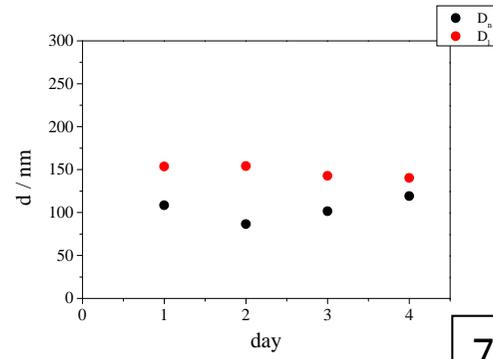


安定で均一な分散液による細胞評価

予備吸着-遠心法



二次粒子レベルで $\leq 100\text{nm}$ の粒子を含む *in vitro* のための安定な分散液を得ることに成功した。

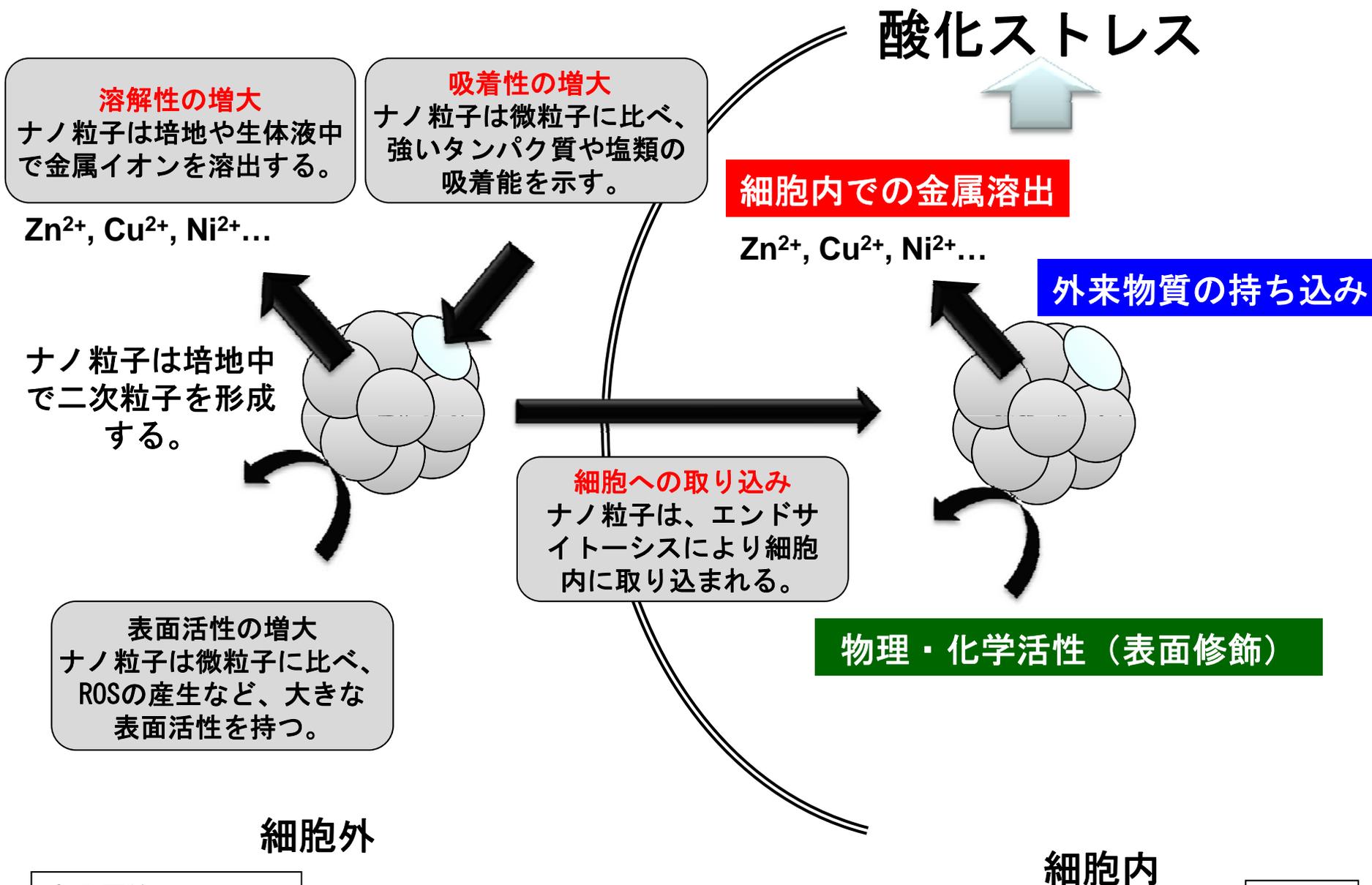


in vitro 試験で検討した工業ナノ粒子 (52種類)

公開

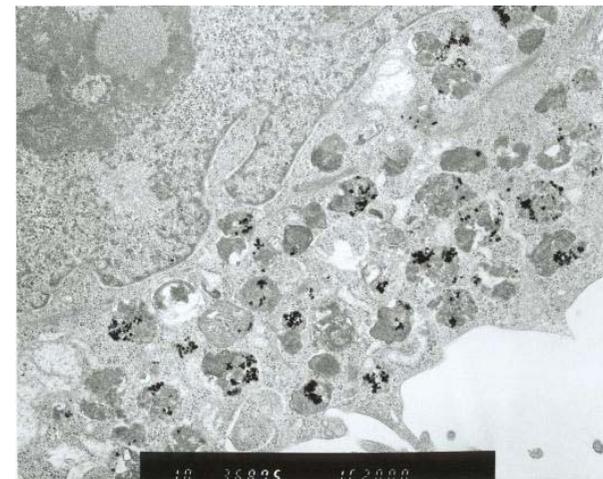
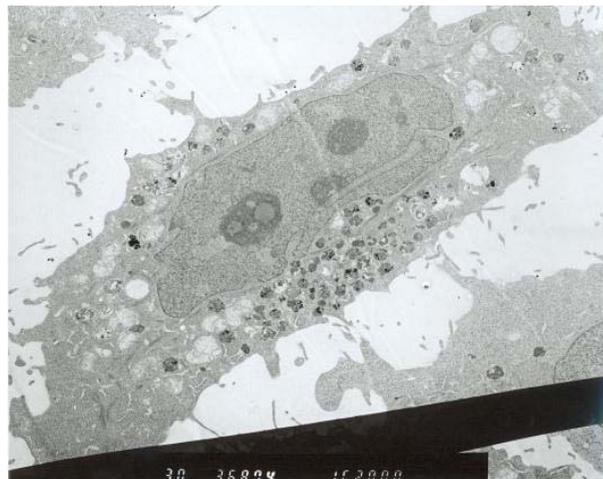
名称	組成式		一次粒子径	比表面積	名称	組成式		一次粒子径	比表面積
1 酸化ニッケル	NiO	黒色	20	50-80	27 酸化ガドリニウム	Gd ₂ O ₃		15-30	30-50
2		緑色	100	>6	28 三酸化アンチモン	Sb ₂ O ₃		15-25	
3 酸化亜鉛	ZnO		21	49.6	29 コバルトブルー	Al ₂ O ₃ ・CoO		40	38
4		(シリカ被覆)	25 (SiO ₂ 3nm)	ND	30 インジウム・スズ酸化物(ITO)			30	30
5 酸化銅	CuO		48	20	31 炭酸カルシウム	CaCO ₃	ロジン酸処	30	52.6
6 酸化コバルト	CoO		22	50	32		ロジン酸処	80	18
7 酸化マグネシウム	MgO		20	<50	33			80	16.3
8 酸化チタン	TiO ₂	アナターゼ	7	316	34 金	Au		3	
9		アナターゼ	20	66.0	35 銀	Ag		30	
10		ルチル	30-50	37.1	36 白金	Pt		<100	13-19
11		ルチル	5-15 × 30-90	134.9	37 パラジウム	Pd		<100	10-15
12		混合	70	19.7	38 白金PVPコロイド	Pt		2	
13 酸化セリウム	CeO ₂		14	61.0	39 金PVPコロイド	Au			
14 酸化スズ	SnO ₂		21	45	40 カーボンブラック			100	
15 酸化ジルコニウム	ZrO ₂		20-30	30-60	41 フラーレンC60	C60			
16 酸化ケイ素	SiO ₂	非晶質	25	110	42 フラーレンC70	C70			
17		非晶質	34	80	43 ナノダイヤモンド	Sample A			
18		非晶質	7	300	44	Sample B			
19 酸化鉄	Fe ₂ O ₃		20-50	>50	45	Sample C			
20 酸化アルミニウム	Al ₂ O ₃		27-43	35	46	Sample D			
21 酸化ビスマス	Bi ₂ O ₃		51	13	47 SWCNT	Sample A			
22 酸化イットリウム	Y ₂ O ₃		33	35	48	Sample B			
23 酸化ランタン	La ₂ O ₃		15-30	20-40	49	Sample C			
24 酸化クロム	Cr ₂ O ₃		60	ND	50	Sample D			
25 酸化モリブデン	MoO ₃		100	ND	51 MWCNT				
26 酸化タングステン	WO ₃		30	ND	52 CNH				

ナノ粒子の性質

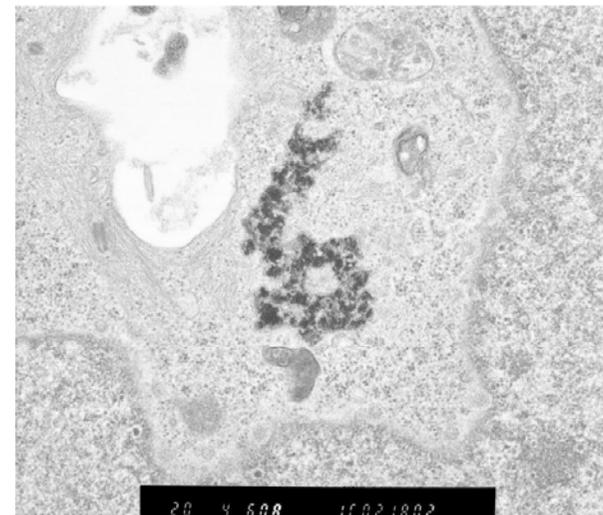


ナノ粒子は細胞内に取り込まれる。

二酸化チタン (TiO_2)



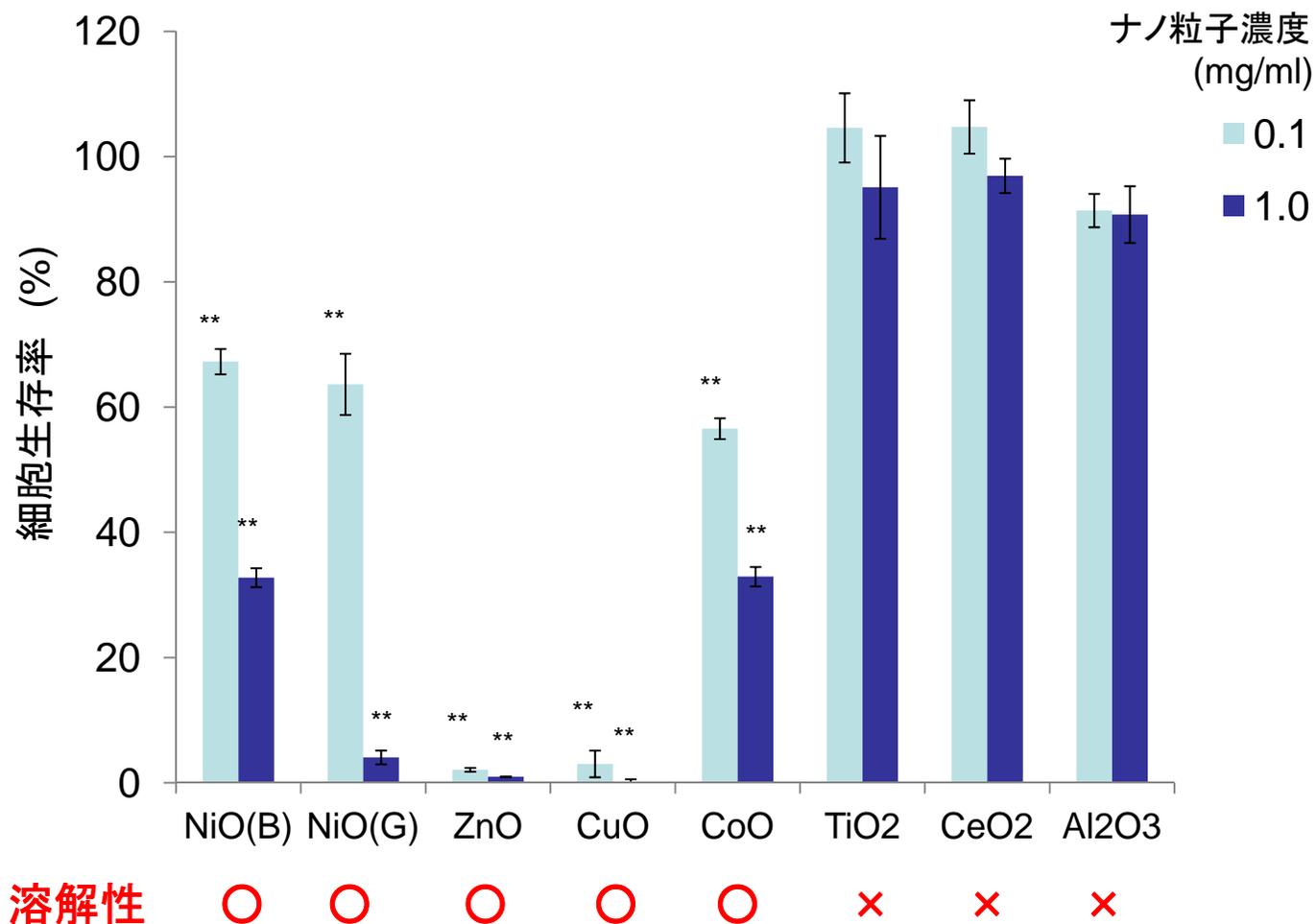
フラーレン (C_{60})



細胞内に取り込まれたナノ粒子の様子

ナノ粒子分散液をヒト皮ふ由来HaCaT細胞に投与、24時間後にTEM観察を行った

金属ナノ粒子は金属イオンを溶出する。

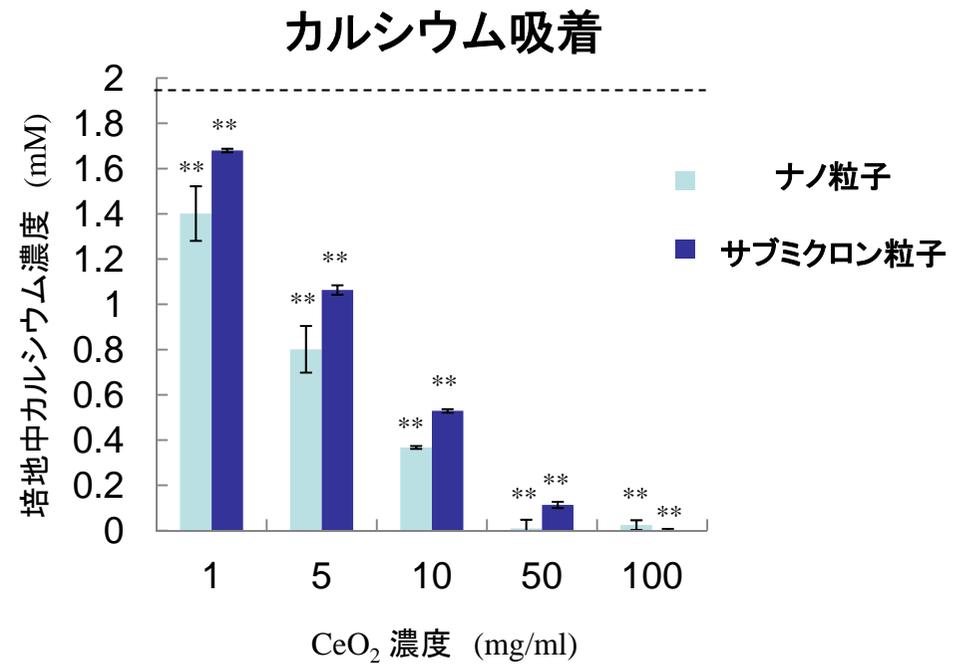
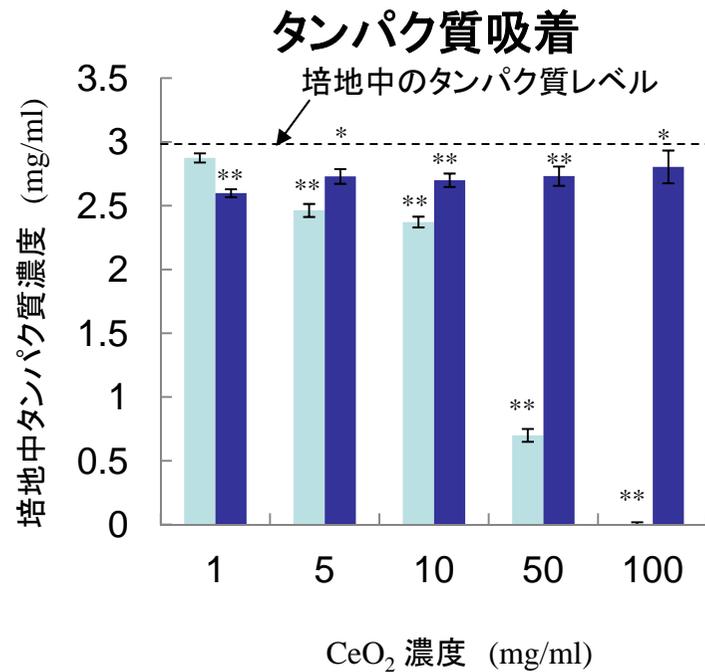


金属酸化物ナノ粒子の細胞生存率への影響

金属酸化物ナノ粒子を培地(10%FBS添加DMEM)に分散しヒト表皮角化細胞由来HaCaT細胞に投与、24時間後にMTT法で細胞生存率を測定した。

ナノ粒子はタンパク質や塩類を吸着する

公開

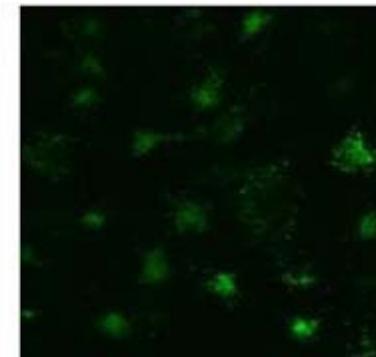


CeO₂ナノ粒子は、培地中に含まれるカルシウムを吸着し、細胞内に取り込まれることで、細胞内カルシウム濃度を上昇させた。

右図は、CeO₂ナノ粒子投与後、カルシウムの存在により緑色蛍光を発する試薬で染めたHaCaT細胞。

コントロール

CeO₂ナノ粒子投与細胞

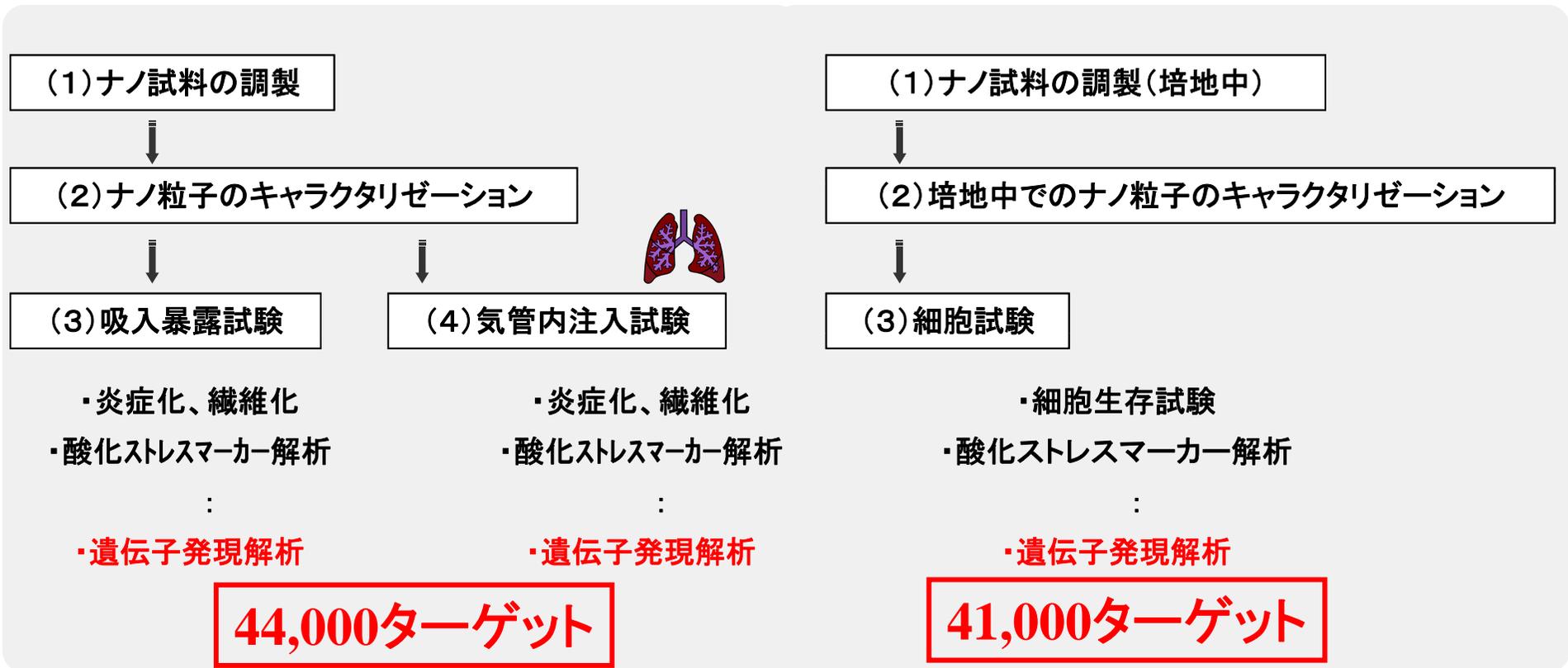


有害性試験(網羅的遺伝子発現解析・OMICS)

公開

インビボ(ラット肺) 

インビトロ(ヒト培養細胞) 



試験に使用したナノ材料

気管内注入試験

#	ナノ材料	用量 (ラット 当たり)	投与後の期間
1	Uf-NiO	0.1mg	6month
2	Uf-NiO	0.2mg	6month
3	C ₆₀ fullerene	0.1mg	6month
4	C ₆₀ fullerene	0.2mg	6month
5	C ₆₀ fullerene	1.0mg	12month
6	SWCNT(N)	0.2mg	12month
7	SWCNT(N)	0.4mg	12month
8	MWCNT (N)	0.2mg	12month
9	MWCNT (N)	1.0mg	12month

吸入暴露試験

	Uf-NiO	C ₆₀ fullerene	SWCNT(N)	SWCNT(A)	MWCNT(N)
Length (um), from number-based distribution*			LD: 0.49 (1.7) HD: 0.70 (1.5)	LD: 0.7 (1.7)	1.1 (2.7)
Mass concentration (mg/m ³) [§]	0.2 ± 0.1	0.12 ± 0.03	LD: 0.08 ± 0.014 HD: 0.40 ± 0.11	LD: 0.03 ± 0.003 HD: 0.13 ± 0.03	0.37 ± 0.18
	LD: (5.0 ± 0.7) x10 ⁴	including Tween-80	including Triton-X	including Tween-80	including Triton-X
		0.5 ± 0.1	LD: 0.66 ± 0.15 HD: 1.38 ± 0.41	LD: 0.085 ± 0.051 HD: 0.42 ± 0.012	0.47 ± 0.18
Particle number concentrations (particles/m ³) [§]	9.2 x 10 ⁴	4.1 x 10 ⁴			

* , Geometric mean length (geometric S.D.); § , Values are expressed as mean ± S.D.

“炎症反応”に関する遺伝子の発現

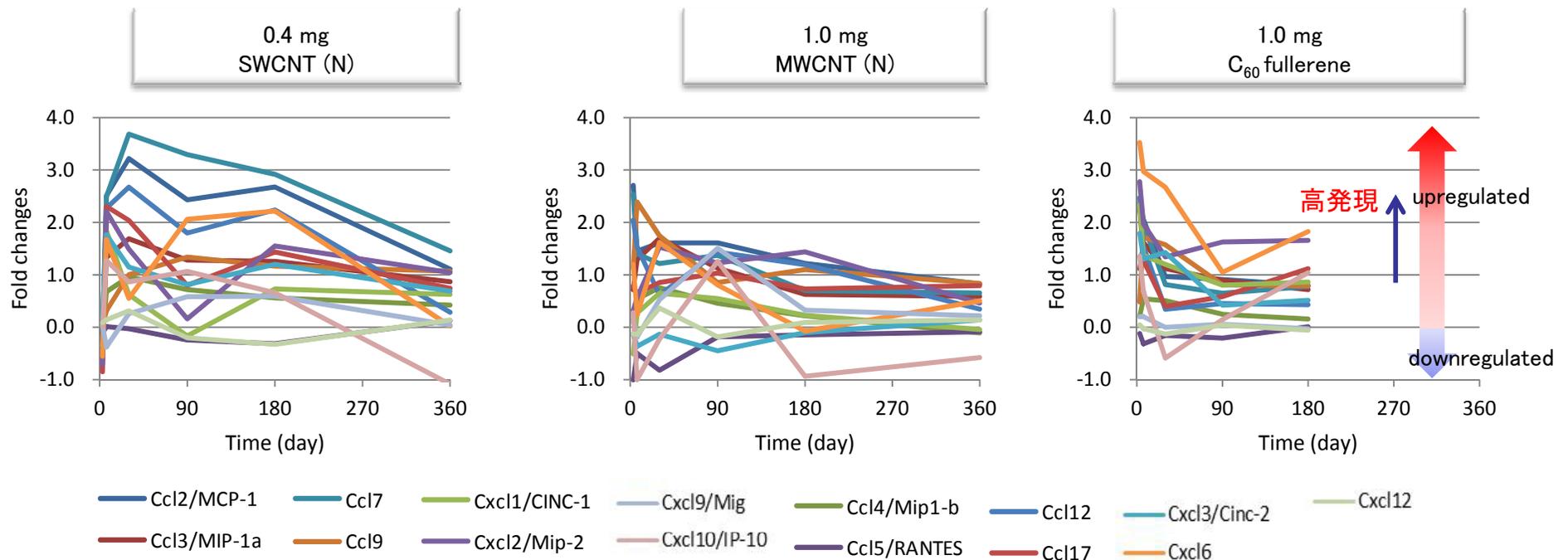
C₆₀ fullerene およびUf-NiO の暴露1カ月後の3日、1カ月

Genbank	Gene name	C60 fullerene		Uf-NiO		Description
		3 days	1month	3 days	1month	
NM 031530	Ccl2/MCP-1	0.5	0.4	2.4	0.8	Chemokine (C-C motif) ligand 2
NM 013025	Ccl3/MIP-1a	0.5	0.3	1.4	0.8	Chemokine (C-C motif) ligand 3
NM 053858	Ccl4/Mip1-b	0.6	0.3	0.8	0.3	Chemokine (C-C motif) ligand 4
NM 031116	Ccl5/RANTES	0.0	0.3	-0.3	0.3	Chemokine (C-C motif) ligand 5
NM 001012357	Ccl9	-0.5	0.3	0.8	1.1	Chemokine (C-C motif) ligand 9
NM_001105822	Ccl12	0.8	1.1	2.0	1.5	Chemokine (C-C motif) ligand 12
NM 057151	Ccl17	-0.7	0.7	1.2	0.6	Chemokine (C-C motif) ligand 17
NM 019233	Ccl20	-0.3	0.1	0.5	0.0	Chemokine (C-C motif) ligand 20
NM 001008513	Ccl21b	-0.7	0.6	0.7	0.4	Chemokine (C-C motif) ligand 21b
NM 030845	Cxcl1/CINC-1	0.8	-0.2	2.6	0.5	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1
NM 053647	Cxcl2/Mip-2	0.7	0.3	3.2	0.5	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2
NM 138522	Cxcl3/Cinc-2	-0.2	0.6	0.3	1.0	Chemokine (C-X-C motif) ligand 3
NM 145672	Cxcl9/Mig	0.1	0.1	-0.3	-1.0	Chemokine (C-X-C motif) ligand 9
NM 139089	Cxcl10/IP-10	0.0	-0.2	-0.5	-0.2	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10
NM_001033883	Cxcl12	0.0	0.3	0.4	0.5	Chemokine (C-X-C motif) ligand 12

Numerical values represent gene expression fold change compared to control levels.

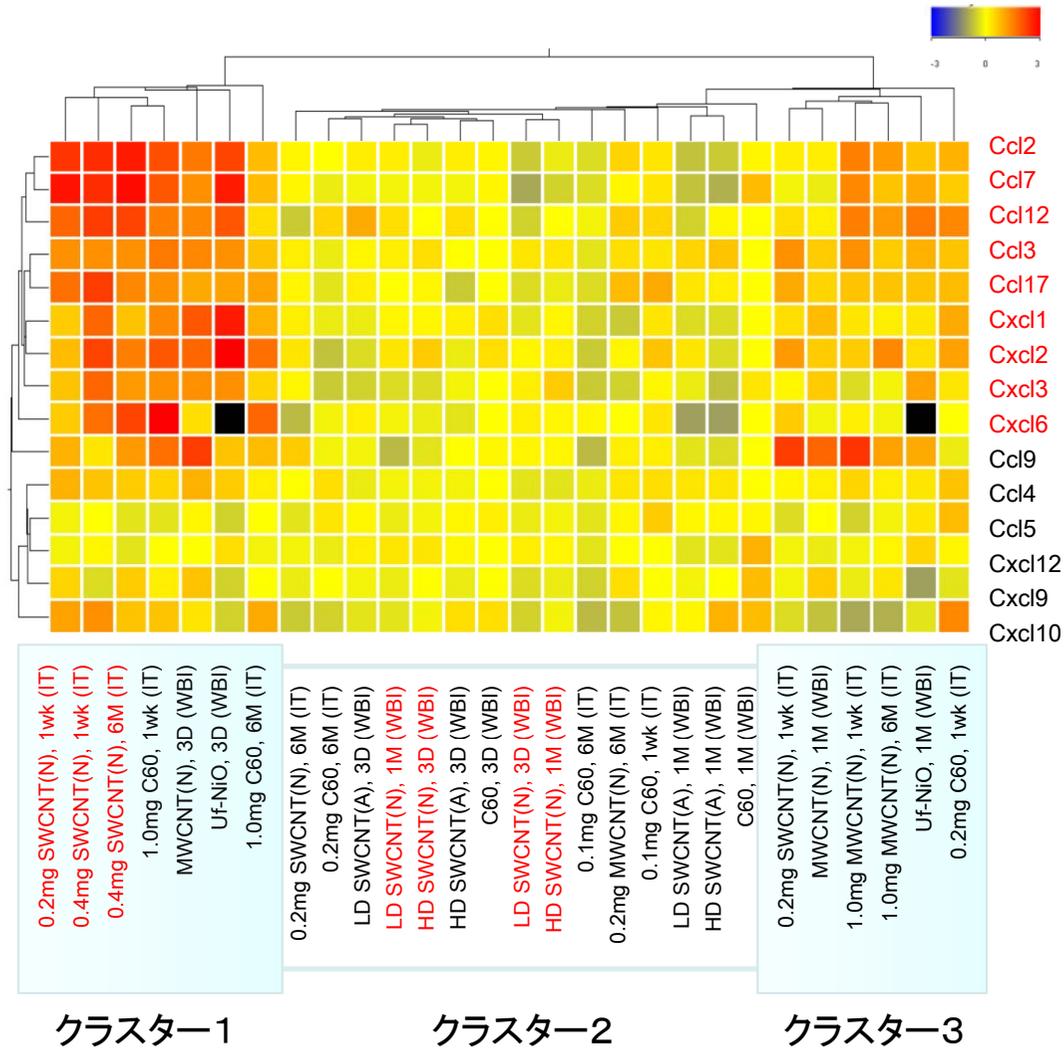
Fujita *et al.*, Toxicology 258 (2009) 47-55

“炎症反応”に関する遺伝子群の発現比較 (SWCNT, MWCNT, C₆₀フラーレン)



- 0.2mg Uf-NiO: 6か月後では、炎症は収束した(BALF中のマクロファージ数、肺中のサイトカインの結果を一致; Morimoto et al., Nanotoxicology, 2010)。
- 0.4mg SWCNT(N)は、投与3日目から、有意な高発現した。投与後6ヶ月後においても、有意な高発現が持続することを見出した。

炎症反応 (ケモカイン) に関する遺伝子発現からみた各処理群の比較



(1) SWCNT(N)

- ・気管内投与群 (IT) : 顕著な高発現が認められた。持続的な炎症反応を引き起こす条件と考える。
- ・吸入暴露群 (WBI) : 高発現は認められない。設定暴露条件(低用量: 0.03 ± 0.003 、高用量: $0.13 \pm 0.003\text{mg}/\text{m}^3$)が低いものと推察する(肺組織への取り込み分析結果との比較検討が必要)。

⇒試験条件(取り込み量)にかい離があると考え。

(2) 吸入暴露群 (WBI)

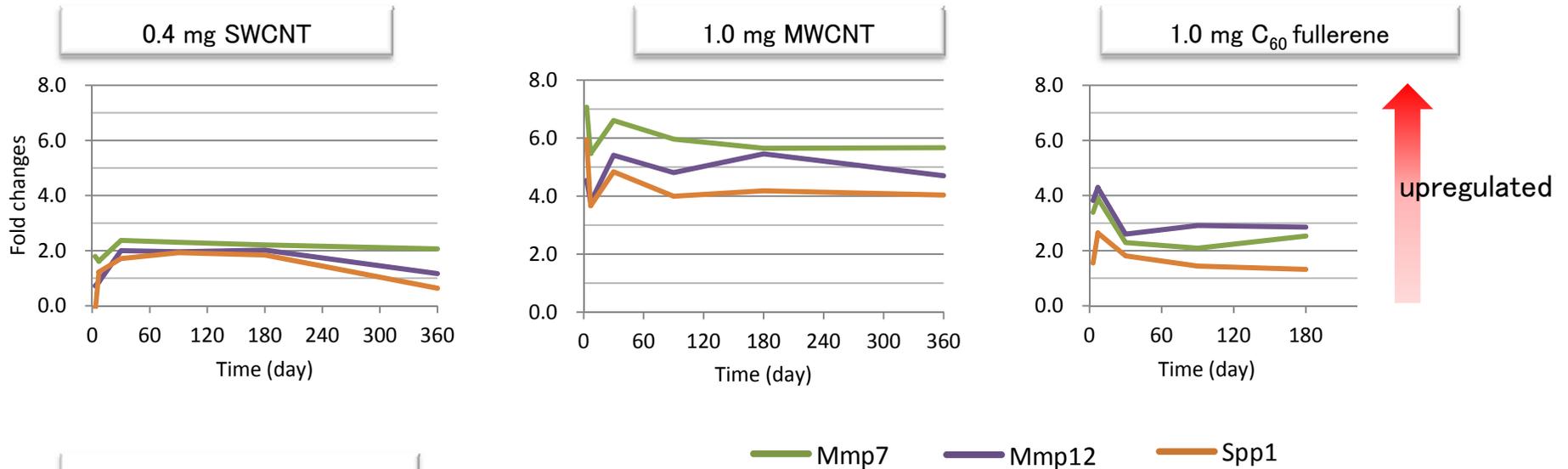
SWCNT(A), SWCNT(N), NWCNT(A), C₆₀ フラーレンに高発現は認められない(クラスター2)。

⇒BALF中の好中球の増加や組織観察 (NOAELの根拠) などの結果と一致する。

(3)数種のケモカイン (Ccl2, Ccl7, Ccl12, Ccl3, Cxcl17, Cxcl1, Cxcl2, Cxcl3, Cxcl6) を、炎症反応を示すマーカー遺伝子候補として選定することができた。

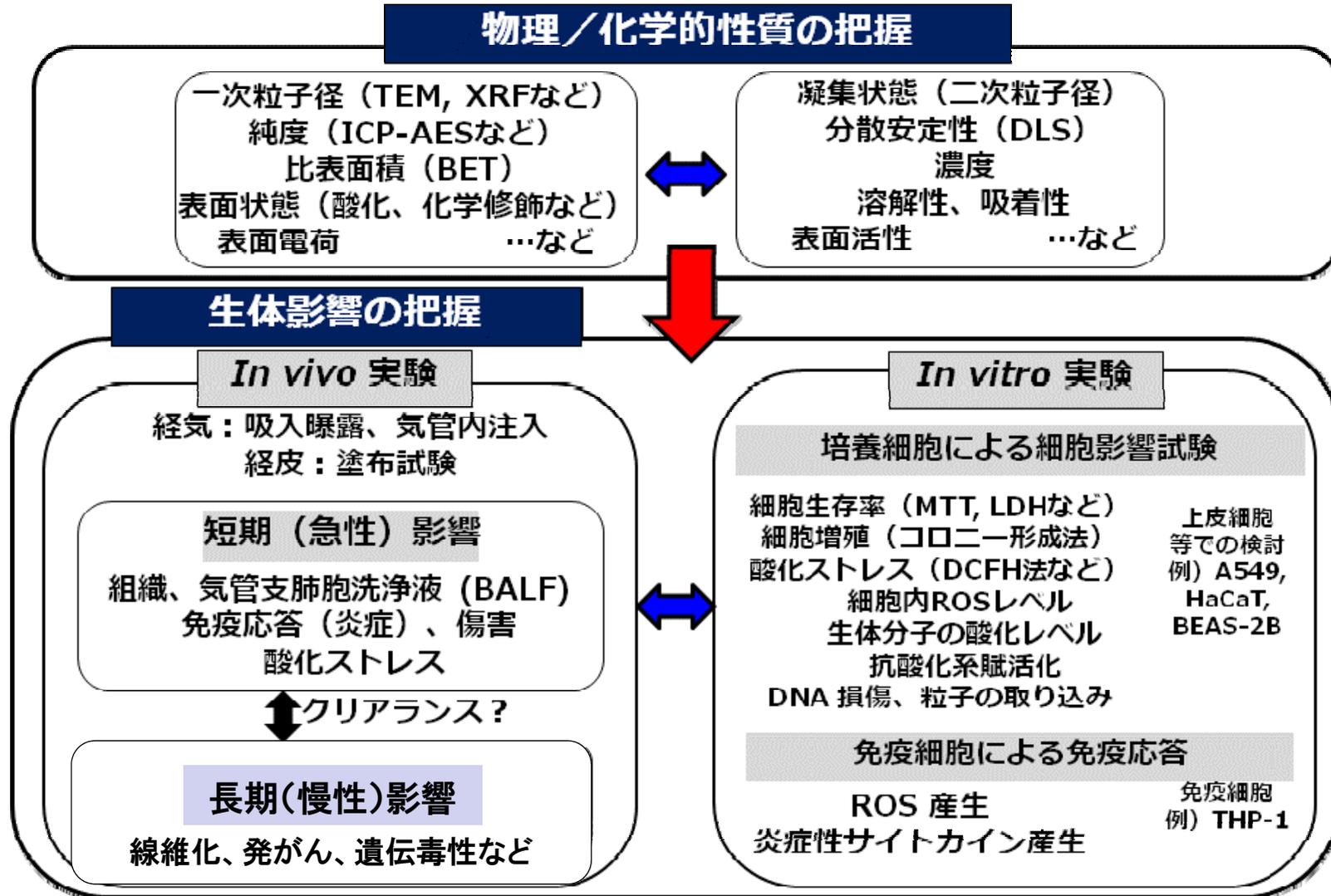
Mmp7、Mmp12 (細胞外マトリックス分解に関与) やSpp1の発現比較
(SWCNT, MWCNT, C60フラーレン , Uf-NiO)

公開



1. 0.2mg Uf-NiOでは、投与6か月で発現レベルが減少した。
2. 0.4mg SWCNT、1.0mg MWCNT、1.0mg C60投与後の長期間において、持続的に有意な高発現することを見出した。
3. 生体影響評価には、急性炎症とは異なる中長期のエンドポイントの観察が必要であることを示唆している。
4. 網羅的な遺伝子発現解析 (OMICS)は、ナノ材料などの新規化学物質のエンドポイントを探索する手法として有用である。

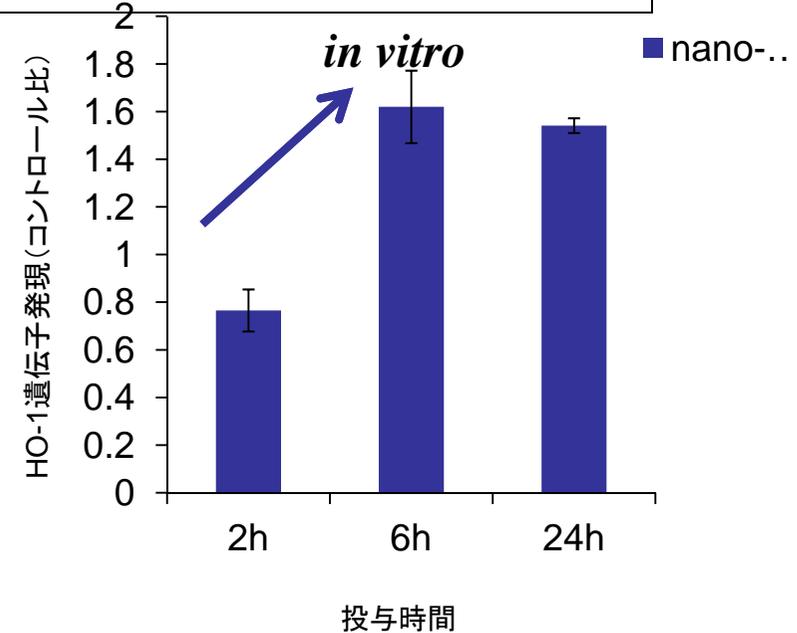
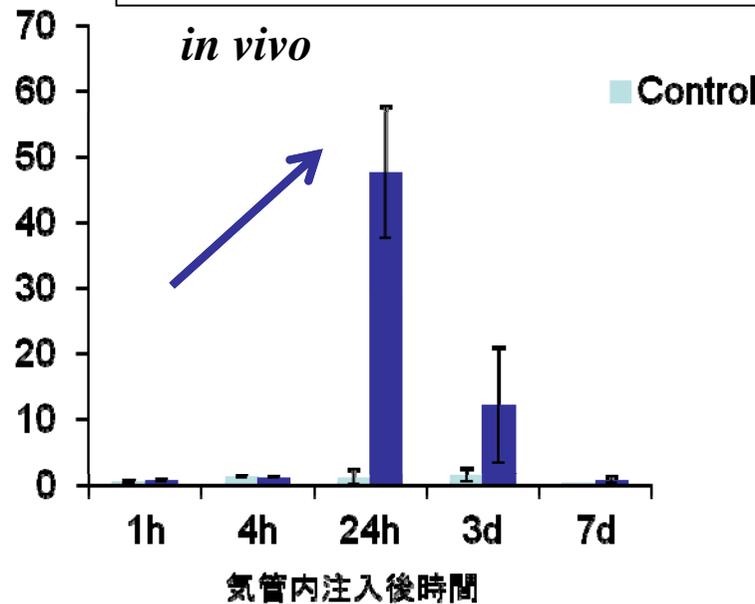
ナノ粒子生体影響評価試験のデザイン



急性期、「肺傷害」と「酸化ストレス負荷」は相関

公開

抗酸化系活性化の比較(酸化ストレス応答タンパク質HO-1の発現)



ラット気管内注入 (*in vivo*)

肺傷害 (LDH漏出)	+
抗酸化系活性化	+
脂質過酸化	+

培養細胞 (*in vitro*)

細胞傷害 (LDH漏出)	+
抗酸化系活性化	+
脂質過酸化	+

・成果の普及

学術論文や学会発表で成果を普及
学術論文約30報(30/100)英語(25/60)

・今後の課題

安定性を確保した影響評価の普及。
環境への影響。
長期的影響。

吸着性と溶解性

(重量、分子数、比表面積、吸着量、1次粒子径、2次粒子径、粒径、粒子形状、長さ、イオン化傾向)

(ナノ粒子の構成元素、吸着物質、不純物、副産物、触媒、等)