ミニ特集 第82回日本衛生学会
繊維・粒子状物質研究会

工業用ナノ材料の有害性評価 —NEDOプロジェクトの報告—

森 本 泰 夫

産業医科大学産業生態科学研究所呼吸病態学

Pulmonary Toxicity of Manufactured Nanomaterials —Report of NEDO Project—

Yasuo MORIMOTO

Department of Occupational Pneumology, University of Occupational and Environmental Health, Japan

Abstract We introduced the report on the pulmonary toxicity of manufactured nanomaterials as a national project in Japan conducted by the New Energy and Industrial Technology Development Organization (NEDO project). Well-characterized and well-dispersed industrial nanomaterials were used in this project. Using multiwall carbon nanotubes (MWCNTs), we conducted intratracheal instillation and inhalation studies. At a low dose (0.2 mg/rat) and a high dose (1 mg/rat) of almost individual MWCNTs, transient and persistent inflammatory responses were induced in the lungs following intratracheal instillation. Well-dispersed MWCNTs at a low concentration (0.37 mg/m³) did not induce pulmonary inflammation. Using single-wall carbon nanotubes (SWCNTs), we also conducted both studies. At low (0.2 mg/rat) and high doses (0.4 mg/rat) of well-dispersed SWCNTs, persistent inflammatory responses were induced in the lungs following intratracheal instillation. Well-dispersed MWCNTs at low and high concentrations (0.03 mg/m³ and 0.13 mg/m³, respectively) did not induce pulmonary inflammation. On the basis of these data from mainly inhalation studies, the acceptable exposure concentration of carbon nanotubes is proposed to be 0.03 mg/m³ in Japan.

Key words: nanomaterial (ナノ材料), carbon nanotube (カーボンナノチューブ), rat (ラット), lung (肺)

1. ナノ粒子の物理化学的特性による有害性仮説

ナノ粒子の物理化学的特性に基づいた有害性仮説（パラダイム (paradigm)）には、大きく2つのパラダイムがある（1）（Fig. 1）。ひとつはナノ粒子パラダイムで、もうひとつはファイバーパラダイムである。ナノ粒子パラダイムは、粒子が小さいほど、つまり粒子の比表面積が

大きくなるほど肺の障害性が強くなる仮説であり、Oberdörsterらの報告（1）で代表される。彼らは、一次粒径がサブミクロンサイズとナノサイズの二酸化チタンをラットに気管内注入し、肺炎症を検討した結果、同一重量用量では、比表面積の大きい粒子（ナノ粒子）が比表面積の小さい粒子（サブミクロン粒子）より肺への好中球の浸潤が多いことが示された（1）。さらに、これらの粒子を比表面積に換算すると、粒子のサイズにかかわらず、粒子の比表面積と気管支肺胞洗浄液（bronchoalveolar lavage fluid (BALF)）の好中球比率は直線上の相関を示すことが認められた（1, 2）。つまり、工業用ナノ材料自体の比表面積が多いほど、動物ばく露試験において好中球浸潤が多くなる。また、この比表面積の検討は、二酸化チタン、カーボンブラックを含めた6種の異なる物質

受付 2012 年 4 月 7 日, 受理 2012 年 4 月 19 日
Reprint requests to: Yasuo MORIMOTO
Department of Occupational Pneumology, University of Occupational and Environmental Health, Japan, Yahata-nishiku Iseigaoka 1-1, Kitakyushu, Fukuoka 807-8555, Japan
TEL: +81(93)691-7136, FAX: +81(93)691-4284
E-mail: yasuom@med.uoeh-u.ac.jp

Fig. 1 Hypothesis of pulmonary disorder induced by manufactured nanomaterials.

で長期吸入ばく露試験の結果でも行われており、比表面積は肺腫瘍発生率とも相関した。このように粒子の比表面積が、肺の反応性を規定するというナノ粒子パラダイムを支持する報告は多くある (3)。

一方、ファイバーパラダイムは、Poland らの報告に代表される (4)。multi-walled carbon nanotube (MWCNT) の腹腔内注入試験を行い、短い繊維は、ほとんど炎症は認められなかったが、長い繊維 (15 μm 以上) が腹腔内の炎症細胞の浸潤や肉芽腫形成を引き起こした。長さに関する研究は、従来から石綿など繊維状物質の研究が行われており、同じ構成成分であるならば、繊維状物質が粒子状物質よりも肺の障害性が大きいことが報告されている (5)。しかし、このように生体影響に関わるいくつかの物理化学的特性が報告されているが、必ずしも独立したパラダイムではない。たとえば、比表面積が大きいのは、長い繊維より短い繊維であるため、ナノ粒子パラダイムでは短い繊維の炎症誘発性が大きいことになる。しかし、ファイバーパラダイムでは長い繊維が炎症・線維化能をもっており、両パラダイムは、逆の関係にある。どちらのパラダイムが有害性評価に有用であるかを検討しなければならないが、大きな障壁がある。ナノ粒子の凝集能である (6, 7)。ナノ材料は凝集能が高く、塊状化しやすいので、正確な比表面積が測定できないことが十

分に考えられる。現状において、一つのパラメーターで、すべての事象を説明できるものはない。これらの観点も踏まえて、分散した工業用ナノ材料を用いることは、真のナノ粒子の有害性評価やパラダイムの有用性において重要である。

2. 有害性試験のエンドポイント

対象物質の有害性に係わるエンドポイントは、ターゲットとなる有害性により様々である。ここでは、工業用ナノ材料の腫瘍発生能を有害性と捉え、肺腫瘍発生に係わるエンドポイントを検討した。このエンドポイントは、ばく露からの観察期間により異なる (Fig. 2)。大きく分類すると、急性期から亜慢性期までは炎症と線維化、慢性期では腫瘍発生率となり、前 2 者は、病態の持続性の有無が評価に重要である。この根底には、肺の腫瘍発生には、持続的な炎症・線維化が存在することが考えられる。Table 1 は慢性吸入性ばく露試験における肺病変の関連を示している。クロシドライトやアモサイトなどのアスベストは、有害性の高い繊維として知られており、慢性吸入ばく露試験にて、炎症・線維化、腫瘍も発生している。一方、slag wool や HT stone wool のように有害性の低い繊維は、肺内に病変を認めていない。さらに注意深く観察すると肺に炎症・線維化を起こしたもののから腫瘍が発生しており、肺の持続的な炎症・線維化が腫瘍の前駆病変と考えられる。

3. 多層カーボンナノチューブ

New Energy and Industrial Technology Development Organization (NEDO) プロジェクトでは、MWCNT の有害性評価試験として気管内注入試験と吸入ばく露試験が行われた。まず、気管内注入試験においては、2 報が報告されている (8, 9)。著者ら (8) は、気管内注入用の懸濁液の作成するために MWCNT を固化分散法後、ろ過を行い、

Fig. 2 Endpoint of pulmonary disorder in intratracheal instillation and inhalation studies.

Table 1 Pathological finding in chronic inhalation studies. There are a relationship of the persistent inflammation/fibrosis and the lung tumor

繊維	肺病変 (長期吸入試験)	
	炎症・線維化	腫瘍
アモサイト石綿	+	+
クロシドライト石綿	+	+
マイクログラスファイバー	+	+
セラミック	+	+
475 グラスウール	+	+ / -
ロックウール	+	-
901 グラスウール	-	-
ニューファイバー	-	-
グラスウール	-	-
スラグウール	-	-
HT ニューファイバー	-	-

ろ液 (0.05% Triton 含有蒸留水) を回収した。この液相中に MWCNT がほぼ単分散していることを透過型電子顕微鏡で確認した。MWCNT 0.2 mg (0.67 mg/kg), 1.0 mg (3.3 mg/kg) を Wistar 系雄性ラットに気管内注入し、3 日後から最大 6 ヶ月後まで肺の炎症を検討した。低用量群では、肺炎症は、一過性であったのに対し、1 mg/kg ばく露群においては肺胞腔内における好中球、好酸球、肺胞マクロファージの肺胞・間質浸潤等が観察期間を通して持続的な炎症として確認された。好中球のケモカインである cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC) ファミリーにおいても、高用量群で持続的に発現亢進を示した遺伝子を認め、低用量群では一過性であった。また、酸化ストレスマーカーとして考えられる heme oxygenase-1 (HO-1) 遺伝子発現も高用量において持続的に亢進し、低用量では亢進を認めなかった。Kobayashi らの報告 (9) では、MWCNT (径 60 nm, 長さ 1.5 μ m) を 0.04 mg/kg, 0.2 mg/kg, 1 mg/kg の用量でラットに気管内注入を行い、最大 3 ヶ月において肺の炎症を検討した。0.04 mg/kg では炎症を認めず、0.2 mg/kg, 1 mg/kg では一過性の炎症を認めた。前述の著者らの報告では、0.67 mg/kg では一過性、3.3 mg/kg では持続性の炎症を認めており、両試験における用量反応性に整合性が認められた。

吸入ばく露試験においても、著者ら (8) は、気管内注入試験で注入した MWCNT 懸濁液を用いた。つまり、両試験において同一の MWCNT を用いた。この分散液を気中に噴霧することで、非常によく分散 (多くは孤立分散した状態で存在) した MWCNT を気中に噴霧することに成功した。湿式法によって CNT を気中へ噴霧した吸入ばく露実験は、現時点では他には存在しない。ラットに MWCNT を 1 ヶ月間 (1 日 6 時間, 週 5 日間, 4 週間) の吸入ばく露を行った。ばく露チャンパー内における MWCNT の重量濃度は $0.37 \pm 0.18 \text{ mg/m}^3$ (幾何平均径 63 nm (1.5), 幾何平均長さ 1.1 μ m (2.7)) であった。なお、チャンパー内の MWCNT のうち 7 割が単離できていることが確認された。ばく露終了後、3 日から 3 ヶ月の観察期間で炎症誘

Fig. 3 Total cell count in bronchoalveolar lavage fluid in rat exposed MWCNTs.

導能を検討した。有意な好中球浸潤は、認めなかった (Fig. 3) が、CINC1-3 の一過性の上昇を認めた。HO-1 遺伝子発現も一過性の亢進のみであった。よって、吸入ばく露濃度 0.37 mg/m³ を no-observed adverse-effect-level (NOAEL) とした。

気管内注入試験と吸入ばく露試験により、分散した多層カーボンナノチューブは、炎症誘導能 (持続炎症) をもつことが認められたが、低濃度ばく露では、ほとんど炎症を示さないことが認められた。

4. 単層カーボンナノチューブ (single-walled carbon nanotube (SWCNT))

MWCNT と同様に気管内注入試験と吸入ばく露試験を行ったが、両試験におけるサンプルが異なっている。気管内注入試験では、日機装製、吸入ばく露試験では産業技術総合研究所 (産総研) 製の SWCNT を用いた。

気管内注入試験では、遊星ボールミルにて SWCNT を粉砕後、超音波破碎にて分散し、SWCNT 懸濁液 (0.1% Triton) とした (10)。懸濁液中のバンドルの径は、44 nm, 長さが 0.69 μ m であった。SWCNT 0.2 mg, 1.0 mg を Wistar 系雄性ラットに気管内注入し、3 日から最大 6 ヶ月後まで、肺の炎症を検討した。陰性対照群と比較して SWCNT の低用量・高用量ばく露群とも BALF 及び肺組織においても好中球や肺胞マクロファージの持続的浸潤を認めた。酸化的ストレスマーカーである HO-1 遺伝子は、低用量・高用量において急性期のみならず慢性期でも発現が亢進した。Kobayashi らの報告 (11) では、SWCNT (径 12 nm, 長さ 0.32 μ m) を 0.04 mg/kg, 0.2 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg の用量でラットに気管内注入を行い、最大 3 ヶ月において肺の炎症を検討した。1 mg/kg, 2 mg/kg において持続的炎症を認めた。前述の著者らの報告 (10) では、0.67 mg/kg では一過性、1.34 mg/kg では持続性の炎症を認めており、両試験間で、用量反応性に整合性が認められた。

吸入ばく露試験で用いられた産総研の SWCNT は、構成成分として鉄やニッケルなどの金属をほとんど含まず (鉄含量: 0.0145%) また、アモルファスカーボンの含量

Fig. 4 Total cell count in bronchoalveolar lavage fluid in rat exposed SWCNTs.

Fig. 5 Relationship the inflammatory change and the specific surface area of carbon nanotubes.

は 2.3% 以下であり、非常に pure な繊維であった (12)。この SWCNT を 0.03 および 0.13 mg/m³ の濃度でラットに 1 日 5 時間、週 5 日で 4 週間のばく露を行い、ばく露終了後 3 ヶ月までの肺の影響を検討したが、好中球の集積、炎症、酸化ストレスなどの影響は認められなかった (Fig. 4)。

以上をまとめると、SWCNT の肺毒性は、MWCNT と同様に気管内注入試験では持続性炎症を認めたが、吸入ばく露試験においては、炎症反応がほとんど認められない低濃度レベルも存在することが認められた (NOAEL; 0.13 mg/m³)。

5. 許容ばく露濃度

カーボンナノチューブにおいては、単層と多層の区別なくカーボンナノチューブとして、OEL は 0.03 mg/m³ が NEDO プロジェクトによって提案されている (13)。この値は、両吸入ばく露試験のデータから、呼吸量、ばく露

時間、沈着率、種間の体重差によって補正を行い、不確実係数によって除している。カーボンナノチューブの炎症活性が比表面積に依存するというデータから、本値は比表面積 1,000 m²/g の SWCNT について得られた値を採用しており、比表面積のより低い MWCNT についても適用することでより安全性の高い数値となるという考え方による (Fig. 5)。また、中西らによる値は、現在も有害性評価が進行中であることから 10 年程度で見直されるものであり、「作業環境における許容ばく露濃度 (時限)」とされている。

6. 終わりに

許容ばく露濃度の提案においても、吸入ばく露試験の果たす役割は大きい。しかし、すべての工業ナノ材料に吸入ばく露試験を行うのは、試験設備や特殊技能が必要であること及びコストの面からも厳しい状況である。新たな経済産業省のプロジェクトにおいては、気管内注入試験の有効利用について研究を行っており、今後の研究に期待したい。

謝 辞

本総説は、NEDO 委託研究、「ナノ粒子特性評価手法の研究開発 (P06041)」や産業技術研究開発「低炭素社会を実現する超軽量・高強度革新的融合材料プロジェクト / ナノ材料の安全・安心確保のための国際先導的安全性評価技術の開発」の部分的サポートによる。

文 献

- (1) Oberdörster G, Ferin J, Gelein R, Soderholm AC, Finkelstein J. Role of the alveolar macrophage in lung injury: Studies with ultrafine particles. *Environ Health Perspect.* 1992;97:193-199.
- (2) Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect.* 2005;113:823-840.
- (3) Heinrich U, Fuhst R, Rittinghausen S, Creutzenberg O, Bellman B, Koch W, Levsen K. Chronic inhalation exposure of Wistar rats and two different strains of mice to diesel engine exhaust, carbon black, and titanium dioxide. *Inhal Toxicol.* 1995;7:533-556.
- (4) Poland CA, Duffin R, Kinloch I, Maynard A, Wallace WAH, Seaton A, Stone V, Brown S, MacNee W, Donaldson K. Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. *Nat Nanotechnol.* 2008;3:423-428.
- (5) Riganti C, Aldidri E, Bergandi L, Tomatis M, Fenoglio I, Costamagna C, Fubini B, Bosia A, Ghigo D. Long and short fiber amosite asbestos alters at a different extent the redox metabolism in human lung epithelial cells. *Toxicol Appl*

- Pharmacol. 2003;193:106–115.
- (6) Morimoto Y, Kobayashi N, Shinohara N, Myojo T, Tanaka I, Nakanishi J. Hazard assessments of manufactured nano-materials. *J Occup Health*. 2010;52:325–334.
- (7) 森本泰夫, 田中勇武. ナノ粒子の有害性評価. 産業衛生学雑誌 2008;50:37–48.
- (8) Morimoto Y, Hirohashi M, Ogami A, Oyabu T, Myojo T, Todoroki M, Yamamoto M, Hashida M, Mizuguchi Y, Lee BW, Kuroda E, Shimada M, Wang WN, Yamamoto K, Fujita K, Endoh S, Uchida K, Kobayashi N, Nakanishi J, Tanaka I. Pulmonary toxicity of well-dispersed multiwall carbon nanotubes in inhalation and intratracheal instillation studies. *Nanotoxicology*, in press. (DOI:10.3109/17435390.2011.594912)
- (9) Kobayashi N, Naya M, Ema M, Endoh S, Maru J, Mizuno K, Nakanishi J. Biological response and morphological assessment of individually dispersed multi-wall carbon nanotubes in the lung after intratracheal instillation in rats. *Toxicology*. 2010;276:143–153.
- (10) Morimoto Y, Hirohashi M, Horie M, Ogami A, Oyabu T, Myojo T, Hashiba M, Mizuguchi Y, Kambara T, Lee BW, Kuroda E, Yamamoto K, Kobayashi N, Endoh S, Uchida K, Nakazato T, Fujita K, Nakanishi J, Tanaka I. Pulmonary toxicity of well-dispersed single-wall carbon nanotubes following intratracheal instillation. *J Nanoparticles Research*, in press.
- (11) Kobayashi N, Naya M, Mizuno K, Yamamoto K, Ema M, Nakanishi J. Pulmonary and systemic responses of highly pure and well-dispersed single-wall carbon nanotubes after intratracheal instillation in rats. *Inhal Toxicol*. 2011;23:814–823.
- (12) Morimoto Y, Hirohashi M, Kobayashi N, Ogami A, Horie M, Oyabu T, Myojo T, Hashiba M, Mizuguchi Y, Kambara T, Lee BW, Kuroda E, Shimada M, Wang WN, Mizuno K, Yamamoto K, Fujita K, Nakanishi J, Tanaka I. Pulmonary toxicity of well-dispersed single-wall carbon nanotubes after inhalation. *Nanotoxicology*, in press. (DOI: 10.3109/08958378.2011.614968)
- (13) 中西準子編. ナノ材料リスク評価書—カーボンナノチューブ (CNT) —最終版: 2011.8.17. NEDO プロジェクト (P06041) 「ナノ粒子特性評価手法の研究開発」, 2011.