

プロジェクト推進における毒性学の役割 ーナノ材料・製品に必要な安全上の配慮についてー

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

kanno@nihs.go.jp

03-3700-9619

背景(1)

- 革新的物質・素材で、過去のものとなってしまったもの
 - アスベスト
 - PCB(ポリ塩化ビフェニール)
 - カドミウム(メッキ)
 -
- 共通点＝体内・環境中で物理化学的に安定性 (biodurability・persistency)
 - 急性毒性が弱い Low acute toxicity
 - 慢性毒性のために使用禁止となった
Banned because of chronic toxicity

背景(1)

- 革新的物質・素材で、過去のものとなってしまったもの
 - アスベスト
 - PCB(ポリ塩化ビフェニール)
 - カドミウム(メッキ)
 -
- 化審法*制定の契機となったPCB
 - 規制の要件(キーワード)
 1. 難分解性
 2. 高蓄積性

*化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律

背景(2)

- 毒性学は、体(からだ)に入る物質と、体との相互作用を明らかにする学問。
- 物質からみると、
 - 化学物質(溶解した状態で生体に届くもの)の毒性学
 - 粒子状物質(粒子のまま、生体に届くもの)の毒性学
- 体からみると、
 - 体に入る経路(暴露経路)
 - ADME

背景(2)

- 体に入る経路(暴露経路)
 - 経口
 - 吸入
 - 経皮
 - 血管内
 - その他

背景(2)

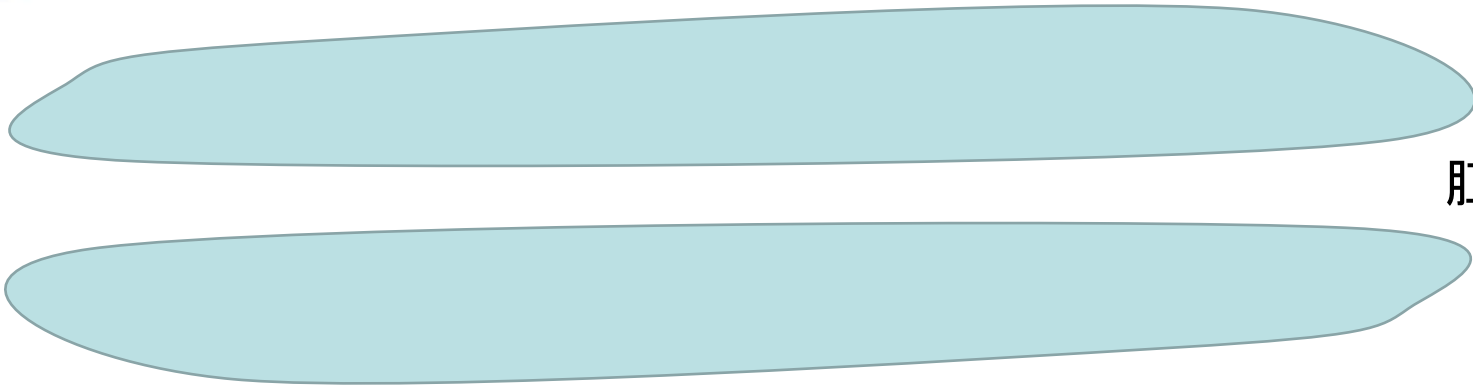
- 体に入る経路(暴露経路)
 - 経口
 - 吸入
 - 経皮
 - 血管内
 - その他



背景(2)

- 経口暴露:消化管

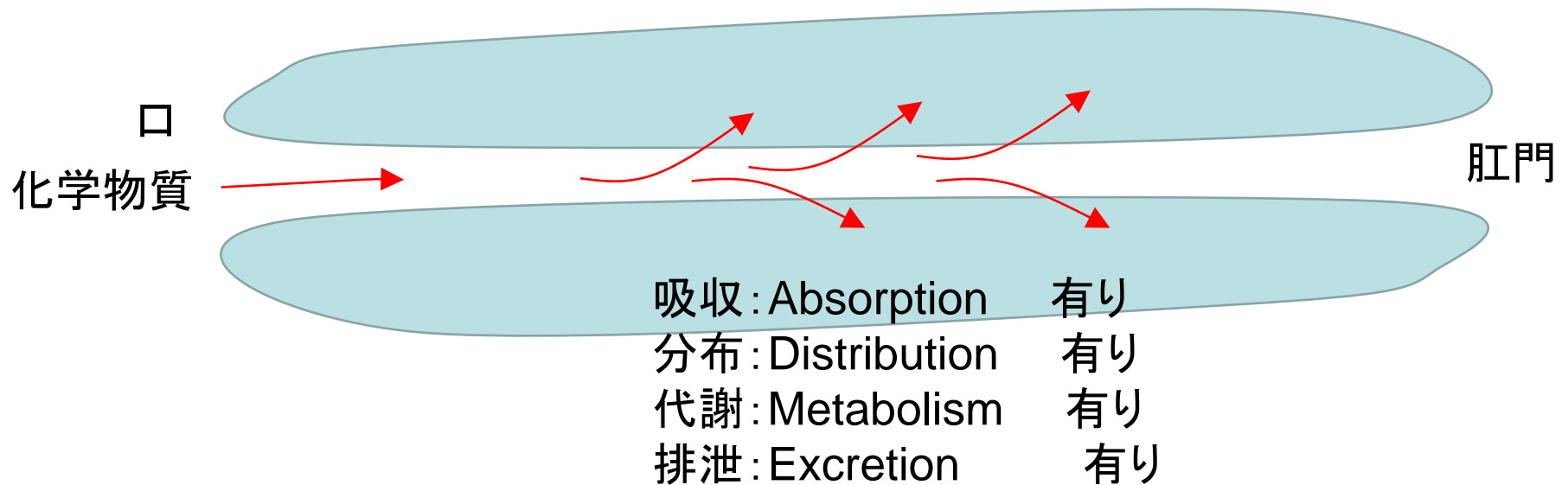
口



肛門

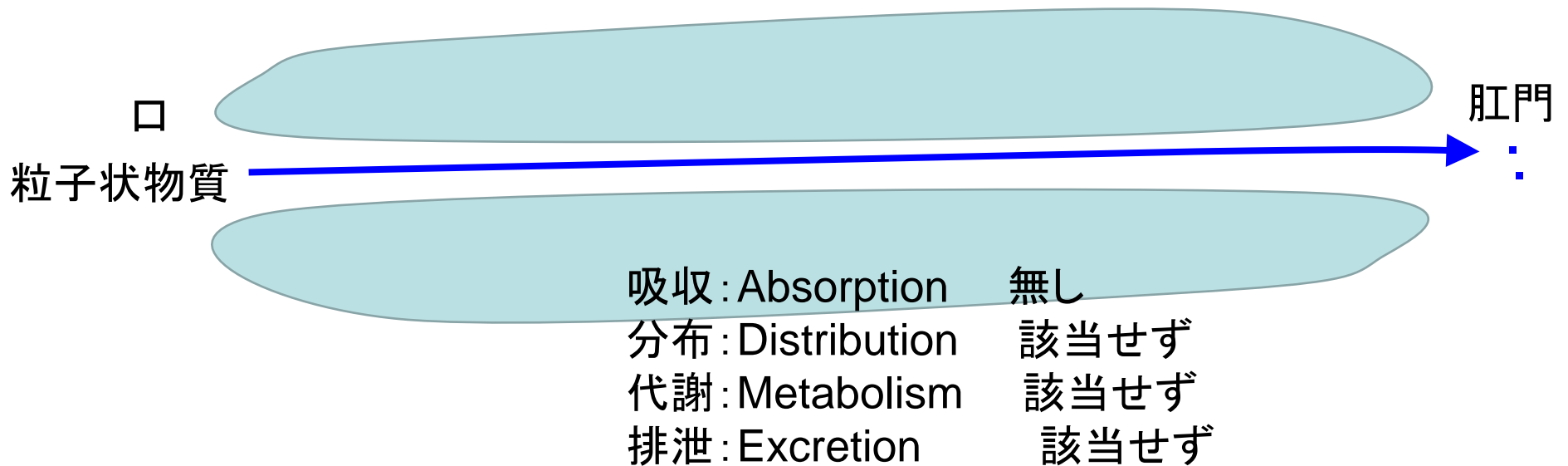
背景(2)

- 経口暴露:消化管



背景(2)

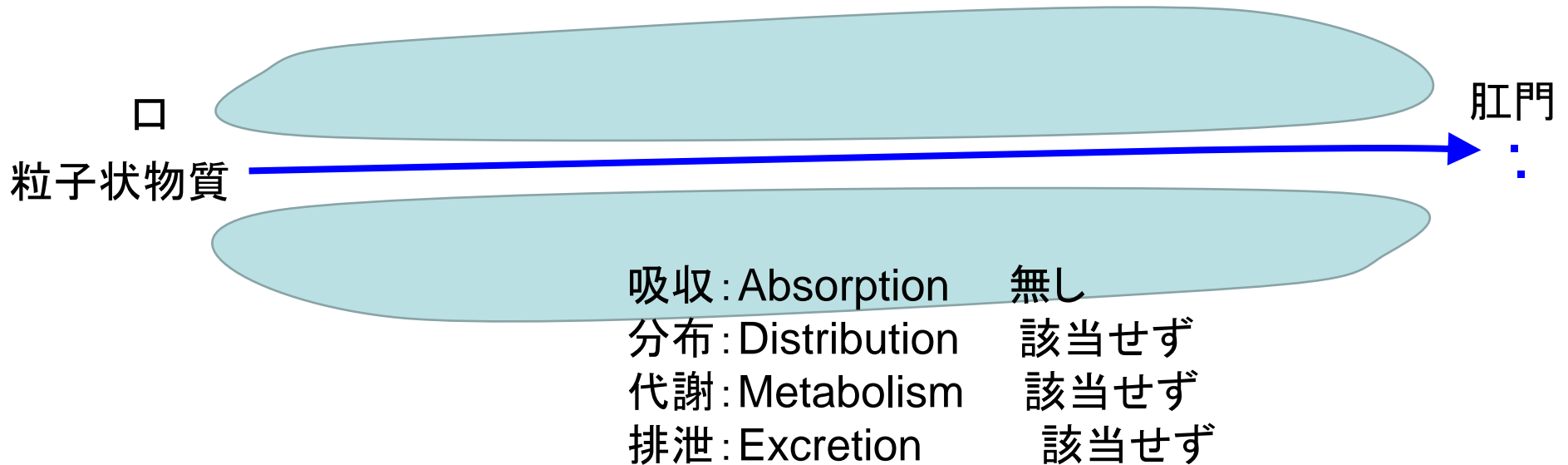
- 経口暴露:消化管



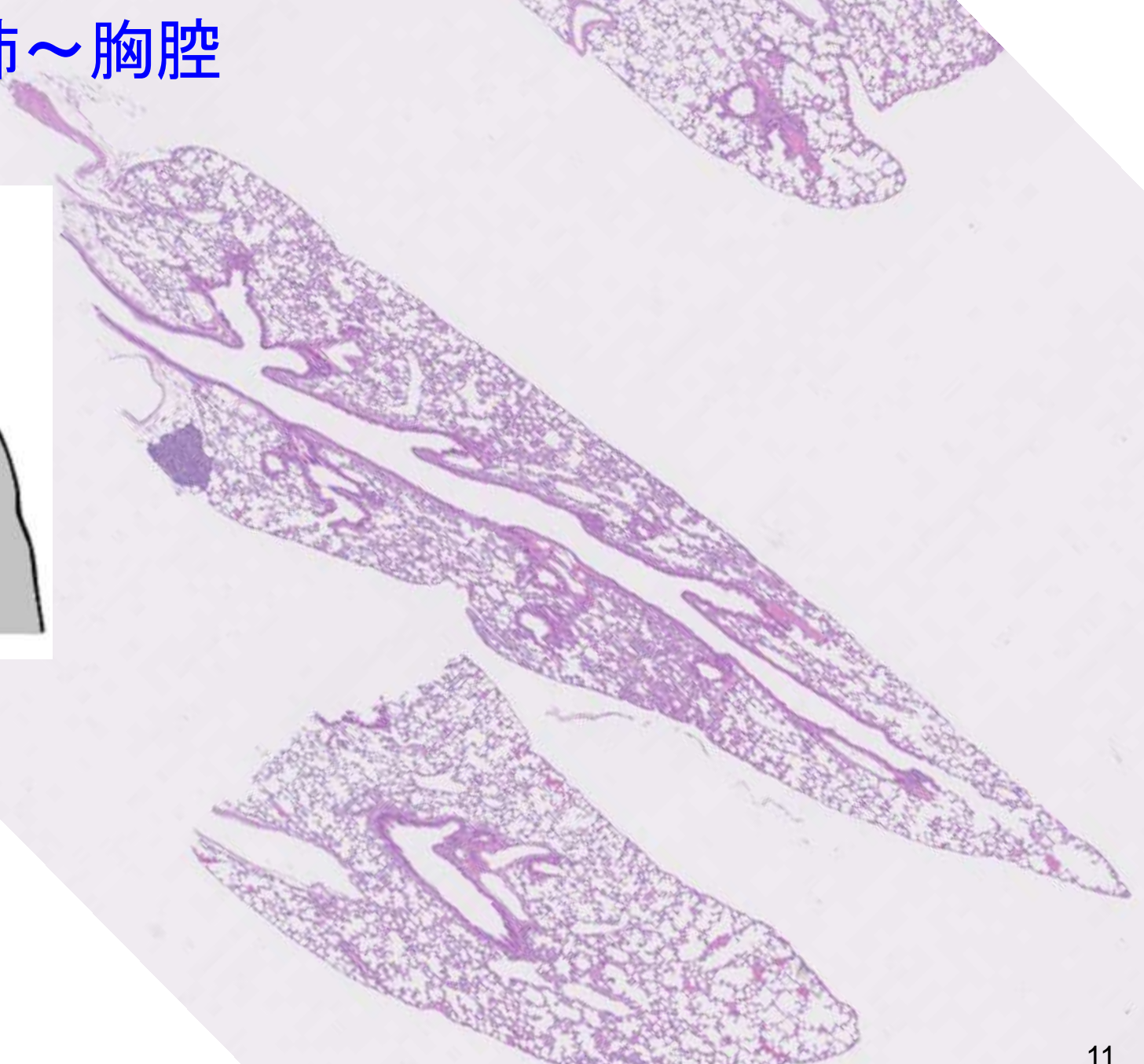
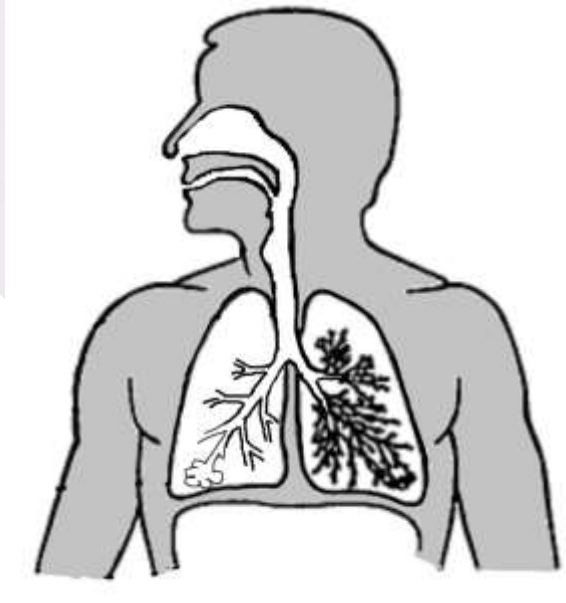
背景(2)

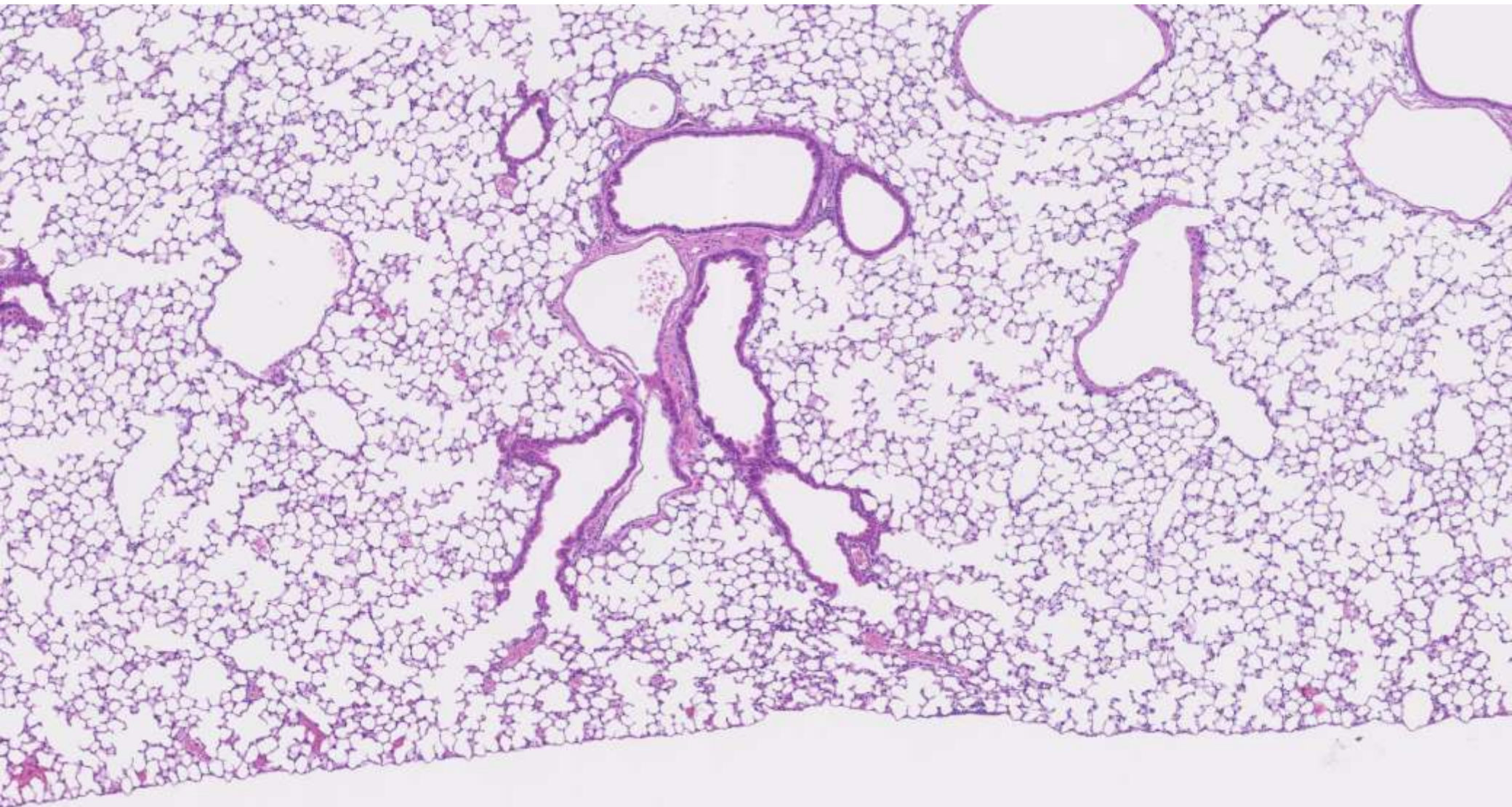
実際に:

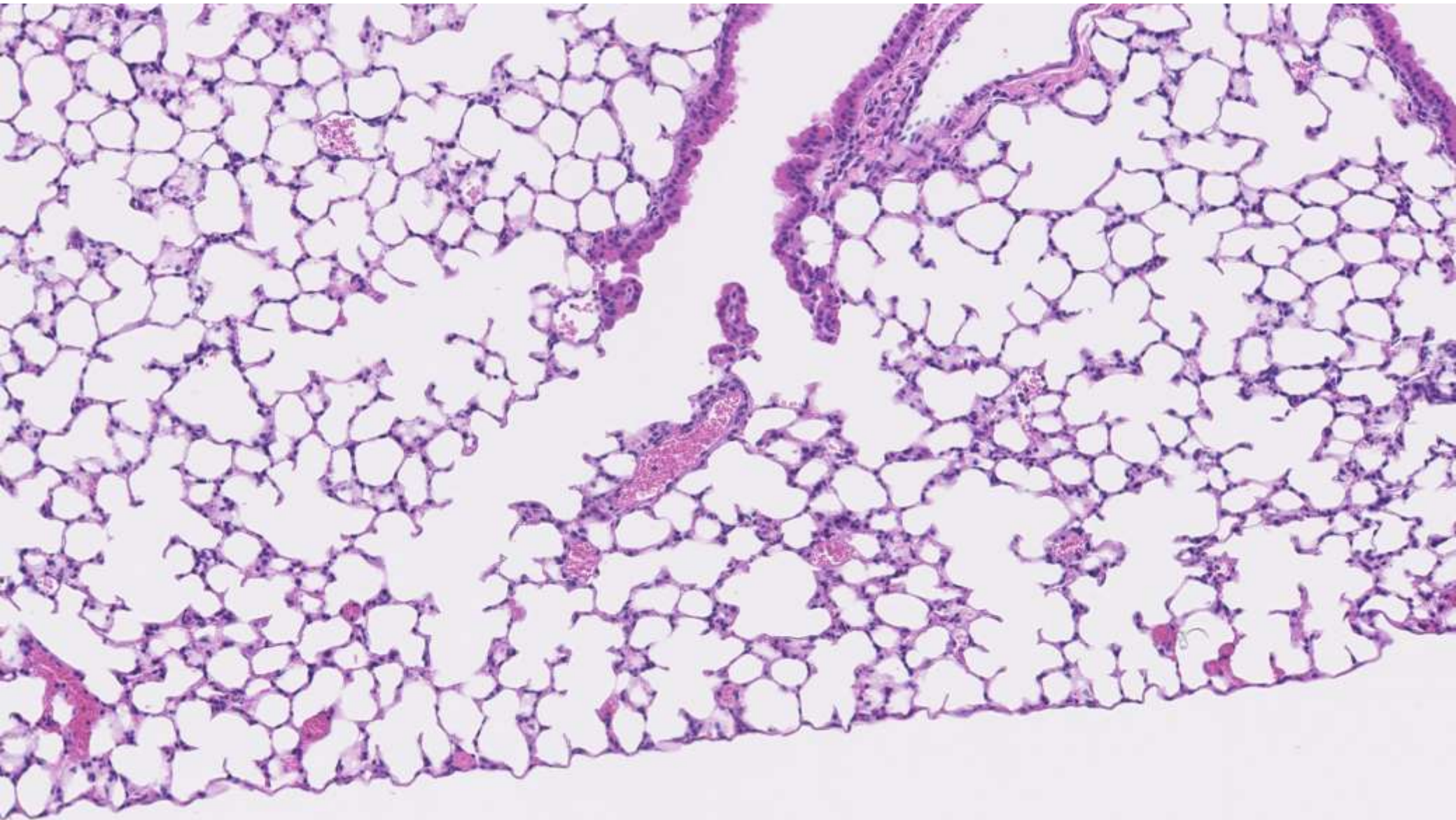
- アスベストを水に懸濁して飲ませた場合、毒性なし(アスベスト水道管の問題)
- 二酸化チタン(非ナノ)を懸濁して飲ませた場合、毒性なし(食用色素)

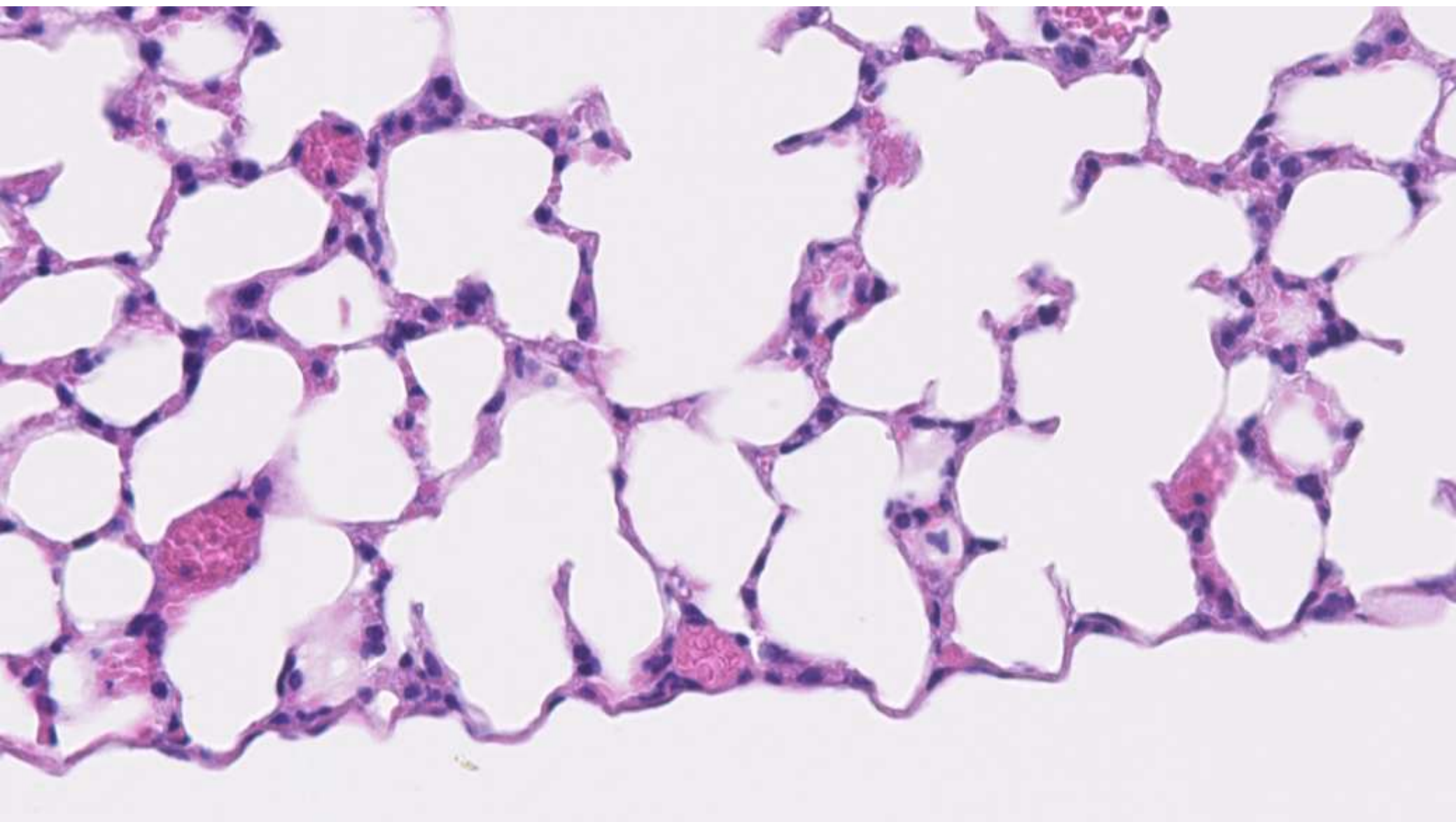


• 吸入暴露：肺～胸腔



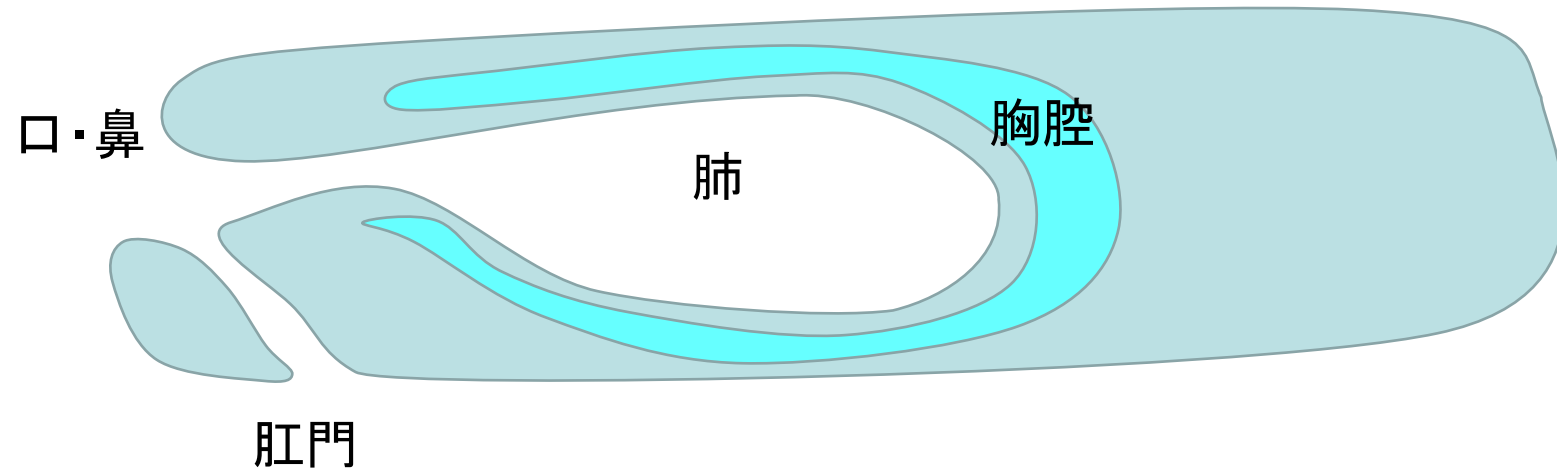






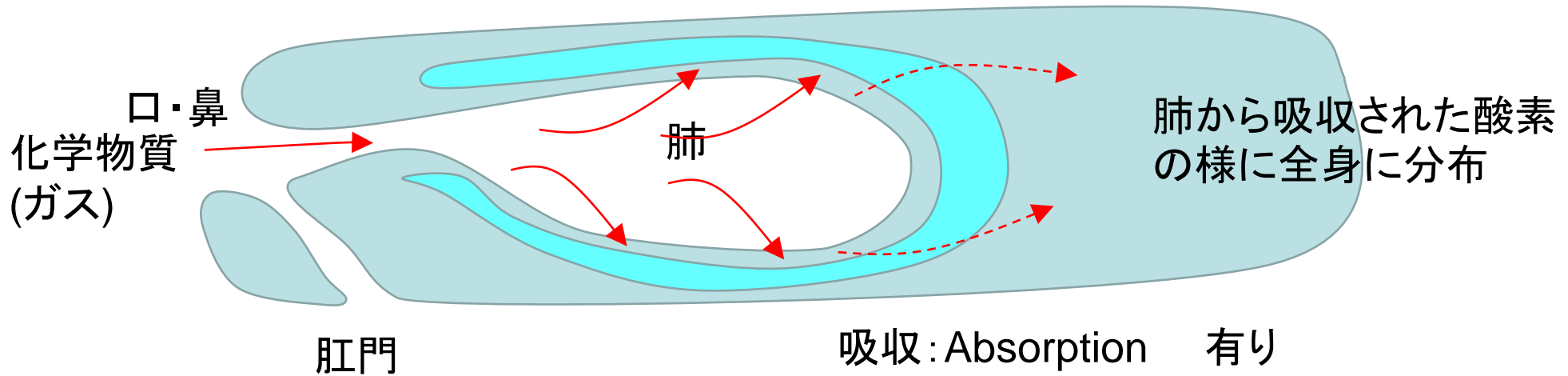
背景(2)

- 吸入暴露: 肺～胸腔



背景(2)

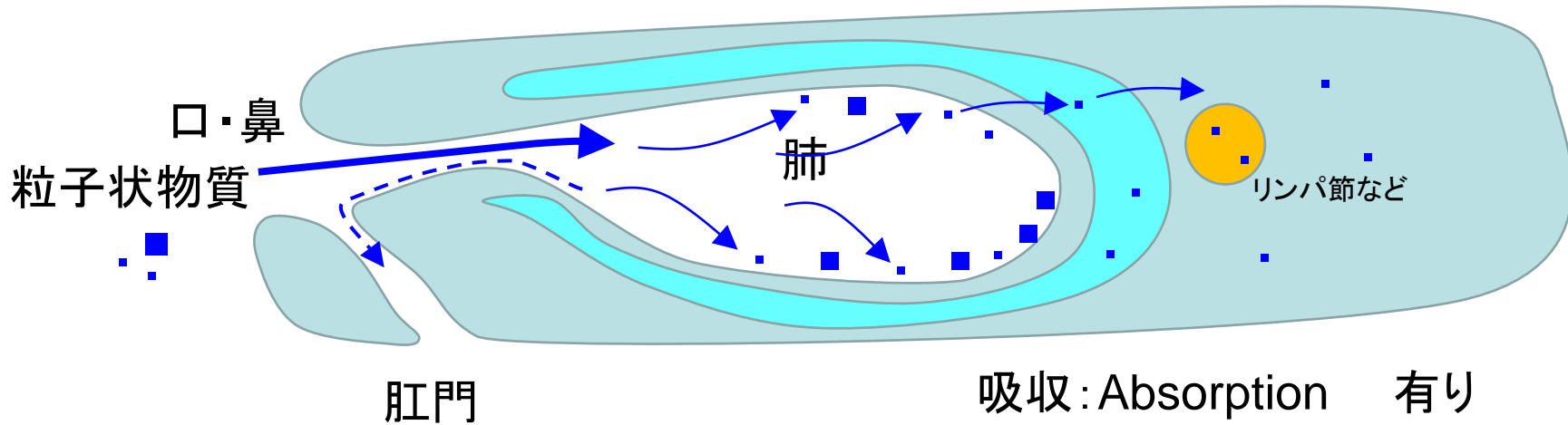
• 吸入暴露: 肺～胸腔



吸収: Absorption	有り
分布: Distribution	有り
代謝: Metabolism	有り
排泄: Excretion	有り

背景(2)

- 吸入暴露: 肺～胸腔

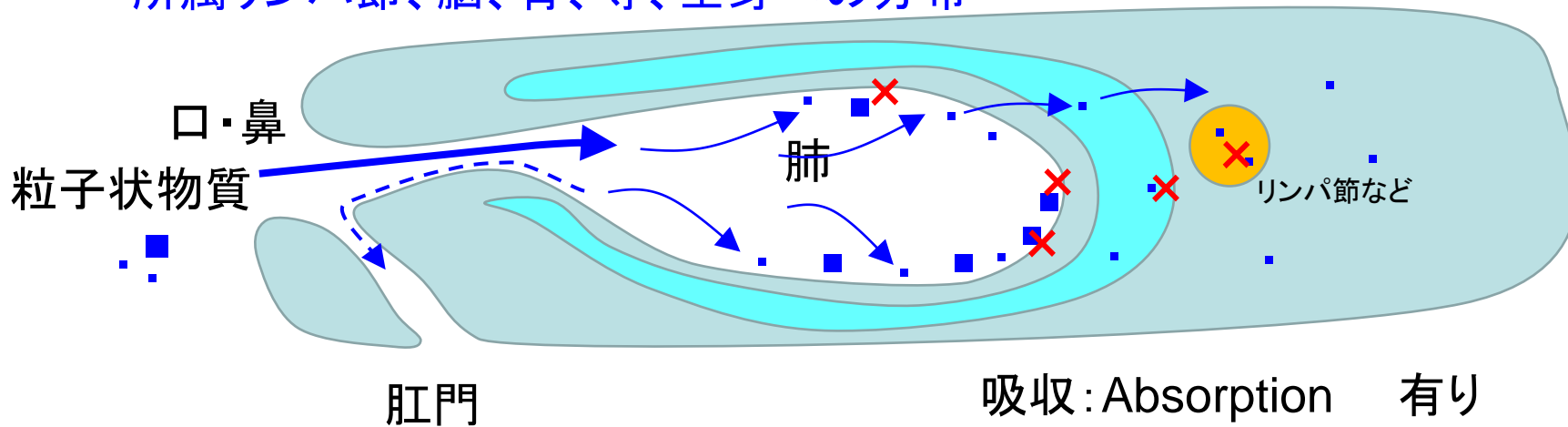


吸収: Absorption	有り
分布: Distribution	有り
代謝: Metabolism	?
排泄: Excretion	?

背景(2)

実際に：吸入した粒子は蓄積する傾向が強い

- ・ アスベストを吸入した場合、肺病変(肺癌を含む)、胸膜病変(中皮腫を含む)
- ・ 二酸化チタン(非ナノ)の吸入実験で、雌ラットに肺癌
- ・ 所属リンパ節、脳、腎、等、全身への分布



吸収: Absorption	有り
分布: Distribution	有り
代謝: Metabolism	?
排泄: Excretion	?

背景(2)

- **粒子状物質の毒性学は相対的に遅れた分野である。**
Particulate Matter (PM) toxicology is a relatively retarded area in toxicology.
 - **難しい** Difficult to study
 - **吸入毒性試験ひとつを取っても、施設が非常に少ない。**
Inhalation facility is very limited in number
 - **費用がかかる** Expensive
 - **熟練した運転者が必要** Needs highly experienced engineer/researcher to run

毒性医学的な背景

Medico-toxicological Background (3)

- 粒子状物質による人身事故例 2例
 - アスベスト吸入による発癌（線維状物質発癌）
 - 悪性中皮腫： 提唱メカニズム frustrated phagocytosisなど
 - 肺腺癌： メカニズム未解明
 - **★閾値が設定できない**
 - アスベストの全身分布による有害影響（他臓器発癌・免疫異常）
 - Asbestos travels through out the body
 - 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 = 数十年から数百年**
 - 10 nm の粒子である 10 nm particles**

* reticuloendothelial system

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

毒性医学的な背景

Medico-toxicological Background (3)

• 粒子状物質による人身事故例 2例

– アスベスト発癌(線維状物質発癌)

- 悪性中皮腫 frustrated
- 肺腺癌: ?????
- **★閾値が設定できない**
- アスベストの全身分布
 - Asbestos travels through ou

1. 難分解性
2. 高蓄積性

– 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 = 数十年から数百年**
 - 10 nm の粒子である 10 nm particles**

* reticuloendothelial system

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

アスベストの毒性の特徴

- 大量吸入＝ほぼ全員に胸膜肥厚が起こり、その中から高率に中皮腫や肺腺癌が発生する。

大量＝「顔の見える」タイプの毒性：**確定的**

- 微量吸入＝胸膜肥厚は起こらない（X線検査やCT、MRIで見つからない）。その様な人の中から中皮腫が見つかる。
 - － 胸膜肥厚の発症には「閾値がある」。
 - － 中皮腫発癌には「閾値が無い」ことが強く想定されており、これは、疫学的にも示されている。
 - － 100万人につき何人中皮腫になるか予測可能である。

微量＝「顔の見えない」タイプの毒性：**確率的**



Figure 4-3

MALIGNANT MESOTHELIOMA

Malignant pleural mesothelioma appears as multiple small tumor nodules. (Fig. 4-3 from Fascicle 15, 3rd Series)

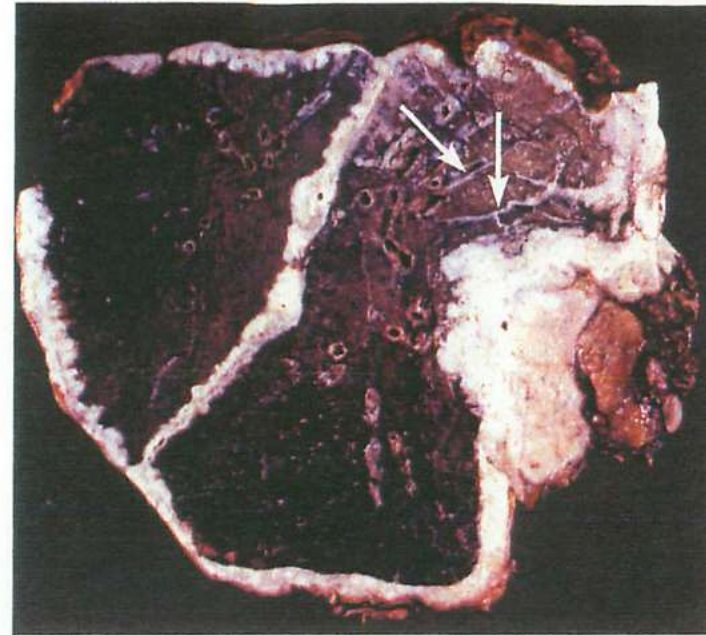


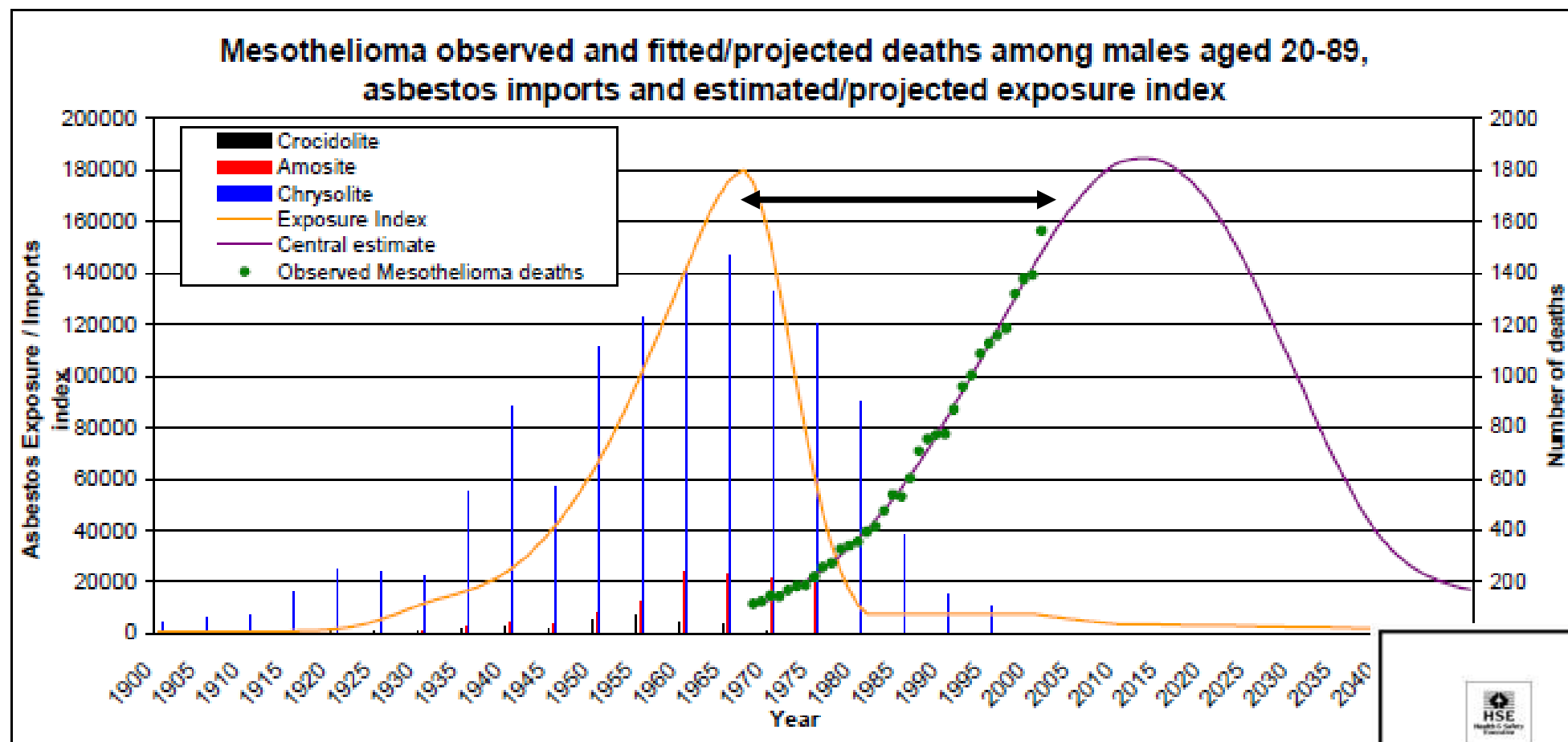
Figure 4-4

MALIGNANT MESOTHELIOMA

The tumor almost completely encases the lung and extends along the major fissure. Tumor also grows into the lung along the interlobular septa, surrounding small vessels and airways (arrows).

localized rather than diffuse disease should make one hesitate before diagnosing a diffuse malignant mesothelioma, although sometimes diffuse microscopic disease is present that is not apparent grossly. Similarly, the presence of disease thought to be benign on gross examination indicates a need for caution, although very early mesotheliomas that are only apparent mi

Figure 3



4. Discussion

Dose–Response Relationship of Fibrous Dusts in Intraperitoneal Studies

Environ Health Perspect 105(Suppl 5):1253–1256 (1997)

Markus Roller,¹ Friedrich Pott,¹ Kenji Kamino,²
Gerhard-Heinrich Althoff,¹ and Bernd Bellmann³

Table 1. Fibrous dusts and mass doses applied in a series of carcinogenicity studies from 1990 to 1992 (number of injections × dust mass/injection, mg).

Fibrous dusts containing relatively long and thick fibers ^a	Fibrous dusts containing relatively short and thin fibers ^b
Glass fibers ^c B-01-0.9 (5 × 25, 10 × 25, 20 × 25, 40 × 25)	
B-09-2.0 (3 × 50, 9 × 50)	B-09-0.6 (2 × 50, 6 × 50)
B-20-2.0 (1 × 6, 1 × 18, 2 × 30)	B-09-0.6 (1 × 3.5, 1 × 8.5, 1 × 25, 3 × 25)
Glass ^d MMVF11 (2 × 35, 6 × 30)	Glass fibers ^d M-753-104 (1 × 17, 1 × 50)
Stone ^d MMVF21 (2 × 30, 5 × 30)	
Slag ^e MMVF22 (1 × 20, 1 × 50, 3 × 50)	Asbestos
M-Stone (1 × 8.5, 1 × 25.5, 2 × 42.5)	Crocidolite (5 × 0.1)
R-Stone-Experimental 3 (4 × 28.5, 9 × 28.5)	Tremolite (1 × 3.3, 1 × 15)

^aParticles with aspect ratio > 5/1, median length 8–17 μm, median diameter 0.7–1.2 μm. ^bParticles with aspect ratio > 5/1, median length 2–4 μm, median diameter 0.2–0.5 μm. ^cAll B-prefix fibers are glass fibers. The first number (B-01, B-09, B-20) represents a code for the chemical composition. The composition of B-20 is similar to stone fibers MMVF21. The second number indicates the nominal median diameter of the original sample. ^dThe designations MMVF11 and -21 originate from the Thermal Insulation Manufacturers Association (TIMA, Stamford, CT). TIMA made the samples available for scientific purposes. The dusts were prepared from the thinnest fraction of typical commercial insulation wools and were also used in inhalation experiments in the laboratories of Research and Consulting Company (RCC), Geneva, Switzerland. Glass fibers M-753-104 are produced as microfibers, i.e., with a relatively small diameter and a chemical composition similar to MMVF11. ^eThe chemical composition of this dust sample, bought in 1990 from Manville Technical Center (Denver, CO), is practically identical to the slag-wool designated MMVF22 in inhalation experiments carried out in the RCC laboratories, Switzerland.

繊維発癌の基礎 スタントン-ポットの仮説

Relation of Particle Dimension to Carcinogenicity in Amphibole Asbestoses and Other Fibrous Minerals^{1,2}

Mearl F. Stanton,^{3,4} Maxwell Layard,^{5,6} Andrew Tegeris,⁷ Eliza Miller,^{3,8} Margaret May,^{3,4} Elizabeth Morgan,^{7,9} and Alroy Smith⁵

mercial crocidolite. Samples crocid 6, 7, 8, 11, 12, and 13 were all prepared in our laboratory by various milling, sedimentation, and flotation methods from a single lot of standard UICC crocidolite designated crocid 5. Differences in dimension were the result of

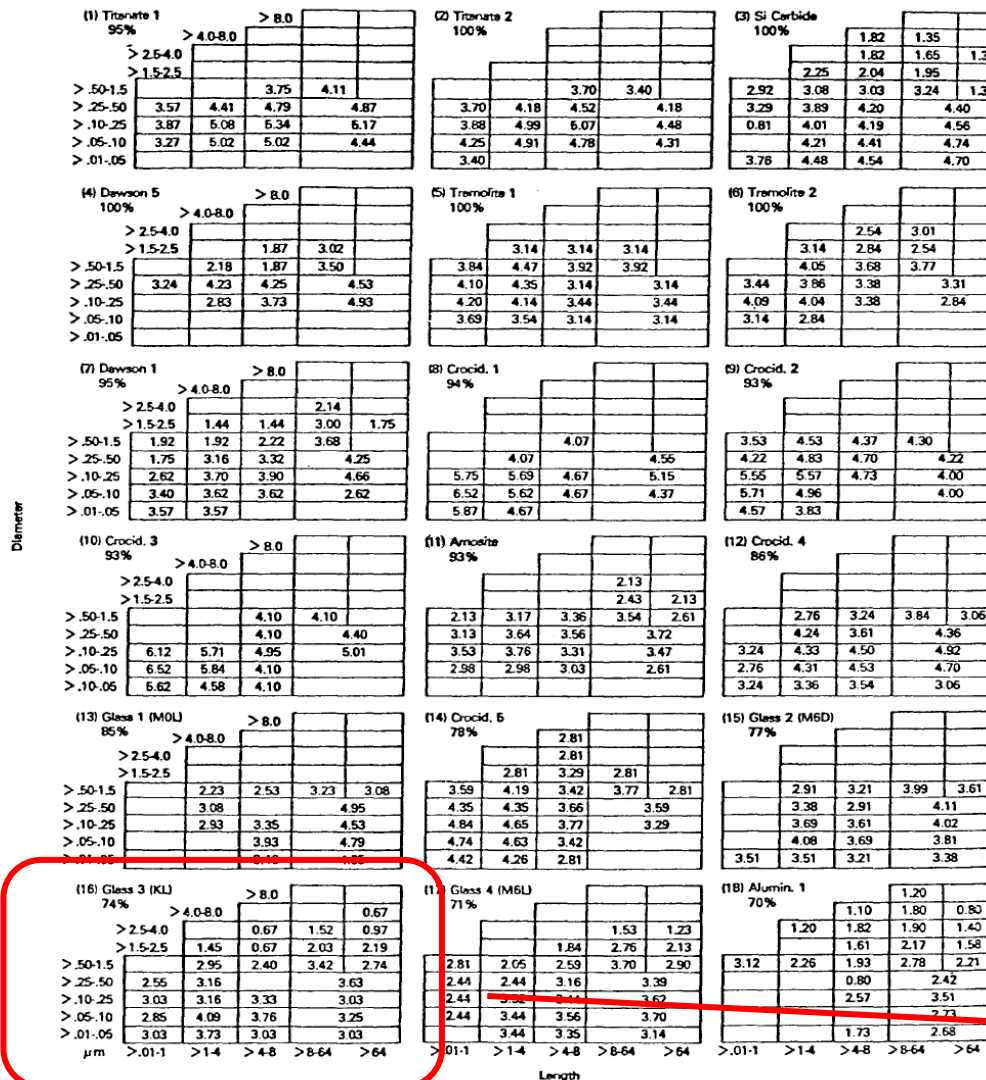
South African crocidolite and separated by centrifugation to obtain mutually exclusive size ranges from the same sample (24). The remaining sample, crocid 2, was

TABLE 1.—Summary of 72 experiments with different fibrous materials

Expt No.	Compound	Actual tumor incidence	Percent tumor probability \pm SD	Common log fibers/ μ g, $\leq 0.25 \mu\text{m} \times > 8 \mu\text{m}$	Expt No.	Compound	Actual tumor incidence	Percent tumor probability \pm SD	Common log fibers/ μ g, $\leq 0.25 \mu\text{m} \times > 8 \mu\text{m}$
1	Titanate 1	21/29	95 \pm 4.7	4.94	37	Halloy 1	4/25	20 \pm 9.0	0
2	Titanate 2	20/29	100	4.70	38	Halloy 2	5/28	23 \pm 9.3	0
3	Si carbide	17/26	100	5.15	39	Glass 8	3/26	19 \pm 10.3	3.01
4	Dawson 5	26/29	100	4.94	40	Crocid 11	4/29	19 \pm 8.5	0
5	Tremolite 1	22/28	100	3.14	41	Glass 19	2/28	15 \pm 9.0	0
6	Tremolite 2	21/28	100	2.84	42	Glass 9	2/28	14 \pm 9.4	1.84
7	Dawson 1	20/25	95 \pm 4.8	4.66	43	Alumin 6	2/28	13 \pm 8.8	0.82
8	Crocid 1	18/27	94 \pm 6.0	5.21	44	Dawson 6	3/30	13 \pm 6.9	0
9	Crocid 2	17/24	93 \pm 6.5	4.30	45	Dawson 2	2/27	12 \pm 7.9	0
10	Crocid 3	15/23	93 \pm 6.9	5.01	46	Wollaston 2	2/25	12 \pm 8.0	0
11	Amosite	14/25	93 \pm 7.1	3.53	47	Crocid 12	2/27	10 \pm 7.0	3.73
12	Crocid 4	15/24	86 \pm 9.0	5.13	48	Attapul 2	2/29	11 \pm 7.5	0
13	Glass 1	9/17	85 \pm 13.2	5.16	49	Glass 10	2/27	8 \pm 5.6	0
14	Crocid 5	14/29	78 \pm 10.8	3.29	50	Glass 11	1/27	8 \pm 5.5	0
15	Glass 2	12/31	77 \pm 16.6	4.29	51	Titanate 3	1/28	8 \pm 8.0	0
16	Glass 3	20/29	74 \pm 8.5	3.59	52	Attapul 1	2/29	8 \pm 5.3	0
17	Glass 4	18/29	71 \pm 9.1	4.02	53	Talc 1	1/26	7 \pm 6.9	0
18	Alumin 1	15/24	70 \pm 10.2	3.63	54	Glass 12	1/25	7 \pm 5.4	0
19	Glass 5	16/25	69 \pm 9.6	3.00	55	Glass 13	1/27	6 \pm 5.7	0
20	Dawson 7	16/30	68 \pm 9.8	4.71	56	Glass 14	1/25	6 \pm 5.5	0
21	Dawson 4	11/26	66 \pm 12.2	4.01	57	Glass 15	1/24	6 \pm 5.9	1.30
22	Dawson 3	9/24	66 \pm 13.4	5.73	58	Alumin 7	1/25	5 \pm 5.1	0
23	Glass 6	7/22	64 \pm 17.7	4.01	59	Glass 16	1/29	5 \pm 4.4	0
24	Crocid 6	9/27	63 \pm 13.9	4.60	60	Talc 3	1/29	4 \pm 4.3	0
25	Crocid 7	11/26	56 \pm 11.7	2.65	61	Talc 2	1/30	4 \pm 3.8	0
26	Crocid 8	8/25	53 \pm 12.9	0	62	Talc 4	1/29	5 \pm 4.9	0
27	Alumin 2	8/27	44 \pm 11.7	2.95	63	Alumin 8	1/28	3 \pm 3.4	0
28	Alumin 3	9/27	41 \pm 10.5	2.47	64	Glass 21	2/47	6 \pm 4.4	0
29	Crocid 9	8/27	33 \pm 9.8	4.25	65	Glass 22	1/45	2 \pm 2.3	0
30	Wollaston 1	5/20	31 \pm 12.5	0	66	Glass 17	0/28	0	0
31	Alumin 4	4/25	28 \pm 12.0	2.60	67	Glass 18	0/115	0	0
32	Crocid 10	6/29	37 \pm 13.5	3.09	68	Crocid 13	0/29	0	0
33	Alumin 5	4/22	22 \pm 9.8	3.73	69	Wollaston 4	0/24	0	0
34	Glass 20	4/25	22 \pm 10.0	0	70	Talc 5	0/30	0	0
35	Glass 7	5/28	21 \pm 8.7	2.50	71	Talc 6	0/30	0	3.30
36	Wollaston 3	3/21	19 \pm 10.5	0	72	Talc 7	0/29	0	0

Carcinogenicity of Fibrous Minerals 96

Diameter



TEXT-FIGURE 1.—Fiber distribution by common log of the number of particles per microgram in each of 34 dimensional categories.

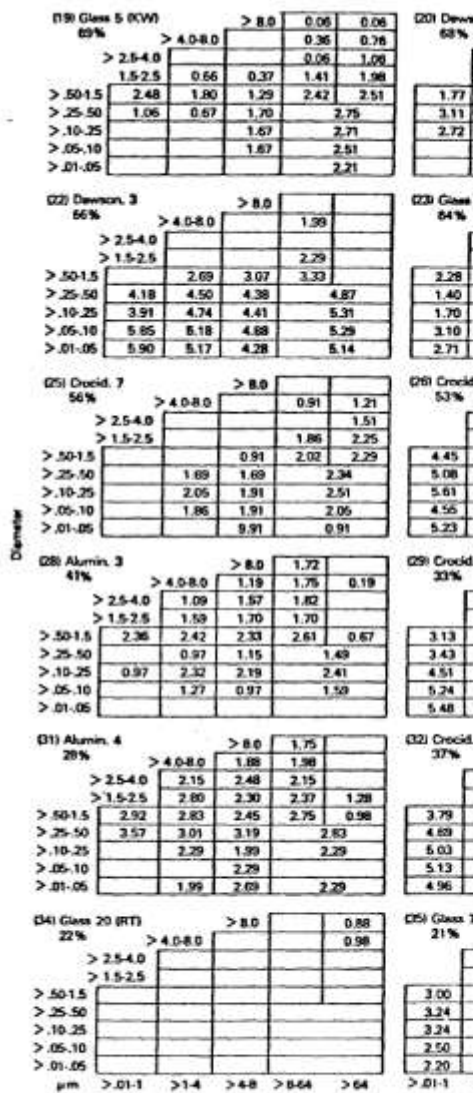
> 25-50	1.75	3.16	3.32	4.25
> 10-25	2.62	3.70	3.90	4.66
> 05-10	3.40	3.62	3.62	2.62
> 01-05	3.57	3.57		

(10) Crocid. 3 93%	> 8.0			
> 4.0-8.0				
> 2.5-4.0				
> 1.5-2.5				
> 50-1.5		4.10	4.10	
> 25-50		4.10		4.40
> 10-25	6.12	5.71	4.95	5.01
> 05-10	6.52	5.84	4.10	
> 01-05	5.62	4.58	4.10	

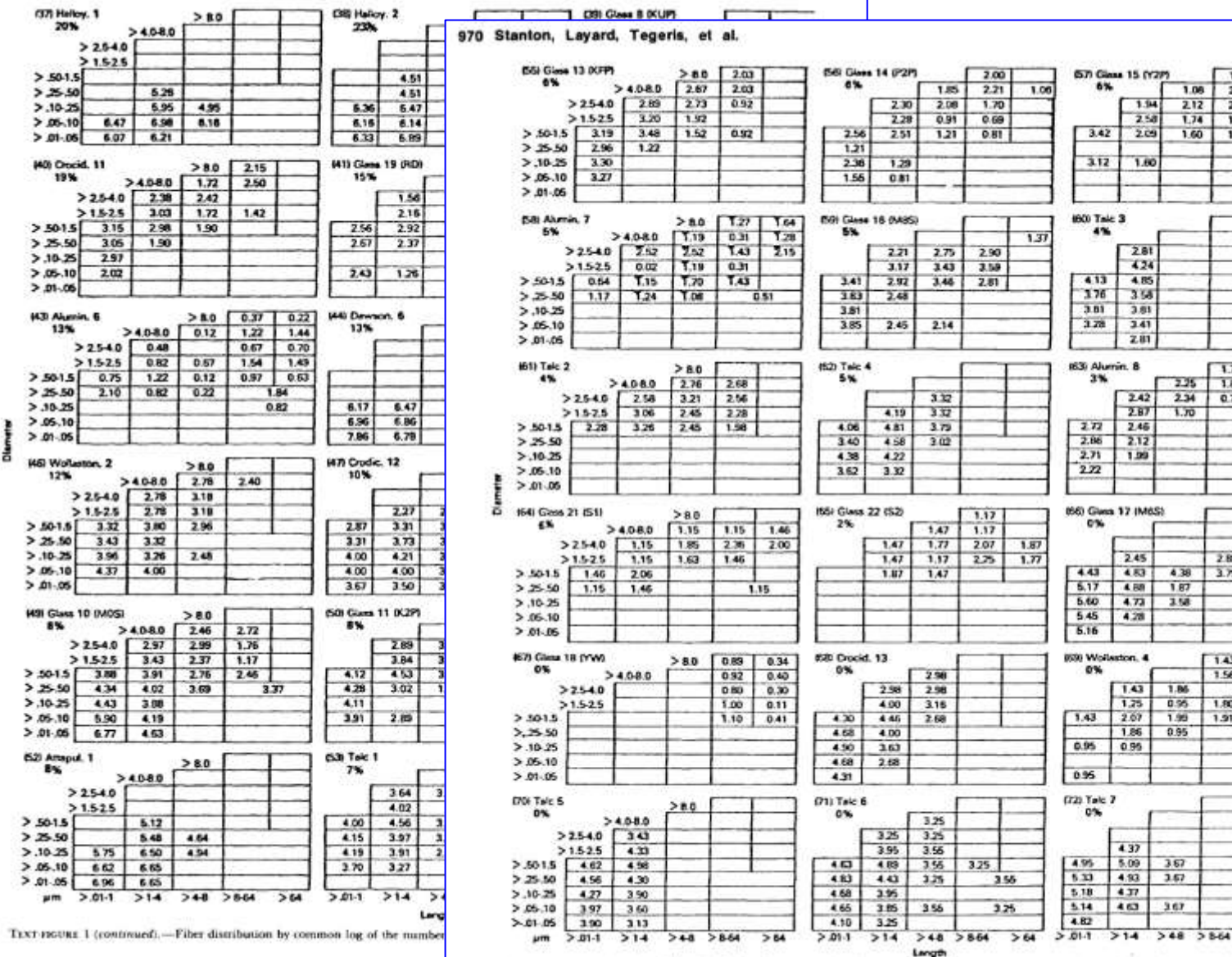
(13) Glass 1 (MOL) 85%	> 8.0				
> 4.0-8.0					
> 2.5-4.0					
> 1.5-2.5					
> 50-1.5		2.23	2.53	3.23	3.08
> 25-50		3.08			4.95
> 10-25		2.93	3.35		4.53
> 05-10			3.93		4.79
> 01-05			3.46		4.65

(16) Glass 3 (KL) 74%	> 8.0				
> 4.0-8.0				0.67	
> 2.5-4.0		0.67	1.52	0.97	
> 1.5-2.5	1.45	0.67	2.03	2.19	
> 50-1.5	2.95	2.40	3.42	2.74	
> 25-50	2.55	3.16		3.63	
> 10-25	3.03	3.16	3.33	3.03	
> 05-10	2.85	4.09	3.76	3.25	
> 01-05	3.03	3.73	3.03	3.03	
µm	> 01-1	> 1-4	> 4-8	> 8-64	> 64

TEXT-FIGURE 1.—Fiber distribution by common log of the number of particles per microgram in each of 34 dimensional categories.



TEXT FIGURE 1 (continued).—Fiber distribution by common log of



TEXT FIGURE 1 (continued).—Fiber distribution by common log of the number

Dose–Response Relationship of Fibrous Dusts in Intraperitoneal Studies

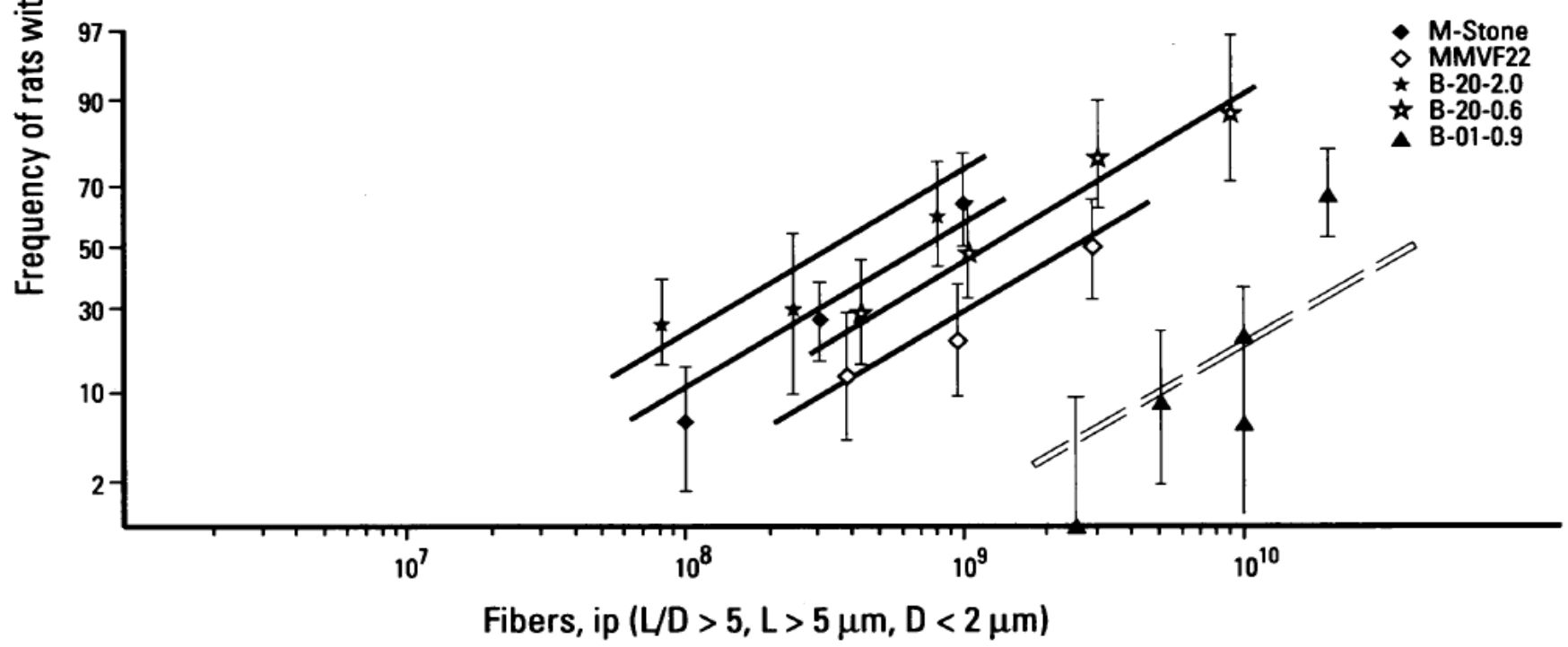
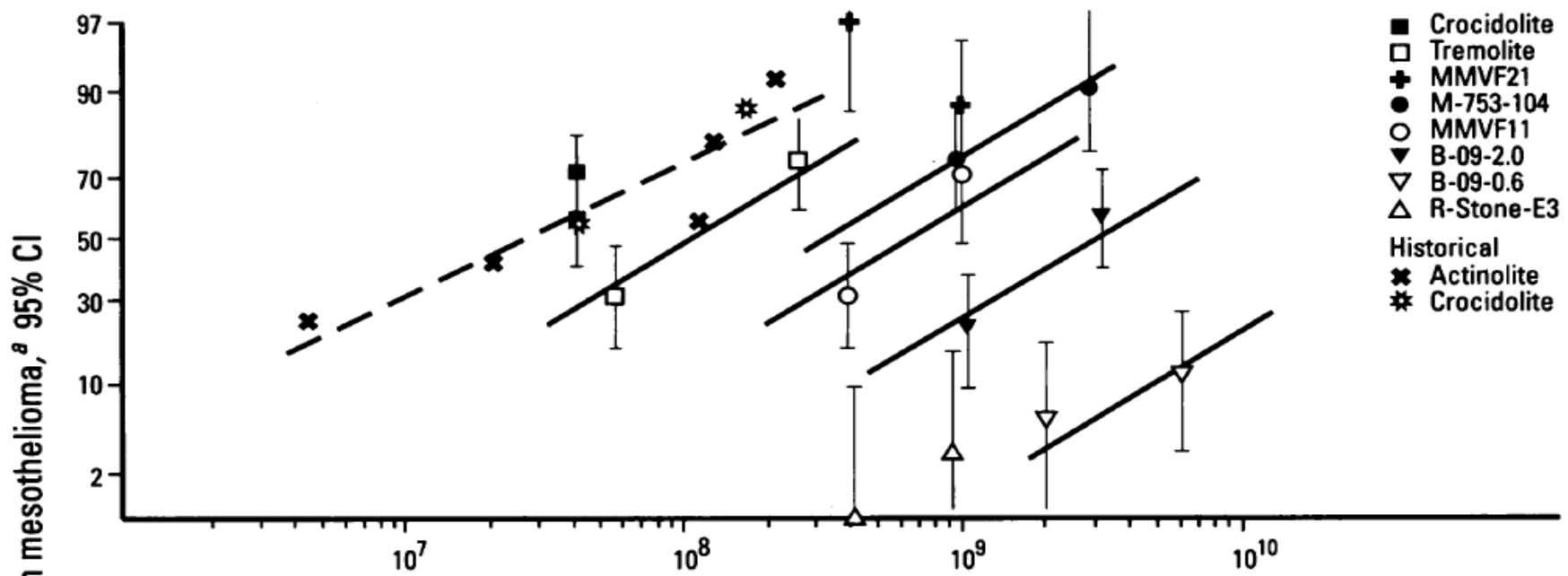
Environ Health Perspect 105(Suppl 5):1253–1256 (1997)

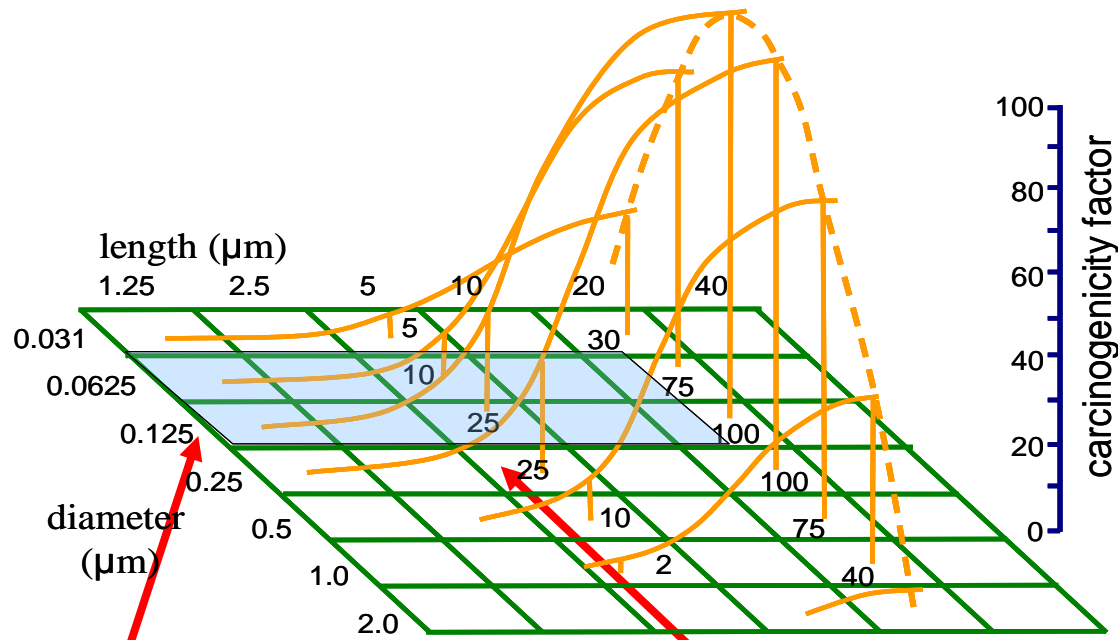
Markus Roller,¹ Friedrich Pott,¹ Kenji Kamino,²
Gerhard-Heinrich Althoff,¹ and Bernd Bellmann³

Table 1. Fibrous dusts and mass doses applied in a series of carcinogenicity studies from 1990 to 1992 (number of injections × dust mass/injection, mg).

Fibrous dusts containing relatively long and thick fibers ^a	Fibrous dusts containing relatively short and thin fibers ^b
Glass fibers ^c B-01-0.9 (5 × 25, 10 × 25, 20 × 25, 40 × 25)	
B-09-2.0 (3 × 50, 9 × 50)	B-09-0.6 (2 × 50, 6 × 50)
B-20-2.0 (1 × 6, 1 × 18, 2 × 30)	B-09-0.6 (1 × 3.5, 1 × 8.5, 1 × 25, 3 × 25)
Glass ^d MMVF11 (2 × 35, 6 × 30)	Glass fibers ^d M-753-104 (1 × 17, 1 × 50)
Stone ^d MMVF21 (2 × 30, 5 × 30)	
Slag ^e MMVF22 (1 × 20, 1 × 50, 3 × 50)	Asbestos
M-Stone (1 × 8.5, 1 × 25.5, 2 × 42.5)	Crocidolite (5 × 0.1)
R-Stone-Experimental 3 (4 × 28.5, 9 × 28.5)	Tremolite (1 × 3.3, 1 × 15)

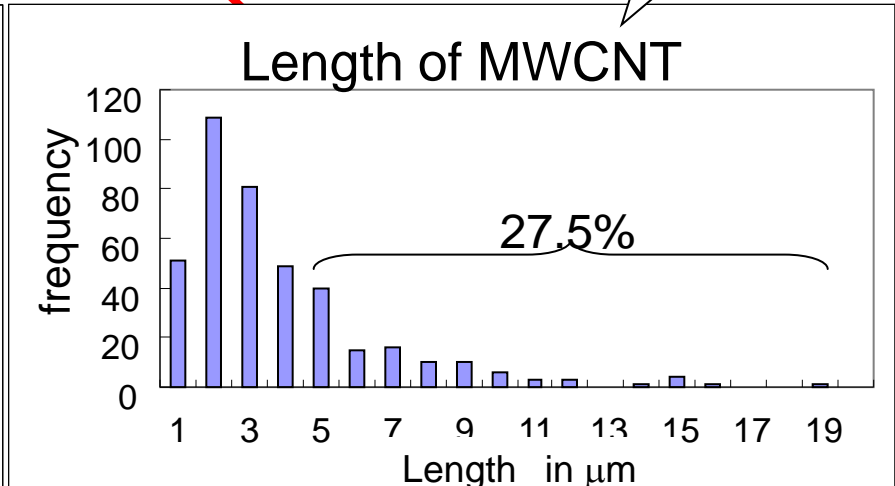
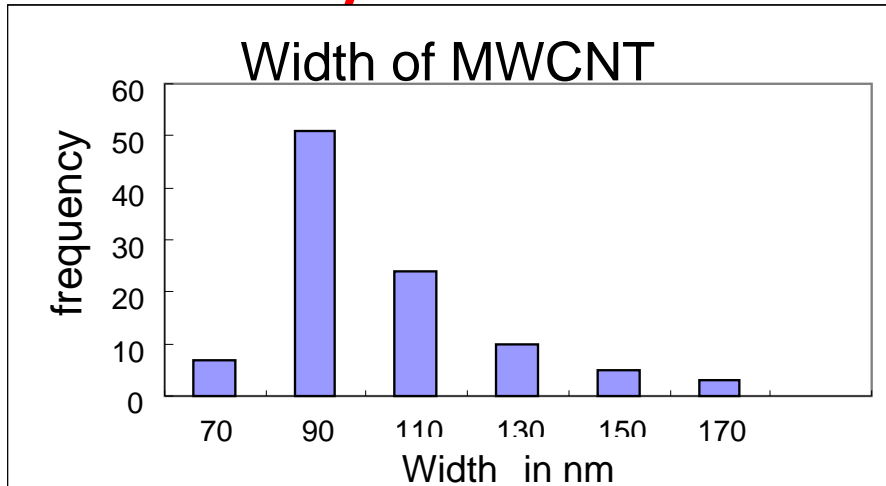
^aParticles with aspect ratio > 5/1, median length 8–17 μm, median diameter 0.7–1.2 μm. ^bParticles with aspect ratio > 5/1, median length 2–4 μm, median diameter 0.2–0.5 μm. ^cAll B-prefix fibers are glass fibers. The first number (B-01, B-09, B-20) represents a code for the chemical composition. The composition of B-20 is similar to stone fibers MMVF21. The second number indicates the nominal median diameter of the original sample. ^dThe designations MMVF11 and -21 originate from the Thermal Insulation Manufacturers Association (TIMA, Stamford, CT). TIMA made the samples available for scientific purposes. The dusts were prepared from the thinnest fraction of typical commercial insulation wools and were also used in inhalation experiments in the laboratories of Research and Consulting Company (RCC), Geneva, Switzerland. Glass fibers M-753-104 are produced as microfibers, i.e., with a relatively small diameter and a chemical composition similar to MMVF11. ^eThe chemical composition of this dust sample, bought in 1990 from Manville Technical Center (Denver, CO), is practically identical to the slag-wool designated MMVF22 in inhalation experiments carried out in the RCC laboratories, Switzerland.





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

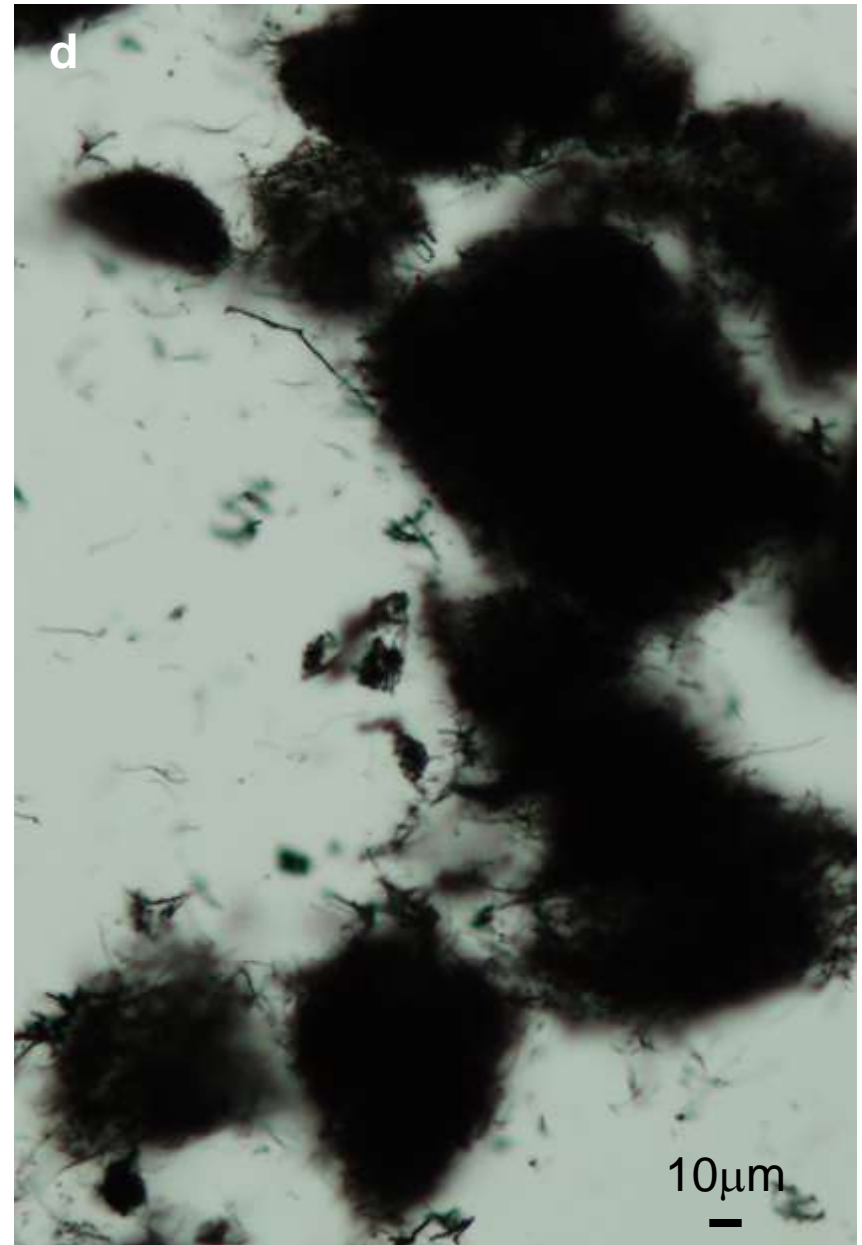
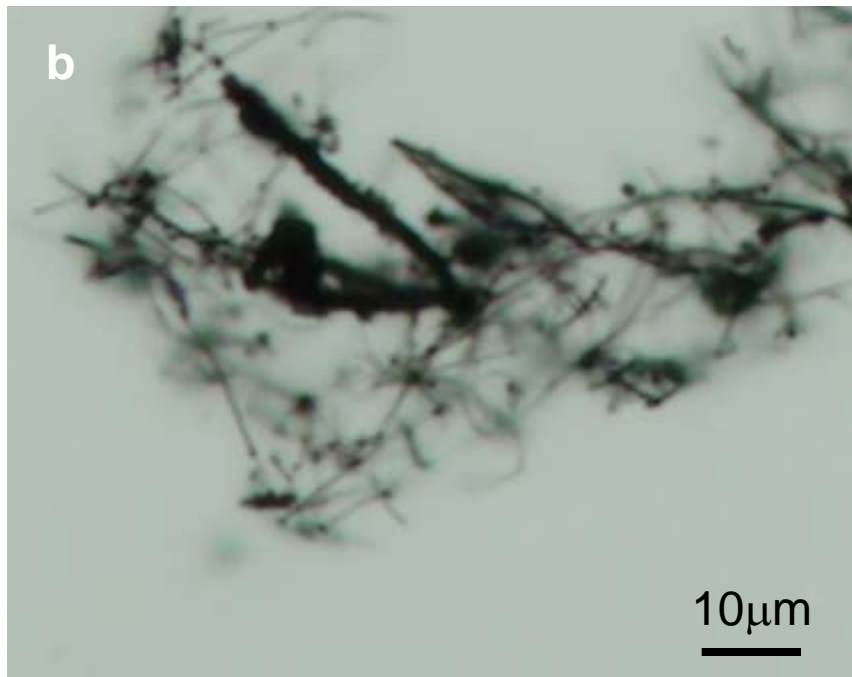
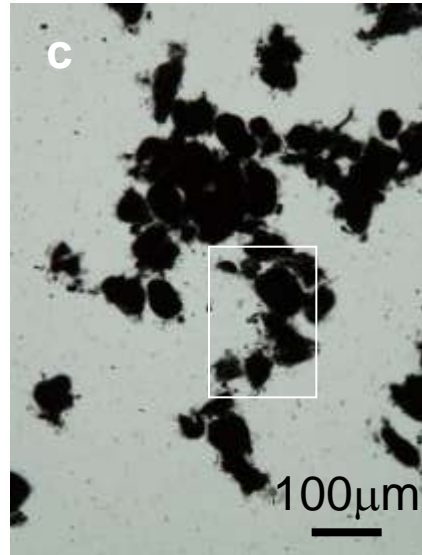
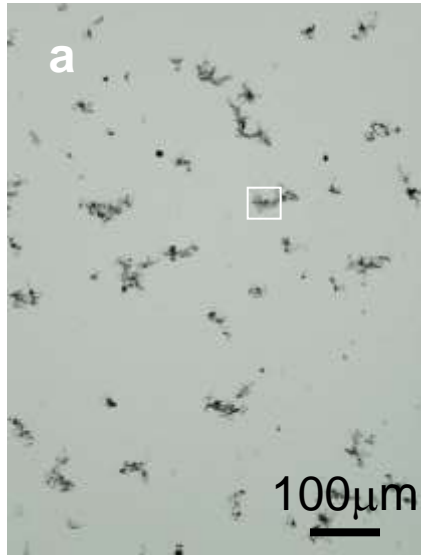
Measured at the Tokyo Metropolitan Institute of Public Health



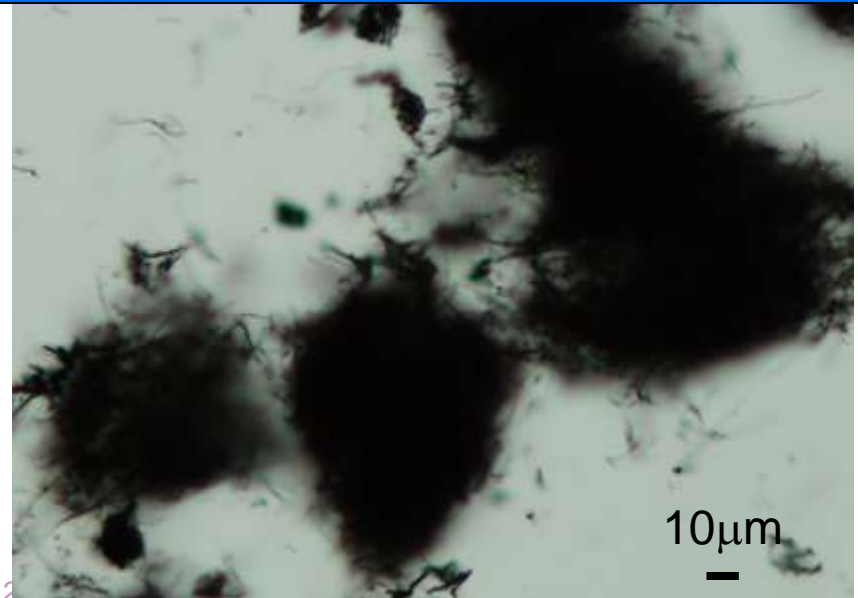
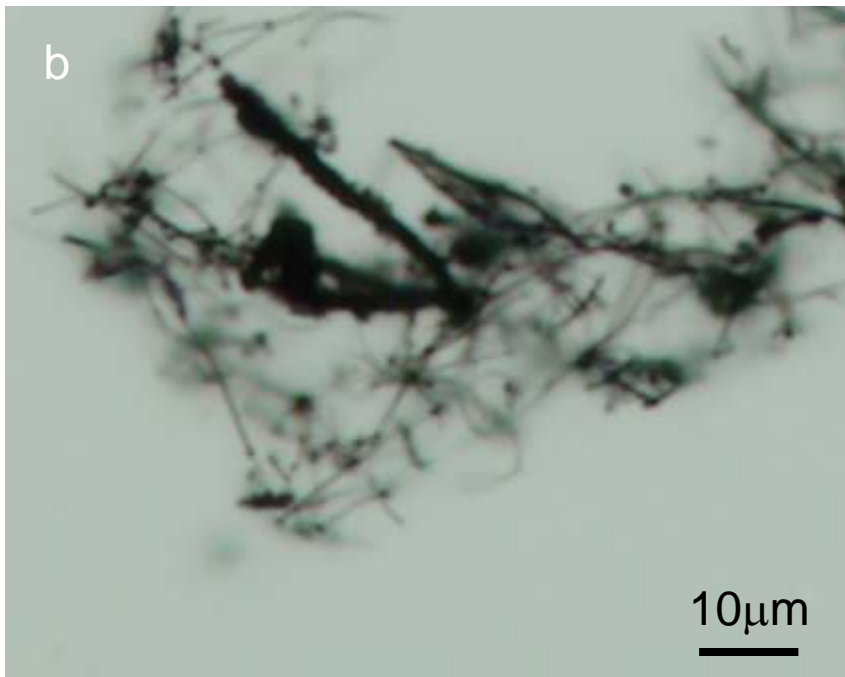
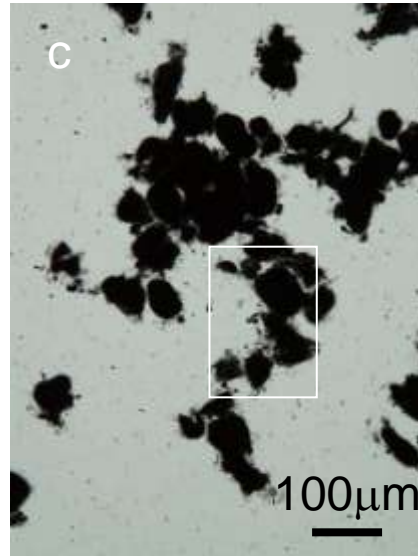
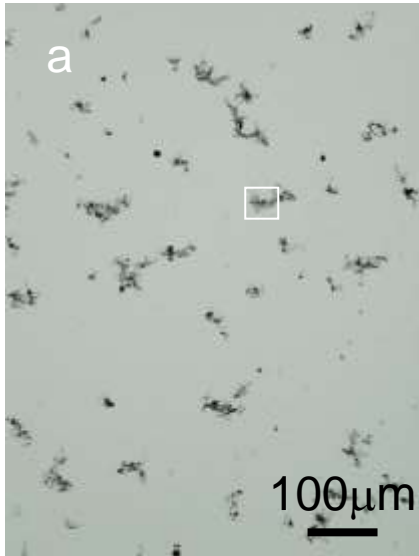
MWCNT: 3mg/animal

= 1.06×10^9 fiber/mouse = 1.86×10^8 WHO fiber/mouse)

MWCNT (MITSUI MWCNT-7, Lot NO.060125-01k)



MWCNT (Mitsui)



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)

Dose-dependent mesothelioma induction by intraperitoneal administration of multi-wall carbon nanotubes in p53 heterozygous mice

Atsuya Takagi,¹ Akihiko Hirose,² Mitsuru Futakuchi,² Hiroyuki Tsuda⁴ and Jun Kanno^{1,3}

¹Division of Cellular and Molecular Toxicology, ²Division of Risk Assessment, Biological Safety Research Center, National Institute of Health Sciences, Tokyo; ³Department of Molecular Toxicology, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences; ⁴Nanomaterial Toxicology Project Laboratory, Nagoya City University, Nagoya, Japan

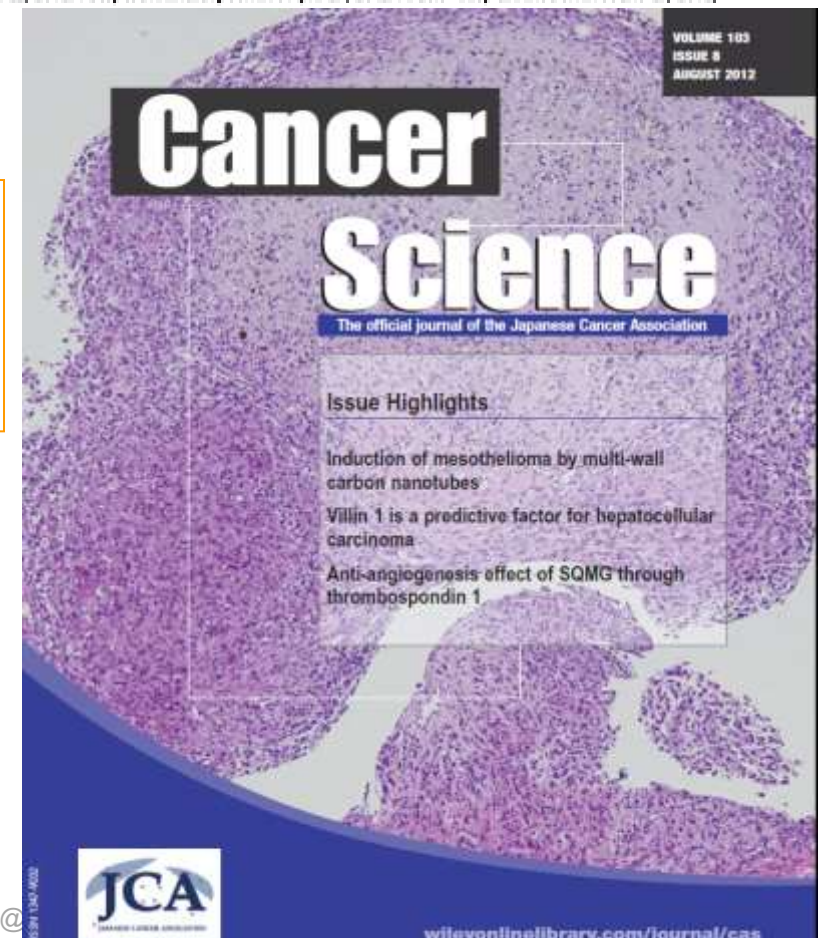
Received February 21, 2012/Revised March 26, 2012/Accepted April 28, 2012/Accepted manuscript online April 27, 2012/Article first published online June 21, 2012

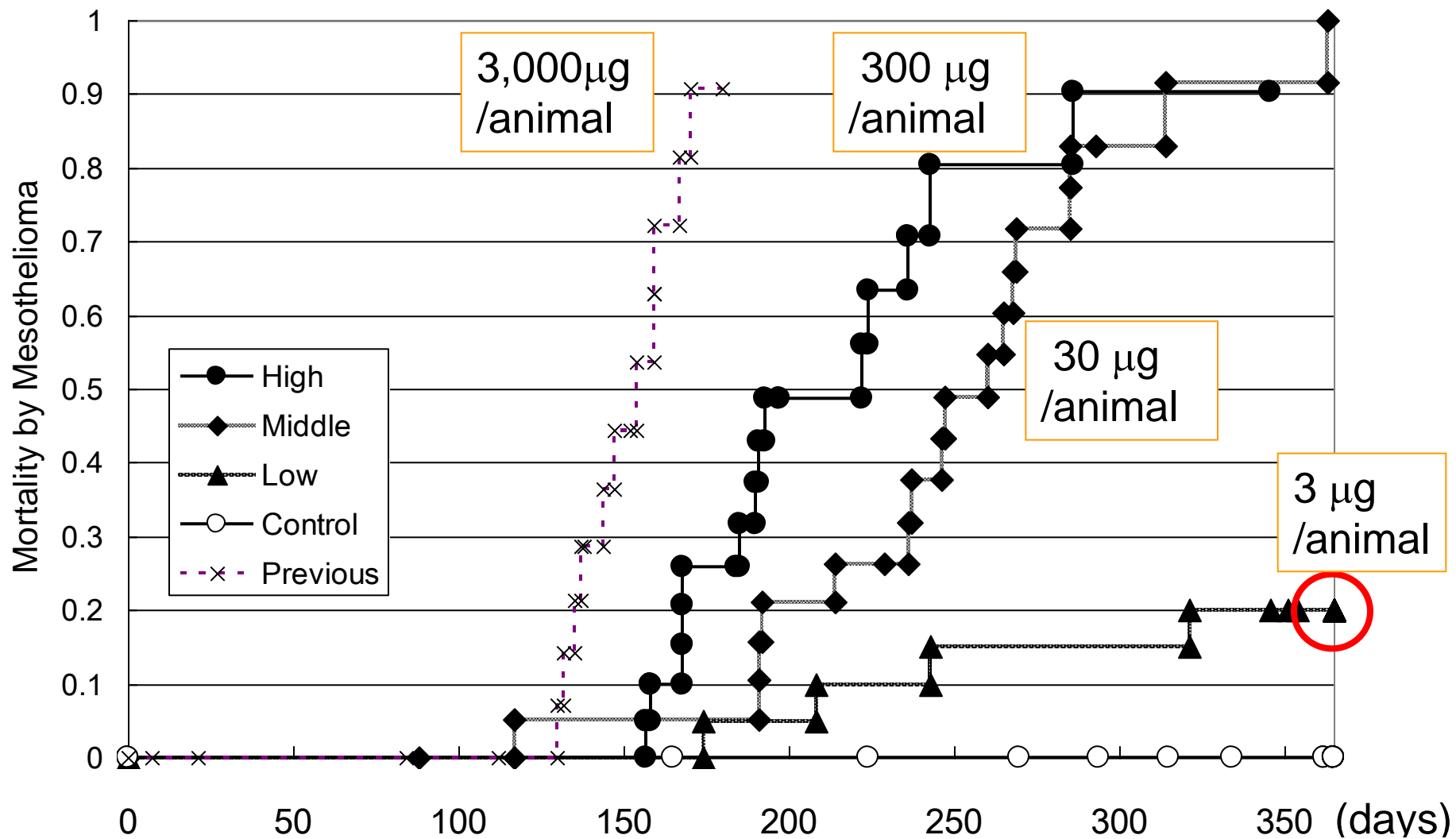
Three doses

300 $\mu\text{g}/\text{animal} = 1 \times 10^8$ fiber /animal

30 $\mu\text{g}/\text{animal} = 1 \times 10^7$ fiber /animal

3 $\mu\text{g}/\text{animal} = 1 \times 10^6$ fiber /animal





Takagi et al. Cancer Science, 2012

Low dose group #19

3 $\mu\text{g}/\text{animal}$ = 1/1,000 of the first study



Takagi et al. Cancer Science, 2012

51

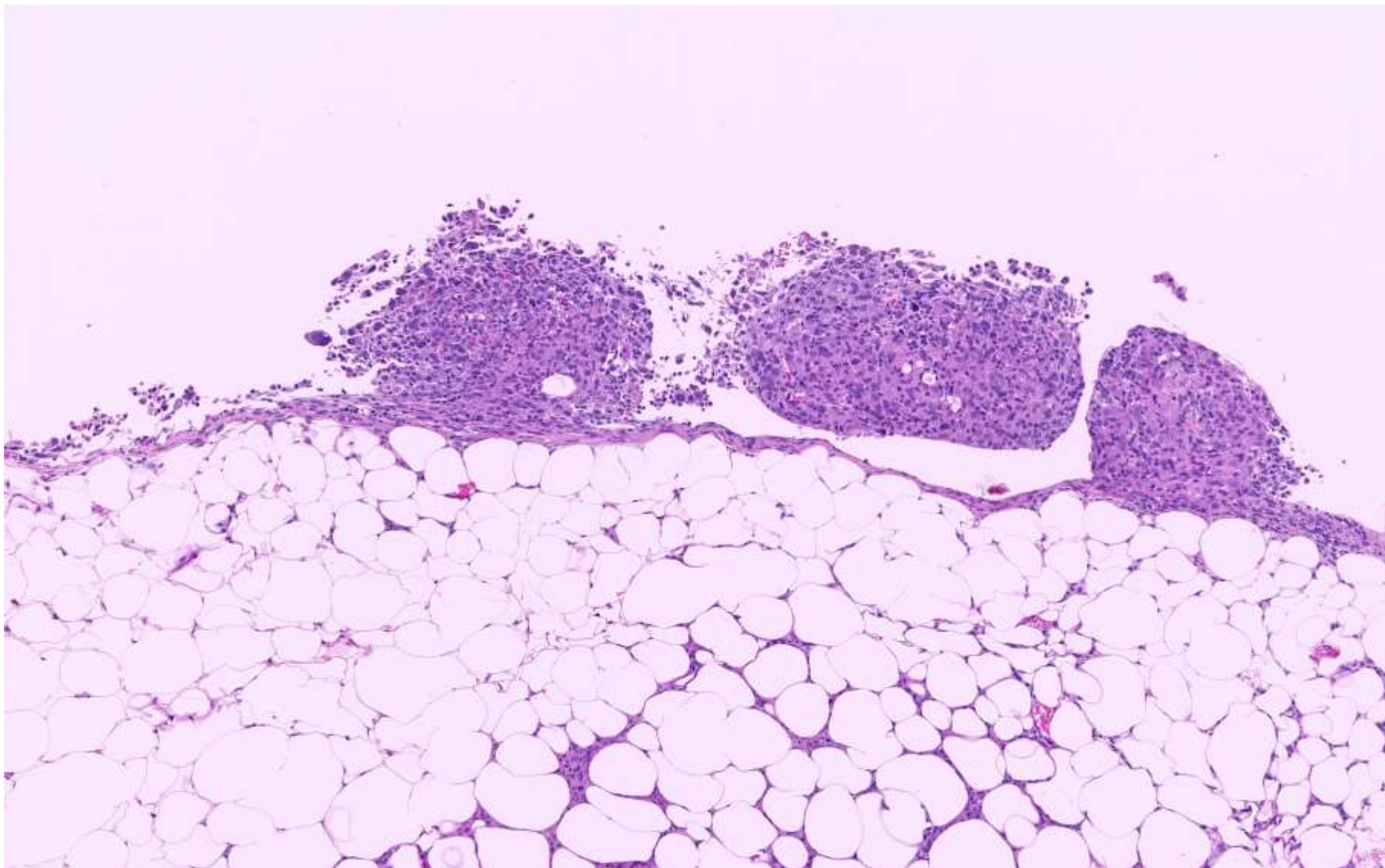
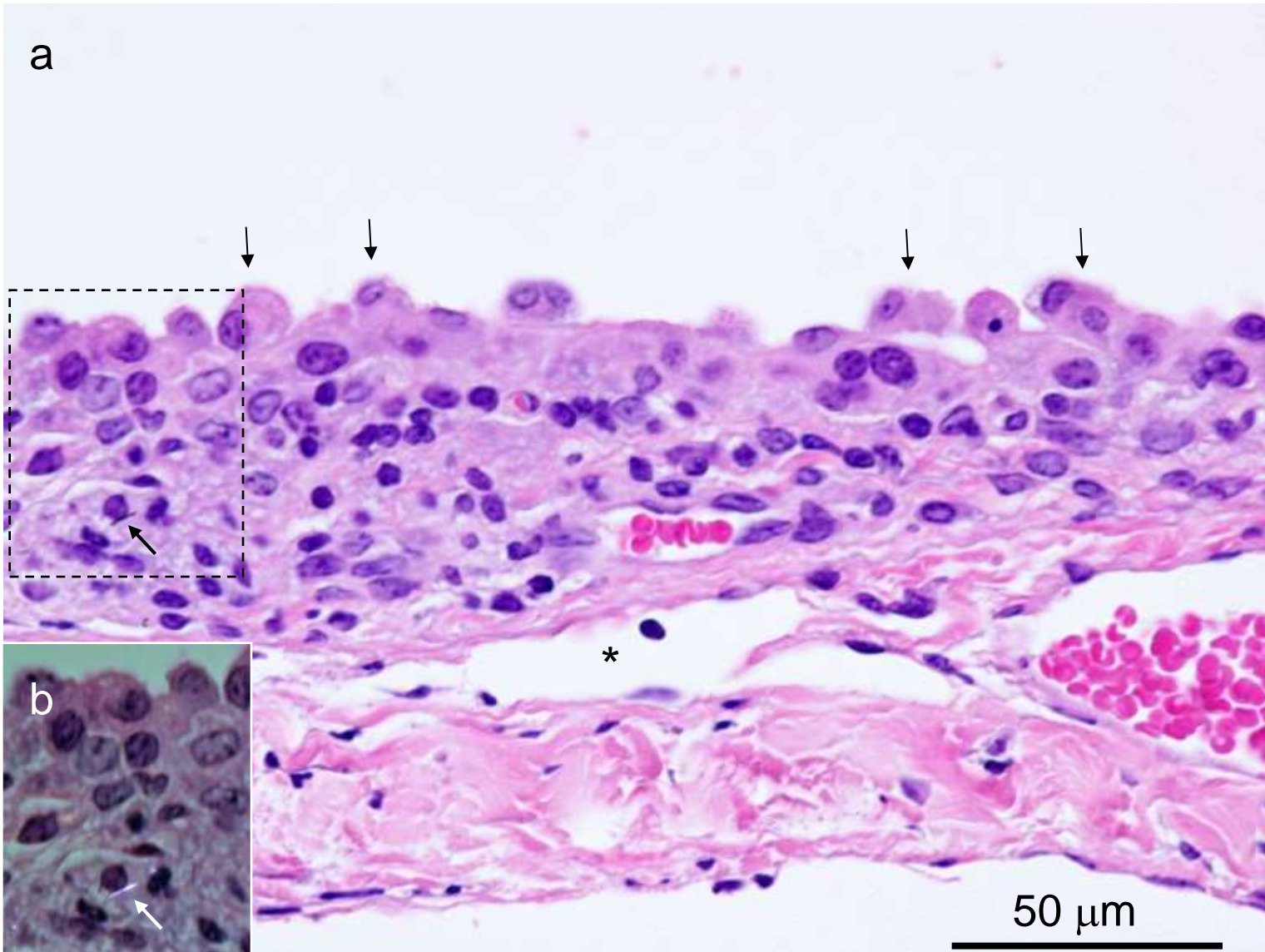
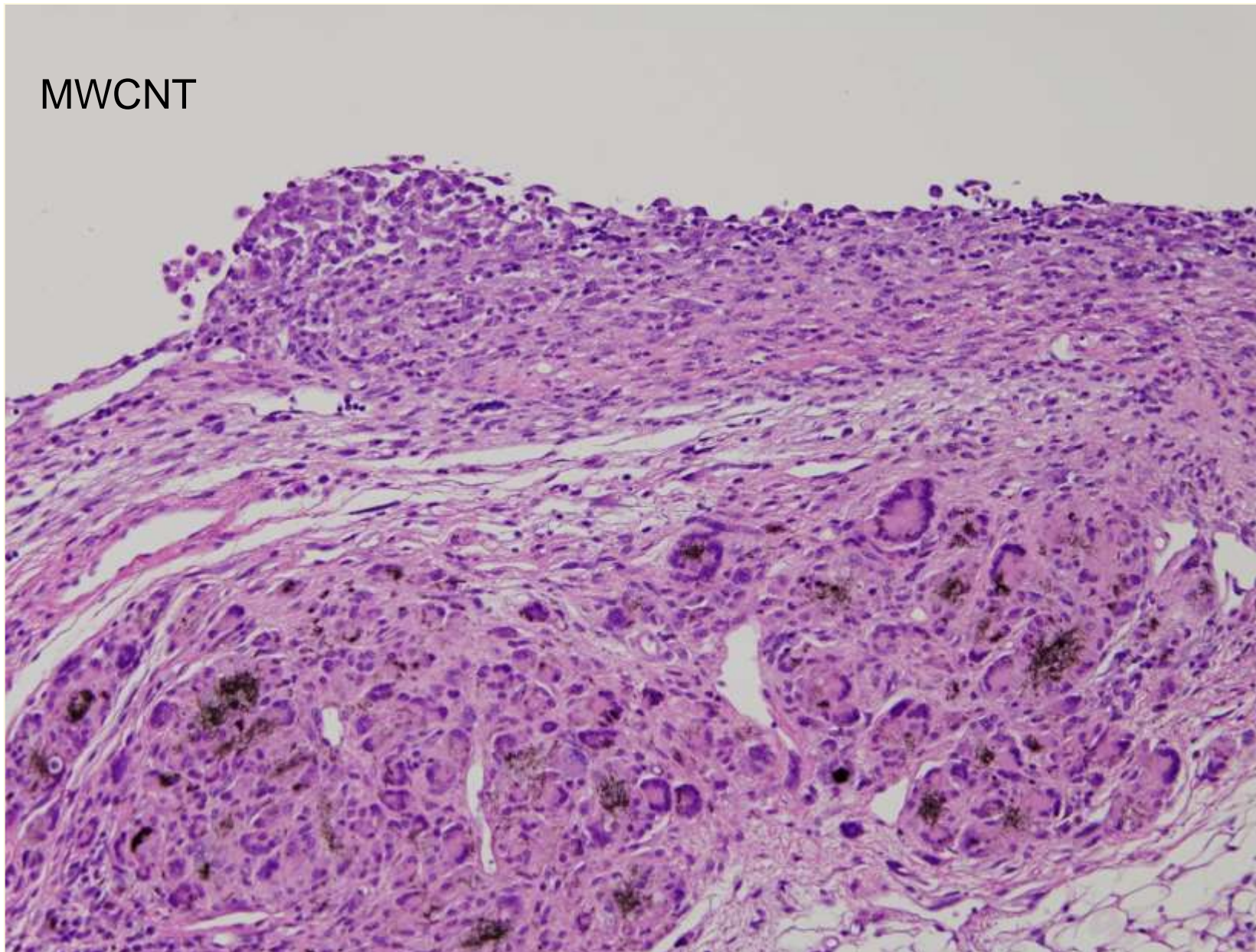


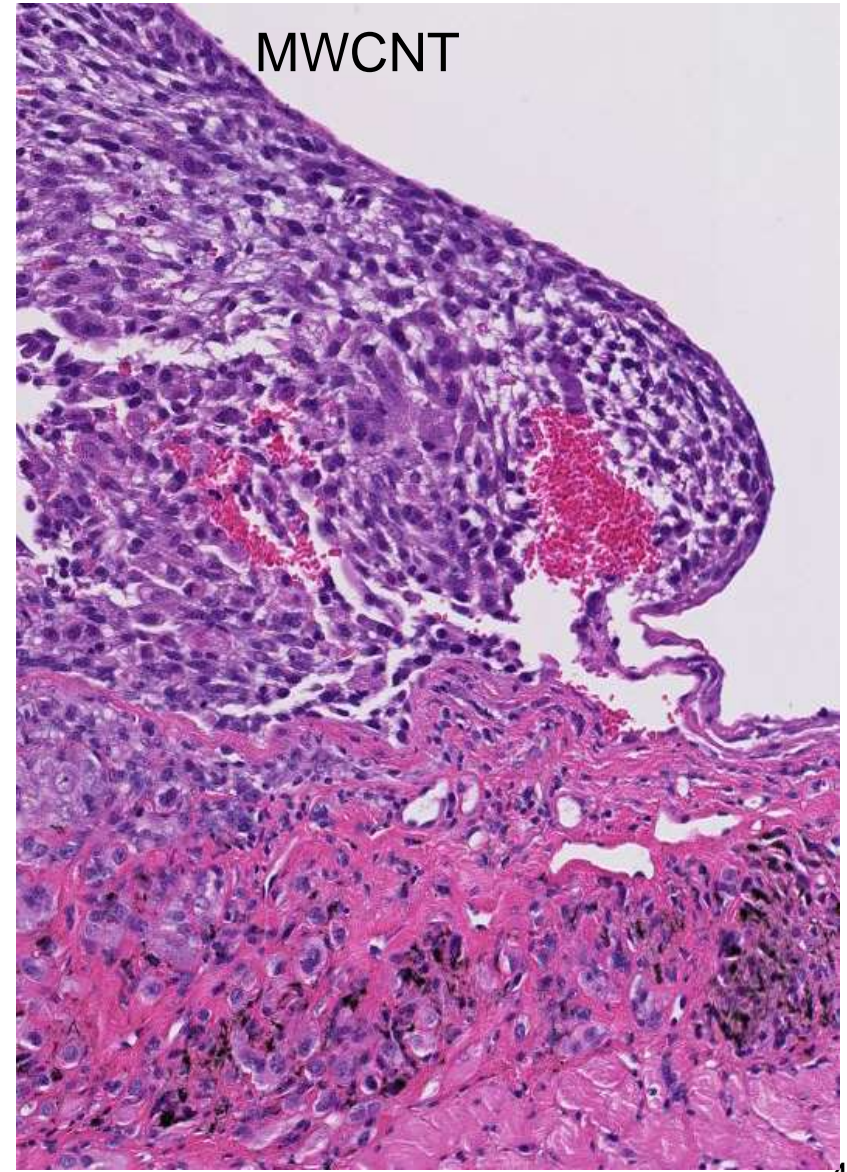
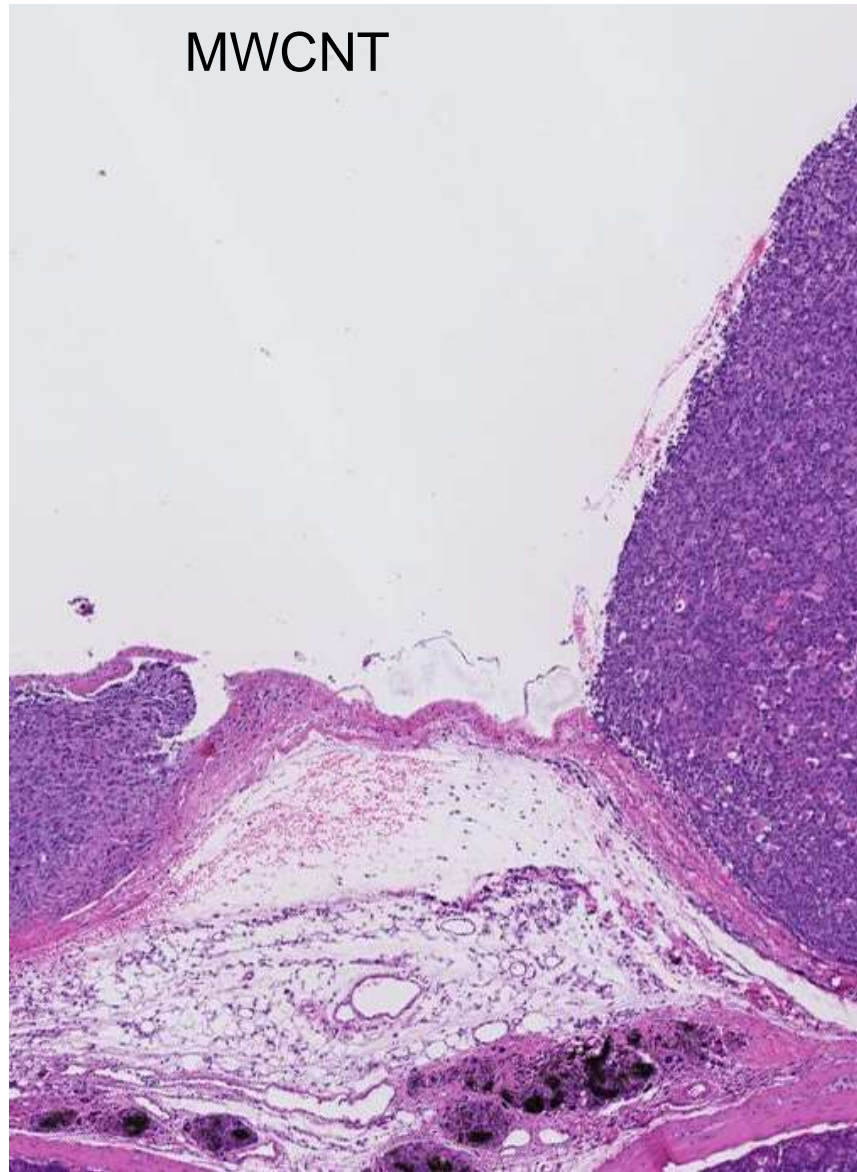
Figure 3

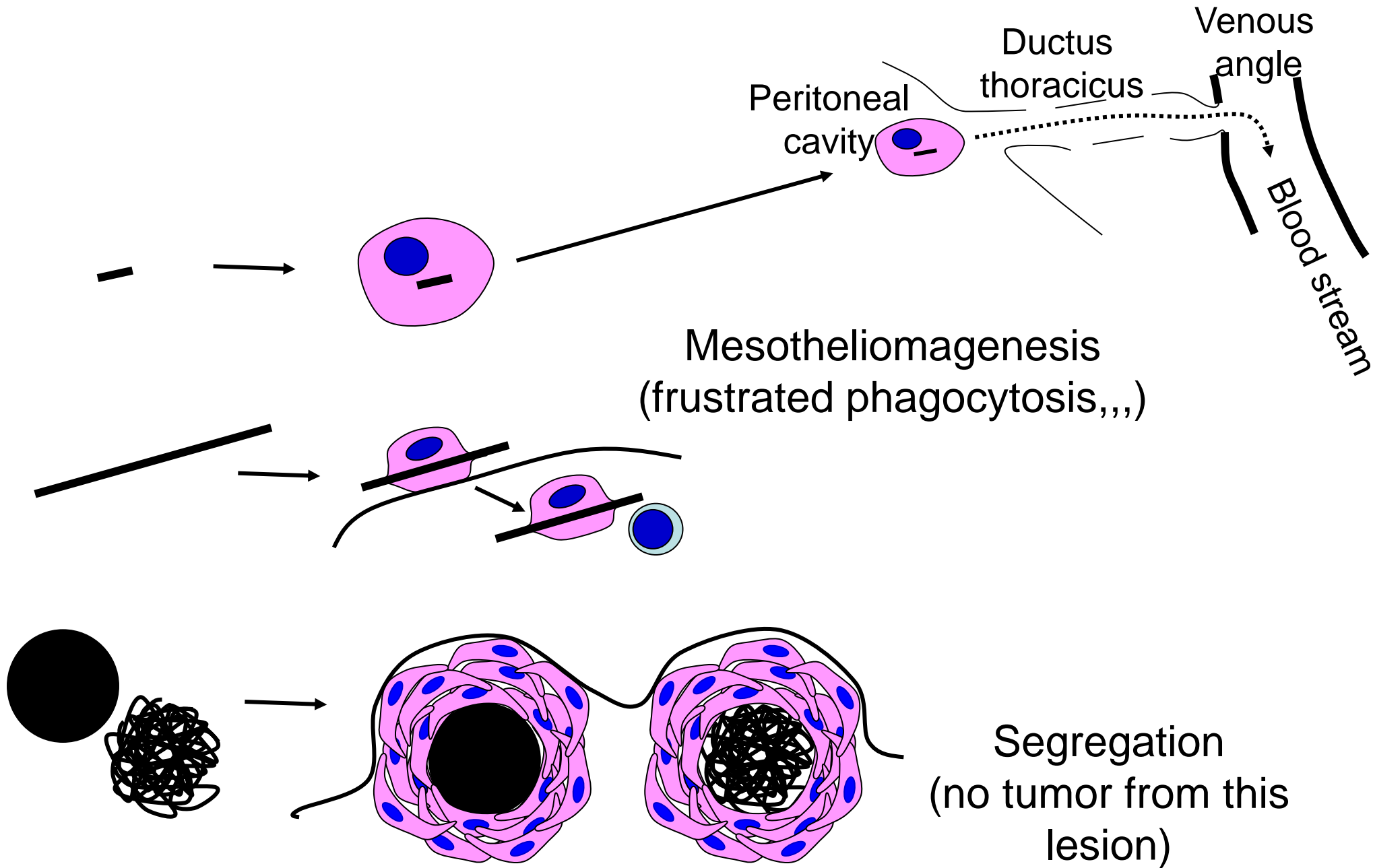


Takagi et al. *Cancer Science*, 2012

MWCNT







MWCNTによりStanton-仮説が支持されている

- 何種類かの異なった性状のMWCNTを腹腔内投与実験し、中皮腫発生の過程を追跡。
 - 日本: 東京
 - ドイツ: Fraunhofer

発癌性が認められないことが十分に予想される
 実験

Absence of Carcinogenic Response to Multiwall Carbon Nanotubes in a 2-Year Bioassay in the Peritoneal Cavity of the Rat

Julie Muller,* Monique Delos,† Nadtha Panin,* Virginie Rabolli,* François Huaux,* and Dominique Lison*¹

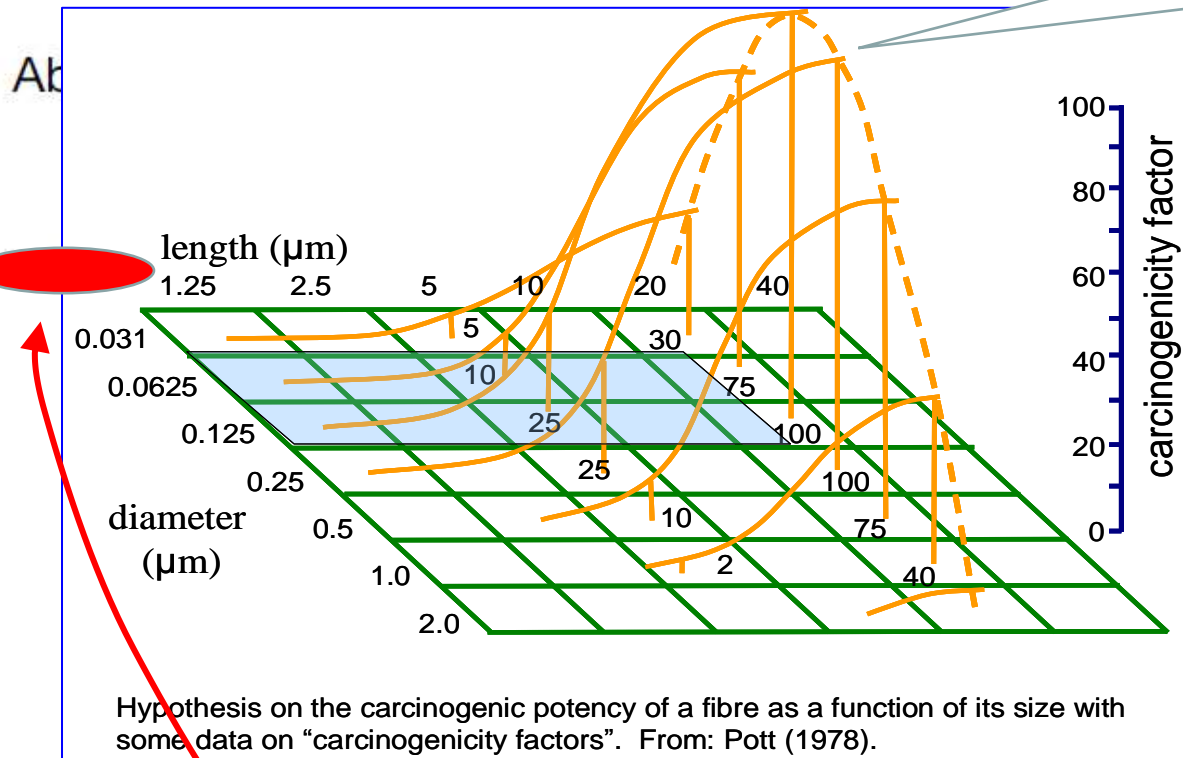
*Industrial Toxicology and Occupational Medicine Unit, Catholic University of Louvain, 1200 Brussels, Belgium; and †Laboratory of Pathology, University Hospital of Mont-Godinne, Catholic University of Louvain, 5530 Yvoir, Belgium

Received April 8, 2009; accepted April 30, 2009

TABLE 1
Main Physico-chemical Characteristics of the Tested Materials

	Crocidolite ^{b,c}	MWCNT+ ^d	MWCNT- ^d
Metal content (%) ^a	nd		
Al		1.97	0.37
Fe		0.49	<0.01
Co		0.48	<0.01
Specific surface area (m ² /g)	8	299	190
Extent of defects (I_D/I_G) ^e	nd	1.16	0.58
Reactive sites ^f , molar	nd	29.2	0.4
enthalpy of adsorption of H ₂ O ₂ (kJ/mmol)			
Diameter (nm)	330 (2.1)*	11.3 ± 3.9**	11.3 ± 3.9
Length (μm)	2.5 (2.0)	About 0.7	About 0.7

発癌性が認められないことが十分に予想される
 実験



Carbon Nanotubes in
 of the Rat
 and Dominique Lison*¹
 and †Laboratory of Pathology, University
 um

Materials

MWCNT-^d

0.37
 <0.01
 <0.01
 0.48
 299
 190
 1.16
 0.58
 29.2
 0.4

Co		0.48	<0.01
Specific surface area (m ² /g)	8	299	190
Extent of defects (I_D/I_G) ^f	nd	1.16	0.58
Reactive sites ^f , molar	nd	29.2	0.4
enthalpy of adsorption of H ₂ O ₂ (kJ/mol)			
Diameter (nm)	330 (2.1)*	11.3 ± 3.9**	11.3 ± 3.9
Length (μm)	2.5 (2.0)	About 0.7	About 0.7

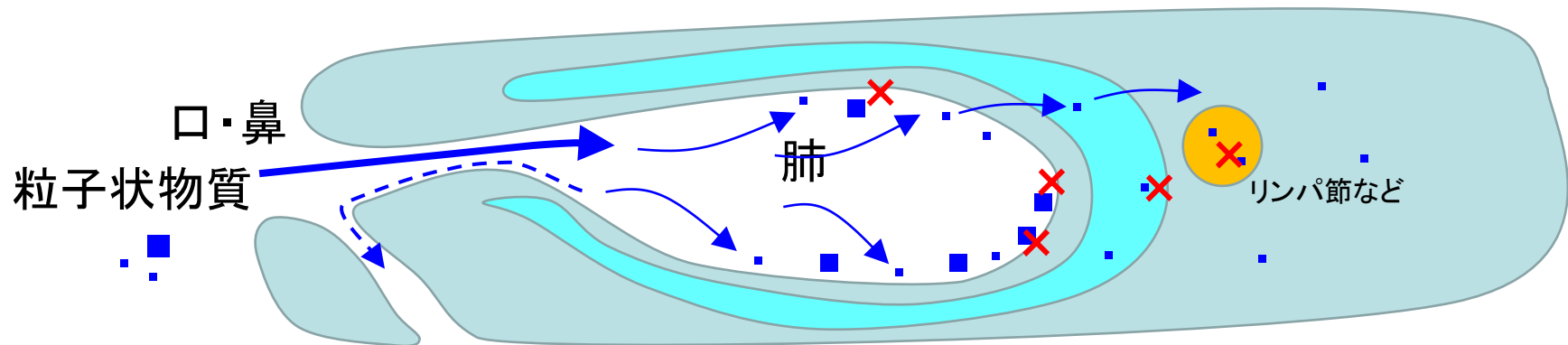
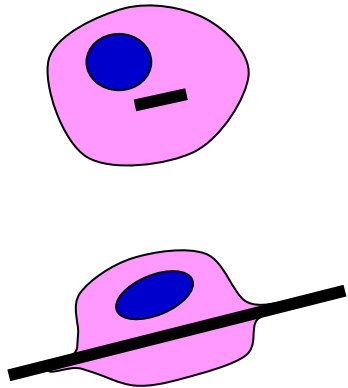
繊維発癌、過去のデータと MWCNTの研究からの結論

- カーボンナノチューブの長さや太さが、発癌性を規定する。
 - 分類は、名前や組成ではなく、形状・サイズと難分解性に基づかなければならない。
- 肉芽腫形成や線維化は、中皮腫発癌と直結しない。
- マクロファージが貪食しきれず、移動できない長さの繊維の存在が中皮腫発癌に直結する。
- 発癌に閾値は無いと考えられる。
- (肺癌の発癌メカニズムの詳細は不明である)

ここでの主役＝マクロファージ(大食細胞)

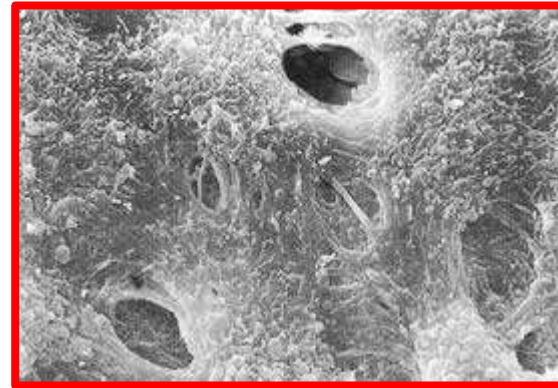
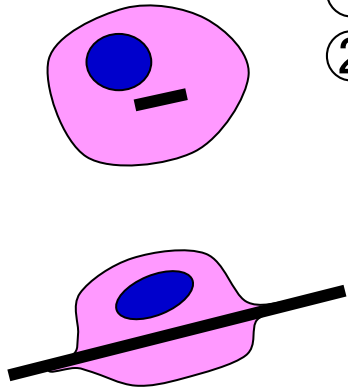
細菌や異物の掃除屋

- 食べる
- 強力に分解(過酸化水素、活性酸素、酵素)
- 応援を呼ぶ(サイトカイン、活性酸素等):炎症、肉芽腫、線維化
- 運ぶ:リンパ節などへ、(胸腔経由、リンパ管、血管経由)
- 処理しきれない時の反応
 - ①原因の隔離肉芽腫・瘢痕化
 - ②くすぶり続ける:Frustrated phagocytosis:発癌

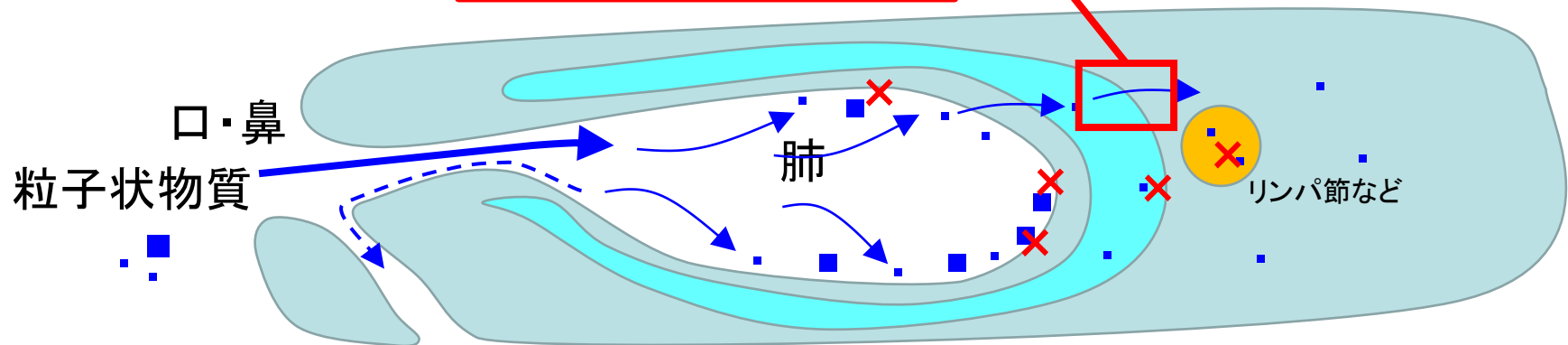


ここでの主役＝マクロファージ(大食細胞) 線維の長さとの関係では、

- ①マクロファージの大きさとの関係: 貪食できるサイズを超えているか
- ②胸膜面の排水口の直径よりも長い(Plural Stomata)

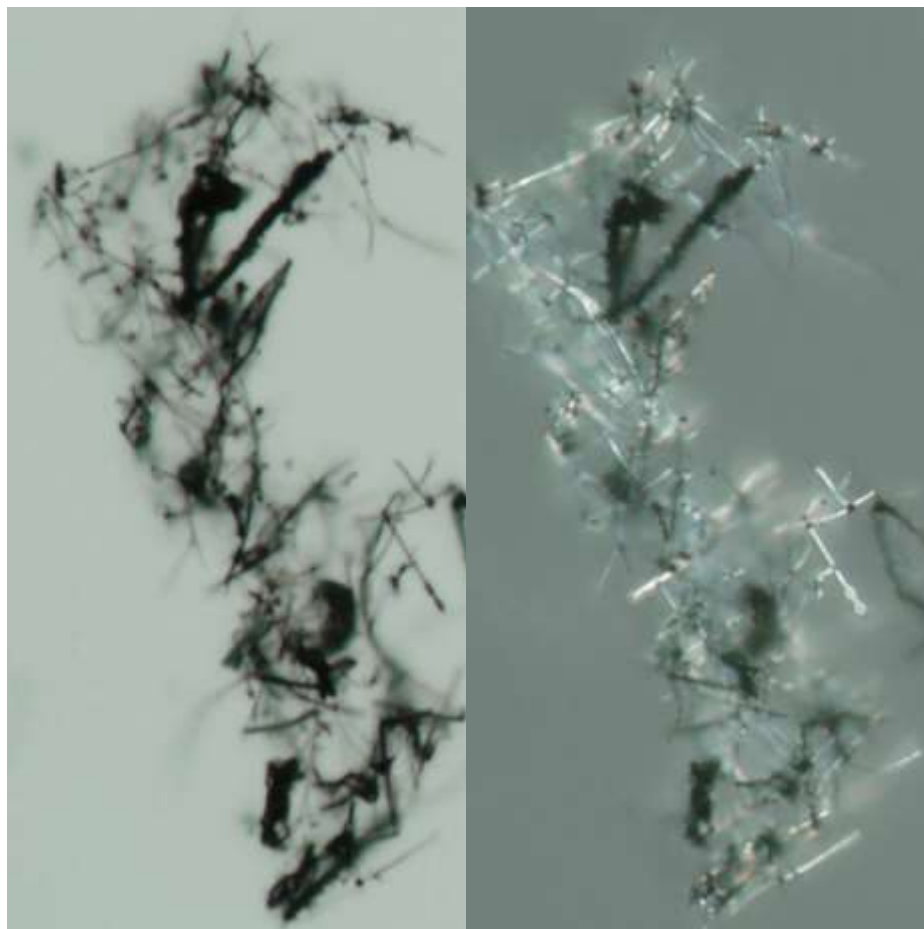


~ $\Phi 10\mu\text{m}$



短めのMWCNTは全身に広がる (リンパ管や血管を介して)

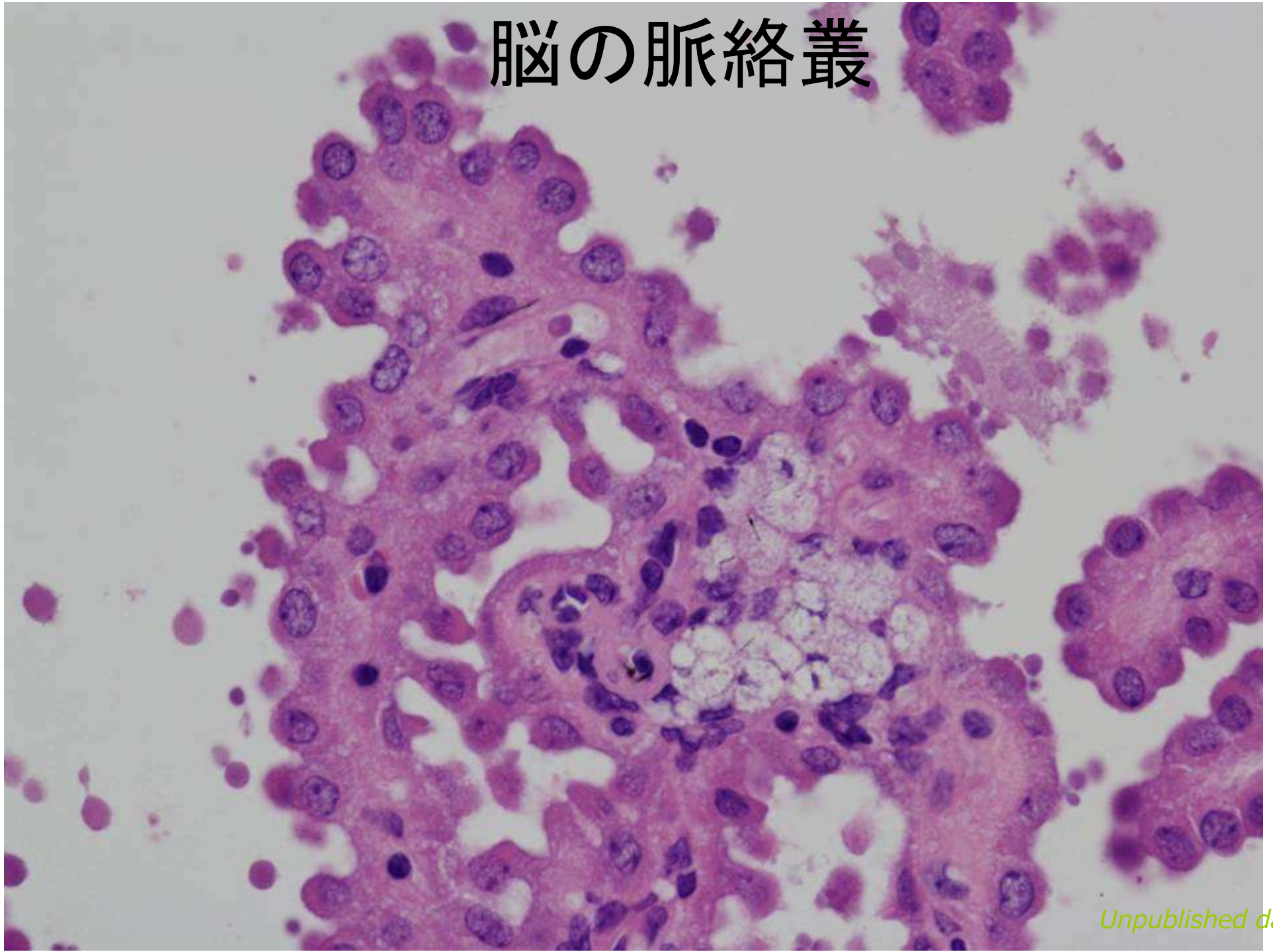
偏光顕微鏡

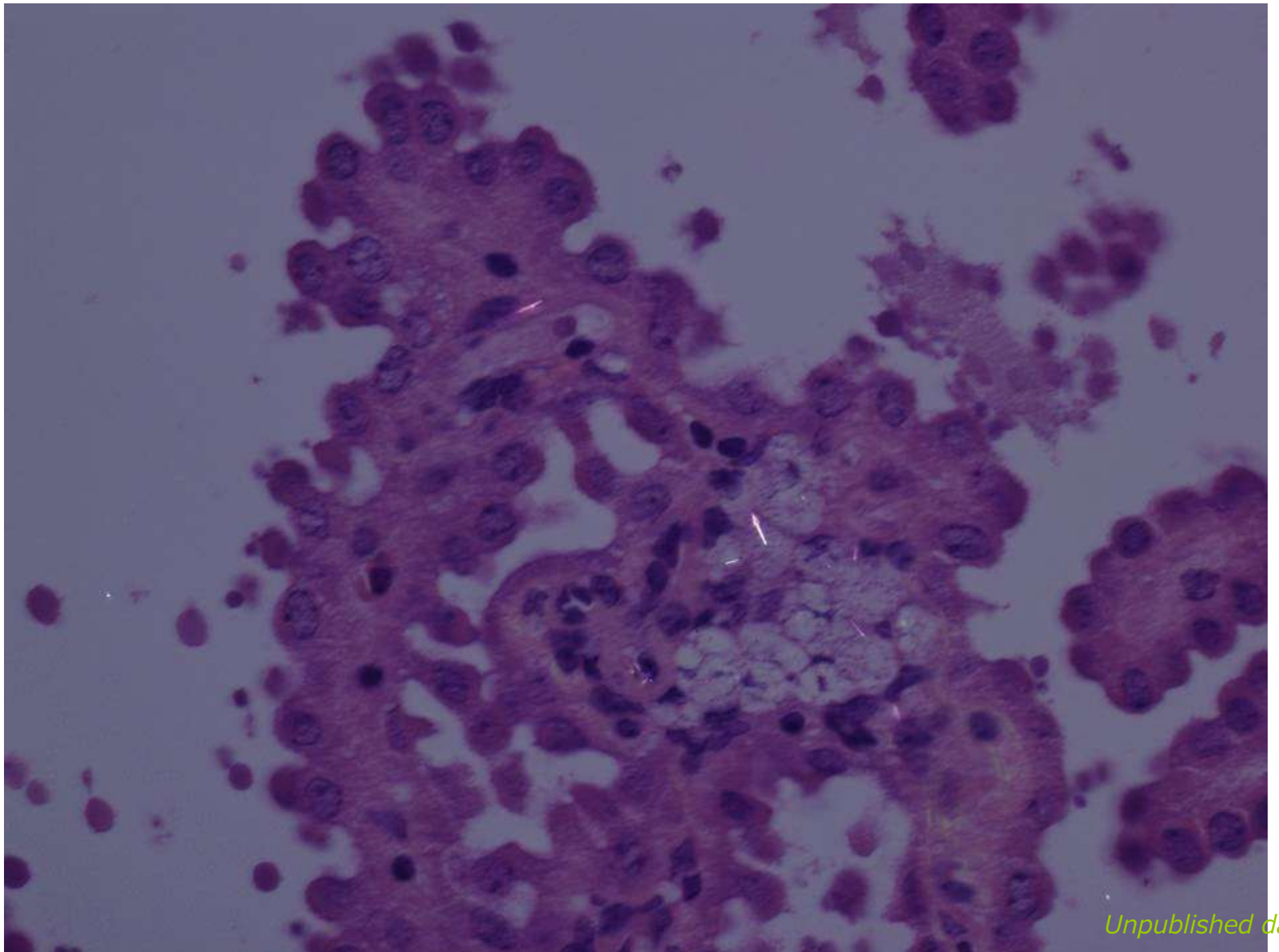


MWNT-7は複屈折性あり

埼玉ナノカーボンプロジェクト講演会 2014-05-17@新都心ヒューマン交流プラザ

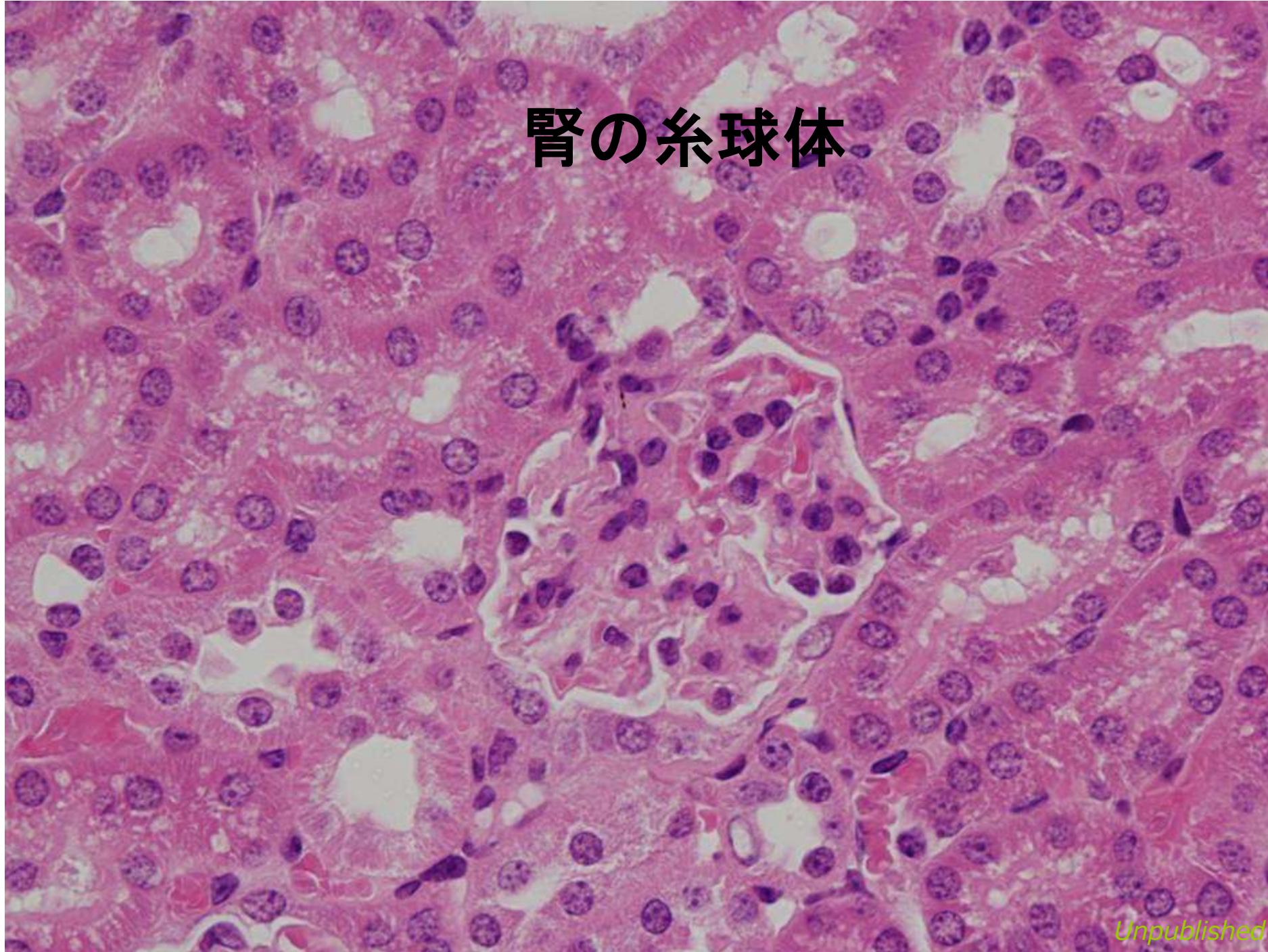
脳の脈絡叢

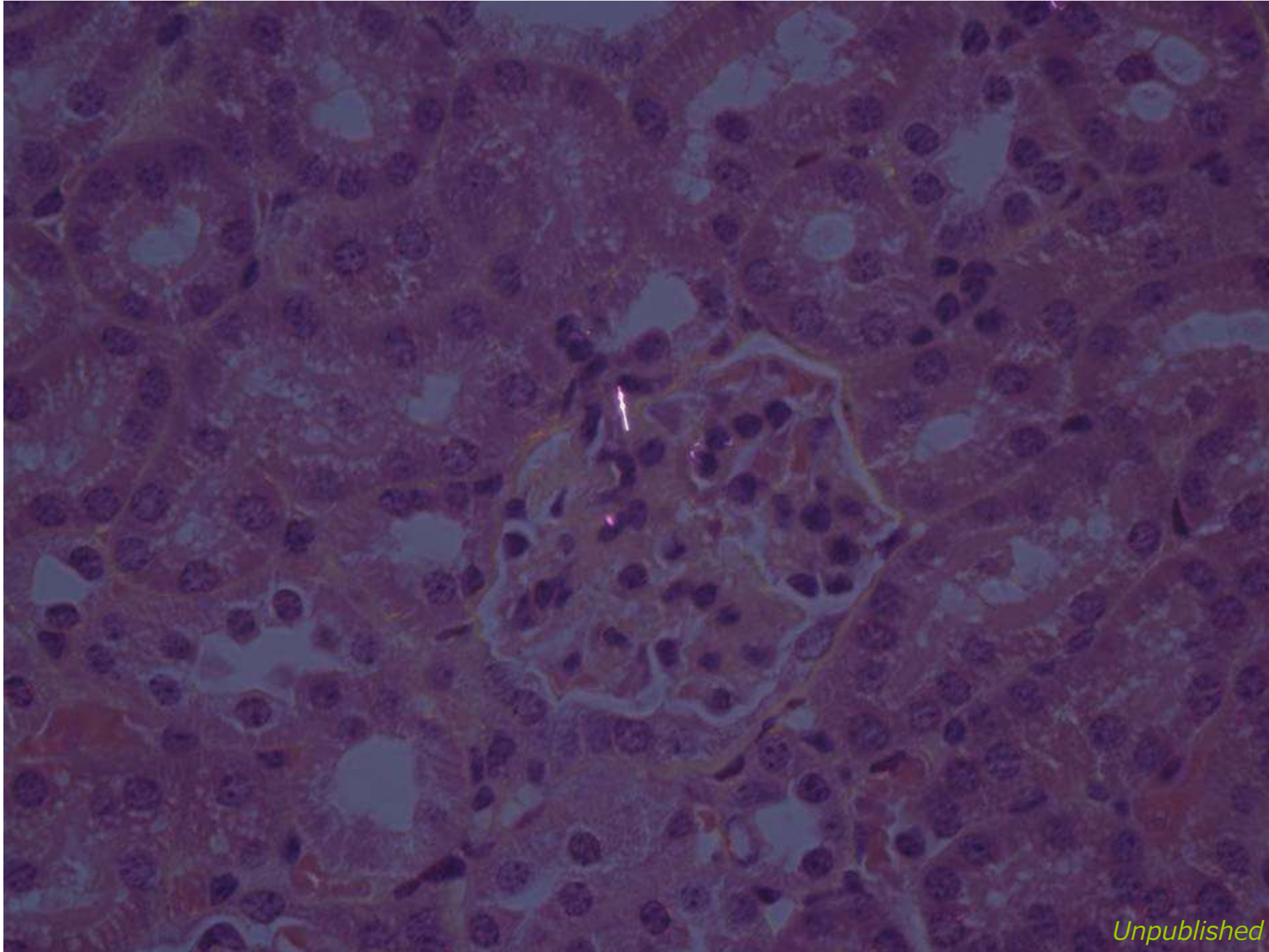




Unpublished data

腎の糸球体





Unpublished data

毒性まとめ：MWCNT

- Stanton仮説により発癌性が予測される長さとおさを持ったMWCNTには中皮腫発癌性があると結論付ける「蓋然性」がある。

毒性まとめ：MWCNT

- Stanton仮説により発癌性が予測される長さとおさを持ったMWCNTには中皮腫発癌性があると結論付ける「蓋然性」がある。

科学的な情報を基に判断する確実さ

Possible	=可能性がある
Probable	=十中八九そうである
Plausible	=蓋然性がある =規制決定等の際して採用せざるを得ない 程度にProbableである (強かに支持する関連データ・情報がある)

毒性まとめ:MWCNT

- Stanton仮説により発癌性が予測される長さとおさを持ったMWCNTには中皮腫発癌性があると結論付ける「蓋然性」がある。
- 凝集などによって出来たMWCNTの大きな塊は、肉芽腫や線維化を起こす。これは、中皮腫発癌とは直結しない。しかし、肉芽腫の形成と繊維化は、体にとって有害であり、非発癌性の毒性である。

毒性まとめ：MWCNT

- Stanton仮説により発癌性が予測される長さとおさを持ったMWCNTには中皮腫発癌性があると結論付ける「蓋然性」がある。
- 凝集などによって出来たMWCNTの大きな塊は、肉芽腫や線維化を起こす。これは、中皮腫発癌とは直結しない。しかし、肉芽腫の形成と繊維化は、体にとって有害であり、非発癌性の毒性である。
- それよりも短いMWCNTは、全身に血行性に広がる。このことによる毒性はまだ調べられていない。

腫瘍（「発癌」という毒性）

- 原因：
 - 遺伝子に傷をつける因子、物質
 - 放射線
 - ウイルス
 - DNAに結合する化学物質
 - 遺伝子に傷がついてしまう状況を作り出す
 - 炎症（活性酸素など、DNAと反応し得る）
 - 過剰刺激（細胞増殖を指令するシグナルの亢進）

腫瘍（「発癌」という毒性）

- 原因：
 - 遺伝子に傷をつける因子、物質
 - 放射線
 - ウイルス
 - DNAに結合する化学物質
 - 遺伝子に傷がついてしまう状況を作り出す
 - 炎症（活性酸素など、DNAと反応し得る）
 - 過剰刺激（細胞増殖を指令するシグナルの亢進）

腫瘍（「発癌」という毒性）

- 原因：

- 遺伝子に傷をつける因子、物質

- 放射線
- ウイルス
- DNAに結合する化学物質

- 遺伝子に傷がついてしまう状況を作り出す

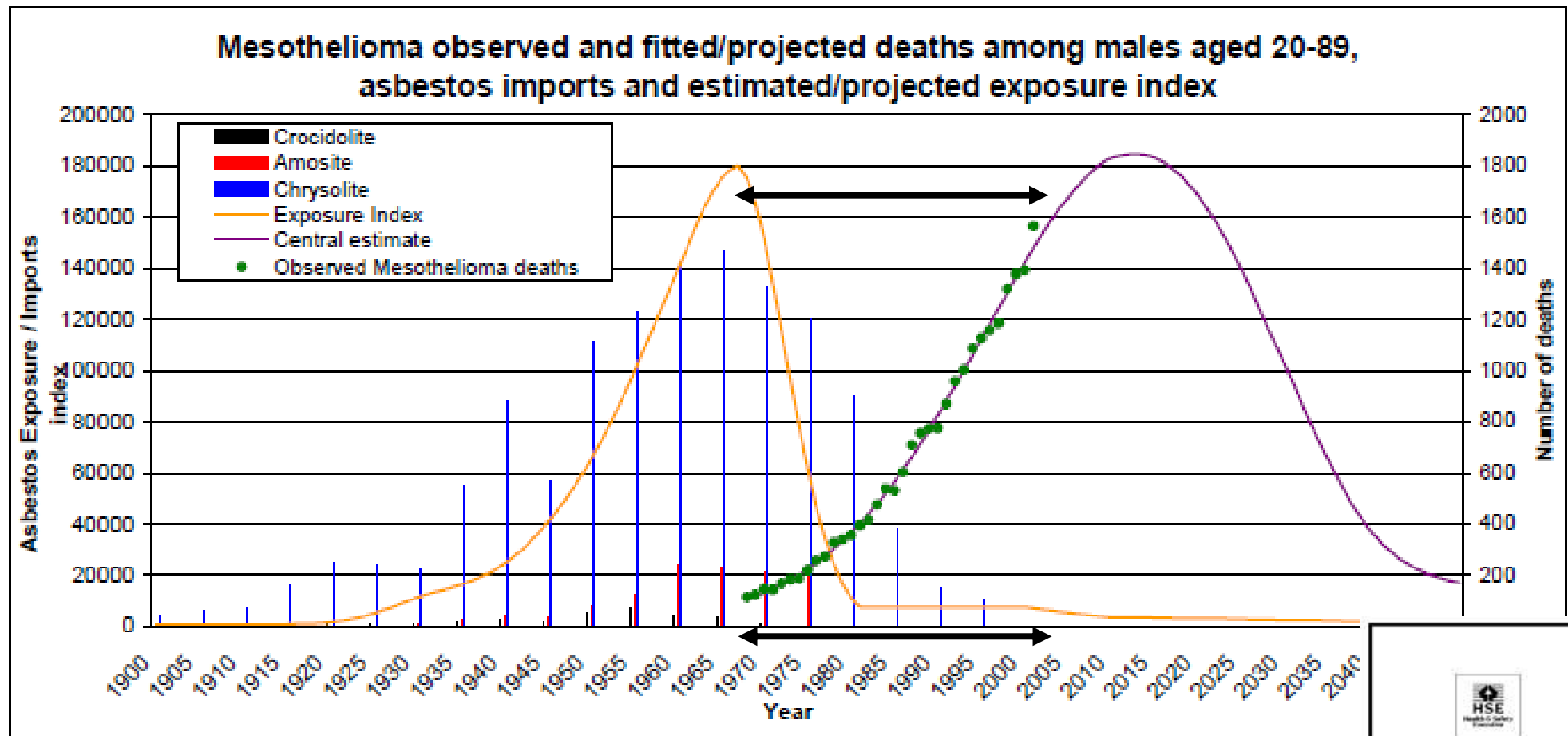
- 炎症（活性酸素など、DNAと反応し得る）
- 過剰刺激（細胞増殖を指令するシグナル）

通常、このメカニズムの発癌に閾値があるとされるが、粒子状物質の場合は、閾値が設定できない。

発癌という毒性の特徴

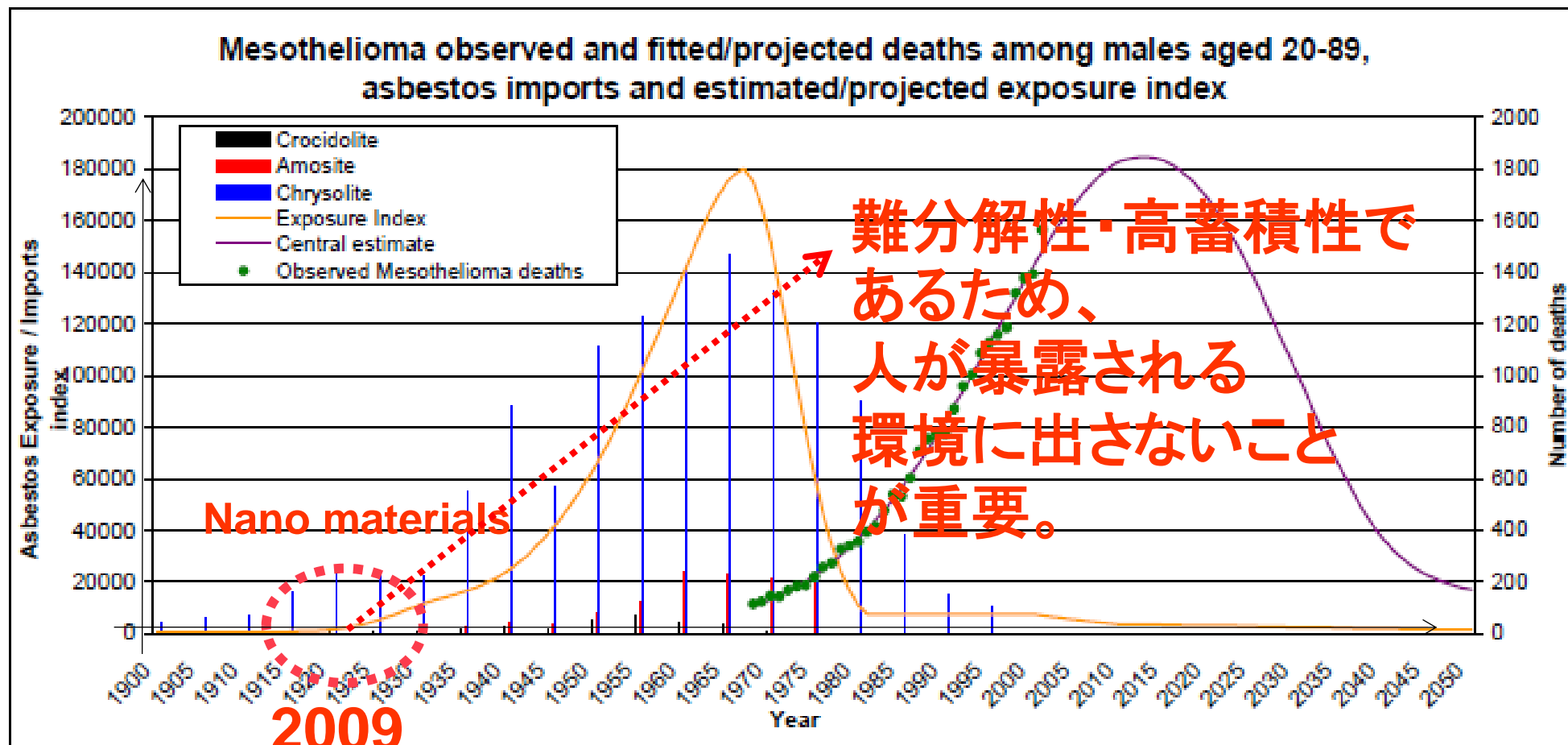
- 「原因」が体を襲ってから、発癌して、症状が出るまでに10年以上かかる。

Figure 3



4. Discussion

Figure 3



4. Discussion



埼玉ナノカーボンプロジェクト講演会 2014-05-17@新都心ビジネス交流プラザ

本題：ナノマテリアルの毒性評価

- わかっていること
 - 難分解性のものが多い。
 - ゆえに、急性毒性は弱い
 - 慢性毒性が問題の中心である。
- わかっていないこと
 - ナノマテリアルの吸収と分布
 - 慢性毒性

毒性研究の方向性

1. メカニズムがある程度、既知の場合 = ごく限られている
 - ・繊維発癌 – 腹腔内投与モデル
 - ・全身分布(血行性・リンパ行性) – 腹腔内投与モデル
-

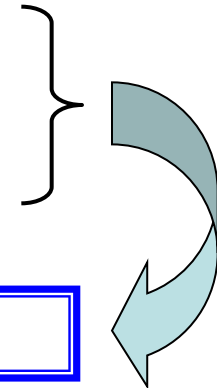
毒性研究の方向性

1. メカニズムがある程度、既知の場合 = ごく限られている
 - ・繊維発癌 – 腹腔内投与モデル
 - ・全身分布(血行性・リンパ行性) – 腹腔内投与モデル
-

2. メカニズムが未知の場合
人で想定される暴露経路*による動物実験

- 有害性同定
- メカニズム同定(推定)
- 用量相関データ取得

人における毒性と用量相関性を推定



*: 吸入(全身, 気管内), 経皮, 経口

毒性研究の方向性

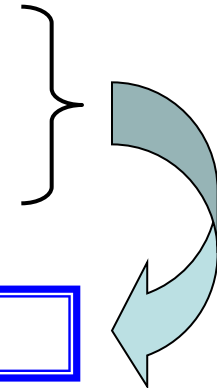
1. メカニズムがある程度、既知の場合 = ごく限られている
 - ・繊維発癌 – 腹腔内投与モデル
 - ・全身分布(血行性・リンパ行性) – 腹腔内投与モデル
-

2. メカニズムが未知の場合
人で想定される暴露経路*による動物実験

- 有害性同定
- メカニズム同定(推定)
- 用量相関データ取得

人における毒性と用量相関性を推定

*: 吸入 (全身, 気管内), 経皮, 経口



毒性研究の方向性

1. メカニズムがある程度、既知の場合 = ごく限られている
 - ・繊維発癌 – 腹腔内投与モデル
 - ・全身分布(血行性・リンパ行性) – 腹腔内投与モデル

2. メカニズムが未知の場合
人で想定される暴露経路*による動物実験

- 有害性同定
- メカニズム同定(推定)
- 用量相関データ取得

SWCNT
Shorter MWCNT
Other CNT
Nano Metals
TiO₂
ZnO
Fullerene whiskers
Etc.

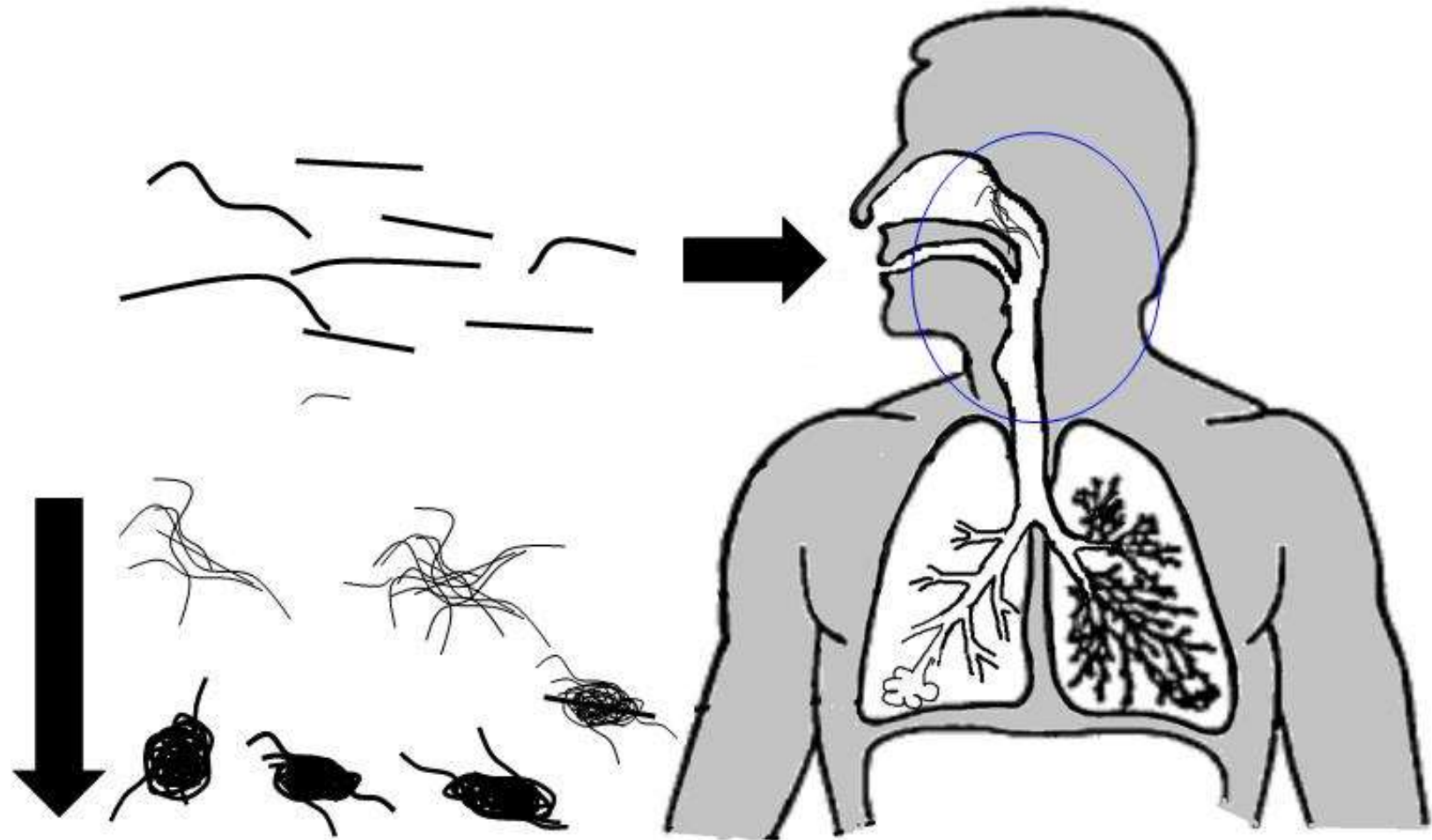
人における毒性と用量相関性を推定

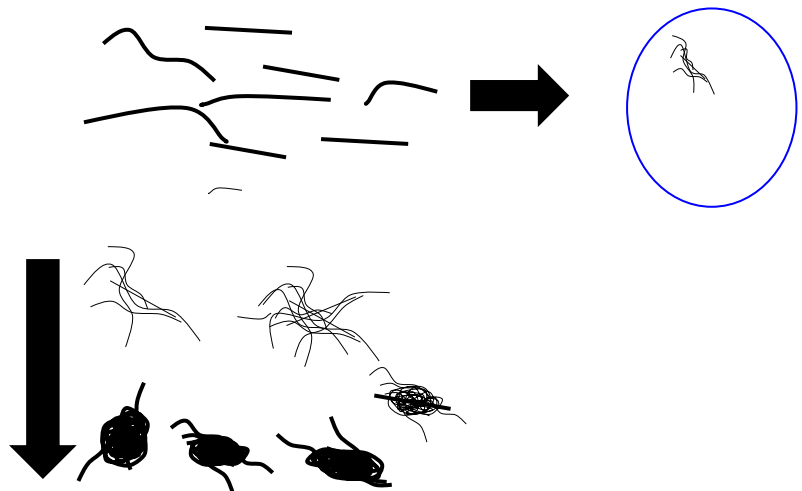
*: 吸入(全身, 気管内), 経皮, 経口

Case study: MWCNT (MWNT-7)

- Human environment allows to inhale dispersed single fibers
 - Low wind in human environment compared to constant rigorous agitation of air in animal chamber
 - Human upper respiratory tract is much longer than rodents'
- Alveolar lesions are important
 - In earlier rodent studies, aggregates/agglomerates induced lesions at proximal segments; masking distal lesions
- Preparing well-dispersed single fiber aerosol
 - Without dispersant
 - No change is size (length and width) of single particles

MWNT-7をテストケースとして





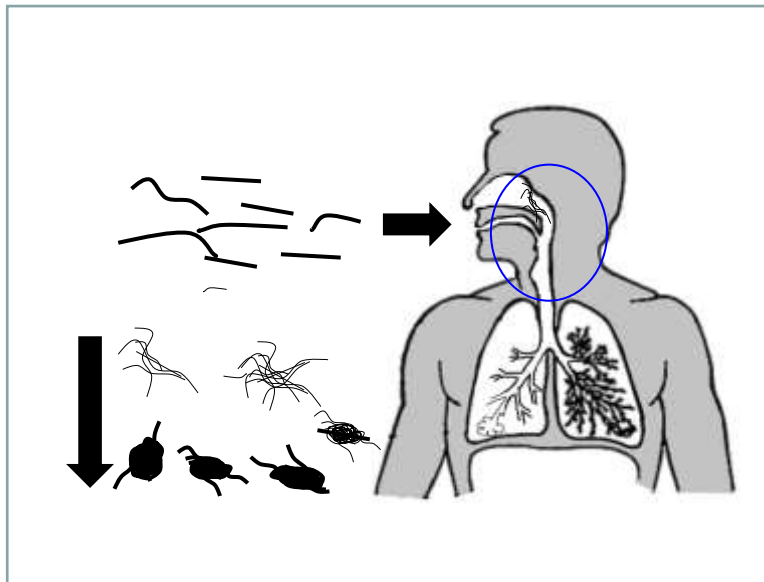
埼玉ナ



新都心ビジネス交流プラザ

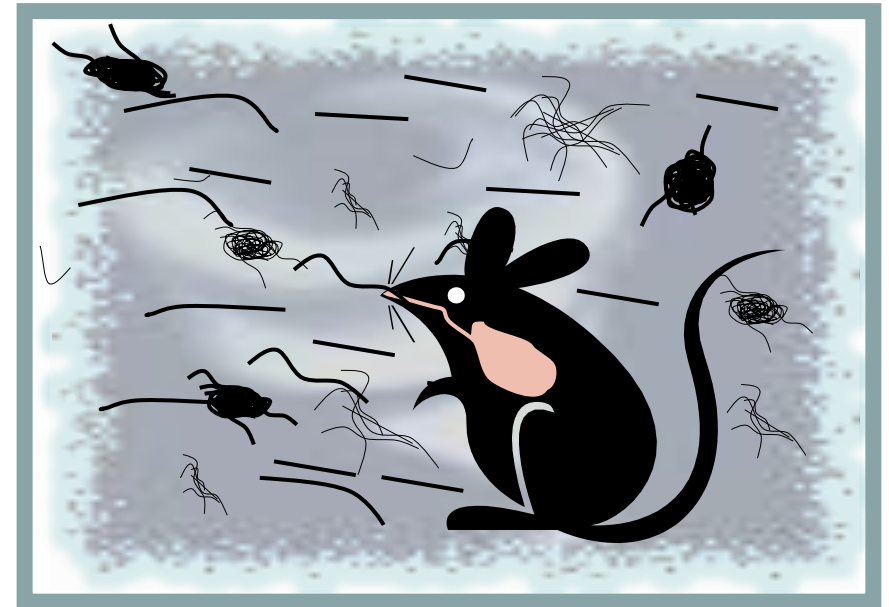


Human



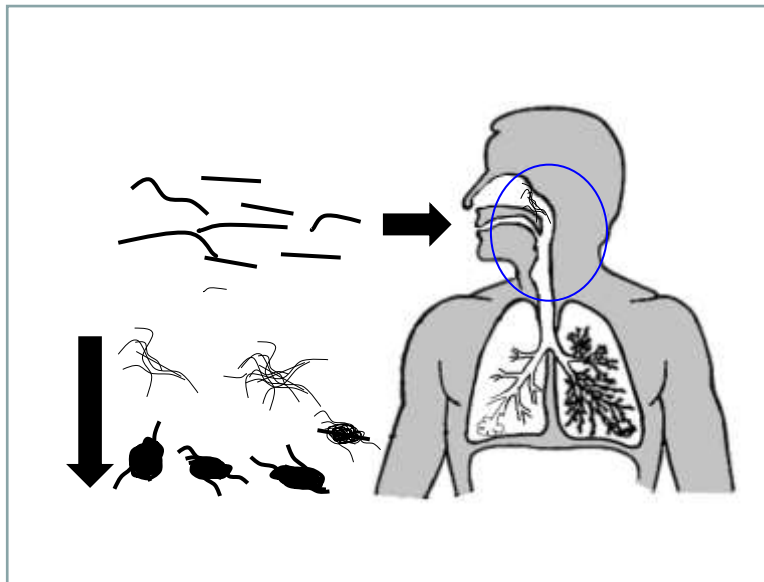
≠

Exposure Chamber
=Rigorous agitation

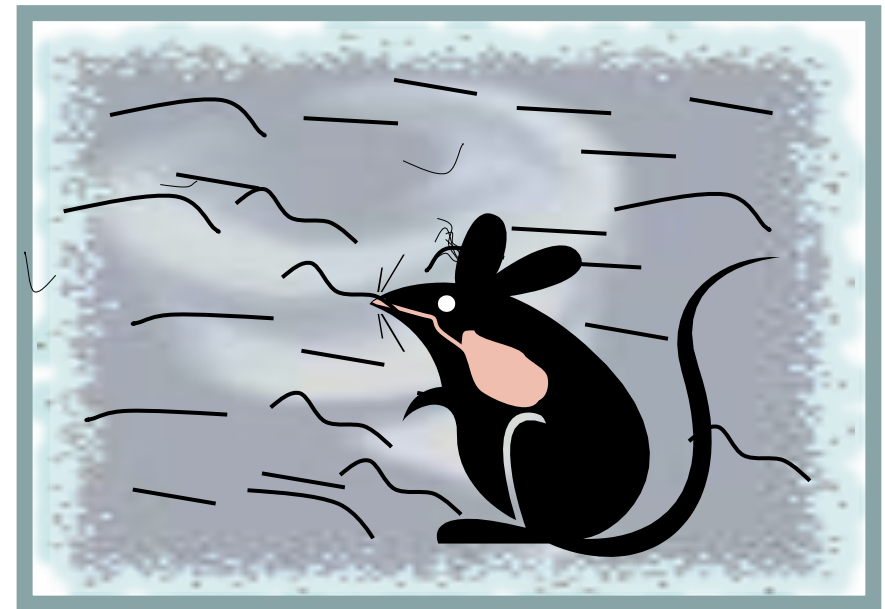


**Aerosol with
aggregates/agglomerates**

Human



Exposure Chamber
=Rigorous agitation



**Aerosol without
aggregates/agglomerates**

Taquann method (outline)

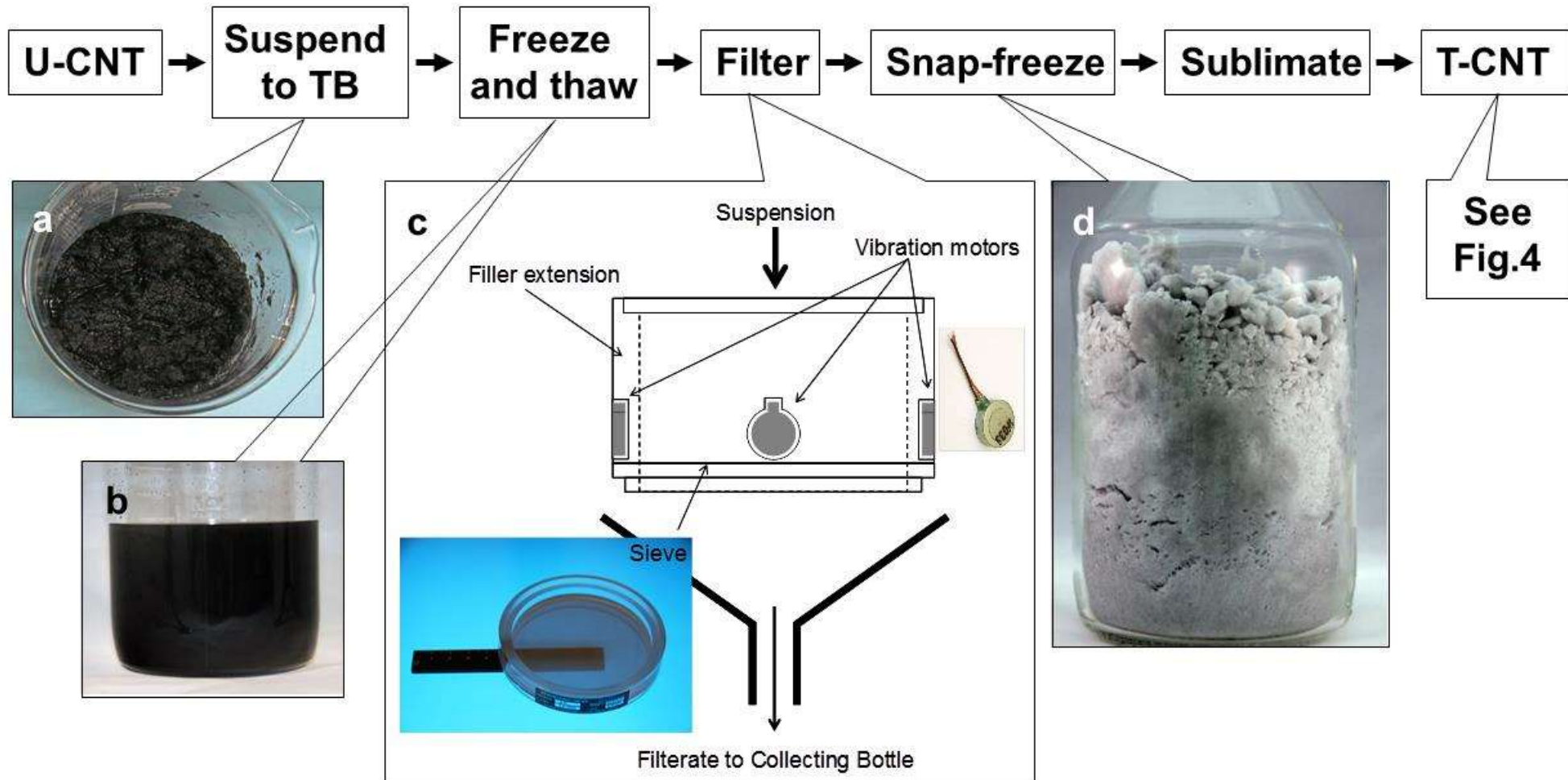
Based on two idea of

- 液相での濾過 : Liquid phase dispersion and filtration using volatile dispersant.
- 臨界点乾燥による再凝集の阻止 : Critical point drying to avoid aggregation by surface tension.

高度に分散した単繊維の MWCNT を精確に分取することが出来る。

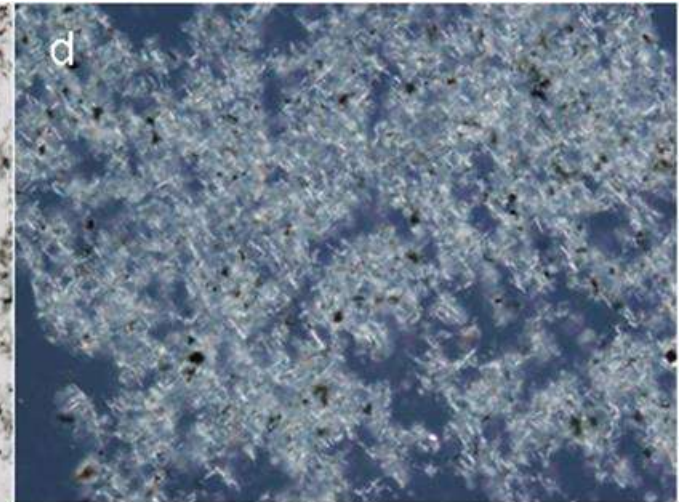
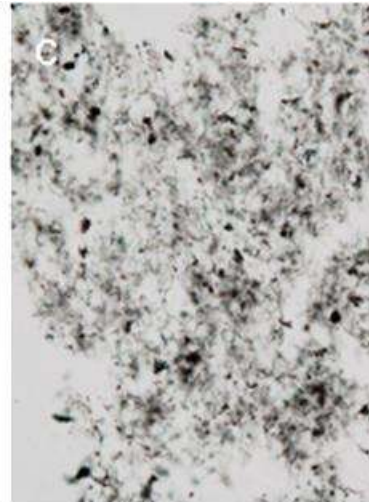
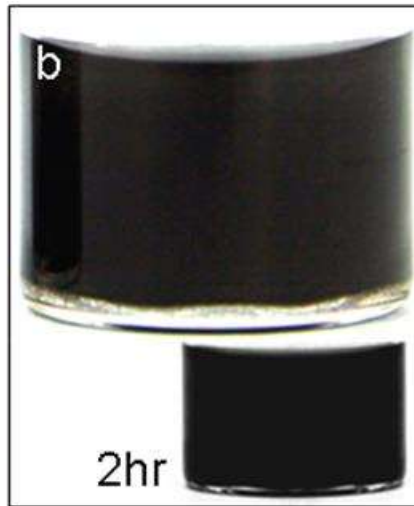
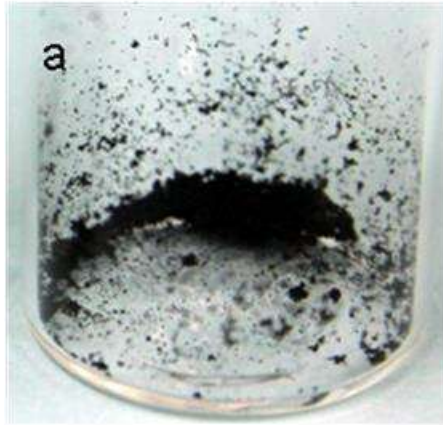
“Taquann method” 概略

Taquahashi et al., J Toxicological Sciences, 2013

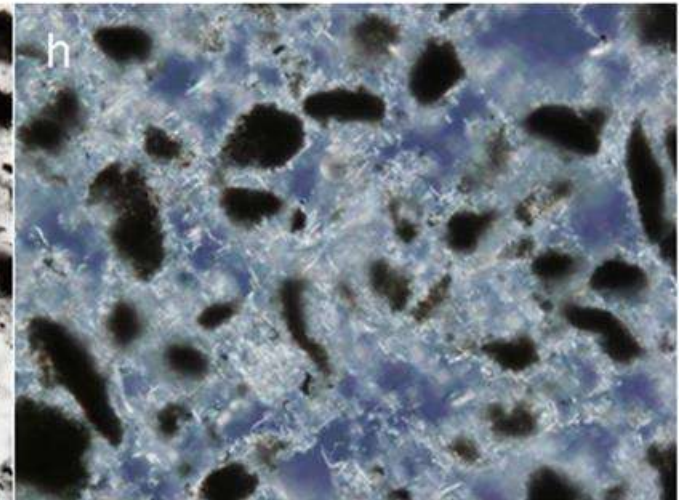
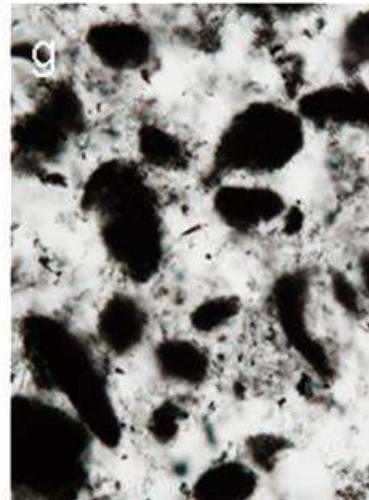
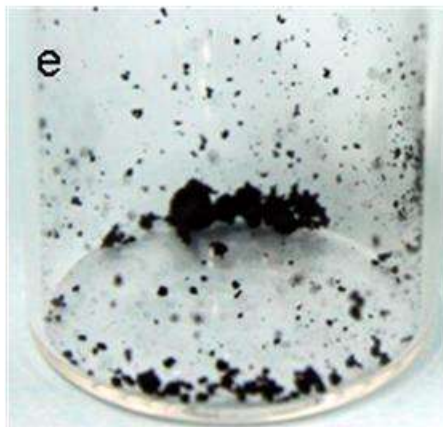


Macroscopic and light microscopic views

T-CNT

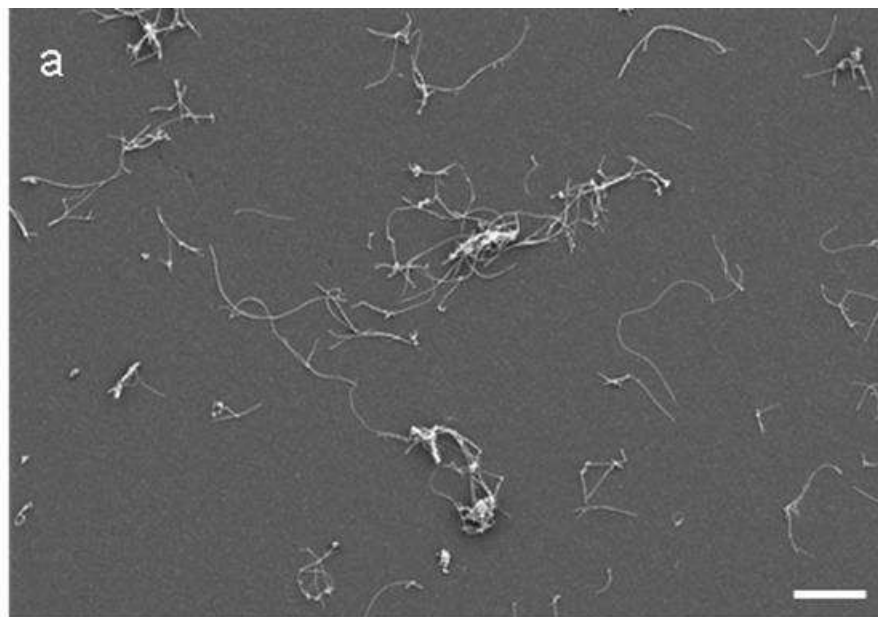


U-CNT

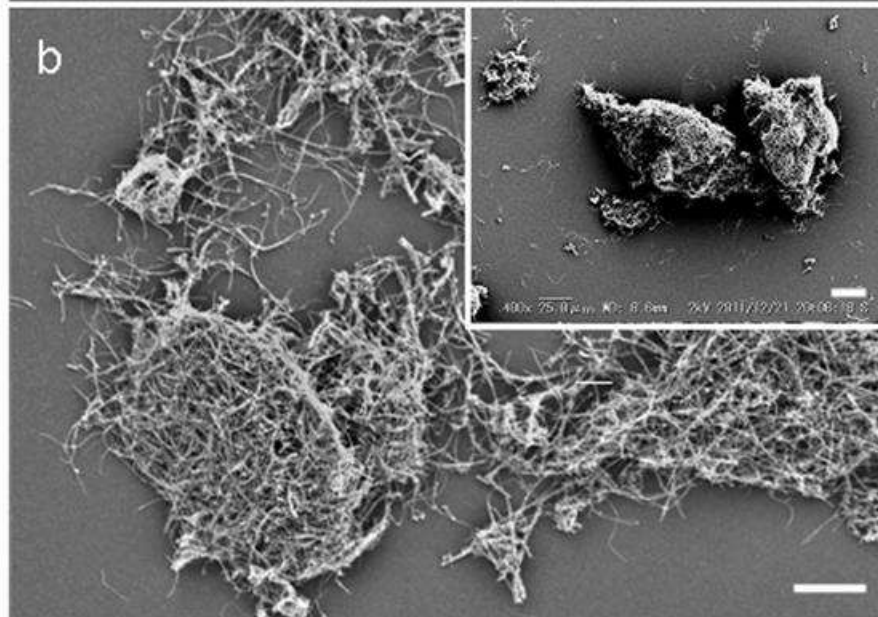


Taquahashi et al., JTS, 2013

T-CNT (SEM x1,000)
Consists mainly of
Dispersed single fibers



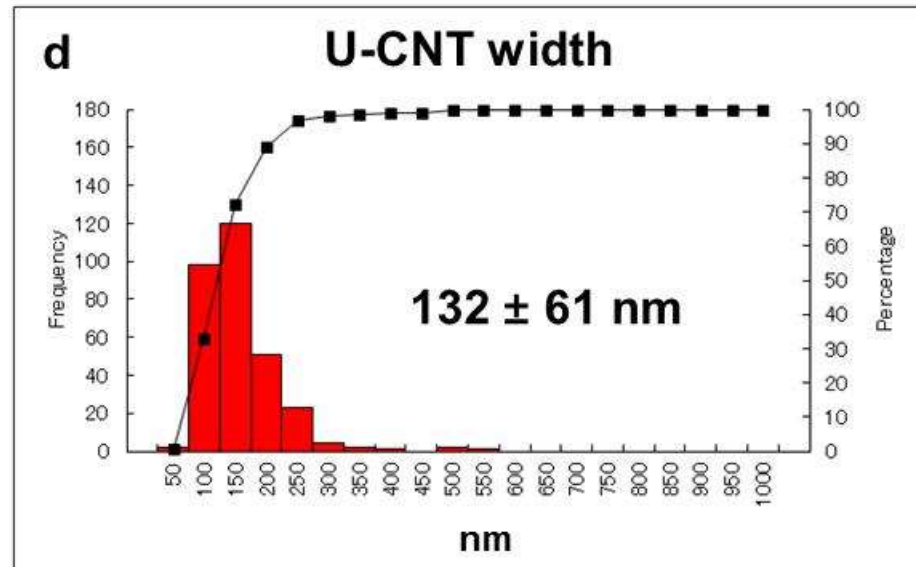
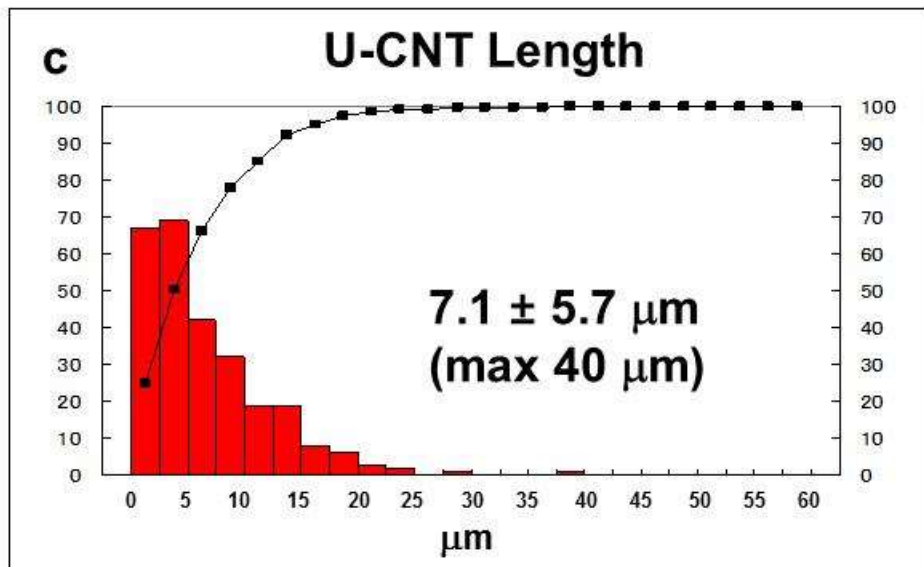
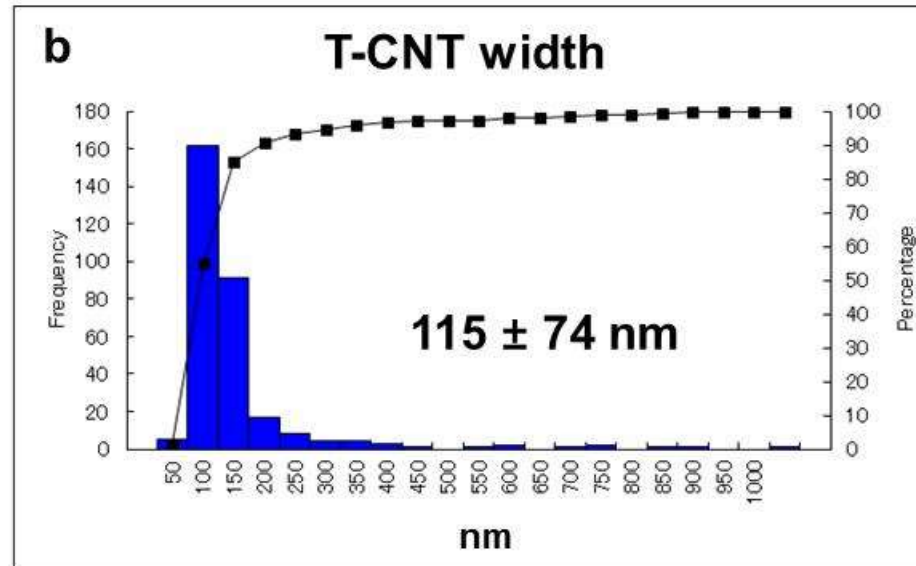
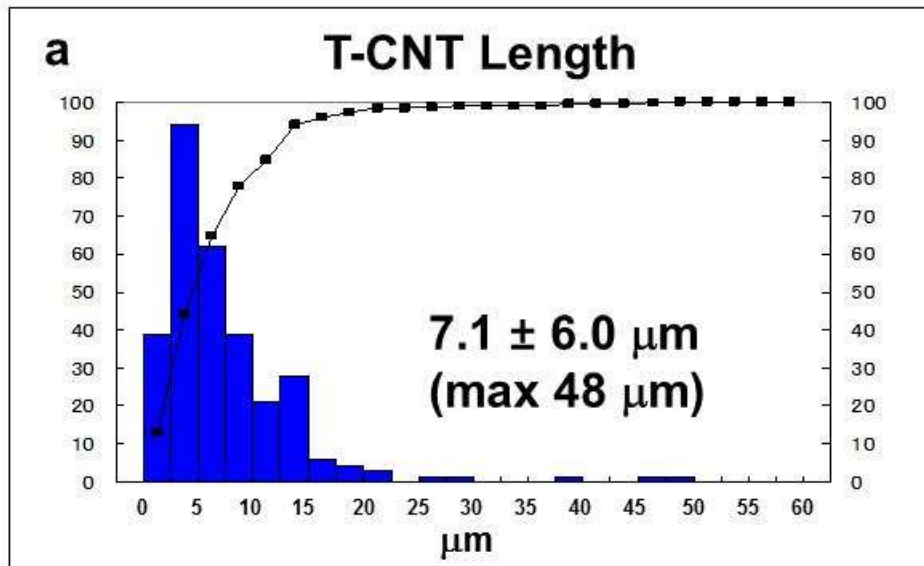
U-CNT (SEM x1,000)
Mixture of single fibers
and large
aggregates/agglomerat



SEM x400

scale bars 10 μ m

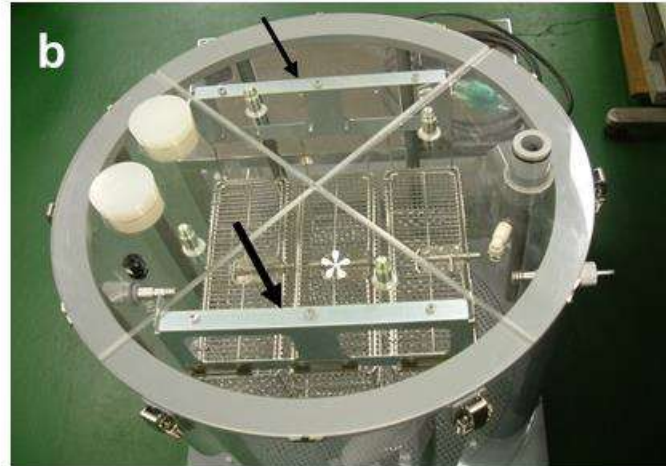
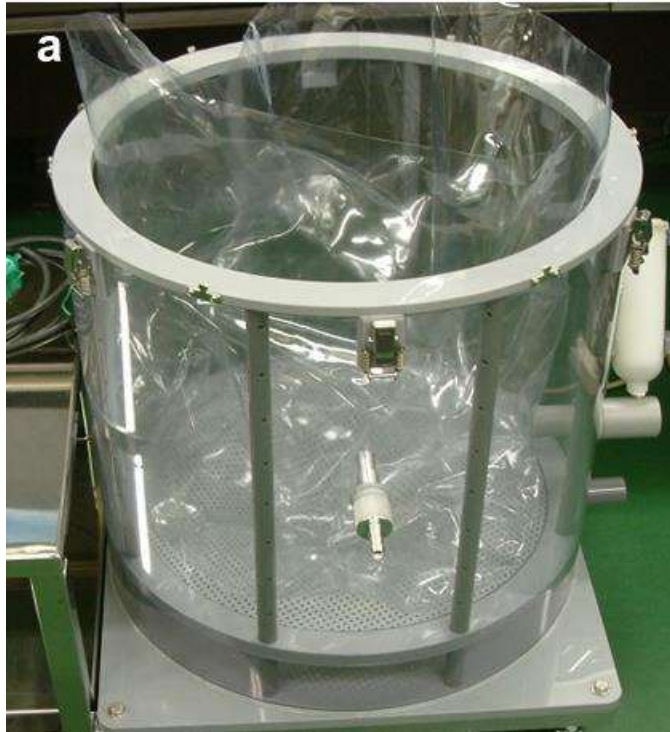
The distribution of the fiber length & width



Mainchamber

Patent pending

Facilitate a solution for changing test substances by using disposable system



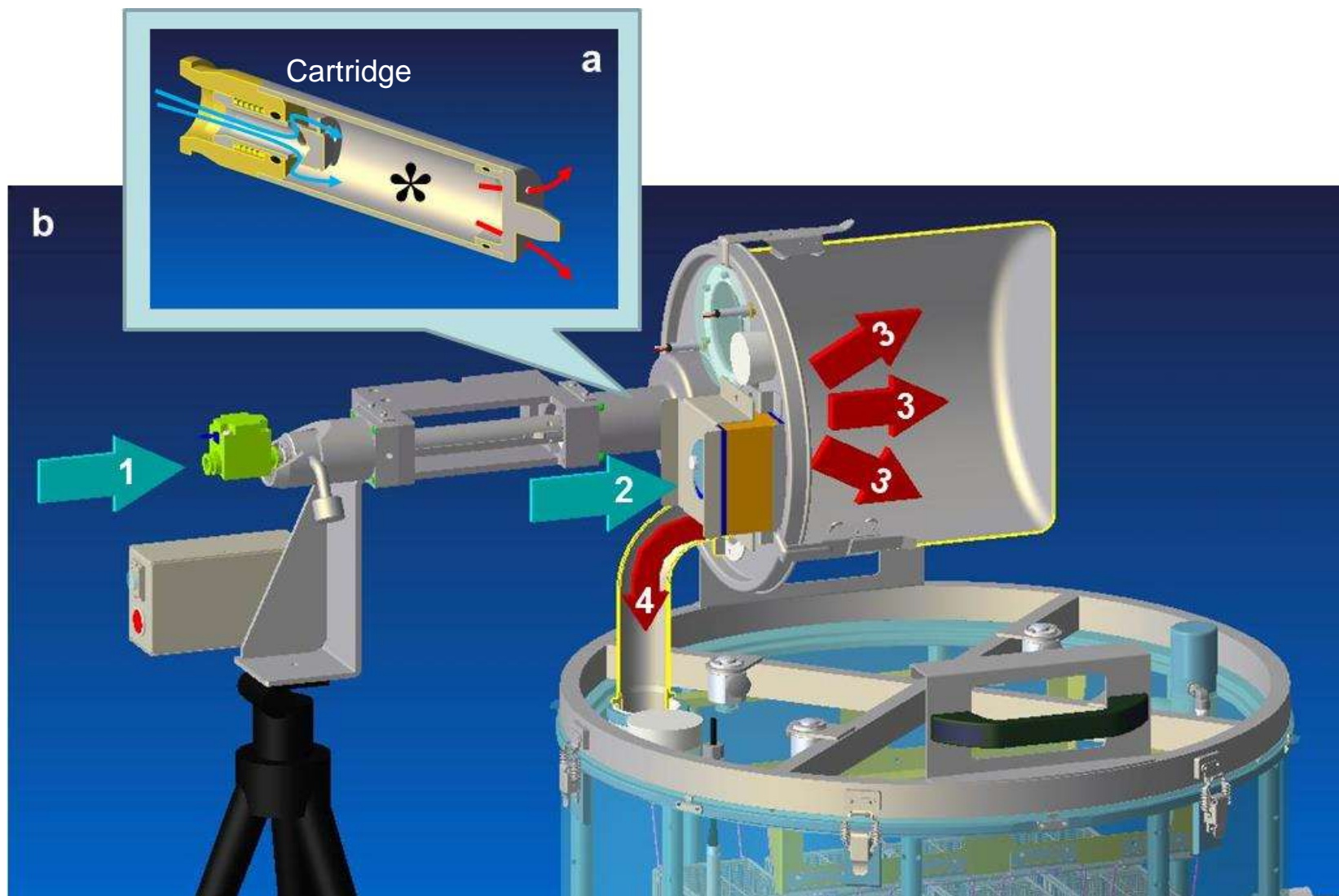
- Disposable top plate with tubing holes
- The animal cages for 16 mice (asterisk) are suspended from the top



A whole image

- Inner bag: Disposable electrostatic-free plastic bag
- Outerchamber: acrylic
- $\Phi 550\text{mm} \times H550\text{mm}$, inner volume: 105.5 L
- Differential pressure : Room > Inner bag > space between outerchamber & inner bag
- Differential pressure maintain the shape of the inner bag

Carrier air flow from subchamber to mainchamber



Loading T-CNT to the cartridges



Cartridges
 $\Phi 22 \text{ mm} \times H65 \text{ mm}$
Capacity; 23.5mL

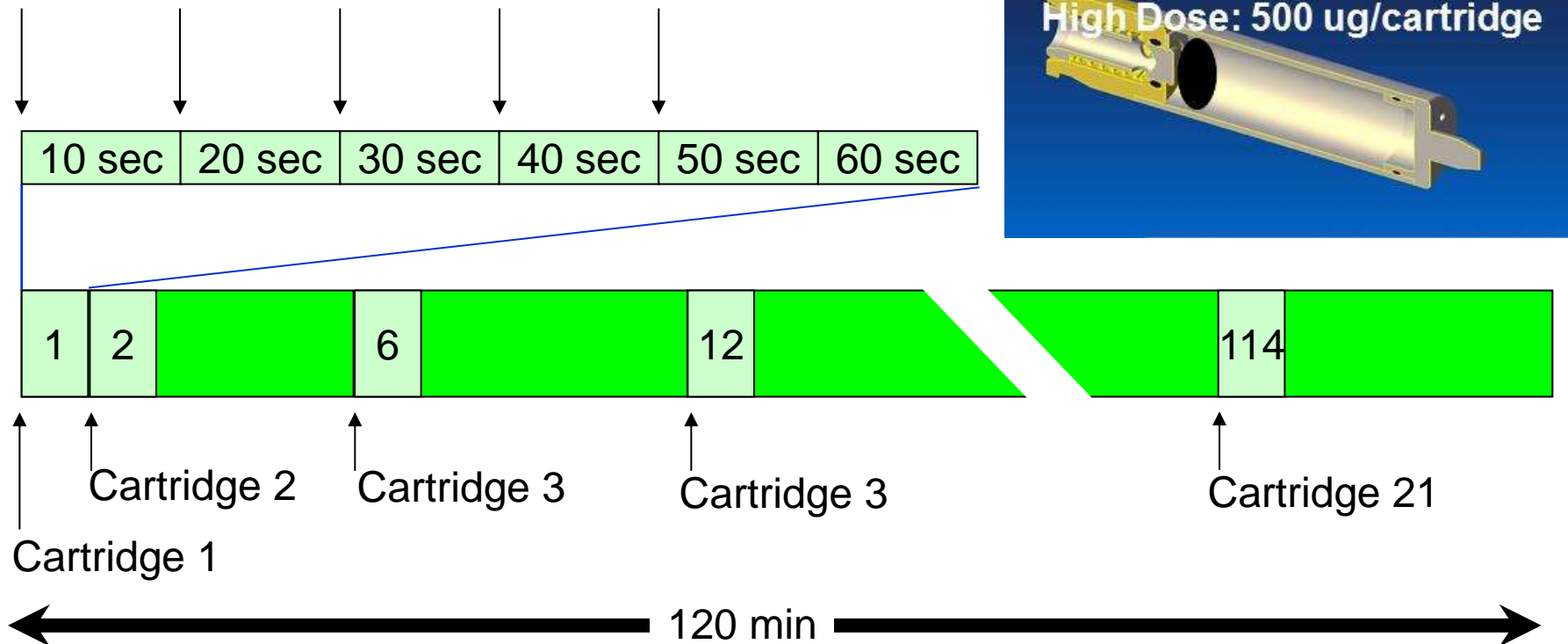


A measured amount the collected T-CNT was resuspended to TB

The suspension was dispensed into the cartridges, snap-frozen and sublimated

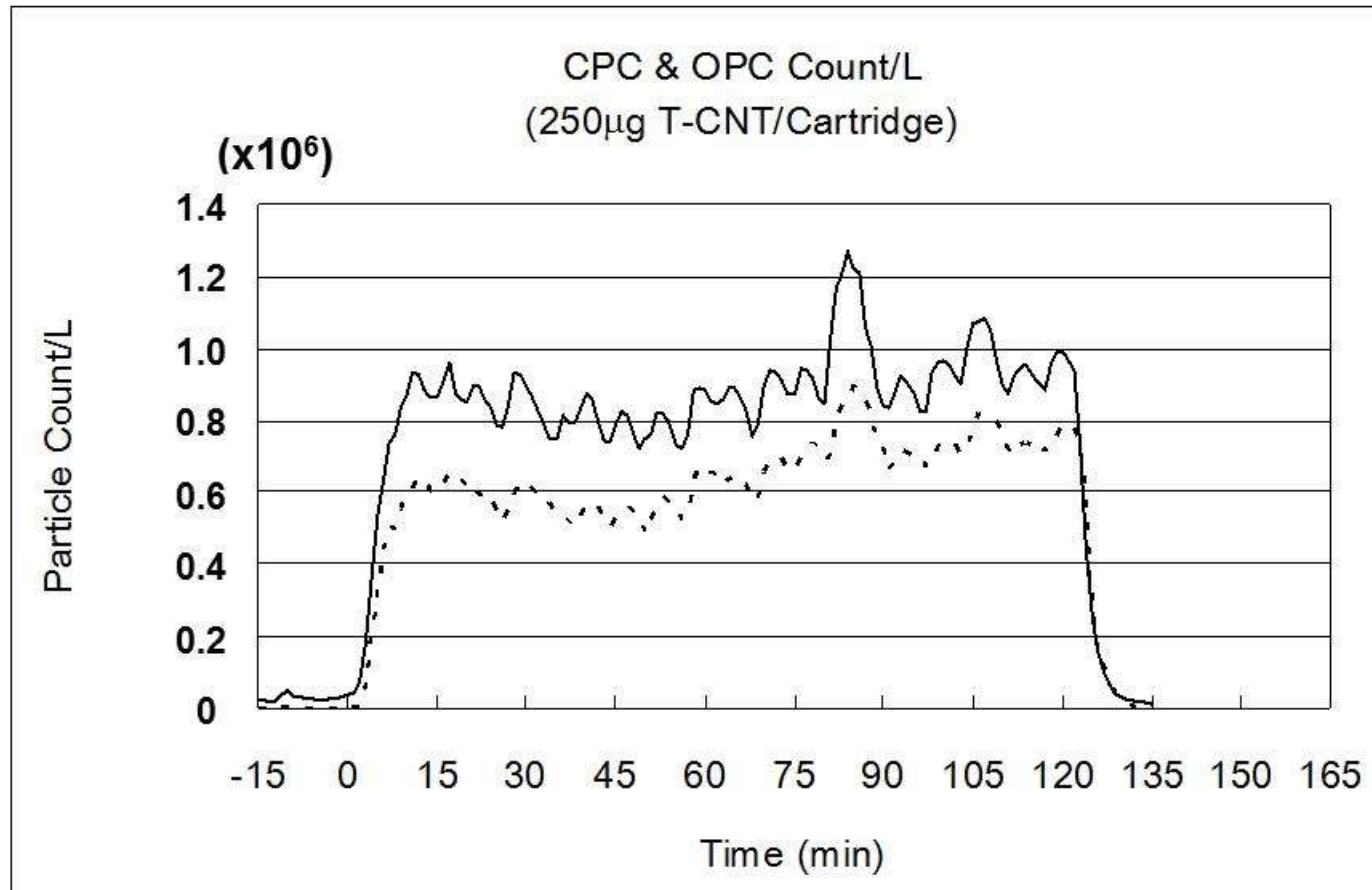
Aerosol generation procedure

Injection (Duration: 0.2 sec)



- Twenty-one cartridges were prepared for a two hour exposure experiment
- The compressed air was injected into subchamber (0.8MPa、0.2 sec × 5 time, 10 sec interval)
- Loading first two in 1 min for an initial boost and then one in every 6 min

A real time particle counting in Mainchamber

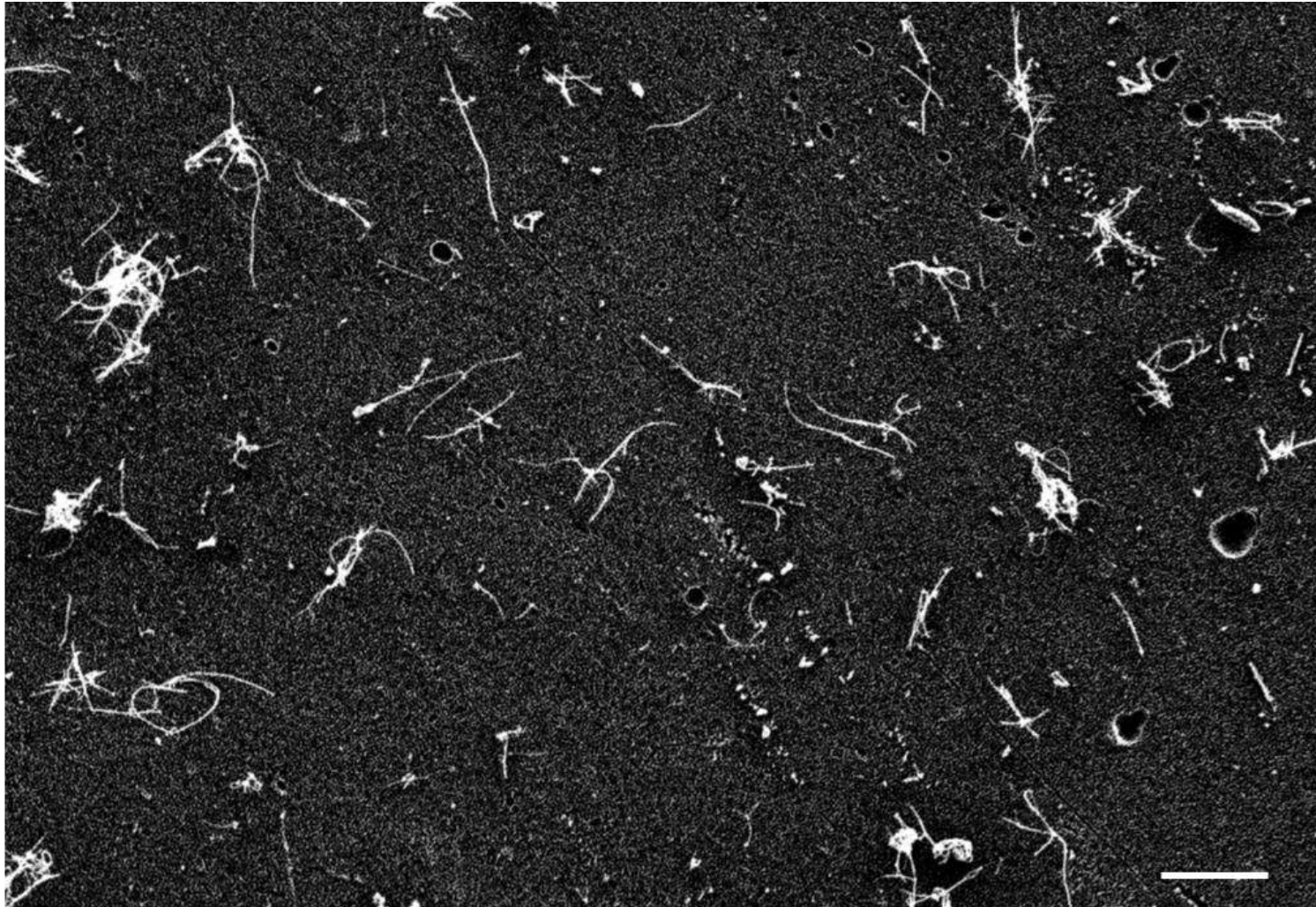


Solid line: CPC Dotted line: OPC

Taquahashi et al., JTS, 2013

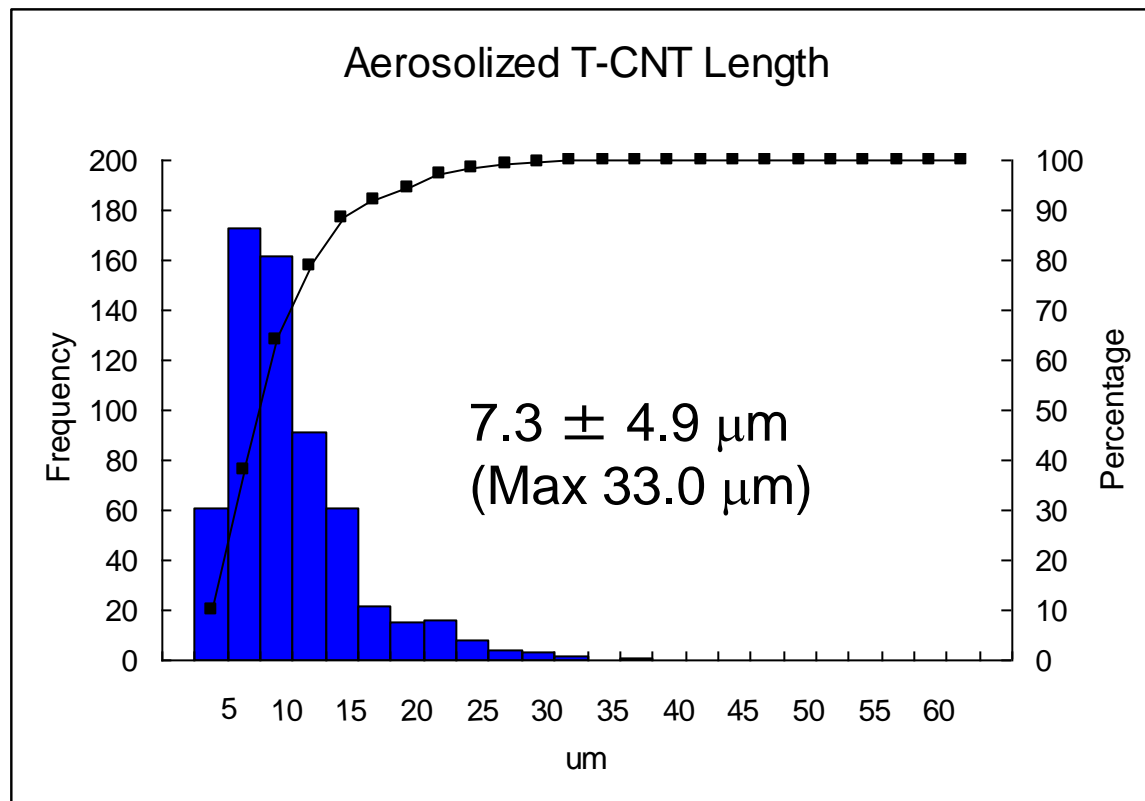
Morphology of T-CNT aerosol collected from the main chamber on a filter

Taquahashi et al., JTS, 2013



5L/min for 3 minutes SEM x1,000 (scale bars are 10 μm).

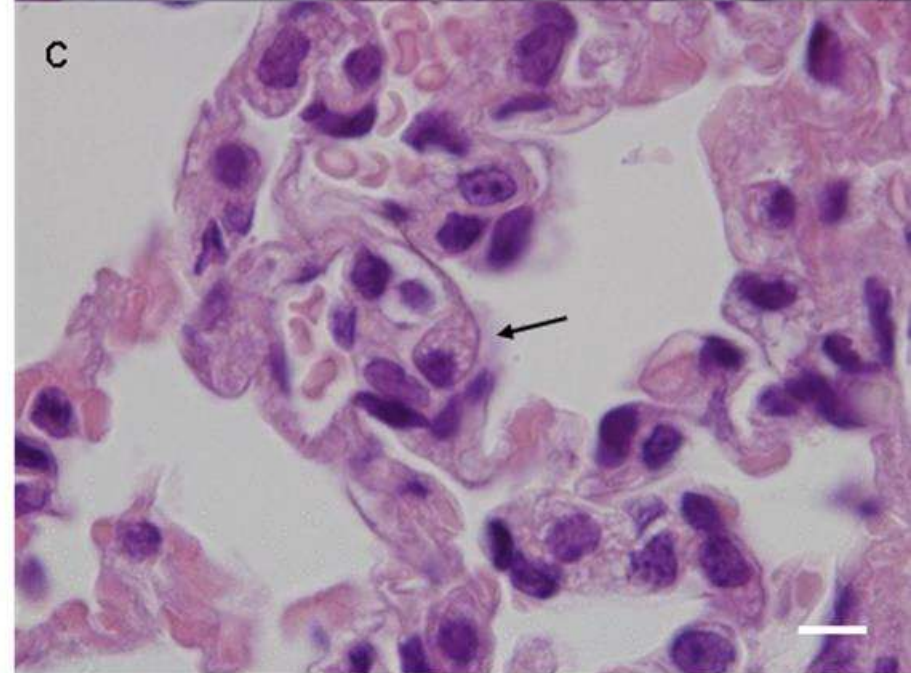
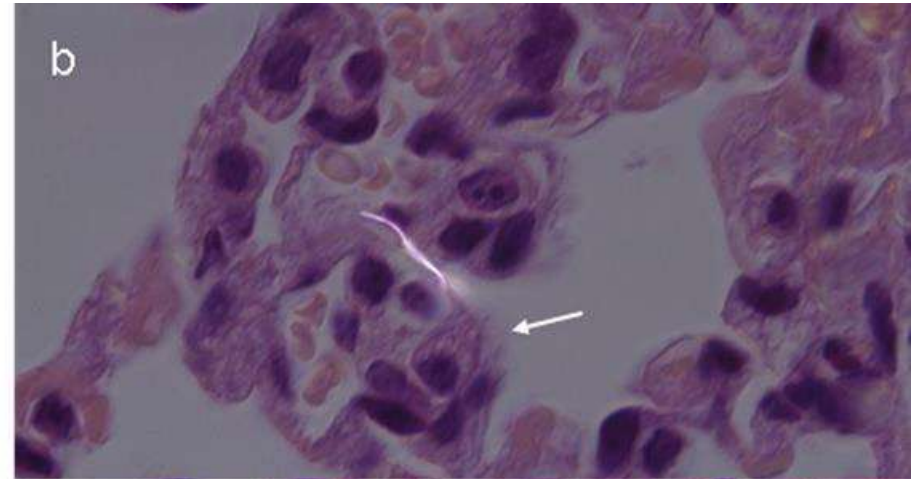
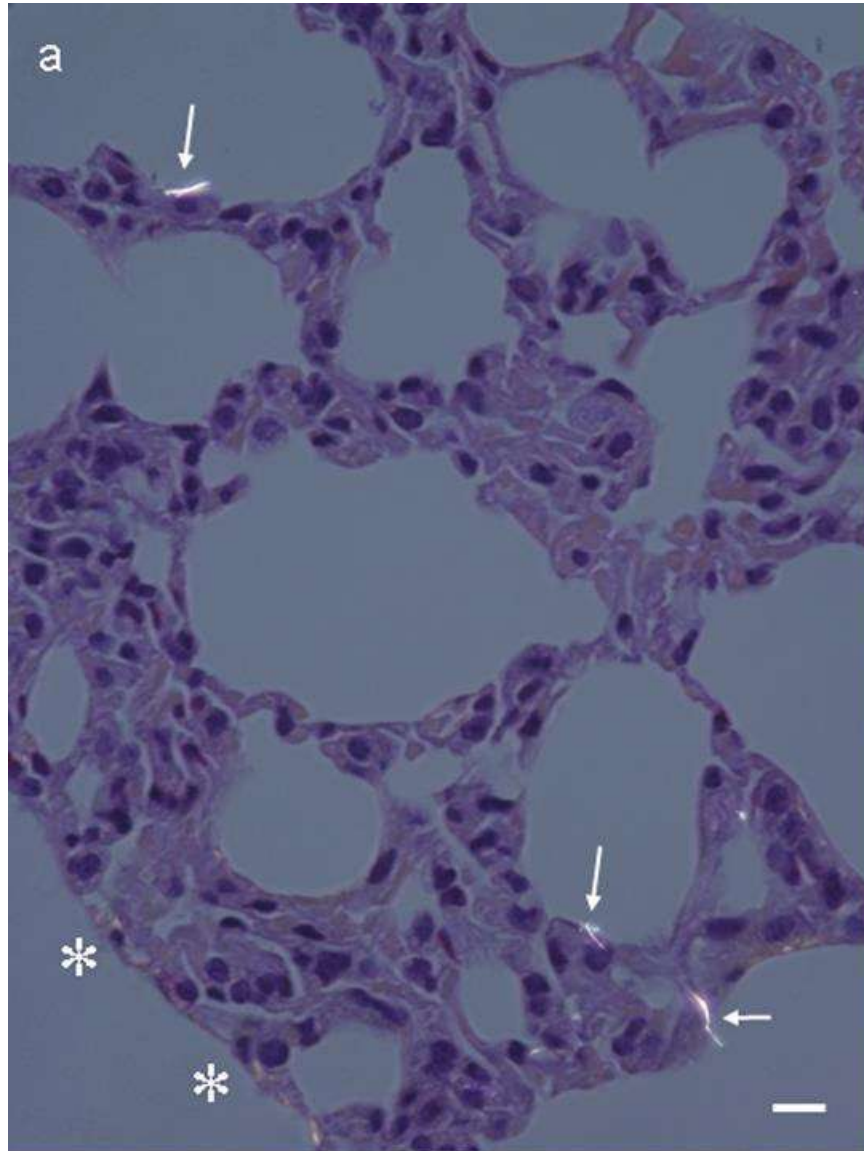
The distribution of the fiber length in T-CNT of the mainchamber



T-CNT aerosol at a concentration of 1 mg/m³ in the main chamber was collected on the Anodisc filter and measured their length by SEM x2,500 (N=618)

A polarized microscopic view of the alveolar region of a lung

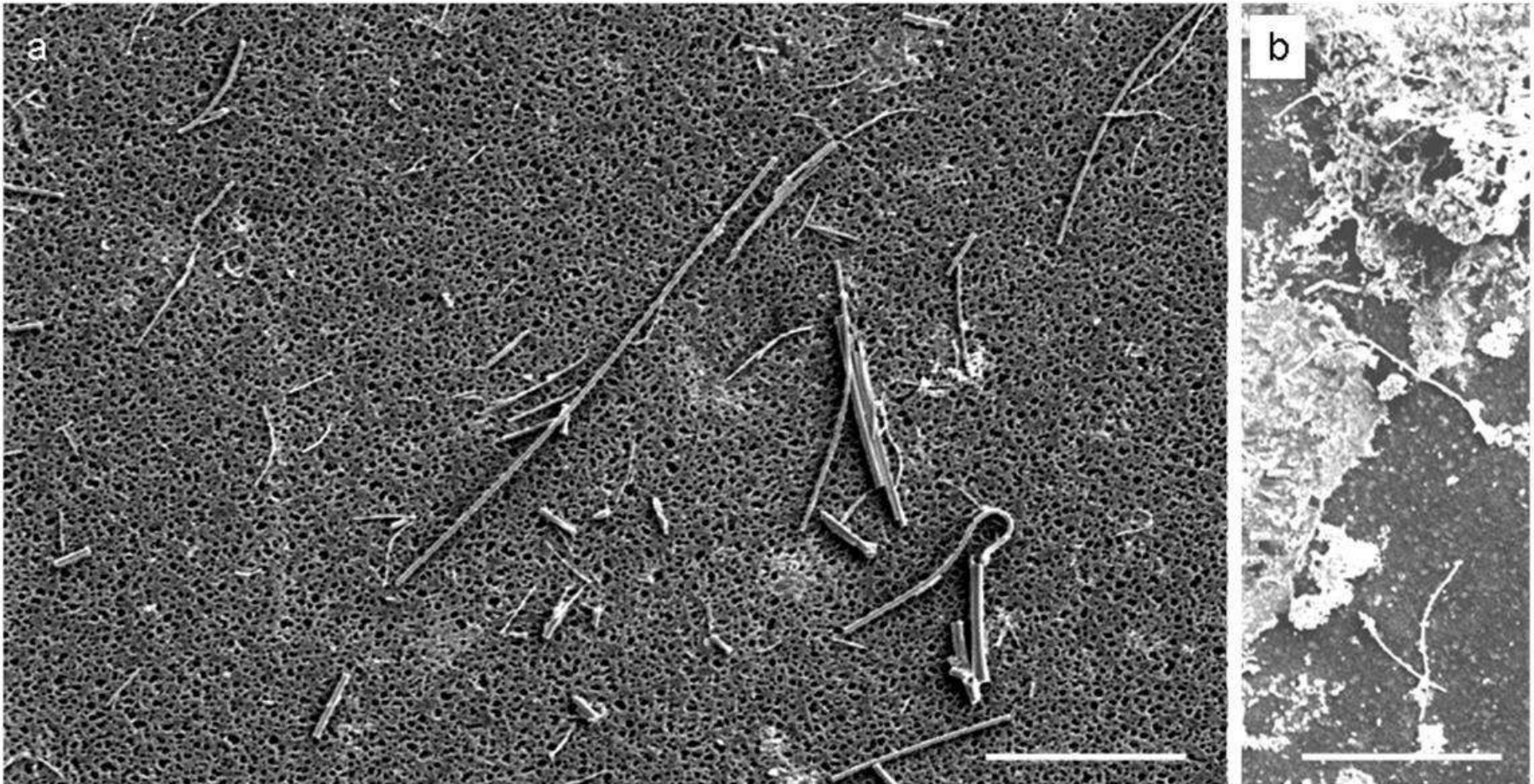
Taquahashi et al., JTS, 2013



The mouse was exposed 1 mg/m³ of T-CNT for 2 hr. a day for 5 days

scale bars 5 μm

From the lysed lung



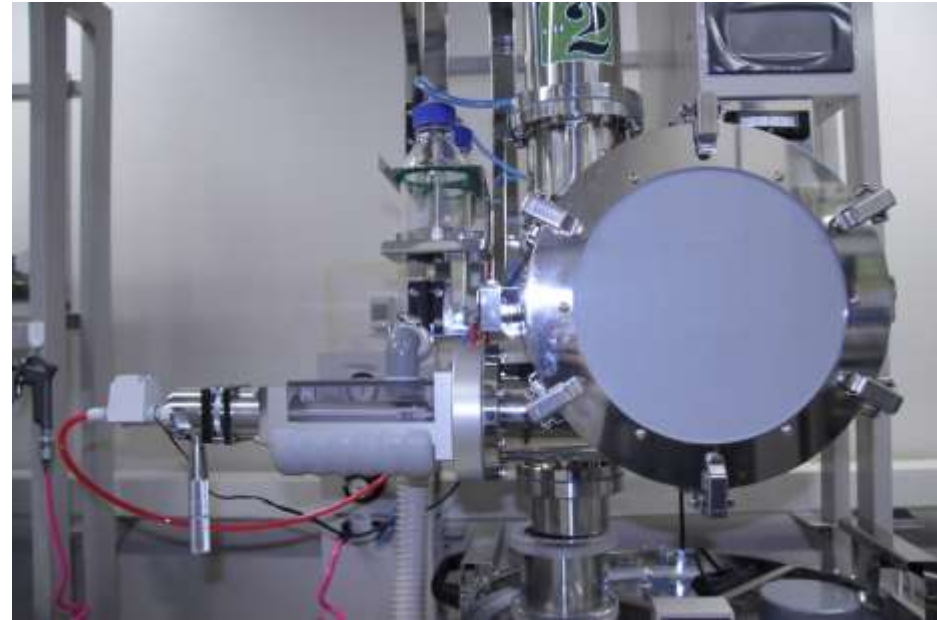
Taquahashi et al., J Tox Sci 38:619-628, 2013



Version 2

2013-10-25

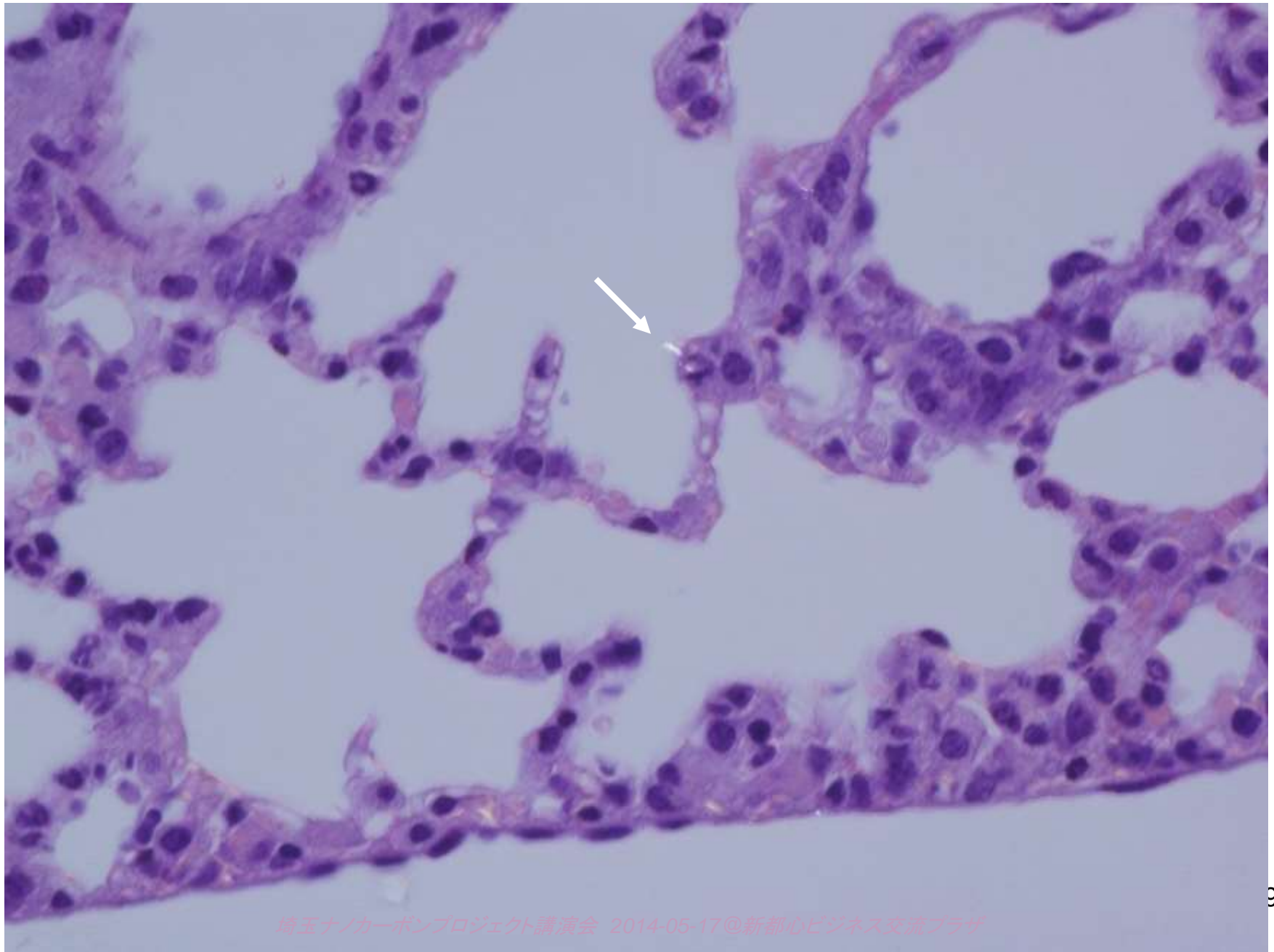
埼玉ナノカーボンプロジェクト講演会 2014-05-17@新都心ビジネス交流プラザ



On-going study: Taquann-Direct Injection System whole body MWCNT inhalation study (C57BL/6 p53 +/- male)

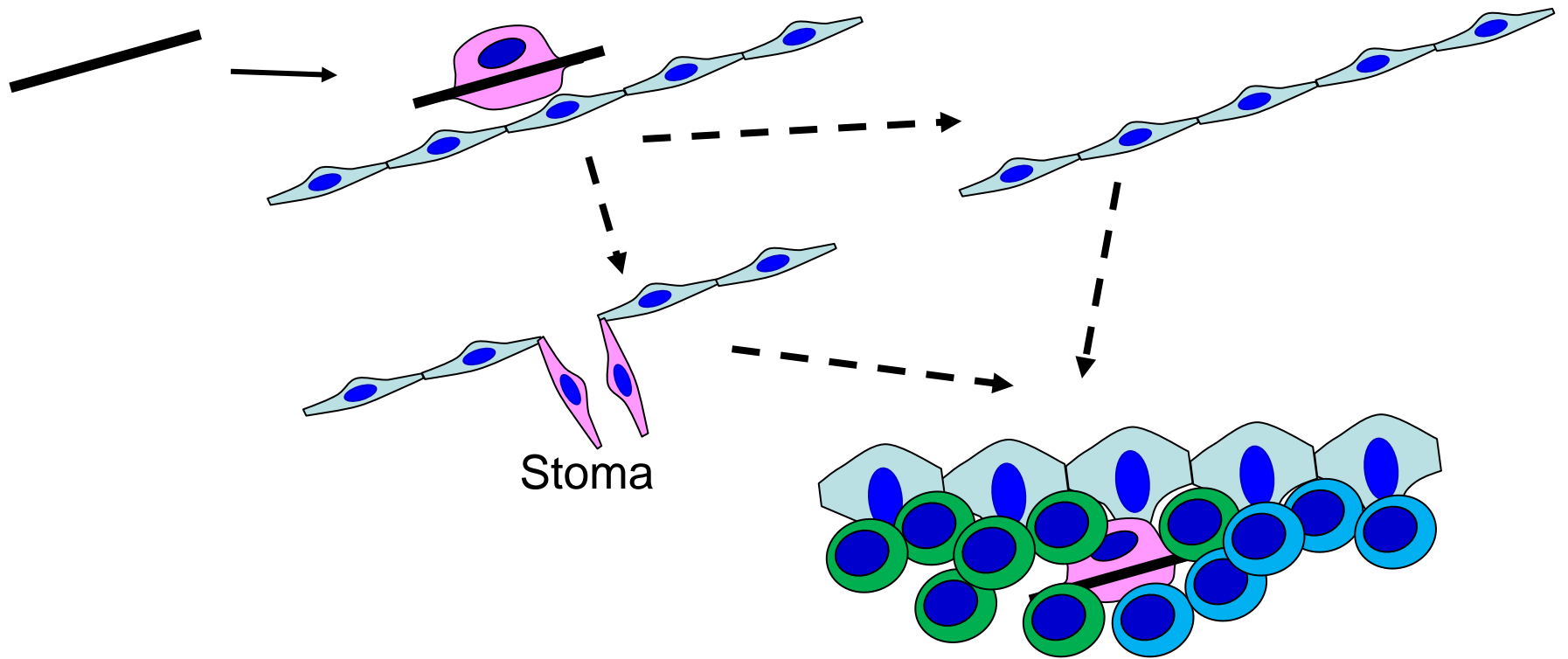
Group/ Exposure*	Conc. mg/m ³		Sampling					
			Animal no.	0D	13W	26W	39W	52W
Control 0 µg/cartridge	0	Pathology	48	3	7	7	8	8
		Burden		3	3	3	3	3
Taquann L 250 µg/cartridge	1	Pathology	48	3	7	7	8	8
		Burden		3	3	3	3	3
Taquann H 500 µg/cartridge	2	Pathology	48	3	7	7	8	8
		Burden		3	3	3	3	3

*: 2hr exposure per week for 5 weeks (total 10 hr)

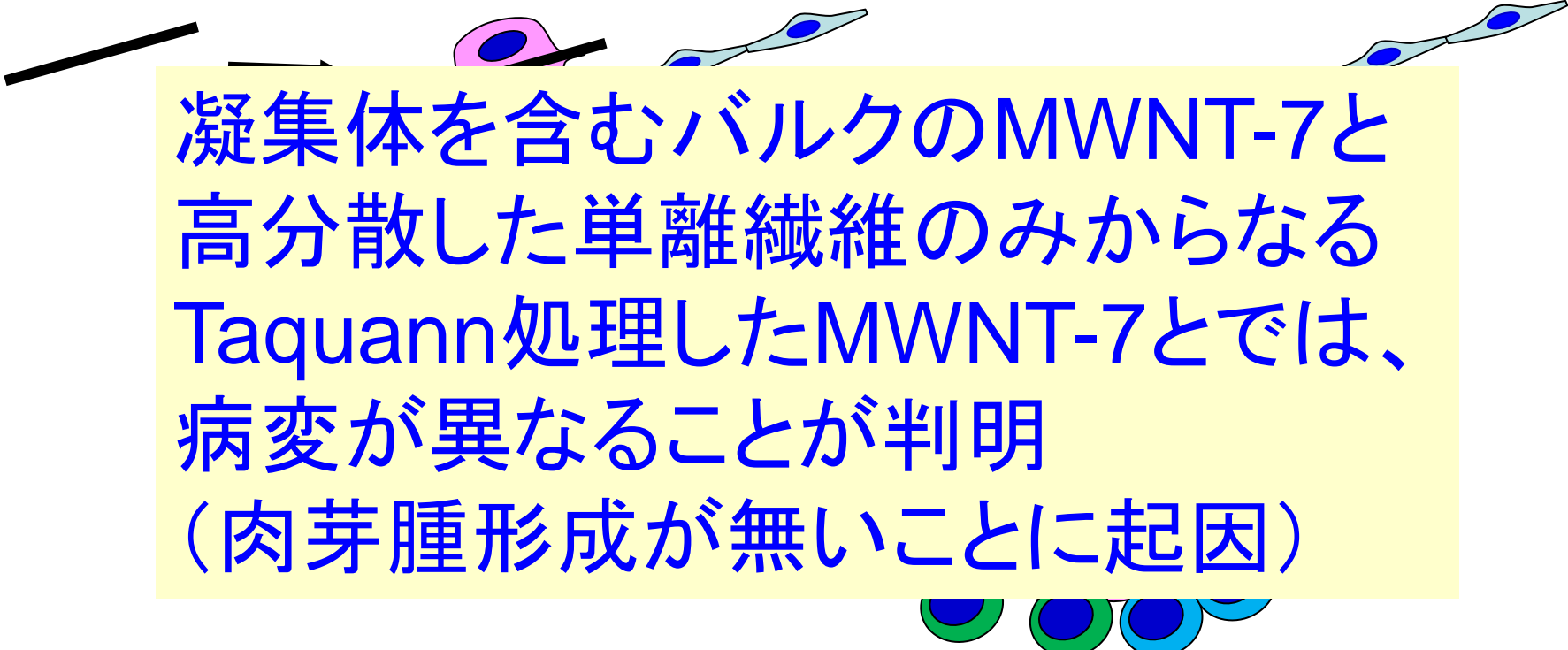




Frustrated Phagocytosis (Mesotheliomagenesis)



Frustrated Phagocytosis (Mesotheliomagenesis)

An illustration showing a pink cell with a blue nucleus attempting to engulf a black rod-like structure. To the right, several blue rod-like structures are shown, some with blue nuclei, representing mesothelial cells. Below the text box, there are several blue and green circular shapes.

凝集体を含むバルクのMWNT-7と
高分散した単離繊維のみからなる
Taquann処理したMWNT-7とでは、
病変が異なることが判明
(肉芽腫形成が無いことに起因)

イオン化傾向

永久に定着
(安定)
溶け出さない

徐放性

早く溶ける

生物学的
半減期が
短い

表面活性

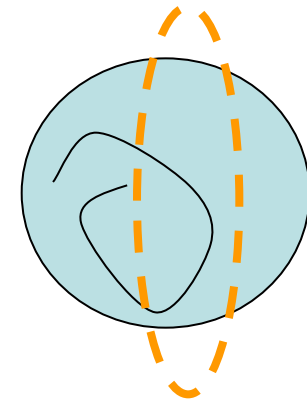
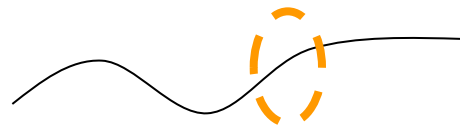
粒子の局在位置

- 器官
- 組織 (細胞外・間質)
- 細胞内小器官
- 受容体・リガンド

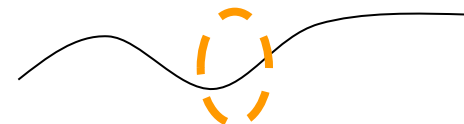
局在位置の違いによる生体内半減期の違い

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

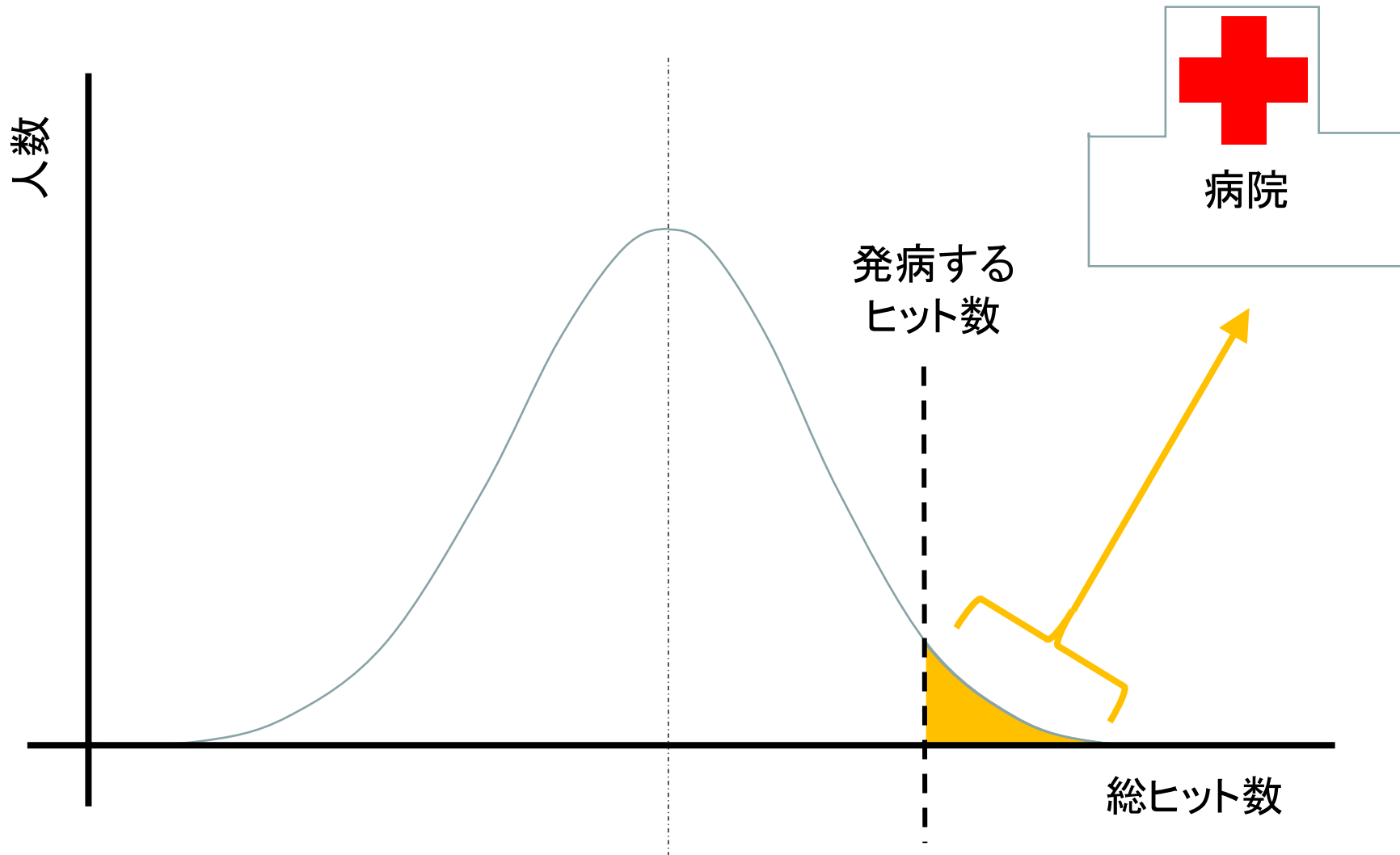


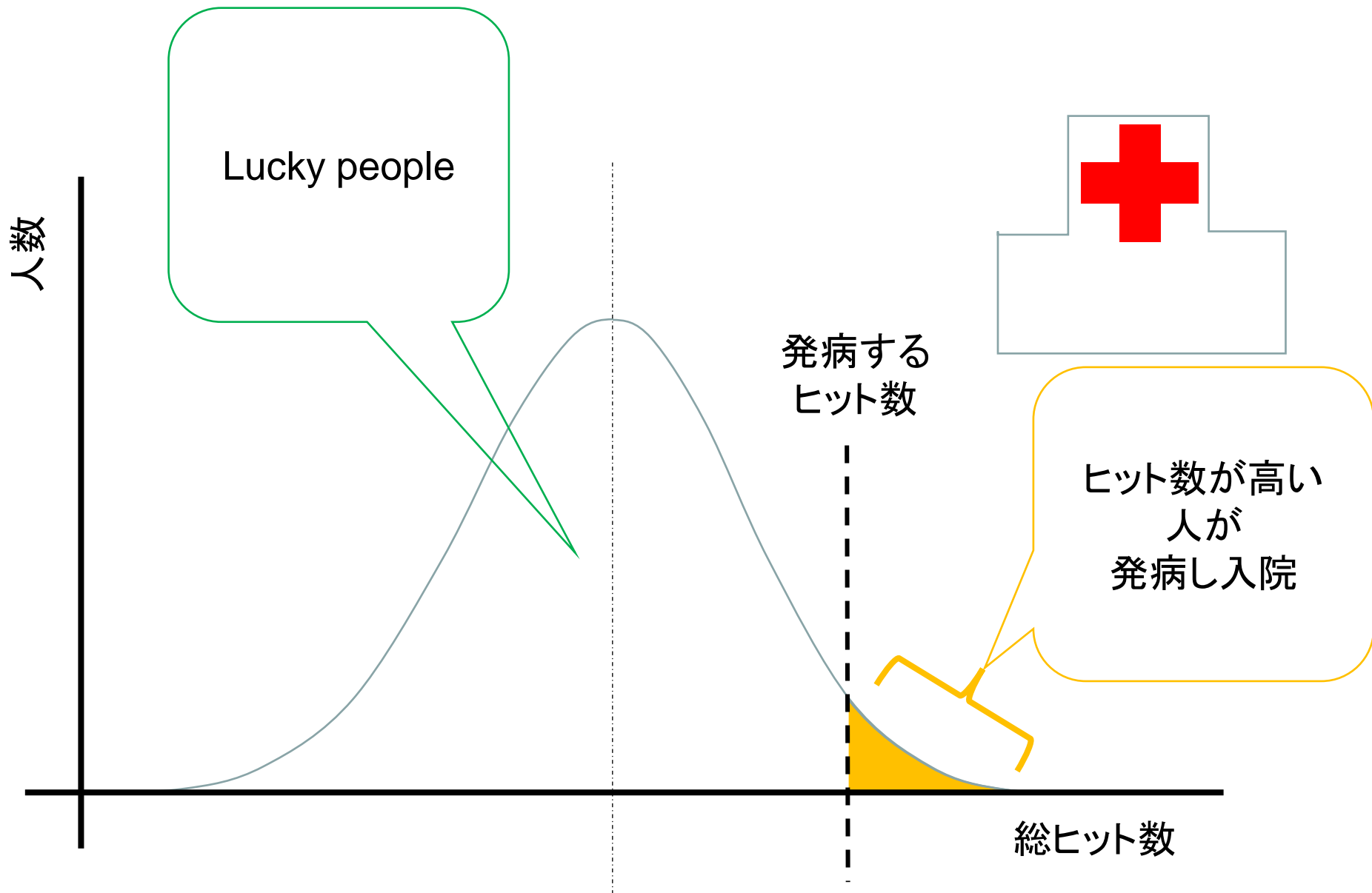
In vitro 試験の問題点

- 結論：多くは「やり直し」が必要。
- 理由：条件設定が不完全
- 背景：比較的新しい重要知見
 - 「タンパク・コロナ」の管理が不徹底
 - 親油性の粒子は、「裸」では非特異的に細胞膜を破壊
 - 生体内では、タンパクなど何らかの成分にコーティングされる。
 - 粒子の分布の把握が不徹底
 - シャーレに入れた量を把握しただけでは、細胞のどこにどれだけ到達したか全くわからない。

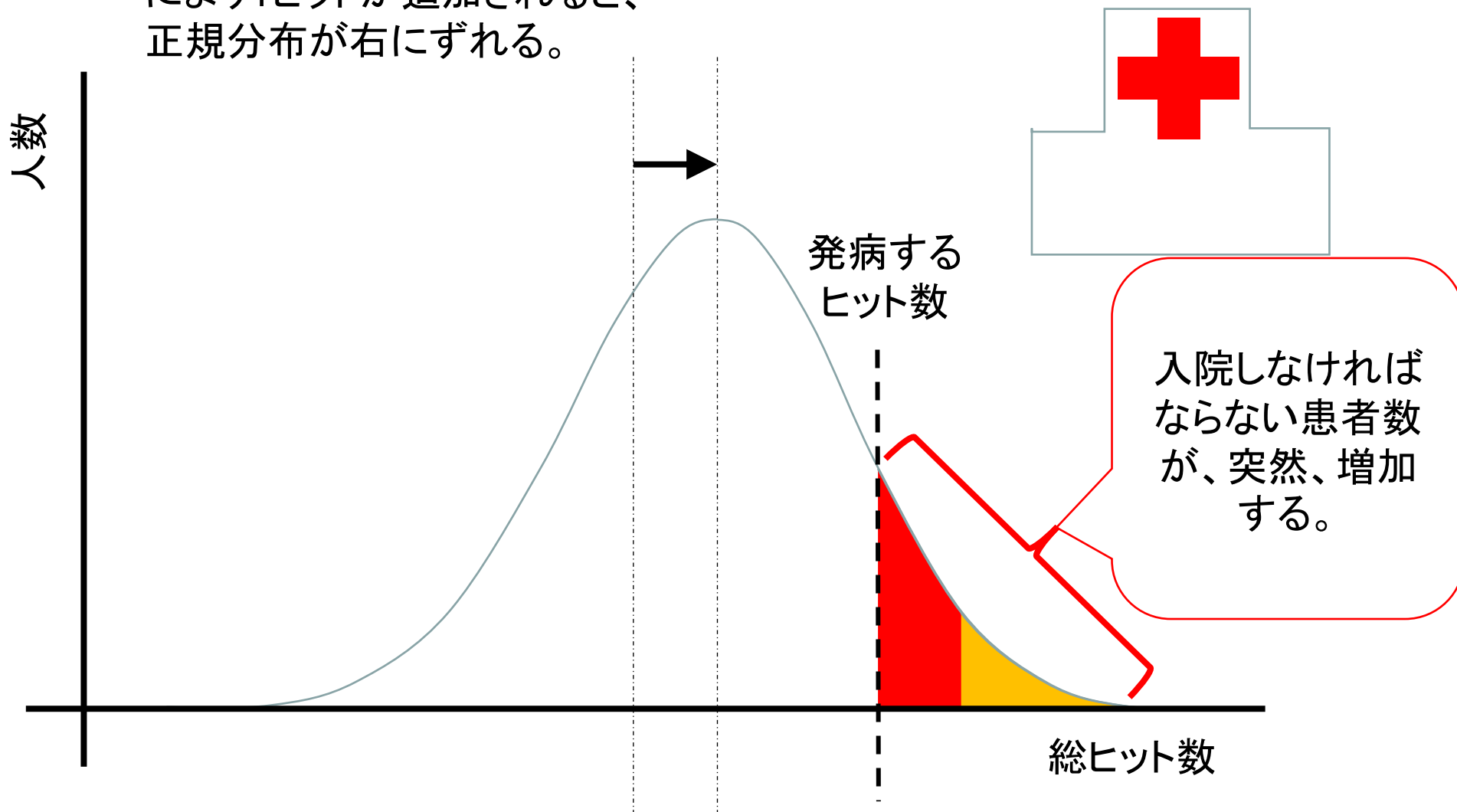
— ナノ材料・製品に必要な安全上の配慮について —

どこまで、環境を汚してもよいのか？





もしも、集団全員に暴露が生じ、それにより1ヒットが追加されると、正規分布が右にずれる。



リスク評価とリスク管理について

評価＝データに責任、解釈に責任、
評価会議

管理＝実行に移す事柄を選択 政策の結果に責任
管理決定会議

必要条件：ともに情報の公開・論議過程の透明性・後者の場合は決定過程の透明性

リスク評価とリスク管理について

リスク評価：

- 科学的データに基づく
- データの不足不備による不確実性の介入に対しては、仮説を設定してそれを補償
- その物質の安全な摂取／曝露条件を判断する

リスク管理：リスク評価の結論に基づいて、

- リスクを、そのまま受け入れる (risk acceptance)
- 最小限にとどめる策を講ずる (risk minimization)
- 減少させる策を取る (risk reduction)
- その他

の政策を決め、政策を推進するための具体的な方法についての選択肢を検討し、それらの中から適切なものを選びそれを実行するための一連の過程(必要に応じて経済的／社会的要請も考慮する)を開始するものである。

評価者と管理者と被管理者

- 「安心」は、手順を間違えると、遠退く。

例：

- LNTから閾値：宣伝不足 安全神話が元凶
- 今まで、「減塩」で高血圧や胃がんを減らし、県の平均寿命を一生懸命、何年もかけて少しずつ伸ばしてきた東北の人々に、「放射線での寿命短縮はたった1歳程度ですから」と言ったら、そっぽを向かれる。

円卓会議

すべてのStakeholder(利害関係者)が一堂に会し、対応を決める会議。

●成立の条件:一つの共通目的があること

●よくある不成立の例:『同席しただけで政府の条件を呑んだとみなされるので、同席しない』

●可能な共通目的=国民のため

評価者と管理者と被管理者

- レギュラトリー・サイエンスは、内山充先生の訳では『調整の科学』であり、このリスク評価・管理の手順の中にそれを採すとすると、狭義には評価者と管理者の役割分担の明確化に伴う「両者の密接な意見交換」を正しく行うための学問ということになる。

まとめ

- ナノマテリアル、特にカーボン系は、安定性が高いものが多いので、
 - 毒性を判断する際には、慢性影響に注意する。
 - アスベストや代替繊維の毒性知識が適応されるナノチューブがある。Stanton仮説は、今や仮説ではないと考えるべき。
 - 単体には、中皮腫発癌性があり、閾値が設定できないと考えて、生産活動・商品開発を行う必要がある。
 - 肺がん、肺の線維症など、中皮腫以外の毒性も誘発することを念頭に、生産活動・商品開発を行う必要がある。
- ほとんどのナノマテリアルの毒性は、未知である。

まとめ

- 社会受容は、「安全」の問題と「安心」の問題。
 - 「安全」の問題では、「取り返しのつかない慢性毒性」の取り扱いが特に難しい。専門家との連絡を密にし、表面的なデータ解釈を避けることが肝要。
 - 例：Mullerの論文、BSEに対する「から騒ぎ指摘」、etc

まとめ

- 社会受容は、「安全」の問題と「安心」の問題。
 - 「安心」は、普段の対応と、事故時の対応に連続性と整合性が無ければ、獲得されないばかりか、信頼回復が非常に遠のく。
 - 例：放射線：国民側から見た際の、LNTから閾値設定への不連続性。

配 慮

- 本当の「円卓会議」を主催できる体制の整備。
 - 座長:
 - 事務局:
- 論議の透明性、公平性、判断力、責任所在の明確化

毒性学 (トキシコロジー、Toxicology)

【科学文明】: 便利、安全、病気が治る (薬、治療法)



【文明がもたらしたいろいろな便利なものの毒性を予測】



【被害を未然に防ぐ】

(+ 起きてしまった被害の対処法の検討)

対象: ヒト (健康人・病人) ∴ 医学の一部分、病理学の一部分
薬学の一部分 (副作用学、毒物学)

終わり