

ナノマテリアル安全対策調査事業
報告書

平成 27 年 3 月

JFE テクノリサーチ株式会社

目次

概要.....	i
1. 消費者製品等に含まれるナノマテリアル等の情報の収集.....	3
1.1. 調査方法.....	3
(1) 調査対象物質.....	3
(2) 調査方法.....	3
1.2. 調査結果概要.....	3
(1) 調査対象物質の使用状況のまとめ.....	3
(2) 調査対象物質ごとの調査結果.....	5
a) フラーレン（水酸化フルーレン誘導体を含む）.....	5
b) 単層カーボンナノチューブ（SWCNT）.....	7
c) 多層カーボンナノチューブ（MWCNT）.....	12
d) グラフェン.....	16
e) 酸化チタン.....	21
f) ナノシリカ.....	25
g) プラチナ.....	29
h) ナノ金.....	30
i) ナノ銀.....	32
j) 亜鉛（主に酸化亜鉛）.....	35
k) ナノクレイ.....	38
l) ナノセルロース.....	40
2. ナノマテリアル等の安全性等に関する情報、試験法等に関する文献調査.....	44
2.1. 検索方法.....	44
2.2. 論文選択手順・方法.....	45
2.3. 文献分類表.....	46
(1) 文献サマリー.....	47
3. ナノマテリアル等の安全対策に係る国際動向調査.....	178
3.1. ナノマテリアル等利用製品の国際規制動向.....	178
(1) 概要.....	178
(2) 定義.....	178
(3) 各国等における規制動向.....	187
a) 米国.....	187
b) 欧州委員会（EC）.....	188
c) EU 加盟国.....	192
d) カナダ.....	193
e) オーストラリア.....	194

f) 韓国	194
g) 中国	195
h) 国際機関	197
i) 各国・地域の規制動向まとめ	197
3.2. 主要学会等におけるナノマテリアル等の安全性、ばく露、試験法等に関する動向	199
(1) 第4回国際会議 NANOSAFE 2014	199
a) 概要	199
b) 発表内容	199
(2) ECHA Topical Science Workshop	217
a) 概要	217
b) 発表および議論の概要	217
(3) 第31回日本毒性病理学会学術集会	231
3.3. 国際組織の規制動向	234
(1) OECD 工業ナノマテリアル作業部会 (WPMN)	234
a) 第13回工業ナノマテリアル作業部会本会合 (WPMN13)	234
b) 第14回 WPMN 本会合	237
(2) ISO におけるナノマテリアルに関する標準化	239
4. 海外行政機関等の報告書の分析と主要なものの翻訳	244
4.1. 翻訳対象報告書の選定	244
4.2. 翻訳対象報告書の要約	244
(1) ナノ粒子の様々な修飾の吸入後の毒性影響	244
(2) カーボンナノチューブの人の健康ハザードアセスメントと分類	245
(3) 新規化学物質として規制されるナノマテリアルの分類法開発	245
(4) ナノマテリアルスクリーニング評価フレームワーク	246
(5) カナダと米国におけるナノマテリアル用途の評価	246
(6) 工業ナノマテリアルの法制度に関する質問状に関する報告書 2010-2011	247

<附属書(別冊)>

海外主要報告書6報の全訳

概要

本報告書は、平成26 年度厚生労働省「ナノマテリアル安全対策調査事業」の結果をまとめたものである。

本調査事業では、ナノマテリアルの基礎的な情報収集の一環として、その製造、消費レベルでの使用状況、あるいは学術論文等で報告される安全性情報や各国の規制動向の調査を継続的に行ってきた。今回の調査では、以下に述べるいくつかの観点から情報を収集し、まとめた。第一にナノマテリアルの国内での製造及び使用状況を調査した。個別には以下のナノマテリアルを取り上げ、調査を行い、結果をまとめた。ただし、今回の調査には食料品とその容器、及び医薬品に関わるものは含まれていない。今回は、個別の調査としてフラーレン、単層カーボンナノチューブ、多層カーボンナノチューブ、グラフェン、酸化チタン、ナノシリカ、プラチナ、銀、亜鉛（主に酸化亜鉛）、ナノクレイ、ナノセルロースを取り上げたが、このうち、グラフェン、酸化チタン、ナノシリカ、プラチナは平成25年度調査事業では調査結果各論として取り上げていない物質である。

次にそれぞれのナノマテリアルについて、最近1年間に新たに報告された安全性に関する文献情報を収集した。さらに、本調査では海外各国におけるナノマテリアルの規制情報を収集した。調査の対象はEU 及び欧州各国、米国、カナダ、オーストラリア、中国、韓国であるがその他の国際機関についても経緯を含め、最近の状況を詳細にまとめた。

- ・ 各国におけるナノマテリアルの定義
- ・ 上市規制、ラベル規制等の規制の見直し
- ・ ナノマテリアルの規制に関する各国及びOECD、ISO の動向
- ・ ナノマテリアルの安全性に関する主要な学会情報
- ・ 海外行政機関の報告書等の翻訳

なお、学会の報告としては①第4回 NANO SAFE (The 4th International Conference NANOSAFE 2014)、②ECHA TPtical Science Workshop、③第31回日本毒性病理学会学術集会、の概要についてまとめた。

Summary

This report is the results of “An Investigative Research on Consumer’s Safety in Utilizing Nanomaterials (2014)” administrated by The Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan.

The continuous surveys have been conducted as a part of basic information gathering of the nanomaterials in terms of manufactured nanomaterials, their consumption, the safety information reports, and the regulation trend in each country. This document summarizes the current information on the production and the use of nanomaterials, and the recent progress of R&D on nanomaterials. In particular, fullerenes, single-walled carbon nanotubes, multi-walled carbon nanotubes, nano graphene, nano silica, nano platinum, nano silver, nano zinc oxide, nanoclay, nano-cellulose are selected as a research individual. Foods and their containers, and medicines are excluded in this investigation. Then as to each of the nanomaterials, newly reported literature on safety information during the past year was collected and summarized. In particular, reports on the safety of a work area and the environment are of special interest and many reports on ecotoxicity and toxicity in aspiration or inhalation were selected.

In addition, we have gathered information about the regulation of nanomaterials including their history in overseas countries and organizations; EU and European countries, the United States, Canada, Australia, China, and Korea.

- Definition of nanomaterials in each country.
- Review on the market and labelling regulations of nanomaterials and the related products.
- Information on the activities of OECD and the ISO on nanomaterials.
- Information on the safety and the regulation of nanomaterials.
- Provisional translation of reports by foreign agencies

As a part of the survey, the reports on the following conferences are also summarized; 1) The 4th International Conference NANOSAFE 2014. 2) ECHA Topical Science Workshop. 3) The 31st Annual Meeting of the Japanese Society of Toxicologic Pathology.

1. 消費者製品等に含まれるナノマテリアル等の情報の収集

日本国内におけるナノマテリアル等利用製品（食品及び食品容器を除く、以下同じ）に関する情報を収集した。

調査対象物質は、ナノマテリアル等製造・輸入業者より直接情報を収集し、川中・川下ユーザーを追跡することにより、ナノマテリアル等が含有される最終製品を特定し、その含有形態、濃度（使用量）等を調査した。また、それらの開発状況についても調査した。

1.1. 調査方法

(1) 調査対象物質

本調査では、以下の 13 物質等を調査対象とした。

- フラーレン（水酸化フルーレンや誘導体を含む）
- 単層カーボンナノチューブ
- 多層カーボンナノチューブ
- グラフェン
- 酸化チタン（ルチル型、アナタース型、の両方を対象とする）
- ナノシリカ
- プラチナ
- 金
- 銀
- 亜鉛（主に酸化亜鉛）
- ナノクレイ
- ナノセルロース
- 上記のサブナノマテリアルを含む

(2) 調査方法

調査対象物質ごとに主要なナノマテリアル等原料製造業者をそれぞれ 2～3 社選定し、ナノマテリアル等が含有される最終製品に関する情報について聞き取り調査を行い、最終製品の特定を行った。なお、必要に応じて、川中・川下ユーザーについても調査対象とした。また、最終製品における各対象物質の含有形態、濃度（使用量）等についても聞き取り調査項目に設定し、可能な限り情報を得るようにした。さらに、各最終製品のリスク評価に関する考え方についても、可能な限り聞き取り調査を行った。なお、平成 25 年度本事業の調査対象物質については、平成 25 年度本事業の調査結果も参考とした。

1.2. 調査結果概要

(1) 調査対象物質の使用状況のまとめ

調査結果のまとめを表 1.2-1 に示した。

フルーレン、酸化チタン、ナノシリカ、銀、ナノクレイについては、市場は横ばい傾向であるものの、フルーレン以外の物質については、現在も、研究開発や用途開発が盛んに行われていた。なお、酸化亜鉛とプラチナについては、市場規模はわずかながら年々拡大しているものの、平成 25 年度本事業の調査結果から新たな研究開発事例や用途開発事例を確認することはできなかった。こうした国内の市場動向を整理すると、今年度も継続して研究開発や用途開発が盛んに行われている物質、あるいは今年度製品化された事例がある物質、市場規模が大きく変化した物質は以下の 9 物質であった。

- 単層カーボンナノチューブ
- 多層カーボンナノチューブ
- グラフェン
- 酸化チタン（ルチル型、アナタース型、の両方を対象とする）

- ナノシリカ
- 金
- 銀
- ナノクレイ
- ナノセルロース

多層カーボンナノチューブについては、生産拡大が見込まれていたものの、2013 年度に国内の生産量が前年比の半分程度にまで激減しており、多層カーボンナノチューブを用いた用途開発もほとんど行われていないようである。これに対して、単層カーボンナノチューブの用途開発は、以前として盛んである。他方、グラフェンについては、様々な用途が期待されつつも、日本での用途開発は世界に比べると遅れているのが現状である。ただ、グラフェンについても、今後、コンポジットなどの新たな用途への利用が加速することが期待され、今後、国内での市場も拡大することが期待される。

表 1.2-1 調査対象候補物質の使用実態

物質名	市場 動向	研究開発・用途開発・製品化等の状況	平成 25 年度 本事業の調 査結果の記 載
フラーレン	横ばい	新たな研究開発は行われていない	○
単層カーボンナノチューブ	開発中	研究開発が盛んである	○
多層カーボンナノチューブ	激減	(2013 年度の国内生産量は、2012 年度の約半減)	○
グラフェン	開発中	用途開発が盛んである (コンポジットへの利用開発により、今後、大幅に市場拡大の可能性あり)	
酸化チタン	減少傾向	研究開発は継続的に行われている	
ナノシリカ	横ばい	用途開発は継続的に行われている	
プラチナ	微増	新たな研究開発は行われていない	
金	開発中	研究開発が盛んである	
銀	横ばい	研究開発、製品化ともに盛んである	○
亜鉛			
酸化亜鉛	微増	新たな研究開発は行われていない	○
ナノクレイ	横ばい	用途開発、製品化が継続的に行われている	○
ナノセルロース	開発中	研究開発・用途開発ともに盛んである	○

(2) 調査対象物質ごとの調査結果

a) フラーレン（水酸化フルーレン誘導体を含む）

(a) 製品概要

サイズ	1 次粒子：0.7～1.0nm 2 次粒子：10～70μm ※フラーレン及び種々修飾され誘導体の一次粒子は、その直径は 0.7～1.0nm 程度であるが、実際には凝集して存在し、実際には、数 10μm の凝集態として存在する。																																			
形状	球状（サッカーボール状の結晶構造）																																			
計測技術	レーザー回析式粒度分布測定、SEM（画像計測）																																			
物性	【フラーレンの基本物性】 <table><tr><td>特性</td><td>単位</td><td>C60</td></tr><tr><td>分子量</td><td>—</td><td>720</td></tr><tr><td>かさ密度（粉体）</td><td>g/cm³</td><td>0.65</td></tr><tr><td>質量密度</td><td>g/cm³</td><td>1.729（5K 計算値）</td></tr><tr><td>比表面積</td><td>m²/g</td><td>0.24～0.92</td></tr><tr><td>蒸気圧</td><td>Pa</td><td>0.67（500℃）</td></tr><tr><td>引火点</td><td>℃</td><td>200℃以上</td></tr><tr><td>融点</td><td>℃</td><td>1,180</td></tr><tr><td>熱伝導率</td><td>W/mK</td><td>0.4（室温）</td></tr><tr><td>熱容量（常圧）</td><td>J/kmol</td><td>500（室温）</td></tr><tr><td>電気抵抗</td><td>Ωcm</td><td>10⁸～10¹⁴</td></tr></table> 【水溶性フラーレン】 水溶性：0.5 mg/ml（pH13）、0.002～0.005 mg/ml（pH7.4） 粒径：凝集して 20 から 200nm で得られる。（水中で安定な溶液）			特性	単位	C60	分子量	—	720	かさ密度（粉体）	g/cm ³	0.65	質量密度	g/cm ³	1.729（5K 計算値）	比表面積	m ² /g	0.24～0.92	蒸気圧	Pa	0.67（500℃）	引火点	℃	200℃以上	融点	℃	1,180	熱伝導率	W/mK	0.4（室温）	熱容量（常圧）	J/kmol	500（室温）	電気抵抗	Ωcm	10 ⁸ ～10 ¹⁴
特性	単位	C60																																		
分子量	—	720																																		
かさ密度（粉体）	g/cm ³	0.65																																		
質量密度	g/cm ³	1.729（5K 計算値）																																		
比表面積	m ² /g	0.24～0.92																																		
蒸気圧	Pa	0.67（500℃）																																		
引火点	℃	200℃以上																																		
融点	℃	1,180																																		
熱伝導率	W/mK	0.4（室温）																																		
熱容量（常圧）	J/kmol	500（室温）																																		
電気抵抗	Ωcm	10 ⁸ ～10 ¹⁴																																		
性能／特性	・ 電子親和性 ・ ラジカル捕捉能 ・ 高い電気抵抗 ・ 光エネルギーを吸収しやすい ・ 側の空孔に金属原子を内包できる ・ 不活性環境下で良好な熱安定性 ・ 溶媒に可溶（種類により溶けにくいものがある） ・ 化学修飾が容易 ・ 重合が可能																																			
製造会社	【国内】 ・ フロンティアカーボン（株） ・ 本荘ケミカル（株） ・ （株）イデアルスター ・ ビタミン C60 バイオリサーチ（株） ・ FLOX（株） 【海外】 ・ Materials Technologies Research（米国） ・ TDA Research（米国） ・ SPEKTR（ロシア） 等																																			

(b) 市場規模

フラーレンの世界市場規模推移及び予測

	2010 年	2011 年	2012 年	2013 年 見込	2014 年 予測	2016 年 予測	2017 年 予測
販売量 (トン)	2.2	2.3	2.4	2.5	2.6	3.0	3.5
販売金額 (百万円)	2,640	2,760	2,880	3,000	3,120	3,600	4,200

※販売金額はメーカー出荷ベース

出典：(株) 富士キメラ総研「2013 年 微粉体市場の現状と将来展望」

フラーレンは、2002 年から工業生産が開始され、2003 年にはスポーツ用品（ゴルフシャフトやテニスラケット等）などが上市された。フラーレンは、太陽電池素材や医薬・ライフサイエンス分野での市場拡大が見込まれているが、一部の化粧品やスポーツ用品などの採用に留まっている。化粧品については、抗酸化作用などの機能が利用されている。

フラーレンのトップシェアはフロンティアカーボンであるが、1 トン未満の生産量と推定される（2013 年見込み）。世界需要の 40%を占める。日本メーカーの生産ウエイトは、世界需要の 75%程度であり、日本での生産が中心となっている。主要メーカーのフロンティアカーボンはかつて出資していた三菱化学が撤退したが、その後、カーボンナノチューブ（CNT）の主要メーカーである昭和電工が資本参加し、現在は三菱商事との合併会社となった。現在は、水酸化フラーレンなど水溶性誘導体の開発が進められており、今後、大幅な市場拡大には医療等の新たな展開が必要であり、変形関節症や潰瘍性大腸炎など、抗酸化作用（活性酸素を消去する機能）を活かした研究開発が進んでいる。また、汎用添加剤としての使用も進められており、熱可塑性スーパーエンブラでは、0.1%の添加で、転移点を向上することが可能である。

(c) 主な用途

- ・ 潤滑油分野：エンジンオイル添加剤、カーエアコン添加剤、軸受油、圧縮機油、絶縁油、プロセス油
- ・ エレクトロニクス・エネルギー分野：有機薄膜太陽電池、燃料電池、コート剤
フロンティアカーボンより、太陽電池向けの高純度フラーレン誘導体、PCBC（フェニル C61 酪酸メチルエステル）を販売している。
- ・ スポーツ用品分野：ボウリングのボール素材、テニスラケット素材、ゴルフクラブ、ゴルフボール、スキーなどのワックス、他
- ・ 化粧品：美白、抗シワ等のスキンケア化粧品、他
- ・ 医薬：抗がん剤、抗ウイルス剤、他
水溶性フラーレン、C60 部分の酸化還元特性のために、スーパーオキシド消去活性を持つため、生体で利用できる水溶性と抗酸化作用を併せ持つフラーレンが販売されている。
- ・ 研究用サンプル

(d) 研究開発事例

新たな研究開発事例は確認できなかった。

(e) 利用事例

汎用性添加剤として利用されている。熱可塑性スーパーエンブラに、0.1%添加することで、転移点を向上することが可能である。また、難溶解性樹脂への添加により、耐熱酸化性を向上する。

化粧品中のフラーレン含有量は、製品により様々であるが、肌への効果のある配合量は、化粧品全体の 1%以上であるとして、基準が設定され、この基準を満たす製品に対しては、

R.S. (ラジカルスポンジ) マーク、を付与することで、製品の差別化が行われている。配合濃度の高いもので、5%という製品もある。

潤滑油用途での含有量は、コスモ石油ルブリカンツ(株)の製品で0.005~10質量%程度、と報告されている。

(f) ナノリスク評価

フラーレンを製造している主な企業は製造プロセスにおいて、作業者が暴露する可能性のある作業は、乾燥工程後の製品取り出しと製品梱包である。取り出しまでは密閉された工程であり通常の作業において暴露の可能性はない。取り出しと梱包作業では粉じんを局所排気設備あるいは高性能フィルタ付き掃除機で除去しており、また作業に当たっては指定された保護着を着用し、付着した廃棄物は産業廃棄物として焼却処分をしている。作業者のナノマテリアル取扱いに関しては作業記録を残している。またSDSには保護具着用など粉じん対策に関する注意書きも詳細に記載されている。フラーレンの製造に関しては行政の通達(平成21年3月31日付け基発第0331013号 厚生労働省労働基準局長通達「ナノマテリアルに対するばく露防止等のための予防的対応について」)に沿った対応がなされている。(平成25年度本調査事業報告書より)

b) 単層カーボンナノチューブ (SWCNT)

(a) 製品概要

サイズ	直径：0.5nm～3 nm 長さ：～10 μm																																														
形状	アスペクト比の大きな凝集体（バンドル構造）																																														
計測技術	SEM、TES																																														
物性	SWCNT は一般にナノマテリアルの中でも非常に直径が小さくサブナノメートルのものもある。またアスペクト比が大きい。目的により、特性と純度の要求が大きく変わり、研究用に多様な種類が販売されている。以下に例を示す。 <table><tr><td>直径</td><td>0.5～3 nm（主に 1.4nm）</td></tr><tr><td>長さ</td><td>～10 μm</td></tr><tr><td>かさ密度</td><td>0.02～0.15 g/cm³</td></tr><tr><td>真密度</td><td>1.3～1.4 g/cm³</td></tr><tr><td>引張り強度</td><td>50～70 GPa</td></tr><tr><td>引張り弾性率</td><td>2,000～5,000 GPa</td></tr><tr><td>熱伝導</td><td>2,000～3,000 W/mK</td></tr><tr><td>屈折率</td><td>1.5～1.6</td></tr><tr><td>製品例（炭素純度）</td><td>EC（>85%）、SO（>90%）、SO-P（>99%）</td></tr></table> 出典：（株）名城ナノカーボン社 ホームページ <table><tr><td>製品</td><td>SWeNT® SG-76</td><td>SWeNT® SG-65</td><td>SWeNT® CG-100</td></tr><tr><td>炭素含量</td><td>>90%</td><td>>90%</td><td>>90%</td></tr><tr><td>SWNT炭素含量</td><td>≥77% (carbon as SWNT)</td><td>≥77% (carbon as SWNT)</td><td>≥70% (carbon as SWNT)</td></tr><tr><td>直径</td><td>0.7～1.13 nm</td><td>0.7～0.93 nm</td><td>0.7～1.3 nm</td></tr><tr><td>長さ</td><td>300～2,300 nm</td><td>≥700 nm</td><td>450～2,300 nm</td></tr><tr><td>融点</td><td colspan="3">3,652～3,697 °C（文献値）</td></tr><tr><td>密度</td><td colspan="3">1.7～1.9 g/cm³ at 25 °C（文献値）</td></tr></table> 出典：シグマアルドリッチ ジャパン（同） ホームページ	直径	0.5～3 nm（主に 1.4nm）	長さ	～10 μm	かさ密度	0.02～0.15 g/cm ³	真密度	1.3～1.4 g/cm ³	引張り強度	50～70 GPa	引張り弾性率	2,000～5,000 GPa	熱伝導	2,000～3,000 W/mK	屈折率	1.5～1.6	製品例（炭素純度）	EC（>85%）、SO（>90%）、SO-P（>99%）	製品	SWeNT® SG-76	SWeNT® SG-65	SWeNT® CG-100	炭素含量	>90%	>90%	>90%	SWNT炭素含量	≥77% (carbon as SWNT)	≥77% (carbon as SWNT)	≥70% (carbon as SWNT)	直径	0.7～1.13 nm	0.7～0.93 nm	0.7～1.3 nm	長さ	300～2,300 nm	≥700 nm	450～2,300 nm	融点	3,652～3,697 °C（文献値）			密度	1.7～1.9 g/cm ³ at 25 °C（文献値）		
直径	0.5～3 nm（主に 1.4nm）																																														
長さ	～10 μm																																														
かさ密度	0.02～0.15 g/cm ³																																														
真密度	1.3～1.4 g/cm ³																																														
引張り強度	50～70 GPa																																														
引張り弾性率	2,000～5,000 GPa																																														
熱伝導	2,000～3,000 W/mK																																														
屈折率	1.5～1.6																																														
製品例（炭素純度）	EC（>85%）、SO（>90%）、SO-P（>99%）																																														
製品	SWeNT® SG-76	SWeNT® SG-65	SWeNT® CG-100																																												
炭素含量	>90%	>90%	>90%																																												
SWNT炭素含量	≥77% (carbon as SWNT)	≥77% (carbon as SWNT)	≥70% (carbon as SWNT)																																												
直径	0.7～1.13 nm	0.7～0.93 nm	0.7～1.3 nm																																												
長さ	300～2,300 nm	≥700 nm	450～2,300 nm																																												
融点	3,652～3,697 °C（文献値）																																														
密度	1.7～1.9 g/cm ³ at 25 °C（文献値）																																														

性能／特性	・ Sp² 炭素構造に基づく高強度（鋼鉄の約 100 倍） ・ CNT 構造に基づく高い柔軟性 ・ 軽量である（アルミの半分程度） ・ 均一性が高く分散性にも優れている ・ 結晶性が高くアスペクト比が大きい ・ 熱伝導性がよい（銅の約 10 倍、ダイヤモンドより高い） ・ 耐食性、摺動性が高い ・ 比表面積が大きい ・ 導電性が高い（銅の約 1,000 倍、銀よりも高い） ・ SWCNT の直径とねじれの度合いによって、電子的特性が大きく変わり金属様の伝導体として挙動するものやバンドギャップ半導体としての挙動を示す。
製造会社	【国内】 ・ 日本ゼオン（株） ・ （株）名城ナノカーボン ・ （株）マイクロフェーズ ・ 本荘ケミカル（株） 【海外】 ・ NanoIntegris（販売：（株）オプトサイエンス、シグマアルドリッチ ジャパン（同）） ・ KH Chemicals（販売：（株）巴工業） ・ CNano Technology（販売：丸紅情報システムズ（株）） ・ South West Nano Technologies（販売：シグマアルドリッチ ジャパン（同））

(b) 市場規模

SWCNT は、現時点ではまだ開発段階であり、市場規模は小さい。SWCNT は非常に高価であるため、量産化のための技術開発が進められている。同時に、金属性や半導体性という高機能 SWCNT の特性を生かすために純度の高い製品が必要であり高純度で効率的な合成法の開発も重要である。SWCNT の世界需要は、年間約 7 トンと見積もられている（日本ゼオン）。2013 年には、産業技術総合研究所（産総研）がナノテクノロジー最先端材料である SWCNT の製造に関する産総研のシーズ技術（eDIPS 法）を（株）名城ナノカーボンに技術移転し、両者の共同研究により eDIPS 法による SWCNT の工業生産プラントを開発し、量産性を実証した。それまで名城ナノカーボンで製造販売してきた高品質カーボンナノチューブ製造に比べて 100 倍の製造スピード向上を実現したものであり、この成果に基づき、名城ナノカーボンは、国産としては初めて化学気相成長（CVD）法で合成された SWCNT を 2014 年に上市する予定としている。また、日本ゼオンが産総研で開発された「スーパーグロース法」を利用し、新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）プロジェクトにおいて、産総研と共同で純度 99%以上の SWCNT の生産を可能にした。これにより、従来法では、1 g 程度／日の生産量であったが、100~150g／時間で、600 g／日を達成可能となった。現在、SWCNT は 10 万円/g 以上で非常に高価であるが、こうした供給体制が整うことにより、高品質で高純度の試料を大量に研究開発用途の市場への投入が可能となるため、SWCNT の実用化研究が加速することが期待されている。

※ eDIPS 法：改良直噴熱分解合成法（enhanced Direct Injection Pyrolytic Synthesis method）。化学気相成長（CVD）法の一つである気相流動法をさらに進化させた触媒/気体接触反応法の一つで、基板を用いない連続法によりカーボンナノチューブを合成する方法。これまでカーボンナノチューブを気相流動法で合成した際に不可避であった不純物の混入が、生成される SWCNT の量と比較して非常に少ないため、精製がほとんどいらない連続カーボンナノチューブ合成技術である。

※ 化学気相成長（CVD）法：さまざまな分解反応など各種化学反応を利用して原料とな

る物質から化学種を発生させ、それを基板や触媒に供給して、それらの表面あるいは気相中で目的とする物質を製造する技術。製造コストが低い／製造速度が速い／製造規模拡大が容易であるといった特徴を持ち大量生産に向いていることから、シリコン系半導体プロセスでの薄膜製造など工業的に広く用いられている。

(c) 主な用途

SWCNTはその非常に特徴的な性質により多くの用途が期待される。代表的なものを以下に示す。

- ・ エレクトロニクス分野：透明導電膜、トランジスタ、LSI配線、薄膜半導体
- ・ エネルギー分野：リチウムイオン電池、キャパシタ、燃料電池
- ・ マテリアル：導電性塗料／樹脂、導電性ペーパー／繊維、強化樹脂／強化金属、放熱部材
- ・ バイオ：細胞培養、バイオセンサー、ドラッグデリバリー
- ・ 構造材料
- ・ 医療分野

SWCNTは多層カーボンナノチューブ(MWCNT)に比べ、非常に均一性が高く、また構造により電氣的性質が大きく変わるため、エレクトロニクス分野での利用の期待が高い。半導体性SWCNTは薄膜トランジスタの活性層への利用が期待されている。また、半導体性CNTは、強度と柔軟性という機械的特性と電子的特性との組み合わせによって、プリンタブル及びフレキシブルエレクトロニクス用の材料として有望である。

(d) 研究開発事例

① カーボンナノチューブの熱を電気エネルギーに変換する性能の発見

開発者：首都大学東京 理工学研究科 真庭豊 教授、東京理科大学 工学部 山本貴博 講師、産業技術総合研究所 ナノシステム研究部門 片浦弘道 主席研究員 研究チーム
開発機構：首都大学東京、東京理科大学、産業技術総合研究所

概要：SWCNTは金属型(m-SWCNT)と半導体型(s-SWCNT)の2種類に大別されるが、本研究では、s-SWCNTを高純度に濃縮する技術を用いることで、m-SWCNT／s-SWCNTの存在比を制御したフィルム状の材料を開発した。その結果、s-SWCNTの割合によって、熱を電気(温度差を電圧)に変換する効率を表すゼーベック係数Sが10倍以上変化することを確認した。最も高純度のs-SWCNT材料では、s-SWCNTの混合比が約67%の従来型SWCNTの約2.8倍、実用Bi₂Te₃系熱電材料に匹敵する170 μ V/Kが得られた。また、単位面積、単位温度差当たりの発電電力の尺度となるパワーファクターPが、従来型SWCNTの約4倍となった。この結果は純度が違うSWCNT材料を組み合わせるだけで、容易に熱電変換素子を作製可能であることを意味する。さらに、ドーパ剤を注入することにより、従来型SWCNTにドーパした場合のパワーファクターの約4倍である108 μ W/K²mが得られることが分かった。さらに、この電圧発生には、SWCNT間の結合部分が重要な役割を担うことを理論計算により見いだした。今後、SWCNTの耐熱性や柔軟性などの優れた特徴を活かし、高性能の新規熱電変換素子の開発につなげていく予定である。

※ゼーベック効果：物体の両端に温度差を与えると、そこに電圧(起電力)が発生する現象。単位温度差(1K、1℃など)を与えたときに発生する電圧をゼーベック係数Sと呼ぶ。Sが大きいほど同じ温度差でも大きな電圧が得られる。また、温度差が大きいほど大きな電圧が得られる。Sは材料の種類に依存して、その大きさや符号(プラスの電圧が発生するか、マイナスの電圧が発生するか)が異なる。実際の熱電変換素子は、Sが違う2種類以上の材料を組み合わせで構成されている。

② シリコン上・超高速のカーボンナノチューブ発光素子開発

開発者：慶應義塾大学 理工学部 物理情報工学科 牧 英之 准教授

開発機構：慶應義塾大学

概要：カーボンナノチューブ薄膜を用いた発光素子によって、高速変調が可能な超小型発光素子をシリコンチップ上で作製することに初めて成功した。本素子は、カーボンナノチューブ薄膜を化学気相成長法でシリコンチップ上に成長させ、その薄膜に電極を形成するという簡単なプロセスで作製している。作製した素子に電圧を印加することで、ジュール加熱による黒体放射で発光する。今回、ほとんどのカーボンナノチューブが基板に接触した薄い薄膜を用い、発生した熱を速やかに基板に逃がす素子構造を実現することで、従来の金属フィラメントによる電球と比べて 100 万倍以上高速となる 1 Gbps での高速変調や半値幅 140ps のパルス光発生の発生に初めて成功した。また、発光機構の理論的な解明も進め、理論的には 10Gbps 以上の高速変調が可能であることを示した。本研究で開発したシリコンチップ上での超高速・超小型カーボンナノチューブ発光素子は、シリコン上での高集積な光源と光インターコネクトや光・電子集積回路の実用化へ大きく貢献することが期待される。また、本成果は、白色の超短パルス光を発生させることが可能であり、スーパーコンティニウム光などに代わるワンチップの白色パルス光源として微小分析装置等への応用も期待される。

③ 単層カーボンナノチューブ薄膜トランジスタで世界最高レベルの移動度を達成

開発者：東レ株式会社

開発機構：東レ株式会社

概要：NEDO プロジェクトの成果である、半導体純度を大幅に高めた単層 CNT と独自に開発した半導体ポリマーを複合化することで、高い半導体純度の品質を維持しながら、SMCNT の均一分散を実現し、単層カーボンナノチューブ薄膜トランジスタ (Carbon Nano-Tube Thin Film Transistor : 以下「CNT-TFT」) において、塗布型 TFT としては世界最高レベルとなる移動度 $13 \text{ cm}^2/\text{Vs}$ 、オンオフ比 106 を達成した。本移動度は、半導体純度を高める前の SWCNT に比べ 5 倍以上、従来のアモルファスシリコン比で 10 倍以上であり、SWCNT の半導体ポテンシャルを十分に引き出した結果と考えられている。また、金属型 CNT による電極間の短絡可能性が大幅に低下したことで安定した特性が得られるようになり、素子間のバラツキが小さくなった。

今後、2016 年近傍での実用化を目指し、塗布型半導体としての技術確立を進めていく、としている。

④ カーボンナノチューブを高分散させるディスク状イオン液晶の開発

開発者：産業技術総合研究所 電子光技術研究部門 メゾ構造的序グループ Kim Yeji

協力研究員、阿澄玲子 研究グループ長、近松 真之 主任研究員

開発機構：産業技術総合研究所

概要：これまで CNT は、ドデシル硫酸ナトリウムなどの界面活性剤に分散し、スピンコート法やスプレー法により成膜されていた。しかし、これらの方法は、材料の無駄が多く、ロール・ツー・ロール法などの量産性の高い連続製造が困難である。今回、eDIPS 法による高品質の SWNT を用いて、新たに成膜性に優れ、高濃度・高粘度の CNT インクを開発した。今回開発した作製法は、室温、大気中で成膜できる溶液プロセスであるため、1) ロール・ツー・ロール法による大面積化、量産化、2) ナノメートルレベルの膜厚制御、3) 多層積層、4) スクリーン印刷法によるパターン印刷、が可能という利点がある。しかも、製造工程における設備投資を抑えられる。また、今回開発した CNT 透明導電フィルムは、真空や高温プロセスを必要とせず、省資源、省エネ、かつ室温で成膜できる溶液プロセスで作製できる。この透明導電フィルムは、基材フィルムの透過率に対して 89~98 %

の透過率のとき、表面抵抗率 $68 \sim 240 \Omega/\square$ という、ウェットコーティング法による透明導電フィルムとしてこれまでに報告されたものと比較して世界最高レベルの透明性と導電性を持つ。また、CNT 特有の屈曲性や密着性により、耐屈曲性、耐衝撃性に優れ、折りたたむことができる。CNT 特有の柔軟性や密着性により、CNT を用いた透明導電フィルムは耐屈曲性や耐久性に優れていると期待される。今回開発した CNT 透明導電フィルムは折り曲げた状態でも導電性を維持できた。また、PEN（ポリエチレンナフタレート）基材上の CNT 透明導電フィルムを用いて屈曲試験を行ったところ、屈曲半径 10 mm で 20 万回屈曲させても導電性が保持されていた。さらに屈曲半径 2 mm での屈曲試験では 5 万回の屈曲で基材が破断するまで導電性が保持された。さらに、今回開発した CNT 透明導電フィルムを用いて抵抗式タッチパネルを作製した。今回開発した CNT 透明導電フィルムを用いたタッチパネルは、公共施設、病院、店舗、イベント会場などで、コンピューターの操作に不慣れな年配者や子どもでも、欲しい情報を簡単に得られるインターフェイスとして、幅広く活用できると期待される。

※ $\Omega/\square$ ：オーム・パー・スクエア。物質表面における電気抵抗を表す単位

※ ロール・ツー・ロール法：ロール状に巻いた基材を送り出して表面に目的物質を成膜・印刷し、再びロールに巻き取る生産性に優れた製造法

※ eDIPS 法：直噴熱分解合成法（Direct Injection Pyrolytic Synthesis Method）を改良したカーボンナノチューブの合成法。化学気相成長法（CVD 法）の 1 種で、触媒（前駆体を含む）と反応促進剤を含む含炭素原料をスプレーなどで霧状にして高温の加熱炉に導入し、流動する気相中で単層カーボンナノチューブを合成する量産方法で気相流動法とも呼ばれる。eDIPS 法は、分解特性の異なる 2 種類以上の炭化水素原料をそれぞれ独立に制御することにより、直径 2 nm 以下の単層カーボンナノチューブの直径を精密制御できる。

⑤ 塗工・印刷可能な単層カーボンナノチューブコート剤の開発

開発者：単層 CNT 融合新材料研究開発機構（TASC）／産業技術総合研究所（産総研）ナノチューブ応用研究センター 畠賢治 TASC サブプロジェクトリーダー／産総研首席研究員、TASC／産総研ナノチューブ応用研究センター スーパーグロース CNT チーム 桜井俊介 TASC 研究員／産総研主任研究員

開発機構：単層 CNT 融合新材料研究開発機構（TASC）、産業技術総合研究所

概要：NEDO のプロジェクト「低炭素社会を実現する革新的カーボンナノチューブ複合材料開発プロジェクト」（平成 22～25 年度）において、TASC と産総研は、カーボンナノチューブ（CNT）を溶媒中に高濃度で分散させることによって、基板上に塗工・印刷が可能な単層 CNT コート剤を得ることに成功し、単層 CNT を、一定の厚さを保った上で大面積厚膜を塗工する技術や、単層 CNT の微細パターンの成形を低コストに印刷する技術を開発した。これらの技術を用いることで、電池用電極部材などをはじめとする様々な製品に低コストで単層 CNT を利用することが可能になる。

⑥ 99%純度の半導体性単層カーボンナノチューブの選択的分離可能な脱着型可溶化剤の創製

開発者：九州大学大学院工学研究院／カーボンニュートラル・エネルギー国際研究所 中嶋直敏 教授、九州大学大学院工学研究院 利光史行 特任助教 研究グループ

開発機構：九州大学

概要：「ダイナミック超分子配位化学」に基づき、「結合生成－解離」が可逆的に制御できる超分子錯体に着目し、新たに分子設計、合成した有機配位子と、コバルト、ニッケル、亜鉛、及び銅イオンからなる超分子金属錯体型可溶化剤を開発した。ここでは、半導体性単層 CNT を選択的に抽出するポリフルオレンの骨格に、金属錯体による一次元ポリマー

化部位を導入したことで、ポリフルオレンに比べて約 10 倍という、有機溶媒中では世界最高レベルの可溶化量を達成した。これは、超分子錯体の形成が、CNT の表面で逐次的に伸長される現象を巧みに利用したためである。この金属錯体型可溶化剤は、酸を加えることで簡単に分解するように設計されており、半導体性単層 CNT の表面から完全除去できることが、各種評価法により明らかになった。また、取り除いた可溶化剤は、アルカリで中和の後、再利用することが可能である。本研究は、ダイナミック超分子配位化学に基づいて分子設計した、「結合生成－解離」が可能な超分子金属錯体型可溶化剤による半導体性単層 CNT の高効率選択的可溶化と、可溶化剤の完全除去を示した初めての研究である。

(e) 利用事例

帝人では、カーボンナノファイバーを、液晶状態の CNT を配向紡糸し、100% CNT の連続繊維を開発し、CNT ヤーンとして、軽量データケーブルや、配線アンテナ、耐熱・耐食微細配線に利用している。

(f) ナノリスク評価

現在 SWCNT については研究開発段階であり、その取扱いは実験室で行われている。日本ゼオンではスーパージグロース法によって SWCNT を合成している。SWCNT の取扱いはクリーンルーム内で行われているが、そこで使われる HEPA フィルタの検査では CNT は観察されていないとのことである。したがって屋外への CNT の排出は無いものと考えている。また手袋マスクゴーグル作業着等の着用を徹底しており、また CNT の保管は密閉容器で行われている。同時に作業従事者の教育も通達（平成 21 年 3 月 31 日付け基発第 0331013 号 厚生労働省労働基準局長通達 「ナノマテリアルに対するばく露防止等のための予防的対応について」）に従って行われているとのことである。

本荘ケミカルでは、他の作業と隔離された専用の部屋で製造が行われている。製造はアーク放電によって行われるが、完全に密閉のリアクターを用いている。取り出しを行う際に暴露の可能性はあるがそこでは粉塵対策を強化作業者装備を用い、局所排気設備を作動させて作業を行っている。

作業後は簡易集塵装置で作業場の集塵を行う。集塵された粉塵は外部に漏れることのない設備にて焼却されている。

（平成 25 年度本調査事業報告書より）

c) 多層カーボンナノチューブ（MWCNT）

(a) 製品概要

サイズ	直径：30 ～100 nm 長さ：～数 10 μm
形状	アスペクト比の大きな凝集体（バンドル構造）
計測技術	SEM、TES
物性	一般的な MWCNT は SWCNT が数層重なった形状を持つ。目的により、特性と純度の要求が大きく変わり、研究用に多様な種類が販売されている。一方、GSI クレオス（株）の製品はカップ型が重なった形を持ち、全体としては長い繊維状の形状であるが、その静止はかなり違っている。また、最近、東レ（株）では 2 層のカーボンナノチューブを開発している。

	1) 一般的な多層カーボンナノチューブ					
	項目	単位	代表値			測定法
			NT-7	CT-12	CT-15	
	繊維径	nm	65	110	150	FE-SEM
	アスペクト比	—	>100	>100	>100	
	かさ密度	g/cm ³	0.007	0.012	0.014	沈降嵩密度法（HCC法）
	真密度	g/cm ³	2.1	2.1	2.1	ピクノメーター
	比表面積	m ² /g	28	17	14	Ni 吸着法
	D/G 比	—	0.1	0.1	0.1	ラマン分光光度法
	酸化温度	℃	600	600	600	TG-DTA
	純度（炭素純度≡CNT純度）	%	>99.5	>99.9	>99.9	蛍光 X 線
出典：保土ヶ谷化学工業（株）カタログデータ						
	2) カップ積層型カーボンナノチューブ					
	構造はカップ形状で積層し、中空構造である。分散性の良さと線長調整と表面処理を行いやすい点が特徴である。					
	項目	24PS	AR10			
	外径（nm）	70～80	70～80			
	長さ（μm）	5	1			
	比表面積（m ² /g）	50	70			
	かさ密度（m ² /g）	0.05	0.23			
	粉体低効率（Ω・cm）	0.033	0.045			
	出典：GSI クレオス（株）のカルベール®カタログデータ					
	性能／特性	製品の種類により多様な物性のものが得られるが、一般的な MWCNT の特徴は以下のとおりである； ・ 機械的特性（軽量・強度・柔軟性）：アルミニウムの約半分の軽さ、鋼鉄の 100 倍の引張り強度、硬さはダイヤモンドの 2 倍。また、破断しにくく復元性、柔軟性に富む。 ・ 導電性：銅と比べ、約 1,000 倍という高い電流密度耐性を持つ。LSI に使用される微細な配線幅でも、銅などが断線してしまうような高密度の電流を流しても断線せず効率よく電子を伝える。複合材料内に適切に導入することで高い伝導性材料を得ることができる。ただし、電気伝導に寄与するのは外層のみで、内側の層は関与しない。 ・ 熱伝導性・耐熱性：銅の約 10 倍の熱を伝える。半導体回路の熱を放出し半導体の高温化を抑制するヒートシンクなどで活用が期待されている。また、空気中で 750℃、真空中では 2,300℃程度の耐熱性がある。 ・ 電磁波吸収性：CNT は電磁波をよく吸収する。CNT 繊維内で電磁波が反射を繰り返し減衰し、CNT が光を吸収して熱に変換すると考えられている。 ・ 化学的安定性：CNT は耐薬品性が高く、化学的に安定である。ほとんどの薬品に反応せず、溶けにくい。				
製造会社	【国内】 ・ 昭和電工（株） ・ 保土ヶ谷化学工業（株） ・ GSI クレオス（株）					

	・ 宇部興産（株） ・ 本荘ケミカル（株） ・ 三菱マテリアル（株） ・ 東レ（株） ・ 名城ナノカーボン 【海外】 ・ Nanocyl（巴工業（株）） ・ CNano Technology（販売：丸紅情報システムズ（株）） ・ Hyperion Catalysis International ・ Arkema（アルケマ（株））
--	---

(b) 市場規模

MWCNT の世界市場規模推移及び予測

	2010 年	2012 年	2013 年 見込	2014 年 予測	2016 年 予測	2017 年 予測
販売量（トン）	150	150	170	185	215	230
販売金額（百万円）	2,700	1,700	3,100	3,400	4,000	4,300

※販売金額はメーカー出荷ベース

出典：（株）富士キメラ総研「2013 年 微粉体市場の現状と将来展望」

MWCNT の NBCI 会員企業の製造量

	2011.年度	2012 年度	2013 年度
製造量（トン）	108	101	46

出典：経済産業省ナノマテリアル情報提供シート

上記のように、MWCNT の 2012 年度の世界需要は 150 トンと推定され、年々拡大傾向にあると予測されている（富士キメラ総研「2013 年 微粉体市場の現状と将来展望」）。一方、国内で経済産業省に報告されたナノマテリアル情報提供シートによれば、ナノテクノロジービジネス推進協議会（NBCI）の会員企業の製造量合計は 2011 年度から年々減少しており、2013 年度には 2012 年度の半分以下にまで製造量が減少している。国内主要企業による MWCNT 製造量の急激な減少は、最近の動物試験の結果、CNT が発がん性をもつ可能性が示唆されたことによる影響も考えられる。

(c) 主な用途

- ・ エレクトロニクス分野
- ・ エネルギー分野：リチウムイオン電池電極添加剤、キャパシタ、燃料電池
- ・ マテリアル：導電性塗料／樹脂、導電性ペーパー／繊維、強化樹脂／強化金属、放熱部材
- ・ バイオ：細胞培養、バイオセンサー、ドラッグデリバリー
- ・ ナノテクノロジー：走査型プローブ顕微鏡、マニピュレーション

(d) 研究開発事例

① 多層カーボンナノチューブの高い触媒活性を発見

開発者：東京工業大学大学院総合理工学研究科 脇慶子 准教授

開発機構：東京工業大学

概要：多層カーボンナノチューブは安定性や導電性に優れているため、電池の空気極（正極）の触媒または触媒担体として用いられているが、電気化学反応に最も重要なエッジ（欠陥）の構造制御が十分にされていない。また、欠陥の電子構造への影響や触媒活性への役割なども解明されていない。脇准教授らは、酸化物微粒子の触媒活性により、多層カーボ

ンナノチューブの炭素を酸化させ、壁に穴を開けることによって多層カーボンナノチューブに欠陥構造を形成した。この手法は従来の気体あるいは液体酸化剤を用いた処理法とは異なり、ナノオーダーの細孔の形成が可能であり、細孔以外の壁の結晶性を高く保ちながら（電気伝導性が高く）、かつ活性に寄与するエッジサイトを高濃度に制御可能である。欠陥形成に用いた酸化コバルト触媒は酸性溶液中で容易に除去できるため、欠陥制御された高純度の多層カーボンナノチューブ（DMWNT）を得ることができる。炭素の酸化によってエッジに形成された酸素官能基をアルゴン雰囲気や真空中で加熱・除去した炭素欠陥を持つ多層カーボンナノチューブ（DMWNT-Ar900）が高い触媒活性を発現することを確認した。電流電圧（CV）測定の結果、酸素還元反応の開始電位が約 0.3V シフトし、可逆水素電極に対して 0.73V 程度であることがわかった。1.85mg/cm² の DMWNT-Ar900 触媒を空気極に用いた発電実験では、0.74V の開放起電力と 100mW/cm² 以上の最大出力が得られた。これは金属や窒素を添加していない炭素電極としては最も活性の高いものである。

多層カーボンナノチューブの作製及び欠陥形成のために用いた触媒の残存不純物（鉄、コバルト）による反応活性への寄与を明らかにするため、バインダーフリーの紙状電極を作製し、酸性溶液中で活性測定後の電極を回収して評価した。触媒活性の測定前後の不純物濃度を測定した結果、測定前に極めて低い濃度の鉄とコバルト（0.02 原子%以下）不純物しか含まれない電極は、酸性溶液中の活性測定後にさらに大幅に減少したことが分かった。鉄とコバルトはそれぞれ測定前の約 1/7 と 1/17 に減少したにも関わらず、高活性に変化が見られなかったことから、これらの不純物が活性に寄与している可能性は低いと結論づけられた。従来は炭素のみでは高活性が得られず、金属や窒素の添加が必須だと考えられてきたが、今回の研究成果により炭素の欠陥が触媒活性の発現に重要な役割を果たしていることが示唆された。炭素のみで鉄や窒素を含むカーボンアロイなどと同等の活性が得られ、炭素系触媒の反応メカニズムの理解や最適構造設計の手掛かりとなることが期待される。

(e) 利用事例

新たな利用事例は確認できなかった。

(f) ナノリスク評価

国内の主要なメーカーではカーボンナノチューブの取扱いについては厚生労働省、経済産業省、環境省の通達、報告書、及びガイドライン¹を意識した安全対策をとっている。具体的には、製造その他で直接カーボンナノチューブの取扱いは、少なくとも局所排気設備のある場所で、保護着を着用し、ナノマテリアルに対応した保護マスクを使用している。また、販売に当たっては SDS を提供し、その危険性についても伝えているということである。保土ヶ谷化学工業（株）では、そのカタログに安全性評価試験データを記載している。最近では、より危険度の少ない分散液で販売するケースも多いようである。

（平成 25 年度本調査事業報告書より）

¹ 厚生労働省：平成 21 年 3 月 31 日付け基発第 0331013 号 厚生労働省労働基準局長通達「ナノマテリアルに対するばく露防止等のための予防的対応について」、経済産業省：「ナノマテリアル製造事業者等における安全対策のあり方研究会」報告書（平成 21 年 3 月 31 日）、環境省：「工業用ナノ材料に関する環境影響防止ガイドライン」（平成 21 年 3 月 10 日）

d) グラフェン

(a) 製品概要

サイズ	厚さ：約 0.335nm（1 層分、炭素原子 1 個分に相当） 形状：葉身形状（1 層）が 1～10 層重なったもの																										
形状	ごく薄のシート状																										
計測技術	TEM、SEM																										
物性	・ グラフェンは、炭素同素体の 1 つで、炭素原子が六角形のメッシュ状に整列した、原子 1 個分の厚みしかないシートであり、グラフェンが多層に積み重なったものがグラファイトである。各炭素原子の 4 個の価電子は 3 個の sp^2 混成軌道と $2p_z$ 軌道に分布し、$2p_z$ 軌道を占める価電子は自由電子となって、シート内を自由に行き来しているため、バンドギャップのない半導体または半金属とみなされる。電子移動度の大きさからポストシリコンとして着目されるほか、化学的に安定で機械的強度にも優れ、様々な用途開発への応用が期待される。 <table><tr><td>製品名</td><td>xGnP® Graphen Nanoplatelets</td></tr><tr><td>融点</td><td>3,600℃</td></tr><tr><td>比重</td><td>0.03～0.1 g/cm³</td></tr></table> 出典：XG Sciences HP			製品名	xGnP® Graphen Nanoplatelets	融点	3,600℃	比重	0.03～0.1 g/cm ³																		
製品名	xGnP® Graphen Nanoplatelets																										
融点	3,600℃																										
比重	0.03～0.1 g/cm ³																										
	<table><tr><td>製品名</td><td>高比表面積グラフェンナノパウダー3nm</td><td>グラフェンナノパウダー12nm</td><td>グラフェンナノパウダー60nm</td></tr><tr><td>純度</td><td>—</td><td>99.2%</td><td>98.5%</td></tr><tr><td>比表面積</td><td>510 m²/g</td><td>80 m²/g</td><td><15 m²/g</td></tr><tr><td>平均フレイク厚</td><td>1.6nm（3 分子層未満）</td><td>12nm（30～50 分子層）</td><td>60nm</td></tr><tr><td>平均粒径</td><td>～10μm（側部）</td><td>～4.5μm（1.5～10μm）</td><td>～3-7μm（側部）</td></tr><tr><td>電気抵抗率</td><td>3.78×10⁻² Ω/□</td><td>2.36×10⁻³ Ω/□</td><td>2.93×10⁻³ Ω/□</td></tr></table> 出典：イーエムジャパン（株）HP			製品名	高比表面積グラフェンナノパウダー3nm	グラフェンナノパウダー12nm	グラフェンナノパウダー60nm	純度	—	99.2%	98.5%	比表面積	510 m ² /g	80 m ² /g	<15 m ² /g	平均フレイク厚	1.6nm（3 分子層未満）	12nm（30～50 分子層）	60nm	平均粒径	～10μm（側部）	～4.5μm（1.5～10μm）	～3-7μm（側部）	電気抵抗率	3.78×10 ⁻² Ω/□	2.36×10 ⁻³ Ω/□	2.93×10 ⁻³ Ω/□
製品名	高比表面積グラフェンナノパウダー3nm	グラフェンナノパウダー12nm	グラフェンナノパウダー60nm																								
純度	—	99.2%	98.5%																								
比表面積	510 m ² /g	80 m ² /g	<15 m ² /g																								
平均フレイク厚	1.6nm（3 分子層未満）	12nm（30～50 分子層）	60nm																								
平均粒径	～10μm（側部）	～4.5μm（1.5～10μm）	～3-7μm（側部）																								
電気抵抗率	3.78×10 ⁻² Ω/□	2.36×10 ⁻³ Ω/□	2.93×10 ⁻³ Ω/□																								
性能／特性	・ 電子移動度：最も大きい物質の 1 つで、室温で 15,000cm²/Vs ・ 高い熱的・化学的安定性 ・ キャリア運動の相対論性 ・ 熱伝導性：現在知られる物質の中で最大（室温） ・ 電気伝導度：現在知られる物質の中で最大（室温）。バンドギャップをもたず金属的な電気伝導を示す。シートを 2 枚重ねて垂直電場を加えるとバンドギャップが生じる。 ・ 重量：現在知られる物質の中で最軽量 ・ 強度：現在知られる物質の中で最も丈夫な物質。同じ厚さの鉄シートの約 100 倍の強度 ・ 引張り強度：0.1%グラフェン含有ポリエチレンの引張り強度は、ポリエチレン単体の約 5 倍。 ・ 光透過性：単層グラフェンは可視光に対してほぼ透明（透過度 98%）。分散の仕方により、光透過性が大きく異なる。0.1%グラフェン含有ポリエチレンでも分散が良いと、光を透過しないが、分散が悪いと光を透過する。 ・ ガスバリア性：六角形の結晶格子構造の炭素間結合距離が 0.1nm 程度であるために、水素分子や He 分子であっても透過できない。 ・ 疎水性である																										

製造会社	【国内】
	・ グラフェンプラットフォーム（株） ・ （株）インキュベーション・アライアンス ・ 東芝（株） ・ （株）ニューメタルスエンドケミカルスコーポレーション（XG Science 社、Nanointegris 社製など） ・ イーエムジャパン（株）
	【海外】
	・ XG-Science（インド） ・ Angstrom（米国） ・ Vorbeck（フランス）

（b） 市場規模

グラフェンの世界市場規模推移及び予測：グラフェンインクベース

	2010 年	2012 年	2013 年 見込	2014 年 予測	2015 年 予測	2016 年 予測	2017 年 予測
販売量（トン）	0	△	1	5	20	100	250
販売金額（百万円）	0	△	100	350	1,000	4,000	7,500

※販売金額はメーカー出荷ベース

出典：（株）富士キメラ総研「2014 年 高機能添加剤・ハイブリッドマテリアルの将来展望」

グラフェンインクは 2013 年に 1 トン、1 億円程度の市場規模とみられる。本格的な採用事例は少なく、研究開発中の事案が多い。2014 年以降に市場が急拡大する見通しとされ、塗料や潤滑油、放送用フィルムなどの展開から市場が開始され、その後、ゴムや樹脂成形品関連で強度を要求するアプリケーションに対して拡大していくものと見込まれている。また、2015 年以降は、プリンテッドエレクトロニクス向けの電極材料での採用を目指しており、こういったアプリケーション展開により、2017 年までに市場規模は 75 億円規模まで拡大するものと予測されている（富士キメラ総研「2014 年 高機能添加剤・ハイブリッドマテリアルの将来展望」）。

また、グラフェンの世界的な市場は、主に、Angstrom、XG-Science、Vorbeck の 3 社であるが、各社の 2015 年 1 月時点での年間生産量は、それぞれ 300 トン、80 トン、40 トンである（各社ホームページ、Applied Graphene Materials Needs Sales-Nalyze）。全世界では、2013 年時点で年間 80 トンであるが、2017 年には年間 400 トンまで増加すると予測されている（Applied Graphene Materials Needs Sales-Nalyze）。

国内でも、2015 年の年間販売量 240 トンが期待されている（グラフェンプラットフォーム ヒアリング）。

製造コストは、天然素材が原料であることから、数百円/kg と安価であり、人工的に製造される CNT の製造コストの 1/100 程度である。なお、コンポジット開発では、分散をよくすることで添加量を少量に抑える（低濃度）ことができるが、均一分散を実現するのは高い技術力が必要となる。

(c) 主な用途

2013 年時点での主な用途は以下のとおりである；

- ・ コンポジット（樹脂・ゴム分野）：フィルム包材（ラップ、真空パック）、構造部材、ギア、タイヤ、ガasket
樹脂に 0.1～0.5%添加することで、強度を 30～40%向上させることができる。樹脂に添加することで、強度や帯電防止機能のほかに、抗菌性や酸素バリア性があることから、フィルムや樹脂成形品に対しての機能性アップアイテムとして注目される。
- ・ エレクトロニクス（電気電子分野）：透明電極（タッチパネル、太陽電池、LED）、電池負極材、RFID タグ、光電変換素子、超高速トランジスタ、テラヘルツ発振素子、パワー半導体
- ・ 電池（エネルギー分野）：リチウムイオン電池負極材、空気酸化電池、燃料電池用 Pt 触媒代替、キャシター、太陽電池、など

そのほか、以下のような用途でも使用されている；

- ・ 塗料・潤滑油分野：エンジンオイル、塗料
グラフェンを添加するだけで潤滑性が得られるという特性を有する。
- ・ 放熱素材：放熱シート、放熱グリース、ヒーター、放熱板
- ・ バイオ・生体：人工網膜、バイオセンサー、生体膜
- ・ その他：海水淡水化膜
海水淡水化膜として、脱塩処理が可能であるとの研究事例がある。グラフェンの膜における孔のサイズをコントロールすることで、透過／非透過物質の選択を行うことが可能である。

(d) 研究開発事例

① 高い電気伝導性を持った 3 次元グラフェンの開発

開発者：東北大学 原子分子材料科学高等研究機構 伊藤良一 助教、陳明偉 教授らグループ

開発機構：東北大学

概要：化学気相蒸着法を用いてナノ多孔質ニッケルの表面にグラフェンを成長させることにより、ナノ多孔質ニッケルの幾何学構造を維持した新規材料「3 次元ナノ多孔質グラフェン」を作成した。3 次元ナノ多孔質グラフェンを拡大した高解像度電子顕微鏡像から、実際の 3 次元構造を原子レベルで捉えることに成功した。この観察より、平坦部分は 6 員環の炭素原子が規則的に配列しており、曲率部分は 5 員環や 7 員環の構造が混ざって曲面を作っていることが明らかとなった。また、この 3 次元ナノ多孔質グラフェンの物性を測定した結果、3 次元構造を持っているグラフェンは 2 次元グラフェンの特徴を引きついでいることがわかった。さらに、移動度の温度依存性は、高温になるにつれて移動度が減少しているが、室温で $200\sim400\text{cm}^2/\text{Vs}$ の値を示し、2 次元グラフェンより少し低い程度であることがわかった。本研究で得られた 3 次元ナノ多孔質グラフェンは今までグラフェンを商品化しようとする際に大きな問題とされていた体積あたりの性能を劇的に向上させる可能性を秘めている。

② ジグザグ型グラフェンナノリボンの作製に成功

開発者：東北大学 原子分子材料科学高等研究機構 パトリック・ハン 助教、一杉太郎 准教授 研究グループ

開発機構：東北大学

概要：グラフェンは、炭素原子が蜂の巣状に並んだ厚さ原子 1 層分の物質で、電子移動度が高いため、透明導電膜や超高速トランジスタなどの応用に向けて、非常に活発な研究が世界中で展開されている。特に、ナノスケールサイズでリボン状にしたグラフェンナノリ

ボンは、エッジの形状がジグザグ型かアームチェア型かで、電気伝導性や磁性などの物性が大きく異なることが期待されている。しかし、ジグザグ型のエッジの作製はきわめて難しく、2種類のエッジを造り分けることができないために、未だに物性の違いを検証することができなかった。研究グループは、分子の合成によりエッジ制御を行うため、二臭化ビアントラセン化合物という分子を銅基板上にばらまき、500℃で10分程度基板を保った。その後、原子1つ1つが識別可能な走査型トンネル顕微鏡を活用して生成する分子を観察すると、ジグザグ型のエッジを有するグラフェンナノリボンが生成していることを確認した。銅基板の表面上に炭素原子が望む方向に連なり、エッジ形状を制御するように、特異的な化学反応が起きていることがわかった。この成果により、グラフェンのエッジ形状による物性の違いを検証するなどの研究を進めることが可能となり、グラフェンを使った新規エレクトロニクスデバイスやスピントロニクスデバイス創製につながるものが期待される。

③ 樹脂の高機能化用グラフェン添加剤「グラフェンナノハイブリッド®」の開発

開発者：グラフェンプラットフォーム（株）

開発機構：グラフェンプラットフォーム（株）

概要：グラフェンプラットフォーム（株）は、世界初となる量産用のグラフェン樹脂添加剤「グラフェンナノハイブリッド®」を開発した。本製品は、樹脂の成形時に添加使用することにより、グラフェンが元来もっている高強度、高伝導性、高電気伝導性などの極めて優れた物性が樹脂に付与され、新しいハイブリッド高機能化樹脂が得られる。同添加剤は、ベース樹脂中にグラフェンを高濃度（5～20重量%）に閉じ込めたマスターバッチ形態になっているので、供給・成形面の取扱いが容易になる。

④ グラフェンの物性制御に向け新しい「炭素－酸素結合」の構造を解明

開発者：（独）理化学研究所 Kim 表面界面科学研究室 鄭載勲（ジョン ジェフン）国際特別研究員、林賢燮（リン ヒョンシヨブ）国際特別研究員、吳準杓（オ ジュンピョウ）基礎科学特別研究員、金有洙（キム ユウス）准主任研究員、ら研究チーム

開発機構：（独）理化学研究所

概要：金属電極に接触した「酸化グラフェン」の化学構造を理論的に調べ、「エノラート」構造という高い反応性の化学種であることを発見した。酸素と反応することでつくる酸化グラフェンは、汎用性の高さや他の官能基への拡張性が優れるため注目されている。しかし、形成される「炭素－酸素結合」がどのような構造をもっているかは未だ明らかではなく、これまでは、酸素原子がグラフェン表面の炭素原子2つと結合している「エポキシ」構造であるという説が有力と考えられていた。研究チームは、密度汎関数理論という高精度の理論計算を行い、銅などの金属電極にグラフェンが接触した場合について、酸化反応の反応性、生成物の構造安定性、および電子物性の詳細を調べた。その結果、接触しているグラフェンを酸化させると、酸素原子1つがグラフェン炭素原子1つと結合している「エノラート」構造が、「エポキシ」構造より安定に生成されることを明らかにした。今回の成果により、体系的にグラフェン表面の化学修飾が行えるようになる。今後、他の官能基への展開も可能になり、多様な物性制御が実現できると期待できる。

⑤ グラフェン NEMS 素子の動作原理検証に成功

開発者：北陸先端科学技術大学院大学 マテリアルサイエンス研究科 水田博 教授、Jian Sun 博士研究員

開発機構：北陸先端科学技術大学院大学

概要：2層グラフェン（原子2層厚の炭素原子シート）膜で作成した両持ち梁を機械的に上下させて動作する電子機械スイッチの原理検証に世界で初めて成功した。現在のIT技術は、シリコン集積回路の基本素子であるMOSFET（金属酸化物半導体電界効果トラン

ジスタ)の堅調な微細化に支えられ発展を遂げてきた。最新のマイクロプロセッサでは、10億個を超える膨大な数の高速 MOSFET をチップに集積することで、大量のデータを瞬時に計算・処理している。しかし、この半導体微細化の追求に伴って、MOSFET のオフリーク電流(トランジスタをスイッチオフした状態での漏れ電流)の増大が深刻な問題となっている。オフリーク電流によりシステム待機時の消費電力(スタンバイパワー)は急増し、現代の集積回路システムにおいてはシステム稼働時の消費電力(アクティブパワー)と同等の電力消費となっている。スタンバイパワーを低減するために、現在、デバイス・回路・システム全てのレベルにおいて様々な対策が検討されている。デバイスレベルでは、トンネルトランジスタやインパクトイオン化 MOSFET などいくつかの新原理のスイッチングトランジスタが提案され、研究開発が進められているが、未だ従来の MOSFET を凌駕するオフリーク電流特性を実現するには至っていない。これに対して、水田らの研究チームは、2004 年に発見された新材料グラフェンをベースとしたナノメータスケールでの電子機械システム(Nano Electro-Mechanical Systems: NEMS)技術による新原理のスイッチングデバイスを提案している。今回、その第一段階として、2 層グラフェンで形成した両持ち梁を機械的に上下させる 2 端子型のグラフェン NEMS スイッチを作製し、低電圧で繰り返しスイッチング動作させることに成功した。グラフェン両持ち梁の下部に設けた制御電極に電圧を印加すると、両持ち梁は静電的な引力で機械的に下方に引き寄せられ、制御電極表面に接触した瞬間、スイッチがオンする。スイッチング電圧は約 1.8V と従来のシリコンを用いた NEMS 素子と比較すると 1 桁以上低電圧であり、また、複数回のスイッチング動作を繰り返しても、スイッチング電圧の値は安定していた。スイッチオフ時において、グラフェン梁は下部電極から物理的に切り離されることから、従来の MOSFET で問題となるオフリーク電流をシャットアウトすることが可能である。一方、スイッチオン時においては、グラフェンの高いキャリア移動度によって非常に高いオン電流が実現されることから、超高速・低消費電力システムの新たな基本素子として大いに期待される。

(e) 利用事例

グラフェンの使用量は、コンポジットへの添加量や用途に応じて大きく変化する。例えば、スマートフォンのタッチパネルにグラフェンを使用した場合には、約 200kg/1 億台、であり、スマートフォンの電池に 1%グラフェンを付与した場合には、約 20 万 kg/1 億台(200 トン/1 億台)となり、コンポジットへの使用が拡大すると、グラフェンの市場規模は数万吨規模となる。

また、三菱鉛筆(株)が特許出願している、ナノグラフェンを鉛筆芯に利用した製品では、含浸処理により得られる鉛筆芯中へのナノ粒子の含有量は、0.001~5%程度である。

そのほか世界では、グラフェンの開発に非常に盛んであり、以下のような利用開発が進められている。

① 超断熱素材へのグラフェン添加(スウェーデン)

超断熱素材にグラフェンを添加することで、強度をあげる試みが進められ、商品化に向けた開発が行われている。空気の割合を増やすことで、断熱性能を向上させることが可能であるが、空気層を増やすためには、ほぼ気泡からなる素材となり、強度が保てない。そこにグラフェンを添加することで、強度を保つことができる。

② 肌着へのグラフェン添加による人工筋肉機能付与(オーストラリア)

女性用の肌着にグラフェンを添加するとともに、電気センサーを付与することで、人工筋肉機能を持たせた製品の開発が進められている。

- ③ 2次電池へのグラフェンの使用（マレーシア）
グラフェンの2次電池の開発が進められている。

(f) ナノリスク評価

国内でグラフェンを生産している小規模事業者は、黒鉛等の粉体状の炭素を長期的に扱ってきた経験を有する大手事業者と共同で製造しており、それらの黒鉛等の製造事業者の工場において、製造時のリスク管理を行っている。

e) 酸化チタン

(a) 製品概要

サイズ	超微粒子：（粒径）10～50 nm、光触媒用：（粒径）～200nm																																																								
形状	粒子状、紡錘状																																																								
計測技術	粉末 X 線回折法、SEM、TEM																																																								
物性	・酸化チタンにはルチル型とアナターゼ型、ブルカイト型の 3 種の結晶形態があるが、工業的に利用されているのはルチル型とアナターゼ型のみである。ルチル型はアナターゼ型に比べて原子配列が緻密で物理的性質もより安定している。ルチル型、アナターゼ型ともに、熱濃硫酸、フッ酸、熔融アルカリ塩には溶解するが、それ以外の酸、アルカリ、有機溶媒、水には溶解せず、化学的にも安定な物質である。 <table><tr><td>結晶形</td><td>ルチル</td><td>アナターゼ</td></tr><tr><td>結晶系</td><td>正方晶系</td><td>正方晶系</td></tr><tr><td>密度（g/cm³）</td><td>4.27</td><td>3.90</td></tr><tr><td>屈折率 <i>n_D</i></td><td>2.72</td><td>2.52</td></tr><tr><td>モース硬度</td><td>7.0～7.5</td><td>5.5～6.0</td></tr><tr><td>比熱 （cal/°C・g at 25°C）</td><td>0.169</td><td>0.169</td></tr><tr><td>熱伝導率 （cal/cm/sec/°C）</td><td>0.148</td><td>0.430</td></tr><tr><td>電気伝導度（mho/cm）</td><td>10⁻¹³～10⁻¹⁴</td><td>10⁻¹³～10⁻¹⁴ 5.5×10⁻⁸（500°C）</td></tr><tr><td>誘電率</td><td>114</td><td>48</td></tr><tr><td>融点（°C）</td><td>1,825</td><td>ルチル形に転位</td></tr></table> 出典：酸化チタン（ナノ酸化チタンを含む）の安全性等について（日本酸化チタン工業会） <table><tr><td>製品名</td><td>スーパータイタニア</td><td>微粒子酸化チタン</td><td>オプトレイク 1120Z（8RU-7・G）</td></tr><tr><td>密度（g/cm³）</td><td>約 0.2（代表値）</td><td>3.9～4.3</td><td>0.9～1.3</td></tr><tr><td>比表面積（m²/g）</td><td>約 30</td><td>10～300（比表面積値は表面処理剤の影響も受ける）</td><td>200 前後</td></tr><tr><td>表面電荷（mV）</td><td>-40（pH7 のスラリーでの測定値）</td><td>約 40（水中における無処理酸化チタン）</td><td>-50 前後</td></tr><tr><td>化学組成</td><td>二酸化チタン</td><td>二酸化チタン</td><td>二酸化チタン</td></tr><tr><td>製造会社</td><td>昭和電工（株）</td><td>テイカ（株）</td><td>日揮触媒化成（株）</td></tr></table>			結晶形	ルチル	アナターゼ	結晶系	正方晶系	正方晶系	密度（g/cm ³ ）	4.27	3.90	屈折率 <i>n_D</i>	2.72	2.52	モース硬度	7.0～7.5	5.5～6.0	比熱 （cal/°C・g at 25°C）	0.169	0.169	熱伝導率 （cal/cm/sec/°C）	0.148	0.430	電気伝導度（mho/cm）	10 ⁻¹³ ～10 ⁻¹⁴	10 ⁻¹³ ～10 ⁻¹⁴ 5.5×10 ⁻⁸ （500°C）	誘電率	114	48	融点（°C）	1,825	ルチル形に転位	製品名	スーパータイタニア	微粒子酸化チタン	オプトレイク 1120Z（8RU-7・G）	密度（g/cm ³ ）	約 0.2（代表値）	3.9～4.3	0.9～1.3	比表面積（m ² /g）	約 30	10～300（比表面積値は表面処理剤の影響も受ける）	200 前後	表面電荷（mV）	-40（pH7 のスラリーでの測定値）	約 40（水中における無処理酸化チタン）	-50 前後	化学組成	二酸化チタン	二酸化チタン	二酸化チタン	製造会社	昭和電工（株）	テイカ（株）	日揮触媒化成（株）
結晶形	ルチル	アナターゼ																																																							
結晶系	正方晶系	正方晶系																																																							
密度（g/cm ³ ）	4.27	3.90																																																							
屈折率 <i>n_D</i>	2.72	2.52																																																							
モース硬度	7.0～7.5	5.5～6.0																																																							
比熱 （cal/°C・g at 25°C）	0.169	0.169																																																							
熱伝導率 （cal/cm/sec/°C）	0.148	0.430																																																							
電気伝導度（mho/cm）	10 ⁻¹³ ～10 ⁻¹⁴	10 ⁻¹³ ～10 ⁻¹⁴ 5.5×10 ⁻⁸ （500°C）																																																							
誘電率	114	48																																																							
融点（°C）	1,825	ルチル形に転位																																																							
製品名	スーパータイタニア	微粒子酸化チタン	オプトレイク 1120Z（8RU-7・G）																																																						
密度（g/cm ³ ）	約 0.2（代表値）	3.9～4.3	0.9～1.3																																																						
比表面積（m ² /g）	約 30	10～300（比表面積値は表面処理剤の影響も受ける）	200 前後																																																						
表面電荷（mV）	-40（pH7 のスラリーでの測定値）	約 40（水中における無処理酸化チタン）	-50 前後																																																						
化学組成	二酸化チタン	二酸化チタン	二酸化チタン																																																						
製造会社	昭和電工（株）	テイカ（株）	日揮触媒化成（株）																																																						
性能／特性	・ 紫外線遮蔽能 ・ 吸着能 ・ 光触媒活性 ・ 触媒活性																																																								

	・ 透明性
製造会社	【国内】 ・ テイカ（株） ・ 石原産業（株） ・ 堺化学工業（株） ・ 昭和電工（株） 【海外】 ・ Sachtleben Chemie（ドイツ）

(b) 市場規模

酸化チタンの市場規模推移および予測（触媒用途を除く）

	2010 年	2012 年	2013 年 見込	2014 年 予測	2016 年 予測	2017 年 予測
超微粒子酸化チタン						
販売量（トン）	2,540	2,740	2,850	2,950	3,140	3,230
販売金額（百万円）	9,600	10,380	10,800	11,200	11,950	12,300
光触媒用酸化チタン						
販売量（トン）	210	213	217	222	235	243
販売金額（百万円）	960	970	990	1,015	1,080	1,120
合計						
販売量（トン）	2,750	2,953	3,067	3,172	3,375	3,473
販売金額（百万円）	10,560	11,350	11,790	12,215	13,030	13,420

※販売金額はメーカー出荷ベース

出典：（株）富士キメラ総研「2013 年 微粉体市場の現状と将来展望」

酸化チタン（二酸化チタン）の日本酸化チタン工業会会員企業の生産量（触媒用途を含む）

	2012 年度	2013 年度
生産量（トン）	9,131	10,534

出典：経済産業省ナノマテリアル情報提供シート

上記のように、ナノサイズの酸化チタンの世界需要は、年々拡大しており、2014 年には超微粒子で 2,950 トン、光触媒用で 222 トンと予測されている（富士キメラ総研「2013 年微粉体市場の現状と将来展望」）。一方、国内の生産量は、経済産業省マテリアル情報提供シートによれば、日本酸化チタン工業会会員企業の合計で、2013 年度には 10,534 トンと報告されている。生産量のうち約 7 割が触媒用である。

サンスクリーン剤市場は国内、海外ともに拡大傾向にあり、需要を押し上げている。国内のサンスクリーン剤市場では、触感が良く、透明性の高いジェルタイプの比率が大幅に上昇しており、有機性紫外線吸収剤や酸化亜鉛の採用が増加していることで、当該需要を侵食している。

酸化チタンの市場は日系メーカーのシェアが高く、各社、海外需要に輸出で対応を行っている。また、国内や欧州での需要が大きい、その他の地域のウェイトも大きく増加しており、特に、タイ、インドネシア、ブラジルなどでの化粧品市場の拡大が需要増につながっている。

(c) 主な用途

ルチル型は化粧品や塗料などの主用途に利用されるのに対して、アナターゼ型は、発電プラント脱臭等の排煙脱硝触媒用途のほか、光触媒、の主用途として利用される。

- ・ 電気・電子材料：誘導体材料、抵抗体材料、電解質材料、電解液材料、セパレータ
- ・ 化学プロセス調節剤：触媒、触媒担体
- ・ 印刷インキ、複写用薬剤（トナー等）：電荷制御剤、流動性付与剤、研磨性付与剤、滑り性付与剤
- ・ 医薬品、医薬部外品、化粧品及び医療機器：外用品医薬部外品の有効成分、製剤用基剤及び添加剤、化粧品用の基剤及び添加剤
- ・ 塗料、コーティング剤：着色剤（染料、顔料、色素、色材、光輝剤）、その他
- ・ 着色剤（染料、顔料、色素、色材）：着色剤（染料、顔料、色素、色材）

（出典：経済産業省 ナノマテリアル情報提供シート）

また、光触媒用の酸化チタンについては、外装材、内装材、清浄機器、等が主な用途である；

- ・ 外装材：外装建材（タイル、サイディングなど）、塗料・コーティング、テント・幕材、他
- ・ 内装材：内装用タイル、ブラインド、壁、カーテン、照明器具、他
- ・ 清浄機器：空気清浄器、エアコン用フィルター、水処理機用フィルター、他
- ・ その他：道路資材（舗装・ブロック、ガードレール、防音壁、反射鏡など）、生活用品（家電など）、他

(d) 研究開発事例

① 最高レベルの光触媒活性をもつ酸化チタンの開発

開発者：昭和タイタニウム株式会社

開発機構：昭和タイタニウム株式会社

概要：2012年に、(独)新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）のプロジェクトにおいて、紫外光応答方光触媒材料として最高レベルの活性を持つ酸化チタンの開発に成功した。光触媒材料としての酸化チタンは、粒子が微細であるほど触媒活性が向上するが、一般に、微細な酸化チタンは結晶に欠陥が生じやすく、光触媒としては光の利用効率が低下し、触媒活性が下がる点が問題となっていた。昭和タイタニウムでは、セラミックコンデンサー向けの超微粒子酸化チタンの製造技術である気相法を応用することで、微細かつ欠陥の少ない十面体チタンを開発した。

② 光を当てるだけで何度でも望む場所を加工できるヒドロゲルの開発

開発者：(独)理化学研究所 創発物性科学研究センター 創発ソフトマター機能研究グループ 相田卓三グループディレクター、創発ソフトマター研究チーム 石田康博 チームリーダー、劉明傑 特別研究員、(独)物質・材料研究機構 国際ナノアーキテクトニクス研究拠点 佐々木高義 フェロー、海老名保男 MANA 研究者

開発機構：(独)理化学研究所、(独)物質・材料研究機構

概要：水を主原料とした固形物であるヒドロゲルは、生体にも地球環境にもやさしいプラスチック代替材料として、近年、産業界、学术界両方からの注目を集めている。しかし、従来のヒドロゲルのほとんどは、古典的な鋳型法により成形されているため、単純な形状の塊としてしか得られなかった。また、一度成形した後に形状や組成を変えることは困難であり、こうした制約がヒドロゲルの用途を著しく狭めてきた。共同研究グループは、光触媒として有名な酸化チタンのナノシートを使うことで、望みの場所を何度でも光加工できるヒドロゲルの開発に成功した。開発したヒドロゲルは、有機ポリマーと酸化チタンナノシートとを連結することで、3次元の網目を形成し、網目の隙間に大量の水を閉じ込め

たものである。これに光を照射すると、酸化チタンの光触媒作用により、網目中の水分子が高反応性のヒドロキシルラジカルに変換される。このヒドロキシルラジカルを使った化学反応を利用すると、ヒドロゲル中に情報を書き込んだり、ヒドロゲルと別物質とを強固に連結したりすることが可能となる。化学反応は光照射された部分でのみ進行するため、リソグラフィ微細加工が可能である。さらに、このプロセスは、半永久的に安定な酸化チタン触媒を用いるため、水と光さえあれば何度でも繰り返すことができる。この成果は、ヒドロゲルの用途を飛躍的に拡張するもので、酵素コンテナ、薬物除放システム、3次元に加工された細胞培地、人工臓器などをはじめ、バイオメディカル分野での様々な応用が期待できる。

(e) 利用事例

ルチル型は主に化粧品に利用されている。このうち、日焼け止め化粧料へのナノサイズの酸化チタンの配合量は、3~5%（新化粧品学）、多いもので15~20重量%の製品がある。また、ファンデーションへの配合量は5~20%が報告されている（化粧品科学, 1990）。

印刷インキ用途では、白インキ皮膜層に用いられる白色無機顔料としての酸化チタンは、インキ組成物に対して、5~50質量%が適量であるとされ、使用されている。

そのほか、光触媒作用を利用した抗菌・消臭効果を付与するために繊維製品に浸透させて機能性を持たせる製品や、インテリア材表面に塗布することで、シックハウス症候群の原因となる有害物質の分解・無害化や抗菌・消臭効果を付与するための塗料が製品化されている。

(f) ナノリスク評価

製造事業者によれば、製造段階での暴露については、可能な限り閉鎖系で作業を実施するとともに、粉塵発生箇所には、局所廃棄設備を設置して集塵し、バグフィルタを用いて回収することで、管理している。また、工場からの排出に関しては、回収した粉末は、可能な限り再利用するが、酸化チタンは、難溶性であるため、可能な限り排出しないように努めている。再利用できない分については、事業場で生産する他の全ての材料の残渣と合わせて回収している。廃棄物については、「廃棄物の処理及び清掃に関する法律」に従い、産業廃棄物の「汚泥」として、製造事業者の管理型廃棄物処分場で埋立処分が行われている。また、飛散防止対策として、搬送にはウイングシート付トラックを使用し、処分場では即日覆い、処理している。また、作業員の管理については、防塵マスクや保護衣、保護手袋、保護眼鏡を着用するほか、労働安全衛生法に基づき、気中粒子の測定を定期的の実施している。

f) ナノシリカ

(a) 製品概要

○ フュームドシリカ

サイズ	粒径：5～50nm																									
形状	主に球状																									
計測技術	SEM																									
物性	一般的な製品の物性を以下に示す。 <table border="1"> <thead> <tr> <th></th><th>(株) トクヤマ</th><th>日本アエロジル (株)</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>結晶構造</td><td>非晶質</td><td>非晶質</td></tr> <tr> <td>平均 1 次粒径</td><td>5～50nm</td><td>5～40nm</td></tr> <tr> <td>かさ密度 (g/cm³)</td><td>0.025～0.2</td><td>0.03～0.1 (真比重：2.2)</td></tr> <tr> <td>比表面積 (m²/g)</td><td>50～500</td><td>50～400</td></tr> <tr> <td>屈折率</td><td>—</td><td>約 1.46</td></tr> <tr> <td>電気比抵抗</td><td>—</td><td>約 10×10¹²Ωcm</td></tr> <tr> <td>その他</td><td>—</td><td> ・ 水中で負に帯電 ・ pH：3.6～4.3 ・ フタル酸ブチルの吸着： 250～350ml/100g ・ 高分散性 ・ 水溶性 (pH7、25℃)： 150mg/l </td></tr> </tbody> </table> (出典：経済産業省ナノマテリアル情報提供シート)			(株) トクヤマ	日本アエロジル (株)	結晶構造	非晶質	非晶質	平均 1 次粒径	5～50nm	5～40nm	かさ密度 (g/cm ³)	0.025～0.2	0.03～0.1 (真比重：2.2)	比表面積 (m ² /g)	50～500	50～400	屈折率	—	約 1.46	電気比抵抗	—	約 10×10 ¹² Ωcm	その他	—	・ 水中で負に帯電 ・ pH：3.6～4.3 ・ フタル酸ブチルの吸着： 250～350ml/100g ・ 高分散性 ・ 水溶性 (pH7、25℃)： 150mg/l
	(株) トクヤマ	日本アエロジル (株)																								
結晶構造	非晶質	非晶質																								
平均 1 次粒径	5～50nm	5～40nm																								
かさ密度 (g/cm ³)	0.025～0.2	0.03～0.1 (真比重：2.2)																								
比表面積 (m ² /g)	50～500	50～400																								
屈折率	—	約 1.46																								
電気比抵抗	—	約 10×10 ¹² Ωcm																								
その他	—	・ 水中で負に帯電 ・ pH：3.6～4.3 ・ フタル酸ブチルの吸着： 250～350ml/100g ・ 高分散性 ・ 水溶性 (pH7、25℃)： 150mg/l																								
性能／特性	・ 化学的に不活性で安定（フッ酸、強アルカリに溶解） ・ 増粘・チキソ性付与、ゴム等に補強性付与、粉体に流動性付与、耐熱性向上付与等の効果あり ・ 高分散性 ・ 高純度、低吸着水分、高批評面積、内部表面積なし、かさ高い ・ 電気抵抗が高い ・ アモルファス構造 ・ 吸油量大																									
製造会社	【国内】 ・ (株) トクヤマ ・ 日本アエロジル																									

○ 高純度コロイダルシリカ

サイズ	粒径：15～100nm 程度																																											
形状	球状																																											
計測技術	SEM																																											
物性	<table><tr><td></td><td>PL-1</td><td>PL-3</td><td>PL-7</td></tr><tr><td>外観</td><td>透明乳白色</td><td>透明乳白色</td><td>乳白色</td></tr><tr><td>比重(20/4℃)</td><td>1.07</td><td>1.12</td><td>1.14</td></tr><tr><td>pH</td><td>7.3</td><td>7.3</td><td>7.3</td></tr><tr><td>シリカ濃度[%]</td><td>12</td><td>20</td><td>23</td></tr><tr><td>1次粒子径[nm]</td><td>15</td><td>35</td><td>75</td></tr><tr><td>2次粒子径[nm]</td><td>40</td><td>70</td><td>125</td></tr><tr><td>会合度</td><td>2.7</td><td>2</td><td>1.7</td></tr><tr><td>アルカリ金属[ppb]</td><td>≤300</td><td>≤300</td><td>≤300</td></tr><tr><td>重金属[ppb]</td><td>≤100</td><td>≤100</td><td>≤100</td></tr></table> (出典：扶桑化学工業 HP カタログ)					PL-1	PL-3	PL-7	外観	透明乳白色	透明乳白色	乳白色	比重(20/4℃)	1.07	1.12	1.14	pH	7.3	7.3	7.3	シリカ濃度[%]	12	20	23	1次粒子径[nm]	15	35	75	2次粒子径[nm]	40	70	125	会合度	2.7	2	1.7	アルカリ金属[ppb]	≤300	≤300	≤300	重金属[ppb]	≤100	≤100	≤100
	PL-1	PL-3	PL-7																																									
外観	透明乳白色	透明乳白色	乳白色																																									
比重(20/4℃)	1.07	1.12	1.14																																									
pH	7.3	7.3	7.3																																									
シリカ濃度[%]	12	20	23																																									
1次粒子径[nm]	15	35	75																																									
2次粒子径[nm]	40	70	125																																									
会合度	2.7	2	1.7																																									
アルカリ金属[ppb]	≤300	≤300	≤300																																									
重金属[ppb]	≤100	≤100	≤100																																									
性能／特性	・ コロイダル溶液のため、外観は液体 ・ 通常状態でコロイド粒子は安定に分散しているが、pH 変動（酸、アルカリの添加）等により分散を保てなくなり、凝集・沈降する。																																											
製造会社	・ 扶桑化学工業（株） ・ 多摩化学工業（株）																																											

(b) 市場規模

ナノシリカの市場規模推移および予測

	2010 年	2012 年	2013 年 見込	2014 年 予測	2016 年 予測	2017 年 予測
フュームドシリカ						
販売量（トン）	26,600	26,100	25,800	25,800	25,700	25,700
販売金額（百万円）	27,200	26,800	26,500	26,500	26,400	26,500
コロイダルシリカ						
販売量（トン）	4,600	4,000	4,200	4,400	4,800	5,000
販売金額（百万円）	7,100	6,000	6,300	6,600	7,200	7,500
合計						
販売量（トン）	31,200	30,100	30,000	30,200	30,500	30,700
販売金額（百万円）	34,300	32,800	32,800	33,100	33,600	34,000

※販売金額はメーカー出荷ベース

出典：(株) 富士キメラ総研「2013 年 微粉体市場の現状と将来展望」

ナノシリカの製造量

		2012 年度	2013 年度
生産量（トン）	フュームドシリカ	1 万～10 万	1 万～10 万
	コロイダルシリカ	1,000～1 万	1,000～1 万

出典：経済産業省ナノマテリアル情報提供シート

上記のように、フュームドシリカの世界需要は、年々減少の傾向を示している。コロイダルシリカも 2010 年から 2012 年にかけて減少したものの、2013 年以降は年々拡大すると予測されている（富士キメラ総研「2013 年 微粉体市場の現状と将来展望」）。同様に、国内

の生産量についても、経済産業省マテリアル情報提供シートによれば、フュームドシリカ、コロイダルシリカ、ともに、2012年度、2013年度と横ばいである。

フュームドシリカはシリコーンゴムの充填材向けを中心に採用されているが、シリコーンゴムは自動車や電機・電子部品、日用品などに採用されているが、目立った競合がないため、国内市場は成熟している。また、当該品についても、汎用的に使用されている材料であり、成熟市場である。また、各用途で、ユーザーの海外生産シフトの傾向があることから、今後の伸長は見込みにくい、と予測されている（富士キメラ総研「2013年 微粉体市場の現状と将来展望」）。

同様に、コロイダルシリカについても、半導体産業の影響を受けて低調であり、横ばいトレンドで推移していたが、2013年に半導体市場が回復傾向となり、当該需要も増加することが見込まれている。当該品は微細化が進展する半導体市場において、欠かせない素材であり、多素材との競合も少ない点が強みであることから、今後もおおむね半導体市場に連動したトレンドとなり、微細化の進展により、半導体市場の成長率を若干上回る伸び率と予測されている（富士キメラ総研「2013年 微粉体市場の現状と将来展望」）。

（c） 主な用途

フュームドシリカの主な用途は、シリコン充填材で、用途別販売量の45%近くを占める。そのほか、FRP用添加剤が8%弱、塗料添加剤が7%程度となっている。また、輸出量は全体の19%強である。主要用途であるシリコン充填材は、強度や伸縮性を高めるために用いられる。フュームドシリカは液体製品では、後年度か、ドリップ防止、チキソトロピー性の付与、分散性向上といった目的で採用されている。また、粉体製品では貯蔵・輸送による凝集（固結）防止が主な採用理由である。応用性が広く、汎用的に採用されているが、国内において大きく伸びている用途はみられないため、今後もシリコーン充填材向けを中心とした市場と推測されている（富士キメラ総研「2013年微粉体市場の現状と将来展望」）。分野別に主な用途を整理すると以下のようになる；

- ・ エラストマー：熱加硫型（HTV）、室温硬化型（RTV）、液状シリコーン、他
- ・ 液体製品：各種塗料・インク、接着剤、農薬、医薬・化粧品、自動車用ワックス、芳香油、クリーナー、歯磨き粉、他
- ・ 粉体製品：粉体塗料、粉末消化剤、医薬品散剤、食品添加用、複写機用トナー、他
- ・ 合成樹脂：FRP用添加剤（不飽和ポリエステル、エポキシ樹脂など）、液体・ペースト・分散系の増粘、フィルムのブロッキング防止、被覆ケーブルの絶縁性向上、他
- ・ その他：インクジェット紙のインク吸収剤、触媒、研磨剤（CMPスラリー）、他

コロイダルシリカの主な用途は、半導体用研磨剤で、ウェハ研磨（55%）やCMPスラリー用（38%）に使用されている。ウェハ研磨剤では、最終鏡面研磨工程などで採用される。高純度品でヘイズやスクラッチ特性に優れることから、最終鏡面研磨に適している。CMPスラリー用では、用途によって低純度品やフュームドシリカなども採用されているが、微細化などの進展から高純度品である当該品の使用量も多い。CMPスラリー用としては、主にCu研磨用に採用されている。その他、バリアメタル、層間油田体（ILD）、タングステン（W）用CMPスラリーにも採用される。半導体の微細化が進展することで、CMPスラリー用では高純度品のニーズが安定的にあるため、CMPスラリー市場の成長率を若干上回るペースで需要が拡大していくことが見込まれている（富士キメラ総研「2013年微粉体市場の現状と将来展望」）。近年はトナー用添加剤として複写機メーカー向けに用途が広がっている。以下のとおりである；

- ・ エレクトロニクス分野：ウェハ研磨剤（ポリシング）、CMPスラリー（主にCu研磨、バリアメタル検査で、一部ILDやW研磨でも使用）
- ・ その他：インクジェット用紙の添加剤（インクのにじみ防止効果）、複写機トナー用添加剤、クロマトグラフィ充填材、コーティング剤、他

- ・ 注目用途：トナー添加剤

(d) 研究開発事例

① 診断薬用蛍光ナノシリカ粒子 Quartz Dot®の開発

開発者：古河電気工業（株） 横浜研究所 ナノテクセンター 会澤英樹、高木智洋、平山陽介、大久保典雄

開発機構：古河電気工業（株）

概要：蛍光試薬に用いられている代表的な蛍光材料は、ナノメートルサイズの有機色素であるが、退色しやすい、輝度が低いなどの問題があり、耐光性や輝度の向上が望まれている。そこで、蛍光による生体分子検出技術の高度化とその診断試薬への適用を目的に、従来から使用されている有機色素と比較して、高輝度であることを特長とする蛍光シリカ粒子の開発を行った。QUARTZ DOT は、有機色素分子をシリカ（二酸化ケイ素）粒子内部に固定化した蛍光粒子であり、1 個の粒子に有機色素分子を 10 ～数万個含有させることにより、有機色素の弱点であった低発光強度の問題を解決した蛍光材料である。

粒子作製では、精密な粒径制御技術によって粒径 15~500nm で均一な蛍光シリカ粒子の合成技術を確立した。また、蛍光シリカ粒子を蛍光試薬として用いるためには、蛍光シリカ粒子表面に抗体、オリゴヌクレオチド、酵素などの生体分子を結合する必要がある、粒子表面処理において、交互吸着法を用いた表面修飾法を開発し、凝析防止と同時にカルボキシル基を付与する技術を確立した。さらに表面に抗体を結合したシリカ粒子は、体外診断試薬であるイムノクロマト検査薬用標識粒子として適用可能であることを確認した。

(e) 利用事例

ナノシリカの製品への使用量は、55 体積%充填のアクリル樹脂などが報告されている。また、化粧品への使用量については、ファンデーションで 2%、歯磨で 20%等が報告されている（新化粧品学）。

扶桑化学工業は、ナノシリカ材料の新分野開拓を加速することを公表した。2014 年初めには、京都第一工場（京都府福知山市）で超高純度コロイダルシリカを応用したナノパウダーの生産能力を増強、増産体制を確立する。2013 年 7 月には、神奈川県川崎市に東京研究所を設立し、研究開発および生産体制の拡充を図り始めている。従来の半導体研磨分野以外の新分野への事業領域を拡大させることで、ナノパウダーおよび新用途で 20 億円規模の売り上げを目指していく、としている。

(f) ナノリスク評価

製造段階における工場内での暴露については、第三種粉塵として管理が行われており、工場建屋の天井に廃棄ファンを設置して喚起するほか、製造設備は密閉系とする等の対策がとられている。出荷工程における袋詰め作業等は、局所排気により対応し、管理している。工場からの排出については、排気をスクラバーで水散布し、粉塵を回収するほか、粉塵含有排水は、沈殿池に送り、浚渫した固形物を、他の製造工程からのものも含めて、リサイクルして管理する等の対策がとられており、廃棄物の発生はほとんどない。

また、作業員についても、防塵マスク等を着用する等、適切な対策がとられている。

g) プラチナ

(a) 製品概要

サイズ	平均粒径：100～300nm
形状	球状、不定形
計測技術	SEM、TEM
物性	- 酸化されにくい - 融点が高い（1,769℃）
性能／特性	- 消臭 - 抗菌 - 除菌 - 制菌 - 坑酸化作用
製造会社	- 田中貴金属工業（株） - 相田化学工業（株） - 石福金属興業（株） （株）徳力化学研究所

(b) 市場規模

プラチナ粉の世界市場規模推移及び予測：平均粒径 100～300nm、2～3μm

	2010 年	2012 年	2013 年 見込	2014 年 予測	2015 年 予測	2016 年 予測	2017 年 予測
販売量 (kg)	7,500	8,600	9,000	9,500	9,900	10,500	11,200
販売金額 (百万円)	33,800	39,600	45,500	48,000	49,000	54,000	55,000

※販売金額はメーカー出荷ベース

出典：（株）富士キメラ総研「2013 年 微粉体市場の現状と将来展望」

プラチナ粉の需要の 8 割強は、HDD の磁性材料向けに使用されているが、HDD 向けは平均粒径が 2～3 μm の粒子である。100～300nm の粒子は導電ペーストとして利用されており、プラチナ粉全体に占めるウェイトは 12%程度であり、2013 年の販売量は 1,100kg との見込みである（富士キメラ総研「2013 年 微粉体市場の現状と将来展望」）。

プラチナ粉のトップメーカーは田中貴金属工業であり全体の 50%を占める。第 2 位は相田化学工業で、年間 1 トン程度の販売規模を誇る。導電ペースト向けへの展開を得意とするのは、石福金属興業などがある。

(c) 主な用途

プラチナ粉の主要用途は、HDD の磁性層向けであるが、磁性材料として使用されるのは、主に平均粒径 2～3 μm のものであり、ナノサイズのプラチナは、銀導電ペーストとしての使用である。

- ・ HDD 分野：垂直磁気記録方式（熱アシスト方式）のハードディスクドライブの構成材料（磁性層）
- ・ その他分野：銀導電ペースト（自動車用酸素センサー、NOx センサー、他）

(d) 研究開発事例

新たな研究開発事例は確認できなかった。

(e) 利用事例

プラチナナノ加工製品として、以下のようなものが商品化されている；

- ・ 衣類：抗菌・消臭効果を付与した衣類
- ・ 医療用品：大腸菌などの衛生管理用として、介護用排尿の洗浄水への使用
- ・ 車：消臭・抗菌作用を利用した、車内コーティング
- ・ 医療機関：院内感染症対策及び消臭・抗菌作用を利用した、病院、介護施設等のコーティング
- ・ 噴霧器、消臭ミスト機：消臭、除菌、抗菌、功老化、室内空気環境改善のための噴霧液としてのプラチナナノ溶液
- ・ 電化製品：米の黄変抑制のためのフッ素加工へのプラチナナノ粒子の練り込みや、衛生管理及び食中毒対策としての自動食器洗い機用の洗浄水への使用、食品の鮮度保持のための冷蔵庫内冷却循環ユニット内のプラチナナノ加工

また、近年では、サプリメントとして、プラチナナノ粒子を含む、飲料水が販売されている。その濃度は、10 μ g/L（商品名：マナプラチナ）である。そのほか、石鹼にナノプラチナ粒子を十数%配合した商品等も販売されている。

h) ナノ金

(a) 製品概要

サイズ	数 nm～数十 nm
形状	球状、棒状、三角形
計測技術	TEM、SEM
物性	・ 表面プラズモン共鳴 ・ 比表面積：20～730m²/g（ハルタゴールド HP より）
性能／特性	・ 表面積が大きい ・ ユニークな光学特性 ・ 表面修飾が容易 ・ 合成が容易 ・ 毒性が低い ・ 生体との相性がよい
製造会社	・ アイ'エムセップ ・ ハルタゴールド ・ 浜松ナノテクノロジー ・ 田中貴金属

(b) 市場規模

金ナノ粒子は触媒作用が注目されているが、現在は用途開発段階にある。球状の金ナノ粒子は、この20年間で光熱癌治療の研究に使用されるようになった。ただし、球状金ナノ粒子の吸収ピークが、皮膚や組織、ヘモグロビンなどの透過窓より短波長に限られていることから、最適ではないとされている。

最近では、金ナノロッド（棒状）の開発により、吸収ピークと散乱特性を最適化することが可能となったことから、金ナノロッドが可視領域から近赤外領域にわたる波長で光散乱が可能となった。金ナノロッドは、光音響や四光波混合などの高効率非線形工学を使用した in vivo イメージングの改善にも使用される。

(c) 主な用途

金ナノ粒子の用途例としては、以下のようなものがあげられる（シグマアルドリッチ HP より）；

- ・ エレクトロニクス
印刷用インクをはじめ電子機器用チップなどの、導電材料として利用される。電子機器が小型化するにつれて、ナノ粒子はチップ設計において重要な要素となっており、ナノスケールである金ナノ粒子は、電子機器用チップの抵抗や導電体などの配線に使われるようになっている。
- ・ 光線力学的療法（PDT：Photodynamic Therapy）
金赤外線吸収金ナノ粒子（金ナノシェルおよび金ナノロッドを含む）は、700～800nmの波長の光で励起されると熱を生成するため、標的とする腫瘍を除去することができる。この治療は「温熱療法」としても知られており、金ナノ粒子を含む腫瘍に光を照射することで粒子が加熱され、腫瘍細胞が破壊される。
- ・ 治療用薬物送達
金ナノ粒子は体積あたりの表面積が大きいので、多数の化合物（池沼薬、標的化剤、防汚高分子など）で表面をコーティングすることが可能である。
- ・ センサー
様々なセンサーに用いられており、金ナノ粒子を利用した比色センサーが食品検査に使用される。また、表面増強ラマン分光法では、金ナノ粒子を用いて科学結合の振動エネルギーを測定することが可能で、金ナノ粒子を用いたたんぱく質や汚染物質、その他化合物の検出の研究が進められている。
- ・ プローブ
金ナノ粒子は光を散乱するため、暗視野顕微鏡において様々な色を生じる。現在、金ナノ粒子の散乱光は生物学的イメージング用途に用いられている。さらに、金ナノ粒子は比較的密度が高いため、透過顕微鏡観察のプローブとしても有用である。
- ・ 診断用途
金ナノ粒子は、心臓病やがん、感染性病原体の診断において、バイオマーカーを検出するのに利用される。金ナノ粒子は、ラテラルフロー免疫学的試験法でも一般的に用いられているが、この方法の家庭での一般的な例には、家庭用妊娠検査がある。
- ・ 触媒
多くの化学反応において触媒として用いられる。金ナノ粒子の表面は選択的酸化反応に用いることができ、場合によっては還元反応を起こす（窒素酸化物）こともある。燃料電池用とでの開発も進んでいる。

(d) 研究開発事例

① 細胞内に自在に金のナノ粒子を作る技術を開発

開発者：大阪大学 免疫学フロンティア研究センター ニコラス・スミス准教授ら 研究グループ

開発機構：大阪大学

概要：細胞内に取り込まれた金イオンに外部からレーザー光を照射することで、金のナノ粒子（結晶）を作成することに成功した。具体的には、細胞内に取り込ませた金イオンに波長 325nm のレーザー光を照射することで、純金のナノ粒子（結晶）を作成することに成功した。ナノ粒子の直径は2～20nmに分布しており、金イオンを洗い流した後でも安定して細胞内にとどまった。また、金ナノ粒子の出現位置を精密に制御することができた。さらに、細胞内に生成した金ナノ粒子を波長 785nm のレーザーで励起し、表面増強ラマン散乱（Surface Enhanced Raman Scattering, SERS）を起こすことで、金粒子周辺の化学的な状態を測定することに成功した。本研究の成果は、細胞内の生体情報を得るための新たな手段を提供したもので、レーザー照射により、細胞内の任意の場所に金の結晶（ナ

ノ粒子) を出現させる。この結晶に対して用いられる表面増強ラマン散乱 (SERS) では、ナノ粒子表面でラマン信号が増強されることにより、金粒子周りの局所的な化学状態を高感度で得ることができる。将来は、細胞を傷つけずに細胞内の任意の場所の情報を得ることに期待が寄せられる。

(e) 利用事例

金ナノ粒子は、その表面プラズモン共鳴に基づき着色材料として注目され、最近になって利用が進んでいる。こうした着色剤への金ナノ粒子の使用量は、顔料に対して数%である。

(f) ナノリスク評価

金ナノ粒子は触媒作用が注目されているが、現在は用途開発段階にあり、製造も実験室規模に留まっている。研究室での開発時における作業においては、適切な作業工程のリスク管理が行われている。

i) ナノ銀

(a) 製品概要

サイズ	銀ナノ粒子； ・ 抗菌用の銀粒子は、数 nm～200μm のものまで幅広く利用されている。 ・ 導電性インクとしては数 nm～数 10nm のものが使用されるが、10nm 以下のより小さいものが求められている。 銀ナノワイヤ； ・ 直径数 10μm、長さ数 10μm のものが導電フィルム等に使用されている。																																																											
形状	粉体、ペースト、分散液																																																											
計測技術	SEM、TEM、AFM（原子間力顕微鏡）																																																											
物性	・ 銀ナノ粒子は独特の光学的、電気的、熱的特性を有する。銀ナノ粒子は、他の多くの色素や段量と異なり、光の吸収や散乱が極めて効率的であり、粒子の大きさや形状に応じて色を持つ。銀ナノ粒子は、特定の波長の光で励起された際に金属表面の伝導電子が集団的な振動を起こす、表面プラズモン共鳴、を生じ、この振動は、通常にはない散乱や吸収特性の原因となる。そのため、銀ナノ粒子は、物理的断面積の 10 倍までの有効消光断面積を示す。 ・ 銀ナノワイヤは、透明性、導電性、柔軟性、伸縮性が非常に高く、ITO フィルム代替として低いコストが期待されている。 （銀ナノ乾粉） <table><tr><td>品番</td><td colspan="2">銀ナノ粒子乾粉-1</td><td colspan="2">銀ナノ粒子乾粉-2</td></tr><tr><td>粒径</td><td colspan="2">20 nm</td><td colspan="2">60 nm</td></tr><tr><td>比表面積</td><td colspan="2">15～20 m²/g</td><td colspan="2">5～8 m²/g</td></tr><tr><td>TAP 密度</td><td colspan="2">2～4 g/cm³</td><td colspan="2">2～4 g/cm³</td></tr><tr><td>Ag 含量</td><td colspan="2">≥95wt%</td><td colspan="2">≥98 wt%</td></tr></table> 出典：DOWA エレクトロニクス（株）HP （銀ナノ粒子分散水溶液）：濃度 0.02mg/l <table><tr><td>品番</td><td>730785</td><td>730793</td><td>730807</td><td>730815</td><td>730777</td></tr><tr><td>粒径（nm）</td><td>10</td><td>20</td><td>40</td><td>60</td><td>100</td></tr><tr><td>密度（g/ml[25℃]）</td><td>0.997</td><td>0.986</td><td>0.990</td><td>0.9976</td><td>0.9978</td></tr><tr><td>粒子数</td><td>3.6×10¹²</td><td>4.5×10¹¹</td><td>5.7×10¹⁰</td><td>1.7×10¹⁰</td><td>3.6×10⁹</td></tr><tr><td>蛍光スペクトル</td><td>λ_{em} = 388nm FWHM59 nm</td><td>λ_{em} = 401nm FWHM6 6nm</td><td>λ_{em} = 412nm FWHM6 3nm</td><td>λ_{em} = 431nm FWHM8 1nm</td><td>λ_{em} = 504nm FWHM1 67nm</td></tr></table> 出典：シグマ・アルドリッチ（同）カタログ					品番	銀ナノ粒子乾粉-1		銀ナノ粒子乾粉-2		粒径	20 nm		60 nm		比表面積	15～20 m ² /g		5～8 m ² /g		TAP 密度	2～4 g/cm ³		2～4 g/cm ³		Ag 含量	≥95wt%		≥98 wt%		品番	730785	730793	730807	730815	730777	粒径（nm）	10	20	40	60	100	密度（g/ml[25℃]）	0.997	0.986	0.990	0.9976	0.9978	粒子数	3.6×10 ¹²	4.5×10 ¹¹	5.7×10 ¹⁰	1.7×10 ¹⁰	3.6×10 ⁹	蛍光スペクトル	λ _{em} = 388nm FWHM59 nm	λ _{em} = 401nm FWHM6 6nm	λ _{em} = 412nm FWHM6 3nm	λ _{em} = 431nm FWHM8 1nm	λ _{em} = 504nm FWHM1 67nm
品番	銀ナノ粒子乾粉-1		銀ナノ粒子乾粉-2																																																									
粒径	20 nm		60 nm																																																									
比表面積	15～20 m ² /g		5～8 m ² /g																																																									
TAP 密度	2～4 g/cm ³		2～4 g/cm ³																																																									
Ag 含量	≥95wt%		≥98 wt%																																																									
品番	730785	730793	730807	730815	730777																																																							
粒径（nm）	10	20	40	60	100																																																							
密度（g/ml[25℃]）	0.997	0.986	0.990	0.9976	0.9978																																																							
粒子数	3.6×10 ¹²	4.5×10 ¹¹	5.7×10 ¹⁰	1.7×10 ¹⁰	3.6×10 ⁹																																																							
蛍光スペクトル	λ _{em} = 388nm FWHM59 nm	λ _{em} = 401nm FWHM6 6nm	λ _{em} = 412nm FWHM6 3nm	λ _{em} = 431nm FWHM8 1nm	λ _{em} = 504nm FWHM1 67nm																																																							

	(銀ナノワイヤ)	
	サイズ	φ30nm×20μm、φ50nm×40μm、φ75nm×45μm、φ100nm×10μm
	溶媒種類	エタノール、イソプロピルアルコール、エチレングリコール、水
	標準濃度	0.625wt% (エタノール)
	標準密度	5mg/ml (エタノール)
	外観	灰色懸濁液
出典：イーエムジャパン(株)HP		
性能／特性	・ 高い電気伝導率 ・ 安定性 ・ 低い焼結温度 ・ 抗菌性（抗菌コーティングなどに利用） ・ 光学特性（粒子サイズにより、紫外・可視吸収スペクトルが変わり、また、凝集によっても変化するという、ナノ銀特有の光学的特性を有する。） ・ 銀ナノ粒子が溶液中に存在する場合、ナノ粒子表面に粒子を安定化させ凝集を伏せず電気二重層が形成される。	
製造会社	【国内】 ・ DOWA エレクトロニクス（株）：ナノ銀乾粉、インク、ペースト ・ 三ツ星ベルト（株）：ナノ銀ペースト ・ 三菱マテリアル（株）：ナノ銀インク ・ 三菱製紙(株)：ナノ銀インク ・ （株）アルバック：ナノ銀インク ・ DIC（株）：ナノ銀インク ・ 日本イオン（株）：ナノ銀分散液 ・ イーエムジャパン（株） 【海外】 ・ Sigma-Aldrich ・ Nanopoly など	

(b) 市場規模

銀ナノ粒子は主に、プリンタブルエレクトロニクス向け（配線材料）に応用されているが、ナノサイズの銀粉の販売量は少ない（2012 年度 4 トン程度、平成 25 年度本調査事業報告書より）。

(c) 主な用途

銀ナノ粒子；

- ・ 診断薬：定量的検出のための生物学的タグとして、バイオセンサーや多くの分析法で利用
- ・ 抗菌：衣服や靴、塗料、創傷被覆材、電化製品、化粧品、プラスチックなどに、その抗菌作用が利用
- ・ 導電性：導電性インクへの利用、熱的特性や電気伝導度の向上のために複合材料の成分として利用
- ・ 光学性：効率的な集光のために、また、金属増強蛍光（MEF：metal-enhanced fluorescence）や表面増強ラマン散乱（SERS：surface-enhanced Raman scattering）などの光学分光法の性能向上に利用

銀ナノワイヤ；

- ・ 導電性コーティング：透明導電性膜、フレキシブルエレクトロニクス用途での導電性コーティング
- ・ プラズモンアンテナ：銀ナノワイヤに金属性ナノ粒子を付与することで、高いプラズモ

- ン効果をもつ、センサーやイメージング用のアンテナとして機能。
- ・ 分子センサー：銀ナノワイヤの単層は、ラマン分光法と組み合わせた特定分子の検出の可能なセンサー用アレイの作製に用いられる。
 - ・ ナノコンポジット：ナノコンポジット用材料として研究されており、これらシステムにおいて高い誘電率を示す。

(d) 研究開発事例

① 室温乾燥のみで導電性が得られる銀ナノ粒子インクの開発

開発者：バンドー化学

開発機構：バンドー化学

概要：従来の銀ナノ粒子インクは、導電性付与に 120℃程度の加熱が必要であったが、室温乾燥のみで導電性が得られる銀ナノ粒子インクを開発した。主力の伝動ベルト事業で培った材料の分散、複合化技術をもとにして、水やアルコールなどの溶媒に銀ナノ粒子を 40%配合して作成した。塗布後、数分で導電性が得られる。銀ナノ粒子を分散させる溶媒や保護材料を新たに開発し、加熱による焼成工程を不要にしたことで、紙など耐熱性がない基材への応用が可能で、導電性パターンが作成できる基材の種類や形状の自由度が広がる。また、基板材料や加工のコスト低減が期待できる。

② 銀ナノ粒子インクと接合剤を開発

開発者：バンドー化学

開発機構：バンドー化学

概要：低温焼成型金属ナノ粒子製品「FlowMetal」の応用技術として、室温焼成型銀ナノ粒子インク、低温焼成型銀ナノ粒子接合剤を開発した。これまでプリントドエレクトロニクス用金属ナノ粒子インクを中心に、開発してきた金属ナノ粒子創生技術を応用し、半導体素子に接合できる銀ナノ粒子接合材の技術開発を完了した。金すずはんだ、高温鉛はんだの融点より低い 250℃の加熱で、半導体素子を基板上に接合することが可能。また、銀に由来する高い熱伝導率や焼成後は融点上がり再溶融しない特長をもち、さらに LED 素子を接合した場合、3000 サイクルのヒートサイクル試験後も破壊強度の低下がないことを社内試験で実証している。同社では、今後、LED 市場、パワーデバイス市場、光半導体市場等に適用する製品開発を進めていく方針である。

(e) 利用事例

日本イオン（株）では、銀ナノ粒子の抗菌性を利用して、銀ナノ粒子を添加した抗菌プラスチック原料である、ナノピュア抗菌プラスチックを製造している。ナノピュア抗菌プラスチック内の銀の含有量は、2,000ppm であり、素材プラスチック 90~95%に対して、本製品を 5~10%混合し、加熱成形することで、抗菌プラスチック製品が製造可能であり、抗菌剤としての配合率は、最終製品で、0.02~0.05%程度となる。

また、東京大学初のベンチャー企業 AgIC は、東京大学で開発された銀ナノインクを使った電位回路プリント技術をもとに、電子回路印刷キット「AgIC Print」としてクラウドファンディングサイト **Kickstarter** で資金調達を開始した。この技術は、AgIC の技術アドバイザーである東京大学の川原圭博准教授の研究成果をベースに事業化したものであり、専用の紙に銀ナノインクでペンを使って回路を書いたり、インクジェットプリンタで回路を印刷したりして、導電性テープや導電性接着剤で電位部品をつけることにより、基板製作やはんだ付けなどの手間なしに、また電子回路の試作に使われるブレッドボードなどと比べても簡単に電子回路が作成できる。これにより、製品のプロトタイプの開発期間が飛躍的に短縮され、低コストで開発できる。紙工作や折り紙のように手軽に電子工作を楽しめ、電子回路の教育や学習ツールへの応用も期待できる。

(f) ナノリスク評価

主な企業のナノ銀の製造現場では、排気やマスク等の保護具など、作業者の保護対策（マスクや作業着）や排気、装置の設置といった厚生労働省の通知（平成21年3月31日付け基発第0331013号 厚生労働省労働基準局長通達「ナノマテリアルに対するばく露防止等のための予防的対応について」）に基づく対策をとっている。

販売先に対しては、SDSの中で、安全対策や保管、廃棄に関する注意書きをはじめ、取扱いにおける注意や応急措置など細かく説明している場合が多い。

有害性情報についても各種毒性に関する情報について SDS中に記載しているケースが多い。（平成25年度本調査事業報告書より）

j) 亜鉛（主に酸化亜鉛）

(a) 製品概要

<酸化亜鉛>

サイズ	10～100 nm（15～50nm のものが中心）																		
形状	球状																		
計測技術	SEM、TEM、HRTEM																		
物性	一般物性；<table><tr><td>結晶系</td><td>六方晶ウルツ型</td></tr><tr><td>外観</td><td>白色粉末</td></tr><tr><td>真密度</td><td>5.67 g/cm³</td></tr><tr><td>比表面積</td><td>15～90 m²/g</td></tr><tr><td>屈折率</td><td>2.01 np</td></tr><tr><td>融点</td><td>1,975℃（加圧下）</td></tr><tr><td>沸点、初留点等</td><td>1,275℃で安定。低温度で昇華することがある</td></tr><tr><td>溶解度</td><td>水・有機溶媒に不溶、酸類に可溶、希酢酸・鉍酸類・アンモニアに可溶</td></tr></table> 出典：日本無機薬品協会、テイカ（株）			結晶系	六方晶ウルツ型	外観	白色粉末	真密度	5.67 g/cm ³	比表面積	15～90 m ² /g	屈折率	2.01 np	融点	1,975℃（加圧下）	沸点、初留点等	1,275℃で安定。低温度で昇華することがある	溶解度	水・有機溶媒に不溶、酸類に可溶、希酢酸・鉍酸類・アンモニアに可溶
結晶系	六方晶ウルツ型																		
外観	白色粉末																		
真密度	5.67 g/cm ³																		
比表面積	15～90 m ² /g																		
屈折率	2.01 np																		
融点	1,975℃（加圧下）																		
沸点、初留点等	1,275℃で安定。低温度で昇華することがある																		
溶解度	水・有機溶媒に不溶、酸類に可溶、希酢酸・鉍酸類・アンモニアに可溶																		
性能／特性	・ 紫外線遮蔽効果 ・ 高い透明性 ・ 抗菌性 ・ 消臭性 ・ 吸着能 ・ 光触媒活性 ・ 触媒活性 ・ 微細で粒度分布がシャープ ・ 高分散性 ・ 安全性が高い ・ 耐熱性 ・ 耐紫外線性																		
製造会社	【国内】 ・ テイカ（株） ・ 住友大阪セメント（株） ・ 堺化学工業（株） ・ 石原産業（株） 【海外】 ・ BASF																		

(b) 市場規模

超微粒子酸化亜鉛の世界市場規模推移及び予測 (10～100 nm)

	2010 年	2012 年	2013 年 見込	2014 年 予測	2015 年 予測	2016 年 予測	2017 年 予測
販売量 (トン)	1,110	1,180	1,260	1,320	1,380	1,430	1,490
販売金額 (百万円)	3,870	4,060	4,310	4,510	4,710	4,860	5,050

※販売金額はメーカー出荷ベース

出典：(株) 富士キメラ総研「2013 年 微粉体市場の現状と将来展望」

上記のように、酸化亜鉛のナノ粒子の市場規模は、年々拡大傾向を示している(富士キメラ総研「2013 年微粉体市場の現状と将来展望」)。ただし、国内の製造量については、経済産業省ナノマテリアル情報提供シートによれば、ここ数年間の年度別の製造量は、100～1,000 トンである。

酸化亜鉛ナノ粒子の市場は、サンスクリーン剤を中心とした紫外線防止用化粧品向けが重要な 9 割弱を占めている。中国や韓国、タイ、ベトナムのようなアジア圏では、サンスクリーン剤を使用する習慣が浸透しつつあり、かつ化粧品市場も大幅に拡大していることから、当該需要も増加傾向で推移している。また、サンスクリーン剤だけでなく、粉系の化粧品などにも紫外線防止効果を付与する傾向が強まっていることも、需要拡大に寄与している。

また、酸化亜鉛は不安定で、空気中で炭酸化しやすいことから、輸出が難しく、輸出量は 1 割程度に留まっている。

(c) 主な用途

主な用途を用途分類別を示すと以下ようになる；

- ・ 塗料、コーティング剤
- ・ 医薬品、医薬部外品、化粧品、医療機器：外用品用医薬部外品の有効成分、製剤用基剤・添加剤、化粧品用の基剤・添加剤
- ・ 合成ゴム、ゴム用添加剤、ゴム用加工助剤：加硫促進剤、加硫促進剤助剤（加硫活性剤）
- ・ 印刷インキ、複写用薬剤（トナー等）：電荷制御剤、流動性付与剤、研磨性付与剤、滑り性付与剤
- ・ 化学プロセス調節剤：触媒、触媒担体

上記したように、当該市場は、サンスクリーン剤など、紫外線防止効果が付与された化粧品向けが大部分の需要を占めている。化粧品用途では、紫外線カット効果として使用されている。従来は、有機系吸収剤が用いられていたが、劣化が厳しいため、安定した無機系材料として注目されている。その他、耐光性の付与を目的として、塗料やインキ、トナー、不織布などに採用がみられるが、全体量の 1 割程度と推定されている。

(d) 研究開発事例

新たな研究開発事例は確認できなかった。

(e) 利用事例

ナノ酸化亜鉛は、光触媒作用、高い透明性、優れた紫外線保護力、により、塗装、ゴム、ファインセラミックス、繊維、環境浄化、日焼け止め、スキンケア、車体仕上げ、プリンター用インク、プラスチック、染料などの様々な分野で応用されている。そのほか、ガスセンサー、蛍光材料、レオスタット、紫外線遮蔽材、録画機器、圧電材、圧電抵抗器、高性能触媒、磁性材料、プラスチックフィルム、など様々な製品に利用されている。

国防産業では、赤外線吸収力、吸光度、熱用量により、赤外線検出器や赤外線センサーとして利用されている。また、光質、明色、吸収性、強力波、を利用して、レーダー波の吸

収や減衰を目的として、新型ステルス機の材料にも利用されている。

電子産業では、圧電抵抗器や避雷器の主材料のほか、磁性材料や工学用材料として利用されている。

ゴム産業では、主に耐摩耗性ゴム材料として利用されており、透明ゴム製品では加磁界面活性剤として利用されている。ラジアルタイヤなどのゴム製品では、ナノ酸化亜鉛を利用することで、熱伝導性、耐摩耗性、耐久性、伸長強度の向上が図られ、耐用期間の延長、生産コストの削減に貢献している。そのほか、密封性を利用した、シーランとやガスケット材料にも利用されている。

酸化亜鉛の主な用途の1つである、塗料では、数重量%の割合で使用されている。

また、酸化亜鉛の主な用途である、化粧品への配合量は、ファンデーションにおいて7%が報告されている（新化粧品学）。

(f) ナノリスク評価

製造事業者では、工場内の暴露については、可能な限り閉鎖系で作業をするほか、粉塵発生箇所には、局所排気設備を設置して集塵し、バグフィルタを用いて粉塵の回収を行っている。また、工場からの排出に関しては、酸化亜鉛は酸に容易に溶解するため、回収した粉末は、可能な限り再利用している。再利用できない分については、事業場で生産するほかの全ての材料の残渣と合わせて回収している。廃棄物については、「廃棄物の処理及び清掃に関する法律」に従い、産業廃棄物の「汚泥」として、事業所の管理型廃棄物処分場で埋立て処分を行っている。また、飛散防止対策として、搬送にはウインドシート付トラックを使用し、工場サイト外で比較的近隣に位置する処分場で、即日覆い、処理を行っている。そのほか、地下水対策も行っている。作業員の管理に関しては、防塵マスク、保護衣、保護手袋、保護眼鏡を装着して作業をするほか、労働安全衛生法に従って、気中粒子測定を定期的に行っている。

他の事業者でも同様に、厚生労働省の通達に適合した対応を行っている。

また、平成25年度調査では、以下のように製造事業者によるリスク評価について報告されている。

・製造工程からの環境排出

ナノスケール酸化亜鉛の製造設備は密閉構造である。設備からの粉体の取り出しや出荷のための袋詰めなど粉じんが発生しうる作業にあたっては、室内換気設備を併用して粉じんを除去する。（除去した粉じんは産業廃棄物「汚泥」として廃棄処分される。こうしたことから、大気環境へのナノスケール酸化亜鉛の排出はほとんどないと考えられる。また、排水処理施設を通しており、工場で使用した水を介する環境への排出もほとんどないと考えられる。

・川下での対応

ナノ酸化亜鉛の用途の多くは化粧品である。酸化チタンを含め、化粧品はナノマテリアルの重要な用途でありその使用量も多いため、今後もその全ライフサイクルにわたる安全対策が必要とされる可能性がある。日本化粧品工業連合会ではそのホームページ上で事業者向けにナノマテリアルに関する情報として、「化粧品のナノテクノロジー安全性情報」をかなり頻繁に更新し掲載しており、業界全体としてのナノマテリアルに関する情報伝達は積極的に行われている。

（平成25年度本調査事業報告書より）

k) ナノクレイ

(a) 製品概要

サイズ	高純度モンモリロナイト：厚さ約 1nm、広がり 100～1,000nm の板状アルミノケイ酸塩が 10 μ m 程度の多層積層構造をとっている。 主成分であるモンモリロナイトの基本粒径：1nm×100nm ※モンモリロナイトは、ベントナイトの主成分																						
形状	板状																						
計測技術	SEM																						
物性	ポリマー・クレイ系複合材料； <table border="1"> <thead> <tr> <th></th><th>引張り強度</th><th>引張り弾性率</th><th>曲げ強度</th><th>曲げ弾性率</th><th>荷重たわみ温度 (264Psi)°C</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Nylon 6(neat)</td><td>75</td><td>3,140</td><td>114</td><td>3,112</td><td>59</td></tr> <tr> <td>5% I.34TCN in Nylon 6</td><td>80</td><td>4,200</td><td>142</td><td>4,223</td><td>102</td></tr> </tbody> </table> 出典：シグマ・アルドリッチ（同）						引張り強度	引張り弾性率	曲げ強度	曲げ弾性率	荷重たわみ温度 (264Psi)°C	Nylon 6(neat)	75	3,140	114	3,112	59	5% I.34TCN in Nylon 6	80	4,200	142	4,223	102
	引張り強度	引張り弾性率	曲げ強度	曲げ弾性率	荷重たわみ温度 (264Psi)°C																		
Nylon 6(neat)	75	3,140	114	3,112	59																		
5% I.34TCN in Nylon 6	80	4,200	142	4,223	102																		
性能／特性	・ 高増粘性 ・ ガスバリア性 ・ 耐熱性 ・ 吸着性 ・ 寸法安定性																						
製造会社	【国内】 ・ （株）ボルクレイ・ジャパン ・ （株）ホージュン ・ クニムネ工業（株） 【海外】 ・ Amcol International Corp.（米国） ・ Clariant International（スイス）																						

(b) 市場規模

ベントナイトの国内生産量は、2012 年時点で 42 万トン、世界全体では 1,480 万トンと推定されている（GLOBAL NOTE 2014/11/27 時点、United States Geological Survey データ参照）。日本の生産量は、世界全体で第 6 位である。

(c) 主な用途

主な用途を特性別に示すと以下のようになる；

- ・ 増粘性：機能性塗料、化粧品、医薬品、無機バインダー、接着剤、グリース、農薬フロアブル
- ・ ガスバリア性：機能性塗料、機能性樹脂、化粧品、医薬品
- ・ 耐熱性：耐熱剤、塗型剤、無機バインダー、特殊塗料、コート剤
- ・ 吸着性：吸着剤、触媒、化粧品、トイレタリー

(d) 研究開発事例

① 粘土膜のハイバリアフィルムへの応用

開発者：(独)産業技術総合研究所 コンパクト化学システム研究センター 蛭名武雄 首席研究員

開発機構：(独)産業技術総合研究所

概要：粘土を主原料にした耐熱性およびガスバリア性が飛躍的に向上したフィルムの開発を行った。着色成分を含まない合成粘土を用いることで、全線透過率 90%を超える透明タイプの開発にも成功した。

(e) 利用事例

① 増粘性を活かした、化粧品や農薬フロアブル剤

増粘性を活かして、化粧品や農薬のフロアブル剤として使用されている。含有量は、製品に対して、1%以下であり、少量である。ナノクレイを添加することで、増粘性を高めるほか、分散性も高めることが可能である。ただし、添加しすぎると、色が悪くなったり、粘性が高すぎてしまったりする等がある。

② ガスバリア性を活かした、機能性塗料や樹脂

高アスペクト比により、ガスバリア性が高まることから、製品表面に塗料として塗布することで、ガスバリア性を高めることが可能となる。こうした性質を活かして、照明器具カバーに塗布する等として利用されている。

その他、樹脂にナノクレイを混合し、ガスバリア性を発揮した製品の製品化が既に行われている。

③ 耐熱性を活かした、耐火物フィラー

耐熱性を活かして、耐火物フィラーとして使用されている。

(f) ナノリスク評価

・急性毒性試験

天然のモンモリロナイト（アルミニウムの含水珪酸塩を主成分とする粘土鉱物）に由来するナノ珪酸塩プレートレット（幾何平均体積 $80 \times 80 \times 1 \text{ nm}$ ）を雌雄SDラットに1,500、3,000及び5,700mg/kgを経口投与した場合、生存率、臨床状態、剖検所見、体重、摂餌量に影響は認められなかった。また、LD50値は5,700mg/kg以上であると報告されている。

〔出典〕Li et al.(2010)（平成23年10月11日に開催された厚生労働省の「平成23年度第1回化学物質のリスク評価検討会」資料7より）

・許容濃度（日本産業衛生学会）

日本産業衛生学会の許容濃度の勧告において、ナノサイズに限定されないベントナイトの粉じんは第1種粉じんに分類され、吸入性粉じんの許容濃度は 0.5 mg/m^3 とされている。クレイは古くから販売されており、第一種粉じんとしての対策は行われている。しかし、ナノマテリアルとしての認識はそれほどされていないと思われる。一方、ナノマテリアルとしてのナノクレイの毒性に関する研究自体が少なく、また得られているデータも現時点ではそれほど高い危険性を示したものはない。

（平成25年度本調査事業報告書より）

1) ナノセルロース

(a) 製品概要

サイズ	セルロースナノファイバー：幅 4～100nm、長さ 5μm 以上 セルロースナノクリスタル：幅 10～50nm、長さ 100～500nm										
形状	繊維状										
計測技術	SEM										
物性	セルロースナノファイバー（補強用繊維）； <table><tr><td>密度</td><td>1.5 g/cm³</td></tr><tr><td>弾性率</td><td>140 GPa</td></tr><tr><td>強度</td><td>3 GPa（推定値）</td></tr><tr><td>熱膨張</td><td>0.1 ppm/K</td></tr></table>			密度	1.5 g/cm ³	弾性率	140 GPa	強度	3 GPa（推定値）	熱膨張	0.1 ppm/K
密度	1.5 g/cm ³										
弾性率	140 GPa										
強度	3 GPa（推定値）										
熱膨張	0.1 ppm/K										
	出典：京都大学 生存圏研究所 生物機能材料分野										
性能／特性	・ 軽くて強い（鋼鉄の 1/5 の軽さで 5 倍以上の強さ） ・ 大きな比表面積（250m²/g 以上） ・ 熱による変形が小さい（ガラスの 1/50 程度） ・ 植物由来 ・ ガスバリア性が高い ・ 水中で特徴的な粘性を示す										
製造会社	【国内】 ・ 王子ホールディングス(株) ・ 三菱化学（株） ・ 日本製紙(株) ・ (株)スギノマシン ・ 旭化成せんい（株） ・ ダイセルファインケム(株)										

(b) 市場規模

セルロースナノファイバー（CNF）は現時点では研究開発段階であり、サンプル供給が中心であり、年間数トン規模の需要と推定されている。研究開発が進められているシングル CNF については、本格的な量産開始は数年先となる見込みである。また、2013 年には国内で各社が実証試験設備などを建設または稼働させ、サンプル販売に乗り出したことから、今後順調に用途開拓および技術確立が進めば、2020 年には年間数百トン～1,000 トンレベルまで市場拡大する潜在需要があると予測されている。

ただし、課題も多く、初期段階では食品添加用や増粘剤用途での採用がスタートしているが、これだけでは市場の広がりが期待できないため、市場規模の大きいフィルム用途の需要創出が鍵となると考えられている。現時点で想定されている用途は、フレキシブル製品向けの透明基板、食品や化粧品・医療などに応用可能なバリアフィルム包材、細胞培養基材、医療用フィルム・シート、電池用のセパレーターなどである。高付加価値ニーズが高く、比較的高コストでも採用可能性はある。これらの用途での採用増加により量産性を高め、コストダウンを図る必要がある。中長期的な方向性としては、フィラー用途への展開が期待されるものの、すでにある炭素繊維やアラミド繊維、CNT などの代替にはやはりコストがネックとなる。また、現段階では添加後の均一分散性、樹脂との密着性・相溶性など、技術的課題も残るため、さらなる研究開発が進められている。なお、構造材などの各種用途では、従来の鉄鋼材料やコンクリート材料から、成形性や軽量性に優れる樹脂材料に置き換える動きがあり、その際課題となる機械的強度を補完するために補強用繊維が使用される。潜在的な需要は大きく、今後の高成長が期待できる。CNF はコストを含め、まだ市場の方向性は不透明であるが、植物由来で持続可能な次世代ナノマテリアルとして大きなポテンシャルを秘めた材料と考えられている（富士キメラ総研「2014 年高機能添加剤・ハイブリッドマテリアルの将来展望」）。

(c) 主な用途

CNF の応用用途は広く、様々な用途が提案されている。現在検討が進められている主要な用途を分野別に以下に示す；

- ・ エレクトロニクス：フレキシブル透明基板、電池用セパレーター、他
- ・ 自動車：構造材、自動車部品
- ・ 包装：ガスバリアフィルム(食品、化粧品、医薬品など)
- ・ 建材：高機能内装材、他
- ・ 医療・医薬：生体適合材料、止血剤、医療用フィルム、他
- ・ その他：増粘剤、化粧品原料、食品添加物、各種補強剤、他

(d) 研究開発事例

CNF については現在研究開発段階にある。CNF の研究開発を進めている企業を中心に、研究開発の動向とともに整理する。

① ミクロフィブリル化セルロース「セリッシュ」

開発機構：ダイセルファリンケム

概要：ミクロフィブリル化セルロース「セリッシュ」の販売を行っている。フォフトクリームなどの食感改善用添加剤といった食品用、工業用などを中心に展開しているとみられる。実績としては、年間数トンレベルと推定される。

② CNF を用いた不織布（多孔質シート材料）の開発

開発機構：旭化成せんい

概要：旭化成せんいは CNF を用いた不織布（多孔質シート材料）を開発している。まだ研究開発段階にあり、数年内の実用化を目指しているとみられている。用途としては、各種フィルター、医療用機材、セパレーターなどを想定して展開を進めていると考えられる。

③ CNF 増粘剤の開発

開発機構：第一工業製薬

概要：第一工業製薬は 2013 年 12 月にセルロースシングルナノファイバーを利用した増粘剤「レオクリスタ」を開発、販売を開始した。従来の界面活性剤と同等の性能を確保しており、同製品の利用によって増粘効果とともに高い無機物分散性、チクソ性を付与できる。ゲル状にも係らずスプレー噴霧できる製品の開発が可能とみられ、リキッドファンデーションや乳液などの化粧品用途のほか、塗料・インキなどへの応用も進める。

④ 透明紙の作製

開発者：京都大学 生存圏研究所 矢野教授、日本製紙

開発機構：京都大学、日本製紙

概要：京都大学と日本製紙は共同で、2014 年 3 月に、紙を透明にする技術化に成功した。化学処理により、製紙用パルプを構成するセルロースナノファイバー間の結束構造をほぐし、パルプ内部に樹脂を浸透することで、透明なパルプ繊維複合樹脂材料を製造する。紙への導電性物質の塗布で透明紙の作製も実現し、プリンテッド・エレクトロニクス、OLED などを用いる透明基板での活用が期待される。また、化学修飾により、吸湿性や樹脂との相溶性の改善につながることが考えられるとしている。

⑤ ACC-ナノセルロースの開発

開発機構：中越パルプ工業

概要：水中対向衝突法（ACC 法：Aqueous Counter Collision）によるナノセルロースの製造を行った。本法により得られる材料は、ナノスケールでサイズ調整が可能であるほか、原料の種類（植物、微生物、海藻、等）の由来に依存した特徴の違いを顕著に示す。また、本法により得られるナノセルロースファイバーの表面は、他の方法では見られない両親媒性の特徴を有する。セルロース分子自体は、疎水性と親水性の部位を持つ両親媒性分子であるが、その集合体であるセルロース繊維は、親水性部位が表面露出しているために、良好な水への親和性を示すのが一般的であるが、本法は特有のナノ微細化メカニズムにより、セルロース分子の構造に由来する疎水性部位をファイバー表面に露出させることで、両親媒性の表面特性をもつナノセルロースの製造を可能にした。

(e) 利用事例

王子ホールディングスと三菱化学は共同で研究開発を行っている。また、両者は NEDO プロジェクトに参加し、京都大学と共同研究開発を行っている。2社は CNF を利用した透明連続シートを開発し、2013 年 3 月よりサンプル供給を開始している。透明性、温度変化による寸法安定性、強度などに優れ、OLED などのフレキシブル透明基板向けへの展開が期待される。

スギノマシンは同社独自の加工技術「超高速ウォータージェット技術」により、CNF の製造を行っている。キッチン・キットサンも合わせて製造し、バイオマスナノファイバー「BiNF-i-s（ビンフィス）」シリーズとして販売している。なお、スギノマシンが販売している CNF はシングル品ではなく、径が約 20nm、長さが 2 μm のもので、触媒などを使用せずに、水と CNF のみで構成された素材を生産できるため、食品や医療向けへの展開がしやすいことが強みである。

旭化成せんいでは、球状のセルロースナノビーズを開発し、着色したセルロースナノビーズが、イヌノクロマト診断キットの高感度化に寄与できるとして、インフルエンザ診断キットの着色粒子として利用されている。同社の開発したセルロースナノビーズは、高い分散安定性と優れた耐薬品性をもち、沈降回収が可能であるという特徴を有する。高い分散安定性では、界面活性剤を添加しなくても長期間の安定分散が可能であり、耐薬品性では、水だけでなく有機溶媒中でも安定分散が可能であるという特徴を示す。また、沈降回収に関しては、遠心分離により、容易に回収が可能であるという特徴がある。着色したセルロースナノビーズをイヌノクロマト診断キットに採用することで、少ない検査対象物質でも検出可能で、病気の早期発見・診断が可能となる。

日本製紙では、セルロースナノファイバーを含有する製紙用コーティング材を開発している。このコーティング材の固形分中のセルロースナノファイバーの含有量は、0.02~0.05 重量%である。

(f) ナノリスク評価

・PFI (Paper and Fiber Research Institute) (ノルウェー)

様々な食品、医薬品にセルロースが使用されており、セルロースそれ自身には毒性は無いと考えている。ナノセルロースが毒性を示すとすれば、ナノの形態、残存薬品、添加剤の影響が考えられる。

前処理法や乾燥方法、表面修飾法が異なる様々なタイプの CNF 材料の細胞毒性を ISO 10993-5 (Biological Evaluation of Medical Devices - Part 5: Tests for In Vitro Cytotoxicity) で評価した結果、界面活性剤の一種である CTAB (Cetyl trimethyl ammonium bromide) を吸着させた CNF 以外の CNF には細胞毒性は認められなかった (イタリアのモテナ大学と共同で実施)。

- ・ UPM-Kymmene Oyj（フィンランド）

Occupational Safety（労働者の安全）については、UPM とStora Enso の両社がフィンランド労働健康研究所（Finnish Institute of Occupational Health）にサンプルを提出し、評価を受けている。製造物の安全関連については、EU 委員会や、ユーザーと協力している。UPM が製造した各種CNF（Biofibrils）に関しては、UPM 独自に試験を行い、細胞毒性、炎症性、遺伝毒性などが無いことを確認。環境、安全、健康問題や標準化の課題については他国のパートナーと協力出来る分野である。

- ・ メイン州立大学（米国）

自らのサンプルについては外部機関に評価を依頼し、無毒との結果を得ている。FPL（ForestProducts Laboratory）が安全性評価に関する費用を出しており、米国ではFPL が主導していると推測される。

- ・ FPIInnovations

硫酸基を持ったCNF についてはカナダの安全性評価をクリアし、食品、医薬品に利用できるまでの許可を得ている。現在、同様の申請を米国、EU にて実施中である。国内で開発を行っている企業においても、ナノセルロース自体が健康被害を起こす可能性は低いと様々な食品、医薬品にセルロースが使用されており、セルロースそれ自身には毒性は無いと考えている。ナノセルロースが毒性を示すとすれば、ナノの形態、残存薬品、添加剤の影響が考えられる。

前処理法や乾燥方法、表面修飾法が異なる様々なタイプのCNF 材料の細胞毒性をISO 10993-5（Biological Evaluation of Medical Devices - Part 5: Tests for In Vitro Cytotoxicity）で評価した結果、界面活性剤の一種であるCTAB（Cetyl trimethyl ammonium bromide）を吸着させたCNF 以外のCNF には細胞毒性は認められなかった（イタリアのモテナ大学と共同で実施）。

（平成25年度本調査事業報告書より）

2. ナノマテリアル等の安全性等に関する情報、試験法等に関する文献調査

2.1. 検索方法

① 使用する DB: PubMed

② 検索キーワード

以下のキーワード及びその組み合わせを使用する。

内容	検索番号	検索式
ナノマテリアル	S1	S nanomaterial OR nanoparticle OR nanosized OR ultrafine OR nanostructure OR subnanosize OR nano?(W)(particle OR material OR size? OR structure)
安全性	S2	S carcinogenicity or toxicity or cytotoxicity or toxicology or biochemical(W)activity or biological(W)activity or biological(W)interaction or biocompatibility
フラーレン	S3	S fullerene? ? or C60 or C70
カーボンナノチューブ	S4	S carbon(W)nanotube? ? or single(W)wall? ? or carbon(W)nanotube? ? or SWNT or SWCNT or multiwall(W)carbon(W)nanotube? ? or MWNT or MWCNT or carbon(W)nanohorn? ?
チタン	S5	S titanium(W)dioxide? ? or titanium(W)oxide? ? or TiO2
酸化亜鉛	S6	S zinc(W)oxide? ? or ZNO
シリカ	S7	S silica or silicon(W)oxide? ? or silicon(W)dioxide? ? or SiO2 or amorphous(W)silica
銀	S8	S silver or nanosilver or AG
グラフェン	S9	S graphene? ? or graphite? ?
プラチナ	S10	S platinum or PT or colloidal(W)platinum
金	S11	S gold or aurum or AU or colloidal(W)gold
亜鉛	S12	S zinc or Zn
クレイ	S13	S clay OR nanoclay
セルロース	S14	S cellulose OR nanocellulose
	S15	S (S3+S4) AND S2
	S16	S ((S5+S6+S7+S8+S9+S10+S11+S12+S13+S14) AND S1 OR (nanosilver OR nanoclay OR nanocellulose OR nano?(W)silver OR nano?(W)clay OR nano?(W)cellulose)) AND S2
	S17	S (S15+S16) AND PY=2013
	S18	S S17 AND DT=JOURNAL ARTICLE
	S19	S S18 NOT DT=REVIEW?

③検索期間

2014/1/01～2014/12/31(文献発行年月日)

④検索式

- S1 Search (((nanomaterial OR nanoparticle OR nanosized OR ultrafine OR nanostructure OR subnanosize OR nano* (particle OR material OR size* OR structure))) AND ("2014/01/01"[Date - Completion] : "2014/09/30"[Date - Completion])
- S2 Search ((carcinogenicity or toxicity or cytotoxicity or toxicology or biochemical activity or biological activity or biological interaction or biocompatibility)) AND ("2014/01/01"[Date - Completion] : "2014/09/30"[Date - Completion])
- S3 Search ((fullerene* or C60 or C70)) AND ("2014/01/01"[Date - Completion] : "2014/09/30"[Date - Completion])
- S4 Search (((((carbon nanotube* OR single wall carbon nanotube* OR swnt OR swnts OR swcnt OR swcnts OR multi wall carbon nanotube* OR mwnt OR mwnts OR mwcnt OR mwcnts OR carbon nanohorn* OR carbon nanofiber OR carbon nanofiber))) AND ("2014/01/01"[CDAT] : "2014/09/30"[CDAT])))
- S5 Search ((titanium dioxide* or titanium oxide* or TiO2)) AND ("2014/01/01"[Date - Completion] : "2014/09/30"[Date - Completion])
- S6 Search ((zinc oxide* or ZNO)) AND ("2014/01/01"[Date - Completion] : "2014/09/30"[Date - Completion])
- S7 Search ((silica or silicon oxide* or silicon dioxide* or SiO2 or amorphous silica)) AND ("2014/01/01"[Date - Completion] : "2014/09/30"[Date - Completion])
- S8 Search ((silver or nanosilver or AG)) AND ("2014/01/01"[Date - Completion] : "2014/09/30"[Date - Completion])
- S11 Search (Search (Search ((graphene* or graphite*)) AND ("2014/01/01"[Date - Completion] : "2014/09/30"[Date - Completion])))
- S12 Search ((platinum or PT or colloidal platinum)) AND ("2014/01/01"[Date - Completion] : "2014/09/30"[Date - Completion])
- S13 Search ((gold or aurum or AU or colloidal gold)) AND ("2014/01/01"[Date - Completion] : "2014/09/30"[Date - Completion])
- S14 Search ((zinc or Zn)) AND ("2014/01/01"[Date - Completion] : "2014/09/30"[Date - Completion])
- S15 Search ((clay OR nanoclay)) AND ("2014/01/01"[Date - Completion] : "2014/09/30"[Date - Completion])
- S16 Search ((cellulose OR nanocellulose)) AND ("2014/01/01"[Date - Modification] : "2014/09/30"[Date - Modification])
- S17 Search ((S3 or S4) AND S2)
- S18 Search (((S5 or S6 or S7 or S8 or S11 or S12 or S13 or S14 or S15 or S16) AND S1 OR (nanosilver OR nanoclay OR nanocellulose OR nano* silver OR nano* clay OR nano* cellulose)) AND S2)
- S19 Search (S17 or S18)
- S20 Search (S19) AND "journal article"[Publication Type]
- S21 Search (S20) AND "review"[Publication Type]

2.2. 論文選択手順・方法

先ず、上記の方法で検索し、タイトル、書誌事項、要旨を出力した。(1500件)タイトルと要旨から内容を判断して、論文を複写する。(200件)

1500件から200件への絞込みは、ドラッグデリバリーシステムや医療診断のためにナノマテリアルを利用する文献、センサーへの応用などに関する文献を除外することにより行った。有害性に関する文献は、カーボンナノチューブに関するものが圧倒的に多く、次いで銀が多い。200件からの絞込みは、これらの物質については類似性がある調査からの選択と、*in vivo* 実験を優先させた。*In vitro* 実験でもメカニズムに触れた文献を取り上げた。二酸化チタン、シリカ、酸化亜鉛についても同様であり、金、白金、ナノクレイ、フラー

レン、グラフェン、ナノセルロースなどは有害性に関して発表されている文献数が少ないので、検索により抽出された文献は優先的に取り上げた。結局、69 件の文献を読み込んでサマリーを作成した。

2.3. 文献分類表

サマリーを作成した文献の分野をまとめて、表 2.3-1 に示す。3 種類までのナノ粒子を使用している論文はそれぞれのナノ粒子に数えた。

表 2.3-1 サマリーを作成した文献分類表

ナノマテリアル	in vivo					生態	in vitro	実験方法	小計
	吸入	気管吸引	静注	腹腔	経口				
C60				1			2		3
SWCNT	1	2					3		6
MWCNT	5	8	1			1	9		24
その他 CNT*	1	1					1		3
グラフェン							2		2
カーボンナノファイバー	1	1							2
ナノセルロース							1		1
ナノクレイ							1		1
TiO ₂	1		1		2		4		8
ZnO						1	3		4
SiO ₂		2		1	1		7		11
CeO ₂		1					1		2
Ag			1		2	1	5		9
Au		1	1			1	1		4
Pt							1		1
Nanoparticles **								8	8
合計	9	16	4	2	5	4	41	8	89

*カーボンナノホーン、カップ型積層カーボンナノチューブ

**新しい実験方法を試験するために 4 種類以上のナノ粒子を用いた文献

(1) 文献サマリー

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
MW CNT -1	Silva RM, Doudrick K, Franzi LM, TeeSy C, Anderson DS, Wu Z, Mittra S, Vu V, Dutrow G, Evans JE, Westerhoff P, Van Winkle LS, Raabe OG, Pinkerton KE ACS Nano. 2014 Sep 23; 8(9):8911-31	Instillation versus Inhalation of Multiwalled Carbon Nanotubes: Exposure-Relat ed Health Effects, Clearance, and the Role of Particle Characteristics (多層カーボン ナノチューブの 気管内点滴注入 対吸入:暴露関連 の健康影響、クリ アランスと粒子 特性の役割)	対象物質: MWCNTs (以下、O-、P-、F- はそれぞれ、 Original(受け入れ た試料), Purified (精製試料)、 Functionalized(官 能基付加)の意) 1)O-MWCNT ・形状:粉 ・Cheap Tubes, Inc., Brattleboro, VT, USAより受け入 れ ・外径:20-30nm、 ・内径:5-10nm、 ・長さ:10-30µm 2)P-MWCNT ・O-から残留金属と 無定形炭素を除去 3)F-MWNTs ・P-を硝酸と硫酸で 処理して官能基付 加 物理化学的特性 ・残留触媒量、ζ電位 (水中)、比表面積: ・O-: Ni4.49%、Fe 0.76%、ζ電位- 14.5 mV、 182m2/g ・P-: Ni 1.8%、	試験動物 ・試験生物:雄SD系ラット ・週齢:9-10週 気管内点滴注入と吸入暴露のため の粒子懸濁液の調製。 ・懸濁液1mlの構成:0.399mL無 菌食塩水、0.600mLラット血 清アルブミン、0.001 mL 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-p hosphocholine (DSPC) 液 ・懸濁液濃度: 10,50,200µg/250µL ・懸濁液は調製後超音波で処理 ・コントロール:粒子無し溶媒 ・暴露方法:吸入暴露 ・暴露時間:6h暴露濃度: 30mg/m3 気管内点滴注入 ・投与方法:気管内点滴注入 ・投与量:0、10、50、200µg MWCNTs in 250µL懸濁液 ・この用量は、人の1週、5週、5 ヵ月の職業被曝に近いものと して設定。 吸入暴露とエアロゾル特性 ・暴露方法:鼻部吸入暴露 ・暴露時間:6hの単回暴露 ・コントロール:濾過空気 ・設定エアロゾル濃度380µg/分 ・各ラットの60分間吸入量:~ 340µg (約1.1mg/kgbw) プログラム化熱分析:血液、気 管支肺胞洗浄液 (BALF)、肺組	・MWCNT点滴注入は、1日目に BALF好中球増加とMWCNT陽 性マクロファージを産生した。 ・点滴されたO-とP-MWCNTsは肺 組織に有意な炎症を産生した。 しかし、MWCNTが肺中に保持 されていたにもかかわらず、21 日目で回復した。 ・MWCNT吸入は、1日でBALF好 中球の増加も有意な組織病理も 産生しなかった。 ・しかし、霧状にされたMWCNTs の吸入後1日と21日で、BALF におけるMWCNT陽性マクロフ ァージ数は有意に増加した。 ・MWCNTsは肺中に持続的に留ま っているにもかかわらず、せい ぜい一過性の炎症を産生するに とどまることが示された。; ・気管内点滴注入された O-MWCNTsは、P-または F-MWCNTsより多くの炎症を 引き起こした。 ・MWCNT懸濁液は、物理化学的 な粒子特性と肺応答に依存する 著しく異なる影響を産生した。 ・肺中にはO-,P-,F-MWCNTsとも 投与法に依らず暴露後、1,21日 でほぼ同じ量のMWCNTsが残 留していた。ただし、気管内注 入ではF-MWCNTsのほうが O-,P-MWCNTsよりも多く残留 していた。またF-MWCNTsで	■MWCNTsは、以下 を誘発する: (1)暴露後1日の急 性の用量依存的炎 症 (2)粒子の取込みと 排出メカニズムに 影響を及ぼす物理化 学的特性と相関す る各種の炎症反 応。 (3)吸入暴露と気管 内点滴注入の場合 における、炎症と 粒子の取込みの逆 転したパターン。 (吸入の方が取込 み量が多いにもか かわらず炎症は少 ない) ■人がMWCNTsに 暴露されると、健 康影響が懸念され る。 ■MWCNTsは長期 間肺に残留して、 短い、職業的関連 の被曝の後でさえ 毒性応答を生じる 可能性がある。 ■MWCNTによる毒 性の機序を解明す るためにはさらな

			Fe0.08%、ζ電位 -8.3 mV、168 m²/g • F⁻ ; Ni,Feとも非検出、ζ電位 -50.5 mV、224 m²/g	織を暴露後1日と21日に採取し、含まれる MWCNTsをプログラム化熱分析によって定量化。	は、吸入(吸入量$\sim 340\mu\text{g}/\text{時間}\times 6$時間)による残留量は気管内注入 $200\mu\text{g}$ よりも $50\mu\text{g}$ に近かった。	る研究が、必要である。
--	--	--	--	--	--	--------------------

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
MWCNT-2	Kasai T, Umeda Y, Ohnishi M, Kondo H, Takeuchi T, Aiso S, Nishizawa T, Matsumoto M, Fukushima S Nanotoxicology. 2014 Jul 17;1-10	Thirteen-week study of toxicity of fiber-like multi-walled carbon nanotubes with whole-body inhalation exposure in rats (ラットへの繊維様多層カーボンナノチューブの13週間の全身吸入暴露による毒性研究)	■対象物質：繊維様直線MWCNTs ・保土谷化学から購入 ・精製、篩い分けなしで使用 ・炭素純度：>99.6% ・直径：40-90nm ・アスペクト比：>100 ・表面積：24-28m²/g ・製法：CVD ■実測特性値 ・幅：90.7nm ・長さ：5.7μm ■生成エアロゾル特性 ・著者らの開発したサイクロン-篩方式で生成 (以下はエアロゾルの13週間の平均値、0.2、1、5 mg/m³の目標濃度に対して) ・平均暴露濃度 mg/m³：0.20、1.01、5.02 ・平均個数濃度 cpm：115200、576500、2933900(OPCによる) ・空力質量直径：	■試験生物： ・F344/DuCrIjラット ・週齢：4週 ■投与方法 ・暴露方法：全身吸入暴露 ・暴露濃度：0.2、1、5mg/m³ ・暴露時間：6h/d×5d/w×13w ・対照群：大気への暴露 ■臨床観察、尿検査と血液学的および血液生化学的分析： ・臨床徴候と死亡率：毎日観察 ・体重と摂食量：毎週計量 ・尿パラメータ：曝露期間の最終週 ■気管支肺胞洗浄液の細胞学的および生化学的分析： ・血液：全細胞、生化学分析 ・BALF：右肺だけから採取 ・測定項目：好中球、リンパ球、肺胞マクロファージ数、マクロファージの形態学的特徴 ・生化学的分析：総蛋白(TP)、アルブミン、LDH、アルカリホスファターゼ(ALP) ■臓器重量と病理検査： ・胸腺、副腎、精巣、卵巣、心臓、左肺、腎臓、脾臓、肝臓、脳：重量測定と肉	■死亡率と臨床徴候、血液学、血液生化学 ・13週間の暴露期間中、暴露群、対照群とも、死亡や異常な臨床徴候は観察されなかった ・成長速度は雄、雌、対照群の間に差はなかった ・体重増(対対照群、それぞれ、0.2、1、5mg/m³暴露に対して) - 雄：96%、101%、94%、雌：102%、100%、102% ・白血球中の好中球比率。(0, 0.2, 1, 5 mg/m³) - 雄：変化なし、雌：21%、24%、25%、28% ■BALFの細胞学的および生化学分析 ・好中球とリンパ球の数の暴露濃度関連の増加は、すべての暴露群で観察された。 ・肺胞マクロファージは広範囲にわたる大きさを有して、膨脹した泡状細胞質を有していた。 ・すべての暴露群でMWCNT線維を貪食していた。 ・1mg/m³以上の暴露群では、そのような形態学的な特徴を有する肺胞マクロファージの率は、用量依存的に増加した。 ・LDHとALP活性の増加、TPとアルブミン濃度の暴露濃度関連の増加が、すべての暴露群で観察された(0.2mg/m³の雌のALP活性を除く)。 ■病理組織学的観察 ・死体解剖の肉眼観察によって、多数の白い領域が、5mg/m³処理のラットで見いだされた。 ・肺重量は、雄雌ともコントロールの1.2と1.3倍増加した(1、5mg/m³暴露群)。 ・上下の気道と縦隔リンパ節は、雄雌とも組織病理学的影响を受けた。 ・肉芽腫性変化と限局性線維形成が肺で観察された。これらの発生率と強さは暴露濃度依存的に増加した。 ・肉芽腫性変化は、すべての肺葉で見いだされた。 ・MWCNTsは、すべての暴露群の肺にも堆積した。 ・それらは、主に肺胞マクロファージの中で検出された。	・ラットを繊維様MWCNTに暴露すると、BALFの肉芽腫性変化や限局性線維形成などの変性亜慢性毒性影響を濃度依存的に誘起する。 ・少数のMWCNTsは、胸膜下領域と横隔膜で観察された。 ・MWCNTsの肺負荷は、毒性の発生率と強さが暴露濃度、期間と保持(retention)に依存することを示した。 ・本研究によって、ヒトに対するMWCNTsのリスク評価として役に立つ繊維様MWCNTsの亜慢性毒性に関する多種多様なデータを得た。 ・より多くの調査

			1.4-1.6μm 形状：ほとんど全て繊維様)	眼的病変観察 - 鼻腔、鼻部、喉頭、気管、肺、他：組織病理学検査 - 肺：コラーゲン線維の有無 ■MWCNT肺負荷 - 左肺組織：肺MWCNT量	■MWCNT肺負荷 左肺のMWCNTS量：雄 3.23、21.2、120.3μg/左肺、雌 2.30、13.7、80.3μg/左肺	が、MWCNTsの慢性毒性と発癌性を評価するために必要である。
--	--	--	---	---	--	--

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
WC NT- 3	Czarny B, Georgin D, Berthon F, Plastow G, Pinault M, Patriarche G, Thuleau A, L'Hermite MM, Taran F, Dive V ACS Nano. 2014 Jun 24 ;8(6):5715-24	Carbon nanotube translocatio n to distant organs after pulmonary exposure: insights from in situ ¹⁴ C -radiolabelin g and tissue radioimagin g (肺暴露後 における遠 隔器官への カーボンナ ノチューブ の転位: in situ での ¹⁴ C -放射化ラベ リングと組 織の放射能 イメージン グからの洞 察)	■ ¹⁴ C のラベル付き MWCNT合成 ・ ¹⁴ C-LabeledMWCNT (以下、CNT) ・化学蒸着法で合成 ・炭素源: ¹⁴ C ベンゼ ン ■CNTの化学的特性 CNT表面のXPS分析 ・C: 98.36at.% ・O: 1.64at.% 不純物 ・Fe: 7.4wt% ■CNTの物理的特性 ・比表面積: 42±2m ² /g ・バルクCNTの平均外 径: 40nm (TEM) ・溶媒中CNT -長さ: 3.9µm(500nm ~12 µm) -直径: 40nm (10~ 150nm) ■試料懸濁液液分散 媒: 5.5mM D-ブドウ糖、 0.6mg/m マウス血清アルブミ ン 0.01mg/mL1,2-dip amitoylsn-glycero- 3-phosphocholine 補充、Ca、Mgフリ ーPBS (pH7.4) ・懸濁液調整後、高エ	■試験生物: ・雌のBalb/cマウス ・週齢: 6週 ■暴露方法-1: ・単回咽頭吸引 ・暴露濃度: 20µgCNT/50µL分散媒 (285×10 ³ Bq) ・試験期間: 暴露後1、7 日、1、3、6、9、12ヵ 月 ・採取組織: 肺、肝臓、 脾臓、腎臓、脳、心臓、 胸腺、骨髄 ・血液は、全採血で採取; ■暴露方法-2: ・胃管による強制投与(単 回食道内注入) ・暴露濃度: 50µgCNT/100µL分散 媒) (714×10 ³ Bq) ・糞便と尿: 毎日採取。 ・試験期間: 暴露後1、7、 30日 ■暴露方法-3 ・投与方法: 静注 (単回) ・試験期間: 暴露後4日間 ・暴露濃度: 1µgCNT/50µL分散媒 (14.8×10 ³ Bq) ■解析方法;放射能イメ ージングで定性的観察、組 織を溶液化してシンチレ ーションカウンターで定 量 (0.2pgのCNTを検出可	■咽頭吸引後の観察 ・体重は正常に増大した。 ・マウスはすべて健康だった。 ・全ての試験項目で炎症は認められなかつ た。 ■転位測定の結果 ・放射信号は、肺暴露後1日の尿と血液で不 検出。 ・放射信号は、1日から90日にかけて肺組織 では減少、7日から360日にかけて脾臓と肝 臓では増大。 ・放射信号は、腎臓と骨髄でも増大したが、 肝臓、脾臓と比較すると少なかった。 ・CNTは、脾臓の白色髄と骨髄に濃縮してい た。 ・暴露後1日の肺負担は、10µg CNTであった。 3月と12ヵ月まで、投与量の10%は肺に残 った。 ・脾臓は肝臓より多くのCNTを蓄積した。 ・12ヵ月後に脾臓と肝臓で検出されたCNT はそれぞれ200ngと75ngであった。 ・これは投与された量の0.2%と0.75%に対応 する。 ・12ヵ月の心臓で少量の放射能が検出され た。しかし、脳と胸腺では検出されなかつ た。 ・12ヵ月の肺から分離されたCNTは、さまざ まな直径と長さ (0.2-10µm) を示した。 ・肝エキスでは、4µm長のCNTが確認された。 ■食道内注入: 注入後1日では、摂取された CNTの95%は、消化管と糞便で見いだされ た。4日には放射能は消化管と糞便で観察 されなかった。放射信号は、1、7、30日後 で脾臓と肝臓で観察されず。 ■以上の結果より、肺暴露後の転位は、空気	・本研究は、組織 切片の放射能 撮像がCNTの 体内分布を決 定するために 使えることを 示した ・マウスへの CNTの咽頭吸 引の後、少量の MWCNTが、 遠隔器官に転 座する。 ・これは、CNT が空気-血液 関門を通過す ることを示す。 ・CNTは、暴露 後1日から12 ヵ月まで、脾臓 と骨髄のよう な末梢臓器に 蓄積する。 ・これより、CNT などのナノ粒 子の第2の器 官におけるバ イオ持続性が 結論される。

			エネルギー超音波で分散	能)	- 血液関門を通したCNTの転位だけによる（腸バリアを横断して起こるものではない）と考えられる。肺からのCNTは、いくつかの遠隔器官まで転位する。	
--	--	--	-------------	----	---	--

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
MWCNT-5	van Berlo D, Wilhelmi V, Boots AW, Hullmann M, Kuhlbusch TA, Bast A, Schins RP, Albrecht C Arch Toxicol. 2014 Sep; 88(9):1725-37	Apoptotic, inflammatory, and fibrogenic effects of two different types of multi-walled carbon nanotubes in mouse lung (マウスの肺におけるアポトーシスや炎症、線維形成におよぼす2つのタイプの多層カーボンナノチューブの影響)	■対象物質：2種 ① MWCNT1 - 三井物産の MWNT-7 - 径：40～100nm - 長さ：13μm - これまでいくつかの毒性学的調査で用いられたもの。 ② MWCNT2 - 欧州委員会共同研究センター (JRC; イタリア) から入手。 - 径：30nm - 長さ：5μm - EUのナノ毒性学プロジェクトで用いられているもの。 ■SEM分析 - MWCNT1は、長～中間長のチューブの束と単体から成る。 - 長さ：5.3±4.0μm (PBS/0.6 mg/ml BSA/0.01 mg/ml DPPC懸濁液中で超音波処理後) - MWCNT2は、短い、より剛性の小さい、絡みあった	■試験対象：A,Bの2種 <in vivo試験> A)特定病原体除去 C57B16/Jマウス (雌)、週齢：9-10週 ■試験方法 - 暴露方法：咽頭吸引 - 溶媒： PBS/BSA/DPPC 溶液 - 懸濁液濃度：1mg/ml - 投与量：体重20g当たり 40μlの懸濁液 - コントロール：粒子無しのPBS/BSA/DPPC溶液 - 試験期間：暴露後8週間 ■試験項目 - 血液及び肺の組織病理/免疫組織化学的評価 - Bio-Plexサイトカイン分析による全身性炎症評価 - RNA, cDNA のqRT-PCR解析 - 開裂カスパーゼ3とマクロファージF4/80の免疫組織化学 - 肺の組織病理評価 <in vitro試験> B)マクロファージ類似 RAW 264.7ネズミ細胞 (ATCC Number TIB-71)	■in vitro 毒性 MWCNT1： - 膜健全性損失が最高20%増加した (LDH分析) - ミトコンドリア活性は対照群の60%にまで減少した (WST-1分析)。 - MWCNT2の毒性：不検出 (両分析とも) ■炎症誘発性および線維症マーカー - MWCNT1暴露は、MCP-1レベルを増大させたが、MWCNT2は増大させなかった (全身性炎症評価)。 - MWCNT1暴露はMMP-8 (1.8倍) と TIMP-1 (2.2倍) を誘発した (mRNA発現分析)。 ■組織病理学 - 肉芽腫病変 (高細胞密度の結節状の構造変化) が、粒子に暴露された全ての動物で観察された。 - 双方のMWCNTで、混合性細胞肺肺炎症と末梢および細気管支周辺リンパ球浸潤が見られた。 - リンパ組織球浸潤を有する肺胞組織細胞増多症と気管支肺胞増殖はMWCNT1だけでみられた。 ■酸化ストレス - in vivoでは、MWCNT1だけがHO-1とγ-GCSを誘発した。 - Nrf2のmRNA発現は、双方のMWCNTに影響されなかった。 (Nrf2：これらと他の抗酸化剤遺伝子の発現増加に関する転写制御因子。) - in vitroでは、二つのMWCNTは、RAW	- 吸入された MWCNTの長さや剛性、凝集特性は、マウス肺における炎症と線維性応答の誘発に対して大きな影響を有する。 - ただし、肺マクロファージ・アポトーシスにおいては、おそらくその開始トリガーではない。 - MWCNTに暴露されたマウスの肺におけるアポトーシスは、単に限局的な炎症性の効果あるいは、炎症と肉芽腫形成を制限するフィードバック・プロセスに対する二次応答を反映するだけかもしれない。 - MWCNTによるマクロファ

		BSA; bovine serum albumine DPPC ; dipalmitoyl-phosphatidylcholine	ナノチューブを含む。 長さ：6.4±4.1µm (2%マウス血清を用いた溶媒中で超音波処理後)	- 培養液：(1.5g/l重炭酸ナトリウム+4.5g/lブドウ糖 4mM)-グルタミン、ペニシリン (100U/ml) /ストレプトマイシン (0.1mg/ml) +10% FCS 補充) DMEM - 粒子濃度：0.625、2.5、10 µg/cm² ■試験項目 - 毒性試験 - アポトーシス caspase 3/7 活性分析 (これに対する陽性対照：スタウロスポリン (STS) (濃度0.1µM×24時間) - ROS生成	264.7細胞のH2O2産生を増大させた。 ■アポトーシス - in vivoでは、-MWCNT-1、-2とも、肉芽腫性病巣に局限された染色強化を誘発した。MWCNT-1はより強い。 - 肉芽腫の範囲内に局限されるものの、MWCNT処理はアポトーシスの強化を誘発した。 - in vitro では、両方ともスタウロスポリン活性を示したが、RAE 264.7 細胞において3/7 カスパーゼ活性は生起しなかった。	ージ・アポトーシスに関する in vitro試験は、肺障害の十分な予測手段ではない。
--	--	---	--	--	---	---

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
MWCNT-6	Han SG Inhal Toxicol. 2014 May; 26(6):327-32	Pulmonary response of mice to a sequential exposure of side-stream cigarette smoke and multi-walled carbon nanotubes (たばこ副流煙と多層カーボンナノチューブの逐次的な暴露に対するマウスの肺応答)	■多層カーボンナノチューブ (MWCNT) ・フェロセン-キシレン混合物の連続化学蒸着法を用いた触媒分解で合成 ・径：20-30nm ・長さ：最高50μm ・凝集粒子径：30-300 (平均98$\pm$10) nm ・ほぼ100%が凝集していた。 ■タバコ副流煙 (SSCS) ・ケンタッキー大学リファレンスシガレット3R4Fを用いて発生 ・煙微粒子濃度：約40mg/m³ ・含有物：タール9.4、ニコチン0.73mg/タバコ	■試験生物：A/Jマウス (雌) ・週齢：10週 ■タバコ副流煙暴露方法 ・暴露室における全身暴露 ・暴露時間：6h/d$\times$5d/w$\times$4w ・コントロール：大気暴露 ■MWCNT暴露 ・暴露方法：内部咽頭吸引法 (SSCSまたは空気への予備暴露後) (単回) ・投与量：40μg / 40μl PBS ・コントロール：PBSのみ ・試験期間：1日 (半数)、3日 (残り半数) ■試験ケース (4 ケース) (A)大気への全身暴露 + PBSのみの吸引暴露 (B) たばこの煙の全身暴露 + PBSのみの吸引暴露 (C) 大気への全身暴露 + MWCNTの吸引暴露 (D) SSCSへの全身暴露 + MWCNTの吸引暴露 ■気管支肺胞洗浄液 (BALF) ・LDH活性 ・全細胞数、多形核白血球% ・BALFの総蛋白濃度 ・ムチン	■BALFの全細胞数と多形核白血球流入 ・SSCS(B)とMWCNT(C)への暴露は、双方とも1日と3日で全BAL細胞の数を増加させた (対対照群)。 ・しかし、SSCS+MWCNT暴露(D)は、MWCNT単独暴露 (C) と比べて全BAL細胞の数を増加させなかった。 ・MWCNT(C)が1日と3日で多形核白血球の比率を上昇させた一方、SSCS(B)はマウス肺への多形核白血球の流入は増加させなかった。 ・MWCNTのみへの暴露(C)との対比で、SSCS+MWCNT(D)暴露は多形核白血球の比率が1日目で減少した。 ・大気のみコントロール(A)との対比で、SSCS+MWCNT(D)暴露では1日、3日とも、多形核白血球の割合は上昇した ■BALFの総蛋白濃度とLDH活性 ・MWCNT暴露(C)はコントロール(A)との対比でBALFへの細胞タンパク質の漏出を増加させた。この増加はSSCSのみの暴露 (B) では見られなかった。 ・MWCNT (C) では、1日でLDH活性が増加したが、3日ではコントロール・レベルに戻った。 ・コントロール (A)との対比で、SSCS+MWCNT群(D)のLDH活性は、3日目で高かった。 ■BALFのムチン・レベル ・BALFへのムチンの分泌は、MWCNT(C)とSSCS+MWCNT(D)で増大したが、この両者に有意な差はなかった。	・A/Jマウスへのたばこ副流煙とMWCNTの逐次的暴露は、マウスの肺で予想される付加的な効果または相乗効果を生じなかった。 ・MWCNTは、マウスにおける肺毒性は著しいが、本研究で選択された濃度と時点におけるたばこ副流煙の予備暴露は、MWCNTに誘起された肺毒性の変化に対して大きな役割は果たさない。

No	著者/書誌 事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
MWCNT-7	Qi W, Bi J, Zhang X, Wang J, Wang J, Liu P, Li Z, Wu W Sci Rep. 2014 Mar 12; 4:4352	Damaging effects of multi-walled carbon nanotubes on pregnant mice with different pregnancy times (異なる妊娠 回数を有する 妊娠マウスに 対する多層カー ボンナノチュー ブの有害 影響)	■対象物質： ・酸化MWCNT(以下 oMWCNT) ・MWCNTをHNO ₃ で 酸化して作成。 ・MWCNT: Shenzhen Nanotech Port Co. Ltd., Guangdong (中国)でCVD法に よって合成された ものを購入 ＜以下は同社資料に よる特性値＞ ・長さ：1-2μm、 ・径：10-30nm ・純度：＞96wt% ・無定形炭素＜3% ・灰分＜0.2% oMWCNTの99mTc標 識 ・実験には、99mTc で放射化して使用 (99mTc-oMWCN T)。 ・99mTcO ₄ -は、China Institute of Atomic Energy, Beijing, Chinaより購入 ・放射能強度：5 mCi	組織内分布 ■試験生物： ・昆明マウス (雌：雄= 1:1) ・体重：15g～18g ■投与方法：静注 ・投与物：99mTc-oMWCNT 水溶液 (0.2mL～0.3mL, pH = 7.26、NaCl = 0.9%) ・投与量：20mg/kgbw ・試験期間：静注後1、2、6、 16、24時間 (妊娠期間：17d) ■採取組織： ・心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、 胃 ・母体の血液と胎児の心臓、肺、 肝臓 ・これらの組織の99mTcを計数 流産率の統計と出産の前後の 重量変化 ＜この項の試験方法＞ ■試験生物：初妊娠、2回目、4 回目の妊娠マウス ・投与方法：oMWCNT (20mg/kg.bw)を妊娠7日から 流産/出産まで注射 ・流産/出産後血液を採取 (1mL) ・血清中プロゲステロンとエスト ラジオール含有量を測定 プロゲステロンとエストラジ オールに及ぼすoMWCNTの影 響。 ＜この項の試験方法-1＞	母体の組織と胎児における 99mTc-oMWCNTの体内分布。 ＜99mTc-oMWCNTの分布＞ ・母体では、主に肺 (最高90% ID/g) に 分配され、次に肝臓、脾臓、腎臓が続 いた。 ・これは、投与後24時間で、肺で70% ID/g に減少し、脾臓と腎臓で最低に減少し、 肝臓でわずかに増加した。 ・胎児では、注射後6時間で胎盤と胎児で ピークに達し、その後6～16時間で大き く減少した。 ・羊水では、この過程で段階的に増加し た。 ・これらの結果は、oMWCNTが生体内で 母体を通過して胎児に達することを示 す。 oMWCNT入りの注射の後の異なる妊娠 回数のマウスの流産と受精率。 ・暴露群では暴露後数日の間、母体の体 重増加が阻害された。 ・母体の体重は、妊娠回数初回、2回、 4回のマウスでそれぞれ妊娠日数13 日、10日、11日で急に増加して、流産 または出産へと続いた。 ・しかし、常に対照群の体重より低かつ た。 母体の血清中のプロゲステロンとエスト ラジオール・レベルにおよぼす暴露投与 量の影響。 ・初妊娠マウスの血清プロゲステロン値 は、対照群より低く、エストラジオール 値は高かった。	・静脈内注射に よって妊娠マ ウスに注入さ れた oMWCNTは、 胎盤関門を通 って胎児に入り、主に胎生 期肝臓、肺、 心臓に蓄積す る。 ・oMWCNTは血 清中プロゲス テロンを低下 させて、エス トラジオール を上昇させ る。 ・oMWCNTの妊 娠に及ぼす影 響は、投与量 に依存する が、妊娠期間 の経過とともに おのの影響は 弱まる。 ・oMWCNTの有 害性は、経産 マウスより初 妊娠マウスの方 が大きい。 ・oMWCNTは胎 盤機能に損傷

			・投与物質：oMWCNT ・投与量：20mg/kg.bw ・投与方法：4、11、15dの妊娠 日数で、妊娠マウスの静脈に毎朝注射。 ・注射液量：0.2mL～0.3mL ・採取組織：母体の血液（1mL） ・測定項目：血清中のプロゲステロンとエストラジオール ＜この項の試験方法-2＞ ・投与物質：oMWCNT ・投与量：4、20、30mg/kg.bw ・注射液量：0.2～0.3mL ・投与日：妊娠日数11日目 ＜この項の試験方法-3＞ ・投与物質：oMWCNT ・投与量：20mg/kg.bw ・注射液量：0.2～0.3mL ・投与日：妊娠日数13日目 ＜この項の試験方法-4＞ ・投与物：oMWCNT ・投与量：4 mg/kg.bw×5日=20 mg/kg.bw ・投与日：妊娠日数13日より5日連続 ・採取試料：血液1mLを妊娠18日目で採取 5異なる妊娠回数をもつ妊娠したマウスの傷害因子の検出。 ＜この項の試験方法＞ ・投与物：oMWCNT ・投与量：20 mg/kg.bw ・投与方法：毎朝静注 ・投与日：妊娠9,10,11日の3日間 ■測定・観察項目	異なる妊娠期間での、母体血清中のプロゲステロンとエストラジオール・レベルに及ぼすoMWCNTの影響。 ・妊娠したマウスは、妊娠7、14、18日で、20mg/kg.bw oMWCNTに暴露された。 ・暴露群の血清プロゲステロン値は、7、14と18dの妊娠期間で対コントロールより低かった。 ・この結果は、oMWCNTが胎盤系に入った後にプロゲステロンの分泌を阻害することを示した。 ・暴露群の血清エストラジオール・レベルは、妊娠7dまたは14dでコントロールより高かった。 母体の血清中のプロゲステロンとエストラジオール・レベルに及ぼす暴露時間の影響。 ・血清プロゲステロン値は、対対照群で低かった。 ・低用量での多重暴露（4mg/kg.bw/d×5日）は、単回の大量暴露（20mg/kg.bw/d×1回）より血清プロゲステロン値は上昇させ、エストロゲンは減少させた。 oMWCNTによる注射の後の胎盤における活性酸素種（ROS）と血管内皮増殖因子の（VEGF）レベル ・胎盤のROS含有量は、初妊娠マウス20mg/kg.bw暴露群では、対対照群で有意に減少した。 ・第2回と第4回妊娠のマウスでは、胎盤組織の明・白な相違は観察されなかった。 ・暴露群の胎盤のVEGF含有量は、4回妊娠マウスを除いて対対照より低かった。 oMWCNTによる注射の後の胎盤の組織	を与え、これによって胎児の発育は遅延し、心臓と脳を害し、流産につながる。 ・以上の結果は、CNTsが妊婦に毒性を誘発することを示唆する。 ・CNTs汚染に起因する妊娠中の傷害を予防するために、適当な安全予防措置がとられなければならない。
--	--	--	---	---	--

				・血漿中のROSとVEGF ・胎盤、肝臓、肺、脾臓、胎児	についての組織学的観察。 ・初妊娠マウスの暴露群では、対対照群で細胞の大きさは増加し、胎盤組織の血管数は減少した。 ・20mg/kg.bw oMWCNTに暴露された妊娠マウスでの胎児の肺と肝臓は影響を受けなかった。一方、胎児の心臓と脳は損傷を受けた。	
--	--	--	--	--	--	--

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料 調整法/試験用 量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
MWCNT-8	Zhao Y, Wu Q, Li Y, Nouara A, Jia R, Wang D Nanoscale. 2014 Apr 21; 6(8):4275-84	In vivo translocation and toxicity of multi-walled carbon nanotubes are regulated by microRNAs (多層カーボンナノチューブのin vivo転座と毒性は、マイクロRNAによって制御される)	■対象物質：MWCNT - 分散媒：K媒体(50 mM NaCl, 30 mM KCl, 10 mM NaOAc, pH 6.0) - Shenzhen Nanotech. Port Co. Ltd (Shenzhen, China)から入手。 ■特性値 - 純度：98.94% - 不純物 (wt%)：-0.017Fe -0.077Ni - 長さ：5-15μm - 径：10-20nm - ζ電位：-32.4mV (K-媒体中)	■試験生物：線虫株 (nematode strains) - 培養液：大腸菌OP50によって接種された線虫増殖培養液 (NGM) - 暴露濃度：0.1-1.0mgmL⁻¹ - 暴露期間：Li-幼虫 (Li-larvae) が若年成虫になるまでの期間 ■測定/評価項目： - 生殖、移動挙動、腸自己蛍光、腸ROS産生に関わる毒性評価 - 測定項目：miRNA発現プロファイリング - MWCNT暴露による異常制御されたmiRNA発現 毒性評価のためのエンドポイント - 生殖 (仔のサイズで評価) - 線虫の移動挙動 (頭打ちと体屈曲の回数) - 自発腸蛍光測定 - 平均排出サイクル長 - 線虫におけるMWCNTの転座と分布	<u>miRNAは線虫におけるMWCNT毒性の制御に関与する</u> - 検出されたSOLiD配列は20と22のヌクレオチドの間に分布した。 - 検出されたSOLiD順序の大部分は、染色体IIとXに局限された。 <u>MWCNT暴露による異常制御されたmiRNA発現</u> - 本研究で55の差別的に表示されたmiRNAが確認された。うち21は増加し34は減少していた。 - SOLiD塩基配列決定法とqRT-PCRで検出されるmiRNAの発現の間に有意な相関が認められた。 <u>MWCNT暴露された線虫における異常制御されたmiRNAのための目標とされた遺伝子の予測と遺伝子存在論の評価</u> <u>MWCNT暴露された線虫で異常制御されたmiRNAのために予測された目標とされた遺伝子によって媒介される信号経路の分析</u> - MWCNTに暴露された線虫で、少なくとも増加したmiRNAに対し19の、減少したmiRNAに対し13の信号経路が同定された。 <u>MWCNT暴露された線虫における若干の異常制御されたmiRNAの突然変異は、第2の目標とされた器官の機能を変えた</u> 1mg L⁻¹MWCNTに対する長期被曝の後、野生型線虫のひなサイズは減少し頭打ちと体屈曲の回数は減少した。 <u>MWCNT暴露された線虫における若干の異常制御されたmiRNAの突然変異は、一次性の目標とされた器官の機能を変えた</u> - MWCNTに暴露されたmir259、mir61/250、mir42-44、mir35とmir355変異体は、MWCNT暴露された野生型N2より顕著な腸自己蛍光と腸ROS産生を誘発した。一方、MWCNT暴露されたmir45、mir51、mir35-41変異体は、野生型N2と比較してそれを減少させた。 <u>mir259とmir51変異体におけるMWCNTの分布と転座</u>	- 長期のin vivo MWCNT暴露は、分析システムとしての線虫のmiRNAターゲットの発現パターンを変える。 - MWCNTのin vivo転座と毒性の制御において、MWCNTに対して特定されたmiRNAターゲットは重要な役割を演じるとともに、MWCNTの転座と毒性を正にも負にも制御できる。 - 腸の発達と排出の挙動は、目標miRNA変異体のMWCNT毒性に対して、感受性や抵抗性の制御において重要な役割を演じる。 - 今後、MWCNTに暴露された

				・小RNA抽出とSOLiD塩基配列決定法 ・生命情報科学分析 ・逆転写と定量的リアルタイムPCR	・MWCNTへの長期被曝の後、MWCNTは、mir 259変異体（n4106）中の腸と性腺、受精囊などの生殖器に大量に蓄積していた。 ・mir259（n4106）変異体の尾部領域には、特に大量のMWCNTが堆積されていた。 <u>MWCNT暴露されたmir259とmir51変異体の排出挙動</u> ・MWCNT暴露の後、mir259（n4106）変異体は野生型N2のそれと比較して、長い排出サイクルを示したが、ミール-51（n4473）変異体は短い排出サイクルを示した。 <u>MWCNT暴露された線虫においてmir259とmir51のための目標とされた遺伝子の予測と遺伝子存在論の評価</u> ・排出挙動の制御に必要とされる遺伝子としてmir259に対して目標とされた遺伝子は、mig-2 encoding Rho/Rac family GTPaseであった。 ・mir51に対して目標とされた遺伝子は、unc-36 encoding voltage-gated Ca²⁺ channel α2サブユニットであった。 ・これらは、mir259とmir51は、MWCNTに暴露された線虫において、反対方向かあるいは、異なる生物学的プロセスに対する影響を有することを意味する。	線虫で特定された異常制御されたmiRNAに対応するmRNAターゲットの特定に注力しなければならない。 ・これによって、哺乳類の動物とヒト細胞系列からのデータと線虫からのデータを比較できるようになる。
--	--	--	--	--	--	--

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整 法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
MW CNT -9	Kim JS, Sung JH, Choi BG, Ryu HY, Song KS, Shin JH, Lee JS, Hwang JH, Lee JH, Lee GH, Jeon K, Ahn KH, Yu IJ Inhal Toxicol. 2014 Mar; 26(4):222-3 4	In vivo genotoxicity evaluation of lung cells from Fischer 344 rats following 28 days of inhalation exposure to MWCNT, plus 28 days and 90 days post-exposure (MWCNT の28日吸入 暴露後と暴 露後28日、90 日における にフィッ シャー344ラ ットの肺細胞 におけるin vivo遺伝毒性 評価)	■対象物質： MWCNT ・ Hanwha Nanotech, Inc (Incheon、韓 国) から入手 ・商品名:CM-100、 ・径:10~15nm、 ・長さ:~20μm ・炭素純度:95% 以上 ・Fe:2wt%以下 ・Co:2wt%以下 ・Al ₂ O ₃ :4wt%以下 ・比表面積: 224.9m ² /g ・エアロゾル化 CNT の長さの分布 (300個をTEM 測定); 68~1517nmの 範囲で個数基準 中間値は330nm、 幾何標準偏差は 1.72nm (超音波プロセ スによるエアロ ゾル化によって 短くなった)	■試験生物:SPFフィッシャー344 ラット (F344/N Slc) 各群25匹 ・週齢:8週 (実験開始日) ・体重:155g (雄) と130g (雌) (実験開始日) ■試験方法 ・暴露方法:鼻のみからの吸入曝 露 ・暴露期間:6h/d×5d/w×28d ・回復期間:0、28、90日 ・暴露濃度 (目標濃度): 低用量群:0.2mg/m ³ 中間群:0.5mg/m ³ 高用量群:1.0mg/m ³ 、 対照群:空気のみ暴露 ■毎日の検査項目: ・呼吸、皮膚、行動、鼻、尿生殖 器などの変化 ・体重測定:購入時、グループ化 時、暴露前1日、吸入暴露と回復 の間週1回、死体解剖の前に計量 ■測定・調査項目 ・BALFの調査 (アルブミン、タン パク質、LDH、H ₂ O ₂ と炎症性サ イトカイン) ・細胞、マクロファージ、多形核 細胞とリンパ球の全数 ・H ₂ O ₂ 、GHS、アルデヒド ・炎症性サイトカイン (TNF-α、 TGF-13、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、 IL-10、IL-12、IFN-γ) ・肺へのMWCNTの沈着 ・細胞懸濁液中の生菌数 ・単一の細胞ゲル電気泳動分析 (コ	■実績暴露濃度 (mg/m ³) ・低濃度室:0.17 + 0.00 ・中間濃度室:0.49±0.00 ・高濃度室0:0.96±0.01 ・吸入室中のMWNCTs長さ分布: 68-1517nm ■DNA損傷の測定; OTM値(Olive Tail Moments) ・実験期間中、死亡、臨床異常、有意な体 重変化は見られなかった。(各群;雄15 匹、雌10匹) ・OTM値:(以下は順に対照群、低、中間、 高用量群の値、日数は暴露後の日数) 雄ラットの0日:13.62、28.43*、34.17*、 44.22* 雄ラットの90日:14.89、17.52、17.16、 18.36* 雌ラットの0日:19.32、27.93*、26.13*、 33.72* 雌ラットの90日:14.07、16.54、20.57*、 21.44* *は統計的に有意に高い (p<0.05) 事 を示す BAL液体の測定 ■ROS ・雄ラットの中間濃度では、暴露後0日目に、 高用量群では0、28日目H ₂ O ₂ は増加し た。 ・雌ラットでは、すべての時点とMWCNT 濃度でH ₂ O ₂ の変化はなかった。 ・MDA、4HHE、ヘキサナールとGSHは、 対照群と暴露群では相違はなかった。 ■炎症性のサイトカイン・レベルの測定 ・細胞、マクロファージ、多形核白血球、	・MWCNTへの 暴露によっ て、ラットの BALF中の OTMは増大し た。 ・高用量群の雄 と、中間群と 高用量群の雌 のラットで は、暴露後90 日でもDNA損 傷は保持され た。 ・雄ラットの H ₂ O ₂ は、中間 群の暴露後0 日と高用量群 の暴露後の0 日、28日で高 かった。 ・雌ラットは、 H ₂ O ₂ の変化を 示さなかつ た。 ・BAL液の炎症 性のサイトカ インは、有意 な相違を示さ なかった。 ・肺細胞に堆積 する短長 MWCNTは、 暴露後の90日

				メットアッセイ;遺伝子損傷)	リンパ球の全数の増加は、0日目と28日目で観察されなかった。 ■ • MWCNTは、28日の吸入暴露の後、胸膜に堆積していた。 • 雄では、暴露後28日、90日でも、MWCNTの沈着は持続した。	まで持続的だった。 • 肺細胞を短いMWCNTに暴露することは、遺伝毒性を誘起するかもしれない。
--	--	--	--	----------------	--	---

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整 法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
MW CNT -10	Wang X, Shannahan JH, Brown JM Inhal Toxicol. 2014 Mar; 26(4):240-9	IL-33 modulates chronic airway resistance changes induced by multi-walled carbon nanotubes (IL-33は、 多層カーボ ンナノチュ ーブによっ て誘起され る慢性気道 抵抗変化を 調節する)	■対象物質： ・ MWCNTs ・ NanoTech Labs, Inc. (Yadkinville, NC)より入手 ・ ドライMWCNTs ・ 径：22.5±1.3 nm ・ 長さ：10-100µm ・ 比表面積： 113.10m ² /g ・ C:99.6at% ・ Fe:0.04at% ・ 懸濁液中ζ電位： - 44.6mV ・ 流体力学径： 180nm (DLSによる) ■試料調整 ・ 10%表面活性物 質を含む食塩水 中で安定に分散	■試験生物：2種 ① 雄C57BL/6マウス。週齢：8 週 ② IL-33-/- (欠損)マウス ■投与方法： ・ 口咽頭吸引（麻酔後単回） ・ 媒体：表面活性剤含有食塩水 ・ 投与量：4mg/kgbw ・ 試験期間：暴露後30日 ■調査項目： ・ 肺機能、メタコリン誘発試験、 アルブテロール処理 ・ 肺疾患に関するコルチコステ ロイド処理の効果 ・ BALF調査と肺組織観察 ■肺機能試験 測定項目： ・ EKG測定（心電図）でチェ ック ・ Rn（中心気道抵抗）とR（気 道、肺組織、胸壁抵抗の合計） 測定 ■メタコリン誘発試験 ・ メタコリン（1.5、3、6、12、 24mg/ml）をエアロゾル暴露 ・ 暴露時期と時間：MWCNT 暴露後30日に10秒間暴露 ■アルブテロールとメチルプレ ド ニゾロン処理 ・ MWCNT暴露後30日に20秒 霧状硫酸アルブテロールに 暴露 ・ MWCNT点滴注入前30分と後 7、14、21、28日にメチルプ	■MWCNT注入後の病理学的観察と肺機能 の変化 ・ C57BL/6マウスでは、注入後30日で、 BALFの全細胞は増加、好酸球は僅かに 増加。間質炎症細胞数の増加と初期の肉 芽腫形成を示した。 ・ IL-33-/- マウスでは、BALFの全細胞数、 肺胞マクロファージ、好中球数は増加せ ず、好酸球増加症は減少。間質炎症細胞 の流入は、軽度。 ・ コラーゲン堆積の増加はIL-33-/- miceと 比較してC57BL/6マウスの気道周辺で 観察された。 ・ 両マウスとも、暴露後粘液産生は増加せ ず。 ・ C57BL/6マウスでは、R、Rnとも増加し たが、IL-33-/- マウスでは増加しなかつ た。 ■メタコリン誘発試験結果 ・ C57BL/6マウスでは、メタコリン24mg/ml の投与で、R、Rnとも顕著に増加した。 これはMWCNTがAHR(気道反応過敏)を 悪化させたことを示す。 ・ IL-33-/- マウスでは、R、Rnとも溶媒と 同じ効果であり、AHRは増加しなかつ た。 ■アルブテロールとメチルプレドニゾ ロン処理 ・ アルブテロール処理は、MWCNTによっ て誘発されたRとRnの増加を逆転させな かった。 ・ メチルプレドニゾロンの腹注によっては、 RまたはRnは増加しなかった。 ・ メチルプレドニゾロンによる処理は、	・ C57BL/6マウ スへの MWCNT点滴 注入後30日 で、ベースラ イン肺機能、 病理学、AHR は変化した。 ・ 一方、IL-33-/- マウスは、こ の期間でベー スライン肺機 能、病理学、 AHRの変化を 示さなかつ た。 ・ アルブテロー ル処理は、マ ウスの肺循環 抵抗増加を軽 減しなかつ た。 ・ コルチコステ ロイド・メチ ルプレドニゾ ロン処理は、 MWCNTによ って誘起され た肺病理学的 変化を減らす とともに、 MWCNTに誘 発される肺抵 抗の変化を予

				レドニゾロン1mg/kgbwを腹注。 ・30日後にRとRnを測定 ■BAL採取と細胞計数 ・測定項目：BALF中全細胞数 ■肺組織病理学的観察	MWCNTによって誘発されたBALFへの炎症細胞の流入を緩和しなかった。 ・メチルプレドニゾロン処理C57BL/6マウスの気道の近くで、炎症細胞流入と初期の肉芽腫形成の減少が認められた。 ・MWCNTによって誘発されたコラーゲン堆積は、メチルプレドニゾロン処理によって減少した。 ・粘液産生は、MWCNT曝露によっても、メチルプレドニゾロン処理によっても変わらなかった。	防する。 ・MWCNT点滴注入後の慢性肺循環抵抗、病理学、AHRの変化は、主として炎症とIL-33経路に起因すると考えられる。
--	--	--	--	---	--	--

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
MW CNT -11	Siegrist KJ, Reynolds SH, Kashon ML, Lowry DT, Dong C, Hubbs AF, Young SH, Salisbury JL, Porter DW, Benkovic SA, McCawley M, Keane MJ, Mastovich JT, Bunker KL, Cena LG, Sparrow MC, Sturgeon JL, Dinu CZ, Sargent LM Part Fibre Toxicol. 2014 Jan 30; 11:6	Genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes at occupationally relevant doses (労働環境暴 露に相当する 投与量におけ る多層カーボ ンナノチュー ブの遺伝毒性)	■対象物質： ・多層カーボンナノチ ューブ(MWCNT) ・Nanolab社製 ・化学蒸着法で製造 ・希硫酸(3:1v/v)中1 時間超音波洗浄に より、Feを除去後、 0.2μmのフィルタ ーで濾過、洗浄して 使用 ・入手のままの MWCNTとの比較 で、酸洗MWCNTの ラマン分光におけ るD帯域は、広くて 高い相対強度を示 し、機能化の程度(G ピークに対するDピ ークの強度の比率) は、 入手MWCNTで 0.59 酸洗MWCNTで 0.81 ・これらは、酸処理が MWCNTのカルボ ン酸基の数を増加 させたことによる。 ・酸洗MWCNTの化学 組成は、Fe; 0.03、 Co ;0、Ni; 0%であ った。 ・酸洗・ろ過によって 長さは、入手	■試験細胞：2種 1) 不死化ヒト気管支上皮 細胞 (BEAS-2B) ・紡錘体の健全性調査に使用 ・培養液：10%血清補充 DMEM 2) 初代小気道呼吸肺胞細 胞 (SAEC) ・正常な細胞集団の応答測定 に使用 ・培養液：Cabrex媒体 ■処理プロトコル ・暴露時間：24h (1)2)とも) ・暴露後24hで分析 (1)2) とも) ・陽性対照：V ₂ O ₅ ・暴露濃度： -MWCNT : 0 (対照群) 0.024、0.24、2.4、24 μg/cm ² 、 -V ₂ O ₅ : 0.31 μg/cm ² ■測定/分析項目： ・アポトーシス、壊死 (紡 錘体の健全性)、中心体 数、染色体数 ・生存度とアポトーシス ・このための付加的陽性 コントロール： 1.68Molar DNase デオ キシリボヌクレアーゼ ・紡錘体分析 ・蛍光in situ雑種形成 (FISH) による染色体数 ・コロニー形成	■紡錘体破壊 ・酸洗MWCNT処理は、用量依存的な紡錘 体破壊を誘起した。破壊された紡錘体は、 主に単極だったが、5-10%が多重極だっ た。 ■染色体数 ・FISH分析によれば、対照SAEC細胞の染 色体1または4の異数性は2.25±1.0%で あった。 ・MWCNT処理SAEC細胞では、V ₂ O ₅ で処 理された細胞に匹敵する異数性を示し た。 ・異常な染色体の発生率は、MWCNT処理 によって対照群の2.25±1.0%から有意 に上昇した： 62±7.0% (24μg/cm ²) 59.0±6.0% (2.4μg/cm ²) 49±6.0% (0.24μg/cm ²) 42±10% (0.024μg/cm ²) ・0.31 μg/cm ² V ₂ O ₅ 処理では、異数体細胞 は67±6.0%であった。 ・MWCNT処理細胞の染色体変化は、主に 染色体1または4のいずれかの増加であっ た。 ■MWCNTの紡錘体装置との相互作用 ・MWCNTは、細胞質と核の中で観察され た。 ・MWCNTは、中心体との強い関連も有し た。 ・MWCNTは、中心体 (の外側) だけでな く中心体の構造の内側に結びついてい た。 ■生存度とクローン増殖 ・V ₂ O ₅ 処理は、SAECとBEAS-2B細胞の生 存度を減少させ、0.024、0.24、2.4、24	・0.024、0.24、 2.4、24 μ g/cm ² の MWCNT暴露 は、24時間後 に、中心体の破 壊、紡錘体異 常、異数体、染 色体数などを 用量依存的に 増加させた。 ・単極紡錘体が、 破壊された細 胞分裂の95% を占めた。 ・カー ボンナノチ ューブは、微小 管、DNAと集 積するか、中心 体構造内に集 積されていた。 ・細胞周期分析に よれば、 MWCNT処理 は対照群と比 較して、S期細 胞を増大させ、 G2期細胞を減 少させた。これ は、細胞周期に おけるG1/Sブ ロックを示す。 ・職業上ありうる 暴露レベルで、 MWCNTは紡

			MWCNTの5499 nmから酸洗 MWCNTの825nmに減少した（径は双方15nmであった）。	・DNA含有量のための細胞周期（サイクル）分析	$\mu\text{g}/\text{cm}^2$のMWCNT暴露は、暴露後72時間で、SAEC細胞の生存度を低下させた。 ■細胞周期 ・24時間、$24\mu\text{g}/\text{cm}^2$のMWCNT処理は、対照群の32.11%から40.1%までS期中の細胞割合を増加させた。	錘体を破壊する。
--	--	--	--	--------------------------------	--	-----------------

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
M W CN T- 12	Sargent LM, Porter DW, Staska LM, Hubbs AF, Lowry DT, Battelli L, Siegrist KJ, Kashon MML, Mercer RR, Bauer AK, Chen BT, Salisbury JL, Frazer D, McKinney W, Andrew MM, Tsuruoka S, Endo MM, Fluharty KL, Castranova V, Reynolds SH Part Fibre Toxicol. 2014 Jan 9 ;11:3	Promotion of lung adenocarcino ma following inhalation exposure to multi-walled carbon nanotubes (多層カーボ ンナノチュー ブの吸入暴露 に伴う肺腺 癌の促進)	■対象物質： MWCNT ・保土谷化学工業より入手 ・流動触媒化学蒸着法により合成。 ・金属不純物：1.32% (内、Fe：1.06%) ■MWCNT吸入暴露とエアロゾル特性 ・McKinney(2009)が報告した音響作用による全身吸入暴露装置を使用 ・質量基準空気力学的径質量中央値の幾何平均と標準偏差)：1.59μm、1.69 ・数基準空気力学的径幾何平均数中央値)：0.42μm	■試験生物： ・雄B6C3F1マウス：週齢：6週 ■投与方法：2段階 ①MCA (methylcholanthrene)； 10μg/gBW、腹腔内注射.またはコーンオイルの単回投与 ・MCA：DNA損傷(がんのイニシエーション)作用がある薬剤 ② MWCNT暴露 ・暴露時期：①の投与の1週後 ・暴露方法：全身吸入暴露 ・エアロゾル濃度：5mg/m³ ・暴露時間：5h/d×15d ■試験期間：暴露後17ヵ月 ■暴露の4ケース； ・大気のみ ・MCAのみ ・MWCNTのみ ・MCA+MWCNT ■観察項目： ・体重、皮膚病変、毛皮の乱れ、嗜眠、ふるえ、陰茎脱出または脱肛、不規則な運動または麻痺 ・肺組織中の異物(MWCNT)；組織を消化し紫外/可視分光分析 ・肺組織、検死(腫瘍と病変)、限局性腺腫様肺胞増殖計数 ・中皮腫のためのマーカーの免疫蛍光	■組織病理学評価、高分解能暗視野撮像から ・MWCNT暴露マウスの初期のMWCNT肺負荷は、31.2$\pm$0.9μgMWCNT/lungであった。 ・MWCNTと推定される外来物は、MWCNT暴露とMCA + MWCNT暴露群のすべてのマウスの肺に存在し、長さは、約0.5～5μmであった。 ・それは、マクロファージ(推定)または気道の内側を覆う上皮細胞の中に、あるいは、気道上皮に隣接した結合組織中のマクロファージの中に存在した。また横隔膜にもMWCNTを示した。 ■肺における増殖とマクロファージ浸潤 ・限局性腺腫様肺胞上皮増殖のマウスの発生率、終末細気管支/肺胞管領域におけるマクロファージ浸潤、外来物、多病巣性腺腫様細気管支肺胞性増殖は、MWCNT暴露群で増加した。 ・限局性腺腫状過形成の発生率は、MCA + MWCNT群で最も大きかった。 ■肺腺腫と腺癌 ・細気管支肺胞性腺腫、細気管支肺胞性腺癌、それらの合計発生率または腫瘍のマウスの数は、MCA + MWCNT群で最大だった ・最後に殺された、MCAとMCA + MWCNT群の細気管支肺胞性腺腫(adenomas)の発生率はそれぞれ、33%、76%であった。一方、大気処理群は11%、MMWCNT処理群は18%であった。 ・MCA処理とMCA + MWCNT処理群の細	・MWCNT暴露は、B6C3F1マウスで開始された肺細胞の成長と新生物形成の進行を促進する。 ・この研究で用いた31.2μg/マウスのMWCNT肺負荷は、ヒトの職業被曝のレベルに近い。 ・MWCNTに対するヒトの暴露を制限するための注意が払わなければならない。

				光検出：MWCNTとMCA暴露マウスの、腹膜および精巣上体の表面の肉腫性腫瘍 ・暗視野高分解能光顕撮像；肺組織 中のMWCNTの検出（光散乱によって光って見える）	気管支肺胞性腺癌(adenocarcinomas)の発生率はそれぞれ、22%、62%であった。一方、大気処理群は13%、MWCNT処理群は14%であった。 ■漿膜腫瘍 ・悪性肉腫性中皮腫と形態学的に一致する悪性漿膜腫瘍は、MCA + MWCNT群の5匹のマウスとMCA群の1匹のマウスで見られた。	
--	--	--	--	---	--	--

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
MWCNT-14	Kido T, Tsunoda M, Kasai T, Sasaki T, Umeda Y, Senoh H, Yanagisawa H, Asakura M, Aizawa Y, Fukushima S Inhal Toxicol. 2014 Oct; 26(12):750-8	The increases in relative mRNA expressions of inflammatory cytokines and chemokines in splenic macrophages from rats exposed to multi-walled carbon nanotubes by whole-body inhalation for 13 weeks (多層カーボン ナノチューブ に13週間全身 吸入暴露され たラットにお ける脾臓マク ロファージの 炎症性サイト カインとケモ カインの相対 的mRNA発現 の増加)	■対象物質：繊維性 直線状MWCNT ・保土谷化学工業か ら購 入 ・浮動化学蒸着法 (CVD) により合 成 ・更なる精製/篩い分 けなしで使用 ■メーカー仕様： ・C純度：>99.6% と>99.8% (2種) ・平均径：40-90nm ・アスペクト比：100 以上 ・比表面面積： 24-28m ² /g ■分析結果： ・バルク平均幅： 90.7nm 長さ：5.7μm	■試験生物： F344/DuCr1CrIjラット (雄と雌) ・週令：6週 (暴露開始時) ・暴露方法：全身吸入暴露 ・暴露濃度：0、0.2、1、 5mg/m ³ ・暴露時間： 6h/d×5d/w×13w ・暴露終了の翌日に脾臓を 摘出 ・対照群：大気暴露 ・組織病理学的分析 ■脾臓マクロファージとリ ンパ球 のサンプリングとRNA の抽出 ・試験方法： ・試験生物：脾細胞 ・培養液： 100Upenicillin/ml、 100μg streptomycin/ml、5%熱 失活ウシ胎児血清を含 むRPMI 1640培地 ・培養時間：1時間 ・RT-PCR/測定項目： ・マクロファージに対 して：TNF-α、IL-18、IL-6、 IL-10、MCP-1、MIP-1α のmRNA発現 ・Tリンパ球に対して： IL-2、TGFβの発現	■目標暴露濃度：実績濃度 ① 0.2mg/m ³ ：0.20±0.02mg/m ³ ② 1.0mg/m ³ ：1.01±0.11mg/m ³ ③ 5.0mg/m ³ ：5.02±0.25mg/m ³ ■試験結果 ・MWCNTに暴露された雄、雌のラット に、最終的な体重と相対的な脾臓重量 (mg/g) の相違はなかった。 ・MWCNTに暴露されたラットの脾組織 でMWCNTの沈着が観察された。 ・IL-10の発現は、暴露の影響を受けな かった。 ・5mgMWCNT/m ³ 処理群のIL-18の発現 レベルは、対照群より有意に高かった。 ・0.2～5mgのMWCNT/m ³ に暴露された ラットの細胞のIL-6値は、対照群より 高かった。 ・0.2～5mgMWCNT/m ³ に暴露された雄 ラットの細胞のIL-10発現とは異なり、 雌宿主 (臓器主) のそれは対照群より 有意に大きかった。 ・対照群のIL-6とIL-10発現は、雌ラット より雄のラットの方が大きかったこと は興味深い； ・5mgMWCNT/m ³ に暴露されたラットの 細胞のMIP-1αmRNAレベルは、対照群 より有意に高かった。 ・雄と同様、mRNA MCP-1レベルに対 する有意な影響はなかった。 ・すべてのMWCNT暴露されたラットの 細胞のIL-2のレベルは、対照群より有 意に低かった。この発現の減少は、0.2、 1.0mg/m ³ MWCNTで1/14、	・MWCNT暴露が 肺の免疫シス テムにおよぼす影 響は、脾臓に由 来するかもしれ ない。 ・13週間MWCNT に暴露されたラ ットの脾臓マク ロファージとリ ンパ球のいくつ かの重要なサイ トカイン/ケモ カインのmRNA 発現の評価は、 これらの宿主 における全身性 炎症反応応答の 誘発の可能性を 示した。 ・脾臓マクロファ ージで起こった 変化は、炎症性 サイトカインの 誘発などの同様 の影響が、肺胞 マクロファージ にも起こり得る ことを示唆す る。 ・これらの宿主 からのTリンパ 球のIL-2

				• Calibrator 正規化された相対的な比率で表示	• 5mgMWCNT/m³で1/10であった; • MWCNT暴露のレベルによるTGF-β1発現の有意な相違はなかった。 • 全てのMWCNT濃度で、IL-2発現は対照群より有意に低かった。	mRNA発現の分析は、粒子によって誘起される毒性は、in situで抗腫瘍活動と全体の免疫監視に影響を与え得ることも示唆する。
--	--	--	--	--	---	---

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
MW CNT -15	Ursini CL, Cavallo D, Freseigna AM, Ciervo A, Maiello R, Buresti G, Casciardi S, Bellucci S, Iavicoli S Biomed Res Int. 2014;2014:359 506	Differences in cytotoxic, genotoxic, and inflammatory response of bronchial and alveolar human lung epithelial cells to pristine and COOH-functio nalized multiwalled carbon nanotubes (無修飾なら びにCOOH官 能基付加多層 カーボンナノ チューブの気 管支および肺 細胞ヒト肺上皮 細胞に及ぼす 細胞毒性、遺伝 毒性および炎症 性応答の相 違)	対象物質：2種 ①無修飾MWCNT ・純度：～97.37% ・不純物：Cl 0.20%、 Fe 0.55%、Ni 1.86%、S 0.02% ②COOH官能基付 加MWCNT 純度：～97.46% (COOH：5 wt% 以上) 不純物：Al 0.19%、Cl 1.02%、 Co 1.09%、S 0.04% ・ともに、HeJi (中 国) より購入 粒子の基本特性 ・平均直径： ① 32±15 nm ② 24.5±10 nm ・長さ： ① 0.070-7.8μm、 ② 0.029-1.56μm ・比表面積： ① 106.7 m ² /g ② 139.1 m ² /g ・ζポテンシャル (10% FBS-RPMI媒体 中)： ① 9.2±0.5 mV、 ② 110.1±0.4mV、	細胞培養と暴露 試験生物：2種 A) ヒト肺上皮細胞 (A549) (以下、A細胞) B)気管支上皮細胞 (BEAS-2B) (以下、B 細胞) ・培養液： A細胞に対して： 10%FBS補充Rosewell Park Memorial Institute 1640 medium (RPMI 1640) B細胞に対して： Bronchial Epithelial cell Growth Medium (BEGM) ・暴露濃度：1、5、10、20、 40μg/mL 細胞に暴露したMWCNTs ・暴露濃度：40μg/mL ・暴露時間：2、4、8、16、 24時間 ・細胞生存度の測定 (WST-1) 細胞膜健全性 ・LDH放出を測定 ・対照：非暴露細胞 ・陽性対照：1%トリトン X-100に暴露された細胞 コメットAssay ・暴露時間：24h ・暴露の後Fpg修正コメッ	暴露後のナノチューブ分散 ・①は互いに付着して、細胞の上で集塊(弱/強凝集 体)を形成した (A細胞、B細胞とも)。 細胞に暴露したナノ粒子の測定 ・A細胞では、①②とも取込みは最初の2時間は緩 慢だったが、4時間では11%に、24時間では①② に対してそれぞれ25%、32%に達した。 ・B細胞では、MWCNTsの取込みは、①②とも最 初の4時間は緩慢だったが、24時間後に①②に対 して、それぞれ15%と18%に達した。 細胞生存度 ・A細胞に対しては、①②とも生存度をわずかに減 少させた。 ・B細胞に対しては、①は最大濃度でだけ、わずか に減少させ、②は用量依存的に減少させた。 細胞膜健全性 (LDH分析) ・A細胞では、①②への暴露とも、LDH放出は投 与量依存的に増加した。 ・B細胞では、①②への暴露とも、A細胞より大き なLDH放出が認められた。 コメットAssay ・A細胞では、①に暴露されると直接的DNA損傷 は濃度依存的に増加したが、②への暴露では直 接的DNA損傷は誘起しなかった。 ・B細胞では、①②とも用量依存的に直接的DNA 損傷が増加した。 サイトカイン放出 ・A細胞では、②の10、20、40μg/mLの暴露によ ってIL-6とIL-8放出は増加したが①への暴露で は増加しなかった。 ・B細胞では、①の20と40μg./mLの曝露によって IL-8放出が増加したが、IL-6放出は①②とも増 加しなかった。	・①②ともA細胞 の生存度を減 少させた。 ・②は高濃度 (40μg/mL) でB細胞の生 存度を減少さ せた。 ・①②とも膜の損 傷を誘起した。 ・A細胞は①によ って、B細胞は ①②双方によ ってDNA損傷 が引き起こさ れた。 ・10μg/mLの② に暴露された A細胞で、IL-6 とIL-8放出の 増加が確認さ れた。 ・①に20、 40μg/mLで暴 露されたB細 胞では、IL-8 放出が増加し た。 ・B細胞には② が、A細胞には ①が細胞遺伝 毒性を示した、 ・得られた知見

				トアッセイでDNA損傷を評価 サイトカインの検出 ・ 暴露時間：24h ・ 測定項目:IL-6、IL-8、TNFα	・ A細胞では、②の最も大きな濃度の暴露で、TNFα放出がわずかに増加した。 ・ B細胞では、①の5μg/mLの場合だけTNFα放出がわずかに増加した。	は、CNT毒性研究のために、異なるエンドポイントと細胞で生体外モデルの使用可能性を示唆する。
--	--	--	--	--	---	---

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
MW CNT -16, Al ₂ O ₃ , C B)	Taylor AJ, McClure CD, Shipkowski KA, Thompson EA, Hussain S, Garantziotis S, Parsons GN, Bonner JC PLoS One. 2014 Sep 12; 9(9):e106870	Atomic layer deposition coating of carbon nanotubes with aluminum oxide alters pro-fibrogenic cytokine expression by human mononuclear phagocytes in vitro and reduces lung fibrosis in mice in vivo (カーボンナ ノチューブへ の酸化アルミ ニウム原子層 コーティング は、in vitroで はヒト単核食 細胞における 線維化促進 性サイトカイン 発現を変え、 in vivoではマ ウスの肺線維 症を減らす)	対象物質：4種 ①Al ₂ O ₃ を原子層で コーティング (ALD) した MWCNT ・Al ₂ O ₃ 原子層は Al(CH ₃) ₃ と水との 逐次飽和反応によ ってMWCNTの上 に製膜 ②コーティングなし のMWCNT ・MWCNT：化学蒸 着法で合成 ・長さ：0.5-40μm 径：10-30nm ・Helix Materials Solutionsより購入 ③Al ₂ O ₃ ナノ粒子 ・径：～60nm) ・Sun Innovationsよ り購入。 ④Carbon blackナノ 粒子 ・径：8nm ・Columbian Chemicalsより購 入 供試材のコーティ ング厚さ：～20nm Al ₂ O ₃ コーティング によって流体力学 直径は増加し、ゼ ータ電位は減少し た(水性培地	<in vitro試験-1> ・試験生物：ヒトTHP-1細胞 ・ATCC社から購入 ・培養液：10%ウシ胎児血 清を含むRPMI-1640 培 地 ・対象物質：①、②、③、 ④(③：陰性対照、④陽 性対照) ・暴露濃度：5、10、50、 100μg/ml ・暴露時間：24h <in vitro試験-2> ・試験生物：CD 14+細胞 ・健康人の血液から分離し て、①、②、③、④に暴 露 <in vivo試験> ・試験生物：C57BL6マウ ス ・対象物質：①、② ・①の層厚：約20nm ・投与方法：口腔咽頭吸引 による単回投与 ・投与量：4mg/kg ・溶媒：0.1%Pluronic表面 活性剤溶液と 0.1%Pluronic液 ・試験期間：暴露後1、28 日 ・採取試料：BAL液、右肺 の中央と尾部葉(mRNA 分析用)、左肺(肺コラ ーゲン堆積観察用)	・①と②のナノ粒子は、THP-1マクロフ ァージによって貪食された。 ・超音波で処理したMWCNTsは、超音波 処理のない場合に比べて大きな細胞毒 性を示した。 ・Al ₂ O ₃ 原子層でコーティングはTHP-1 細胞におけるMWCNTの細胞毒性を変 化させた。 ・①は、THP-1細胞においてIL-18、IL-6、 OPN、TNF-αの分泌は増加させた ・②は、THP-1細胞によるIL-18産生を増 加させたが、IL-6、OPN、TNF-αの分 泌は減少させた ③はわずかに用量依存的にIL-18を増 加させた(③との対比で)。 ④は、IL-6、OPNとTNF-αを増加させ た。 ・①は、IL-18を増加させたが、ヒトの末 梢血単球によるOPN分泌を減少させ た。 ・Al ₂ O ₃ コーティングはMWCNTsの線維 化促進性を減少させたが、急性炎症誘 発性は変化させなかった。 ・Al ₂ O ₃ コーティングは、マウスの肺中の 炎症誘発性および線維形成促進性サイ トカインのレベルを減少させた。	・MWCNTへのアル ミナコーティ ングは、ヒトの 単核細胞とマウ スの肺のサイト カイン産生を変 えるとともに、 肺線維症も減少 させる。 ・マウスの肺の、 線維形成の減少 はIL-18、IL-6、 OPN、TNF-αの mRNAの減少、 またはタンパク 質レベルと相関 していた。 ・in vitroでアルミ ナコーティング したMWCNTで 処理された単核 細胞のIL-6、 OPN、TNF-αの 減少したレベル は、同試料曝露 後のマウスの肺 におけるサイト カインの減少レ ベルを予測し た。 ・以上より、アル ミナコーティ ングは、吸入曝露 の後人間の肺線 維症に対して低

			(RPMI) 中)	＜測定/分析項目＞ BALF分析 肺線維症の評価 細胞生存度の測定 ELISA分析		いリスクを示す。
--	--	--	-----------	---	--	----------

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料 調整法	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
M W CN T -17	Kasai T, Gotoh K, Nishizawa T, Sasaki T, Katagiri T, Umeda Y, Toya T, Fukushima S Nanotoxicology. 2014 Mar; 8(2):169-78	Development of a new multi-walled carbon nanotube (MWCNT) aerosol generation and exposure system and confirmation of suitability for conducting a single-exposure inhalation study of MWCNT in rats (多層カーボンナノチューブ (MWCNT) エアロゾルの生成・暴露システムに関する新規開発とラットを用いたMWCNTの単回暴露吸入研究によるその適合性の確認)	■対象物質： MWCNT ・保土谷化学工業から購入 ・CVD法で製造されたままで使用 ■特性値-1 (メーカー仕様) ・C純度：99.8% ・アスペクト比：100超 ・名目平均径：40-90nm ■特性値-2 (本研究でのバルクMWCNTのSEM観察結果) ・平均長：5.7 μm；中央値4.8μm、範囲0.9-33.4μm ・平均幅：90.7nm	■試験生物： 雄 F344/DuCrIjCrIj ラット ・週齢：4週 ■試験方法： ・MWCNTエアロゾル吸入暴露 ・暴露方法：6時間/日(単回) ・暴露濃度：5mg/m ³ ・試験期間：暴露終了0、1、7、28日後に検死 ■観察/検査項目： ・肺の光顕微鏡検査 ・臨床徴候と死亡率(毎日) ・体重と摂食量(毎週) ・BALFの全細胞、好中球数 ・LDHとアルブミン系組織(BALT) ■エアロゾル発生装置 (「サイクロン篩法」) ・上下を絞った円筒容器にCNTを供給し、側下部から空気を吹き込み、上昇スパイラル気流によりCNTを分散し、重力	■質量濃度と調節・制御の安定性 ・MWCNTエアロゾルは、6時間着実に発生した。 ・目標濃度：実績濃度 0.2mg/ m ³ : 0.20±0.01mg/m ³ 、 1mg/ m ³ : 1.00±0.03mg/m ³ 5mg/ m ³ : 5.07±0.10mg/m ³ ・目標濃度ごとの質量空力中央径と平均個数濃度 (#/cm ³) 0.20 mg/m ³ : 1.33μm、25.9個 1 mg/m ³ : 1.04μm、123.0個 5 mg/m ³ : 1.21μm、657.7個 ・エアロゾル化MWCNTsの長さ：5.7μm、平均幅：130.5nm アスペクト比：44 ■臨床観察、BALF分析と病理所見 ・MWCNTに6時間暴露されたラットは、不規則な呼吸、呼吸困難、異常行動などの臨床徴候を示さなかった。 ・暴露された動物は、暴露期間の間も暴露後も時折身繕いや顔面洗浄行動を示した。動物は試験期間の間、発育異常を示さなかった。 ・対照群と暴露群の間で腫瘍の相違は見いだされなかった。 ・6時間暴露終了時では、肺のほとんど全てのMWCNTはナノスケールの繊維で、肺のMWCNT繊維の形態は、吸入室のそれと同様だった。 平均長：8.1μm (中央値6.8μm, 範囲：0.7-36.5 μm) 平均幅：100.3nm (中央値88.1 nm, 範囲：42.4-505.1 nm) ・好中球の数は、0日、1日で有意に増加し、その後7日、28日後で減少した。LDHとアルブミンは、暴露後1、7、28日で、対照群との比較で有意に上昇した。 ・MWCNTsは、暴露群の肺(気管支と肺胞腔と肺胞壁)で、黒色の孤立した繊維状に堆積していた。 ・いくつかの遊離繊維が気管支と肺胞腔で見いだされたが、MWCNTは主として肺胞マクロファージ内で検出された。 ・長いMWCNT繊維は、暴露後28日まで肺胞腔で観察された。 ・BALTにおけるMWCNT沈着は、暴露後1、28日で見いだされた。そのレベルは時間とともに増加した。 ・初期段階の肉芽腫性変化は、暴露28日後に肺で観察された。	・MWCNTを用いたラットの吸入暴露研究を容易にするために、独自のサイクロン大気篩エアロゾル生成・暴露システムを開発した。 ・その結果、優れたサイズ分布を有する 0.2-5mg/ m ³ MWCNTエアロゾルを、迅速なフィードバック制御で6時間安定して発生できることを確認した。 ・性能試験と最終的な試験の結果は、OECDガイドラインによって要求される基準を大部分満たして、エアロゾル生成と暴露システムが2～13週の吸入研究に使用できることを示した。 ・開発した暴露シ

			・アスペクト比：64	と遠心力で分級し、出口上部に設置したフィルターを通過したエアロゾル粒子のみを吸入チャンバーに供給する。	それは、MWCNTを食菌した肺胞マクロファージの集合様の外観を有した。	システムは、この研究に适当である。
--	--	--	--	---	-------------------------------------	-------------------

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調 整法 /試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
M W CN T -18	Girtsman TA, Beamer CA, Wu N, Buford M, Holian A Nanotoxicology. 2014 Feb;8(1):17-27	IL-1R signalling is critical for regulation of multi-walled carbon nanotubes- induced acute lung inflammation in C57Bl/6 mice (IL-1R信号 は、多層カーボン ナノチューブによって C57Bl/6マウス に誘起された 急性肺炎症の 制御に重要である)	■対象物質：2種 ①低 Ni-MWCNT (LN-MWCNT) ・ Ni : 2.5% ・ MK Impex Corp, Mississauga, ONより購入 ②高 Ni-MWCNT (HN-MWCNT) ・ Ni : 5.54% ・ Sun Innovations Inc., Fremont, CA, USAより購入 ■粒子特性 ・凝集粒径と電位 (分散媒中) : LN- -MWCNT : 682nm、 -11.3mV HN-MWCNT : 429nm、 -12mV ・ HN-MWCNT は、45nmと 690nmにピーク をもつ二頂	■試験生物：2種 A)Wildtype C57BL/6 (WTマウス) B)IL-1R-/-マウス ・ 月齢：双方とも2 か月 ■試験方法： ・ 暴露方法：口頭咽 頭吸引 ・ 分散媒：0.6mg/ml マウス血清アルブ ミン、 0.01mg/ml1,2-ジ パルミトイル-sn- グリセロ-3-ホス ホコリンを含む PBS) ・ 投与量：50μg ・ 懸濁液量：30μl ・ 懸濁液濃度：1.67 mg/ml ・ 試験期間：暴露後 28日 ■測定・分析項目 ・ 全肺洗浄液 (WLL; (Whole lung lavage) ・ 肺機能検査 ・ 組織学 ・ サイトカイン分析 ・ ヒドロキシプロリン 分析 ・ 明視野鏡検	MWCNTは、急性の肺炎症を誘起する ・ LN-またはHN-MWCNT処理WTマウスのWLLの全細胞数は、対照群との対比で増大し、急性炎症反応を示す。 ・ HN-MWCNT処理IL-1R-/-マウスでは、対照群との対比で全細胞数は増加した。しかし、増加はWTマウスより少なかった。 ・ LN-/HN-MWCNT処理WTマウスの気道への多形核白血球と好酸球の流入は、IL-1R-/-マウスでは減少した。 ・ IL-1R-/-マウスのAMは、WTマウスのAMと同様の粒子取り込みを示した。 ・ これは、これらの炎症反応は、IL-R-/-AMが粒子と反応しない、あるいは、粒子を取り込めないことに起因するのではなく、むしろIL-18の信号発信の損失に起因することを示唆する。 ・ LN-と比較してHN-MWCNT暴露によって、好中球はWTマウスでは大きく増加し、IL-1R-/-マウスでは劇的に減少した。 <u>MWCNTは、WLL液に炎症誘発性メディエーターを誘起する</u> ・ WTマウスでは、LN-とHN-MWCNT暴露によって、炎症誘発性サイトカインIL-18、TNFα、IL-6、ケモカインMCP-1の分泌が増大した。 ・ IL-1R-/-マウスでも、LN-とHN-MWCNT暴露によって、WLLのIL-18、IL-6、TNFαは増大した。 <u>MWCNTによって誘発されたコラーゲン堆積と肉芽腫形成</u> ・ HN-MWCNT処理後7日のIL-1R-/-マウスの肺は、DMまたはLN-MWCNT暴露マウスと比較して、コラーゲン堆積の増加と気管支周囲および血管周囲の炎症を示した。 ・ 暴露後7日のマウスと比較して、暴露後28日では、進行性のコラーゲン堆積が、IL-1R-/-マウスの肺で観察	・ MWCNTは、WTマウスに重篤な急性肺炎症を誘起する。 ・ それはIL-1R-/-マウスでは急速に減少する。 ・ WTマウスでは、急性炎症反応の回復が観察された。 ・ 一方、IL-1R-/-マウスでは、MWCNT暴露後28日で、好酸球流入は顕著に増加し、同時に肺循環抵抗も増大した。 ・ これらは、IL-1R信号は、マウスの肺におけるNi-MWCNTへの急性相炎症反応の除去に重要で、場合によっては走化因子MCP-1とKC発現の減少に起因することを示唆する。 ・ これらの材料の

			径分布を示した。 • 双方とも、屈曲とよじれ(kinks)を含むからみ合った構造であった。	• 好酸球ペルオキシダーゼ分析	された。 <u>MWCNTは、肺機能の変化を誘起する</u> • HN-MWCNTの点滴注入後24時間で、WTマウスは高められた気道反応亢進によって、メタコリン誘発試験に応答した。これは、肺抵抗の増大によって示された。 • 対照的に、IL-1R-/-マウスはWTマウスとの対比で、HN-MWCNTに対する急性の応答が減少した。これは、メタコリン誘発試験によっては、肺抵抗値が増大しなかったことによって示された、 <u>Ni-MWCNTは、IL-1R-/-マウスでは減少した急性の気道好酸球増加症をWTマウスに誘起する</u> • DM処理マウスと比較して、HN-MWCNT処理WTマウスのWLLへの好酸球の流入は顕著であった。 • 28日で、HN-MWCNTは、IL-1R-/-マウスの好酸球流入を増加させた。 • 一方、好酸球は、28日にHN-MWCNTまたはDM処理WTマウスで検出されなかった。	毒性学的評価を続ける必要がある。 • MWCNTへの暴露からの急性応答とその回復において、インフラマソーム活性化は重要である。
--	--	--	--	---	--	--

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
MW CNT -19	Dong C, EIdawud R, Sargent LM, Kashon ML, Lowry D, Rojanasakul Y, Dinu CZ Environ Sci Nano. 2014 Dec 1; 1(6):595-603	Towards Elucidatin g the Effects of Purified MWCNTs on Human Lung Epithelial cells (ヒト肺上 皮細胞に及 ぼす精製 MWCNTの 影響の解明 に向けて)	■対象物質：MWCNT ・ Nanolab incより入手 ・ 硫酸+硝酸（容積比3:1） 処理によって精製（精製 MWCNT）。 ・ 精製条件：23℃×1h ■蛍光タンパク質による MWCNTsの機能化 ・ 精製MWCNT は、EDCと NHSを用いてAlexa-BSAま たはBSAを共有結合された （EDC-NHS 活性化 MWCNT） ・ EDC-NHS 活性化MWCNTs は、その後タンパク質水溶液 で培養された（タンパク質系 複合物） EDC:1-ethyl-3-[3-dimethyla minopropyl] carbodiimide NHS : N-hydroxysuccinimide ■粒子特性 ・ 精製によってMWCNTの形態 は変わらなかった。（SEM 分析） ・ 精製MWCNTの平均長さは未 精製のそれより81%短かつ た（それぞれ、792、4261nm） （AFM分析） ・ 精製MWCNTでは、Oを含む 官能基が確認された。 （ATR-FTIR分析） ・ DMEM媒体中では、精製 MWCNTは高度に分散して いた。これはおそらく カル	■試験生物：不死化ヒト気管 支上皮細胞（BEAS-2B） ・ 培養液：10% FBS、0.1% L- グルタミンと1%ペニシリン/ ストレプトマイシンを 含むDMEM媒体 ■暴露方法： ・ 暴露物質：以下の4種。た だし、②-④はコントロール ① Alexa-BSA-MWCNT複合 物 ② PBSに暴露 ③ ①相当量の遊離 Alexa-BSA ④ 機能化なしのMWCNT ・ 暴露濃度：24 $\mu\text{g cm}^{-2}$ ・ 暴露時間；24時間 ■測定/分析項目 <u>タンパク質積載</u> ・ 精製MWCNTsに結合され たタンパク質量分析 <u>分散度分析</u> ・ MWCNTとタンパク質機能 化MWCNTの分散度 <u>蛍光活性化された細胞ソー ティング (FACS)</u> ・ フローサイトメトリー <u>細胞活性</u> ・ 細胞活性度（暴露時間：24、 48、72時間） <u>細胞サイクル分析</u> ・ DNA含有量変化測定 <u>細胞機械的性質変化測定</u> ・ 細胞の弾性率、バネ定数 （FITC強度）	・ すべての対照群との対比で、① Alexa-BSA- MWCNT 複合物に 暴露された細胞は高い FITC 強度 を示した。 ・ 遊離Alexa- BSAに暴露された細胞 で観察された高い信号は、ラベル をつけられたMWCNTsの内在化 と一致した。これは、安定な MWCNTに固定された Alexa-BSAと比べて、その取り込 みによって生じたプロテアソーム の低下のため増加したAlexa-BSA 感受性による。 ・ 精製MWCNTに24、48、72時間暴 露された細胞の活動度は減少し た。この減少は、おそらく、ミト コンドリア・ストレスを始動させ る内在化されたMWCNTに起因 する。（ミトコンドリア・ストレ スは、細胞質Ca²⁺濃度の増加とミ トコンドリア浸透性移行膜孔 （MPTP）ポテンシャルの変化に 導く） ・ 精製MWCNTsに暴露された細胞 では、G1期（増殖開始）は増加（13 ±5.35%）、S期(DNA合成)は減少 （25±6.42%）した。 ・ G1期の増加は、DNA含有量、細 胞容積、mRNAとタンパク質合成 の変化と関連した。 ・ S 期の変化は、核酸とCNTの親和 性に基づく利用可能な細胞の DNAの減少と関連した。 ・ 対照細胞および暴露活細胞の全細 胞体の平均ヤング率は、それぞれ	・ 精製MWCNT への暴露は、ヒ ト肺上皮細胞 におけるミト コンドリア活 性、細胞の生体 機械的な特性、 細胞サイクル 進行に影響を 及ぼす。 ・ MWCNTへの 細胞の暴露と 関連する細胞 毒性と遺伝毒 性の相乗作用 が示唆される。 ・ それは細胞の形 質転換と、それ に基づく癌進 行を誘起する 可能性がある。

			ボン酸塩アニオンの形成、あるいは、流体力学サイズによるものと考えられる。		2.72 ± 0.96 、 $3.84 \pm 1.12 \text{ kPa}$ であった。 一方、核領域の平均ヤング率はそれぞれ1.58 ± 0.67、$2.20 \pm 0.59 \text{ kPa}$であった。	
--	--	--	--------------------------------------	--	--	--

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
CNTs-1,(S WCNT-4,M WCNT-14) polystyrene	Fröhlich E, Meindl C, Wagner K, Leitinger G, Roblegg E Toxicol Appl Pharmacol . 2014 Aug 4; 280(2):272 -284	Use of whole genome expression analysis in the toxicity screening of nanoparticles (ナノ粒子 の毒性スク リーニング における全 ゲノム発現 分析法の活 用)	■対象物質：4種 ①20、200nmカルボ キシル・ポリスチ レン粒子 (CPS20,CPS200) ・Invitrogenより入 手 ②20、200nmのポリ スチレン粒子 (PPS20,PPS200) ・Thermo Scientific より入手 ③短長 (0.5-2μm) 単層カーボンナノ チューブ (SCNT,1-2nm) ・Cheap Tubesより 入手 ④多層CNT (MCNT8,20,50) ・長さ～8nm、20～ 30 nm、50nm以上 の3種 CNTにcが付くも のは、 carboxylationし たもの ■特性値 ・0%FBSのDMEM 中では、10%FBS のDMEM中との 対比で、PPS20と CPS20の径は小 さく、ζ電位はよ り負であった。	■試験生物：ヒト内皮細 胞系EAhy926 ・培養液： 10% FBS、 2mML-グルタミン、 1%ペニシリン/スト レプトマイシンで補 充されたDMEM、 ■細胞の取り込み ・CPS20, CPS200, PPS20, PPS200の取 り込みは、赤の蛍光で ラベリングして、 CNTの取り込みは、 蛍光BSAでラベリン グして測定。 ■細胞中の局在 ・緑の蛍光でラベリン グされたCPS20, CPS200, PPS20, PPS200, CNTを使 用。 ■細胞毒性スクリーニ ング (ホルマザン・バイオ 還元) ・CellTiter 96水性非放 射性細胞増殖分析を 用いて実施 ■マイクロアレイ試験 試験生物：EAhy926細 胞 試験方法-1： ・暴露粒子と濃度：150、 200μg/mlのCPS20、 CPS200、 培養液：DMEM	■NPsの細胞の取り込みと細胞毒性 ・DMEM+10% FBS中の200μg/mlのPPS20へ の暴露とDMEM中の200μg/mlのCPS20へ の暴露は、24時間後に有意な細胞毒性を生 じた。 ・4時間後では、200μg/ml PPS20と200μg/ml CPS20粒子は生存度を低下させなかった。 ・0%FBSのDMEM中に懸濁されたPPS20粒子 は大きな細胞毒性を示した。 ・10μg/ml PPS20は、DMEM+10% FBS中の 200μg/mlのPPS20粒子と同程度に生存度を 減少させた。 ■全ゲノム発現分析 ・発現した遺伝子の数は、CNTよりポリスチ レン粒子の方が多かった。 ・内皮細胞に特有の遺伝子 (P-、E-セレクチン、 VWF、VCAM-1、GAADD45B、MAPK、 STAT、サイクリンA、B) は、ナノ粒子に よって発現しなかった。 ・エンドセリン1 (EDN1) はPPS20 (10% FBS)、CPS20 (200μg/ml) とSCNTc (50μg/ml) に暴露によって、減少した。 ■NP暴露によって発現される遺伝子 ・炎症応答とDNA損傷に關係する遺伝子は、 PPS20,CPS20,SCNTcによって増加した。 ・酸化ストレス関連の遺伝子を増加させたの は、PPS20だけだった。 ・CPS20とSCNTcは、アポトーシスと細胞サ イクルに關係する遺伝子を増加させた。 ・発現した遺伝子の最大数は、細胞死と生存、 細胞腫瘍と増殖、細胞間相互作用、血液学的 なシステム発現のカテゴリーに属していた。 ■細胞の分析による確証： インターロイキン分泌 ・IL-6分泌は、PPS20粒子→CPS20粒子	・(試験したナ ノ粒子によ って) 発現し た(遺伝子 の)機能は、 細胞実験の 結果とよく 関連づけら れた。 ・(培養媒体中 のFBSなど の)タンパク 質の存在は、 タンパク質 コロナの形 成と粒子凝 集を招き、細 胞毒性を緩 和した。その 際、遺伝子発 現過程の各 種のパター ンに変化は 無かったが 発現の数は 減少した。

			• PPS20との対比で、CPS20の径は大きく、ζ 電位はより負であった。 • 凝集していないCNTの平均長さは、217～446nmであった。 • SCNT、SCNTc、MCNT8cの凝集した束の長さは、543～816nmであった。	培養時間：6h 試験方法-2： • 暴露粒子と濃度： -10μg/ml のPPS粒子、 -20, 50μg/mlのCNT 培養液：DMEM+10% FBS 培養時間：24h	→50μg/mlのSCNTc順に増加した。 • IL-8分泌は、PPS20粒子→50μg/mlのSCNTc→CPS20粒子→50μg/mlMCNT20の順に増加した。 <u>酸化ストレス</u> • マイクロアレイ・データは細胞のストレスの存在を示した（保護遺伝子は活性化した）。 <u>アポトーシス</u> • CPS20（150、200μg/ml）とPPS20（FBS有りとなしのDMEM中で）は、アポトーシスのカテゴリーで遺伝子を減少させた。 • 抗アポトーシスの遺伝子BIRC3は、PPS20とCPS20への暴露によって増加した、 • 抗アポトーシス遺伝子BCL2A1は、SCNTcに対する暴露によって増加した、	
--	--	--	--	--	---	--

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物/殺与方法・ 期間試験方法	試験結果	結論
CNT s-2(MW CNT -4, CSC NT- 1)	Haniu H, Saito N, Matsuda Y, Tsukahara T, Usui Y, Maruyama K, Takanashi S, Aoki K, Kobayashi S, Nomura H, Tanaka M, Okamoto M, Kato H Int J Nanomedicine. 2014 Apr 17; 9:1979-90	Biological responses according to the shape and size of carbon nanotubes in BEAS-2B and MESO-1 cells (カーボン ナノチュー ブの形状と 寸法に応じ たBEAS-2B とMESO-1細 胞の生体応 答)	■対象物質：2×3種 1)多層カーボンナ ノチューブ (MWCNT) (3種； VGCF-X, VGCF-S, VGCF)；昭和電工 製 ・気相成長法で合成 ・長さ：3, 10, 8μm ・径：15, 80, 150 nm ・凝集径：4,417±401, 1,638±98, 1,660± 38nm 2) カップ積層型カー ボンナノチューブ (CSCNT) (3種； CS-L, CS-S, CS-M)；GSIクレ オス製 ・製法：記載なし ・長さ：20-80, 0.5-20, CS-M (CS-L, CS-S の中間) ・径：全て100 nm ・凝集径：2,029±79, 1,547±15, 1,833 ±201nm ・分散媒：0.1%ゼラチ ン含有PBS (水浴中超音波で 30 分分散処理)	■試験生物：2種 ① ヒト気管支上皮細胞系 (BEAS-2B) ・培養液：10%FBS補充 Ham's Nutrient Mixture F-12 ② ヒト悪性胸膜中皮腫細 胞系(ACC-MESO-1) ・培養液：10% FBS補充 RPMI1640 ■alarmarBlue (AB) アッ セイ 評価項目 i)細胞生存度 (AB分析に よる) ・粒子濃度：1、10、50 μ g/mL CNTs ・コントロール：0.001%と なるようにゼラチンを加 えた培養液で細胞培養 ii)血漿膜透過性(LDH放出 分析による) ・粒子濃度：10 μ g/mL CNT ・コントロール：CNTなし ・陽性対照：0.01%トリト ンX-100含有媒体で細胞 培養 iii) CNT取り込み (レーザ ー読み取り共焦点顕微鏡観 察による) iv) CNT取り込み (TEM観 察による) v)全活性酸素種 (ロス) /ス ーパーオキシド産生 vi)細胞内酸性度の評価	CSCNTは、MWCNTより低い毒性を有する ・BEAS-2B細胞に対するMWCNTの毒性は、 濃度依存性であったが、長さや径にはよら なかった。 ・BEAS-2B細胞に対するCSCNTの毒性は、 濃度と長さや径に依存した。 ・MESO-1細胞に対するMWCNTの毒性は濃 度によって変化して、BEAS-2B細胞より低 かった。 ・MESO-1細胞に対しては、CS-LとCS-Mは 最高濃度 (50μg/mL) 以外では毒性でなか った。 ・MWCNTは両細胞系でCSCNTより毒性だ った。 <u>BEAS-2B細胞はMWCNTにCSCNTより浸 透し易い</u> ・BEAS-2B細胞は、10μg/mLではCSCNTに 対するよりMWCNTに対する方が浸透性 だった。 ・MWCNTの間では、VGCF-Xに対する浸透 性が77%で最高だった (その後VGCF-S→ VGCFの順)。 ・CSCNTに対する浸透性はCS-M > CS-L > CS-S ・MESO-1細胞の浸透性は、2つのCNTに対 して30%以下であった。 ・2つの細胞型の浸透性は細胞毒性と同様の 傾向を示した。 ・MESO-1細胞がBEAS-2B細胞より10倍高 い濃度で粒子に暴露された場合でも、CNT 線維と凝集塊はリソソームと結合せず、細 胞質全体に分配された。 ・MWCNTはBEAS-2B細胞でROS産生を促 進する ・酸化ストレス・レベルの増加は、VGCF-X	・CNTに対する 細胞の応答を 評価した。 ・CSCNTは大き な表面積を有 するので機能 化に役立つ。 かつ、長さは ボールミルで 調整できる。 ・CSCNTはわず かに毒性であ るものの MWCNTより 生体適合的だ る。 ・このため、ナ ノ生体適合物 質として大き な潜在性を有 する。 ・CNTの細胞毒 性は、長さ、 径、凝集を含 む多くの因子 に依存する が、細胞によ っても変化した。 ・生体適合物質 としてCNTの 応用を考える とき、細胞型 ごとに生体適 合性を確認す

					に暴露されたMESO-1細胞で観察された。 • CNTsは、取り込まれると、即座に、リソソーム酸性化を誘起する • 1μg/mL VGCF、VGCF-SとVGCF-Xに暴露されたBEAS-2B細胞の酸親和性(acidotropic)プローブの蛍光強度の増大は、それぞれ、10.8%、7.5%と17.5%であった。同じ濃度のCSCNTでは、強度の増大は5%以下であった。	る必要がある。
--	--	--	--	--	--	----------------

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料 調整法/試験用量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
CN Ts- 3(M W CN T-1 3,S W CN T-3)	Clift MJ, Endes C, Vanhecke D, Wick P, Gehr P, Schins RP, Petri-Fink A, Rothen- Rutishauser B Toxicol Sci. 2014 Jan; 137(1):55-64	A comparative study of different in vitro lung cell culture systems to assess the most beneficial tool for screening the potential adverse effects of carbon nanotubes (カーボン ナノチュー ブの有害影 響可能性を スクリーニ ングするた めの最も有 効なツール を評価する 各種のin vitro肺細胞 培養システ ムに関する 比較研究)	■対象物質；3種 1)単層CNT (SWCNT) ・メーカー： Yangtze Nanotechnolog y (China) ・Tween 80で分散 2)多層CNT (MWCNT) ・メーカー：Cheap Tubes Inc. ・Pluronic F127で 分散 3)SWCNT懸濁液中 のすべての非線 維状物質(=微量 元素)(SWCNT P) (以上の試料の物性 は 全て Supplementary のTable に) ■陽性対照： 4)クロシドライト 石綿線維 (CAFs)； National Res. Inst. For Occup. Diseases,,South Africaから 5)標準ディーゼル 排気粒子	■試験生物：単一培養細胞3種 ①ヒト単球由来マクロファージ (MDM) ②単球由来樹枝状細胞 (MDDC) ③ヒト気管支上皮細胞系 (16HBE14o-) ■暴露方法： ・粒子濃度：0.005、0.01、0.02、 0.03、0.04mg/ml ・暴露時間：24時間、37℃、5%CO ₂ ■培養液： A)MDMとMDDC単一培養用： 10%FCS、1% L-グルタミン (L-G)、1%ペニシリン/ストレ プトマイシン (P/S) 補充 RPMI1640培養液 ・この培養液にはMDMとMDDC 単一培養の成熟促進のため、以 下を加えた。 -MDMには成長因子M-CSF -MDDCに成長因子GM-CSF + IL-4 B)16HBE14o-用：10% FCS、1% L-G、1% P/S補充MEM ・培養期間：7日 ■気道バリア上皮の3D三重の細 胞共培養モデル ・16HBE14o層を間に、上部に MDM層、下部にMDDC層が共 同培養された。(TCC-C; triple cell co-culture) ■測定項目： ・TEM電子断層撮影。 ・LDH放出。 ・腫瘍壊死因子；TNF- α 放出	■断層撮影によるNanofiber-細胞相互作用 ・SWCNTsが、0.03mg/mlの濃度で24時 間処理されたTCC-CのMDMで見いだ された。 ■細胞毒性 ・MDM、MDDC、16HBE 14o-の単一培 養で0.005～0.04mg/mlの濃度の SWCNT、MWCNT、CAF、DEPに24 時間暴露されたとき、いずれも、細胞 毒性を示さなかった ・TCC-Cでは、SWCNTsとMWCNTs は、濃度0.02mg/mlまで無毒だった。 ■炎症誘発性応答／TNF- α 放出 ・MDMとMDDCがMWCNTsに24時間曝 露されたとき、すべての濃度でTNF- α 放出は用量依存的に増加した。また、 濃度0.01～0.04mg/mlのSWCNT、 CAF、DEPに暴露されたときも、同様 の傾向が認められた。 ・IL-8放出 ・16HBE14o-が単一培養で濃度 0.02mg/mlまでのCAF、DEP、CNT、 MWCNTに24時間暴露されたとき、 炎症誘発性ケモカインIL-8の放出が 用量依存的に増加した。 ・濃度0.03と0.04mg/mlで、TNF- α タ ンパク質に関して、IL-8タンパク質 の同様の吸着パターンが観察され た。 ■還元GSH含有量 ・MDMとMDDCが単一培養で、0.01、 0.02mg/mlの濃度のMWCNTに暴露さ れたとき、細胞内の還元GSH含有量は 低下した。	・ヒト肺のシミュレーション に用いられる in vitro単一培 養と共培養の 間には、得ら れる生化学的 応答に相違が ある。 ・ナノ材料によ る有害影響の 研究に、単一 培養と共培養 のどちらが優 れているかは 言えない。 ・単一培養は、 ナノ材料暴露 による生死を 評価するには 十分である。 ・共培養は生体 内で起こる細 胞間相互作用 を考慮に入れ るので、ナノ 材料のin vitro 病理学に情報 を付け加えら れる。 ・多細胞系を用 いれば、ナノ 材料のリスク を全体的に評 価できる可能

			(DEP) ; SRM No.2975	・炎症誘発性ケモカイン ; IL-8放出 ・蛋白質吸着	・16HBE14o-が単一培養で、DEP、SWCNTs、MWCNTに暴露されたとき、検査されたすべての濃度 (0.005、0.01、0.02mg/ml) で、還元GSH含有量は低下した。	性があり、動物実験を置き換えるのに十分かもしれない。
--	--	--	------------------------	---	---	----------------------------

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整 法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
SW CNT -1	Fujita K, Fukuda M, Fukui H, Horie M, Endoh S, Uchida K, Shichiri M, Morimoto Y, Ogami A, Iwahashi H Nanotoxicology. 2014 Jun 9:1-12	Intratracheal instillation of single-wall carbon nanotubes in the rat lung induces time-depended changes in gene expression (ラットの肺 への単層カー ボンナノチュー ブの気管内 点滴注入は、遺 伝子発現の時 間依存的变化 を誘起する)	■対象物質： SWCNT ・触媒化学蒸着方 法によって合成 ・Nikkiso Co., Ltd から入手 ・幾何平均直径： 1.8nm ・比表面積： 877.7m ² /g ■試験SWCNTの 調製 ・入手SWCNTを エタノール水溶 液中で遊星ボー ルミルでミリン グ処理し親水化 してバンドルを 解砕する。次に フラクトース加 えてさらにミリン グした後、メン ブレンフィル ターでろ過し洗 浄し、0.1%トリ トンX-100水溶 液とする。 ・分散SWCNT中 のSWCNTの幾 何平均直径と長 さ： 直径：44nm（範 囲15-152nm） 長さ：0.69μm	■試験生物：雄ウィスターラ ット ・週齢：9週 ・体重：270g（点滴注入前） ■投与方法：気管内点滴注入 （単回） ・投与量：（2水準） ラットあたり0.2、0.4mg SWCNT /0.4mL溶媒 ■実験計画 ・溶媒：0.1%トリトンX- 100 水 ・コントロール： 0.1%トリ トンX-100水溶液のみの投 与 ・試験期間：点滴注入後、3,7, 30, 90, 180, 365,754日で 解剖 ■観察/調査項目： ・ラットの生存度と一般状 態：毎日一回 ・体重：点滴注入前、暴露後 3,7,30,90,180,365,754日 ・肺、肝臓と脳の重量：3、7、 30、90、180、365と754日 ・解剖学的観察、組織病理学 的観察 ・遺伝子発現マイクロアレイ 分析	体重／肺重量と一般状態 ・0.4mg群の3日、180日、365日で体重の 有意な変化が観察された（対照群）。 ・異常行動や規則な呼吸などの臨床徴候、 ならびに肺重量の違いは全処理群で認め られなかった ・死亡数は、対照群で1、0.2mg群で2、0.4mg 群で3匹であった。 解剖学的観察 ・SWCNT凝集体は各処理群の肺の気管支 と細気管支周辺で観察された。 ・これは、各群とも時間依存的に減少した。 ・肺胞マクロファージによって貪食された 細密な粒状物質は、各処理群の肺胞、肺 胞壁、細気管支で観察された。 ・炎症性細胞浸潤は各処理群で、わずかに 観察された。 ・各処理群の90日で、肺胞マクロファージ を含む肉芽腫がSWCNT凝集体の周辺で 観察された。 遺伝子オントロジー（GO）解析 ・炎症反応に関係する多数の遺伝子は90日 または180日まで大きく発現が増加した （遺伝子発現プロファイリングによる）。 その後、遺伝子発現パターンは365日で 劇的に変化し、炎症反応に関係する発現 が増加した遺伝子の数は減少した。 このことは注入後90から180日まで急性 の肺応答が持続し、組織病理学的に遷移 領域が存在していることを反映してい る。 ・遺伝子Ctsk、Gcgr、Gpnmb、Lilrb4、 Marco、Mreg、Mt3、Slc2604、Sppl、 Tnfsf4とTrem2の発現レベルは、注入後	・SWCNTの気管 内点滴注入で あり得る機序 を提案するた めに、組織病 理および免疫 組織化学的知 見と共に、遺 伝子発現の時 間依存的变化 を用いたCNT 毒性を調査す る方法を示し た。 ・遺伝子発現プ ロファイリン グは毒物学的 エンドポイン トの統合に向 けての有益な 洞察を提供す る。 ・遺伝子発現プ ロファイリン グ・データは 同じ種の多数 の異なる器官 に適用でき て、in vivoと in vitroの試験 をつなぐ橋を 提供するかも しれない。 ・GO解析を用い

			(範囲 0.18-3.3μm)		365日まで用量依存的かつ持続的に増加した。 • Atp6v0d2、Lpo、Mmp7、Mmp12とRnase9の発現レベルは、注入後754日まで有意に増加した。	た遺伝子発現プロファイリングは、様々な種間の比較分析のために有益であり得る。
--	--	--	--------------------	--	---	---

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整 法 /試験用量	試験生物投与方法 ・ 期間/試験方法	試験結果	結論
SW CN T-2	Wang LR, Xue X, Hu XM, Wei MY, Zhang CQ, Ge GL, Liang XJ Small. 2014 Jul; 10(14): 2859-69	Structure- dependent mitochondri- al dysfunction and hypoxia induced with single-walle d carbon nanotubes (単層カー ボンナノチ ューブによ って誘起さ れる構造依 存的ミトコ ンドリア機 能不全と低 酸素症) 前報 ; L.R.Wang et al.; Nanoscale 2012,4(13),3 99	■対象物質 : SWNT ・DGU法によって 4つの画分に使 用。 (DGU:密度勾配超 遠心分離 ; density gradient ultra- centrifugation) ■DGUソーティ ング ・超遠心分離器を 用いて、SWNT を密度別に分別 するもの。 ・原料 : 高度に分 散した SWNT-DOC- Rh123 システム (DOC:デオキシ コール酸ナトリ ウム、Rh123 : ローダミン123 (共同表面活性 物質) ; 著者前 報 ・分別後 : 4種 -画分A : 単独分 散、径 : 1nm -画分B : 単独分 散、径 : 2nm -画分C : 凝集体、 幅15nm (凝集ナ ノ粒子数5-10 ;	■試験生物 : 2 種 ①ラット気管上皮 (RTE) 細胞 ②ヒト上皮癌 (KB) 細胞 ■暴露方法 : ・培養液 : 記載な し ・培養時間 : 48h ・粒子濃度 : 0.5-10 μ g/mL ■レーザー走査共 焦点顕微鏡 (LSCM) 像によ るミトコンドリア 機能変化の測定 : ・陽性対照 : アポ トーシス誘起試 薬 ; carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazine (CCCP) ・SWCNT暴露後、 5,5',6,6'-tetrach loro-1,1',3,3'-tet raethylbenzimi -dazoly carboc y anine iodide(JC-1)染 色し、蛍光測定 ■測定・分析項目 ・酸素フラックス	RTE及びKB細胞における4つのSWNT画分の細胞毒性 ・RTE細胞に対して画分AとBは、5 μ g/ml SWNT培養で、 明白な細胞毒性を誘起しなかった。一方、画分CとDは細胞 毒性を約50%減少させた。 ・KB細胞では、同様の傾向が1 μ g/mlのより低い濃度で観 察された。 ・細胞生存度の結果に反して、画分CとDではなく画分Aと Bで培養後強いラマン信号がRTEとKBの両細胞で観察 された。 不規則なミトコンドリア呼吸に関する4つのSWNT画分に よるミトコンドリア機能障害 ・RCC-I活性は画分Cでの処理に反応して呼吸の最大の減少 を示した。すなわち、コントロールとの対比でRCC-I活 性はおおよそ25%低下した。 ・一方、画分Aは明白な変化を示さず、画分BとDは、RCC-I 活性をわずかに高めた。 ミトコンドリア酸素消費と低酸素症関連のタンパク質に及 ぼす4つのSWNT画分の影響 ・画分A,B,C,Dの培養によってミトコンドリアは、稜(crista) は部分的に消失して、ふくらんで、からっぽのように観 察された。これは、構造依存的低酸素症変動を示す。 ・RTE細胞では、画分CとDでの培養によって、画分A、B とコントロールと比較して、O ₂ の消費はそれぞれ25%、 20%低下した。 ・KB細胞では、画分CとDでの培養により、画分A、Bとコ ントロールのそれらと比較して、O ₂ の消費はそれぞれ 35%、30%増加した。 ・RTEとKB細胞の画分CとDの処理によってHIF-1 α の高い 発現が見いだされた。これは、より多くの低酸素症状 況を示す一方、HIF-1に応答して低下したミトコンドリア 活性と一致した。 4つのSWNT画分の構造依存的メカニズムはミトコンドリア 機能障害と低酸素症に関してもたらす ・画分AとBは、より少ないミトコンドリア機能障害と低酸	・SWNTを径、凝集 性、構造健全性に 基づいて4つの画 分に分別する DGU法を開発し た。これによって、 SWNTの構造依 存的生体効果を調 査することが可能 になった。 ・ミトコンドリア機 能不全と低酸素症 には、SWNTの凝 集と構造健全性が 重要な役割を果た す。 ・完全なSWNTで は、凝集は、不規 則なミトコンドリア とアポトーシス 誘発性タンパク質 の開始(initiation) によって、ミトコ ンドリア機能不全 と低酸素症を誘起 して、より毒性で あった。 ・一方、不完全な SWNTでは、同様の 影響は主に ROSの増加に依 存した。 ・本研究は、高い生 物学的安全性、少

			SWCNTバンドル形成) -画分D：凝集体、幅20nm (凝集ナノ粒子数5・10) (多数の欠陥のため構造健全性は不十分)	測定 ・RCC-1活性エリサ分 - 析 ・4.8 H1F-10、PDK1とBNiP3のためのウエスタンブロット法 (Wb)	素症を示した。 ・それは、ETCとROSに対する影響を僅かに示したが、OXPHOSと解糖のバランスは変えず、最終的により少ない細胞死を誘起した。	ない生物学的反応性、高い腫瘍死滅率を有する SWNTの開発に向けての指針を提供する。
--	--	--	---	--	---	--

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質試料調整法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
C60-1	Chen L, Miao Y, Chen L, Xu J, Wang X, Zhao H, Shen Y, Hu Y, Bian Y, Shen Y, Chen J, Zha Y, Wen LP, Wang M Biomaterials 2014 Nov; 35(34):926 9-79	The role of low levels of fullerene C60 nanocrystals on enhanced learning and memory of rats through persistent CaMKII activation (CaMKIIの 持続的活性化によるラ ットの学習 と記憶の強化に関する 低レベルフ ラーレンC60 ナノ結晶の 役割)	・ナノ粒子調製と特性 対象物質：2種 1)フラーレンC60ナ ノ粒子 ・純度：99.9% ・Bucky USAより 2)ダイヤモンド粒子 ・Sigma-Aldrichより ・双方とも水性懸濁 液として供試。 ・濃度： 1)：40μg/ml、 2)：1mg/ml ナノ粒子の物理的性質と特性 ・ナノC60はおよそ 100nmの粒径で 円形あるいは、矩 形・ナノC60の流 体力学的サイズ は、少なくとも10 日間、DMEMまたは10% BS補充 DMEM中で安定 ・C60ナノ粒子の一部は凝集していた。 ・ナノC60のミ セル化は、10% FBS補充 DMEM中で、1日 目の-19.13mVから10日目の -11.15mVに上昇。	■試験生物： ・成SDラット；体重180-250g ■試験方法 ・投与方法：IP注射 ・投与期間：1回/日×10日（長期 投与） ・投与量：320μgナノC60/kgbw ・コントロール：食塩水のみ ・カニューレによる海馬内注入も 実施（DG域またはCA1領域） ・注入物質：ナノC60、ナノ・ ダイヤモンド、人工脳脊髄液 (ACSF) ・注入量：各20ng ■試験項目/採取組織 生体内電場電位記録法 ・電場電位の記録は、麻酔下のラ ット海馬のDGとCA1域を対象 スライス標本：日齢14-16日のラ ット（雄、雌）の脳を採取 モリス水迷路 ・空間記憶に関するナノC60の影響は、モリス水迷路試験で評価 プライマリ・ニューロン培養 ・出産当日に子ラットから海馬を 取出 CaMKIIキナーゼ分析 ・海馬は、CycLex CaMKII assay キットでCaMKII活性を測定。 ウェスタンブロット法分析 ・ニューロン細胞のリン酸化されたタンパク質レベルを分析 HPLCとMALDI-TOF分析 ・IP投与の後のラットのナノC60 の体内分布を測定。	・細胞毒性評価 ・試験生物：HT22細胞（ニューロン細胞系） ・対象物質：ナノC60とH ₂ O ₂ （陽性対照） ・暴露濃度：ナノC60 0.08、0.04、0.2μg/ml ・測定項目：細胞生存度 ・ナノC60の有意な毒性は、最高0.2 mg/ml の濃度で観察されなかった。 ・対照細胞と比較して、生存細胞の数は、 1mMの濃度のH ₂ O ₂ 処理で有意に減少した。 ・明白な壊死はナノC60処理HT22細胞で 観察されなかったが、H ₂ O ₂ （1mM）処理ではPI陽性細胞数が増加した。 ・空間学習と記憶に関するナノC60の影響 ・ナノC60のIP注射を受けたラットは、注入 2日目以降モリス水迷路からの脱出時間が 短くなった（対対照動物）。 ・ナノC60処理ラットは、より多くのプラ ットフォーム横断回数と目標四分円部 (target quadrant)への高い到達度を示した（対対照動物）。 ナノC60によるLTP強化 ・LTP long term potentiation：長期強化 ・20μg/kg体重/日×10日のナノC60注射を受けたラットでは、高頻度刺激（HFS）は、 CA1で興奮性シナプス後電位（EPSP）の 強化を誘発した。 ・ナノC60処理の後、海馬のCM領域でシナ プス密度の変化は見られなかった。 ・ナノC60は、DG領域のLTPも有意に強化した。 ・C60は腎臓、肝臓、脾臓、脳などの組織で 確認。 ナノC60による持続的なCaMKII活性化 ・FRET分析は、ナノC60が培養ニューロン	・ナノC60は、 非常に低い用量で 海馬依存的なLTP と空間記憶を強化 する予想 外の能力 を備えている。 ・これは、お そらく、海 馬の CaMKIIの 持続的な 活性化を 通して発 現する。

			水懸濁液中のナノ・ダイヤはおよそ10nmの粒径であった。	電子顕微鏡法 内部移行したナノC60の検	に入ることができて、CaMKIIの構造変化と持続的な活性化を誘発したことを証明した。 ナノC60の一回のIH注入によって、CaMKIIのCa²⁺/CaM-自律キナーゼ活性は有意に強化された。	
--	--	--	--	---	---	--

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
C60-2	Wang F, Jin C, Liang H, Tang Y, Zhang H, Yang Y Environ Toxicol Pharmacol. 2014 Mar;37(2):65 6-61 。	Effects of fullerene C ₆₀ nanoparticles on A549 cells (A549 細胞に およぼすフラ ーレン C ₆₀ ナノ 粒子の影響)	■対象物質：フラ ーレン C ₆₀ ナノ粒子 (C ₆₀ NPs) ・純度：99.9% ・シグマアルドリッ チ社から購入 ■C ₆₀ NPsの特性・ 径：150±50nm ・DMEM中で凝集 (超音波破壊後)	■試験生物：A549細胞 ・細胞培養液：含、10% FBS、100U/mlペニシリ ン、100 µg/mlストレプト マイシンDMEM ・暴露濃度：12.5、25、50、 100、200µgml ・暴露時間：6時間 ・コントロール：C ₆₀ NPs なしの培養液 ■観察・測定項目 ・超微細構造観察 ・細胞生存度測定 ・ROSとGSHの測定 ・細胞内ATG16L1の測定	■A549細胞の超微細構造 ・C ₆₀ NPsは、A549細胞に直ちに内在化さ れた。 ・ただし、細胞質に局限されていた。 ・ミトコンドリアは肥大していた。 ・クリステは可視だった。 ・他の細胞小器官は正常だった。 ・C ₆₀ NPsは、ミトコンドリアや核では見 られなかった。 ・C ₆₀ NPsは細胞中で膜で包まれていなか った。 ・細胞内には、オートファゴソームも見ら れた。 ■細胞生存度 ・C ₆₀ NPsは、細胞生存度を減少させなか った。(CCK-8分析) ■細胞内ROSとGSHの決定 ・C ₆₀ NPsに暴露されたA549細胞のDCF蛍 光強度は、濃度依存的に増加した(対照 群の蛍光強度は有意でなかった)。 ・これは、C ₆₀ NPsに反応してROS生成が 生じていることを意味する。 ・細胞内GSHレベルも濃度依存的に増加し た。 ■細胞内ATG16L1レベル ・C ₆₀ NPsに暴露されたA549細胞では、 ATG16L1が用量依存的に増加した (ATG16L1：細胞自食の指標)。	・C ₆₀ NPsは、本 研究の範囲内 では、生物学的 に相当に安全 である。 ・C ₆₀ NPsは A549細胞に直 ちに内在化す るものの、直接 的な毒性をほ とんど示さな かった。 ・C ₆₀ NPsに暴露 されたA549細 胞のROSは増 加した。 ・一方、グルタチ オン還元酵素 活性は、さらに GSHを生成し て細胞の酸化 還元平衡を維 持するために おそらく活性 化した。 ・フラーレン・ナ ノ粒子の存在 下で細胞の生 存度を最大に することを目 的とした自己 貪食応答も検 出された。

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
C60-3	Lehto M, Karilainen T, Róg T, Cramariuc O, Vanhala E, Tornaueus J, Taberman H, Jänis J, Alenius H, Vattulainen I, Laine O PLoS One. 2014 Dec 4; 9(12):e11449 0	Co-exposure with fullerene may strengthen health effects of organic industrial chemicals (フラーレンとの同時暴露は、有機工業化学薬品の健康影響を強化するかもしれない)	■対象物質： 1)昇華C₆₀フラーレン (99.95%) (以下、C₆₀) ・Materials Technologies Research から 2)アセトフェノン (99%) 3)ベンズアルデヒド (99%超) 4)ベンジルアルコール (99%) 5)m-クレゾール (99%) 6)トルエン(99.9%) ・2)以下はシグマアルドリッチから入手。 ■フラーレンとフラーレン懸濁液の特性 ・C₆₀中に、酸化C₆₀、C₇₀、他のフラーレン種の不純物は認めず。 ・DLSによる懸濁液中のC₆₀凝集体の平均径は、有機化合物の有無で差はなかった。 ・全ての懸濁液でC₆₀凝集体の粒度は、	■試験生物：ヒト単球白血病細胞系列THP-1；THP-1は、100nMホルボール12-ミリスチン酸塩13-酢酸塩補充10% FBS/cRPMIでの培養によって、マクロファージ類似の表現型に分化した。 ■暴露方法： ・cRPMI：2mM GlutaMAX 1、10mM HEPES、50μM β-メルカプトエタノール、50U/mL ペニシリン、50μg/mL ストレプトマイシン補充RPMI 1640 ・2% BSAを含むcRPMI中にC₆₀を分散させ懸濁液の原液(1mg/mL)を調製。 ・懸濁液の一部は、暴露の前に0.45μm フィルターでろ過し使用。 ・濃度：-C₆₀：200μg/mL ・アセトフェノン、ベンズアルデヒド、ベンジルアルコール、トルエン：10mM ・m-クレゾール：5mM、 ■分析方法 ・フーリエ変換イオン・サイクロトロン発振質量スペクトロメトリー ・動的散乱とζ-ポテンシャル測	■フラーレンの細胞への取り込み ・有機化合物有りと無しとも、C₆₀懸濁液のC₆₀はヒトTHP-1由来マクロファージに取込まれた。 ・取込まれたC₆₀は細胞内で径4μmに達する大きな凝集体となっていた。これは、有機化合物ありとなしとも C₆₀凝集体は細胞の中に止まること、凝集体は1桁大きくなることを意味する。 ■フラーレン懸濁液の急性細胞毒性 ・C₆₀懸濁液のLDH放出は有機化合物群と比較して30- 50%だった (トルエンを除く)。 ・純粋なトルエンは、1%未満のLDH放出増だった。 これはサンプル調製と細胞への暴露の間のトルエンの蒸発に起因するかもしれない。 ・本研究におけるC₆₀の濃度は、高レベル職業的吸入暴露に対応する。 ・C₆₀は未濾過懸濁液のすべての化学物質の急性細胞毒性をわずかに増加させた。しかし、共存影響はベンズアルデヒドのみ有意だった。 ・ベンズアルデヒドの細胞毒性の増加は14%で、純粋なC₆₀の細胞毒性より大きい。ベンズアルデヒドの細胞毒性の陽性共存影響は、ろ過した懸濁液で消失した。 ・ろ過したm-クレゾールを有する液で5%の負の共存影響が観察され、m-クレゾールがC₆₀と共存するときは単独の場合より細胞毒性が少ないことを意味する。 ■フラーレン懸濁液の免疫毒性 ・C₆₀は、有機化合物の免疫毒性に対して、有意な共存影響を生じなかった。 ・IL-18とTNFα分泌のC₆₀による増加の最高値	・職場環境における同時暴露を模擬したが、おそらく有機化合物とC₆₀の間の短い相互作用時間のため、観察された共存影響はわずかであった。 ・MDシミュレーションは、有機分子は水環境フラーレンと共凝集することを示した。これは、実験結果と一致した。 ・C₆₀クラスターは、親水性有機分子より多くの疎水性有機分子を含むかもしれない。 ・共凝集体は、ろ過懸濁液における疎水性化合物の細胞毒性の増加を説明する。

			200 nm程度であった。 有機化合物なし（純粋）の懸濁液中のC₆₀凝集体のζ-電位は、有機化合物との混合懸濁液の場合より少し陽性だった。一方、混合懸濁液中では、互いに他と異ならなかった。	定 - 液体クロマトグラフィ質量スペクトロメトリー - 透過電子顕微鏡検査 - 細胞毒性分析／免疫毒性分析 - 分子動力学(MD)シミュレーション	は、未ろ過懸濁液のベンジルアルコールで観察されたが、ろ過した懸濁液では消失した。ろ過懸濁液で最も高い陽性共存影響は、アセトフェノンで観察された。 ■MDシミュレーション：実験と一致した。 有機分子は水環境においてフラーレンと共凝集する。このC60クラスターは、親水性有機分子よりも疎水性分子の方をより多く含む。	- 他の化学物質とフラーレンの同時暴露は健康影響を引き起こすかもしれない。 - 以上の結果は、フラーレンの環境への暴露にも適用できる。
--	--	--	--	---	---	--

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
CNF, SWCNT, asbestos	Shvedova AA, Yanamala N, Kisin ER, Tkach AV, Murray AR, Hubbs A, Chirila MM, Keohavong P, Sycheva LP, Kagan VE, Castranova V Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2014 Jan; 306(2): L170-82	Long-term effects of carbon containing engineered nanomaterials and asbestos in the lung: one year postexposure comparisons (肺における含炭素ナノ材料とアスベストの長期的影響: 暴露後1年の比較)	■対象物質: 3種 ① 炭素ナノ線維CNF - Pyrograf Productsから入手。 - 気相成長法によって合成後、3,000℃の熱処理によってFeを除去 ② SWCNT: - 高圧CO不均化法(HiPco法)によって製造後、酸処理によって触媒金属を除去 - Unidymから入手 ③ UICC標準クロシドライト・アスベスト 粒子特性 - PBS懸濁液中では、SWCNTはナノ・ロープ様、あるいは、μm径の絡み合った形で凝集していた。 - CNFとアスベストは、懸濁液中で分散かつ安定して存在した。 ■特性値 (左から順に SWCNT、CNF、アスベストの値) - C: 99.7、98.6、- % - Fe: 0.23、1.4、18% - 粒径: ~65、80~160、160~800nm - 長さ: 1-3、5~30、2-30μm、	■試験生物: 特定病原体フリー雌C57BL/6マウス - 週齢: 8-10週 - 体重: 20.0g (試験開始時) ■投与方法: 2種 A) 咽頭吸引 - 投与量 (μg/マウス) - CNF: 40、120 - アスベスト: 120 - SWCNT: 40 - コントロール: 無菌PBS - 測定項目: 細胞数、LDH分析、タンパク質、サイトカイン・レベル B) 全身吸入暴露: - 対象物質: SWCNTのみ 5mg/m³で5時間/日×4日 - 肺への負荷: 5μg - コントロール: 大気 - 試験期間: 最後の暴露後1年 ■評価項目 - 炎症: BAL液中の全細胞数、細胞差とサイトカインの蓄積 - 肺毒性: 無細胞BAL液のLDH活性、タンパク質濃度の上昇 - 線維形成性: コラーゲン堆積 - 組織病理学 - 肺核学的分析(lung karyological assay)	■肺炎症と損傷の特徴づけ - 肺負荷40μgのSWCNT咽頭吸引の1年後で、急性の炎症は認められなかった - 肺負荷40μgのCNF暴露では、全BAL細胞、AM、リンパ球、多形核白血球は、対照群との対比で有意に増加した。 - より高い肺負荷 (120μg) のCNFまたはアスベストの咽頭吸引は、すべての細胞の炎症マーカーの大きな上昇を誘起した。 - 咽頭吸引暴露群の全てで、肺コラーゲンは対照群との対比で、有意に増加した。その程度は、SWCNT > CNF = アスベストであった、 - SWCNT吸入1年後で、気管気管支のリンパ節の肉芽腫性気管支間質性肺炎 (granulomatous bronchointerstitial pneumonia) と肉芽腫性リンパ腺炎が見られた。 ■K-ras 突然変異 - 肺負荷5μg SWCNT吸入では、肺負荷40μg の吸引より大きく突然変異が増加した。 - 同じ肺負荷 (40μg) のCNFの吸引では、クラス突然変異 (K-ras mutations) を誘起しなかった。しかし、120μgでは、対照群より50%多いコドン12 (codon 12) の突然変異を発生させた。 - アスベスト吸引では、120μgでも突然変異は検出されなかった。 ■核学的分析 - 肺負荷5μgのSWCNT吸入では、肺細胞における小核と小核プラス突出の有意な	- SWCNT、CNF、アスベストとも暴露1年後に肺腫瘍の増加は見られなかった。 - SWCNTとCNFでは、K-ras 腫瘍遺伝子の突然変異の増加があり、アスベストではなかった。 - 吸引投与よりも吸入の方が炎症、線維症、遺伝毒性が有意に大きかった。 - SWCNT、CNFとアスベストの長期的肺毒性は、それらの化学組成だけでなく、比表面積や暴露のタイプによって規定される。

			・比表面積：1040, 35 ～45、8.3m²/g	・ K-ras変異解析 ・ ラマン分光分析	増加（increase in micronuclei and micronuclei plus protrusions）によってもSWCNTの遺伝毒性が示された。 ■ラマン分光分析 ・ 半定量的推定により～4.1±1.9μg が肺に残留	
--	--	--	---	--	--	--

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間試験方法	試験結果	結論
SWC VH, CB, CeO ₂ , Ni 分 析 法	Pal AK, Aalaei I, Gadde S, Gaines P, Schmidt D, Demokritou P, Bello D ACS Nano. 2014 Sep 23; 8(9):9003-15	High resolution characterization of engineered nanomaterial dispersions in complex media using tunable resistive pulse sensing technology (可変抵抗パルス検知技術を用いた、複合媒体中の工業ナノ材料懸濁液の高解像度分析法) Tunable Resistive Pulse Sensing (TRPS ;可変抵抗パルス検知法)	■対象物質：4種 ①酸化単層炭素ナノ・ホーン (SWCNH-ox) ②Printex 90 (カーボンブラック) ③CeO ₂ ④Ni Inco(Niナノ粒子) ■ナノ粒子懸濁液の特性；TRPS対DLS ・TRPSによる粒度分布は、各粒子とも2つのピークを示した。 ・主要なピークは、DLS測定によるピーク (250-270nm) と一致 ・第2のピークは700 - 900nmの範囲に存在 ・分布は最大2 μ m超まで広がっていた。 ■粒子の特性値 A)DLSによる流体力学径(nm)、粒子径多分散指数PdI、 ζ 電位 (mV) ① 261, 0.23, -9.3 ② 270, 0.37, -13.1 ③ 265, 0.31, 12.1 ④ 234, 0.40, 14.4 B)TRPSによる第1、第2ピークの大きさ(nm) ① 249, 660 ② 264, 1068 ③ 268, 1066 ④ 268, 1136	■TRPSとは ・Coulterの原理に基づく、 μ m～nmの粒子の測定技術 ・検出下限：～40nm ・エラストマー膜に正確に作られたナノサイズの細孔を、個々の微粒子が通過するときのイオン電流の変化をモニターすることによって、微粒子の電荷、形状、伝導率などを測定する。 ■試験-1 ・測定項目：細胞生存度 ・試験生物；ヒト単球/マクロファージ (THP-1) 白血病細胞系 ・培養液：10% FBS、ペニシリンG (50U/mL) 硫酸ストレプトマイシン (50/Cg/mL) を含む RPMI 1640媒体 ・暴露濃度：0、1、5、10、30、50 μ g/mL ・暴露時間：24時間 ■試験-2 ・測定項目：サイズ分布 測定のDLSとTRPSの感度確認 ・対象物質：SWCHN-ox ・希釈液：RPMI+10% FBS ・希釈比率：1:10から	■サイズ測定の感度 ・DLS測定は、すべての濃度で広い単峰形のサイズ分布を示した。 ・流体力学平均径dh,z-aveは濃度50 μ g/mLでは311nmだったが、0.5 μ g/mLでは43nmまで減少した。 ・この後のピークは、血清蛋白質に対応する。 ・多分散指数PdIは (高濃度域の) 0.3 ～0.4から、1 μ g/mL以下の濃度では1まで増加した。 ・TRPS測定は、感度確認の試験でも220と660nmにピークを有する二頂分布を示した ・このピークは、0.5 μ g/mLまでの濃度によっては特に変化しなかった。 ■サイズ分布相違の毒物学的な結果への影響 ・SWCNH-oxとPrintex 90の細胞生存度勾配 (投与量が細胞生存度に及ぼす影響) は、DLS-データからの堆積投与量deposited doseに基づく勾配が有意に大きかった。 ・この勾配はSWCHN-oxが最も大きく、以下Printex-90→Ni-Inco→CeO ₂ の順に小さくなった。 ・TRPSに基づく勾配は、DLSに基づく勾配と若干異なった。 ■TRPの他の有望な特徴 ・1% FBSのSWCNH-oxのdh, z-aveは、10% FBSより50nmほど大きかった。 ・1%FBSのSWCNH-oxは、血清不十分のため十分に安定しないように見えた。 ・SWCNH-ox粒子はH ₂ O ₂ 処理によって、負の大きな表面電荷を示した。 ・血清によるコーティングで、この負の電荷は減少 ・SWCNH-ox、CeO ₂ 、Ni Incoは規則的な、ほぼ球面上の凝集塊を形づくったのに対して、Printex 90の集塊は不規則な形状であった。	・TRPS法は、DLS法と比較して、複雑な生物学的媒体に対して高い感度と解像度を有する分析法を提供する。 ・これはナノ毒物学とナノ薬剤への応用のための有益な方法であり得る。 ・容積50 μ Lの希薄懸濁液の個数濃度の直接測定は特に価値がある。 ・TRPSは、安価な機器価格、良好な携帯性と精度で、凝集体形態、粒子間と粒子-生体分子間の相互作用に関する付加的な情報を抽出する可能性を提供する。 ・これらの理由で、この技術はナノ毒物学

				1:1000 ・この希釈による期待濃 度：0.5-50 μ g/mL		とナノ薬剤の 分野で更なる 研究に値す る。
--	--	--	--	--	--	---------------------------------

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
Graphene-1	Chng EL, Chua CK, Pumera M Nanoscale. 2014 Sep 21; 6(18):10792-7	Graphene oxide nanoribbons exhibit significantly greater toxicity than graphene oxide nanoplatelets (酸化グラフェンナノリボンは、酸化グラフェンナノ小板より大きな毒性を示す)	■対象物質：2種 1)酸化グラフェンナノリボン (GONR) 2) 酸化グラフェンナノ小板 (GONP) ・1),2)とも修正ハマー法によって1)はMWCNTより、2)は積層グラフェンナノ線維 (SGNF)より調製。 ■原料MWCNT： ・直径：～100nm、 ・長さ：5-9μm、 ・Fe不純物：<3ppm ■原料SGNF： ・直径：～100nm、 ・長さ：5-9μm、 ■材料特性 ・GONR： 径：～310 nm 長さ：5000 nm ・GONP： 径：100 nm 長さ：100 nm ・格子サイズ： -GONR 22.2nm -GONP 19.1nm ・C/O比率： -GONR 1.9 -GONP 1.9 ・CO=基の比率： -GONR 28.22. -GONP 11.06	■試験細胞：ヒト肺癌上皮細胞系A549 ■培養液：10%FBS+1%ペニシリン/ストレプトマイシン補充MEM ■試験方法 ・ナノ材料濃度：8水準の濃度 (3.125,6.25,12.5,25,50,100,200,400 μg/mL-1) ・暴露時間：24時間 ・溶媒量：570 μ L ・コントロール：溶媒のみ ■分析方法と測定項目 ・MTT分析—細胞生存度 —粒子干渉実験(細胞なし) ・WST-8分析—細胞生存度 —粒子干渉実験(細胞なし) (粒子干渉 (particle interference) とは、細胞生存度測定に使用した試薬がナノ粒子と干渉して、生存度が低下したように見える現象)	■細胞生存度 ・GONRとGONPとも、A549細胞の生存度に対して強い用量依存的影響を示した。 ・GONRの場合、最低の暴露濃度 (3.125μg/mL-1) で、生存度は56%であった。 ・GONR濃度上昇に伴って生存度は低下し、400μg/mL-1では10%未満となった。 ・GONPの場合、生存度は3.125 μg/mL-1の暴露で81%、400 μg/mL-1では25%であった。 ・WST-8分析によっても、生存度が用量依存的に減少するという同様の結果が得られた。 ・ただし、生存度の値は異なり、かつ、WST-8分析による生存度の減少はMTTの場合ほど急激でなかった。 ・GONR、GONPとも用量依存的な細胞毒性を有する。ならびに、GONRの方がGONPより大きな毒性応答を誘起したことが明らかになった。 ・無細胞対照実験によっても、以上の結果の信頼性は確認された。(粒子干渉は、一部を除いて殆ど見られなかった。) ・GONRの方がGONPより大きな毒性を示す理由として、CO=基の比率が考えられる (GONR のC=O基の量は、GONPの2倍以上)。 ・加えて、GONPに対してGONRが有する非常に広い寸法の分布は、GONRの強い毒性発現に、主な役割を果たす。	・GONRはGONPより強い細胞毒性を有する。 ・この理由として、①MWCNTを酸化的に破砕する (unzipping) ことの結果として、より多くのC=O基が存在すること、ならびに②GONRが有する長さの大きな範囲の分布があることが考えられる。 ・本研究で使用したin vitro研究は、グラフェン酸化物の潜在毒性に焦点をあてる第一歩である。 ・より系統的調査が、グラフェン酸化物ベースのナノ材料の実際的な適用の前に必要である。

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整 法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
TiO ₂ , a-SiO ₂ 実験方法	Lehmbecker A, Rittinghausen S, Rohn K, Baumgärtner W, Schaudien D Toxicol Pathol. 2014 May 6; 42(6):1041-10 46	Nanoparticles and Pop-off Technique for Electron Microscopy: A Known Technique for a New Purpose (ナノ粒子 と電子顕微 鏡法のため のポップオ フ技術: 新しい目的 のための既 知の技術)	■ 調査標本: 3種 ① TiO₂ナノ粒子を以前に吸入したラットの肺のH&E染色した薄片(陽性対照) ・光顕観察ではこの薄片中にナノ粒子の凝a-集塊が認められた。 ② 同じ動物の喉頭組織 ・光顕観察ではこの薄片中にナノ粒子の集塊は確認できなかった。 ③ 非晶質SiO₂を以前に吸入したラットの肺の薄片 ・これは、以前にカーボンナノチューブを用いて処理されたラットの3つの気管支肺胞洗浄液(BAL)の細胞内スポット(cyto-spots)からなる。	■ ポップオフ技術における薄片製造手順。 (1) 関心領域のマーキング (2) カバーガラスの除去。 (3) 各種試薬によるスライドのコーティング。 (4) エポキシ樹脂充填ガラス・カプセルのマーク位置への配置。 (5) 液体窒素を用いて重合後、エポン(Epon)ブロックの除去。 (6) 関心領域のトリミングによる超薄切片調製。	■ 光顕観察結果 ・ ①の標本は光顕下で、肺胞マクロファージの中に微細な顆粒状の、金色から茶色の細胞質内粒子を示した。 ・ ②の標本では、鱗片状から呼吸皮覆組織への移行ゾーンで、腹側部に位置する上皮の潰瘍と上皮の変化が見られた。 ・ ③の標本では、微細な顆粒状のわずかに好酸性の泡状細胞質が見られたものの、ナノ粒子は見られなかった。 ・ BALの標本では、黒い、ねじれたカーボンナノチューブを含む、泡状細胞質を有するマクロファージが認められた。 ■ 電顕観察結果 ・ 肺標本では、光顕観察と同様、TiO₂ナノ粒子が肺胞マクロファージの細胞質に確認された。 ・ 肺胞マクロファージの細胞質内のナノ粒子は、やや濃い電子密度、不規則形状の、球ないしは回転楕円体ように見えた。 ・ 粒子の径はおよそ20nm、凝集塊の径は～1μmであった。 ・ SiO₂ナノ粒子の吸入の後、空胞のある肺胞マクロファージでは、電顕検査では細胞質内にやや高電子密度の、不規則な形状の凝集したナノ粒子が認められた。 ・ 主要な粒子の径はおよそ20nm、凝集塊は1μmであった。 ・ EDXによっても、上述のTiO₂とSiO₂粒子の存在は確認された。	・ ポップオフ技術は、組織学的薄片中のナノ粒子を検出するための、速くて簡単な方法である。 ・ これはEDXのような付加的な技術によって、ナノ粒子の更なる分析を可能にする。 ・ さらに、光顕微鏡的病変とナノ粒子の直接的な関係を、正確に同一部位で調査できる。

No	著者/ 書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料 調整法/試験用 量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
Gr phe ne-2	Ding Z., Zhang Z., Ma H., Chen Y. ACS Appl. Mater. Interfac es 2014.6, 19797- 19807	In Vitro Hemo- compatibilit y and Toxic Mechanism of Graphene Oxide on Human Peripheral Blood T Lymphocyte s and Serum Albumin (ヒト末梢 血のTリンパ 球と血清アル ブミンに 対する酸化 グラフェン の in vitro の血液適合 性および毒 性メカニズ ム)	■試験物質 ・本来の酸化グラ フェン (p -GO) Hummer 法に 少し修正を加 えて作成。 ・官能基化酸化 グラフェン (f -GO ; GO-COOH、 GO-PEI を含 む) GO-COOH : p-GO 表面上の エポキシおよ び水酸基の酸 化を通して、化 学修飾によっ て得た。 GO-PEI : カル ボキシル活性 化試薬を使っ て、p-GO とポ リエチレンイ ミン (PEI、 MW=25KD) の間アミド連 鎖の形成を起 こして合成さ れた。 ■試料調整法 DI 水に分散。 ■Hummer 法	■試験生物;分離された T リン パ球は、10%FBS を加えた RPMI 1640 培養液中に維持さ れ、5%CO ₂ 、37℃の飽和湿度 空気の CO ₂ 培養器内(Thermo、 3111) で培養された。 ■投与方法・期間 T リンパ球 (1X10 ⁶ mL ⁻¹) は、 フラスコ内で培養され、24 時 間、異なる濃度の p-GO 又は f-GO で処理。 沈殿現象は起きなかった。 遠心分離後、上澄液廃棄。細胞 ペレットは、新しい培養液に分 散、下記のバイオアッセイに使 用。 ■試験方法 ・TEM 撮影; T リンパ球中の p-GO、f-GO の位置を明らかに するため。 ・WST-8 細胞毒性アッセイ 細胞増殖と細胞毒性における 細胞生存性の敏感な比色分析 (p-GO 又は f-GO、0-100µg mL ⁻¹ 、24 時間処理)。 ・乳酸塩デヒドロゲナーゼ (LDH) 放出アッセイ GO 処理細胞膜の完全性を評価 (p-GO 又は f-GO、100µg mL ⁻¹ 、24 時間処理)。 ・DCFH-DA アッセイ 細胞内の ROS 産生は、2、7 ジ クロロフルオレセインアセト 酢酸エステルを使って検出さ	①細胞生存性に対する GO の影響; (WST-8 細胞毒性アッセイ) ・p-GO は 25µgm L ⁻¹ の濃度未満で小さい 毒性影響。50µg mL ⁻¹ まで濃度を上昇させ ると、T リンパ球は細胞生存能力の低下を 示し始める。 ・GO-COOH は p-GO と同様な用量依存毒 性関係を示した。一方、GO-PEI は 1.6µg mL ⁻¹ でさえ激しい毒性を示した(GO、PEI (42.9%) の両方の影響)。 ②細胞膜および ROS に対する GO の影響 (TEM) p-GO または GO-COOH : いくつかのアグ ルゲートが細胞膜上に吸着しているが、T リンパ球の細胞質、核内には見付からない。 GO-PEI 処理 T リンパ球は、膜損傷により、 GO-PEI が内部に侵入。 p-GO 及び f-GO は T 細胞レセプター (TCR) と相互作用し、TCR の免疫反応を ブロックする。 (LDH 放出アッセイ) p-GO または GO-COOH 処理はともに、顕 著な LDH 放出が無かった (高濃度で毒性 を示すが、細胞膜の物理的な損傷無し)。 GO-PEI 処理 T リンパ球は、ポジの 21.2% (細胞膜の物理的損傷有)。 (DCFH-DA アッセイ) p-GO 処理 T リンパ球はネガに比べ強い蛍 光シグナルを持ち、細胞内での ROS が増 加。 GO-COOH 処理は僅かな蛍光シグナルを持 ち、ネガに比べ細胞内 ROS は正常なレベ ル。 GO-PEI 処理は、低いシグナルだが、細胞	・T リンパ球に対して、 p-GO が用量依存的な細 胞毒性を持ち、25 µ g mL ⁻¹ 未満の低濃度の時 に細胞毒性を示さないこ とが実証され、それは他 の細胞タイプでのほとん どの毒性分析と一致して いる。予想外に、p-GO の 存在が HAS における立 体配座の変化と、ビリル ビンに対するその結合能 力の機能不全を引き起こ し、潜在的な毒性をもた らすことを示す。従って、 GO の血漿蛋白への有毒 影響は、さらに調査され なければならない。 ・高濃度での GO の細胞 毒性の分析に対して、 p-GO は内在化もしくは 膜分裂なしで細胞膜に吸 着されているのが発見さ れたが、それは細胞生存 能力を低下、増大した細 胞内の ROS、適度な DNA 損害、T リンパ球アポト ーシスを引き起こす。 p-GO は細胞生存能力の 明らかな減少とアポト ーシスを引き起こすけれ ども、T リンパ球免疫反応 抑制へのその影響は小さ い。GO-COOH は、正常

			によって準備された p-GO のキャラクターゼーション：紫外・可視分光法 (UV-vis)、フーリエ変換赤外分光法 (FT-IR)、ラマン分光法、原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて実施。p-GO は 1-2 層。C=O、C-O 基確認。官能基化確認。p-GO と GO-COOH は負に電荷でほぼ同レベル。GO-PEI は正に電荷。	れた (p-GO 又は f-GO、100µg mL⁻¹、24 時間処理)。 ・コメットアッセイ 真核細胞中の DNA 系破壊を測定する簡単な方法 (p-GO 又は f-GO、100µg mL⁻¹、24 時間処理)。 ・アネキシン V-FITC/PI アッセイ アネキシン V-フルオレセインイソチオシアネート (FITC) /プロピジウムヨウ化物 (PI) 二重染色法は、細胞のアポトーシスと壊死を「検出するために使用された (p-GO 又は f-GO、100µg /mL、24 時間処理)。 ・リンパ球芽球化試験 (LTT) アッセイ; T リンパ球免疫反応における GO の干渉を評価するために、フィトヘムアグルチニン (PHA) の存在下で培養された T リンパ球を用いて調べられた (p-GO 又は f-GO、100µg mL⁻¹、24 時間処理)。 ・ウエスタンブロットアッセイ 24 時間 GO 処理後の T リンパ球中での Bcl-2 の発現量を用いる (p-GO 又は f-GO、24 時間処理)。 ・円偏光二色性 (CD) 測定 CD スペクトルは、0.2 および 1.0cm キュベットをそれぞれ使って 200-250 および 325-500nm の範囲にわたって円偏光二色性分光モデル 410 (AVIV Biomedical Inc.、米	膜の損傷と細胞からの蛍光生産物の放出によるため、結果は信用できない。 ③GO によって引き起こされた DNA 損傷、アポトーシス、免疫毒性 (コメットアッセイ) p-GO と GO-COOH は、ネガに比べ DNA 損傷は穏やか。 GO-PEI は、15.6% の tail DNA 損傷を顕著に起こした。 (アネキシン V-FITC アポトーシス検出キット) p-GO 処理 T リンパ球は、約 17.2% 細胞が初期アポトーシス、9.8% が後期アポトーシスを受けたことを示した。 GO-COOH 処理は、18.3% が初期、9.5% が後期。 一方、GO-PEI 処理は、76.8% が初期。 (ウエスタンブロットアッセイ) p-GO と GO-COOH 処理 T リンパ球の Bcl-2 レベルがコントロールに比べ約 50% まで減少、Bcl-2 経路を通るパッシブアポトーシスであることを示した。 ④表面特性および信号伝達経路の影響 p-GO と GO-COOH は、T リンパ球に対して同様の生体適合性を示すが、GO-PEI は激しい血液毒性を示し、膜損傷を引き起こす。可能な理由は、表面電荷の違い。 p-GO と GO-COOH はゼロに近い負に荷電、一方、GO-PEI は正。正電荷粒子は、細胞膜に強い静電吸着を示し、細胞摂取を強化し、細胞膜の電荷バランスを壊し、損傷するからであろう。 ⑤HAS の構造と機能に対する GO の影響 p-GO は FBS たん白質と強い相互作用を持ち、FBS を加えた培養液中で、GO の流体力学的サイズが劇的に増大することを示した。FBS の存在は、GO の T リンパ球への	な細胞内 ROS レベルを保持するのを除いて、T リンパ球への p-GO と同様な影響を示す。 ・GO-PEI は、細胞膜への物理的損傷、重大な DNA 損傷、T リンパ球免疫反応能力の抑制を伴う T リンパ球への厳しい有毒な影響がある。血漿蛋白 HAS に対して、GO-PEI が HAS の構造と機能を厳しく破壊するのに対して GO-COOH は最小の立体配座および機能の変化を伴って HAS と結合する。これまでに、ドラッグデリバリーシステム、細胞撮像、抗ガン療法適用に対して、GO の用量は一般に 25µg mL⁻¹ より低い。結果は、この範囲の濃度の GO-COOH が生物医学の適用のための将来有望なナノ材料 a であることを示す。高濃度の GO の全身細胞毒性の分析を通じて、示唆された毒性メカニズムは、p-GO が配位子とのたんぱく質感レセプターの結合を抑制し、ROS の増加に依存して受動的なアポトーシスを引き起こすことである。GO-COOH は膜たんぱく質レセプターと相互作用し、ROS と
--	--	--	--	---	---	---

				国) に記録された。スペクトルは、$\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$ のモル楕円率$[\theta]$として表現された。立体配座の変化検出のために、$100\mu\text{g mL}^{-1}$ HAS は、2 時間反応の間、$40\mu\text{g mL}^{-1}$ p-GO または f-GO と混ぜられた。官能基の変化検出のために、$100\mu\text{g mL}^{-1}$ GO は、最初、1mg mL^{-1} HAS と混ぜられ、その後 2 時間、混合物に $4.4\mu\text{g mL}^{-1}$ ビリルビンが追加された。沈殿現象は無かった。	細胞毒性を大きく緩和することを示唆する。 GO は HAS 構造に対して有害影響を持ち、その大きさの順は、$\text{GO-PEI} > \text{p-GO} > \text{GO-COOH}$。 p-GO と GO-PEI は、HAS のビリルビン結合の機能への有害影響を持つ一方、GO-COOH は機能を混乱させることなしでの HSA と相互作用するかもしれないことが示唆された。 HSA 機能に対する有害影響の大きさの順は、$\text{GO-PEI} > \text{p-GO} > \text{GO-COOH}$。	は独立したメカニズムを通じて受動的なアポトーシスシグナルを核 DNA に手渡す。GO-PEI は膜損傷を引き起こすことによる T リンパ球への激しい血液毒性を示す。正電荷粒子は負電荷粒子より細胞に対してより有毒であり、カルボキシル修飾は、細胞内の ROS 産生を抑制する効果的な方法である。
--	--	--	--	--	---	--

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
Si O2 -1	Yoshida T, Yoshioka Y, Takahashi H, Misato K, Mori T, Hirai T, Nagano K, AbeY, Mukai Y, Kamada H, Tsunoda S, Nabeshi H, Yoshikawa T, Higashisaka K, Tsutsumi Y Nanoscale Res Lett. 2014 Sep 26 ;9(1):532	Intestinal absorption and biological effects of orally administered amorphous silica particles (経口投与さ れた非晶質シ リカ粒子の腸 吸収および生 物学的影響)	■試験物質 ・70nm (nSP70) 直径の非晶質シリカ ナノ粒子 ・300 または 1,000nm 直径のマ イクロシリカ粒子 (mSP300 、 mSP1000) ・カルボキシルまた はアミン基表面修飾 nSP70 (nSP70-C、 nSP70-N) 購入先: Micromod Partikeltechnologie (独) ■試料調整法 全てのシリカ粒子は 5 分間超音波処理、 使用に先がけて 1 分 間攪拌。	■試験生物 ALB/c マウス(雌、6 週)(購 入先: 日本 SLC) ・Wister ラット(雄、8 週) (購入先: 清水実験材料(株)) ・動物は、12・時間明/12・ 時間暗サイクル下、20℃± 2℃に維持された換気され た部屋に別々に収納。 ■試験方法等 ①Everted gut sac 分析 ・Wister ラット ・3～4cm の血抜きした腸 断片中に、Tyrode's 緩衝液 (NaCl, 137 mM; KCl, 5.4 mM; NaH2P04, 0.16 mM; MgCl2, 0.5 mM; CaCl2, 1.8mM; HEPEs, 5 mM; pH7.4) 0.6～0.8mL のみ満 たす(コントロールグルー プ)、または、シリカ粒子 (12.5mg/mL) 含有 Tyrode's 緩衝液 2.5 mL を 満たす。 ・45 分間、37℃培養 ②経口暴露 ・BALB/c マウス ・nSP70、mSP300、 mSP1000、nSP70-C、 nSP70-N、または水(コン トロールグループ) ・28 日間経口食事投与、用 量 2.5mg/マウス・日 ・マウスは、研究期間 7、 14、21、28 日に重量測定。	① Everted gut sac 分析 培養 45 分後、nSP70-C および nSP70-N の 囊の粘膜側から漿膜側への吸収が他の粒子 より有意に大。表面特性が吸収の決定因子 の一つと示唆。 ②経口暴露 ■血液バイオマーカーアッセイ ・投与 24 時間後、心臓血液採取。遠心分離、 血漿取得。 ・アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) と血尿素窒素(BUN) を測定(生 化学的自動分析器) ・コントロールグループと体重差なし。 ・ALT 値はコントロールグループに比較し て若干多いが、健康な範囲にあった。肝機 能 ALT レベルに影響していない。 ■組織病理学的検査 ・投与 24 時間後、肝臓、腎臓、脳、肺、脾 臓、心臓、胃、小腸、または大腸切除。 ・異常なし。 ■血液学的分析 ・投与 24 時間後、全体の血中の全白血球、 リンパ球、単球、赤血球、顆粒球、および の血小板の数を測定(自動分析器: VetScan HMII Hematology System, Abaxis, 米)。 ・単球、顆粒球、血小板はコントロールグ ループとあまり差無し。 ・全白血球、リンパ球、赤血球はコント ロールグループと有意差あるが、正常・健康 範囲か若干増。 ・全体として、異常な生物学的影響はなし。 食物適用での安全性を示唆。	・ICP-OES と結 合した Everted gut sac 分析で、 シリカ粒子の腸 吸収を調査し、表 面特性が腸吸収 の程度の主要な 決定因子である と分かった。 ・試験されたどの 粒子も 28 日経口 投与後に有毒な 生物学影響を示 さなかった。 ・この研究の結果 は、シリカナノ粒 子の安全を評価 すること、および より安全なナノ 粒子の作成の方 法の開発に有益 である。

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
Si O2 -2	Panas A, Comouth A, Saathoff H, Leisner T, Al-Rawi M, Simon M, Seemann G,Dössel O, Mülhopt S, Paur HR, Fritsch-Dec ker S, Weiss C, Diabaté S Beilstein J Nanotechnol . 2014 Sep 19;5:1590-60 2	Silica nanoparticles are less toxic to human lung cells when deposited at the air-liquid interface compared to conventional submerged exposure (従来の水中 暴露と比較し て空気-液体界 面に堆積した 時、シリカナノ 粒子はヒト肺 細胞に対して 毒性が低い)	■試験物質 ・Aerosil@200 粉 (提供 先: Evonik、独) ・SiO ₂ -50nm NPs (フ ルオレセインイソチオ シアネート (FITC) に よるラベルリングあり、 無し)。25 mg/mL 水の 均一分散液として (Postnova Analytics、独) ・Dulbecco 修正 Eagle 培地 (DMEM), Roswell Park Memorial Institute 培 地 (RPMI-1640), Hank 液 (HBSS), Dulbecco 燐酸緩衝生理食塩水: Ca ²⁺ 、Mg ²⁺ 無し (DPBS-1 -), ペニシリ ン、ストレプトマイシ ン、トリプシン子牛胎児 血清(FCS). ■試料調整法/試験用量 ・エアロジル生成 (ナノ 粒子モノマーの細胞暴 露のため) とキャラクタ リゼーション SiO ₂ -50nmNP 懸濁液 を合成空気 (3ppm 不純 物) 中へエレクトロスプレ ーエアロジル生成機 で分散。アグロメレート	■試験生物 ・ヒト肺胞上皮細胞株 A549 (入手先: American Type Culture Collection) 10% (v/v) FCS, 2m ML- グルタミン, 100 U·mL ⁻¹ ペニシリン, 100 mg·mL ⁻¹ ストレプトマイシンを含む DMEM 中に保持 (5% CO ₂ , 37 °C) ALI(空気-液体界面)暴露 2 日前に、装置内に Transwell insert に RPMI-1640 培地の細胞を 植え付け (8.5×10 ⁴ 細胞· cm ⁻²) ■投与方法 ①エアロジルへの細胞暴露 ALIDI 暴露システム内で暴 露 (37.5°C、相対湿度 80-90%、100mL·min ⁻¹) ・用量測定 ②細胞の水没処理 ・Aerosil200 粒子は 10% FCS なし細胞培養培地に 10 mg·mL ⁻¹ で分散、細胞 添加前に超音波処理。 ・SiO ₂ -50 nm 粒子は、培地 中で希釈、攪拌。 ■生物学的影響 暴露細胞は、直接溶解され たかもしくは、さらに HEPES なしで、無血清	①粒子のクアラクタリゼーション 一次粒子径 (TEM) 比表面積 Aerosil200 (7-100) nm 200m ² ·g ⁻¹ SiO ₂ -50nm (54±3) nm 60 m ² ·g ⁻¹ ②エアロジルの発生方法 ・アトマイザー (A) とエレクトロスプレ ー(ES) Aerosil200 SiO ₂ -50nm SiO ₂ -50nm (A) (A) (ES・電場) 平均 (アグロメレート) 径 (SMPS 測定) アグロメレートフラクション 100% 92% 7% 粒子堆積 暴露時間 5 時間 7 時間 5 時間 質量用量 (TEM 測定) 52±26) µg/cm (117±46) (0.14±0.05) ③生物学的影響 ・LDH 放出 Aerosil200 エレクトロスプレー (用量: 52µg·cm ⁻²) に比べ、水没 (用量: 15.6) の方が大きい。 SiO ₂ -50nm エレクトロスプレー (用量: 117µg·cm ⁻²) に比べ、水没 (用量: 15.6) の方が大きい。 ・IL-8 放出 LDH と同様の傾向を示した。 ・COX-2 Aerosil200 では、ALI と水没と比較し、水 没の方が用量が低いにもかかわらず、 COX-2 は同レベルであった。SiO ₂ でも同 様。 ・p-p38 p38 のリン酸エステル化は、ALI は	アモルファスシリ カ NPs は、水 没条件下と ALI で性質的に同様 な細胞反応を引き 起こした。 しかし、NPs へ の水没暴露により ずっと低い細胞 用量でより強い 影響は引き起 こされる。 このため、ALI 中の細胞は NPs に対して一般に それほど脆弱で はないのか、特 定の NPs は暴露 方法に依存する 異なった活性を 示すのかどうか を判読するため に、より多くの 研究が是認され る。

			フラクションを 7%未満にするため、Nanopure water (type 1 ultrapure Barnstead, 独) で 7 mg・mL ⁻¹ に希釈。	RPMI 培地で水没状態 (37℃、95%湿度) で 24 時間培養 (最上のサイトカイン放出) 後分析。LDH、IL-6、IL-8 の放出を分析。	Aerosil200 もしくは水没と比べて ALI の方が強められた。	
--	--	--	---	--	-------------------------------------	--

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整 法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
SiO 2-3	Nemmar A, Albarwani S, Beegam S, Yuvaraju P, Yasin J, Attoub S, Ali BH Int J Nanomedicine 2014 Jun 2; 9:2779-89	Amorphous silica nanoparticles impair vascular homeostasis and induce systemic inflammation (非晶質シリカナノ粒子は血管内平衡を害し、全身性炎症を引き起こす)	■試験試料 ・非晶質 SiNPs(50 nm、 500 nm) 購入先： Polysciences, Inc. (米) ■試料調製法 ・SiNPs は、 Tween 80 (0.01 %)を含む通常生理食塩水 (NaCl 0.9%) に分散。 ・投与前に、アグリゲーション最小化のため、超音波処理、攪拌実施 ■試験用量 両 SiNPs 分散液 (0.5 mg/kg) か、 生理食塩水のみ。 用量 150 μ L。	■試験生物 ・雄 Tuck-Ordinary マウス (購入先：HsdOla:TO; Harlan Laboratories UK, Ltd., 英) ・12 時間明: 12 時間暗サイクル、温度 22°C $\pm$ 10°C で飼育。 ■投与方法 ・腹腔内注入 ・24 時間後、様々な血栓性および全身性パラメーターを評価。 ■試験方法 ・血液採取と分析 血小板数計測 (ABX VET ABC 血液学分析器 (HORIBA ABXS AS, 仏)。血漿はさらに分析。 ・実験的な軟膜細静脈の血栓症モデル 右頸静脈 (蛍光顕微鏡) ・炎症、酸化ストレス、線維素溶解の全身性マーカーの測定 プラスミノーゲン活性化抑制因子 (PAI-1)、フィブリノゲン、von Willebrand ファクター (vWF)、腫瘍壊死因子 α (TNF α)、インターロイキン 1 β (IL-1 β)、8-イソプロスタニン。チオバルビツール酸反応性物質 (TBARS)、カタラーゼ、グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST)。乳酸塩デヒドロゲナーゼ (LDH) 活性。 ・プロトロンビン時間 (出血が始まってから肝臓でプロトロンビン (血液凝固因子) がつくられる	①軟膜細静脈中で光化学的に引き起こされる血栓症に対する SiNPs の影響； 顕著な血栓症発症時間の短縮が起こった。 ②循環血小板数、PAI-1、フィブリノゲン、vWF の血漿中の濃度に対する SiNPs の影響； ・50nm SiNPs への暴露は、コントロールに比べ循環血小板顕著に減少。500nm SiNPs に対しても同様。 ・血漿中の PAI-1 濃度は、コントロールに比べ両方の投与で顕著に増加。 ・フィブリノゲン濃度は、コントロールに比べ 50nm SiNPs の投与は顕著に増加。 ・vWF 濃度は、コントロールおよび 500nm SiNPs に対して、50nm SiNPs の投与は顕著に増加。 ③PT、PTT に対する SiNPs の影響； ・PT は、コントロールに比べ、両方の投与で顕著な変化なし。 ・PTT も同様。 ④生体外、全血中での血小板凝集に対する SiNPs の影響； ・50nm SiNPs および 500nm SiNPs の低濃度 (0.2-5 μ g/mL 血) で、用量依存で、血小板凝集が起こった。同濃度で、50nm SiNPs の投与は 500nm SiNPs の投与に比べ、統計的に有意な影響があった。 ⑤血漿 LDH 活性に対する SiNPs の影響； ・50nm SiNPs、500nm SiNPs はコントロールに比べ顕著な増加。 ⑥TNF α 、IL-1 β の血漿濃度に対する SiNPs の影響； ・TNF α は、50nm SiNPs の投与はコント	・非結晶 SiNPs は生体内および生体外で、投与の 24 時間後に、プロトロンビン影響を引き起こし、TNF α と IL-1 β を含め、繊維素原 (フィブリノゲン)、PAI-1、vWF、炎症誘発性サイトカインの血漿 (細胞質) 中濃度を増加させる。8-イソプロスタニン、TBARS、カタラーゼ、GST から成る酸化ストレスのマーカーは SiNPs によって影響されなかった。さらに、SiNPs が、生体外で、HUVEC 細胞毒性を引き起こし、小腸間膜動脈の内皮依存の弛緩を減らす。全体として、より多くの顕著な影響が 500 nm SiNPs に比べて 50 nm で記録さ

				までの時間)および活性化部分トロンボプラスチン時間(血漿に接触因子活性化物質を添加した場合の凝固時間)の生体外での測定 ・生体外でのマウス全血中の血小板凝集 ・生体外でのアセチルコリンによって引き起こされた分離された小腸間膜動脈の弛緩に対する生体外での SiNPs の影響	ロールに比べ、顕著に増加。500nm SiNPs は無影響。 ・ IL-18 は、50nm SiNPs の投与はコントロールに比べ、顕著に増加。500nm SiNPs はさらに高い。 ⑦8-イソプラスタン、TBARS、カタラーゼ、GST に対する SiNPs の影響; ・ どれも影響なし。 ⑧細胞生存能力に対する SiNPs の影響; ・ 50nm SiNPs、500nm SiNPs の投与(0.1-100μg/mL)は、24 時間にわたって、HUVEC 細胞の細胞生存能力を濃度依存で減少させた。50nm SiNPs は 500nm SiNPs より大きい影響力を示した。 ⑨Ach によって引き起こされた単離された小腸間膜動脈の弛緩に対する生体外での SiNPs の影響; ・ 0.1μm Ach 濃度下で、50nm SiNPs、500nm SiNPs の投与の両方とも、(2μg/mL、10μg/mL、50μg/mL)のうち 50μg/mL で顕著な減少を起こした。	れたため、観察された悪影響はサイズ依存であった。これが高い表面積・体積比(サイズに対して逆方向で減少する)に帰することができる;これは生物学的相互作用に好ましく、その結果、より血管および全身の毒性を起こす。発見は SiNPs は血管のホメオスタシスに有害であるという妥当な説明を提供する。
--	--	--	--	--	--	---

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整 法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
SiO2-4	Nagakura C, Negishi Y, Tsukimoto M, Itou S, Kondo T, Takeda K, Kojima S Toxicology. 2014 Aug 1; 322:61-8	Involvement of P2Y11 receptor in silica nanoparticle s 30-induced IL-6 production by human keratinocyte s (ヒトケラチノサイト (角化細胞) によるシリカナノ粒子 30-誘引 IL-6 産生における P2Y11 レセプターの関与)	■試験物質 ・シリカ NP(SNP)(直径: 30、70、300 nm ; SNP30、SNP70、SNP300) (購入先: Micromod Partikeltechnologie GmbH) ■試料調整法 (キャラクターゼーション) ・Dulbecco 修正 Eagle 培養液 (含 1.0g グルコース/L) (低グルコースタイプ DMEM) 中の粒径分布測定 (動的光散乱法; DLS) ・SNP30 モルフォロジー (TEM) ■試験用量 ・最高 50 μg/cm²	■試験生物 ヒトケラチノサイト細胞株 (HaCaT) ■投与方法・期間 ・生体外 ・暴露後 24 時間 ■試験方法 ・逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR) 本研究で使用して P2 受容体の特殊プライマーのシーケンス: P2X1~7、P2Y1,2,4,6,11~14、GAPDH(ポジティブコントロール) ・細胞外 ATP の試験 ENLITEN rLuciferase/Luciferin Reagent (Promega, Madison, WI) で濃度測定 ・IL-6、TNF-α、IFN-γ の試験 ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) で測定 ・細胞生存性の試験 WST-1 リガンドを用いた比色分析法で測定	①SNPs のキャラクターゼーション ・SNP30、SNP70、SNP300 の平均径: 35.1、65.6、278.7 nm。 ・SNP30 大半: 一次粒子径 <50 nm (TEM)、媒体中でほぼ均一に分散 ②HaCaT 細胞による IL-6 産生に対する SNP30 の用量および時間依存影響 ・5μg/cm² から 50μg/cm² まで用量依存で増加。 ・24 時間まで時間依存で増加。 ③HaCaT 中での IL-6 産生に対する SNPs のサイズ依存影響 ・用量 5μg/cm² で、SPN30 は暴露後 24 時間で、SPN70、SPN300 よりより顕著に産生した。 ④HaCaT 細胞による TNF-α と INF-γ 産生に対する SNP30 の影響 ・暴露 24 時間後、産生能力顕著に低く、変化は殆どなかった。 ⑤HaCaT 細胞による SNP が引き起こす IL-6 産生での P2 受容体の関与 ・データは、両方の受容体が IL-6 産生の抑制に関与していたことを示唆。 ⑥P2 受容体アゴニストによる IL-6 生産の誘発およびそれらのアンチアゴニストによる妨害 ・24 時間後、ATP、UTP のようなアゴニストは IL-6 生産を顕著に増加。 ・これらの増加は、スラミンによって、ブロックされた。さらに、P2Y11 受容体-特定アンチアゴニスト NF157 は IL-6 産生を減少させた。 ⑦細胞外 ATP リリースに対する SNP30 暴露の影響および異なるサイズを持つ SNPs とのその比較 ・SNP30 の 5μg/m² 用量で、処理後 40 分から 50 分の間増加し、その後コントロールレベルに戻った。 ・3 つの SNPs (SNP30、SNP70、SNP30) 0 の間で ATP リリースが調査された。ATP リリースは SNP30 は顕著、SNP70 は適度、SNP300 は、SPN 不処理のコントロールとほとんど同様であった。	SNP30 は、P2Y11 レセプターを通して、HaCaT 細胞中での ATP シグナリングを経て、IL-6 産生を引き起こすことが示唆される。

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料 調整法/試験用 量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
SiO 2-5	Kusaka T, Nakayama M, Nakamura K, Ishimiya M, Furusawa E, Ogasawara K PLoS One. 2014 Mar 28; 9(3):e92634	Effect of silica particle size on macrophage inflammatory responses (マクロファージ炎症 反応に対するシリカ粒 子サイズの 影響)	■試験物質 ・全てのアモルファスシリカ (購入先: Micromod Paltikeltechnologie GmbH (独)) ・全生体外試験に対して、マクロファージのシリカ粒子の認識は、マクロファージへのシリカ粒子の短い遠心分離と同調させた。 ■試料調整法 ・右記 ■試験用量 ・右記	■試験生物 ・C57BL/6N マウス (5-6 週齢) (購入先: 日本 CLEA) 特定の病原体フリー状態で飼育。 ・C57BL/6N マウス骨髄由来マクロファージ (BMDMs) 完全 RPMI 1640(1/10 体積の M-CSF 含有 CMG-1412 を含む) 中で 5 もしくは 6 日間育成。 ■投与方法・期間/試験方法 ①生体外での BMDMs からのインターロイキン(IL)-1β 分泌 LPS 刺激 BMDMs はシリカ粒子または 1 mM ATP で 4 時間、37°C 刺激。いくつかの実験は、LPS 刺激 BMDMs は 20 μM サイトカラシン D もしくは 200 nM のバフィロマイシン A1 で 1 時間前処理後、4 時間シリカ粒子で刺激。細胞培地上澄液中の IL-18 はエライザ診断(enzyme-linked immunosorbent assay) で測定。 ②BMDMs によるシリカ粒子の取り込み フルオレセインには、フルオレセインイソチオシアネート (FITC)ラベル付けシリカ粒子 (50μg/mL) とともに、1 時間、37°C で培養後、測定。 ③BMDM におけるリソソーム損傷 BMDMs は LPS(10 mg/mL)、6 時間刺激後、10kDa FTTC-デキストランで負荷、シリカ粒子(0.3 mg/mL) 又は ATP(1mM) に 2 時間暴露後、測定。 ④イムノブロット分析 細胞は LPS (10ng/mL) 6 時間、37 °C 刺激後、培地を変更し、0.3 mg/mL のシリカ粒子 2 時間、37°C で 刺激後、測定。 ⑤乳酸脱水素酵素(LDH)放出アッセイ LPS (10ng/mL) 刺激細胞は、シリカ粒子 2 時間、37°C で刺激後、測定。 ⑥肺炎症のマウスモデル ・生理食塩水中のシリカ粒子 (25mg/kg)、ビークルは、C57BL/6N マウスに気管内注入された。6 または 24 時間後、	①サブミクロンのアモルファスシリカ粒子は、マクロファージからの IL-18 分泌の強い誘発者である。 ②サブミクロンのアモルファスシリカ粒子は、IL-18 分泌によって引き起こされる相当なリソソーム損傷を起こす。 ③シリカ粒子は、カスパーゼ-1 と IL-18 化膿を誘発するが、カスパーゼ-11 活性化を誘発しない。 ④BMDMs へのシリカ粒子のサイズ依存細胞毒性 30-1000nm シリカ粒子は、3000nm および 10000nm シリカ粒子よりより高く細胞毒性活性を BMDMs に対して持っていた。 ⑤30nm シリカ粒	・生体外と生体内で、1000nm を超えるシリカ粒子よりサブミクロンアモルファスシリカ粒子がより大きい炎症特性と細胞毒性を持っていた。直径サイズとは無関係に、シリカ粒子はアクチン細胞骨格依存経路を経てマクロファージによって取り込まれ、インフラマソーム活性化を引き起こす。 ・サブミクロンシリカ粒子はより大きいシリカ粒子より高いレベルでリソソームの不安定化を起こし、どのような大きさのシリカ誘発 IL-1 β 分泌も CA074ME またはバフィロマイ

				肺炎症は、micro computed された CT スキャン LaTheta TM LCT-200 によって分析された（日立 ALOKA、日）。 - マウスの気管支肺胞洗浄液（BALF）中の IL-1β、TNF-α、IL-6 の濃度は ELISA によって分析された。 - BALF 中の好中球浸透のために、細胞は、染色され FACSCantoII によって分析された。	子の気管内注入は、マウスにおいて、激しい肺炎症を誘発する。	シンによって抑制されなかった。 30nm シリカの気管内注入後 6 時間後に多くのマウスが瀕死になったが、3000nm ではなかった。
--	--	--	--	---	--------------------------------------	--

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質試料 調整法/試験用量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
SiO 2-6	Brown DM, Kanase N, Gaiser B, Johnston H, Stone V Toxicol Lett. 2014 Jan3; 224(1):147-5 6	Inflammatio n and gene expression in the rat lung after instillation of silica nanoparticle s: effect of size, dispersion medium and particle surface charge (シリカナ ノ粒子の注 入後、ラット 肺における 炎症および 遺伝子発 現：サイズ、 分散、表面電 荷の影響)	■試験物質 ・シリカ NPs(直 径 50、200 nm) (購入先： Kisker Biotech、 独) ①中性表面電荷 ②正電荷 (NH2 修飾) ■試料調整法 ・RPMI 媒体中 に分散。 希釈、超音波処 理。希 釈： 62.5μg/ml から 3μg/ml の範囲に (well Plate で は 1-16μg/cm ² 粒 子に相当)。 ・水力直径とζ電 位測定(Malvern nano ZS zetalyzer) ■試験用量 ・30μg/ラット (比較的低用量 である)	■試験生物 ・Male Sprague Dawley ラット (ほぼ 3 月齢)：研究中食物・水 に自由にアクセス。 ■投与方法・期間 ・肺注入 ・注入後、殺処分まで 24 時間放置 ■試験方法 ①気管支肺胞洗浄 ・好中球の合計数測定。 細胞は、Nrf2 の染色へ。 ②LDH 評価 ・BAL 上澄液 (吸収は 自動プレートリーダー 上で 540nm で読み取 り) ③アルブミン評価 ・BAL 液中濃度 (プロ ムクレゾールグリーン 使用して) 測定 ④Nrf2 の染色 ・Nrf2 の核内分布 (BAL 細胞中の酸化シグナリ ングの指標に使用) ⑤RNA 抽出とリアルタ イム PCR ・BAL 細胞からの抽出 (Mag MAX total RNA isolation kit (Ambion) 使用) ・RNA 含有量測定 (NanoDrop 2000 (Thermo Scientific)使	①粒子キャラクターゼーション ・水力直径 (DLS で測定) 粒子生理食塩水中 BSA 中 LLF 中 無修飾シリカ 50nm 81 35 75 無修飾シリカ 200nm 192 126 209 シリカ NH2 50nm 348 34 298 シリカ NH2 200nm 206 149 217 下線数値は、アグロメレート化傾向 ・ζ電位測定 ②TEM ・無修飾シリカ 50nm は、分散媒に関係なく、3 つ中で、 均一分散していなかった。他のタイプも同様パターン。 ③LLF のエンドトキシン含有量 ・含有量レベル<0.25 EU /1ml ・プロテオミクスによる LLF の分析は、5 つの最も豊 富なたんぱく質が、トランスフェリン、アルファ-1抑制 剤 3、JgG 受容体たんぱく質;界面活性剤たんぱく質 A、 たんぱく質のようなケラチンであることを示した。 ④粒子注入後の好中球動員 ・生理食塩水、BSA 中分散では、整理無修飾 50nm と アミノ化 50nm NPs は顕著に増加。 ・LLF 中分散では、どの NPs タイプもピークルと同様。 ただし、LLF のみで増加することの説明不可であった。 ⑤BAL 液の分析 ・BAL 中の LDH とアルブミン含有量は、ピークルと 比べ、どのタイプも顕著な違いなし。 ⑥BAL 細胞中での Nrf2 発現 ・生理食塩水中に分散の場合、粒子タイプでピークルの みに対する核 Nrf2 染色での差はないが、ともに 50nm で顕著な増加あり。 ・BSA 中に分散の場合、無修飾 50nm は顕著な増加。 ・LLF 中に分散の場合、無修飾 50nm、アミノ化 200nm は顕著な増加。 ⑦シリカ粒子の貪食 ・肺胞マクロファージによる貪食は、無修飾 50nm で	・データは、生 体内でのシリ カ粒子の単回 低用量の注入 の炎症影響は 注入前に粒子 が懸濁される 分散媒体に依 存して調整さ れることが可 能であること を示唆する。 ・また、研究は、 粒子のアグロ メレート状態 に対する分散 媒体の重要性 を強調し、これ は、一度注入さ れ肺細胞に送 られた粒子の 実表面積にお いて重要な役 割を果たすか もしれない。 ・この性質の研 究は、これが 種々のエンド ポイントの結 果に影響する かもしれない ため、注入前 の粒子の分散 の問題を主張す る。

				用) ・PCRs (triplicate on a 7900 RT fast PCR system 中で実行) ⑦GSH 評価 ・粒子暴露動物の肝臓 (末梢 (遠位の) 酸化ストレスの指標として使用) (Promega GSH/GSSG-Glo kit 使用)	は、LLF 中に分散されている場合わずかに増加しているだけ。さらに、LLF、生理食塩水中に比べ BSA 中に分散されたものは、さらに顕著に少ない増加であった。 ・アルブミンは、生理食塩水中の無修飾 200nm に比べ、無修飾 200nm の摂取を減らし、さらに LLF に対してさえも減らした。 ・アミノ化された 50nm NPs に対して、BSA では食食を顕著に減少させなかったが、LLF を分散剤として使うと顕著な減少があった。 ・生理食塩水と BSA 中のアミノ化された 200nm NPs の分散は、無修飾 50nm NPs と同等レベルの食食であったが、LLF を使いと、生理食塩水と BSA に比べ、無修飾 50nm NPs、アミノ化された 200nm の両方ともに、摂取を減少させた。 ⑧肝臓中の GSH 含有量 ・ビークル処理に比較し、どれも顕著な変化なし。 ⑨遺伝子発現 ・BAL 中のサイトカイン mRNA 発現はどの処理も変化なし。 ・しかし、特定の遺伝子、特に IL-10、FasL、ICAM の遺伝子発現は、粒子がその中に分散している媒体にある程度影響されているかもしれないことが示唆された。	
--	--	--	--	--	--	--

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
SiO 2-7	Horie M, Nishio K, Kato H, Endoh S, Fujita K, Nakamura A, Hagihara Y, Yoshida Y, Iwahashi H Toxicol Mech Methods. 2014 Mar; 24(3):196-20 3	Evaluation of cellular effects of silicon dioxide nanoparticle s (二酸化珪 素ナノ粒子 の細胞影響 の評価)	■試験物質 非晶質 SiO ₂ 粒子： ・ nSiO ₂ -1 (UFP-80：電 気化学工業)：34nm、 80.0m ² /g ・ nSiO ₂ -2 (REOROSIL ； QS-30：トクヤマ)： 7nm、300m ² /g ・ nSiO ₂ -3 (NanoTek：CIK NanoTek)：25nm、 86.0m ² /g ・ fSiO ₂ (SFP-20M：電 気化学工業)：300nm、 11.3 m ² /g ・ mSiO ₂ (HS-301：日 鉄住金)：2400nm、8 m ² /g 結晶質 ・ mc-SiO ₂ (MIN-U-SIL5：U.S. Silica Company)： 1800nm ■試料調整法 DMEM-FBS 中に分散 剤なしで直接分散 (濃 度：10、100、 1000μg/mL)。いくつか の実験では、安定均一分 散液用意。 ・ SiO ₂ -DMEM-FBS 分 散液のキャラクタリゼ ーション：平均粒子径	■試験生物 ・ HaCaT ヒトケラチン細胞株 (購入先：ドイツ癌研究センタ ー、独) ・ A549 ヒト肺癌細胞 (購入先： 理研バイオリソースセンター、 日) ・ 細胞は 10 % 加熱不活性化ウ シ胎児血清(FBS)、100 units/mL のペニシリン、 100μg/mL のストレプトマイ シン、250ng/mL の アンフォ テリシン B を加えた Dulbecco 修正 Eagle 培地 (DMEM) で 培養 (37℃、5%CO ₂)。 ■投与方法・期間/試験方法 ・ 細胞生存率アッセイ： 1×10 ⁵ 細胞/mL、24 時間培養。 続いて、細胞は培地から移さ れ、金属酸化物分散液を被り 24 時間培養。 ・ SiO ₂ -DMEM-FBS 分散液中、 6 及び 24 時間培養後、ミトコ ンドリア活性 (MTT アッセイ) と細胞膜ダメージ (LDH リリ ース) の測定、細胞毒性を計算。 ・ 細胞内酸化ストレス (ROS) レベルの測定；分散液に 2、6、 12、24 時間暴露後、分散液を 10μM MCFH-DA を含む血清 無し DMEM と置換し 30 分、 37℃で培養後測定。 ・ 細胞内過酸化；分散液暴露後	①SiO ₂ 粒子のタンパク質および Ca 吸着 10, 100mg/ml で、fSiO ₂ 、mSiO ₂ は吸着ほとんどなし。一方、nSiO ₂ は、Ca をわずかに、タンパク質を 顕著に吸着。 ②SiO ₂ 粒子 (不安定) の細胞毒性 ミトコンドリア活性： 用量依存だが、顕著でない。 1000μg/mL で非暴露 (コントロール) の 70%。 細胞膜ダメージ：粒子によって異 なり、顕著なものもあり。nSiO ₂ だか特別ということはない。 ③SiO ₂ 粒子 (安定) の細胞毒性 nSiO ₂ -1 (安定)、nSiO ₂ -2、nSiO ₂ -3 (不安定：粒度分布複数ピークも つ) で比較した。 ミトコンドリア活性：安定は低下 させる。 細胞膜ダメージ：nSiO ₂ -1、nSiO ₂ -2 はわずかだが、nSiO ₂ -3 は両細胞 に対して顕著な変化あり。 ④SiO ₂ 粒子による ROS の誘発 nSiO ₂ は 24 時間後でコントロール のせいぜい 1.6 倍と、わずかであ る。 脂質過酸化は n SiO ₂ -1、n SiO ₂ -2 はコントロールの 2 倍だが、n SiO ₂ -3 は 5 倍。 ⑤SiO ₂ 粒子によるカスパーゼ-3 活 性の誘発 アポトーシスの誘発能力の評価。	・ nSiO ₂ の細胞影響は メーカーによって異 なり、この研究におい て、nSiO ₂ によって起 こされた細胞影響の 物質的なおよび/ま たは化学的なファク ターは、明確に決定す ることができなかった。 ・ nSiO ₂ の可溶性およ び蛋白質吸着能力と その細胞影響の関係 性は小さいようであ った。 ・ nSiO ₂ s の細胞影響 は金属酸化物ナノ粒 子のそれと同様であ るにもかかわらず、 nSiO ₂ s の違う細胞効 果の原因のうちの 1 つ は、違う表面特性であ るかもしれない。細胞 影響のメカニズムは 違うかもしれない。こ れらの影響はそれら の表面特性に依存で するかも知れず、ミク ロスケールの SiO ₂ 粒 子の細胞影響に比べ て、それらが特に強力 ではなかったことに 注目されるべきであ

			(DLS)、SiO₂ 濃度 (XRF)、Ca 量 (SiO₂ から推定) ・粒子のタンパク質、Ca 吸着能力の測定 (遠心分離後、上澄み液を測定)	24 時間に、DPPP 使用して測定。 ・カスバーゼ-3 活性の測定；7-アミノ-4-トリフルオロメチル クマリン (AFC) と複合した Asp-Glu-Val-Asp (DEVD) ペプチドの切断を用いて測定。	24 時間後測定で、増加あり。特に、n SiO₂-3 は、70.8 μg/mL の時、コントロールの 10 倍と顕著。	る。著者らの先行調査によると、n SiO₂s の細胞毒活性は、ZnO、CuO>n SiO₂>TiO₂、CeO₂ として要約できる (堀江ら、2010、2011、2012)
--	--	--	--	--	---	--

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
SiO 2-8	Imai S., Yoshioka Y., Morishita Y., Yoshida T., Uji M., Nagano K., Mukai, Y., Kamada H., Tsunoda S., Higashisaka K., Tsutsumi Y. Nanoscale Research Letters 2014, 9:651	Size and surface modification of amorphous silica particles determine their effects on the activity of human CYP3A4 in vitro 非結晶のシリ カ粒子のサイ ズと表面部分 修飾は in vitro のヒト CYP3A4 活性へのそれ らの影響を 決定する	■試験物質/試料調整法 ・シリカナノ粒子： 直径 30、70nm (nSP30、 nSP70) ・従来のシリカ微粒子： 直径 300、1,000nm (mSP300、mSP1000) ・カルボキシル基修飾 (nSP30-C、nSP70-C) アミ ン修飾 (nSP30-N、nSP70-N) 購入先：Micromod Partikeltechnologie 社 (独)。 水中に分散保管。使用直前に 5 分間超音波、1 分間攪拌。 ・超純水又は 10%胎児子牛血 清 (FCS)、1%抗生物質抗か び混合ストック溶液 (Ab) を 加えた Dulbecco 修正 Eagle 培養液で 0.1 又は 0.2 mg/mL に希釈し、平均粒径 と ζ 電位 (zetasizer Nano-ZS)、粒径 (DLS)、ζ 電位 (レーザードップラー電 気泳動) 測定。 ・平均粒径 (DLC 測定)： nSP30, nSP30-C, nSP30-N, nSP70, nSP70-C, nSP70-N, mSP300, mSP1000 : 36.8 ±3.0, 49.0±1.7, 40.4 ±0.9, 86.2±2.7, 78.7± 0.3, 103±0, 293.0±2.7, 1, 253.3±32.1 nm (水中), 84.9±1.9, 294.0±45.0, 410.3±48.2, 128.3±2.3,	①■試験物質； HLMs (Xtreme 200) (購入先： XenoTech、米国) ・ケトコナゾール〈代表的 CYP3A4 抑制剤〉 ・ルシフェリンイソプロピルアセ タール (LIPA) 〈CYP3A4 によ って物質代謝され、ルシフェリンを 放出。LIPA と ATP ルシフェラー ゼ反応混合物との反応後、蛍光に よって CYP3A4 活性を定量〉 ■投与方法・期間/試験方法 ・HLMs 中の CYP3A4 活性評価 培養混合物 HLMs 20µg/mL LIPA 10µmol/L リン酸カリウム緩衝液 15µL シリカ粒子濃度：2, 10, 50, 200, 800 µg/mL 又はケトコナゾール： 200nmol/L を 10 分、37°C で事前培養後、 NADPH 再生システム 15 µL を添 加して酵素反応開始。 加えて、 添加順を変えて、シリカ粒子と LIPA、シリカ粒子とミクロゾーム たんぱく質の物理的な結合の有無 を確認した。 ②■試験生物 HepG2 細胞 (10%FCS、1% Ab を 含む Dulbecco 修正 Eagle メ培養 液に維持) ■投与方法・期間/試験方法 ・乳酸塩デヒドロゲナーゼ (LDH) 放出アッセイ	①シリカ粒子の HLMs の CYP3A4 活性への影響 抑制定数 (IC50) は、nSP30、 nSP30-C、nSP30-N、nSP70、 nSP70-C、または mSP300 によ って用量依存的に減少した。 mSP1000-処理グループはコント ロールグループと比較して有意な 差無し。 無修飾シリカ粒子に対して、IC50 は粒度増大に伴い増大した。 対照的に、nSP30 と nSP70 に対 する IC50 値は、nSP30-C、 nSP30-N、nSP70-C に対しての値 より低く、表面部分修飾によって 粒子の抑制ポテンシャルが変更さ れたことを示している。 なお、nSP70-N は増加しており、 アミン基の影響が nSP30-N とは 異なっている。 シリカナノ粒子と mSP300 が、ミ クロゾームたんぱく質と物理的に 結合し、HLMs の CYP3A4 活性に 影響したことを示唆する。 ②HepG2 細胞と HepG2 細胞の CYP3A4 活性へのシリカ粒子の細 胞毒性 25、50、100、200µg/mL のシリ カ粒子濃度、48 時間の処理時にグ ループの生存率は約 100%であり、 この条件では粒子は膜損傷を引き 起こさなかった。 対照的に、nSP70, nSP70-N、m SP300、または mSP1000 処理が CYP3A4 活性への影響が無かった	・シリカ粒子 が生体外で CYP3A4 活 性を抑制す るか、または 活性化でき ることを初 めて報告す る。より小 さい粒子が、 より大きい粒 子より、 CYP3A4 活 動を抑制す る大きい可 能性を持ち、 シリカ粒子 の表面部分 修飾によっ てそれらの CYP3A4 活 性への影響 が変更でき ることを示 した。結果 は、シリカ粒 子のサイズ と表面部分 修飾の最適 化がシリカ ナノ粒子の より安全な 適用の開発 に寄与する ことを示唆

			267.0±28.6, 267.3±2.1, 249.3±24.0, and 1,083.3±35.1 nm (培養液中)。 ・表面電位 (ドップラーで測定): nSP30, nSP30-C, nSP30-N, nSP70, nSP70-C, nSP70-N, mSP300, mSP1000: -32.5±1.4, -46.9±1.8, -18.3±1.9, -58.4±0.2, -64.3±1.9, -35.6±1.1, -56.4±0.7, -72.4±0.6 mV (水中)、-9.0±1.0, -11.2±0.2, -11.1±1.1, -10.0±0.1, -10.2±0.5, -10.1±1.0, -9.3±0.5, -10.0±1.6m V (培養液中)	商業用の LDH 細胞毒性試験 (和光純薬) を使用して実施。 シリカ粒子 (25µg から 200µg ま で/mL)、48 時間培養。上澄液の 吸光分析。 ・HepG2 細胞中の CYP3A4 活性 評価 シリカ粒子処理は LDH 放出アッ セイと同様。 48 時間培養後、細胞はリン酸塩緩 衝液で洗浄後、LIPA(3µ mol/L)200µL 添加 1 時間後、培養 液採取し、100µL ルシフェリン検 知リガンド添加、蛍光分析。	のに対して 50、100、200µg/mL の nSP30、100、200µg/mL の nSP30-C、100µg/mL の nSP30-N、200µg/mL の nSP70-C 処理は、コントロールグ ループに比べて、かなり下の CYP3A4 活性を結果として生じ た。 これらの結果は、より小さいシリ カ粒子が、細胞の CYP3A4 活性を 抑制するより大きいポテンシャル を持っていたことを示唆する。	する。
--	--	--	---	--	--	------------

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質試料 調整法 /試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
SiO 2-9	Kim YH, Boykin E., Stevens T., Lavrich K., Gilmour M. Journal of Nonobiotechnology 2014, 12:47	Comparativ e lung toxicity of engineered nanomateria ls utilizing in vitro, ex vivo and in vivo approaches (in vitro, ex vivo、in vivo アプローチ を利用した 工業ナノマ テリアルの 比較肺毒性)	■試験物質 工業ナノ材料 (ENM) ・SiO ₂ (10) (一 次直径 5-15nm; 無定 形; Sigma Aldrich) ・CeO ₂ (23) (同 15-30nm; セリ アナイト; NanoAmor)、 CeO ₂ (88) (同 70-105nm; セ リアナイト; Alfa Aesar)、 ・TiO ₂ (10) (同 10nm; アナタ ーゼ; Alfa Aesar)、TiO ₂ (200) (同 200nm; アナタ ーゼ; Acros Organics)。 DLS で測定し た各水力直径 (nm) (水、生 理食塩水 (in vitro)、培養液 (ex vivo)、培養	■試験生物 おとな無菌雌 CD-1 マウス (体重: 肺毒性用-20-25g、 肺組織スライス用-30-45g) (購入先: Charles River 繁殖研究所) ■投与方法・期間/試験方法 ①口咽頭吸引 (in vivo) 50μL 生理食塩水中の 100μg の ENM ネガ: 50μL 生理食塩水 ポジ: 2μg のリポ多糖体 暴露時間: 4、24 時間 ・安楽死後、採血と解剖、 肺胞洗浄。血液学値測定 (全 白血球、全赤血球、ヘモグ ロビン、ヘマトクリット、 平均血球容積、平均血球ヘ モグロビン濃度、血小板) ・生化学とサイトカイン分 析; 乳酸塩デヒドロゲナーゼ (LDH) と γ-グルタミルト ランスフェラーゼ (GGT) 濃度、アルブミンと全たん ぱく質濃度、N-アセチル -s-D-glucosaminidase (NAG) 活性、腫瘍壊死フ ァクター-α (TNF-α) およ びインターロイキン 6 (IL-6) の濃度、および BALF のマクロファージ抑	①肺炎症反応 (in vivo) ・BALF へ放出された LDH 濃度は、コ ントロールに比べ、CeO ₂ (88) (暴露後 24 時間) を除いてどれもさほど増加さ せなかった。 ・N-アセチル基-s-D-グルコサミニダー ゼに比べて、リソソーム酵素および酸化 ストレスのバイオマーカーとしての (NAG) と γ-グルタミルトランスフェ ラーゼ (GGT) は、不変であった。 ・CeO ₂ (23) (暴露後 4 時間、24 時間) は、BALF 中のアルブミンおよび全たん ぱく質濃度を顕著に増加させ、この物質 が肺浮腫を起こしたことを示した。 ②肺炎症反応 (ex vivo、in vitro) ・暴露後 24 時間の肺組織スライスから の上澄み液の LDH、GGT、および NAG 濃度は、試験されたどの濃度でも変化が 無かった。最も高い濃度 (132μg/mL) の時の SiO ₂ (10) だけがネガティブな コントロールに比べて IL-6 と MIP-2 の 濃度をかなり増大させた。また、CeO ₂ (23) は IL-6 濃度を増大させたが、こ れは統計的に有意ではなかった。 ・暴露後 24 時間の ENM 暴露 MH-S 細 胞からの細胞培養上澄み液の評価は、す べての ENM が LDH 放出を用量依存的 に増加させることを明らかにした。SiO ₂ (10) と TiO ₂ (10 と 200) は多少細 胞毒性を示したが、明白なサイズ依存の 影響 (細胞膜完全性についての) は観察 されなかった。SiO ₂ (10)、CeO ₂ (23)、	・小さなサイズの ENM (SiO ₂ (10) と CeO ₂ (23)。TiO ₂ (10) を除 く) はマウスにおいて急 性肺毒性を引き起こし た (in vivo)。CeO ₂ (23) はマウス肺中へのサイ トカイン (IL-6、TNF- α、MIP-2) 放出、好中 球の増加、たんぱく質増 加に対して最も強い影 響がある一方、より大き い CeO ₂ (88) と TiO ₂ (200) はそれほど強力 ではなく、影響が ENM のサイズおよび化学組 成に依存することを示 した。 ・肺組織スライス (ex vivo) および肺胞マクロ ファージ (in vitro) 両 方からの ENM 毒性の 順位は、マウス (in vivo) から順位付け結果と うまく一致し、肺マクロ ファージがこの影響を 反映していることを示 唆した。暴露が細胞表面 積あたりの質量に基づ いた時には、ex vivo と in vitro の炎症反応がほ とんど同様なプロフィ

			液 (in vivo) : 100 μg/mL) SiO₂(10) : 401、574、458、342 CeO₂(23) : 131、269、796、432 CeO₂(88) : 162、239、500、220 TiO₂(10) : 402、739、645、660 TiO₂(200) : 387、690、493、417	制たんぱく質 2 (MIP-2) ②EMN の ex vivo 毒性 ■投与方法・期間試験方法 ENM 懸濁液は 2 分間超音波処理、1 分間攪拌後、22、44、66、132μg/mL に培養液で希釈。 2 日間培養後、肺細胞スライスは、24 時間、合計量 0.5mL に暴露 (ポジは 87ng/mL の LPS、ネガは培養液のみに暴露)。 ENM への暴露後の組織培養液の上澄み液と組織ホモジネートは、細胞外の (LDH、NAG) および細胞内 (GGT) 生化学分析、サイトカイン分析 (IL-6、MIP-2、TNF-α) に使用。 ③EMN の in vitro 毒性 ■試験生物 ネズミ科肺胞マクロファージ (MH-S) 細胞 (購入先 : ATCC) ■投与方法・期間試験方法 暴露粒子濃度 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, and 100μg/mL (ポジ : 37°C のトリトン X-100、ネガ : 培養液のみに暴露) 培養液中 24 時間暴露。 ・生化学とサイトカイン分析	CeO₂ (88)、TiO₂ (10)、TiO₂ (200) の細胞膜完全性に対する 50%効果濃度 (EC50) は、それぞれ約 100、295、141、330、384μg/mL であった。 ・ミトコンドリアの代謝活性に基づく細胞生存能力は暴露後 24 時間で評価された)。LDH 分析データと同様に、また、ENM の用量依存影響が観察され、細胞生存能力に対する LEC50 は、SiO₂ (10)、CeO₂ (23)、CeO₂ (88)、TiO₂ (10)、TiO₂ (200) で、それぞれ約 13、18、55、30、77μg/mL であった。 従って、生存能力に対する EC50 に基づく ENM の毒性順位は、SiO₂ (10) > CeO₂ (23) > TiO₂ (10) > CeO₂ (88) > TiO₂ (200) の順にあった。LDH に対する EC50 がずっと高かったのも、これは、細胞膜完全性よりミトコンドリアの機能が ENM 暴露に敏感であったことを示す。 ・暴露後 24 時間の DNA 含有量に基づき細胞増殖も測定した結果、細胞数は、高い濃度暴露で ENM-暴露されたグループを除いて、どれも顕著な変化は見られなかった。100μg/mL 濃度の時に、SiO₂ (10) は MH-S 細胞数を顕著に減少させる一方、TiO₂ (10) と TiO₂ (200) は細胞数を顕著に増大させた。 ・MH-S 細胞中の炎症誘発サイトカイン IL-6 の濃度を暴露後 24 時間に測定した。SiO₂ (10) は、IL-6 肺組織スライス反応が同様に並んでいる他の ENM よりもより多い IL-6 生産を引き起こした。	ールであることが明白であった。 ・3 つの異なる試験方法からの急性肺毒性エンドポイントの間で比較的良好な相互関係を示したけれども、影響の可逆性または長期毒性への進行をより一層研究することを未だ必要としている。それにもかかわらず、結果は、細胞または肺組織スライスによって動物肺毒性試験を置き換えることの実現可能性のより一層の証拠を提供し、生物系における ENM 毒性の解釈を改善する重要なパラメーター (例えば、アグロメレーション状態および暴露用量の計量) についての情報を提供する。
--	--	--	--	---	--	---

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法/試験用量	試験生物/投与方法・期間/試験方法	試験結果	結論
ナノセルロース	Catalán J, Ilves M, Järventausta H, Hannukainen KS, Kontturi E, Vanhala E, Alenius H, Savolainen KM, Norppa H /Environ Mol Mutagen. 2014 Sep 24	Genotoxic and immunotoxic effects of cellulose nanocrystals in vitro (in vitro でのセルロースナノ結晶の遺伝毒性および免疫毒性効果)	●対象物質 ・CNC：セルロースナノ結晶 ・サイズ：幅 7.3±0.2nm ・フィブリル長さ 135±5nm ●MCC：微結晶（非ナノスケール）セルロース ・サイズ：粒子径約 50µm ●CNC 試料調整方法 ・Whatman 1 フィルターの天然綿を硫酸で液体化し、酸を洗浄し、ウィスカーを抽出 ・sulfur/carbon 比= 0.015	●試験生物 ①BEAS 2B：ヒト気管支上皮細胞 ②hMDMs：ヒト単球由来マクロファージ ●試験方法 a. 細胞毒性 ①BEAS 2B 20,000セルを含む 1ml の BEGM 液を 24 培養皿に移し、MCC、CNC を添加 ・濃度：5、15、30、60、100、150、300µg/ml ・測定時間：4、24、48 時間 ②hMDMs 300,000 セルを 24 培養皿に移し、半数は 1µg/ml の LPS で処理し、MCC、CNC を添加 ・濃度：30、100、300µg/ml ・測定時間：6 時間 b. 小核分析—MN アッセイによる ①BEAS 2B 250,000 セルを T25 フラスコで 72hr 培養し、MCC、CNC を添加 ・濃度：2.5、5、15、30、60、80、100µg/ml ・24hr 後 Cytochalasin B(9µg/ml) 添加 ・測定時間：48hr ・コントロール：セルロース無添加 ・ポジティブコントロール：mitomycin C(150ng/ml) 添加 ・1 培養当たり 200 セルにつき CBPI をカウント	●BEAS 2B における細胞毒性、細胞周期遅れ、小核誘発 ・CNC は 4hr 後および 48hr 後において、他の測定時間に比し高い細胞生存率を示した。MCC は各暴露時間ではほぼ同等の生存率であった。 ・48hr 暴露後の 55%細胞毒性を細胞生存率、蛍光細胞生存測定両方で評価した結果、CNC、MCC とも 100µg/ml が MN アッセイの最大投与量とした。(Table-1) ・MN アッセイにより CBPI を評価した結果、両セルロースはいずれも、48 時間の処理 (2.5 ~100µg/ml) 後に二核または単核 BEAS 2B 細胞における小核 (MN) を誘導しなかった。 ●hMDMs における細胞毒性、サイトカイン放出 ・CNC、MCC とも 0~300µg/ml の投与に対し、LPS 処理、未処理とも、生存率に差はなかった。 ・CNC (30-300µg/ml) では IL-18、TNF-α の放出はなかったが、MCC は、LPS 処理の 300µg/ml 投与 6hr 暴露で、IL-18 の有意な放出を誘導し、また LPS 未処理の 300µg/ml 投与で TNF-α の有意な放出を誘導した。この放出は投与量に依存し増加し	・MCC、CNC ともヒト気管支上皮細胞に遺伝毒性を示さなかった ・MCC が IL-18、TNF-α を誘導するのにに対し、CNC は、試験した条件下で、炎症反応は示さなかった。

				c. hMDMs におけるサイトカイン放出 ・ 12 培養皿培養の LPS 処理及び未処理の各 500,000 セルに MCC、CNC を添加 ・ 濃度：30、100、300µg/ml ・ 測定時間：6 時間 ・ コントロール：セルロース無添加 ・ ネガティブコントロール：LPS1µg/ml 添加 ・ ELISA アッセイによりサイトカイン放出を測定	た。	
--	--	--	--	---	----	--

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
Ag-1	Herzog F, Loza K, Balog S, Clift MJ, Epple M, Gehr P, Petri-Fink A, Rothen-Rutish auser B /Beilstein J Nanotechnol. 2014 Aug 26;5:1357-70	Mimicking exposures to acute and lifetime concentrations of inhaled silver nanoparticles by two different in vitro approaches (二つの異なる in vitro のアプロー チによる吸入銀 ナノ粒子の急性 および生涯濃縮 に対する模擬暴 露)	●対象物質 ・PVP コート AgNPs ポリビニールピロ リロン 平均粒径：116nm ゼータ電位：20mV ●試料調整方法 ・2g ブドウ糖＋ 1gPVP＋40g 水を 90℃に加熱し、1ml の水に溶解した 0.5gAgNO ₃ を添加し 1hr 加熱 ・遠心分離、洗浄し、 ブドウ糖、酸化物、 Ag イオン等を除去 ・24、240、 2400µgAg/ml に調整	●試験生物 ヒト肺胞/気道障壁 (A549 上皮細胞、 ヒト末梢血単球由来樹状細胞および マクロファージ細胞) のトリプル細胞 共培養モデル ・A549 (人肺胞タイプ II 上皮細胞由 来腺癌) を RPMI1640 液で培養 ・培養後、0.5x10 ⁶ cells/ml を培養皿に 移し、RPMI 中で 5 日培養 ・MDDCs (単球由来樹枝状細胞) は 末梢血単球を RPMI 液中に 10ng/ml IL-4+10ng/ml GM-CSF を添加し、7 日培養し作成 ・MDMs (単球由来マクロファージ) は末梢血単球を RPMI 液中に 10ng/ml M-CSF を添加し、7 日培養し作成 ・2.5x10 ⁵ MDDCs に 5x10 ⁴ MDMs を 添加し、24hr 培養し、トリプル細胞 共培養モデルとする。 ●試験方法 a. 浸漬試験 ・トリプル細胞共培養モデルに AgNPs (10、20、30µgAg/ml) 1ml を添加し、 4hr～24hr 培養 ・4hr 後の表面 Ag 濃度：0.6、1.1、 1.7µgAg/cm ² ・24hr 後の表面 Ag 濃度：1.7、3.4、 5.1µgAg/cm ² b. 気液界面 (ALI) の細胞の曝露試験 (ALICE) ・最終表面濃度 (0.03、0.3、3µgAg/cm ²) となるよう、AgNPs 液 1ml を ALICE に噴霧	●細胞組織と銀粒子の取込 ・LSM による観察では、a、b と も細胞組織、DNA の変化はなかつ た。 ・トリプル細胞共培養モデルの表 層の細胞とその小胞に AgNPs の 集合体が見出された。 ●細胞毒性 ・b において、細胞毒性 (LDH) の放出の有意な増加はなかった が、3µgAg/cm ² 、24hr では 2.7±1.3 倍と高いレベルを示した。 ・a において、20、30µgAg/ml、 24hr では、それぞれ 2.0±0.5、 1.9±0.3 倍と有意に増加した。また LPS 処理の 20µgAg/ml では 2.2±0.6 と有意に増加した。 ●サイトカイン/ケモキネ分泌 ELISA アッセイによる調査 ・b において、3µgAg/cm ² 、24hr で TNF-α が若干増加した。 また IL-8 の有意な変化はなかった が、4hr より 24hr の方が放出は多 い。 ・a において、TNF-α の有意な変 化は観察されない。 また 30µgAg/ml、24hr で IL-8 の 有意な増加があった。 また a,b とも LPS 処理の影響はな かった。 ●炎症誘発遺伝子発現と酸化スト レスマーカー (SOD-1、HMOX-1)	・二つの暴露方法 により、a の浸漬 試験は、b の ALICE より AgNPs 暴露の影響 が大きいこと が示された。 ・AgNPs の急性 細胞毒性、炎症誘 発性は実際の濃 度では起こり得 ない。 ・Ag NP の慢性的 吸引の研究を考 慮すべきである。

				・両暴露法とも肺細胞表面の銀の表面濃度はほぼ等価である。	・b の RNA を 4hr、24hr 後に収集し、分析 ・0.03$\mu\text{gAg}/\text{cm}^2$ 投与では、TNF-α、IL-8 の変化はないが、0.3$\mu\text{gAg}/\text{cm}^2$、4hr 後で、TNF-$\alpha$、IL-8 の有意な増加があった。しかし、24hr 後には変化がない。 ・LPS 処理では TNF-α、IL-8 は増加したが、AgNPs 投与量の影響はなかった。 ・酸化ストレスマーカーの変化はない。	
--	--	--	--	--	--	--

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
Au-1	Han SG, Lee JS, Ahn K, Kim YS, Kim JK, Lee JH, Shin JH, Jeon KS, Cho WS, Song NW, Gulumian M, Shin BS, Yu IJ /Arch Toxicol. 2014 Jun 17	Size-dependent clearance of gold nanoparticles from lungs of Sprague-Dawley rats after short-term inhalation exposure (短期吸入暴露後 の Sprague-Dawley ラットの肺から の金ナノ粒子の サイズ依存排出 能)	●対象物質 ・ AuNPs サイズ 小 AuNPs : 平均 12.8nm 大 AuNPs : 平均 105.4nm	●試験生物 ・ Sprague-Dawley ラット : 6 週齢 ●投与方法 ・ ラットを経鼻暴露システムにセットし、 AuNPs を投与 ・ AuNPs は 30 l/min の空気霧化し、 各鼻孔で 1l/min に調整 ・ 霧化空気中の AuNPs 濃度 : 13µg/m ³ ・ ラットを小 AuNPs 投与、大 AuNPs 投 与、対照群 (無投与) の 3 グループに分 離 (1 グループ 24 匹) ・ 1 日 6hr 暴露を 5 日継続 ●試験方法 ・ 投与終了後、1、3、28 日後に 8 匹ずつ 解剖し、調査 ・ 血液、精巣、腎臓、脾臓、肝臓、肺、 心臓、脳を採取 a. 外観、体重変化 ・ 外観を毎日観察 ・ 購入時、グループ分け時、暴露時毎日、 暴露終了後 5 日毎に体重測定 b. 組織内の AuNPs の分布 ・ 臓器をホルマリン処理し、硝酸で溶解 し、電子オープンで 200℃、1h 処理 ・ 処理後、原子吸光分析計で分析 c. 毒物動態評価 ・ 肺組織中の金粒子を、暴露後 1、3、28 日後に測定 ・ 粒子濃度 vs 経過時間より、薬物動態パ	a. 外観、体重変化 ・ 投与中および回復期間中と も、AuNPs 投与の影響は見ら れない。 b. 組織内の AuNPs の分布 ・ 小 AuNPs 投与群では、回復 期間中に AuNPs は肺、脾臓に 高度に有意に集積し、また回復 1 日後では肝臓、脳、精巣、血 液に有意に集積したが、3、28 日後では有意でない。 ・ 大 AuNPs 投与群では、回復 期間中に AuNPs は肺に高度に 有意に集積した。 ・ また回復 1 日後のみ血液に有 意に集積した。 c. 毒物動態評価 ・ 肺の薬物動態パラメータ (t _{1/2} 、C _{max} 、AUC _{all} 、AUC _{inf} 、 MRT _{all} 、MRT _{inf}) は大 AuNPs 投与において、小 AuNPs 投与 より長い t _{1/2} 、MRT を示した。 d. 病理組織評価 ハイパース ペクトル ・ 肺の病理組織はいずれの AuNPs について変化を示さな かったが、かすかな肺胞の肥厚 があった。 ・ 肺胞、肺胞マクロファージ、 肺リンパ節に 28 日後も大、小 AuNP s がハイパースペクト ル画像で観察される。	・ 本研究データ は、小 AuNPs が 大 AuNPs よりも 速い速度で肺 (一 次曝露器官) から 肺外臓器へ転位 することができ ることを示唆し ている。

				ラメータを計算 (MinNonlin : 非線形最小二乗法ソフト) d. 病理組織評価 ・臓器をホルマリン処理しヘマトキシリンとエオシンで染色 ・処理後、ハイパースペクトル顕微鏡で観察	・肺に比べ、肝臓、脳、精巣、腎臓、脾臓の AuNPs は僅かである。	
--	--	--	--	--	--	--

No	著者/書誌事項	論文題目(和訳)	試験物質/試料調整 法 /試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
Ag-2	Vandebriel RJ, Tonk EC, de la Fonteyne-Blank estijn LJ, Gremmer ER, Verharen HW, van der Ven LT, van Loveren H, de Jong WH /PartFibre Toxicol. 2014 May 7;11:21	Immunotoxicity of silver nanoparticles in an intravenous 28-day repeated-dose toxicity study in rats (ラットにおける静脈 28 日間反復投与毒性試験における銀ナノ粒子の免疫毒性)	●対象物質 ・ AgNPs : 平均粒径 21nm 濃度 : 2mg/ml (1mM クエン酸塩中) ・ KLH : キーホールリンペットヘモシアニン	●試験生物 ・ Wistar derived WU ラット : 雄、8 週齢 ●投与方法 ・ AgNP 実験グループ ・ 28 日間 1 回/日 AgNP 尾静脈注射 ・ 投与 AgNP 量 0 (対照群: PB のみ)、0.0082、0.025、0.074、0.22、0.67、2、6mg/kg(体重) ・ KLH200μl を 14 日目、28 日目に首に注射 ・ KLH 免疫効果確認グループ KLH 投与無し + AgNP6mg/kg KLH 投与無し + AgNP 無し ●試験方法 ・ 49 日後に解剖し、臓器、血液を収集し、各種分析 ・ 測定値は統計処理モデル (BMD) により解析 ①AgNP 暴露効果 a. 体重、臓器重量測定 b. 血液分析 ・ Advia 120 Hematology Analyser で分析 赤血球、ヘモグロビン、白血球を分析 c. 脾臓細胞数分析 ・ FACSCalibur フローサイトメーターで分析 d. 骨髄細胞 ・ 大腿骨細胞を集め、有核細胞数を計測 ②KLH 免疫効果 (投与方法 (Fig2))	①AgNP 暴露効果 a. AgNP1.84mg/kg で体重減少、AgNP0.76mg/kg で胸腺重量減、脾臓重量は増加 ・ 肝臓、腎臓重量には AgNP の影響は無い b. 血液分析-AgNP 暴露の影響 ・ RBC、RDW、HDW は、BMDL s 2.04、1.50、1.28mg/kg で増加 ・ MCV、MCH、MCHC は、BMDL s 1.77、1.39、5.65mg/kg で減少 ・ HGB、HCT、PLT、MPV は AgNP の影響はない。 ・ 白血球の好中球、モノサイト、大非染色細胞、網状赤血球の比率は、BMDL s 0.69、0.48、1.24、0.85mg/kg で増加 ・ モノサイト数は BMDL0.35mg/kg で増加 ・ リンパ球は BMDL2.57mg/kg で減少 c. 脾臓細胞数分析 ・ 脾臓細胞数、CD3、CD4、CD8 細胞比は BMDL s 0.74、1.09、1.11、0.73mg/kg で増加 ・ CD3、CD4、CD8 細胞数は BMDL s 0.45、1.09、0.46、0.39mg/kg で増加 ・ CD161a 細胞の比と数は BMLD0.62、0.36mg/kg で増加 ・ CD45RA 細胞の比は影響なく、数は BMLD 0.68mg/kg で増加 ・ CD3/CD45RA 比は BMLD0.86mg/kg で増加 d. 骨髄細胞数への AgNP 投与の影響は無い。 ②KLH 免疫効果 e. KLH 免疫は体重、臓器重量に影響しなかった。	・ Ag-NP の静脈注射は、機能免疫系の抑制をもたらす。・ この効果は AgNP の緩慢な溶解による銀イオンによりもたらされたことを、否定できない。

				e. 体重、臓器重量測定 f. KLH による IgG、IgM の測定 ・血清を ELISA で IgG、IgM を測定 ・490nm でスペクトロメータで測定 g. サイトカイン生成 ・胸腺と脾臓を圧縮し、細胞を収集し、10^6細胞/ml を細胞培養皿で 24hr 培養 ・培養後、Bio-Plex で分析	f. KLH による IgG、IgM の測定 ・KLH 特定 IgG は BMLD0.4mg/kg で減少し、KLH 特定 IgM は BMLD3.64mg/kg で増加した。 g. サイトカイン生成 ・胸腺細胞の IL-10、IL-17 は BMLD0.58、1.47mg/kg で減少し、脾臓細胞の IL-18、IL-6 は BMLD1.57、1.21mg/kg で減少した。 ・胸腺細胞の IFN-γ、IL-2、TNF-α、脾臓細胞の IL-2、IL-10 は AgNP 暴露の影響はなかった。	
--	--	--	--	--	---	--

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
Au-2	Zhang J, Nie X, Ji Y, Liu Y, Wu X, Chen C, Fang X /J Nanosci Nanotechnol. 2014 Jun; 14(6):4124-38	Quantitative biokinetics and systemic translocation of various gold nanostructures are highly dependent on their size and shape (各種金ナノ構造 体の定量的生体 内動態および全 身転移のサイズ 形状依存性)	●対象物質 BSA 被覆各種金ナ ノ粒子 (GNP) ・金ナノクラスター : GNC 平均サイズ: 7.1nm ・加水分解 GNC 平均サイズ: 3.2nm ・金ナノロッド: GNR 平均サイズ : 57.5x18.2nm ・金ナノスフィア : GNS ・20nmGNS 粒径 : 17.8nm ・50nmGNS 粒径 : 54.2nm ・表面ゼータ電位は全 GNP で負極性 ●試料調整方法 ・GNC : 5mlHAuCl ₄ (10mM) を 5mlBSA (30mg/ml) に添加 後、0.5mlNaOH(1M) を加え、変色後洗浄 ・加水分解 GNC : 5mlGNC を 5mgトリ プシン添加の 10m INH ₄ HCO ₃ (50mM) に加え合成し、洗浄 ・GNR : CTAB 被覆 GNR を 1%BSA に添	●試験生物 ・雄 Balb/C マウス : 8 週齢 ●投与方法 ・0.5mgAu/kg を含む各種 GNP (GNC、加水分解 GNC、 GNR、2 種の GNS) を 200μ l の PBS に溶解し、静脈注 射 ●試験方法 ・投与後、2min、10min、 30min、60min、1 日、7 日、 28 日に解剖し、血液、臓器 (心臓、肝臓、脾臓、肺、腎 臓、脳) を採取 ・投与後、3hr、9hr、1 日、 3 日、5 日、9 日に尿を採取 a. Au 含有量の ICP-MS 分 析 ・臓器、血液、尿の重量測定、 ICPS-MS 分析 ・Au 検出限界 : 0.05ng/ml b. 血清の生化学分析 ・血清をバイオケミカルアナ ライザー (日立) で肝臓、腎 臓への影響を分析 ・BUN(A)、CREA(B)、 ALT(C)、AST(D)、TP(E)、 ALB(F)、GLOB(G)を測定	a. Au 含有量の ICP-MS 分析 <u>臓器内の Au 分布</u> ・サイズ 10nm 以下の小サイズ GNC、加水 分解 GNC は腎臓、脳、心臓に蓄積した。 腎臓への蓄積は加水分解 GNC が GNC より 多かった。 心臓、肺、脳への蓄積は 10 分後にピークと なったが、28 日後では大サイズ GNP と同 等レベルとなった。(Fig5) ・大サイズの GNP は肝臓に蓄積し、注射 10 分後に、50nmGNS で投入量の 90%、 GNR では 60%、20nmGNS では 40%が蓄 積された。 <u>血中の Au</u> ・GNC、加水分解 GNC は注射 10 分後で血 中に投入量の約 10%が残ったが、GNR、 20nmGNS、50nmGNS では注射 2 分後で 血中に投入量の約 5%しか残らなかった。 (Fig4C) <u>尿中の Au</u> ・小サイズ GNP s では尿中 Au は高濃度で、 特に加水分解 GNC では注射後 1~7 日で高 かった。 大サイズ GNP s は殆どなかった。 b. 血清の生化学分析 ・コントロールと比較し、明確な差は無か った。 c. 病理組織分析 ・肝臓では、50nmGNS は投与 10 分で血管 周辺細胞浮腫、炎症細胞浸潤が観察され、 20nmGNS は 60 分で広範囲の脂質/空胞の	・20nm 以上の GNP s は血流か ら速やかに除去 され、肝臓に蓄積 される。 ・GNC は半分以上は肝臓に、10% は腎臓に蓄積さ れる。 ・加水分解 GNC は殆ど腎臓に蓄 積される。 ・尿中への排出 は、腎臓への蓄積 に密接に関連し ている。 ・GNS は急性肝 臓損傷をもたら すが、GNR は 28 日後に肝臓損傷 が見られた。 ・加水分解 GNC では腎組織の損 傷が見られたが、 同時に尿への排 出が始まった。

			加、合成後、遠心分離 ・ GNS : 10ml 水、100μlCTAB (0.1M)、105.3μlHAuCL₄(23.9mM)を混合後、400μlL-アスコルビン酸(0.1M)を添加 ・ 10nmGNS を含むタネ溶液 1.6ml、0.75ml を加え、20、50nm の GNS を合成し、1%BSA に添加し、遠心分離	c. 病理組織分析 ・ 投与 28 日後、心臓、肝臓、脾臓、肺、腎臓、脳の組織を HE ステイン後光学顕微鏡で観察	変質、異常小葉構造、肝索の消失が観察された。GNR では 28 日後に血管周辺に小さなネクロシスがあった。GNC、加水分解 GNC では病変は観察されない。 ・ 腎臓では、特に加水分解 GNC で糸球体の減少、浮腫が 1 日後まで観察されたが、28 日後までに徐々に回復した。 ・ 心臓、肺、脳では全 GNP で病変は観察されない。	
--	--	--	--	--	--	--

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法/試験用量	試験生物投与方法・期間/試験方法	試験結果	結論
Ag-3	Verano-Braga T, Miethling-Graff R, Wojdyla K, Rogowska-Wrzesinska A, Brewer JR, Erdmann H, Kjeldsen F /ACS Nano.2014 Mar25;8(3):2161-75	Insights into the cellular response triggered by silver nanoparticles using quantitative proteomics (量的プロテオミクスを用いた銀ナノ粒子起因細胞反応に対する考察)	●対象物質 クエン酸塩被覆 AgNPs ・ 10nmAgNP 平均粒径：20.6nm ・ 100nmAgNP 平均粒径：93.1nm (Fig1,Table1) ・ AgNO3：Ag ⁺ イオンソース ●試料調整方法 ・ AgNPs0.02mg/ml を 2mM のクエン酸塩バッファに分散	●試験生物 ・ LoVo 細胞 (人結腸癌細胞) 単層として RPMI1640 液 +10%FBS (グルタミン含有) で培養 ●試験方法 ①プロテオーム分析 ・ 3x10 ⁵ cell/ml を T75 フラスコ中で培養 ▼投与方法(Fig2) ・ 10μg/ml の AgNPs 投与グループ 20nmAgNPs、100nmAgNPs 投与 ・ Ag ⁺ イオングループ AgNPs 投与 24hr 後、粒子を遠心分離で除去し、Ag ⁺ イオンに暴露 Ctrl20nm、Ctrl100nm Ag ⁺ ：対照群：1μg/ml Ag イオン (AgNO3 添加) ・ 無投与グループ：Control ▼試験方法 a. プロテオーム分析 ・ たんぱく質をトリプシンで消化し、ペプチドを iTRAQ で分類、質量分光分析 (MS) で定量する。 b. 遺伝子オントロジー分析 (GO) c. 蛋白質間相互作用 ・ STRING (遺伝子/蛋白質相互作用検索ツール) による蛋白質間相互作用の解析 d. 階層的クラスタ分析 蛋白質変化を AgNPs 別に 6 分類し解析 ・ クラスタ I：20nm による発現増加 ・ クラスタ II：両粒子による発現増	①プロテオーム分析 a. 3352 の蛋白質の内、AgNPs による変化(Fig3) ・ 20nmAgNPs 投与：発現減少 340、発現増加 280 ・ 100nmAgNPs 投与：発現減少 378、発現増加 339 ・ Ctrl20nm 投与：発現減少 120、発現増加 132 ・ Ctrl100nm 投与：発現減少 254、発現増加 204 ・ 粒子単独効果は 20nm で 467、100nm で 306 であった。 b. 遺伝子オントロジーによる蛋白質変化分析 ・ 20nmAgNPs は 100nmAgNPs より多くの蛋白質変化をもたらした。 ・ 特にミトコンドリア蛋白質は AgNPs により発現減少、細胞基質蛋白質は発現増加の傾向がある。 c. 蛋白質間相互作用の AgNPs の影響(Fig5)、 ・ 20nmAgNPs は 100nmAgNPs より、ミトコンドリア呼吸鎖の蛋白質の発現減少と、DNA 損傷応答の蛋白質の発現増加をもたらした。 ・ 20nmAgNPs のみの蛋白質クラスタ変化 発現減少：ミトコンドリア伝達系、RNA 処理、細胞増殖 発現増加：tRNA 代謝 ・ 100nmAgNPs のみの蛋白質クラスタ変化 発現減少：脂質代謝、膜対象蛋白質 発現増加：糖質代謝、新規(de novo)	・ 小 Ag 粒子は蛋白質ネットワークに大きな影響を及ぼす。 ・ 20nmAgNPs は細胞内に取り込まれ、100nmAgNPs は細胞膜外に留まり、20nmAgNPs で ROS の高いことと一致する。 ・ Ag 粒子は Ag イオンより、より多くの蛋白質変異をもたらす。 ・ AgNPs により蛋白質ユビキチン化と劣化をもたらされた。 ・ 20nmAgNPs で蛋白質の SUMO 化、100nmAgNPs で MAPK1、PAK2、フォスファターゼ 2A が活性化した。

				加 ・ クラスタⅢ：100nm による発現増加 ・ クラスタⅣ：20nm による発現減少 ・ クラスタⅤ：100nm による発現減少 ・ クラスタⅥ：両粒子による発現減少 ②AgNPs による酸化ストレス評価 3x10⁵cell/ml を T75 フラスコ中で培養 e. Oxyblot 分析 ・ カルボニル化蛋白質のウェスタンブロット f. 細胞間 ROS レベル測定 ・ H2DCF-DA ステイン後フローサイトメトリーで細胞間 ROS を計測 ③AgNPs サイズ依存細胞取り込み ・ 共焦レーザースキャン顕微鏡 (CLSM)による検査	蛋白質 folding d. 階層的クラスタ分析 ・ クラスタⅠでユビキチン関連変更遺伝子(SUMO)が見られた。 ・ クラスタⅢでプロテインキナーゼ MAPK1、PAK2、フォスファターゼ 2A(PPP2CA、PPP2R1A)が見られた。 ・ クラスタⅡでユビキチン化を伴う蛋白質が見られた。 ②AgNPs による酸化ストレス評価 e. Oxyblot 分析 ・ 20nmAgNPs のみに蛋白質カルボニル化が見られた。 f. 細胞間 ROS レベル測定 ・ ROS レベルは 20nmAgNPs >100nmAgNPs≠Ctrl100 >Ctrl20> Ag+≠Control であった。 ・ 20nmAgNPs は control の 3 倍であった。 ③AgNPs サイズ依存細胞取り込み (Fig8) ・ 20nmAgNPs は細胞内に取り込まれ、凝集した大きなクラスタが観察され、更に病変で丸まった細胞が観察された。 ・ 100nmAgNPs は数個が細胞内に取り込まれたが、大部分は細胞膜に見られた。	
--	--	--	--	---	---	--

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間試験方法	試験結果	結論
Pt	Shiny PJ, Mukherjee A, Chandrasekar an N /BioprocessBio syst Eng.2014 Jun;37(6):991- 7	Haemocompatibili ty assessment of synthesised platinum nanoparticles and its implication in biology (合成白金ナノ粒 子の血液適合性 評価とその生 物学における関 連)	●対象物質 ・プラチナナノ粒子 : PtNPs ●試料調整方法 ・ 褐 藻 <i>Padina gymnospora</i> を乾燥 し、10g を 100ml 水 中に分散、抽出液とす る。 ・ 0.001M H₂PtCl₆(20ml) に 上 記 抽 出 液 10ml を 50℃で反応させ、淡 黄色から暗黄褐色に 変色するまで、間欠的 に攪拌 (PtNPs 単体を反応 液から分離せず、反応 液そのまま以後の 実験を行っている。) ●粒子特性 ・ XRD 解析では、 (111) 面で粒子径 14nm ・電子顕微鏡による観 察では、粒子は球形で 粒径は 5-20nm、凝集 していない。	●試験生物 ①NADH (還元型ニコチンアミドアデニンジ ヌクレオチド) (注) 全ての真核生物あるいは多く の原核生物で用いられる電子伝達 体 ②人血の RBC(赤血球細胞)ペレット ●試験方法 ①NADH の NAD (+) への酸化 ・ 200ml の NADH と同量の反応液に 混合 a. UV-分光測光計による測定 波長 200-400nm で測定 ②ヘパリン処理した人の血液を 5℃、 1500rpm で遠心分離し、RBC ペレ ットにする。 ・RBC ペレットを PBS で洗浄後、PBS に溶解 ・ 反応液を加え、37℃で 60 分攪拌 (最大添加量 1:1 のようだが、詳細 記載無し) - 正対照群 : Triton-100 添加 (100% 溶血性) - 負対照群 : 無添加 PBS のみ (0%溶 血性) b. 吸光分析 波長 540nm で測定 c. 電子顕微鏡 (SEM) 観察 ・ FEI Quanta FEG 200 を使用	a. UV-分光測光計による測定 ・ NADH の 340、260nm のピー クが、反応液混合 12-16hr 後、 340nm の吸収ピークが減少した。 b. 吸光分析 ・ 溶血現象は 10%以下であった。 c. 電子顕微鏡観察 ・ PtNPs 処理の赤血球は、未処理 と同様に形態変化は起こさなかつ た。 ・ Triton-100 添加では、上澄みは 赤変し、赤血球は損傷を受け、溶 血性を示した。	・ 合成した PtNP s は NADH の酸 化能力を示した。 ・ 合成した PtNP s は赤血球に対 し溶血性を示さ なかった。

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
Ag-4	Munger MA, Radwanski P, Hadlock GC, Stoddard G, Shaaban A, Falconer J, Grainger DW, Deering-Rice CE /Nanomedicine . 2014 Jan;10(1):1-9	In vivo human time-exposure study of orally dosed commercial silver nanoparticles (経口投与商用銀 ナノ粒子の in vivo ヒト長期暴 露試験)	●対象物質 ・市販 AgNP のコロイド液 American Silver、LLC 製 ●AgNP 粒子の性状 ・表面を銀酸化物でカバーされた零価の銀粒子 ・10ppm ロット 粒径 5-10nm ・32ppm ロット 粒径 25-40nm - 平均粒径 32.8nm (DLS で は 59.8$\pm$20nm) - 銀イオン含有率：84.3% (ICP-MS 測定による) ●試料調整方法 ・銀金属電極を用いた AC 高電圧純水電解質	●試験生物 ・健康な被験者 60 名(男/女：35/25) ・年齢：18～80 歳 ●投与方法 ・2 グループに分離し、15ml の希釈 AgNP コロイダル液を経口注入 ・10ppm グループ：36 名 平均摂取量：100μg/day 3 日間、7 日間及び 14 日間摂取 ・32ppm グループ：24 名 平均摂取量：480μg/day 14 日間摂取 (一部被験者にプラセボを投与しているが詳細記載無し) ●試験方法 a. 臨床所見 ・試験開始前及び各試験期間終了後、測定を実施 - a-1. 体重、BMI、血圧、心拍数測定 - a-2. 血液(代謝、血球)検査 b. 血清、尿の銀含有量調査 ・10ppm グループ 3、7 日は投与 24hr 後に血清、尿を採取 ・10ppm グループ 14 日、32ppm グループは投与 2hr 以内に血清、尿を採取 ・ICP-MS で測定 c. 痰分析 ・最終投与後 24hr 以内に吸引し、採取 ・ROS と炎症性サイトカイン	a. 臨床所見 a-1 体重、BMI、血圧、心拍数測定 ・全項目で、10ppm グループは暴露日数による傾向は無かった。 ・血行動態は両グループで変化は無かった。 ・但し、心拍数は全グループで 2.3 拍有意に減少した。(P=0.05) a-2. 血液(代謝、血球)検査 ・10ppm グループで BUN、ALT、RBC が有意に減少したが、32ppm グループではこれらに変化が無かった。 b. 血清、尿の銀含有量 ・10ppm 投与 3 日、7 日では血清中に銀は未検出 ・10ppm 投与 14 日で 42%の被験者に検出され、平均は 1.6$\pm$0.4mcg/L であった。 ・32ppm 投与では 92%の被験者に検出され、平均は 6.8m$\pm$4.5cg/L であった。 ・尿中に銀は検出されなかった。 c. 痰分析 ・ROS 濃度に有意な変化は無い。 ・RNA(IL-8,IL-1α,IL-1β,MCP1,NQO1)について、AgNP 投与とプラセボ投与間に有意な差は無い。 d. MRI 検査 ・腹部の MRI 検査結果、AgNP 投与とプラセボ投与とも、形態、構造の変化は観察されない。	・市販のナノスケール銀粒子溶液の 14 日間の生体内経口暴露では、人間の代謝、血液学、尿、身体所見及び MRI に重要な変化を誘起しない。

				RNA の測定 d. MRI 検査 ・各タイムピリオッド毎に胸、腹部の MRI 検査		
--	--	--	--	--	--	--

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法/試験用量	試験生物/投与方法・期間/試験方法	試験結果	結論
Au-3	Park S, Woodhall J, Ma G, Veinot JG, Cresser MS, Boxall AB /Nanotoxicology 2014 Aug; 8(5):583-92	Regulatory ecotoxicity testing of engineered nanoparticles: are the results relevant to the natural environment? (工業ナノ粒子の限定的生態毒性試験: 結果は自然環境に適合しているか?)	●対象物質(Table I) ・ Au NPs-citrate(径<30nm) ・ Au NPs-MUDA(径<30nm) ・ Au NPs-NH₂ (市販) ・ Au NPs-PEG (市販) ●試料調整方法 ・ Au NPs-citrate H₂AuCl₄・2H₂O を 90℃、1h 加熱し、透析 ・ Au NPs-MUDA メルカプトタンウンデカン酸 (0.12g、3ml) を Au NPs-citrate500ml に添加し、1 週間攪拌後、透析 ●試験用量 ・ Au NPs-citrate : 0.5mg/ l ・ Au NPs-MUDA : 0.5mg/ l ・ Au NPs-NH₂ : 1mg/ l ・ Au NPs-PEG : 1mg/ l	●試験生物 ① <i>Daphnia magna</i> : オオミジンコ ② <i>Gammarus pulex</i> : ヨコエビ ③ <i>Lemna minor</i> : コウキクサ ●試験流体 ④ DI water : 純水 ⑤ APW : 人工池水 ⑥ M4 media : OECD2004 ⑦ ASW : 人工海水(35%塩分濃度) ⑧ Algae media : 緑藻類入り ⑨ Lemna media : Gamborg's B-5 基底物質を攪拌した流体のように思えるが、論文中で試験方法の記載が混乱) ⑩ HW : 硬水 米国環境保護局基準 ⑪ MHW : 弱硬水 同上 ⑫ SW : 軟水 同上 ⑬ 河川水 : 49 の北イングランドの川より収集 ●試験方法 a. 試験流体中の NP s の挙動 ・ 各試験流体に各 NP s を添加し、15 分超音波攪拌 ・ 1、2、4、6、8、24 時間後、NP s の挙動を NTA (ナノ粒子のブラウン運動を記録する装置) で記録 b. 試験生物の凝集への効果 ・ Au NPs-MUDA を試験流体/試験生物/暴露時間の組合せで、NTA で評価 ・ b-1 : 500ml④/①5 匹/48h、 ・ b-2 : 500ml⑤/②10 匹/96h ・ b-3 : 100ml⑥/③4 コロニー/24h c. 自然水中 NP s の挙動 ・ Au-MUDA を 49 の①に河川水に添加、 ・ AuNPs-citrate、AuNPs-NH₂ は 26 の	a. 試験流体中の NP s の挙動 (Fig1) ・ Au--NH₂ は④に比較し、⑧～⑩液中で凝集しなかった。(有意) ・ Au-PEG は④を除き、全試験流体で凝集しなかった。(有意) ・ Au-MUDA は全試験流体で凝集した。 ・ Au-citrate は⑨、⑩以外で凝集した。 b. 試験生物の凝集への効果 (Fig2) ・ b-1、b-2 では生物無添加に比べ、凝集状態は有意に減少した。 ・ b-3 では凝集状態は変化無し (有意) c. 自然水中 NP s の挙動 (Fig3) ・ Au-NH₂、Au-PEG は試験流体に比べ、河川水中では若干凝集しやすい。(Fig3C、D) ・ Au-MUDA は試験流体のほうが、河川水より凝集しやすい。(Fig3A) ・ Au-citrate は一部では安定、他では不安定であった。(Fig3B) d. 腐植酸(HA)の凝集への影響 (Fig4) ・ ④では、全 AuNPs で、HA 量に応じ、少ないが、有意な凝集が観察された。 ・ Au-MUDA では、HA 添加により、④を除き、全試験流体で平均粒径は有意に小さくなっ	・ ENPs は粒子タイプにより、種々の標準試験流体中で異なる挙動を示す。 ・ ENPs の凝集は水生生物や DOC の存在により、影響される。 ・ NP s の挙動は自然水と試験流体では異なる。 ・ 生態毒性試験には、実際の河川水と同様の特性範囲を用いるのが適当であろう。

				河川水に添加 ・ 添加後 15 分超音波撹拌 ・ 1、2、4、6、8 時間後、NP s の挙動を NTA で記録 d. 腐植酸(HA)の凝集への影響 ・ AuNPs-citrate、AuNPs-MUDA、AuNPs-NH₂ 各 0.5mg/ l を各試験流体 ①②③④⑤⑥ に添加し、更に腐植酸(0、1、5mg/ l)を加え撹拌 ・ 撹拌後 1、2、4、6、8 時間後に NTA で測定	た。 ・ Au-citrate では、HA 添加により、⑤⑥ で少ないが、有意な凝集が観察され、他の試験流体では変化がなかった。 ・ Au-NH₂ では、HA 量に応じ、全試験流体で、有意な凝集が観察された。	
--	--	--	--	--	---	--

No	著者/書誌事項	論文題目(和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
Ag-5	Hong JS, Kim S, Lee SH, Jo E, Lee B, Yoon J, Eom IC, Kim HM, Kim P, Choi K, Lee MY, Seo YR, Kim Y, Lee Y, Choi J, Park K /Nanotoxicology .2014 Jun; 8(4):349-62	Combined repeated-dose toxicity study of silver nanoparticles with the reproduction/d evelopmental toxicity screening test (生殖/発生毒性 スクリーニング 試験と組み合わ せた銀ナノ粒子 の反復投与毒性 試験)	●対象物質 ・クエン酸被覆 AgNPs 平均粒径: 7.9±0.95 nm ゼータ電位 : -17.55±4.16mV TEM 測定粒径(Fig1) ・調整直後: 8.8±5.2 nm ・調整 1 日後: 7.7±4.8 nm	●試験生物 ・Sprague-Dawley ラット: 雄、雌、7 周齢 ・投与中は雌雄を同一ケージ内で飼育、 交配する。 ・妊娠、授乳中の雌は、個別に飼育 ●投与方法 ・10ml/kg(bw)の AgNPs 混濁液を経口 投与 ・AgNPs 濃度: 0(control)、62.5、125、 250mg/kg ・投与期間: 雄: 42 日、雌: 最大 52 日 ・実験グループ編成 main group は各投与毎に 10 匹 recovery group: 0、250mg/kg 雌雄 5 匹以上 ●試験方法 a. 体重測定 ・1 回/週測定 ・雌は妊娠後は 3,6,9,12,18,20 日に測定 及び出産時、その 4 日後に測定 b. 飼育中の観察 b-1. 生殖行動/胎児の観察 ・生殖行動、妊娠期間、黄体数、着床率、 出生率、胎児の生存率、体重等の観察 b-2. 運動/感覚機能の観察 ・聴力、瞳孔反射、受傷反射、運動能力 を最終 1 日前に測定 c. 解剖試験 ・試験期間終了後、解剖して血液、尿及 び臓器(肝臓、腎臓、副腎、心臓、肺、 卵巣、脾臓、前立腺/膣、精巣、胸腺、 甲状腺、胃、膀胱、膵臓)を採取 c-1. 血液、血清、尿生化学分析 ・雌雄の血液、血漿、血清を分析	a. 体重測定 ・全てのラットで死んだものはない。 ・全投与期間、雌雄で体重変化は AgNPs 投与量に対し有意でない。 b-1. 生殖/胎児の観察(Table VIII) ・交配、受精率、受胎率に銀投与 の影響は無い。 ・妊娠期間、黄体数、着床率、出 生率、胎児の生存率、体重等に銀 投与の影響は無い。 b-2. 運動/感覚機能の観察(Table VIII) ・雌雄とも聴力、瞳孔反射、受傷 反射、運動能力に銀投与の影響は 無い。 c-1. 血液、血清、尿生化学分析 ・血液分析では有意な変化は無い。 ・血清分析では AST 等に有意な変 化があるが、AgNPs によるもので はない。 ・尿分析では有意な変化は無い。 c-2. 臓器重量測定 ・recovery group 250mg/kg の雄で 肝臓、雌で腎臓、副腎の重量が有 意に増加した。 ・他の臓器重量に有意な差はない。 c-3. 解剖、病理組織学的所見(Table VII) ・いくつかの臓器に病変が認めら れたが、銀投与の影響かどうか確 認できない。	・交配、生殖能力、 着床、出産、胎児 を含む生殖/発生 スクリーニング 検査の毒性エン ドポイントを測 定した。 毒性の証拠はな かった。

				・雄の尿を分析 c-2. 臓器重量測定 ・ main group、recovery group の臓器重量と重量比を測定 c-3. 病理組織学的所見 ・ 0、250mg/kg 投与の臓器組織を顕微鏡観察 d. 銀の細胞内分布 ・ 投与後、0、250mg/kg の4匹の雌を解剖し、肝臓、腎臓、肺の組織を採取し、ICP-MSで測定	d. 銀の細胞内分布 ・ 250mg/kg 投与はコントロールに比較し、顕著に肝臓、腎臓、肺に検出された。 （注）統計的に有意かどうか記載がない。特に肺は平均値に比べ、SD が大き過ぎる。	
--	--	--	--	---	--	--

No	著者/書誌事項	論文題目(和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間試験方法	試験結果	結論
ナノクレイ	Janer G, Fernández-Rosas E, Mas del Molino E, González-Gálvez D, Vilar G, López-Iglesias C, Ermini V, Vázquez-Campos S /Nanotoxicology .2014 May; 8(3):279-94	In vitro toxicity of functionalised nanoclays is mainly driven by the presence of organic modifiers (主に有機改質剤の存在による官能化されたナノクレイの in vitro 毒性)	●対象物質 ・ナノクレイ (MMTdell) 8種類 モンモリロナイト (層状珪酸塩鉱物の1種) LAVIOSA CHIMICA MINERARIA 製(Table I) ・メーカーで2種の修飾クレイ、無修飾クレイを作成 (Fig1) ・修飾基 ・水添ジメチル獣脂アンモニウム(DDTA と略す): 4種 MMTdell72T、MMTdell72Ts、MMTdell67G、MMTdell67Gs ・水添ジメチルベンジル獣脂アンモニウム (DBHTA): 2種 MMTdell43B、MMTdell43Bs ・無修飾(PRS): 2種 MMTdell pristine (HPS) ・粒子径は各修飾大小2種類 : 大 7-9µm、小 5-7µm ●乾燥状態の試料特性 ・粒子径分布 TEM 測定 (Fig2) 大: 100-3230nm 小: 100-822nm ・修飾基の残存率 (クレイ	●試験生物 (5種の人腫瘍細胞株) ①Ramos(バーキットリンパ腫) ②A-549(肺癌) ③HCT116(結腸直腸癌) ④SK-MEL28(黒色腫) ⑤HepG2(肝臓癌) ⑥HUVEC (人臍帯静脈内皮初代細胞系) ・培養液: DMEM+10%FBS+ペニシリン ●投与方法 ・ナノクレイを培養液に超音波攪拌後 1hr 以内に、①～⑥に添加 ●試験方法 ・上記を培養皿で 24hr 培養後、MMT 又は修飾剤に 72hr 暴露後に評価 ・濃度 0.3～最大 500µg/ml a. 修飾ナノクレイの細胞毒性試験 ・修飾ナノクレイ添加後、Alamar Blue テストで評価 b-1. 有機修飾剤の細胞毒性試験 ・DDTA、DBHTA 添加し、Alamar Blue テストで評価 b-2. 実測 IC ₅₀ /予想 IC ₅₀ の比による評価 IC ₅₀ : 50%抑制濃度 実測 IC ₅₀ : 生存率 vs 濃度カーブより算出 予想 IC ₅₀ : 修飾剤濃度から予想される IC ₅₀ b-3. 有機修飾剤分離の影響 (Fig6) ・メタノールまたは水に MMTdell43Bs と 67Gs を分散し、72h 後遠心分離し、ペレット、上澄み液それぞれで②を培養、IC ₅₀ で評価 c. 純粋なナノクレイの細胞毒性	a. 修飾ナノクレイの細胞毒性試験 ・DBHTA 修飾 MMT は DDTA 修飾 MMT より強い毒性を示した。 ・粒子径の影響は観察されない。 ・①は殆どの MMT に高感度であり、⑥は MMTdell43B(s) に若干高感度であった。 b-1. 有機修飾剤の細胞毒性試験 ・DBHTA は DDTA より強い毒性を示した。 b-2. 実測 IC ₅₀ /予想 IC ₅₀ は DDTA ではほぼ 1 に近いが、DBHTA では 3.5～4.1 であった。 b-3. メタノール洗浄した 43Bs のペレットは有意に毒性が低下した。 ・水洗浄 (メーカー実施) した 43Bs、67Gs のペレットの毒性は b-1 と同様であった。上澄み液の毒性は低下した。 c. 純粋なナノクレイの細胞毒性 ・修飾ナノクレイに比較し、純粋なナノクレイの毒性は低い。 d-1. カスパーゼ 3/7 活性評価 (Fig8) ・4.5h 後、④はカスパーゼ 3/7 は増加しないが、⑤で	・ナノクレイは修飾基の4級アンモニウムイオンにより、毒性を示す。 ・メタノール、エタノール洗浄により、過剰修飾基はある程度除去できるが、イオン結合した修飾基がナノクレイの毒性の大部分である。 ・無修飾ナノクレイも毒性を示すが、これは細胞内取り込みによるアポトーシスに起因する。

			中) MMTdell43Bs : 5.5% MMTdell67G : 10.4% ●培養液中の試料特性 ・1mg/ml の試料を DMEM または FBS0.6g/1 を含む水に溶解、15 分間超音波攪拌し、懸濁液とする。 ・懸濁液は若干不安定で少量の沈殿物がある。HPS は安定 ・修飾 MMT の 24hr 後の DLS は、沈殿により顕著に小さくなる。 ・培養液中の蛋白質等とナノクレイが反応し、沈殿物となる。	・ Alamar Blue テストで評価 d. アポトーシス d-1. カスパーゼ 3/7 活性評価 ・ pristine を④、⑤に添加、4.5h、48h 後に活性評価 d-2. フローサイトメトリーアッセイ ・⑤を 100µg/ml の pristine (大) に 48h 暴露後、アネキシン V で染色し、フローサイトメトリーで評価 e. ナノクレイの細胞内取り込み ・②を pristine (100µg/ml)、67Gs(5µg/ml)に 72h 培養し、TEM で観察	100µg/ml 以上で増加した。 ・ 48h 後、④、⑤ともカスパーゼ 3/7 は 33µg/ml でも有意に増加した。 d-2. フローサイトメトリーアッセイ ・ 48h 後、染色された細胞は 7 倍 (有意) であった。 e. ナノクレイの細胞内取り込み ・ 72h 後、両クレイとも細胞質に見られ、小胞内に凝集している。 ・ pristine の方が 67Gs より細胞内取り込みが多い。(73、86%vs0、16%)	
--	--	--	--	---	--	--

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論																								
Ag-6	Braydich-Stoll e LK, Breitner EK, Comfort KK, Schlager JJ, Hussain SM /Langmuir. 2014 Dec 23; 30(50):15309-1 6	Dynamic characteristics of silver nanoparticles in physiological fluids: toxicological implications (生理的流体中 の銀のナノ粒子 のダイナミック 特性：毒物的意 味)	●対象ナノ物質 ・ Ag-HC : 炭 化 水 素 coating25nmAg 炭化水素 coating は不連 続 ・ Ag-PS : 多 糖 類 coating25nmAg 多糖類 coating は 1-3nm で連続 (いずれも購入物質) ●試験人工体液 Stopford 等によるレポ ートに基づき調整 ①人工肺胞液 PH=7.4 ③ベースに脂質ホスファ チジル基コリンを添加 ②人工リソソーム PH=4.5 数種の塩、グリセリン、 ホルムアルデヒドの混 合 ③人工間質液 PH=7.4 数種の塩で構成	●試験生物 ・ U937 細胞株：肺胞マクロフ ァージ細胞 ●試験方法 a. 人工体液中の AgNPs の特 性評価 ・ 10ml の人工体液中に AgNPs500µg/ml を添加 ・ 37℃で 2、6、24、72h 保持 a-1. AgNPs の人工体液中の粒 径、凝集状態 ・ 各種液中に溶解し、24h 後 TEM 測定 a-1-1 TEM 測定 a-1-2 DLS 測定 a-2. Ag イオンの放出 ・ 各種液中に溶解し、24h 後 ICP-MS で測定 b. AgNPs の毒性評価 ・ U937 の培養 RPMI-1640+1%Pen-Strep+ 10%FBS 中で培養 暴露 48h 前に分化導入のた め PMA 100ng/ml を投与 細胞密度：50000 細胞/well ・ 投与量 職業暴露約 2.5 ヶ月及び 10 年に相当する堆積投与量 (0.5 および 25ng/ml) を投 与	a-1-1 TEM 測定結果(Fig1) ・ Ag-HC 水中：粒子径：27.2nm ②リソソーム：溶着径：120.5nm 凝集 径：290.1nm ①肺胞液：溶着径：68.5nm 凝集径： 204.2nm ・ Ag-PS 水中：粒子径：23.2nm ②リソソーム：溶着径：50.3 凝集径： 160.6nm ①肺胞液：溶着径：53.9nm 凝集径： 341.1nm リソソーム、肺胞液中では、表面コー トは消失 a-1-2 DLS 測定 24h 後の凝集径 (nm) <table><tr><td></td><td>Ag-H C</td><td>Ag-PS</td></tr><tr><td>水中</td><td>123.5</td><td>52.1</td></tr><tr><td>①肺胞液中</td><td>550</td><td>964.6</td></tr><tr><td>②リソソー ム中</td><td>550</td><td>218.7</td></tr></table> a-2. Ag イオンの放出 (Fig2B) 24h 後の解離率(%) <table><tr><td></td><td>Ag-H C</td><td>Ag-PS</td></tr><tr><td>水中</td><td>1.1</td><td>0.35</td></tr><tr><td>①肺胞液中</td><td>0.38</td><td>0.53</td></tr><tr><td>②リソソー ム中</td><td>0.22</td><td>1.0</td></tr></table> ・ 時間経過による AgNPs の液中での変 化		Ag-H C	Ag-PS	水中	123.5	52.1	①肺胞液中	550	964.6	②リソソー ム中	550	218.7		Ag-H C	Ag-PS	水中	1.1	0.35	①肺胞液中	0.38	0.53	②リソソー ム中	0.22	1.0	・ Ag-HC は全人 工体液中で毒性 は無かった。 ・ Ag-PS は、特 にリソソーム液 中で、その酸性 により、毒性と なった。 ・ 本研究は、生 理系において、 NM の生理的特 性と生物学的結 果を変更し、新 たな毒性をもた らすことを示し た。 *1 別資料に図 表がある
	Ag-H C	Ag-PS																												
水中	123.5	52.1																												
①肺胞液中	550	964.6																												
②リソソー ム中	550	218.7																												
	Ag-H C	Ag-PS																												
水中	1.1	0.35																												
①肺胞液中	0.38	0.53																												
②リソソー ム中	0.22	1.0																												

				b-1. 細胞生存率 ・ AgNPs0.5 および 25 ng/ml に暴露 ・ 24h 後 MTS アッセイで評価 b-2. CD68、CSFR-1 の発現 ・ AgNPs25ng/ml に 4h 暴露 ・ 染色後 BD Pathway 435 で評価 b-3. 腫瘍反応 ・ AgNPs25ng/ml に 8h 暴露 ・ IL-6、TNF-α の存在を ELISA アッセイで評価	② : Ag-HC の凝集径、解離率は急速に安定 Ag-PS は dynamic nature を示す。 * 1 ① : Ag-HS、PS の凝集径は経時的に増加 解離率は 24h で安定 ③ : 両 Ag の凝集径は経時的に増加、解離率は安定 b. AgNPs の毒性評価 b-1. 細胞生存率 ・ 水、①②に分散 Ag-HC で生存率低下は僅少 ・ 水に分散 Ag-PS では生存率低下はない。 ・ ①②に分散 Ag-PS では、有意に低下 b-2. CD68、CSFR-1 の発現 ・ ②に分散 Ag-PS では CD68 は 50% 増加（有意） ・ CSFR-1 は全てのケースで変化なし b-3. 腫瘍反応 ・ ②に分散した Ag-PS で、未処理と比較し IL-6 は 5 倍、TNF-α は増加（有意） ・ 他のケースでは未処理と差はない。	
--	--	--	--	--	--	--

No	著者/書誌事項	論文題目(和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
Au-4	Ng CT, Yung LY, Swa HL, Poh RW, Gunaratne J, Bay BH /Biomaterials. 2015 Jan;39:31-8	Altered protein expression profile associated with phenotypic changes in lung fibroblasts co-cultured with gold nanoparticle-treated small airway epithelial cells (金ナノ粒子投与をうける小気道上皮細胞で共培養された肺線維芽細胞における表現型変化に伴う改変タンパク質表現プロフィール)	●対象物質 ・AuNPs: 径 20nm ●試料調整方法 ・HAuCl₄ をクエン酸三ナトリウムで脱水	●試験生物 ①SAECs: 末梢気道上皮細胞 ②MRC5: 肺線維芽細胞 ・特定アミノ酸の代わりに 2 種の同位体アミノ酸を添加した DMEM 中で最低 4 継代培養し同位体ラベリング ・特定アミノ酸: リシン、アルギニン ・同位体アミノ酸: light、heavy の 2 種 light (L): K0R0 アイソトープでラベリング heavy(H): K8R10 アイソトープでラベリング ・SILAC: 細胞培養中のアミノ酸による安定同位体ラベリング ●投与方法 ・①に 1nm の AgNPs を添加し、72h 培養、コントロールは無投与 ・①と②の共培養 ラベリングした②の上にポリカーボネート膜を介して① (AuNPs 投与または無投与) を培養 ・②は AgNPs 無投与は light アイソトープラベリング (Forward)、AgNPs 投与は heavy アイソトープでラベリング (Reverse) ●試験方法 a. SAECs 内の AuNPs の測定 ・FIB-SEM により観察 b. AuNPs 暴露 SAECs による MRCS5 内の蛋白質差別的発現 ・共培養 72h 後、MRCS5 のプロテオームを分離し、light、heavy の蛋白質溶解液を蛋白質量比 1:1 に混合 ・トリプシンで消化後、ペプチドを LTQ-Orbitrap 質量スペクトルメータで LC-MS/MS 分析 (定量的プロテオミックス分析)	a. SAECs 内の AuNPs の測定 ・核小体を持つ二重膜の核、小胞体、リソソーム、エンドソームを含む細胞小器官のような超構造的詳細が観察された。 ・細胞内に AuNP クラスターが黒点として観察される。 b. AuNPs 暴露 SAECs による MRCS5 内の蛋白質差別的発現 ・SILAC ベースの質量分析により、109 のタンパク質 (アップレギュレート 47、ダウンレギュレーション 62 を含む) を同定した。 c. 蛋白質差別的発現の経路解析 ・調整不全蛋白質は主に細胞癒着、細胞外基質/細胞骨格の改変に係るものであった。(Fig3B) ・細胞移行に関する蛋白質、プラスミノゲン活性化因子、ウロキナーゼ (PLAU、UPA)、GRO - 1 は顕著に減少した。 ・細胞癒着を増加する PXN、BCAR1、Cav-1 の発現が顕著に増加した。	・AgNPs 暴露の SAECs が下部の肺線維芽細胞に、細胞プロセスに係る蛋白質変質に繋がるバイスタンダー効果を及ぼす。 ・これにより細胞癒着と細胞骨格の増加に繋がる形質変化をもたらす。 ・共培養により異種細胞間のクロストークを外部液体の応答から理解できる。 ・共培養と SILAC-MS の組合せたプロテオーム段階の変化に関する生物情報学アプローチにより NP 毒性の生物学的洞察が可能である。

				• 蛋白質同定、定量化は IPI 人蛋白質データベースに関する Mascot ソフトで解析 • 正規化 H/L(Reverse、Forward)で蛋白質差別的発現を評価 c. 蛋白質差別的発現の経路解析 • 遺伝子オントロジー (GO) 分析は遺伝子 ID をソフトに入力し解析、IPA 経路解析は IPI ナンバーをソフトに入力し解析 d. MRCS5 内の細胞癒着と細胞骨格に対する蛋白質不全とその効果 • AgNP 投与①と共培養の②を、5×10^4 cell/100 μl の懸濁液にし、コラーゲン又はフィブロネクチン塗布の培養皿で 30 分培養 - コントロールはコラーゲン等、unwashed	d. MRCS5 内の細胞癒着と細胞骨格に対する蛋白質不全とその効果 • コラーゲン、フィブロネクチン塗布で細胞癒着はコントロールに比べ顕著に増加した。 • ②の細胞骨格に stress fiber 又は FA 形成を伴う改変 F-actin 配置の増加と (Fig4C)、F-actin を②の細胞膜に固定する vinculin 結合サイトの増加があった。	
--	--	--	--	---	---	--

No	著者/書誌事項	論文題目(和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
Ag-7	Ahlberg S, Meinke MC, Werner L, Epple M, Diendorf J, Blume-Peytavi U, Lademann J, Vogt A, Rancan F Eur J Pharm /Biopharm. 2014 Nov;88(3):651- 7	Comparison of silver nanoparticles stored under air or argon with respect to the induction of intracellular free radicals and toxic effects toward keratinocytes (空気またはアルゴン中に保存された銀ナノ粒子のケラチン生成細胞に対する細胞内フリーラジカルと毒性作用の誘発に関する比較)	●対象物質 ・PVP 被覆 AgNPs - PVP: ポリビニールピロリドン ・粒径: 70±20nm ・ゼータ電位: -25mv ・大気中保存: AgNP(O₂) ・Ar 中保存: AgNP(Ar) ●試料調整方法 ・40g の水中に 2g グルコース、1gPVP、1mlAgNO₃ (0.5g/ml) を混合 ・溶液を 90℃、1h 保持後室温まで冷却 ・溶液を遠心分離、水洗 ・AgNP(O₂)は大気中で純水懸濁液とする。 ・AgNP(Ar)は Ar 雰囲気中で純水懸濁液とする。	●試験生物 ・HaCaT 細胞: ヒト皮膚ケラチノサイト ・10cm² フラスコで 10mlRPMI (10%FCS、4mM グルタミン、10µg/ml ストレプトマイシン、100IE/ml ペニシリン) 中で培養 ・70-80%培養密度時、RPMI 除去、細胞を PBS で洗浄 ・PBS 除去後、5ml トリプシン、EDTA を添加し、細胞を剥離 ・RPMI で洗浄、遠心分離後、RPMI に再懸濁 ●投与方法 ・AgNP 懸濁液を純水で濃度調整し、細胞懸濁液に添加 ●試験方法 a. HaCaT の AgNP の取り込みとアポトーシス ・HaCaT25x10⁵cell/ml に AgNP(O₂)25gµ/ml を添加し、24h 間 RPMI 液 (10%FCS 入り) 中で培養 ・染色後 TEM で観察 b. HaCaT に対する AgNP の濃度依存毒性 ・HaCaT1x10⁴cell/well を 1 日培養し、AgNP (O₂) (10、20、40µg/ml) に 1 又は 24h 暴露 (FCS: 9、6、3%) - Negative control: 10%FCS で培養 - Positive control: 0.1%Triton-X で培養 ・XTT アッセイ (細胞活性アッセイ) で	a. HaCaT の AgNP の取り込みとアポトーシス ・AgNP は小胞内に集積し、充満 ・エンドソム逸脱は見られない。 ・細分化した細胞核、細胞膜の特徴的小胞が観察された。 ・NP は細胞核に入らず、又細胞器官と反応していない。 ・AgNP(O₂)と AgNP(Ar)の形態的差はない。 ・アポトーシス、ネクローシスは AgNP(O₂)に多く見られる。 b. HaCaT に対する AgNP の濃度依存毒性 ・暴露 1h 後 - 細胞活性に大きな変化は無い。 ・暴露 24h ・AgNP 無しは FCS 減少に応じ、活性は低下する。 ・FCS 9%、AgNP10、20µg/ml では活性は増加するが、AgNP40µg/ml では活性が 70% に減少した。 ・FCS 6、3%では、どの AgNP でも活性は顕著に減少する。 c. EPR による細胞内フリーラジカルの測定 ・UV 照射ほどではないが、AgNP 添加で EPR 信号は時間と伴に減少した。 ・3h 後では、AgNP 濃度依存的に EPR は減衰した ・AgNP(O₂)では 30µg/ml で ROS	・EPR 分光分析により Ag+イオンが細胞内 ROS 発生要因であることが明らかになった。 ・AgNP (O₂) と AgNP (Ar) を比較した結果、準備・保管中に放出された Ag+イオンが細胞内 ROS 発生とそれによる細胞毒性の主因であることを示した。 ・AgNP は HaCaT に有毒である。 ・AgNP(Ar)は皮膚細胞に対する毒性を減少する。 ・不活性ガス雰囲気下で AgNP 製剤、銀含有創傷被覆材を格納することにより、AgNP の治療範囲を改善する可能性を示唆している。

				評価 細胞を PBS で洗浄後、XTT 液を加え、 3h 後測定 波長 492nm、650nm で測定 c. 電子常磁性共鳴（EPR）による細胞内 フリーラジカルの測定 • HaCaT 1x10⁵cell/well を AgNP(O₂)及 び (Ar) 各 10、30、50μg/ml に 1h 暴 露 • positive control : AgNP 無、1 分間 UV 照射 (210mJ/cm² 相当) • 細胞を PBS 洗浄後、TEMPO (5μM : PBS 中) を添加 TEMPO : 2,2,6,6-テトラメチルピペリ ジニロキシ • 添加後、30 分毎に EPR 信号を測定	を検出した • AgNP(Ar)では 50μg/ml で ROS を検出した • AgNP(O₂)は AgNP(Ar)より ROS の発生量が多い	
--	--	--	--	--	--	--

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料 調整法/試験用 量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
ZnO -1	Chia SL, Tay CY, Setyawati MI, Leong DT Small, 2014 Oct 20	Biomimicry 3D Gastro- intestinal Spheroid Platform for the Assessment of Toxicity and Inflammato ry Effects of Zinc Oxide Nanoparticl es (酸化亜鉛 ナノ粒子の 毒性評価と 炎症作用に 係る生物模 倣 3D 胃腸球 状プラットフォーム)	■ 試験物質 ZnO ナノ粒 子 : [TEM]1 次 粒径 24.02± 6.08nm、流体 力学径 222.0nm(水 中)、 142.2nm(Dulb ecco's Modified Eagle Medium supplement with Fetal Bovine Serum : DMEM) ■ 試験調整法 ・ 2D 細胞培 養 ; CO2 5%、 37℃で培養。 処理用に、 SW480(1.2× 10 ⁵ 細胞/well) と NCM460 細胞(1.8×10 ⁵ 細胞/well)を プレートに播種。 アッセイ用に、 SW480(3.6× 10 ⁵ 細胞/well)	■ 試験生物 ・ 3D NCM460, SW480 細胞回転楕円体 ・ 細胞炎症反応 : 炎症遺 伝子(Interleukin-18 (IL18), Toll-like receptor 6 (TLR6), NOD-like receptor family, CARD domain containing 4 (NLRC4), interleukin 18 (IL18)) ・ DNA 損傷 : pγ-H2AX、 TBP ■ 期間・投与方法 ・ ROS 発現量 : 2 時間、 6 時間 ・ 細胞炎症反応 : 6 時間、 24 時間 ・ DNA 損傷耐性 : 12 時 間 ■ 試験方法 ・ ROS 発現量 : 酸化還元 反応性 CellROX オレン ジ染料を用いて検出。 ROS 陽性細胞は、事前決 定蛍光閾値よりも高い 細胞と定義。 ・ pγ-H2AX の免疫ブロット 法 : DNA 損傷の程度の 決定。 ・ A[nnexin V/PI(可化ブ ロミシウム) assay : ・ 細胞を 2D プレート、3D マ	■ ROS 発現量 ・ ZnO への 2 時間暴露 : 2D 細胞に関して、NCM460 細胞の 細胞質 ROS レベルが有意に増加。3D の NCM460 細胞では ROS レベルはわずかに低下。 ・ 1,000 μ M の ZnO への 6 時間暴露 : 2D、3D とともに NCM460 で ROS 陽性細胞数の劇的増加。ROS 発現増加を伴う 3D 培 養細胞グループにおける NCM460 細胞の割合は、未処理 3D 対照群と比較して 18.8%から 44.6%に増加。 ・ がんの SW480 細胞モデル : ZnO が非常に様々な反応を誘発。 2D の SW480 細胞で ROS レベルが統計的に有意に増加。3D 細胞では、2 時間暴露も 6 時間暴露もともに、SW480 細胞 は増加せず。3D 細胞モデルでは、3D で培養されたがん SW480 細胞は、2D 培養細胞と比較して、ZnO への暴露前後ともに、 ROS 陽性細胞割合が高いことを示唆。3D の SW480 細胞は、 内因性 ROS が 32.3%と高く、3D の NCM460 細胞の内因性 ROS の 5.74%よりも明らかに高く、2D の内因性 ROS は NCM460 で 0.30%、SW480 で 0.45%と非常に低かった。 ・ ROS : 腫瘍形成が可能。過去の研究報告による概念と一致 して、2D と比較して 3D の SW480 細胞の高レベルの内因性 ROS は、3D 培養することで、in vitro 細胞が in vivo の特性 の複製が可能であることを示唆。しかし、2D 細胞になると、 SW480 の ROS 特性は消失することから、細胞の微小環境と 細胞タイプは劇的に、ナノ材料に対する細胞応答と最終的な評価 結果に影響を与えることが可能なことを暗示。 ■ 細胞炎症反応 ・ ZnO への 6 時間暴露 : 炎症遺伝子は IL18 遺伝子の 2D SW480 以外は全細胞モデルで明らかに上方制御。 ・ 高濃度 ZnO : NCM460 2D 細胞と SW480 3D 細胞におい て IL-18 と IL-18 の発現の 7 倍以上の増加を誘発することを 確認。6 時間暴露後の NCM460 3D 培養細胞と SW480 2D 細胞では増加はあまりみられない。これらの ZnO 誘発 IL-18、IL-18 過剰発現は、核因子 kappa-B (NF-κB)の下流 活性化が起こる可能性を示唆。 ・ 免疫染色による 3D SW480 細胞の NF-κB : 非常に強い染	・ 細胞の次元は、ZnO ナノ材 料への暴露による細胞毒性 と炎症反応のよう な時空間的細胞の 結果に影響を与える 重要な役割を担 っている。 ・ 従来の 2D 細胞モ デルの細胞は、 ZnO ナノ材 料の毒性 影響により敏感で あるのに対して、 同様の組織-ECM 構造を有する 3D 細胞モデル と現実的な物質移

			と NCM460 細胞(5.4×10^5 細胞/well)を播種。処理溶液導入前に、細胞を 1 日間静置。 ・3D 細胞培養；非生物付着アコース(2%, First Base, Singapore)マイクロモールドを 3D ペトリ皿を用いて鑄造。使用前に、完全 DMEM とマイクロモールドと 1 日間平衡にする前に凝固したアコースを 30 分間 UV 照射して滅菌。完全 DMEM に分散した SW480 と NCM460 細胞懸濁液($50 \mu\text{M}$)を個々のマイクロモールドに播種。5% CO_2、37°Cで細胞を培養。マイクロモールド内に細胞沈殿後 5 分間、完全 DMEM($500 \mu\text{M}$)を well に	マイクロモールドに播種。 ・2D モデルでは流動性細胞を全て回収後、$1 \times \text{PBS}$ で洗浄、トリプシン-EDTA で 37°C、5 分間トリプシン処理。トリプシン処理細胞を流動性細胞と結合し、完全 DMEM で中和後、細胞混合物を遠心分離し、細胞ペレットを回収。 ・3D 回転楕円体細胞モデルについては、処理後の 3D 細胞を全て回収・洗浄。細胞楕円体から細胞を分散するために、細胞楕円体を 37°Cで 5 分間、トリプシン-EDTA によりトリプシン処理。トリプシン処理後の細胞を完全 DMEM で中和後、遠心分離により細胞ペレットから懸濁液を分離。 ・Annexin V 結合バッファと Annexin V-Alexa Flour 488 共役混合物(20:1)を細胞ペレットに添加後、20 分間培養。その後、培養細胞懸濁液を遠心分離により除去。Fresh Annexin V 結合バッファとヨウ化プロピジウム(PI)溶液混合物(100:1)を細胞懸濁液に添加し 5 分間培養。自然細胞死と壊死細胞を Tali Image Cytometer で分析。	色はほぼ楕円体周縁部のみで観察。NF-κB タンパク質発現の上り調整は、大部分は細胞の 2 層か 3 層内に制限され、細胞への ZnO のアクセスが制限された結果。 ・ZnO への 6 時間暴露：TLR6 と NLRC4 の過剰発現が 2D と 3D 細胞モデルで検出。これらの結果から、ZnO が誘発する炎症反応は、NF-κB シグナル伝達経路のほかにも複数伝達軸を伴う可能性、トル様受容体シグナル伝達経路のように ZnO ナノ材料は他の炎症経路を引き起こす可能性があることを示唆。 ・6 時間暴露後の ROS 陽性細胞：ZnO は顕著な増加を引き起こさなかったが、同時点の 3D 形態 SW480 細胞に激しい炎症反応を引き起こした。ZnO は、3D 細胞の ROS レベルの独立した炎症反応を誘発可能なことを示唆。 ・24 時間暴露：炎症遺伝子発現レベルが、2D 細胞モデルで、特に 2D SW480 でさらに増加するものあり(2D NCM460 の IL-1β と TLR6、2D SW480 の全遺伝子)。3D 細胞モデルケースでは、そうではなかった。大部分の 3D 細胞の炎症発現レベルは戻り、発現の中には、対照群のベースレベルよりも低くなるものもあり。これらより、ZnO が 2D 細胞に対する長期(慢性)の炎症反応を誘発し、3D 細胞に対しては短期(急性)炎症反応は誘発することを暗示。ZnO が誘発する炎症に関連した遺伝子の異なる発現は、ZnO のような異物に遭遇した際の細胞反応に対する細胞培養システムの基本的効果を示唆。ZnO は、ROS の上り調整を無視した炎症反応の誘発が可能で、それにより、下流方向の事象の他の形態を含むさらなる研究が、ZnO の基本的な毒性メカニズムを決定するのに必要。 ・3D 細胞による ZnO ナノ材料誘発 DNA 損傷への耐性 ・$\gamma\text{-H2AX}$ 免疫プロット法：細胞の DNA 損傷の発生を確認、エネルギー集約型 DNA 修復メカニズムの活性化を立証。激しい DNA 損傷は、2D 細胞モデルの両方について、高濃度 ZnO により誘発。ZnO は、3D SW480 細胞に対する DNA 損傷も誘発したが、3D NCM460 細胞では $\gamma\text{-H2AX}$ のレベルで明確な変化は非検出。2D SW480 と比較して、高濃度 ZnO は、3D SW480 の DNA 損傷を誘発するのに必要。このことは、3D 細胞は、2D 細胞よりも高濃度 ZnO への耐性があることを示唆。しかし、激しい DNA 損傷は 12 時間暴露後の 3D SW480 細胞で検出されるため、ZnO への長期暴露は組織と器官の DNA 損傷の蓄積を引き起こす可能性を高める。	動勾配から、異物である ZnO ナノ材料に対する組織上の外側細胞の防御作用を説明した。
--	--	--	--	--	---	--

			添加。重力と凝集により細胞は3D 楕円体細胞を形成(1日)。処理溶液を用いて、作製した3D 楕円体細胞をマイクロモールドから非生物アガロース層を有する培地皿に流出移動。 ■ 試験用量 ・ROS 発現量: 31.5、125、500、1,000μM ZnO ナノ材料 ・細胞炎症反応: 1,000μM ZnO ナノ粒子 ・DNA 損傷耐性: 0、31.5、125、500、1,000μM ZnO ナノ材料	・明視野像を倒立顕微鏡で撮影。 ・NF-κB の免疫蛍光染色 ・細胞を SW480 用にマイクロモールドで作製。ZnO ナノ材料で処理した細胞楕円体を処理後に回収し、1$\times$PBS で3回洗浄し、ハロホルムアルデヒド[®] (PFA, 4%)で1時間固定。固定した細胞楕円体をプロモフェノール・ブルーで30分間染色し、1$\times$PBS で3回洗浄後、O.C.T.組織凍結培地に埋め込み。10μm 厚さの楕円体の凍結切片を作製。切片を PBS で15分間、Triton X-100(0.2%)を用いて透過処理し、PBS で1時間、Triton X-100(0.1%)を用いてウシ血清アルブミン (BSA、2%)でブロック。切片を BSA(0.2%)で NF-κB p65 ウサギ[®]ポリクローナル抗体を用いて4°Cで1晩培養後、1$\times$PBS で3回洗浄し、Akexa Flour 488 ニトリ抗ウサギ[®]抗体を用いて1時間培養。ラベルしたスライドを ProLong Gold 退色防止試薬を用いて DAPI とともに埋め込み。 ・切片の画像をレーザー走査型共焦点顕微鏡によ	■ 2D、3D 細胞の細胞死誘因モード[®]の相違 ・500μM の ZnO への24時間暴露: 2D の平らな表面上に培養した細胞の単分子層が丸くなって分離。ZnO が介在した劇的細胞状態の変化は、細胞の健康が危険にさらされていることを示唆。逆に、3D 細胞では一部のみで、楕円球体細胞表面から解離することを観察。おそらく細胞間の接触の損失によるもの。3D 細胞楕円体の細胞解離は、楕円体全体の形態に影響せずに楕円体細胞の径のみを縮小させたことから、解離プロセスは層ごとに起こっていることを示唆。暴露後、3D NCM460 細胞の平均径は 195.0$\pm$9.5μm で、対照群の 242.6$\pm$7.1μm とは明らかに相違。同様に、楕円体の平均径の変化は ZnO への暴露後の 3D SW460 でも観察され、対照群 176.3$\pm$9.6μm に対して、210.2$\pm$16.7μm。3D 楕円体細胞の NCM460 と比較して、より解離(細分化)した細胞はまだ SW460 にくっついていていた。本観察から、ZnO の生物学的効果は、2D と 3D で異なり、細胞タイプ[®]に依存する可能性があることを示唆。 ・Annexin V/PI assay: 細胞は、細胞モデル[®]に関係なく、用量依存的に ZnO の毒性に反応することが明らかとなった。3D 楕円体細胞は、ZnO の毒性に対する反応低下を示唆。1,000μM の ZnO への24時間暴露後の、2D NCM460 の初期自然細胞死、後期自然細胞死、壊死レベルは、それぞれ対照群の 3.5、2.5、2 倍、3D 細胞では、1.8、3.2、1 倍。SW480 細胞株での 2D と 3D の相違は、もっと劇的で、初期自然細胞死細胞は最高濃度 1,000μM の ZnO への暴露時に 2D モデルでは全く観察されず、後期自然細胞死と壊死のレベルは、それぞれ対照群の 5.2、45 倍に対して、3D では初期細胞死、後期細胞死、壊死がそれぞれ対照群の 4.8、8.5、2 倍。1,000μM ZnO への24時間暴露後には、2D 細胞の NCM460 で 58.3%、SW480 で 9.67%のみが生存し続けていたのに対して、3D 細胞では NCM460 で 85.3%、SW480 で 80.3%が生存。 ・SW480 細胞モデル: 高濃度 ZnO への暴露(500μM、1,000μM)により 2D モデルで誘発される細胞死の主な状態は、自然細胞死よりはむしろ壊死。低濃度 ZnO(31.5、125μM)への暴露でも観察。NCM460 細胞株で観察された細胞死の主状態も大部分は自然細胞死。壊死プロセスは、細胞膜が傷ついた結果として細胞小器官の膨張を引き起こし、2D 細胞モデル[®]の独特の	
--	--	--	---	---	---	--

				り撮影。 ・細胞代謝速度の決定 ・SW480 と NCM460 用に 2D はプレートで、3D はマイクロモールドで作製。 ・トリプシン処理後の 3D 細胞モデル用に、細胞橢円体を回収後、分散。細胞を、3,4,5-ジメチルイル-2,5-ジフェニルテトラゾウムに 3 時間暴露。その後、懸濁液を除去し、沈殿したホルマリンを等量のジメチルスルホキシドで 30 分間溶解した後、マイクロプレート分光光度計により 570nm で定量。	溶解した形態を壊死細胞に与える。壊死は、毒素や感染症、外傷のような広範な外的因子が引き金で起こることが可能。同様に、細胞間 ATP の喪失、主要なエネルギーの現在分子が壊死のトリガーとなることも示唆。 ・γ-H2AX の免疫ブロット法: ZnO は 2D SW480 の深刻な DNA 損傷を引き起こし、大規模の DNA 修復を引き起こし、細胞間の ATP 貯蔵物を使い尽くし、それにより、2D SW480 細胞が壊死に至る。2D SW480 は、3D 橢円体状態の SW480 よりも広く扁平な形状で、壊死は、堆積したナノ材料に高濃度で暴露した範囲でより起こる可能性がある。	
--	--	--	--	--	---	--

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料 調整法/試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
Zn O-2	Suzuki Y, Tada- Oikawa S, Ichihara G, Yabata M, Izuoka K, Suzuki M, Sakai K, Ichihara S, Toxicol Appl Pharmacol. 2014 Jul 1; 278(1):16-25	Zinc oxide nano- particles induce migration and adhesion of monocytes to endothelial cells and accelerate foam cell formation (ZnO ナノ 粒子による 内皮細胞に 対する単核 白血球の移 動と接着の 誘導及び、 泡沫細胞形 成の加速)	■ 試験物質 TiO₂ と ZnO のナノサイズ 粒子 TiO₂: AEROXIDE TiO₂ P25 (Degussa AG, Dusseldorf, Germany), 21 nm ZnO: MKN-ZnO-02 0 (mkNANO, Mississauga, ONT, Canada), 20 nm ■ 試料調整法 試験物質は、 培養培地中 で懸濁させ、 超音波破碎 機を使って分 散させた (100W, 15分)。 ■ 試験用量 ・細胞生存ア ッセイ : 1 ~ 100µg/ml ・細胞による ナノ粒子吸 収 : 1, 5, 10 µg/ml	■ 試験生物 ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVECs) ヒト単球性白血病細胞 (THP-1) ■ 試験方法・期間・投与方法 ・細胞生存アッセイ ・HUVECs: 実験前に1晩、マイクロプレート上に1.5×10⁴細胞/ウェルで播種。ナノ粒子を完全培地に分散。細胞生存率をMTSアッセイにより24時間、懸濁ナノ粒子を培養後に決定。暴露後、細胞をMTS試薬含有新鮮培地で1時間培養後、吸光測定。細胞増殖に対するナノ粒子の影響を、コントロールに対する細胞成長抑制割合により算出。 ・THP-1単核白血球: マイクロウェルプレート上に1.5×10⁴細胞/ウェルで播種、ナノ粒子に3時間暴露後、10%FBS含有RPMI 1640培地を使って16時間、162nM PMAで処理。細胞生存率は、MTSにより決定。 ・細胞によるナノ粒子吸収: HUVECsを、TiO₂またはZnOに暴露。16時間後に、Hanks' Salt Solutionで洗浄、トリプシンで分離、完全細胞培養培地で培養。細胞ペレットをHBSS1mlに懸濁させ、細胞数算出。溶液はHNO₃濃度3%になるまでHNO₃を混合、細胞含有物質が完全に溶解するまで80℃に加熱。ブランクコントロール溶液はHNO₃を同量添加した溶液でHBSS1mlを混合。最後に、溶存溶液を10ml調整し、ICP-MSで分析し、TiとZn濃度を決定。 ・細胞内遊離Znイオン検出: 細胞内遊離Znを、蛍光膜透過プローブZinquin ethyl esterにより可視化。HUVECs (1×10⁵ cells/ml)をウェルプレートに播種、16時間後に、細胞	■ 細胞生存率 MTSアッセイで、ZnO粒子が25~100 µg/mlで存在するHUVECsの培養時に細胞生存率が低下したが、TiO₂粒子存在下では低下しなかった。THP-1単核白血球/マクロファージでは、細胞生存率はZnO 100µg/mlに暴露した後で明らかに低下した。以降の試験では、10 µg/ml以下のナノ粒子濃度を実験で使用した。 ■ 金属吸収と細胞内遊離Znイオン ICP-MSの結果から、HUVECsの金属吸収量は、媒体中のZnO粒子濃度と関連性があること、HUVECsによるZnO粒子の明確な用量依存吸収を示した。遊離細胞内Znの可視化のためにZnquin ethyl esterを用いた試験では、コントロール条件では遊離細胞内Znは検出されなかった。ZnO粒子10 µg/mlによる16時間培養後に、遊離細胞内Znが観察されたが、TiO₂粒子10 µg/mlへの暴露後には観察されなかった。 ■ 単核白血球移動とMCP-1生成におけるZnO粒子の影響 単核白血球の移動が、内皮細胞への単核白血球の接着を誘導する重要なステップであることを確認するために、TiO₂またはZnOナノ粒子への暴露後のHUVECsの上澄み中のMCP-1濃度を測定した。予備実験では、37℃でZnOナノ粒子10µg/mlに16時間HUVECsを暴露した時間条件でMCP-1濃度の顕著な増加が確認できた。MTSアッセイ	・ZnO粒子への16時間暴露により、MCP-1レベルが増加し、MCP-1の増加が、HUVECsへのTHP-1の細胞移動及び接着を誘導した。 ・ZnO粒子は、修飾されたLDLのメンブレンスカベンジャー受容体の発現を増加させ、THP-1単核白血球/マクロファージでのコレステロール吸収を増加したが、TiO₂粒子ではこうした変化は確認されず、ZnO粒子への暴露がマクロファージコ

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料 調整法/試験用量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
			- 細胞内遊離 Zn イオン検出： 10μg/ml - 単球走化アッセイ：1, 5, 10μg/ml	をナノ粒子に 16 時間暴露。HBSS で 3 回洗浄後、細胞を Zinquin ethyl ester 25μ M、37°C、30 分間処理。細胞を HBSS で洗浄、蛍光顕微鏡で観察。 - 単球走化アッセイ - HUVECs (1$\times$10⁵ cells/ml)：ウェルプレートに播種、1 晩接着。HUVECs をナノ粒子に 16 時間暴露、遠心分離により懸濁態ナノ粒子を除去後、上澄みを培養、Cell Culture insets のチャンバー下部に化学誘因物質として使用。 - THP-1：チャンバー上部に 2.5$\times$10⁵ cells/well を 3 つ入れ 37°C で 2 時間培養。膜を透過した細胞を 100%エタノールで 5 分間固定クリスタル・バイオレットで染色。移動割合を 200 倍の光学顕微鏡でランダムな 4 か所の細胞数の計数により定量。HUVECs を異なる用量のナノ粒子に 37°C で 16 時間暴露後に、MCP-1 (単球走化性タンパク質-1) レベルを ELISA により測定。 - 細胞接着アッセイ：HUVECs への THP-1 細胞の接着評価。HUVECs (1.5$\times$10⁴ cells) を 37°C で、ウェルプレートで 1 晩成長後、アッセイ前に異なる用量のナノ粒子に 37°C で 16 時間暴露、0.1%BSA 含有 HBSS で 3 回洗浄。THP-1 細胞は、0.1%BSA/HBSS の 1.0$\times$10⁶ cells/ml 密度で懸濁させ、37°C 30 分間培養してカルサイン-AM 1μM でラベル後、0.1%BSA/HBSS で 3 回洗浄。ラベルした THP-1 細胞を、37°C で 30 分間、ナノ粒子に暴露した HUVECs とともに培養。ナノ粒子接着細胞を 0.1%BSA/HBSS で 3 回洗浄して除去、カルサインでラベリングされた THP-1 細胞の接着を、蛍光顕微鏡で、内皮単層数の	では、1,5,10μg/ml の ZnO 粒子に 16 時間暴露した HUVECs の培養後に、細胞生存率の顕著な変化は確認されなかった。MCP-1 レベルは、37°C 16 時間、TiO₂ または ZnO 粒子への異なる容量 (1,5, 10μg/ml) への HUVECs の暴露後に MCP-1 レベルを測定したところ、ZnO 粒子 10μg/ml への暴露により、MCP-1 濃度が顕著に増加したが、HUVECs の上澄み中の MCP-1 レベルは TiO₂ への暴露では全く影響を受けなかった。ZnO 粒子への暴露した HUVECs の上澄み中での MCP-1 生成量の明確な増加結果をもとに、単核白血球の移動における HUVECs の上澄みの効果を調べたところ、HUVECs の上澄みは、ZnO 10μg/ml への暴露により、Transwell マイクロポーラメンブレンを通過した THP-1 単核白血球の数が、コントロールと比較して顕著に増加した。THP-1 単核白血球の移動は、TiO₂ 粒子に暴露した HUVECs の上澄みを用いた実験では確認されなかった。 ■ 単核白血球接着における ZnO 粒子の影響 ナノ粒子を用いた 16 時間培養後に HUVECs への THP-1 単核白血球の接着アッセイを行ったところ、HUVECs への THP-1 単核白血球の接着は TiO₂ 粒子により強化されなかったが、ZnO 粒子 5 または 10 マイクロ g/ml への暴露により、接着している THP-1 単核白血球の数は顕著に増加した。さらに、HUVECs における接着分子の発現について調べたところ、ICAM-1 の発現レベ	レステロール吸収を増加させることを確認し、修飾された LDL のメンブレンスカベンジャー受容体の上方調整によるものであった。 ・以上の結果から、ナノサイズの ZnO 粒子は、泡沫細胞形成を加速し、アテローム性動脈硬化の発症と進行を増進する可能性があることを示唆した。

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料 調整法/試験用量	試験生物役与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
				カウントにより定量。 ウェスタンブロット法：HUVECs を、プロテアーゼ阻害剤含有溶解バッファ－RIPA(放射性免疫沈降アッセイ)に溶解。抽出プロテイン濃度をプロテインアッセイ濃縮色素試薬により 3 回測定。プロテイン試料を 12%SDS-PAGE で分離、PVDF メンブレンで転移。メンブレンを ICAM-1 (細胞内接着分子-1) に対するウサギモノクローナル抗体とともに 500 倍希釈で培養。VCAM-1 (血管細胞接着分子-1) に対するマウスモノクローナル抗体を 500 倍希釈で培養。5000 倍希釈の ACTB (マウス抗 β アクチン) モノクローナル抗体をローディングコントロールとして使用。免疫反応バンドを ECL-選択化学発光により可視化。バンドの明度を定量。プロテイン発現レベルを β アクチンプロテインに対して標準化。 • DiI アセチル化 LDL 吸収アッセイ：THP-1 (3×10^5 cells) をウェルプレートに播種、懸濁ナノ粒子に 3 時間暴露、162nM PMA と 10%FBS 含有 RPMI 1640 中で 16 時間処理。接着細胞を、アセチル化 LDL (Ac-LDL) 吸収アッセイの単核白血球/マクロファージとして使用。分化された THP-1 細胞を、0.2% 脂肪酸遊離 BSA 含有 RPMI 1640 中で DiI-AcLDL 10μg/ml で 37°C、6 時間培養後、DiI-AcLDL 吸収を分析。 • オイルレッド O 染色：泡沫細胞形成を調べる。THP-1 細胞 (2×10^5 cells) を培地スライドに播種、懸濁ナノ粒子に 3 時間暴露、10%FBS 含有 RPMI 1640 中で 16 時間 162nM PMA を使って処理。分化した THP-1 細胞を 0.2% 脂肪酸遊離 BSA 含有 RPMI-1640 中で 6 時間、Ac-LDL 10 μg/ml とともに 37°Cで培	ルは ZnO 粒子 10μg/ml に暴露した HUVECs でコントロールに比べて明らかに高くなったが、TiO₂ と ZnO 粒子の両方に暴露した HUVECs では、VCAM-1 の発現に変化はみられなかった。 ■ THP-1 単核白血球/マクロファージでの Ac-LDL 吸収における ZnO 粒子の影響 In vitro 泡沫細胞形成アッセイに使用した Ac-LDL の吸収を測定した。THP-1 単核白血球を TiO と ZnO 粒子に 3 時間暴露した後、THP-1 単核白血球を PMA を用いてマクロファージに分化したところ、ZnO 粒子 5 または 10 μg/ml に暴露した後に、DiI-AcLDL の吸収が顕著に増加した。逆に、DiI-AcLDL の吸収は、TiO₂ 粒子に暴露した細胞では変化しなかった。オイルレッド O 染色でも、同様に、ZnO 粒子 10μg/ml への暴露で、Ac-LDL 吸収後に THP-1 単核白血球/マクロファージにおける脂質の蓄積の顕著な促進が確認された。 ■ THP-1 単核白血球/マクロファージでの CD36 と SR-A 発現における ZnO 粒子の影響 CD36 と SR-A のスカベンジャー受容体の発現における TiO₂ と ZnO 粒子の影響を調べるために、THP-1 単核白血球を 3 時間、TiO₂ と ZnO 粒子に暴露し、THP-1 単核白血球を PMA とともにマクロファージ中に分化したところ、ZnO 粒子への暴露により、THP-1 単核白血球/マクロファージで SR-A の発現レベルが増加し、CD36 の発現についても、ZnO	

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料 調整法/試験用量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
				養。細胞を PBS で洗浄後、4%パラホルムアルデヒドで固定。ホルマリン除去後に、細胞を PBS で洗浄、0.2%オイルレッド O 溶液で 30 分間染色。光学顕微鏡で細胞観察。 ・スカベンジャー受容体発現：スカベンジャー受容体、CD36、SR-A の発現を、フローサイトメオリーとウェスタンブロット法により測定。THP-1 細胞 (3×10^5 cells) をウェルプレートに播種、懸濁ナノ粒子に 3 時間暴露、162nM PMA を用いて THP-1 単核白血球/マクロファージに分化。THP-1 単核白血球/マクロファージを、プライマリー anti-CD36 またはマウス IgG1 κ アイソタイプコントロール、SR-A またはマウス IgG2b κ アイソタイプコントロール、を使って、メンブレン CD36 または SR-A 発現に対して評価。その後、細胞を Alexa647 でラベルした anti-マウス IgG 抗体で染色、フローサイトメトリーで分析。 ・ウェスタンブロット法：THP-1 細胞 (8×10^5 cells) をディッシュに播種、懸濁ナノ粒子に 3 時間暴露、THP-1 単核白血球/マクロファージに分化。細胞を RIPA 溶解バッファーに溶解、プロテイン試料を 4/20%SDS-PAGE により分離、PVDF メンブレン上に転移。メンブレンを 400 倍希釈の CD36 と SR-A に対するウサギポリクローナル抗体とともに培養。プロテイン発現レベルを β-アクチンプロテインレベルに対して標準化。	粒子 10μg/ml への暴露後に顕著な増加がみられた。しかし、TiO₂ 粒子への暴露では、CD36 の発現は減少したが、SR-A の発現は変化しなかった。ウェスタン・ブロット法でも、THP-1 単核白血球/マクロファージでの CD36 と SR-A の発現レベルを調べたところ、THP-1 単核白血球/マクロファージでの CD36 と SR-A の発現が、ZnO 粒子 10μg/ml への暴露でコントロールと比較して増加することを示した。	

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整 法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
ZnO ,TiO 2	Filippi C, Pryde A, Cowan P, Lee T, Hayes P, Donaldson K, Plevris J, Stone V, Nanotoxicolog y. 2014 Apr 8	Toxicology of ZnO and TiO ₂ nanoparticle s on hepatocytes: Impact on metabolism and bioenergetic s (肝細胞に おける ZnO と TiO ₂ の毒 性:代謝とバ イオエナジ エティック スへの影響)	■ 試験物質 TiO₂ と ZnO 粒 子 ZnO : 10.7± 0.7nm、 NanoScale Corporation, Manhattan, KS TiO₂ : ルテル 型、305± 1.8nm、 Nanostructure and Amorphous Materials Inc., Houston, TX ■ 試料調整法 C3A 細胞株と HepG2 細胞株ク ローン誘導体を、 ナノ粒子に暴露 する前に、6 ウェ ルプレートで、 10%ウシ胎仔血 清と 80%融合化 するまで Pen/Strep とと もに 3ml Minimum Essential Medium Eagle(MEME)で 培養。	■ 試験生物 ・ C3A 細胞株、 ・ 肝細胞がん HepG2 細胞 株のクローン誘導体 ■ 投与方法・期間 ・ 投与方法超音波破碎機で 破碎後に、最終密度が選択 濃度になるように細胞に添 加。 ・ 期間 : 4 時間 ■ 試験方法 ➤ 肝臓中間代謝における ナノ物質 (NM) の影 響 NM に暴露後、細胞をリン 酸緩衝食塩水で洗い流し、 その後、4 時間カルシウム とマグネシウムとともに HBSS 中で以下 2 条件で 培養。(i)内在性基質のみか らの代謝を調べるために 外から添加しない条件、 (ii)生理学的基質の混合物 (乳酸塩 20mM、ピルビ ン酸塩 2mM、オクタン酸 塩 4mM、塩化アンモニウ ム 4mM)。乳酸(L)とピル ビン酸(P)のフラックスの 合計 (J_{L+P}) から解糖フラ ックスを、L/P 比とグルコ ース精製フラックス(J_{glc}) から細胞質酸化還元電位 を評価。 ➤ ミトコンドリア膜電位	■ in vitro での肝細胞グリコーゲン代謝におけ る ZnO と TiO₂ の影響 ZnO が、肝臓細胞中でのグリコーゲン分解 (2G+L+P) の用量に依存した著しい増加を 誘導し、2.5µg/cm²で 430%まで増加した。グ リコーゲン分解の増加は、解糖とグルコース 生成の両者の大幅な増加と関連していた。解 糖、J_{L+P}、は ZnO が最も高い濃度で、77±13 から 348±44µmol.gTP-1.hr⁻¹まで 450%増加 した。細胞質酸化還元電位 (L/P) は統計的 に優位な増加を示さなかった。グルコースフ ラックス、J_{glc}、は ZnO 濃度 2.5µg/cm²で、8±3 から 46±14µmol.gTP-1.hr⁻¹、で増加した。逆 に、TiO₂は、グリコーゲン分解、グルコース、 LP (リポたんぱく) 放出に関して、最も高用 量条件での試験においても、非常に限定的な 影響しかみられなかった。 ■ 肝細胞 ΔΨ_mにおける ZnO と TiO₂の影響 ZnO がより低用量 (0.08µg/cm²) のときに、 ΔΨ_m が劇的に低下し、古典的なミトコンド リアの脱共役剤 CCCP (カルボニルシアニド m-クロロフェニルヒドラジン) 50µM で得 られたものと同様の値まで低下した。 ■ グルコース新生 (グルコネオゲネシス) に おける NM の影響 LP 由来のグルコース新生を PEPCK 発現レベ ルで調整したが、ATP の生成減少が強く、LP 由来のグルコース生成を下方に調整すること から、ZnO への暴露後に LP 由来のグルコ ース新生 (J_{glc}) が 20 倍もの増加が観察され (コ ントロールで 4.8±0.8µmol.hr⁻¹.gTP-1) に対して ZnO 10µg/cm²で 101±39µmol.hr⁻¹.gTP-1)、 ミトコンドリアの酸化的リン酸化が影響を受 けているときと一致した。逆に、C3A 細胞の	・ C3A 細胞株を 用いた 10µg/cm² 濃度での 4 時間 の培養で、ZnO はミトコンドリア の機能に強い 有害影響をもた らし、結果とし て LP からのグ リコーゲン分解 フラックスを強 く刺激した。 ・ エネルギー欠 乏状況により、 ミトコンドリア の機能低下が、 LPからのグルコ ース新生フラッ クスの大幅な増 加に付随した が、これは、 PEPCK の過剰 発現と潜在的な 解糖の付随阻害 により生じた。 これらの効果の 一部は、エネル ギー同化におけ る Zn²⁺の影響と 類似し、おそら く粒子の溶解度 と細胞内の Zn²⁺ の放出によるも のである。

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整 法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
			ナノ粒子は、初めにリン酸緩衝食塩水中に 1mg/ml で懸濁させ、完全培地 1ml 中で 4 時間 (NM 暴露による、慢性よりはむしろ初期の影響を検出するために選択された時間)、25°C で 16 分間休みなく超音波破碎。 ■ 試験用量 0-10μg/cm² (LC50 以下に十分なるように、また、NM の繰り返し吸収あるいは摂取後に in vivo で起こる可能性のある肝細胞暴露用量に類似するような濃度範囲を選択)。0.5, 2.5, 10μg/cm² になるように、10cm² 細胞培地ウェルに 100, 25, 5μg/ml 添加。	($\Delta\Psi_m$) における NM の影響 NM に暴露後、細胞を HBSS で洗い流し、JC-10 (1μM、20 分間、37°C) で染色。活動性ミトコンドリア中での JC-10 形態の J-凝集体を測定。 ➤ RNA 単離と qRT-PCR C3A 細胞から、RNA を単離。RNA の量と濃度を分析後に、PRPCK(PCK1) 遺伝子発現レベル (ABI Hs00159918_ml) 検出のために one-step qRT-PCR を実施。82m ハウスキーピング遺伝子発現に標準化。 ➤ ZnO 分解と Zn²⁺ の放出 ZnO の溶解度と Zn²⁺ イオンのその後の放出を調べるために、MEME 中で 4 時間、ZnO NM を、細胞暴露時の同濃度条件で培養。培養培地をその後、Zn²⁺ が完全に溶解するようによく攪拌して均一に分散させた後、Vivaspin 限外ろ過スピナラムを用いてろ過。ろ液中 Zn²⁺ イオン濃度を空気/アセチレン原子吸光法により分析。	10μg/cm² 濃度の TiO₂ への暴露では、LP 代謝への影響はみられなかった。 ■ ZnO の溶解度 細胞上での 10μg/cm² の最も高い暴露濃度と一致する、100μg/ml の ZnO 粒子中の溶存 Zn²⁺ 濃度は、4 時間暴露時に 3.9$\pm$0.4μg/ml で、粒子の溶解度は僅かに 4% であった。 ■ PEPCK mRNA 発現 LP 由来のグルコース新生の長期間の調整は、PEPCK の発現レベルにより制御されていることから、NM へ暴露した C3As の PEPCK の mRNA 発現レベル発現を確認した。PEPCK 発現における溶存 Zn イオンの遷座材的影響を調べるために、ZnO 粒子への暴露濃度と同濃度で ZnCl₂ に暴露した際の影響を分析したところ、ZnO ナノ粒子への C3A 細胞の暴露は、用量依存の関係で PEPCK の mRNA 発現を増幅し、最高で 10μg/cm² 用量で約 4 倍となった。溶存 Zn²⁺ イオンもまた、PEPCK mRNA 発現を増幅した。 ■ ZnO と TiO₂-ROS 生成 酸化ストレスが、肝臓細胞の PEPCK 遺伝子の転写を上方調整することが知られているほか、細胞内 ROS がミトコンドリアの酸化リン酸化機能障害を誘発し、これは、$\Delta\Psi_m$ における ZnO の影響を説明することができることから、(i) 細胞遊離システムにおける ZnO と TiO₂ の ROS 生成能、(ii) 細胞内 ROS 生成を誘発する NM の能力、の評価を行った。実験で用いた ZnO NM は、細胞遊離環境での ROS の比較的小規模の生成を示した (EPR intensity 619$\pm$23) のに対して、TiO₂ 粒子では EPR intensity 2004$\pm$80 であった。細胞内 ROS 生成の DHE と FACS	・TiO₂ ナノ粒子では、今回の濃度範囲では、いかなる有害影響も現れず、過去の結果と一致した。

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整 法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
				➤ 細胞内 ROS (活性酸素種) の測定 NM への暴露後、C3A 細胞を単一細胞懸濁液中にトリプシン処理し、HBSS 中で DHE により 37°C、30 分間、染色。細胞蛍光を分析。H₂O₂(5mM) または銀 NM への暴露を、ポジティブ・コントロールとした。	分析では、ZnO が ROS 生成の用量依存的な細胞内増加を誘導し、それは TiO₂ よりもずっと高レベルであるとの結果 (DHE ポジティブ細胞の 4.5±1.05% に対して、13.7±0.8%) であり、増幅した PEPCK 発現とミトコンドリアの機能障害を潜在的に説明している。	

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料 調整法/試験用 量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
Zn O, Ag	Musee N, Zvimba JN, Schaefer LM, Nota N, Sikhwivhilu LM, Thwala M, J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.2014; 49(1):59-66	Fate and behavior of ZnO- and Ag- engineered nanoparticle s and a bacterial viability assessment in a simulated wastewater treatment plant (シミュレ ートした排 水処理プラ ントでの、 ZnO、Ag の 人工的に製 造されたナ ノ粒子の運 命と挙動、及 びバクテリ アの生存能 力の評価)	■ 試験物質 ・ ZnO と Ag の人工的に製 造されたナノ 粒子 (ENPs) (Sigma-Aldri ch) : < 100nm、球状 ・ ZnO : サイ ズ 分 布 16-89nm、棒 状・立方体 状・標準的形 状・規格外形 状を含む不均 一混合物、 ・ Ag : サイズ 分 布 29-50nm、均 一な球状形状 ・ 排水 : 排水 処理プラント より 1 週間に 1 度、排水を 約 100L 収集 し、バクテリ ア活性を抑え るために 4℃ の冷所で保 存。 ■ 試料調整法 排水処理プラ	■ 試験生物 バクテリア ■ 投与方法・期間 ・ 投与方法 : 水の滞留時間 6 時間で、シミュレートし た WWTP (排水処理プラ ント) の 3-L バイオリア クターに ENPs を投入。 ・ 期間 : 240 時間 ■ 試験方法 ・ シミュレートした排水処 理プラントのレイアウ ト : OECD 設計ガイドラ イン(303. A, , 2001)に従 って設計。2 つのチャンバ ーから構成されるモデル (攪拌タンクリアクター、 活性スラッジシステムを 用いた生物処理をシミュ レートした浄化装置)。モ デルユニットは、試験ユニ ットとコントロールユニ ットの 2 つで、ENPs の種 類別に並行して同時に実 験を実施。排水を各ユニ ットに 8.3mL/min で連続的 に 168 時間以上取り込み、 定常状態に到達したとこ ろで、ENPs 含有排水と非 含有排水を連続的に 240 時間、取込む。 ・ シミュレートした排水処	■ 排水中の ZnO と Ag ENPs の安定性と pH の影響 ZnO ENPs は、酸性排水条件下 (pH3~4) での溶解度が 高く、pH3 で 38.2mg/L Zn であり、ENPs として添加し た Zn の 47.5%が溶解した。排水中の pH が上昇すると、 溶解度は急激に減少し、pH7.0 以上では溶解度は一定とな った。 Ag ENPs は、試験時に曝気していなかったため、排水の pH の変化に関わらず、溶解度はほぼ一定で、限定的にし か溶解しなかった。 ■ シミュレートした排水処理プラント 事前の平衡シミュレート WWTP では、有機物が安定して 溶解していることを示し、少なくとも 168 時間後の排水 中の COD から、COD 除去効率は ZnO 試験ユニットで 72±8%、Ag ENPs で 74±9%であった。その後、排水中 に連続的にナノ粒子を分散したところ、240 時間後の COD 除去効率は、ZnO の試験ユニットで 71±7%、コン トロールユニットで 80±5%、Ag ENPs では、試験ユニ ットで 74±14%、コントロールユニットで 78±8%とな り、試験ユニットのほうがコントロールユニットに比べて わずかに COD 除去効率が高くなったが、ZnO と Ag の両 者ともに試験ユニットでもコントロールユニットでも同 程度の COD 除去効率であり、試験ユニットスラッジ中の Zn 及び Ag の蓄積は、COD 除去効率に顕著な影響を与え ず、スラッジ中の有機物を分解するバクテリアの能力への 影響も取るに足らない程度であった。 ■ スラッジ中へのナノ粒子の蓄積 ナノ粒子への暴露から 240 時間後に収集したスラッジの SEM からは、個々の ENPs の結晶の存在は不明であった が、ZnO と AG ENPs はどちらも、スラッジ中に蓄積し ていることが、全 Zn と全 Ag 濃度の測定から確認できた。 試験ユニット中では、Zn と Ag 濃度は時間とともに漸進 的に増加したのに対して、コントロールユニットでは、	・金属 ENPs あるいは金 属酸化物 ENPs の大 部分は、処 理された排 水に分散し た場合より も下水スラ ッジへの高 い親和性を 示すことが 明らかとな った。 ・スラッジ 上の ENPs の分散は、 おそくメ 生物吸着や 生物汚泥へ の沈着メカ ニズムによ って駆動さ れており、 そのために 限定的な溶 解度の結果 が得られ た。 ・ZnO と Ag ENPs への 短期暴露

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料 調整法/試験用 量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
			ント中にナノ粒子を添加。 ■ 試験用量 ・排水処理プラントの排水供給速度：0.83mg/min 安定性試験のストック懸濁液濃度：100mg/L	理プラントの運転：攪拌タンクリアクターは 100L/h で曝気。試験ユニットとコントロールユニットからスラッジを毎日 15 分間ポンプで吸い出す。モデルユニットの設計は、攪拌タンクリアクター内の水の滞留時間を 6 時間とした。各ユニットの浄化装置から、処理排水と活性化スラッジサンプルをそれぞれ 250ml、毎日採取。浄化装置から収集したスラッジの一部を RAS（返送活性スラッジ）として攪拌タンクリアクターに導入。 ・排水中人工ナノ粒子の安定性試験：排水中の ZnO と Ag ENPs の安定性を、pH3-11 の範囲で調査（典型的な排水の pH は 7-8）。ストック懸濁液(1L)を 9 分割して pH を調整し、軽く揺すって混合し、96 時間静置後、Zn と Ag を分析。 ・バクテリア生存能力評価：240 時間後に、試験ユニットとコントロールユニットから収集した一部のスラッジ (1ml) を使って、バクテリアの生存能力を評価。L 7007	240 時間までは実質的に一定であった。試験ユニットスラッジ中の Zn 及び Ag の平均濃度は、それぞれ $54 \pm 39\text{mg/g}$、$57 \pm 42\text{mg/g}$ で、処理された排水中の濃度は、1.39 ± 0.54、$0.12 \pm 0.06\text{mg/L}$ に比べて非常に高く、下水スラッジへの ENPs の高い親和性を示した。 ナノ粒子への暴露から 240 時間後の XRD スペクトルパターンは、ZnO の結晶ウルツ鉱構造と、Ag の面心立方部分で点家氣的な回折ピークを示し、ZnO ENPs に暴露したピークのほうが鋭くなった。ナノ粒子への暴露から 240 時間後の TEM 画像から、ナノ粒子に暴露しなかった場合の ZnO の平均サイズは 44nm で、サイズ分布幅は 16～89nm であったのに対して、暴露後の平均サイズは 70nm で大きな違いはなかった。Ag については、暴露前のサイズは 29-50nm であったが、暴露後には大きな凝集体が形成され、ナノ粒子を単離することは困難であった。Ag ENPs の固まった凝集体は、緩い凝集体を形成した ZnO に比べて表面積が少なくなったが、COD 除去効率の違いは顕著ではなく、短時間のバクテリアの生存能力の結果からは、Zn と Ag の濃度とは関係がみられなかった。 ■ バクテリア生存能力評価 バクテリア生存キットを用いたコントロールユニットと試験ユニットの試験結果から、フロック形成の証拠として、細胞の厚い凝集体が確認された。ZnO と Ag ENPs を混ぜた試験ユニットの蛍光赤色細胞の偶然の発生は、ネガティブコントロールの結果と比較することで、バクテリアの細胞膜が損傷したことを示す可能性があるが、蛍光緑色細胞が大量に偶発したことは、このシステムで明確であり、有機物の生物分解を行う排水中バクテリアの能力に対して、ほとんど影響がないとの観測結果をもたらす可能性がある。また、損傷を受けた膜をもつ細胞は、コントロールユニットでも、自然死により確認された。 COR 除去と有機物の分解を行う活性スラッジ（排水中バクテリア）の能力は、試験ユニットで顕著な妨害は確認されず、コントロールユニットと試験ユニットの活性スラッ	は、COD 除去に関する試験結果が、試験ユニットとコントロールユニットで同等であったとの結果により証拠付けられるように、シミュレートされた WWTP での有機物の生物分解を行う排水中バクテリアの能力に対する影響は取るに足らないものであることを示した。微生物個体数への ENPs の全体的な有害影響は、ENPs 凝集体により抑制され、環境因子により抑

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料 調整法/試験用 量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
				LIVE/DEAD BacLight Viability kit を使用。キットは、ヨウ化プロピジウム (PI) と SYTO®9 の 2 つの染色からなる。染色液とバクテリア懸濁液を混合して室温で暗条件で 15 分間培養した後、蛍光顕微鏡で観察。	ジブロックにおけるバクテリアの生存を蛍光顕微鏡で観察したところ、排水システムでは、定量データではないが、ZnO と Ag ENPs への短期間の暴露に対する回復が確認できた。 排水中での ENPs の溶解と凝集は、ENPs の安定性に影響を与えること、そうしたプロセスはどちらも、pH やイオン強度などの環境因子による影響を受けること、を今回の結果は示唆している。また、排水中のバクテリア細胞は、今回のシミュレートした排水処理過程で観察されたように、ZnO や Ag ENPs への短期間への暴露に対して回復力を示した。これは、COD 除去効率が試験ユニットでもコントロールユニットでも同等であったとの結果からも支持された。	制される生物学的利用 脳を阻害するのと同様に、おそらく ESP (細胞外高分子物質) によって引き起こされる遮蔽効果によるものと考えられる。

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
TiO ₂ -1	Sweeney S, Berhanu D, Ruenraroengsak P, Thorley AJ, Valsami-Jones E, Tetley TD Nanotoxicology . 2014 Aug 19; 1-11	Nano-titanium dioxide bioreactivity with human alveolar type-I-like epithelial cells: Investigating crystalline phase as a critical determinant (ナノ二酸化チタンのヒト肺胞 I 型様上皮細胞との生体反応性: 重要決定要因としての結晶相の研究)	試験物質 (NP : TiO ₂) : アナターゼ (9.8、10.9nm) , ルチル (11.7、9.1nm) 試料調整法 : 肺胞上皮細胞 TT1 (擬似ヒト肺胞 I 型) を使用、既定用量の NP を超音波バス中、30 秒処理、TT1 細胞単層に暴露 試験用量 : 1,10,50,100µg/ml; 純水または DDCM-1 培地	試験生物: ヒト肺胞上皮細胞 TT1 (擬似ヒト肺胞 I 型)、10%の FCS 新生児仔牛血清、0.05%のジェネティシン、10%のペニシリン/トレプトアビジン/グルタミンの DCCM-1 組織培地を使って培養。シード後 48 h 培養し、成長させた。NP に暴露させる 24 h 前に培地は、無血清 DCCM-1 培養基と入れ替えた。5%の CO ₂ /95%の空気、37°C で保持。 投与方法/期間試験方法 : ・生存率試験・細胞毒性 (24 h) : 規定用量の NP を添加した培地で TT1 細胞の生存率を、MTT アッセイにより生存率を評価、LDH 分析キットで細胞毒性を評価 ・サイトカインの測定 (4、8、24h) : IL-6、IL-8 または MCP-1 の 1000pg/ml の標準液を使用し、ELISA 分析法で測定 ・細胞活性酸素種の同定 (0、0.5、1、2、24h) : ジヒドロエチジウム (DHE) の酸化から生じている蛍光プローブを画像化、画像ソフトによって定量化 ・酸化・還元グルタチオンの測定 (2、6、24h) : Calbiochem GSH アッセイキット I 使用、分析は分光光度計 (405nm)	・生存率試験・細胞毒性 : 生存率については、アナターゼとルチルともに 500µg/ml の用量のときに、5%危険率で有意に低下し、結晶差は無い。細胞毒性は、アナターゼは 50µg/ml 以上、ルチルは 100µg/ml で、有意 (1%危険率) に増加したが、結晶差は小さい。 ・サイトカインの測定 (4、8、24h) : ルチルの方が IL-6、IL-8 および MCP-1 について、一貫してわずかな大きな応答を引き起こしたが、炎症性メディエーターの放出プロファイルパターンは、これら二つのナノ TiO ₂ の結晶相と同様である。 ・細胞活性酸素種の同定 (0、0.5、1、2、24h) : ジヒドロエチジウム (DHE) の酸化量は、10µg/ml 以上で、ルチルについては、24 h 以上で有意 (1%危険率) となり、アナターゼについては、2h で有意 (1%危険率) となり、24 h では有意性が 5%危険率となる。 ・酸化・還元グルタチオンの測定 グルタチオンの酸化種/還元種の比は、用量が大きいほど高くなるが、ルチルは、ル 6h で有意性が上がり、さらに 24h で有意性が高くなる。一方、アナターゼの場合は、2h で有意性が高いものの、24h では有意がかなり減少する。結晶種の差は大きい。	結晶相の異なる 2 種のナノ二酸化チタンのヒト肺胞 I 型様上皮細胞との生体反応に関する差異を明確にした。 今回の実験に使用した特別に作製したナノ材料と肺胞上皮細胞モデルは、ナノ材料の細胞反応性に重要な物理化学的特性を調べるための、有用なアプローチを提供した。

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
TiO ₂ -2	Sheng L, Wang L, Sang X, Zhao X, Hong J, Cheng S, Yu X, Liu D, Xu B, Hu R, Sun Q, Cheng J, Cheng Z, Gui S, Hong F JHazard Mater. 2014 Aug 15; 278:180-8	Nano-sized titanium dioxide-induced splenic toxicity: a biological pathway explored using microarray technology (ナノ二酸化チタンによって引き起こされる脾臓毒性：マイクロアレイ技術を使用した生物学的経路)	試験物質： ナノ二酸化チタン (TiO ₂ NP)： アナターゼ、 平均径 5-6nm、 比表面積 174.8m ² /g、 水力学的直径 294nm) 試料調整法： 0.5% (w/v) ヒドロキシプロピルメチルセルロース (HPMC) 水溶液の表面上に NP 粉を分散、30 分間超音波処理の後、5 分間機械的に振とうした。 試験用量： 2.5、5、10mg/kg 体重	試験生物： 160 匹の CD-1 (ICR) 雌のマウス (24±2g) 投与方法・期間： 胃内投与、毎日投与、最大 90 日 試験方法： 成長状態、飲食状況、活動状況または死亡率を含むすべての症状を毎日記録。 90 日後、解剖により、血液、脾臓を回収、Ti 量を ICP-MS 測定、組織を顕微鏡観察。 脾臓細胞微細組織は、脾臓 (n = 5 各々) を 2.5% のグルタルアルデヒド、2% のホルムアルデヒドを含む 0.1M のナトリウム・カコジル酸塩バッファ溶液で処理後、50mM のナトリウム・カコジル酸塩 (pH 7.2-7.4) 中、1% の四酸化オスミウムで 40℃、2h 処理し、試料は段階的な一連のエタノール (75%、85%、95%、と 100%) 処理で脱水して、Epon 812 に埋め込んだ。薄片試料は、ウラニル・アセテートとクエン酸鉛でコントラストをつけ、TEM 観察した。脾臓部は共焦ラマン顕微鏡検査実施。 血液学的なパラメータは、抗凝固剤として EDTA を使用、赤血球	体重：TiO ₂ NP 服用は体重の段階的に減少し、脾臓インデックスとチタン蓄積はかなり増加した (p < 0.05 または 0.01)。 血液学的なパラメータ：TiO ₂ NP 暴露で血液中の WBC、LYMPH、NEUT、RBC、HGB と PLT が著しく減少。リンパ球の Cn3+、cn4+、ens+ と B 細胞が、TiO ₂ NP 投与で大きく減少 (p < 0.05 または 0.01) した。 脾臓の組織病理評価：TiO ₂ NP 投与を受けているグループは、マクロファージ浸潤を示し、脾臓で白いパルプ状の複製を観察した。さらに、黒か茶色のかたまりを観察し、共焦ラマン顕微鏡検査により TiO ₂ であることを確認した。 脾細胞微細構造評価：TiO ₂ NP 投与グループは、古典的な形態のアポトーシスの特徴を示した。TEM によって、TiO ₂ NP の黒い析出物を観察した。 遺伝子発現プロファイル：10mg/kg の暴露検体で最もひどい脾臓損傷を確認した脾臓を、遺伝子発現プロファイル評価に供した。全遺伝子 (45, 000 遺伝子) のおよそ 2.55% 以上 (1194 の遺伝子) が TiO ₂ NP 暴露によって変化した。 1194 の遺伝子のうち 1041 の遺伝子が免疫/刺激的反応、アポトーシス、酸化性ストレス、代謝プロセス、ストレスへの反応、細胞周期、イオン輸送、信号形質導入、細胞増殖、細胞骨格と細胞分化と関係していた。 リアルタイム PCR：7 つの遺伝子にアポトーシス、酸化性ストレスとストレスに対するレスポンスを確認した。Cfd、Lbp、Cd14、Atf4 と Cyp2e1 を含む 5 つの遺伝子はアップレギュレートされ、Asns と Cdk1 を含む 2 つの遺	TiO ₂ NP 暴露によって、脾臓への NP の蓄積、マクロファージ浸潤、アポトーシス形態を確認した。 マイクロアレイ・データは、TiO ₂ NP にさらされた脾臓について、免疫/刺激的反応、アポトーシス、酸化性ストレス、ストレス反応、代謝プロセス、イオン輸送、信号形質導入、細胞増殖/分割、細胞骨格に関する 1041 の遺伝子に重要な変化を示した。

				(RBC)、リンパ球（リンパ）、白血球（WBC）、ヘモグロビン（Hgb）、血小板（PLT）と好中球顆粒白血球は、血液学自動分析装置で測定。 Illumina 社の Illumina BeadChips を用いたマイクロアレイ分析法によって、脾臓組織のマイクロ配列と遺伝子発現プロファイリングをデータ分析。	伝子はダウンレギュレートされた。 エライザ法（ELISA）分析結果：10mg/kg の TiO₂ NPs 暴露によって、Cfd、Lbp、Cd14、Atf4 と脾臓の Cyp2e1 タンパク質レベルはかなり上昇し、Asns、Cdk1 のレベルは低下した。	
--	--	--	--	--	---	--

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質試料調 整法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間試験方法	試験結果	結論
TiO ₂ -3	Louro H, Tavares A, Vital N, Costa PM, Alverca E, Zwart E, de Jong WH, Fessard V, Lavinha J, Silva MJ Environ Mol Mutagen. 2014 Jul; 55(6):500-9	Integrated approach to the in vivo genotoxic effects of a titanium dioxide nanomaterial using LacZ plasmid-based transgenic mice (LacZ プラスミドベースの遺伝子導入マウスを使用した二酸化チタンナノ材料の in vivo 遺伝毒性効果への統合的アプローチ)	試験物質: ア ナ タ ー ゼ 型 TiO ₂ ナ ノ 粉 末 (NM-102、球状、コーティングなし、平均径 22nm) 試料調整法: 陽性対照として、N-エチル-N-nitrosurea (ENU) を DMSOに溶解 (100 mg/ml)、さらにリン酸塩バッファ食塩水で希釈。NM-102の2.56 mg/mlの分散液は、0.05%の血清アルブミン、続いて0.05%のエタノールを添加し、16分超音波処理し、10-1倍のPBSで希釈し、2mg/mlの最終濃度とした。比較対照は、PBSのみ使用 試験用量: 1日あたり 10、15 mg/kg 体重の	試験生物: LacZ プラスミドベースの遺伝子導入マウス 投与方法: 1日2回に分け、尻尾より静脈内注射。尻尾は 40°C に暖め、1ml の注射針を使用。 試験方法: 42時間後、MN (小核) アッセイのため、採血。DNA 鎖切断 (コメットアッセイ) および遺伝子突然変異は、28日目、最後の処置後の脾臓および肝臓で測定した。病理組織学的および細胞学的分析は、肝臓試料で行った。肝臓と脾臓のおよそ3分の1は、PBS で洗浄し、コメットアッセイに使用。 肝臓と脾臓の残りの部分は、冷たい食塩水で洗い、突然変異分析のDNA抽出までの-80°Cで保存。 コメットアッセイ: 肝臓と脾臓からの細胞懸濁液(20 mM EDTA、10% DMSO のPBS溶液)を使用。Tice等と同様の方法にて4°C、0.8V/cm、300mAで電気泳動、無効化 (0.4Mのトリス-HClバッファ、pH 7.5) の後、ミクロゲルは臭化エチジウム (0.125g/l) で染色した。 高解像度カメラとコメット評価ソフトウェア、Imaging蛍光顕微	病理組織学的および細胞学的分析: 対照動物の肝臓形態は通常通りで、炎症性または循環障害は観察されなかった。血管も、赤血球と他の血球の比率も通常であった。10mg/kgのNM-102を注射された5匹の肝臓は、対照と比較して、重要な組織病理上の差がなかった。しかし、肝細胞の間とマクロファージの中に、対照で観察されなかったナノ粒子の強凝集体と考えられる無色で不規則な大きさと形状の粒子 (1-1.5μm) が存在した。10mg/kg を注射されたマウスの肝臓と比較して 15mg/kgのNM-102を注射されたマウスで多く観察された。用量に関係なくこれらの粒子は肝細胞の核のいくつかでも検出された。核の内側のNMは、常に好塩基性異質染色質によって囲まれていた。NM-102の最も高い用量の動物の肝臓に唯一ははっきりした病理学的変化を検出した。組織病理特徴は、胆管または小管で観察されなかった。TEMによる微細構造分析では電子密度の高い析出物を確認した。NM-102を注射されたマウスの肝臓組織でNMの蓄積と一致する。10mg/kgのNM-102を投与されたマウスは若干の肝細胞で電子密度の高い材料のゆるい集合を観察した。細胞質の範囲内で分散して、ミトコンドリアで蓄積していた。高電子密度の薄片は、15mg/kgのNM-102のマウスの肝細胞でも観察され、細胞質でも散らばって、ミトコンドリアでも蓄積していた。クップファー細胞に存在する場合は、NM-102薄片が細胞質小囊の範囲内で高密度に蓄積していた。 遺伝毒性評価: MNRET (小核赤血球) の頻度は、NM-102 のどちらの用量でも 42 時間後にも、対照と差がなく、骨髓に細胞障害性でないことを示した。ENU (陽性対象) による処置は対照と比	遺伝毒性は、肝臓で観察された中程度の炎症反応にもかかわらず、使用された実験条件下では、ナノサイズの酸化チタンに暴露したマウスで検出されなかった。マウス肝臓中の TiO ₂ の生体内持続性および適度な炎症反応を考慮すると、より強力な炎症応答をもたらす高用量では二次的な遺伝毒性作用および状態の可能性は、例えば、より長い時間枠内で、さらに調査されるべきである。

			NM-102 (4.6、7.5ml/kg) 鏡使用。 LacZ変異体頻度：均質化肝臓と脾臓とLacZ-プラスミドレスキューからのゲノムDNA抽出。マン・ホイットニーU-テストを使って、NM-102と比較サンプル間で、平均変異体頻度を比較。	較して、MNRET ($P < 0.001$) の頻度が増加し、骨髄毒性を示した。NM-102 のどちらの用量でも28 日後のコメット分析で測定される DNA 切断の違いは無かった。しかし、ENU は、28 日後に、脾臓ではなく、肝臓 ($P = 0.008$) の中の DNA の平均パーセンテージの有意な増加を示した。LacZ 突然変異分析は、対象マウスと比較し、肝臓または脾臓で NM-102 暴露による MF の差は検出できなかった。反対に、ENU は、4 倍以上 ($P < 0.021$) 、両方の器官で MF の重要な増加を引き起こした。	
--	--	--	--	--	--

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
TiO ₂ -4	Takaki K, Higuchi Y, Hashii M, Ogino C, Shimizu N J Biosci Bioeng. 2014Jan; 117(1):129-33	Induction of apoptosis associated with chromosomal DNA fragmentation and caspase-3 activation in leukemia L1210 cells by TiO ₂ nanoparticles (二酸化チタンナノ粒子による白血 病L1210細胞における染色体 DNAの断片化およびカスパーゼ 3活性化に関連するアポトーシ スの誘導)	試験物質： TiO ₂ (100nm)、水分 散、石原産業 (MPT-422) 試料調整法/試験用 量： ポリアクリル酸を 5mlのN、N-ジメチル ホルムアミドに 10mgのTiO ₂ を添加、 30分の超音波処理。 混合は、150×・5hの 保持の後、2倍の量の アセトンを加え、20 分の間200Gで遠心分 離し、ペレットはエタ ノールで洗浄、再度、 遠心分離後、水中に再 懸濁。TiO ₂ 分散液は、 リン酸塩バッファ食 塩水と入れ替えた。 PD-10コラムを通し てのゲル濾過によっ て殺菌し、培地とし た。	試験生物： マウス白血病 L1210 細胞 投与方法： 培地として、10%のウシ胎児 血清 (Fetal bovine serum; FBS) を補充した Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)を使用、 37℃、10%CO ₂ に保持、0.5 ml の媒体に 10 万の細胞を 培養。 期間：最大 96 h 試験方法： 細胞生存能力は、CytoTox-1 分析キットを用いた。 凝縮核は、遠心分離によっ て細胞を集め、PBS で洗浄、室 温で 30 分の間 4%のparaホル ムアルデヒドで固定。 DNA は特有の蛍光色素 4 (6- ジアミノ-2-フェニルインド ール (DAPI)) で染色の後 蛍光顕微鏡で観察した。 DNA 断片化は、フィール ド・ジェル電気泳動 (PFGE) による。収集された L1210 細胞を、0.5%のアガロースゲ ルに埋め込み、電気泳動後、 ジェルを臭化エチジウムで 染色し、視覚化、写真撮影し た。	細胞毒性影響： 生細胞の数を、0.05、0.1、0.2、0.4、および 0.8 mg/ml の TiO ₂ 濃度で調べると、用量が高 く、時間がたつほど、未処置の対象と差が大 きい。培養基の中に傷ついた細胞から放出さ れる LDH 活性も、用量が高く、時間がたつ ほど高くなった。 凝縮核と DNA 断片化： 細胞死の特徴となる核凝縮は、12h 後、TiO ₂ 無しで 8%に対し、有りでは 14%となった。 また、TiO ₂ 無しでは少なくとも 24h 無傷であ るが、18h 後に断片化が検出された。TiO ₂ は ROS による DNA 断片化を引き起こす。 カスパーゼ活性：アポトーシスの細胞死を誘 発する指標として調べた結果、TiO ₂ 有り で 24h での活性は、TiO ₂ 無しの 3 倍であ った。またポリスチレンのナノ粒子によ って、活性に影響ないことを確認し、コー ティングの影響がないものと推定した。 サイトカラシン D による LDH 放出： TiO ₂ の有無と、高い LDH 活性との関係 を調べた結果、エンドサイトーシスの抑制 剤が TiO ₂ によって誘導される LDH の放 出を妨げないこと示した。	TiO ₂ がマウス白血 病 L1210 細胞 に及ぼす影響を 調べ、細胞生存率 への悪影響を確 認した。さらに、 ROS による DNA 断片化を引き起 こすこと、エンド サイトーシスの 抑制剤が TiO ₂ によって誘導さ れる LDH の放出 を妨げないこと を明確にした。

				カスパーゼ活性 : Apo-ONE homogeneouscaspase-3/7 分 析キット		
--	--	--	--	---	--	--

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
TiO ₂ -5	Tassinari R, Cubadda F, Moracci G, Aureli F, D'Amato M, Valeri M, DeBerardis B, Raggi A, Mantovani A, Passeri D, Rossi M, Maranghi F Nanotoxicology. 2014Sep; 8(6):654-62	Oral, short-term exposure to titanium dioxide nanoparticles in Sprague-Dawley rat: focus on reproductive and endocrine systems and spleen (Sprague-Dawleyラットへの二酸化チタンナノ粒子の経口、短期暴露:生殖および内分泌系および脾臓を焦点として)	試験物質:アナターゼ TiO ₂ のナノ粒子(平均直径は、284±43nm) 試料調整法: TiO ₂ ナノ粒子は15分の間超音波処理によって蒸留水に分散、毎日準備 試験用量:一日あたり0,1,2 mg / kg 体重	試験生物:(およそ 60 日齢)の42匹の若い性的に成熟したスピローグ・ドーリー・ネズミ 投与方法・期間:期間5日間の経口暴露 試験方法: ナノ粒子を走査型電子顕微鏡(SEM)および透過型電子顕微鏡、および脾臓における生物蓄積 組織病理学観察:甲状腺、副腎、卵巣、子宮、精巣および脾臓、パラフィン埋め込み、顕微鏡検査 性的ステロイドと甲状腺ホルモン血清レベルの生化学評価:T ₃ 、E ₂ とTの濃度は、DELFAによって複製したネズミ血清で評価。測定は、ウォーレス1420 VICTOR3TMMultilabel マイクロプレート測定器 Ti濃度:ICP-MASおよびSEM/エネルギー分散型X線によって調べた。	TiO ₂ 濃度: Ti濃度は、甲状腺(高用量、2mg/kg)で0.24の±0.09µg/g、卵巣では、2と1mg/kgの用量に対し0.28±0.07と0.12±0.04µg/g、子宮では、0.051±0.006と0.49±0.04µg/gだった。 脾臓に関しては、Ti濃度の雄雌の差は無い。 検出されたTiO ₂ の平均サイズはおよそ130nmであった。球形ナノ構造は、周囲の組織と判別できた。EDXマッピングによってTiとOの存在を確認し、O/Tiの比率が1.999であることも確認した。 雄への影響: 試験期間中、用量差は体重差、臓器重さに影響しなかったが、食事量に差がでて、高用量で食欲減退が観察された。 性的ステロイドと甲状腺ホルモン濃度は、用量が高い場合、T血清は増加、T ₃ 血清は減少、E ₂ 血清には差がなかった。甲状腺は、2mg/kgの用量で、ルーメンに小胞上皮の剥離が発生し、不規則形状の小胞の発生率も増加した。副腎皮質で変化は観察されなかったが、骨髄の核発生率は、有意な増加を示した。精巣または脾臓に関して影響は観察されなかった。 雌への影響: 試験期間中、用量差は体重差、臓器重さに影響しなかった。性的ステロイドと甲状腺ホルモン濃度は、用量が高い場合、用量が高い場合、T血清は低下、T ₃ およびE ₂ 血清には差がなかった。 卵巣において、細胞のアポトーシスの発生率は増加した。組織病理学観察は、グループの間に差がなかった。甲状腺の組織形態計測は、高用量で、小胞上皮の高さ増加した。	アナターゼ TiO ₂ のナノ粒子の甲状腺、副腎、卵巣、子宮、精巣と脾臓および血清ホルモン濃度(テストステロン、17-β-エストラジオールとトリヨードサイロニン)への影響を、ねずみの雌雄の差に焦点をあてて調べた。 甲状腺の機能は、T ₃ 血清について雄で減少した。T血清濃度は高用量で雄は増加して、雌は減少した。低用量で短い暴露でも、脾臓において、TiO ₂ 強凝集体と増加した白いパルプ(高用量の雌)が見られた。

					副腎皮質で壊死の細胞の発生率増加を観察した。骨髓に、濃縮した核の発生率増加が観察された。 脾臓で、白いパルプ域の比率が、高用量で増加した。子宮では影響が見られなかった。	
--	--	--	--	--	--	--

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
NPs; CuO, ZnO, NiO, CeO ₂ , Fe ₃ O ₄ , TiO ₂ , MWCNT 実験 方法	Karlsson HL, Gliga AR, Calléja FM, Gonçalves CS, Wallinder IO, Vrieling H, Fadeel B, Hendriks G Particle and FibreToxicol. 2014 Sep 2;11(1):41	Mechanism-based genotoxicity screening of metal oxide nanoparticles using the ToxTracker panel of reporter cell lines (レポーター 細胞株の「Tox Tracker」を用 いた、金属酸化 物ナノ粒子の 機序に基づく 遺伝毒性スク リーニング)	CuO (20-40 nm)、 ZnO (20-200nm)、 NiO (20-70nm)、 CeO ₂ (4-30nm)、 Fe ₃ O ₄ (20-40 nm)、 TiO ₂ (20-100nm)、 MWCNT (100-200 nm×3-7μm)、 クエン酸コート Ag (10、40 nm)、 ディーゼル粒子、 石英粒子、 可溶性の金属塩 (CuSO ₄ 、ZnSO ₄ 、 NiCl ₂) キャラクタリゼー ション： 凝集状態；光子断面 相関スペクトロス コピー (PCCS) で計 測。 セル培養液中のイ オン放出；ICP-OES で計測。	試験生物； ToxTracker mES 細胞； Bsc12-GFP,Srxn1-GFP,Btg 2-GFP mES reporter cell line 細胞内取り込み：TEM で観 察。 無細胞 ROS 生成： DCFH-DA 試験 GFP レポーターおよび細 胞毒性：フローサイトメ トリ (ToxTracker mES レ ポーターセル試験) 8 種の金属酸化物ナノ粒子 を 0~100μg/mL の範囲で、 24 時間暴露。 DNA 損傷としての GFP レ ポーター誘導、酸化スト レス、細胞生存率を測定。 遺伝毒性： ・ コメットアセイ： 8 種の金属酸化物を 20μg/mL で 4 時間暴 露、 ・ γ-H2AX と RAD51 病巣 形成試験 CuO 20μg/mL、ZnO 30μg/mL、NiO 100μg/mL で 4 または 8 時間暴露	キャラクタリゼーション： mES 細胞培養液中で凝集するが 100nm 以 下の粒子も存在した。溶解により溶液中の 粒子重量は 24 時間後には、ZnO-20%、 CuO-60%、Ag-80~90%、NiO-95%に減 少した。 細胞内取り込み：全ての粒子が細胞内に取 り込まれることを確認した。ZnO と CuO は溶解するためその数は少なかった。 無細胞 ROS：NiO とそれに続いて CuO が ROS 生成するが、他の粒子では ROS なし。 GFP レポーターおよび細胞毒性：CuO と NiO で酸化ストレスレポーター (Srxn1-GFP) の誘導が見られたが、CeO ₂ 、 Fe ₃ O ₄ 、TiO ₂ 、Ag ナノ粒子では認められな かった。 また、イオンの影響をみるため、CuSO ₄ 、 ZnSO ₄ 、NiCl ₂ を調べたところ、NiCl ₂ のみ ToxTracker の誘導が認められなかった。 発ガン性のクォーツでは GFP レポーター を誘導したが、MWCNT ではそうならな かった。 遺伝毒性試験： コメットアセイ；CuO、NiO、TiO ₂ で重大 な Tailing を示したが、他の粒子では認め られなかった。CuO では酸化ストレスを示 す FPG 反応サイトが 5 倍であった。 γ-H2AX と RAD51 病巣形成試験；CuO、 NiO、TiO ₂ に対し、γ-H2AX のレスポンス は有ったが、RAD51 病巣形成は認められな かった。	ToxTracker mES レポーター セル試験はナノ 粒子の遺伝毒性 試験に適用でき る。 CuO と NiO は酸 化ストレスによ るレポーターセ ル反応を示した。 CuO では溶解金 属イオンによる のに対し NiO で は粒子そのもの による。

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
NPs 実験 方法	Cohen JM, Teegarden JG, Demokritou P Part Fibre Toxicol.2014 May1;11:20	An integrated approach for the in vitro dosimetry of engineered nanomaterials (工業ナノ材 料の in vitro 投 与到達量の統 合的アプロー チ)	Al ₂ O ₃ 、CeO ₂ 、(4 種)、CoO、Cr ₂ O ₃ 、 Fe ₂ O ₃ (2種)、Fe ₃ O ₄ 、 Gd ₂ O ₃ 、Mn ₂ O ₃ 、SiO ₂ (3種)、TiO ₂ 、ZrO ₂ 、 CB、CNT、Au、 以上、計 20 種のナ ノ粒子 ナノ粒子は、脱イオ ン水中で 3W の超音 波で懸濁化した。	In vitro での投与到達性 (Dosimetry) 予測モデル開発 ナノ粒子のキャラクタリゼーショ ン：流体力学径、ゼータ電位、比導 電度、凝集体の有効密度を計測。 投与到達度の計算： 細胞への到達粒子時間関数 $f_D(t) = 1 - e^{-at}$ t = 時間 (h) a = 粒子到達定数 in vitro 投与到達関数 (RID)： 質量：RID _M = f _D (t) × M 個数：RID _N = f _D (t) × N 表面積：RID _{SA} = f _D (t) × SA M：溶媒中の質量濃度 N：溶媒中の個数濃度 SA：溶媒中の表面積濃度 モデルの確証： 2 種の中性子同位体化のナノ粒子 (CeO ₂ 、SiO ₂ コーティング CeO ₂) を培養時間 2、4、24 時間後に細胞 上および細胞内の粒子個数を γ 線量 計で実測した。	- 金属酸化物の凝集体有効密度は実密度より極めて小さく、ポーラスな凝集体である。 - モデルの検証で、2 種のナノ粒子の in vitro 試験で、細胞への到達粒子量はモデルと実績が良い一致を示した。 20 種のナノ粒子の in vitro 試験での 90%の投与粒子の細胞到達時間を計算し、10 時間以下から 100 時間以上に亘る結果を得た。In vitro 試験で、粒子の細胞への到達は、粒子、媒体、ウェル特性に大きく依存する。	本研究の In vitro 投与到達性予測モデルは、毒性学者に正確な RID _M 、RID _N 、RID _{SA} を計算するツールを提供する。このモデルは、安価で、正確で、再現性の良い in vitro スクリーニング試験開発の大きな助けとなる。

No	著者/ 書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料 調整法/試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
SiO ₂ , Coated Ag 実験 方法	Vecchio G, Fenech M, Pompa PP, Voelcker NH Small. 2014 Jul 9; 10(13): 2721-34	Lab-on-a-chip-based high-throughput screening of the genotoxicity of engineered nanomaterials (工業ナノ材料遺 伝毒性のラボオン チップベースのハ イスループットス クリーニング)	10nm および 70nm のク エン酸 また は PVP で被 覆された銀 粒子。25nm のシリカナ ノ粒子。	サイトカインブロッック小核試験 (CBMN)、 ラボオンチップ細胞選別、自動画像処理を 組み合わせたハイスループットスクリー ニング (HTS) プラットフォームを開発した。 開発に当たり、2 種のマイクロアレイス ライドを作成した。 マイクロアレイ#1 は、3 種の抗体 (抗 CD2、 抗 CD20、抗 CD45) を載せたアレイで、 細胞捕獲とリンパ球細胞株を用いた自動ス コアリング法開発に用いた。 自動スコアリングには蛍光顕微鏡画像を取 り込み、画像処理に Operetta High Content Imaging System を用いた。 マイクロアレイ#1 で、初代ヒトリンパ球に 対する Ag ナノ粒子の影響を調べた。 試験濃度は (0、0.1、1、10、50 μ g/mL)、 培養時間は (24、48、72 時間)、方法は、 Ag ナノ粒子のみで PHA なし、PHA で培 養後 Ag ナノ粒子添加、PHA と Ag ナノ粒 子の同時添加の 3 法で行った。 マイクロアレイ#2 は、5 種の抗体 (抗 CD2、 抗 CD4、抗 CD8、抗 CD20、抗 CD45) を 載せたアレイである。10 および 70nm のク エン酸または PVP で被覆された銀ナノ粒 子を添加 (0、0.1、1、10 μ g/mL) 初代ヒト リンパ球細胞の 48 時間培養後細胞生存率 の自動計測を行った。 さらに、他のナノ粒子に適用できることの 確認に、生体適合性がある 25nm シリカナ ノ粒子 (表面電荷の異なる 2 種、“+”と“-”) を 10、100 μ g/mL で試験を行った。	マイクロアレイ#1 の結果 染色した HR1K 細胞株と Jukat 細胞株を用いて、マイク ロアレイ#1 で細胞認識と選別 ができることを確認した。ま た、cyt-B で処理した細胞に H ₂ O ₂ またはナノ粒子を入れ 培養することにより、遺伝毒性 に関連する 2 核細胞の数が増 えることが計測できた。 マイクロアレイ#2 の結果 銀ナノ粒子による細胞生存率 試験では、粒子径と表面コーテ ィングの影響が確認できた。 CD2+と CD20+の感度が良か った。 遺伝毒性評価では、CD2+と CD4+の感度が良かった。 シリカの試験では、負の電荷の 粒子は細胞生存率に影響しな いが、正電荷の粒子はドーズ依 存性がわずかに見られた。 10 μ g/mL のドーズ量で Ag ナ ノ粒子は遺伝毒性を示したが、 シリカナノ粒子は示さなかつ た。	ヒト初代リンパ 球サブタイプへ のナノ粒子の影 響を調べるこ とができる新しい ラボオンチップ を開発した。 これを用いて、ナ ノ粒子のサイズ、 表面処理、表面荷 電の細胞毒性お よび遺伝毒性へ の影響が分かっ た。 HTS-CBMN と 新しいラボオン チップの組み合 わせはナノ粒子 の他の組織への 影響を調査する のに適用できる。

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
NPs (16 OEC D refere nce NMs) 実験 方法	Sauer UG, Vogel S, Aumann A, Hess A, Kolle SN, Ma-Hock L, Wohlleben W, Dammann M, Strauss V, Treumann S, Gröters S, Wiench K, van Ravenzwaay B, Landsiedel R ToxicolAppl Pharmacol.2 014 Apr 1;276(1):1-2 0	Applicability of rat precision-cut lung slices in evaluating nanomateria l cytotoxicity, apoptosis, oxidative stress, and inflammatio n (ナノ材料 の細胞毒性、 アポトーシ ス、酸化スト レス、炎症評 価へのラッ トの肺の精 密カッス ライスの適 用性)	サイズ、表面コーティ ング有り、無しの 16 種のナノ粒子(OECD reference NMs) : 3 種のアナタース TiO ₂ 、 2 種のルチル TiO ₂ 、 1 種のアナタース-ル チル混合 TiO ₂ 、 2 種の ZnO、 2 種の SiO ₂ 、 2 種の CeO ₂ 、 1 種の Ag、 3 種の MWCNT 各粒子のストック液 に細胞培養液を加え、 10、50、100、500、 1000 µg/mL の試験溶 液とした。	精密カッスライス (PCLuS) の作成;妊娠していないメスの Wister Cr 1 : W1 ラットの肺か ら Krumidiek 組織スライサー により、経 8mm、厚さ 200 - 250nm のスライスを作成。 有効ドーズ量の計算: 試験物質 濃度 50%以下までを AUC 測 定で、それ以下を ISDD モデル で算出。 PCLuS 試験: PCLuS を各試料と 24 時間培 養後、下記を測定した。 ・ 細胞破壊; BCA 試験で PCLuS 中 総蛋白量を測定 ・ 細胞毒性; WST-1 試験でミトコン ドリア活性を測定 ・ カスパーゼ-3 と-7 活性化; PCLuS をカスパーゼ -3/-7 活性化試験実施、 ・ 酸化ストレス; GSH-Glo グルタチオン 試験で細胞内 GSH 量を 測定 ・ サイトカイン誘導; 上澄み液から、細胞内外 の 1L-1α、TNF-α、 CINC-1 (IL-8)、 MCP-1、M-CSF、OPN を測定	有効ドーズ量計算: 有効ドーズ量は、24 時間後で、AUC で は 100%近いもの (TiO ₂ の 1 種と ZnO) から 2 % と非常に少ないもの (MWCNT) の範囲であった。ISDD モ デルでは ZnO の 80%から MWCNT の 17%の範囲であった。 PCLuS 試験: ・ 細胞破壊; ZnO、Ag の試験で、総 蛋白質測定により、細胞破壊が認め られた。 ・ 細胞毒性; ミトコンドリア活性試験 で TiO ₂ の 2 種、Ce ₂ O ₃ の 2 種、 MWCNT の 2 種で有意な細胞毒性 が確認された。 ・ カスパーゼ-3、-7 活性化: SiO ₂ と TiO ₂ でカスパーゼ-3、-7 の活性化が 認められた。SiO ₂ では相当する細胞 毒性はなかった。 ・ 酸化ストレス: GHS 試験で TiO ₂ と MWCNT の無細胞毒性濃度を求め た。GSH 濃度上昇は ROS に対する 細胞の防御反応を示す。 ・ サイトカイン誘導; 12 物質に対しサ イトカイン誘導試験を行った。 1L-1α、TNF-α、IL-8、MCP-1、 M-CSF、OPN の測定結果を表に示 した。	PCLuS はナノ材 料の様々な初期 影響を知ること ができる。しかし ながら、これらの 影響は in vivo 試 験で起こる複雑 な影響を予測す るには不十分で ある。また、ドー ズ量は短期吸入 試験の肺負荷量 より 3 桁多く、 PCLuS で見られ た影響が in vivo で現れるとは限 らない。今後の研 究が必要である。

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
NPs 実験 方法	Wang XZ, Yang Y, Li R, McGuinness C, Adamson J, Megson IL, Donaldson K Nanotoxicolog y. 2014 Aug; 8(5):465-76	Principal component and causal analysis of structural and acute in vitro toxicity data for nanoparticle s (ナノ材料 の in vitro 構 造的、急性毒 性の主要素 と原因分析)	カーボンブラック(Printex 90)、 ディーゼル排ガス粒子 (EPA)、 ナノチューブ(Vicki Stone)、 フラーレン(Sigma)、 ポリスチレンラテックス 3 種(Unmodified,Amine, Carboxylated)、 酸化アルミニウム 3 種 (7,50,300nm)、 酸化セリウム、 酸化ニッケル、 シリカ、 酸化亜鉛、 二酸化チタン (ルチル、ア ナターズ)、 銀 ()は、供給者。酸化アルミ ニウム以下は、 Nanostructure and amorphous Materials	In vitro 試験 (24h) : A549 上皮細胞で、 LDH リリース試験、 アポトーシス/ネクロ ーシス試験、細胞生存 試験、細胞形態試験、 MTT 試験を行い、ま たエライザ法 (ELISA) により炎症 誘発影響を調べた。 赤血球溶血試験およ び THP-1 細胞で DiOC6 試験を行った。 構造特性 : 粒子径、粒子径分布、 表面積、形状、金属含 有量、反応性、フリー ラジカル生成、ゼータ 電位を測定した。 主成分分析 (PCA) に より、構造特性と毒性 試験結果を整理した。	異なる急性毒性測定値を主成分分析 (PCA) で処理し、4つのナノ材料、酸 化亜鉛、ポリスチレンラテックス、ナノチ ューブ、酸化ニッケルの急性毒性プロフ ァイルを特定した。また、PCA と寄与プ ロット解析による感度分析でこれら 4 つ の材料の急性細胞毒性を決定する構造特 性の特定を行った。酸化亜鉛と酸化ニッ ケルでは金属含有量が支配的変数であ り、ナノチューブでは高アスペクト比が 最も影響する因子でありポリスチレンラ テックスアミンでは粒子電荷が決定因子 であった。	SAR 分析により、 急性毒性の構造因 子として以下の結 論となった。 ナノチューブでは 高アスペクト比が 最も影響する因子 である。 酸化亜鉛と酸化ニ ッケルでは金属含 有量が支配的変数 である。ポリスチ レンラテックスア ミンではゼータ電 位が決定因子であ る。

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
NPs 実験 方法	Sauer UG, Aumann A, Ma-Hock L, Landsiedel R, Wohlleben W Toxicol In Vitro. 2014 Oct 24; 29(1):182-186	Influence of dispersive agent on nanomaterial agglomerati on and implications for biological effects in vivo or in vitro (ナノマテ リアル凝 集性に及ぼ す分散剤の 影響とその in vivo in vitro の生物 的効果との 関わりあい)	TiO ₂ (アナターズ 3 種、 ルチル 2 種、混合 1 種)、 ZnO 2 種 (コーティング 有りと無し)、 アモルファスシリカ 2 種、CeO ₂ 2 種、 Ag 1 種、 MWCNT 3 種、 計 16 種の OECD 試験 ナノマテリアル ナノマテリアル分散原 液: 3mg のナノマテ リアルを 1mL の 1%ペ シリン DMEM に添加。 NM-300K (Ag)、NM- 103 (TiO ₂)、NM-111 (ZnO)、NM-102 (TiO ₂)の濃度はそれぞ れ、1、4、10、15mg/mL とした。溶液は 200W で 2 回超音波攪拌した。	Cursorf 社の豚肺表面活性剤と ウシリンパアルブミン (BSA) 溶液中でのナノマテリアルの 分散挙動を調べた。 BSA 分散液は 5%BSA 溶液: ナノマテリアル分散原液=1:9 で混合後 700rpm で 24 時間マ グネット攪拌した。 Cursorf 分散液は 1: 37Cursorf [®] 水溶液 2mL に 1mg のナノマテリアルを添加した。 分散ナノマテリアル粒子の分 離と沈降状況は超遠心分離分 析機 (AUC) と光学的検知器 または UV-Vis 検知器 (MWCNT) でリアルタイムに 観察した。 10μm 以下の粒子を分散粒子 と評価した。 12 時間と 24 時間後の in vitro 有効投与量を AUC 測定結果か ら計算し、さらに良好な分散液 (24 時間有効ドーズ<50%) について「In vitro Sedimentation, Diffusion and Dosimetry model」 (Hinderliter 2010)で有効ド ーズを計算した。	総じて、ナノマテリアルの分散性は BSA 方が Cursorf より良かった。 BSA+超音波攪拌は MWCNT の凝集 解除に有効で、他のほとんどの金属酸 化物に対しても凝集を低減した。 サンプル作成時に BSA または Cursorf [®] を添加すると、AUC 沈殿速 度から得られる in vitro 有効ドーズに 大きく影響する。また、サンプリング 法やインキュベーション時間も大き く影響する。 AUC 法と ISDD 法の差は有効ドーズ 量を決定するのに、沈降と拡散の特性 値を考慮する必要性を示した。	サンプルプレパ レーションが in vitro 有効ドーズ に影響を与え、ま たその与え方は 材料によって異 なる。 In vitro 試験の 設計に当たって は、できるだけ分 散させるのか、よ り生体組織への 吸収と分散のシ ミュレーション に近づけるのか によって、手法を 適正化する必要 がある。 有効ドーズ量の 計算は in vitro 試験結果を解釈 するために不可 欠である。

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質試料調整法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
NPs 実験 方法	Kermanizadeh A, Løhr M, Roursgaard M, Messner S, Gunness P, Kelm JM, Møller P, Stone V, Loft S Part Fibre Toxicol. 2014 Oct 20;11(1):56	Hepatic toxicology following single and multiple exposure of engineered nanomateria ls utilising a novel primary human 3D liver microtissue model (新規のヒ ト肝臓ミク ロ組織の一 次 3D モデル を用いた単 回、複数回の 工業ナノ材 料暴露後の 肝臓毒性)	ZnO(NM 110 (BASF, Z-Cote; ZnO, uncoated, 100 nm)、 Ag(NM 300 (RAS GmbH;Ag capped with polyoxylaurat Tween 20 - <20nm)、 MWCNT(NM400 (Nanocyl; entangled MWCNT, diameter 30 nm))、 TiO2(NRCWE 002 NM was produced from the NRCWE 001 (TiO2 rutile 10 nm) as previously described [Kermanizadeh 2013] ナノマテリアルは 2% FCS の細胞培養グレ ード水分散させ。16 分 超音波攪拌を行う。分 散液を希釈して試験に 用いた。 試験濃度： TiO2 と MWCNT ； 16,31.25,62.5.125.25/ µg/ml ZnO と Ag ; 0.5、1、2、 4、8µg/ml	ヒトの肝細胞と肝臓由来 の非実質細胞を用いた in vitro 3D モデルで試験 を行った。 投与方法 単回投与 投与後、24、72、168、 216、264、336、360 時 間で培地交換 反復投与 初回投与後、24、96、168、 240、312、360 時間で培 地交換、 72、144、216、288 時間 で再投与 処理後、 アデニル酸キナーゼ試 験、細胞生死染色、サイ トカイン分泌、脂質過酸 化、DNA 損傷、アルブミ ン生成、CYP3A4 レベル 計測を行った。	アデニル酸キナーゼ試験：濃度依存性の細 胞膜健全性低下が見られ、反復投与でより 顕著であったが、統計的には ZnO と Ag が 有意であった。 生死染色：反復投与で細胞死の増加が認め られた。 サイトカイン分泌：単回投与では、各材料 とも濃度依存性で IL8 と IL10 の増加が見 られ、360 時間後には定常レベルになった。 反復投与では、時間が経過しても IL8 と IL10 の増加が見られたが、そのレベルは最 高点の 24 時間に及ばなかった。後半部分で Ag と ZnO が統計的有意に増加していた。 脂質過酸化：単回投与で TBARS の増加は 無かったが、反復投与の ZnO と Ag でのみ 統計的有意に増加した。 DNA 損傷：全ての NM の高濃度で DNA 鎖切断が認めら、特に Ag と ZnO で顕著で あった。また、反復投与のほうが顕著であ った。 アルブミン生成：単回投与では、濃度。時 間依存の変化はなかった。反復投与の ZnO で後半でアルブミン生成の低下が見られ た。 CYP3A4 計測：全ての処理で代謝酵素の低 下は見られなかった。	ナノマテリアルの肝臓毒性研究 に 3D ヒト肝臓 ミクロ組織法は 非常に有効な試 験法である。

3. ナノマテリアル等の安全対策に係る国際動向調査

3.1. ナノマテリアル等利用製品の国際規制動向

(1) 概要

ナノマテリアルについては、多くの国・地域で、その有用性を認めるとともに、新たなリスクをもたらす可能性があるとして認識されている。例えば、欧州委員会が 2008 年に公表した「ナノマテリアルの規制側面」では、ナノテクノロジーは、広く社会に対して便益をもたらすことが期待される技術である一方、これまでの化学物質のものと大きく異なるメカニズムにより人及び環境に対して作用し、新たなリスクをもたらす可能性がある。したがって、ナノテクノロジーの新しい応用によって社会が便益を得られると同時に、高い水準での人健康、労働安全及び環境の保護を確実に維持することが、規制における課題である、旨の認識が述べられている。

各国・地域は、人健康、労働安全及び環境の保護に向けて、ナノマテリアルを特定した規制の制定、従来法規のナノマテリアルへの適用により、既に規制を行い、又は、規制案を検討中である。また、規制検討の基礎とするべく、ナノマテリアル/ナノマテリアル含有製品の登録や実績報告を求める制度の制定も行われている。また、ナノマテリアルを規制するには、ナノマテリアルの規制上の定義が必須であり、これら制定済み又は検討中の法規制や制度では、それぞれの定義が示されている。

そこで、まず、ナノマテリアルの定義について概観し、次いで各規制・制度について概観する。

(2) 定義

ナノマテリアルを規制するには、規制上の厳密な定義が必須である。既に、国際標準化機構 (ISO) は、ナノテクノロジーの用語について標準化を検討し、ナノマテリアルについては「何らかの外径寸法がナノスケールであるか、又はナノスケールにある内部構造若しくは表面構造を有する材料」と定義し、ナノスケールとは概ね 1 nm から 100 nm の範囲とした。

欧州委員会は、さらに規制に用いる定義として含有量や起源の要素を加味し、以下の定義を策定した。「『ナノマテリアル』とは、非結合の状態にあるか、又は強凝集体 (アグリゲート) 若しくは弱凝集体 (アグロメレート) であり、かつ、個数基準サイズ分布で 50% 以上の粒子が、一つ以上の外径が 1 nm から 100 nm のサイズ範囲にある粒子を含有する、天然産、又は偶然にできた、又は製造された材料 (マテリアル) をいう」。欧州委員会は、本定義を欧州連合 (EU) の法令その他で、共通に用いるべきナノマテリアルの定義として勧告した。

その後制定された EU の殺生物製品規則、EU 加盟国であるフランスが制定した年次報告制度、またベルギー、デンマークで制定を予定している登録、報告制度では、起源について製造されたものに限定するか、天然産や偶成物を含めるかの点では各様であるが、その他はこの勧告に基づいた定義を採用している。

また、米国連邦殺虫剤・殺菌剤・殺鼠剤法 (FIFRA) でも今後の規制案の中で、同様のサイズに基づく定義を示している。

一方、カナダ、米国食品医薬品局 (FDA) (ナノマテリアルへのアプローチ draft)、中国では、サイズとともに、ナノスケールで発現する特異な特性も定義の要素とし、100 nm 以下のサイズ又は特別な性質を有するものとしてナノマテリアルを定義している。

表 3.1-1 に各国・地域又は特定法令における定義全文を示し、表 3.1-2 に定義を要素に分解して比較を行った。

表 3.1-1 定義一覧

国・地域/規則		定義	備考
EU	委員会勧告	「ナノマテリアル」とは、非結合の状態にあるか、又は強凝集体（アグリゲート）若しくは弱凝集体（アグロメレート）であり、かつ、個数基準サイズ分布で 50%以上の粒子が、一つ以上の外径が 1 nm から 100 nm のサイズ範囲にある粒子を含有する、天然産、又は偶然にできた、又は製造された材料（マテリアル）をいう。 特定のケース、及び環境、健康、安全又は競争力に関する懸念が正当である場合には、個数基準サイズ分布の閾値である 50%を、1%～50%の間の閾値に変更してもよい。 上記の例外として、一つ以上の外径が 1 nm 未満のフラーレン、グラフェンフレーク及び単層カーボンナノチューブはナノマテリアルと見なすべきである。	
	化粧品規則	「ナノマテリアル」とは、非溶解性又は生体内残留性の意図的に製造された物質であり、一つ又は複数の外径又は内部構造が 1～100nm の大きさであるものをいう。	
	殺生物製品規則	「ナノマテリアル」とは、天然又は人工の活性物質又は不活性物質で、非結合状態（unbound state）にあるか、又は強凝集体（アグリゲート）若しくは弱凝集体（アグロメレート）として粒子を含有し、個数基準のサイズ分布で、その 50%以上が一つ又は複数の外径が 1～100 nm の範囲である粒子であるものをいう。 一つ又は複数の外径が 1 nm 未満のフラーレン、グラフェンフレーク及び単層カーボンナノチューブはナノマテリアルと見なすものとする。	殺生物製品に関連する「活性物質又は不活性物質」という語が含まれている他は、委員会勧告と同内容である。
	REACH 規則	委員会勧告を採用するものと思われる： ・第 2 回見直し報告書（2012）で、「欧州委員会は、この定義を EU 法令中で用いる予定である」と述べている。（すなわち、「一つ以上の外径が 1 nm から 100 nm のサイズ範囲にある粒子を含有する天然産、又は偶然にできた、又は製造された材料」という定義となるとと思われる。） ・「REACH 付属書改定に関するパブリックコンサルテーション」では、欧州委員会勧告定義について、設問がある。	
	RoHS 指令	微小サイズ又は微小内部若しくは表面構造を有する物質	前文における記載より。
欧州	フランス	ナノ粒子状物質（Substance à l'état nanoparticulaire）； 非結合の状態にあるか、又は強凝集体（アグリゲート）若しくは弱凝集体（アグロメレート）であり、かつ、個数基準サイズ分布で、ある比率以上の粒子が、一つ以上の外径が 1 nm から 100 nm のサイズ範囲にある粒子を含有する、意図的に製造された物質。	「ある比率」は別途省令により、50%に設定されている。

国・地域/規則		定義	備考
	ベルギー	ナノスケールで製造された物質：非結合の状態にある粒子か、又は強凝集体（アグリゲート）若しくは弱凝集体（アグロメレート）の形態をとる粒子であり、かつ、個数基準サイズ分布で最低限 50%の粒子が、一つ以上の外径が 1 nm から 100 nm のサイズ範囲にある粒子を含有する物質。化学修飾を受けていない天然物質、偶成物及び 1 nm から 10 nm 間の区分が何らかの人的活動の副生成物である物質は除く。 一つ以上の外径が 1 nm 未満のフラーレン、グラフェンフレーク及び単層カーボンナノチューブはナノスケールで製造された物質として取り扱う。	
	デンマーク	非結合の状態にあるか、又は強凝集体（アグリゲート）若しくは弱凝集体（アグロメレート）であり、かつ、個数基準サイズ分布で 50%以上の粒子が、一つ以上の外径が 1 nm から 100 nm のサイズ範囲にある粒子を含有する、天然産、又は偶然にできた、又は製造された材料。本定義はナノマテリアルの定義に関する委員会勧告 2011/696/EU に従っている。	
	ノルウェー	欧州委員会勧告定義	
カナダ		以下に該当する製造された物質・製品、部材、成分、デバイス、構造物はすべてナノマテリアルとみなす。 1～100 nm の外径、内部構造若しくは表面構造のいずれかを有するもの、又はサイズはナノスケールではないがナノスケールに特有の特性／現象を示すものの、いずれかに該当する製造された物質等。	
米国	TSCA	TSCA はナノマテリアルを特別視していない。TSCA において、ある物質が他の物質と同一かどうかの判定基準は「分子アイデンティティ」が同一かどうかにより、粒子サイズは「分子アイデンティティ」の要素とはなっていない。「分子アイデンティティ」とは「分子中の原子の種類と数、化学結合の種類と数、分子中の原子の結合性、及び分子中の原子の空間配置といった、構造的・組成的な特徴に基づくもの」と説明されている。	定義とは関連しないが、「カーボンナノチューブは、TSCA インベントリに収載されているグラファイトその他の炭素同素体とは異なる化学物質であるとみなす」とされている。
	FIFRA (現状)	現状の FIFRA は、ナノマテリアルを特別視していない。	
	FIFRA (提案)	活性又は不活性成分、又はその構成成分の一部が、最終的に強凝集又は弱凝集状態であろうとなかろうと、1～100 nm の範囲にある次元を少なくとも一つ有するように意図的に製造された場合はナノマテリアルとして検討の対象とする。	情報収集ルールの提案、及びナノ形態品審査へのアプローチ案における説明

国・地域/規則		定義	備考
	FDA ナノマテ リアルへ の該否判 定検討の ためのガ イダンス (案)	(a) 加工された材料 (engineered material) 又は最終製品は、少なくとも一つのナノスケール範囲 (約 1nm から 100nm) の寸法を有しているかどうか；又は (b) 加工された材料又は最終製品は、たとえ寸法がナノスケールの範囲外にあっても (1 マイクロメートルまで)、その寸法に起因する物理化学的特性又は生物学的作用などの特性や現象を示すかどうか。	ナノマテリアル含有製品又はナノテクノロジー応用製品に該当するか否かの検討の際に考慮すべき項目
	NIOSH 二酸化チ タンの許 容暴露濃 度	呼吸性粒子のサンプリングで捕捉された粒子サイズの中で、一次粒子径が 100 nm 未満の部分。	本定義は超微粉 (ultrafine) に対して与えられた定義であるが、「100 nm 未満の粒子はナノ粒子とも定義されている」。
オーストラリア 工業化学品 (届出・審査) 法に基づき、国家工業化学品届出・審査機構 (NICNAS) が審査を行う際の定義		ナノスケールでの特異な特性を有するように、又は特定の組成を持つように、意図的に生産、製造又は加工された材料であって、代表的なサイズ範囲が 1 nm から 100 nm であり、ナノ物体 (すなわち一、二、又は三次元がナノスケールである)、又はナノ構造体 (ナノスケールの内部又は表面構造を有する) のいずれかである工業材料。	10%以上の左記定義 (サイズ、特異な特性、意図的生産) を満たす粒子を個数基準で 10%以上含有する材料は、NICNAS はナノマテリアルとみなすこととする。
中国 国 家 標 準 GB/T 19619-2004「ナノマテ リアル用語」		この規格は、一般的な概念と技術固有の概念によるナノマテリアルの用語を規定する。ただしナノマテリアルで製造された製品は含まない。本規格は、ナノマテリアルとその関連分野における標準文書及び技術文書に使用される一般的な用語の定義に適用される。 ナノスケール： 1 nm から 100 nm ($1\text{ nm}=10^{-9}\text{ m}$) の範囲の幾何学的寸法。 ナノ構造材料単位： ナノスケール構造の特性を有する物質単位であり、安定したクラスタ又は人工原子クラスタ、ナノ結晶、ナノ粒子、ナノチューブ、ナノロッド、ナノワイヤ、単層膜及びナノポア等を包括する。 ナノマテリアル： 3次元空間において少なくとも一つの次元がナノスケールである物質、又はナノ構造単位から成りかつ特別な性質を有する材料。	
韓国	ナノ製品の 安全管理に 関するガイ ドライン KS A 6203	ナノ物体及びナノ構造材料 (内部ナノ構造やナノ粒子凝集材料を含む) であって、固体状であり、何らかの次元が 100 nm より小さいものを意味する。	ガイダンスには、ナノマテリアルの例として、フラーレン、カーボンナノチューブ、ナノワイヤ及び量子ドットが列挙されている。

国・地域/規則		定義	備考
	ナノマテリアルの製造、取扱、労働者安全衛生に関する技術ガイドライン	(a)「ナノ粒子 (Nanoparticles)」とは、1～100 nm の範囲の直径を有する粒子をいう。 (b)「ナノ構造材料 (Nanostructured material)」とは、ナノサイズの粒子を含んでいる構造の物質又はナノ粒子が凝集したものをいう。 (c)「ナノマテリアル (Nanomaterials)」とは、粒子の大きさが3次元のうち少なくとも一つの次元の長さが 100 nm よりも小さいナノ粒子とナノ構造材料をいう。 (d)「ナノエアロゾル (Nanoparticles)」とは、空気中に浮遊するナノマテリアルの集合体をいう。 (e)「極微細粒子 (Ultrafine particles)」とは、意図的に製造されたものではなく、燃焼、溶接又はディーゼルエンジンの作動等の過程で非意図的に製造されたナノサイズの粒子をいう。	
ISO ISO/TS 80004-1: 2010		ナノマテリアル：何らかの外径寸法がナノスケールであるか、又はナノスケールにある内部構造若しくは表面構造を有する材料 (原注 この用語にはナノ物体及びナノ構造材料を包含する) ナノ物体：一つ、二つ又は三つの外径寸法がナノスケールである材料 ナノ構造材料：内部ナノ構造又は表面ナノ構造を有する材料 ナノスケール：概ね 1 nm から 100 nm までのサイズ範囲 ナノ構造：相互に関連した (inter-related) 構成要素の組み合わせであり、これら要素の一つ又は複数がナノスケール域にあるもの	

表 3.1-2 定義の要素

国・地域/規則		要素								備考
		サイズ	含有量	含有量の基準	状態	比表面積	固有特性	起源	対象	
EU	委員会勧告	一つ以上の外径が 1 nm から 100 nm	50%以上	個 数 基 準 サ イ ズ 分 布	非結合の状態にあるか、又は強凝集体若しくは弱凝集体			天然産、又は偶然にできた、又は製造された材料		
	(特定のケース、妥当な場合は変更してもよい)		1~50%							含有量の閾値変更を認めている
	(サイズの特例)	一つ又は複数の外径が 1 nm 未満							フラーレン、グラフェンフレーク及び単層カーボンナノチューブ	勧告における下限値の特例
	化粧品規則	一つ又は複数の外径又は内部構造が 1~100nm					非溶解性又は生体内残留性	意図的に製造された物質		
	殺生物製品規則	一つ又は複数の外径が 1-100 nm	50%以上	個 数 基 準 サ イ ズ 分 布	非結合の状態、又は強凝集体若しくは弱凝集体			天然又は人工	活性物質又は不活性物質	委員会勧告を採用
	(サイズの特例)	一つ又は複数の外径が 1 nm 未満							フラーレン、グラフェンフレーク及び単層カーボンナノチューブ	定義における下限値の特例
	REACH									委員会勧告を採用か？
	RoHS 指令	微小サイズ			微小内部表面構造を有する					サイズと構造要件は「又は」

[illegible]

[illegible]

国・地域/規則		要素								備考
		サイズ	含有量	含有量の基準	状態	比表面積	固有特性	起源	対象	
							特別な性質を有する	ナノ構造単位	ナノ構造単位等：安定したクラスタ又は人工原子クラスタ、ナノ結晶、ナノ粒子、ナノチューブ、ナノロッド、ナノワイヤ、単層膜及びナノポア等	れかが合致すればナノマテリアル
韓国	ナノ製品の安全管理に関するガイドライン KS A 6203	何らかの次元が100 nm 以下			ナノ物体又はナノ構造材料（内部ナノ構造やナノ粒子凝集材料を含む）		固体状			
	ナノマテリアルの製造、取扱、労働者安全衛生に関する技術ガイドライン	3次元のうち少なくとも一つの次元の長さが100 nm よりも小さい			ナノ粒子又はナノ構造材料（ナノサイズの粒子を含んでいる構造の物質又はナノ粒子が凝集したもの）					
ISO	ISO/TS 80004-1: 2010	約 1 nm から 100 nm までのサイズ範囲			何らかの外径寸法がナノスケール、又はナノスケールにある内部構造若しくは表面構造					

(3) 各国等における規制動向

a) 米国

- EPA（環境保護庁）の動向

EPA はこれまでナノマテリアルのうち、新規物質であると判断される物質に SNUR（重要新規利用規則）を発効してきている。今年度も以下のナノマテリアルに SNUR が発行された（表 3.1-3）。

表 3.1-3 2014 年の SNUR 発効

物質	PMN 番号	官報日付	用途指定
SWCNT	P-10-15	2014.7.8	分散液かインク中の PMN 物質を用いた導電コーティングのコンポーネント、および機械強度を上げるための樹脂/加熱可塑性物/エラストマーへの添加物
MWCNT	P-11-339	2014.7.8	機械的強度工場および電気特性向上のために、樹脂、加熱可塑性物およびエラストマーへの添加物、バッテリー用金属箔上のコーティング、または織布複合材製造用途
MWCNT	P-08-0392	2014.9.2	帯電防止および強化用添加剤
MWCNT	P-09-257	2014.9.2	導電適用用ポリマー樹脂のようなマトリックス中のカーボンブラック又は炭素繊維のような従来材を置き替える導電性繊維、エラストマー、ポリマー、樹脂の機械的特性を強化するための添加物
MWCNT	P-10-115 ～126	2014.9.2	導電性および熱伝導性添加物、機械的補強添加物、エネルギー貯蔵添加物、化学品中間体
カーバイトから製造されるナノカーボン	P-11-290	2014.9.2	電気化学センサー中のセンサーエレメント
MWCNTを含むテレフタル酸とエチルベンゼンのポリマー	P-13-573	2015.2.2	熱硬化性、エラストマー、熱可塑性プラスチックのような様々な樹脂系、溶剤、水にための分散剤

EPA は 10 月 6 日、ナノマテリアルの報告と記録を有害物質規制法（TSCA）を通して義務付ける規則の提案を行政管理予算局（OMB）に提出した。この規則提案は、2015 年 3 月に官報に公示する見込みである。11 月 21 日、OMB のウェブサイト上に、EPA の 2014 年下半期の規制アジェンダが公表され、この規則提案もふくまれていた。報告の方法や根拠法については、

- TSCA 第 8 条(a)項のもと、情報とデータの提出義務をナノマテリアルの製造業者に義務付ける規則を設けるとされている。

水質浄化法（Clean Water Act）は、EPA に 2 年毎に既存の工業廃水基準ガイドラインの見直しと改定を行うことを義務付けている。この作業の一環として、EPA は 2014 年 9 月 16 日付の官報に 2014 年の「工業廃水ガイドラインプログラム計画（Effluent Guidelines

Program Plans)」のドラフト版を発表し、その中でナノマテリアルの製造と利用に伴う排水を含む4つのトピックについて、関係者の意見やデータ、情報を募っている。ナノマテリアル関連の情報として、ナノマテリアルの製造と利用に伴う工業排水の潜在的有害性に関するデータ、および関連する情報を、2014年11月17日まで受け付ける。

- FDA（食品医薬品局）の動向

FDAは食品、化粧品、飼料へのナノテク・ナノマテリアル利用に関する3件のガイダンス文書と1件のガイダンス文書ドラフトを2014年6月に公表した。これらの中で、事業者がナノテク、ナノマテリアルを利用した製品の開発時などの早い段階でFDAの意見を求めることを勧めている。また、製品全般に関するガイダンスでは、「FDAは製品毎に既存法に遵守しているかどうかを判断する」としている。

- その他

米国とカナダの米加規制協力会議（RCC：Canada-United States Regulatory Cooperation Council）は2014年8月、これまでの活動から得られた教訓と今後の活動方針をまとめた協同計画、「Canada-United States Regulatory Cooperation Council Joint Forward Plan August 2014」を発表した。協同計画の付録（Annex）には、ナノテク規制への協同の取り組みを含む29のイニシアチブの成果が評価されている。

これまでの取り組みとして、両国はナノマテリアルの規制について共通の政策原則を採択し、両国の企業と消費者にとって一貫性のある取り組みができる下地を作った。今後の活動方針として、個々のイニシアチブに関する具体的な計画はまだ示されていないが、各分野で米国とカナダの規制当局間の規制協力プロセスを強化するため、必要に応じて米国とカナダが省庁レベルで連携して動くための下地をつくるとしている。その最初のステップとして、両国は3ヵ月後にワシントン DC でステークホルダーと規制当局の会議を開催し、合同行動計画の実施に向けた協議に着手し、連携する米国およびカナダの省庁間の活動の管理方法を考案し、6ヵ月後に規制パートナーシップ声明（Regulatory Partnership Statements: RPS）として公表する。化学物質規制の分野では、米国 EPA とカナダ環境省（Environment Canada）およびカナダ保健省（Health Canada）の3機関が協力する。

b) 欧州委員会（EC）

- ナノマテリアルの登録に関する動向

2014年3月、欧州化学品庁（ECHA）は、「登録済みナノマテリアル評価グループ（group assessing already registered nanomaterials: GAARN）」の最終会議（第3回）の内容をまとめた報告書を発表した。GAARNは、持続可能なナノテク・ナノマテリアルの開発のために、REACH下でナノマテリアルの安全性評価および安全性管理を実施するベストプラクティスの作成を目的に、2012年1月に欧州委員会環境総局（DG Environment）が設立

した。報告書には、2013 年 9 月 30 日に行われた最終会議で協議された、REACH 下でナノマテリアルを登録する事業者が直面する課題の説明と ECHA の助言を掲載している。ECHA の助言は、REACH 登録全般に関わるものから、詳細なドシエの項目に関するものまで多岐にわたるものである。

EC の共同研究センター(JRC)は、2014 年 4 月に消費者製品に使用されるナノマテリアルの表示と報告を義務付ける制度に関する報告書を発表した。この報告書は EU の既存法規がナノマテリアルにどのように対応しているか、ナノマテリアル登録制度の必要性、登録制度を実施した場合の影響をまとめたものである。同報告書は、ナノマテリアルを使用しているだけでは必ずしもリスクに繋がらないので、表示および登録を義務付けられるナノマテリアル製品が風評被害を受けないために、リスクと関連しない形で登録および表示が実施されるべきだとしている。また、表示や登録など、ナノマテリアル製品に関する情報提供を高める方法は、世界的に実施し、貿易障壁や不公平な商習慣の発生を避けるべきであるとしている。さらに、表示や登録を義務化する複数のアプローチとその影響についても分析されている。

EU 加盟国の中に、ナノマテリアル登録制度が施行、計画されている状況で、EU 加盟諸国は EU 執行部に、ナノマテリアルあるいはナノマテリアル含有製品の登録および市場監視についての立法措置を求めている。これに対応する活動の一環として、欧州委員会は、市場に出ているナノマテリアルの透明性を高め、確実に規制監督を行うための方法を特定/構築するために、リスク アンド ポリシー アナリスト社 (Risk & Policy Analysts: RPA) とビプロ社 (BiPRO GmbH) に次の 4 つの政策オプションの影響調査を依頼し、そのドラフト報告書を 2014 年 5 月 13 日に公開した。

0. ベースライン・シナリオ (現状)

1. 国内制度を設けることを望む加盟国において「ベストプラクティスモデル」を実施する場合
2. 体系的に情報を収集する場合 (Nanomaterials Observatory の設置)
3. EU レベルのナノマテリアル登録制度 (業者ごとに各物質を年に一度登録) を設けた場合
4. EU レベルのナノマテリアル登録制度 (用途ごとに物質、混合物、物品などを年に一度登録) を設けた場合

次いで、6 月 30 日にこの外部委託調査の暫定的結果の妥当性を話し合うためにワークショップを開催した。さらに、欧州委員会は、2014 年 5 月 13 日から 8 月 5 日まで上記報告書の内容についての意見公募を実施した。この結果は、サマリーレポートして下記の EC HP で見ることができる。

http://ec.europa.eu/enterprise/sectors/chemicals/reach/nanomaterials/index_en.htm

1. 食品に関する規制動向

EU で「消費者への食品情報の提供に関する新・食品表示規則（1169/2011、以下、『新・食品表示規則』と表記）」が 2014 年 12 月 13 日に施行された。この新・食品表示規則は、食品中に含まれる「工業ナノマテリアル（engineered nanomaterials）」を、成分名の後ろに括弧書きで（nano）と表示することを業者に義務付けている。

一方、今回施行された新・食品表示規則の対象となる「工業ナノマテリアル」の範囲については、欧州委員会と欧州議会の間で修正の議論が継続されており、2014 年 11 月 26 日、欧州委員会は新たな修正案を欧州議会に提出する意向の通知と修正案のドラフトを世界貿易機関（WTO）に提出した。これによると、欧州議会の意向を反映して、食品添加物中のナノマテリアルも含めることになる。

欧州議会の環境公衆衛生食品安全委員会（Committee on the Environment, Public Health and Food Safety: ENVI）は 11 月 24 日、新規食品規則（Novel Foods Regulation、258/97、2013 年 12 月に欧州議会で採択）の委員会改正案（2013/0435<COD>）の修正案（ENVI 修正案）を賛成多数で採択した。ナノマテリアルを「新規食品」の範囲に含め、EU 域内で加盟国の認可なしに食品に使用することを禁止する内容となっている。主な変更点としては、ナノマテリアルの範囲を、新・食品表示規則（1169/2011）における「工業ナノマテリアル」の範囲と同一としていた記述が削除された（新・食品表示規則下では、食品に使用される成分の内、総粒子数の 50%以上がナノスケールであるものをナノマテリアルであるとしているが、欧州食品安全機関（EFSA）は、食品に関しては 10%を閾値とすることを推奨）。

また、食品包装は新規食品規制の範囲ではないが、食品接触材料（food contact materials: FCMS）に含まれるナノマテリアルへの対応方法に関する報告書を作成し、欧州議会と欧州連合理事会に提出することを義務付ける条項が新しく加えられた。

今後、欧州議会は、この新規食品規則改正案の ENVI 修正案について本会議で協議する予定で、欧州議会と欧州連合理事会の間での交渉も開始される。

2. ナノマテリアルの定義見直しに関する動向

欧州委員会は 2011 年に「ナノマテリアル」の定義の勧告（2011/696/EU）を発行した際、2014 年 12 月までに同定義の見直しを行うこととしていた。

これを受けて、JRC は 2014 年 3 月付で欧州委員会のナノマテリアルの定義の見直しに向けた報告書の第一弾を発表した。この報告書は、JRC がステークホルダーを対象に行ったオンラインアンケートで得られた EC 定義の適用に関する経験なども盛り込まれた、見直し作業に必要な科学技術的課題に関する情報を集めたものである。

続けて、JRC は 2014 年 8 月に、欧州委員会のナノマテリアルの定義の見直しに関する 2

つ目の報告書を発表した。この報告書は 2013 年 8 月から 2014 年 4 月にかけて、欧州委員会の定義の実施について科学者、研究機関、規制当局、NGO、産業などから寄せられた情報を評価し、まとめたものとなっている。本報告書においては以下の 3 点が指摘されている。

- ・ EC 定義は、粒子の外部次元の最小値を基準としているが、電子顕微鏡以外の粒子径分布測定装置は、殆どが球相当径を求める方法であり、球形でない粒子については外部次元の最小値は測定できない。

- ・ EC 定義はで凝集体はその構成粒子のサイズが要求されるが、弱凝集体(agglomerate)は分散できても、強凝集体 (aggregate) は分散できないので、粒子径分布測定装置で構成粒子の粒子径は求められない。強凝集体を分散しようとする構成粒子にダメージを与えてしまう。

- ・ 通常の粒子径分布測定装置は、重量または体積基準の粒子径分布が求められるので、それを数基準に変換すると大きな誤差が生じる。

JRC はこれまでに公表した 2 つの報告書にまとめられた関係者からのフィードバックやその評価の検討を進めており、欧州委員会の定義の明確性、有効性、実施可能性を高める方法の提言を 3 回目の報告書にまとめ、年内に公表することを予定した。しかし、最新の情報では、2015 年前半にずれ込む見込みである。

なお、EC のナノマテリアルの定義勧告の実行をサポートするため、検証され標準化された方法に基く統合的なアプローチを開発することを目的とした NanoDefine プロジェクトが 2013 年 11 月から 5 年間の予定で、EU の第 7 次研究枠組み計画 (FP7) で実施されている。

3. 職場での安全に関する動向

EC は、11 月付で工業ナノマテリアルの安全な取り扱いに関して 2 件のガイダンスを公表した。

1 件目は、ナノマテリアルを扱う労働者に向けで、労働者のナノマテリアルへの暴露の管理に活用できるリスク管理措置について簡潔に説明し、詳細な情報源として、各国のガイダンスを紹介している。

2 件目は、雇用主や労働安全衛生従事者が、労働者の健康と安全性を確実に適切に保護することを目的として作成され、リスクの評価と管理のプロセスが 7 つのステップとして説明されている。

2015 年 1 月 28 日、NanoSafePACK (FP7 のもとで 3 年間にわたって実施された研究プロジェクト) は、その活動をまとめた「包装産業におけるナノ粒子の安全な取扱いと使用のためのベストプラクティス」を発行した。

このガイダンスは、包装用の高分子系ナノコンポジットを製造している中小規模の企業

での利用を念頭に作成され、ナノフィラーや高分子系ナノコンポジットの応用や特性に関する技術情報、および EHS 関連の新たな知識と手引きを示している。

c) EU 加盟国

- フランス

フランス国立安全研究所 (Institut national de la recherche scientifique: INRS) は 2014 年 6 月、職場におけるナノマテリアルの特定に役立つガイダンス (Aide au Repérage des Nanomateriaux en Entreprise) を発表した。職場でナノマテリアルによるリスクを適切に管理するには労働者がナノマテリアルに暴露する可能性がある状況を特定することが重要であるとし、特定のためのチェック項目やリスク低減策などを簡潔に示している。

フランスの環境・持続可能開発・エネルギー省 (MEDDE) は 2014 年 11 月、2013 年から始まったナノマテリアル年次報告制度の 2 度目の報告書を発表した。それによりと、2013 年にフランスで生産あるいは輸入されたナノマテリアルの届出数は 1 万 417 件 (前年は 3,409 件) にのぼった。

- ベルギー

ベルギーは 9 月 24 日付の官報に 2016 年 1 月 1 日からナノマテリアルの登録を義務化する国王令が掲載された。2015 年に上市されるナノスケール粒子物質 (substance) の届出の締め切りが 2016 年 1 月 1 日に、そして、ナノマテリアル混合物 (mixture) の届出締め切りは 2017 年 1 月 1 日とされている。登録義務の対象となるのは、殺生物剤、医薬品、食品、飼料、食品接触材料、顔料など、既に EU や国内の他の規則の対象を除き、ナノマテリアルを年間 100 グラム以上市場に出す場合である。

- デンマーク

デンマークで、ナノマテリアルを含む製品の登録制度指令が 6 月 18 日に施行された。同指令の対象となるのはデンマーク国内での販売を意図してナノマテリアルを含む混合物や製品を製造、または輸入する業者であり、前年に販売した製品の名称や量などの情報を毎年報告することを義務付けた。初年度の報告は、2014 年 6 月 20 日から 2015 年 6 月 20 日の期間内に販売した分を 2015 年 8 月 30 日までに報告しなければならない。ただし、食品、食品接触材料、飼料、医薬品、医療機器、化粧品、農薬、廃棄物など、既存規則がある分野は報告義務の対象としない。ナノマテリアルの定義には、欧州委員会推奨の定義が適用される。

デンマークの環境保護庁 (EPA) がナノ製品登録制度への報告のためのガイドラインの英語版を発表した。ガイダンスでは、以下の製品は登録する必要はないとしている。

- ・ 食品、食品接触材料、飼料、医薬品、医療器具、化粧品、殺虫剤、廃棄物はこの制度から除外される。
- ・ 塗料、木材保護材、にかわ、フィラーやシーラントで、着色のみのために使用されるナノ顔料のみを含み、他のナノマテリアルを含まないもの
- ・ 繊維製品で、印刷インク又は染色のためにのみナノマテリアル（例えば顔料）を含むもの
- ・ カーボンブラック又は二酸化ケイ素を含み、他のナノマテリアルを含まないゴム製品又はゴム部品
- ・ 表面又はラベルに印刷するインクのみナノマテリアル（例えば顔料）を含むもの
- ・ ナノマテリアルであっても、自然に生成するものまたは生物分子、すなわち REACH 付属文書Ⅳ又はⅤに含まれる物質および化学プロセスなしに製造される物質
- ・ 意図的にナノスケールで生成される物質ではない場合
- ・ 通常又は合理的に予想される使用状況で、その製品からナノマテリアルがフリーの状態で放出されることがない場合

● オランダ

オランダで食品包装と消費者製品に関する改正規則が、2014 年 4 月 1 日に施行された。対象となる物質については、特に食品容器包装に関して、食品への移行限度（migration limit）などを定めている。

国際的なナノテク業界団体、ナノテク工業協会（NIA）によれば、この改正規則は EU による規制との重複を避け、また、EU による規制の対象となっていない材料や物質（materials and substances）を規制対象とする目的で改正されたとしている。

d) カナダ

カナダ環境省（Environment Canada）は、工業ナノ材料の安全性試験と評価に関する OECD の勧告 - 既存の国際レベル、および国レベルの化学物質規制枠組みやその他の管理制度を工業ナノ材料に特有の特性を考慮に入れて変更して適用することを推奨、（2013 年 9 月 19 日） - を承認したと化学品管理計画進捗報告書（Chemicals Management Plan Progress Report）の 2014 年夏号で発表した。

カナダ環境省は、「ナノマテリアルに分類され得る、短く、絡まった多層カーボンナノチューブ（a short tangled multi-walled carbon nanotube that can be classified as a nanomaterial）」（2013 年 8 月 24 日付け重要新規活動通知（Significant New Activity notice: SNAC notice、第 17192 号））のリスク評価結果のサマリーを発表した。サマリーによると、この多層カーボンナノチューブは、プラスチックの添加剤としてカナダ国内での製造、あるいは輸入の意図が申告されており、申請者が届け出た使用によるヒトの健康

や環境への悪影響は疑われなかったが、それ超えた量が使用された場合のリスクについては不確実性があると判断し、2013 年 8 月に SNAc が発行された。

e) オーストラリア

オーストラリア農薬・動物医薬品局 (Australian Pesticide and Veterinary Medicines Authority: APVMA) は、10 月付でナノ農薬と動物用ナノメディシンの将来的な規制に関する報告書のドラフト を公表した。APVMA は既存のリスク評価方法と試験方法は概してナノ粒子の毒性評価に適切であると考えているが、今後、既存のリスク評価の限界を示す新たな情報が出てきたら規制枠組みも変更されるとしている。

オーストラリアの労働安全局 (Safe Work Australia: SWA) は 2015 年 1 月 30 日に、工業ナノマテリアルの毒性と労働衛生上の有害性に関する最新情報をまとめた報告書を発表した。報告書には、カーボンナノチューブ、二酸化チタン、酸化亜鉛、酸化セリウム、および銀の有害性を取り上げ、ナノマテリアルを扱う製造業者や輸入業者、労働衛生・労働安全性の担当者や研究者などに向けて、職場での暴露基準などに関する情報を提供している。

f) 韓国

韓国の未来創造科学部は 2014 年 7 月 22 日、韓国標準科学研究院 (KRISS) にナノマテリアルの安全性対応システムの構築と国際認証システムの確立のための「ナノ安全性技術支援センター」を開所した。同センターは、ナノマテリアルの特性の研究や製造方法、生体内毒性物質の検出方法の開発などナノマテリアルの安全性を確保するための標準となる測定技術の開発を行う予定である。また、ナノ安全性規制に関する韓国発の標準の迅速な国際化を促進するために国際協力を強化するとしている。

現在のところ韓国国内のナノ安全性に関する研究はベースとなる標準が存在しないため各研究者が異なる方法で進めており、研究者ごとにナノマテリアルの特性や毒性分析の研究結果の一貫性が不足していることが問題であった。

同センターは、標準物質の開発チームと測定標準技術開発チーム、毒性試験評価チーム等で構成され、年間 25 億ウォンの予算が配分される予定である。

韓国標準科学研究院 (KRISS) ナノ安全性技術支援センターが示した推進ロードマップを図 3-1-1 に示す。

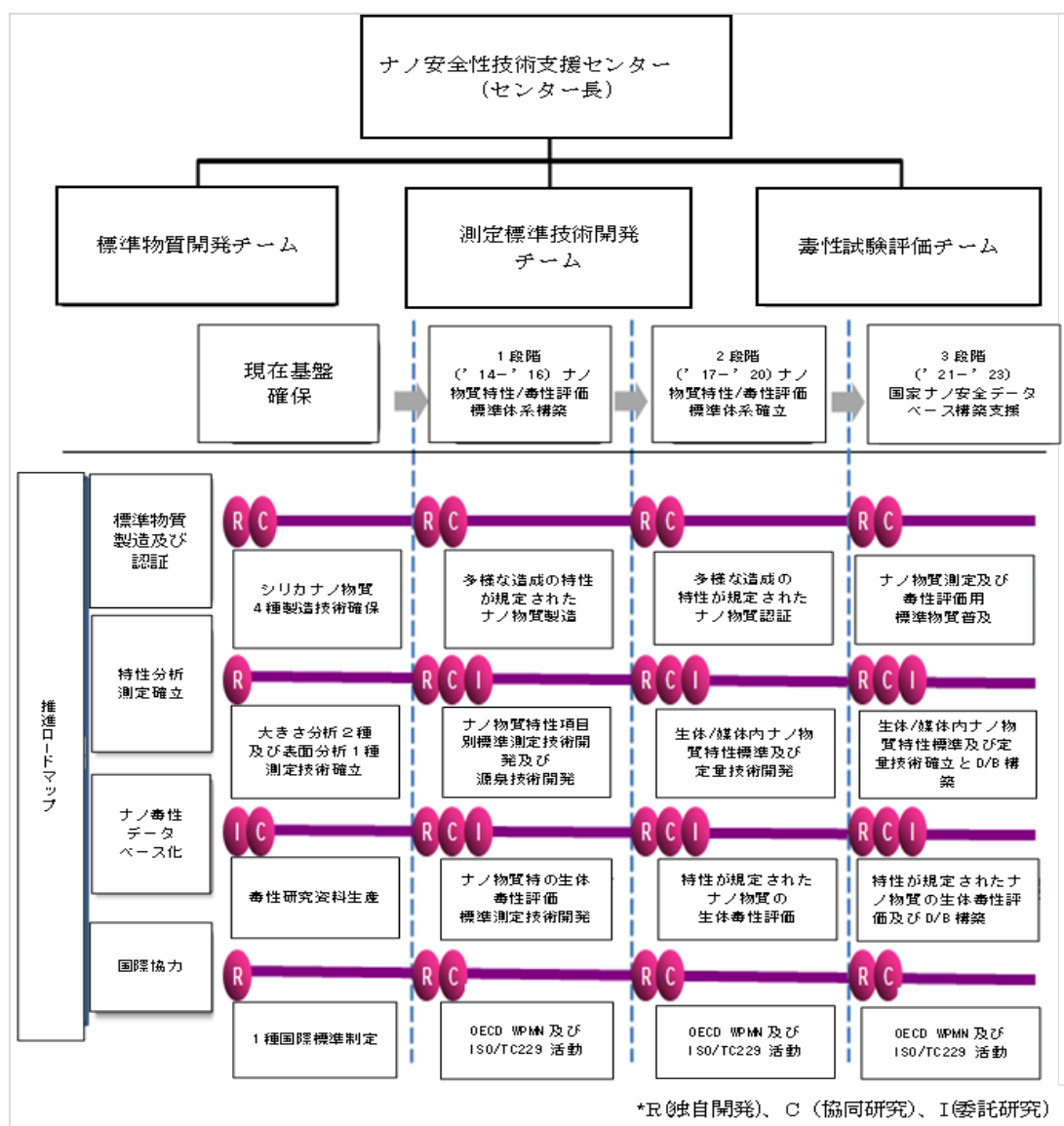


図 3-1-1 韓国「ナノ安全性技術支援センター」の推進ロードマップ

g) 中国

本年は、中国のナノ安全性規制に関する法令等の制定の動向は特になが、国内の標準規格に相当する「国家標準」についてナノ関連で新しく制定されたものがある。中国国家標準化管理委員会の下部組織である全国ナノ技術標準化技術委員会が公表した「ナノ推奨性国家標準リスト（2014 年 12 月現在）」によると 2014 年に 8 件のナノ関連の推奨性国家標準が制定された（表 3.1-4）。

表 3.1-4 2014 年に制定されたナノ関連の推奨性国家標準

No	標準番号	標準名称	引用標準番号	引用標準名称
1	GB/T 30544.1-2014	ナノテクノロジー・用語 第 1 部分：コア用語	ISO/TS 80004-1:2010	ナノテクノロジー・用語 第 1 部分：コア用語
2	GB/T 30544.5-2014	ナノテクノロジー・用語 第 5 部分：ナノ/バイオ表界面	ISO/TS 80004-5:2011	ナノテクノロジー・用語 第 5 部分：ナノ/バイオ表界面
3	GB/T 30543-2014	ナノテクノロジー・単層ナノチューブの透過型電子顕微鏡のキャラクタリゼーション方法	ISO/TS 10797:2012	ナノテクノロジー・単層ナノチューブの透過型電子顕微鏡のキャラクタリゼーション方法
4	GB/T 31225-2014	楕円偏光測定器による Si 基板表面の SiO ₂ 薄膜の厚み計測方法		
5	GB/T 31226-2014	走査型トンネル顕微鏡による気体配送システム部品表面の粗さ測定方法		
6	GB/T 31227-2014	原子間力顕微鏡によるスパッタ薄膜表面の粗さ測定方法		
7	GB/T 31228-2014	ナノ計装化押込み試験の用語		
8	GB/T 31229-2014	熱重量分析法による揮発率の試験測定方法	ASTM E2008:2008	熱重量分析法による揮発率の試験測定方法

中国国家ナノ科学センター、<http://nw.nanoctr.cas.cn/fwxyzm/index.html> より

注：「国家標準」は国家標準化管理委員会が国内の各産業分野の全国統一的な標準化業務の所管機関として制定や改定の管理を実施する。法的強制性の有無により、「強制性標準 (GB)」と「推奨性標準 (GB/T)」があり、強制性標準は必ず遵守しなければならないものとされ国の規制の一部となる。強制性標準は GB、推奨性標準は GB/T の記号が付される。強制性標準は非常に多数が制定されているが、一例として危険廃棄物分類に関する国家標準を下表に示す。これらはいずれも「強制性標準 (GB)」であり罰則等も盛り込まれている。

中国においてナノマテリアルの定義は、国家標準「GB/T19619-2004：ナノマテリアルの用語」により以下のように規定されている。

- ナノスケール：1 nm から 100nm の範囲の幾何学的寸法
- ナノ構造材料単位：ナノスケール構造の特性を有する物質単位で、安定したクラスタまたは人工原子クラスタ、ナノ結晶、ナノ粒子、ナノチューブ、ナノロッド、ナノワイヤ、単層膜及びナノポア等を含む
- ナノマテリアル：3 次元空間において少なくとも一つの次元がナノスケールでる物質またはナノ構造単位から構成され、かつ特別な性質を有する材料

上記表の No.1 「GB/T 30544.1-2014：ナノテクノロジー用語 第 1 部分 重要用語」及び No.2 「GB/T 30544.5-2014：ナノテクノロジー用語 第 5 部分 ナノ・バイオ表界面」はナ

ノ分野の用語の定義に関する推奨性国家標準として 2014 年に新たに制定（2014 年 5 月 6 日公布、2014 年 11 月 1 日実施）されたが、2004 年制定の「GB/T19619-2004：ナノマテリアルの用語」を改定して置き換えるものではない。ISO の「TS 80004-1:2010：Nanotechnologies-Vocabulary-Part 1: Core terms」及び「TS 80004-5:2011：Nanotechnologies—Vocabulary—Part 5: Nano/bio interface」の内容を引用して中国国内の標準として導入したものとなっている。

2014 年に制定されたその他のナノ関連の国家標準はいずれも計測、測量または試験方法に関するものである。

h) 国際機関

世界保健機関（WHO）の附属機関である国際がん研究機関（International Agency for Research on Cancer: IARC）の諮問グループ（21 名の科学者で構成）は 9 月 30 日から同 10 月 7 日のフランス リヨンの会議で、「IARC モノグラフ（IARC Monograph）」の第 111 巻 で取り上げるカーボンナノチューブ（CNT）などの発がん性評価を行った。CNT については、単層カーボンナノチューブ（SWCNT）と多層カーボンナノチューブ（MWCNT）の両方について、ヒトの発がん性に関する既存データが無く、ヒトにおける発がん性について判断するには証拠が不十分であったため、げっ歯類における研究や、培養されたヒトの肺細胞、中皮細胞などを使った研究結果について評価を行った。

その結果、MWCNT-7 はグループ 2B（ヒトに対する発がん性が疑われる）とし、他の MWCNT および SWCNT はグループ 3（ヒトに対する発癌性が分類できない）とした。

i) 各国・地域の規制動向まとめ

2014 年の各国・地域の主要な規制動向を一覧にして、表 3.1-5 に示す。

表 3.1-5 2014 年の各国・地域の規制動向のまとめ

国・地域	法律	更新の動き	内容等
米国	TSCA	2014/10/6 規則提案を OBM へ提出	ナノマテリアル情報提供の義務化。
	TSCA	SNUR 発行	表 3-1-3 参照
EU	食品表示規則 (1169/2011)	2014/12/13 施行	食品中に含まれるナノマテリアルを成分の後に (nano) と表示義務。
	新食品規則 (2013/0435 (COD))	EC の環境公衆衛生食品委員会で改正案採決。2015 年に本会議で審議。	ナノマテリアルの定義を粒子個数の 50% 以上を削除 (10% 以上への変更を意図)。
ベルギー	ナノ登録国王令	2014/9/24 官報で 2016/1/1 から施行を公表	上市されるナノマテリアル、ナノマテリアル混合物の登録。
デンマーク	ナノマテリアル登録制度指令	2014/6/18 施行	前年に製造したナノマテリアルを含む混合物および製品を報告する。
オランダ	食品包装と消費者製品改正	2014/4/1 施行	食品容器、包装からの意向限度を定めた。

	規則		
--	----	--	--

3.2. 主要学会等におけるナノマテリアル等の安全性、ばく露、試験法等に関する動向

(1) 第4回国際会議 NANOSAFE 2014

a) 概要

期間：2014年11月18～20日

場所：MINATEC（フランス グルノーブル）

NANOSAFE は、ナノマテリアルの安全な製造と利用に関する国際ワークショップで、2年に1度開催されている。

2014年の主要トピックは以下の12テーマであった；

セッション1：New applications of nanomaterials

セッション2：Exposure

セッション3：Detection and Characterization

セッション4：Toxicology

セッション5：Environmental interactions of nanomaterials

セッション6：Nanomaterials Release

セッション7：Industrial production and prevention

セッション8：Life Cycle Analysis

セッション9：Regulation and standardization

セッション10：Commercial equipment

セッション11：Risk Management

セッション12：Nanoresponsible Development

b) 発表内容

(a) オープニング

オープニングでは、「EU H2020 プログラムにおけるナノの安全性に関する研究方針」、「ナノマテリアルの経済活動の将来傾向と予測」、「市場で利用可能なナノ製品の現状と今後について」、「水処理膜へのナノマテリアルの利用への挑戦と戦略」、「ナノ医薬品からナノ安全性までを含めたナノ特性について」、が、それぞれ招待講演として発表が行われた。

(b) セッション2：Exposure

① Recent developments in human exposure assessment (Derk Brouwer, Netherlands)

セッション2「Exposure」のオープニングとして招待講演が行われた。人への暴露評価では、室内大気中に分散しているナノマテリアルを対象とした、局所的な管理に係る影響を評価することが必要である。人工的に製造されたナノ粒子の吸入暴露を評価するための

概念モデルについては、既に論文が発表されている。この論文で設定しているナノ粒子の供給領域は、放出メカニズムの違いを反映したものとなっている。このように放出メカニズムの違いを反映したモデルを用いた結果、放出メカニズムの違いが、放出されたエアロゾルの形態にも影響を与えるとの結果が得られ、モデルではナノマテリアルのライフサイクルに着目することが必要である、ことが示された。ナノマテリアルの供給領域の例として、粉体の取扱い時のほこりがある。粉状のナノ粒子についてのそのほこりの程度に着目した研究は、本ワークショップの中でもいくつかの講演で紹介される予定である。粉体の取扱いでは、放出の決定要因を特定することが必要となる。擬似放出レベルを、**cleaning** や **dumping, mixing** 等の粉体の取扱いに係る作業別に測定した結果がある。それによれば、体積辺りの粒子数は、**cleaning** と **harvesting** で、その濃度幅が最も広くなる、という結果となった。そのほか、擬似放出レベルを、エネルギーレベルや取扱うバルクのナノマテリアル量についても測定した。こうした実験結果をもとに、既存の2ボックスモデルを用いた性能試験を行った。その結果、粉体の取扱いなどの、特定の暴露シナリオや供給領域に対しては、既存のモデルとよく合っていた。また、分散モデルは非常によく合ったが、放出速度の予測については再現が難しかった。今後、モデルについてはさらなる改良が必要である。

② Mass vs number-based exposure assessment to nanoparticles, a comparison of a personal sampler and monitors (Faure Bertrand, France)

ナノマテリアルのサンプリング装置と、蛍光 X 線分光法による化学分析、エアロゾル粒子の実効密度の測定、数量から質量への変換、を行った結果について報告した。その結果、粒度を基に計算した質量は、ナノサンプリング装置を使ってサンプリングした質量とよく一致するとの結果が得られた。

③ Analysis and characterization of multivariate stochastic signals sampled by on-line particle analysers. Application to the quantitative assessment of exposure to NOAA in occupational scenarios (Jesus Lopez de Ipina, Spain)

本研究では、補間的な方法により、データセットを解析し、主な特徴と確率論的信号に含まれる情報を示し、抽出して、まとめ、信号の供給源を識別するために、時間・頻度領域を使った統計的なアプローチを探索することを試みた。ターゲットは NOAA とし、リスク管理には NRVs を用いた。暴露シナリオは、様々な金属粉体を混合して冷間圧縮することで、アルミニウム産業用の合金タブレット及びミニタブレットの製造時に、NOAA にナノ TiO₂ が含まれる場合を想定し、実験目的でのナノ TiO₂ タブレットの **drilling** 時に、1つのラインで実験作業を行い、その際に、並行した3つのタブレット製造ラインが連続的に稼働しているケースを暴露シナリオとして設定した。なお、実験作業には、ナノ TiO₂ (乾燥粉体) の計量 (T1)、冷間圧縮によるタブレットの製造 (T2)、タブレットの **drilling** (T3)、

タブレットの packing (T4)、の 4 工程が含まれる。サンプリング戦略は、NEAT、NANO GEM (NIOSH, Bull 64, 2011) に従った。統計解析は、SPSS (時系列スペクトル分析) と MATLAB (単一分析モジュール) を用いた。サンプリングは、作業者の呼吸ゾーン近くに測定器を固定し、固定サンプリングを行ったほか、バックグラウンドエアロゾルは、供給源から離れた場所で測定した。また、総粒子濃度と測定経路別の粒子濃度を測定した。

実験作業別に粒子濃度を測定・比較した結果、T1 よりも T2 で粒子濃度が高く、T3 と T4 では T3 のほうが粒子濃度が高く、全体としては、ピーク時の粒子濃度は T3 作業が最も高いという結果となり、packing 作業よりも drilling 作業のほうが作業者が吸入する粒子濃度が高くなるとの結果が得られた。

④ Exposure Scenario libraries as a tool for exposure assessment (Aracel Sanchez Jimenez, UK)

ナノマテリアルが適用される製品範囲が拡大し、かつ様々な用途にナノマテリアルが使用されるようになったことから、ナノマテリアルへの暴露の現状と将来的な暴露についてのシナリオの評価を効果的な方法で行っていくことが必要である。そこで、本発表では、ナノマテリアルについての利用可能な暴露シナリオライブラリの開発状況に関する報告が行われた。人工的なナノマテリアル (ENMs) の暴露評価は、ENMS に関する暴露測定データや特定の暴露モデルの不足がネックとなって未だに進んでいない。暴露ライブラリは、ENMs の暴露評価を実施する際に有用なツールであり、暴露シナリオ (ES) カタログが含まれる。ES は REACH で示される暴露シナリオに関係するものであり、ユーザは暴露情報を調査したり推定したりする際に、類似のシナリオをこうしたライブラリから探すことができる。労働者の暴露評価に関して、NANEX ES ライブラリと MARINA ES ライブラリは、それぞれ推論アプローチとして使用可能である。NANEX ES ライブラリは NANEX プロジェクトにおいて、MS ACCESS の ES データライブラリの 1 つとして開発されたもので、職業暴露に係るものが全体の 95% を占め、残りの 5% は消費者に関するものである。また、職業暴露のうち、70% については測定データが利用可能である。MS ACCESS には 54 個の職業 ES と 3 個の消費者 ES が含まれ、そのうち 40 の職業 ES には測定データも存在している。また、FP7 プロジェクトである MARINA では、1 つの ES ライブラリについて NANEX データベースを基に、さらなる開発が進められている。MARINA ライブラリの ES の特長は、ENM、ライフサイクルステージ、プロセスステップ、寄与するシナリオ、を調べることが可能である点で、様々な物質 (CNT、CeO₂、CrO₃、TiO₂、ZrO₂、ナノ銀、ナノ銅、ナノ鉄、QD) についての情報が存在し、職業暴露に関するものが 83% を占め、専門的な利用 (繊維製品、消臭剤、塗料、モーター、歯の修復材料) に関するものが 11%、消費者に係るものは 6% である。全シナリオはオンラインで利用可能である。ライブラリに占める CNT に係る ES の割合は、NANEX が 45%、MARINA が 25% である。また、NANEX と MARINA は特に吸入経路を重点的に扱っている。このライブラリは、階層的な (tiered)

暴露評価手法では、初めての階層的ツールとして利用可能なものである。Tier1 では、情報の収集とシナリオの優先順位付けにより、除外可能な放出シナリオがあるかを決定する。Tier2 では、モデル化や基本的なモニタリングの実施により、放出／暴露を確認する。Tier3 では、詳細なモニタリングを実施して、暴露の定量化を行う。暴露評価は、リスク評価あるいはリスク管理において重要な部分を占めるものであり、Tiered アプローチのような効果的な方法で行う必要がある。ES ライブラリはこうしたアプローチにおいて有効なツールとして使用できる。なお、これらのライブラリは、暴露シナリオ情報の品質面での問題や、統一された方法で測定が行われていないこと、不確実性が示されるものの、定量化されていないこと、等の欠点を含んでいる。

⑤ Towards a strategy for engineered nanomaterials exposure monitoring in the workplace: a case study (Fabio Boccuni, Italy)

人工的なナノマテリアル (ENMs) による労働者の潜在的なリスクの評価及び管理が急務となっている。ナノマテリアルへの暴露に係るリスク分析のフローは、まず有害性を特定し、その後暴露評価、リスク評価を行い、リスク管理を行った後に、便益の予測を行う、という手順である。本研究では、ナノ技術過程で発生するエアロゾル粒子の測定戦略を提案するとともに、特定のケーススタディにそうした測定戦略を適用するために、ENMs の作業環境中でのモニタリングアプローチにおいて重要な問題点等を特定することを目的とした。ケーススタディでは、作業環境中でのナノゼオライトに対する暴露モニタリングを対象とした。

まず、労働環境での ENMs による暴露モニタリングに関する科学論文のレビューを行い、作業環境中の空気中のエアロゾル粒子状物質に係る主要な戦略と測定技術の分析を行った。また、ENMs 暴露モニタリングに係る重要な点として、生産過程の分析や、測定プロトコルの定義、バックグラウンドの大気由来の粒子状物質、測定機器の選定、包括的な暴露評価、等に特に注目した。また、作業環境中での ENMs モニタリングに係る実験研究結果を、学際的研究及び多変量アプローチを用いて、4段階でまとめた：phase1) 暴露シナリオの予備的分析と情報交換、phase 2) 事前観察サイトでの定性的測定を用いた段階的説明、phase 3) プロセスに係る実験室予測に関するパイロット研究、phase 4) 作業環境での測定。階層的アプローチは、費用対効果のバランスをとるために採用した。Phase3 では、生産作業を行う場所の近くのオフィスで1週間バックグラウンド値を測定するとともに、生産作業場所で1週間現場測定を行った。また、バルクについては FegSEM と ICP-MS 及び GC-MS による個別物質の分析を行った。リアルタイム測定による結果から、生産工程ごと (cleaning、pouring、process) に、暴露する粒子濃度に違いが生じること、ある粒子サイズに着目して、バックグラウンドの粒子濃度と比較することで、作業により発生する粒子サイズを特定することができた。また、FegSEM による分析では、Si、O₂、C の粒子や凝集体に近づくと、EDX シグナルが増加した。今後は、凝集体の挙動の評価や、データ処理過程を完全なもの

とすること、異なる室内環境での測定を繰り返し実施すること、サンプリングした物質に関する毒性研究を進める必要がある。

(c) セッション 3 : Detection and Characterization

① Measurement of Air/Liquid/Surface-borne Nanoparticles in Support of sustainable Nanotechnology (David Y. H. Pui, USA)

持続可能なナノ技術と、環境保護及び安全性に関するナノ粒子研究 (Nano-EHS) 、大気由来ナノ粒子と液体由来ナノ粒子、地表由来のナノ粒子の測定とろ過について報告した。持続可能なナノ技術については、作業環境中でのナノ粒子による作業者の健康と安全性や、人工的に生成されたナノ粒子の環境や生活系での関わりに関する問題があるほか、ナノ製品を消費者が受け入れるかどうかは、環境、健康、安全性に関する研究結果に依存するものである。そのため、政府機関は、こうした NanoEHS に関する知見を増やしている。持続可能なナノ技術には、暴露と毒性、物理化学的特性、ろ過 (フィルター) による軽減、の3つの側面について、Nano-EHS を進めることが必要である。CNT に関しては、サイズ分布や吸入暴露時の分散影響があり、NIOSH では、CNTs と CNFs の暴露限度 $1\mu\text{g}/\text{m}^3$ を推奨しており、カーボンブラックの暴露限度 $3.5\text{mg}/\text{m}^3$ に比べると非常に低い濃度に設定されている。その結果、多くの企業では、CNTs の製造能力が数百トンレベルにまで到達したにもかかわらず、CNTs の製造を中止することした。

ナノ粒子のろ過と測定については、ナノマテリアルの形態 (球体、凝集体、MWCNT (繊維状)) により、移動可能な径に違いがあり、移動可能な径は、球体 < 凝集体 < MWCNT の順に大きくなる。Baytubes (Germany) と Timesnano (China) の2つの MWCNTs について、フィルターを通過する割合を銀ナノ粒子を用いて測定した。使用したフィルターサイズは、 $1\mu\text{m}$ と $3\mu\text{m}$ で、それぞれフィルターに当てる前面風速を $2\text{cm}/\text{s}$ と $5\text{cm}/\text{s}$ の2つの条件について行った。結果は、前面風速が大きいほうが、移動可能な径は大きくなるが、フィルターサイズの関係では、移動可能な径とその効率の関係は、フィルターサイズが小さい場合には、ある一定以上の粒子径では、効率が急激に低下し、フィルターを通過可能な粒子割合が急激に少なくなるのに対して、フィルターサイズが大きい場合には、粒子径の増加によりフィルターを通過する割合は一定割合で減少する、という関係がみられた。また、 50nm の金粒子と 150nm の SiO_2 を 50nm と 100nm の W-L Gore membrane フィルターにそれぞれ流したところ、 50nm の金粒子は 50nm の W-L Gore フィルターを高効率で通過したのに対して、 150nm の SiO_2 は 100nm の W-L Gore フィルターをほとんど通過しなかった。これは、細孔閉塞効果によるものである。そのほか、粒子の捕獲については、帯電効果も影響し、フィルターの種類によって、フィルター表面の相対的な表面電位が異なる。また、フィルター構造も粒子の捕獲には影響し、従来のフィルター構造はフィルター表面で粒子を捕獲するのではなく、フィルター内部で粒子を捕獲する構造となっていることから、ナノ粒子の捕獲には効果が低い。したがって、フィルター表面で捕獲で

きるような薄膜構造であれば、ナノ粒子を高い効率で捕獲することができる。このように、持続可能なナノ技術にとって、フィルターに係る研究は重要であり、環境やエネルギー、輸送や半導体、健康ケア等の様々な産業に影響を与えるものとなる。

② Towards an indicator of nanomaterial deposition in the human lung (Dimitrios Bitounis, France)

人工ナノ粒子の肺への蓄積が間質性肺疾患の原因となる可能性があることから、本研究では、間質性肺疾患の症状を示す 100 人の患者を対象として、病態に対する気管支洗浄により、ナノ粒子の全質量、サイズ、形態の関係を説明することを最終的な目的として、気道から回収したサンプル中のナノ粒子の抽出と分析を効果的に行う方法の開発を行った。ナノ粒子の抽出は、グリセロールスペースのクッションを試験管の底部分にいれ、その上に、一定量の気管支洗浄により得られたサンプルを入れた後、遠心分離を行って、上澄みと沈殿物に分離した。この上澄みと沈殿物について、UV、DLS（動的光散乱法）、ICP-OES（公衆半誘導結合プラズマ発光分析）、TEM による分析をそれぞれ行った。ICP-OES による測定から、上澄み中の質量は、溶存している金属の種類と一致するのに対して、抽出分の質量は、粒子として存在する金属の種類と一致することがわかった。DLS による測定では、上澄みと抽出物による光の散乱は、粒子物質の性質と存在を示すものであり、抽出物の測定結果は粒子の存在量が多種多様であることを示した。データ分析により、肺にナノ粒子が運ばれる可能性があることが示された。発表では、11 人分の結果が公表された。今後は、100 人の患者の結果を統計解析する予定である。

③ Identification of Carbon Nanotubes by Thermal-Optical Analysis (Bertrand Faure, France)

大気由来 CNT への暴露評価を、熱重量分析 (TGV) により行った。評価には、様々な方法があるが、多くの国で採用されているのは、質量ベースでの職業暴露値である。測定に用いた試料は、5 個の単層 CNT 粉体と、2 個の多層 CNT 粉体と、カーボンブラック (Vulcan XC72R)、すす粒子、とした。純酸素下での TGV による質量変化の割合（酸化温度）がピークを示したのは、SWCNT では 500 ℃ 以下、MWCNT では約 600℃、カーボンブラックは 600℃ 超（約 650℃）であり、SWCNT では、表面を機能化した材料のほうが、ピークを示す温度は高くなった。また、SWCNT の酸化温度は狭い範囲に鋭いピークを示した。3 物質について熱安定性は、カーボンブラック > MWCNT > SWCNT、であることを示した。また、20 分間、930℃ まで段階的に温度を上昇させ、様々な径の CNT を対象に、酸化温度をさらに詳しく調べたところ、熱安定性は、管の径とともに増加すること、MWCNT とすすは熱変遷に関して似たようなプロファイルを示した。また、MWCNT は OC/EC 分析だけでは、他の炭素と区別することはできなかった。バックグラウンド粒子の触媒作用については、酸洗浄により残留合成触媒を除去すると、CNT の熱的安定性が向上し、バックグラ

ンド粒子が存在することで、CNT の酸化温度が低下することが判明した。また、OC/EC 分析（有機炭素／元素状炭素）では、質量により EC を定量することができたが、CNT の測定については、温度の分解能が低く、バックグラウンド粒子（Fe）により酸化温度が低下することから困難であった。

（d） セッション 4 : Toxicology

① Nanoparticle Toxicology: A critical appraisal of hazard and risk characterization (Gunter Oberdorster, USA)

人工ナノ粒子（NPs）のリスク評価及びリスク管理のパラダイムは、有害性の特定、暴露評価、リスク管理、有害性の特徴づけ、リスクの特徴付け、の 5 つのプロセスからなり、これら 5 つのプロセス全体に係るものとしてリスクコミュニケーションがある。潜在的な有害性に影響を与える物理化学的な NP の特性は、サイズ、サイズ分布、形態、凝集、密度、表面特性（面積、電荷、反応性、化学（コーティング、混合物）、欠陥）、溶解性、結晶化度、生物的汚染物質（内毒素、等）、であり、生成の方法や処理過程、貯蔵の方法や、生理学的媒体や生物中への導入時、またライフサイクルを通じて、こうした特性は変化する。これらにおいて重要なパラメータは dose である。結晶性 SiO_2 とアモルファス SiO_2 、 ZnO_2 のナノ粒子と細粒の毒性を *in vitro* と *in vivo* により調べた結果からは、*in vitro* と *in vivo* 間での相関はほとんどないとの結果が得られたが、それぞれの結果を表面積当たりの値として算出し、4 つの物質（結晶性 SiO_2 、アモルファス SiO_2 、ナノ ZnO_2 、細粒 ZnO_2 ）の *in vivo* と *in vitro* の値をプロットすると、1 次相関がみられることが報告されており、NP の有害性には、表面積や存在形態、サイズ等の物理化学的な特性が影響を与えることが明らかとなっている。

② The impact of SiC and TiC nanomaterials in a rat model (Omar Lozano, Belgium)

SiC と TiC は、鉱業や石油産業等、工業規模で広範囲に使用されていることから、これらのナノマテリアルによる、肺内投与と経口投与による影響を調べた。肺内投与では、急性の気管内注入と全身暴露による急性吸入を行った。また、経口投与では、急性投与と亜急性投与を行った。実験に用いた粒子の平均径は、SiC が 31nm、TiC が 25nm であった。気管内注入量は、0.5mg または 5 mg とした。そのほか、WC-Co（タングステンカーバイド-コバルト合金）を 5mg 注入した実験も行い、それぞれ NaCl の場合と比較した。タンパク質分解酵素濃度、LDH 活性、細胞総数、細胞中のマクロファージ数、細胞中の好中球数は、SiC 5 mg > 0.5mg、用量が同じ場合には、SiC > TiC となり、ナノ粒子を注入することで、遺伝毒性影響がみられた。SiC と TiC の生体内での持続性については、TiC が SiC の約 2 倍であるとの結果となった。全身暴露実験では、SiC を使って、急性暴露条件としては、2.5 粒子/cm³ で 6 時間、メスのラットに暴露した。マクロファージ数は SiC の暴露後 24 時間で 0 時間及び 72 時間後よりも少なくなり、好中球数は 24 時間後に炎症を示した。

肺への暴露結果から、肺経路での SiC の急性暴露に対する炎症反応は、気管支内注入と全身暴露のどちらについても、限定的であることがわかった。経口投与試験では、メスのラットを用いて、SiC あるいは TiC の 50mg/kg 濃度に、急性については 1 日投与、亜急性については 28 日間投与試験を行った。急性投与では、SiC のほうが、TiC に比べて統計的に優位な変化を示した。TiC の急性投与では、排泄により投与した用量がほぼ 1 日で完全に除去されていたのに対して、SiC の除去割合は 65%であることがわかった。また、亜急性投与試験で排泄物中のナノマテリアル量を調べたところ、亜急性投与により、排泄物中にナノマテリアルが濃縮されるほか、Ca や P、Mg 等の無機物質の放出量が増加した。

③ Organ weight changes in mice after long-term inhalation exposure to manganese oxides nanoparticles (Tomas Zeman, Czech Republic)

本研究の目的は、臓器の重量に対して、吸入による酸化マンガンナノ粒子の影響を評価することである。この目的により、実験用成体マウスを使って、照度、温度、相対湿度、圧力を制御した環境下で、長期吸入実験を行った。

マンガン酸化物 ($\text{MnO} \cdot \text{Mn}_2\text{O}_3$) ナノ粒子 (MnONPs) を、酸素体積濃度 30%、温度 750 °C (垂直位置) の条件で、流通管反応器内の有機金属前駆体であるマンガン(II)アセチルアセトネートの熱分解を利用して、ホットウォール流通管反応器内でエアロゾル経路を介して連続的に合成した。反応器出口での生成された MnONPs の濃度の範囲は、 $1 \sim 3 \times 10^7$ 個/ cm^3 で、生成されたナノ粒子 $\text{MnO} \cdot \text{Mn}_2\text{O}_3$ のサイズ範囲は、7~50 nm であった。吸入チャンバーに入れる前に、3 L/分の総流量で N_2 、 O_2 及び空気との混合物中の MnONPs をさらに、60L/min 以上の流量でろ過した加湿空気を用いて 21°C の温度下で希釈した結果、MnONPs の濃度は、 $5 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$ 個/ cm^3 となった。マウスの実験群は、17 週間 MnONPs に暴露した。一定期間ごとに何匹かのマウスを取り出し、解剖して、それらの内部器官(脳、肺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、膵臓、睾丸、胸腺)の重量を測定した。

Mn の濃度と Mn 重量は、脳、肺、睾丸、胸腺では、暴露条件のほうが、対照条件に比べて高濃度の結果が得られた。それに対して、肝臓、腎臓、脾臓の臓器重量は対照条件のほうが暴露条件よりも重いという結果となった。以上より、吸入されたナノ粒子は、内部臓器の重さに影響を与えること、臓器の種類により重量変化もそれぞれ異なることがわかった。このことから、与える食物量を減らすことで、神経系に対する損失を減らすことができるのか、を今後研究する必要がある。

④ Interlab study on nanotoxicology of representative grapheme oxide (Nelson Durán, Brazil)

グラフェン酸化物についての溶血アッセイでは、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ までは完全に溶血性を示さなかった。異なる生媒質中でのグラフェン酸化物のコロイド安定性を、毒物アッセイを使って調べた結果、細胞培養が異なれば、それぞれ設定時間が異なることがわかった。また、

標準的な細胞培養では、結腸直腸がん細胞、マウス胎児繊維芽細胞、慢性骨髄性白血病細胞（K562）、Lewis肺癌細胞、急性骨髄性白血病細胞（Jurkat）については、グラフェン酸化物が 100 μ g/ml まで細胞毒性は示さなかった。ヒトケラチノサイト、慢性骨髄性白血病細胞（Lucena）、急性骨髄性白血病細胞（Kasumi-1）、チャイニーズハムスター卵巣細胞は、50 μ g/ml まで細胞毒性を示さなかった。また、急性骨髄性白血病細胞（KG-1）、乳がん細胞、ヒト単核白血病リンパ腫細胞、ヒトリンパ球については、20 μ g/ml まで細胞毒性を示さなかった。コメットアッセイでは、グラフェン酸化物を、様々な濃度のケースを対象としたが、どのケースにおいても、1 時間後には、わずかな DNA 損傷を示した。ただし、チャイニーズハムスター卵巣細胞は例外で、明らかな DNA 損傷を示したが、50 μ g/ml までは生存が維持され、最大 100 μ g/ml で 70%の生存が阻害されたことから、細胞死を伴わずに DNA 修復が行われている可能性が考えられた。そのほか、細胞毒性は、アッセイの方法に依存すること、リンパ球、Kasumi-1（急性骨髄性白血病細胞）、K562（慢性骨髄性白血病細胞）の細胞死は、アポトーシスによって起こること、3T3（マウス胎児繊維芽細胞）と CHO（チャイニーズハムスター卵巣細胞）の細胞死は壊死によって起こること、が示された。なお、14 の培養細胞と、リンパ球については、グラフェン酸化物が 50 μ g/ml までは、毒性を示さなかったが、その他の細胞については、100 μ g/ml まで毒性は示されなかった。生態毒性に関する試験では、ミジンコ急性毒性試験（48 時間）では、100 μ g/ml までは毒性影響が現れなかった。ヒドラに対するグラフェン酸化物の影響に関する試験では、100 μ g/mL への暴露条件の際に、72 時間にヒドラの死亡と崩壊が観察された。線虫のシノハラブディス・エレガンス（*Caenorhabditis elegans*）を使った試験では、L4 stage では 72 時間の慢性毒性試験の結果、最大で 100 μ g/ml まで毒性影響が示されず、同様に L1 stage で 72 時間の慢性毒性試験においても、最大で 100 μ g/ml まで毒性影響が見られなかった。淡水エビに対する急性生態毒性試験では、24 時間暴露で 3.0 μ g/ml までは急性生態毒性が確認されず、酸素消費による影響とアンモニア排泄による影響は、1.0 μ g/ml まで確認されなかった。生態毒性試験の結果から、グラフェン酸化物は、in vitro あるいは in vivo アッセイで、ヒドラを使った 96 時間の試験を除くと、毒性影響を示さない、との結果が得られた。In vivo 毒性試験で、Fischer 344 ラットを用いたところ、コントロール条件に対してグラフェン酸化物を注入した場合には全て生存したが、N-メチル-N-ニトロソウレアで前処理した後、前立腺がんのグループにグラフェン酸化物を与えた場合と与えなかった場合の生存率を調べたところ、グラフェン酸化物を与えない場合には生存率 0%であったのに対して、グラフェン酸化物を与えた場合は生存率は 60%以上となり、グラフェン酸化物は、臨床研究においては、がん治療に適したナノマテリアルであると考えられた。

⑤ Assessment of the oxidative potential of nanoparticles: Comparison and Improvement of methods (Mathilde Delaval, France)

活性酸素種 (ROS) により誘導される酸化ストレスは、ナノ粒子 (NPs) によって誘導される生物学的応答において重要な役割を果たす。しかし、NPs の本質的な細胞酸化能の特徴づけを行うためには、現在の方法を改善することが必要であり、毒性に関して NPs の分類を行うために NPs の迅速なスクリーニングを可能とするハイスループットアッセイを開発することが求められている。そこで、NPs の酸化能を評価する無細胞手法を改善し、シトクロム c 酸化アッセイと、DTT 枯渇アッセイを比較することと、NPs の酸化能と細胞酸化ストレス反応との関係性を評価することを目的とした。実験に用いたナノ粒子は、 Mn_2O_3 、 BaSO_4 、 CeO_2 、 TiO_2 、とした。シトクロム c 酸化アッセイは、シトクロム c の吸収波長の形状を基に新たな分析手法を開発した。また、バッファー中の CeO_2 と TiO_2 は強濁度を示したことから、こうした干渉を説明できるような手法への改良を行った。その結果、シトクロム c アッセイは、NP の干渉を扱うのに適した試験法であること、DTT アッセイとシトクロム c アッセイは、同様の順位付けが可能であったが、シトクロム c アッセイは、動態研究に係るハイスループット試験に適していること、 Mn_2O_3 ナノ粒子は、同じ条件での CeO_2 、 TiO_2 、 BaSO_4 とは異なり酸化能が高いこと、が示された。また、 Mn_2O_3 ナノ粒子は、高いサイトカイン放出を誘導し、気管支上皮細胞で著しい抗酸化防御を導いた。こうした本質的な酸化剤生成能が低いにもかかわらず、 CeO_2 ナノ粒子や TiO_2 ナノ粒子は、気管支上皮細胞における抗酸化防御及び、あるいは炎症反応を誘発した。

⑥ Nanomaterials solubility/biodurability and reactivity in synthetic biological fluids and cell media (Keld Alstrub Jensen, Denmark)

ナノマテリアルとメディア、細胞、毒性メカニズムの影響との間の相互作用には、実験時の潜在的な影響などの生体分子との影響や、電荷や pH の潜在的な変化によるプロトン化／脱プロトン化、電子の遊離により ROS や呼吸影響を引き起こすなどの酸化還元反応、pH や Eh の潜在的な変化や元素としての毒性を引き起こす物質の溶解、予期せぬ毒性影響を生じる可能性のある溶存物質の再沈殿、などがある。溶解度は、生体構成要素（マクロファージリソソーム、肺外部細胞、・・・）により異なることが報告されている。そこで、試験法の開発と、生体構成要素（肺粘膜、マクロファージ細胞、等）や *in vitro* 細胞アッセイ（長期目標としては、熱力学モデルに入力するデータを集めるため）において急性の水理化学的反応の理解を強化するために、3つのアプローチを用いて実験を行った。1つ目は、一般的に利用できる pH センサーと O_2 センサーディッシュリーダー (pH and O_2 Sensor Dish Reader; SDR) を用いた水理化学的反応性と溶解のスクリーニングで、肺粘膜を用いた *in vitro* 試験を、pH と Eh を変化させて行った。2つ目は、オンラインで Eh をモニタリングしつつ大気、温度、pH を制御した自作のバッチ式の攪拌型リアクター (ATempH SBR) を用いた反応性と NM の溶解についての高精度で制御した解析で、ファゴリソソーム条件

で実施した。3つ目は、GeoChemist Workbench などを用いた反応モデル、である。SDR システムを用いた試験では、細胞培地と Gambles 溶液である合成肺粘液中での NMs (ナノマテリアル) の pH と O₂ の反応性を調べたところ、Gambles 溶液に NMs を添加した条件ではある一定時間後に pH の上昇が確認され、タルベッコ培地では、O₂ の上昇が確認された。また、24 時間の溶解量 (ZnO) は、Nanopure water で最も高く、タルベッコ培地で最も低い結果となった。この結果から、ZnO の変質に O₂ の反応性が関係しているものと考えられた。ATempH SBR を用いたファゴリソソーム流体に対する反応性と生物耐久性試験では、Gambles 溶液とファゴリソソーム流体中でのナノマテリアルの溶解性を比較すると、肺間質液とファゴリソソームにそれぞれ対応する培地でのナノマテリアルの溶解度が大きく異なり、肺間質液よりもファゴリソソームでの溶解度が高いとの結果が得られた。このことは、不溶性のナノマテリアルが、低溶解性のナノマテリアルに変化することを示唆している。

⑦ Easy to digest? A comprehensive in vitro approach to monitor the fate of orally ingested nanoparticles (Patrick Knappe, Germany)

複合培地中のナノ粒子の物理化学的パラメータを決定することは、生理的条件などのナノ特有の効果を割り当てるためには重要な課題である。摂取したナノ粒子がどのように人の腸系の生理的環境による影響を受けるのかを監視するために、in vitro アプローチにより、口、胃、腸の特定環境を模擬した実験を行った。実験は、フラスコ中に、水とナノ粒子を入れ、唾液、胃液、腸液を添加することで、擬似的環境を作成した。実験手順は、ドイツ DIN 19738 を参考に、汚染された土壌から有機及び無機形態の汚染物質の吸収利用に対応するようにして、BAM でのナノマテリアルの調査に適合させた。さらに、プロセス中のナノ粒子の安定性について、スキムミルク、オリーブオイル、トウモロコシデンプン中のタンパク質として3つの代表的な栄養素の影響を観察した。実験には、十分に特徴付けられたレファレンスである銀ナノ粒子を用いた。これらの銀ナノ粒子は、小角度 X 線散乱 (Small-Angle X-ray Scattering、SAXS) により、すべての段階の消化プロセス全体で詳細な観察を行った。pH に対する応答が期待されたが、実験結果は、物理化学的効果のほうが強いとの結果となった。また、ナノ粒子の凝集化が水だけのときには確認されなかったのに対して、食物を添加することで確認された。なお、銀ナノ粒子は凝集体を形成したが、その際には、ナノ粒子の形態は保持されたままであった。

⑧ Study of lung lining fluid interactions with nanoparticles: Towards more relevant in vitro toxicity tests (Fanny Mousseau, France)

肺胞は、肺においてガス交換を行う場所で、肺胞は、吸入した粒子が、始めに肺の粘液と接触する。肺粘液は、第一リン脂質小胞と proteins¹ で構成される。その結果、肺胞細胞は、粒子と接触するだけでなく、タンパク質コロナに囲まれた粒子あるいは粒子小胞複

合体と接触しているようなものである。そこで、吸入したナノ粒子が肺に移動し、肺粘液に取り込まれた後、肺上皮細胞を介して血液に移動していく間に、各過程で何が起きているのかを理解するために、吸入後に血流で血管に運ばれていく経路を段階的に研究した。肺粘液に関するモデルでは、*curosurf*（薬）とリン脂質混合物（DPPC/PG/POPC）を用いた。実験に用いた粒子サイズ径は 50nm で、実験に用いたナノマテリアルは、シリカ（正と負にそれぞれ帯電したもの）、 Al_2O_3 、 TiO_2 、表面を機能化したラテックス、とした。細胞は、A549（ヒト肺胞基底上皮腺がん細胞）を用いた。光散乱実験により相互作用の定量化を行ったところ、－に帯電したシリカでは相互作用は観察されなかったが、＋に帯電したシリカでは弱い相互作用が、また、＋に帯電したアルミニウムでは、強い相互作用がそれぞれ、肺粘液とナノ粒子がほぼ同量で混合しているときに観察され、負の相互作用は観察されなかった。これは、＋に帯電したナノ粒子が肺粘液同士をつなぐように存在することにより、散乱強度を高めていることを示しており、肺粘液とナノ粒子が同程度で存在するほど、肺粘液とナノ粒子が結合している割合が高くなるためである。実験から、相互作用強度は、 Al ＞ラテックス＞シリカ（＋）＞シリカ（－）、となった。各粒子の表面積辺りの電荷は、 Al ＞ラテックス＞シリカ（＋）＞シリカ（－）であった。これらの結果から、＋に帯電した粒子の場合は、ナノ粒子の電荷が増えると、相互作用も強くなるのに対して、－に帯電した粒子の場合は、相互作用はない、ということがわかった。つまり、相互作用は、静電力によって駆動されるようにみえた。また、－に帯電した粒子に対しては、タンパク質の存在（リン脂質混合物）下での特定の相互作用はみられなかった。

⑨ Cerium dioxide nanoparticles affect in vitro fertilization in mice (Lise Preaubert, France)

ナノマテリアルの触媒特性により、二酸化セリウム粒子（ CeO_2NP ）が、ディーゼル添加剤としてだけでなく、がん腫学における有望な治療として広範囲で使用されているが、現在、 CeO_2NP の毒性に関して利用可能なデータは不足しており、生殖毒性に関するデータは全くない。そこで、マウスの精子における CeO_2NP の遺伝毒性と、ネズミ科の体外受精（in vitro fertilization、IVF）に対して起こる可能性のある影響について調査することを目的として、0.01mg/L の CeO_2 ナノ粒子を用いて実験を行った。マウス精子に対するコメントアッセイにより、1 時間 in vitro での培養を行った。実験では、ネガティブコントロールに HTF-BSA を、ポジティブコントロールに 110 μM の H_2O_2 を用い、 CeO_2NP を含む培養培地と含まない培養培地について、メスの過剰排卵と新鮮な精子を収集した後、マウスの体外受精を行った。37℃で 5 時間、 CO_2 濃度 5% の条件で、受精率を測定した。DNA 損傷に係る Mean % Tail DNA は、ネガティブコントロール＜0.01mg/L ナノ粒子の上澄み＜0.01mg/L ナノ粒子＜ポジティブコントロール、であった。受精率は、ナノ粒子上澄みで最も高く（68.7%）、次にコントロールの 68.05%で、 CeO_2 ナノ粒子では 55.1%となり、 CeO_2 ナノ粒子に暴露した卵母細胞の受精率が統計的に優位な減少を示した。 CeO_2 ナノ粒子への

暴露による卵母細胞の受精率の低下の原因としては、配偶子における遺伝毒性と、メカニズムによる影響、酸化ストレス、の3つの可能性が考えられ、メカニズムによる影響は、卵母細胞の透明帯や精子膜に沿ってナノ粒子が蓄積することにより、配偶子相互作用が破壊されたものと考えられた。なお、*in vitro* 試験には限界があることから、*in vivo* での試験が重要である。

⑩ Titanium dioxide nanoparticles toxicology: Towards more physiological *in vitro* exposure models? (Lucie Armand, France)

これまでほとんどの研究では、細胞が高濃度の NPs 懸濁液に暴露するモデルを用いて、*in vitro* での TiO₂-NPs (二酸化チタンナノ粒子) の吸入による遺伝毒性の調査に取り組んできた。こうしたモデルの妥当性については、①吸入時に肺細胞が NPs の液体懸濁物よりも NPs のエアロゾルに暴露すること、②暴露用量は、最悪ケースの暴露シナリオであっても、それよりもずっと高い用量を使って実験していること、から、問題があると考えられる。そこで、古典的な暴露設定で得られたこれまでのデータに基づき、より関連性の高い暴露条件で TiO₂ の NPs による遺伝毒性を評価することを目的とした。実験には、A549 細胞株 (肺胞上皮細胞) を用い、1~50µg/mL の TiO₂ ナノ粒子に最大で2ヶ月間暴露する面性暴露モデルを用いた。TEM 画像から、2ヵ月後にナノ粒子の吸収が確認されたが、細胞毒性については TiO₂ ナノ粒子の暴露濃度によらず、確認されなかった。ROS (活性酸素) の生成は、TiO₂ ナノ粒子濃度が高くなると増加し、酸化ストレスがナノ粒子濃度に対応して増加するとの結果が得られた。DNA 損傷に関するアルキルコメットアッセイでの %DNA tail は、時間及び用量依存的に増加し、fpg コメットアッセイでの %DNA tail は、アルキルコメットアッセイに比べてさらにはっきりと、時間及び用量依存性を示した。53BP1 巢の測定により DNA 2本鎖切断について測定したところ、暴露量が1 µg/ml 超で、1ヵ月後の結果は、用量とともに53BP1 巢が増加し、DNA 2本鎖の切断が起こっていることを示した。また、2ヶ月間 TiO₂ に暴露した細胞についてタンパク質への影響を調べたところ、6つのタンパク質で細胞内移動を、5つのタンパク質で細胞代謝を示し、2つのタンパク質 (タンパク質セリン/トレオニンホスファターゼ 5、セリン/トレオニンケナーゼレセプター関連タンパク質) で DNA 損傷を発現した。また、p53 タンパク質のアセチル化がコントロールと比較して増加した。p53 タンパク質のアセチル化は p21 の活性化につながり、G1 phase の細胞周期の停止につながる。細胞周期解析では、G1 phase 細胞でコントロールと比較して、% cells が増加し、S phase 細胞では減少したことから、細胞周期が G1 phase で減速することがわかった。また、細胞増殖については、TiO₂ の暴露濃度によらず、暴露した細胞全てについて、コントロールに対して、BrdU 細胞の合成が減少したことから、細胞増殖が低下することがわかった。これらをまとめると、TiO₂ ナノ粒子は、慢性暴露により、細胞毒性は示さないが、酸化ストレスを与え、DNA の1本鎖及び2本鎖を切断するほか、p53 タンパク質の活性化することで細胞周期及び細胞増殖に損傷を与えた。また、用量依存影

響は、特定の用量よりも高くなると出現し始め、時間依存影響は、特定の時間より後で現れるようにみえた。あらゆる影響が観察された用量は、10 μ g/ml と 50 μ g/ml であったが、影響は 1 μ g/ml から現れ始めた。

⑪ How do oxide carbide ENM dispersions evolve in an in vitro assessment? (Omar Lozano, Belgium)

人工的なナノマテリアル (ENMs) が in vitro 試験用に調整する方法が毒性結果に影響することが示されている。そこで、in vitro アッセイを、MEM で培養された A549 細胞と Epilife で培養された N-hTERT ケラチノサイトを用いて、培養時間 6~72 時間で、20 μ g/ml 濃度で行い、酸化物として SiO₂ と TiO₂ のナノマテリアルを、炭化物としては SiC と TiC のナノマテリアルをそれぞれ用い、生体反応を調べた。MEM 培地中の A549 細胞における SiO₂ と TiO₂ の粒子状物質の割合は、培養時間に対して、TiO₂ はほぼ一定で変化しなかったが、SiO₂ は培養初期に増加し、その後一定となった。Epilife 培地の N-hTERT ケラチノサイトでは、粒子状の SiO₂ は培養初期に増加し、その後一定期間は一定であったが、培養後半で再び増加したが、TiO₂ は培養時間に対してほぼ一定であった。遠心分離により沈殿した割合は、2つの細胞で異なる結果となった。以上をまとめると、ENMs の沈殿は、特に多孔質粒子において、培地による影響を受けること、細胞培養培地に含まれる物質が、沈降過程で重要な役割を担っていること、が示された。

⑫ Characterization of the oxidative potential of nanomaterials (Leticia A. Santiago, France)

毒物学的研究から、製造されたナノマテリアル (NMN) と、そうした物質の生物及び環境との反応の総合的な知見が、ナノマテリアルによる副作用を決定するのに必要であることが示されている。サイズ、表面特性および反応性酸素種 (ROS) を形成する能力のような特定の特性は、NMN への暴露による有害な結果を予測するための有望な測定基準になりうる。NanOxiMet プロジェクトの目的は、NMN の病原性を予測する有効なツールとして使用するために、物理化学的特性の解析と in vitro 試験の組合せにより NMN を分類することである。そこで、様々なナノ粒子を対象に研究を行った。暴露は吸入により行い、NCI-H292 細胞、ヒト気管支上皮細胞株、マクロファージに分化させた THP-1 細胞に対する影響を調べた。ナノ粒子は、金属酸化物 (TiO₂ (アナターセ)、TiO₂ (ルチル)、Fe₂O₃、Al₂O₃、CeO₂、BaSO₄、ZnO) と金属 (Cu、Ag、Au、Ni)、炭素質 (カーボンブラック) とした。細胞生存率に関する試験では、ZnO と Cu に暴露した細胞で、高い細胞毒性が観察され、その他の NMN への暴露による細胞毒性は、それほど顕著ではなかった。NMN 懸濁液の本来のオキシダント生成能は、16~256 μ g/mL の NMN を用いて、37 $^{\circ}$ C 4 時間、培養することで、200 μ M の尿酸 (UA)、アスコルビン酸 (AA)、グルタチオン (GSH) からなる合成気道被覆液の抗酸化物質の消費により測定した。HPLC 定量では、Cu を用い

た培養で、同じ抗酸化物質の部分的な消費により誘導される GHS と Printex 90 に加えて、AA が完全に枯渇する、という結果を示した。また、同じ粒子が、ジチオスレイトール (DTT) の酸化も示した。バクテリオファージ ϕ X174 の DNA 鎖切断は、Cu の MNM で誘導されたのに対して、他の粒子については、 H_2O_2 ($\text{ZnO} > \text{TiO}_2 \text{ NM104} > \text{Fe}_2\text{O}_3$) の存在した場合のみに DNA の損傷が明らかであった。このことは、ROS を生成するフェントン反応で説明できる。得られた結果から、ZnO ナノ粒子の細胞毒性は、酸化能の増加に関係したものではなく、Cu ナノ粒子が、高い反応性を持っていて、おそらく Cu ナノ粒子の細胞毒性の発症機序である、ということを示している。

⑬ The influence of size, time and dose the translocation of gold nanoparticles across mouse and human alveolar epithelial cell monolayers (Gerald Bachler, Switzerland)

ナノ粒子 (NPs) の吸入は、人への暴露に係る最も重要な経路の 1 つであると考えられている。そのため、多くの研究が、肺細胞と可能な細胞応答による NP の取込みメカニズムに注目して行われている。しかし、これまで、空気-血液境界を通じた NPs の転位の動力学についてはほとんど分かっていない。そこで、本研究では、NPs の転位動力学と種間差を決定するために、人およびマウスの肺胞上皮細胞単層に、NPs のサイズと用量を変えて、気液界面 (ALI) で暴露した。また、利用可能な *in vivo* データと、得られた転位割合を比較するために、我々が最近、生理学に基づくモデルとして公表した、NPs についての薬物動態学的 (PBPK) モデルを用いた。実験は、大気-液体インターフェイス細胞暴露システム (ALICE システム) を用いた。また、金ナノ粒子を用いた。実験では、A549 (ヒト肺胞 II 型、58 歳男性) と MLE-12 (マウス肺胞 II 型、メス 5 ヶ月齢マウス) 細胞単層を用いて、それらを多孔質膜 ($3\text{ }\mu\text{m}$ の孔サイズ) 上で 7 日間と、水中条件下で 3.5 日間、粒子への暴露前に ALI で 1 日間、それぞれ培養した。細胞は、空気-液体界面細胞暴露系 (the air-liquid interface cell exposure system, ALICE) を用いて、クエン酸で被覆した金 NPs、またはイオン金溶液の、異なる用量 (25、50、100、150、200 ng/cm^2) とサイズ (2、7、17、46、80nm) に暴露した。暴露後 0、7、8、24、48、72 時間後に、界面活性剤層、細胞単層、基底外側媒体、間での金 NPs の分布を ICP-MS を用いて測定した。これらの結果から、NPs の異なるサイズ及び用量と暴露後時間での転位割合を決定した。用量と転位割合の結果は、A549 細胞で、100 ng/cm^2 を超えると、転位割合が相対的に減少した。時間と転位割合については、開始から 8 時間までの転位は速く、24 時間を越えると非常にゆっくりとした転位が支配的となることが観察された。このことは、NPs が細胞単層を横断するのに異なる経路を使用していることを示すものである。サイズと転位割合については、転位割合がサイズに反比例するという結果を示した。17 nm より大きな粒子のわずか 2~4% が、24 時間以内に単層を横断するのに対して、2 nm の粒子の転位割合は、約 60% で、金イオンでは転位割合は 80% 近くとなることを示した。以上より、PBPK モデルは、*in vitro*

測定を立証するのに利用できる可能性があること、既存の PBPK モデルと *in vitro* 測定を組み合わせることで、動物試験に置き換えて使用できる可能性があることを示した。

⑭ Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human keratinocytes: Influence of surface coating (Helena Oliveira, Portugal)

銀ナノ粒子 (AgNPs) は、最も広範に商品化されているナノマテリアルの 1 つで、医療用や一般的なアプリケーションとして使用されている。形態やサイズ、表面化学等のファクターが、ナノ粒子の物理化学的な特性や、生体システムとの相互作用、吸収と毒性に対する最終的な影響を与えることが知られている。銀ナノ粒子については、安定性を保持し、凝集を避けるためにコーティングされている場合が多いが、銀ナノ粒子の体内に入る経路は主に皮膚を介したものである。そこで、皮膚が、体内に AgNPs が入り込む主要な経路であることから、*in vitro* モデルとして人のケラチノサイト細胞株 HaCaT を用いて、AgNPs の細胞毒性と遺伝毒性を調査・比較した。実験では、HaCaT 細胞を、24 時間及び 48 時間、30nm のクエン酸および PEG でコーティングした AgNPs に暴露した。実験により、PEG コーティングしたものよりも、クエン酸コーティングした AgNPs のほうが、細胞生存率のより高い減少を誘導することが示された。なお、PEG コーティングした AgNPs は 24 時間暴露では細胞生存率はいかなる濃度でも低下しなかったが、48 時間暴露では 25µg/ml 以上の濃度条件で低下がみられた。Ag⁺の IC₅₀ (50%阻害濃度) は 1.26µg/ml となった。酸化ストレスに関する実験では、クエン酸及び PEG でコーティングした AgNPs のどちらも ROS レベルが 40µg/ml で増加することを確認し、これにより、抗酸化能が十分に機能しなくなることで、HaCaT 細胞における酸化ストレスを誘導し、クエン酸コーティングしたナノ粒子は視覚的に確認できた。細胞周期に関しては、クエン酸でコーティングした AgNPs により G2 phase が停止し、PEG でコーティングした AgNPs は S 期の遅延を誘導し、2 つの AgNPs が、細胞周期の進行に異なる影響を与えることが示された。なお、銀イオンの場合は、細胞周期には明確な変化は現れなかった。これらの実験結果から、クエン酸または PEG でコーティングした AgNPs はどちらも、細胞増殖と細胞生存率を低下させることがわかったが、クエン酸コーティングしたもののほうが、PEG コーティングしたものと比べて細胞毒性がより高いことが確認された。毒性を誘導しない AgNPs の用量は、どちらのコーティング試料でも同濃度であった。細胞静止作用はコーティングした AgNPs の個々の特性により違いを生じることがデータから示唆され、クエン酸コーティングした AgNPs は、細胞周期の G2 phase を停止したのに対して、PEG コーティングした AgNP2 は S phase を遅らせた。また、AgNPs で高い毒性が確認されたにもかかわらず、Ag イオンを同量投与しても、細胞周期には変化はみられなかった。これらのデータから、AgNPs の安全性を増加させるためには表面特性を考慮すべきであることが示された。

(e) セッション 5 : Environmental Interactions of Nanomaterials

① Imogolites as a model for the study of nanoparticle's ecotoxicity toward *Pseudomonas Brassicacearum* (Avellan Astrid, France)

ナノ粒子は、そのマイクロメートルサイズによるユニークな特性を有している。それらの産業利用及び環境へ放出により、製造されたナノ粒子の規制と環境への影響評価は重要な課題となっている。しかし、生態毒物学研究は、毒性またはそれらが引き起こすストレスに対するナノ粒子のメカニズムを物理化学的特性に関連させて実施した生態毒性学的研究はわずかしかない。さらに、特に調製方法、構造の全体、不純物の存在に関する研究で使用されるナノ粒子のばらつきにより、現在、明確な結論には至っていない。そこで、本研究では、こうした生態毒性に対して、無機ナノチューブの物理化学的性質を関連づけることを目的とした。本研究で使用したナノ粒子は、イモゴライト（ケイ酸塩鉱物の一種）で、天然のナノチューブの類似体であり、構造化されたアルミノケイ酸塩で、ガラスや火山灰の変質により生成される。1977 年以降、文献で種々の合成プロトコルが提案され、それらのプロトコルを使うことで、これらのアルミノケイ酸塩やアルミノゲルマン酸塩の同型構造類似体の構造と反応をより良く理解するに至った。これらの研究は、構造パラメータ（長さ、径、単層／二重壁、構造上の欠陥）の 1 つずつを制御することが可能で、そのために物理化学的性質を調べることができる。多様な特性をもつこれらのナノチューブを、*Pseudomonas brassicacearum* と、根圏の土壌バクテリアである *Brassica napus* と *Arabidopsis thaliana* の培地に添加した。バクテリアの培地中のイモゴライトの存在により誘発されるストレスと毒性を詳細に調べるために、バクテリアとの接触前後の各タイプのイモゴライトの特徴づけを行った。さらに、イモゴライトの存在によって誘発される代謝メカニズムについて、バクテリアの増殖と誘導性酸化ストレスをモニタリングすることで、細胞レベルでの検討を行った。その結果、*Pseudomonas brassicacearum* に対するイモゴライトの毒性を調節するメカニズムをいくつか特定することに成功した。チューブの長さは重要な役割を担っており、チューブの長さが最も長いときには、バクテリアの増殖に対して影響がなかったのに、チューブの長さが最短のときにはバクテリアの増殖が低下した。しかし、他のクライテリアがこれらの相互作用を調節しているように見える。実際には、表面に隙間があると、イモゴライトの結晶化度は、生物学的な利用効率を調節し、そのために、培養培地中の栄養分の欠乏を調節しているようにみえる。以上より、本研究から、同じ化学組成を示すナノ粒子であっても、物理化学的パラメータがいくつか変動するようなナノ粒子に対して、バクテリア群集の反応はかなり異なるものであり、その逆も同様であることを示した。

② Environmental transformations of silver nanoparticles: Impacts on stability, bioavailability and toxicity (C. Levard, France)

ナノテクノロジーの開発は、自然界で生成されたナノ粒子の潜在的なリスクについての懸念を高めることにつながっている。そうしたナノ粒子の環境中での変質（腐食、溶解、凝集、等）を、関連する自然条件下で特徴づけることは、生態系におけるナノ粒子の挙動を予測のためには重要である。ナノテクノロジーで使用される生成された様々なナノ粒子の中では、銀ナノ粒子（Ag-NPs）が最も広範に使用されている。広範に使用されている理由の1つは、抗菌および抗真菌の性質によるもので、銀ナノ粒子は自然界に大量に放出されている。特に主要な問題は、これらのナノ粒子が、水溶液との相互作用によって引き起こされる変質と溶解に起因した毒性種を放出する程度である。B型金属としてAgは、硫黄と強く反応する。これについて、本研究では、消費者製品の中で最も使用されているだけでなく、様々な生物に最も毒性を示すAg-NPsの硫化に焦点を当てた。その結果、硫化が、多様な生物に対してAg-NPsの毒性を強く低下させることを示した。また、硫化された粒子は、溶解度が非常に低いにもかかわらず、植物にとっては生物学的に利用可能であった。さらにAgは、硫黄のほかに、天然水中にどこでも存在する塩化物などのハロゲン化物と強く反応することで、毒性に強い影響を示す可能性がある。Cl/Ag濃度に依存して、Clは可溶性を示し毒性のあるAgCl種の生成をもたらすAg-NPsの酸化と溶解に対して触媒作用を示す可能性がある。他方で、Cl/Ag濃度が低いと、Clは溶解を防止するAg-NPsの表面に析出する可能性がある。本研究結果からは、E.Coli（大腸菌）におけるAg-NPsの毒性は、Ag/Cl比と相関することが示唆された。

③ Comparison of TiO₂ Nano-objects toxicity on *Caenorhabditis Elegans* (Gladys Saez, France)

二酸化チタンナノ粒子（TiO₂-NPs）は、低コストに関連した電子特性と、TiO₂ナノマテリアルの合成と改変に関して多くの可能性を秘めていることから、非常に多く利用されている。しかし、環境中への放出と蓄積については、十分に文書化されていないことから、生態系や生物へのTiO₂-NPsの潜在的な毒性を調査する必要がある。*C.elegans*（無脊椎動物、線虫）は、実験室での取扱いが便利なことと、異なるストレスに対して敏感に反応することから、よい生態毒性モデルである。そこで、本研究は、この点に関して、*C.elegans*を使って、3つのよく特徴付けられたTiO₂-NPsの様々な形態（P25 エボニック、ナノチューブ、ナノニードル）の結晶相、サイズ、表面積あるいは露出面に対する生態毒性影響を調べた。NPsの摂取については、FITC あるいは TRITC などの蛍光色素分子で標識したTiO₂-NPsを用いて、従来の顕微鏡とイオンビーム分析により調べた。NPsは、咽頭や線虫の腸内で確認され、時々外陰部でも確認された。生殖腺あるいは胚における転座は観察されなかった。透過型電子顕微鏡による最初の観察結果では、腸や他の細胞で3つのTiO₂-NPsのいずれかの内在化は示されなかった。TiO₂-NPsの毒性を、線虫の成長サイクルに係るパ

ラメータ（生存、線虫の長さ、再生）を使って調査した。光触媒の活性化を最小限に抑えるために、暗条件で、幼虫段階（L1、成虫）での暴露期間を変えて実験を行った。暴露中に、*C.elegans* の食料源である *E.Coli* 細菌は、TiOs-NPs による影響を受けなかった。*C.elegans* の異なるエンドポイントに関して観察された毒性は、TiO₂-NPs の特性に依存しているようであった。

(f) Conclusion

最後に全体の総括が行われた。今回の会議は、4大陸30カ国以上から320人の参加があり、口頭発表は160件、ポスター発表は86件であった（ただし、当日キャンセルもかなりあった）。

(2) ECHA Topical Science Workshop

- Regulatory Challenge in Risk Assessment of Nanomaterials

a) 概要

期間：2014年10月23、24日

場所：ECHA（ヘルシンキ）

ECHAは、毎年、重要なテーマを決めて Topical Scientific Workshop を開催している。今年は「Regulatory Challenge in Risk Assessment of Nanomaterials」のテーマでナノマテリアルのリスクアセスメントに関するワークショップとした。EU域内以外から米国2名、カナダ2名、日本1名が参加、総参加者数150名の盛大なワークショップであった。本ワークショップでは、EU、米、カナダ規制当局の発表の後、アカデミア、企業の研究者からの報告（主としてEUの各プロジェクト）があり、規制当局と研究者のコミュニケーションを図ろうとしている。

b) 発表および議論の概要

(a) 歓迎の辞 Jukka Malm, Deputy Executive Director (ECHA)

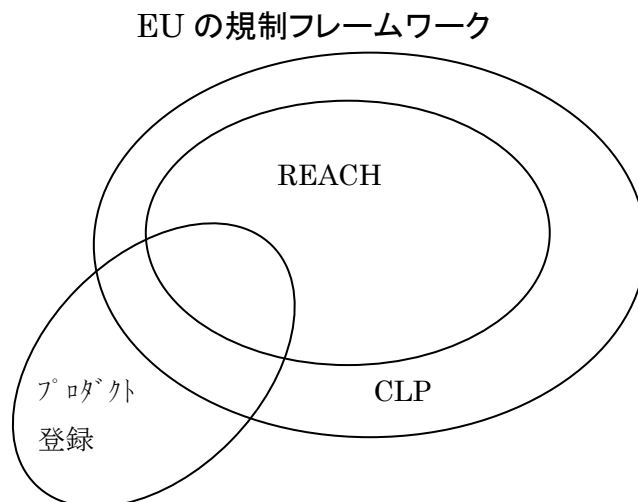
ECHAはTopical Science Workshopを毎年開催しており、今年はナノを取り上げた。ナノは未だ科学的知見が十分でなく、例年のワークショップとは異なり、結論ができないかもしれないが、規制に向けての前進を図りたい。ECHAは米、加と協力アグリーメントを結んでおり、両国の規制当局からの参加もある。本ワークショップでは、専門家と規制当局の間で議論し、進むべき方向を検討したい。

(b) トピック1 ナノマテリアルの規制リスクアセスメントの科学的チャレンジ

本トピックは各国の規制当局から報告があった。

① 「EU のナノチャレンジ」 Jenny Holmqvist (ECHA)

EU の規制として REACH でのナノマテリアルの取り扱いについて説明した。



ナノマテリアルは REACH 規制フレームワークで取り扱う。ナノマテリアルの登録は 2010 年にカーボンブラック、 CeO_2 、 CaCO_3 、 ZnO 、 Ag の 5 件、2013 年に MWNT 2 件、 TiO_2 、 SiO_2 の 4 件であった。

ECHA は REACH の中で評価、制限、禁止の処置を行う。ECHA の評価プロセスは Article36 (データ提出) → ドシエ評価 → 材料評価の順に進む。各段階で登録が行われるが、疑問があるときに次の段階に進む。懸念のある材料に対しては使用制限等、不確実リスクがある物質に対しては承認を行わない等のリスク管理を行う。

質疑応答で、ナノマテリアル規制は REACH のみでなく、殺生物剤、食品、化粧品等の規制がある、悪影響の懸念を明らかにするのに特性評価データが必要との議論が行われた。

② 「TSCA におけるナノ」 Jim Alwood (US EPA)

米国でもナノ特有の規制は行っておらず、TSCA (有害物質規制法) の枠組みの中で取り扱っている。TSCA ではインベントリにない物質の届出を要求しており、90 日前の PMN (製造前届出) を義務付けている。PMN では、新たなデータは要求しない。今までに 160 のナノマテリアルを評価した。評価で不確実なリスクがある場合は使用制限や 90 日の吸入試験データを要求等のアクションをとる。TSCA では、①サイズの差が 10%以上、②表面チャージ、比表面積、分散性、表面反応性が 10%以上差がある場合、異なるナノマテリアルとみなす。

まとめとして、よりよい特性評価、個別／グループのナノマテリアル特有の標準類が必要であり、まだ十分なデータがない、とした。

発表後、60 の CNT を評価したがそれらは異なる製造者の物、TiO₂ は既存物質の扱いと
している、等の議論が行われた。

③ 「カナダにおける化学物質アセスメントマネジメントのナノマテリアルへの適用の経験」 Braf Fisher (Environment Canada)

カナダにおいては、インベントリリストにない物質を新規化学物質としており、ヒト健康・環境アセスメントの対象となる。Environment Canada (カナダ環境省) と Health Canada (カナダ保健省) が共同で上市前のリスクアセスメントを行い、懸念物質は「Significant New Activity Notice (重要新規活動)」になる。

2000 年から化学物質管理計画 (Chemicals Management Plan) が始まり、4300 物質をアセスメントの対象とした。CMP1 (2006～010 年) で 1100 物質、CMP2 (2011～015 年) で 1500 物質、CMP3 (2016 年～2020 年) で 1700 物質のアセスメントを行う。

ナノマテリアルアセスメントのチャレンジとして、以下がある。

- ・ ナノマテリアルの特定；報告すべきナノマテリアルをどうやって決めるか
- ・ ナノマテリアルのグルーピング；毒性エンドポイントによるグルーピング
- ・ リスクアセスメントの方法論；実態を表すリスクアセスメント
- ・ 情報収集；使用パターン情報を暴露アセスに与える

ナノマテリアルの規制関連には、まだ多くの科学的チャレンジが残されており、カナダは 2 ヶ国間 (ECHA、米、オーストラリア) や多国間 (OECD) 活動をサポートする。

発表後、リスクアセスメントを行う材料選定はケースバイケース等の議論が行われた。

(c) トピック 2 ナノマテリアルの測定と特性化

本トピックでは、EC のナノ定義に関連して測定に関する報告があった。

① 「リスクに関係しない広い範囲の EC ナノ定義の実行」 Wendel Wohlleben (BASF)

EC のナノ定義は大変チャレンジングなものである。市場に出ている製品説明をまとめると以下となるが、EC 定義に該当しているかが分からない。

- ・ 染料やフィラーでは DLS や表面積測定が行われるが、粒子個数は測定されない
- ・ 固形ワックスやモルタルでは、サイズ表示はない
- ・ ポリマーとの混合液は EC 定義を適用するかあいまい

染料のラウンドロビンテストを行った結果では、単一の測定法では EC 定義に該当するか確認できない。特に分散状態の影響が大きい。

EC 定義に該当するかを決める提案は以下の二つである；

● 提案 1

個数測定 (CLS による測定が望ましい)	EC 定義該当性
D50<100nm	ナノマテリアル
D50>100nm	非ナノマテリアル (分散性が確認されている場合)

● 提案 2：VSSA (Volume Specific Surface Area) による判定

VSSA 測定値	EC 定義該当性	特記事項
VSSA>60	ナノマテリアル	空孔がない場合
60>VSSA>M	判定不能	電顕による測定が必要
M>VSSA>X	非ナノマテリアル	似た材料が特異形状でないとき
X>VSSA	非ナノマテリアル	更なる確認は不要

リスクアセスメントに関連した放出ナノ粒子について、ナノ粒子の放出は測定可能であるが、母材や放出シナリオに影響される。リスクアセスメントは、放出、分散性、溶解性を考慮しなければならない。

質疑応答で、加工時に発生するナノ粒子は定義の範疇を超えている、毒性学的に溶解性粒子はナノ粒子ではないとの意見があるが、定義は規制側で決めること、等の議論が行われた。

② 「NANoREG における試験の検証」 Keld Jensen (デンマーク国立作業環境研究所)

NANoREG プロジェクトは 50 百万ユーロ (内 20% を EU から) の予算で 2013 年から開始し、EU の 15 ヶ国、61 機関が参加して行われている。社会的ニーズと産業界の要求を結びつけ、①調和のとれた信頼性ある方法の特定、②物理化学特性によるグルーピング法の確立、を目指すものである。NANoREG には WP1～WP7 の作業グループがあり、WP2 でナノマテリアルの作成、提供、キャラクタリゼーションを行った。この中で、各種の測定法の比較を行ったが、かなりのばらつきがあった。サイズ測定の共通ツールとして DLS が良い。また、TEM の画像解析による粒子測定法を開発し、現状は半自動モードが使える。全自動モードはまだ開発段階である。

質疑応答で、DLS では個数が分からず、他の方法との組み合わせが必要、等の議論があった。

③ 「ライフサイクルでのナノ粒子放出のキャラクタリゼーション」 Michael Stintz (ドイツ ドレスデン工科大学)

ISO での粒子測定法および、ナノ粒子放出測定実験例として、磨耗試験、エージング試験、やすりがけ試験、スプレー粒子試験、での粒子測定法と結果を説明した。

(d) トピック 3 ライフサイクルを通じての有害性と暴露試験のドーズメトリックス

本トピックでは、有害性や暴露評価を行うのに、どのドーズを用いるべきかの報告があった。

① 「ナノ粒子毒性学のコンセプト、ドーズとリスクアセスメント」 Gunter Oberdorster (米国ロチェスター大学)

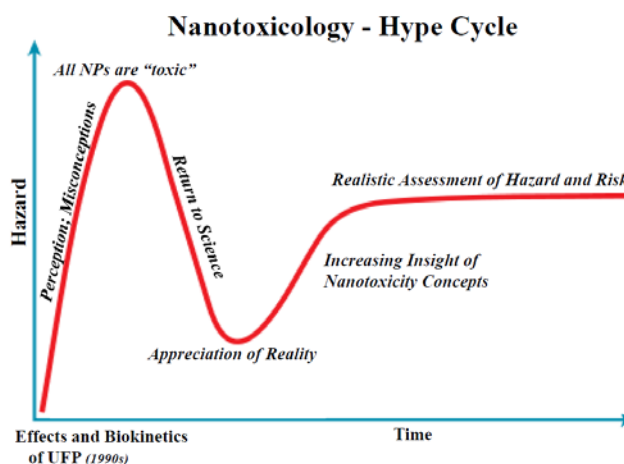
ナノマテリアルの有害性について、ナノマテリアルが世の中に出始めた時期には非常に危険なものとの見方が広がったが、その後、科学的知見が出てきてさほどでもないとの雰囲気になった (右図)。

しかし、現状はハザードとリスクアセスメントの実態に即したものとなってきた。

今までの、急性毒性試験は、実際に人間に暴露されるより大きな量で行われているとの説明後、MWCNT

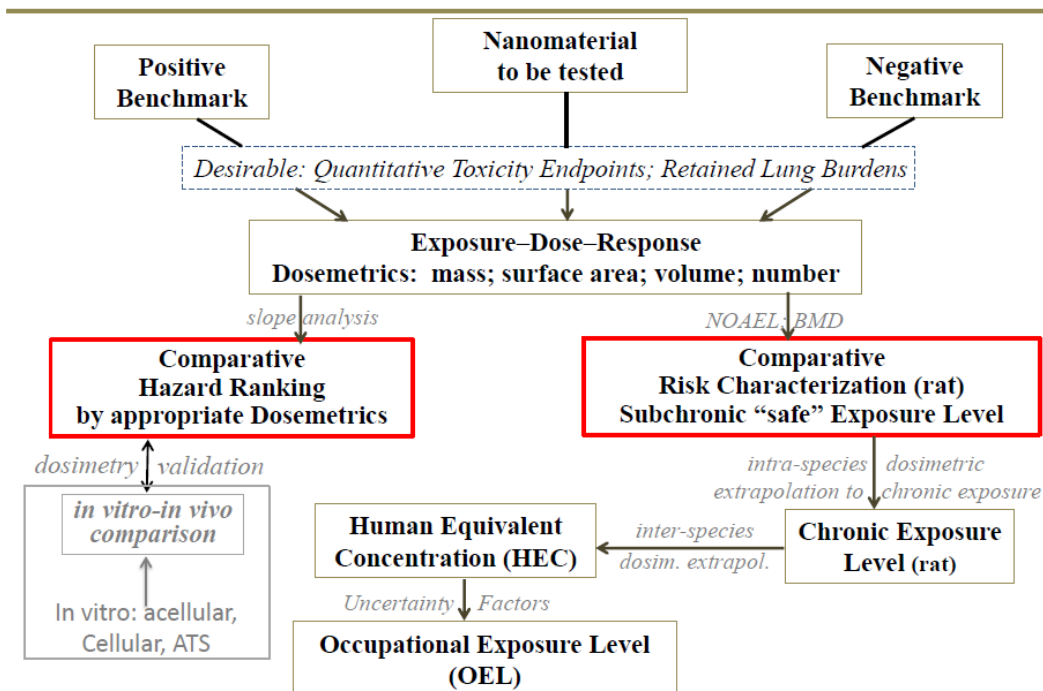
を含む各種データを示しながら、どのメトリックスが良いかの議論を展開した。

次いで、ハザードとリスクの特性化にポジティブおよびネガティブベンチマークとの比較を用いるアプローチを説明した。



ECHA HP より

Approach for Comparative Hazard and Risk Characterization of Inhaled Nano-Particles Based on Subchronic (3 months) Rat Inhalation Studies



ECHA HP より

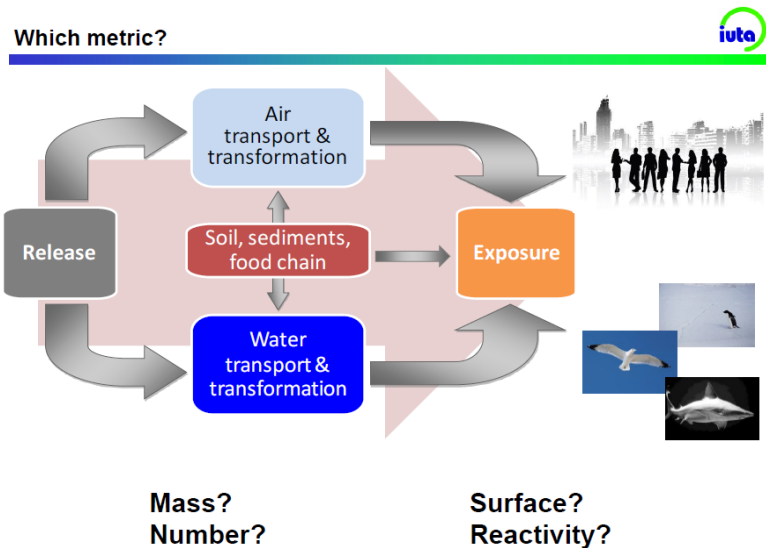
ケーススタディとして Nanocyl、Baytubes、三井 MWCNT、VGCF をネガティブコントロールのカーボンブラック、ポジティブコントロールの NiO との比較を示した。VGCF はネガティブコントロールと同様な挙動を示した。

表面積により整理すると、CB<CNF=Nanocyl=Baytubes<三井 MWCNT<NiS の順に急性毒性が強くなるのとは一致した。

発表後、長くて硬いファイバーが中皮腫を引き起こす、ラットのデータを人へ適用することの妥当性、等が議論された。

② 「ライフサイクルを通じた暴露評価の計測法と計測単位」 Thomas Kuhlbusch（ドイツエネルギー環境研究所）

暴露評価に用いる測定メトリクスを図と表にまとめそれぞれの特質を説明後、OECD ガイダンス「Tiered approach for exposure assessment」の階層に沿った説明を行った。



ECHA HP より

メトリクス	個人モニター	計測簡便性	従来手法	暴露検知の鋭敏性	ヒト健康関連性	バックグラウンドとの識別	グループ化	再現性	規制への取り入れ易さ
質量濃度	+++	+++	+++	+	++	+	+	+++	+++
表面積濃度	+++	+++	—	++	++	+	+	+	+++
個数濃度	++	+++	—	+++	+	+	+	+	+++
粒径分布	0	+	—	+++	+++	++	+++	0	—
粒子反応性	—	—	—	—	+++	—	+++	0	0

ライフサイクルの各段階で同じメカニズムの放出が起こり、これらは、機械的、熱的、化学的、混合のメカニズムに分けられる。EU の MARINA プロジェクトでも階層的アプローチを行っており、Tier2 のサンプリングに関してテストプラントでの実測で装置からのリークがあった例を示した。

発表後、バックグラウンド検証について議論があり、オンタイムでの測定はできず、長期測定+TEM による確認が必要とされた。

③ 「ナノマテリアル規制のための測定とメトリクスの最新科学技術」 Steve Hankin（英国産業医学研究所）

規制当局がどのようなデータが必要かの観点からいくつかのプロジェクトを説明した。

RIP-oN2「Information Requirement」の主要な考察／推奨は、以下である；

- ・ 最適なメトリクスはない（現在も無い）
- ・ 質量ベースのメトリクスは規制用試験に用いられている

- ・ 吸入試験には表面積と個数が重要
- ・ 環境試験に最適なメトリクスははっきりしていない
- ・ 測定法決定アプローチは利用できる
- ・ メトリクスの変換はチャレンジングである

RIP-oN 報告書以降の変化として、以下が挙げられた；

- ・ EC がナノマテリアルの推奨定義を発表
- ・ REACH のレビューが行われた
- ・ 幅広く深い情報（証拠）の収集が行われた
- ・ ナノマテリアル規制の2回目のレビュー
- ・ OECD スポンサーシッププログラムの終了

フランスではナノマテリアルの報告制度が始まっているが、規制当局にとってこの情報がどのように利用できるかは、まだ分らない。

ITS-Nano でも測定法とメトリクスのライフサイクルアプローチに取り組んでいる。

まとめとして、

- ・ リスクアセスメントに測定法が基本である
- ・ リードアクロスにはしっかりした測定結果が必要である
- ・ ナノマテリアルの特性と挙動の関係は有効である

(e) パネルディスカッション

① VSSA と定義適用性について

ナノマテリアルの EC 定義該当性について下表（再掲）をもとに、VSSA 適用の議論が行われ、本法に対する肯定的意見が多かった。VSSA と毒性の関連については、本法はあくまでも中立的評価であるとされた。

VSSA 測定値	EC 定義該当性	特記事項
VSSA>60	ナノマテリアル	空孔がない場合
60>VSSA>M	判定不能	電顕による測定が必要
M>VSSA>X	非ナノマテリアル	似た材料が得意形状でないとき
X>VSSA	非ナノマテリアル	更なる確認は不要

② キャラクターゼーションの階層的アプローチ

下表（再掲）を元に議論が行われ、本テーブルに示すのは、発生源近くの測定を念頭に置いたものであり、一般環境を意図したものではないが、暴露評価に使えるようである。バックグラウンドとの識別が重要である、等の議論がなされた。

	個人 モニター	計測 簡便性	従来 手法	暴露検 知の鋭 敏性	ヒト健 康関連 性	バック グラウンド との識 別	ゲルビ ン化	再現性	規制へ の取り 入れ易 さ
質量濃度	+++	+++	+++	+	++	+	+	+++	+++
表面積 濃度	+++	+++	—	++	++	+	+	+	+++
個数濃度	++	+++	—	+++	+	+	+	+	+++
粒径分布	0	+	—	+++	+++	++	+++	0	—
粒子 反応性	—	—	—	—	+++	—	+++	0	0

(f) トピック 4 ライフサイクルを通じての環境中運命、残留性、生体内蓄積性

① 「ナノマテリアルの環境中運命モデルと測定」 Geert Cornelis（スウェーデン ゴーテンブルグ大学）

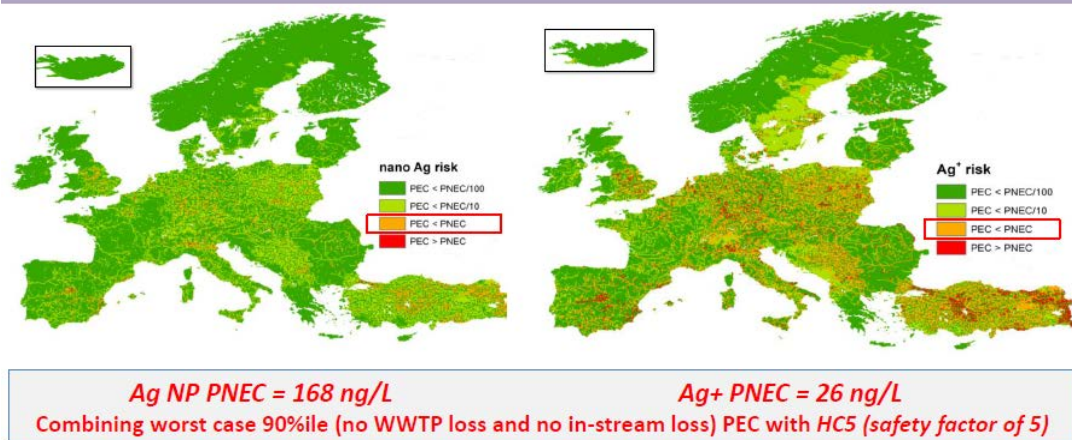
環境中運命のモデルを提案した。最大吸着係数と実吸着係数の比 α を用いたモデルが良い。TiO₂ を例にモデルの検証を試みたが、バックグラウンド TiO₂ が多すぎて、検証できなかった。

発表後、バックグラウンド TiO₂ が夏に多いのは土壌からとサンスクリーンからであろう、報告の中でアグリゲート（強凝集体）との用語を用いているが土壌に吸着したナノ粒子がほとんど放出されないため、等の議論が行われた。

② 「標準的なエンドポイントとアプローチに基づく従来の ERA（環境リスクアセスメント）と ZnO および銀ナノ粒子の幅広いナノ特有の ERA の比較」 Claus Svendsen（英国生態・水文センター）

EU の Nanofate プロジェクトでは、消費者製品に含まれるナノによる環境リスクの全ヨーロッパのマッピングを行った。Part1 は水系の Ag ナノ粒子と Ag イオンを示した。

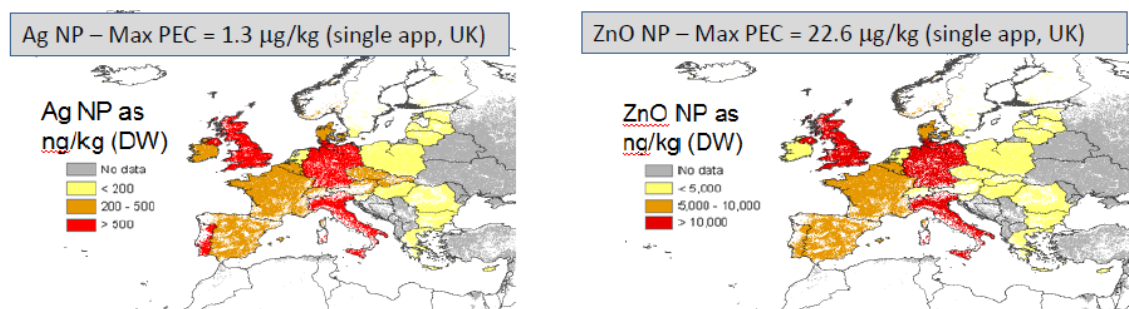
European Ag NP vs. Ionic risk map (PEC/PNEC)



ECHA HP より

Part2 で土壌中の Ag ナノ粒子と ZnO ナノ粒子を調査した。

SOILS: Standard worst case RA



ECHA HP より

Part1 では、各地域とも Ag に比して Ag+が高い。Ag の予測環境濃度は炭化水素の 1/10 から 1/50、ZnO は 1/10 から 1/100 であった。Part2 の結果では、英国とドイツの濃度が高く出た。植物への取り込みはイオンだけでなくナノ粒子でも起こる。最悪ケースでも Part1、Part2 ともヨーロッパは危険領域にはない。詳しい情報は Nanosafety Cluster で見ることができる。

③ 「環境中のナノマテリアルの影響評価のチャレンジ」 Teresa Fernandes (英ヘリオット・ワット大学)

米 EPA との OECD TG 201 および TG 305 適用性の共同研究について報告した。TG 201 では、OECD メディアから EDTA を除くとナノ粒子の毒性が発現する。JM (Jaworski's Medium) は OECD メディアよりナノ粒子の毒性発現が強く出る。葉酸は藻類成長に影響しない。TG305 では Ag の表面修飾により毒性の変化が見られた。

結論として、①実環境と標準試験の差を考慮しなければならない、②藻類の試験では、メディア組成、試験液の分散法、光の有無等が影響する。

(g) トピック 5 ナノマテリアルのリードアクロスと分類

① 「ナノマテリアルの安全性アセスメント」 Wim De Jong (オランダ国立公衆衛生環境研究所)

SCENIHR (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks) は 2009 年にナノの安全性につき、以下の意見書を出した；

- ・ 小さくなると、反応性が高くなり、より毒性が強くなると仮定される
- ・ ナノマテリアルはケースバイケースで調べるべきである

また、何故ナノが難しいのかについて、

- ・ 通常物質の延長線では考えられない
- ・ 投与メトリクスをどうするか
- ・ ヒトおよび環境中の運命と残留性がわかっていない

とした。

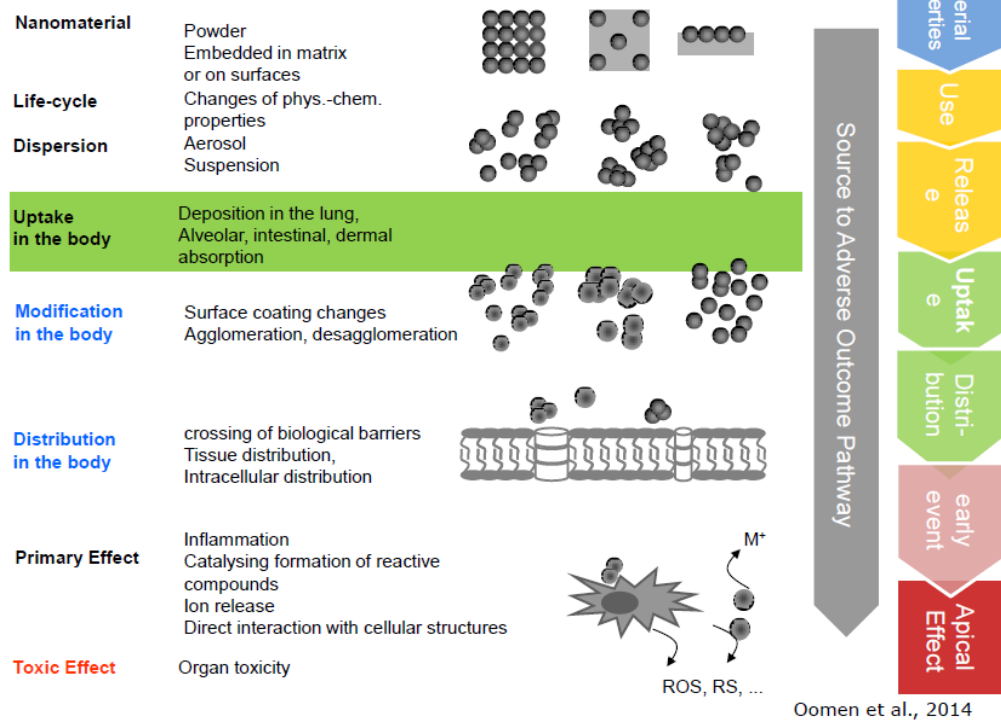
次いで、ナノマテリアルのグルーピングの説明を行った。ナノマテリアルは通常物質より物理化学特性の影響を強く受ける。形状影響として、ファイバー状物質で、長く、硬い材料が体内残留性が高く悪影響を与えることが分かってきた。CNT だけでなく、TiO₂ でも長く、硬い材料の炎症性が高いデータがある。現状では、グルーピングとして、

- ・ カーボンベース
- ・ 金属／金属酸化物
- ・ ナノチューブ／ワイヤ

が考えられる。

続けて、リードアクロスに関する説明を行った。SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety) は 15 の結晶形や形状の異なる TiO₂ の研究論文を調べ、サンスクリーンとして 10% 含有量までは安全であるとした。ZnO についても同様な調査を行い、サンスクリーンでの使用は問題ないとした。これら、二つの材料はグルーピングができる。また、高速スクリーニングに言及し、AOP (Adverse Outcome Pathway) のスクリーニングが in vitro で可能とし、悪影響と関連する特性を明らかにすることで、ナノマテリアルのグルーピングが可能であろうとした。

Source-to-adverse outcome pathway



ECHA HP より

発表後、 TiO_2 や ZnO の安全性の限界値は提出されたデータに基づくものであること、ハイスループット法として、コメット法や小核試験は適用できるがAmes試験はナノマテリアルに適さない、等の議論が行われた。

② 「短期吸入試験（STIS）とそれに関連する *in vitro* 法を用いたナノマテリアルのグルーピング」 Robert Landsiedel（BASF）

5日間の吸入試験とその後の28日間の観察により、カーボン系物質や金属酸化物のNOAEC (mg/m^3)を調べた。

- ・ MWCNT : 0.1
- ・ グラフェン : 0.5
- ・ グラファイトナノプレート : 10
- ・ カーボンブラック : 10
- ・ 染料 : 10~30
- ・ TiO_2 : 2
- ・ ZnO : 0.5

- ・ SiO₂ : 10
- ・ CeO₂ : <0.5
- ・ BaSO₄ : 50

これらの毒性（NOAEC）レベルによってナノマテリアルのグルーピングができるであろう。

in vitro 試験でマクロファージ試験（NR8383 細胞）が STIS の NOAEC の結果と良い一致を示した（CeO₂ のみが違う傾向を示した）。グルーピングにこの方法が使えるようである。

質疑応答で、複合暴露の影響は個体群評価であり、化学物質評価ではないので行わない、最高濃度の 200mg/m³ ではいかなるダストでも悪影響を示す、等の議論が行われた。

(h) パネルディスカッション

環境関連のパネルディスカッションでは、以下を示しながら、議論が行われた。

重大なデータギャップ

- ・ 技術的正確性と作業の簡便性を勘案して環境中運命の記述をどうするか
- ・ 現実的に確立し、モニタリングできる投与メトリクスを予測できるモデルの開発
- ・ ナノマテリアルの低濃度測定技術の開発
- ・ ナノマテリアルの特性を検知する技術開発

主に行政が何を求めるかについて、以下の議論が行われた。

- ・ ECHA はライフサイクルのデータを求めるのか、下水処理以降のデータを求めるのか
- ・ REACH では分解生成物のデータは要求していない
- ・ REACH での情報要求は最低限であり、ドシエに記載される。但し、それを超えたデータ要求もありえる。

グルーピングのパネルディスカッションでは、次のスライドを示しながら、議論が行われた。

ナノマテリアル	粉体 母材中、表面	材料製造
		使用
分散	エアロゾル 懸濁液	放出
体内吸収	肺への沈着 肺胞、皮膚透過	吸収
体内での変化	表面コーティング変化 凝集 凝集分解	分散
体内移動	生体膜通過 組織への分散 気管内分散	
初期影響	炎症 反応性物質生成触媒 イオン放出 細胞組織との直接反応	初期影響
毒性影響	臓器毒性	細胞毒性

パネルディスカッションでは以下のコメントが出た。

- ・ 研究者はリードアクロスには関心ないが、グルーピングには興味を持っている
- ・ 研究者はコロナに興味がある。in vivo では不要だが in vitro では関連がある
- ・ 単独ナノ粒子の毒性が強いが、一般的には凝集体になっている。しかし、体内ではデアグロメレーションが起こり遊離ナノ粒子となる。これに注意すべきである
- ・ 化学工業界が協力して、グルーピングの試みを行うことは、各社が経済性、優位性を競うことからできないであろう
- ・ 行政からみて、データは豊富にあるが、必要なデータは限定的である。

(i) ラップアップミーティング

議長の Wim De Coen が、ECHA が関心を持つ 4 つの項目についてまとめを行い、今回のワークショップの報告から以下のキーワードを抽出した。

キャラタリゼーション

- ・ 階層的アプローチ (TEM 補完による VSSA)
- ・ 物質がナノでないときの調整が重要
- ・ 中間／グレイゾーン
- ・ 測定の組み合わせ
- ・ 標準手順と標準物質
- ・ 材料とプロセスを考慮した放出

測定法と投与メトリクス

- ・ とても重要な項目
- ・ 表面積と表面反応性の重要性
- ・ 比較による有害性特性化におけるベンチマークの有用性
- ・ 暴露評価における階層的アプローチ
- ・ 放出プロセスに基づくライフサイクルの暴露シナリオの構築
- ・ バックグラウンドの考慮
- ・ 関連付けと優先付け

環境関連

- ・ 現状の環境中運命の記述の妥当性
- ・ 従来型研究の K_d と α
- ・ モデルの妥当性（バックグラウンド）
- ・ 環境毒性試験における粒子ダイナミック特性
- ・ 標準リスクアセスメントツールは機能するか（多くの場合 Yes, but.....）
- ・ 溶媒影響と土壌や沈殿物のエージング
- ・ 製造材料と暴露／放出材料の妥当性
- ・ 粒子とイオンの効果
- ・ 濃度の妥当性－環境毒性試験での過負荷と環境中の低濃度

リードアクロス

- ・ REACH の目的－データギャップの補填
- ・ 高い緊急性
- ・ 物理化学特性の特性化
- ・ 生体膜通過のトキシコキネティクスと有効性（どの臓器が影響されるか）
- ・ メカニズム（ナノマテリアルの初期影響は限定的）
- ・ *in vitro* 法（とその限界）（有害性ランキング）
- ・ 高速スクリーニング（グルーピングを用いたランキングとメカニズム）

（3）第 31 回日本毒性病理学会学術集会

1) 概要

期間：2015 年 1 月 29、30 日

場所：タワーホール船堀（東京）

日本毒性病理学会では、毎年、テーマを設定して、学術集会を開催している。今回のテーマは、「毒性病理学と比較病理学」であり、ナノマテリアルに注目した発表は、呼吸器系で 4 件、皮膚・運動器で 1 件であった。

2) 発表内容

① ナノマテリアルの気管内投与試験における投与器具及び投与液量の影響（小林俊夫ほか、（一財）化学物質評価研究機構）

本発表は、気管内投与試験の標準化を目的として投与器具及び液量の違いによる影響を検討したものである。12週齢の雄のF344ラットに、2 mg/mL リン酸二ナトリウム水溶液に分散したナノ二酸化チタン P25 を複数濃度で調整し、投与用量が 3.0mg/kg となるように液量を変えて気管内投与した。投与液量は、経口ゾンデでは、0.5~3 mL/kg、スプレーゾンデでは 0.5~2mL/kg とした。投与3日後に気管支は違法洗浄液（BALF）検査を実施した。

同一器具での液量間の比較では、両器具とも 0.5~2 mL/kg の範囲で顕著な差はみられなかったが、経口ゾンデの 3 mL/kg では炎症反応の程度が弱かった。同一液量での器具間の比較では、スプレーゾンデ使用時に一部の検査項目で有意な低値がみられた。このことから、P25 の気管内投与試験において、0.5~2 mL/kg の範囲では、投与液量の違いは結果に影響しないと考えられた。一方、投与器具の違いによって肺の炎症の程度が変化する可能性が示唆された。

② 多層カーボンナノチューブによるラット中皮及び肺増殖性病変誘発に対する phenyl N-tert-butyl nitrene (PBN)の影響（坂本義光ほか、東京都健康安全研究センター）

本発表は、CNT によるラット発がんに対する PBN の影響を観察した結果を示したものである。試験動物は、Han:WIST 系の雄ラット 10 週齢を用いた。CNT は、MWNT-7（長さ 2 µm、径 75nm、Fe 含有量 0.344%）を懸濁し、0、0.25mg/kg を単回腹腔内投与、0、0.01、0.05、0.25mg/kg を 1 回/4 週間・12 回経気管内投与した。PBN は、CNT 0、0.25 mg/kg 腹腔内および経気管内投与追加群に、0.065%の濃度で飲水投与した。実験気管は、104 週間である。

上記の試験の結果、CNT 投与に関係した中途死亡・瀕死、臨床症状または体重変化はなかった。CNT 群では、主に腹膜中皮腫と、肺の細気管四抹消・肺胞の増殖性病変を認めた。PBN 併用は、これらの病変の発現に明らかな影響を示さなかった。以上より、CNT によるラット発がんにおいては、酸化ストレスとそれによるシグナル異常の関与が限定的であり、それ以外の要因が介在する可能性が示唆された。

③ 多層カーボンナノチューブの腫瘍発生プロファイル（酒々井眞澄ほか、名古屋市立大学院）

本発表は、MWCNT の肺ばく露後の長期経過の影響について調べたものである。25µm のふるい板を用いて MWCNT をろ過、非ろ過及び原液に分画化し、各分画をラットはいかに噴霧した。雄 F344 ラットに 2 週間で計 8 回（径 1.0mg）を肺内噴霧した。分散剤としては、PF68 を用いた。2 年経過まで観察し、途中死亡例及び定期解剖例の腫瘍発生を記録

し、組織学的に調べた。

実験・観察の結果、実験終了時までに径 20 個体に腫瘍の発生が確認された。65 週目に 1 個体に中皮腫が発生し、以降剖検までに 11 個体に中皮腫が発生した。計 12 個体中 8 個体が心外膜あるいは胸膜原発で、4 個体は腹膜中皮腫であった。胸腔での中皮腫発がんまでの平均経過は 92 週であった。腫瘍および各臓器の組織学的検索の結果、気管内にスプレーされた MWCNT は、上縦隔リンパ節、中皮腫組織、肥厚した横隔膜中皮などに存在した。少なくとも本実験条件下では、CNT が気管あるいは肺内から胸腔に移動し胸膜や心外膜を標的に中皮腫発がんに至ったと考えられた。

④ NNK でイニシエートされた A/J マウスにおける磁性な粒子マグネタイト気管内スプレー投与の影響（多田幸恵ほか、東京都健康安全研究センター）

これまでの発表者らの研究では、ラットを用いて急性及び慢性毒性・肺発がん性・体内動態について調べたものである。マグネタイトの慢性毒性試験では、肺胞上皮の過形成性変化を観察し、肺に対する発がん性も示唆されたが、二段階肺発がん試験では、イニシエーション・プロモーション作用を示さず、むしろ肺発がんを抑制する傾向が示されている。そこで、本発表では、A/J マウスを用いた二段階肺発がん試験のプロモーション期に投与したマグネタイトの影響を検討した。

実験は、雌の A/JJmsSlc マウスを 5 週齢で 4 群にわけ、生理食塩液あるいは NNK を投与度、マグネタイトを 0、5.0mg/kg 体重、で 4 週間ごとに 1 回反復経気管投与し、実験開始後 18 週間までと殺した。

試験期間中の体重の推移は、NNK 投与群で投与後 6 週まで低い値を示したが、その後有意な差はなく推移した。血液学的政情には、NNK 及びマグネタイトの影響は認められなかった。肺の重量は、マグネタイト投与群で有意に増加した。NNK による肺の重量変化は、認められなかった。解剖時の肉眼観察で、NNK 投与群には結節／白斑が多数認められたが、結節の発現率及び個体あたりの結節数にマグネタイトの影響は認められなかった。

⑤ 皮膚バリア破綻とナノ銀粒子皮膚透過性の検討（熊谷文明ほか、食品薬品安全センター）

これまでの発表者らの研究では、ナノ銀粒子をラットに 24 時間及び 28 日間経皮投与し生体への影響を調べた結果からは、ナノ銀は皮膚に局限していたが、全身毒性は確認されていなかった。これらの結果をうけ、本発表は、皮膚透過性を検討するために、皮膚バリアを変化させ 24 時間経皮投与後の生体への影響を調べたものである。

実験では、SD ラットの背部に、5 nm ナノ銀（nAg 群）または硝酸銀（Ag+群）を 24 時間経皮投与した。投与前に剃毛後、テープストリッピング（TP 処理）またはアセトン清拭（AC 処理）を施した。解剖後、血液学、血液生化学および組織学検査を実施した。さらに、ICP-MS により、皮膚、肝臓および血液の銀含有量を測定した。

ICP-MS の結果、nAg 群および Ag+群の皮膚には、TP、AC 処理により銀の残留がみられ、Ag+群の TP 処理例では肝臓にも検出された。血液では前例で検出限界以下であった。組織学検査の結果からは、皮膚では TP、AC 処理により錯角化や細胞湿潤がみられたが、銀特異的な変化ではなかった。銀が検出された Ag+群の TP 処理例の肝臓では異常はなかった。血液学、血液生化学検査の結果からは、銀投与による変化はなかった。

以上より、Ag+群では、TP 処理後の経皮投与によって肝臓に銀が検出されたが、全身毒性を示唆する所見はなかった。したがって、皮膚バリアの破綻により、イオン化したナノ銀粒子が経皮的に生体内に入ることが示唆されたが、急性毒性は認められないと考えられた。

3.3. 国際組織の規制動向

(1) OECD 工業ナノマテリアル作業部会 (WPMN)

2014 年度は2回の工業ナノマテリアル作業部会本会合が開催された。以下にその要点を記す。

a) 第 13 回工業ナノマテリアル作業部会本会合 (WPMN13)

日程：2014 年 6 月 4 日～5 日

① 工業ナノマテリアルに関する各国近況報告 (Tour de Table)

Tour de Table の情報に関し、近況報告がなされた。以下に主要な報告を記す。

米国

- ・ 2014 年 2 月に 4 つの CNT を含む 5 つの SNUR が発効した。
- ・ 2014 年 1 月にカナダと共同で行っている RCC (Regulatory Cooperation Committee) の最終会議が開かれた。
- ・ NNI 予算のうち EHS 関連に 110M \$ が維持された。

フランス

- ・ ナノマテリアル登録制度に基づく 2013 年の登録が終了した。報告数は 2012 年度 3,000 件に対し、2013 年度は 11,000 件であった。

EU :

- ・ EC のナノマテリアルの定義に関する勧告の見直しを JRC が実施中であり、2014 年中には完了の予定。最初のレビュードキュメントが 2014 年 5 月に公開された。
- ・ ナノ製品登録のインパクト評価を始め、2014 年にレポートを完成予定で現在パブコメを募集しているところである。

② SGTA 報告

・ SGAP とジョイント作業グループの設置

SGTA と SGAP のジョイント作業グループを設置し、ドシエデータを利用してナノマテリアルの生態毒性、環境毒性に係る検討を開始することが合意された。7 月末までに、各デリゲーションは参加するエキスパートを連絡することになった。

・ ドシエの形式

ドシエの形式は日本が用いた IUCLID5.6 フォーマットで統一することで合意した (NanoHub 形式は用いない)。サマリーの形式も日本が用いた SIAR 形式が推奨されることとなった。

・ P-Chem 分野でのドシエ評価

オランダから、ボランティアを募り物専門領域ごとに分担してドシエの物理化学特性データ評価を進めていることが説明された。

・ スポンサーシッププログラム成果のコミュニケーション方法

パンフレット (事務局担当)、Lesson to learn (スポンサーシッププログラムを通じての知見; 旧 SG3 議長と現 SGTA 議長が事務局と協力)、各物質の試験結果 (エグゼクティブサマリー、ドシエ、SIAR、SIAP) を公開する。

・ 工業ナノマテリアルに関するテストガイドライン (SPSF) の進捗

2014 年 4 月の WNT で承認された以下の SPSF について説明がなされた。

- ・ 様々な水系媒体中のナノマテリアルのアグロメレーション挙動の新規 TG
- ・ ナノマテリアルの水系環境中溶解速度の新規 TG
- ・ 排水からのナノマテリアル除去の新規 TG
- ・ ナノマテリアルに適合するための吸入試験 TG と GD の改訂
- ・ ナノマテリアルの水棲 (底棲) 生物毒性試験の GD
- ・ 様々な水系媒体中のナノマテリアルのアグロメレーション挙動の新規 GD (デシジョンツリー)
- ・ ナノマテリアルの見かけ蓄積ポテンシャル評価の新規 GD

・ 試験と評価に関する過去および今後のワークショップ

以下のワークショップの概要および計画が報告された。

実施済みワークショップ

トキシコキネティクスワークショップ (2014 年 2 月 26~28 日、ソウル)

ドイツから概要が報告された

工業ナノマテリアルの遺伝毒性ワークショップ (2013 年 11 月 18~19 日、オタワ)

カナダから概要および報告書の公開作業をすすめていることが報告された。

今後予定されているワークショップとして、米国から、ワシントン DC で、

物理化学特性ワークショップ (2014 年 6 月 18~19 日)

工業ナノマテリアルのカテゴリゼーションワークショップ (2014 年 9 月 17~

19 日)

が開催されることが報告された。

③ NM のリスク評価への国内および国際アプローチに関するセミナー

SGAP 議長から 6 月 3 日に行われたセミナーの概要について以下のような報告がなされ、同様なセミナーを今後とも準定期的に行う提案があり同意された。

④ SGAP 報告

実施中の 4 つのプログラムの進捗が報告され、新たに 2 つのプロジェクトを提案、承認された。

実施中プログラム

- ・ ヒト健康リスク評価における種間変異要因 (ドイツ)
報告書を作成、WPMN14 で秘密解除が行われる予定。
- ・ 規制リスク評価における物理化学特性 (カナダ)
報告書ドラフト版を修正中、WPMN14 で秘密解除が行われる予定。
- ・ 規制に向けた、物理化学特性を基にしたナノマテリアルの同等性、グルーピング^o等に関する調査 (日本)
第 15 回 WPMN に報告書提出予定。
- ・ リードアクロスガイダンスに向けた物理化学特性の解析 (米国)
TiO₂ データベースの分析中であり、2014 年 6 月のワークショップで公開予定、2014 年 12 月には WPMN に報告書を提出予定。

新規提案

- ・ 各国におけるリスク評価のマッピング
- ・ Tour de Table の質問項目改訂

⑤ SG8 報告

SG8 で実施中のプロジェクトの進捗が報告された。

- ・ ナノマテリアルの暴露評価：ナノ銀のケーススタディ (米国、韓国)
米国、韓国による銀ナノ粒子についてのケーススタディを報告、今後、重量と個数濃度の比較を中心に行なう。
- ・ ナノマテリアルの暴露評価：ナノ金のケーススタディ (南アフリカ)
WPMN12 で報告したがコメントがなかった。さらに、コメントを募集し、公開へと進む。
- ・ ナノマテリアルの生耐久性と表面リガンドの評価 (南アフリカ)
セリア、CNT、シリカ、チタニア、金などの生態液中での耐性または溶解性の調査について、進捗が報告された。

- ・労働現場でのナノマテリアルの空気中の測定方法と評価に関する階層的アプローチ (BIAC)

報告書が完成し、公開が了承された。

新規プロジェクト

- ・消費者と環境暴露に関する調査プロジェクト

消費者および環境暴露に関する調査が提案され、同意された。

⑥ SG9 報告

- ・LCA ケーススタディに関するガイダンスマニュアルプロジェクト (EC)

報告書を WPMN14 で秘密解除予定。

⑦ 工業ナノマテリアルデータベースの出口戦略 (日本)

最近の WEB 上でのアクセス数は 100 件/月に留まり、その更新にも労力を要する。そのため、エクセル形式で OECD の WEB のアクセス制限エリアに移すことに決定した。

⑧ 次回会合開催日程

第 14 回 WPMN 2015 年 2 月 2～6 日 (パリ OECD 本部)

第 15 回 WPMN 2015 年 11 月 2～6 日 (パリ OECD 本部)

b) 第 14 回 WPMN 本会合

日程：2015 年 2 月 4 日

① 事務局からの報告－OECD のナノテクノロジー／ナノマテリアルに関する最近の展開

- ・WPN (Working Party on Nanotechnology) と WPB (Working Party on Biotechnology) の 2 つの作業グループが統合し BNCT (Working Party on Biotechnology, Nanotechnology and Converging Technologies) が設置された。

② 工業ナノマテリアルの安全性に関する各国近況報告－Tour de Table－

Tour de Table の情報に関し、近況報告がなされた。以下に主要な報告を記す。

- ・米国：7 月に CNT 2 種、9 月に CNT およびカーボンナノファイバー 17 種に SNUR を出した。
- ・EU：ナノ安全クラスター報告書を出した。昨年、ECHA ワークショップ「ナノマテリアルのリスク評価の規制チャレンジ」を開催した。ナノマテリアル定義に関して JRC から 2 つの報告書が出された。

- ③ Tour de Table フォーマット変更の提案
- ・カナダから、米国と BIAC の協力で Tour de Table の質問項目の見直しについて報告され、了承された。WPMN15 から適用される。
- ④ 2017-2020 作業計画
- ・事務局から 2017-2020 作業計画作成について説明された。事務局が WPMN15 に「Thought Starter」を準備、WPMN15、WPMN16 で論議し、2016 年末に JM に提出する。
- ⑤ ナノマテリアルの安全：理事会勧告の実行
- ・WPMN への理事会勧告は 2016 年にレビューがなされると事務局から説明があった。本文の変更は行わず、Annex の改訂で行う方針で、事務局が WPMN15 までに「Thought Starter」を作成する。
- ⑥ LCA ケーススタディに関するガイダンスマニュアル (SG9)
- ・SG9 の議長から進捗と今後の方針の説明があった。ガイダンスマニュアル (GM) の構成を変えて完成した。公開に向けてコメントを募集する。Phase1 はこれで終了し、Phase2 の製品カテゴリールール、意思決定ツリーとその他のツールを開始する。
- ⑦ SGTA 報告
- SGTA 議長から前日開催された SGTA ミーティングの報告がなされた。
- ・ドシエは IUCLID フォーマットに統一され、11 のドシエと 4 つの SIAR が 3 月に公開される予定。
 - ・TG (テストガイドラン) と GD (ガイダンスドキュメント) に関して 7 つのプロジェクトが進行中であるが、残りの課題にリードを募る。
 - ・EU からリードアクロスワークショップが提案され、会議概要へのコメントを募る。日本から *in vitro* 吸入試験スクリーニングのセミナーの提案があり、今後の進め方を検討する (その後、米国が吸入試験 TG のワークショップを計画し、その中に含める提案があった)。
- ⑧ SGAP 報告
- SGAP 議長から実施中のプロジェクト説明が以下行われた。
- ・プロジェクト 1 ; ヒト健康リスク評価における種間変動要因
報告書に最終コメントを受けて公開する。専門家の意見報告書は、ドシエのデータを用いているので、公開はドシエ公開以降とする。
 - ・プロジェクト 2 ; リスクアセスメントにおける環境動態を評価するための表面化学に

関係する溶解性使用の考察

報告書に最終コメントを受けて公開する。

- ・プロジェクト3；規制制度のための物理化学特性によるナノマテリアルのグルーピング、同等性、リードアクロスコンセプトの開発と使用に関するメンバー国アプローチの調査

WPMN15に報告書ドラフト提出予定。

- ・プロジェクト4；リードアクロスとリスクアセスメントのための物理化学特性解析ガイダンス

WPMN15に報告書ドラフト提出予定。

- ・プロジェクト5；リスク評価法、リスク管理ツール、不確実性に関して追加的データの必要性のメンバー国調査

プロジェクト計画を作成した。コメントを受けた後修正する

- ・プロジェクト6；TdTの質問項目改訂

新しく質問事項を追加し WPMN15 から適用、規制セミナーの中でハイライトを紹介していく。

⑨ SG8 報告

SG8 議長の米国から、プロジェクトの進捗が報告された。

- ・ナノマテリアルの暴露評価：ナノ銀のケーススタディ（米国、韓国）および労働現場でのナノマテリアルの空気中の測定方法と評価に関する階層的アプローチ（BIAC）の報告書を公開する
- ・2015年5月31日～6月3日に韓国ソウルで第31回ICOH (International Congress on Occupational Health) が開催され、併せて6月3日に暴露評価専門家ワークショップを行う。
- ・消費者および環境への暴露の調査（米国、カナダ）

WPMN15で調査結果を報告する予定。

⑨ 次回会合開催日程

第15回 WPMN：2015年11月2日～6日

第16回 WPMN：2016年6月13～17日

（2）ISOにおけるナノマテリアルに関する標準化

① ISO/TC229の体制

ナノマテリアルに関する国際標準化を推進する ISO/TC229 の体制を図 3-3-2-1 に示す。積極的参加国 (Participating countries: P-メンバー国) とは、規格案提出や規格案賛否の投票権を有する国である。

2006 年 9 月に国際電気標準会議(IEC)の中に「ナノテクノロジーの電子・電気応用」を検討する技術委員会 TC113 が設置されたため、共通するワーキンググループ(WG)は合同会合という形態を取るることになり、TC229 と TC113 の WG1 と WG2 は、各々、JWG1, JWG2 と名称改変を行った（図 3.3-1）。

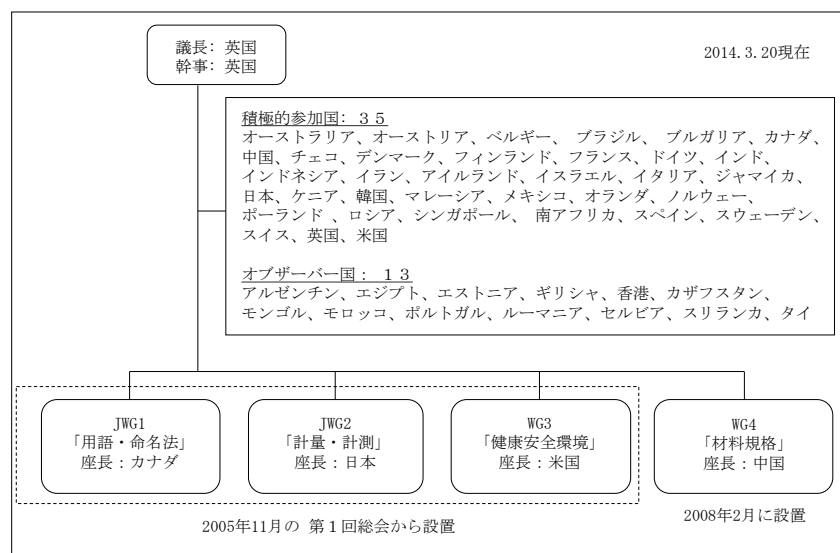


図 3.3-1 ISO/TC229 の体制図

② TC229 全体並びに 4 つのワーキンググループの役割

TC229 全体並びに 4 つのワーキンググループ(WG)の役割（業務範囲）を以下に説明する。

◇TC229 の役割：

以下的一方もしくは両方を含むナノテクノロジー分野における標準化

- ・ 大きさに依存する現象の開始が一般的に新しい応用を可能にするような、一次元あるいは複数の次元において、通常 100 ナノメートル以下ではあるが、これに限定しない、ナノスケールの物質と過程の理解と制御。
- ・ 個別の原子、分子、バルク物質の性質とは異なるナノスケール物質の性質を活かした、より高度な材料、装置、システムを創造するための、ナノスケール物質の性質の利用。具体的業務として、以下についての標準の開発を含む：
用語と命名法、標準物質の規定を含む測定法および計器の使用、試験方法論、モデル化とシミュレーション、科学的根拠に基づいた健康、安全性、および環境面での実践。

◇JWG1の役割：

コミュニケーションを容易にし、共通の理解を促進するため、ナノテクノロジー分野における一義的で一貫した用語および命名法を定義し確立する。

◇JWG2の役割：

ナノテクノロジーの計測とキャラクタリゼーションおよび試験方法の基準を、計測法

および標準物質の必要性を考慮に入れつつ開発する。

◇WG3の役割：

ナノテクノロジーの健康、安全性、および環境の分野において、科学的根拠をベースとした基準を開発する。

◇WG4の役割

製造ナノマテリアルに関する組成、性質および特性を規定する。ただし、ISO および IEC の他の技術委員会との重複範囲は除外する。

注記：その規格は原材料および中間材料の購入者、販売者および規制当局の間の情報連絡を促進する。

ナノテクノロジーは技術革新の速い分野であるため、当初は半年毎に総会が開催されていたが、数年前から原則 9 ヶ月毎の開催となった。しかし、最近審議すべき案件が増加し各 WG はそれぞれ総会間の間に中間会合を開く状況にある。

2013 年は 11 月 11 日～15 日にブラジルで第 16 回総会が、2014 年は 11 月 3 日～7 日にインドのニューデリーで第 17 回総会が実施され、2015 年は 9 月 28 日～10 月 2 日にカナダで第 18 回総会が開催される予定である。

③ ISO/TC229 規格類作成進捗（第 17 回総会報告より）

以下、第 17 回総会での各作業グループ（WG）の報告を元に、2014 年度の規格類の審議の進捗を確認する。

作業グループには、規格類を提案、検討するプロジェクトグループ（PG）がある。また、ISO で検討、作成、出版する規格類には、以下の 4 種がある。

- ・ International Standard (IS)：国際規格、公的に利用可能な規格。
- ・ Technical Specification(TS)：技術仕様書、将来的には IS になる可能性がある、現状は合意に至らない文書。
- ・ Technical Report：技術報告書、TS とは異なる種類のデータを収集した文書。
- ・ Publicly Available Specification(PAS)：緊急の市場ニーズに対応して、外部組織または WG 内の専門家の合意が得られた文書。

作業グループでは、上記の文書の議論に加え、規格類の制定を目指すプロジェクト提案に向けての予備検討（PWI：予備業務項目）も実施される。

総会で議論、審議のあった規格類を表 3.3-1 に整理する。

表 3.3-1 ナノ関連規格類の作業進捗

WG No.	PJ No.	規格化付与番号	総会での進捗	タイトル (非公式和訳)
JWG1		ISO/DTS 80004-1	改訂版出版に同意	Part 1: Core terms (基本語彙)
		ISO/DTS 80004-2	出版の最終段階	Part 2: Nano-objects: Nanoparticle, nanofibre and nanoplate (ナノ物体の語彙)
		ISO/DTS 80004-3	3年延長	Part 3: Carbon nano-objects (カーボンナノ物体)
	PG13	ISO/DTS 18110	出版に向ける	Vocabularies for science, technology and innovation Indicators (科学・技術・イノベーション指標の語彙)
	PG14	ISO/AWI TR 18401	WD継続審議	Plain language guide -- Explanation of core terms with examples (ナノテクノロジー語彙の平易な手引き)
	PG19	ISO/NP TS 80004-13	WD継続審議	Part 13: Graphene and other two dimensional materials (グラフェンと2次元材料の語彙)
JWG2		ISO/TS10867	TS延長	Characterization of single-wall carbon nanotubes using near infrared photoluminescence spectroscopy (SWCNTの近赤外ルミネッセンス分光法)
		ISO/TS11251	TS延長	Characterization of volatile components in single-wall carbon nanotube samples using evolved gas analysis/gas chromatograph-mass spectrometry (SWCNT中揮発物のGC-Mass分析)
	PG14	ISO/DTS 17466	文書改訂し出版へ	Use of UV-Vis absorption spectroscopy in the characterization cadmium chalcogenide quantum dots (カドミウムカルコゲナイド量子ドットの紫外可視吸収分析法)
	PG16	ISO/NP TS 19590	2015/1にDTS投票	Detection and sizing of nanoparticles in aqueous media via single particle inductively coupled plasma mass spectrometry (spICP質量分析による水系媒体中のナノ粒子の検出と粒子径測)
	PG17	ISO/NP TR 19716	WD修正中	Characterization of cellulose nanocrystals -- Particle morphology, purity and surface properties (セルロースナノ結晶の評価-粒子形状、純度、表面特性)
	PG18	ISO/NP TR 19733	WD作成前	Matrix of properties and measurement technique for graphene and other two-dimensional materials (グラフェンとその他2D材質の特性と測定技法)
WG3	PG1	ISO/NP TR 12885	改訂のための初会合	Health and safety practice in occupational settings relevant to nanotechnologies (ナノ関連職場での健康と安全の実践)
	PG12	ISO/NP TR 16196	WD修正中	Compilation and description of sample preparation and dosing methods for engineered and manufactured nanomaterials (工業ナノ材料のサンプル調整・服用に関する編集と描写)
	PG15	ISO/AWI TR 18637	2015/4までに新WD配信	General framework for the development of occupational exposure limits for nano-objects and their aggregates and agglomerates (ナノ物体及びその凝集物の職業暴露限界の開発のための一般的枠組み)
	PG16	ISO/AWI TS 18827	WD継続審議	Electron spin resonance (ESR) as a method for detecting reactive oxygen species (ROS) generated by metal oxide nanomaterials (金属酸化物により生成した活性酸素検出法としてのESR)
	PG17	ISO/AWI 19007	専門家承諾の後DIS投票	Modified MTS Assay for measuring the effect of nanoparticles on cell viability (細胞生存性に及ぼすナノ粒子の効果測定のための修正MTS試)
	PG18	ISO/AWI TS 19006	専門家承諾の後DTS投票	DCFH-DA Assay for evaluating nanoparticle-induced intracellular ROS production (ナノ粒子起因の細胞内活性酸素生成評価のためのDCFH-DA試)
	PG19	ISO/NP TR 19057	WD継続審議	The use and application of acellular in Vitro Tests and Methodologies to assess Nanomaterial Biodurability (ナノ材質の生態環境残留性評価のための無細胞in vitro試験・手法の使用と適用)
	PG20	ISO/NP TS 19337	専門家承諾の後DTS投票	Characterization of nanosuspensions to verify nano-object induced toxicity assessed in vitro (in vitroで評価したナノ物質起因の毒性を確認するためのナノ分散液評価方法)
	PG21	ISO/NP TR 19601	2015/3にWD送付	Aerosol generation for NOAA (nano-objects and their aggregates and agglomerates) air exposure studies (ナノ物体及びその凝集物の空気暴露評価のためのエアロゾル生成の研究)

注: IS(国際規格), TS(技術仕様書), TR(技術報告書)

WD(Working draft), DTS(TS draft), DIS(IS draft)

各作業グループでは、

- ・ JWG1 [用語・命名法]：5 件の技術仕様書 (TS) と 1 件の技術報告書 (TR)
 - ・ JWG2 [計測・評価]：4 件の技術仕様書 (TS) と 2 件の技術報告書 (TR)
 - ・ WG3 [健康安全環境]：1 件の国際規格 (IS)、3 件の技術仕様書 (TS)、5 件の技術報告書 (TR)
 - ・ WG4 [材料規格]：予備業務項目 (PWI) のみ
- について、各々、進捗があった。

4. 海外行政機関等の報告書の分析と主要なものの翻訳

4.1. 翻訳対象報告書の選定

海外行政機関・国際機関が発行する、ナノマテリアル等の安全対策等に関わる報告書の翻訳を行った。翻訳対象とする報告書の選定に当たっては、多層カーボンナノチューブの吸入暴露に関する海外や国内のナノマテリアル安全性研究の成果や手法の動向に関する情報が含まれるようにした。

翻訳を行った報告書一覧を表 4.1-1 に示す。また、全文の翻訳を添付した。

表 4.1-1 翻訳対象とした報告書一覧

No.	海外行政機関・国際機関名	報告書タイトル	公開年月
1	Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin	Toxic Effects of Various Modifications of a Nanoparticle Following Inhalation Research Project F 2246	2013
2	Safe Work Australia	Human Health Hazard Assessment and Classification of Carbon Nanotubes	2012.1
3	U.S.-CANADA REGULATORY COOPERATION COUNCIL ; RCC	Development of a classification scheme for nanomaterials regulated under the New Substances	2014
4	U.S.-CANADA REGULATORY COOPERATION COUNCIL ; RCC	Nanoparticle Screening Assessment Framework	2014
5	U.S.-CANADA REGULATORY COOPERATION COUNCIL ; RCC	Assessment of Nanomaterial Uses in Canada and the US	2014
6	OECD	Report of the questionnaire on regulatory regimes for manufactured nanomaterials 2010-2011	2014.9

4.2. 翻訳対象報告書の要約

表 4.1-1 に示した報告書の概要をまとめた。

(1) ナノ粒子の様々な修飾の吸入後の毒性影響

- タイトル：Toxic Effects of Various Modifications of a Nanoparticle Following Inhalation
- 機関：ドイツ連邦労働安全衛生研究所（Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin）
- 報告年：2013 年
- 要約：ナノマテリアルの発がん性と変異原性について既存の情報を評価した結果をまとめた報告書。この調査は今後の規制を検討するうえでの参考となる情報を得るために実施されたもの。調査では、発がん性の前兆の特定、異なる種類のナノスケ

ールの物体 (nano object) の毒性比較、バルクサイズの物体とナノスケールの物体の毒性比較などを目的として、様々なナノマテリアルに関する 100 件以上の実験結果を分析した。その結果、全てのナノマテリアルについて炎症が見られたほか、ナノスケールの物体は一貫してナノスケールではない物体 (non-nano object) よりも高い毒性を持つことがわかった。

(2) カーボンナノチューブの人の健康ハザードアセスメントと分類

- タイトル : Human Health Hazard Assessment and Classification of Carbon Nanotubes
- 機関 : オーストラリア労働安全局 (Safe Work Australia)
- 報告年 : 2012 年 11 月
- 要約 : 多層カーボンナノチューブについて、毒性データ等がない場合には、有害なものとして区分することを推奨しているレポートで、カーボンナノチューブの毒性に関する公開文献の広範なレビューを行った。多数の論文レビューにより、多層カーボンナノチューブが、長期あるいは繰り返しの吸入暴露により肺に損害を与える可能性がある。

(3) 新規化学物質として規制されるナノマテリアルの分類法開発

- タイトル : Development of a classification scheme for nanomaterials regulated under the New Substances (Work Element 2)
- 機関名 : 米加規制協力委員会 (U.S.-CANADA REGULATORY COOPERATION COUNCIL ; RCC)
- 報告年 : 2014 年
- 要約 : この報告書はワークエレメント 2「プライオリティの設定」に関するものであり、その実施項目は、懸念の有無に関わらずナノマテリアルの特性を決定する共通の基準を明らかにすることである。

作業計画の最初のアウトプットは、懸念の有無に関わらずナノマテリアルの特性を決定する基準案を開発することであった。この作業の一部として、カナダおよび米国の新規化学物質プログラム (米加規制プログラム) で、どのナノマテリアルがナノの観点から懸念がありそうかどうかを特定した。

さらに、規制上のナノマテリアルの定義はないが、米加規制プログラムは以下に基づいてナノマテリアルを判断する: (1) 粒径範囲が 1–100nm; さらに米国はナノマテリアルと判断するために追加の基準を使用している: (2) 少なくとも 10% の粒子が 1–100nm および/または (3) ナノスケールに特有の特性を示す粒子。

この分類体系の目的は、次のフレームワークを開発することである;

- (1) リスク評価において、どのナノマテリアル分類が典型的にナノ特有の考察が

要求されるかを特定する

- (2) ナノマテリアルの材料特有のリスク評価に当たり、用いるべき適切な情報の類似および／またはリードアクロスの選択を支援する。

(4) ナノマテリアルスクリーニング評価フレームワーク

- タイトル：Nanoparticle Screening Assessment Framework (Work element 3)
- 機関名：米加規制協力委員会 (U.S.-CANADA REGULATORY COOPERATION COUNCIL ; RCC)
- 報告年：2014 年
- 要約：ケーススタディ／比較分析研究における分析および議論に基づいて、ナノ粒子の追加試験必要性を評価し特定するための共通アプローチは、現在の粒子毒性学についての知見に基づいて開発されている。本報告書は、物理的特性（つまり粒子形状、アスペクト比、粒子／ファイバーサイズ、可溶性、組成および界面化学）に基づいたナノ粒子に対するヒト健康への懸念および追加試験の必要性の系統的アプローチを要約したものである。

(5) カナダと米国におけるナノマテリアル用途の評価

- タイトル：Assessment of Nanomaterial Uses in Canada and the US (Work Element 4)
- 機関名：米加規制協力委員会 (U.S.-CANADA REGULATORY COOPERATION COUNCIL ; RCC)
- 報告年：2014 年
- 要約：RCC ナノテク作業計画の作業要素 4 の作業項目は、ナノマテリアルに関する現状の商業活動の特徴付けを行い、将来の情報収集のために、空白部分を明らかにし、優先付けを行なうことである。

作業計画は、以下のとおりである；

- 商業データ収集活動からの既存の情報と知見を共有する。
- 上市されている工業ナノマテリアルに関する非企業秘密情報 (CBI) を共有する
- 情報が限られている領域を同定し、ステークホルダーに依頼してその空白を埋めるよう要請する。
- カナダと米国における工業ナノマテリアルの用途の解析を行う。

である。今後、カナダと米国における工業ナノマテリアルの用途の評価を完成させ、実施してきた協力活動と規制協力の機会と障壁を明らかにする。

本報告書はRCCナノテクイニシアチブ以前及び期間中の両国のデータ収集努力による収集したナノマテリアル用途の知見の現状を表している。この結果は、ナノマテリアル用途マトリクスの形にまとめられた。

(6) 工業ナノマテリアルの法制度に関する質問状に関する報告書 2010-2011

- タイトル : Report of the questionnaire on regulatory regimes for manufactured nanomaterials 2010-2011
- 機関名 : OECD
- 報告年 : 2014 年 9 月
- 要約 : WPMN のナノマテリアル規制に関するアンケートにより得られた情報を示したもので、4つのセクションからなる ;
 - 規制に関する情報更新
 - 定義及び/または当局によるナノマテリアルの規制アプローチ
 - 規制の課題
 - 協力の機会