ナノマテリアル安全対策調査事業
報告書

平成 28 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 1
1.1. 調査方法 1
（1） 調査対象物質 1
（2） 調査方法 1
1.2. 調査結果概要 1
（1） 調査対象物質の使用状況のまとめ 1
（2） 調査対象物質ごとの調査結果 3
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 29
2.1. 検索方法 29
2.2. 論文選択手順・方法 30
2.3. 文献分類表 31
（1） 文献サマリー 32
3. ナノマテリアル等の安全対策に係る国際動向調査 139
3.1. ナノマテリアル等利用製品の国際規制動向 139
（1） 概要 139
（2） 定義 139
（3） 各国等における規制動向 149
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 164
（1） 第 4 回持続可能ナノテクノロジー機構（SNO）会議 164
（2） MARINA Workshop 178
（3） Seminar on Risk Assessment and Regulatory Programmes for Nanomaterials 183
4. 海外行政機関等の報告書の分析と主要なものの翻訳 193
4.1. 翻訳対象報告書の選定 193
4.2. 翻訳対象報告書の要約 193
（1） 消費者製品のナノマテリアルの有害性評価 193
（2） 消費者製品中のナノマテリアルの暴露評価 194
（3） ナノマテリアルのグループ化 195
（4） カーボンナノチューブとナノファイバーの暴露評価：14 サイト訪問による分析 195

＜附属書（別冊）＞
海外主要報告書 4 報の全訳

概要

本報告書は、平成27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、銀、亜鉛（主に酸化亜鉛）、ナノセルロースを取り上げた。

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回持続可能ナノテクノロジー機構（SNO会議）､②MARINA Workshop、③ナノマテリアルに関するリスク評価・規制プログラムセミナー、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 (2015)" 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, single-walled carbon nanotubes, multi-walled carbon nanotubes, nano graphen, nano silver, and 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 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 Sustainable Nanotechnology Organization Conference 2015 (2015 SNO Conference). 2) MARINA (Managing Risks of Nanomaterials) Workshop. 3) Seminar on Risk Assessment and Regulatory Programmes for Nanomaterials.

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（水酸化フラ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

調査対象物質のうち、既に製品化されている物質について、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）等についても聴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、可能な限り聴き取り調査を行った。なお、平成 26 年度本事業の調査対象物質については、そ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。

フラーレン、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、フラーレン及びナノクレイ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、酸化チタン、ナノシリカ、プラチナ、酸化亜鉛については、市場規模はわずかながら年々拡大しているものの、平成 26 年度調査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。また、金については開発中ではあるものの、平成 26 年度調査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８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）
- 銀
- ナノセルロース

そこで、上記８物質を平成 27 年度調査対象物質として選定した。

経済産業省によると、多層カーボンナノチューブについては、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たが、2014 年度には、2012 年度並みに生産量が回復したようである。これに対して、単層カーボンナノチューブの用途開発は、依然として盛んである。他方、グラフェンについては、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はあるが、2015 年度の用途開発は目覚ましく、大量生産技術に関する特許も取得したことから、今後、国内での市場が拡大することが期待される。また、国内の酸化チタンの 2014 年度販売量は 2013 年度から半減し、酸化チタンに関する研究開発、用途開発はともに、2014 年度以降は低迷している。

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 26 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	回復	用途開発が盛んである	○
グラフェン	開発中	用途開発が盛んである	○
酸化チタン	半減	新たな研究開発はほとんど行われていない 新たな用途開発も確認できない	○
ナノシリカ	横ばい	新たな研究開発はほとんど行われていない 新たな用途開発も確認できない	○
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	新たな研究開発はほとんど行われていない	○
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	新たな研究開発はほとんど行われていない	○
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

（ア） 単層カーボンナノチューブ（SWCNT）

(i) 製品概要

<table>
<tr><td>サイズ</td><td>直径：0.5nm～3 nm
長さ：～10 µm</td></tr>
<tr><td>形状</td><td>アスペクト比の大きな凝集体（バンドル構造）</td></tr>
<tr><td>計測技術</td><td>SEM、TES</td></tr>
<tr><td>物性</td><td>・ 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/cm^3</td></tr>
<tr><td>真密度</td><td>1.3～1.4 g/cm^3</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 □s 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.□ 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 ℃（文献値）</td></tr>
<tr><td>密度</td><td colspan="3">1.7～1.9 g/cm^3 at 25 ℃（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</td></tr>
<tr><td>性能／特性</td><td>・ 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キャップ半導体としての挙動を示す。</td></tr>
<tr><td>製造会社</td><td>【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</td></tr>
</table>

	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））

(ii) 市場規模

SWCNT は、現時点ではまだ開発段階であり、市場規模は小さく、2014 年の世界市場規模はメーカーの出荷量ベースで 0.8 トンと報告されている（矢野経済研究所　ニュースリリース）。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きたが、2015 年 11 月には、日本ゼオンが産総研で開発した「スーパーグロース法」を利用した量産工場が稼働した。こうした動向により、SWCNT は試料から量産品向けへの供給に移行し、今後はトン単位で市場が動くものと予想されており（矢野経済研究所）、矢野経済研究所の推計によれば、2015 年の世界市場規模は 2 トン（見込み）、2016 年は 4 トン（予測）であり、今後、市場が拡大することが予想されている。

今後は、こうした供給体制の整うことにより、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。

(iii) 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：軽量部材
- 医療分野：再生医療

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、また構造により電気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。

(iv) 研究開発事例

① インジウムを含まないフレキシブルなカーボンナノチューブ有機薄膜太陽電池を開発

開発者：東京大学大学院理学系研究科　化学専攻　特任教授　松尾豊、工学系研究科　機械工学専攻　教授　丸山茂夫

開発機構：東京大学

概要：東京大学大学院理学系研究科の松尾豊特任教授、東京大学大学院工学系研究科の丸山茂夫教授らの研究グループは、高純度で透明性の高いカーボンナノチューブ薄膜のエネルギー準位を変え、有機発電層からプラスの電荷（ホール）のみを選択的に捕集して輸送するカーボンナノチューブ透明電極を開発し、それによりレアメタルであるインジウムを用いない有機薄膜太陽電池のエネルギー変換効率を向上させた。具体的には、6%以上のエネルギー変換効率を得ることができ、従来のカーボンナノチューブを電極とした有機薄膜太陽電池の変換効率を 3 倍に向上させることに成功した。さらに、PET（ポ

リエチレンテレフタラート）フィルムの上にカーボンナノチューブ薄膜を転写して用いることでカーボンナノチューブ薄膜の柔軟性を活かし、フレキシブルな太陽電池の開発にも成功した。

カーボンナノチューブは安価な塩化鉄などの鉄触媒とアルコールや一酸化炭素などの炭素源を用いて合成され、原理的には安価に製造することが可能といえる。インジウムの代わりにカーボンナノチューブを活用することにより、有機系太陽電池の実用化へ向けた研究が加速されるものと期待される。また、有機発電層に用いる共役系高分子やフラーレン誘導体も炭素豊富な有機化合物であり、電極に用いるカーボンナノチューブを含めて炭素を主な構成成分とする新たなカテゴリーに属する有機系太陽電池の創出にもつながるものと期待される。有機系太陽電池が実用化されれば、より一層太陽エネルギーを活用する社会になることが期待される。今後は有機材料やデバイス構造の最適化を行うことにより、さらなる高効率化研究に取り組む予定としている。

② 衣類のように柔らかく丈夫なトランジスタを開発

開発者：産業技術総合研究所　ナノチューブ実用化研究センター　CNT 用途チーム　関口貴子　主任研究員、田中文昭　元特別研究員

開発機構：産業技術総合研究所

概要：研究チームは、衣類のように柔らかく、さまざまな負荷（伸縮、曲げ、ねじり、圧縮、衝撃）をかけても壊れないトランジスタを開発した。このトランジスタは、金属や酸化物のような硬い材料を一切使用せず、単層カーボンナノチューブ（単層 CNT）、ゴム、ゲルといった柔らかい炭素系材料だけで構成されるため、負荷をかけると全ての部材が一体化して変形する。衣類に付けて着用したときには、人体の形状に合わせて自在に変形でき、身体に与えるストレスも少なくてすむ。将来的には、生体センシングシステムや介護ロボットの皮膚など、医療用ヒューマンモニタリングエレクトロニクスへの応用が期待される。

③ カーボンナノチューブ集積化マイクロキャパシターを開発

開発者：産業技術総合研究所　ナノチューブ実用化研究センター　CNT 用途チーム　小橋和文　主任研究員、ラスチェスカ・カロリーナ・アーズラ　特別研究員（現：技術研究組合　単層 CNT 融合新材料研究開発機構　パートナー研究員）

開発機構：産業技術総合研究所

概要：研究チームは、アルミ電解コンデンサーと同等な性能（作動電圧 4 V、静電容量 30 μF、充放電速度（緩和時定数）数 ms）を持ちながらも体積が 1/1000 となる超小型のカーボンナノチューブ（CNT）集積化マイクロキャパシターを開発した。キャパシター電極材料として有望な、スーパーグロース法で作製した高純度で比表面積の大きい単層 CNT を用いて、リソグラフィーによる CNT 膜電極微細加工技術と電極隔離技術を開発し、超小型で集積化されたキャパシターを開発した。今回開発した CNT 集積化マイクロキャパシターは、アルミ電解コンデンサーの代替、電子機器の軽薄小型化、超小型電子機器の電源への応用が期待される。

(v) 利用事例

日本ゼオンでは、スーパーグロース法による SWCNT「ZEONANO™SG101」を製造・販売している。同製品の代表性状は表 1.2-2 のとおりである。

表 1.2-2　ZEONANO™SG101 の代表性状

外観	黒色紛体
比表面積	800～1,000　m^2/g
CNT 配向集合体の長さ	300～500μm
平均直径	3～5nm
Fe 不純物量	≤500ppm
炭素純度	≥99%

また、同社は、同製品の個々の特性に応じた用途例を提案している（表 1.2-3)。

表 1.2-3　ZEONANO™SG101 の特徴と用途例

特徴	利点	用途例
単層	単位重量当たりの強度:大	高強度ポリマー
比表面積大	電荷を多く蓄えることが可能	蓄電デバイス電極
長尺（数 100μm）・高アスペクト比	バインダーフリーで自立膜形成	蓄電デバイス電極
	パーコレーション閾値:低	導電性ポリマー、帯電防止ポリマー、導電性塗料
高純度	電解液などと反応しにくい	蓄電デバイス電極

（※ゼオンテクノロジーウェブサイトより）

日本ゼオンでは上記 SWCNT の量産工場を 2015 年より稼働しており、工場の生産能力は、SGCNT の長さや基板上の密度によって変わるが、数トン／年程度である。現在は、まだサンプル出荷がほとんどであり、商品化に至ったものはまだない。

また、日本ゼオンでは従来よりゴム製品の開発・販売を行っており、自社では、既成事業とコラボして、ゴムに SWCNT を練りこむことで、高温でも耐久性が向上し、疲労に強い用途を開発中である。実際の用途としては、高温・高圧装置のリース剤や石油掘削のシール材等をサンプル出荷している。この用途ではシール材交換によるプラント停止が減り稼働率が上がるため、高価なシール材でも適用可能としている。

(vi)　ナノリスク評価

単層カーボンナノチューブを製造している事業者は、暴露等の対策として、CNT を取扱う際には、クリーンルーム内で作業を行い、排気は HEPA フィルター、スクラバー経由で大気に排出している。また、CNT 製造装置は、クリーンルーム内に設置されており、作業者とは隔離されている。保管は、密閉性の高い容器での保管を行い、作業記録を徹底している。他の事業者においても、製造設備は完全密閉であり、後工程の製品の取り出し、梱包時には、可能な限り粉じんを除去するように、局所排気設備等を使用している。また、作業者の装備についてもエアラインマスク等を装着する等して、可能な限りの防塵強化を行っている。出入口にはエアーシャワー室を設置しているほか、集塵にはバグフィルター、HEPA フィルターを設置している。

労働者に対しては、作業従事者に暴露対策を説明するほか、作業時には、ウエア、手袋、マスク、ゴーグルの保護具の着用を徹底して実施している。また、労働者教育として、関係官庁の動向を説明している。別の事業者では、既に発せられている通知、ガイドラインについては、労働者に教育しているほか、労働安全衛生法上の各種教育、ISO9001、ISO14001 に基づく力量教育等により、資格取得に努め、理解度の向上を進めている。

（経済産業省　ナノマテリアル情報提供シート）

また、日本ゼオンでは、TASC（技術研究組合単層 CNT 融合新材料研究開発機構）とともに、自主安全管理支援のために排出・暴露評価技術の開発、自主安全管理支援のための簡易で迅速な有害性評価手法の開発、自主安全管理支援のための安全性情報の提供と技術

普及活動、を行っている。その成果として、TASC と AIST（独立行政法人　産業技術総合研究所）の安全科学研究部門（RISS）とともに、「CNT の安全性試験のための試料調整と計測、および細胞を用いたインビトロ試験の手順」、「CNT の作業環境計測の手引き」、「ケーススタディ報告書（安全性データおよび TASC 自主安全管理の紹介）」、「SG-単層 CNT データ＆自主安全管理」を作成し、AIST－RISS あるいはゼオンナノテクノロジーのウェブサイトに公開している。また、NEDO 研究プロジェクト「ナノ粒子特性評価手法の研究開発」（2006-2011 年）の結果として策定したリスク評価書、その考え方の概略、有害性試験のための試料調整と計測のための手順書、排出・暴露評価書、有害性評価のための手順書、気中粒子の校正に関する手順書、フィルタに関する手順書、社会受容のためのビジョンを、ゼオンナノテクノロジーのほか、NEDO、AIST 等のウェブサイトに公開している。（NEDO ウェブサイト、AIST-RISS ウェブサイト、ゼオンテクノロジー ウェブサイト）

（イ）　多層カーボンナノチューブ（MWCNT）

(i)　製品概要

<table>
<tr><td>サイズ</td><td>直径：30 ～100 nm
長さ：～数 10 μm</td></tr>
<tr><td>形状</td><td>アスペクト比の大きな凝集体（バンドル構造）</td></tr>
<tr><td>計測技術</td><td>SEM、TES</td></tr>
<tr><td>物性</td><td>・ 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、その性質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
<table>
<tr><th rowspan="2">項目</th><th rowspan="2">単位</th><th colspan="3">代表値</th><th rowspan="2">測定法</th></tr>
<tr><th>NT-7</th><th>□T-12</th><th>□T-15</th></tr>
<tr><td>繊維径</td><td>nm</td><td>65</td><td>110</td><td>150</td><td rowspan="2">FE-SEM</td></tr>
<tr><td>アスペクト比</td><td>－</td><td>>100</td><td>>100</td><td>>1□□</td></tr>
<tr><td>かさ密度</td><td>g/cm³</td><td>0.007</td><td>0.0□2</td><td>0.014</td><td>沈降嵩密度法（HCC 法□</td></tr>
<tr><td>真密度</td><td>g/cm³</td><td>2.1</td><td>2.1</td><td>2.1</td><td>ピクノメーター</td></tr>
<tr><td>比表面積</td><td>m²/g</td><td>28</td><td>17</td><td>14</td><td>Ni 吸着法</td></tr>
<tr><td>D/G 比</td><td>－</td><td>□.1</td><td>0.1</td><td>0.1</td><td>ラマン分光光度法</td></tr>
<tr><td>酸化温度</td><td>℃</td><td>600</td><td>□00</td><td>60□</td><td>TG-DTA</td></tr>
<tr><td>純度（炭素純度≒CNT□度）</td><td>%</td><td>>99.5</td><td>>99.9</td><td>>99.9</td><td>蛍光 X 線</td></tr>
</table>
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。
<table>
<tr><th>項目</th><th>24PS</th><th>AR10</th></tr>
<tr><td>外径（nm）</td><td>70～80</td><td>70～80</td></tr>
<tr><td>長さ（μm）</td><td>5</td><td>1</td></tr>
<tr><td>比表面積（m²/g）</td><td>50</td><td>70</td></tr>
<tr><td>かさ密度（m²/g）</td><td>0.05</td><td>0.23</td></tr>
</table></td></tr>
</table>

	粉体低効率□Ω□c□）　0.033　□.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） ・ 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））

(ii)　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	2015 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	3,700	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「2014 年　高機能添加剤・ハイブリッドマテリアルの将来展望」

MWCNT の NBCI 会員企業の製造量

	2012 年度	2013 年度	2014 年度
製造量（トン）	101	46	70-120

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（富士キメラ総研推定）。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 が呼吸有害性をもつ可能性が示唆されたことによる影響と考えられる。一方で、MWCNT の世界市場については、中国における LiB 導電助剤向けでの 300 トン超の使用量の推定をもとに、2015 年に見込みベースで 700 トンとの予測値も報告されている（2015 年版カーボンナノチューブ市場の現状と将来展望、矢野経済研究所ニュースリリース）。

(iii) **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、キャパシター、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

(iv) **研究開発事例**

① カーボンナノチューブ･ポリアミドのナノ複合膜による高性能､多機能性逆浸透（RO）膜の開発

開発者：科学技術振興機構「世界の豊かな生活環境と地球規模の持続可能性に貢献するアクア・イノベーション拠点」（日立製作所インフラシステム社　技術最高顧問　上田新次郎　プロジェクトリーダー）

開発機構：信州大学、物質・材料研究機構、長野県、日立製作所インフラシステム社、東レ、昭和電工、理化学研究所、高度情報科学技術研究機構、北川工業、トクラス、海洋研究開発機構、ソニーコンピュータサイエンス研究所、東京大学、中央大学、宇宙航空研究開発機構

概要：非共有結合的に弱く表面修飾（改質）した多層カーボンナノチューブ（MWCNT）と芳香族ポリアミドとで、厚さ約 100nm のナノ複合膜を独自の方法で調製し、逆浸透膜（RO 膜）を界面重合によって生成した。この RO 膜活性層は、よく分散させた CNT（15.5 重量%）とマトリックス（母材）のポリアミドの複合で構成されている。従来の CNT とエラストマー・樹脂類などの複合系（ナノ複合材）では、CNT の均一分散が困難だったため、CNT の特性が十分に発揮されてはいなかった。RO 膜の分野でも CNT との複合化は多数行われ発表されているが、同様に CNT の均一分散が困難であったために、CNT の特性を活かした開発成果は得られていない。一方、信州大学グループは CNT を均一分散するのではなく解繊（かいせん／繊維を解きほぐすこと）という独自の手法を開発し、様々な分野で成功を収めてきた。本研究では信州大学グループが有する CNT 解繊技術を、従来の薄膜形成技術と融合することで新しいナノ複合膜形成技術を開発し、この技術を用いて、従来は不可能であった、高濃度の MWCNT が解繊分離したポリアミド複合膜による RO 膜の開発に成功した。開発した MW CNT－ポリアミド複合膜は透水性能が向上するだけでなく、以下に示すように優れた耐汚染性および耐塩素性を有することが分かった。開発した MW CNT－ポリアミド複合膜の特徴は、フィラー（添加材）のナノチューブ表面周辺に水透過性、脱塩性の良好な特異な微細構造を持った芳香族ポリアミド層を形成したこと、及びそのナノ構造の RO 膜機能への寄与を明らかにしたことである。また、ポリアミド層への MWCNT の添加は、処理水中に含有する鉄分の吸収を抑制する効果を有することを見出し、これが RO 膜表面にファウリング層の形成を防ぐ効果をもたらすことを明らかにした。さらに、特筆すべき本複合膜の機能としては、耐塩素水性が著しく向上する点がある。これらの特徴は、開

発したナノ複合膜が塩水から塩分を排除する高い脱塩性能を示し、かつ高い透水性を有していることを示している。また、耐ファウリング性、耐塩素性を兼備したものであり、これまで多数報告された CNT／ポリアミド複合膜と比較して、卓越した RO 膜機能を有することも分かった。これらの機能発現は解繊技術の応用という独自の複合膜調製法が寄与したもので、CNT の周辺に形成される固有のポリアミドのナノ構造がこの RO 膜の高い透水性と脱塩性に寄与していることは、TEM（透過型電子顕微鏡）の画像でも裏付けられている。開発した MWCNT－ポリアミド複合膜による RO 膜では、市販の CNT を用いているため、水の世紀における新たな膜として実用的発展が期待できる。

② 宇宙エレベーターの材料　カーボンナノチューブの耐久性を国際宇宙ステーションで実験へ

開発者：大林組、静岡大学、有人宇宙システム株式会社

開発機構：大林組、静岡大学、有人宇宙システム株式会社

概要：大林組は、静岡大学と有人宇宙システム株式会社と共同で、航空宇宙産業向け先端材料の宇宙環境曝露実験を開始することを 5 月に発表した。これは、国立研究開発法人宇宙航空研究開発機構（JAXA）の「簡易曝露実験装置（ExHAM）」の利用テーマとして採択されたもので、国際宇宙ステーション/「きぼう」日本実験棟の船外実験プラットフォームを利用して行うものである。大林組ではこれまでに、先端材料であるカーボンナノチューブ（以下 CNT）の利用を想定した未来の宇宙インフラ建設構想を発表している。

この実験は、CNT の建設材料としての可能性を探る各種実験の一環として、宇宙曝露環境における耐久性を検証することを目的としている。CNT は、高い軽量性（アルミニウムの約半分の比重）、高機械強度（鉄鋼の約 20 倍の引張強度）、高弾性力、高電流密度耐性（銅の 100 倍以上）、高熱伝導性（銅の 5 倍以上）など多くの優れた性質を持つ。現在、CNT の複合材は電池材料などの用途で使われ始めているが、将来、CNT 繊維を構造材などほかの用途で利用することが期待されている。一方で、使用環境が CNT に及ぼす影響はほとんど知られておらず、紫外線（UV）、放射線、原子状酸素（AO）などによる劣化の可能性がある。個別要素についての環境評価は地上試験でも可能であるが、宇宙空間のように各要素が複合的に影響する環境下での評価は、実験試料が回収可能な実験でのみ実現可能である。この実験では、CNT から構成する標準試験体と、ほかの炭素材料から構成する比較試験体を用いて材料による耐久性の差異、曝露期間および曝露位置による劣化の差異などを把握した。

本実験で使用する CNT は高品質で長尺な撚糸（ねんし）の形状で、直径約 20 ナノメートル（ナノメートル：10 億分の 1 メートル）の多層カーボンナノチューブ繊維をより合わせて試験体とした。複数の試験体で試験を実施し、宇宙環境への曝露期間は、試験体により 1 年間または 2 年間を予定している。第一回目の試験体は、2015 年 4 月に米国ケープカナベラル空軍基地から、米国の民間ロケットにより成功裏に打ち上げられた。今後、ExHAM に取り付けられた後、「きぼう」船外実験プラットフォームに置かれ、曝露実験を開始する。1 年または 2 年の曝露後には試験体を回収し、状態を分析することにより、宇宙環境における耐久性を調査する。CNT の機械的強度や、その変化をもたらす結晶欠陥密度の変化などを観測することにより、宇宙環境における原子状酸素、放射線、紫外線などの影響を調べる予定である。

(v) 利用事例

新たな利用事例は確認できなかった。

(vi) ナノリスク評価

CNT を輸入している事業者が国内で加工する際には、閉鎖系で加工を行っているほか、

局所排気装置等を使用して粉じんの除去を行っている。

また、労働者については、加工装置に CNT を投入する際、あるいは取り出す際に、平成 21 年 3 月公表の経済産業省、厚生労働省、環境省のナノ粒子取扱いガイドラインを参考として、労働者は保護具を着用し、局所排気装置で粉じんを除去し、労働者に暴露しないように管理するとともに、加工記録を管理している。

環境への排出に関しては、CNT の加工は極めて限定された空間で行っており、閉鎖系ない、もしくは局所排気装置を用いており、既存の手法で判断する限りは、環境への排出はほとんどない。

（経済産業省　ナノマテリアル情報提供シート）

（ウ） グラフェン

(i)　　製品概要

<table>
<tr><td>サイズ</td><td>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</td></tr>
<tr><td>形状</td><td>ごく薄のシート状</td></tr>
<tr><td>計測技術</td><td>TEM、SEM</td></tr>
<tr><td>物性</td><td>・ 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、バンドキ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® Gra□hen Na□o□latel□ts</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
<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>□9.2%</td><td>98□□%</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>平均フレーク厚</td><td>1.6nm（３分子層未満）</td><td>12nm（30～50 分□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（□部）</td></tr>
<tr><td>電□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</td></tr>
<tr><td>性能／特性</td><td>・ 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）。バンドキ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キャップが生じる。
・ 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</td></tr>
</table>

	・ 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） ・ Angstron（米国） ・ Vorbeck（フランス）

(ii) 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」）。

グラフェンの世界的な市場は、主に、Angstron、XG-Science、Vorbeck の 3 社で占められ、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 Needds Sales-Nanalyze）。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 Needds Sales-Nanalyze）。

国内でも、2015 年の年間販売量 240 トンが予測されており（グラフェンプラットフォーム　平成 26 年度ヒアリング）、2015 年 4 月には、グラフェンプラットフォームはグラフェンを安価に大量生産する技術を開発し、その生成物の製品についての基本特許を取得した。このように、グラフェンについては、国内での開発が盛んに進められている。

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。

(iii) 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、ガスケット
  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。

(iv) 研究開発事例

① グラフェン大量生産技術特許

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：天然黒鉛から高品質のグラフェンを安価に大量生成する技術を開発し、その生成物（グラフェン前駆体）の製品についての基本特許を取得した。一般的には、天然黒鉛は結晶性が高いため、グラフェンへの剥離は困難とされてきた。天然黒鉛のうち 90%以上は AB 型積層であり、層の相対位置が A-B 間で六員環が半分ずれた積層構造を持っている。層間の結合エネルギーが最も強く、安定構造であるため、A-B 間の結晶性が高いため、剥離しにくいという問題があり、従来の剥離法では低濃度のグラフェンを生成してから濃縮工程を経る必要があった。このため大量生産には向かず、実験用など限られた用途にしか使えなかった。一方、今回開発したグラフェン量産技術では、AB 型積層の天然黒鉛に電波および物理的な力を加えることによって、ABC 型積層構造を持ったグラフェン前駆体に変性させる。ABC 型積層では、層の相対位置が A-B 間で六員環が半分ずれ、さらに B-C 間でも半分ずれるため、A-C 間では六員環 1 個分の大きなずれが生じ、層間の結合エネルギーが弱くなることになる。このため、グラフェン前駆体は結晶性が低く剥離しやすくなり、濃縮工程を経なくても高濃度のグラフェンを大量生成できる。天然黒鉛からのグラフェン精製を超低コストに大量生産剥離を容易にできるという点で、従来のグラフェン生成理論とは大きく異なるものであり、学術的価値と製造技術革新の両面から注目されている。独自のプロセス技術によって、天然黒鉛に通常

は 10%未満しか含まれていない ABC 型積層の割合を 40%以上へと変えることができる。この生成プロセスでは、天然黒鉛に対して、マイクロ波、ミリ波、プラズマ、電磁誘導加熱（IH）、磁場などの電波的力による処理と、ボールミル、ジェットミル、遠心力、超臨界などの物理的力による処理を併用するのが特徴である。この処理を真空または気中で施すことで、グラフェンへの剥離が容易な前駆体を短時間で得ることができ、３億円程度の生産装置で、１日１トンのグラフェン前駆体の生産が可能である。

②　電子レンジとイオン液体で高速、高効率なグラファイト剥離に成功

開発者：東京大学大学院　工学系研究科　化学生命工学専攻　相田卓三　教授（理化学研究所　創発物性科学研究センター　副センター長）、東京大学大学院　工学系研究科　化学生命工学専攻　松本道生　大学院生ら　研究グループ

開発機構：東京大学、理化学研究所、東京工業大学

概要：研究グループは、新しく合成開発したイオン液体とマイクロ波の組み合わせを用いることで、30 分という短時間に天然グラファイト（グラフェンの積層体）を 1 層、1 層のグラフェンへと破格に高効率（単層グラフェン選択性：95%）に剥がす手法を開拓した。この手法では原料グラファイトに対し生成物であるグラフェンを 93%という高い効率で回収することが可能で、さらに得られるグラフェンは構造欠陥をほとんど含まず、また、剥離が完全に進行しないがゆえに生成される複層物のグラフェンによる実験汚染も少ないことを明らかにした。本研究によって示されたグラファイトの破格な高効率剥離法は、より複雑・高機能なナノ構造体に関する科学技術の進歩と次世代エレクトロニクス分野での応用に大いに貢献すると期待される。

③　グラフェンナノリボンへのホウ素原子のドープに成功

開発者：バーゼル大学　物理学科　川井茂樹　シニアサイエンティスト、名古屋大学　物質科学国際研究センター　斉藤尚平　助教、山口茂弘　教授ら

開発機構：バーゼル大学、名古屋大学

概要：バーゼル大学物理学科の川井茂樹シニアサイエンティストと名古屋大学物質科学国際研究センターの齊藤尚平助教、山口茂弘教授らは、新たに合成した前駆体分子を金属表面に蒸着し精密化学反応を行うことにより、世界で初めてホウ素をドープしたグラフェンナノリボン（B-GNR）の生成に成功した。グラフェンは、電子移動度が高く、電子デバイスの性能を大幅に向上させると期待されている材料だが、バンドギャップがないため電気が流れていない状態を作ることができない。しかし、二次元のシートからナノリボン状の構造にすることで、その幅に対応したバンドギャップを生成できる。一方、グラフェンナノリボン（GNR）に炭素以外の原子をドーピングする研究も行われており、これまでに n 型にする窒素のドープは実現されていたが、p 型にするホウ素のドープの成功報告はなかった。そのため、ドープしたホウ素がもたらす電子状態や化学吸着特性は不明だった。

今回 JST さきがけの同一研究領域内の研究グループは、新たに設計、合成したホウ素を含む前駆体分子を金属表面上に蒸着し、さらに三段階加熱することにより、ホウ素を含んださまざまな幅の GNR の生成に成功した。その分子構造を超高分解能原子間力顕微鏡で直接観察し、実際に設計した位置にホウ素原子がドープされていることを確認した。また、走査型トンネル顕微鏡を用いて 2.4eV のバンドギャップがあることを測定した。さらに、ホウ素のルイス酸特性を利用し、一酸化窒素の吸着素子になることを示した。今後、開発した B-GNR 素子を使うことでカーボン薄膜素子のバンドギャップエンジニアリングや、超高感度ガスセンサーの実現が期待される。

④　大容量の蓄電が可能な「リチウム空気電池」用電極材料の開発

開発者：東北大学原子分子材料科学高等研究機構　陳　明偉　教授ら

開発機構：東北大学　原子分子材料科学高等研究機構（AIMR）

概要： JST 戦略的創造研究推進事業の一環として、東北大学原子分子材料科学高等研究機構（AIMR）の陳明偉 教授らは、3 次元構造を持つナノ多孔質グラフェンによる高性能なリチウム空気電池を開発した。現在の電気自動車に使われているリチウムイオン電池の電気容量では、200km 程度しか走行できず、走行距離を飛躍的に伸ばすために新しいタイプの大容量の蓄電池の開発が望まれている。近年、注目されている新しい二次電池の中に「リチウム空気電池」がある。この電池はリチウムイオン電池とは異なり、正極にコバルト系やマンガン系の化合物を用いることなく、リチウム金属、電解液と空気だけで作動し、リチウムイオン電池の 5～8 倍の容量を実現できるとされている。

陳教授らはこのリチウム空気電池の正極に新たに開発した多孔質グラフェンを使用し、電極の単位重量あたり 2000mAh の大きな電気エネルギーを持ち、かつ 100 回以上の繰返し充放電が可能なリチウム空気電池の開発に成功した。正極に使用した多孔質グラフェンは、グラフェンの持つ電気伝導性に加えて、大きな空隙を持つことから、大容量の電極材料となりうることに着目したものである。現時点では、少量の貴金属を触媒に使用し、また、充電時の過電圧が大きいなどの課題は残るが、実験結果を電気自動車の走行距離に換算すると充電 1 回あたりで 500～600km の走行に相当する結果が得られた。今後、さらなる改善を行うことで実用的な電気容量と寿命への到達が期待される。

⑤　二層グラフェンでバレー流の生成／検出に成功

開発者：理化学研究所 創発物性科学研究センター、物質・材料研究機構 先端的共通技術部門 先端材料プロセスユニット 超高圧グループ　谷口 尚　グループリーダー、同機構 環境・エネルギー材料部門 光・電子材料ユニット 光・電子機能グループ　渡邊 賢司　主席研究員

開発機構：理化学研究所、物質・材料研究機構

概要：東京大学 大学院工学系研究科の島崎 佑也　大学院生、山本 倫久　講師、樽茶 清悟　教授らの研究グループは、電気的に反転対称性を破った二層グラフェンにおいて、バレー流の生成、検出に初めて成功した。単層グラフェンのままでは垂直電場により結晶の反転対称性を破ることはできないが、二層にすることで上下の層にエネルギー差ができるため、結晶の反転対称性を破ることができる。二層グラフェンも単層グラフェンと同様に幾何学的位相を持つため、結晶の反転対称性を破ることでバレーホール効果を誘起することができる。さらにエネルギーギャップを垂直電場により制御することで、電流からバレー流への変換効率も広範囲に渡り制御することができる。研究グループはこの二層グラフェンの電場での制御性に着目し、研究を行った。

研究グループは上下のペアの電極を用いることで二層グラフェンの電子密度を制御すると同時に、垂直電場を制御した。この系においてバレーホール効果によりバレー流を電気的に生成し、電流の漏れ出しの寄与を無視できる 3.5 マイクロメートルの長距離にわたり伝送した後に逆バレーホール効果によりバレー流を電圧に変換することで検出した。検出した電圧と注入した電流の比を非局所抵抗として、バレー流の伝送の指標として評価した。研究グループは垂直電場により反転対称性を破った際に巨大な非局所抵抗が出現することを発見した。バレー流を介した輸送である場合、非局所抵抗は抵抗率の 3 乗に比例することが予想される。温度 70 ケルビン（約-203℃）において垂直電場により抵抗率を変調した際にこの 3 乗の関係が実際に観測され、非局所抵抗がバレー流を介した輸送に起因することを実証した。

今回はゲート絶縁層を破壊しない程度の大きさに垂直電場を制限したため、室温での動作は実証できていないが、加える垂直電場を増大すれば変換効率はさらに向上し、原理的には室温での動作が可能である。またバレー流を生成する際に流れる電流によるエネルギー消費についても、変換効率の向上により改善できると考えられ、二層グラフェンを用いることでバレー流を用いた低消費電力エレクトロニクスの実現が期待される。

(v)　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トン規模となる。

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。

また、NEDO プロジェクトにおいて、TASC は、TASC の組合員である（株）カネカが中心となって、これまで作製が困難であった高品質多層グラフェンの開発に成功し、大型粒子加速器のビーム形状測定センサー材料として実装された。今回開発された多層グラフェンは従来の金属材料に比べて非常に薄く、ビーム損失が小さい、上部で耐久性が高い等の特徴があり、強いビーム測定に最適な材料である。（株）カネカは、この材料を製品化し、2015 年 8 月から大学共同利用機関法人高エネルギー加速器研究機構（KEK）へ販売を開始した。これは、多層グラフェンの初めての商品化例となった。（NEDO ホームページより）

(vi)　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。（平成 26 年度本調査事業報告書より）

（エ）　酸化チタン

(i)　　製品概要

<table>
<tr><td>サイズ</td><td>超微粒子：（粒径）10～50 nm、光触媒用：（粒径）～200nm</td></tr>
<tr><td>形状</td><td>粒子状、紡錘状</td></tr>
<tr><td>計測技術</td><td>粉末 X 線回折法、SEM、TEM</td></tr>
<tr><td>物性</td><td>・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、溶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>アナタース</td></tr>
<tr><td>結晶系</td><td>正方晶系</td><td>正方晶系</td></tr>
<tr><td>密□（g/□m3）</td><td>4.27</td><td>3□□0</td></tr>
<tr><td>屈折率　nD</td><td>2.72</td><td>2.52</td></tr>
<tr><td>モース□度</td><td>7.0～7.5</td><td>5.5～6.0</td></tr>
<tr><td>比熱
（cal/℃･g at 25℃）</td><td>0.169</td><td>0.169</td></tr>
<tr><td>熱伝導率
（cal/cm/sec/℃）</td><td>0.1□8</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℃）</td></tr>
<tr><td>誘電率</td><td>114</td><td>48</td></tr>
<tr><td>融点（℃）</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）</td></tr>
</table>

	製品名	スーパータイタニ□	微粒子酸化チタン	オ□トレイク 1120Z（8RU-7・G）
	密度（g/cm³）	約 0.2（□表値）	3.9～4.3	0.9～1.3
	比表面積（m²/g）	約 30	10～300（比表面積値は表面処理剤の影響も受□る）	200 前後
	表面電荷（mV）	-40（pH□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□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）			

（ii） 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	2015 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	3,050	3,140	3,230
販売金額（百万円）	9,600	10,380	10,800	11,600	11,950	12,300
光触媒用酸化チタン						
販売量（トン）	210	213	217	228	235	243
販売金額（百万円）	960	970	990	1,045	1,080	1,120
合計						
販売量（トン）	2,750	2,953	3,067	3,278	3,375	3,473
販売金額（百万円）	10,560	11,350	11,790	12,645	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	2014 年度
生産量（トン）	9,131	10,534	5,780

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、2015 年には超微粒子で 3,050 トン、光触媒用で 228 トンと予測されている（富士キメラ総研推定）。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ものの、2014 年度は 2013 年度の半分程度の 5,780 トンまで激減している。

(iii) 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

(iv) 研究開発事例

① 超極細チタン酸ナノワイヤーの作成手法の開発

開発者：東北大学原子分子材料科学高等研究機構（AIMR）浅尾直樹教授　研究グループ、中山幸仁准教授　研究グループ

開発機構：東北大学原子分子材料科学高等研究機構

概要： チタンアルミ合金を出発原料として、これを水酸化ナトリウム水溶液に浸漬する極めてシンプルな方法により、チタン酸ナトリウムナノワイヤーを高収率で作製することに成功した。この作製法は直径の増大をもたらす熱処理が不要であるため、これまで作製されたナノワイヤーに比べ、直径が数ナノメートルという極めて細いナノワイヤーを作製することが可能になった。得られたナノワイヤーは無数に絡み合ってマリモのような特徴的な集合体をつくり、これを更に拡大するとナノワイヤーが生成していることがわかる。このナノワイヤーの結晶構造は、X 線構造解析法や高分解能透過電子顕微鏡法により、ナトリウム原子層が酸化チタン層にサンドイッチされた層状構造であることを明らかにした。層状構造を有する金属酸化物は、イオン交換によって様々なイオンを吸着することが知られており、特にチタン酸ナトリウムは、放射性ストロンチウムイオンの吸着材として研究が進められている。今回作製したナノワイヤーの吸着能を評価したところ、従来の材料と比べてより多量のストロンチウムイオンを吸着することが可能であり、なおかつイオン交換速度が極めて速いことを明らかにした。今後は海水など様々な金属イオンを含む条件でストロンチウムイオンを選択的に吸着するかどうかを検証する実験を行うなど、実用化に向けた取り組みを進めていく予定である。

(v)　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（香粧品科学, 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。

(vi)　ナノリスク評価

製造事業者は、暴露等に関して、厚労省局長通知（基発 331013 号）に沿った管理を行っており、局所排気や捕集効率 99.9%の防塵マスクやエアラインマスク及び専用の防塵衣を使用している。袋詰め作業では、プッシュプル型局所排気装置により暴露低減をはかり、作業場と外部との区画化により外部への排出を防いでいる。製造設備においても密閉化度の向上を進めている。別の事業者においても、労働安全衛生法（粉じん則）及び厚生労働省労働基準局長通知に基づいて、保護具基準の見直しや、密閉化と局所排気の強化による設備対策を検討・実施している。

労働者については、粉じん特別教育を実施しているほか、何のマテリアルの特性及び暴露防止対策についての教育を行っている。別の事業者では、一般的な労働安全衛生法（粉じん則、特化則）の機会を利用した教育のほか、ナノマテリアルに該当する製品の MSDS を中心とした特性教育を実施している。さらに別の事業者では、年に 1 度程度、全従業員を対象に粉じん作業の安全教育を実施しているほか、厚生労働省等からの通達、その他ナノ粒子に関する安全性に関する情報を、掲示板等を通じて従業員に周知しているところもある。

（経済産業省　ナノマテリアル情報提供シート）

（オ）ナノ銀

(i)　製品概要

<table>
<tr><td>サイズ</td><td>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。
銀ナノワイヤー；
・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。</td></tr>
<tr><td>形状</td><td>粉体、ペースト、分散液</td></tr>
<tr><td>計測技術</td><td>SEM、TEM、AFM（原子間力顕微鏡）</td></tr>
<tr><td>物性</td><td>・ 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。
・ 銀ナノワイヤーは、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>銀ナノ粒子乾粉-1</td><td>銀ナノ粒子乾粉-2</td></tr>
<tr><td>粒径</td><td>20 nm</td><td>60 nm</td></tr>
<tr><td>比表面積</td><td>15～20 m^2/g</td><td>5～8 m^2/g</td></tr>
</table></td></tr>
</table>

<table>
<tr><td></td><td>
<table>
<tr><td>TAP 密度</td><td>2～4 g/cm^3</td><td>2～4 g/cm^3</td></tr>
<tr><td>Ag 含量</td><td>≧95%wt%</td><td>≧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>730□9□</td><td>7□0807</td><td>730815</td><td>7□077□</td></tr>
<tr><td>粒径（nm）</td><td>10</td><td>□0</td><td>40</td><td>60</td><td>100</td></tr>
<tr><td>密度（g/ml[25℃]）</td><td>0.9□7</td><td>0.986</td><td>0.990</td><td>0.□976</td><td>0.9978</td></tr>
<tr><td>粒子数</td><td>3.6×10^{12}</td><td>4.5×10^{11}</td><td>5.7×10^{10}</td><td>1.7×10^{10}</td><td>3.6×10^{9}</td></tr>
<tr><td>蛍光
□ペクトル</td><td>λem ＝ 388nm FWHM59 nm</td><td>λem ＝ 401nm FWH□6 6nm</td><td>λem ＝ 412nm FWHM6 3nm</td><td>λem ＝ 431nm FWHM8 1nm</td><td>λem ＝ 504nm FWHM1 67nm</td></tr>
</table>
出典：シグマ・アルドリッチ（同）カタログ

（銀ナノワイヤー）
<table>
<tr><td>サイズ</td><td>φ30nm×20μm、φ50nm×40μm、φ□5nm×45μm、φ100nm×1□μm</td></tr>
<tr><td>溶媒種類</td><td>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</td></tr>
<tr><td>標準濃度</td><td>0.625wt%（エタノール）</td></tr>
<tr><td>標準密度</td><td>5mg/ml（エタノール）</td></tr>
<tr><td>外□</td><td>灰色懸濁液</td></tr>
</table>
出典：イーエムジャパン(株)HP
</td></tr>
<tr><td>性能／特性</td><td>・ 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。</td></tr>
<tr><td>製造会社</td><td>【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</td></tr>
</table>

(ii)　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 26 年度本調査事業報告書より）。

(iii) **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

銀ナノワイヤー；

- 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：銀ナノワイヤー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：銀ナノワイヤーの単層は、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。

(iv) **研究開発事例**

① ナノレベルの極細銀ワイヤーを使用した透明導電フィルムを開発

開発者： 大日本印刷株式会社

概要：大日本印刷株式会社（DNP）は、光学フィルムの製造で培ったコーティング技術により、ナノ（nm：10-9 メートル）レベルの極細の銀ワイヤー（銀ナノワイヤー）を使用した高性能かつ低価格の透明導電フィルムを開発した。DNP は、銀ナノワイヤーインキを開発・製造する米国ベンチャー企業の Innova Dynamics Inc.と共同開発を行い、透明導電フィルムの開発に成功した。さらに、ウエットコーティングによる量産性の確立と低コスト化の実現を行うことで、ノートパソコンサイズへの適用も可能な透明導電フィルムとして展開していく。また、当製品は屈曲性が高いため、フレキシブルディスプレーやウエアラブルデバイスのセンサーなどの多様な用途に展開が可能である。

製品の特徴は、数十ナノメートルの非常に細いワイヤーを配線として使用しており、光透過率が高く視認性に優れているため、スマートフォンやタブレット端末などの高精細ディスプレーのタッチパネルに最適である。また、シート抵抗値は 50Ω/□（オーム毎スクエア：単位面積あたりの抵抗）で、ITO フィルムと比べて約半分程度と低いため、より大型のディスプレーに適している。またタッチパネル以外で透明電極を用いるデバイス向けにおいても展開が可能である。折り曲げに強いことから、厚さが 50 マイクロメートル（um:10－6 メートル）以下の各種薄型フィルムや 3D 成型体に加工することで、タッチパネルやタッチパネル以外のフレキシブル性が求められるウエアラブル端末などにも使用可能である。

今後は、DNP の他の光学フィルムなどとの組み合わせによる各種センサー用途での事業化を目指す。

② 新導電材料の開発に成功

開発者： 日本写真印刷株式会社

概要： 日本写真印刷株式会社（日本写真印刷）は、次世代の導電材料として期待される

銀ナノワイヤーインキに関して、米国企業の C3Nano Inc.（以下、C3Nano）と共同開発を進めてきたが、今回、開発のターゲットに定めていた光透過率、シート抵抗値を実現することに成功した。日本写真印刷はタッチパネルを構成する要素の一つとして導電材料の開発を推進している。銀ナノワイヤーインキを用いた導電材料はシート抵抗値が低く、優れた屈曲性を有するため、次世代のスマートフォンやタブレット端末などに新たな価値を提供することが期待されている。 今回開発に成功した導電材料は、90%以上という高い光透過率を保持したまま、シート抵抗値 30Ω/□というスペックを充足したため、日本写真印刷が有するさまざまな加工技術（パターニング）との組み合わせを検証する段階に入った。今後、日本写真印刷は同導電材料を活用したタッチパネル製品の開発に着手し、2016 年度の量産化を目指す。

③ 透明導電パターン形成用銀ナノワイヤーインクの量産技術を開発

開発者： 昭和電工株式会社、マイクロ波化学株式会社

概要：昭和電工株式会社とマイクロ波化学株式会社（社長：吉野 巌 以下、マイクロ波化学）は、印刷技術によって透明導電パターンを形成する銀ナノワイヤーインクについて、共同で量産技術を開発した。昭和電工は、2012 年に国立大学法人 大阪大学の菅沼克昭教授と共同で、印刷により透明導電パターンを形成する銀ナノワイヤーインクを開発している。銀ナノワイヤーインクで高い光透過性と導電性を実現するには、金属ナノ材料である銀ナノワイヤーのアスペクト比（長さと径の比）を高めることが重要であり、従来の合成方法では銀ナノ粒子が表面全体で結晶成長しやすくワイヤー状になりにくいことから、安定的に生産するための量産技術の確立が課題となっていた。昭和電工およびマイクロ波化学は、今回、選択加熱技術のひとつであるマイクロ波加熱を用いた合成方法を開発した。銀ナノワイヤーの成長過程において銀ナノ粒子にマイクロ波を照射すると、成長末端のみがエネルギーを吸収し発熱する。この特性を利用し、銀ナノ粒子に結晶成長を阻害するキャッピング剤を選択的に吸着させることで、細長いワイヤーを効率的に生産することに成功した。また、銀ナノワイヤーインクは印刷後、光焼成技術（Photonic Curing TM）により導電性を発現させるが、昭和電工では今回、基板への密着度を高め、焼成時の基板へのダメージを最小限に抑えるアンダーコート剤も開発している。一般的に熱に弱いとされる銀ナノワイヤーの劣化を防ぐオーバーコート剤も開発中で、本インクおよび周辺部材は、昭和電工が 7 月よりサンプル提供を開始する予定である。

④ ミリ波帯で優れた伝送特性を持つ高周波伝送路を開発

開発者：国立研究開発法人 産業技術総合研究所　物理計測標準研究部門　高周波標準研究グループ 堀部 雅弘 主任研究員、同研究所　フレキシブルエレクトロニクス研究センター　印刷デバイスチーム 吉田学 研究チーム長

開発機構：国立研究開発法人 産業技術総合研究所

概要：産業技術総合研究所（産総研）物理計測標準研究部門　高周波標準研究グループ 堀部 雅弘 主任研究員とフレキシブルエレクトロニクス研究センター　印刷デバイスチーム 吉田学 研究チーム長は、印刷技術を利用して、100 GHz を超えるミリ波帯で優れた伝送特性を示す高周波伝送路（コプレーナ導波路）を開発した。導電率が高い銀ナノ粒子インクを用いた印刷技術によって、導体の導電率が高く寸法精度の良いコプレーナ導波路を作製した。この導波路は、100 GHz を超える高周波帯域まで低損失特性を示し、特に 60 GHz 以上では、従来のコプレーナ導波路の約半分の伝送損失であった。また繰り返し使用による特性劣化も小さいことから、ミリ波帯デバイスの電気的な性能を評価する「標準伝送路」として利用できる。さらに、一度に多くのパターン形成が可能なスクリーン印刷技術の活用により、導電膜形成、露光およびエッチングによる従来の作製法に比べて作製時間の短縮と低コスト化を実現した（作製時間：約 1 時間、従来

比 20 分の 1 以下。作製費：約 6000 円、従来比 10 分の 1 以下)。

今回開発したコプレーナ導波路を、様々なミリ波帯デバイスの性能評価に活用し、「標準伝送路」としての有用性を実証する予定である。

(v) 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利率は、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。

（平成 26 年度本調査事業報告書より）

(vi) 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 26 年度本調査事業報告書より）

(カ) ナノセルロース

(i) 製品概要

<table>
<tr><td>サイズ</td><td>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</td></tr>
<tr><td>形状</td><td>繊維状</td></tr>
<tr><td>計測技術</td><td>SEM</td></tr>
<tr><td>物性</td><td>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/cm^3</td></tr>
<tr><td>弾性率</td><td>□40 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>
出典：京都大学　生存圏研究所　生物機能材料分野</td></tr>
<tr><td>性能／特性</td><td>・ 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（250m^2/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</td></tr>
</table>

	・ 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）

(ii) 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、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動させ、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」）。

なお、CNF は自動車部品や食品の鮮度を保つ包装材、液晶ディスプレーなど様々な用途に利用可能であると考えられており、経済産業省では、2030 年に 1 兆円規模の市場に育てている目標を掲げ、産学連携の支援も始まっている。

(iii) 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、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

(iv) 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 速書きでもカスれない“SKIP FREE”描線を実現　新開発ゲルインクボールペン「ユニボール　シグノ　UMN-307」

開発者： 三菱鉛筆株式会社、第一工業製薬株式会社

概要：三菱鉛筆株式会社は、第一工業製薬株式会社との共同開発で、植物由来の次世代素材として各産業で用途開発が進んでいる「セルロースナノファイバー」を新規ゲルインクボールペン（製品名：ユニボール　シグノ UMN-307）のインクに増粘剤として採用し、世界初の実用化に成功した。採用した増粘剤は、セルロースナノファイバーの中でも、極めて繊維が細いグレードの「セルロースシングルナノファイバー」（製品名：レオクリスタ）である。レオクリスタは、東京大学磯貝教授らの研究成果と第一工業製薬のセルロース応用技術を活用した「セルロースシングルナノファイバー」である。化学処理と機械処理との相互技術により、繊維の幅を3nmから4nmまで細かくしたもので、一般的なセルロースナノファイバーの数十分の一ほどの細かさを実現している。

ユニボール　シグノ UMN-307 は、三菱鉛筆が 2015 年 3 月から北米地域で先行発売し、速書きでもカスれない安定した描線が”SKIP FREE（スキップ・フリー）”と評価され、大変好評である。このたび欧米での本格展開に向け増産体制を整え、2015 年 9 月より販売地域を欧州に拡大する。

三菱鉛筆は、ゲルインクボールペンにおける理想的なゲル化剤としていち早くレオクリスタの機能に注目し、2013 年 6 月から実用化検討を進め、ユニボール　シグノ UMN-307 のインク増粘剤に採用した。インクに配合することで、速書きや左書きなど様々な筆記状況においても適切に粘度が変化し、筆記描線がカスれにくい・ボテにくいといった安定した筆記描線と、低粘度インクのなめらかな筆記感が得られる。

筆記具開発で培った超微粒子顔料分散技術の応用により、極めて細かな繊維であるセルロースシングルナノファイバーをインク内に均一に配合し、かつ安定状態を保つ技術を確立し、世界で初めての実用化に至った。

② TEMPO 触媒酸化処理によるセルロースナノファイバーを実用化

開発者： 日本製紙株式会社

概要： 日本製紙株式会社は、TEMPO 触媒酸化法により化学処理したパルプを原料とするセルロースナノファイバー（以下、「CNF」）を用いて、触媒、消臭、抗菌などさまざまな性能を有する機能性シートの実用化に成功した。製品化第 1 弾として、CNF を配合した高い消臭機能を持つシートを使って、同グループの日本製紙クレシア株式会社において 2015 年秋から、需要の伸長が著しい「ポイズ®」シリーズ、「アクティ®」シリーズなどのヘルスケア製品への展開を図っていく。

CNF は、植物繊維（パルプ）をナノレベルまで細かく解繊したもので、軽量でありながら、弾性率は高強度繊維で知られるアラミド繊維並に高く、温度変化に伴う伸縮はガラス並みに良好、酸素などのガスバリア性が高いなど、優れた特性を発現する。また、植物繊維由来であることから、生産・廃棄において環境負荷が小さいことが特徴として挙げられる。日本製紙は、2013 年 10 月に岩国工場（山口県岩国市）に CNF 実証生産設備（年産能力 30 トン／年）を設置し、大量のサンプル製造と用途開発に取り組んでいる。

今回、TEMPO 触媒酸化法により化学処理されることで、CNF の表面に金属イオンや金属ナノ粒子を高密度に付着させることが容易であるという特徴を生かし、紙や板紙、不織布、フィルムに配合・塗布することでシート化することに成功した。付着させる金属の種類を変えることにより、触媒、消臭、抗菌など、ユーザーから求められるさまざまな性能や機能をシートに付与することが可能であり、また、ナノファイバー化されていることから比表面積が大きく、少量の添加で機能を効果的に発現することができるという利点があり、今後の用途展開が期待できる。

③　世界初の機能性セルロースナノファイバーの実用化商品の発売開始
開発者：　日本製紙株式会社
概要：　日本製紙株式会社は、2015 年春に、TEMPO 触媒酸化法により化学処理したパルプを原料とするセルロースナノファイバー（以下、「CNF」）を用いた高い消臭機能を持つシートの実用化に成功した。このシートを同グループの日本製紙クレシア株式会社が、大人用紙おむつの新ブランド「肌ケア　アクティ」シリーズに採用し、機能性 CNF の世界初となる実用化商品として、10 月 1 日より全国で発売開始する。

同グループは、TEMPO 触媒酸化法により化学処理されることで、CNF の表面に金属イオンや金属ナノ粒子を高密度に付着させることが容易であるという特徴を生かし、抗菌・消臭効果のある金属イオンを CNF に大量に保有させたままシート化することに成功し、これまでに無い、高い消臭機能を持つシートを実現した。今回、日本製紙クレシアが発売開始する大人用紙おむつの新ブランド「肌ケア　アクティ」シリーズに、この機能性 CNF を用いた消臭シートが採用された。便臭は、従来品に比べ 3 倍以上という高い消臭力を持った商品となっている。

④　世界初の容易に分散可能なウェットパウダー状セルロースナノファイバーのサンプル提供を開始
開発者：　王子ホールディングス株式会社
概要：　王子ホールディングス株式会社では、セルロースナノファイバー（以下、CNF）の技術基盤の確立を目指し、研究を進めており、今回、世界初となる容易に分散可能なウェットパウダー状 CNF の製造方法を開発し、サンプル供給を開始することになった。

CNF は、水に分散した状態で高い粘性を持つことから、増粘剤としての用途が期待されている。現在利用されている増粘剤の多くは粉体として供給されているのに対し、CNF はその製法上の制約から濃度１～２％程度の液体（スラリー状 CNF）として供給されている。このスラリー状 CNF は極めて粘度の高い液体であり、取り扱いが難しいだけでなく、水を多く含むことから、添加量が制限されるという問題があった。また、輸送において大量の水を運ぶこととなり、環境負荷やコストの面でも課題となっていた。

今回世界で初めて開発したウェットパウダー状 CNF は、添加剤を一切含まず、固形分含有量が 20%以上であり、容易に水に分散させることができる。また、一般的な増粘剤と比較して高い増粘効果を有しており、その性能はスラリー状 CNF と同等である。更に、ハンドリング性を重視するニーズに応えるため、添加剤を使用することにより極めて流動性の高いウェットパウダー状 CNF の開発にも成功した。

このようなウェットパウダー状 CNF の利用により、さらなる用途の拡大が期待できるほか、輸送エネルギーの面で環境負荷の低減にも寄与し、CNF の早期実用化に貢献できるものと考える。今後はユーザーの要望を踏まえ改良を重ね、より魅力的な製品開発を進めていく。サンプル提供は、2015 年 10 月より開始する。

⑤　セルロースナノファイバーを使用した振動板の開発に成功
開発者：オンキヨー
概要：　振動板の主原料である木材パルプを構成する繊維をナノレベル（１mm の百万分の一）まで細かくすることで生まれた最先端のバイオマス素材「ピュアセルロースナノファイバー（以下「CNF」）」を使用した振動板の開発に世界で初めて成功した。

スピーカーの中でも振動板は空気を振動させて音楽や音声を最終的に再現する極めて重要なパーツであり、その音声再現能力に加え軽量性と高い剛性を併せ持つことが理想とされている。鉄の５分の１の質量でありながら、鉄の５倍の強度を実現した「夢の新素材」ともいわれる最先端のバイオマス素材「CNF」をパルプに混抄することで、更なる音質の向上を実現し、強さやしなやかさと軽さを両立したスピーカー振動板の開

発に成功した。スピーカー振動板の物性値で重要なヤング率は２倍に向上し、高域再生帯域は拡大した。

今後当社は、この「CNF」振動板を採用したスピーカーを商品化し、今後更に省エネが要求される車載スピーカーを中心とした OEM 製品や自社ブランド製品に 2016 年より採用を目指す。

(v) 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。キチン・キトサンも合わせて製造し、バイオマスナノファイバー「BiNFi-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２μm 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、イム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ム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。

（平成 26 年度本調査事業報告書より）

(vi) 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、遺伝毒性などがないことを確認。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。

・FPInnovations
　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26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

（ア） 使用する DB: PubMed

（イ） 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? ?
白金	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?

（ウ） 検索期間

2015/1/01～2015/12/31(文献発行年月日)

（エ） 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

まず、上記した検索方法により検索し、タイトルを出力した（4000 件）。次に、タイトルから内容を判断して、論文を約 200 件に絞った。それらの要旨を出力してさらに絞り込みを行った。

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なった。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、次いで二酸化チタン、銀が多い。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。シリカ、酸化亜鉛についても同様であり、金、フラーレン、グラフェン、などは数が少ないので優先的に取り上げた。白金、ナノクレイ、ナノセルロースについての文献は見当たらなかった。最終的に 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。また、一つの文献でいくつかの方法で実験している場合がある。従ってこの表の総数は読み込んだ文献数の 69 件以上となる。

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					生態毒性	in vitro	実験方法	小計
	吸入	気管内注入 咽頭吸引	静脈注入	腹腔	経口				
SWCNT		4		2		1	9		16
MWCNT	3	7	1			1*	10		22
C60					1		3	1	5
グラフェン	1			1			3		5
ナノダイアモンド				1					2
ポリスチレン							1		1
TiO_2	1	2	2	1	2	1*	2	1	11
ZnO				1	1		1		3
SiO_2		1			2		1		4
Ag	2	3			1		3		9
Au	1			1			3	1	6
合計	8	16	3	7	7	3	36	3	83

* 線虫やゼブラフィッシュを使用した研究

（1） 文献サマリー

（ア） SWCNT

No	SWCNT-1
論文題目 （和訳）	Genotoxicity of single-walled carbon nanotubes: in vitro study on human embryonic fibroblast cells. （単層カーボンナノチューブの遺伝毒性 : 胚芽期ヒト線維芽細胞の in vitro 研究
著者 所属機関	Nikitina VA, Chausheva AI, Suetina IA, Katosova LD, Zheglo DG, Mezentseva MV, Platonova VI, Revazova YA, Kutsev SI. Medical Genetic Research Center, Russian Academy of Medical Sciences
書誌事項	Bull Exp Biol Med. 2015 Apr;158(6):812-5. doi: 10.1007/s10517-015-2868-y.
試験物質	SWCNT; A. V. Krestinin (Institute of Chemical Physics Problems, Russian Academy of Science s より。一本の直径が 1nm で、10-30nm 径のバンドルを形成している SWCNT のペースト。
試料調整法	上記ペーストを 1 気圧、120℃のオートクレーブで 30 分処理し、1%SWCNT、0.9%NaCl とし、1/1000 に希釈
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	ウシ胎児血清 10%を加えたイーグル培地で培養された胚芽期ヒト線維芽細胞（HEF 細胞）を 100,000cells/ml で SWCNT 溶液に接種し、3,24,48 時間培養。SWCNT 添加後 3 時間以内に DNA の分裂が現れコメットアッセイで評価。大部分の細胞が有糸分裂を始める 24 時間後に染色体異常のレベルを調べる細胞発生調査を実施し、48 時間後の HEF 細胞の分裂後、小核と倍数体の発生を染色体 1,6,8,11,X,Y で解析した。 ・DNA コメットアッセイ ; Zhanataev らの方法、コメット尾部の DNA 含量%を DNA 異常の指標として使用。 ・染色体異常の表示法 ; 染色し、単独、対をなす断片、染色体、染色分体を計数。 ・染色体のスペクトル解析 ; hybridizer (ThermoBrite; StatSpin Inc.)を使用。 ・小核試験 ; 細胞懸濁液を冷却媒上のdry cold slide上に滴下、乾燥後染色。 ・FISH解析 ; セントロメア（動原体）専用のDNAプローブを使用。
試験結果	・試験前に HEF 細胞の核型（karyotype）を SKY 法で決定 ; 25 の有糸分裂中期のうち、23 が正常雄核型(46,XY)で、2 細胞が 4 および 17 染色体から転座した誘導染色体 ・コントロールのDNA異常が4.58±0.40% (median 2.13)であったが、SWCNT添加後3時間で6.10±0.58 tail DNA%(median 1.97)となり、SWCNTに暴露した場合には、20%以上のDNA尾部を有するひどく破壊された細胞の存在によって、異常の平均レベルが上昇した。 ・コントロールの染色体異常は、4.50±0.04%、SWCNT暴露では、5.40±0.44%であった。有糸分裂中期の損傷の有無は大差がなかったが、染色体異常のスペクトルは、染色分体が主で、染色体断片や染色体交換は稀であった。 ・染色体異常や異数性の誘発性を特徴づける小核の発生は、SWCNT暴露の有無は関係なかった。 ・染色体の異数性の発生も、暴露の有無で大差なかったが、染色体Yの発生が他にくらべて大きかった。
結論	HEF 細胞の DNA 異常は、3 時間の SWCNT への暴露により増大する。しかし、24、48 時間暴露でも、染色体異常、小核および異数性の発生は無視できるレベルである。この結果は、より高いレベルの染色体異常、小核、異数性で特徴づけられる SWCNT の遺伝毒性を部分的に確かめたことになる。

<table>
<tr><td>No</td><td>SWCNT-2</td></tr>
<tr><td>論文題目
（和訳）</td><td>Size effects of single-walled carbon nanotubes on in vivo and in vitro pulmonary toxicity
（in vivo および in vitro 肺毒性に関する単層カーボンナノチューブのサイズ影響）</td></tr>
<tr><td>著者
所属機関</td><td>Fujita K, Fukuda M, Endoh S, Maru J, Kato H, Nakamura A, Shinohara N, Uchino K, Honda K.
Research Institute of Science for Safety and Sustainability (RISS), National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST),</td></tr>
<tr><td>書誌事項</td><td>Inhal Toxicol. 2015 Mar; 27(4):207-23. doi: 10.3109/08958378.2015.1026620. Epub 2015 Apr 13.</td></tr>
<tr><td>試験物質</td><td>長さと凝集状態が異なる二つの単層カーボンナノチューブ（CNT-1,CNT-2）を作成。
Technology Research Association for Single-Wall Carbonsより原試料を入手し、
（原試料は水を触媒とした CVD 法で作成され、金属成分はじめ不純物が殆ど含まれない SWCNT である。特性 : BET 比表面積 ; 1064±37m2/g、組成 ; elemental C＞99.0% (wt)、Fe;0.011%、G/D 比 ; 5.9、試料濃度 ; 1.0mg/mL）以下の２つのプロトコルで作成。
① SWCNT を 10mg/mLBSA 溶液に超音波ホモジナイザーで 2 時間処理後、遠心分離し得られた上澄み液を 40 マイクロ m のナイロンメッシュの細胞ろ過器でろ過したろ液（CNT-1S）
② SWCNT を 10mg/mLBSA 溶液に超音波ホモジナイザーで 30 分間処理後、遠心分離し得られた上澄み液を 70μm のナイロンメッシュの細胞ろ過器でろ過したろ液を再度遠心分離し、沈降物を BSA 溶液中に入れ超音波浴中で再分散し、その溶液を 100μm のナイロンメッシュの細胞ろ過器でろ過したろ液（CNT-2S）</td></tr>
<tr><td>試料調整法</td><td>・CNT-1S,CNT-2S をリン酸緩衝液（PBS）で 0.1mg/mL に希釈 ; 低用量 ; 0.18mg/kg(CNT-1(L)、または 1mg/mL に希釈 ; 高用量 ; 1.8mg/kg(CNT-1(H) ←in vivo 実験
・CNT-1S,CNT-2S を細胞培養液(Ham'sF-12K(Kaighn's) ; F-12K 培養液+15%(v/v)ウシ胎児血清+それぞれ100unit/mLのペニシリンとストレプトマイシン(以降 F-12K+FBS と呼称)で 0.1mg/mL に希釈;CNT-1、CNT-2←in vitro 実験</td></tr>
<tr><td>試験生物
投与方法・ 期間
試験用量</td><td>・in vivo 実験 : Wister ラット、平均体重 ; 220g、3 グループ（n=9/Gr/時点）、気管支注入、
低用量 ; 0.18mg/kg(CNT-1(L)、高用量 ; 1.8mg/kg(CNT-1(H)、コントロール ; BSA 溶液（10mg/mL）0.4mL/ﾗｯﾄ、体重測定 ; 注入前、注入後 1, 3, 7, 30, 90 日後肺摘出し、形態観察、BALF（肺胞洗浄液）解析、病理組織学的解析、包括的遺伝子発現・マイクロアレイを実施。
・in vitro 実験 : NR8383 ラットマクロファージを F-12K+FBS で培養（5%CO_2＋湿潤空気中、37℃、24 時間）後、培養液を遠心分離し、CNT-1、CNT-2 に置き換え。（この時点で細胞密度は 2×10^5Cell/mL）WST-1 アッセイによる細胞生存率測定、DCFH-DA アッセイによる細胞内 ROS 測定、サイトカイン発現（MIP-1α）測定を実施。</td></tr>
<tr><td>試験結果</td><td>・試験溶液中に分散した SWCNT s の特性 :
<table>
<tr><td colspan="3" rowspan="2"></td><td rowspan="2">濃度
(□g/mL)</td><td colspan="2">粒径(nm)</td><td rowspan="2">対数平均長さ
(μm)</td></tr>
<tr><td>光散乱径</td><td>数基準</td></tr>
<tr><td rowspan="3">CNT-1</td><td rowspan="2">in vivo</td><td>低用量</td><td>0.11</td><td>352.2</td><td>141.9</td><td>測定せず</td></tr>
<tr><td>高用量</td><td>1.03</td><td>404.4</td><td>167.2</td><td>0.51(0.36)</td></tr>
<tr><td colspan="2">in vitro</td><td>0.10</td><td>380.8</td><td>132.8</td><td>0.36(0.31)</td></tr>
<tr><td rowspan="3">CNT-2</td><td rowspan="2">in viv□</td><td>低用量</td><td>0.11</td><td>1□51.3</td><td>41□.6</td><td>測定せず</td></tr>
<tr><td>高□量</td><td>1.10</td><td>1534.2</td><td>584.5</td><td>1.67(1.53)</td></tr>
<tr><td colspan="2">in vitro</td><td>0.11</td><td>1069.□</td><td>□□7.5</td><td>□.52(1.99]</td></tr>
</table>
・BALF 解析
全蛋白レベル　高用量において、一日目に増大した全蛋白が、CNT-1 では、時間と共にさらに増大し、そのレベルを維持するのに対し、CNT-2 では時間と共に減少する。（低用量でも少し増大したレベルが、時間と共に減少する。）</td></tr>
</table>

	MIP1-α は、高用量の 30、90 日で増大するが、CNT-1 で極めて顕著。 マクロファージ　コントロールでは全核細胞が全観察期間において支配的であったが、CNT-1 暴露の低、高用量と CNT-2 暴露の高用量では全核細胞と好中球数が支配的であった。 ・SWCNT 注入後の解剖、組織病理学的知見 肺に SWCNT が入り込んでいることが確認された。90 日後でも完全に排出されていない。 肺胞炎、マクロファージの増加、試験物質を貪食したマクロファージが 90 日後でも観察された。好酸球の浸透は、血管や気管支周辺に見られたが、30 日以降はない。肺胞の出血は、CNT-2 の方に多くみられたが、30 日以降見られない。肉芽腫は CNT-2(H)で 3 日以降、CNT-1(H)で 30 日に見られた。肺胞への好中球の浸透は、両 CNT に 90 日後も観察されたが、CNT-2(L)では 30 日以降はみられなかった。 TEM 観察によれば、CNT-1(H),CNT-2 で、90 日後の縦隔リンパ節に、試料の TEM 観察で見られたと同様の SWCNT ﾊﾞﾝﾄﾞﾙが観察された。絡まってはいなかった。 ・気管支注入試験での遺伝子発現ﾌﾟﾛﾌｧｲﾙ 高用量における CNT-1、CNT-2 の試験で、遺伝子は有意に上方または下方制御されたが、特に CNT-2 の 1 日後に顕著であった。30、90 日後では CNT-1 の方が大きく制御された。P 値の経日変化では、CNT-1,2 ともに、GO ターム の免疫系プロセスに関わるものの変化が大きく、細胞増殖に関わるものは比較的小さかったが、炎症応答に関わるものは CNT-1 が大きかった。 ・in vitro 試験結果 細胞生存率は 6 時間後では殆ど変化がなかったが、24 時間後の CNT-1 は特に大きく減少した。細胞内 ROS レベルは時間とともに増加したが、CNT-2 の方が著しかった。MIP-1α 発現は、CNT－1 はコントロールと変わらなかったが、CNT-2 は時間とともに増加した。 試料は貪食によってその形態的特徴は殆ど変化せず、核内には存在しなかった。 CNT-2 には暴露された細胞の遺伝子は CNT-1 に比べて大きく情報/下方に制御を受けた。 ・遺伝子発現の in vivo, in vitro 比較 in vitro 試験での遺伝子発現は総じて、in vivo 試験に比べて CNT-1 では小さく、CNT-2 では大きかった。
結論	相対的に小さな径で短いバンドルの SWCNT は、肺炎症をすぐには惹起しないが回復も遅い。一方長くて太いバンドルを形成している SWCNT は、肺胞マクロファージの敏感な応答を誘発し、吸入後すぐに肺炎症を起こす。SWCNT の肺毒性はバンドルの物理的なパラメータと関係づけられ、SWCNT のリスク評価、管理に有用である。

No	SWCNT-3
論文題目 （和訳）	Gene expression profile of human lung epithelial cells chronically exposed to single-walled carbon nanotubes (単層カーボンナノチューブに長期暴露したヒト肺胞上皮細胞の遺伝子発現プロファイル)
著者 所属機関	Chen D, Stueckle TA, Luanpitpong S, Rojanasakul Y, Lu Y, Wang L. Department of Medicine, University of Alabama
書誌事項	Nanoscale Res Lett. 2015;10:12.　doi: 10.1186/s11671-014-0707-0
試験物質	SWCNT; CNI(Houston,TX,USA)社製。HiPco 法、組成；元素状炭素；99%、Fe；0.23%、BET 比表面積 400～1,000m²/g、FESEM による直径と長さ；0.8-1.2nm, 0.1-1μm
試料調整法	・アセトン中に加え 24 時間超音波浴処理後、20μm 目開きのナイロン篩にかけた後、0.2μmPTFE フィルターでろ過し、蒸留水で完全に洗浄した後、リン酸緩衝液(PBS)中に懸濁し、2 - 3 分超音波処理する。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	・試験生物；　ヒト肺胞上皮細胞（BEAS-2B） ・投与方法；　6 ウェルの培養プレート中の細胞を、分散した SWCNT または PBS のみ（コントロール）に連続暴露する。（3 組ずつ）；3 または 4 日毎に PBS で洗浄し、懸濁した SWCNT 取り込まれていない SWCNT を除き、あらたな SWCNT を含む暴露媒体で満たす。細胞は毎週、トリプシンと EDTA を含む溶液を通過させ、50%以上を取り除く。比較的小部分の SWCNT を含む細胞が残る。 ・期間；　6 カ月間 ・試験用量；0.02μg/cm2; 0.1μg/ml と同等、これは in vivo の 10μg/マウスと同等 試験期間終了後 3 組の B-SWCNT と B - コントロールが得られ、3 つはそれぞれ一緒にして、RNA 採取用等のサンプルとする。以下の調査を実施。 ・DNA マイクロアレーとデータ解析 ・ヒトアポトーシス蛋白発現アレー ・ウェスタンブロット
試験結果	・遺伝子オントロジー（GO）解析により、免疫応答に含まれる遺伝子が生体プロセスの中で最も関与しており、金属イオンへの応答、抗原プロセス、貪食の制御、液胞輸送などが含まれる。 ・分子機能の変化という点では、免疫応答タンパク質結合、転写後修飾およびその他の酵素活性が変化した。 ・B-SWCNT のトキシコゲノミックプロファイルによる遺伝子間相互作用の解析では、免疫応答、細胞生長、細胞の生死、細胞サイクル制御信号ネットワークなどが変化を受けていることが分かった。 ・SWCNT 暴露により、異常型 p53 の不安定性は、B-SWCNT 細胞のアポトーシス抗生と腫瘍形成性に関与する可能性がある pAkt と Bcl-2 過剰発現を生起させた。 ・形質転換した B-SWCNT の腫瘍遺伝子の表現型は、活性な pAkt 信号、不安定化した p53、Ras ファミリー遺伝子の発現増加、Dsh に媒介された Notch1、過剰発現した Bcl-2 および抗アポトーシス遺伝子 BAX および PMAIP1 の下方発現によって説明される可能性がある。
結論	・*in vitro* での 6 カ月という長期の SWCNT への暴露によって、ヒト肺上皮細胞は悪性の形質転換を引き起こすことが、全ゲノム発現データを解析することにより示唆された。 ・亜慢性 in vitro 暴露モデルの開発は、総括的なトランスクリプトーム解析とあいまって、CNT の発がん性の機構の研究を促進する。 ・全ゲノム発現解析アプローチは発がんプロセスに含まれる遺伝子への新しい考察を提供する。

No	SWCNT-4
論文題目 （和訳）	Minimal inflammogenicity of pristine single-wall carbon nanotubes. （非修飾単層カーボンナノチューブの最小の炎症発現性）
著者 所属機関	Toyokuni S, Jiang LI, Kitaura R, Shinohara H. Nagoya University Graduate School of Medicine
書誌事項	Nagoya J Med Sci. 2015 Feb;77(1-2):195-202.
試験物質	㈱日本ゼオン製；SWCNT1（Lot No.HT0209-DA00;比表面積 1,100m²/g）、 SWCNT2(Lot No.HT0209-SA001; 比表面積 650m²/g)、 MWCNT-50（陽性対照群；径 50nm、高炎症発現性、高がん原性） MWCNT-tngl(陰性対照群；径 15nm、炎症を殆ど誘起せず、悪性中皮腫を誘起せず)
試料調整法	・0.5%の結晶性ウシ血清アルブミンを含む生理食塩水の 5 mg/ml 中、使用直前に 10 分間超音波処理。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	動物実験：試験動物；Wister ラット（6 週齢、体重～120 g） 投与方法；腹腔単回注入 期間；4 週間 用量；SWCNT s 、0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10mg MWCNT-50、MWCNT-50　10mg ベヒクルコントロール(0.5%の血清アルブミンを含む生理食塩水) 3ml 細胞実験：細胞；不死化ヒト中皮細胞株(MeT5A) 培地;Medium 199(+L グルタミン 0.685 mM、重炭酸ナトリウム 2.2 g/l、上皮細胞増殖因子 10 ng/ml、ヒドロコルチゾン 400 nM、組み換えヒトインシュリン 870 nM、25 mM HEPES 緩衝液、Trace Element B Solution 2.8 ml/l、10%ウシ胎児血清、5%CO2 空気中、37℃ 細胞生存率定量；MTT アッセイ 期間；24, 48, 72 時間 用量；0.5,5,15,25μg/cm²
試験結果	SWCNTs のキャラクタリゼーション； 二つの SWCNT は、ともに蜘蛛の巣のように絡み合った構造で、壁（wall）は,1 重または 2 重であった。長さは決定不能。ともに平坦な部分と捩れた部分があり、後者は SWCNT2 の方に多かった。 腹腔投与実験； ・10mg の MWCNT-50 は腹膜炎を誘起し、腹腔線維症は明白であった。 ・SWCNT1 ではマクロな変化は見られず、凝集した SWCNT が黒い異物として観察された。MWCNT-tngl でも同様であった。組織学的観察では、MWCNT-50 では、腹腔内器官と腹膜にかなりの線維症（500μm 以上の厚み、白い膜状の外観）を誘起したが、この分散した異物反応の様態を示す繊維状の損傷は極端に広がっていた。しかし、この繊維状損傷は、SWCNT1 と MWCNT-tngl では見られなかった。 細胞実験 ・SWCNTs と MWCNT-tngl は MeT5A 細胞には、25μg/cm² まで毒性を示さなかったのに対し、MWCNT-50 は、5μg/cm² で有意な毒性を示した。
結論	・腹腔投与実験において、SWCNT は、中皮細胞に対しがん原性の可能性を示す MWCNT-50 とは対照的に、最小の炎症性しか示さなかった。同様の炎症性を示す MWCNT-tngl は悪質な中皮腫を誘起しなかった。それ故、SWCNTs は、中皮腫がん原性のリスクは低いと言える。 ・動物実験によるがん原性試験の時間とコスト、倫理的問題を考えると、4 週間腹腔投与実験は、スクリーニングとして使用し得る。

No	SWCNT-5
論文題目 （和訳）	Intratracheal instillation of single-wall carbon nanotubes in the rat lung induces time-dependent changes in gene expression. （単層カーボンナノチューブのラット肺への気管支内注入によって誘起される遺伝子発現は時間変化がある）
著者 所属機関	Fujita K, Fukuda M, Fukui H, Horie M, Endoh S, Uchida K, Shichiri M, Morimoto Y, Ogami A, Iwahashi H. Research Institute of Science for Safety and Sustainability, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST),
書誌事項	Nanotoxicology. 2015 May;9(3):290-301. doi: 10.3109/17435390.2014.921737. Epub 2014 Jun 9.
試験物質	SWCNT;　触媒 CVD 法による Nikkiso Co.の SWCNT、径 1.8nm、BET 比表面積 877.7m²/g
試料調整法	・上記 SWCNT をエタノール水溶液に浸漬して 450rpm の遊星ボールミルで 30 分処理し親水性とする。さらにフラクトースを加え、処理を 30-60 分続行し、SWCNT を粉砕、バンドルをほぐす。次に孔径 1.0μm のメンブランフィルターでろ過し，残渣を熱水で洗浄し、0.5mg/ml のトリトンX-100 中で 30 分間ホモジナイザーで超音波処理する。これを 3000 - 2000g で遠心分離し最大 1mg/mL に調節する。0.1%トリトン X-100 を含む蒸留水中での分散 SWCNT のサイズは、44nm(15-152nm)、長さ 0.69μm（0.18 - 3.3μm）である。分散した SWCNT s の Fe 含有量は、13700ppm である。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	・9 週齢の雄ｳｨｽﾀｰﾗｯﾄ（3ｸﾞﾙｰﾌﾟ、n=6/ｸﾞﾙｰﾌﾟ）注入前約 270g ・気管支内単回注入 ・ベヒクルコントロール(0.1%トリトン X-100／ﾗｯﾄ；低用量 0.2 mg SWCNTs／ラット; L-SWCNT) または高用量 0.4 mg SWCNTs／ラット;H-SWCNT)それぞれ 0.1%トリトン X-100 蒸留水 0.4mL に分散 ・注入後 3、7、30、90、180、365、754 日後体重測定、解剖、肺、肝臓、脳重量測定、 ４つの右肺をホモジネートし RNA を定量し、DNA マイクロアレー解析、qRT-PCR アッセイによる遺伝子発現検証を実施。さらに組織病理学的観察、免疫組織化学的解析も行った。
試験結果	・体重、肺重量および一般的条件；体重の統計的有意差は、高用量の 3、180、365 日後にあっただけだった。いかなるグループでも異常行動や不規則呼吸のような臨床的兆候はなかった。 ・解剖および組織所見；SWCNT s が肺胞マクロファージに貪食された結果の微細な塊状物質は、肺胞、肺胞壁、気管支に全期間においてみられたが、コントロールでは存在せず、高用量の 90 日までは中位の量で、他はそれほどの量ではなかった。フィブリンの堆積が高用量の 30 日と 90 日でみられたが 180 日ではなかった。肉芽腫が高用量の 90 日で見られたが、180 日で最小となり、365 日では無くなった。低用量では 190 日で見られただけであった。炎症細胞の浸潤物も殆ど見られなかった。 ・遺伝子発現解析；DNA マイクロアレーにより、遺伝子発現プロファイルを求め解析した結果、上方制御発現遺伝子数は 7 日までに顕著に増加し、180 日までに徐々に低下し、365 日で再び上昇するが 754 日にはゼロに近くなる。下方制御遺伝子数は 3 日に最大で 30 日までに急激に減少し 90 日から上昇に転ずるが 365 日にはゼロに近くなり、754 日には再び大きくなる。このことから、180 日と 365 日の間で遺伝子発現プロファイルに遷移があることが示唆される。そこで H-SWCNT について、上方制御発現遺伝子の GO ターム（term）を調査した結果、炎症応答に関連した遺伝子発現プロファイルが 180 日後に劇的に変化することが示唆された。 アポトーシスに関わる代表的な遺伝子は、どれも大きく誘導されず、アポトーシスを含む代表的な遺伝子もほとんど変化がなかった。 ・MMP12、MMP7、SPP1 免疫染色；H-SWCNT グループで観察期間中顕著に発現した遺伝子に、マクロファージメタロエラスターゼ（Mmp12）、マトリリシン（Mmp7）、および分泌されたフォスフォプロテイン 1 がある。これらは SWCNT 注入後肺組織における急性応答に続く慢性応答におけるバイオマーカーとなる可能性がある。これらの結果を検証し、肺組織中のこれらの遺伝子産物の局在化を観察するため、抗 - MMP12、 - MMP7 または - SPP1 抗体で免疫染色を行った。結果は、L 及び H - SWCNT で、MMP12 と SPP1 が気

	管支上皮細胞と肺胞マクロファージ中に誘導され、さらに泡状肺胞マクロファージに顕著に誘導されたことがわかった。
結論	本研究において、遺伝子発現における時間に依存した変化と病理組織学的ならびに免疫化学的知見を結びつけることにより、SWCNT の気管注入後の肺毒性の機構を提案するに至った。遺伝子発現プロファイルは各毒性学的なエンドポイントの統合に有益な洞察を提供することがわかった。また、遺伝子発現プロファイルデータは、同じ種の複数の別個の器官に適用し、in vitro と in vivo 試験の間の有用な橋渡しとなる。さらに、遺伝子発現プロファイルは遺伝子オントロジー解析と結合することにより、異なる種間の比較解析にも有用である。

<table>
<tr><td>No</td><td>SWCNT-6</td></tr>
<tr><td>論文題目
（和訳）</td><td>Cytotoxicity of carbon nanotube variants: a comparative in vitro exposure study with A549 epithelial and J774 macrophage cells.
（異なる種類のカーボンナノチューブの細胞毒性：A549 上皮細胞と J774 マクロファージ細胞への暴露 in vitro 比較研究</td></tr>
<tr><td>著者
所属機関</td><td>Kumarathasan P, Breznan D, Das D, Salam MA, Siddiqui Y, MacKinnon-Roy C, Guan J, de Silva N, Simard B, Vincent R.
Environmental Health Science and Research Bureau, Health Canada</td></tr>
<tr><td>書誌事項</td><td>Nanotoxicology. 2015 Mar;9(2):148-61. doi: 10.3109/17435390.2014.902519. Epub 2014 Apr 9.</td></tr>
<tr><td>試験物質</td><td>・SWCNT-P；Co と Ni を触媒としたﾊﾟﾙｽﾚｰｻﾞｰ法（Kingston et al. , 2004）による。
・MWCNT-P; Sun Nanotech（China, Fe 触媒による CVD 法、純度>80%、径 10-30nm)製。
・酸化した SWCNT,MWCNT；金属触媒を除くため硫酸と硝酸の混酸中で超音波処理し、水洗後ろ過し、脱ｲｵﾝ水で超音波処理後、遠心分離し、沈降したアモルファスカーボンを除去し、上澄みを乾燥する。(SWCNT-O、MWCNT-O)
・対照物質；μ サイズの NIST 標準物質（SRM ｓ）の SiO2(SRM-168a)、TiO2(SRM-154b)</td></tr>
<tr><td>試料調整法</td><td>・4 種類の CNT ｓは、緩衝液（25μg/mL の Tween-80、0.19%NaCl 水を含む）に 3 mg/mL の濃度で voltex で懸濁する。さらに Dounce glass-glass ホモジナイザーで分散し、エッペンドルフ管に入れ栓をする。さらに超音波水浴中で 20 分処理し、56℃の水浴中で 30 分間滅菌する。細胞単一層に加えるときは再び超音波処理する。</td></tr>
<tr><td>試験生物
投与方法・ 期間
試験用量</td><td>細胞；A549; ・Ⅱ型肺上皮細胞株 トリプシン処理し培地で洗浄、2×10^5 cell/mL
・J774；マウス血液単球/マクロファージ 剥ぎ取って 100μm ろ過器でろ過して遠心分離、2×10^5 cell/mL
投与方法・期間・試験用量 96ｳｪﾙ細胞培養プレート上、0.1mL/ウェルの培地で 37℃、24 時間培養し、4 つの CNT ｓを 0,3,10,30,100μg/cm² の用量で各ウェルに加える。最終体積；5%FBS を含め 200mL/ウェルとし、24 時間培養し、その後各種アッセイを実施。各試験は、3 通りの培養プレートで、3 回実施し、平均する。
細胞毒性測定；
・CTB アッセイ、LDH アッセイ、ATP アッセイ、BrdU アッセイを所定の方法で実施。</td></tr>
<tr><td>試験結果</td><td>CNT ｓのキャラクタリゼーション；
<table>
<tr><td rowspan="2">試料</td><td rowspan="2">比 表面積 m2/g</td><td rowspan="2">細 孔体積 cc/g</td><td colspan="4">金属成分の含有量%
（BDL;検知限界以下）</td><td rowspan="2">試 料懸 濁液中 DLS 径</td></tr>
<tr><td>Co</td><td>Fe</td><td>Ni</td><td>Mo</td></tr>
<tr><td>SWCNT-P</td><td>89</td><td>0.30</td><td>1.24±0.13</td><td>0.32±0.04</td><td>1.16±0.13</td><td>0.28±0.02</td><td>7778 nm</td></tr>
<tr><td>SWCNT-O</td><td>21</td><td>0.11</td><td>0.2□±0□02</td><td>0.10±0.0□</td><td>0.19±0.03</td><td>0.04±0.01</td><td>2918 nm</td></tr>
<tr><td>MWCNT-P</td><td>106</td><td>0.44</td><td>BDL</td><td>1.08±□□03</td><td>0□62±0.04</td><td>BDL</td><td>1511 nm</td></tr>
<tr><td>MWCNT-O</td><td>23</td><td>0.12</td><td>BDL</td><td>0.52±0.12</td><td>0.44±0.10</td><td>BDL</td><td>188nm</td></tr>
</table>
・酸化処理によって、上表に見るように金属含有量は低下し、赤外スペクトルや酸素含有量の分析から COOH 基で修飾されていることが示された。
細胞毒性アッセイの結果；
・LDH；J774,A549 ともに 30μg/cm² から LDH 放出が有意に。用量依存性の傾きは酸化していない CNT ｓの方が大きい。A549 は CNT-O（特に SWCNT-O）は殆ど放出がない。（TiO2 と同程度）
・CTB；J774,A549 ともに CTB の還元減は酸化した CNT ｓの方でより顕著。
・ATP；細胞 ATP の減量は LDH と相関性あり。
・Br d U；細胞増殖 Br d U の減少は、J774 ではすべての試料で同様の結果だ</td></tr>
</table>

	が、A549 では CNTs では余り変化がなく、酸化 CNT s で用量依存的に現れる。総じて細胞毒性のエンドポイントの用量変化の傾きは、A549 よりも J774 の方が大きいが、これら CNTs の細胞毒性能（potency）は、二つの細胞においてアッセイに依存する。CNTs の物理・化学的特性と平均の相対的細胞毒性能は、ATP と LDH アッセイから推定した場合には金属含有量と比表面積の影響が大きく、CTB と BrdU の場合には表面極性が影響する。
結論	これらの CNTs の信頼性のあるリスク推定のためには、*in vitro* の毒性評価は、十分にキャラクタライズされた材料で、多数の細胞モデルで、明確な細胞プロセスの理解につながるいくつかの細胞毒性アッセイを行うべきである。

No	SWCNT-7
論文題目 （和訳）	Evaluation of *in vitro* and *in vivo* genotoxicity of single-walled carbon nanotubes. (単層カーボンナノチューブの *in vitro* 及び *in vivo* 遺伝毒性の評価)
著者 所属機関	Kim JS, Song KS, Yu IJ. Toxicity Evaluation Center, Korea Conformity Laboratories, Incheon, Republic of Korea
書誌事項	Nanotoxicology. 2015 Mar;9(2):242-52. Epub 2014 May 19.
試験物質	SWCNT; Hanwa Nanotech (Incheon Korea); ASP-100F (Lot No. ASP-1002121) 径；1-1.2 nm　長さ；～20 µm　純度；～90%（TGA による） 不純物；Co ～3.0%　Ni ～3.0%　Fe ～1.5%　S ～1.5%
試料調整法	分散媒：Ca^{2+}及び Mg^{2+}フリーリン酸緩衝液（pH 7.4）に、5.5 mM D-グルコース, 0.6 mg/ml 種対応血清アルブミン及び 0.01mg/ml 1,2－ジパルミトイルグリセロホスフォコリン(DPPC)を加えたもの；SWCNT は 5%以下であれば、この分散媒に濡れ、マクロな分散度(分散液と遠心分離上澄みの光吸収度の比)は 6.5-12%。 毒性試験時には、10 分間超音波処理する。
試験生物 投与方法・期間 試験用量	① 細胞を用いる復帰突然変異試験（エームス試験）；OECDtesutogaidorainNo.471 に準拠、代謝活性化系を組み込むか否か；S9 ﾐｯｸｽを加える試験、加えない試験を実施 ・試験生物；ヒスチジン要求性サルモネラ菌株 S. typhimurium (TA98, TA100, TA1535, TA1537) 及びトリプトファン要求性大腸菌株 E. coli (WP2uvrA) ・寒天培地プレート上に加え培養、dark/36±1℃、44-48 時間 ・用量；31.3,62.5,125,250,500 µg/plate ② 染色体異常試験；OECD テストガイドライン No.473 に準拠 ・チャイニーズハムスター卵巣細胞；CHO-k1 ・F-12 培地（＋10%仔牛血清、ペニシリン、ストレプトマイシン）で培養 ・12.5,25,50 µg/ml の被験物質を添加し培養 6 時間または 24 時間 ③ *in vivo* 小核試験；OECD テストガイドライン No.474 に準拠 ・試験生物；ICR マウス（雄 7 週齢、病原体フリー） ・腹腔投与；0, 25, 50, 100 mg/kg 及び陽性コントロール(2.0 mg/kg ミトマイシン C)
試験結果	① 復帰突然変異試験；500µg 以下のいかなる投与量でも、また代謝活性化系の有無にかかわらず、被験物質は細胞毒性並びに復帰変異コロニー数の増加を誘起しなかった。 ②染色体異常試験；全ての被験濃度において細胞毒性が見られたが、50%増殖阻害にはいたらなかった。また染色体異常の細胞数、倍数体及び核内倍加においても有意な増加は無かった。 ③*in vivo* 小核試験；試験を通して動物に異常な臨床的兆候はなく、体重増加においても陰性対象と有意な差はなかった。また赤血球に対する細胞毒性は見られず、小核の発生数増加も有意でなかった。腹腔内に SWCNT が見出されたが、器官や血流には浸透していなかった。
結論	本研究の結果によれば、SWCNTs は、in vitro 及び in vivo 遺伝毒性試験において、遺伝毒性的影響が見出されなかった。

No	SWCNT-8
論文題目 （和訳）	Toxicity of Raw and Purified Single-Walled Carbon Nanotubes in Rat's Lung Epithelial and Cervical Cancer Cells （製造したままの、及び、精製した単層カーボンナノチューブのラット肺上皮細胞及び子宮頸がん細胞に対する毒性）
著者 所属機関	Goornavar V, Biradar S, Ezeagwu C, Ezeagwu D, Hall JC, Ramesh GT. Molecular Toxicology Laboratory, Center for Biotechnology and Biomedical Sciences, Norfolk State University, Norfolk, VA, USA
書誌事項	J Nanosci Nanotechnol. 2015 Mar;15(3):2105-14.
試験物質	製造したままの SWCNT；Sigma Aldrich (St.Louis, MO, USA) より購入 精製した SWCNT；450℃で 1 時間の熱処理後、8N HCl+30%H2O2 水中で 40℃、6 時間の超音波処理（金属触媒とアモルファス C の大部分を除去（データ示さず。ＴＥＭ写真を提示））。この精製プロセスによっては、CNT 膜構造は維持され、短くもなっていない。
試料調整法	ジメチルフォルムアミド（DME）中に分散；コントロールにも使用、全てのアッセイに同体積の DME を使用
試験生物 投与方法・期間 試験用量	ラット肺上皮細胞(RLE)、子宮頸がん細胞(HeLa)は、10%FBS、100IU/ml のペニシリン、100g/ml のストレプトマイシンを加えた DMEM 培地で、5%CO_2、95%の湿潤空気中で培養 ROS（反応性酸素種）アッセイ；5、50μg/ml で時間経過を調査後、0.5,1.2.5,5,8,10,25,50 μg/ml で 3 時間暴露 細胞生存率測定；細胞に 72 時間暴露、MTT アッセイによる。 生／死アッセイ；MTT アッセイの再確認、confluency(細胞の密集)形成後、calcein-AM 染料（生細胞中で酵素により蛍光分子に変換）を使用 GSH（グルタチオン）活性、SOD（活性酸素分解酵素）活性、LPO（脂質過酸化反応）、Caspase（カスパーゼ）-3、 Caspase-8 各測定；5μg/ml で暴露後、1,3,6.12,24,48 時間に測定
試験結果	ROS；両細胞ともに用量に依存して増大するが、精製 SWCNT の方がより ROS を誘起する。 細胞生存率は、ROS 同様、用量に依存して低下する。精製した SWCNT の方がより早く低下し､RLE 細胞の方がより顕著である｡生／死アッセイにおいても、両細胞で精製 SWCNT の方に細胞死がより多く観察された。 GSH（細胞中に存在する非酵素系抗酸化物質）は、生成した ROS に対する防御となるが、これも用量依存的に減少する。GSH 系の損失は細胞死とも関連するが、精製 SWCNT において顕著であった。 SOD（ｶﾀﾗｰｾﾞと結合して抗酸化する酵素）も GSH と同様に減少し､精製 SWCNT において著しい。 LPO 生成も、GSH、SOD の減少と反対に増加する。精製 SWCNT で顕著なことも同様である。 Caspase-3 は 12 時間までは殆ど生成しないが、その後急激に増加する。Caspase-8 は当初から生成した。これはアポトーシスが当初から始まることを意味している。この場合も、精製 SWCNT の方に毒性が強いことが示された。
結論	SWCNT は、細胞中に ROS を生成させ、細胞内抗酸化物質 GSH、SOD を消耗させ、カスパーゼカスケードを活性化し、細胞への酸化ストレスを引き起こす。これは、用量と時間に依存しており、精製した SWCNT の方により顕著である。これは精製 SWCNT の方が、製造したままの SWCNT に比べて、より細胞に取り込まれ易い（bioavailable）ことによると考えられる。

No	SWCNT-9
論文題目 （和訳）	MDSC and TGFβ Are Required for Facilitation of Tumor Growth in the Lungs of Mice Exposed to Carbon Nanotubes. カーボンナノチューブに暴露されたマウス肺におけるがん成長の促進にＭＤＳＣとＴＧＦβが必要とされる
著者 所属機関	Shvedova AA, Kisin ER, Yanamala N, Tkach AV, Gutkin DW, Star A, Shurin GV, Kagan VE, Shurin MR. HELD, NIOSH, CDC, Morgantown, West Virginia
書誌事項	Cancer Res. 2015 Apr 15;75(8):1615-23.　Epub 2015 Mar 5.
試験物質	SWCNT；CNI　Inc.　製造、HiPco 法（CO ガスの連続供給、Fe(CO)6 触媒プリカーサ、気相不均化反応）による）、酸処理により Fe を除去したもの。径 1-4nm、BET 比表面積 1,040 m^2/g、化学的切断により長さ 228±77 n
試料調整法	ストック懸濁液；PBS 中、1 mg/mL、pH 7、実験前に 5 分間超音波処理、オートクレーブ中滅菌処理。試験前に要求濃度に希釈し、3-1 分サイクルで超音波しょり。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	がん細胞（Lewis 肺がん細胞；LLC）入手後、RPMI 培地（＋所定濃度の L-グルタミン、ペニシリン、ストレプトマイシン）HEPES、10%熱不活性化 FBS、非必須アミノ酸、ピルビン酸ナトリウム）で維持 ヒト気管上皮細胞；BEAS-2B）；DMEM（5%FBS）で培養、0.06, 0.12, 0.24 mg/mL の SWCNT に 18 時間暴露 野生型（WT）及び TGFβ 欠損マウス；NIOSH 方式鼻部投与（Shvedova et al.; Am J Physiol 2008;295:L552–65)、SWCNT 懸濁液（PBS 中 80μg/マウス、コントロール；PBS）投与、48 時間後、LLC 細胞（3×10^5 cells (300 mL PBS)）を尾部血管に注入、21 日後殺戮、肺を摘出、重量測定、固定後染色し組織観察 MDSC（myeloid-derived suppressor cells;骨髄由来免疫抑制細胞）評価 SWCNT 暴露後 48 時間で肺と脾臓の MDSC 細胞を集め、その数と肺と脾臓の全細胞及び $CD45^+$細胞数に対する％を求める。MDSC による TGFβ の産生は細胞無の上澄みの TGFβ1 のレベル（ELISA による）で評価する。 肺がんの成長促進に関わる CNT に誘導され、MDSC に媒介される因子のバイオインフォーマティクスによる同定は、公開された文献、IPA ソフトウェア及び SWCNT 暴露された BEAS-2B 細胞のマイクロアレー解析による。 高密度オリゴニュークレオタイドアレーの発現解析；BEAS-2B 細胞の SWCNT 暴露したものとしないものの全 RNA を分離し、マイクロアレー解析を行った。
試験結果	肺がんにおける CNT 暴露と MDSC による免疫抑制に共通する炎症媒介者のバイオインフォーマティクス解析；MDSC、肺がん、SWCNT 暴露の 3 者に共通するサイトカイン、ケモカイン、成長因子は、マクロファージコロニー刺激因子（M-CSF）、顆粒球/マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、TGFβ であった。この 3 者の SWCNT 暴露による上方制御が MDSC の蓄積増加、肺がんの加速成長に関わる。そこで、肺における腫瘍の転移成長の機構を調べるため TGFβ の影響を実験的に評価することとした。 SWCNT 暴露後がん細胞を注入した WT マウスは、SWCNT 暴露しない場合に比べて、肺重量で 5 倍、可視のマクロな肺転移の数で 2.5 倍、腫瘍結節の組織病理学的面積で 3 倍に増加した。SWCNT 暴露は、腫瘍の典型的な形態的特徴は変えることなく、腫瘍の成長を加速した。TGFβ 欠損マウスでは、腫瘍は同様に生じるが、SWCNT 暴露によってこのような変化は生じなかった。 SWCNT 暴露 48 時間後に、TGFβ 欠損マウスの肺における MDSC の蓄積を調査したが、肺とリンパには MDSC の導入において TGFβ は含まれていなかった。これは、TGFβ の欠損は SWCNT 暴露後において MDSC の導入を排除しないことを意味している。 両マウスに SWCNT の暴露有無で 48 時間後肺を取り出し、MDSC 細胞を区分けし、コントロールとがん細胞を加えた培地で、活性化した共通遺伝子のＴ細胞と 48 時間共培養し、IL2 産生を調べた。その結果、SWCNT 暴露肺のミクロ環境にさらされた MDSC は、in vivo で 48 時間以下でも、肺がんに誘起された、TGFβ による免疫抑制ポテンシャルに敏感であることが示唆された。 両マウスに SWCNT の暴露有無で 48 時間後腫瘍細胞又は PBS を注入し、2 週間後肺を取り出し、MDSC 細胞を区分けし、活性化した共通遺伝子のＴ細胞と 24 時間共培養し、チミジン産生を調べた。その結果、SWCNT によって誘発された MDSC は、肺がんミクロ環境における活性化に対して、肺のコントロ

	ール MDSC よりも敏感なこと及び T 細胞を妨害する肺の MDSC の能力は TGFβ に媒介されると考えらえる。 SWCNT の MDSC 及び MDSC による TGFβ 産生への直接の効果を調べ、SWCNT は肺がん細胞に誘起される MDSC によって TGFβ 発現を増加させることが示された。
結論	SWCNT の急性暴露は、肺に関連した;骨髄由来免疫抑制細胞（MDSC）の導入と蓄積及び MDSC 誘起 TGFβ 産生を引き起こし、その結果肺に上方制御された腫瘍負荷を招く。MDSC 誘起 TGFβ 産生は、SWCNT と腫瘍細胞の相互作用を必要とする。 SWCNT の肺暴露は、SWCNT に誘引され感作された MDSC による TGFβ 産生の活性化を *in vivo* で介した肺がんの内部での成長を支えるニッチ（niche）の形成を助長する。

No	SWCNT-10
論文題目 （和訳）	Unique toxicological behavior from single-wall carbon nanotubes separated via selective adsorption on hydrogels. (ヒドロゲル上への選択吸着を介して分離された単層カーボンナノチューブの独特な毒性挙動)
著者 所属機関	Clar JG, Gustitus SA, Youn S, Silvera Batista CA, Ziegler KJ, Bonzongo JC. Dept. of Environmental Engineering Sciences, University of Florida, USA
書誌事項	Environ Sci Technol. 2015 Mar 17;49(6):3913-21. Epub 2015 Mar 4.
試験物質	HiPco 法 SWCNTs；Rice University(HPR 164.1)
試料調整法	SWCNTs の水懸濁液；原料 SWCNTs 40ｍｇを 1%界面活性剤（SDS; ドデシル硫酸ナトリウム）水溶液 100mL に投入し、8000rpm で 30 分間ホモジナイズ後、10 分間の超音波処理を 3 回繰り返し、20,000 rpm、4 時間超遠心分離し、上澄み液を取る。 金属及び半導体単層カーボンナノチューブ（m-SWCNTs, s-SWCNTs）への分離；内径 2.5cm、高さ約 8cm のガラスカラムを使用。これに 40mL（ｶﾗﾑ体積；CV）の分離材を充填する。分離前に 4CV の溶媒（1%SDS 溶液）でフラッシュした後、SWCNT 懸濁液 8mL(20%CV)を導入し、溶媒を 1mL/min で流す。高濃度の m-SWCNTs が溶出してくる（検出は吸収／蛍光スペクトルで行う）のでそれを集める。分離材に吸着されている s-SWCNTs は、2%SC(ｺｰﾙ酸ﾅﾄﾘｳﾑ)で溶出される。 毒性試験には SC を用いて SWCNTs を懸濁して使用する。試験水が同一の SC 濃度になるように調整する。（SC の影響を一定にするため）
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	試験生物；淡水産単細胞緑藻類(Green Algae)である Pseudokirchneriella subcapitata 試験法；U.S. Environmental Protection Agency (USEPA) P. subcapitata 96 h growth inhibition method 1003.0 による。 濃度を調整した SC-SWCNT 溶液を含む 50mL の培地に、500,000 cells/mL の P. subcapitatawo1ｍＬを加え、96 時間後の成長阻害度（ｸﾛﾛﾌｨﾙ a の蛍光を利用）を測定する。
試験結果	界面活性剤の影響；SDS は SC と比べて、P. subcapitata に対する毒性が強い。SDS は 0.01mM 加えただけで成長阻害があり、0.075mM で 50%阻害となる。SC は 4mM まで成長阻害せず､8mM で 40%に低下する。緑藻成長阻害実験は、SC1mM で行った。 金属、半導体に分ける前の試料についての緑藻成長阻害実験では、0.25ppm から有意な成長阻害が始まっており、培地での SWCNTs の 50%成長阻害濃度は 0.75mg/L であった。 分離した試料についての結果は金属、半導体で顕著な違いがあった。m-SWCNTs は 0.5 mg/L まで有意な成長阻害は見られないが、s-SWCNTs は 0.5 mg/L で 100%阻害された。このことは混合物でみられた成長阻害は、主に s-SWCNTs よるものであると考えられる。 s-SWCNTs の有害性は SC を加えることによって低減される；s-SWCNTs を 0.2mg/L 一定とし、SC の濃度を増加させると、2mg/L で事実状成長阻害は無くなった。これは、分散剤が SWCNT をカバーし安定化させることを示している。 NanoIntegris（ｱｰｸ放電法）より供給された m-SWCNTs,、s-SWCNTs の水懸濁液（DGU 法;；密度勾配超遠心法による）の P. subcapitata に対する毒性；m-SWCNTs の方が顕著であった。これは、製法や分離法の相違が生体との相互作用に大きく影響することを示していると考える。
結論	金属単層カーボンナノチューブと半導体単層カーボンナノチューブは、P. subcapitata に対する毒性において大きな相違がある。生体に暴露した SWCNTs の有害性は、それ自体の物理的性質のみでなく、界面活性剤と形成される複合体の性質も考慮されなければならない。

No	SWCNT-11
論文題目 （和訳）	Conscious Changes of Carbon Nanotubes Cytotoxicity by Manipulation with Selected Nanofactors （選択したナノ因子を用いて操作することによるカーボンナノチューブの細胞毒性の意識変化）
著者 所属機関	Karolina Werengowska-Ciećwierz1 & Marek Wiśniewski 1,2 & Artur P. Terzyk1 & Katarzyna Roszek3 & Joanna Czarnecka3 & Paulina Bolibok1 & Gerhard Rychlicki1 1 Physicochemistry of Carbon Materials Research Group, Faculty of Chemistry, Nicolaus Copernicus University in Toruń, 7 Gagarin St., 87-100 Toruń, Poland 2 INVEST-TECH R&D Center, 32-34 Plaska Street, 87-100 Toruń, Poland 3 Department of Biochemistry, Faculty of Biology and Environment Protection, Nicolaus Copernicus University in Toruń, 7 Gagarin St., 87-100 Toruń, Poland
書誌事項	Appl Biochem Biotechnol. 2015 Jun;176(3):730-41. doi: 10.1007/s12010-015-1607-1. Epub 2015 Apr 18.
試験物質	SWCNT(Nanostructured and Amorphous Materials (Houston,USA) 社製)
試料調整法	熱水的に（303-523K）30%H2O2 で酸化。異なる表面化学特性を有する SWCNT の試験試料一式を 10mmol/l　PBS 緩衝液（pH=7.4）中で 1mg/ml 濃度で 3 時間超音波により分散。その後、溶液の適量を細胞培地に添加し、最終濃度を 1，10，50μg/ml にした。この段階で、毒性に対する超音波の影響を調査。例えば、試験用 CNT をつい以下して 5 分間超音波分散するか、超音波なしにｳｪﾙに添加するか、を実施。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	【In vitro 試験】 ① chinese hamster ovary(CHO)細胞（Sigma-Aldrich）：10%FBS(ウシ胎児血清)を含む F-12 培地で 310K、CO2 5%で成長。約 5×10^5 細胞を含む 25μl をウェルプレートに播種(24 時間)。 ② ・ヒト MSC(間充織幹細胞)（臍帯由来、PromoCell）：10%SupplementMix を用いた MSC 培地で細胞を成長。約 5×10^5 細胞を含む 25μl をｳｪﾙﾌﾟﾚｰﾄに播種(24 時間)。 ③ CNT サンプル：CNT を成長した CHO、MSC 細胞に、1,10,50μg/ml で添加。24 時間培養。MTT（）3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5－ジフェニルテトラゾリウム・ブロマイド）と LDH 活性試験を実施。 【タンパク質吸着分析】1mg/mlA0-o-493 チューブ 200μl を F-12 培地の 5%FBS 800μl に添加。310K で 12 時間培養。サンプルを遠心分離、上澄みの吸光度を 280nm で測定。変性条件で電気泳動は、ポリアクリルアミド・ゲル・電気泳動（SDS-PAGE）を実施。タンパク質分離では、4%スタッキング・ゲルと 7.5%ランニング・ゲルを使用。電気泳動を電極緩衝液で実施（25mmol/l トリスーグリシン、pH8.3、1%SDS 含有）。分析サンプルを 4%SDS と 10%β-メルカプトエタノール含有緩衝液の低下時に 370K で 5 分間編成。ゲルウェル上に重点。分離後、タンパク質を 0.1%Coomassie Brilliant Blue R-250 staining を使って可視化。
試験結果	① スペクトル分析 ・C1s スペクトル分析（炭素形態）：黒鉛、アルコール性／脂肪族エーテル／その他 sp3、フェノール性／芳香族エーテル、カルボニル／キノン、カルボキシルとエステル、π→π* ・O1s ピーク分析：酸素分子の存在、ｶﾙﾎﾞﾆﾙ官能性からの酸素、フェノール／エーテル／芳香環の炭素に結合した酸素。 ・計算したピークエリア比較：初期ナノチューブ表面の酸素基の数はそれほど高くない。組換え条件の漸進的変化が表面カルボキシル基とカルボニル基の創造を導出。 ・O1s/C1s（元素%比）：熱水学的処理手順の適用が漸進的な焼き払い(burn-off)に導出。同時に、表面極性における漸進的上昇に導く。 ・相互関係では、カーボンナノチューブは活性化された炭素とカーボンブラックと特性が類似。表面酸性基濃度の状況、O1s/C1s　XPS ピーク比の増加。懸濁液 pH の低下。ナノチューブの入った細胞培地の pH レベルは 7.4 で安定。異なる活性化された炭素について、表面酸性基の上昇は、表面塩基性の同時減少による。ナノチューブに関して、酸性の上昇とともに、塩基性も同時減少。塩基性の上昇

	は、G/D 比の上昇と基本的に関係。酸性基数の上昇と同様、焼き払い(burn-off)の上昇とともに、アモルファスカーボン濃度が同時減少。表面酸性の上昇は表面塩基性の同時上昇に付随。 ② 細胞株への毒性影響 ・MTT 試験で、ミトコンドリア酵素活性の低下に基づく初期細胞毒性ｲﾍﾞﾝﾄを検出した。LDH 漏出は細胞膜損失と培地内への酵素の放出によるものであった。 ・ナノチューブの毒性における超音波処理影響では、超音波処理していない強く酸化された CNT は、MSC 細胞として早期に潜水し分化していない細胞に対して毒性があることを示唆した。超音波処理はこの影響を完全に低減した。CHO として標準的で分化し不滅化した細胞に対しては、超音波処理後に最高濃度のときのみ毒性を観察した。MSC 細胞のように、CNT 細胞毒性は、細胞膜ダメージが起こる前の細胞内影響と関係していた。 ・MSC 細胞の生存率の低下は、非常に低い LDH 活性とともに起こり、知覚可能な未分化細胞の生物学的応答を示唆した。CHO 細胞に関して、表面酸性と塩基性官能性(Ca/Cb)用量濃度比は LDH 活性に影響せず、活性は CNT 濃度のみに依存した。追超音波処理は、高 Ca/Cb 比を約 20%低下させる劇的な毒性影響と生存率低下を引き起こした。相互関係の分析から、Ca/Cb 比は毒性を変化する重要なファクターであること、表面酸性の上昇が毒性影響を増加させることがわかった。 ・ナノチューブ A0-o-493 のタンパク質吸着能の試験から、超音波未処理のタンパク質吸着は約 1.8g/gCNT まで時間とともに上昇した。初期プロセスでの超音波処理により、吸着能が低下した。溶液内のナノチューブがタンパク質に接近可能な間隙と束状構造の形成が可能なことを意味した。CNT の超音波分散は、タンパク質との相互関係に係る荷電群の可触性を増加した。 ・12 時間培養後の細胞培地に残ったタンパク質の電気泳動分離では、CNT-タンパク質相互関係の特性を説明した。超音波分散したナノチューブは CHO 細胞に対して高い毒性を示すようであるが、MSC に対しては見かけ上は毒性が低いようであり、細胞の感度は異なっていた。細胞外スペースからのシグナルに対する MSC の生理学的応答は、高い増殖速度と自己再生を維持した。培地のタンパク質組成の変化、特に重要な成長ファクターの欠落は、細胞増殖を阻害することを示唆した。CHO 細胞のケースで、未分散 CNT は分散したものよりも毒性が低かった。細胞外環境の存在は病理学的シグナル「として認識され、強度は培地内の CNT 量と比例した。CHO 細胞に関して、超音波処理 CNT による分散は、細胞を取り込みやすくし、そのために毒性が高くなる。表面積の大きな CNT は成長ファクターと、細胞成長と増殖に重要な他のタンパク質の強い収着を可能にした。タンパク質のアモルファス特性を考慮すると、CNT 表面の荷電群の可触性は相互作用に重要であることを示唆した。 ・Ca/Cb 比は CNT の毒性に影響した。比が高いほど、CHO、MSC 細胞に対するナノチューブの毒性が高くなった。
結論	本研究では、CNT の段階的酸化を解した表面特性の系統的な変化について調べた。CNT 細胞毒性は、試験物質の表面特性と分散に強く依存することを証明した。試験物質の CHO 細胞に対する細胞毒性は低く（CNT が最高濃度のときのみ、明らかに細胞生存率が低下）、主にこの結果は、CNT の超音波分散により起こる。MSC 細胞に対する識別可能な CNT の細胞毒性は、未分化細胞の生物学的応答が異なることを示唆し、一見したところでは、超音波分散と同時に起こる限定された影響とともに、Ca/Cb 比と相互関係を示す。本論文は、ナノファクターと細胞毒性幹の定量的な関係を示した初めての論文である。Ca/Cb 比の変化により、細胞毒性が変化する。

（イ） MWCNT

No	MWCNT-1
論文題目 （和訳）	Lung inflammation and lack of genotoxicity in the comet and micronucleus assays of industrial multiwalled carbon nanotubes GraphistrengthTM C100 after a 90-day nose-only inhalation exposure of rats （工業多層カーボンナノチューブ Graphistrength®C10 のラットへの 90 日間鼻のみ吸入暴露後のコメット・アッセイと小核試験での肺炎症と遺伝毒性の欠如）
著者 所属機関	Daniela Pothmann1, Sophie Simar2, Detlef Schuler1, Eva Dony3, Stéphane Gaering1, Jean-Loïc Le Net4, Yoshi Okazaki5, Jean Michel Chabagno6, Cécile Bessibes6, Julien Beausoleil6, Fabrice Nesslany2,7 and Jean-François Régnier8 1）Harlan Laboratories Ltd, Zelgliweg 1, 4452 Itingen, Switzerland. 、2）Laboratoire de Toxicologie Génétique, Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Pr. Calmette, 59019 Lille, Cedex, France. 、3）Harlan Cytotest Cell Research GmbH, In den Leppsteinwiesen 19, 64380 Rossdorf, Germany.、 4）Le Net Pathology Consulting, 18 rue Henry Dunant, 37400 Amboise, France.、5）AnaPath GmbH, Buchsweg 56, 4625 Oberbuchsiten, Switzerland. 、6）Arkema France, Groupement de Recherches de Lacq (GRL), Laboratoires d'analyse de surface et microscopie et de chimie analytique, 64170 Lacq, France. 、7）UDSL, EA 4483, Département Toxicologie-Santé Publique-Environnement, Faculté de Pharmacie, 1 rue du Pr. Laguesse, 59019 Lille, France. 、8）Arkema France, Département Toxicologie et Environnement, 420 rue d' Estienne d' Orves, 92705 Colombes, France.
書誌事項	Pothmann et al. Particle and Fibre Toxicology (2015) 12:21
試験物質	Graphistrength®C10 (Arkema France) 平均粒径：約 400μm、0.23%が 15μm、状態：強凝集体
試料調整法	エアロゾル生成法を使用し、OECD テストガイドラインを満たすようにした。試験物質を粉砕（5 日間試験：大気下 20 時間、90 日間試験：アルゴン下で 12 時間）後、ふるいにかけた。エアロゾル生成器を用いて高濃度エアロゾルを作成。生成したエアロゾルを暴露チャンバーに流入し、試験濃度になるように大気希釈。エアロゾルは、暴露チャンバー内に継続的に流入。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	【試験生物】Wistar rats（雌雄）、投与群：雄 10／雌 10／雄 35＋雌 35 【試験方法】 ① 5 日間試験：6 時間／1 日、鼻への吸入暴露（nose only）。28 日間回復期間。 ② ①の後に 90 日間試験：5 日間／1 週、鼻への吸入暴露（nose only）。90 日間回復期間。 ③ ②の試験後に、肺炎症パラメータの評価 ④ Micronucleus アッセイ（骨髄細胞）、hOGG1-modified アッセイ（肺、肝臓、腎臓、の細胞）、遺伝毒性ポテンシャル評価 【試験用量】 ① 5 日間試験：気中濃度 0.05／0.25／1.25 mg/m3、コントロール 0 mg/m3 ② 90 日間試験：気中濃度 0.05／0.25／5.0 mg/m3、コントロール 0 mg/m3 【投与方法】 ・暴露チャンバー内にエアロゾル放出。濃度は、大気希釈により実施。
試験結果	① 5 日間試験 ・全ラット：生存（臨床兆候なし）。食物摂取状況：全群同様。体重：曝露影響なし ② 90 日間試験 ・全ラット：生存（臨床兆候なし）。食物消費：観察されず。食物摂取量：0.05/5mg/m3 雄ラットで回復期間の最初の 1 週間に確認、5mg/m3 雌ラットで回復期間の最初の 2 週間に確認。体重増加：0.25,5mg/m3 の雌雄ラットで暴露数週間後に確認。平均体重：コントロールと同様。体重増加：雌雄で確認。体重：5mg/m3 雄で暴露期間内に確認。相対／絶対好中球数の増加・相対リンパ球数の減少：5.0mg/m3 雌雄ラットで暴露期間の最後と回復期に確認。K 値増加（血中化学パラメータ）：5.0mg/m3 雌雄ラットで暴露期間最後に確認。回復期では確認されず、暴露影響ではない。 ③ 気管支肺胞洗浄液（BALF）分析 ・5 日間試験の 24 時間暴露後：[BALF の細胞数]PMN（多形核好中球）レベル

	が 1.25mg/m3 で顕著な増加。[マクロファージ]全グループで貪食された試験材料を含む。用量関連性のある増加。[生化学分析]GGT レベルが 1.25mg/m3 で優位に増加。0.25,1.25mg/m3 でプロテイン値増加。 ・90 日間試験の 24 時間暴露後：[BALF の全細胞数生存率]雄変化なし。[BALF 全細胞数]雌 50mg/m3 で増加。生存率の差なし。[BALF 細胞の細胞分化]雌雄のマクロファージで減少。雄 0.25mg/m3、雌 5.0mg/m3 の好中球とリンパ球で増加。[生化学分析]5.0mg/m3 でプロテイン、リン脂質、LDH、GGT、ALP の顕著な増加。0.25mg/m3 のリン脂質、GGT も増加。[α 腫瘍壊死因子]0.25,5.0mg/m3 の BALF、5.0mg/m3 雌の IL-1β レベルの統計的・生物学的優位な増加。 ・90 日間試験の暴露後：[全細胞数]5.0mg/m3 雌雄で増加。0.25mg/m3 雄で増加。[生存率]影響なし。[差]24 時間暴露後と同程度。[生化学パラメータ]サイトカインレベルが 5.0mg/m3 で変化。[α 腫瘍壊死因子]0.05,0.25mg/m3 で継続的増加。 ④　臓器重量、顕微鏡試験 ・5 日間試験：[肺重量]変化なし。[腎臓重量]雄 0.25,1.25mg/m3 で 5 日間暴露後に優位な現象。[腎臓／全重]0.25mg/m3 で減少。[組織学的相関欠如]雌で影響あり。 ・90 日間試験：[肺の黒褐色病巣、気管支リンパ節の黒褐色変色]全ラット又は 5.0mg/m3 の 90 日間暴露後 24 時間、90 日間後で確認。[試験物質に関連した顕微鏡的所見]0.05,0.25mg/m33 暴露で観察されず。[絶対・相対肺重量]24 時間暴露後、90 日間暴露後ともに 5.0mg/m3 の雌雄で増加。 ⑤　顕微鏡試験 ・5 日間試験：[24 時間暴露後]気管支、気管支上皮細胞の肥大、マクロファージの浸潤重症度を 1.25mg/m3 の数匹で確認。浸潤マクロファージのサイトプラズマでの黒色包含を BALF で濃度依存確認。 ・90 日間試験：[24 時間暴露後]黒粒濃度に関連した明確な沈着の最小化を全暴露群の肺で確認。[90 日間回復後]平均重症度は 0.05,0.25mg/m3 で減少。黒粒の部分的除去を示す。肺胞マクロファージの低~中程度濃度に関連した浸潤と関係。回復期間終了時に、5.0mg/m3 の雄 3 匹、雌 2 匹で間質コラーゲン繊維の増加が最小。 [強凝集体の沈着]暴露臓器で観察されず。 ⑥　精子数 ・90 日間試験の 24 時間暴露後：[精子数、運動性、形態]暴露影響なし。 ⑦　小核試験 ・[PCE(多染性赤血球)の頻度増加、骨髄毒性の兆候]0.05,0.25,5mg/m3 の雌雄で観察されず。[小核と PCEs の頻度の優位な増加]positive コントロール CPA で処理した雌雄で観察。 ⑧　コメットアッセイ ・[テール輝度、hoGG1 の欠落・存在の増加]0.05,0.25,5mg/m3 の 90 日間暴露後 24 時間の雌雄の単離肺、肝臓、腎臓細胞で確認。[テールにおける DNA%の優位な増加]positive コントロール MMS で処理した雄 nose ラットの肺、肝臓、腎臓細胞で確認。
結論	不溶性粒子の過剰投与による肺炎症の特徴は、5.0mg/m3 濃度に 90 日間暴露した際に観察された。除去と回復の明確な兆候は、0.25mg/m3 濃度で観察された。遺伝毒性は、肺で局所的に、骨髄、肝臓、腎臓で遠位には検出されなかった。したがって、Graphistrength®C10 は、局所的な全身遺伝毒性に対する関連は低いようにみえ、0.25mg/m3 を NOAEC と考えることができ、0.25mg/m3 の NOAEC を反復投与毒性に設定した。

No	MWCNT-2
論文題目 （和訳）	Carbon Nanotube Uptake Changes the Biomechanical Properties of Human Lung Epithelial Cells in a Time-dependent Manner （カーボンンナノチューブの取込みが、時間依存性をもってヒト肺上皮細胞の生物学的メカニズム特性を変化させる）
著者 所属機関	Chenbo Dong1, Reem Eldawud1, Dr. Linda M. Sargent2, Dr. Michael L. Kashon2, David Lowry2, Prof. Yon Rojanasakul3, Prof. Cerasela Zoica Dinu1 Department of Chemical Engineering, West Virginia University, Morgantown WV, 26506, USA, 2) National Institute for Occupational Safety and Health, Morgantown WV, 26505, USA, 3) Department of Basic Pharmaceutical Sciences, West Virginia University, Morgantown WV, 26506, USA
書誌事項	J Mater Chem B Mater Biol Med. 2015 ; 3: 3983–3992. doi:10.1039/C5TB00179J.
試験物質	多層カーボンナノチューブ（MWCNTs；純度 95%、PD15L5-20、径 10-20nm、長さ 1-5μm、Nanolab Inc.）
試料調整法	硫酸：硝酸＝3：1 の混合液で洗浄→氷槽内で超音波分解(1 時間)→脱イオン水で希釈後、フィルターろ過(3 回)→乾燥 Alexa 488 Bovine Serum Albumin 488(Alexa-BSA)を EDC と NHS を用いて MWCNTs 上に共有結合で固定化→MES に、160mM EDC と 80mM NHS に 2mg MWCNTs を 200rpm でベンチシェーカー装置で室温 15 分間分散→EDC/NHS 活性化 MWCNTs をフィルターろ過し、MES バッファーで洗浄後すぐに、PBS 中に 1mg/mlAlexa-BSA 溶液 2mL で再分散。室温 15 分間 200rpm→フィルターろ過、PBS 洗浄→洗浄されたプロテイン量の定量
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	【試験生物】ヒト肺上皮細胞（BEAS-2B） 【試験方法】 ・MWWCNTs へのプロテイン負荷と負荷されたプロテインの放出効果 ・ROS（活性酸素種）評価 ・生物学的分析：ペトリ皿状の細胞に 24μ g /cm2（OSHA による推奨を基に設定）MWCNT に 1/3/6/12 時間暴露。暴露後細胞を PBS 洗浄。30 分間 4%グルタルアルデヒド溶液で固定後、グルタルアルデヒド溶液洗浄除去。BEAS-2B 細胞の弾性係数分析を実施。Hertz モデルの Sneddon's modification を使ってナノメカニズム的特性を評価。細胞弾力性を評価。
試験結果	① プロテイン負荷分析 ・0.22±0.06mg プロテイン／mg MWCNTs ・結合固定化プロテイン／無プロテインの蛍光放射効率：34±9%→効率低下は、プロテインの変更とナノチューブ接触部分のクエンチングによる。 ・コントロールに対する Alexa-BSA-MWCNT 結合に暴露した細胞の蛍光強度：暴露後最初の 30 分は遅く、FITC シグナルの変化は明確ではない。FITC 高シグナルは、Alexa-BSA 以外の細胞吸収で観察。MWCNT 結合部分よりも細胞膜を横断する能力が無プロテインで効果的であることと関係があると推定。Alexa-BSA-MWCNT に暴露した細胞は暴露していない細胞と比較して、また Alexa-BSA 以外に暴露した細胞は MWCNTs に暴露した細胞と比較して、FITC シグナルが暴露時間が長くなると次第に増加。暴露 3 時間後には、Alexa-BSA-MWCNTs に暴露した細胞の FITC シグナルが暴露していない細胞に比べて 55%増加、ラベルしていない MWCNTs に暴露した細胞と比べて 19%増加、Alexa-BSA 以外に暴露した細胞と比べて 12%増加。暴露 6 時間後には、Akexa-BSA-MWCNTs に暴露した細胞の FITC シグナルが、暴露していない細胞、ラベルしていない MWCNTs に暴露した細胞、Alexa-BSA-MWCNTs 以外に暴露した細胞に比べて、それぞれ 92、50、20%変化。12 時間後には、FITC シグナルは、暴露していない細胞、ラベルしていない MWCNTs に比べて 100%高く、Alexa-BSA 以外に暴露した細胞よりわずかに高くなった。Akexa-BSA-MWCNT 結合の取込みは暴露時間とともに増加。 ② ROS 評価 ・1，3，6 時間暴露では ROS 生成量が増加、12 時間暴露後にはコントロールと同様に減少。12 時間後の減少は、細胞内部のグルタチオン(GHS)の上方調節か、取り込まれた MWCNTs のクエンチング効果のどちらかと関係するものと推定。 ・精製された MWCNTs と初期 MWCNTs に暴露した細胞間の ROS レベルを相互比較すると、精製した部分に比べて初期 MWCNTs の ROS レベルが明らかに

	高くなった。アスペクト比との関連を推定。 ③　生物学的分析 ・ヤング率：1，3 時間暴露では、細胞全体の弾性係数の明確な変化はなし。3 時間暴露で、暴露された細胞の細胞核部分はコントロールと比較して明確な変化あり。6 時間以上の長期暴露では、暴露された細胞は、細胞全体でも核部分でもコントロールと比べて明らかに増加。取り込まれたナノチューブの細胞蓄積が大きいためと推定。6 時間暴露では、暴露していない細胞に比べて暴露された細胞で、細胞全体で 39%、細胞核で 49%、12 時間暴露では、22%、28%それぞれ増加。
結論	ヒト肺上皮細胞を、使用者が用途に合わせて特徴づけを行った MWCNTs に職業的に暴露する用量での暴露は、時間により異なる取り込みを示したほか、ROS 生成と生物学的メカニズムでの細胞変化を誘導した。特に、本ン研究では、MWCNTs の取込みの大部分は、細胞への暴露が 6 時間以内で起こった。さらに、2 時間暴露では、細胞の弾性特性の変化が暴露時間とともに次第に、また時間依存性をもって生物学的メカニズム特性全体のさらなる変化とともに起こった。暴露された細胞と弾性変化という生物学的メカニズム特性の評価は、MWCNT が誘導した細胞変化と in vitro モデル細胞システムを用いた毒性に対する基となる基礎を決定する能力を提案する。

No	MWCNT-3
論文題目 （和訳）	A systems toxicology approach on the mechanism of uptake and toxicity of MWCNT in Caenorhabditis elegans （シトラブディス・エレガンス（線虫の一種）におけるMWCNTの取込みと毒性メカニズムに関する体系的毒性アプローチ）
著者 所属機関	Hyun-Jeong Eoma, Carlos P. Roca b, Ji-Yeon Roh a, Nivedita Chatterjee a, Jae-Seong Jeong a, Ilseob Shim c, Hyun-Mi Kim c, Phil-Je Kim c, Kyunghee Choi c, Francesc Giralt b, Jinhee Choi a School of Environmental Engineering, Graduate School of Energy and Environmental System Engineering, University of Seoul, Seoul 130-743, Republic of Korea b Departament d'Enginyeria Quimica, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Catalunya, Spain c Risk Assessment Division, National Institute of Environmental Research, Incheon 404-708, Republic of Korea
書誌事項	Chemico-Biological Interactions 239 (2015) 153–163
試験物質	MWCNTs、OH-MWCNTs（Cheaptube より購入） ・純度：90%、95%　・外径：110-170nm、8-15nm ・チューブ長：5-9μm、0.5-2.0μm　・真密度：1.7-2.1g/ml、～2.1g/cm3 ・機能的グループ含有率：－、3.7%　・流体力学直径：1097.5nm、785.2nm ・ゼータポテンシャル：-30.93、-31.47
試料調整法	脱イオン水で 1 時間超音波分解。*C.elegans* 暴露用に、K-media（0.032M KCl,0.051M NaCl）で実験濃度に準備。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	【試験生物】シトラブディス・エレガンス（線虫の一種）（*C.elegans*） 【試験方法等】 ① 生存・生殖試験：野生株使用。48 時間、72 時間暴露後に実施。 ② マイクロアレイ、プロテオミクス解析：*C.elegans* に MWCNTs1mg/L を、0、4、24 時間暴露。コントロールは 24 時間。全 RNA（the RNeasy Mini Kit）とタンパク質溶解物を準備。全 RNA は 5μg を、逆転写及び in vitro 転写用に準備し、洗浄・染色後に、Affymetrix GeneChip® *C.elegans* Genome Array をスキャン。スキャン、イメージ、発現データ。データのノーマライズ。(1)マイクロアレイデータを用いた IPA(Ingenuity pathways analysis)による遺伝子発現解析（カットオフ値 1.5 倍）と、(2)24 時間暴露条件でのﾏｲｸﾛｱﾚｲﾃﾞｰﾀを用いた遺伝子オントロジー解析による遺伝子発現解析。(3)全タンパク質溶解物を用いた 2-DE 解析。(4)2－ジェルスポットをトリプシンで消化、トリプシンペプチドを分離・解析してタンパク質同定。(5)ﾌﾟﾛﾃｵﾐｸｽﾃﾞｰﾀを用いた経路解析。ﾈｯﾄﾜｰｸ解析を基にした 4 ステップを開発。ステップ 1；リファレンス・ネットワークを KEGG リファレンスデータベースに入力した *C.elegans* を用いて構築。ステップ 2；検出されたタンパク質を対応遺伝子を示すﾈｯﾄﾜｰｸのノードにマップ化。ステップ 3；影響をうけた経路を、検出された 2 つのタンパク質をつなぎ、検出されたタンパク質のみを構成する、ネットワークの最短経路により同定。ステップ 4；個々のタンパク質、経路について得られたスコアの統計的有意性を帰無仮説と一致するスコア分布との比較により計算。 ③ 生存試験：500mg/L 濃度の MWCNTs と OH-MWCNTs に *C.elegans* 野生株と突然変異株を暴露。 ④ 定量リアルタイムポリメラーゼ鎖反応：qRT-PCR のために、線虫を MWCNTs と OH-MWCNTs に 24 時間暴露し、遺伝子発現を IQTM SYBR Green SuperMis により分析。定量 RT-PCR を、Choromo4 Real-Time PCR 検出システムを用いて選択した遺伝子について実施。プライマーは、*C.elegans* データベースから検索されたシーケンスを基に構築。
試験結果	① 生存・生殖試験：500mg/L 濃度 MWCNTs に暴露した *C.elegans* の死亡率の増加せず。生殖能力は 72 時間　1mg/LMWCNTs 暴露後に約 15%減少。→オミクス試験濃度として 1mg/L を選定。 ② マイクロアレイと経路解析：トランスクリプトームの反応は、MWCNTs への 24 時間暴露のほうが 4 時間暴露に比べて強かった。*C.elegans* の発現変動遺伝子(DEGs)の数は、24 時間暴露の方が 4 時間暴露よりも多かった。転写産物は 4，24 時間ともに調節されたが、転写産物の多くが個別暴露条件で特

	異的に調節された。24 時間暴露後の DEGs の約 31%は 4 時間暴露のものと重複し、4 時間暴露後の DEGs の 72%は 24 時間暴露後のものと重複していた。若い成体への 1mg/L　24 時間暴露で比較的軽度のストレス反応を観察した。 (1) マイクロアレイデータを用いた IPA(Ingenuity pathways analysis)による遺伝子発現解析：真核生物開始因子 2（eIF2）、eIF3、eIF4、AKT は、DEGs とともに生成されたﾈｯﾄﾜｰｸにおいて、主要結合分子であること、炎症誘発転写因子である NF-κB は DEGs とともに生成されたﾈｯﾄﾜｰｸにおいて分子の過半数に結合していることが示された。遺伝子経路として、異物代謝シグナル伝達、脂肪酸代謝、ﾗﾊﾟﾏｲｼﾝの哺乳類標的(mTOR)、細胞外シグナル調節キナーゼ／マイトジェン活性化プロテインキナーゼシグナル伝達経路もまた、MWCNTs に暴露した *C.elegans* の明確な変化により観察。 (2) 24 時間暴露条件でのマイクロアレイデータを用いた遺伝子オントロジー解析による遺伝子発現解析：MWCNTs 暴露が、生殖能力の減少に寄与する可能性を示した。ファゴソームは潜在的に MWCNTs の取込みメカニズムがあることを示唆した。 ③ ﾌﾟﾛﾃｵﾐｸｽと経路解析：エンドソーム、ファゴソーム、リソソームの経路の関係から、ベーシックと確率的アプローチのどちらも、*C.elegans* の MWCNTs の取込みと最終的な毒性イベントによるものと示唆された。実際の *C.elegans* 遺伝子あるいはタンパク質ではなく、KEGG 相同分子を基にした経路解析でも、ファゴソーム経路を検出等から、MWCNTs に暴露した *C.elegans* の小胞体（ER）ストレスの関与を暗示した。 ④ トランスクリプトミクスープロテオミクス：プロテオミクスアッセイとトランスクリプトミクスアッセイの両者で、異なる形でのタンパク質の発現や、遺伝子／タンパク質間の転写レベル、翻訳レベルの下方発現と逆方向への修正、食作用の確認から、食作用が MWCNTs の取込みの主要なメカニズムであることを示唆した。 ⑤ *C.elegans* の機能的突現変異体を用いた仮定の検証：経路解析の結果の組合せにより、エンドサイトーシス、ER ストレス、酸化ストレスが、*C.elegans* において MWCNTs の取込みと毒性の潜在的なメカニズムであることを確認した。マルチオミックス駆動過程に関する試験では、500mg/l までは突然変異体に MWCNTs の影響は見られなかった。OH-MWCNTs の応答に関する試験における線虫の生存低下は、取込みと毒性を誘導する試験媒体中にヒドロキシル基の導入された MWCNTs の分散が増加したことが原因である。eat-2 突然変異体で毒性の完全消失から MWCNTs 取込みの主要経路が経口摂取であることを強く示唆した。ファゴサイトーシスは MWCNTs の取込みメカニズムの 1 つで、*C.elegans* への毒性に直接影響した。MWCNTs 単体は、比較的低濃度で生殖毒性を引き起こしたが、かなり高濃度までの広範囲で死亡は観察されなかった。OH-MWCNTs 暴露により hsp-4 の感受性は野生株に比べて明らかに増加し、MWCNTs による ER ストレスの直接的な刺激を示した。Hsp-4 発現から、MWCNT 暴露が ER ストレス自身の直接的な起動よりはむしろ ER ストレスに向けた *C.elegans* の応答に影響する可能性を示唆した。sod-3,pmk-1,cep-1 突然変異体の OH-MWCNTs に対する感受性の増加から、酸化ストレスもまた、*C.elegans* において OH-MWCNTs が誘導した毒性に関与することを示唆し、個々の突然変異体は MWCNT に対して感受性が異なることを確認した。
結論	トランスクリプトミクス、プロテオミクス、最終的な機能的遺伝子解析が、MWCNTs に暴露した *C.elegans* における取込みメカニズムと毒性についての詳細な洞察を提供した。*C.elegans* の機能的ネットワークの詳細分析から、*C.elegans* の MWCNTs に対する取込み及び毒性のメカニズムとして、食作用、エンドサイトーシス（飲食作用）、ER ストレス、酸化ストレス、を導き出すことが可能である。経路解析に関するネットワークに基づくアプローチの力は目覚ましいものであり、特に、さらなる実験的研究のガイダンスに十分な仮定の作成に関しては目覚ましい。本研究で採用された統合された体系的な毒性学的アプローチは、MWCNTs のような化学物質の毒性についての包括的な洞察を提供する。この統合的アプローチもまた、本研究で採用した機能的な遺伝的ツールを使ったリスク評価に関連した組織の生物学的レベルでの不利な結果と組み合わせる際に、AOP の開発に役立つ。

No	MWCNT-4
論文題目 （和訳）	MWCNTs induce ROS generation, ERK phosphorylation, and SOD-2 expression in human mesothelial cells （MWCNTs は、ヒト中皮腫細胞における ROS 生成、ERK リン酸化、SOD-2 発現を誘発する）
著者 所属機関	Min Yu1, Riping Chen2, Zhenyu Jia1, Junqiang Chen1, Jianlin Lou1, Shichuan Tang3, and Xing Zhang1 1 Department of Occupational Diseases, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Zhejiang, P. R. China 2 Department of Hygiene, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Zhejiang, P. R. China 3 Key Laboratory of Occupational Safety and Health, Beijing Municipal Institute of Labor Protection, Beijing, P. R. China
書誌事項	International Journal of Toxicology 2015 Jun 25. doi:pii: 1091581815591223.
試験物質	MWCNTs(Sigma-Aldrich)：径110-170nm、長さ5-9μm、純度90%以上、金属混合率0.1%以下、非表面積130m2/g。溶液中MWCNTsの微細構造・・・時々凝集体をもつ針状繊維（TEM）、径（予測）120-280nm、長さ（予測）2-10μm。 DHE（ジヒドロエチジウム）とU0126（Beyotime）、N-アセチル-L-(+)-システイン（NAC）（Sigma-Aldrich）、モノクローナルマウス抗GAPDH抗体と抗SOD-2（スーパーオキシドジスムターゼ）抗体（Santa Cruz Biotechnology）、リン酸化p44/42 MAP　キナーゼに対する抗体（リン酸-Thr202）と全p44/42 MAP キナーゼ（Ab-204）（Signalway Antibody）、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）結合ヤギ抗マウス免疫グロブリン（Ig）GとHRP結合ヤギ抗ウサギIgG（Multisciences）、Clarity Western ECL基盤（Bio-Rad）、RPMI 1640とリン酸緩衝生理食塩水（PBS）とFBSSと0.05%トリプシンEDTA（Gibco Life technologies）
試料調整法	MWCNTs を細胞培地 RPMI 1640 に分散、10%ウシ胎仔血清（FBS）を追加。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	【試験生物】不死化ヒト中皮細胞株Met-5A（the American Type Culture Collection, ATCC）：37℃、5%CO2で10%FBSを追加したRPMI 1640の継代培養 【試験方法】 ① MWCNTsの細胞毒性：(1)Cell Titer-Glo発光細胞生存率アッセイまたは、(2)乳酸脱水素酵素（LDH）細胞毒ｱｯｾｲｷｯﾄ（Beyotime）により決定。 (1) Cell Titer-Glo発光細胞生存率アッセイ：Met-5A細胞を、0,10,20,40,80μg/mL　MWCNTsで処理（全量100μL/well、24時間）後、100μL Cell Titer-Glo 試薬を個々のウェルに添加。発光をSpectra Max M5 multimode microplate seaderで記録。 (2) LDH放出アッセイ：Met-5A細胞を0-80μg/mLの範囲の異なる用量のMWCNTsに24時間暴露し、上澄みを96-ウェルプレートに異動。60μLのLDH試験試薬を各ウェルに追加。30分の培養後に、各ウェルの吸光度を490nmの波長で測定。細胞生存率は、処理しないコントロールのパーセンテージ表記。 ② 透過型電子顕微鏡を用いたMet-5A細胞とのMWCNTsの相互作用：MWCNTsに暴露したMet-5A細胞をTEMにより分析。細胞を0,20,40,80μg/mL　MWCNTsに24時間暴露後、トリプシン処理し、2.5%パラホルムアルデヒド懸濁液で固定、1%オスミウム酸で後固定、Eponで包埋。超微細（60-70nm厚）スライスをカット、酢酸ウラニルとクエン酸鉛で染色。JEOL 1400 TEM下で実験。 ・ROS生成の測定：0,10,20,40μg/mL　MWCNTsにMet-5A細胞を24時間暴露し、細胞のDHE蛍光頻度を測定。未処理細胞をコントロール。任意蛍光ﾕﾆｯﾄ（AFUs）の結果＝処理細胞のAFU／コントロール細胞のAFU×100. Met-5A細胞をNAC（2.5mmol/L）で1時間前処理後、MWCNTs　40μg/mLに24時間暴露して、MWCNTs暴露後のMet-5A細胞のROD生成における抗酸化物質の効果を調査。蛍光値を測定。 ③ タンパク質抽出とウェスタンブロット法：Met-5A細胞を、PMSF（フッ化フェニルメタンスルホニル）とホスファターゼ阻害混合物で補完したRIPA（放射性免疫アッセイ）溶解バッファーで40分間氷上で溶解。遠心分離後上澄みを捕集。上澄み中のタンパク質濃度をBCAタンパク質アッセイにより測定。

	個々のサンプルからの15μgタンパク質を12%ドジシル硫酸ナトリウムーポリアクリルアミドゲルで分解。Immun-Blot PVDFﾒﾝﾌﾞﾚﾝに電気的移動。メンブレンをGAPDH／SOD-2／リン酸ERK1/2／ERK1/2の個々に対する抗体を用いて、4℃、１晩、穏やかに振とう培養。ブロットをTween-20とリン酸緩衝生理食塩水（PBST）で洗浄し、HRP結合2次抗体で1時間培養し、PBSTで洗浄。免疫反応性バンドをECLウェスタンブロット検出試薬を用いて化学蛍光により検出。Fluo Chem FCを用いて可視化 ④ RNA単離と定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応：全RNAをMet-5A細胞からUltrapure RNAキットを用いて抽出。全RNAのうち1μgをTaKaRa RNA PCRキットver.3.0を用いて、20μL全量中の相補的DNA（cDNA）に逆転写。cDNA2μL全量、10μmol/L個別ﾌﾟﾗｲﾏｰの0.4μL、10μL SYBR Promix Ex Taqを最終量20μLでPCRで使用。ヒトGAPDHに対するプライマー…5'-ACG GAT TTG GTC GTA TTG GG-3', 5'-CTC GCT CCT GGA AGA TGG TG-3', ヒトSOD-2に対するプライマー…5'-GAC ACT TAC AAA TTG CTG CTT GTC C-3', 5'-CTT TCA GTT ACA TTC TCC CAG TTG-3', メッセンジャーRNA(mRNA)発現をGAPDHに対して標準化。 ⑤ 統計解析：SPSS Statistics 17.0により分散の1方向分析。
試験結果	① 細胞毒性と形態変化 ・LDHｱｯｾｲとCell Titer-Glo蛍光細胞生存率アッセイ：Met-5A細胞は40μg/mL以下MWCNTsで細胞毒性影響はなかったが、80μg/mLでは細胞生存率が低下した。Met-5A細胞は24時間暴露では40μg/mLまで毒性は見られなかった。 ・TEM：20～40μg/mLへの暴露では、細胞の形態変化もMWCNTsの内在化も観察されなかった。80μg/mL暴露では、細胞にリソソームに似た細胞小器官が確認された。無毒性用量に暴露したMet-5A細胞ではMWCNTsは存在しなかった。 ② 反応性酸化種生成：DHE蛍光頻度により、MWCNTsが用量依存的に細胞内ROSレベルを著しく増加した。40μg/mLへの暴露前にROS阻害NACによる前処理を行うとROSレベルが著しく低下した。 ③ ROSにより媒介された細胞外シグナル調節キナーゼ1/2(ERK1/2)活性化：Met-5A細胞をMWCNTsに24時間培養処理した後に、ERK1/2リン酸化反応では用量依存性をもって増加した。MWCNTsへの暴露前にROS阻害NACで前処理したところ、NACがMWCNTsの誘導したERK1/2リン酸化反応を著しく低下することを観察し、ERK1/2活性化がROS生成と関係することがわかった。 ④ SOD-2の発現：0～40μg/mL MWCNTsへの24時間暴露後のmRNAレベルは用量依存的に増加し、20／40μg/mL MWCNTsに暴露したMet-5A細胞のSOD-2タンパク質レベルは転写調節と一致して増加した。 ⑤ SOD-2発現の誘発はROS-ERK1/2と関係：細胞をMWCNTsへの暴露前に、ROS阻害剤／NAC／MEK1/2阻害剤U0126により前処理したところ、2.5mmol/L NACまたは20μmol/L U0126を用いた場合に、MWCNTsが誘発したSOD-2の上方調節を著しく低下した。
結論	MWCNTs は mRNA でもタンパク質レベルでも SOD-2 発現を上方調節し、SOD-2 の発現を強化することを示した。同時に、スーパーオキシド形成と ERK1/2 リン酸化反応の両者が、MWCNTs に暴露した Met-5A 細胞で観察され、ROS スカベンジャー、NAC を用いた前処理により減少した。MWCNTs 暴露前に、MWCNTs が誘発した SOD-2 の過剰発現における ROS/ERK1/2 の役割をさらに調べるために、分裂促進因子が活性化したタンパク質キナーゼ　キナーゼ 1/2（MEK 1/2）阻害剤（U0126）または NAC を用いて細胞を前処理した。両方の前処理で、SOD-2 の MWCNTs が誘発した過剰発現を低下した。これらの結果から、MWCNTs に暴露した Met-5A 細胞の SOD-2 の上方調節に、ROS 形成と ERK1/2 活性化が媒介している。

No	MWCNT—5
論文題目 （和訳）	Multi-walled carbon nanotube induced frustrated phagocytosis, cytotoxicity and pro-inflammatory conditions in macrophages are length dependent and greater than that of asbestos （多層カーボンナノチューブが誘発するマクロファージの食作用、細胞毒性、炎症誘発条件の妨害は、長さに依存し、アスベストよりも大きい）
著者 所属機関	Matthew S.P. Boyles [a], Lesley Young a, David M. Brown [a,b], Laura MacCalman [c], Hilary Cowie [c], Anna Moisala [d], Fiona Smail [d], Paula J.W. Smith [a], Lorna Proudfoot [a], Alan H. Windle [d], Vicki Stone [a,b] a Centre for Nano Safety, Edinburgh Napier University, UK b Heriot-Watt University, School of Life Sciences, UK c Institute of Occupational Medicine, UK d Department of Materials Science and Metallurgy, University of Cambridge, UK
書誌事項	Toxicology in Vitro 29 (2015) 1513–1528
試験物質	・工業的に生産された MWCNTs を含む（CNTI）（Mitsui&Co.,Ltd.） ・アスベスト 2 種：短繊維アモサイト（SFA）、長繊維アモサイト（LFA）、 ・ナノ粒子カーボンブラック（NPCB）
試料調整法	【MWCNTs】 ・化学的蒸着（CVD）：短 MWCNTs（<20nm、CNTA、CNTB）と長 MWCNTs（>20nm、CNTC、CNTD）を合成 ・高温焼鈍：金属不純物とアモルファスカーボンの除去により CNTB、CNTD 形成。2,000℃、6 時間。 ・鉄の溶解：全粒子からの Fe2+と Fe3+の溶解を鉄キレート剤を用いて決定。Fe2+には、3-(2-ピリジル)-5,6-ジフェニル-1,2,4-トリアジン-4',4"-ジスルホン酸ナトリウム塩(ferrozine)、Fe(III)には、メシル酸デフェロキサミン。 ・粒子分散液：典型的な細胞培地中での粒子の安全性を決定するために、RPMI 1640, RPMI 1640+10%胎児子牛血清（FCS）、ROMI 1640+1%ウシ血清アルブミン（BSA）　1mg/ml で粒子を懸濁
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	【試験生物】3 つの異なるマクロファージモデルを使用して組織培養。 ・ラット由来の 2 つの細胞株と原発性肺胞マクロファージ。動物細胞は、粒子アッセイで細胞株が効果がないことが確認できたときのみ使用。 ・ヒト単球系、モノマック-6(MM6)、マウスマクロファージ（J774A.1）細胞（RPMI 1640 一般培地を用いてフラスコで維持）。 ・BAL（気管支肺胞洗浄）細胞を 3 か月齢オス Sparague-Dawley(SD)ラットから単離、安楽死後に肺を単離、ｶﾆｭｰﾚ挿入、無菌食塩水で洗浄。BAL 細胞をペレット化後、無菌リン酸緩衝生理食塩水（PBS）で懸濁（5×106 細胞/ml）。 【試験用量】細胞培地に 1mg/ml で粒子を懸濁、ボルテックス、超音波処理し、MM6 について 31,62,125μg/ml、J774A.1 細胞評価のために、7.5,15,31,62,125μg/ml で、4,24,48 時間。 【試験方法】 ① LDH：MM6 と J774A.1 から懸濁液への放出により、失われたメンブレン完全性（lost membrane integrity）、つまり細胞毒性を測定。媒体のみとトリトン X-100(0.1%)をネガティブ、ポジティブコントロールとして使用。LDH 濃度を社内手法にて測定。 ② WST-1：MMT アッセイの代替法として、水溶性ホルマザンに対する 2-(4-ヨードフェニル)-3-(4-ニトロフェニル)-5-(2,4-ジスルホフェニル)-2H テトラゾリウム・モノナトリウム塩(WST-1)の低下を採用。MM6、J774A.1 細胞培地を、4,24,48 時間、7.5-125μg/ml の粒子濃度に暴露し評価。媒体のみのものはネガティブコントロールとして使用。細胞を 10%WST-1 試薬で 37℃、MM6 については 2 時間、J774A.1 細胞については 40 分間培養し、吸光度を測定。10%WST-1 を用いた細胞培地をブランク。培地のみで成長した細胞を 100%視細胞集団。プレートを遠心分離し上澄みをウェルプレートに移動。 ③ ELISA（酵素免疫吸着測定法）：4,24,48 時間暴露後の粒子で処理した J774A.1 から上澄みを収集。培地上澄みの TGF- ß 濃度を ELISA により評価。試験感度<15pg/ml。ポジティブコントロールは、15ng/ml 大腸菌由来 LPS を使用。 ④ CBA（cytometric bead array）：MM6 から、GM-CSF（ヒト顆粒球マクロ

	ファージコロニー刺激因子）、ｲﾝﾀｰﾛｲｷﾝ-1α(IL-1α)、IL-1β、IL-6、単球走化性タンパク質-1(MCP-1)、形質転換成長因子（TGF- ß 1）、腫瘍壊死因子-α（TNF-α）、血管内皮成長因子（VEGF）、J774A.1 からネズミ科の IL-1β、IL-6、IL-10、MCP-1、TNF-α の濃度を決定。測定は、4,24,48 時間粒子に暴露した細胞からの捕集した上澄みについて実施。ポジティブコントロールに 15ng/ml 大腸菌由来 LPS を使用。サンプルを BD FACSArray　フローサイトメーターで測定し、データを FCS Filter と FCAP Array ｿﾌﾄｳｪｱﾌﾟﾛｸﾞﾗﾑで解析。 ⑤　SEM（臓器サンプルの準備）：暴露した細胞を無菌 PBS で 1 回洗浄、0.1M カコシル酸ナトリウム緩衝液で洗浄、固着剤 2%グルタルアルデヒド 500µl で 4℃、2 時間培養。全ウェルを 0.1M カコシル酸ナトリウム緩衝液で洗浄、同緩衝液で 4℃で培養。固定サンプルを有機溶媒（アセトン濃度を 5 分毎に増加：10,30,50,70,90,100%）で脱水。FEG SEM で測定。 ⑥　食細胞バースト：マクロファージモデルに暴露した粒子からのスーパーオキシドアニオン(O2-)の放出を測定。ｼﾄｸﾛﾑ c の低下に基づくアッセイを使用。24 ウェルプレートに、180µg/ml 粒子懸濁液 100µl（最終濃度 15µg/ml）を 900µl 反応混合物（50mlPBS に溶解させた 50mg ｼﾄｸﾛﾑ c と 100mgD 型グルコース）に添加。ポジティブコントロールとして、100µl の PBS か、1µg/ml の PMA（ホルボール　12-ミリスチン酸　13-酢酸）を 100µl 添加。ネガティブコントロール（ROS の低下）は、暴露した培地内で 150IU/mlSOD を用いて培養した細胞を用いた・SOD により粒子間相互作用を決定。50µl、5×106 細胞／ml、BAL 細胞懸濁液を各ウェルに添加し 5%CO2、37℃で 5 時間培養。この後、上澄み液 100µl を 90 ウェルに移動してプレートリーダーで解読。 ⑦　食作用機能障害：食作用能を J774A.1 細胞で評価。Vybrant™ Phagocytosis Assay Kit を使用。J774A.1 細胞をウェルプレートにシーズし粒子を 31µg/ml 濃度で 1 又は 4 時間暴露。ポジティブコントロールには培地のみものを使用。1，4 時間後に、粒子処理をやめ、細胞を PBS で洗浄後、1mg/ml のフルオレセインでラベルした大腸菌 K 12 生物粒子 100µl に暴露。最終洗浄後、内在化していない粒子の蛍光をトリパンブルー色素で消滅。蛍光強度を測定。食作用能を、ポジティブコントロールに対する食作用％として表示。 ⑧　統計解析：粒子暴露と培地のみコントロールとの明らかの相違、特定粒子処理における違いを決定。
試験結果	①　粒子パネル ・長さ：CNTC=CNTD>CNTI=CNTA=CNTB ・結晶化度（I_G/I_D,I_G/I_D'）：CNTI>CNTD>CNTB>CNTA>CNTC ・鉄分（乾燥）：CNTA>CNTB>CNTC>CNTI>CNTD ・生物学的鉄放出（pH 中性）：CNTI>CNTC>CNTD>CNTA>CNTB ・生物学的鉄放出（pH 酸性）：CNTA>CNTC>CNTI>CNTD>CNTB ②　細胞毒性 ・J774A.1 細胞は 62µg/ml 以下では細胞毒性に対して微々たる影響しか示さなかった。4 時間暴露でのみ、NPCB と SFA への応答によりミトコンドリア活性が低下した。工業的に気に生成された長い MWCNTs は統計的に有意な細胞毒性を示した。 ・MM6 細胞では、J774A.1 細胞よりも粒子処理による影響を受けにくく、大きな影響は受けなかった。CNTI と CNTC で細胞生存率の顕著な減少を確認した。 ・短い CNTs では、いかなる細胞毒性も誘発されなかった。 ③　免疫反応 ・工業的に生成された長い MWCNTs は炎症誘発と線維化免疫応答に影響を与えた。 ・J744A.1 細胞の炎症誘発マーカーである IL-1β、IL-6、IL-10 の分泌では識別可能な違いは確認できなかったが、LPS は炎症誘発マーカーIL-1β と IL-6 の著しい分泌を誘発した。MCP-1 については、24、48 時間で、長く、高い鉄分／低結晶化度の CNTC が著しい MCP-1 タンパク質放出を誘発した。高濃度、長期暴露で、MCP-1 分泌が誘発された。線維化誘発 TGF-ß1 の分泌は、全粒子において最高濃度時に著しく、MWCNTs による高い TNF-α の生成の誘発が明らかとなった。・MCP-1、TGF-ß1、TNF-α に関する用量反応曲線では、MCP-1 分泌に関して、多数の粒子の EC50 は他のよりも明らかに低いことを確認した。長く、高鉄分 CNTC は他の粒子よりも低く、長くて低鉄分 CNTD、短くて低鉄分 CNTC、工業的に生成された CNTI の EC50 は 24 時間でコントロールよりも低かった。48 時間では CNTB は NPCB、SFA と比較すると低く、NPCB と比較すると CNTI

	が低かった。 ・MM6 細胞では、GM-CSF,IL-6,IL-α、IL-1β、TNF-α の分泌で認識可能な変化はなかった。MCP-1 発現は CNTI と 48 時間暴露 CNTD で強化された。TGF-ß1 または VEGF の放出は 4、24 時間暴露で観察されなかった。TGF-ß1 の目立った分泌を 48 時間 CNTI で確認した。細胞による VEGF の放出は短く、低鉄分、高い結晶化度の CNTB と、長い CNT（CNTC,CNTD）の 48 時間で強化された。 ④ 取込み、食作用の妨害、食作用機能障害：異なる長さの MWCNTs と食作用を有する細胞間の相互作用を調査し、J774A.1 マウス・マクロファージ様細胞の粒子暴露を SEM で観察した。 ・食作用の妨害は長い CNTs に対する応答で最も顕著で、呼吸バーストと食作用の低下から確認された。短い CNTs の金属濃度と結晶化度は、こうしたエンドポイントに対してほとんどあるいは全く影響を与えなかった。このことから、多くの応答は繊維長に依存することが示唆された。 ・コントロール細胞では、食作用に関係した細胞膜波うち現象が増加し、繊維に向かって、繊維に沿っての細胞移動からの葉状仮足が増加した。LFA 暴露細胞では、食作用には長い繊維にそって槍のようにつくことを確認した。 ・CNTI では、多数の細胞が CNTI 弱凝集体に接触していた。 ・短く実験室で生成された CNT：食作用を示す表面の波うち現象は、CNTA と直接関係し、細胞内への CNTA 侵入サイトの細胞膜は波うち現象や仮足形成との関係はなく、細胞表面を直接刺していることを示唆した。CNTB は、低用量でも、細胞は微絨毛と細胞膜波うち現象が増加した。CNTI 暴露のように、食作用 CNTB 弱凝集体への試みが多数の仮足の形成を誘導した。 ・長い CNTC と CNTD では、細胞形態の変化が最大であった。波うち現象に関係した食作用は多数の細胞膜を横切る際に観察された。多数細胞は同じ CNT 弱凝集体の食作用を試み、単一の細胞が多数の CNTs の内在化を継続的に試みていた。LFA 暴露で細胞は繊維長に沿って拡大したが、比較的球状では細胞は仮足の中に CNTs を引きこんでいるように見えた。大きな刻み目が粒子取込み箇所で明らかであった。 ・ラット BAL 細胞の食作用バースト評価で、全粒子（NPCB 暴露以外）で明らかな O2-が放出された。 ・食作用障害では、粒子パネルの J774A.1 細胞への暴露では、未処理コントロールと比較して食作用大腸菌の取込みに関する明確な違いは確認できなかったが、粒子暴露前 4 時間に、大腸菌の粒子取込みの 50%低下を、長 CNTC で観察した。
結論	本研究では、CNT の長さを、長いもの vs.短いもの、あるいは金属を含むのと、MWCNTs 単体を比較した。工業的に生成された長い MWCNTs は細胞に対して細胞毒性があり、炎症誘発、線維化促進免疫応答を誘発する際に影響を及ぼした。短い CNTs はほとんど細胞毒性を誘発しなかった。妨害された食作用は、呼吸バーストと食作用能の低下のように、長い CNTs に対する応答でほとんど明らかであった。短い CNTs、金属含有率、結晶化度はこうしたエンドポイントに対して全くあるいはほとんど影響を与えなかった。これは、多くの反応が線維長に依存することを示唆する。本研究から、CNTs は潜在的に病原性があり、同じ物質に基づく用量で、アスベストにより誘発されるよりも大きな、マクロファージの有害な反応を誘発することを示した。

No	MWCNT-7
論文題目 （和訳）	The interaction of carbon nanotubes with an *in vitro* blood-brain barrier model and mouse brain *in vivo* （in vitro 血液－脳関門モデルとマウス能 in vivo を用いたカーボンナノチューブの相互作用）
著者 所属機関	Houmam Kafa [a], Julie Tzu-WenWang [a], Noelia Rubio [a], Kerrie Venner [b], Glenn Anderson [c], Elzbieta Pach [d], Bel_en Ballesteros [d], Jane E. Preston [a], N. Joan Abbott [a], Khuloud T. Al-Jamal [a], a Institute of Pharmaceutical Science, King's College London, Franklin-Wilkins Building, 150 Stamford Street, London SE1 9NH, UK b Institute of Neurology, University College London, Queen Square, London WC1N 3BG, UK c Histopathology Department, Great Ormond Street Hospital for Children, London WC1N 3JH, UK d ICN2-Institut Catala de Nanociencia i Nanotecnologia, Campus UAB, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain
書誌事項	Biomaterials. 2015 Jun;53:437-52. doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.02.083. Epub 2015 Mar 19.
試験物質	アミノ官能多層カーボンナノチューブ（MWNTs-NH_3^+）
試料調整法	・MWNTs 誘導体の機能化：Al-Jamal et al.(2011、2012)の方法に従って、MWNTs-NH_3^+と DTPA-MWNTs を合成。Boc 保護アミノ酸を Al-Jamal et al.(2012)と Pastorin et al.(2006)により合成。合成した MWNTs を、Kaiser テストと熱重量分析により特徴づけ。 ・In111 による DTPA-MWNTs の放射性ラベル化：f-MWNTs（機能化 MWNTs）の DTPA 誘導体（1mg/ml-水）を等量の酢酸アンモニウム緩衝剤で希釈（最終濃度 0.1M、pH5.5）後、$^{111}InCl_3$を添加。室温で 30 分間反応後、未反応インジウムのキレート化のために EDTA クエンチング溶液を添加して終了。[^{111}In]DTPA-MWNTs のラベル効率を TLC（薄膜層クロマトグラフィ）により決定。[^{111}In]DTPA-MWNTs 少量を PBS で 5 倍希釈し、1μl をシリカゲル含浸ガラス繊維シート状に塗布。TLC を 50mM EDTA 含有 0.1M 酢酸アンモニウム移動相に移動、乾燥後、サイクロン蛍光検出器を使ってシグナル計数。[^{111}In]DTPA-MWNTs の分散を [^{111}In]DTPA のコンタミから確認。[^{111}In]DTPA-MWNTs の安定性を等量の PBS または血清との混合により試験し、放射性ラベル化後に 24 時間 37℃で培養。未結合インジウムを細胞培養前に除去。50mM EDTA 含有 0.1M 酢酸アンモニウム移動相を用いた TLC を用いて構造安定性を確認。コントロールとして、[^{111}In]EDTA を使用。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	【試験生物】新生仔牛熱不活性化血清、ウシ血漿由来血清（First-Link, UK Ltd.） 【試験方法】 ① 改変 LDH（乳酸脱水素酵素）アッセイ：PBEC をウェルプレートに播種。24 時間で培地を無血清培地に変え、細胞に MWNTs-NH3+を添加。MWNTs-NH3+分散をデキストロース溶液に準備し、最終濃度 20μg/ml と 50μg/ml で細胞上に添加。24 時間、72 時間後に、光学顕微鏡画像保存。細胞を HBSS で洗浄後、TritonX-100 を溶解。細胞溶解物を収集、遠心分離。LDH 顔料を CytoTox96®アッセイプロトコル後に試験。シグナルを FLUOstar Omega マイクロプレート・リーダーで測定。 ② PBEC（主要ブタ脳内皮細胞）の単離：Rubin et al.(1991)によりウシ脳内皮用開発 PBEC 単離方法を基に実施。ブタ脳を氷温 IMDM 培地に移動し氷温保持。脳半球を氷温リン酸緩衝生理食塩水で洗浄し、大脳除去。脳表面と溝内部から髄膜をはがした後、半球内部から白質を回収。MEM/HEPES 培地含有無菌ビーカーに皮質を捕集、切り刻む。MEM/HEPES 含有フラスコ内で均一化後、150μm と 60μm でフィルターろ過。脳毛細血管をフィルタートラップ。消化混合物（M199 培地に溶解させた、コラゲナーゼ・タイプ 3、トリプシン、DNase、FBS、ペニシリン／ストレプトマイシン）を含むペトリ皿に設置して 37℃1 時間培養。フィルター上の脳毛細血管を捕集、遠心分離。上澄みを吸引し、ペレットを MEM/HEPES に再懸濁。本ステップ 2 回。凍結培地に再懸濁。 ③ PBEC の培養・維持培養フラスコをラット尾コラーゲンでコーティング後、HBSS で洗浄。フィブロネクチンをフラスコに 2 時間添加。フィブロネクチ

ンにコラーゲン架橋後、フラスコを HBSS で洗浄。PBEC 培地を準備し、細胞成長・分化を助ける補足剤を確認。PBEC 用に利用した最適増殖培地は、10%v/v 血漿由来仔ウシ血清、100U/100μg/ml ペニシリン／ストレプトマイシン、2mMGlutamax™、125μg/ml ヘパリン、4μg/ml ﾋﾟｭｰﾛﾏｲｼﾝを補足した低グルコース DMEM。培地を無菌フィルターろ過。PBEC 60's バイアルを無菌カバー後、PBEC 培地で希釈。懸濁液をコーティングしたフラスコにいれ、培地が 50%融合するまで培地を 3 日毎交換。

④ 出生後仔ラットからの主要ﾗｯﾄ星状膠細胞の単離：主要な星状膠細胞ﾀｲﾌﾟ I を 0-2 日齢 Wistar 仔ﾗｯﾄから分離。頭蓋骨から脳を除去し、氷温解剖緩衝剤に保持。脳を大脳、中脳構造、脈絡叢、海馬の除去のために解剖。髄膜を除去、皮質を氷温解剖バッファーに設置。皮質を刻んだ後、トリプシン溶液を添加、30 分間 37℃培養。培養後、トリプシンを中和し、遠心分離。ペレットを再懸濁し、培地中で粉末化。ホモジネートを 70μm でフィルターろ過。血球計で計数。細胞をポリー L-リジンでコーティング゛したフラスコに播種後、培養。7-9 日後に、コンタミ細胞を除去。シトシンアラビノシドを添加して、さらに精製。5 日毎に培地交換。

⑤ BBB 共培養 Transwell™システムの設置：実験 1 週間前に、星状膠細胞をポリ－L-リジンでコーティングしたウェルプレート中で 2 次培養。成長速度を 3 日後にモニター。細胞が 50%密集度に到達後、ポリエステルインサート上で PBEC がフィルター上に内皮細胞単層を形成するまで細胞培養。培地を無血清培地に変更。頂端、基底室を pCPT-cAMP,RO-20-1724、ヒドロコルチゾンで補足。BBB モデル緊張を評価のために TEER（経内皮電気抵抗）を測定。

⑥ 電顕による BBB を横断する f-MWNTs の輸送：PBEC/星状膠細胞共培養 BBB モデルをセットアップ。F-MWNTs 頂端室に添加し、f-MWNTs と PBEC 単層間相互作用を超微形態的画像により調査。細胞取込み実験を 2,24,48 時間、37℃で実施。PBEC/星状膠細胞 BBB モデルを f-MWNTs（20μg/ml）の頂端室への添加後、4℃30 分間前培養し、f-MWNTs の PBEC への取込みのエネルギー依存性調査。プレートを 4℃4 時間培養。PBEC 単層と星状膠細胞をグルタルアルデヒド溶液で固定。

⑦ Transwell™フィルターのサンプル処理と電顕画像用星状膠細胞：PBEC と星状膠細胞を含む Transwell™フィルターを酸化オスミウムにより固定。カコジル酸緩衝剤ですすいだ後、エタノール（70,90%,無水エタノール）で脱水。各エタノール濃度で 10 分培養。酸化プロピレン添加後、酸化プロピレンとエポキシ混合液ですすぎ、エポキシ樹脂中に設置、60℃で 3 日間重合。超薄膜切片を銅 200 メッシュグリッド上に捕集、酢酸ウラニルで染色、TEM／低電圧 STEM で測定。

⑧ Transwell™フィルター処理された電顕画像：80kV で Philips CM12 操作により PBEC と星状膠細胞の明視野 TEM 画像を獲得。低電圧 STEM 画像を測定。明視野から電子を捕集。環状暗視野（ADF）から散乱電子を捕集。ADF は高密度電子構造の解像度が可能な逆対照とする。高角度環状暗視野（HAADF）を生成。高解像度 TEM（HRTEM）画像と STEM 画像を 120kV で獲得。

⑨ PBEC を横断する[^{111}In]DTPA-MWNTs と[^{14}C]スクロースの輸送に関する研究：PBEC/星状膠細胞共培養 BBB モデルをウェルプレートにセットアップ。[^{111}In]DTPA-MWNTs（20μg/ml）を Transwell™ insert の頂端室に添加。プレートを 37℃、72 時間培養。3 インサートを 4℃4 時間培養後、37℃で再培養し輸送時の温度影響を調査。透過性マーカー[^{14}C]スクロースを Transwell™の室に添加して密着接合部上での[^{111}In]DTPA-MWNTs の潜在的損傷を評価。影響のない同位体[^{111}In]EDTA を別のコントロールとして使用。PBEC／星状膠細胞なし条件で処理したフィルターでの実験を同時に実施、ﾒﾝﾌﾞﾚﾝﾌｨﾙﾀｰを横断する[^{111}In]DTPA-MWNTs の透過性評価。1, 3, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 120, 240, 1080, 2880, 4320 分に、0.5ml を基底室から採取、カウンターバイアルに捕集。基底室の培地を温培地とともに最充填。[^{111}In]シグナルを定量。[^{111}In]崩壊時に、^{14}C シグナルを定量。吸収割合を計算。

⑩ γ－シンチグラフィーによるマウスにおける[^{111}In]DTPA-MWNTs 組織生体内分布：[^{111}In]DTPA-MWNTs の組織生体内分布をγ－シンチグラフィーを用いて測定。5-6 週齢メス C57/B16 マウスをイソフルレン吸入麻酔。100μl PBS に[^{111}In]DTPA-MWNTs とともに単一尾静脈注射により静脈内投与。投与後 5 分、30 分、1 時間、4 時間、24 時間に全身かん流を心臓左心室を介し、ヘパリン添加生理食塩水により実施。血管から緩く結合した[^{111}In]DTPA-MWNTs 又は残留物を血管から洗浄。皮膚、肝臓、脾臓、腎臓、

	心臓、肺、筋肉、骨、脳、胃、腸を含む主要全組織を死後採取、重量測定、放射能測定。結果を、投与用量／臓器の%、投与用量／組織 g の%で表示。 ⑪ 脳毛細血管枯渇：毛細血管枯渇法により脳毛細血管から柔組織を分離。 【試験材料】IMDM(イスコフ改変ダルベッコ培地)、DMEM（高グルコースタルベッコ改変イーグル培地）、低グルコース EMEM、培地 199、PBS（リン酸緩衝生理食塩水、10x、pH7.4）、最少必須培地／HEPES、ペニシリンーストレプトマイシン 100X、フェノールレッドを用いた 0.05%トリプシン - EDTA(1X)、GlutaMAX™ Supplement（Invitrogen, Life Science,UK）、コラーゲン タイプ 3、トリプシン粉末、デオキシリボ核酸 I（Worthington Biochemicals Inc, USA）
試験結果	・TEM 画像から、MWNTs-NH3+が PBEC 単層をエネルギー依存的トランスサイトーシスにより横断することを確認した。 ・MWNTs-NH3+は、4 時間暴露と 24 時間暴露後のエンドサイトーシス小胞と多小胞体内に観察された。 ・In vitro BBB モデルで完全な横断は 48 時間暴露後に観察され、MWNTs-NH3+の存在により、星状膠細胞内に入ることを確認した。 PBEC 層を横断する MWNTs-NH3+を放射性ﾄﾚｰｻｰを用いて定量的に評価したところ、共培養モデルを使って 72 時間暴露後に 13.0±1.1%の最大輸送に到達した。 ・f-MWNT は、マウスに対する静脈投与後 5 分で、著しい脳取込みを示した。 ・毛細血管枯渇では、f-MWNT が脳毛細血管と柔組織画分の両方に存在することが確認された。 これらの結果から、全身投与後に、脳への薬物送達と生物製剤に対するナノキャリアーとして CNTs が利用できることを示した。
結論	本研究は、in vitro 共培養 BBB モデルを横断し、in vivo 全身投与後にマウス脳に蓄積する f-MWNTs の特異的な能力に関する初めての証拠を与えた。共培養 BBB モデルの選択は、密着結合の形成し、表面受容体の発現し、トランスサイトーシスを示すことにより、in vivo BBB 特性を不死化内皮細胞株よりももっと近く模倣できるという、共培養主要内皮細胞培地の優位性を基に行った。TEM と STEM による超微細構造画像を用いて、損傷を受けていない MWNT-NH3+の転座に関する絶対的な証拠を獲得するとともに、取込み経路についても確認した。電子顕微鏡写真から、MWNTs-NH3+のトランスサイトーシスと、時間関数としてのシーケンスを確認した。MWNTs-NH3+はエンドサイトーシス小胞と多小胞体内で 4-24 時間培養中に確認され、48 時間後には PBEC 細胞から基底部出口で確認された。ADF と HAADF 画像からは、小胞を囲む脂質膜と MWNTs-NH3+出口に続く損傷を受けていない細胞膜の存在が明確に示され、改良された LDH アッセイとの組合せにより、MWNTs-NH3+ベクターの生体適合性を示した。もっとも重要なことは、星状膠細胞層における f-MWNT の存在が、TEM でも確認されたことである。PBEC 単層を横断する f-MWNTs の輸送の程度は、放射性ラベル[^{111}In]DTPA-MWNT を頂端部から基底部まで追跡することで調査した。これは、in vitro モデルで BBB を横断する f-MWNT の転座の証拠を初めて示したものである。4℃で BBB を横断する f-MWNT の輸送は著しく低下し、このことから、取込みが、エネルギー依存性をもった経路により駆動されていることを確認した。In vivo 生体内分布研究からは、かなりの量の f-MWNTs が全身投与後にマウス脳に早い時点で蓄積されることを示した。毛細血管枯渇は、脳柔組織内の f-MWNT の存在に関する初期の証拠を提供した。

No	MWCNT-8
論文題目 （和訳）	Extensive temporal transcriptome and microRNA analyses identify molecular mechanisms underlying mitochondrial dysfunction induced by multi-walled carbon nanotubes in human lung cells （広範囲の時間的トランスクリプトームとマイクロ RNA の分析は、多層カーボンナノチューブによりヒト肺細胞で誘導されるミトコンドリア機能障害の基になる分子メカニズムを特定する）
著者 所属機関	Penny Nymark[1,2], Peter Wijshoff[1], Rachel Cavill[1], Marcel van Herwijnen[1], Maarten L. J. Coonen[1], Sandra Claessen[1],Julia Catalan[3,4], Hannu Norppa[3], Jos C. S. Kleinjans[1], and Jacob J. Briede[1] 1:Department of Toxicogenomics, Maastricht University, Maastricht, The Netherlands, 2:Institute of Environmental Medicine, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden, 3:Nanosafety Research Center and Systems Toxicology, Health and Work Ability, Finnish Institute of Occupational Health, Helsinki, Finland, and 4:Department of Anatomy, Embryology and Genetics, University of Zaragoza, Zaragoza, Spain
書誌事項	Nanotoxicology. 2015;9(5):624-35. doi: 10.3109/17435390.2015.1017022. Epub 2015 Apr 1.
試験物質	Mitsui MWCNT-7（MWCNT-XNRI-7）、クロシドライト・アスベスト（UICC より購入）、MMVF10 グラスウール（Dr David Brown より提供）
試料調整法	BSA（ウシ血清アルブミン）0.6mg/ml とともに細胞成長培地に 1mg/ml の分散原液をガラス管に準備し、超音波洗浄器で 37℃20 分間、超音波分解。調整・分解した分散原液を最終分散で 0.25、2、10μg/cm2 になるように希釈（それぞれ、2、16、80μg/ml に相当）し、37℃20 分間再び超音波分解し、直接、細胞上に塗布。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	【細胞株】上皮表現型を示す、形質転換したヒト気管支上皮 BEAS 2B 細胞（the American Type Culture Collection）。BEAS 2B 細胞を 37℃無血清 BEGM 培地で成長。 【試験方法】 ・ミトコンドリア膜ポテンシャル（MMP）：細胞を 0.25、2、10μg/cm2MWCNTs、アスベスト、グラスウールに 24 時間暴露（各々、MWCNT025, MWCNT2, MWCNT10, ASB025, ASB2, ASB10, GW025, GW2, GW10）。持続性効果を 2 低用量（0.25、2μg/cm2）について 48 時間試験。MMP の変化を JC-1 染色との組合せによりフローサイトメトリーで検出。CCCP（カルボニル-シアン-3-クロロフェニルヒドラゾン）、ミトコンドリア脱共役をアッセイ固有ポジティブ・コントロールとして 5 分間 100μM で使用。暴露した細胞を 15 分間トリプシン処理し、ハンクス液（HBSS）中に 10%胎児血清（FCS）を添加。細胞を HBSS で洗浄し、JC-1 で染色。染色細胞を 50μm ナイロンメッシュでフィルターろ過し、10,000 細胞／複製をフローサイトメトリーで分析。Flowing software 2.5.0 を使って結果を解析。暴露していない細胞は R1gate をセットするのに使用し、CCCP 暴露細胞は R2gate をセットするのに使用。Ra と R2gate の比を個別暴露条件から計算し、コントロールと比較して、不変 MMP との細胞割合を決定。統計解析を実施。 ・ミトコンドリアのラジカル形成：ミトコンドリアを 0.25、2μg/cm2MWCNTs、アスベスト、グラスウールへの 24 時間暴露細胞から単離。各暴露条件について 2 つの独立した実験を実施。ミトコンドリアを MiB01 に希釈し、37℃5 分間培養、800nM リンゴ酸塩、2M グルタミン酸塩、1M ｺﾊｸ酸ｴｽﾃﾙで 37℃20 分間再活性化。ｽﾋﾟﾝﾌﾟﾛｰﾌﾞ CPH と組合わせた ESR 分光計を使ってミトコンドリアのラジカル形成を決定。1U/μlSOD を使って、スーパーオキシド・ラジカルの検出を確認。ラジカル形成を ER 4119HS 高感度共振器と X バンド頻度で動作する 12kW 電源を設置した Bruker EMX 1273 を使って測定。CPH シグナルを WIN-EPR スペクトラム定量プログラムを使って解析。スペクトラの定量はピーク表面の測定により実施。統計解析を実施。 ・トータル RNA 抽出とマイクロアレイ実験：細胞を、0.25、2μg/cm2　MWCNTs、アスベスト、グラスウールに、1、4、6、12、24、48 時間暴露。トータル RNA を 0.5mlTRIZOL を使って抽出。Affymetrix Human GeneChip HT HG-U133 Plus 24-Array Plates と Agilent Human miRNA Microarrays の試料調整、ハイブリダイゼーション、洗浄、染色、スキャンを実施。Affymetrix arrays の品質管理を ArrayAnalysis.org web service を使って実施。Agilent については、R 統

	計言語で開発した社内パイプラインを使用。前景・背景強度、スポット飽和、背景を超えるスポット平均 - 中央比とレベルを評価。全アレイは高品質。ハイブリダイゼーション・コントロールを present と呼び、強度の期待された増加を与える。 ・マイクロアレイデータの注釈、正規化、フィルタリング：遺伝子発現データを RMA 正規化、EntrezGeneIDs に再注釈、発現レベルにフィルタリング。miRNA データの前処理を R/Bionconductor package AgiMicroRNA により実施。全遺伝子シグナルを分位正規化、Log2 転送、固定。 ・示差的に発現した、遺伝子（DEGs）と microRNA（DEmiRs）：DEGs を R の limma を用いて決定。DEmiRs を Chipster のペアになった経験的ベイズテストにより特定。未調整の p 値と低倍率変化を用いて、リベラル・アプローチを mRNA と miRNA データの両方に適用して、低用量を考慮した低レベル変化を特定。RNA データとターゲット遺伝子との負の相関を個々のデータについて検出。ウェブ・ツール VENNY を使って遺伝子／miRNAs のﾘｽﾄ比較。 ・核転写ミトコンドリア関連遺伝子と microRNA：核転写ミトコンドリア関連遺伝子リストを mitoP2 and DAVID データベースを基に設置。1243 の特異的なミトコンドリア関連遺伝子を特定し、Affymetrix arrays に 1161 が存在。ミトコンドリアの機能に関連した 67 の miRNA リストを設定。ミトコンドリア関連 DEGs（mDEGs）と DEmiRs（mitomiRs）をリストを用いてデータセットで特定。 ・バイオインフォマティクス解析：[PCA 解析]PCA（主成分分析）を custom-made のスクリプトを使って MMP 関連遺伝子上の R について実施し、暴露影響の違いを評価。同じ処理グループのサンプルの主成分をプールし、ﾕｰｸﾘｯﾄﾞ距離を計算。[遺伝子オントロジー、経路、遺伝子ネットワーク解析]Chipster を使って遺伝子ｵﾝﾄﾛｼﾞｰ（GO）用語のエンリッチメントについて超幾何学テストを実施。ConsensusPathDB を使用して、最短 DEG リストにおいてエンリッチした関連経路を特定。完全なミトコンドリア遺伝子リスト（1161 遺伝子）を背景リストとして使用。誘発されたネットワークモジュールを遺伝子リストに対して分析。[STEM 解析]STEM（short time series expression miner）を使って MMP の低下に関連する DEGs を評価。発現プロファイルと遺伝子リストを暴露条件別に作成し、重複する遺伝子をリスト化して、さらに解析。類似発現プロファイルを示す遺伝子セットを、経路のエンリッチメントと CPDB において誘発されたネットワークモジュールに対して解析。[DTW4Omics 解析]時系列ｵﾐｸｽﾃﾞｰﾀ用に設計された動的時間伸縮を使って抗相関 DEGs と DEmiRs に使用。手法はﾃﾞｰﾀｾｯﾄ間の時間シフトを考慮して、負の相関を特定。DTW4omics をｴﾝﾄﾞﾎﾟｲﾝﾄﾓｰﾄﾞで使用。
試験結果	・ミトコンドリア膜ポテンシャルの低下（MMP↓）が生物学的に関連する用量（0.25μg/cm2）の MWCNTs で観察され、アスベストでは 2μg/cm2 で観察されたが、グラスウールでは観察されなかった。 ・広範囲転写発現及び microRNA 発現解析から、MWCNT とアスベストが誘導する MMP の低下に関連した 330 の遺伝子シグネチャーを特定し、それらの遺伝子にはミトコンドリア機能として知られている 26 の遺伝子も含まれていた。 ・MMP の低下に関連した遺伝子のうち 49 の遺伝子は、実験時間全体で非常に類似した発現パターンを示し、大部分はミトコンドリア恒常性に強く関与する 2 つの転写因子、APP と NRF1、によって調節されていることがわかった。 ・4 つの microRNA は MMP の低下と相互に関連があり、そのうちの 1 つである miR-1275 は、MMP 低下と関連した遺伝子の大部分と負の相関があることがわかった。 ・グルコース新生、ミトコンドリア LC-脂肪酸 β-酸化とスピンドル微小管機能のような細胞プロセスは、MMP 低下に関連した遺伝子と miRNA の中で強化された。
結論	330 遺伝子のセットで、ミトコンドリア機能に強く関与する 2 つの転写因子（NRF1、APP）と 4 つの miRNAs（特に、miR-1275）は、低用量の MWCNTs とアスベストへの暴露後の MMP の低下の誘発に関係していた。これらの遺伝子と miRNAs が、グルコース代謝、グルコース新生、ミトコンドリア LC-脂肪酸 β-酸化のようないくつかのミトコンドリアプロセスの停止だけでなく、微小管に関連した機能にも関与することが特定された。ここで示された最も中心的な遺伝子は 3 つの in vivo 試験で特定され、Figure2 に視覚化されている。ここで重複についての知見は、マウスの MWCNT が誘発した炎症と線維化と細胞の MWCNT に関連したミトコンドリアの機能障害を結びつけるものである。グラスウールは MMP に影響を与えず、全体として異なる経路の停止を示した。

No	MWCNT-9
論文題目 （和訳）	Asbestos and multi-walled carbon nanotubes generate distinct oxidative responses in inflammatory cells. （アスベストと多層カーボンナノチューブが炎症細胞の明確な酸化反応を生成する）
著者 所属機関	Satomi Funahashi1, Yasumasa Okazaki1, Daiki Ito1, Atsushi Asakawa2, Hirotaka Nagai1, Masafumi Tajima2, Shinya Toyokuni1 1)Department of Pathology and Biologidal Responses, Nagoya University Graduate School of Medicine, 65 Trumai-cho, Showa-ku, Nagoya 466-8550, Japan, 2)ATTO Corporation, 3-2-2 Motoasakusa, Taito-ku, Tokyo 111-0041, Japan
書誌事項	J Clin Biochem Nutr. 2015 Mar;56(2):111-7. doi: 10.3164/jcbn.14-92. Epub 2014 Nov 28.
試験物質	MWCNT：CNT-50、CNT-115、CNT-145、CNT-tngl アスベスト：クロシドライト、アオモサイト、クリソタイル
試料調整法	・アスベスト：0.9%食塩水に懸濁（5mg/ml） ・MWCNTs：0.5%ウシ血清アルブミン（BSA）に懸濁（食塩水で 5mg/ml）
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	【試験生物】SD ラット 15 週齢、ネズミ科マクロファージ細胞株 RAW264.7 【試験方法】 ・E.coli 0111:B4 由来のザイモサンと LPS（リポ多糖類）を用いて炎症開始。DFO（メシル酸デフェロキサミン）とニトロトリアセテート・ジナトリウム塩を最終濃度 40μM で使用。 ・抗酸化物質：Cu、ウシ赤血球由来 Zn 活性酸素分解酵素、ウシ肝臓由来カタラーゼ、アポチニンを各々最終濃度、1,000 units/L、1,000 units/L、1mM で使用。NaN3（アジ化ナトリウム、カタラーゼ阻害剤、ペルオキシダーゼ、シトクロム酸化酵素）を最終濃度 1mM で使用。 ・末梢血とマクロファージ細胞株：SD ラット 15 週齢使用。ペントパルビタールを用いて麻酔。血液を下大静脈から収集。ネズミ科マクロファージ細胞株 RAW264.7 を使用。 ・炎症細胞から生成された ROS の決定：照度計により L-012 を用いて ROS 測定。L-012 を ROS と反応する際に λmax458nm で強い化学発光を示すように開発。【末梢血実験】血液（20μl）とグルコース（5μl、最終濃度 10mM）を 37℃3 分間培養。L-012（20μl、最終濃度 2μM）、材料物質サンプル（最終濃度 1.0、2.0、4.0mg/ml）、抗酸化物質を組合わせて、10mM リン酸緩衝生理食塩水で全量 250μl に調整。ピペット、ボルテックス作業後に個々の測定を開始。照度計で 10s 測定を 30s ごとに約 50 分間実施。ザイモサン（1mg/ml）をポジティブコントロールに使用。生理食塩水中 0.9%NaCl と 0.5%BSA をネガティブコントロールに使用。【マクロファージ実験】RAW264.7 細胞（1×10^6）を 10%FBS と抗生物質／抗真菌で補足したダルベッコ改変イーグル培地で 37℃24 時間培養。その後、アスベスト（5μg/cm2）または MWCNTs（5μg/cm2）を培地に添加し、細胞を 7 時間培養。細胞を除去した後、遠心分離。FBS（230μl）を用いた新しい培地を添加し、37℃3 分間培養。その後、L-012（20μl、最終濃度 2μM）を全量 250μl になるように添加し測定。LPS（1.2μg/ml）をマクロファージ刺激に対するポジティブコントロールとして使用し、生理食塩水中 0.9%NaCl と 0.5%BSA をネガティブコントロールとして使用。 ・溶血反応：ヘパリン添加血液（100μl）と繊維材料（5mg/ml、PBS または PBS 中 0.5%BSA）を混合し、37℃4 時間培養。その後、サンプルを遠心分離し、上澄みを捕集、540nm で吸光度測定。溶血割合（HP）を計算。 ・低速度撮影顕微鏡観察：BZ-9000 を用いて、RAW264.7 細胞の低速度撮影ビデオ顕微鏡法を最大 5 時間実施。 ・統計：化学発光のピーク値を片方向 ANOVA により、Dennett's multiple comparison test を用いて解析。
試験結果	・アスベスト処理では、用量依存的に ROS 生成の増加が確認され、そのピークは 10 分であった。ROS 生成は、アモサイト＞＞クロシドライト≫クリソタイルであった。しかし、MWCNTs 処理ではどの径についても目立った ROS 生成は誘発されなかった。 ・SOD1、カタラーゼ（クロシドライトのみ）、アジ化ナトリウム、アポチニンはクロシドライトとアモサイトによって誘発された ROS 生成を阻害し、O2-、H2O2、シトクローム酸化酵素、NADPH オキシダーゼの関与を示した。DFO も

	ROS 生成を阻害したが、ﾆﾄﾛ三酢酸は促進した。 ・マクロファージからの ROS はアスベスト処理でも MWCNTs 処理でもともに増加した。ピーク時間はアスベストの種類によって異なったほか、MWCNTs の方がアスベストよりもずっと早かった。 ・SOD1 とアポチニンは継続的に ROS 生成を阻害したが、カタラーゼは全実験で阻害しなかった。NaN3 は CNT-115、CNT-145、CNT-tngl により生成される ROS を阻害した。NTA は CNT-50 処理のみで ROS 生成を促進した。 ・溶血反応はクリソタイルのみによって誘発された。
結論	本研究では、ROS の検出のために照度計と L-012（8-アミノ-5-クロロ－7-フェニルピリド[3,4-d]ピリダジン-1,4-(2H,3H)ジオン）を用いてアスベストと多層カーボンナノチューブという繊維物質への暴露後の炎症細胞反応の違いを評価した。ラット末梢血又は RAW264.7 細胞を用いて好中球とマクロファージに対する影響を評価した。クロシドライトとアモサイトは 10 分で好中球による ROS の著しい生成のﾋﾟｰｸを誘発したが、クリソタイルはクロシドライト／アモサイトの応答の 25%程度であった。直径（～15、50、115、145nm）と発がん性の異なる MWCNTs は末梢血で明らかな ROS を誘発しなかった。しかし、MWCNTs はアスベストへの暴露後の RAW264.7 細胞の ROS と同量の ROS を誘発した。MWCNTs のﾋﾟｰｸ（0.5-1.5 時間）はアスベストのピーク（1-5 時間）よりも早い時点に観察された。アポチニンと活性酸素分解酵素は個々の繊維において ROS の生成を明らかに阻害し、このことは、NADPH オキシダーゼとスーパーオキシドの関与を示唆した。したがって、アスベストと MWCNTs は炎症細胞において異なる酸化応答を誘発し、このことは発がん性に係る中皮細胞の評価に重要であることを示す。

No	MWCNT-10
論文題目 （和訳）	Repeated exposure to carbon nanotube-based aerosols dose not affect the functional properties of 3D human epithelial airway model （カーボンナノチューブベースのエアロゾルへの繰り返し暴露は 3D ヒト上皮経路モデルの機能特性に影響を与えない）
著者 所属機関	Savvina Chortarea1, Martin J. D. Clift1, Dimitri Vanhecke1, Carola Endes1, Peter Wick2, Alke Petri-Fink1, and Barbara Rothen-Rutishauser1 1)Department of BioNanomaterials, Adolphe Merkle Institute, University of Fribourg, Marly, Switzerland and 2)Laboratory for Materials-Biology Interactions, EMPA, Swiss Federal Laboratories for Materials, Science and Technology, St. Gallen, Switzerland
書誌事項	Nanotoxicology. 2015 Nov;9(8):983-93. doi: 10.3109/17435390.2014.993344. Epub 2015 Sep 4.
試験物質	多層カーボンナノチューブ、ポジティブコントロール：結晶性 DQ（0.1mg/ml）
試料調整法	・MWCNTs : Pluronic F127 に分散後、原液 MWCNTs（250μg/ml）を Pluronic F127 で 25、125μg/ml 濃度に希釈。 ・肺細胞株：A549 細胞を気液境界（ALI）で培養し、界面活性剤（肺胞の細胞頂端側から放出）を生成。共培養はヒト（肺胞）上皮 A549 細胞株からなり、ヒト単球由来樹状細胞（MDDCs）とマクロファージ（MDMs）と組合せた。A549 細胞株を 10%FCS、1%L-グルタミン、1%ペニシリン／ステプトマイシンを用いた培地で補足した RPMI1640 で 37℃培養。細胞を 0.5×10^6 細胞/ml 密度で播種。細胞を水面下で 5 日間成長。ヒト末梢血単球をヒト血液バフィーコートから単離。単球を 6 日間 10^6 細胞/ml 密度で補足 RPMI 培地で培養。MDDCs と MDMs の生成のために、成長因子 GM-CSF、IL-4、MCSF を培養培地に添加。3 連で共培養を実施。細胞密度は～9714 上皮細胞/mm2、～231MDM/mm2、～411MDDC/mm2。水面下条件で 24 時間後に、3 連共培養を ALI 条件に移動し、さらに 24 時間細胞を大気に暴露した後、共培養を実験用に準備。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	【試験生物】A549 細胞株（肺細胞株） 【試験方法】 ・ALI 細胞暴露システム：気液境界（ALI）で培養する 3D 上皮気道境界モデルを組合わせた気液界面細胞暴露システム（ALICE）。1ml MWCNTs 懸濁液を 500μM NaCl とともにネブライザーに添加。エアロゾルを eFlow ネブライザーの振動穴あき膜により精子柄し、暴露チャンバーに輸送。ALI で培養された細胞上に沈着。MWCNTs の沈着を QCM で測定。 ・暴露シナリオ：ALICE システムを用いて MWCNTs 濃度（25、125、250μg/ml）に細胞を暴露し、エアロゾル化した MWCNTs の単回暴露による生物学的影響を評価。細胞応答を培養後 24 時間後に決定。次に、継続暴露による影響を調べるために、ネブライザによる MWCNTs の繰り返し暴露を、250μg/ml で 3 連共培養に適用し、1 日を 3 回または 3 日間を 3 回実施。最後の MWCNTs への暴露後 24 時間後に生物学的影響を評価。 ・TEM：MWCNTs 沈着特性と 3 連共培養による MWCNTs の相互作用を測定。 ・生化学分析：LDG 細胞毒性検出キットを用いて LDH 放出を評価。培養後に、PFA で固定、トライトン X-100 で処理、F-アクチン細胞骨格をファロイジン・ローダミンで、細胞核を DAPI で染色し、細胞形態を観察。 ・酸化ストレス：グルタチオン減少総量（GSH）濃度を特徴的なグルタチオン・アッセイ・キットを用いて決定。細胞をインサート膜からスクラップ、MES 緩衝剤でホモジナイズ、遠心分離。等量の MPA を添加してタンパク質除去 GSH 量を評価。ポジティブコントロールとして、TGHP100mM に細胞を暴露。 ・サイトカイン／ケモカインの提供：MWCNTs 暴露後の 3 連共培養の炎症誘発藩王を炎症誘発メディエーター、IL-β、TNF-α、IL-8 の量を定量化することで測定。24 時間リポ多糖類で処理した共培養を炎症誘発タンパク質試験のポジティブコントロールとした。 ・統計解析：統計解析を GraphPad Prism 5 を用いて実施。ANOVA を Bonferroni post-hoc test により実施。
試験結果	・MWCNTs の噴霧と沈着の特徴づけ：TEM による定性的解析から、沈着していた MWCNTs の平均系・長さは、原液のサイズ特性と類似。ALICE は、MWCNTs の用量依存的、再生可能で制御された沈着を示した。 ・MWCNTs の細胞の取込み：3 日間繰り返し暴露後の TEM 画像から、MWCNTs を試験した全細胞タイプで確認、特に小胞構造内に局在化していることを観察し

	た。MWCNTs はほとんどの細胞で観察されたが、MWCNTs の大部分が弱凝集体でも単一のチューブでも MDM の内側に存在していた。1 日繰り返し暴露では、MWCNTs は主に MDM 内で検出され、A549 内での少量検出され、0.39μg/cm3 への単回 MWCNTs 暴露後にも同様の観察結果が得られた。単回でも 1 日繰り返し暴露でも、3 日間繰り返し暴露に比べると、細胞に対する CNT 量はずっと低かった。 ・細胞毒性：MWCNTs の繰り返し暴露はどちらのシナリオでも細胞毒性が増加する証拠は示されず、DQ12 への繰り返し暴露した細胞でも同様の結果であった。MWCNTs の単回暴露ではどの濃度でも細胞毒性反応を誘発することはなかった。Pluronic は単回でも繰り返し暴露シナリオでも細胞毒性を示さなかった。 ・肺細胞形態：形態変化は MWCNTs に暴露した細胞では 1 日でも 3 日間暴露でも観察されなかった。異なるナノ繊維濃度での単回暴露は細胞形態に影響を与えなかった。Pluronic F127 に暴露した細胞での変化は観察されなかった。 ・酸化ストレス：1 日繰り返し暴露で酸化ｽﾄﾚｽを誘発しなかった。3 日間繰り返し暴露した細胞では、統計的に有意ではなかったが、GSH レベルが減少し、DQ12 への繰り返暴露でも同様の影響がみられず、単回暴露でも 24 時間以内では GSH レベルへの著しい影響はなかった。統計的に有意ではなかったが、細胞内で低下した GSH の生物学的に関連した減少が、単回でも繰り返し暴露でも Pluronic F127 の暴露後に観察された。 ・炎症誘発応答：MWCNTs の繰り返し暴露では IL-β、TNF-α に対して著しい影響を誘発せず、コントロールに対する IL-8 の増加も示されなかった。単一 MWCNTs 暴露でも同様であった。DQ12 に繰り返し暴露した細胞は、1 日でも 3 日でも繰り返し暴露で、IL-8 と TNF-α の放出の有意な増加を示し、Pluronic F127 に暴露した細胞では単回でも繰り返し暴露でも免疫応答の変化を示さなかった。
結論	CNTs の急性毒性についての調査は増加しているが、ヒト肺での生理学的暴露を現実的に反映した実験手順と組合わせた、繰り返し長期の結果についての知見を増やす必要があることは明らかである。本研究では、初めて、高度肺細胞モデルと気液暴露システムを組み合わせることで、MWCNTs の吸入を現実的に模倣することができ、それにより動物試験戦略に対する効果的な代替手法を提供した。結論として、本研究は in vitro 毒性研究の多くに対してさらなる主要ステップであり、MWCNTs の潜在的な急性毒性だけでなく、繰り返し暴露と暴露時間の延長後の潜在的な有害影響についても試験を行い、ALI で肺細胞培地への繰り返し MWCNT 暴露が 3 日間で限定された生物学的影響を生じることを示した。

No	MWCNT-11
論文題目 （和訳）	Characterization of Genotoxic Response to15 Multiwalled CarbonNanotubes with Variable Physicochemical Properties Including Surface Functionalizations in the FE1-Muta(TM)Mouse Lung Epithelial Cell Line （FE1-Muta™マウスの肺上皮細胞株における表面機能化を含む多様な物理化学的特性を有する 15 の多層カーボンナノチューブに対する遺伝毒性反応の特徴付け）
著者 所属機関	Petra Jackson,1 Kirsten Kling,[1] Keld Alstrup Jensen,1 Per Axel Clausen,[1] AnneMetteMadsen,[1] H_kanWallin,1,2 and Ulla Vogel[1,3] 1)Danish Centre for Nanosafety, National Research Centre for the Working Environment, Copenhagen Ø, Denmark, 2)Institute of Public Health, Copenhagen University, Denmark, 3)Department of Micro- and Nanotechnology, DTU, Lyngby, Denmark
書誌事項	Environmental and MolecularMutagenesis 56:183-203 (2015)
試験物質	15 種。Stanndard : NRCWE-026（長さ 1.5μm、径 9.5nm）、Materials : OECD WPMN NM-400 （ NM-401 、 NM-402 、 NM-403 ） 、 NRCWE-006（MWCNT-XNRI-7、Mitsui）、グループ I : NRCWE-040~042（薄い；順に単体、-OH 修飾、-COOH 修飾；長さ 10-50μm、計 8-15nm）、グループ II : NRCWE-043~045（厚い；順に単体、-OH 修飾、-COOH 修飾；長さ 10-20μm、径 50-80nm）、グループ III : NRCWE-046~049（短い；順に単体、-OH 修飾、-COOH 修飾、-NH2 修飾；長さ 1-12μm、径 13-18nm）、Reference : カーボンブラック
試料調整法	2%血清（C57BL/6N ﾏｳｽ）とともにナノピュア水中に 2.0mgMWCNT/ml 濃度で準備した原液を超音波分解により分散（暴露中に弱凝集化、沈着確認）。分散を、細胞成長／暴露培地中で直接希釈して、実験用濃度の上昇。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	【試験生物】FE1-Muta(TM)マウス肺上皮細胞（MML 細胞）：細胞株を、DMEM/F-12+GlutaMax™-1 培地（Gibco）中で、ペニシリン－ストレプトマイシン、不活性ウシ胎仔血清（FBS）、EGF とともにウェル上で 24 時間培養。成長培地を、MWCNT 含有暴露培地（0、12.5、25、50、100、200μg-MWCNT/ml→0、7.1、14.1、28.3、56.6、113.2μg-MWCNT/cm2 に相当）に置換。 【投与方法等】細胞を 24 時間暴露して培養。暴露濃度：0、12.5、25、50、100、200μg-MWCNT/ml。 【試験・分析等】 ・動的光散乱（DSL）分析：原液と暴露培地濃度について実施。培地濃度での弱凝集体と沈着挙動を分析。原液の分散粘土を測定。動粘性率を計算。 ・ROS 生成能の決定：ジクロロフルオレセイン（DCFH）酸化アッセイにより材料分散液の繊維の ROS 生成能を評価。 ・繊維懸濁液中エンドトキシンレベルの決定：9.9-16.8mgMWCNT を 3.9-6.6ml の発熱物質を含まない水に懸濁させ、超音波分解、懸濁液の色がなくなるまで遠心分離。pH7 に調整。上澄み液をエンドトキシン・アッセイに供す。エンドトキシン含量を、同的 Limulus Amebocyte Lysate 試験により分析。標準曲線を大腸菌 O55:B5 参照エンドトキシンから取得し、エンドトキシン単位濃度を決定。 ・顕微鏡試験：暴露後に、弱凝集状態を光学顕微鏡により記録。画像撮影。細胞を洗浄、トリプシン処理、氷冷凍結培地添加。細胞懸濁液を 3 バイアルに分割し、細胞毒性分析（1 バイアル）、コメットアッセイ分析（2 バイアル）を実施。 ・SB（DNA 鎖切断）レベル：コメットアッセイにより評価。ナノ材料の遺伝毒性試験用に適したスクリーニング・アッセイ。 ・統計解析：一般線形モデル（GLM）解析による要因計画～データを Minitab v.1.5 を用いて解析。主成分分析～観察された生物学的影響と MWCNT の物理・化学的特徴との関係を特定するために、Minitab v.1.5 を用いて主成分分析。
試験結果	・分散状態による影響：弱凝集体による影響が最も大きかったのは、200μg/ml では NM401、NRCWE-006、NRCWE-044、NRCWE-046、12.5μg/ml では NM-402、NM-403。MM 暴露培地に 200μg/ml 添加後、Zav（平均ゼータサイズ）が有意に減少。 ・MML 暴露培地中の MWCNT 弱凝集体と沈着挙動の評価：沈下が最も速かったのは NRCWE-006（流体力学的粒子サイズ大）。蓄積が最速だったのは、NRCWE-049、-048 で、その後沈着。NRCWE-041、-043、-44 以外のサンプルは 12.5μg/ml で速い MWCNT の蓄積と沈着を誘発。沈下は、NM-401、-402、-403、NRCWE-044、-48 でも確認。分散は NRCWE-026、-049 で不安定。NRCWE-046、

	-047、-042 の分散は、200μg/ml で長時間継続して懸濁した状態を保持、ただし部分的に沈下。沈下速度が最も遅かったのは、NRCWE-026、-044、-043。データから、3 時間よりも 24 時間のほうが十分な分散、懸濁していることを確認。24 時間暴露では、暴露条件と弱凝集化レベルはサンプル間で類似。 ・ROS 生成能 : MWCNT は高濃度で DCFH アッセイとの相関があり、MWCNT ピーク濃度は、OD の最大値濃度。Printex90 は ROS をよく生成する粒子。NM-401 、NRCWE-006 の ROS 生成能は最小。NRCWE-042 は Printex90 の半分以下。その他の MWCNT は Printex90 と同等かそれ以上。生成能の機能化に基づくパターンはなし。 ・繊維上懸濁液のエンドトキシンレベル : MWCNT 懸濁液の上澄みは 1 種類以外は、エンドトキシン濃度を妨害あるいは強化しなかった。エンドトキシンは原液では確認されず。 ・細胞毒性 : MWCNT への暴露による顕著な細胞毒性は誘発されず。細胞拡散は、NR-401、-403、NRCWE-006、-041、-045、グループ III で減少、MML 細胞の成長速度が低下するもの、用量依存的に細胞分画が妨害されるものあり。 ・コメットアッセイによる DNA　SB レベル : 24 時間後の細胞生存率は 92%以上。MWCNT に暴露した MML 細胞の%TDNA が統計的有意に増加、MWCNT と用量ともに、用量依存性をもって TL に影響。200μg/ml のみで NRCWE-042 は%TDNA を有意に増加。NRCWE-044、-046、-047、-049 は最高用量で TL を有意に減少。同ｸﾞﾙｰﾌﾟで TL の低下は、拡散の低下と一致。グループ II の MWCNT はグループ I、III と比べて%TDNA が有意に高い。各グループの水酸基繊維は、単体及びカルボキシル基形態のものより DNA SB レベル低。MWCNT 単体は、グループ I ではカルボキシル基形態より DNA　SB レベルが低く、グループ III では水酸基形態より高い。 ・主要構成要素解析 : 細胞拡散の低下が統計的有意に達した用量は、MWCNT 生成 ROS レベルと BET（測定された表面積）とクラスターを形成。DNA SB レベルは、物理パラメータのうち長さと径とクラスターを形成。グループ I－III のみで解析すると、%TDNA は MWCNT の径と明らかにクラスター形成。わずかな金属酸化物が%TDNA とクラスター形成。特に Fe2O3 と NiO で突出。グループ II の MWCNT は径が大きいほど NiO レベル増。
結論	MWCNT への暴露による顕著な細胞毒性は誘発されなかった。わずかな遺伝毒性が観察された。MWCNT の径、Fe2O3、NiO レベルとの関係がクラスター化された。グループ I-III の DNA SB レベルの低下は同じサンプルの細胞拡散の低下と関係がみられた。研究対象とした機能化した MWCNT の毒性は限られたもので、主要な影響はなかった。しかし、水酸基化した MWCNT は単体やカルボキシル基化したものと比べると、DNA SB レベルが低かった。MWCNT の分散の質に関する分析から、原液はよく分散していた。MML 暴露培地中の MWCNT は 3 時間後には沈積しはじめ、これは濃度と MWCNT のタイプとの関係がみられた。この毒性スクリーニングは、マウスへの肺暴露を調べる実験に関するベンチマーク研究として使用できる。

No	MWCNT-12
論文題目 （和訳）	Intratracheal exposure to multi-walled carbon nanotubes induces a nonalcoholic steatohepatitis-like phenotype in C57BL/6J mice （多層カーボンナノチューブへの気管内曝露は、C57BL/6J マウスにおける非アルコール性脂肪肝炎様表現型を誘導する）
著者 所属機関	Ji-Eun Kim1,2, Somin Lee1,3, Ah Young Lee1, Hwi Won Seo4, Chanhee Chae4, and Myung-Haing Cho1,2,3,5 1)Laboratory of Toxicology, BK21 PLUS Program for Creative Veterinary Science Research, Research Institute for Veterinary Science and College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul, Korea, 2)Graduate School of Convergence Science and Technology, Seoul National University, Suwon, Korea, 3)Graduate Group of Tumor Biology, Seoul National University, Seoul, Korea, 4)Laboratory of Veterinary Pathology, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul, Korea, and 5Advanced Institute of Convergence Technology, Seoul National University, Suwon, Korea
書誌事項	Nanotoxicology. 2015;9(5):613-23. doi: 10.3109/17435390.2014.963186. Epub 2014 Sep 29.
試験物質	純粋なもの MWCNTs（PMWCNTs、CM-95™）：純度＞95%、径 12.5±2.5nm、長さ 13.0±1.5μm、CVD（化学蒸着）により合成されたもの 酸処理した MWCNTs（TMWCNTs）：純度＞98%、径 7.5±2.5nm、長さ 400±94.4nm
試料調整法	PMWCNTs：H2SO4/HNO3(3:1, v/v)混合液中で、25 分間超音波分解後、120℃ 90 分間還流。pH5.5 になるまで脱イオン水で洗浄 TMWCNTs：洗浄した TMWCNTs を 0.8μm 膜孔フィルターでろ過し、120℃で 1 時間乾燥。 両者を滅菌後、180℃16 時間熱風をあて、エンドトキシンを不活性化し、滅菌した生理食塩水で懸濁、投与前に 15 分間超音波分解。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	【試験生物】6 週齢オス C57BL/6J マウス、5 匹／グループ 【試験方法】 ・投与・試料採取：ゲタミンとキシラジンの腹腔内投与による麻酔下で、0.01、0.1mg の PMWCNTs、TMWCNTs を気管内投与し肺に浸透。PMWCNTs と TMWCNTs に対する 10%減量投与である、1 年間 MWCNTs への暴露で用量 0.1mg を MTD に基づき決定。コントロールとして、滅菌した生理食塩水 50μL をマウスに気管内投与。4 時間断食後暴露し、その後 1 か月または 1 年で解剖。腹部静脈から血液収集。臓器収集。血清を遠心分離し、-70℃で保存。 ・組織処理：肺と肝臓の組織を 10%中性緩衝ホルマリンで固定、パラフィン処理、3μm 切片にした。組織病理学的分析用に、組織切片をｷｼﾚﾝで脱パラフィン、段階的なアルコール濃度（100, 90, 80, 70, 50%）に各 5 分再水和した後、染色。 ・肺組織病理：H&E（ヘマトキシリンとエオシン）で染色。顕微鏡観察。 ・肝臓組織病理：H&E、Masson 三重染色、または PAS（過ヨウ素酸 Schiff）で染色。脂肪症のスコアリングと、肝細胞変性と炎症のバルーニング(急騰)を実施。 ・オイルレッド O 染色：肝臓組織を 2 日間 4℃パラホルムアルデヒドで固定、2 日間スクロース溶液で移動、Tissue-Tel OCT で設置。凍結肝切片（10μm）を切断、スライド上に設置。肝切片を 0.5%オイルレッド O 原液で染色。 ・ウェスタンブロット解析：肺をホモジナイズし、タンパク質濃度を Bradford kit で測定。タンパク質等量 25μg を負荷し、10-15%SDS-ポリ-アクリルアミド ゲル電気泳動で分離し、ﾆﾄﾛｾﾙﾛｰｽ膜に移動。膜を TTBS で室温で 1 時間固定し 1 晩 4℃で 1 次抗体とともに培養。膜を HRP と共役した 2 次抗体とともに室温 2 時間培養。関心のあるバンドを LAS-3000 発光イメージアナライザーで可視化し、MultiGauge ソフトウェアで定量。 ・IHC（免疫組織化学）：ホルマリン固定、パラフィン設置組織を 4μm に切片処理し、ProbeOn Plus™上に移動。肺切片を脱パラフィン、脱水後、洗浄し 3%過酸化水素で 30 分間培養し、内因性ペルオキシダーゼ活性をクエンチ。PBS で洗浄後、組織切片を DAKO-pen で環状にした後、切片をクエン酸塩緩衝剤で煮沸、1xTTBS ですすぎ、内因性ペルオキシダーゼを IHC のためにクエンチ。非特異的結合サイトを BSA でブロックし、1 次抗体をに 1 晩 4℃で組織切片に適用。次の比、組織切片を洗浄し、抗体と共役した 2 次ホースラデッシュペルオキシダーゼで室温 2 時間培養。切片を 1xTTBS ですすぎ、DAB を適用。水道水で洗浄

	後、組織切片を Mater のヘマトキシリンで対比染色、流水で洗浄、脱水、ｷｼﾚﾝに引いたす。カバーシリップをのせ、スライドを光学顕微鏡で観察。ランダムに抽出した領域画像の陽性細胞の数を In Studio ソフトウェア version 3.01 を用いて計数し染色を評価。画像を ImageJ プログラムを使って計数。 ・血清リポタンパク質とサイトカイン分析：TC（総コレステロール）、TG（トリグリセリド）、HDL(高密度リポタンパク質)-コレステロール（HDL-C）、IL-6、MCP（単球走化性タンパク質）-1、PAI（プラスミノオーゲン活性化因子阻害剤）-1、TNF（腫瘍壊死因子）-α、血清アミロイド A3（SAA3）、のレベルに関するバッチ試験を実施。 ・統計解析：スチューデント t テストを用いて統計解析
試験結果	・MWCNTs 投与後 1 か月のマウスの胚と肝臓の組織についての組織病理学的分析を行い、H&E 染色により、肺では PMWCNTs により気管支過形成が、TMWCNTs によりリンパ球湿潤、肝臓についてはリンパ球湿潤は肝臓の炎症。 ・PMWCNTs と TMWCNTs が全身のサイトカイン放出を誘発し、血清コレステロール・ホメオスタシスに影響。NF-κBp65 と ABCA1 タンパク質レベルを投与後 1 か月のマウス肺では、MWCNTs への暴露後 1 か月で、濃度依存性をもって NF-κBp65 は増加、ABCA1 は減少、ABCA1 の発現が NF-κBp65 活性化の誘発を抑制する、マクロファージでのアポ A-I に対する主要なコレステロール輸送体であることを示唆。PMWCNTs は NF-κBp65 と ABCA1 のタンパク質発現で TMWCNTs よりも大きな変化。投与後 1 か月の IL-6 と MCP-1、PAI-1、TNF-α の血清サイトカインレベルでは、0.1mgOMWCNTs を投与したマウスが最も有意な変化、その次が TMWCNTs。SAA3 レベルは 0.1mg　MWCNTs 投与で増加。血清のトリグリセリドレベルは 2 種の MWCNTs で異なった（統計的な差なし）。(HDL)-(HDL-C)レベルは PMWCNTs では濃度依存的に減少、PMWCNTs は TMWCNTs に比べて HDL-C の優位な減少。 ・血清サイトカインと SAA3 レベルの増加は PMWCNTs 投与後 1 年間持続。顕微鏡観察の低強度画像で炎症性病変を確認、気管支周囲と気管支過形成でのリンパ球湿潤を観察。特に、PMWCNTs を投与したマウスで、Mallory の硝子に似た好酸球性材料を含む肺胞上皮細胞と有糸分裂像を観察。SAA3 レベルの増加は PMWCNTs 投与マウスのみで観察、IL-6、PAI-1、MCP-1 の血清サイトカインレベルは TMWCNTs と比べて PMWCNTs 投与後 1 年のほうが高。 ・MWCNTs への暴露は、気管内投与 1 年後に、肝臓で非アルコール性脂肪肝炎（NASH）様表現型を誘発。染色画像と H&E 顕微鏡画像から、PMWCNTs が非アルコール性脂肪肝を誘発、肝脂肪変性、小葉及び門脈炎症、類洞周囲線維症も誘発。TMWCNTs 投与マウスでは微妙な肝脂肪変性、小葉炎症、類洞周囲線維症を誘発。オイルレッド O 染色により、MWCNTs 投与後 1 年のマウス肝臓で肝臓の脂質蓄積を特定、PMCNTs グループのほうが影響大。PAS 染色からは MWCNTs への暴露後 1 年のマウス肝臓でグリコーゲン貯蔵の減少、PMWCNTs の方が TMWCNTs ｸﾞﾙｰﾌﾟよりもグリコーゲン貯蔵を阻害。TG レベルの増加による肝臓の脂質蓄積を特定。マウス血清における HDL-C レベルの減少と TG レベルの増加は異常脂質ホメオスタシスを示した。 ・炎症シグナル、PPAR シグナル、クッパー細胞は PMWCNTs と TMWCNTs の気管内投与後 1 年の肝臓で活性化。MWCNTs 投与後 1 年のマウス肝臓のウェスタンブロット解析で、PPARγ とリン酸化 AMPKα の発現レベルの減少、α-SMA 発現の増加、炎症関連タンパク質の増加を確認。IHC とウェスタンブロッティング、マクロファージ表面マーカーから、マクロファージが活性化することを示した。別のマクロファージマーカー、MAC-2 は TMWCNTs よりも PMWCNTs 投与で顕著に増加。
結論	肝臓の発症機序に対する 2 つの異なるタイプの MWCNTs の気管内暴露影響を調査した。MWCNTs を肺を通じて投与し、投与後 1 年のマウスに NASH 様表現型を誘発すること、TMWCNTs への暴露よりも PMWCNTs への暴露のほうが深刻な影響となること、を示した。 NASH 発症の素因は、いくつかのサイトカインの継続的な放出があると思われ、肝臓への MWCNTs の転移と脂質ホメオスタシスを変更することができる。NASH 患者の数の増加と 2 型糖尿病、循環器疾患、肝細胞がん、と NASH との密接な関係を与えるためには、NASH に対するリスク因子として MWCNTs 暴露を理解することは重要である。

No	MWCNT-13
論文題目 （和訳）	Multiwall Carbon Nanotubes Directly Promote Fibroblast-Myofibroblast and Epithelial-Mesenchymal Transitions through the Activation of the TGF-β/Smad Signaling Pathway （多層カーボンナノチューブは、直接、TGF-β/ Smad のシグナル伝達経路の活性化を介して線維芽細胞、線維芽細胞および上皮間葉移行を推進する）
著者 所属機関	*Peng Wang1 , Yue Wang1 , Xin Nie1 , Celine Braini 2, Ru Bai 1, and Chunying Chen1* 1)CAS Key Laboratory for Biomedical Effects of Nanomaterials & Nanosafety National Center for Nanoscience and Technology Beijing 100190 , China, 2)Institut Neel CNRS, and Universite Grenoble Alpes Grenoble F-38042 , France
書誌事項	Small. 2015 Jan 27;11(4):446-55. doi: 10.1002/smll.201303588. Epub 2014 Sep 25.
試験物質	MWCNTs
試料調整法	1.5mg/mL　MWCNTs 原液を 1%ﾌﾟﾙﾛﾆｯｸ F108 で調整し、30℃で 1 時間超音波分解。最適な懸濁液を作成するために、動物への投与直前に、原液をさらに 30 分間超音波分解。1.5mg/mL　MWCNTs 懸濁液を新鮮培地中に最終濃度に希釈。古い培地を除去し、最終濃度に調整した MWCNTs を含む新しい培地に置換。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	【試験生物】オスの SH ラット、11-12 週齢、体重 220-250g 【使用細胞】マウス胚線維芽細胞株（NH3T3）、ラット肺タイプ II 上皮細胞株（RLE-6TN） 【投与方法等】Han et al.(2010)にしたがって MWCNTs に暴露（鼻部吸引） 【試験方法】 ・免疫組織化学分析 : 肺を解剖、即 10%リン酸緩衝ホルマリンで 24-72 時間固定。肺組織を脱水、パラフィンに設置、4μm 厚さのスライスにカット。切片をヘマトキシリンで染色することで、SH ラットの肺組織の MWCNTs の局在化を検出。免疫組織化学様に、切片を脱パラフィン。内因性ペルオキシダーゼを 0.3%H2O2 で 15 分間ブロック。ヤギ血清を 15 分間ブロック処理後、切片を FSP-1 抗体と E-カドヘリン抗体で、その後、ビオチン化リンク 2 次抗体とペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンで 1 晩培養。その後、ジアミノベンジジンで培養し、Mayer のヘマトキシリンで対比染色。切片を顕微鏡下で分析。 ・細胞培養： MIH3T3 細胞を Dulbecco 改良 Wagle 培地（DMEM）中に 10%ウシ胎仔血清とともに維持。RLE-6TN 細胞を RPMI1640 中で 10%ウシ胎仔血清とともに培養。各培地を 2mml グルタミン、100U/mL ペニシリン、100μg/mL ステプトマイシンで補足。 ・TEM による細胞内微細構造と MWCNTs の分布観察：NIH3T3 と RLE-6TN 細胞をウェルプレートに上で 1 晩成長させた後、MWCNTs で培養。各ウェルの細胞を PBS で洗浄、0.02%EDTA 含有 0.25%トリプシンで消化、10 分間遠心分離、その後捕集。細胞ペレットを 0.1mPBS 中 2.5%グルタルアルデヒド含有固定液で 1 晩固定後、ペレットを PBS 中 1%OsO4 で 1 時間、後固定、様々な濃度のエタノール溶液で脱水し、酸化プロピレンで処理、Durcupan に設置。約 80nm 厚さの切片にして、カーボンフィルム上に設置、酢酸ウラニルとクエン酸鉛で染色。生物学的 TEM で観察。 ・細胞生存率アッセイ：細胞生存率を CCK-8 を用いて決定。NIT3T3 又は RLE-6TN　2×10^4 細胞をウェルプレートに上、1 晩成長させた後、個々のタイプの細胞を 24 時間又は 48 時間、長い MWCNTs の各濃度に暴露。その後、細胞を CCK-8 試薬で 1 時間培養。細胞を遠心分離し、上澄み 80μL を新しいプレートに移動。プレートを UV-vis 光度計で 490nm で解読。CCK-8 値をコントロールで標準化。 ・リアルタイム定量 PCR 分析：全 RNA を TRIzol を用いて細胞から単離。M-MLV により cDNA に変換。cDNA を定量リアルタイム PCR で SYBR ｸﾞﾘｰﾝｱｯｾｲを用いて分析。mRNA 発現の相対レベルを個々の遺伝子に対する β アクチン発現に標準化。 ・免疫ﾌﾞﾛｯﾄ法：細胞を RIPA 緩衝液に溶解し、溶解物中のタンパク質濃度を分光光度計を使って決定。同量の溶解物を SDS-PAGE に供し、免疫ﾌﾞﾛｯﾄを、西洋ワサビペルオキシダーゼに接合した様々な 1 次抗体と 2 次抗体を用いて実施。タンパク質を化学発光により可視化。 ・免疫蛍光 : 間接的免疫蛍光分析をフィブロネクチン抗体と、Alexa Fluor488 抗

	lgG 抗体を用いて実施。細胞核を Hoechst 33342 で染色。細胞画像をレーザー走査共焦点顕微鏡で撮影。 ・統計解析：Student t test または χ2 test を用いて統計解析を実施。
試験結果	・7 日間暴露後の SH ラットの肺組織中に、短 MWCNTs と長 MWCNTs の局在化を観察した。短 MWCNTs はマクロファージにより容易に内在化すたが、長 MWCNTs の多くは肺胞マクロファージにより取り込まれず、肺の他の細胞の表面に蓄積する傾向がみられた。In vivo で、マクロファージに取込まれなかった長 MWCNTs は FSP-1 又は E-カドヘリンに対して陽性染色した細胞表面に蓄積した。いくつかの MWCNTs は FSP-1 または E-カドヘリン陽性染色細胞により取り込まれた。In vitro では、30μg/mL の MWCNTs に暴露した NIH3T3 繊維芽細胞を用いた実験で、MWCNTs の大部分が 3 時間暴露した NIH3T3 繊維芽細胞の表面に蓄積すること、24 時間暴露後には MWCNTs が繊維芽細胞に取り込まれたことを示した。RLE-6TN 細胞でも同様の結果となった。繊維芽細胞と上皮細胞に取り込まれた MWCNTs は膜に沿った小胞内に局在化したようであり、細胞内に取り込まれた MWCNTs は飲食作用メカニズムにより達成することを示唆した。 ・NIH3T3 繊維芽細胞の細胞生存率に対する MWCNTs の影響は、150μg/mL の最高濃度で試験した際にわずかに減少したのみで、MWCNTs は NIH3T3 繊維芽細胞に対して細胞毒性が限定的であった。線維芽細胞から筋繊維芽細胞への変換マーカーの発現に対する MWCNTs 暴露の影響では、PCR 分析で、MWCNTs が FSP-1、α-SMA、コラーゲン III の mRNA 発現を、用量依存的に強化した。免疫ﾌﾞﾛｯﾄでも、MWCNTs 処理に反応して NIH3T3 細胞の FSP-1、α-SMA、コラーゲン III のタンパク質発現が増加した。MWCNTs は直接、繊維芽細胞における FSP-1、α-SMA、コラーゲン III の発現を強化した。 ・MWCNTs に暴露した NIH3T3 細胞の細胞溶解物を Smad2 の活性に関して調べたところ、Smad2 と全 Smad2 タンパク質は細胞中でリン酸化されず、MWCNTs は直接、用量及び時間依存性をもって、Smad2 のリン酸化を活性化することを示した。NIH3T3 細胞を MWCNTs30μg/mL で 24 時間暴露し、TGF-β1 10ng/mL を用いて刺激したところ、MWCNTs 前処理は NIH3T3 細胞において TGF-β1 が刺激する Smad2 リン酸化を促進した。MWCNTs は有意に、NIH3T3 細胞において、TGF-β1 が誘発する FSP-1、α-SMA、コラーゲン III の発現を増加し、MWCNTs は TGF-β/Smad2 伝達経路の活性化を通じて、繊維芽細胞の活性化を促進した。TGF-β/Smad2 伝達は、MWCNTs の線維増殖及びコラーゲン誘発効果と、MWCNTs 誘発肺線維症への寄与効果を伴う重要な経路でありえることを示唆した。 ・RLE-6TN 細胞への様々な濃度の MWCNTs への暴露により、RLE-6TN 細胞の細胞生存率は 24 時間暴露後に約 20%阻害され、阻害は 48 時間＞24 時間、用量依存性を示した。リアルタイム PCR と免疫ブロッティングを用いた、RLE-6T 細胞におけるフィブロネクチンと E-カドヘリンの発現に関する実験では、RLE-6TN 細胞に 30μg/mL MWCNTs への暴露で、E-カドヘリン転写産物の数が減少（12 時間＜24 時間）したのに対して、フィブロネクチン転写産物の数は増加（24 時間＜48 時間）した。免疫ブロッティングの結果もまた、MWCNTs が RLE-6TN 細胞における E-カドヘリン発現を阻害し、フィブロネクチンの発現を誘発することを示した。MWCNTs 誘発フィブロネクチンの発現はさらに免疫蛍光でも確認された。MWCNTs 暴露により、RLE-6TN 細胞における基本的発現と TGF-β1 が誘発する Smad2 におけるリン酸化を押し上げることを示した。MWCNTs は上皮細胞の TGF-β/Smad2 伝達活性化を通じて EMT を誘発した。
結論	本研究では、MWCNTs が直接、線維芽細胞又は上皮細胞において TGF-β/Smad2 伝達を活性化し、線維芽細胞は線維芽細胞から筋線維芽細胞への変換を、上皮細胞は EMT を、それぞれ誘発し、両者が MWCNTs が誘発する線維化反応に寄与することを指摘した。分子ターゲットと細胞伝達を特定することは、リスク評価に関する固有の生物学的指標を開発し、CNT が誘発する病院を早期に検査湯津するために重要である。これらのデータは、TGF-β/Smad2 伝達活性化が、長い MWCNTs によって引き起こされる線維芽細胞から筋線維芽細胞への変換と EMT の両方において重要なステップであることを示唆している。したがって、TGF-β と TGF-β 受容体伝達システムは CNTs の生物学的安全性を評価する際に、潜在的な生物学的指標として考慮される可能性がある。これらの知見はさらに、MWCNT 暴露によって生じる潜在的な重度の健康影響を強調し、MWCNT が誘発した肺線維症の原因となる細胞、分子メカニズムのよりよい理解を提供する。

No	MWCNT-14
論文題目 （和訳）	Thirteen-week study of toxicity of fiber-like multi-walled carbon nanotubes with whole-body inhalation exposure in rats （ラットの全身吸入暴露による繊維様多層カーボンナノチューブの毒性に関する 13 週間の研究）
著者 所属機関	Tatsuya Kasai, Yumi Umeda, Makoto Ohnishi, Hitomi Kondo, Tetsuya Takeuchi, Shigetoshi Aiso, Tomoshi Nishizawa, Michiharu Matsumoto, and Shoji Fukushima Japan Bioassay Research Center, Japan, Industrial Safety and Health Association, 2445 Hirasawa, Hadano, Kanagawa 257-0015, Japan
書誌事項	Nanotoxicology. 2015 May;9(4):413-22. doi: 10.3109/17435390.2014.933903. Epub 2014 Jul 17.
試験物質	MWCNT（MWNT-7、Hodogaya Chemical Co., Ltd）： CVD により生成。平均径 40-90nm、アスペクト比＞100、表面積 24-28m2/g、バルク平均幅 90.7nm（94.1-98.0nm）、バルク平均長 5.7μm（5.53-6.19μm）、長さ 5μm 以上 48.7%
試料調整法	エアロゾル：Kasai et al.(2013 の手法にしたがって生成
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	【試験生物】F344/DuCrlCrlj ラット、オス／メス、6 週齢（Charles River Japan Inc.） 【投与方法・期間・用量】全身吸入暴露。0、0.2、1、5mg/m3 濃度 MWCNT で 6 時間／日、5 日間／週、13 週間（全 62 回吸入暴露実施）。サイクロンふるい法を利用して暴露。暴露チャンバー内濃度（13 週間）は、それぞれ 0.20±0.02、1.01±0.11、5.02±0.25mg/m3。雌雄各 10 匹のグループ。チャンバー内のエアロゾルをモニタリングして調節。 【動物試験】OECD Guideline for Testing of Chemicals 413（亜慢性吸入毒性：90 日間）にしたがって、実施。 【その他試験】 ・臨床観察・尿実験・血液分析等：臨床的兆候、死亡、を毎日観察。体重と餌の消費状態を毎週測定。尿パラメータを 13 週目に測定。血液を腹部大動脈から採取、遠心分離後、細胞成分を染色。生化学分析用に、血液を遠心分離し、無細胞上澄みを分離、自動分析器で測定。 ・BALF の細胞／生化学的分析： BALF 中の全細胞を細胞分析、自動細胞分析器で計数。BALF を遠心分離して、細胞画分を染色。好中球、リンパ球、肺胞マクロファージの数を光学顕微鏡で計数（＞500）。マクロファージの形態学的特徴を調査。二核及び多核マクロファージの数を光学顕微鏡で計数（＞1000）。BALF を遠心分離し、無細胞上澄みを分離して、自動分析器で生化学的分析実施。TP（全タンパク質）とアルブミン（肺胞毛細血管透過性用）、LDH（乳酸脱水素酵素）と ALP（アルカリホスファターゼ）（一般的細胞毒性及びタイプ II 上皮細胞毒性用）を測定。 ・某気重量・病理学検査：臓器（胸腺、副腎、精巣、卵巣、心臓、左肺、腎臓、脾臓、肝臓、脳）の重量測定と、顕微鏡的病変観察。臓器と組織の組織病理学検査。組織を固定後、切片化、染色（H&E）。肺中のコラーゲン繊維の特定用に染色。病理組織学的病変を、slight, moderate, marked/severe のカテゴリーに区分。 ・MWCNT の肺負荷量(左肺)：MWCNT 暴露ｸﾞﾙｰﾌﾟの 5 匹ラット左肺 0.18-0.36g 組織を Kohyama & Suzuki (1991) の方法で分解、フィルター、Ohnishi et al. (2013)により MWCNT を測定。マーカーとして、PAH と B(ghi)P を使用。吸着したマーカーを測定することで、肺中の MWCNT 量を決定。 ・統計：BALF 中の臓器重量と生化学的・細胞学的パラメータを、Dunnett's multiple comparison test により分析。MWCNT 暴露グループとコントロールグループとの病理組織学的病変の発生率をカイ二乗検定により実施。
試験結果	・死亡率、臨床兆候：死亡なし。異常な臨床兆候なし。成長速度への影響なし。体重もほとんど変化なし。 ・血液生化学・尿検査：差動白血球中の好中球割合は、雌では暴露濃度とともに上昇（0→5mg/m3 で 21→28%）、雄では濃度依存変化なし。血液生化学パラメータと尿パラメータの濃度依存変化なし。 ・BALF の細胞学的分析：好中球とリンパ球数は暴露濃度に依存して増加。肺マクロファージ数は変化なし。形態は、肺胞マクロファージサイズは広範、腫れと泡沫状細胞質、MWCNT 繊維の取り込みを確認。それらの形態を有する肺胞マクロファージの割合が用量依存的増加（1mg/m3 以上、雌雄）。二核、多核マク

	ロファージの割合が有意に増加（全暴露群、雌雄）。 ・BALF の生化学分析：LDH と ALP 活性、TP とアルブミン濃度の濃度依存的有意増加（全暴露群、雌雄、ALP 活性の雌 0.2mg/m3 暴露以外）。 ・肉芽腫と焦点線維症：実験終了後、5mg/m3 暴露群（雄全 10 匹、雌 9 匹）で複数白色領域確認（肺切片・表面、1 ㎜程度パッチ周辺に点在）。パッチは肉芽腫の変化と肺胞壁の焦点線維症（1 次所見）。他の臓器は異常なし。1mg/m3 以上暴露群で肺重量増加（雌雄）。他の臓器重量変化なし。上部および下部気道および縦隔リンパ節の病理組織学的影響あり（雌雄）。肺で肉芽腫変化と焦点線維症観察（発生率と重症度は暴露濃度依存的増加）。肉芽腫変化は終末細気管支近くの肺胞領域で主に確認（1mg/m3 以上、雌雄、雄 1 匹のみ 0.2mg/m3 でも確認）。肺胞壁焦点線維症は肺胞管で主に観察（1mg/m3 以上、雌雄）。肉芽腫変化は両肺葉で確認（重症度：両肺葉で相違なし）。主要肉芽腫変化はコラーゲン繊維の増加による（詳細観察）。MWCNT 取り込み肺胞マクロファージとラングハンス様巨細胞の強凝集化を何匹かのラットで観察（1mg/m3 以上）。巨細胞の肉芽腫変化を観察（全暴露群）。焦点線維症は肉芽腫変化と関係（染色試験）。肉芽腫変化は 1mg/m3 以上濃度ラットで観察され、様々な領域に点在、発生率と重症度は濃度依存（0.2mg/m3 暴露の雄 1 匹に小さな肉芽腫病変を確認、ただし、組織周辺に焦点線維症は観察されず）。MWCNTs は全ラット肺（主に肺胞マクロファージ内）に沈着。肺胞や気管支でも、取り込まれていない MWCNT をわずかに確認。肺胞内には 2 種の肺胞マクロファージが優先：①多く MWCNTs を取り込んだ肺胞マクロファージ、②少量の長い MWCNT のみを取り込んだ泡沫状細胞質を有する肺胞マクロファージ。全暴露群ラットに、BALT と縦隔リンパ節での MWCNT 沈着を確認。 ・内臓胸膜と胸膜下領域：炎症性湿潤を 5mg/m3 ﾗｯﾄ 1 匹に確認。病変周辺の肺胞腔に MWCNT 取込みマクロファージを確認。MWCNTs は内臓胸膜領域および振動版の壁側胸膜で観察。振動版での沈着により、胸膜中皮と筋肉毛細血管中の量は少ない。中皮の形態変化なし。振動版の筋肉組織毛細血管に MWCNT を確認し、MWCNT は全身に広がっている可能性あり。 ・杯細胞過形成：鼻腔と鼻咽頭の正面気道上皮（1mg/m3 以上、雌雄）と鼻咽頭の軌道上日（0.2 mg/m3、雄）に確認。好酸球の球の発生率が増加（1mg/m3 以上、雌雄）。鼻腔に MWCNT が沈着（全暴露群、雌雄）。 ・MWCNT の肺負荷：暴露濃度に対応した、MWCNTs の肺平均量は、雌雄ともに、暴露濃度と相関あり。雄のほうが雌よりも濃度に対する MWCNT 量大。 ・LOAEL：ラットへの吸入暴露による気道毒性に関する LOAEL を 0.2mg/m3 と決定。
結論	本研究では、雌雄 F344 ラットを繊維状 MWCNT エアロゾルに暴露した。毒性学的データから、線維状 MWCNT への暴露により、濃度依存的に、肉芽腫変化や焦点線維症、BALF パラメータの変化などの亜慢性毒性影響を誘発することを示した。わずかに胸膜下領域と隔膜でも MWCNTs が観察された。さらに、MWCNTs の肺負荷から、毒性の発生率と重症度が暴露濃度、期間、保持に依存することを示した。 本研究から、線維状 MWCNTs の亜慢性毒性に係る広範なデータが取得でき、それらはヒトへの MWCNTs のリスク評価にとって重要である。しかし、結果は長期間の毒性影響の症状を提供するものであるが、慢性毒性と発がん性に関する情報を得るにはさらなる調査が必要である。特に、MWCNT の胸膜腔への転座と中皮細胞中の変化を考慮して、我々が進行中の 2 年間発がん性研究では、長期毒性プロファイルの明確な絵を提供するべきである。

No	MWCNT-15
論文題目 （和訳）	Lung burdens and kinetics of multi-walled carbon nanotubes (Baytubes) are highly dependent on the disaggregation of aerosolized MWCNT （MWCNTs（Baytubes）の肺の負荷と動態はエアロゾル化した MWCNT の分解に高大きく依存する）
著者 所属機関	Ju¨ rgen Pauluhn and Martin Rosenbruch Department of Experimental Toxicology, Bayer Pharma AG, Wuppertal, Germany
書誌事項	Nanotoxicology. 2015 Mar;9(2):242-52. doi: 10.3109/17435390.2014.918204. Epub 2014 May 19.
試験物質	MWCNT：Baytubes®（Bayer Material Science、不純物を含有）
試料調整法	Baytubes を吸入試験用に、粉末の粉じんを増すために、最小限の微小化に供した。さらに、Baytubes（4.2%）をカルボキシメチルーセルロース・ナトリウム（2.9%）水溶液に懸濁。水分量は 92.8%。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	【試験生物】特定病原体を含まない、健康で若いオス成体 SPF 飼育 Wistar ラット。実験開始時 3 か月齢。実験前 1 週間、慣らし。色マーカーとゲージラベルで識別。開始時の体重は、乾燥粉じんグループで 218±6.4、懸濁液ｸﾞﾙｰﾌﾟで 217±6.5g。3 か月後の暴露期間終了時の体重は、各々472±44、471±35.3g。 【実験方法】 ・暴露条件：～25mg/m3、6 時間 13 週間暴露後の肺に蓄積した肺負荷 0.4mg/m3 と一致。鼻部のみへの 1×6 時間吸入暴露で、1ｸﾞﾙｰﾌﾟは乾燥粉じん Baytubes を、もう 1 グループは懸濁液中に最大で分散させた Baytubes を使用。MWCNT 乾燥粉じんを吸入チャンバー内に分散。 ・OECD GD#39 により推奨された手順で観察。体重を 1 週間ごとに記録。化学的観察は個別ラットについて毎日実施。 ・6 匹／1ｸﾞﾙｰﾌﾟの肺を解剖して、1（暴露初日）、7、28、56、91 日目の MWCNT の肺負荷を分析。解剖時に、失血ラットの肺重量を測定。2 匹／1ｸﾞﾙｰﾌﾟの肺を顕微鏡観察用（7 日暴露後 3 か月のもの）、TEM 観察用（7 日暴露時点のもの）に保持。肺をパラホルムアルデヒド／グルタアルデヒドで固定後、浸水後固定。標本を Paraplast に設置、4μm 厚切片をヘマトキシリン＆エオシンデ顕微鏡用に固定。左肺と右尾状葉をプラスチックに埋め込み、半薄に、その後極薄切片までカット。極薄切片を銅グリッド上に移動し、ウラニル酢酸／クエン酸 - 鉛で対比した後、透過型 TEM で観察。5 カテゴリー・ステップで半定量的に知見をグレード化：no effect, minimal, slight, moderate, severe, massive。 ・MWCNT 肺負荷量の決定：麻酔をかけたラットの腹部大動脈を切断して放血。切除した湿った肺の重量を測定、写真撮影。肺を凍結保存。解凍肺をメタノール中テトラミチル・アンモニア水酸化物 25%溶液 4mL で 50℃で 1 晩分解後、5mL ﾒﾀﾉｰﾙ含有遠心分離チューブに移動後、遠心分離。上澄みを捨て、遠心分離後の密度の濃い部分をメタノールで再懸濁し、再度遠心分離。得られたペレットを 5mL 硝酸に再懸濁し、10 分間超音波分解、1 晩反応。超音波分解、遠心分離、メタノールでの再懸濁の細工を 2 度繰り返し。最終ステップで、ペレットのスラリー懸濁液を水晶フィルターのパンチ上で測定し、EC/OC 分析用にサイズ調整し、溶媒が完全に蒸発するまで 180℃で加熱。その後フィルターをマイクロチューブに移し、IUTA で EC/OC 分析。 ・吸入用量と肺負荷：肺負荷を以下の式により計算；MV（1 分あたりの呼吸量、0.8L/min/kg-rat） $\text{Lung burden}\frac{\mu g}{rat-lung}=\text{conc.}\frac{\mu g}{L}\ \text{x}\ \text{MV}_{rat}\left[\frac{L}{6-hours}\right]\ \text{x alveolar fraction}_{\text{MPPD2.11}}\ \text{x}$ $\text{bw}[kg]\ \Rightarrow\ 24.8\frac{\mu g}{L}\ \text{x}\ 290\frac{L}{day\ x\ kg-bw}\ \text{x}\ 0.031\ \text{x}\ \frac{220}{1000}=49\frac{\mu g}{rat-lung}$ 肺負荷量の計算値は、乾燥粉じんで 49、湿式分散で 167μg。肺領域の蓄積割合は、乾燥粉じんで 3.1%、湿式分解で 8.2%。 ・データ解析：体重と肺重量を ANOVA と Dunnett あるいは Turkey-Kramer post

	hoc tests を用いて比較。
試験結果	・肺負荷と動態：Baytubes の乾燥粉じんと湿式分散したものの 1 次消失速度の半減期は各々87 日、46 日。24.8mg/m3×6 時間単回暴露後の Baytubes 乾燥粉じんの初期肺負荷は、0.4mg/m3 で 13 週間暴露したラットの累積肺負荷の計算値と一致。湿式分散 MWCNT のほうが呼吸可能性がより高いことから、初期に蓄積した肺負荷は乾燥粉じん Baytubes のわずかに低い濃度への暴露よりも 3 倍高。暴露後 1 日から 7 日の間の肺負荷の増加を、より呼吸可能な湿式分散 MWCNT に暴露したラットで観察。 ・肺重量：絶対重量と相対重量（乾燥空気に暴露したラットのコントロールデータと比較）。乾燥粉じん暴露グループの肺重量はヒストリカル・コントロールと統計的な違いはなし。一方、湿式分散に暴露したラットの肺重量は、わずかに、しかし、明らかに、暴露後 7 日に高。乾燥分散に対する湿式分散の絶対、相対肺重量は、7 日に有意に高。 ・剖検と病理組織学的検査：顕微鏡観察により、乾燥粉じんに暴露したﾗｯﾄの肺と肺に関連したリンパ節は通常の外観。一方、湿式分散暴露ラットの肺は全個体で灰色に変色。7 日目には、湿式分散暴露全ラットに、縦隔リンパ節の非常に顕著な拡大と変色が発生。肺表面（臓側胸膜部分）の灰色への変色は、暴露後の期間中継続。暴露後 7 日目に、光学顕微鏡による観察から、乾燥粉じん暴露ラットの末梢肺気道における AM の存在の増加が明らかに。細気管支肺胞上皮接合で細胞クラスターは上皮過形成最小。湿式分散暴露ラットでは、AM と過形成はより広く行き渡っていた。プラスチックに設置した少し薄い切片を光学顕微鏡で観察すると、取り込まれた MWCNT の存在が暴露グループにより異なった：弱凝集化して取り込まれた暗い含有物が、乾燥粉じんに暴露したラットのマクロファージの細胞質で観察。一方、湿式分散暴露後のラットでは緩く分布した粒子様構造を観察。暴露後 3 か月で、取り込まれた細胞内物質の存在は、暴露後 7 日目に観察されたものと比較して定性的にずっと低い。乾燥粉じん暴露ラットでは、肺の大部分が MWCNT を取り込んだマクロファージの出現が最小で、通常の外観。一方、湿式分散暴露ラットでは、細気管支肺胞接合に隣接した AM のクラスターが高い確率で発生。これらの発生は、多焦点で、部分的には黒い物質を含んだ間質マクロファージと密接な関係。中隔の肥厚は、湿式分散でも乾燥粉じん Baytubes に暴露したラットでも最小。
結論	本研究の目的は、湿式分散の場合の自然状態の MWCNT の処方が崩壊部分構造の存在下で集合体構造の形態をどの程度変化させるかについて研究することであった。本研究では、自然状態と厳密に処方された MWCNT 由来の肺毒性の推定上の違いの原因をよりよく理解するために、乾式分散と湿式分散の Baytubes の比較吸入線量測定と動態に着目した。結果として、初めに蓄積した MWCNT の肺用量は、本質的に同様の吸入チャンバー濃度で、湿式分散 MWCNT のほうが乾燥粉じんに比べて 3 倍となった。乾式分散と湿式分散 MWCNT の消失半減期はそれぞれ 87 日、46 日であった。TEM からは、湿式分散 MWCNT が、乾燥ダストを暴露した動物のものとはかなり異なる AMs の細胞質内での分布パターンとともに崩壊した構造として吸入されているという証拠を提供した。本研究は、MWCNT を処方する専門的な技術プロセスがそれらの肺での挙動とそれに係る毒性に対して劇的な結果をもたらす可能性があることを示した。そうした特定は、肺の染料測定と動態と肺毒性の比較することによってのみ明らかにすることが可能である。

No	MWCNT-16
論文題目 （和訳）	Changes in cholesterol homeostasis and acute phase response link pulmonary exposure to multi-walled carbon nanotubes to risk of cardiovascular disease （コレステロール恒常性の変化および肺の多層カーボンナノチューブ暴露急性期反応が心臓血管疾患リスクにつながる）
著者 所属機関	Sarah S. Poulsen [a,b,□], Anne T. Saber [a], Alicja Mortensen [c], Józef Szarek [d], DongmeiWu[e], Andrew Williams [e], Ole Andersen [b], Nicklas R. Jacobsen [a], Carole L. Yauk[e], HåkanWallin[a][f], Sabina Halappanavar [e], Ulla Vogel [a,g] a National Research Centre for the Working Environment, DK-2100 Copenhagen, Denmark b Department of Science, Systems and Models, Roskilde University, DK-4000 Roskilde, Denmark c National Food Institute, Technical University of Denmark, Søborg, Denmark d Faculty of Veterinary Medicine, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, 10-719 Olsztyn, Poland e Environmental and Radiation Health Sciences Directorate, Health Canada, Ottawa, Ontario K1A 0K9, Canada f Department of Public Health, University of Copenhagen, DK-1014 Copenhagen K, Denmark g Department of Micro- and Nanotechnology, Technical University of Denmark, DK-2800 Kgs. Lyngby, Denmark
書誌事項	Toxicology and Applied Pharmacology 283 (2015) 210–222
試験物質	2 種の多層カーボンナノチューブ ・CNT_{small}：NRCWE-026(NANOCYL)、11nmφ、847nmL、表面積 245.8 m^2/g のからまりあった形状 ・CNT_{large}：MITSUI XNRi-7、67nmφ、4048nmL、表面積 14.6 m^2/g
試料調整法	C57BL/6 マウスから採取した漿液 2%を含む NanoPure 水中に 3.24mg/ml のそれぞれの MWCNT を 40W で 16 分間超音波撹拌
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	5-7 週齢の C57BL/6 マウス（6 匹/グループ） 18、54、162μg/ラットを単回気管内注入 注入後、1、3、28 日後に屠殺し、調査
試験結果	**血中蛋白分析**：CNT_{small} の高ドーズで SAA3 が投与後 1、3、28 日目に有意に増加、3 日目は全ドーズで有意に増加した。CNT_{large} では高ドーズで 1、3 日目に有意に増加、3 日目に中ドーズが有意に増加した。肺 *Saa3* は血中 SAA3 レベルと強い相関があった。両 CNT とも 3 日目にハプトグロビンが有意に増加した。 **コレステロール恒常性（ホメオスタシス）の改変**：総コレステロールが、高ドーズの両 CNT で 3 日目と、CNT_{large} の 1 日目で大きく増加した。LDL/VLDL レベルも高ドーズの両 CNT で有意に大きくなった。HDL は高ドーズの CNT_{small} で有意に増加したが、CNT_{large} では増加傾向にあったが有意ではなかった。血中中性脂肪は影響を受けなかった。肝臓コレステロールは、CNT_{small} では変化がなかったが、高ドーズの CNT_{large} で 3 日目に有意に増加した。 **全般的肝臓遺伝子発現の改変**：両 CNT 高ドーズの全般的肝臓遺伝子発現を 1、3、28 日目に調べた。CNT_{small} では、肝臓組織の 60,000 プローブの内 4028 が差次的に発現し、1、3、28 日目ではそれぞれ 2,505、2,401、255 の遺伝子が変化した。CNT_{large} では CNT_{small} より影響は小さかったが有意な差はあった。 **炎症と急性期応答シグナリング** 肝臓の急性期反応（APR）遺伝子の差次的発現がみられた。 **コレステロール恒常性制御** HMC-CoA リダクターゼ経路に関連する遺伝子は両 CNT 暴露により肝臓内で下方制御された。CNT_{small} はもっとも HMC-CoA リダクターゼ経路を乱し、遺伝子発現変化は 1 日目と 3 日目で同様であった。脂質恒常性に関連する遺伝子も影響を受けた。低密度脂質蛋白受容体（*Ldlr*）は CNT_{small} 暴露で 1 日目と 3 日目に、CNT_{large} 暴露で 3 日目に下方制御された。スカベンジャー受容体の *Scarb1* も CNT_{small}1 日目に下方制御され、低密度脂質蛋白需要体に関連する蛋白（*Lrp1*）は両 CNT で 3 日目に上方制御された。*Scarb1* と *Lrp1* はそれぞれ肝細胞膜を通過しての HDL と LDL 輸送に関与する。 HMC-CoA リダクターゼ経路とは別に、IPA の標準的な経路解析は、LXL/RXR

	活性、グルタチオン媒介解毒、急性期応答シグナル、ニコチン分解 III、肝臓の胆汁うっ滞および薬物動態のシグナリング経路の増加を示した。 **qRT-PCR 検証** 162μg の両 CNT に暴露 1、3、28 日後および 18μg と 54μg に暴露 1、3、日後に、18 の差次的に発現した肝臓の遺伝子を調べた。CNT_{small} に暴露した脂質恒常性遺伝子はすべてのドーズ量で 3、28 日後に差次的に発現したが、CNT_{large} では起こらなかった。反対に炎症性や APR 遺伝子は CNT_{large} の方が増加傾向が見られた。24 時間周期に含まれる PAR ロイシンジッパー転写要素である *Dbp* 発現は、CNT_{small} ではすべてのドーズ、すべての時間で下方制御されたが、CNT_{large} では上方制御された。 **肝臓組織検査** CNT_{small} または CNT_{large} は各ドーズ、各時間に濃度に非依存的な組織学的変化を起こした。MWCNT の肺から肝臓への移動は認められなかった。CNT 暴露によって、空胞変性、肉芽腫、肝細胞壊死、クッパー細胞の増加と/または肥大化がしばしば起こった。空胞変性は CNT_{large} に暴露後、暴露からの経過時間に関わらず肺小葉のあらゆるところに見られたが、CNT_{small} に暴露後は、1 日目に小葉中心部に、3 日目に中間部に、28 日目には外周部に見られた。肝臓肉芽腫は CNT_{large} の方が大きかった。肉芽腫周囲の細胞壊死の微小点在、好酸球性壊死、核濃縮した肝細胞は CNT_{large} の方が多かった。中心静脈を取り囲む好酸球性壊死が 162μg の CNT_{large} で 1 日目と 3 日目に見られた。クッパー細胞の増加と肥大化は CNT_{large} の方が大きかった。二核肝細胞はコントロールより多かった。総括すると、CNT_{large} の肺暴露は CNT_{small} より肝臓損傷の発生と重篤度が大きかった。
結論	2 種の大いに異なる MWCNT の肺への暴露は、同様な、血液中の APR タンパク質、コレステロール、LDL/HDL 比、HDL の変化および肝臓遺伝子発現や肝臓組織の変化といった急性期反応（APR）を引き起こすことを示した。 さらに、血中 SAA3 レベルと肺 *Saa3* の相関関係を見出した。 これらから、MWCNT の肺暴露は心血管系疾患（CVD）リスクに結びつく。

No	MWCNT-17
論文題目 （和訳）	Subchronic Toxicity and in Spontaneously Hypertensive Rats after Exposure to Multiwalled Carbon Nanotubes by Intratracheal Instillation （気管内注入による多層カーボンナノチューブへの暴露後の自然発生高血圧ラット(SH ラット)における亜慢性毒性と心血管応答）
著者 所属機関	Rui Chen1, Lili Zhang1, Cuicui Ge2, Michael T. Tseng3, Ru Bai1 Ying Qu1 Christiane Beer4, Herman Autrup4, Chunying Chen1,2 1)CAS Key Laboratory for Biomedical Effects of Nanomaterials and Nanosafety, National Center for Nanoscience and Technology of China, Beijing 100090, China,　2)School for Radiological and Interdisciplinary Sciences (RAD-X) & Collaborative Innovation Center of Radiation Medicine of Jiangsu Higher Education Institutions, Soochow University, Suzhou, China 3)Department of Anatomical Sciences & Neurobiology, University of Louisville, Louisville, Kentucky 40292, United States 4)Department of Public Health, Aarhus University, Bartholins Alle 2, 8000 Aarhus C, Denmark
書誌事項	Chem Res Toxicol. 2015 Mar 16;28(3):440-50. doi: 10.1021/tx5004003. Epub 2015 Jan 22.
試験物質	MWCNTs　4 種類:ﾗﾍﾞﾙした短いもの（labeled short；長さ 0.5-2μm、径＜8nm）、一列に並んだもの（aligned；長さ 30-100μm、径 10-20nm）、Fe 含有率の低いもの（Fe-low）、Fe 含有率の高いもの（Fe-high）
試料調整法	1.5mg/mL　MWCNT s 懸濁液を、MWCNTs 粉末を 0.5%Pluronic F108(PF108)含有生理食塩水中に分散させて長生し、使用前に 30 分間超音波分解。PF108 を MWCNTs の分散剤として選定。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	【試験生物】11-12 週齢オス SH ﾗｯﾄ(220-250g)、オス WKY ﾗｯﾄ(370-400g) 【試験方法】 ・暴露方法：6 匹／1 グループ×5 グループ。200μL 生理食塩水中に 600μg/kg MWCNT を添加した用量で、エタノール麻酔後に外科手術以外の気管内注入により 1 日に 1 回で連続 2 日間投与（全用量は 1.2mg/kg）。生理食塩水に懸濁させた 4 種類の MWCNTs 粒子に暴露し、1 ｸﾞﾙｰﾌﾟは生理食塩水に暴露したコントロール・グループとした。最後の暴露後、7 日目と 30 日目にそれぞれ解剖。40mg/kg 腹腔内ペントバルビタール・ナトリウムで麻酔、腹部大動脈を経由して放血。組織及び器官（心臓、肝臓、脾臓、腎臓、肺、等）を摘出・重量測定。体重と組織の重量測定後、心臓、肝臓、脾臓、肺、腎臓の体重に対する器官計数を計算（組織湿重量-mg／体重-g）。 ・心電図モニタリング：血圧、心拍数を含む生物物理学的パラメータと心電図（ECG）データを測定。MWCNTs への 2 日間連続暴露の前後 1 日とコントロール・グループに対して、毎週実施。 ・気管支肺胞洗浄（BALF）と血清サンプルの生物化学的分析：BALF と血液を捕集。BALF の LDH、TNF-α、CC16 タンパク質、を酵素免疫測定法（ELISA）により分析。血清サンプルの、ET-1、ACE、クエン酸血漿の vWF、CRP、ICAM-1 を Ge et al.(2012)に従って決定。3 回 PBS で洗浄。回復した BALFs を遠心分離し、沈殿物を回収。PMN の分化細胞数を Giemsa で染色後計数。BALF 上澄み液を ELISA による細胞毒性評価用に使用。血清又は血漿サンプルを標準的な手順で回収。フィブリノゲン、ET-1、ACE、クエン酸血漿の vWF、ICAM-1、TNF-α、CRP の血清中の含有量を ELISA キットを用いて測定。マイクロプレート・リーダーにより吸光度を測定。 ・組織病理学的実験：組織病理学的試験を標準的な実験室手順で実施。臓器組織をパラフィン・ブロックに設置後、4μm 厚切片にカットし、ｽﾗｲﾄﾞ・ｶﾞﾗｽ状に設置。ヘマトキシリンーエオシン（HE）で染色後、組織の病理学的変化を光学顕微鏡で観察。 ・TEM 観察：新鮮な単離した組織サンプルを 2.5%グルタルアルデヒドに 4℃で浸し、PBS で十分洗浄後、1%ｵｽﾐｳﾑ・ﾃﾄﾛｵｷｼﾄﾞで固定、エタノールの様々な濃度で脱水、アラルバイトで接着し、37℃で 24 時間重合。極薄切片(50nm)をカットし、酢酸ウラニルとクエン酸鉛で染色した後、TEM 又は Phillips CM-10 電子顕微鏡で観察。 ・統計解析：SPSS v19.0 を用いて統計解析。ｸﾞﾙｰﾌﾟ間の比較には、Newman-Keuls Test を用いた。
試験結果	・器官係数の影響：MWCNTs 暴露は両ﾗｯﾄで、暴露後 7、30 日目ともに、体重及び、心臓、脾臓、腎臓の器官係数への影響なし。暴露後 7 日目に、肝臓の器官

	係数がコントロールと比較して有意に減少。ただし、Fe-low に暴露した WKY ラットでは有意な影響はなし。暴露した全ｸﾞﾙｰﾌﾟで肺水腫を誘発。特に、暴露後 7 日目の SH ラットで大。一方 short MWCNTs に暴露した WKY ラットでは影響なし。肺係数の変化を考慮すると、Fe-low の毒性は他の MWCNTs よりもずっと高い。肝臓の器官係数の減少と肺係数の増加は、これらの臓器での重大な損傷が MWCNTs への暴露に由来することを示す。暴露後 30 日目でも、肺と肝臓の回復は乏しく、器官係数は有意な差があり、特に Fe-los と Fe-high グループで大。Short と aligned グループでは、7 日目にラットに大きな損傷が示されたが、30 日目の結果から、影響は持続しなかった。 ・MWCNT 暴露後の亜慢性毒性影響：[LDH 活性]SH ラットの全時間で上方調節を示し、呼吸器系における深刻な細胞損傷を示唆。WKY ラットでは、Fe-low／-high の 30 日目以外は SH ラットと同様の肺損傷。[PMNs 数]両ラットで有意な変化。短い方が損傷大。[アルブミン濃度]WKY ラットでは暴露後 7 日目に有意に増加。一方、SH ラットでは両日ともに有意に増加し、SH ラットは MWCNTs 暴露からの回復に長時間を有する可能性を示唆。[TNF-α]SH ラットの 7 日目に上昇。30 日目はどのグループでも非検出。一方、WKY ラットでは、両日ともに増加せず。[CC16]短い MWCNTs に暴露した WKY ラット以外の両ラットの各グループで、暴露後 30 日目に著しい上昇を検出。Fe-high では 7 日目でも SH ラットで増加を確認。 ・MWCNTs 暴露後の血圧と心拍数の反応：WKY ラットでは MWCNTs 暴露による血圧と心調律に対する影響なし。SH ラットでは、暴露後 24 時間の血圧が継時的に減少し、心拍数は長期間（1-30 日）で減少。心血管システムのストレス応答が SH ラットモデルのほうが容易に検出。SH ラットの Aligned と Fe-high グループでは、心拍数が実験期間を通じてわずかに継時的に減少。他方、Fe-low と short グループでは心拍数への影響は大きくなく、回復が早い。 ・MWCNTs に暴露したラットの心血管影響：[血液の生物化学的ｱｯｾｲ]白血球、リンパ球、好中球の有意な増加を確認。他のﾊﾟﾗﾒｰﾀでは確認されず。[ET-1 濃度]SH ラットの暴露後 7 日目に血液中で有意に増加、30 日目は通常レベル。WKY ラットでは、aligned ｸﾞﾙｰﾌﾟでも 30 日目に ET-1 レベルが増加。[ACE 濃度]SH ラットの 30 日目に有意に増加。WKY ラットでは aligned（両日）と Fe-high（7 日目）ｸﾞﾙｰﾌﾟのみで増加。［CRP 濃度］short グループを除くと MWCNTs への暴露により、CRP の生成が SH ラットの 30 日目と WKY ラットの Fe-high グループの両日で増加し、継続的な炎症と回復が乏しいことを示唆。[フィブリノゲン]7 日目には、SH ラットで有意に増加したが、WKY ラットでは増加せず。WKY ラットの Fe-high グループの 30 日目に上昇し、強力な長期の肺損傷を示唆。[vWF と ICAM-1]両ラットともに、有意な変化なし。WKY ラットの Fe-high グループの 7 日目のみで vWF が有意に増加。 ・暴露後 30 日目の SH ラットにおける MWCNTs の生物学的蓄積と全身移動：SH ラットの暴露後 30 日目の TEM による臓器観察により、MWCNTs が肺に蓄積していること、肝臓、腎臓、脾臓にも存在するが、心臓と大動脈には存在しない。肺と脾臓のマクロファージと肝臓肝細胞は MWCNTs の食作用に関与。MWCNT 暴露により、管状介在物の小さなパッチを導出。脾臓への取込みから、鉄含有 MWCNTs の食作用による蓄積を確認。圧縮された管状要素が脾臓でのみ多く蓄積。腎臓で時々電子密度の高い粒子を、足細胞の茎のみで検出。 ・MWCNTs 暴露後 7 日目と 30 日目の SH ラットの大動脈の構造変化：SH ラットで血管合併症を引き起こす可能性を示唆。中膜内の平滑筋層を覆う内膜はコントロールと生理食塩水グループでわずかに接着しているように見えた。平滑筋細胞過形成を含む病変、内皮矛盾、弾性板の障害でさえも、MWCNTs への暴露後 7 日目と 30 日目の SH ラットで確認。SH ラットの Aligned グループ以外の全 MWCNTs で、30 日目にかなり深刻な損傷。
結論	WKY ラットに比べて SH ラットで、高レベルの亜慢性毒性と間接的な心血管損傷を示した。さらに、SH ラットの腹部動脈の病変が MWCNTs への暴露による長期の悪影響とともに確認された。これらの毒性影響は、心拍数の長期減少の表現型を含み観察された心血管応答を導いた。我々は、MWCNTs が SH ラットの肺に留まり、肺の血管-気体境界を貫通し、それにより、肝臓、腎臓、脾臓に MWCNTs の生物学的蓄積を導く可能性を示した。MWCNTs への呼吸暴露が肺システムに対して偉大な潜在的リスクをもたらすだけでなく、全心血管システムに影響を与えることも示した。SH ラットの高感受性から、既存の循環器疾患を有する個体は作業場あるいは環境での MWCNTs の吸入後の悪影響に対してより多くの影響を受けやすいことを示唆した。

No	MWCNT-19
論文題目 （和訳）	Multi-walled carbon nanotube-induced gene expression in vitro: Concordance with in vivo studies （多層カーボンナノチューブが誘発する in vitro 遺伝子発現 : in vivo 研究との一致）
著者 所属機関	Brandi N. Snyder-Talkington 1, Chunlin Dong 2, Xiangyi Zhao 2, Julian Dymacek 3, Dale W. Porter 1, Michael G. Wolfarth 1, Vincent Castranova 1,4, Yong Qian 1, Nancy L. Guo 2, 1)Pathology and Physiology Research Branch, Health Effects Laboratory Division, National Institute for Occupational Safety and Health, Morgantown, WV, 26505, USA, 2) Mary Babb Randolph Cancer Center, West Virginia University, Morgantown, WV 26506-9300, USA, 3)Lane Department of Computer Science and Electrical Engineering, West Virginia University, Morgantown, WV 26506-6070, USA, 4)Department of Basic Pharmaceutical Sciences, School of Pharmacy, West Virginia University, Morgantown, WV 26506, USA
書誌事項	Toxicology. 2015 Feb 3;328:66-74. doi: 10.1016/j.tox.2014.12.012. Epub 2014 Dec 13.
試験物質	バルク MWCNT : MWCNT-7（Mitsui & Company）。独特の結晶構造。層数 20-50、微量金属 0.78%（Na0.41%、Fe0.32%） DM 中 MWCNT : DM に MWCNT を分散。長さの中央値 3.86μm。平均カウント 49±13.4nm。ゼータポテンシャル-11mV
試料調整法	In vitro の MWCNT 調整：細胞培地の暴露用に、MWCNT を DM 中で調整。その後、間接的超音波分解を実施。懸濁液を直接超音波分解。MWCNT 原液（0.5mg/mL）を 4℃で保存し、2-3 週間以内に使用。細胞培養実験前に、MWCNT 原液を直接超音波分解。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	【試験生物】C57BL/6J オスマウス（7 週齢） 【細胞培養】 ・SAEC：メーカーにより提供された様々な成長因子を補完した無血清完全 SAGM 培地で培養。 ・HMVEC：内皮基礎培地（EBM-2）で培養し、10%ウシ胎児血清、100U/mL ペニシリン、10μg/mL ストレプトマイシン、0.01μg/mL 上皮成長因子、1μg/mL ヒドロコルチゾンで補完。全細胞を 37℃インキュベーターで管理。共培養用に、インサートを 100mm ポリカーボネイト Transwell dishes から除去し、SAEC 完全培地に水和。HMVEC を Transwell dishes の底部に配置し接着し、インサートを水和後に Transwell に配置、SAEC を Transwell インサート上に配置。細胞を完全 EBM-2 培地と完全 SAEC 培地で保管。単培養暴露用に、SAEC と HMVEC を細胞培地皿に直接設置し、72 時間で無傷のバリアを形成させ、血清を 1 晩飢餓状態にしてから、1.2μg/mL 濃度 MWCNT に 6 時間／12 時間、直接暴露。24 時間 DM 暴露をネガティブ・コントロールとして使用。共培養暴露では、SAEC と HMVEC を 72 時間、上皮、内皮バリアを形成させ、1 晩血清を飢餓状態にしたのち、SAEC を 1.2μg/mL 濃度の MWCNT に 6 時間／24 時間暴露し、DM24 時間暴露をネガティブ・コントロールとして使用。HMVEC については、MWCNT に直接は暴露しなかった。細胞形態と密集度イメージを、単培養と共培養で成長させた SAEC と HMVEC に取得。単培養 SAEC と HMVEC はプレート配置後 5 日目に画像確認。撮影後に細胞を皿／膜から取り外し、サイトスピン用に準備。 ・細胞内 RNA 単離：トータル RNA を SAEC と HMVEC から単離。RNA 濃度を NanoDrop1000 分光計で決定。RNA の室を Agilent2100Bioanalyzer で評価。 ・MWCNT 咽頭アスピレーション暴露：動物を DM に分散した MWCNT に暴露。1 グループ 8 匹。DM／10／20／40／80μg　MWCNT に暴露後、1／7／28／56 日後に組織等摘出。 ・組織 RNA の抽出：トータル RNA を抽出し、RNase-free water に溶出。個々の RNA サンプルの室と濃度を決定。 ・マイクロアレイ発現プロファイリング： in vivo で 160 匹のマウス肺サンプルの発現プロファイリングを分析。In vitro で 72 細胞サンプルから抽出した RNA

	の発現プロファイリングを分析。両マイクロアレイ分析に対するトータル RNA の室を決定。抽出した RNA を cyanine(cy)-3-CTP でラベルし、リファレンス RNA を(cy)-5-CTP でラベル。ラベルした cRNAs を精製後ラベルした cRNAs を組合せて、17 時間 65℃で重合。マイクロアレイを洗浄後ｽｷｬﾝ。 ・サンプルサイズ正当化：Pobbin & Simon(2005)の式 4.2 を用いてｱﾚｲの数を計算。以前のデータを基に、in vitro 研究の差異を 0.029 と予測、in vivo は 0.25 と予測。In vitro 実験用に全 18 ｱﾚｲ（ｺﾝﾄﾛｰﾙ 6、6 時間 6、24 時間 6）を個々の条件（SAEC）単培養／共培養、HMVEC 単培養／共培養；全 72）が要求された統計的検出力に到達。In vivo 実験用に各時間ごとに 40 アレイ、とトータル 160 とした。 ・有意遺伝子決定のためにマイクロアレイ・データ処理と統計解析を実施 ・ヒトとマウスの遺伝子ペアと、遺伝子発現解析の関係：マウスとヒトのゲノムを遺伝子名で一致させた。一致した遺伝子は全部で 15,473。個々の in vitro 細胞条件の全ゲノムスケールの mRNA プロファイルを in vivo 用量／時間条件での全動物実験 mRNA プロファイルとの相互関係を比較。相関係数を統計的仮説検定により試験し、多重仮説検定に調節。 ・IPA（創意工夫経路解析）：データを QUIGEN's ingenuity pathway Analysis を用いて解析。6 時間と 24 時間でかなり一致した遺伝子を特定。SAEC、HMVEC 単培養と共培養 Core 分析を比較分析ツールを用いて比較。P 値を IPA により決定。
試験結果	・in vivo と in vitro での mRNA 発現の相互比較：in vivo 肺胞表面積を基にすると、作業環境で観察された MWCNT 空気中濃度と、MWCNT 空気力学的質量中央径、分時換気量、in vitro 暴露での MWCNT1.2μg/mL 濃度は、in vivo での MWCNT 暴露後に見られた一過性の炎症と慢性線維症を反映する高用量と考えられた。In vitro 細胞条件の全ゲノム発現プロファイルは Pearson の係数を用いて in vivo 処理条件のものと一致。In vitro 条件の全 HMVEC の遺伝子発現は、単培養でも共培養でも、in vivo での遺伝子発現と正の相関。SAEC に関しては、6 時間共培養条件のみが in vivo 発現と正の相関。単一仮説検定と多重仮説検定による相関係数は、ゲノムの広範囲で、in vitro 共培養モデルが、単培養モデルに比べて、 in vivo 転写プロファイルとよく一致。 ・in vivo と in vitro 条件間の一致遺伝子：24 時間の SAEC 共培養を除くと、全共培養条件は一致遺伝子を単培養よりも有意に変化。in vivo MWCNT 誘発発現変化を反映して一致した遺伝子が共培養で特定されたことを確認。 ・in vivo と in vitro での一致遺伝子の経路解析： SAEC 単培養と共培養で有意に変化した一致遺伝子に関連したネットワークのトップ 5 は、喘息の炎症気道、マトリックスメタロプロテイナーゼの阻害、LXR/RXR 活性、自然免疫と適応免疫細胞との間のコミュニケーション、多能性幹細胞から造血。SAEC 共培養遺伝子は、SAEC 単培養遺伝子よりも LXR/RXR 活性外の 4 つのネットワークにより関与。SAEC 単培養遺伝子は LXR/RXR 活性経路に SAEC 共培養経路よりも関与。HMVEC 単培養と共培養の比較で確認されたトップ 5 のネットワークは、PTEM 伝達、ARP-WASP 混合物によるアクチン核形成、ATM 伝達、BMP 受容体による心筋細胞分科、ERK5 伝達。共培養の方が単培養遺伝子よりも個々の経路に強く関与。 ・in vivo と in vitro の疾患に関連一致遺伝子：SAEC24 時間共培養を除くと、炎症応答と線維症疾患の両方に関与した一致遺伝子は、単培養よりも共培養で多かった。
結論	本研究は、多層カーボンナノチューブ(MWCNT)が誘発する、ヒト肺上皮細胞と微小血管内皮細胞からの遺伝子発現を、単培養の場合と、MWCNT に暴露したマウス肺からの遺伝子発現との共培養での場合を比較した。10%の偽発見率のカットオフを使用して、単作よりも共培養で両者の細胞タイプでより一致した遺伝子が発現した。炎症と線維症「に関与した遺伝子のみが減少した場合に、in vivo での MWCNT 暴露の結果が知られており、単培養に比べて共培養で疾患に関連した一致した遺伝子が発現した。さらに、異なる細胞伝達経路が、培養条件に依存した MWCNT に対応して活性化された。In vivo での遺伝子発現と関連性の高い共培養遺伝子発現のように、細胞共培養はナノ粒子のリスク評価に係る in vitro モデルの強化と in vivo で毒性試験の削減を提供する可能性を示唆する。

No	MWCNT-20
論文題目 （和訳）	Health surveilaance study of workers who manufacture multi-walled carbon nanotubes （多層カーボンナノチューブを製造する労働者の健康サーベイランス研究）
著者 所属機関	Jong Seong Lee1, Young Chul Choi2, Jae Hoon Shin1, Ji Hyun Lee3, Yurim Lee1, So Young Park1, Jin Ee Baek1, Jung Duck Park4, Kangho Ahn5, and Il Je Yu3 1)Occupational Lung Diseases Institute, Korea Workers' Compensation & Welfare Service, Ansan, Korea, 2)Electronics Telecommunications Research Institute, Daejeon, Korea, 3)Institute of Nanoproduct Safety Research, Hoseo University, Asan, Korea, 4)College of Medicine, Chung-Ang University, Seoul, Korea, and 5)Department of Mechanical Engineering, Hanyang University, Ansan, Korea
書誌事項	Nanotoxicology. 2015;9(6):802-11. doi: 10.3109/17435390.2014.978404. Epub 2014 Nov 14.
試験物質	MWCNT：最高ピーク 100nm。屋外の最高粒子サイズ 200nm。全シフト中の粒子サイズ 100-200nm。フィルター上の MWCNTs は弱凝集体を形成。
試料調整法	なし（製造工程でのサンプリング。CDC プロセスによる MWCNT の製造）
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	【試験生物】MWCNT を製造する労働者 9 人、事務員 4 人。製造労働者は、ﾊｰﾌマスクとグローブを着用。既往歴なし。 【作業環境・試験用量】MWCNT は CDC プロセスにより製造。24 時間稼働。製造量は 20kg/day。各 CDC 反応プレートで MWCNT500g 製造。1 日 40 回。労働者は8時間かける3回のシフト性。パッケージ用に50分間合成したMWCNTの回収作業＋10 分休憩後、清潔にしてから、合成のための触媒準備。炭素元素濃度：個人サンプル 6.2-9.3μg/m3、エリアサンプル 5.5-7.3μg/m2。 【サンプリング】 ・個人サンプル：8 時間ごと。製造労働者に装着。 ・エリアサンプル：製造装置から 1-4m 範囲にｻﾝﾌﾟﾗｰ設置。 【試験内容】 ・フィルター分析：MCE フィルターの SEM 分析。クォーツフィルターを用いて、TSP サンプリング゛と EC（炭素元素）濃度分析。残留金属のフィルター濃度分析。フィルターを電子レンジで消化し、ICP-MS で分析。MCE フィルターをプラチナでコーティングし、SEM で分析。 ・エアロゾル：リアルタイムモニタリング。 ・肺関連分析：肺機能検査（PFT）実施。肺応答に対する MWCNT 暴露の影響を調べるために EBCs を非侵襲性の酸化ストレスのバイオマーカー（H2O2、MDA、4-HHE、n-ヘキサナール）を用いてモニタリングし、呼気凝縮液（EBCs）を採取。各シフト後に労働者からサンプル回収。EBCs のバイオマーカー分析。 ・血液検査：シフト前後の労働者の血液をサンプリング、血液生物化学を含む血液検査実施。金属触媒を使用しているため、血液中の金属濃度を MWCNT 暴露に関するバイオマーカーとして ICP-MS で分析。 ・統計解析の実施
試験結果	・残留金属濃度：Mg、Al、Co、Zn、Mo、Fe を検出。金属暴露レベルは ACGIH TLVs よりも低い。 ・肺機能試験：MWCNT 製造労働者、事務員ともに、肺機能は通常範囲内。喫煙者と非喫煙者の間にも、事務員と製造労働者の間にも有意な差なし。 ・血液分析：顕著な以上は観察されず。1 人の事務員にアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、1 人の製造労働者にアラニンアミノトランスフェラーゼ、1 人の製造労働者に γ－グルタミルトランスペプチダーゼ、事務員と製造労働者各 1 人に低密度リポタンパクコレステロール、2 人の製造労働者に単球数、のわずかな異常を確認。ただし、だれもこれらのマーカーの同時増加は確認されず。 ・暴露バイオマーカーと呼気バイオマーカー濃度：血液中の Mo や Co 等の MWCNT 暴露バイオマーカーあるいは、EBCs 中の MDA や 4-HHE、n-ヘキサナール等の呼気バイオマーカーはいずれも、喫煙等の交絡変数による影響を受けなかったが、呼気バイオマーカーは事務員と製造労働者間で統計的に有意な差。製造労働者に対する日中の労働シフトによる影響をバイオマーカーレベルについての試験で、バイオマーカーに有意な変化なし。変数間の相関を Spearman のランク相関係数を用いた試験で、血液中の Mo レベルは EBC 酸化マーカー（MDA、n-ヘキサナール）と相関あり。しかし、MWCNT 暴露による影響を受

	けた血液中の Mo ではこの相関は確認されず。MWCNT 暴露労働者とコントロールとの血液中 Mo レベルに差なし。EBC の MDA と n-ヘキサナールも有意な相関あり。
結論	炭素元素に暴露した労働者は個人サンプリングでは 6.2-9.3μg/m3、エリアサンプリングでは 5.5-7.3μg/m3 であった。それにもかかわらず、労働者は、血液も血液生化学の値も通常範囲であり、肺機能パラメータもふつうであった。EBCs（呼気凝縮液）を分析したところ、MWCNT を製造する労働者の、MDA(マロンジアルデヒド)、4-HHE（4-ヒドロキシ-2-ヘキセナール）、n-ヘキサナールのレベルは事務員のものよりも明らかに高かった。MDA と n-ヘキサナールのレベルもまた、血液モリブデン濃度と有意な相関があり、MDA、n-ヘキサナール、モリブデンは MWCNT 暴露の有用なﾊﾞｲｵﾏｰｶｰとして利用可能であることを示唆した。

No	2-MWCNT-1
論文題目 （和訳）	Long-term retention of pristine multi-walled carbon nanotubes in rat lungs after intratracheal instillation （気管内注入後のラット肺における多層カーボンナノチューブの長期残留）
著者 所属機関	Naohide Shinohara[a], Tetsuya Nakazato[a*], Kumiko Ohkawa[a], Moritaka Tamura[a], Norihiro Kobayashi[a,b], YasuoMorimoto[c], Takako Oyabu[c], Toshihiko Myojo[c], Manabu Shimada[d], Kazuhiro Yamamoto[a], Hiroaki Tao[a], Makoto Ema[a], Masato Naya[a,e] and Junko Nakanishi[a] a)National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Onogawa 16-1, Tsukuba, Ibaraki 305-8569, Japan,　b) National Institute of Health Sciences, Kamiyouga 1-18-1, Setagaya, Tokyo 158-0098, Japan, c)Institute of Industrial Ecological Sciences, University of Occupational and Environmental Health, Iseigaoka 1-1, Yahatanishi, Kitakyushu, Fukuoka 807-8555, Japan,　d)Graduate School of Engineering, Hiroshima University, Kagamiyama 1-4-1, Higashi Hiroshima, Hiroshima 739-8527, Japan, e)BioSafety Research Center (BSRC), Shioshinden 582-2, Iwata, Shizuoka, 437-1213,Japan
書誌事項	Journal of Applied Toxicology, 2015, DOI 10.1002/jat.3271
試験物質	MWCNT（浮遊触媒法により合成）：表面積 69±37m2/g、金属不純物 Li、Al、Ca、Fe、Cd がそれぞれ 0.5、80、176、53、16μg/g。懸濁液中 MWCNT s の幾何学的平均径 48nm、幾何学的平均長 2.5μm。
試料調整法	MWCNTs を 0.5mg/ml　Triton-X 溶液に 30 分間超音波分解。0.5mg/ml Triton-X 水溶液 0.4ml に MWCNTs を懸濁させ、0.50、1.38mg/ml に調整。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	【試験生物】オス Wistar ラット、8 週齢、平均体重 196g 【投与方法・期間・用量】MWCNTs　0.20mg/ラット、または 0.55mg/ラットで、気管内注入。注入後、1、3、7、28、91、175、364 日間飼育した後、肺、肝臓、脳を摘出。 【分析】腹部大動脈から血液採取。左右肺と肝臓、脳（ラット 5 匹）を摘出、重量計測、切片を生理食塩水で均一化。肺、肝臓、脳中の MWCNTs を酸分解、マッフル炉で灰化、現場予熱、燃焼酸化-NDIR 測定により定量。 【光学顕微鏡観察・TEM 観察】肺とリンパ節をホルマリンで固定、パラフィンに設置、切片化、ヘマトキシリンとエオジンで染色し、光学顕微鏡で観察。TEM 用には、肺組織をグルタルアルデヒドとオスミウム・テトラオキシド溶液で固定、エタノールで脱水、エポシキ樹脂に設置、超ミクロトーム切片をカット。検体の切片を酢酸ウラニルとクエン酸鉛溶液で染色。
試験結果	・肺における MWCNTs 負荷：0.20、0.55mgMWCNT の投与後 1 日目にそれぞれ 0.15、0.38mg の MWCNTs が検出された（投与した MWCNTs の約 30%に相当）。投与後 24 時間以内に気管支繊毛運動により除去された可能性がある。 ・光学顕微鏡と TEM による観察：光学顕微鏡により、MWCNTs を含むマクロファージが肺気管及び肺胞で観察された（両用量）。注入後 1 日目には、MWCNTs は強凝集体の形態でマクロファージ中に存在。細胞外にもわずかに強凝集体を確認。3 日後にはほとんどの MWCNTs はマクロファージ中に強凝集体で確認。7-90 日後には、MWCNTs を含むマクロファージが肺に蓄積しているものも確認。90-364 日後には、MWCNTs を含むマクロファージのほとんどが肺胞間質に取り込まれ、肉芽腫を形成。TEM 画像からは、0.20mgMWCNTs 投与後 7 日及び 364 日後のラット肺の肺胞マクロファージにファゴリソソームを確認したが、核や他の細胞内小器官では確認されなかった。MWCNTs の内部多層構造は維持。
結論	MWCNTs は、気管内への注入後 1 年たっても肺に残留していた。しかし、肺マクロファージ中のこれらの MWCNTs は安定した肉芽腫を形成しているようにみえ、投与後 1 年後でも腫瘍は観察されなかった。本研究で観察された長期にわたる MWCNTs の残留は、MWCNTs の慢性毒性の可能性があるが、今回の知見からは、MWCNTs が肺に重度の慢性的な悪影響を誘発する可能性は低いことを示した。また、MWCNTs は 364 日間の試験期間内においては、肝臓や脳で検出されなかった。

No	2-MWCNT-2
論文題目 （和訳）	The impact of multi-walled carbon nanotubes with different amount of metallic impurities on immunometabolic parameters in healthy volunteers （健常者における免疫代謝パラメータに対する、金属不純物量の異なる多層カーボンナノチューブの影響）
著者 所属機関	T.I. Vitkina a, V.I. Yankova a, T.A. Gvozdenko a, V.L. Kuznetsov b, D.V. Krasnikov b, A.V. Nazarenko a, V.V. Chaika c, S.V. Smagin c, A.M. Tsatsakis c, d, A.B. Engin e, S.P. Karakitsios f, D.A. Sarigiannis f, g, K.S. Golokhvast a, c a) Vladivostok Branch of Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration, Research Institute of Medical Climatology and Rehabilitation Treatment, Vladivostok, Russia, b) Boreskov Institute of Catalysis SB RAS, Novosibirsk, Russia, c) Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia, d) University of Crete, Heraklion, Greece, e) Gazi University, Faculty of Pharmacy, Department of Toxicology, 06330, Hipodrom, Ankara, Turkey, f) Aristotle University of Thessaloniki, Department of Chemical Engineering, Thessaloniki, Greece, g) Chair of Environmental Health Engineering, Institute for Advanced Study, Pavia, Italy
書誌事項	Food and Chemical Toxicology 87 (2016) 138-147
試験物質	MWCNTs：乾燥状態で強凝集体形成。サイズ 20-200μm 範囲。高表面積。液相中では強凝集体が分離。純粋なタイプ I と、金属不純物を高濃度で含有するタイプ II。ただし、タイプ I も分析により金属不純物を検出。
試料調整法	MWCNTs を触媒表面上で気相から化学沈降により合成。金属不純物を含む MWCNTs を、濃塩酸の煮沸により精製。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	【試験生物】12 人の健常者。年齢 25-30 歳（平均 27±2.1 歳）。妊娠者、慢性疾患、急性疾患、常備薬を有する人は含まない。静脈の血液サンプルを早朝に収集。血液サンプルに MWCNTs を添加した負荷試験を実施。 A549 細胞（肺胞タイプ II 型表現型を有するヒト白人肺腺がん）：DMEM、L-グルタミン、ペニシリン、ストレプトマイシンで培養。 ケラチノサイト（HaCaT）ヒト細胞：キレックス FBS と、無カルシウム DMEM、L-グルタミン、で培養し、塩化カルシウムで補完。キレックス 100 樹脂による培養で FBS のカルシウムが枯渇。キレックスは最終的にフィルター除去。 【投与方法・期間・用量】 人血液への暴露：1mg/ml 用量レベルを健常者血液に暴露。 A549 細胞への暴露：亜融合性細胞で実施。 【各種分析】 ・免疫学的研究：CD3+CD95+、CD3+CD25+、CD3+CD126+細胞ﾚﾍﾞﾙを評価。試薬（BD Biosciences より購入）。MMP（ﾐﾄｺﾝﾄﾞﾘｱ膜電位）を測定。低 MMP を有する細胞割合を計数。 ・生物化学的解析：LPO-LHP の 1 次生成レベル、LPO-DC（ジエン結合体）、KD（ブタジエン）、CT（共役トリエン）、CCIDB（二重結合の単離を含む化合物）の中間生成物レベル、を評価。LPO 生成物は波長吸収極大が異なるため、ヘプタンとイソプロパノールでそれぞれ抽出。ヘプタンとイソプロパノールの体積混合割合を、LHP 用には 2:1、それ以外には 1:1 と 3:7 とした。血漿中の LHP レベルの評価は、Galaktionova の手法にしたがい評価。血液中の LPO 中間生成物の評価は Volvhegorsky の手法にしたがって評価。 ・遺伝子発現解析：一連の実験段階には、RNA 抽出・調整、マイクロアレイ・ハイブリダイゼーション、化学発光シグナル検出、画像取得とマイクロアレイの画像解析、マイクロアレイデータ解析、を含む。マイクロアレイデータ解析では、示差的に発現する遺伝子を特定。マイクロアレイ解析結果は PCR を用いて検証。 ・統計解析と経路解析：全解析は 3 連で実施。データは中央値と 25-75%四分位範囲で表現。Statitica 10.0 ソフトウェアを使用。グループ間の違いは Mann-Whitney テストにより解析。重要プローブセットを、標準経路、分子機能、生物学的機能との関連性を PANTHER を用いて評価。統計的に有意な過大／過小評価注釈を二項統計（発現遺伝子数とその期待値）により決定。
試験結果	**生物化学的応答と免疫応答** ・MWCNTs（タイプ 1）は炎症前影響を誘発する脂質過酸化パラメータに影響を与えた。酸化的障害は、LPO（脂質過酸化）の 1 次生成物含有量の増加と、血

	液細胞膜の中性脂肪及びリン脂質中の中間生成物（CCIDB、DC、KD+CT）の再分配として確認。 ・MWCNTs（ﾀｲﾌﾟ 2）による血液負荷試験で、Fe-Co 触媒由来の金属ｲｵﾝの存在により、LHP レベルが有意に増加。 ・中性脂肪の FA（脂肪酸）と血漿の無 FA は、膜リン脂質の FA よりも不純物含有 MWCNTs により過酸化の影響を受けやすいことを、KD と CT レベルの増加と、CCIDB と DC レベルの安定により確認。無極性 MWCNTs 表面上の低極性中性脂質の再酸化反応による可能性あり。 ・負荷試験後の血液リン脂質の中間過酸化生成物レベルは、不純物含有 MWCNTs では変化せず。これは以下の 2 つの説明ができる;①無血漿リン脂質が MWCNTs 上の ROS 酸化基板になれず、分子の極性が高いために MWCNTs の表面上に吸着されない、②膜リン脂質のみが部分的に細胞膜を容易に貫通できる MWCNTs を利用できる。 ・鉄は ROS 生成能を顕著に低下する。純粋な MWCNTs への暴露後の LHP レベルは、不純物含有 MWCNTs に比べて増加が少ない。純粋な MWCNTs によるリン脂質過酸化の中間生成物含有量の低下は、負荷試験をしなかったときの中間生成物レベルに比べて中間生成物含有量を増加可能なリン脂質脂肪酸の過酸化を超えた MWCNT 吸着が卓越していることと関係している可能性あり。暴露後すぐに、炎症性サイトカイン、IL-1、TNF-α、IL-6 が用量とともに増加。ナノ粒子暴露によりマロンジアルデヒド濃度が顕著に増加したが、細胞内で低下したグルタチオンと抗酸化酵素活性は低下。 ・不純物濃度が最小の MWCNTs への暴露で、ミトコンドリア膜電位の低下とともに、免疫細胞の割合が増加。電位の低下とともに成熟 T リンパ球の数は増加。同時に、CD3+細胞上の前アポトーシス CD95 マーカーの上方調節を観察。純粋 MWCNTs は T 細胞応答の初期段階を活性化し、IL-6 を発現する機能的に活発な T リンパ球の割合が増加。 ・不純物含有 MWCNTs の損傷影響は、ミトコンドリア膜電位の低下とともに、リンパ球と CD3+細胞の割合の有意な増加により確認。CD3+CD95+、CD3+CD25+細胞レベルの増加は、純粋な MWCNTs への暴露時と有意な相違なし。 **In vivo での遺伝子発現** ・A549 と HaCaT の全ゲノムトランスクリプトミクスは、純粋と不純物含有 MWCNTs への暴露後に遺伝子発現が有意に異なることを示した。同様の結果は、酸化ストレスに関係する分子経路に関与する 25 の遺伝子のデータ解析でも確認できた。不純物濃度が異なる MWCNTs に暴露すると、細胞の挙動が異なることが示された。48 時間暴露後の発現レベルを調節する遺伝子数は、純粋、不純物含有 MWCNTs の両者ともに減少した。2 種の in vitro モデルに関する炎症経路に関与する遺伝子の発現の比較分析の実施により、48 時間暴露後の A549 細胞の遺伝子発現の調節はケラチノサイトの遺伝子発現よりもずっと高いことを示した。 **経路解析** ・不純物が、ケモカインとサイトカインシグナル伝達によって媒介される炎症などの重要な毒性経路の誘発に明らかに影響することを示した。特に、MWCNT はケモカイン（C-C motif）（Ccl2）と配位子 19（Ccl19）の過剰発現を誘発。不純物含有 WMCNTs はケモカイン（C-X-C motif）配位子 10（Cxcl10）と配位子 11（Cxcl11）の過剰発現を誘発し、インターフェロン γ により免疫調節に関与するタンパク質を誘発。経路解析から、NF k B 経路に関連する遺伝子の調節が示された。
結論	本研究では、MWCNTs の 2 タイプによる影響の主要メカニズムは、酸化ストレスの誘発であることを示した。頻度は、直接、MWCNTs の金属不純物量と関係する。最終的な炎症反応の進展と過酸化の強化は、免疫応答性細胞でのミトコンドリアに対する損傷を引き起こす。不純物含有 MWCNTs は、純粋な CNTs よりも高い酸化反応を生成し、顕著なミトコンドリア機能不全を示した。トランスクリプトーム解析からは、NFkB 経路の活性化は、影響のカスケードを開始する重要な生物学的プロセスであることを示した。これは、IL-8 経路の摂動を引き起こす可能性がある。全体として、MWCNTs 暴露に関連した免疫反応は、全身の相乗効果と局所的炎症の結果と考えられる。

（ウ） C60

No	C60-1
著者 所属機関	V. A. Shipelin, T. A. Smirnova, I. V. Gmoshinskii, and V. A. Tutelyan State Research Institute of Nutrition, Moscow, Russia.
論文題目 （和訳）	Analysis of toxicity biomarkers of fullerene C60 nanoparticles by confocal fluorescent microscopy. （共焦点蛍光顕微鏡によるフラーレン C60 ナノ粒子の毒性バイオマーカーの解析）
書誌事項	Bull Exp Biol Med. 2015 Feb;158(4):443-9. doi: 10.1007/s10517-015-2781-4. Epub 2015 Feb 26.
試験物質	C60 (Fullerene-Center) 純度 99.8%以上
試料調整法	投与前に慎重に乳鉢で粉砕し、「キャリア」(2% 食品澱粉と脱イオン水で 0.5% Tween 80)を追加。混合、懸濁液は超音波処理。 フラーレン粒子アグリゲートは 31nm(質量で 75%粒子)と 660nm(25%）で最大の 2 峰性のサイズ分布。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	雄 Wistar ラット（n=24)、重量 100±5g、4 グループに分ける。 グループ 1 (コントロール)：グループ 2～4：0.1, 1.0, 10 mg/kg 体重　でフラーレンを懸濁液で経口投与（液では 1 cm3/100 g 体重）。試験期間 92 日間で、殺処分。 組織を蛍光色素を用い、共焦点蛍光顕微鏡（CFM）で観察。
試験結果	使用した蛍光表示：DAPI、1）CF568 蛍光色素と共役されたファロイジン、2）DyLight 488 蛍光色素と共役されたクローディン 1 に対する抗体と 二次抗体、3）Alexa Fluor 488 蛍光色素と共役された CD106 (VCAM-1)に対する抗体，4) Alexa Fluor 647 でラベルされた CD31 に対する抗体。 ・回腸での CD31＋細胞のポピュレーション： グループ 1（コントロール）：316±126、グループ 2（0.1 mg/kg）：275±66、グループ 3（1.0mg/kg）：220±117、グループ 4（10 mg/kg）156±35。 ・肝実質での CD31＋細胞のポピュレーション： グループ 1：39、グループ 2：51、グループ 3：146、グループ 4：130。 可視の炎症や壊死の領域がなくてもクッパーマクロファージの細胞質の顆粒の蓄積が生じており、CD106 細胞が増加している。
結論	CFM により、肝組織におけるフラーレン C60 の有害な作用の敏感なバイオインジケーターである毒性反応の初期段階の発症を証拠づけることができる。

No	C60-2
著者 所属機関	Li-Yun Yang[a], Jia-Ling Gao[b], Tian Gao[a], Ping Dong[a], Long Ma[a], Feng-Lei Jiang[a], Yi Liu[a] a State Key Laboratory of Virology & Key Laboratory of Analytical Chemistry for Biology and Medicine (MOE), College of Chemistry and Molecular Sciences,Wuhan University, Wuhan 430072, PR China b Department of Chemistry, College of Chemistry and Environmental Engineering, Yangtze University, Jingzhou 434023, PR China
論文題目 （和訳）	Toxicity of polyhydroxylated fullerene to mitochondria. （ミトコンドリアに対するポリヒドロキシル化フラーレンの毒性）
書誌事項	J Hazard Mater. 2015 Aug 28;301:119-126. doi: 10.1016/j.jhazmat.2015.08.046. [Epub ahead of print]
試験物質	C60 （XF Nano, Inc. (中国)より購入）。報告されている方法 [32]に従ってフルオレノールを合成。
試料調整法	得られたフラレノールはストック溶液として 20 mg mL−1 で蒸留水に溶解した。アグロメレートとして安定、平均径 26.96nm。16.36nm と 286.4 にピークがあり、体積で小さいほうが 99%。様々な培地で表面電位は負。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	試験生物：雌 wistar ラット (約 250 g) （湖北省実験動物研究センター(武漢、中国) から入手）。ラット肝ミトコンドリアは、従来 [33] のように標準的な差動遠心分離によって分離。 投与方法・期間・試験用量：in vitro(細胞暴露)。15 分（TEM 観察）。0～200μg/ML
試験結果	・ミトコンドリアの膨潤の測定（室温、600 秒以上、540 nm UV 吸収の変化）・H +と K +のミトコンドリア内膜の透過（膨張法[35]）：図 3 (b)、明らかな腫れは、フラレノールがミトコンドリア内膜のコンダクタンス K + 強化につながったことを示した。 ・ミトコンドリア膜電位の測定（Rh123 の蛍光強度の変化を flow cytometer (BD Accuri C6)で検出）：フラレノールは Rh123 蛍光強度の明らかな減少を引き起こし、ミトコンドリア膜電位の急落を示した。 ・MTP（ミトコンドリア膜透過性遷移）に対するフラレノールの影響：EDTA は Ca2+をキレートすることができるので EDTA によるフラレノール誘起膨潤抑制は、Ca2+がフラレノール誘起 MPTP を開始するために必要であることを確認した。 ・ミトコンドリア膜の流動性の測定（ミトコンドリアにラベルされた HP と DPH の蛍光異方性変化）： フラレノールは極性蛋白質領域の膜流動性の顕著な変化を誘発することが示唆された。 ・ミトコンドリア呼吸測定（Clark-type の酸素電極(Hansatech)）：RCR はフラレノール処理で有意な減少を示した(図 7)。 ・ミトコンドリアの微細構造（ミトコンドリアを 15 分間フラレノールの異なる濃度で処理、TEM 観察）：高濃度フラレノールは重症マトリックス腫れを引き起こした外膜損傷を伴った(図 8(C))。
結論	分離されたミトコンドリアへのフラレノールの暴露は、H +と K +のミトコンドリア内膜の透過性の亢進、ミトコンドリア腫れ、膜電位の崩壊、膜流動性の減少およびミトコンドリアの微細構造の変化を引き起こした。特に、フラレノールは、極性タンパク質域でミトコンドリアの内膜に大きな影響を与え、その毒性影響のための重要なステップとなるかもしれない。すべての結果は、フラレノールが呼吸鎖に影響を与えるだけでなく、内膜に損傷を与えることを示す。本研究は、ミトコンドリアに対するフラーレンナノ材料の毒性のメカニズムの理解のための固い証拠を提供することが期待される。

No	C60-3
著者 所属機関	Sabrina Pacor,[1] Alberto Grillo,[1] Luka YorZeviT,[2] Sonia Zorzet,[1] Marianna Lucafò,[1] Tatiana Da Ros,[2] Maurizio Prato,[2] and Gianni Sava1,[3] 1 Department of Life Sciences, University of Trieste, Via L. Giorgieri 5, 34127 Trieste, Italy 2 Department of Chemical and Pharmaceutical Sciences, University of Trieste, Via L. Giorgieri 5, 34127 Trieste, Italy 3 Callerio Foundation, Institutes of Biological Research, Via A. Fleming 22-31, 34127 Trieste, Italy
論文題目 （和訳）	Effects of Two Fullerene Derivatives on Monocytes and Macrophages. （単球やマクロファージに対する 2 つのフラーレン誘導体の影響）
書誌事項	Biomed Res Int. 2015;2015:915130. doi: 10.1155/2015/915130. Epub 2015 May 19.
試験物質	C60 誘導体。1：1–:FITC、2：2-FITC、等（8 つ）
試料調整法	PBS
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	ヒト単球 U937 (cell line ATCC CRL 1593, Rockville, MD)、Burkitt's リンパ腫 BJAB 細胞(Dr. Macor, Department of Life Sciences, University of Trieste より供給)。U937 単球からマクロファージ(U937-PMA)への分化誘導。 投与方法：in vitro。期間・試験用量：下記
試験結果	・細胞毒性（MTT アッセイ。完全培地中の 0.5～25μM のフラーレン 1 及びフラーレン 2 で、24～72 時間処理）：休止細胞、マクロファージはフラーレン 1 及び 2 に低感受性。U937-PMA を含め安定化細胞は測定可能な細胞毒性示す。フラーレン 2 の方が U937 と BJAB 細胞で若干強い。25μM フラーレン 2、72 時間暴露でより大きな毒性。10μM フラーレン 1 及び 2 に暴露した U937 細胞の細胞周期解析は細胞周期進行減速を示し、フラーレン 2 がより大きい。 ・フローサイトメトリーアッセイ（Cytomics FC500 上で実施）、・アポトーシス/壊死アッセイ（U937-PMA 又は単球/MDM-LPS 細胞を試験化合物と培養（37℃、5%CO2 中）後、洗浄、プローブ（（ｉ）DiOC6（蛍光プローブ）/ヨウ化プロピジウム（PI）、（ⅱ）JC-1 ヨウ化シアニン（分子プローブ）、（ⅲ）YOPRO-1（分子プローブ））で染色）、・細胞周期アッセイ（細胞はエタノールで固定、洗浄。10 μg PI, 0.25ng FITC, 4μg Rnase で染色）、0.5～10μM フラーレン、24 時間暴露で、フラーレン 1 はコントロール比較で顕著な変化無いが、5μM フラーレン 2 は処理細胞のおよそ 50%でミトコンドリア脱分極を起こした（10μM では 100%）。25μM フラーレン 1 まではアポトーシス及び壊死細胞は検出が限られたが、25μM フラーレン 2 は細胞毒性が確認され 70%以上の細胞が不可逆的損傷を伴った。10μM フラーレン 2 まででは、細胞死に至らず、アポトーシス経路不完全。フラーレン 2 での処理は、細胞を ATP のより敏感にさせ、アポトーシスに結び付く。 ・共焦点顕微鏡（単球/MDM-LPS は 10 μM 1-FITC 又は 2-FITC と一緒に 24 時間培地で培養。洗浄後、フラーレンの細胞内配置をミトコンドリアマーカー MITO-ID® Red ミトコンドリアで染色、顕微鏡観察）：フラーレン 1 は細胞質中でアグリゲートの形、フラーレン 2 は細胞質内にびまん。ミトコンドリア内の直接内在化は無し。リソソーム（酸性環境、FITC 分解を起こす）によって隔離されない。 ・細胞—摂取アッセイ、・フローサイトメトリー評価（単球/MDM-LPS は 5–10 μM 1-FITC 又は 2-FITC と一緒に 24 時間培地で培養。洗浄後フローサイトメトリーで分析）：単球よりマクロファージに選択的、濃度依存的に結合。1-FITC での速度論も同様。1-FITC は暴露してすぐに MDM-LPS と結合（＞90%）。相互作用は弱い。 ・（10 μM 試験フラーレンで処理、洗浄後、CMH2DCF-DA プローブで染色）：PMA による MDM-LPS 細胞刺激は OS 産生を抑える傾向があり、特に 2-FITC で前処理した場合約 30-40% の統計的有意な抑制がある。溶解性の高い 2-FITC の方がスカベンジャー能力が大きい。1-FITC はアグリゲートするため、表面積比が小さくなる。
結論	1-FITC は、それを単球やマクロファージと親和させる生物学的特性を示し、免疫応答を調節することができる物質を搬送する潜在的な使用が、または既に提案されているように抗がん剤を搬送する輸送手段として、示唆される。

No	C60-4
著者 所属機関	Bo Zhang[a], Weilin Bian[a], Amrita Pal[b], Yiliang He[a] a School of Environmental Science & Engineering, Shanghai Jiaotong University, 800 Dongchuan Road,Shanghai 200240, China b Department of Civil and Environmental Engineering, National University of Singapore, 1 Engineering Drive 2,E1A 07-03, Singapore 117576, Singapore
論文題目 （和訳）	Macrophage apoptosis induced by aqueous C60 aggregates changing the mitochondrial membrane potential. （水性 C60 アグリゲートがミトコンドリアを変化させることによって誘導されるマクロファージアポトーシス）
書誌事項	Environ Toxicol Pharmacol. 2015 Jan;39(1):237-46. doi: 10.1016/j.etap.2014.11.013. Epub 2014 Dec 2.
試験物質	C60 (99.9%、MER 株式会社)
試料調整法	C60 は Andrievsky らの方法を微修正することで、水中に懸濁させた(SON/nC60) (Andrievsky ら,1995)。nC60 は、100nm オーダーの球状アグリゲートとして安定。多分散インデックスは 0.34。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	試験生物：マウス腹腔マクロファージ、RAW 264.7 細胞 投与方法・ 期間・試験用量：in vitro（細胞暴露）。12、24 時間。0、0.21、0.83、1.65、3.3、6.6、9.9 ｍｇ/L
試験結果	・細胞生存率（細胞増殖アッセイキット）：nC60 アグリゲートへの暴露はコントロールの細胞と比較して細胞生存率の用量依存と時間依存の減少の結果を示した。 ・細胞形態検出（TEM 画像）：nC60 ナノ粒子は細胞の表面に蓄積することができ、RAW264.7 細胞は nC60 を細胞中に貪食することができることを示唆した。 ・乳酸脱水素酵素の漏出（Cayman の LDH 細胞毒性アッセイキット）：高濃度の nC60 で培養した細胞に対する LDH は増加しない（ナノ粒子上に吸着）。 ・アポトーシスと壊死の検出（アネクシン V-FITC と PI を用いたダブル染色）」：濃度依存でアポトーシス増加。壊死の増加は無。 ・細胞内活性酸素種（ROS）生産（Hussain らの方法(2006)）：nC60 ナノ粒子への暴露は細胞内活性酸素種（ROS）生産を増加させた。 ・脂質過酸化（Cayman の脂質過酸化 MDA 測定キット）：nC60 ナノ粒子の濃度増加に伴う MDA 量の変化無。 ・ミトコンドリア膜電位（MMP)の検出（Cayman’の JC-1 m MMP アッセイキット）：nC60 ナノ粒子高濃度で、特に MMP のロス顕著。アポトーシスを引き起こしているらしい。
結論	本研究は、RAW264.7 マクロファージの nC60 アグリゲートの細胞毒性を評価する。1.65 mg/L よりも低い濃度で nC60 アグリゲートは有毒影響を持たない一方、nC60 アグリゲートの濃度の増加に伴い、nC60 は細胞毒性を示すことがあり、健康と安全を考慮するため nC60 アグリゲートの蓄積を抑制されるべきである。nC60 アグリゲートが MMP の枯渇および細胞内活性酸素の増加を通して細胞毒性を誘発し、ミトコンドリア経路の活性化によるアポトーシスを誘発することがわかった。この研究は、nC60 アグリゲートの環境と健康評価のために不可欠な情報を提供する。しかし、ミトコンドリア経路に対する nC60 の影響のより良い理解のために、いくつか重要なシグナル伝達経路とカスパーゼは、さらに調査される必要がある。

（エ） グラフェン

No	２　グラフェン－１
著者 所属機関	Jin Kwon Kim1, Jae Hoon Shin2, Jong Seong Lee2, Joo Hwan Hwang2, Ji Hyun Lee1, Jin Ee Baek2, Tae Gyu Kim1, Boo Wook Kim2, Jin Sik Kim3, Gun Ho Lee4, Kangho Ahn4, Sung Gu Han5, Dhimiter Bello6, Il Je Yu1 1 Institute of Nanoproduct Safety Research, Hoseo University, Asan, Korea 2 Occupational Lung Diseases Institute, KCOMWEL, Ansan, Korea 3 KCL, Incheon, Korea 4 Department of Mechanical Engineering, Hanyang University, Ansan, Korea 5 Toxicology Laboratory, College of Animal Bioscience and Technology, Konkuk University, Seoul, 143-701, Korea 6 University of Massachusetts, Department of Work Environment, Lowell, MA, USA
論文題目 （和訳）	28-day Inhalation Toxicity of Graphene Nanoplatelets in Sprague-Dawley Rats （Sprague-dawley ラットにおけるグラフェンナノ平板の 28 日間吸入毒性）
書誌事項	Nanotoxicology. 2015 Dec 22: 1-34. [Epub ahead of print]
試験物質	グラフェン材料（購入先：Cabot Corporation (Boston, Massachusetts, USA) (GPX-205, 10538-96A； 平均横方向寸法<2 μm； 表面積 750 m2/g、密度 0.2 g/mL)。グラフェンアグリゲートの平均厚み 20～30 層（x 線回折分析）。
試料調整法	グラフェンナノ粉末は、アトマイザー(AG 01、HCT, 利川, 韓国)によって生成。キャリアガスは清浄空気。エアロゾルに使用する水懸濁液中のグラフェン濃度：０（コントロール）、1.5 mg/mL（低濃度）、5 mg/mL（中）、16 mg/mL （高）。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	試験生物： 6 週齢の男性特定病原体無料 SD ラット（購入先：OrientBio (城南、韓国)）。各条件 5 匹使用。 投与方法：鼻吸入チャンバー（エアロゾル、鼻 port でのエアロゾル速度（ｆｌｏｗ rate）1L/分。） 期間・試験用量：低、中、高濃度室内で生成されたグラフェンナノ粉末の濃度は 0.12 mg/m 3、0.47 mg/m 3、1.88 mg/m 3。6 時間/日、28 日間（5 日間/週）暴露。 ポスト暴露、1、28、90 日に血液採取後殺処分。副腎、膀胱、精巣、精巣上体、心臓、胸腺、甲状腺、気管、食道、前立腺、肺、鼻腔、腎臓、脾臓、肝臓、膵臓、脳を除去(光学顕微鏡検査用)。左肺除去（病理組織学的評価用）。
試験結果	・エアロゾルキャラクタリゼーション：低・中・高濃度エアロゾルの吸入/総エアロゾル（EC）率；1.01、0.68、0.86。 ・動物観察、食料消費、身体・器官重量への影響（コントロール比較で）： 顕著な全体影響観察されない（暴露中、ポスト暴露）。ただし、肺組織に濃度依存のグラフェン沈着あり（暴露後、ポスト暴露 28 日）。有意な体重損失あり（中濃度・暴露開始 2 週目、高濃度・1、5、6、11、13 週目に）。有意な摂餌量減（低濃度・暴露開始 2、6、12、16、17 週目、高濃度・1、7、9、12、13、14、16、17 週目で）。ポスト暴露 28 日で、有意な臓器重量損失（肝臓（中濃度）、左肺（低・中濃度））。ポスト暴露 90 日で、有意な脳重量増（高濃度）、有意な胸腺重量増（低濃度）。 ・血液生化学・血液学・凝固（コントロール比較で）： 血糖値と総ビリルビン (TBIL)有意増（中濃度）、血液中カリウム有意減（中濃度・ポスト暴露１日）。ポスト暴露 28 日で、ＬＤＨ有意減（中濃度）、TBIL 有意増とカリウム有意減（高濃度）。ポスト暴露 90 日で、血液尿窒素(BUN)有意減（中濃度）、ナトリウム(Na)有意増（低濃度）、塩素(Cl)有意増（高濃度）、アルブミンと糖の割合有意増（中濃度）。血液生化学的パラメーターは濃度関連変化なし。血液学的値変化なし（ポスト暴露１、90 日）、トロンビンと活性化部分トロンボプラスチン時間は有意な影響なし（ポスト暴露１、90 日）。 ・BAL 液への影響（コントロール比較で）： 総細胞数・大食細胞数有意減（すべて・（ポスト暴露１、28 日）、リンパ球数有意減（ポスト暴露１日）。ポスト暴露 28 日で、微小アルブミン(mALB)有意減（中濃度）、乳酸脱水素酵素(LDH)有意増（低濃度）。炎症性マーカー濃度関連影響なし。酸化ストレスマーカー（H2O2、GHS、MDA）上昇なし（ポスト暴露１、28、90 日）。特に、MDA レベル低い（低・中濃度・ポスト暴露 90 日）。 ・肺組織溶解液と BAL 液中のサイトカインへの影響： 肺組織溶解液中のサイトカイン顕著な変化なし（ポスト暴露１、28、90 日）。 BAL 液中では、インターロイキン-18（IL-18）有意増（中濃度・ポスト暴露１日、

	低濃度・ポスト暴露 28 日）、血管内皮成長因子（VEGF）有意減（中濃度・ポスト暴露 90 日）。 ・コメットアッセイ（右肺由来細胞（ポスト暴露 1 、28 日）： オリーブテールモーメント(OTM)値有意な変化がなく、グラフェン暴露からの遺伝毒性影響がないことを示す。 ・病理組織学（肺（ポスト暴露 1 、28、90 日）： 炎症関連の病理組織学的証拠なし。肺胞マクロファージに貪食された黒い粒子観察。肺関連リンパ節へのグラフェンの移行あり。グラフェンの濃度依存沈着はほとんどがマクロファージ、いくらかが肺上皮細胞中で示された。肺胞マクロファージに摂取されたグラフェンはポスト暴露 90 日でも残留した。
結論	この 28 日グラフェン吸入研究の全体的な結果は、BAL 液や肺組織中の炎症性細胞、炎症性マーカーまたはサイトカインの大幅な増加無し、遺伝毒性の欠如、暴露後 1 日、28 日、90 日後の病理組織学的評価からの全体的にネガティブな結果に基づく 1.88 mg/m 3 以上の NOAEL を提案する。1.88 mg/m 3 は研究でテストされた最高用量だったので、グラフェン材料の NOAEL はこの値よりも高いかもしれない。

No	2Graphene-2
論文題目 （和訳）	Long Term Influence of Carbon Nanoparticles on Health and Liver Status in Rats （カーボンナノ粒子のラットにおける健康と肝臓の状態への長期影響）
著者 所属機関	Strojny B, Kurantowicz N, Sawosz E, Grodzik M, Jaworski S, Kutwin M, Wierzbicki M, Hotowy A, Lipińska L, Chwalibog A Division of Nanobiotechnology, Warsaw University of Life Sciences, Poland
書誌事項	PLoS One. 2015 Dec 14; 10(12)
試験物質	ナノダイアモンド（ND）、ナノグラファイト（GR）；Skyspring Nanomaterials Inc. (Houston, TX, USA)より、爆発法で製造 酸化グラフェン（GO）；Institute of Electronic Materials Technology (Warsaw, Poland)より、modified Hummers method により製造 純度；ＤＮ>95%, GR>93%、比表面積；DN=282m²/g, GR=540-650m²/g、ゼータポテンシャル；DN=-15.8mV, GR=12.5mV, GO=-8.80mV TEM からの粒径(nm)；ＤＮ=3-4、GR=3-4、GO=8-25
試料調整法	滅菌生理食塩水中 500mg/L; 550W/m², 超音波浴中処理 1 時間
試験生物 投与方法・期間 試験用量	試験生物；雌ウィスターラット（Crl:WI(Han)）；6 週齢、124 ± 19 g 投与方法・期間；試料 1 mL(対照（プラセボ）は、生理食塩水（0.9%NaCl）, 1 mL を投与)を 3 日間隔で 7 回（4 週間）腹腔投与、各グループから、7 匹は投与後 3 日後、3 匹は 8 週間後屠殺、この間健康状態を観察、解剖し、腹腔内を観察するとともに、肝臓を取り出し、各種試験を実施。 試験用量；4mg/kgbw
試験結果	ラットの健康状態；実験の全期間を通じて、全てのラットの挙動は正常であった。毒性による乱れの徴候もなかった。体重、肝臓重量にも有意な差はなかった。 解剖所見；一次器官に病理学的特徴は無く、マクロに見て、炎症や組織の破裂の兆候はなかった。組織中に球または楕円体状のナノ粒子の凝集体が見られ、全てのグループで差はなかった。 血液のモルフォロジーと血清の生化学的指標；全ての指標において、この動物の参照値に比べて有意な異常値はなかった。 肝臓の総グルタチオン（Total Glutathione）；GO の 12 週間グループが対照に比べて有意に増加した。 脂質の過酸化；肝臓中のマロンジアルデヒド（MDA）の濃度は、全てのグループで対照より有意に低かった。DN グループでは 12 週後 4 週に比べて増加した。 C 反応性蛋白（C-reactive protein; CRP））；肝臓中のＣＲＰは、暴露時間と各グループとの間に有意な差はなかった。DN グループでは、対照に比べて有意に高かった。 サイトカイン；肝臓組織のメンブレンサイトカイン抗体アレイにより、炎症、過敏性、アポトーシス、組織再生に関係する 34 のサイトカインの発現を調べたがどれも検知可能なレベルでなかった。
結論	ナノダイアモンド、酸化グラフェン、グラファイトを腹腔投与し、12 週後の状態を調査したがこれらは生体親和性が高く、ラットの健康に影響がなかった。注入したナノ粒子は注入箇所の近傍で凝集体を形成していた。4 週間の注入後、8 週間経過しても凝集体は存在し周囲の組織に影響を与えなかった。ナノ粒子は肝臓に到達したかもしれないが、毒性は誘起されなかった。これらの材料を、有害な副作用なく標的組織中に蓄積し緩やかな放出を行う、局所的な治療のための薬剤キャリアとして使用できる可能性があるとして更なる研究の必要性を確認した。

No	グラフェン－４
著者 所属機関	TRANG H. D. NGUYEN, MENGSHI LIN,* AND AZLIN MUSTAPHA* Food Science Program, Division of Food Systems & Bioengineering, University of Missouri, Columbia, Missouri 65211, USA
論文題目 （和訳）	Toxicity of Graphene Oxide on Intestinal Bacteria and Caco-2 Cells （腸内細菌と caco-2 細胞に対する酸化グラフェンの毒性）
書誌事項	Journal of Food Protection, Vol. 78, No. 5, 2015, Pages 996–1002
試験物質	単層 GO 水分散液 ：平均フレーク粒子サイズ 500 nm（購入先：ACS Material (Medford, MA)）。当初濃度 10mg/ml。
試料調整法	GO（100、200、300、400 mg/ml、フリー）を含む上記培地は超音波処理で、GO の培地への溶解性（分散）を増加。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	（１）E. coli、L. acidophilus、B. animalis の成長への GO の影響 細菌株 : 大腸菌 K12 株（E. coli K-12）、好酸性乳酸桿菌（L. acidophilus ADH）、ビフィズス菌（B. animalis Bif-6）（ミズーリ大学 Food Microbiology Laboratory より入手）（E. coli K-12 は、TSBY ブロス中で成育。残り２つは、MRS ブロス中で成育） GO（100、200、300、400 mg/ml、フリー）を含む上記培地で培養（0、4、10、24 h）。 （２）哺乳類細胞研究 Caco-2 細胞（American Type Culture Collection [ATCC], Rockville, MD） ①予め培地と混合した（１：２比率）異なる濃度（10, 100, 200, 500, 1,500 mg/ml）の 150µl の GO 溶液と 24 時間培養後、細胞生存率測定（MTT 還元アッセイ、WST-8 増殖アッセイ）。 ②毒性に対する GO による栄養枯渇の影響を試験する目的で、 細胞フリー培地で GO サンプル（10, 100, 200, 500, 1,500 mg/ml)を 24 時間培養後、遠心分離し GO 除去。GO フリー上澄液を Caco-2 細胞に暴露、24 時間後細胞生存率測定。
試験結果	（０）GO 特性評価（紫外可視吸収、FTIR、DLS、TEM） GO の単層シート確認。表面電位は負。 （１）E. coli、L. acidophilus、B. animalis の成長への GO の影響 どの菌も、全 GO 濃度で成育曲線の有意差無し。 （２）哺乳類細胞研究 Caco-2 細胞に対して、MTT 還元アッセイと WST-8 増殖アッセイ両方ともで、GO の用量依存的影響は無かった。しかし、TEM 画像は細胞の微絨毛のいくらかの変化を示した。培地からの GO シート上への栄養分の吸収は細胞に影響を与えるほどではなかった。
結論	酸化グラフェン（GO）は生体親和性であり、様々な目的に使用される可能性があることを示した。しかし、細胞培地と細菌培養液中での GO の凝集傾向は、その健康リスクの評価を困難にする。さらなる調査は、細胞毒性を評価し、GO のユニークな特性（例えば、形状、表面特性、分散性）が細胞から全体生物までの階層レベルでのヒト健康にどのように影響するかのメカニズムを明らかにするために必要である。

No	グラフェン－５
著者 所属機関	Binquan Luan,*,† Tien Huynh,† Lin Zhao,‡ and Ruhong Zhou*,†,z,‡ †Computational Biological Center, IBM Thomas J. Watson Research, Yorktown Heights, New York 10598, United States, ‡Institute of Quantitative Biology and Medicine, SRMP and RAD-X, Collaborative Innovation Center of Radiation Medicine of Jiangsu Higher Education Institutions, Soochow University, Suzhou 215123, China, and zDepartment of Chemistry, Columbia University, New York, New York 10027, United States
論文題目 （和訳）	Potential Toxicity of Graphene to Cell Functions via Disrupting Protein -Protein Interactions （タンパク質破壊-蛋白質の相互作用を介した細胞機能へのグラフェンの潜在的毒性）
書誌事項	American Chemical Society, Vol. 9, No.1, 2015, Pages 663–669
試験物質	その側表面が 1100 Å2 である六角グラフェンシート
試料調整法	記載なし。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	試験生物（ここではタンパク質）：折られたタンパク質構造（タンパク質構造データバンク ID（PDB ID）：1QMC） シミュレーション方法： すべての 分子動力学（MD ）シミュレーションは、ソフトウェアパッケージ NAMD2.9 を使って、IBM BlueGene スーパーコンピューター上で行った。CHARMM 力場は、タンパク質に適用された。イオンの標準力場は塩化ナトリウムが使われ、TIP3P モードは水とグラフェンの力場に対して選ばれた。全 3 次元で周期境界条件を適用した。長距離クーロン相互作用は、64×64×64 グリッドにわたる Particle Mesh Ewald（PME）full electrostatics を使って計算され、一方、原子間の van der Waals 相互作用はスムース(10-12 Å) カットオフを使用して計算された。1 bar、300 K でのシミュレーション系の平衡(能勢フーバーランジュバンピストン圧力制御)後、NVT アンサンブル中で実走行が行われた。
試験結果	（１）水ボックス中の蛋白質ダイマーのシミュレーション系： 折られた蛋白質構造（蛋白質構造データバンク ID（PDB ID）：1QMC）は、SH3 ドメインの一つと類似している。ナトリウムと塩素イオンは、シミュレーション系を中和し、0.1 M での結果的な電解質の濃度をもたらすために添加された。全体のシミュレーション系は 77.4×77.4×77.4 Å と測定される。50 ns シミュレーションの間、結果はダイマーが安定である、ことを示唆している。 （２）0.1MNaCl 電解質とダイマー-グラフェン複合体のシミュレーション系： その側表面が 1100 Å2 である六角グラフェンシートは、ダイマーの疎水性界面近傍に置かれた。4 シミュレーションを実施（Sim-1～Sim-4）。 全体的に、すべてのシミュレーションは、ダイマー中へのグラフェンシートの速い挿入を示し、それは次の 2 つの理由に起因することができる。まず、グラフェンと水との好ましくない相互作用はダイマーとのグラフェンの接触を引き起こす。Sim-1 と Sim-2 で、グラフェンシートはダイマーの非界面部分（親水性残基を含む）と接触した。ダイマー界面への引き続く侵入は、疎水性残基との相互作用によって駆動される。一方 Sim-3 と Sim-4 で、グラフェンシートはダイマーの界面部分と相互作用し、すなわち直接挿入する。第二に、ダイマーの疎水性残基間の界面相互作用は、疎水性残基とグラフェン シートのエネルギー的により好ましい相互作用につながる。したがって、グラフェン端にある疎水性残基と接触する分離（または unzipping)過程は非常に速い（数ナノ秒)。
結論	分子動力学シミュレーションを用いて、蛋白質蛋白質界面（PPI）を妨げることができるグラフェンの可能な毒性を調べた。シミュレーション結果は、PPI へのグラフェンの挿入後、疎水性相互作用を介して PPI は不安定化されることができ、蛋白質の複合体は壊されることができる、ことを示す。グラフェンの平坦度と強い疎水性のために、グラフェンとタンパク質の間の van der Waals ポテンシャルエネルギーは、挿入後大幅に削減した。これは、グラフェンが細胞の内部に一度入ると、いくつかの PPI を破壊し、その結果発生する機能障害および/または細胞の死亡さえも引き起す可能性が高い、ことを示す。疎水性界面へのグラフェンの挿入に関するこの研究は、エネルギー的にグラフェンシートは親水性相互作用によって PPI をそれほど妨げないかもしれない、ことを示す。

（オ） TiO2

No	TiO_2-1
著者 所属機関	Oyabu T[1], Morimoto Y[1], Izumi H[1], Yoshiura Y[1], Tomonaga T[1], Lee BW[1], Okada T[1], Myojo T[1], Shimada M[2], Kubo M[2], Yamamoto K[3], Kawaguchi K[3], Sasaki T.[3] [1]University of Occupational and Environmental Health, [2]hiroshima university, [3]National Institute of Advanced Industrial Science and Technology. Japan
論文題目 （和訳）	Comparison between whole-body inhalation and nose-only inhalation on the deposition and health effects of nanoparticles. (全身吸入曝露法と鼻部吸入曝露法をナノ粒子の粒子沈着とその生体影響について比較)
書誌事項	Environ Health Prev Med. 2015 Oct 5. [Epub ahead of print]
試験物質	TiO_2 (MT-150AW, Tayca Co. Japan) 形状（メーカー情報）：紡錘形(一次粒子 12nm×55nm)、BET：121m²/g、ルチル型、純度 99.5%
試料調整法	TiO_2 粒子を蒸留水に分散、調整した分散液の DLS 測定二次粒子径（実測）：49.1nm
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	試験生物：Fisher344 ラット（雄、曝露開始時 11 週齢） 投与方法：全身吸入曝露、鼻部吸入曝露（スプレードライ法で粒子発生） 曝露時間：６時間、曝露後全匹安楽死 鼻部曝露装置：柴田科学製 SIS-R36B 試験用量（曝露濃度）：全身曝露 4.10±1.07mg/m³、鼻部曝露 4.01±1.11mg/m³、対照群：清浄空気 曝露粒子の幾何平均粒子径：全身曝露 230nm、鼻部曝露 180nm 調査項目：肺内沈着量(ICP 発光分析)、肺の病理組織像(HE 染色)、肺重量測定、曝露前後の体重測定
試験結果	肺内沈着量：全身曝露群 42.6±3.5 マイクログラム、沈着率 13.5% 鼻部曝露群 46.0±7.7 マイクログラム、沈着率 14.9% 肺の病理組織：全身曝露群、鼻部曝露群で色素様成分が肺胞腔内に散在して認められたが、その他は対照群との差は認められなかった。曝露した肺組織の顕微鏡観察では、両群ともに粒子を貪食した Mφ が認められた。好中球の浸潤もなし。 体重および肺重量：３群で、曝露前後の体重に差は認められなかった。鼻部曝露後の肺重量に減少が認められたが、肺重量／体重では、有意差は見られなかった。
結論	同じ TiO_2 粒子を用いて、ほぼ同じ粒径と曝露濃度で全身曝露試験と鼻部曝露試験を行った結果、肺沈着量は同程度であった。病理組織評価でも両群とも肺胞腔や間質への好中球の浸潤や線維化は認められなかった。これらのことより、同じ条件で曝露を行えば、全身曝露試験と鼻部曝露試験では同じ結果が得られることが考えられた。

No	TiO2-2
論文題目 （和訳）	Developmental toxicity studies with 6 forms of titanium dioxide test materials (3 pigment-different grade & 3 nanoscale) demonstrate an absence of effects in orally-exposed rats. （６種の二酸化チタン試験材料（3 種の顔料グレードと３種のナノ材料）を使用した発達毒性研究は、経口暴露したラットに影響がないことを示す。）
著者 所属機関	Warheit DB[1], Boatman R[2], Brown SC[1]. 1：Chemours Company, USA 2：Boatman Toxicology Consulting LLC, USA.
書誌事項	Regul Toxicol Pharmacol. 2015 Oct、P.1-10
試験物質	・uf-1：個数水力学的D_{50}：43nm、89%アナターセ-11%ルチル型 TiO_2 ・uf-2：個数水力学的D_{50}：42nm、100%アナターセ型 TiO_2 ・uf-3：個数水力学的D_{50}：47nm、100%ルチル型 TiO_2 ・pg-1：個数水力学的D_{50}：153nm、100%アナターセ型 TiO_2 ・pg-2：個数水力学的D_{50}：195nm、100%ルチル型 TiO_2 ・pg-3：個数水力学的D_{50}：213nm、100%ルチル型 TiO_2
試料調整法	・減菌水にＴｉO_2粒子を分散
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	・OECD ガイドライン 414（胎児期発達毒性研究）に準拠。 ・（pg-1、uf-1、uf-3 の試験）SD(Sprague Dawley) ラット（1 グループ当り 22 匹）、9 週齢、投与 5ml/kg 体重、挿管投与、投与濃度 0、100、300、1000mg/kg 体重/日、懐妊後 6 日～20 日に投与 ・（uf-2、pg-2、pg-3 の試験）ウィスターラット（1 グループ当り 22-23 匹）11-12 週齢、懐妊後 5 日～19 日に投与、挿管投与、未経産および非懐妊ラットと雄ラットを 2：1 の比で混合し、交配日（懐妊 0 日目）に体重別に４つに分けた。投与濃度 0、100、300、1000mg/kg 体重/日で挿管投与した。
試験結果	１．（uf-1 の試験）SD ラットによる試験結果 ・投与濃度に関わらず、死亡したラットはいない。臨床観察でも、試験剤による際立った影響はなく、母体体重や体重変化にも、試験剤投与の影響は検出されなかった。 ・1000g/kg 体重/日の投与水準では、懐妊後 20-21 日間および 6-21 日間の体重増加は、比較グループに比べ、有意に大きかった。6-21 日間の増加量は、比較グループの 36.86ｇに対し、47.78ｇであった。 ・飼料消費に関し、どの投与水準でも、試験剤投与による悪影響は見られなかった。懐妊後 18-20 日の期間、100 および 1000mg/kg 体重/日の投与グループの平均飼料消費は、各々、26.6ｇと 26.5ｇであったが、比較グループは 23.9ｇであった。 ・検視観察に関し、どの投与水準でも、試験剤投与による悪影響は認められなかった。300mg/kg 体重/日のグル-プに 1 匹のみ大きな胎盤を観察したが、投与との関連はないと考えられた。 ・子宮成長、胎児生存に関しても、試験剤投与の悪影響はなかった。1000mg/kg 体重/日の投与で、胎児の性別比、胎児数は比較グループと統計的な差がでた。雄の胎児数は、比較グループの 5.7 対し、7.2 と多く、一方、雌の胎児数は、比較グループの 6.7 に対し、4.8 と少なかった。雄の比率は、比較グループの 46%に対し 60%と高くなった。ただし、受胎後直後に性別は決まるため、この雌雄の比率の差は、受胎後 6 日目に開始した試料の投与の影響とは考えられない。その他、胎児サイズに影響する要因にも差が認められず、この雌雄の比率の差は、偽の影響と考えられる。 ・以上、どの投与水準でも uf-1 投与に起因する悪影響、変化はなかった。 ２．（pg-1、uf-3 の試験）SD ラットによる試験結果 ・uf-1 と同じ試験項目に対する pg-1、uf-3 の投与試験の結果に関しても、どの投与水準でも、試料投与による悪影響は認められなかった。また、uf-1 投与では、胎児の雌雄比が比較グループと差があったが、pg-1、uf-3 の投与では比較グループと差がなかった。 ・pg-1 を 100mg/kg 体重/日で投与したグループは、比較グループよりも平均胎児重量が有意に増加した。ただし、その増加は、最小限で、投与量依存性がなく、重量減少のような典型的な悪影響を反映したものでなかったため、試験剤投与とは関連がない、偽の影響だと考えられる。 ３．（uf-2、pg-2、pg-3 の試験）ウィスターラットによる試験結果

	・懐妊したウィンスターラットに、uf-2、pg-2、pg-3 の TiO_2 を、100、300、1000mg/kg 体重/日の投与水準で、懐妊後 5 日～19 日の期間、経口投与したが、どの投与水準でも母体および胎児への毒性的悪影響または有意な効果は認められなかった。 ４．まとめ ・6 種の TiO_2 に対して、1000mg/kg 体重/日までの投与水準で、母体および胎児期発達に毒性が認められなかったため、無副作用量（NOAEL）は 1000mg/kg 体重/日であると考えられる。
結論	・6 種の形態とサイズが異なる商用 TiO2 について、OECD ガイドライン 414 に準拠して、胎児期発達毒性を調べた。 ・3 種の TiO_2（uf-1、uf-3、pg-1）に対しては、SD ラットの受胎後 6 日～20 日の期間、最大 1000mg/kg 体重/日まで経口投与したが、母体および胎児への毒性的悪影響が認められなかった。 ・他の 3 種の TiO_2（uf-2、pg-2、pg-3）に対しては、ウィンスターラットの受胎後 5 日～19 日の期間、最大 1000mg/kg 体重/日まで経口投与したが、母体および胎児への毒性的悪影響が認められなかった。 ・6 種の TiO_2 に対して、1000mg/kg 体重/日までの投与水準で、母体および胎児期発達に毒性が認められなかったため、無副作用量（NOAEL）は 1000mg/kg 体重/日であると考えられる。

No	TiO2-3
論文題目 （和訳）	Acute and subchronic oral toxicity studies in rats with nanoscale and pigment grade titanium dioxide particles. （ナノスケールおよび顔料グレードの二酸化チタン粒子のラットによる急性および亜急性経口毒性試験）
著者 所属機関	Warheit DB [1], Brown SC [1], Donner EM [2] 1：Chemours Company, USA、２：DuPont, USA
書誌事項	Food Chem Toxicol.　８４、 2015、P.208-P224.
試験物質	・試料１：ＴＥＭによる個数Ｄ50%粒径（145nm）、顔料用グレード、ルチル型、表面をアルミナ被覆 ・試料２：ＴＥＭによる個数Ｄ50%粒径（173nm）、顔料用グレード、ルチル型、被覆無 ・試料３：ＴＥＭによる個数Ｄ50%粒径（73nm）、超微細グレード、79%ルチル-21%アナターセ型、表面をアルミナ-シリカ被覆
試料調整法	・亜急性毒性試験（90 日、OECD TG 408）：試料１を 0.5%メチルセルロース水に分散、濃度は 10、30、100ｍｇ/1ｍｌ ・繰り返し服用試験（28 日、OECD TG 407） ・急性毒性試験（90 日、OECD TG 425）
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	・亜急性毒性試験（90 日、OECD TG 408）：8 週齢の雌雄のラット（CrI:CD(SD)）、1 グル-プ当り雌雄各 10 匹、経口投与量（0、100、300、1000mg/kg 体重/日）、投与試料（試料１、10ｍｌ/ｋｇ体重、0.5%メチルセルロース水に分散して投与） ・繰り返し服用試験（28 日、OECD TG 407）：挿管投与、若い雄のラット（4-5 匹/グループ）、投与量 24,000mg/kg 体重/日、投与試料（試料２、リサーチグレードと商用グレード）、29 日 ・急性毒性試験（90 日、OECD TG 425）：試料 3 を胃管投与、1 日食事を抜いた雌ラットには 175、550、1750mg/kg 体重、３日食事を抜いた雌ラットには 5000mg/kg 体重を投与。
試験結果	・亜急性毒性 90 日試験（OECD TG 408）結果：8 週齢の雌雄のラットのグループはルチル型 TiO_2（表面をアルミナ被覆、顔料グレード、D_{50} = 145 nm、粒子数基準 21%のナノ粒子を含む）を 90 日間経口投与した。試験した最高用量である 1000 mg/kg 体重/日が、雌雄のラットの無副作用量（NOAEL）であった。NOAEL は、90 日後の雌雄のラットの臨床化学分析値、臓器重量、重量比、さらに、90 日間の飼料消費量、飼料効率データに基づき、生活、臨床病理、解剖学的/顕微鏡病理パラメーターに対し、TiO_2 が有意な有害作用を示さなかったことにより決定された。 ・28 日間反復経口投与毒性試験（OECD TG 407）結果：若年成熟した雄のラットのグループに、試料２のルチル型の、TiO_2（顔料グレード、D_{50} = 173 nm）を 24,000mg/kg 体重/日の用量で毎日強制経口投与した。28 日間の雄ラットの体重増加、28 日後の雄ラットの臨床化学分析値、臓器重量、重量比に、TiO_2 を投与したことによる悪影響はみられなかった。NOAEL は 24,000 mg/kg 体重/日と決定された。 ・急性経口毒性試験（OECD TG 425）結果：試料 3（超微細グレード、79%ルチル-21%アナターセ型、表面をアルミナ-シリカ被覆、D_{50} = 73 nm）を胃管投与、1 日食事を抜いた雌ラットには 175、550、1750mg/kg 体重、３日食事を抜いた雌ラットには 5000 mg/kg 体重を投与した。試験期間中、ラットは灰色の顔色であったが、体重減少等の甚だしい障害や変化は見られなかった。以上の条件下では、ＬＤ50＞5000mg/kg 体重である。 ・以上、要約すると、これら三つの毒性試験の結果、今回試験した異なる TiO_2 に対しては、有害な毒性効果がないことを実証した。 ・さらに、顔料グレードの TiO_2 粒子の粒度分布測定に関連する問題についてコメントした。90 日試験で仕様した顔料グレードの TiO_2 の粒子サイズ分布は、ナノスケール粒子成分（重量基準の分布では 1%未満だが、個数基準分布では 21%に相当する）を含む。これらの粒度分布測定に基づき、ナノ材料の定義に従って、分類することが必要である。 ・90 日間の試験によると、TiO_2 試験材料のナノスケール成分の寄与による有意な経口毒性影響はないと推定される。物理化学的特性が極めて類似している食品グレードの TiO 2 粒子（例えば、E171）に対しい、本調査結果をリードアクロス目的のための利用が考慮されるべきであると結論するのも妥当であると考える。

結論	複数のＴｉＯ$_2$（顔料用グレード２種、超微細グレード１種）のリスク評価行うため、再現性と信頼性の高い毒性試験のための標準化された試験プロトコルとして、ＯＥＣＤガイドラインに基づく３つの方法を使用した。 ・亜急性毒性 90 日試験（OECD TG 408）結果：8 週齢の雌雄のラットのグループはルチル型 TiO_2（表面をアルミナ被覆、顔料グレード、D_{50} = 145 nm、粒子数基準 21%のナノ粒子を含む）を 90 日間経口投与し、雌雄のラットの無有害作用量（NOAEL）は 1000 mg/kg 体重/日であった。 ・28 日間反復経口投与毒性試験（OECD TG 407）結果：若年成熟した雄のラットのグループに、試料２のルチル型の、TiO_2（顔料グレード、D_{50} = 173 nm）を投与した場合の NOAEL は 24,000 mg/kg 体重/日であった。 ・急性経口毒性試験（OECD TG 425）結果：試料 3（超微細グレード、79%ルチル-21%アナターセ型、表面をアルミナ-シリカ被覆、D_{50} = 73 nm）を胃管投与し、評価した結果、ＬＤ50＞5000mg/kg 体重であった。 三つの毒性試験の結果、今回試験した異なる TiO_2 に対しては、有害な毒性効果がないことを実証した。

No	TiO2-4
論文題目 （和訳）	Vascular toxicity of ultra-small TiO2 nanoparticles and single walled carbon nanotubes in vitro and in vivo. （超微小の TiO 2 ナノ粒子と単層カーボンナノチューブの in vitro および in vivo による血管毒性）
著者 所属機関	Bayat N [1], Lopes VR [2], Schölermann J [3], Jensen LD [4], Cristobal S [1]. （1） Stockholm University, Sweden. （2） Medicine and Health Sciences Linköping University, Sweden. （3） University of Bergen, Norway. （4） Linköping University, Sweden.
書誌事項	Biomaterials. 63、2015、P.1-P.13
試験物質	・TiO_2-USNPs：1-3nm、（Plasmachem GmbH、ドイツ）、純度＞99%、ルチル、比表面積　～470m^2/g ・TiO_2-NPs：30nm、(#4025、Nanograde LIc、スイス)、純度＞99%、アナターセ/ルチル、比表面積　50.35m^2/g ・SWCNTs：(#519308、Sigma Aldrich Co.　、米国)、純度 50-70%、1.5×25μm
試料調整法	・血管内皮細胞による in vitro 試験：購入したヒト血管内皮細胞（HMEC-1；CDC、米国）は、MCD131（Life Technologies　、＃10372019）中で培養し、10%ウシ胎児血清（FBS；Life technologies）を補充、10ng/ml 上皮増殖因子(Becton-Dickinson, #354001)、ヒドロコルチゾン（1mｇ/ｌ）、l-グルタミン(10mM/ｌ）と抗生物質（ペニシリン 100ＩU/mｌ、ストレプトマイシン 100mｇ/ｌ）を添加。細胞は、加湿状態で 37℃に保持。ナノ材料は、培養液に分散、希釈し、細胞に加えた。ナノ材料の IC50 は、TiO2-USNPs に対し 1508mｇ/ｌ、TiO2-USNPs に対し 177mｇ/ｌ、SWCNTs に対し 107mｇ/ｌであった。 ・ゼブラフィッシュの胚を使用した in vivo 試験：10-1000mｇ/ｌの濃度で水にナノ材料を分散。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	・血管内皮細胞による in vitro 試験：ＨＭＥＣ-1 細胞を、0-40mg/l のナノ材料に 24ｈ暴露し、上澄みを LDH（乳酸脱水素酵素）キット（Cayman chemical、米国、#10008882）により処理し、細胞毒性を測定した。また、ＨＭＥＣ-1 細胞を、10mg/l のナノ材料に 24ｈ暴露し、コメットアセイ（Ｔｒｅｖｉｇｅｎ、MD）によって、遺伝子毒性を測定した。オリーブテールモーメント（ＯＴＭ）パラメーターは、ＤＮＡの損傷の定量化のために使用した。ナノ材料固有の酸化能は、100,50,10mｇ/ｌの濃度で、セルフリーＲＯＳ（活性酸素種）アセイ（ＤＣＦＨ-ＤＡの酸化を測定）により、燐光(530nm)を測定した。ナノ材料の生きた細胞中での活性酸素種（ＲＯＳ）の生成測定は、トータルＲＯＳ検出キット（Enzo life Science inc）を使用し、燐光(520nm)を測定した。内皮細胞の血管生成については、血管生成アセイを使用して調べた。ナノ材料の生きた細胞中での一酸化窒素（ＮＯ）の測定は、ＮＯ検出キット（Enzo life sciences Inc）を使用し、光（540-570nm）強度を測定した。 ・ゼブラフィッシュの胚を使用した in vivo 試験：受精後 0ｈで、ナノ材料分散水（10-1000mｇ/ｌ）中に投入または 1000mｇ/ｌの分散水 1-3nl を卵に注射。受精後 48ｈ後、ナノ材料分散水（10-1000mｇ/ｌ）中に投入または 1000mｇ/ｌ分散水 4nl を主静脈に注射。
試験結果	・ＨＭＥＣ-1 のナノ材料への 24ｈ暴露後のＬＤＨレベルは、40mｇ/ｌの SWCNTs に対して最も高く 20%の細胞毒性を示した。40mｇ/ｌの TiO_2-NPs、TiO_2-USNPs に対し、各々、13%、5%の細胞毒性を示した。コメットアセイによると、10mｇ/ｌのナノ材料暴露に対し、TiO_2-NPs は遺伝毒性を、TiO_2-USNPs は強い遺伝毒性を示したが、SWCNTs は遺伝毒性を示さなかった。 ・セルフリーＲＯＳアセイにより、清浄水または培養液中に 10-100mｇ/ｌ濃度で分散させた SWCNTs は高いＲＯＳ量を示した。TiO_2-NPs は培養液中に分散させた場合に、やや高いＲＯＳ量を示したが、TiO_2-USNPs は酸化能を示さなかった。細胞中でのＲＯＳの生成については、SWCNTs のみが 12.5-50mｇ/ｌで ROS 生成を示した。いずれの材料も超酸化物を生成しなかった。 ・内皮細胞の血管生成については、ナノ材料暴露に関係なく、効率的に進行した。40mｇ/ｌのナノ材料濃度では、血管中に SWCNTs、TiO_2-NPs の凝集が確認できたが、血管外には確認できなかった。TiO_2-USNPs は、血管長さを減少させ、血管生成の活性低下が確認されたが、濃度依存性は不明確だった。ＮＯ生成は検出されなかった。 ・ゼブラフィッシュの胚を受精後 0ｈまたは 48ｈ後ナノ材料分散水に投入暴露し

	た場合、1000ｍｇ/ｌの TiO_2-USNPs に暴露したケースを除き、影響がなく、正常に成長した。しかし、TiO_2-USNPs に投入暴露した場合は、1000ｍｇ/ｌ濃度で 100％致死（胚の成長なし；ｐＨ3 の酸性水でも同様）し、100ｍｇ/ｌ濃度で、孵化が遅れ、10ｍｇ/ｌ濃度で影響がなかった。一方、受精後 0ｈまたは 48ｈ後ナノ材料分散水を注射した場合、0ｈで TiO_2-USNPs を注射したゼブラフィッシュは脳、心膜、卵巣に浮腫を生成し、筋節奇形と動脈瘤を示し、致死率も高かったが、その他のゼブラフィッシュに影響はなかった。
結論	・血管内皮細胞による in vitro 試験、およびゼブラフィッシュの胚を使用した in vivo 試験により、TiO_2-USNPs(1-3nm)、 TiO_2-NPs（30nm）、SWCNTs を比較した。 ・in vitro 暴露試験では、TiO2-USNPs は細胞毒性も酸化能もなかったが、遺伝毒性を持つことを示した。 ・in vivo 試験生体内実験では、TiO2-USNPs の高濃度水に投入暴露したゼブラフィッシュ胚は、（おそらく水を酸性化することによって）、死亡し、注射した場合、心膜等に浮腫の形成し、筋節に奇形を引き起こした。 ・大きな TiO_2-NPs も遺伝毒性で、細胞傷害性ではなかった。SWCNTs は、in vitro での細胞毒性であり、最も高い酸化能力を持っていた。しかし、これらのナノ材料は、in vivo で有意な影響を示さなかった。

No	TiO2-5
著者 所属機関	Shinohara N, Oshima Y, Kobayashi T, Imatanaka N, Nakai M, Ichinose T, Sasaki T, Kawaguchi K, Zhang G, Gamo M. 産総研
論文題目 （和訳）	Pulmonary clearance kinetics and extrapulmonary translocation of seven titanium dioxide nano- and submicron materials following intratracheal administration in rats. ラット気管内注入試験によるナノおよびサブミクロンの７種の二酸化チタンの肺クリアランス速度と肺外への移行
書誌事項	Nanotoxicology. 2015 Nov;9(8):1050-8. doi: 10.3109/17435390.2015.1015644. Epub 2015 May 4.
試験物質	二酸化チタン７種類　AEROSIL P25 (Nippon Aerosil Co. Ltd., Tokyo, Japan), MT-150AW, AMT-100, MP-100 (Tayca Co. Ltd., Osaka, Japan), FTL-100, TTOS-3 表面修飾なし, TTOS-3 で Al(OH)3 表面修飾(Ishihara Sangyo Kaisha, Ltd., Osaka, Japan)
試料調整法	０．２％リン酸２水素ナトリウム(DSP)水溶液に分散
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	雄Ｆ３４４ラットで投与時に１２週令 MicroSprayer Aerosolizer (Penn-Centruy Inc)を用いて気管内注入 試料の DSP 水溶液の単回注入。1 mL/kg BW DSP 水溶液 P25では 0.375, 0.75, 1.5, 3.0 及び 6.0 mg/ kg BW。その他は0.67, 2.0及び 6.0 mg/ kg BW。
試験結果	肺からのクリアランスを指数的に減少するとして 1 日当たりの速度定数 k_{lung} を測定した。同じく肺から胸部のリンパ節への移行も速度定数 $k_{lung\ ->\ lym}$ として求めた。 TTOS-3 では $Al(OH)_3$ 表面修飾したものの方がクリアランスは遅かった。それ以外では 91 日後に肺には投与の 9.0–18%（0.375–2.0 mg/kg bw）また 21–37%（3.0–6.0 mg/kg bw）が残っていた。BALF 中（マクロファージ中）のチタン量の肺全体のチタン量の割合は 3, 28 と 91 日後でそれぞれ 2.6–12%,0.86–9.6%,0.88–11%。 ３日後の胸部リンパ節中のチタン量の投与量に対する比は 0.012–0.068%, 0.022–0.18%,0.092–0.30%（用量がそれぞれ 0.375–0.75, 1.5–3.0 and 6.0 mg/kg bw）。90 日後の同じ比は 0.016–0.93%, 0.071–3.3%, 0.54–6.4%（用量がそれぞれ 0.375–0.75, 1.5–3.0 and 6.0 mg/kg bw）。 Al(OH)3 を表面修飾した二酸化チタンのリンパ節での比率は３日後では他と違いはなかったが、91 日後では 0.93, 3.3, 6.4%（それぞれ 0.67, 2.0, 6.0 mg/kg bw）と多かった。
結論	すべての二酸化チタン試料で肺クリアランスの速度定数は用量が少ない方が大きく（生物学的半減期は短く）、$Al(OH)_3$ 修飾のある試料（１種）は、修飾がないそのほかの試料より低い（生物学的半減期は長い）。胸部リンパ節への移行の速度定数は用量により増加し、試料によらなかった。肝臓には微量の移行があり、腎臓、脾臓、脳への移行はほとんどなかった。

No	TiO2-6
著者 所属機関	Zhang G, Shinohara N, Kano H, Senoh H, Suzuki M, Sasaki T, Fukushima S, Gamo M. 産総研
論文題目 （和訳）	Quantitative evaluation of the pulmonary microdistribution of TiO2 nanoparticles using X-ray fluorescence microscopy after intratracheal administration with a microsprayer in rats. ラットのマイクロスプレーによる気管内注入後のＸ線蛍光顕微鏡による二酸化チタンナノ粒子の肺内微小分布の定量評価
書誌事項	J Appl Toxicol. 2015 Jun;35(6):623-30. doi: 10.1002/jat.3109. Epub 2015 Jan 23.
試験物質	二酸化チタン AEROSIL® P25 (Nippon Aerosil Co. Ltd, Tokyo, Japan)
試料調整法	0.2%リン酸２水素ナトリウム(DSP)水溶液に分散、超音波バスで３時間振とう、遠心分離器により 1000g で２０分間分離した上清を使用した。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	雄 F344/DuCrlCrlj ラットで投与時 12 週令 MicroSprayer Aerosolizer (Penn-Centruy Inc)を用いて気管内注入、1 日後に解剖 単回注入　10 mg/kgBW
試験結果	肺病理切片をタートラジン（黄色）で染色、Ｘ線蛍光顕微鏡（X 線分析顕微鏡 XGT-7200V、堀場製作所）でチタンの Kα 線を定量分析した。測定単位は 100μm 角格子、測定間隔 100μm ないし 200μm、測定時間 40 から 80 時間。標準試料により Kα 線強度(cps)をチタン量に換算する校正曲線を求めた。格子当たり 0.0083–3.2 ng チタンを定量可能であった。肺の分析では定量下限は 0.02 ng であった。 ラット肺は右肺前葉、中葉、後葉、副葉、左肺葉についてそれぞれ分析した。 チタンは肺に不均一に分布し、右肺の後葉(0.13± 0.036 ng/ mesh)と副葉(0.13 ± 0.071 ng/mesh)にほかの部位より顕著に沈着していた。左中葉が中でも沈着が少なかった。
結論	Ｘ線強度とスライド上のチタン量とはよい直線関係を示した。肺の病理探索の場合、すべての肺葉について調べる必要がある。

No	TiO2-7
著者 所属機関	Sweeney S, Berhanu D, Ruenraroengsak P, Thorley AJ, Valsami-Jones E, Tetley TD. National Heart and Lung Institute, Imperial College London,英国
論文題目 （和訳）	Nano-titanium dioxide bioreactivity with human alveolar type-I-like epithelial cells: Investigating crystalline phase as a critical determinant ヒト肺胞 I 型上皮細胞のナノ二酸化チタンの生物反応：判断因子としての結晶系の研究
書誌事項	Nanotoxicology. 2015 May;9(4):482-92. doi: 10.3109/17435390.2014.948518. Epub 2014 Aug 19.
試験物質	二酸化チタンナノ粒子（合成）アナターゼ型(水分散 9.8 nm)とルチル型(水分散 11.7 nm)、表面積やゼータポテンシャルも同程度
試料調整法	DCCM-1 培養液に試料を分散
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	不死化ヒト肺胞 I 型上皮細胞による in vitro 試験 細胞を培養液で培養し試験物質を与える。投与後 0.5, 1, 2, 6, 24 時間後および試料を除去後に解析。観察期間は測定バイオマーカーによる。 0.5～500μg/ml 投与
試験結果	生存率 MTT アッセイ:最大用量 500μg/ml で有意に減少 細胞障害 LDH 測定: アナターゼは 50μg/ml でルチルは 100μg/ml 有意に酵素増加 炎症サイトカイン IL6: アナターゼは 10μg/ml でルチルは 1μg/ml から用量依存的に増加、等用量ではルチルがアナターゼより有意に高い。 炎症ケモカイン IL8:すべての用量で対照群に比べ高い。 炎症ケモカイン MCP1:4 時間後では反応なし、8 時間後から反応があり、すべての用量で対照群に比べ高い。粒子を除くと減少した。 活性酸素種 ROS: 0.5, 1, 2 と 24 時間後に dihydroethidium 染色により観察。アナターゼは 1～2 時間後に増加するが、その後減少。ルチルは 24 時間後に増加して、粒子除去後も増加。ケモカインで変化のあった 1 lg/ml では変化なし。 酸化ストレスマーカーのグルタチオン(酸化型と還元型の比): 2, 6 と 24 時間後でアナターゼは 2 時間後から 10μg/ml 以上で対照群に比べ有意に増加、ルチルは変化なし。6 時間は両者とも 50μg/ml 以上で有意に増加。24 時間後ではルチルは 10μg/ml 以上で有意に増加、アナターゼは対照群に比べ有意差なし。
結論	二酸化チタンのルチル型とアナターゼ型では、ここで測定した結果からは細胞への影響にほとんど違いはない。

No	TiO2-8
論文題目 （和訳）	Using physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling for dietary risk assessment of titanium dioxide (TiO_2) nanoparticles. （二酸化チタン（TiO_2）ナノ粒子の食事のリスク評価のための生理学的薬物動態（PBPK）モデル）の使用
著者 所属機関	Bachler G, von Goetz N, Hungerbuhler K. ETH Zurich , Switzerland.
書誌事項	Nanotoxicology、2015 May、9(3)、P.373-P380.
試験物質	・TiO_2：20nm、ルチル（Ｘｉｅ等のデータ、2011） ・TiO_2：20-30nm（被覆無）、アナターセ 70%-ルチル 30%（Fabian 等のデータ、2008） ・TiO_2：25 および 80nm（被覆無）、ルチル（Wang 等のデータ、2007、2008） ・TiO_2：21nm（被覆無）のアナターセ 75%-ルチル 25%、25nm（被覆無）のルチル、60nm（被覆無）のルチル、（Wu 等のデータ、2009）
試料調整法	記述なし（in vivo データは引用によるため）
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	・ネズミ（murine）、静脈内投与、暴露濃度 10mg/kg、暴露期間（1, 3 , 7, 15 ,30 日）、臓器等（肝臓、腎臓、すい臓、脾臓、心臓、胃、肺、血液、骨、脳、腸、糞便）の TiO_2 濃度を測定、ｎ数=5、（Ｘｉｅ等のデータ） ・ネズミ（Ｗｉｓｔｅｒ　rat）、静脈内投与、暴露濃度 5mg/kg、暴露期間（1, 14, 28 日）、臓器等（肝臓、脾臓、腎臓、肺）の TiO_2 濃度を測定、ｎ数=3（Fabian 等のデータ） ・ネズミ（Ｍｉｃｅ）、経口投与、暴露濃度 5g/kg、暴露期間（14 日）、臓器等（肝臓、脾臓、腎臓、肺、脳、血液）の TiO_2 濃度を測定、ｎ数=6～20（Wang 等のデータ） ・ネズミ（Ｍｉｃｅ）、経皮投与、暴露濃度 1.2mg/日、暴露期間（60 日）、臓器等（肝臓、脾臓、腎臓、肺、脳、血液）の TiO_2 濃度を測定、ｎ数=6～20（Wu 等のデータ）
試験結果	・TiO_2 用薬物動態（PBPK）モデルの作成：銀 NPs 用 PBPK モデル（Bachler 等）と同様に開発した。モデルは 15～150nm の領域に適用でき、2 つの主な素反応過程に従い器官内分布を表すことができる。ナノ酸化チタンの生体内分布は、器官の毛細血管壁を通過する能力と、単核食細胞系（MPS）に貪食される能力に基づいてモデル化した。また、ナノ酸化チタンの血液から組織部位への移動と排泄は、膜組織制限モデル（Ｌｉ等）によって表した。すなわち、移動速度ｋ＝ｂ×Q/Ｖで表される（ここで、ｋは血液から器官、胆汁、尿への移動速度、ｂは特定の器官に対する定数、Qは器官を通過する血液流量（Ｌ/分）、Ｖは体内の全血液量（Ｌ））。毛細血管壁通過パスウェイに対しては、定数ｂは、管壁通過能を表すことになり、同じ管壁を持つ器官（5 種に分類できる）に対して、同じ値が使用される。一方、単核食細胞系（MPS）に貪食される能力に対しては、定数ｂは、NPs の粒子径や暴露濃度によって決まると推定されるが、実験データがない。 ・TiO_2 用 PBPK モデルの確認：Ｘｉｅ等の試験結果について、暴露期間毎に、臓器等の TiO_2 濃度に対し、PBPK モデル予測値を両対数プロットした。暴露期間に関係なく、予測値は試験結果より、1：1 直線より上方の直線上に並び（一律、3.9 倍）、よい一致となった。ただし、例外は腸であり、やや高めの予測値になった。 ・別実験結果(Fabian 等)との比較：同様に、暴露期間毎、臓器毎の TiO_2 濃度(実験結果)に対し、PBPK モデル予測値を両対数プロットした。腎臓の 1 日目の濃度データを除き、いずれのデータも、1：1 直線上にのり、モデルで予測できることを示した。 ・経口暴露実験結果（Wang 等）への適用：PBPK モデル予測値は、肝臓を除いた臓器の経口暴露試験結果にかなり近い値を示した。80nm の TiO_2 の肝臓での値は、予測より高かったが、その理由としては、TiO_2 が凝集し、引き続き、MPS 中のマクロファージによって取り込まれたためだと推定した。 ・経皮暴露実験結果（Wu 等）への適用：PBPK モデル予測値は、経皮暴露実験結果とかなりよく一致した。しかし、腎臓の予測濃度は、すべての粒径に対し、過度のものであった。この原因としては、皮膚を透過する粒子は、より大きな透過孔を持つ腎臓血管壁を容易に透過、排泄できるため、腎臓での濃度が低くなっ

	たものと推定できる。 ・PBPK モデルのリスク評価ために使用方法の例：リスク評価のために、ナノ酸化チタンの毎日の摂取量を、ドイツの人口に対し、世代毎に計算した。 PBPK モデルによって、この慢性外部露出を各臓器の内部のチタンレベルを予測した。
結論	・取り込まれたナノ酸化チタン粒子の配置を決定するために、生理学的に基づいた薬物動態（PBPK）モデルを開発した。 ・臓器に含まれる TiO_2 濃度について、複数の独立した試験結果と PBPK モデル予測結果を比較し、モデルの妥当性を確認した。 ・15～150 ナノメートルのＰＢＰＫモデル適用領域内で、粒子の大きさおよび結晶構造は、生体内分布への影響は小さい。 ・暴露方法として、静脈内投与のみならず、経口投与、経皮投与に対する試験結果も、PBPK モデル予測の結果と一致した。 ・PBPK モデル予測よりも高い in vivo 試験結果が出る場合は、粒子が凝集し、引き続き、MPS 中のマクロファージによって取り込まれるためだと推定した。 ・PBPK モデルのリスク評価ために使用方法の例として、ナノ酸化チタンの毎日の摂取量を、ドイツの人口に対し計算した。 PBPK モデルによって、この慢性外部露出を各臓器の内部のチタンレベルを予測できる。

No	2TiO2－1
著者 所属機関	Adny H Silva1, Claudriana Locatelli2, Ubirajara PR Filho3, Bruna F Gomes4, Rui M de Carvalho Ju´ nior1, Jefferson S de Gois1, Daniel LG Borges1 and Taˆnia B Creczynski-Pasa1 1 Universidade Federal de Santa Catarina, Trindade, Floriano´ polis, SC, Brasil 2 Universidade do Oeste de Santa Catarina, Videira, SC, Brasil 3 Universidade de Sa˜o Paulo, Sa˜o Carlos, SP, Brasil 4 Instituto de Qui´mica de Sa˜o Carlos, Sa˜o Carlos, SP, Brasi
論文題目 （和訳）	Visceral fat increase and signals of inflammation in adipose tissue after administration of titanium dioxide nanoparticles in mice （マウスにおける二酸化チタンナノ粒子の投与後の脂肪組織における内臓脂肪の増加と炎症のシグナル）
書誌事項	Toxicol Ind Health. 2015 Dec 9 [Epub ahead of print]
試験物質	市販 TiO2 NP（Sigma-Aldrich より購入）アナターゼ：ルチル比＝7：3。ブルッカイト、非晶質は無し。平均サイズ 118 + 30 nm 、表面電荷（負）36.82 mV。
試料調整法	in vivo 研究前に NPs は滅菌水に懸濁、1 時間超音波処理。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	試験生物：Swiss albino 雄マウス（6–8 週齢)、実験前体重(25-30g)。2 つのグループ（各 6 匹）に分けられた。 投与方法・期間・試験用量：コントロール群:生理食塩水のみ投与。処理群：TiO2-NPs を 2 mg kg-1 day-1 で投与。溶液を連続 10 日間腹腔内投与。
試験結果	・一般的試験：投与マウスの死亡なし。水・食料摂取変化なし。体重の大幅な減少、内臓や精巣、皮下の脂肪組織に顕著な脂肪沈着、脾臓・腎臓の重量に大幅な差あり。 ・肝臓と腎臓の機能分析：酵素 ALT 、クレアチニン、アルブミンと蛋白質レベルの差なし。しかし、AST のわずかな増加と尿素の減少が TiO2 NPs 投与したマウスで観察された。 ・血液検査と病理組織学的分析：TiO2 NPs 投与したマウスで、赤血球、白血球の合計数とヘマトクリットの割合の大幅な減少と水泡の割合の増加があった。50%の動物の胃の平滑筋の硝子変性、動物の 85%に肝細胞の微細空胞変性を観察。腹部脂肪切片は、を示した脂肪質組織の色の変化だけでなく、細胞質まで拡張した単核球の炎症性浸潤を示した。すべての投与動物は、周囲と膵臓内の炎症反応および腎杯中の炎症性浸潤を示した。 ・チタン含有量分析：チタンは、腎臓、肝臓、脾臓に蓄積され、腹腔内投与の TiO2 NPs が全身循環によって吸収され、分配され、組織、主に脾臓に蓄積されることが示唆された。
結論	本研究は、連続 10 日の腹腔内投与後 TiO2 NPs へのマウス暴露の影響を報告した。毒性、特に炎症や肝臓の損傷の誘導、に関連するいくつかの生物学的パラメーターが観察された。TiO2 NPs によって引き起こされる炎症の正確なメカニズムは完全に解明されていないにもかかわらず、内臓脂肪の蓄積は処理の 10 日後に驚くほど発見された事実を考えると、データとここで提示された議論は重要である。これらの結果は、Ti の蓄積と同様に炎症反応のメカニズムを特徴付けるために、さらなる in vivo 長期的な暴露研究のための根拠を提供する。

（カ） SiO2

No	SiO2-1
著者 所属機関	Arshiya Parveen[1], Syed Husain Mustafa Rizvi[1], Sushma[2], Farzana Mahdi[3], Iqbal Ahmad[2], Prem Prakhash Singh[3] and Abbas Ali Mahdi[1] 1Department of Biochemistry, King George's Medical University, Lucknow, Uttar Pradesh, India 2Fibre Toxicology Division, CSIR-Indian Institute of Toxicology Research, Lucknow, Uttar Pradesh, India 3Department of Biochemistry, Era's Lucknow Medical College & Hospital, Lucknow, Uttar Pradesh, India
論文題目 （和訳）	Intranasal exposure to silica nanoparticles induce alterations in pro-inflammatory environment of rat brain: Involvement of oxidative stress. （シリカナノ粒子への鼻腔内暴露はラット脳のプロ炎症性環境における変化を誘発する: 酸化ストレスの関与）
書誌事項	Toxicol Ind Health. 2015 Oct 2. doi:pii: 0748233715602985. [Epub ahead of print]
試験物質	2 種類のサイズの SiNPs（10nm、80 nm；非晶質）：NanoAmor から購入(米国)。ほぼ球状。 微量金属：シリカ 10 nm とシリカ 80 nm は、それぞれ鉄を < 0.001% と 0.00002%含有。
試料調整法	SiNPs の乾燥粉を生理食塩液に懸濁させた。懸濁液は室温で超音波処理（40 W、15 分間）。シリカ８０nm とシリカ １０nm の流体力学的径は、397 + 0.9 nm および 72 + 0.8 nm。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	試験生物：Wistar 系の若い雄ラット(5-6 週間、N＝72)、約 150-200g の重量。 投与方法・期間・試験用量：グループ Ⅰ ：80 nm SiNPs (150 mg/50 mL リン酸緩衝生理食塩水(PBS)/ラット)、30 日間毎日両方の鼻に鼻腔内注入(各鼻孔に 25 mL) 。グループ II 群：10 nm SiNPs (150 mg/50 mL PBS/ラット)、同様。グループ III：コントロール(50 mL PBS /ラット)、同様。殺処分後、線条体（CS)、海馬（HP）、前頭葉（FC)域を解剖。
試験結果	・SiNPs 含有量分析（約 0.1-0.3 g 脳領域（CS、HP 、FC）の重量測定、消化後、元素分析）：80 nm と 10 nm SiNPs は、FC、CS、HP の SiNPs 含有量の顕著な増加を示した。 ・過酸化脂質レベル（Ohkawa ら(1979)の方法）・H2O2 レベル（Zadeh ら(1994)の方法）：SiNPs はラット脳において酸化ストレスと障害のある抗酸化防衛を誘導する。 ・還元グルタチオン(GSH)レベル（Hasan と Haider (1989)の方法）・SOD 活性（Stahl ら(1963)の手順）・CAT 活性（Aebi (1984)の方法）・GPX 活性（Flohe と Gunzler (1984)の手順）：SiNPs は、ラット脳において、プロ炎症性の転写因子を活性化する。 ・リアルタイム PCR (RNAqueous kit (米国))・イムノブロット解析(Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP substrate kit (米国))・ELISA (R&D Systems (米国)推奨法）：：SiNPs は、ラット脳において、TNF-α と IL-β を上昇させる。SiNPs はラット脳における MCP 1 の発現を上昇させる。
結論	鼻腔内注入させた SiNPs は ラットの脳の異なる領域に堆積し OS と細胞の抗酸化物質の枯渇をもたらしたと結論されるかもしれない。さらに、長期にわたる OS は、脳内でプロ炎症性環境をもたらした。しかし、このような反応に関連するしっかりした結論を出すには詳細な解明が必要である。本研究のもう一つの限界は、脳中の SiNPs 毒性の長期結果だけでなく急性反応に対処しなかったことだった。したがって、さらに綿密な研究がこれらの問題に対処するために必要である。

No	SiO2-2　（PS ナノ粒子）
著者 所属機関	Claudia Meindl[a], Tatjana Kueznik[a], Martina Bösch[b], Eva Roblegg[b], and Eleonore Fröhlich[a], a Center for Medical Research, Medical University of Graz, Austria b Institute of Pharmaceutical Sciences, Department of Pharmaceutical Technology, Karl-Franzens-University of Graz, Austria
論文題目 （和訳）	Intracellular calcium levels as screening tool for nanoparticle toxicity. （ナノ粒子の毒性のスクリーニングのためのツールとしての細胞内カルシウム濃度）
書誌事項	J Appl Toxicol. 2015 Oct;35(10):1150-9. doi: 10.1002/jat.3160. Epub 2015 May 14.
試験物質	カルボキシル基 PS (CPS) ラテックスビーズ (20 及び 200 nm; Invitrogen、オーストリア)、普通の PS（ポリスチレン） 粒子 (PPS) (20 nm 及び 200 nm;ThermoScientific、ドイツ)、アミン PS 粒子 (AMI) 20 nm (Merck Chemicals and Life SCiences、オーストリア) 及び 200 nm (Invitrogen) 、アミジン PS 粒子 (AP) (20 nm 及び 200 nm、Invitrogen) 使用。Aerosil ® 200 (Aero200; 12 nm) と Aerosil ® OX50 (OX50; 40 nm) は、Degussa（ドイツ）から入手。
試料調整法	水、細胞培養液、HBSS に懸濁
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	試験生物：ヒト血管内皮細胞ライン EAhy926 (Dr. C. J. Edgell から寄贈)。ヒト神経芽腫細胞 SH-SY5Y (米国組織・細胞培養コレクション、米国) (細胞内 Ca2+ 濃度変化の検出に使用）。 投与方法・ 期間・試験用量は、下記。
試験結果	・MTS によるホルマザン生体還元性 (細胞は 0、25、50、100、200、400 µ g ml−1 粒子に暴露：CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive 非放射性細胞増殖試験 (Promega, ドイツ)）：小さな粒子は 200 nm の粒子より細胞毒性。小さな粒子の間で PPS20 と AMI20 は CPS20 と APS20 の粒子よりも細胞毒性。200 nm の PS 粒子は 200 µgml−1 まで暴露後生存率の顕著な減少無。 Aero200 粒子は、OX50 粒子より EAhy926 細胞生存率の強い減少を引き起こす。すべての粒子への感度は、SH SY5Y 神経細胞中より EAhy926 内皮細胞中でより明白であるが、パターンは同様。 ・乳酸脱水素酵素放出（細胞は 0、25、50、100、200、400 µ g ml−1 粒子に暴露 : CytoTox-ONE™ The Homogeneous Membrane Integrity Assay (Promega)）：非細胞傷害性の APS20 粒子を除いて、小さい粒子のほうが大きな粒子よりもより膜損傷 を起こす。CPS200、PPS200、AMI200 は 400 µ g ml−1 まで大きな LDH 放出無。 ・リソソーム機能（検出に 2 つの異なる pH 敏感な染料 (アクリジンオレンジと Lyso ID ® 赤染料)使用）。アクリジンオレンジ：ネガティブコントロール (DMEM) とポジティブコントロール (25 µ M クロロキン)、0、5、10、20、40 µ g ml−1 PS; 24 時間暴露後）。Lyso ID ® 赤染料：PS の非細胞毒性濃度(0、5、10、20、40 µ g ml−1) 24 時間暴露後）：PI 染色は PPS20 と AMI20 の粒子の膜損傷を示すが、他のすべての粒子は、100 µ g ml−1 まで染色を示さなかった。APS20 曝露細胞は、主に PI 染色細胞が見られる。両アエロジル粒子は顕著な膜損傷を示した。 ・カスパーゼ 3/7 活性化（0、25、50、100、200、400 µ g ml−1 粒子に対して 8 時間と 24 時間後、Caspase-Glo 3/7 Assay (Promega)）： ・YoPro1/ヨウ化プロピジウム染色（細胞は 0、12.5、25、50、100 µ g ml−1 粒子で 24 時間処理、100 µM YoPro1 と 1.5 mM ヨウ化プロピジウム(PI)で構成されている Vybrant Apoptosis Assay Kit no. 4 (Invitrogen)）： APS20 粒子を除く、すべて 20 nm の PS 粒子は、カスパーゼ 3/7 活性化を発生。CPS20 微粒子より AMI20 と PPS20 はカスパーゼ 3/7 活性化をより強く誘発。CPS200、PPS200、AMI200 は 00 µ g ml−1 でいくらかのカスパーゼ 3/7 の活性化を誘発するが、YoPro1 染色に影響無。 CPS20、PPS20、AMI20 粒子に暴露した細胞で YoPro1 染色増加、他のすべての PS 粒子は試験濃度範囲 (最大 100 µ g ml−1)で顕著な増加無。 OX50 と Aero200 の粒子はカスパーゼ 3/7 活性化増加したが、YoPro1 染色は OX50 粒子のみ。 ・ジヒドロエチジウムの酸化による酸化ストレスの評価（10 µ M ジヒドロエチ

	ジウム、培地、粒子及びポジティブコントロールとして 100 µ M 中で培養。粒子濃度は 0、12.5、25、50、100、200、300 µ g ml−1） ：酸化 DHE は細胞毒性 AMI20、CPS20 、PPS20 粒子の 100 µ g ml−1 まで、及び 他の PS 粒子の 300 µ g ml−1 までで測定された。PPS20、AMI20、APS200 の粒子は蛍光信号で顕著な増加を示した。 OX50 と Aero200 の粒子は 100 µ g ml−1 濃度までに DHE 蛍光の増加無。 ・カルシウムイメージング（A-Plan 20×/0.45 Ph2 objective on an inverted microscope (Axiovert M200; Zeiss。SH SY5Y 細胞。粒子濃度 0、12.5、25、50、75、125、250、500、750 µ g ml−1 で HBSS 中に懸濁。実験は潅流 bathflow; 30 秒 PS 懸濁液潅流; 30 秒停止 (NPs と細胞の接触許す); 潅流中で 2 分間記録) : CPS20、PPS20、AMI20 に暴露された細胞の細胞内 ca 2 + 濃度レベルの大幅な増加が見られた。CPS20 粒子よりも PPS20 と AMI20 の粒子の方が濃度増加。200 nm サイズの粒子は、細胞内 ca 2 + 濃度レベル増加無し。APS 粒子高いアグルゲーションで、評価不可能。 Aero200 粒子より OX50 の粒子の低濃度で細胞内 ca 2 + 濃度レベル増加。125 µ g ml−1 OX50 と 500 µ g ml−1 Aero200 粒子での培養で、顕著な増加。
結論	大半の粒子に対して、24 h 細胞毒性と細胞内[Ca2+]濃度レベルの測定値は、細胞毒性として同じ粒子を識別した。PS 粒子の細胞毒性は、表面電荷によってよりもサイズによってより決まる。200 nm PS 粒子対してだけ、正の表面電荷は有害細胞影響と相関した。細胞内[Ca2+]濃度レベルの測定は、NPs と膜の相互作用に関する追加情報を与えるかもしれない。

No	SiO2-3
著者 所属機関	Ramin Hassankhani[1] & Mohammad Esmaeillou[2] & Ali Asghar Tehrani[3] & Keyvan Nasirzadeh[4] & Fatemeh Khadir[3] & Hamid Maadi[2] 1 Department of Science, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran 2 Young Researchers and Elite Club, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran 3 Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran 4 Industrial and Environmental Biotechnology Division, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran
論文題目 （和訳）	In vivo toxicity of orally administrated silicon dioxide nanoparticles in healthy adult mice. (健康な大人のマウスにおける二酸化ケイ素ナノ粒子経口投与の in vivo 毒性)
書誌事項	Environ Sci Pollut Res Int. 2015 Jan;22(2):1127-32. doi: 10.1007/s11356-014-3413-7. Epub 2014 Aug 13.
試験物質	99.972%純度 SiNPs（10-15 nm）（購入先：TECNAN（Tecnología Navarra de Nanoproductos S.L, スペイン）
試料調整法	40 mg/ml 濃度で水に分散した SiNPs の溶液を、15-20 分間超音波処理し、3 分間振動
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	試験動物：雄マウス（Wistar)、6-8 週齢、8 匹。 投与方法・期間：経口投与。試験用量：第 1 グループ（4 匹）：蒸留水、第 2 グループ：SiNPs (333.33 mg kg−1day−1）を含む懸濁液。投与 5 日後、殺処分。
試験結果	・症状と死亡率：SiNPs 懸濁液投与後マウスの実験期間中に嘔吐、ひどい無気力の症状を観察。実験の終わりには、処理グループの 1 匹が死亡。 ・血清の生化学的試験（アルブミン、総コレステロール、総蛋白（TP)、乳酸脱水素酵素（LDH)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST)、アルカリ性ホスファターゼ（ALP)、クレアチニン（Cr)、総ビリルビン（TBIL)、尿酸(UA)、尿素、リン、総カルシウム、グルコース、トリグリセリドを含む生化学的レベル、低密度リポタンパク質（LDL）と高密度リポタンパク質（HDL)を生化学オートアナライザーで測定。カルシウムイオン（Ca + +)、ナトリウムイオン（Na +)、カリウムイオン（K +）を電解質分析装置で測定。）：SiNPs 暴露全マウスの血清コレステロール、HDL と LDL がコントロールグループよりも有意に高い。しかし、血清トリグリセライドレベルは低下。ALP と AST 活性、LDH がコントロールグループより有意に高い。さらに、血清中の尿素がコントロールグループより有意に高い。興味深いことに、血清アルブミンや総蛋白がコントロールグループより有意に低下。 ・病理組織学的観察（肝臓、腎臓、胃、肺、脾臓、精巣の切片をヘマトキシリン-エオシン染色、光学顕微鏡観察）：腎臓で、雲様腫脹、水腫性変性、腎尿細管上皮細胞の壊死、うっ血、ボーマン嚢の膨張、硝子様円柱、糸球体分割、糸球体に、管状の腫れが SiNPs 暴露全マウスで発見。SiNPs 投与マウスのうっ血、間質性肺炎、肺胞の厚さ、肺胞中の炎症性滲出物が浸透、気管支肺炎を含む肺傷害。精巣で、うっ血、攪乱、精子の減少、壊死、浮腫が全 SiNPs 処理マウスで発見。また、肝臓で、うっ血、肝細胞の膨潤、細胞の壊死が見られた。
結論	嘔吐の症状、食欲不振、重度の倦怠感は、SiNPs が in vivo で深刻な毒性学的影響を持つことを示す。生化学的および病理組織学的検査は、肺、肝臓、精巣、腎臓がこれらの粒子の標的臓器であることをより明らかにする。我々の結果によると、SiNPs が 5 日間でさまざまな器官への毒性学的影響を誘発することが出来る。したがって、ナノ粒子に取り組むすべての研究者とナノ粒子に直接接触する者にとって、安全性のガイドラインを考慮することは必要である。

No	SiO2-4
著者 所属機関	Thomas Hofmann[a,*], Steffen Schneider[a], André Wolterbeek[b], Han van de Sandt[b], Robert Landsiedel[a], Bennard van Ravenzwaay[a] A BASF SE,Experimental Toxicology and Ecology, 67056 Ludwigshafen, Germany b TNO, P.O.Box360,3700 AJ Zeist,The Netherlands
論文題目 （和訳）	Prenatal toxicity of synthetic amorphous silica nanomaterial in rats. （ラットにおける合成非晶質シリカナノ材料の胎児毒性）
書誌事項	Reprod Toxicol. 2015 Aug 15;56:141-6. doi: 10.1016/j.reprotox.2015.04.006. Epub 2015 Apr 18.
試験物質	NM 200 合成非晶質シリカ、batch PR-A-2、白粉（EU 共同研究センター（Ispra）から入手）。沈殿で生産、96.5% の二酸化ケイ素含有量（エネルギー分散型 x 線分光法に基づく不純物: Na, Al, S)。一次粒子は 10-25 nm の範囲、表面積 230 m 2/g。
試料調整法	シリカの凝集を避けるために 10% 牛胎児血清を含む高度脱イオン水で調製。 一次粒子 40nm。アグロメレートはサブ-100-nm から 3μm。
試験生物 投与方法・期間 試験用量	試験生物：性的に成熟した、処女 Wistar ラット(Crl: WI [Han])（Charles River Laboratories, Research Models and Services, Germany GmbH から入手）。雄ラットと交配・妊娠後実験に使用（妊娠日；GD 0、実験段階の始め）。GD 0 は、生後 12～15 週、体重 195.3～271.0g。 投与方法・期間・試験用量：経口投与。GD 6～GD 19 の間、0（ビークル、10% 牛胎児血清を含む高度脱イオン水）100、300、または 1000 mg/kg 体重（10 mL/kg 体重）で毎日 1 回投与。GD 20 に殺処分後、顕微鏡観察。
試験結果	・死亡率と臨床症状：化合物関連死亡や臨床症状は認められなかった。 ・体重と食品消費量：研究中の処理による影響は認められなかった。 ・帝王切開と剖検：剖検では化合物関連の肉眼所見は認められなかった。 ・胎児形態検査：処理グループの外表奇形、骨角奇形及び形態変化、その他所見は、コントロールグループと変わっていない。
結論	妊娠ラットに着床から妊娠を通じて 1000 mg/kg bw/d までの毎日の用量で合成非晶質シリカの経口投与後、母体も胚-胎児も毒性がみられなかった。また、化合物に関連する影響は、胎児において外部、内臓と骨格の検査によって、認められなかった。本研究の結果に基づき、無毒性量(NOAEL)は、1000 mg/kg bw/d で設定された。

（キ） ZnO

No	ZnO-1
論文題目 （和訳）	Comparison of cellular toxicity caused by ambient ultrafine particles and engineered metal oxide nanoparticles (環境超微粒子と工業金属酸化物ナノ粒子により引き起こされる細胞毒性の比較)
著者 所属機関	Senlin Lu1*, Wenchao Zhang1, Rui Zhang1, Pinwei Liu1, Qiangxiang Wang1, Yu Shang2, Minghong Wu1*,Ken Donaldson3 and Qingyue Wang4* 1 School of environmental and chemical engineering, Shanghai University, No.333, Nanchen Rd, Shanghai 200444, China 4 School of Science and Engineering, Saitama University, Saitama 338-8570, Japan
書誌事項	Lu et al. Particle and Fibre Toxicology (2015) 12:5
試験物質	CeO_2(20-30nm), NiO(10-20nm), および ZnO(90-210nm)ナノ粒子(Nanamor 社)、 中国上海で採取した環境粒子を結合：粗粒子(PM10-5.6,PM5.6-3.2,PM3.2-1.8)、微粒子(PM1.0-0.56,PM0.56-0.32,PM0.32-0.18,PM0.18-0.1)、超微粒子(PM0.1-0.056,PM0.056-0.032,PM0.032-0.018,PM0.018-0.01)
試料調整法	0.2ｇナノ粒子を 100ml 殺菌脱イオン水に溶解し、1 時間室温で超音波洗浄後 100,50,および 25μg/ml に希釈
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	A549 細胞(タイプⅡ人肺胞上皮細胞)使用 ○MTT 試験 1×10^3~1×10^4細胞を培養地に 24 時間置いた後、Hank 液で 3 回洗浄し、100μL の環境粒子液もしくは 200,100,50,および 25μg/ml のナノ粒子液に 4 時間浸漬。その後 10μL の 5mg/mL MTT 液を滴下し 37℃4 時間培養し、分析。 ○LDH 溶出試験 細胞毒性試験は LDH 溶出試験で実施。LDH 酵素活性を 440nm での比色分析で測定。
試験結果	測定した粒子はすべて 25~200 / ml の範囲の濃度で A549 細胞を損傷する恐れがある。最も低い生存率と最高の乳酸デヒドロゲナーゼのレベルを示したのは、ナノ ZnO 粒子であったが、細胞内の活性酸素種（ROS）とアポトーシスの割合の最高レベルは、周囲の微粒子の 200μg/ mL の可溶性分（PM1.8）で処理した細胞で観察された。鉛、ニッケル、鉄、及び銅などの人的要因の金属が比較的高い濃度にあると、環境の粗大粒子や超微粒子と比較して細かい環境粒子の高い毒性に匹敵することがある。選択された重金属（亜鉛、ニッケル、鉄、及び銅）は A549 細胞の核周囲および細胞質領域に存在することが見出された。環境の粒子の金属の分布パターンから以下のことが示される。A549 細胞中の金属の分布は不均一であり、銅> 亜鉛>鉄>ニッケの順であり Cu が他の金属よりも A549 細胞に吸収されやすいことを示唆している。
結論	低濃度の金属ナノ粒子酸化物および超微粒子は細胞に損傷を与えうるが、製造した金属酸化物ナノ粒子は、環境の粒子に比べて肺細胞に対して毒性は極めて高くはない。細胞に観察された損傷は、粒子による酸化ストレスが誘導されただけでなく、A549 細胞中の重金属の局所濃度の効果による可能性がある。

No	ZnO-2
論文題目 （和訳）	TOXICITY OF ZINC OXIDE NANOPARTICLES IN RATS TREATED BY TWO DIFFERENT ROUTES: SINGLE INTRAVENOUS INJECTION AND SINGLE ORAL ADMINISTRATION （二つの異なる経路で処置したラットにおける酸化亜鉛ナノ粒子の毒性：単回静脈内注射及び単回経口投与）
著者 所属機関	Jonghye Choi1, Heyjin Kim1, Pilje Kim2, Eunhye Jo2, Hyun-Mi Kim2, Moo-Yeol Lee3, Seon Mi Jin4, Kwangsik Park1 1College of Pharmacy, Dongduk Women's University, Seoul, Korea 2National Institute of Health, Incheon, Korea 3College of Pharmacy, Dongguk University, Goyang, Korea 4College of Medicine, Eulji University, Daejeon, Korea
書誌事項	Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A, 78:226–243, 2015
試験物質	酸化亜鉛ナノ粒子(ZnONP,米 Sigma-Aldrich 社製,粒子サイズ 35nm 未満)
試料調整法	5%グルコース溶液に懸濁。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	酸化亜鉛ナノ粒子（ZnONP）の毒物動態は、単回静脈内（IV）注射と単回経口投与（3mg/kg または 30 mg/ kg）を介して、ラット(雄)で調査。亜鉛（Zn）の血中濃度は 7 日間モニターし、組織分布は、肝臓、腎臓、肺、脾臓、胸腺、脳、および精巣において調べた。 ZnONP の排泄を確認するために、尿と糞中の Zn 濃度は 7 日間測定した。
試験結果	ZnONP は経口投与では容易には消化管（GIT）から吸収されず、糞中に大部分が排泄された。30 mg / kg の用量でラットに静脈内注射した場合には、ピーク濃度は、5 分後に現れたが、注射後 48 時間で正常範囲に戻った。 ZnONP は主に肝臓、腎臓、肺、および脾臓に分布し、胸腺、脳、および精巣にはみられなかった。 分布レベルは有意に 7 日後に正常値まで低下した。静脈内注射後の糞排泄が ZnONP の胆汁排泄を促進した。30 mg の/ kg の静脈内注射により、肝細胞における有糸分裂像が大幅に増加し、また、暗褐色の色素を持つ多焦点急性傷害が肺に認められたが、同量を経口投与したラットでは有意な損傷が観察されなかった。
結論	本研究では、ZnONP の毒物動態学とその毒性に関する以下の情報が得られた。ラットに対し、ZnONP を経口投与及び静脈内注射で投与したが、30mg/kg の用量で静脈内注射でのみ血液中および肝臓、肺、腎臓、および脾臓を含む組織の Zn 量が上昇した。ZnONP は、消化管から容易に吸収されず、糞を介して排泄された。ZnONP 静脈注射は、尿中に排泄されたが、主な排泄は、胆汁経路、その後糞によってである。血清生化学および組織病理学的分析での毒性は ZnONP の高用量を静脈内注射したラットで主に発生した。

（ク） Ag

No	Ag-1
論文題目 （和訳）	Lung distribution, quantification, co-localization and speciation of silver nanoparticles after lung exposure in mice （マウスの肺に暴露した銀ナノ粒子の肺中の分布、定量化、共局在と化学形態別分析）
著者 所属機関	Stijn Smuldersa,1, Camille Larueb,1, Geraldine Sarretb, Hiram Castillo-Michelc, Jeroen Vanoirbeeka, Peter H.M. Hoeta a Center for Environment and Health, KU Leuven, Leuven, Belgium、 b ISTerre, Université Grenoble Alpes, CNRS, F-38041 Grenoble, France、 c European Radiation Synchrotron Facility, Grenoble, France
書誌事項	Toxicology Letters 238 (2015) 1–6
試験物質	Ag ナノ粒子（FP7 Nanohouse プロジェクトで使用したものと同じ） 分散液の DLS 測定で、130μm、506μm、5180μm の 3 グループが認められた。ゼータ電位は - 31ｍV、ICP-MS による不純物分析で Ca；216.8μg/g、Fe；23.8μg/g、Cu；0.6μg/g が確認された。
試料調整法	0.9%食塩水に分散
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	BALB/c OlaHsd マウス（6 週齢） 0、7、14、21、28 日に 0.8mg/ml のナノ銀分散液を 25μl、軽麻酔下のマウスに咽頭吸引させた（総投与量 100mg/マウス（4mg/kg））。最終投与の 2 日後に殺処分した。
試験結果	BAL 洗浄液；銀ナノ粒子投与マウスはコントロールに対し、細胞数（88.7×10^3 対 38.2×10^3）、マクロファージ（75.8×10^3 対 37.9×10^3）、好中球数（12.9×10^3 対 0.3×10^3）と増加した。 μXRF 測定；洗浄後の肺スライスの観察で、コントロールでは銀スポットが観察されなかったが、銀投与マウスでは約 5μm の銀に富んだ球状スポットが観察された。3 つのスポットの内 2 つでは銀元素が確認されたが（37%と 55%）、1 つのスポットでは銀はイオンとして溶解後チロール含有分子の再構成が起こった。これらの分子は、システイン、グルタチオン、メタルチオネインに相当する。また、スポットでは Cu、Fe、S の濃縮も確認された。
結論	投与された銀ナノ粒子は、マクロファージに取り込まれ、部分的あるいは全体が溶解し、メタルチオネインを含むチオール含有分子を再構成する。

No	Ag - 3
論文題目（和訳）	Mechanisms of Toxicity of Ag Nanoparticles in Comparison to Bulk and Ionic Ag on Mussel Hemocytes and Gill Cells （ムール貝の血球およびえら細胞へのバルク銀と銀イオンと比較した銀ナノ粒子の毒性メカニズム　）
著者 所属機関	Alberto Katsumiti[1], Douglas Gilliland[2], Inmaculada Arostegui[3], Miren P. Cajaraville[1] [1] CBET Research Group, Department of Zoology and Animal Cell Biology, Faculty of Science and Technology and Research Centre for Experimental Marine Biology and Biotechnology PIE, University of the Basque Country UPV/EHU, Plentzia, Spain, [2] European Commission–Joint Research Centre, Institute of Health and Consumer Protection, NSB Unit, Ispra (VA), Italy, [3] Department of Applied Mathematics, Statistics and Operations Research, Faculty of Science and Technology, University of the Basque Country UPV/EHU, Leioa, Spain
書誌事項	PLOS ONE　June 10, 2015　DOI:10.1371
試験物質	マルトーズ安定化 Ag 分散液（Ag20-Mal、Ag40-Mal、Ag100-Mal、JRC）；球状で約 20、40、100nm、ゼータ電位-30～-35mV。 商業 Ag（Ag20 と Ag80、Nanostructured Amorphous materials）；20 および 80nm だが、大きな凝集体もある。ゼータ電位は-50 と-44mV バルク Ag（10μm、Sigma Aldrich）；2μm を超えるアモルファス銀。ゼータ電位は-68.3mV。 イオン Ag（2%Ag 硝酸、BDH PRO-LABO）。
試料調整法	ビスケー湾のムール貝から血球とえら細胞を採取。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	2 段階の in vitro 試験実施。第 1 段階で細胞毒性を調べるため、0.001、0.01、0.1、1、10、20、50、100mgAg/L の濃度でマルトース安定化ナノ Ag、市販のナノ銀、バルク銀、銀イオンを細胞に暴露した。 第 2 段階試験では亜致死量濃度（LC25 以下）、ナノ銀（0.15、0.31、0.62、1.25、2.5mgAg/L）、バルク銀（0.62、1.25、2.5、5、10mgAg/L）、銀イオン（0.03、0.06、0.12、2.5mgAg/L）で細胞に暴露した。暴露時間は最長 24 時間であった。 第 2 段階では、ROS、カタラーゼ（CAT）活性、コメット試験、リン酸（AcP）活性、多様生体異物（MXR）移動活性、ナトリウム-カリウム ATP アーゼ活性、アクチン細胞骨格形態、食細胞活性を調べた。
試験結果	細胞生存性： NR および NTT 試験ですべての形態の銀はムール貝の血球とえら細胞に毒性を示した。銀イオンの毒性が一番強く、LC50 は 1.2m g /L 以下。バルク Ag の LC50 は 17.8-21mg/L の範囲である。マルトース安定化ナノ銀はバルク銀より毒性が強く、粒子径が小さいほど毒性が強くなるサイズ依存性を示した。市販のナノ銀はもっとも毒性が弱く、LC５０はバルク銀と同じであった。 メカニズム試験： ・ ROS ; ROS 産生は銀イオンと Ag20-Mal で血球とえら細胞ともに有意に増加したがバルク銀では影響が認められなかった。 ・ CAT 活性；３種とも CAT 活性を上昇させた。銀イオンでは、血球細胞で 0.03mg/L、えら細胞で 0.06 mg/L で CAT 活性が上昇した。バルク銀の血球細胞では 5 と 10 mg/L、えら細胞では 10 mg/L で上昇した。Ag20-Mal ではそれぞれ、1.25 と 2.5 mg/L で上昇した。 ・ DNA 損傷 ; 血球では３種とも DNA 損傷が認められ、えら細胞では銀イオンと Ag20-Mal で DNA 損傷が認められた。銀イオンへの暴露では、血球細胞で 0.06mg/L、えら細胞で 0.12 mg/L から DNA 損傷が始まった。バルク銀では血球細胞では最高試験濃度の 10 mg/L でのみ DNA 損傷が認められた。Ag20-Mal では血球細胞 1.25 と 2.5 mg/L で、えら細胞では 2.5 mg/L で DNA 損傷が見られた。 ・ AcP 活性 ; 血球細胞へ３種の銀を暴露していずれも AcP 活性が上昇したが、えら細胞では銀イオンのみ上昇した。銀イオンの血球細胞への暴露では、0.06、0.25、0.5 mg/L で AcP 活性が上昇したが、えら細胞では最高試験濃度の 0.5 mg/L のみで AcP 活性が上昇した。バルク銀では血球細胞では 10 mg/L でのみ

	AcP 活性が上昇した。Ag20-Mal では血球細胞の 1.25 mg/L 以上で AcP 活性が上昇した。 ・ MXR 移動活性；えら細胞へ 3 種の銀を暴露していずれも MXR 移動活性が向上したが、血球細胞では銀イオンのみ上昇した。銀イオンの血球細胞への暴露では、0.25、0.5 mg/L で MXR 活性が上昇したが、えら細胞では 0.06 mg/L から上昇した。バルク銀ではえら細胞で 0.62 mg/L から MXR 活性が上昇した。Ag20-Mal ではえら細胞の 0.31 mg/L から MXR 活性が上昇した。 ・ Na-K-ATP アーゼ活性；えら細胞へ 3 種の銀を暴露していずれも Na-K-ATP アーゼ活性が低下した。酵素活性の低下は銀イオンでは 0.06mg/L から始まり、バルク銀では 5 mg/L から、Ag20-Mal では 1.25mg/L から始まった。 ・ アクチン細胞骨格形態；異なる銀による処理で血球細胞にアクチン細胞骨格形態の健全性の改変が認められた。バルク銀や Ag20-Mal と比較し、強い影響が銀イオンに見られた。 ・ 食細胞活性；血球食活動への影響はわずかであり、血球食活動の増加は 1.25 mg/L の Ag20-Mal に暴露したときだけに見られた。
結論	3 種の形態の銀はそれぞれ細胞毒性を示した。 マルトース安定化ナノ銀は市販のナノ銀より強い毒性を示し、それはサイズ依存性である。

No	Ag - 4
論文題目（和訳）	Mechanism of neutrophil activation and toxicity elicited by engineered nanomaterials （工業ナノ材料により起こる好中球活性化と毒性のメカニズム）
著者 所属機関	Helinor Johnston [a,ft], David M. Brown [a], Nilesh Kanase [a], Matthew Euston [b], Birgit K. Gaiser [a], Calum T. Robb [a,c], Elisabeth Dyrynda [a], Adriano G. Rossi [c], Euan R. Brown [b], Vicki Stone [a] [a] School of Life Sciences, Heriot-Watt University, Edinburgh EH14 4AS, United Kingdom, [b] Institute of Biological Chemistry, Biophysics and Bioengineering, School of Engineering and Physical Sciences, Heriot-Watt University, Edinburgh EH14 4AS, United Kingdom, [c]MRC Centre for Inflammation Research, Queen's Medical Research Institute, University of Edinburgh, Edinburgh EH16 4TJ, United Kingdom
書誌事項	Toxicology in Vitro 29 (2015) 1172–1184
試験物質	TiO2(NM101)、ZnO（NM110）、MWCNT（NM400）、Ag（NM300）は JRC から入手し、超微細カーボンブラック（ufCB）は Degussa から入手した。
試料調整法	Ag は 85%DIW－7%安定剤（硝酸アンモニウム）－8%分散剤で供給された。他のナノ材料は粉体で供給され、試験直前に 2%ウシ胎児血清中に入れ 1mg/ml の分散液とし、16 分間超音波撹拌を行った。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	ヒト HL60 細胞を、L-グルタミン（2mM）、ペニシリン（100U）、ストレプトマイシン（100μg/ml）、10%FCS 含有の RPMI 培養液で培養した。ナノ材料に暴露する前に 2 日間オール・トランストレチノン（1μM）を用いて、成熟好中球様細胞へと細胞分化させた。 ・ 細胞毒性試験； 細胞分化後、細胞を 1×10^5/well で種付け後、ナノ材料（Ag、TiO_2、MWCNT、ZnO）を最終濃度 1.9-125μg/ml（0.03-2μg/cm²）となるように 3 連で 96 ウェルプレートに添加した。ufCB はすでに試験したので、確認のため 15 と 31μg/ml のみ試験した。24 時間後、上澄み液を除去しアルマーブルー法で細胞生存率を調べた。 ・ サイトカイン産生； 事前試験でサイトカインの内、MCP-1 と IL-8 のみが影響を受けることを確認した。本試験では、細胞分化後、細胞を 1×10^5/well で種付け後、ナノ材料（Ag、TiO_2、または ufCB）50μl を亜致死濃度で 3 連で 4 または 24 時間 96 ウェルプレートに添加した。銀は 1/2×LC_{20}、LC_{20}、 2 ×LC_{20} 濃度（それぞれ 3.9、7.8、15.6μg/ml）とした。TiO_2 と ufCB は LC20 濃度に到達していなかったので、15.6、31.25、62.54μg/ml で試験した。暴露後の上澄み液のサイトカインを BD Biosciences cytometric bead flex set kit を用いて調べた。 ・ Ca^{2+}シグナル阻害物質と抗酸化物質トロロックスのナノ銀を媒介としたサイトカイン産生への影響； 細胞分化後、細胞を 2×10^6/well で種付け後、ナノ Ag 7.8μg/ml とともに 1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N0,N0-tetraacetic acid tetrakis (acetoxymethyl ester) (BAPTA-AM, 1 lM), verapamil (12.5 lM), または 1-[2-(4- Methoxyphenyl)-2-[3- (4-methoxyphenyl)propoxy] ethyl] imidazole,1-[b-(3-(4 - Methoxyphenyl)propoxy)-4-ethoxyphenethyl]-1H-imidazole hydrochloride (SKF96365, 5 lM)に 4 時間暴露した。これとは別に、細胞をトロロックスで 1 時間事前処理後、洗浄しナノ銀 7.8μg/ml に 4 時間暴露した。暴露後の上澄み液のサイトカインを BD Biosciences cytometric bead flex set kit を用いて調べた。 ・ Ca^{2+}シグナルへのナノ材料の影響； ① 細胞を Ag（1.9 または 3.9μg/ml）、ufCB（15 または 31μg/ml）、TiO_2（31μg/ml）に 1000 秒間暴露した。細胞内 Ca^{2+}を蛍光プローブ Fura-2 で測定し、最初と最後の平均 Ca^{2+}濃度を計算した。 ② 細胞分化後、細胞を濃度 1×10^6/ml でペトリ皿に種付け、24 時間後に電気生理学緩衝液で洗浄依した。Ag（1.9 または 3.9μg/ml）、ufCB および TiO_2（31μg/ml）を添加して、HEKA EPC7 を用いて全細胞電位固定法測定を行った。 ・ 過酸化陰イオン産生；

	呼吸破裂の指標である過酸化陰イオン産生をみるためにナノ材料暴露後の使途クローム c の低下を用いた。細胞分散液（2.5×10^5/well）、培養液または試験物質を 24 ウェルプレートに入れた。ナノ材料は亜致死濃度の、Ag（0.49、0.98、1.95、または 3.9μg/ml）、TiO_2 と ufCB（7.8、15.6、31.25μg/ml）とした。各ウェルに反応混合物（PBS 中 80μM シトクローム c、11mM デクストロース）900μ l を添加 4 時間後、暴露サンプルを 96 ウェルプレートに 3 連で移し、488nm と 550nm で吸収を測定した。 ・ナノ材料によって引き起こされるアポトーシス； 細胞分化後、細胞を 0.5×10^4/well で 96 ウェルプレートに種付け後、ナノ材料（Ag、（1.9、3.9、7.8、15.6μg/ml ）、TiO_2、と ufCB（15.6、31.25、125μg/ml）に 24 時間暴露した。アポトーシス細胞数を BD Pharmingen PE Annexin V アポトーシス検査キット と BD FACS Array で調べた。
試験結果	・ナノ材料の細胞生存率への影響； ZnO、Ag、MWCNT ナノ材料暴露後の細胞生存率は濃度依存的に減少した。TiO_2 は試験を行った濃度では細胞生存率に影響しなかった。毒性は Ag が一番強かった。各材料の LC_{50} は Ag/13μg/ml、ZnO/17μg/ml であったが、TiO2 と MWCNT は半数致死に至らなかった。 ・ナノ材料が媒介するサイトカイン産生； ナノ Ag は時間、濃度依存性で MCP-1 および IL-8 産生を引き起こす。IL-8 の有意な増加は暴露 4 時間後の濃度 7.8 と 15.6μg/ml で、暴露 24 時間後の濃度 3.9、7.8、15.6μg/ml で認められた。MC-1 の有意な増加は暴露 4、24 時間後の濃度 7.8μg/ml で認められた。 ・銀ナノ材料に暴露した細胞を Ca^{2+}シグナル阻害物質や抗酸化物質トロロックスに暴露した後のサイトカイン産生； ナノ銀（7.8μg/ml）と Ca^{2+}シグナル阻害物質（BAPTP-AM、ベラパミルまたは SKF96365）を同時に細胞に 4 時間暴露した結果、IL-8 および MCP-1 産生は Ca^{2+}シグナル阻害物質がないときより低減した。また、トロロックスによる事前処理によっても、IL-8 および MCP-1 産生の減少を確認した。 ・過酸化陰イオン産生； 3.9μg/ml ナノ銀への暴露 2 時間後に有意な過酸化陰イオンの産生が確認された。TiO_2 および ufCB ではどの濃度でも過酸化陰イオンは産生されなかった。 ・細胞内 Ca^{2+}濃度； TiO_2 では細胞内 Ca^{2+}濃度変化は認められなかったが、Ag と ufCB では時間、濃度依存の Ca^{2+}濃度上昇があった。有意な Ca^{2+}濃度上昇が Ag では最後の 100 秒に、ufCB では最初と最後の 100 秒とも認められた。 全細胞電位固定法測定により Ag（3.9mg/ml）添加後 2～5 分で内向き電流が認められ、その後細胞膜電流は定常的に増加した。 ・アポトーシス； 15.6μg/ml の AgNM への暴露 24 時間後に有意なアポトーシス細胞のパーセント上昇が認められたが、TiO2 と ufCB では認められなかった。光学顕微鏡観察により、AgMN への暴露で細胞の縮小と不健全なアポトーシスが観察された。 ・細胞活性化 NM 暴露後 2 時間の光学顕微鏡観察で TiO_2 はコントロールと差がないが、ufCB と Ag では細胞の活性化が見られた。
結論	Ag ナノ粒子は細胞内の Ca^{2+}と ROS 濃度の変化によって引き起こされる、時間および濃度依存の酸化、炎症プロセスを亢進する。反対に、ufCB の毒性は低く、サイトカイン産生や細胞死を伴わずに細胞内の Ca^{2+}を増加する。TiO_2 は他の試験したエンドポイントと同様に Ca^{2+}変化を引き起こさない。 ナノ材料の亜致死性毒性に支配的な役割を果たす Ca^{2+}は将来的にナノ材料のスクリーニングの新規アプローチ探求の可能性がある。

No	Ag-5
著者 所属機関	Anderson DS[1], Silva RM[1], Lee D[1], Edwards PC[1], Sharmah A[2], Guo T[2], Pinkerton KE[1,3,4], Van Winkle LS[1,3] [1]Center for Health and Environment,[2,3]School of Veterinary Medicine, [4]School of Medicine, University of California Davis, USA
論文題目 （和訳）	Persistence of silver nanoparticles in the rat lung: Influence of dose, size, and chemical composition. （肺内銀ナノ粒子の滞留性におよぼす投与量、粒子径、化学組成の影響）
書誌事項	Nanotoxicology. 2015;9(5):591-602. doi: 10.3109/17435390.2014.958116. Epub 2014 Sep 18.
試験物質	粒子径２種(20nm、110nm)、表面コーティング２種（クエン酸、ポリビニルピロリドン（PVP））の銀ナノ粒子、計４種類
試料調整法	試験物質：20nm と 110nm の銀ナノ粒子(nanoComposix, USA 製造) 粒子調整法：2mM、pH５のクエン酸緩衝液と PVP に懸濁 PVP 量：20nm：10kD PVP 33ug*/ml、110nm：40kD PVP 62ug*/ml 対照群：それぞれ懸濁したクエン酸緩衝液およびその濃度の PVP 溶液 DLS と TEM で粒子径を確認： DLS 結果：20nm-クエン酸 19.5nm、110nm-クエン酸 108.5nm（コアの銀の大きさ）
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	試験生物：Sprague-Dawley ラット 12 週齢 投与方法：気管内注入(麻酔下) 投与量：0.5 および 1.0mg/kg、注入液量が、1ul**/g 体重になるように調製 銀ナノ粒子の懸濁液は使用直前に５分間ソニケーターにかけ、分散。 試験期間：注入後、１、７、２１日後に各群６匹を安楽死 肺の処理：右肺から BALF 採取（生理食塩水 8ml×3 回）、左肺はパラホルムアルデヒ ドで固定（病理組織、肺内の銀の分布)評価 調査項目：右肺 BALF：総細胞数、死細胞数、マクロファージ(Mφ)数、銀を貪食した Mφ の割合、Mφ 中の銀の半定量、Mφ の TEM 観察（銀の評価には増感キットを利用） BAL 後の右中葉：沈着銀重量の定量(ICP-MS) 左肺組織：光学顕微鏡により経時的に銀の存在部位を評価（銀増感キット） 左肺終末細気管支：組織の銀の量を半定量 統計処理：STATISTICA 64 (MANOVA 法、PLSD 法他)　有意差は P<0.05
試験結果	○BALF 中の死細胞の割合は、対照群と曝露群で変わらなかった。 ○BALF 中の細胞で、銀を最も取り込んでいたのは Mφ であった。 ○BALF 中の Mφ 数の増加：20nm＞110nm (クエン酸、PVP とも) ○銀を貪食した Mφ の割合： １日目に増加、21 日目：すべて減少。PVP コーティングの粒子注入群で迅速に減少。1mg/kg 注入のクエン酸-20nm が最も割合が高い。 ○Mφ 中の銀の半定量： 21 日目では、銀を取り込んだ Mφ の割合と同様に、クエン酸-20nm が最も Mφ に取り込まれる量が多い。 ○Mφ の TEM 画像：取り込まれた銀は液胞中や、リソソーム内で確認。 ○BAL 後の右中葉の ICP-MS 分析：単位重量当たりの銀重量の 21 日までの滞留割合は、クエン酸-20nm で２％、クエン酸-110nm で９％、PVP-20nm で 91%、PVP-110nm で 71%。サイズにかかわらず、PVP 粒子の方がクエン酸粒子より、肺組織から速く排泄される。 クエン酸-20nm の粒子が、21 日後まで肺胞 Mφ 数の持続的増加という最も大きな影響を与え、それが肺組織の銀の滞留を引き起こしたと考えられる。 ○肺組織における銀の存在部位:1 日後:中枢気道に 110nm の粒子は少ない。20nm の粒子は気道上皮、繊毛上、クララ細胞内に多数存在。細胞内の銀はクエン酸-20nm で多い。すべての群で末梢の気道、終末細気管支、気管支肺胞領域の気道上皮、クララ細胞、上皮下の基底膜ゾーンに銀が多く確認された。上皮下の基底膜ゾーンおよび基底膜ゾーンの組織 Mφ 内の銀の存在は、20nm＞110nm。 ７日後：すべての群で、大きな気道や末梢の肺胞に、銀はほとんどなく、終末細気管支の基底膜ゾーン、肺胞 Mφ、気管支肺胞管接合部に隣接した肺胞に粒子を多数確認。粒子は、血管内皮にも認められた。 ○終末細気管支領域の組織の銀の半定量：注入後組織の銀は減少し、すべての群で 21 日目には銀はほとんど認められなかった。

結論	銀ナノ粒子の投与量(0.5,1.0mg/kg)、粒子径(20,110nm)、表面コーティング(クエン酸、PVP)を変えて、ラットに気管内注入を行った結果、PVP コーティングの粒子はクエン酸コーティングの粒子に比較して、BALF 中の Mφ 中の銀は急速に減少し、肺組織からも迅速に排泄されていた。また、110nm の粒子の方が 20nm の粒子より中枢気道から迅速に排泄された。終末細気管支に存在していた銀は、初期は表面の上皮細胞に存在していたが、7 日後には、基底膜内に顕著に存在した。

No	Ag - 6
論文題目（和訳）	Effects of subchronic exposure of silver nanoparticles on intestinal microbiota and gut-associated immune responses in the ileum of Sprague-Dawley rats （銀ナノ粒子の亜慢性暴露によるSprague-Dawleyラットの回腸内の腸内微生物と腸に関係する免疫反応への影響）
著者 所属機関	Katherine Williams[1*], Jessica Milner[1*], Mary D. Boudreau[2], Kuppan Gokulan[1], Carl E. Cerniglia[1], and Sangeeta Khare[1] [1]Division of Microbiology and [2]Division of Biochemical Toxicology, National Center for Toxicological Research, Jefferson, AR, USA
書誌事項	Nanotoxicology, 2015; 9(3): 279–289
試験物質	クエン酸安定化 AgNP（10、75、110nm、NanoComposix）、AgOAC
試料調整法	AgNP は 0.1%CMC の 2mM クエン酸ナトリウムに分散させた。 AgOAC は 0.1%MC 水に溶解させた。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	オスとメスの Sorague-Dewley ラット、13 週齢。 9、18、36mg/kgBW/日の AgNP および 100、200、400mg/kgBW/日の AgOAC を 10 匹ずつのグループに経口投与した。投与は 1 日 2 回、7 日/週で 13 週間行った。動物は最終投与の翌日に殺処分した。 ・ 回腸粘膜菌へのナノ粒子の抗菌作用 総菌数および乳酸菌を数えるため、粘膜ホモジェネートを羊血寒天培地および乳酸菌-MRS 寒天培地に加えた。両培地は 37℃で 48 時間培養、乳酸菌コロニーはさらにリアルタイム PCR で確認した。 ・ バクテリアコロニーまたは回腸組織からの DNA 抽出 バクテリアまたは組織の溶解液サンプルはビーズビーティングにより準備した。溶解液はプロティナーゼ K とともに 65℃、20 分間、RNAse-A とともに 37℃、15 分間、培養した。溶解液を遠心分離後、液相に酢酸ナトリウムを加え、DNA を析出させた。 ・ バクテリア同定のためのリアルタイム PCR リアルタイム PCR を用いて、DNA の優勢形質を測定した。 ・ RNA 抽出と宿主遺伝子発現解析 ラットの回腸組織から Trizol 反応液を用いて、抽出した。
試験結果	**AgOAC 暴露後の回腸内の代表的バクテリア集団** ・ 回腸粘膜バクテリア集団培養の解析 サイズと量に依存する抗微生物影響が認められた。 オスのラットでは、10nm、75nm ですべての投与量で抗微生物影響が認められたが、110nm では、低投与量で抗微生物影響が認められた。 メスのラットでは、10nm のすべての投与量で高い有意な抗微生物影響が認められ、75nm では低投与量で影響が認められ、110nm では低、中投与量で有意な影響が認められた。 100mg/kgBW の AgOAC（陽性対象）投与の CFU は 10nmAGNP の低投与と同等であった。 ・ ファミキューテスとバクテロイデスの比率 AgNP と AGOAC の投与はファミキューテス（グラム陽性菌）とバクテロイデス門（グラム陰性菌グループ）の比率を変化させる。10nm AgNP の経口投与で、ほとんどの投与量でファミキューテスの減少を示した。オスへの 75nm、110nm の AgNP 投与でバクテロイデス門への影響が見られた。110nm の高投与でおす、メスともにファミキューテスとバクテロイデス門の比率の有意な変化が見られた。 ・ バクテロイデス門、乳酸菌、ビフィズス菌の相対的定量化 10nm と 75nm の AgNP 投与でほとんどの実験動物で乳酸菌群の比率の低下が見られた。110nm の高投与ではオス、メスともバクテロイデス門の比率上昇が認められた。75nm と 110nm の低量投与ではビフィズス菌が大きく上昇した。オスへの AgOAC 投与ではビフィズス菌が全くなくなった。 ・ 腸内細菌ファミリー特異的遺伝子の相対的発現 AgOAC 投与のラットで腸内細菌ファミリー特異的遺伝子発現の増加が見られた。サイズと投与量依存の変化が認められ、特にメスで顕著であった。 ・ AgOAC 暴露による腸内の宿主遺伝子発現への影響 AgNP の投与は回腸の MUC2 発現にはほとんど影響しないが、MUC3 を迅速

	に低下させる。腸内の微生物関連の遺伝子（TLR2、TLR4、NOD2）は AgNP 投与で低下傾向を示すが、性差と投与量により有意に異なる。ナノ粒子の投与は、T 細胞制御に係る遺伝子（FOXP3、GPR43、IL-10、TGF-β）発現の低下を促進させ、特に低、中量投与で顕著となる。AgNP の高投与の反応は AgOAC と同じである。遺伝子発現変化への一番影響があるのは投与量であり、低投与量の時に影響が大きい。ナノ粒子のサイズも影響因子である。また、性差の影響も顕著である。一般的に AgNP への暴露は遺伝子発現の低下を引き起こすのに対し、AgOAC と溶媒対象は変化なしかやや上昇を示す。このことから、本研究での遺伝子発現反応はナノ粒子特有のものと考えられる。
結論	本研究は AgNP の摂取が、腸内微生物や宿主遺伝子への影響を含む腸内健康へ影響を与えることを示した。

<table>
<tr><td>No</td><td>Ag - 8</td></tr>
<tr><td>論文題目（和訳）</td><td>Identification of the appropriate dose metric for pulmonary inflammation of silver nanoparticles in an inhalation toxicity study
（銀ナノ粒子の吸入毒性試験における適正な投与計測単位の特定）</td></tr>
<tr><td>著者
所属機関</td><td>Hedwig M. Braakhuis[1,2], Flemming R. Cassee[2,3], Paul H.B. Fokkens[2], Liset J.J. de la Fonteyne[2], Agnes G. Oomen[2], Petra Krystek[4], Wim H. de Jong[2], Henk van Loveren[1,2], and Margriet V.D.Z. Park[2]

[1]Department of Toxicogenomics, Maastricht University, Maastricht, The Netherlands, [2]Centre for Health Protection, Centre for Sustainability, Environment and Health, Centre for Safety of Substances and Products, National Institute for Public Health and the Environment (RIVM), Bilthoven, The Netherlands, [3]Environmental Epidemiology, Institute of Risk Assessment Sciences, Utrecht University, TD Utrecht, The Netherlands, and [4]Philips Innovation Services, Eindhoven, The Netherlands</td></tr>
<tr><td>書誌事項</td><td>Nanotoxicology, Early Online: 1–11</td></tr>
<tr><td>試験物質</td><td>銀粒子（15-20、30-35、60-65nm）は Palas GFG 1000 スパーク発生器で銀電極を用いて製造、銀粒子（80nm）は NanoComposik から 1mg/ml の MilliQ 水溶液で購入。</td></tr>
<tr><td>試料調整法</td><td>銀粒子（15-20、30-35、60-65nm）は Palas GFG 1000 スパーク発生器で銀電極を用いて製造、HEPA フィルターでろ過した清浄空気と混合してエアロゾルとする。
銀粒子（80nm）は NanoComposik から 1mg/ml の MilliQ 水溶液で購入、スプレーから噴霧し、空気共にヒーター部を通過させ水分を除いた。
吸入試験での銀粒子のサイズと濃度は以下である。
<table>
<tr><td>ｱｸﾞﾛﾒﾚｰﾄｻｲｽﾞ（nm）</td><td>質量濃度（μg/m³）</td><td>個数濃度（#/ m³）</td><td>表面積（nm²/cm³）</td></tr>
<tr><td>18.1</td><td>438</td><td>1.3×10^{7}</td><td>1.4×10^{9}</td></tr>
<tr><td>34.5</td><td>325</td><td>6.6×10^{7}</td><td>5.4×10^{9}</td></tr>
<tr><td>60.3</td><td>341</td><td>3.6×10^{7}</td><td>3.2×10^{9}</td></tr>
<tr><td>160</td><td>1109</td><td>5.3×10^{7}</td><td>1.4×10^{9}</td></tr>
</table></td></tr>
<tr><td>試験生物
投与方法・ 期間
試験用量</td><td>10 週齢のオスのフィッシャーラット（F344/DuCrl、SPF）
・ 投与—レスポンスデータ取得の吸入試験
3 ラット/グループに、1 日当たり 45 分、90 分、3 時間または 6 時間、4 日連続で清浄空気または 18、34、60 または 160nm の銀粒子を鼻部吸入させた。吸入終了後 24 時間後に屠殺して、肺毒性と組織分布を調べた。
・ 銀の残留性試験
5 ラット/グループに、1 日当たり 6 時間、4 日連続で清浄空気または 18、34、60 または 160nm の銀粒子を鼻部吸入させた。吸入終了後 7 日後に屠殺した。</td></tr>
<tr><td>試験結果</td><td>**HR-ICP-MS による肺と肝臓中の銀の定量**
吸入後 24 時間の肺と肝臓の残量は濃度依存（暴露時間依存）で増えた。最高濃度（最長暴露；6 時間/日）での残量は、25.5μg（18nm）、33.0μg（34nm）、40.0μg（60nm）、46.1μg（160nm）であった。吸入後 7 日では、16.1μg（18nm）、20.6μg（34nm）、18.7μg（60nm）、38.7μg（160nm）に減少した。肝臓中には、24 時間後に、0.52μg（18nm）、0.75μg（34nm）、0.71μg（60nm）、0.24μg（160nm）であった。吸入後 7 日では、0.07μg（18nm）、0.31μg（34nm）、0.17μg（60nm）、0.17μg（160nm）に減少した。
MPPD（Multiple Path Particle Dosimetry）モデルによる肺蓄積量の推定
MPPD モデルによると、吸入銀ナノ粒子の気管と肺胞への沈着率は、0.66（18nm）、0.5（34nm）、0.37（60nm）、0.39（160nm）である。肺胞への沈着率は 0.28（18 および 34nm）、0.22（60nm）、0.10（120nm）である。暴露濃度および ICP-MS 測定値を MPPD モデルと組み合わせて求めた、暴露 24 時間後の銀ナノ粒子の肺胞沈着量は以下となる。
<table>
<tr><td>粒子サイズ（nm）</td><td>質量（μg）</td><td>個数（個/cm³）</td><td>表面積（nm²/cm³）</td></tr>
<tr><td>18</td><td>11</td><td>2.1×10^{11}</td><td>2.2×10^{14}</td></tr>
</table></td></tr>
</table>

34	19	5.3×10^{10}	1.9×10^{14}
60	24	1.2×10^{10}	1.4×10^{14}
160	12	4.1×10^{8}	3.3×10^{13}

血液検査
血中の計測パラメータ（赤血球、白血球、白血球分画、血小板と網状赤血球、ヘモグロビン、ヘモトクリット、MCV、 MCH、MCHC）は暴露後、24 時間、7 日とも変化がなかった。

BALF 中細胞数
暴露後 24 時間で、BALF 中の総細胞数は濃度依存的に増加した。細胞数の増加は好中球によるものが主であり、各サイズとも濃度依存的に増加した。18nm および 36nm サイズではリンパ球と単球も濃度依存で増加したが、60nm と 160nm では増加しなかった。マクロファージと好酸球の数は影響されなかった。
暴露 7 日で、総細胞数は暴露 24 時間後より低下したが、60nm ではコントロールと比較して有意に多かった。好中球数も暴露 24 時間後より低下したが、34nm と 60nm ではコントロールと比較して有意に多かった。リンパ球数も 34nm と 60nm ではコントロールと比較して有意に多かった。マクロファージと好酸球の数は影響されなかった。
この結果は、34nm と 60nm で炎症が長引くことを示す。

BALF 中の LDH と総蛋白数
18nm と 34nm に暴露 24 時間後で、濃度依存的に BALF 中の LDH と総蛋白数が増加しており、肺の細胞の損傷が起こっていることを示す。60nm と 160nm ではこの変化は起きなかった。7 日後には LDH と総蛋白は低下した。34nm の LDH はコントロールと比較して有意に多かったが、総蛋白は有意な変化レベルではなかった。

BALF 中の炎症誘発サイトカイン
IK-1β、TNF-α、MCP-1、RANTES はすべてのサイズで濃度依存的な増加をし示した。IL-6、IL12p70、GM-CSF は検出限界以下であった。MIP-2 は検出されたが、暴露との関連はなかった。

肺の酸化ストレス
酸化ストレスの指標であるグルタチオンレベルはコントロールと差がなかった。

投与の単位
試験条件で有意な差を示す暴露 24 時間後の BALF の総細胞数、好中球数、IL-1β、MCP-1 を用いて影響を表すのに最適な投与量の単位を検討した。図示した結果、表面積が一番オーバーラップしており、銀ナノ粒子の肺への影響を示す投与量単位に最適である。

結論	本研究の結果では、銀ナノ粒子短期吸入影響を表す最適な投与の単位は表面積である。表面積は銀ナノ粒子の急性毒性評価や暴露限界を定めるのに用いることができるであろう。

<table>
<tr><td>No</td><td>Ag - 9</td></tr>
<tr><td>論文題目（和訳）</td><td>Influence of Particle Size on Persistence and Clearance of Aerosolized Silver Nanoparticles in the Rat Lung
（ラットの肺中へのエアロゾル銀ナノ粒子の残留と排出への粒子サイズの影響）</td></tr>
<tr><td>著者
所属機関</td><td>Donald S. Anderson*, Esther S. Patchin*, Rona M. Silva*, Dale L. Uyeminami*, Arjun Sharmah†, Ting Guo†, Gautom K. Das‡, Jared M. Brown§, Jonathan Shannahan§, Terry Gordon¶, Lung Chi Chen¶, Kent E. Pinkerton*,jj,jjj, and Laura S. Van Winkle*,jj,1

*Center for Health and the Environment, †Department of Chemistry, ‡Department of Mechanical and Aerospace Engineering, University of California Davis, Davis, California 95616, §Skaggs School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, University of Colorado, Anschutz Medical Campus, Aurora, Colorado 80045, ¶Department of Environmental Medicine, Langone Medical Center, New York University, Tuxedo, New York 10987, jjDepartment of Anatomy, Physiology and Cell Biology, School of Veterinary Medicine, University of California Davis, Davis, California 95616 and jjjDepartment of Pediatrics, School of Medicine, University of California Davis, Sacramento, California 95817</td></tr>
<tr><td>書誌事項</td><td>TOXICOLOGICAL SCIENCES, 144(2), 2015, 366–381</td></tr>
<tr><td>試験物質</td><td>20nm と 110nm の AgNP の 1.0mg/ml のクエン酸安定化溶液（nanoComposix 社製）</td></tr>
<tr><td>試料調整法</td><td>噴霧器で上記溶液をエアロゾル化、乾燥、電荷除去後ラットに吸入させる。</td></tr>
<tr><td>試験生物
投与方法・ 期間
試験用量</td><td>13 週齢のオスの Sprague Dawley ラット
20nm、110nm、クエン酸（コントロール）をラットに 6 時間、鼻部吸入させる。
ラットは 0、1、7、21、56 日後に屠殺した。
暴露条件は以下。
<table>
<tr><td></td><td>ｸｴﾝ酸ﾊﾞｯﾌｧｰ液</td><td>20nmAGNP</td><td>110nmAGNP</td></tr>
<tr><td>金属質量濃度（XRF）
(mg/m3)</td><td>NA</td><td>7.2±0.8</td><td>5.3±1.0</td></tr>
<tr><td>質量濃度（重量測定）
(mg/m3)</td><td>5.0±1.7</td><td>13.9±2.3</td><td>12.4±2.5</td></tr>
<tr><td>SMPS サイズ（nm）</td><td>76.6 (SD1.8)</td><td>77.4 (SD1.8)</td><td>78.2 (SD1.8)</td></tr>
<tr><td>SMPS 個数濃度（個/㎤ 3）</td><td>1.8×10^6
$\pm0.2\times10^6$</td><td>2.2×10^6
$\pm0.4\times10^6$</td><td>1.3×10^6
$\pm0.3\times10^6$</td></tr>
<tr><td>DLS 流体力学径（nm）</td><td>NA</td><td>27.24±0.21</td><td>106.6±0.2</td></tr>
</table></td></tr>
<tr><td>試験結果</td><td>**AgNP のマクロファージによる排出**
暴露 1 日後の BALF 中のマクロファージは 40%（20nm）と 50%(110nm)減少した。暴露 7 日後に、20nm では暴露 1 日後に、コントロールと比べ有意に上昇したが、110nm ではコントロールと比較し差異が見られなかった。暴露後、21 日および 56 日には 3 種で差異はなくなった。
暴露後 1 日に銀含有マクロファージは 20nm で 64%の最高値を示し、110nm では有意に低い 52%であった。暴露 7 日後にはそれぞれ 22%と 19%へと有意に低下した。暴露後 7 日から 56 日まで 20nm では有意な変化はなかったが、110nm では低下し続け 56 日では 1.5%まで低下した。
さらに、銀ステイン程度を軽中重度に重みづけた銀負荷スコアでは 110nm への暴露は 20nm への暴露に比較して有意に小さかった。暴露 1 日後の銀含有マクロファージは 20nm と 110nm でそれぞれ 64%と 52%と有意ではあるものの差は小さかったが、銀負荷スコアではそれぞれ 6.0 と 3.3 と 45%の差があり、20nm の方が多くの粒子を含むことが示唆される。暴露後 1 日から 56 日までの銀負荷スコアは 110nm で 96%の低下であったが、20nm では 69%に過ぎなかった。
肺組織中の銀
肺葉および気管を ICP-MS、左肺葉の組織をオートメタログラフィー（autometallography）を用いて、銀の分布を調べた。6 時間の暴露直後の銀の空間的分布は両 AgNP で差がなかった。ICP-MS による右肺葉中央部組織中の銀の測定値は 1.66μg/g（20nm）と 1.57μg/g（110nm）であり、胸部気管全体の銀の計算値は 321ng（20nm）と 357ng（110nm）であった。1 日後に 20nm の残</td></tr>
</table>

	存量は有意に低下した。7 日後は 20nm、110nm ともに有意に低下したが、21 日後と 56 日後は低下傾向にはあるが 7 日後と比べ有意ではない。 オートメタログラフィーを用いた分布調査では、どのタイミングでも気管に銀は認められなかった。1 日後では、両ナノ粒子とも肺胞管分岐部では銀は主としてマクロファージに認められ、まれに上皮にも認められた。7 日後には、銀含有マクロファージが存在するが、細気管支や肺胞管端末の基底膜にも銀が認められた。基底部の銀は 21 日後にもっとも多く、56 日後に減少はするがまだ存在した。 **暗視野像とハイパースペクトラルイメージングによる AgNP の位置特定** マクロファージに貪食されるた 20nm と 110nm の AgNP は、水分散の AgNP と比較して、スペクトルが「赤色」方向へシフトする。これはマクロファージ内蛋白が付くためと考えられる。さらに確認のため AgNP を ALF 中で 24 時間培養した結果、同様の「赤色」シフトが確認された。 **マクロファージ TEM** BALF から回収したマクロファージの TEM 観察で 20nm および 110nm の AgNP から生じた約 100nm の小球の銀粒子が観察された。
結論	本研究で吸入した 20nm と 110nm の AgNP は暴露 56 日後も 30%以上が肺中に残存することを示した。また、BALF マクロファージで 20nm では暴露 1 日後に銀含有量が大きい多くのマクロファージが見られ、また、21 と 56 日後には銀含有量は小さいが銀を含む多くのマクロファージが見られた。さらに、銀のサイズに関係なく、気管支/肺胞管端末分岐部の組織中に銀が含まれることを確認した。この研究で、マクロファージによる排出がサイズに影響されるが、肺中の長期残留への影響は小さいことを示唆した。

No	Ag - 10
論文題目（和訳）	Difference in the toxicity mechanism between ion and nanoparticle forms of silver in the mouse lung and in macrophages （マウスの肺とマクロファージにおける銀イオンとナノ銀粒子の毒性メカニズムの違い）
著者 所属機関	Yuta Arai [a], Takamitsu Miyayama [b,c], Seishiro Hirano [a,b,*] [a] Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University, Japan [b] Environmental Nanotoxicology Project, RCER, National Institute for Environmental Studies, Japan [c] Department of Hygiene and Public Health I, School of Medicine, Tokyo Women's Medical University, Japan
書誌事項	Toxicology 328 (2015) 84–92
試験物質	異なるウシリンパ液中の粒子安定性試験は、ポリビニルピロリドンでコートされた AgNP（＜100nm、Sigma-Aldrich）を使用。 *in vitro* および *in vivo* 試験には、20、60、100nm のクエン酸被覆 AgNP（nanoComposix）を使用。
試料調整法	**ウシリンパ液溶液での安定性** AgNP を 10%アルブミン溶液中に超音波 30 分で分散させ、希釈した。ウシリンパ液 0、0.1、1、2%中の AgNP を TEM で観察。 ***In vitro*、*in vivo* 試験** クエン酸被膜 AgNP 溶液を乾燥後、10%アルブミン溶液に再分散させた。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	**ウシリンパ液溶液での安定性細胞毒性** ウシリンパ液 0、0.1、1、2%中の AgNP を TEM で観察。 **気管内注入試験** オスの SPF ICR マウス（6 週齢） ① BAL 調査 3 匹/グループのマウスに 50μL の溶媒（コントロール）、10μgAg/匹の 20nmAgNP 分散液または $AgNO_3$ 溶液を気管内注入し、4 時間後、24 時間後に屠殺し、BAL を調べた。 ② 8 匹/グループのマウスに 50μL の溶媒（コントロール）、10μgAg/匹の 20nmAgNP 分散液または $AgNO_3$ 溶液を気管内注入し、4 匹/グループを 4 時間後に屠殺し、残りの 4 匹/グループは 24 時間後の全採血の前に尿を採取した。 **J744.1 細胞試験** ① 細胞内、細胞小器官の銀濃度 J774.1 細胞を、100mm 培養皿を用いて 1%アルブミンの PRMI1640 培養液中で 1.0μg/ml の AgNOs または AgNP に 3 時間爆露。細胞を回収し、溶解部および不要部中の Ag 濃度を ICP-MS で測定した。 ② J774.1 細胞を 35mm 培養皿を用いて 1%アルブミンの PRMI1640 培養液中で 10μg/ml の AgNOs または AgNP に 3 時間爆露。細胞を回収し、共焦点レーザー顕微鏡で蛍光像を得た。
試験結果	**ウシリンパ液溶液での安定性** アルブミンがないとき、AgNP の径は時間とともに変化する。1%アルブミンで AgNP の径は比較的安定しているが、呼称径よりは大きい。 **細胞毒性** 20、60、100nm の AgNP の細胞毒性 EC50 は、それぞれ 38.4、27.9、51.8μg/mL であった。AgNO3 の細胞毒性 EC50 は 4.51μg/mL と毒性は AgNP より強い。 **気管内注入試験** 10μg の目標投入量に対し、気管内への実投入量は $AgNO_3$ で 10.3μg、AgNP で 7.5μg であった。 投与後 4 時間で、AgNP では肝臓内の Ag はトレースであったが、$AgNO_3$ では投与量の 7%が肝臓から回収された。投与後 24 時間で、肝臓重量は、$AgNO_3$ 投与で有意に低下したが、AgNP とコントロールでは変化なく、$AgNO_3$ の早い移動が肝臓にダメージを与えることを示唆する。$AgNO_3$ 処理、AgNP 処理とも尿中に銀は検出されなかった。4 時間後、24 時間後ともに、AgNP 処理の肺組織中の銀濃度は $AgNO_3$ 処理と比較して有意に高かった。BALF 中細胞の銀濃度は $AgNO_3$ 処理の方が予想される通り有意に高かった。気管内投与後 4 時間と 24 時間の BALF 中の総細胞数と好中球数は、$AgNO_3$、AgNP とも増加した。好中球

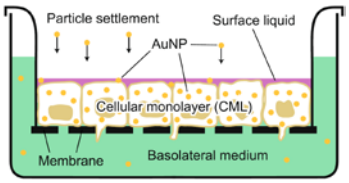
	数は $AgNO_3$ 処理の方が AgNP 処理より有意に多かった。BALF 中 IL-1β は両処理とも 24 時間後にほんのわずかに増加した。4 時間後では、BALFIL-1β は $AgNO_3$ 処理の方が AgNP 処理より低かった。 **J744.1 細胞試験** $AgNO_3$ 処理の J744.1 の細胞溶解物に溶解性割合が不溶性割合より多いのに対し、AgNP 処理では、不溶性割合が溶解性銀割合より多い。溶解性部の Ag の化学種を HPLC-ICP-MS で調べたところ、3 時間で $AgNO_3$ 処理ではメタロチオネイン結合（Ag-MT）が認められたのに対し、AgNP 処理では認められなかった。細胞レベル下の AgNP の分布を共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、10μg/ml の 20nm の AgNP に 24 時間暴露後の J744.1 中で銀がアグロメレートし、リソゾーム中に蓄積するのが認められた。
結論	Ag イオンは速やかに肺から他の臓器に移動し、肺中で $AgNO_3$ は AgNP より好中球の浸潤を引き起こす。J774.1 細胞に対し、AgNP の細胞毒性は $AgNO_3$ より低い。J744.1 細胞に対し、$AgNO_3$ は MT を誘導するのに対し、AgNP はリソゾームに蓄積し MT 合成を引き起こさない。

（ケ） Au

No	Au - 1
論文題目 （和訳）	The effects of intraperitoneal administration of gold nanoparticles size and exposure duration on oxidative and antioxidants levels in various rat organs （腹腔内投与した金ナノ粒子のサイズと暴露期間のラットの器官の酸化と抗酸化物質レベルへの影響）
著者 所属機関	Mohamed Anwar Kassem Abdelhalim1*, Mohammed Suliman Al-Ayed1 and Sherif Abdelmottaleb Moussa2 1Physics and Astronomy, King Saud University, College of Science, Riyadh, Saudi Arabia 2Al Imam Mohammad Ibn Saud Islamic University (IMSIU), College of Science, Department of Physics, Riyadh, Saudi Arabia
書誌事項	Pak. J. Pharm. Sci., Vol.28, No.2(Suppl), March 2015, pp.705-712
試験物質	0.01%の 10nm　金ナノ粒子 GNP（MK Impex 社（カナダ））、TEM による実測定は 9.45±1.33nm。
試料調整法	水に懸濁
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	オスの Wistar-Kyoto ラット（230±20g） 50μ l /日を 3 日または 7 日間腹腔注入。最終注入後 24 時間で屠殺。
試験結果	**Gpx（グルタチオン過酸化物）** Gpx を Beutler 法（1971 年）で測定した。暴露 3 日および 7 日でラットの肝臓中 Gpx レベルは有意に増加した。 **GR（グルタチオンレダクターゼ）** GR を Goldberg と Spooner 法（1983 年）で測定した。GR は Gpx の基質であり、Gpx が増加するとき、GR は減少する。暴露 3 日および 7 日でラットの肝臓、腎臓、肺組織で GR レベルは有意に減少した。 **抗酸化能** 抗酸化能を Randox Laboratries 社製の測定キットで測った。暴露 3 日および 7 日でラットの肝臓、腎臓、肺組織で、生体内の抗酸化物質の状態を示す抗酸化能レベルは有意に増加した。 **GSH（還元グルタチオン）** GSH を Detect X®社のグルタチオン比色キットで測定した。暴露 3 日および 7 日でラットの肝臓、肺、心臓、腎臓で GSH レベルは有意に増加した。 **SOD（活性酸素消去酵素）** SOD[を Paolleti ら（1986）の分光光度法により測定した。暴露 3 日および 7 日でラットの肝臓、腎臓、肺組織で SOD レベルは有意に減少した。 **MDA（マロンジアルデヒド）** MDA を Del Rio ら（2003）に記載された方法により測定した。暴露 3 日および 7 日でラットの肝臓、肺、心臓、腎臓で MDA レベルは有意に増加した。このことは、遊離酸素または ROS の産生増加を示唆する。
結論	3 日間および 7 日間、10nmGNP を腹腔注入するとラット器官中の Gpx、抗酸化能、GSH、MDA レベルが有意に増加した。Gpx 酵素は過酸化物をグルタチオンを使ってアルコールへと低下させ、遊離酸素の形成を阻害する。 3 日間および 7 日間、10nmGNP を腹腔注入するとラット器官中の GR および SOD は有意に低下した。SOD は過酸化陰イオン（O_2^-）を過酸化水素と分子酸素に不均化の触媒作用をする。GR は GDDG（酸化グルタチオン）を GSH に還元するもので、多くの器官に認められ、細胞の GSH を適正レベルに維持する。

No	Au-2
著者 所属機関	Han SG[1], Lee JS[2], Ahn K[3], Kim YS[4], Kim JK[5], Lee JH[5], Shin JH[2], Jeon KS[3], Cho WS[6], Song NW[7], Gulumian M[8], Shin BS[9], Yu IJ[5]. [1]Toxicology laboratory, College of Animal Bioscience and Technology, Konkuk University, [2]Korea Workers' Compensation Welfare Service, [3]Hanyang Univ., [4]Korea Ginseng Corporation, [5]Hoseo Univ., [6]Dong-A Univ., [7]Korea Research Institute of Standards and Science, [8]NIOH of South Africa, [9]Catholic Univ. of Daegu, Korea
論文題目 （和訳）	Size-dependent clearance of gold nanoparticles from lungs of Sprague-Dawley rats after short-term inhalation exposure. （金ナノ粒子を短期吸入曝露した SD ラット肺から排泄される粒子の径依存性）
書誌事項	Arch Toxicol. 2015 Jul;89(7):1083-94. doi: 10.1007/s00204-014-1292-9. Epub 2014 Jun 17.
試験物質	金ナノ粒子２種類 13nm と表記：TEM 測定：CMD12.8nm（GSD1.14）、OECD 標準物質 NM-330(TMU14G) 105nm と表記：　　CMD105.4nm（GSD1.29）、TMU95G
試料調整法	１％クエン酸溶液に Au 粒子を分散、溶解した Au は 0.002%(低溶解性)
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	試験生物：Sprague-Dawley ラット（開始６週齢） 　対照群、13nm 曝露群、105nm 曝露群の３群（各群２４匹） 投与方法：鼻部曝露（金ナノ粒子はアトマイザーで発生） 投与期間：１日６時間、５日間、曝露後の観察時期：１、３、２８日 曝露濃度：13nm:12.8±2.42ug*/m^3、105nm:13.7±1.32ug*/m^3、対照群は清浄空気 粒子数濃度：13nm:4.61±0.873×10^5 個/cm^3、105nm:1.58±0.152×10^3 個/cm^3 　重量濃度と TEM 粒径分布から単分散と仮定して算出(クエン酸粒子の影響を除外) 全粒子数濃度：曝露は安定（13nm:1.97±0.0167×10^6 個/cm^3、105nm:1.06±0.0282×10^6 個/cm^3）。
試験結果	○曝露期間中に曝露群で体重の減少が認められたが、有意ではなかった。 ○粒子曝露により毒性反応はなし。 ○粒子の毒物動態学的評価：肺、肝臓、腎臓、脾臓、脳、精巣、血液中（マイクロウェーブ酸分解後、原子吸光法で定量）：サイズにかかわらず、ほとんどの粒子は肺に沈着。肺１ｇ当たりの粒子の肺からの排泄半減期は 13nm：44.5 日、105nm:179.5 日で、 小さい粒子の方が排泄が速い。 肺以外の臓器：小さな粒子：１日後の肝臓、脾臓、脳、精巣、血液中で有意な増加、３、２８日後は脾臓のみ有意な増加。大きな粒子は、１日後の血液中にのみ有意な増加。他臓器への移行は、小さい金ナノ粒子の方が多い。 ○病理組織評価：病理組織的には粒子曝露による特異的な変化は認められなかったが、両曝露群でわずかな肺胞の肥厚が 1、3、28 日後に認められた。肺胞腔や Mφ 中に存在している粒子をハイパースペクトラルイメージングにより確認。
結論	肺に沈着した金ナノ粒子は、小さな粒子の方が大きな粒子より肺から速く排泄され、他の臓器へ移行する。 ハイパースペクトラルイメージングシステムは、病理組織中の粒子の存在を明らかにするのに有効である。 本実験は、５日の吸入曝露試験が、吸入した金ナノ粒子の臓器への分布を明らかにするための有効な方法であることを示した。

No	Au - 3
論文題目（和訳）	Small-sized gold nanoparticles inhibit the proliferation and invasion of SW579 cells （金の小粒子は SW579 細胞の増殖と浸潤を阻害する）
著者 所属機関	QINGQING ZHANG, YONGMEI MA, SHUFANG YANG, BANGKUI XU and XIAOQIANG FEI Department of Endocrinology, Taizhou People's Hospital, Taizhou, Jiangsu 225300, P.R. China
書誌事項	MOLECULAR MEDICINE REPORTS 12: 8313-8319, 2015
試験物質	クエン酸還元法で作成した Au ナノ粒子。粒子径 5、10、20、40、50、60nm
試料調整法	
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	10%ウシ胎児血清含有 RPMI-1640 媒体中の SW579 甲状腺癌腫細胞を 50μg/ml の Ag-NP に 24 時間暴露。
試験結果	**Au-NP の取り込み** 5、10、20、40、50、60nm の Au-NP で 24 時間処理後の細胞を TEM で観察した。ほとんどの粒子は、細胞内の小胞または核周辺部に認められた。 **CCK-8 試験** 5、10nm の Au-NP のみが生存を阻害し、アポトーシスを亢進した。さらに、5nm Au-NP のみが G0/G1 期の細胞周期停止を引き起こした。20-60nm の Au-NP は生存性、アポトーシス、細胞周期に何らの影響も与えなかった。 **Transwell 試験** 5nm と 10nm の Au-NP は細胞浸潤を抑制したのに対し、20-60nm は細胞浸潤に有意な影響を与えなかった。この結果、細胞浸潤はサイズ依存の影響がある。 **RT-qPCR 分析** 5nm と 10nm の Au-NP は MMP2 と MMP9 の mRNA 発現を顕著に低下させたのに対し、20-60nm の Au-NP では有意な影響はなかった。 **ウェスタンブロッド分析** 5nm の Au-NP は MMP2 の蛋白質発現を有意に低下させ、タンパク発現の MMP9 をやや低下させた。10nm は MMP2 と MMP9 の蛋白質発現を有意に低下させた。一方、20-60nm は有意な差を起こさなかった。
結論	異なるサイズ（5、10、20、40、50、60nm）の Ag-NP を用いて、甲状腺癌腫細胞の増殖、生存、浸潤に対する抑制効果のサイズ依存性を調べた。5nm と 10nm のみが SW579 細胞の増殖と浸潤を抑制し、これは MMP2 と MMP9 の発現低下が寄与していることが示唆された。

No	Au - 4
論文題目 （和訳）	Translocation of gold nanoparticles across the lung epithelial tissue barrier: Combining in vitro and in silico methods to substitute in vivo experiments （肺の上皮組織を通過する金ナノ粒子の移動：*in vivo*試験代替の*in vitro*と*in silico*法の組み合わせ）
著者 所属機関	Gerald Bachler1,2, Sabrina Losert1,3, Yuki Umehara2, Natalie von Goetz1*, Laura Rodriguez-Lorenzo2, Alke Petri-Fink2, Barbara Rothen-Rutishauser2 and Konrad Hungerbuehler1 1ETH Zürich, Institute for Chemical and Bioengineering, 8093 Zürich, Switzerland. 2University of Fribourg, Adolphe Merkle Institute, 1700 Fribourg, Switzerland. 3EMPA, Swiss Federal Laboratories for Material Science and Technology, 8600 Dübendorf, Switzerland
書誌事項	Particle and Fibre Toxicology (2015) 12:18
試験物質	自家製造の Au（2、7、18、46、80nm）、実暴露粒子サイズ（TEM）（2.5、6.5、19.6、49.1、85.5nm）
試料調整法	クエン酸塩で安定化し、ALICE で暴露。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	ヒト AT II 上皮細胞 *A549*（*A549* CML：Cell Mono Culture）、マウス AT II 上皮細胞 *MLE-12*（*MLE-12* CML：Cell Mono Culture）、ヒト気管支上皮細胞 *16HBE14o*（*16HBE14o* CML：Cell Mono Culture）、3 種細胞（TCCC；肺胞上皮細胞 A549、ヒト血液単球由来のマクロファージ、樹状細胞）の細胞膜を通過する AuNP を測定。 
試験結果	**移動キネティクス** ・ ドーズ量影響 A549、MLE12 ともに 100ng/cm² までは移動割合は約 2%で同じであるが、100ng/cm² を超えると A549 では有意に移動割合が低下する。 ・ サイズ影響 暴露後 24 時間での移動割合のサイズ依存は、A549 と MLE12 でほぼ同じである。有意な差は 2nm で認められ、マウス細胞がヒト細胞と比較し、有意に高い移動割合であった。移動割合はサイズに逆比例し、in vitro 測定と Kreyling らの invivo 測定では移動量は一桁違うが平行線の関係にあった。 ・ 暴露後経過時間の影響 A549、MLE12 とも暴露後の 2～3 時間で移動割合はピークを示しその後 8～24 時間継続する。24 時間から 72 時間の移動割合は緩やかに増加した。両細胞での有意な差は、A549 ではるかに高い移動割合を示したことである。Kreyling らや Schelh らによる *in vivo* 結果の PBPK 補正による A549 の結果でも暴露後 2 時間で同様な急激増加が見られる。 ・ 金イオンとの比較 Kreyling らの金イオンの *in vivo* データと比較して、*in vitro* の結果と有意な差はなかった。金イオンの移動割合は約 75%で 2nm の金粒子とほとんど差がない。 ・ 3 種細胞との比較 単純な A549CML と 3 細胞混合の TCCC を 18nm の金粒子で比較し、有意な差を認めなかったことから、空気-血液バリヤの細胞の AuNP 移動研究に CML が使える。 ・ PBPK モデル 文献の *in vivo* データを PBPK モデルで修正し良い一致を見た。
結論	・ 空気-液体界面の CML で得られた in vitro の結果を PBPK モデルと組み合わせて、吸入ナノ粒子の評価に使える。 ・ 実暴露濃度範囲でドーズ量に依存しない AuNP の移動が認められた。 ・ ネズミ科とヒトの AT II 上皮細胞でほとんど差がなく、肺での吸収も同様と考えられる。 ・ 非常に小さい AuNP は Au イオンと同じくらい容易に CML を通過するので、血液-空気バリヤの通過は同じパスウェイであることを示す。

No	2Au-2
論文題目（和訳）	A combined proteomics and metabolomics approach to assess the effects of gold nanoparticles in vitro. （*in vitro*で金ナノ粒子の影響を評価するプロテオミクスとメタボロミクスの結合アプローチ）
著者 所属機関	Sabrina Gioria[1*], Joana Lobo Vicente[1], Paola Barboro[2], Rita La Spina [1], Giorgio Tomasi1[1], Patricia Urbán1[1], Agnieszka Kinsner-Ovaskainen[1], François Rossi1 and Hubert Chassaigne[1] [1] European Commission, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, Via Enrico Fermi 2749, I-21027 Ispra, Italy [2] IRCCS Azienda Ospedaliera Universitaria San Martino - IST Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Largo Rosanna Benzi 10, I-16132 Genova, Italy *Corresponding author at: Joint Research Centre, IHCP, NBS Unit, TP125, via E. Fermi 2749, 21027 Ispra, VA, Italy. Tel.: +39 0332783584; Fax: +39 0332 785787. E-mail address: sabrina.gioria@ec.europa.eu (S. Gioria)
書誌事項	Nanotoxicology, doi: 10.3109/17435390.2015.1121412
試験物質	5 nm および 30nm の合成金ナノ粒子
試料調整法	合成金ナノ粒子はクエン酸ナトリウムで安定化されている。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	ヒト結腸癌 Caco-2 細胞 **【プロテオミクス試験】** Caco-2 細胞を完全培養液に種付け、24 時間後に液を交換し濃度 300μM の 5nm または 30nm の AuNP を添加した。72 時間の暴露後に細胞室画分からタンパク質を抽出した。 **【2D gel-based プロテオミクス解析】** （Gioria ら、2014）に従って、2D gel-based プロテオミク解析を行った。 **【メタボロミクス試験】** 上記と同様の細胞処理を行い、72 時間の暴露後に細胞溶解液を得て（詳細省略）LC-HRMS 分析計で計測した。 **【メタボロミクス試験】** 「メタボロミクス報告標準」（メタボロミクス協会）を参照して、level1(特定された化合物)、level2（注釈つき推定）、level3（推定化合物クラス）、level4（特定できない代謝物質）に代謝物質を分類した。
試験結果	**【発現タンパク質の差異の特定】** Mann-Whitney 試験で、タンパク質発現プロフィルを比較した。調節解除された蛋白質スポットは 5nmAuNP 処理で 36 スポット、30nmAu で 33 スポット認められた（対コントロール）。Au 処理同士では 66 タンパク質に発現量変化がみられ、これは細胞への取り込みの差と考えられる。 **【調節解除された代謝物質の調査】** 代謝プロフィルを評価して、5nm および 30nmAuNP とも代謝プロフィルに有意な影響を与え、同じ代謝物質が調節解除されたが、5nm の方がより顕著であった。 **【計算生物学解析】** 発現量が変化したタンパク質と代謝物質の解析で、5nmAu に反応して変化するネットワークは、小分子生化学、細胞集合と組織化、細胞成長と増殖であり、30nm では細胞損傷（退歩）と形状であった。 **【その他の技法】** いくつかの技法を用いて、上記の事実を確認した。 ①顕微鏡観察で AuNP により細胞成長の阻害が認められ、その影響は 5nm で強く出た。 ②免疫細胞化学手法で細胞骨格組織と核を調べた。AuNP への暴露は、F アクチンの分布を細く、指向性が悪いファイバーへと変化させた。この変化は、細胞の形状、成長率、生存メカニズムを変化させるであろう。核の分裂も認められた。 ③Caco-2 細胞の核と細胞骨格形状を INCell アナライザーで定量化した。細胞骨格は AuNP への暴露で有意に崩壊するが、F アクチン解析では 5nm と 30nm に差はなかった。AuNP に暴露すると、核面積は有意に減少し、分裂も見られ、これは細胞死につながる。さらに、細胞死指標としての核測定では、AuNP に暴露

	すると指数は上昇し、5nm でより顕著であった。 ④上記の事実確認のため、アネクシン V で染色、43 のヒトマーカーをスクリーニングした。細胞死に関連するいくつかのタンパク質発現に差を認めた。
結論	タンパク質と代謝物質プロフィル変化を評価する in vitro 手法を開発した。

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的側面」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。

なお、欧州委員会が策定した定義に対して、欧州委員会の共同研究センター（JRC）が、ナノマテリアル定義に関する欧州委員会の勧告についての評価報告書第 3 弾を 2015 年 10 月 19 日に

発表した。JRC はこれまで、この評価報告書の第１弾を 2014 年３月に、第２弾を 2014 年８月に発表している 。

欧州委員会は 2011 年に発効した「ナノマテリアル」の定義に関する勧告（2011/696/EU） の中で、その定義を用いた経験や科学技術の発展に鑑みて 2014 年 12 月までに同定義の見直しを行うとしていた。これに基づき、JRC は３段階に分けて本報告書を発表する予定となっていた。その最終章となる第３弾では、これまでの２本の報告書で示した課題や専門家意見を反映し、ナノマテリアルの定義をより明確にして実施するための科学技術的根拠に基づく具体的な措置を提案している。即ち、粒子（Particle）、粒径（Particle Size）、外部次元（External Domension）、構成粒子（Constituent Particle）等の用語をもっと厳格に、あるいはより良く定義すべきだとしている。

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「ナノマテリアルの用語」		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 nm=10^{-9} 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（Nanoaerosol)」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」

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	
フランス	年次申告制度	一つ以上の外径が 1 nm から 100 nm のサイズ範囲	ある比率（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			意図的に製造された物質		起源を除き、委員会勧告どおり
ベルギー	ナノスケールで製造された物質の上市に関する王令	一つ以上の外径が 1 nm から 100 nm	最低限 50%	個数基準サイズ分布	非結合の状態にある粒子か、又は強凝集体若しくは弱凝集体の形態			ナノスケールで製造された物質		起源を除き、委員会勧告どおり
	（サイズの特例）	一つ以上の外径が 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
デンマーク	ナノマテリアル含有品の登録と報告制度	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		委員会勧告どおり
カナダ	作業定義に関するステートメント	1～100 nm の外径、内部構造若しくは表面構造のいずれか						製造された物質・製品、部材、成分、デバイス、構造物		サイズ又は特性のいずれかが合致すれば、ナノマテリアルとみなす
		（非ナノスケール）					ナノスケールに特有の特性／現象を示す			
米国	EPA TSCA	—	—	—	—	—	—	—	—	定義されていない

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	
	EPA FIFRA（ルール提案）	1～100 nm の範囲にある次元を少なくとも一つ有する			強凝集又は弱凝集状態であろうとなかろうと			意図的に製造された場合	活性若しくは不活性成分、又はその構成成分の一部	
	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）	少なくとも一つのナノスケール範囲（約 1nm から 100nm）の寸法						加工された材料又は最終製品		サイズ又は特性のいずれかが合致すれば、ナノマテリアルとして検討対象とする
		1 μm まで					寸法に起因する物理化学的特性、生物学的作用などの特性や現象			
	NIOSH 二酸化チタンの許容暴露濃度	一次粒子径が 100 nm 未満						呼吸性粒子のサンプリングで捕捉された粒子		
オーストラリア	工業化学品（届出・審査）法	代表的なサイズ範囲が 1 nm から 100 nm			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）		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		
中国	GB/T 19619-2004	1 nm から 100 nm の範囲								「サイズ」又は「特性」のいず

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

（ア） 米国

(i) EPA（環境保護庁）

EPA 全体の動きとして、TSCA 改正の動きがあり、連邦議会下院で 2015 年 6 月 23 日に「TSCA 近代改正法案（HR2576）」を、上院で 2015 年 12 月 17 日に「21 世紀の化学物質安全性法案（S697）」をそれぞれ可決した。今後は、上院案と下院案を 1 つに統合していくことが求められている。なお、上記 TSCA 改正案にはナノテクノロジーについての規定は含まれていない。

(a) ナノマテリアル報告・記録管理義務付け

EPA は、有害物質規制法（TSCA）セクション 8（a）のもとに、ナノマテリアルの製造業者および加工業者に対して報告・記録保管を義務付ける規則を提案する旨を 2015 年 3 月 25 日に発表し、4 月 6 日には連邦官報（Vol.80,No.65）上に規則案を発表した。規則案が発効すると、既に商用のナノマテリアルを製造あるいは加工している、あるいはしようと意図している事業者は、マテリアルの特定情報、その製造量、製造や加工の方法、暴露や放出に関する情報、環境と健康への影響に関連した既存データを報告することが求められる。なお、この報告は 1 回限りとされている。本規則案は EPA によれば、人や環境に悪影響を与えるナノマテリアルを特定することを意図したものではなく、この報告義務を通して収集された情報を用いて、TSCA のもとでさらなる措置や情報収集が必要かどうかを決定していく、としている。本規則案の最終規則については、2015 年下半期の規制アジェンダの中で 2016 年 10 月に発表予定であると発表している。

(b) ナノマテリアル、ナノ製品の認可

- ナノ銀

2015 年 5 月 19 日に EPA は、連邦殺虫剤殺菌剤殺鼠剤法（FIFRA）の下、銀のナノ粒子を含む抗菌製品ナノシルバ（Nanosilva）を条件付きで登録したことを発表した。ナノシルバは、ナノシルバ社が製造する、カビやバクテリアなどからプラスチックや繊維を保護する用途で使用される抗菌製品で、家庭用電化製品、スポーツ用品、医療器具、バスルームの設備、アクセサリーなど、様々な物品に適用でき、食品には接触しないとされる。

- グラフェン

2015 年 6 月 5 日には、グラフェンナノプレートレットを含む 22 種類の化学物質に対して有害物質規制法（TSCA）のもとに重要新規利用規則（SNUR）を発行する内容の直接最終規則を官報に公示した。このグラフェンナノプレートレットは大部分の厚みが 1 から 10 の層から成り、長さや幅が主に 2 マイクロメートル（micron）未満のものである。

● カーボンナノチューブ

2015 年 6 月 10 日には、官能基を有するカーボンナノチューブ（PMN 番号 P-13-793）など 30 の化学物質に対し、SNUR を提案した。EPA は PMN 提出者が提案している方法でこの物質の製造、加工、あるいは使用を行うことが健康や環境に不当なリスクをもたらす可能性があるかどうかについてはまだ結論に達していないが下記に挙げたような場合は、人体の健康や環境への深刻な悪影響を引き起こす可能性があると判断し、今回の SNUR 発行に至ったとしている。

① 従業員に皮膚暴露する可能性がある場合に、不浸透性の手袋を使用しない
② PMN であげられている用途（電子機器に使用する薄膜）以外ための製造
③ 液体以外の形態で PMN 物質を製造、加工、使用すること
④ ミスト、蒸気やエアロゾルを発生させる応用用途を含む PMN 物質の使用
⑤ 水域への放出

● 単層 CNT 製品

Nano-C 社が、同社の単層カーボンナノチューブ（SWCNT）技術を応用した幅広い製品について、2015 年 7 月 21 日付で、EPA から製造・販売の承認を得た。Nano-C 社は、SWCNT 製造・販売許可を得る前に、EPA の有害物質規制法（TSCA）が定める新規化学物質の報告に関する規定に従い、製造前届出（Premanufacture Notice : PMN）を提出し、PMN に記した通りに SWCNT の製造・使用に際する環境・健康・安全対策を講じた。

(c) ガイドライン、ガイダンス

2015 年 8 月 4 日付で EPA は、産業排水中の工業ナノマテリアル調査結果も含んだ「2014 年次産業排水ガイドライン・プログラム・プラン最終版（Final 2014 Effluent Guidelines Program Plan）」を発表した。EPA は今回初めて「工業ナノマテリアル」を新たにガイドラインが必要となり得る廃棄物質に指定し、検討を開始した。また、EPA は、工業排水中に放出された工業ナノ物質の有無と、ヒトや環境への影響について更に調査研究が必要な分野として以下の 4 分野を挙げている；

① 産業排水中のナノマテリアルを検出、同定するのに基準となるサンプリングや検査の方法
② 産業排水中の工業ナノマテリアルの形状と蓄積を考慮した上での、有害性の影響とそれが生成される可能性についての評価方法
③ 工業ナノマテリアルを扱う施設の種類、それらの施設におけるナノマテリアルの生産量、排出物の特性や廃棄物量
④ 産業排水中の工業ナノマテリアルの特質と環境中に排出された時の運命と変換、処理方法についての評価方法

EPA は、引き続き上記分野の研究のモニタリングを行い、工業ナノマテリアルの排出に

関する新しい情報を可能な限り収集する計画としている。

(ii) FDA（**食品医薬品局**）

FDA の獣医学センターは、2015 年８月４日付で「動物用飼料におけるナノマテリアル使用のガイダンス（Guidance for Industry: Use of Nanomaterials in Food for Animals）」最終版を発表した。本ガイダンスは、動物用飼料の製造・取扱関連企業を対象にしたもので、動物に与える飼料の内、ナノマテリアルを含むものや、製造過程でナノテクを使用しているものについて、安全性や規制に関する問題を特定する手助けをする目的で策定されている。本ガイダンスでは、動物用飼料製造者が、ナノマテリアルを動物用飼料に添加する前に、「食品添加物許可申請（Food Additive Petition : FAP）」を提出することや、FAP 提出以前の早期に FDA に相談することなどを勧めている。なお、本ガイダンスは、動物用飼料の成分が以下のものに適用される；

- 全てナノマテリアルでできている
- 一部にナノマテリアルを含む
- 製造過程で、ナノテクを利用している

(iii) **その他**

- 国家ナノテク・イニシアティブ（NNI）

  2015 年 3 月 11 日付けで、2016 年度大統領予算教書（2 月 2 日発表）への付属文書を発表した。2016 年度は、連邦政府予算からの国家ナノテク・イニシアティブ（NNI）への歳出として約 14 億 9,500 万ドルを要求している。このうち、環境・健康・安全性分野は 1 億 540 万ドルとなっている。

- 国立労働安全衛生研究所（NIOSH）

  米国産業衛生協会（AIHA）のナノテク作業部会が、工業ナノ粒子への暴露対策として、個人保護具に関するファクトシートを発表し、NIOSH のウェブサイトで公表した。ファクトシートには、工業ナノ粒子を「少なくとも一つの次元が 1 ～100 nm のサイズ範囲にある人為的に製造された個体粒子」と定義し、職場におけるナノマテリアルへの暴露への優先順位を付けた段階的なリスク対策や、個人保護具のうち、呼吸保護具、耐化学物質防護衣料、手袋、目の保護具などの有効な使い方や、それらの使用済み個人保護具の廃棄時の注意事項などが記載されている。ファクトシートによると、「従来の暴露対策は、職場の包括的な安全健康計画の一部として実施された場合、工業ナノ粒子の暴露対策にも有効であるという最近の研究結果がある」として、ナノマテリアルへの暴露リスク管理にも、従来の優先順位を付けた段階的なリスク対策である、産業衛生ヒエラルキーアプローチを踏襲することを奨励している。特に、ファクトシートでは、個人防護具の重要性を強調している。

また、NIOSH は、2016 年 1 月 21 日付官報に、銀ナノ粒子への暴露が及ぼす健康への影響に関する報告書のドラフト版を発表について公示した。同報告書は、実験動物や細胞組織を用いた銀のナノ粒子への暴露に関する研究や、職場における銀の粉じん・ヒュームへの暴露が労働者の健康におよぼす影響に関する研究について、最新の文献を収集・分析した結果をまとめたものである。本報告書で、銀のナノ粒子への暴露を現行の NIOSH の推奨暴露限界（REL）以下に抑えれば、労働者が皮膚などへの銀沈着症を引き起こす可能性は低いと結論づけた。また、実験動物の肺への影響を示す研究結果から、ナノ粒子を扱う職場では細心の注意が必要であると勧告した。

（イ） 欧州委員会（EC）

◆ REACH

EC は、2015 年 5 月 28 日付で REACH 規則を修正する規則（Commission Regulation (EU) 2015/830）を公布した。REACH 規則の付属書 II は、REACH 規則のもとに提出される安全性データシート（SDS）に含むべき情報の要件について規定している。今回の規則が定める修正を、2015 年 6 月 1 日に発効した。

また、2016 年 2 月 2 日には、ナノマテリアル登録を開始するため、REACH 付属書の改訂を想定した「初期影響評価（inception impact assessment）」報告書を発表した。

◆ 化粧品

2015 年 3 月 24 日に EC は、化粧品に含まれる「銀コロイド（ナノ）」（CAS No.7440-22-4）の安全性に関するデータを募集することを発表した。EC によると、欧州の化粧品規則（EC 1223/2009） 下での報告義務を通して、成分に「銀コロイド（ナノ）」を含む複数の化粧品に関する通知を受け取ったため、としている。

2015 年 9 月 14 日に、日焼け止め剤や、パーソナルケア用スプレー製品に UV フィルターとして使われている二酸化チタンのナノ粒子の安全性について、科学的な知見を求める EC からの要請があった旨を消費者安全科学委員会（SCCS）が公示した。

また、2015 年 12 月 17 日には、皮膚に塗る化粧品内の紫外線吸収剤として利用される二酸化チタンナノ粒子について、そのコーティングに使われる 3 種類の物質（セチルリン酸塩、二酸化マンガン、トリエトキシカプリリルシラン）の安全性に関する科学的な意見を求める旨の要請が EC からあったことを SCCS が公示した。

EC の域内市場・産業・起業・中小企業総局 の化粧品委員会（Standing Committee on Cosmetic Products）は、2016 年 2 月 9 日に化粧品規制の付属書 IV、V、VI の更新案を採択し、それぞれ欧州議会と欧州連合理事会に送付した。議会と理事会の承認を得て、欧州連合官報に掲載されれば、その 20 日後に発効する。対象は、同規制下のカーボンブラック、

エチルラウロイルアルギン酸塩酸塩、二酸化チタンに関するものである。現行の規制下での扱いやこれまでの SCCS によるオピニオンを参考に、許可される使用方法を示した。カーボンブラックについては、顔料として使用可能な物質と要件を定めた付属書 IV（第 126 項）の更新で、ナノ粒子の記載が追加された。同様に、二酸化チタンは、紫外線吸収剤として使用可能な物質と要件を定めた付属書 VI（第 27 項）の更新で、ナノ粒子の記載が追加された。

(i)　**欧州委員会共同研究センター（JRC）**

JRC は、2015 年 7 月 10 日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 JRC の３つ目の報告書（６月付け）を発表した。本報告書は JRC が 2014 年３月から欧州委員会のナノマテリアルの定義の見直しに向けて発表してきた報告書シリーズ（３回完結） の第３弾である。第３弾となる本報告書では、定義内で使用される用語の意味、個数濃度の粒子径分布による閾値に規則間での相違の余地を与えることの是非、体積比表面積の考慮の是非、ある物質がナノマテリアルでないと証明する方法、ナノマテリアルでない物質を明確に定義範囲から外す言い回し、定義内に示された確実にナノマテリアルとされる物質リスクの一貫性、について検討した。

(ii)　**新興及び新たに特定された健康リスクに関する科学委員会（SCENIHR）**

2015 年４月９日に、EC の SCENIHR は、新しく特定された健康リスクに関する意見表明書をまとめ、新たに以下のような課題を特定し、新規のリスク要因として緊急な対応が必要であるとしている；

- 医用画像やドラッグデリバリー向けのナノマテリアルの使用
- グラフェンのナノマテリアルの使用

(iii)　**欧州議会**

◆　改正 RoHS 指令

欧州議会は 2015 年５月 20 日に、電気･電子機器における特定有害物質の使用制限指令（Directive 2011/65/EU、改正 RoHS 指令）で使用が禁じられているカドミウムを一部の用途に限って同指令の適用外とする EC の RoHS 指令修正案に反対する意見を賛成多数で採択した。EC の RoHS 指令修正案は、カドミウムを用いた半導体ナノ結晶量子ドットをディスプレーや照明に用いる場合は 2017 年 7 月まで同指令の適用外とする、という内容である。なお、欧州議会による反対理由は、カドミウムを使用せずにディスプレーや照明を製造する方法が存在するため、としている。

◆　新規食品規則

新規食品規則（Novel Foods Regulation、258/97）の改正案が、10 月 28 日に本会議で審

議・投票が行われ、採択され、成立した。12 月 22 日には改正規則が官報に掲載され、正式に規則改正が完了した。同規則の施行は、2017 年末である。改正された規則は、2013 年 12 月に EC が起草・採択、環境公衆衛生食品安全委員会（ENVI）が修正を加えて 2015 年６月に採択したものである。ナノマテリアルについては、EU 圏内の食品に関わる全ての規則で統一した、新たな「工業ナノマテリアル」の範囲を定めている。採択された改正案には、新たに新規食品に工業ナノマテリアルを使用している食品を含む条項が追加されるとともに、工業ナノマテリアルの範囲も、新規食品規則と新・食品表示規則（1169/2011） で統一する旨が記されている。

さらに、ナノマテリアルを含む全ての新規食品に適用される主な改正点としては、欧州食品安全機関（EFSA）が製造業者が届け出た新規食品の安全性評価を行い、EC が記録管理をすることで、現行法下で複雑化していた新規食品の承認プロセスを一元化すること等が定められている。

(iv) 消費者安全科学委員会（SCCS）

◆ ナノシリカ

EC は 2015 年５月 29 日に、ナノ形態のシリカ、水和シリカ、及びシリル化アルキルで表面修飾したシリカに関する SCCS のオピニオンを発表した。SCCS のオピニオンには、ナノ形態のシリカ、水和シリカ、シリル化シリカ、ジメチルシリル化シリカの４種類のシリカの安全性ついて、想定される使用条件を念頭に置いて評価した結果がまとめられている。このオピニオンは、化粧品規則（Cosmetic Products Regulation、EC/1223/2009）の実施のために作られたオンラインの届出制度を通じて提出された情報をもとに作成された最初の科学的オピニオンである。SCCS は届出制度を通じて情報が提出された 28 件の SAS のうち、23 件について評価を行った結果、提出された情報と既存文献から得られた情報だけでは化粧品に使用されるナノシリカの安全性を判断するのに不充分であるとの結論に至った。

◆ 化粧品・パーソナルケア製品

SCCS は 2015 年 10 月 16 日に、化粧品・パーソナルケア製品に関する２件のドラフト意見書を発表した。

１件目は、化粧品・パーソナルケア製品に含まれるヒドロキシアパタイトのナノ粒子を対象としている。化粧品・パーソナルケア製品の製造業者は、化粧品規則（Regulation 1223/2009/EC、2013 年７月施行） の条項に従い、ヒドロキシアパタイトなどのナノマテリアルを含む製品の通知を EC に提出しており、今回の意見書は、こうした通知の内ヒドロキシアパタイトに関する 35 件を基に策定されたものである。本意見書で SCCS は、“通知と共に提出された情報やデータは、ガイダンス（SCCS1484/12）に対応した限定された量であり、その後のメモランダム（SCCS Memorandum on Relevance,Adequacy and Quality

of Data in Safety Dossiers on Nanomaterials (SCCS/1524/13)）にも合致しておらず、ヒドロキシアパタイトのナノ粒子の、口腔内ケア製品への使用が安全か否かを結論付けるには不十分である、とした。また、針状のヒドロキシアパタイトのナノ粒子は化粧品に使用するべきではない、と勧告した。

２件目は、「化粧品材料の試験および安全性評価のガイダンスに関する SCCS の注釈」である。ナノマテリアルを化粧品・パーソナルケア製品の材料として使用する上での試験や安全性評価に必要な手順を示したものである。

（v） **欧州食品安全機関**（EFSA）

◆ 食品接触材料

2015 年４月 13 日に、EFSA の食品接触材料･酵素･香味料･食品加工材パネル（CEF Panel）が「食品接触材料に使用されるナノ粒子状の酸化亜鉛の安全性評価に関する科学的意見」を発表した。本意見書は、透明な紫外線吸収材として、全てのポリオレフィン（polyolefin）に使われるナノ粒子状の酸化亜鉛について、EFSA の CEF パネルが実施した安全性に関する評価をもとにしたもので、食品接触材料に使用される酸化亜鉛は、メタクリル酸 3-＜トリメトキシシリル＞プロピルでの被覆有無に関わらず、ナノ形態では移行しない、と結論付けた。

◆ 新規食品規則改正に伴う許可申請書作成ガイダンス

EFSA は、新規食品規則改正版の成立をうけて、2016 年２月 18 日に、同規則下における許可申請の作成に関するガイダンスのドラフトを作成・発表し、パブリックコメントの募集を開始した。同ガイダンスでは、申請書に、当該食品に関して以下の 10 項目の情報を明示するように定めた；

① 食品の概要
② 製造プロセス
③ 組成データ
④ 仕様
⑤ 食品及び食品原料の使用の歴史
⑥ 利用方法や想定される摂取量
⑦ 吸収、循環、代謝、排せつ
⑧ 栄養情報
⑨ 毒性情報
⑩ アレルギー誘発性

（ウ） EU 加盟国

(i)　フランス

フランスの食品環境労働衛生安全庁（ANSES）は、2015 年 3 月 10 日に銀のナノ粒子への暴露に関する意見書を発表した。今回発表された意見書は、2011 年に ANSES に対して求められた、銀のナノ粒子への暴露による健康と環境へのリスクの評価について知識を更新についての要求に答えたものである。同意見書によると、ANSES は、銀のナノ粒子による健康と環境への潜在的な影響に関するこれまでの調査だけでは健康に関する危険性を評価するにはまだ不十分であると述べている。

(ii)　ベルギー

ベルギーの連邦公衆衛生・食物連鎖・環境安全省は、ベルギーでは上市するナノマテリアルの登録を義務化する国王令にしたがい、ナノスケールの粒子を持つ物質（substance）を登録するオンライン・ポータルサイトを開設したことを 2015 年 9 月 3 日に発表し、ベルギーでナノマテリアルのオンライン登録が開始された。ナノマテリアルに関する届出の締切は 2016 年 1 月 1 日、ナノマテリアル含有製品の届出の締切は 2017 年 1 月 1 日である。

今回登録の対象となるナノマテリアル及びナノマテリアル含有製品には、殺生物剤、医薬品、食品、食品接触材料、飼料、顔料、農産物由来製品の加工用製品や、加工技術補助製品（technological aid）など、既に他の規則の対象となっているものは含まれない。

(iii)　デンマーク

デンマーク環境保護庁（DEPA）は、「デンマークのナノマテリアル製品登録への報告義務を持つ企業が被る事務的負担の概算」と題する新しい報告書を 2016 年 1 月 12 日に発表した。本報告書は、2015 年にデンマークのナノマテリアル製品登録制度へ報告した企業へのインタビューとその他の統計をもとに、企業がナノマテリアル製品の登録またはその準備にかける時間や人員等について、複数のシナリオを想定してまとめられたものである。本報告書により、ナノマテリアル製品をデンマーク国内で製造あるいは輸入する企業が、登録義務を遵守するためにかかる事務処理・管理・調査などにかかる経費や、ナノマテリアル登録に際しての障壁などが明らかになった。

(iv)　スウェーデン

スウェーデン化学品庁（KEMI）が同国におけるナノマテリアル登録制度の構築準備に着手していることが、ナノテク工業協会（NIA）により 2015 年 5 月に報告された。スウェーデンでは、スウェーデン環境省の要請により、KEMI がナノマテリアル登録制度に関する提案書を作成し、影響評価を実施した後、他の関連政府機関やステークホルダーの意見を求めたうえで、2015 年 12 月 1 日までにこれらの作業を完了した。KEMI は、12 月 1 日に化学製品中のナノマテリアルの報告義務付けを、スウェーデン政府に対して提案すること

を発表した。本報告義務の目的は、スウェーデン国内市場に出回っているナノマテリアルの種類と量を把握すること、である。KEMI による提案は「製品中の化学物質を KEMI の製品登録に報告する場合、当該の化学物質に関する情報に加え、その製品に人為的に加えられた、いかなるナノマテリアルについても、その濃度にかかわらず、情報を提出しなければならない」というものである。なお、本報告義務は、自然発生したナノマテリアルや、意図せず製造されたナノマテリアルは適用外である。また、年間の売上が 500 万スウェーデン・クローネ（SEK、約 7000 万円相当）以下の企業は、本報告義務が免除される。顔料状のナノマテリアルも報告義務の免除対象である。さらに、既に報告義務が免除されている物質に新たな報告義務が発生することはない。報告免除対象製品・物質群には、廃棄物、食品、飼料、医薬品、化粧品、刺青用の顔料が含まれる。

（エ） カナダ

カナダの環境省と保健省は、2015 年３月 18 日に、カナダ環境保護法（CEPA1999）の下、ナノマテリアルを規制する新たなアプローチ「コンサルテーション文書：国内物質リスト（DSL）にあるナノスケール形態の物質に係るアプローチの提案」を発表した。本アプローチは次の３段階で順次実施される；

① カナダにおける既存ナノマテリアルリストの作成
② それらに対する措置の優先順位付け
③ 更なる作業が必要と認められる物質への措置

この文書では、第 2 段階までについて解説されている。第１段階のリスト作成については、カナダ保健省は、CEPA セクション 71 の下での義務的調査を利用する。この文書では、米国-カナダ規制協力会議（RCC）のナノテクノロジーイニシャティブで使用されたリストを基に、DSL と照合してカナダにおける既存ナノマテリアル（230 種）のリストが付属資料として掲載され、それを基に、検証し、情報を追加し、包括的なリストにしていく。

カナダ環境省は、カナダ環境保護法第 71 条（1）項（b）節に基づき、毒性評価や規制の必要性を見極めるため、ナノマテリアルの製造・輸入業者に対して、206 種類のナノマテリアルについて、名称、数量、有害性などに関する未公開データなどの情報提供を義務として要請する通知を 2015 年７月 25 日付で官報に発表した。情報提供義務の対象は、2014 年に当該ナノマテリアルを総計 100kg 以上製造、もしくは、輸入した者全てである。取り扱うナノマテリアルが、カナダ国内を通過するだけの場合や、有害廃棄物中に含まれている場合、殺虫剤や肥料、飼料の成分である場合など、他の規則により規制されている物質は、情報提供義務の対象にはならない。

具体的に提出義務のある情報は以下のとおりである；

- 報告対象物質(substance)の CAS 登録番号および物質名、及びそれが、「ナノスケール形態である」と分類された根拠（研究開発、テクニカル・データ、特許デー

タ、自己申告、推測などによる）

- 報告対象物質またはそれを（いかなる濃度でも）含んだ最終的な製品や混合物の製造・輸入総量
- 報告対象物質の機能コードまたはそれを（いかなる濃度でも）含んだ最終的な製品や混合物の消費者・製品分類番号
- 消費者・製品分類番号別に、それらの報告対象物質や製品が最終的に商業活動に使用されるかどうか
- 消費者・製品分類番号別に、それらの報告対象物質や製品が最終的に 14 歳以下の未成年により使用されるかどうか
- 報告対象物質の物理・化学的性質、生物内における蓄積、持続性

（オ） オーストラリア

(i) オーストラリア厚生省

オーストラリアの厚生省は、2015 年 5 月末に国家工業化学物質通知評価機構（NICNAS）の改定を予定していることを発表した。2018 年 9 月 1 日までに完全に移行する予定としている。ただし、ナノテク、ナノマテリアルには言及していない。

(ii) オーストラリア農薬・動物医薬品局（APVMA）

APVMA は 2015 年 7 月 6 日に、農薬と動物医薬品に用いられるナノテクについて、今後の予想される利用状況やそれに応じた規制の必要性等についての検討結果をまとめた報告書（最終版）を発表した。本報告書はオーストラリアで農薬と動物医薬品に使用されるナノテクを規制することの便益と、それにあたって考慮すべき課題を現在の知識に基づいて検討することを目的に作成され、ナノマテリアルの定義、計測、物理化学特性、製造、ヒトの健康や環境への潜在的影響など、ナノテクに関わる規制関連の側面について検討した結果について記載している。

APVMA では、本報告書を基に、ナノテク製品に対する規制的取組みを最終化することを予定している。

（カ） 韓国

韓国のナノマテリアルの安全性に向けた最近の動向として 3 点挙げられる。

- 第 1 は、安全性基準の確立に関する国家計画の策定である。
- 第 2 は、規制の前提となるナノ物質インベントリ作業への着手である。
- 第 3 に、安全性に関するデータベースの整備、公開である。

以下に、その内容を記す。

(i)　ナノテク産業化戦略

2015 年４月、未来創造部、産業部、環境部は共同で「ナノテク産業化戦略」を発表した。2020 年までの活動として、1）安全性評価基準測定技術の標準化の推進、2）ナノ安全性に関する国際協力の推進、を掲げた。この背景として、以下の必要性が謳われている。

- ナノテクの安全性に関する評価体系が確立されていない現状のなか、企業は自ら安全確認に関する情報収集と検証作業を行わなければならず、事業化へのコスト負担が増大する。
- 評価体系の不在は安全性確認・検証の長期化を招き、結果的にナノテクの事業化周期の長期化を招く。
- 事業化に成功しても、後続的な環境・健康被害が発生した場合、より大きな代償を払わざるを得ない社会リスクが存在する。
- 国内基準を確立しても、国際基準とリンクしない限り、韓国のナノテクの産業輸出（産業競争力）には限界が生じる。国際基準とリンクした国内安全性基準の確立は、国内の事業化効率の向上に貢献できるだけではなく、ナノ産業競争力の強化にもつながる。

(a)　安全性評価基準測定技術の標準化の推進

安全性評価技術の標準化政策には、（１）ナノ物質の安全性に関する部署間の横断的な政策協議会を通じ、より効率的な政策および研究の実施体制を早急に構築する、（２）ナノ安全性に関する体系的な研究基盤を構築するため、ナノ物質の特性および有害性（毒性）評価に適した標準測定技術を開発する、（３）国際公認評価技術を国内において積極的に採用する、（４）確立した標準測定技術をベースに、ナノ素材特性に関するデータベース（2017 年以降）とナノ製品データベース（2016 年以降）を構築し、2017 年をめどに、ナノ物質の毒性や環境評価に関する既存のデータベースと統合したサービスを提供する、という４つの措置が含まれる。

また、「ナノテク産業化戦略」は標準化に関連して表 ３.１-3 に示す目標を掲げている。

表 ３.１-3　具体的な目標

年度	目標
2015年	●ISOへの新規基準、規格の提案（ナノ物質の光触媒活性に関する測定） ●OECD WPMNのナノ物質安全に関するガイドライン策定プロセスへの参加（細胞レベルのナノ毒性評価） ●細胞レベルのナノ毒性評価の基準測定手順書の作成（１件）
2018年	●認証標準物質の開発（５種類） ●ナノ安全性評価基準手順書の作成（７件） ●ISOへの新規基準、規格の提案、採択獲得（１件） ●ナノ安全性評価KS規格の発刊（２件）
2020年	●認証標準物質の開発（４種類）

	●ナノ安全性評価基準手順書の作成（４件） ●ISOへの新規基準、規格の提案、採択獲得（１件） ●ナノ安全性評価KS規格の発刊（２件）

出典：韓国政府「ナノテク産業化戦略」2015年４月29日

(b)　ナノ安全性に関する国際協力の促進

韓国が国際規格競争に積極的に参加することが、国内ナノテク関連産業の国際競争力の向上につながるとして、以下の方策を挙げている。

① SOやIECといった国際機関との連携を強化する。

② ２国間、または多国間の国際共同研究コンソーシアムを構築し、リードする。

③ 国政協力機関の比較研究プログラムを積極的に実施するなどを通じ、規格策定プロセスに能動的にアクセスする。

具体的には表 ３.１-4に示す活動を行う。

表 ３.１-4　ナノ安全性に関する国際協力

協力類型	協力内容
国際共同研究コンソーシアムへの参加	●NANoGEG　研究事業への参加 － EU等15カ国と共同研究を展開 ●担当部署（2015年～16年）：未来創造部（30億ウォン）、産業部（７億ウォン）、環境部（7.8億ウォン）
標準規格の開発、国際比較研究	●OECD（WPMN　SG7）国際比較研究への参加 － 細胞レベルのナノ毒性評価方法の標準化の比較研究 ●ISO/（TC229）比較研究への参加 － Au、SiO_2、TiO_2の大きさおよび大きさ分布の測定に関する比較研究への参加 ●APMPの比較研究への参加 － SiO_2ナノ粒子の大きさの測定に関する国際比較研究への参加
二国間の共同研究	●韓国（標準院）とアメリカ（NIST）との共同研究 － ナノ物質の光触媒効率の測定に関する比較研究の実行（2014年５月～） ●韓国（標準院）とスイスEMPAとの共同研究 － 細胞レベルのナノ毒性評価方法の標準化の比較研究 － 血球細胞分析器の活用によるナノ毒性比較研究の推進

出典：韓国政府「ナノテク産業化戦略」2015年４月29日

(c)　予算計画

「ナノテク産業化戦略」は、2015 年～2020 年までの計画で、全体予算は 1772 億ウォンである。そのうち、ナノ物質、製品の安全性に関連する予算は 65 億ウォンを占めている。安全性に関する予算のほか、ナノテクの物質性状の変更を低予算でシミュレーションできるモデル計算機インフラ事業（25 億ウォン）、ナノテク成果の活用、支援センターの構築事業（16 億ウォン）なども安全性に関する標準化事業と相乗効果が期待される。

(ii) ナノ物質インベントリ作業

2011 年より、部署横断的な連携のもと、ナノテク製品のライフサイクルを把握するための調査を開始した。調査対象は、2011 年の 12 種類から 2015 年の 15 種類（カーボンブラック、二酸化ケイ素、酸化アルミニウム、二酸化チタン、酸化亜鉛、酸化セリウム、銀ナノ粒子、カーボンナノチューブ（SWCNT、 MWCNT)、鉄ナノ粒子、金ナノ粒子、フラーレン、炭酸カルシウム、ナノクレイ、デンドリマー、チタン酸カリウム）までに拡大した。調査項目は、ナノ物質の流通情況、供給網、ナノ物質の物理・化学的性質（大きさ、濃度、表面積、形態、凝縮・分散）、流通地域・用途・業種などが含まれている。

韓国環境部化学物質政策課は 2015 年５月に、2013 年の調査結果をまとめ、公表した。

- 対象事業者数は 1100 社で、前年 650 社の２倍弱
- 二酸化ケイ素などナノテクが適用された 20 種類の物質の流通ルートを確定
- 調査対象となったナノ物質の流通量は 29.8 万トンに達し、前年（1.1 万トン）の 26 倍
- 調査対象となったナノ製品の種類は 2606 種、前年（1100 種）の２倍相当
- 流通量ベースで見た場合、カーボンブラックが一番多く、255,918 トンである。二位以下は、二酸化ケイ素（4917 トン）、酸化亜鉛（435 トン）、酸化アルミニウム（291 トン）の順

(iii) 安全性に関するデータベースの整備、公開

韓国政府は 2014 年より、ナノテクの安全性に関する国内外政策や研究成果を体系的に整理したデータベース「ナノ安全性情報システム」を整備し、国民一般的に公開している。ナノ素材の毒性および環境影響関連の情報がわかりやすく整理されている。

また、ナノテク産業化戦略でも、下記データベース整備活動を行う。

- ナノ素材の特性評価結果に関するデータベースの構築（未来科学部）
- ナノ製品情報に関するデータベースの構築（産業部）
- ナノ物質の毒性や環境評価に関する既存のデータベースとの統合
- ナノ安全関連のデータベースの構築および政策決定、総括の体系的な運用の実現（部署横断的なナノ安全協議体の結成・運営）

（キ） 中国

2015 年は、ナノ安全性に関する国際会議等、学術活動は行われたが、規制関連の活動は特になかった。

（ク） 各国･地域の規制動向まとめ

2015 年の各国・地域の主要な規制動向を一覧にして、表 ３.１-5～表 ３.１-7 に示す。

表 3.1-5 各国のナノマテリアル上市規制

国	法律・規則	内容
EU	REACH	現行 REACH でナノマテリアルに対応。ＲＥＡＣＨ付属文書改訂で安全性試験を強化していく方針だが、未改訂。
	殺生物製品規則	ナノマテリアルが使用されている場合は、ヒト健康、動物健康、環境へのリスクが評価されていること（2013 年９月施行）
	改正化粧品規則	ナノマテリアルを含む成分の事前登録、化粧品安全報告書の提出が義務化（2013 年７月施行）
	新規食品規則改正案	人工ナノマテリアルを含む新規食品の上市は認可が必要（2017 年末施行）
米国	TSCA（有害物質管理法）	現行 TSCA でナノマテリアルにも対応。CNT 等を新規化学物質としている。懸念物質には SNUR を出し使用条件等に制限を付ける。
	FIFRA（連邦殺虫剤・殺菌剤・殺鼠剤法）	ナノ銀製品に適用（時限で認可）、但しナノマテリアル故ではない
カナダ	CEPA（カナダ環境保護法）	現行環境保護法でナノマテリアルに対応。多層 CNT を有害性が疑われる新規化学物質として届出義務化
その他の国		現行化学物質管理の枠組みでナノマテリアルに対応

表 3.1-6 各国のナノマテリアル利用製品の表示規制

国等	法律・規則	内容
EU	改正化粧品規則	成分にナノマテリアルが含まれる場合、製品の成分名称において(nano)と表記しなければならない（2013 年７月施行）
	殺生物製品規則	同様な表示規制（2013 年９月施行）
	食品情報の提供に関する規則	同様な表示規制（2014 年 12 月施行）
	乳幼児食品	同様な表示規制（2016 年以降）
ニュージーランド	化粧品グループ規準	ナノマテリアル使用化粧品の表示義務（2016 年～）
その他の国		表示義務なし

表 3.1-7 各国のナノマテリアルの強制報告制度

国等		ナノマテリアルの報告
ＥＵ加盟国	フランス	年次報告制度（2013 年１月施行）
	デンマーク	2014 年６月施行
	ベルギー	2015 年９月運用開始、ナノ材料を含む製品の報告（2016 年１月までに）、複合材料の報告（2017 年１月までに）
	スウェーデン	報告義務制度の案を公表（2015/12）
ノルウェー		2013 年１月施行
米国		１回限りのナノマテリアルの報告・記録保管を義務付ける規則を提案中

カナダ	206 種類のナノマテリアルについて情報提供を義務化
その他の国	表示義務なし

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 回持続可能ナノテクノロジー機構（SNO）会議

（ア） 概要

期間：2015 年 11 月 8 日～10 日

場所：米国オレゴン州ポートランド

国際的な NPO である「持続可能ナノテクノロジー機構（Sustainable Nanotechnology Organization: SNO）」による第 4 回年次会議は、オレゴン州ポートランドで、2015 年 11 月 8 日～10 日の 3 日にわたり開催された。カナダ、フランス、ポルトガル、中国、南アフリカなどを含む各国から、約 150 名（参加登録者 144 名とゲスト 10 数名）が参加したが、殆どは、米国出身者であった。参加者の内訳は、主に学術機関、政府、メディア、NGO の関係者で、その殆どが学術機関からの参加であった（特に大学院課程の学生の参加が圧倒的に多い）[1]。なお、2014 年は、規制関連の参加者もいたが、2015 年は規制関連の講演者はいない。

SNO は、持続可能な社会に寄与する、ナノテクノロジー（以下「ナノテク」）の責任ある応用を推進するため、科学者やエンジニアが、意見やアイディア、最先端の研究成果を活発に交換できるプラットフォームを提供することを目的とする。2011 年にニューハンプシャー州ウォータービルで開かれた環境とナノテクを議題とするゴードン・リサーチ会議（Gordon Research Conference）を機に設立された。SNO の主な会員は学術機関、政府、NGO で、学生も（博士課程とポスドクを含む）約 45%を占める。

SNO の共同創立者は、創立当時は全米科学財団（National Science Foundation: NSF）に所属していたバーバラ・カーン博士（Barbara Karn）と、ニューヨーク州立大学（State University of New York: SUNY）のウンミ・サディク博士（Wunmi Sadik）。また、今回の会議では、カーネギーメロン大学（Carnegie Mellon University: CMU）のグレッグ・ローリー博士（Greg Lowry）と、オレゴン保健科学大学（Oregon Health and Science University: OHSU）のポール・トラントニエック博士が共同議長を務めた。なお、NSF は SNO のスポンサーとして会議内でも言及されており、基調講演を行ったミハイル・ロコ博士（Mihail ＜Mike＞ Roco）も NSF に所属していることから、今回の会議でも NSF の支援が大きいことが見受けられる。

これまでの SNO 会議は、第 1 回目は 2012 年 11 月 4 日～6 日にワシントン DC で、第 2 回は 2013 年 11 月 3 日～5 日にカリフォルニア州サンタバーバラで、第 3 回は 2014 年 11

[1] SNO 共同創立者、カーン博士と弊社参加者との個別の会話でのコメント。

月２日～４日にボストンで開催された。次回の第５回会議は、2016 年 11 月にフロリダ州オーランドで開催される予定となっている。なお、SNO はこの他にも、2015 年３月には、EU の支援を受けた研究プロジェクト（SUN および GUIDENANO[2]）と共催で、持続可能なナノテクノロジーに関する国際会議 [3]を初めて開催し、2016 年６月にボストンで開催されるナノ毒性国際会議（International Nanotoxicology Congress: NanoTox2016）のスポンサーにもなっている。さらに、SNO は、全米各地でナノテクに関する知識や情報を広め、一般の関心を高めるためのサイエンスフェアを開催するなど、活動の場を広げている [4]。

４回目となる今年の SNO 会議は、持続可能なナノテク利用に向け、「市民のナノテクへの印象や先入観を変えていく」ことも視野に入れており、プレゼンテーションにも、一般を対象にしたナノテクに関する教育・啓蒙プログラムの例も複数含まれていた。また、会議開催日前日の、11 月７日には、ナノインフォマティックスのワークショップが開かれるなど、今年は、ナノインフォマティックスにも重点を置いていたようである。

今年のセッションは、ナノテクが関わる重要な「システム（例、水と空気システム等）」毎に、プレゼンテーションを分類しており、サディク博士によると、ナノインフォマティックスとナノコンピュータが、注目分野としてプレゼンテーションのトピックに加わったという。また、前年と比較して、ナノメディシンのセッション数が予想以上に多くなったとトラントニエック博士は述べている [5]。

プレゼンテーションのトピック分野と、その分野別発表件数は、以下の通り。

トピック	件数	日程
基調講演・パネルディスカッション	7	プレナリーセッション
ナノインフォマティックス	6	分野別セッション 1A
農業と食品システム	12	分野別セッション 1B、5B
空気と水システム	12	分野別セッション 1C、2C
エネルギーシステム	4	分野別セッション 2A
社会システムとガバナンス	7	分野別セッション 2B

[2] Sustainable Nanotechnologies（SUN: http://www.sun-fp7.eu/）および GUIDEnano（http://www.guidenano.eu/）

[3] イタリアのベネチアで、160 名ほどの参加があった（参加者は、欧州人が大半、米国からは 25 名が参加）。

[4] この他、米国の法改正関係者や欧州の化学物質規制機関に対しても、多くの提言を行っている。（本会議共同議長のローリー博士と弊社参加者との個別の会話でのコメント）

[5] ただし、これは会議主催者が意図したことではなく、講演者選出を依頼された人物の人脈に医療関係者が多かったため。医療分野は企業の関心も大きいが、ナノテク利用については、未だそれほどの関心は得られないとのこと。（本会議共同議長のトラントニエック博士と弊社参加者との個別の会話でのコメント）

製造システム（産業利用）	11	分野別セッション 3A、4A
ヒトの保健システム（ナノメディシン）	13	分野別セッション 3B、4C
固形廃棄物と電気・電子機器廃棄物の低減と循環	5	分野別セッション 3C
環境システム（生物学的応用）	22	分野別セッション 4B、5C、6A
教育システム	5	分野別セッション 6B
ナノマテリアルの環境運命と影響のモデリング	6	分野別セッション 6C

（イ） 発表内容

(i) プレナリーセッション

① Nanotechnology Future and Sustainability Challenges（ナノテクの未来と、持続可能性（サステイナビリティ）への課題）（全米科学財団（NSF）、ミハイル（マイク）・ロコ博士）

ロコ博士は、NSF 上級アドバイザーであり、大統領府国家科学技術会議（National Science and Technology Council: NSTC）[6]ナノスケール科学・工学・技術小委員長（Founding Chair of the Subcommittee on Nanoscale Science, Engineering and Technology: NSET）。国家レベルのナノテクプログラム設立を最初に提唱し、国家ナノテクのイニシアチブ（National Nanotechnology Initiative: NNI）発足への貢献でも知られる。

ロコ博士は、基調講演の中で、2000 年から 2030 年にかけてのナノテクの飛躍的な発達とその変遷を 3 段階に分け、その展望を語った。そして、システム統合の時期にあたる現在（2010 年～2020 年）、ナノマテリアルを単体で考える時代は終わったと述べた。同博士によれば、例えばカーボンナノチューブ（CNT）単体の毒性や分類法にこだわるのは現実に即していない。様々な製品へのナノテク・ナノマテリアルの使用が一般的になると予想される中で、ナノ含有製品とそのライフサイクルを考えなければならないと説明した。

また、持続可能な社会に寄与するナノテクの方向性を考える時、長期的な視野が必要であるとして、環境だけでなく、社会経済、インフラなど、他の様々な分野と、協力する必要がある、と述べた。そして、現在最も早急な解決を要する地球的規模の課題（生物多様性、地球気候変動、窒素循環など）の技術的解決策を、ナノテクの発達がもたらす可能性があり、その方向づけが必要な時期であると呼びかけた。

米国のナノテクへの取り組み例としては、NNI のプログラムを紹介した。更に、2016 年以降、NSF が注力する、ナノテクの応用分野として、レーダーや撮像装置開発と、コンピュータ分野を挙げ、連邦政府の支援体制などを紹介した。

最後に、世界各国（日本、米国、ドイツ、フランス、中国、韓国）における、ナノテク研究開発への国家予算、論文発表数、論文引用数、特許出願及び取得数を示し、ナノテク研究開発の各国の現状を比較した。これによると、研究開発予算については、日本は過去

[6]科学技術政策局（Office of Science and Technology Policy: OSTP）の下に設けられた諮問委員会。

10 年、米国は過去 5 年、横ばいであったのに対し、中国は、予算に加え、論文発表数や特許出願数についても目覚ましく伸びている。

② パネルディスカッション

SNO 共同創立者のカーン博士およびサディク博士と、ノースイースタン大学（Northeastern University）工学部のジャッキー・アイザックス教授（Jackie Issacs: 機械・産業工学）、ハーバード大学（Harvard University）公衆衛生学部のフィル・デモクリトゥー助教授（Phil Demokritou: エアロゾル物理学）が、「より持続可能な社会の実現における、ナノテクの役割」について、パネルディスカッションを行った。ナノテクを応用した技術は、地球規模の持続可能性分野の課題解決（汚染物質の除去や温室効果ガス削減など）に最も貢献できるという点で、パネリストは合意した。また、センサー、撮像技術、投薬技術で、医療分野への貢献も期待できるという。しかし、ナノテクの開発者や研究者は、ナノ製品の製造から廃棄に至るライフサイクル全体での恩恵と悪影響を総合的に考える視点に欠けるという指摘もあった。

③ Nanomedicine: State of the Science（ナノメディシン—最先端科学）（カリフォルニア大学ロサンゼルス校（University of California, Los Angeles: UCLA）医学部教授、カリフォルニア・ナノシステムズ研究所（California NanoSystems Institute: CNSI）ナノメディシン部長兼ナノテク環境作用研究所（University of California Center for Environmental Implications of Nanotechnology: UC CEIN）所長、アンドレ・ネル博士（Andre Nel））

抗生物質開発における耐性菌の出現への対処のための、従来の創薬とは異なる画期的な方法の例など、医療分野における、有用なナノテク利用の先端事例を紹介した。現在は、あらゆるところにナノテクが利用されており、「ナノ専門の産業は存在しないが、様々な製品が次々開発・製造されている」状態であると説明した。そのため、持続可能なナノテクを考える時、一つのナノ物質についての定義に時間を費やしているより、ナノテク製品としてのシステムとその製造過程で区切った（Tiered）アプローチの方が、現状に即している、と述べた。更に、ナノテクの医療分野応用の可能性を広げていくと、遺伝子操作にもたどり着き、人間がどうありたいか、という根本的な問いに関わってくるとも述べた。健康と環境に害を与えない、ナノテクの安全な利用と応用分野開発について、様々な分野を総合したアプローチを通じ、研究、教育、啓蒙を推進する必要があると述べた。また、米国内の大学でのナノテク研究状況を聞いた会場からの質問に対して、現在、5～6 大学が、ナノテク研究をけん引している状態であると述べた。

④ Assessing Environmental Impact of Next Generation Nanomaterials（次世代ナノマテリアルの環境への影響評価）（ウィスコンシン大学マディソン校（University of Wisconsin-Madison: UW-Madison）物理学教授、持続可能なナノテク研究所（Center for

Sustainable Nanotechnology）[7]ディレクター、Silatronix 社 [8]共同設立者、ロバート・ヘイマーズ博士（Robert Hamers））

交通、電子製品、溶媒・電池、ナノバイオ分野における最先端、及び次世代的なナノテクの応用例を挙げ、これらのナノテク製品数は、急激に増加していると共に、とても複雑になっていることを示した。製品の例には、バッテリー式電気自動車の日産リーフ（Leaf）や米テスラモーターズ社の製品が挙げられ、ナノマテリアルの電池分野での画期的な役割が注目されているとした。複雑なナノマテリアル製品がもたらす様々な問題が考えうるが、それらの問題の本質は、化学の問題に集約されるとして、このような複雑なナノ製品に関するリスクの評価および管理には、製品のデザイン段階で考えうるリスクを最小限に抑える「ベナイン・バイ・デザイン（Benign by Design）」というアプローチが必要であると提案した。これは、リスクが発生する前にデザイン段階でリスクを軽減する対策を講じるという、持続可能なナノテクを実現するために必要な一種のパラダイムシフトであると説明した。ヘイマーズ博士の研究所では、2012 年～2020 年の間に、ナノマテリアルと生物の細胞組織の化学的性質を把握し、2020 年以降は、環境と生物がナノマテリアルにどのように反応するのかを特定し、ナノマテリアル製品の開発段階に上記アプローチを組み込んで、持続可能なナノテク利用に役立てるというビジョンを持っていると紹介した。

⑤ Modeling Fate and Transport of Nanomaterials for Exposure Assessment: Complexity versus Practicality（暴露評価におけるナノマテリアルの環境中の運命と移動のモデリング—複雑性 VS 実用性）（カリフォルニア大学ロサンゼルス校（UCLA）応用工学科　化学・生物分子工学教授 [9]、カリフォルニア大学ナノテク環境作用研究所（UC CEIN）所属、イスラエル研究所（Y&S Nazarian Center for Israel Studies）主任代理、ヨーラム・コーエン博士（Yoram Cohen））

リスク評価のためのナノマテリアルの環境中の運命と移動のモデリングに関するプレゼンテーションで、空間における粒子拡散のモデル（Spatial Model）や、箱の中を想定してナノマテリアルの凝集と沈降をシミュレーションするコンパートメント・モデル（Compartmental Models）など、複数のモデルを紹介しながら、それらのモデルの質は高くなってきているものの未だに欠陥があると指摘した。また、化学物質拡散の既存モデルをナノマテリアルに応用しようとしても、粒子サイズがナノスケールの物質の動きは通常の化学物質のそれとは異なるため、モデルの転用には限界があることや、既存の化学物質拡散モデルは、温度、風向、風力など、様々な要因を考慮しなくてはならない複雑なモデ

---

[7] NSF の助成金を受け、12 大学とエネルギー省パシフィック・ノースウェスト国立研究所（Pacific Northwest National Laboratory: PNNL）で構成する。

[8] 有機シリコン（organosilicon: OS）をリチウムイオン電池（lithium-ion: Li-ion）などのエネルギー貯蔵装置に応用した製品を製造する。

[9] 研究分野は、水処理法や物質製造方法の開発及びそれらの社会・経済・環境への影響評価など。

ルであると説明した。同博士は、複雑性と実用性、コスト、不確実性などの要素を鑑み、分析を行う目的に沿ったモデルを選択することが必要であると述べ、CEIN で開発中の、モデル検証のためのチャートや、ウェブベースのシミュレーションツール（LearNano）を紹介した。

⑥ Nano for Water Treatment: NEWT（ナノテクと水処理技術）（アリゾナ州立大学（Arizona State University: ASU）持続可能工学部（School of Sustainable Engineering）土木・環境・持続可能工学科（Civil, Environmental and Sustainable Engineering Program）人工環境学（Built Environment）教授、ナノマテリアル・ライフサイクル研究所（Center on Life Cycle of Nanomaterials: LC Nano）主催者（PI）[10]、持続可能性グローバル研究所（Julie Ann Wrigley Global Institute of Sustainability）シニア研究員、ポール・ウエスターホフ博士（Paul Westerhoff））

ナノテクを応用した水浄化システム（Nanotechnology-Enabled Water Treatment: NEWT）を、ナノテクによる持続可能な社会貢献の事例として紹介した。工業ナノマテリアルを塗布した膜を用い、既存の化学的処理より効率の高い触媒反応と物理的プロセスを利用して、水を浄化する仕組み。また、太陽光を原動力として使うことで環境への影響を軽減し、モジュール式にして運搬を可能にするなど、実用的な工夫も凝らされている。

現在、米国内に約 4,000 万人いる、市町村の水供給システムにアクセスが無い人々への安全な飲料水の供給に、この水浄化装置が役立つという。また、油田やガス田、沿岸の石油コンビナートなどの産業排水浄化にも、この技術が応用できるという。アリゾナ州立大学（ASU）は、米国内からはイエール大学やライス大学、国外からは中国やブラジルの大学と提携し、NEWT 開発プロジェクトを推進している。ただし、この装置はまだ、コストが高く、健康や環境への影響等のリスク分析は不十分なので、車に飲料水用浄化装置を搭載した「移動式 NEWT」や NEWT を使った飲料水ステーションを設置し、試験的使用を実施していると報告した。

⑦ Nanotechnology Supply Chains: A Framework for Evaluating Their Global Implications（ナノテク・サプライチェーン—地球規模の影響の評価の枠組み）（レンセラー工科大学（Rensselaer Polytechnic Institute）経済学教授、前・人文・社会科学部長、フェイ・ダンチン博士（Faye Dunchin））

1987 年に出版され、「持続可能な開発（Sustainable Development）」という言葉を広めるきっかけとなった「ブラントランド報告書－我々に共通の未来（Brundtland Report: Our Common Future）」から、2015 年 10 月に国連が発表した、2015 年～2030 年にわたる、17 の持続可能な開発目標（Sustainable Development Goals: SDGs 2015-2030）に至る、持続可能な社会という概念の発達を振り返り、ナノテクがどのような役割を果たすか

[10] 環境保護庁（EPA）の支援を受け、全米の大学、研究機関と共同で、設立。

を予測した。同博士によると、2050 年には 1,000 億人に達すると見積もられる世界人口と、それに付随する食糧問題や天然資源の枯渇などの課題に対し、ナノテクが解決策をもたらす可能性は大きい。しかし、ナノマテリアルの生産が 1 地域に留まると、世界経済のバランスが崩れる可能性があるとも分析した。また、製品を分類する米国標準産業分類（Standard Industrial Classifications: SIC）を改定し、ナノマテリアルの含まれた製品を区別できるようにする必要があると提言した。

(ii) **セッション** 1B：Food and Agricultural Systems

農業と食品関連では、6 件の発表が予定されていたが、マサチューセッツ大学ローウェル校（University of Massachusetts Lowell: UMass Lowell）のイコジョット・シンハ・ソハル氏（Ikjot Shingh Sohal）が欠席したため、5 件の発表となった。このセッションは、ナノマテリアルが植物に及ぼす毒性の実験と、その手法に関する発表が多かった。

コネチカット州政府農業試験所（Connecticut Agricultural Experiment Station: CAES）のジェイソン・ホワイト氏（Jason White）は、トマトとズッキーニに共通して存在する遺伝子に対する、ナノ状の酸化銅（CuO）、ランタナ（La_2O_3）、酸化セリウム（CeO_2）の影響を調査した研究結果を発表した。植物の種類によって、ナノマテリアルに対する異なる反応が観察された。

続いて、カーネギーメロン大学（CMU）ナノテク環境影響研究所（Center for Environmental Implications of Nanotechnology: CEINT）のジョン・ステグマイヤー氏（John Stegemeier）が、デューク大学（Duke University）と共同で行った、浮草（Duckweed）に対する、銀と硫化銀ナノ粒子の影響を、断層写真（トモグラフィー）とレーザー（Laser ablation ICP-MS）で調べた実験を発表した。フランスの環境地球化学研究教育センター（Center de Rechrche et d'Enseignement de Geosciences de l'Environment: CEREGE）ファビエン・シュワッブ氏（Fabienne Schwab）も、植物に取り込まれたナノ粒子をナノスケールの断層写真を用いて 3 次元的に可視化する技術と、その可視化により、ナノ粒子の量を測る方法を紹介した。シュワッブ氏の研究では、ナノマテリアルが植物内に取りこまれ、移動する経路を解明した。

次に、アリゾナ州立大学（ASU）のジャレッド・シュエップ氏（Jared Schoepf）は、NSF の助成金を受け開発した、物質のスペクトルを解析するレーザー分光線観察装置（Laser Induced Breakdown Spectroscopy: LIBS）で、食物に含まれているナノマテリアルへの暴露状況を短時間に調査できる技術を紹介した。この LIBS を用い、市場に出回っている一般的な食品群を調査した結果、ナノマテリアルを含む旨をラベルに記載していなくても、二

酸化ケイ素（SiO_2）やチタン（TiO_2）のナノ粒子が検出された食品が多く発見されたという。

ポルトガルのアヴェイロ大学（Universidade de Aveiro）のソニア・ロドリゲス氏（Sonia Rodrigues）は、機器類、布、食品などに使われている抗菌剤に含まれる、銀、金、二酸化チタン（TiO_2）、一酸化亜鉛（ZnO）などの金属の工業ナノマテリアルの環境中の移動と運命を、農業地帯の土壌をサンプルにしたインビトロ・バイオアクセシビリティ試験によって評価した例を紹介した。

（iii） **セッション** 2B：Social Systems and Governance

社会システムと政策セッションでは、計 7 件のプレゼンテーションが行われた。このセッションでは、ナノマテリアルについてのリスクを伝達および理解する、リスクコミュニケーション方法や実践例の紹介が多かった。

まず、コンサルタント会社コンパス・リソース・マネジメント社（Compass Resource Management）と、カナダのブリティッシュコロンビア大学（University of British Columbia: UBC）資源・環境・持続可能性研究所（Institute for Resoruces, Environment and Sustainability: IRES）に籍を置く、クリスチャン・ボードリー氏（Christian Beaudrie）が、ナノテク開発におけるリスクガバナンスと、ナノマテリアルが果たす社会への貢献について発表した。リスクガバナンスは、従来のリスク分析を拡大し、リスク評価、リクス管理、リスクコミュニケーションを含んでいると説明した。

他 4 件のプレゼンテーションは、このリスクガバナンスの、特にリスクコミュニケーション分野の研究に、集中していた。

アリゾナ州立大学（ASU）のカミラ・ジェンセン氏（Camilla Jensen）は、ナノマテリアルのライフサイクル評価に、ステークホールダーの意見・価値観を反映させた例を、チャートを使って紹介した。また、ジェンセン氏と共同研究を行っている、同大学のケイトリン・ボルサームス氏（Katlin Vortherms）が、レゴブロックを使い、研究者が協力して問題解決する上での課題や成功例などを浮き彫りにする手法を発表した。続いて、同大学のマーガレット・ハインリックス氏（Margaret Hinrichs）が、ナノテクを扱う研究者チームの成員間のコミュニケーションに関するアンケート結果を紹介した。さらに、アイラ・ベネット氏（Ira Bennett）は、同大学の「社会の中のナノテク研究所（Center for Nanotechnology in Society）」の大学院生とエンジニアに対し実施した、「研究結果が社会へもたらす影響まで考慮し、責任ある研究を行える研究者」の養成講座の試験的取組み

を紹介した。この取り組みでは、科学・工学分野専攻の学生に社会学の研究をさせたり、首都ワシントン DC で政策立案現場を体験する機会を設けたりするなどしている。

ノースダコタ州立大学（North Dakota State University: NDSU）のラジャニ・ガネシュ・ピライ氏（Rajani Ganesh Pillai）は、NSF と米国農務省の助成金を受けて実施した、ナノテクに対する市民の認識・考え方・受容（Perception-Attitude-Acceptance）のモデル研究を紹介した。ナノテクに対する一般の反応は概ね「有用な技術である」と好意的であったが、そのリスクに関する知識には、乏しい状態であった。

カリフォルニア大学ロサンゼルス校（UCLA）に籍を置く、法律家のティム・マーロイ氏（Tim Malloy）は、法定・規制当局との効果的なコミュニケーション方法について発表した。同氏は、実例として、米国の有害物質規制法（Toxic Substances Control Act: TSCA）下でのナノマテリアルを含む化学物質の毒性試験において、動物実験の代替となる試験手法を採用するか否かという EPA の意思決定の過程を挙げ、数種の動物実験を使った毒性試験と代替手法での試験のコスト比較などを示しつつ、リスクや利点などを分析・共有する際の課題などを説明した。

(iv) **セッション** 3C：Solid Waste and E-waste Reduction and Cycling

固形廃棄物と電気・電子機器関連のゴミの低減と循環に関するセッションでは、計５件のプレゼンテーションがあった。このセッションでは、ナノマテリアルを、排水や汚泥から回収する技術を紹介した発表が多かった。

バージニア工科大学（Virginia Polytechnic Institute and State University: Virginia Tech）のピーター・ヴァイクスランド氏（Peter Vikesland）は、排水からナノマテリアルを回収するべきか否か、また、どのナノマテリアルを回収すべきなのかをテーマとして発表した。太陽光発電や水浄化システムなど環境に優しい技術に使われているか否かを指標とし、希少度とも合わせて、金やネオジミウムを優先物質として特定した。そして、これら物質を汚泥や廃棄物から取り出す研究論文など、既存の文献を調査した。ヴァイクスランド氏は、これらの物質を製品に使用する際は、回収手段も考慮したデザインが必要ではないかと述べた。

台湾の国立中興大学（National Chung Hsing University）から参加したレンシャウン・ヤン氏（Ren-Xaun Yang）は、プラスチック製品の増加に対し、原料である石油の枯渇を見据え、文献調査により特定した２段階の反応炉を用い、ニッケル、鉄、コバルトなどの金属をエチレングリコールに溶かし、有機加工したモンモリロナイト（Organically-Modified Montmorillonite: OMMT）を触媒として加える方法で、炭素と水

素を主な成分とするプラスチックゴミを、カーボンナノチューブ（CNT）と水素に分解する実験結果を発表した。実験の結果、ニッケルと OMMT を組み合わせた触媒を使うと、最も純度が高く、量も多くの CNT を得ることができた。

アリゾナ州立大学（ASU）のアンジャリ・マルチャンダニ氏（Anjali Mulchandani）の研究も、米国の汚水処理施設の下水汚泥から金属ナノ粒子を回収する方法についての発表であった。汚泥中に多く含まれる金属ナノ粒子のうち、経済的価値の高い銀、金、パラジウム（Pd）に的を絞り試算した結果、１トンの汚泥から回収できるこれらの物質の価値は約 280 ドルとなった（百万人規模のコミュニティの場合、年間 1,300 万ドル）。マルチャンダ二氏は、水熱反応溶解（Hydrothermal liquefaction）法を使って汚泥から金属を取り出す実験をし、研究対象となったカルシウム、リン、カリウム、鉄、アルミ、クロム、銀、金、亜鉛、銅、ニッケル、ヒ素、カドミウムのうち、60%～80%の金属が、バイオ炭（Biochar）になった処理段階で、回収できることがわかったと報告した。

マサチューセッツ州にあるスミス大学（Smith College）のパラムジート・パティ氏（Paramjeet Pati）は、金のナノ粒子を廃棄物から回収する価値があるかどうかを調査した結果を発表した。これによると、金のナノ粒子を新規に製造する際に使われるエネルギー量や、環境への毒性が懸念される副産物の化学物質のことを考慮すると、新規に金のナノ粒子を製造するより、金のナノ粒子のリサイクルを奨励するべきである。しかし、リサイクルする際に高温で煮沸する過程が、化石燃料の使用による温暖化の助長に繋がる。新規製造とリサイクルのバランスは、全過程で消費されるエネルギー量を考え、材料のライフサイクルとして総合的に見るべきであると説明した。

オークリッジ国立研究所と米国内の大学のコンソーシアムである、オークリッジ提携大学コンソーシアム（Oak Ridge Associated Universities: ORAU）のグレゴリー・ニコラス氏（Gregory Nicolos）は、現在、約 1,700 種もの製品に工業ナノマテリアルが使われており、毎年、大量の工業ナノマテリアルを含む廃棄物が埋め立て廃棄されている現状を示した。その上で、廃棄物になった時点での毒性を低減し、リサイクル可能な工業ナノマテリアルを使った製品のデザインを促進し、規制法を整えるためにも、工業ナノマテリアルの処理マネジメントのための統一規格が早急に必要であると述べた（ただし、国内あるいは国外でどの機関が担当するといった具体的な話には言及無し）。

(v)　**セッション** 4B：Biological/Ecological Systems

環境システム、つまりナノテクの生物学的応用に関するセッションでは、計８件のプレゼンテーションがあった。ナノマテリアルの微生物への作用や毒性研究が７件と、バクテリアに対するナノテクを応用した抗菌作用の研究が、１件あった。

カーネギーメロン大学（CMU）CEINT から３件の研究発表があった。ケルビン・グレゴリー氏（Kelvin Gregory）は、工業ナノマテリアルである酸化チタン（TiO_2）の形状や量の、微生物（桿菌）への毒性を調べた実験結果を報告した。実験では、桿菌がコロニーとして生存および増殖するために重要である、桿菌コロニー内でのコミュニケーション・プロセスを、酸化チタンのナノ粒子が阻害している可能性が高いことがわかったという。ジョー・ムーア氏（Joe Moore）は、河川などに放出された工業ナノマテリアルが、天然の水浄化作用があるバクテリアに及ぼす毒性を調べた実験結果を報告した。人工の自然界水循環サイクルの類似環境を作り実験した結果、銀・銅ナノ粒子の微生物への影響を自然の硫化作用が低減せず、微生物は死滅・減少したが、もう一方の観察群では、観察日数 300 日を経過した時点で、環境の自然回復力がナノ粒子の微生物への影響を低減し、対象微生物群はナノ粒子を与えていないコントロール群同様の増殖を見せたという。アレックス・ベルトゥッチオ氏（Alex Bertuccio）は、抗菌作用がある銀のナノ粒子で覆われた物質の表面にバクテリアが繁殖する場合があるのは、バクテリアが表面に膜状のコロニーであるバイオフィルム（biofilm）を形成し、銀のナノ粒子と接触せずに死滅をまぬがれたバクテリアがいることが原因であるとの実験結果を発表した。

オレゴン州立大学（Oregon State University: OSU）からは、２件の発表があった。テイラー・ラドニエッキ氏（Tyler Radniecki）は、消費者製品の抗菌剤として使われる銀のナノ粒子が排水中に放出された場合を想定し、排水処理で使われる硝化バクテリアに及ぼす毒性を、銀のナノ粒子の形状とサイズに注目して実験した結果を発表した。この研究では、プレート状の銀のナノ粒子の方が、同様のサイズのナノ粒子より、毒性が強いことがわかった。また、銀のナノ粒子の水溶液に、イオン吸着力を特性とする牛血清アルブミン（bovine serum albumin: BSA）を加えると、BSA が銀のナノ粒子と結合し、銀のナノ粒子のバクテリアへの毒性が弱まったと報告した。次にレイラ・ベイカー氏（Leila Baker）が発表した、ラドニエッキ氏との共同研究は、銀のイオンと銀のナノ粒子が硝化バクテリアに及ぼす影響を比べたもの。その結果、銀のナノ粒子がバクテリアのバイオフィルムに与える毒性は確認できなかったが、銀イオンの毒性は観察できたと報告した。

ノースダコタ州立大学（NDSU）のサンジヴニ・シンハ氏（Sanjivni Sinha）の研究は、作物に鉄分増強剤として与えられているゼロ価鉄のナノ粒子（nano zero-valent iron: NZVI）が、微生物に及ぼす影響をバクテリアの遺伝子を使って実験したもの。NZVI の毒性は、その量と、バクテリアのいる環境の水素イオン指数（pH）により、変化することがわかったと報告した。バージニア工科大学（Virginia Tech）の、マリア・リケルメ氏（Maria Riquelme）の発表も、ナノマテリアルと微生物との関連を調べたもので、動物飼料に加えられているセルロースのナノ粒子が、環境中で分解される過程で、微生物の発生に影響を

及ぼす可能性のある酵素が放出されるかどうかを調べた。実験結果によると、セルロースのナノ粒子は、自然界で容易に分解されたという。

ミネソタ大学（University of Minnesota: UMN）のクリスティ・ヘインズ氏（Christy Haynes）の発表は、金のナノ粒子が、細胞膜と外膜を持つグラム陰性菌と、外膜を持たないグラム陽性菌に及ぼす影響を調べたもの。実験結果によると、ナノ粒子は健康なバクテリアの細胞内に侵入しないと考えられるが、それはバクテリアの細胞膜の状態によることがわかった。また、金のナノ粒子は、水性の環境では毒性が増すことも示された。ナノ粒子の毒性評価の対象となる生物の表面の化学的組成も考慮すべきであると提言した。

（vi） **セッション** 5C：Biological/Ecological Systems

セッション 5C では、上記同様、ナノテクの生物学的応用に関する計７件のプレゼンテーションがあった。ナノマテリアルの環境中での行動や作用に関する研究の発表が５件と、ナノテクの生物学的応用の研究の例が２件あった。

テキサス大学オースチン校（University of Texas at Austin: UTA）のナビッシュ・サレ氏（Navish Saleh）によると、近年、電池、センサー、殺菌剤などの用途に、金属や金属酸化物を用いたナノハイブリッド材料の使用が増加しているが、ナノハイブリッド材料の性質はまだわからないことが多い。サレ氏は、銀、亜鉛、チタンなどの金属及び金属酸化物ナノ粒子が、多層カーボンナノチューブ（CNT）と接合して生成されるナノハイブリッド材料である、金属-炭素質ナノチューブ（Metal Carbonaceous Nanotubes）の、環境中での移動・凝集に関して研究した。研究の結果、CNT とナノハイブリッドの間で、有機物がその運動に与える影響が異なった。

オレゴン州立大学（OSU）のマーク・シュレッテ氏（Mark Surette）は、工業ナノマテリアルを用いた表面コーティングへの水環境での影響を評価した研究について発表した。研究結果によると、溶液中の水素イオン指数（pH）が上がると、表面をコーティングするナノマテリアルの凝集度は下がり、凝集を防ぐ作用がみられたという。

国立標準技術局（National Institute of Standards and Technology: NIST）のクリストファー・シムズ氏（Christopher Sims）は、毒性が注目されている酸化セリウムのナノ粒子について、サイズと形による生理化学的影響の違いの研究について発表した。その結果、球状のナノ粒子が、一番毒性が強かった。

オレゴン保健科学大学（OHSU）のポール・トラントニエック氏（Paul Trantnyek）は、カルボキシメチルセルロース（CMC）で修飾したゼロ価鉄のナノマテリアルの量的特性化

に、レドックスプローブとなる化学物質（Chemical Redox Probe: CRP）を使用した例を紹介した。

パシフィック・ノースウェスト国立研究所（PNNL）の D・R・バエール氏（D.R. Baer）は、2013 年にナノテク関連の研究者を対象に、現在必要とされるナノマテリアルに関する標準や統一規格の内容を聞いたアンケート調査結果から、ナノマテリアルの表面分析を実施する前の準備のための標準ガイダンスや、ナノマテリアルの取扱いに関する統一規格が早急に必要ではないかと述べた。なお、この研究は米保健社会福祉省（Department of Health and Human Services: DHHS）傘下の国立衛生研究所（National Institutes of Health: NIH）の助成金を受けて実施された。

ナノテクを応用した技術の発表としては、オレゴン州立大学（OSU）のルイス・センプリーニ氏（Lewis Semprini）の、グラフェンのナノ粒子を含むバイオトランジスタを用いて、バイオフィルムの硝化作用をモニタリングする研究があった。また、バージニア工科大学（Virginia Tech）の マリア・リケルメ氏（Maria Riquelme）は、ナノテクを抗生物質耐性遺伝子検査に応用した研究成果を発表した。研究の結果、金のナノ粒子を使い、排水中の黄色ブドウ球菌のうち、メチシリンに対する耐性を持つ菌の抗生物質耐性に関連のある mecA 遺伝子が検出できたと報告した。この研究は、NSF からの助成金を受けている。

（vii）**セッション** 6A：Biological/Ecological Systems

セッション 6A では、上記同様、ナノテクの生物学的応用に関する計 7 件のプレゼンテーションがあった。ナノマテリアルの健康への有害性を調べた研究発表が殆どであった。

インディアナ州立のパーデュー大学（Purdue University）のキャンディス・ツァイ氏（Candace Tsai）は、前駆物質を溶鉱炉で加熱し、カーボン多孔体を生成する際、排煙中にナノ粒子が放出されるかどうかを調べた実験結果を発表した。実験では、カーボン多孔体は、リチウムイオンなどに対する電極として優れた効果を発揮し、その前駆物質であるデンプン質ベースの有機物質も、環境に優しく安価であり、加熱する製造方法も比較的シンプルであることから、「持続可能な」物質であると仮説を立てていた。しかし、溶鉱炉のフィルターに、カーボンナノ粒子が検出された。また、長期間にわたるサンプリングでは、大きなナノ凝集体も見つかった。また、水フィルターでも、ナノマテリアルの排出を抑えるには不十分であるとの実験結果だった。

マサチューセッツ大学ローウェル校（Umass Lowell）のディミター・ベロー氏（Dhimiter Bello）は、インビトロの薬量測定（Dosimetry）が、工業ナノマテリアルの毒性評価に与える影響に関する実験の結果を報告した。また、今回の実験結果と照らし合わせて、ナノ

マテリアルの毒性に関する論文に発表されている、工業ナノマテリアルのインビトロの毒性に関するデータは、薬量測定を考慮して見直す必要があると提言した。

コロラド大学（University of Colorado）薬学部のジャレッド・ブラウン助教授（Jared Brown: 毒性学専門）は、銀のナノ粒子に対する 16 種類の異なる細胞の反応を調べ、その反応の差異の原因を探るため、たんぱく質などの分子がナノマテリアルを覆うことで形成されるバイオコロナに注目した研究について発表した。細胞がナノ粒子を取り込み、炎症が起き、バイオコロナが形成される過程で、ナノ粒子のたんぱく質構造への影響をインビトロ実験した結果、脂質に富んだ（Lipid-rich）バイオコロナが、炎症反応を変えることがわかったという。

ニューヨーク州にあるロチェスター大学（University of Rochester）環境医学部のアリソン・エルダー氏（Alison Elder）は、工業ナノマテリアルと健康との関わりの知識不足を解消し、持続可能性に貢献する、と題した講演を行い、ナノテク・ナノマテリアルの使用に伴うリスクと恩恵のバランスを図ることが大切であると述べた。そして、ヒトに対する最小毒性量（LOAEL）および最大無毒性量（NOAEL）を、科学的根拠の重み付け（weight-of-evidence）によって見極めるべきであると提言した。

アイダホ州立のボイシ州立大学（Boise State University）のキャサリン・アンダース氏（Catherine Anders）は、酸化亜鉛（ZnO）ナノ粒子の細胞毒性を利用し、正常細胞を傷つけずに癌細胞だけ選別して殺すことができるかどうかを調べる研究手法を改善させたと発表した。同氏によると、8 ナノメートルの酸化亜鉛ナノ粒子を用い、正常な細胞を傷つけずに癌細胞のみを殺すことができたという学術論文は複数あるが、ナノ粒子の特性化の手順（プロトコル）に統一性を欠いていることが問題であると指摘した。その上で、他の研究が、細胞毒性に影響があるナノ粒子の性質を調べるため、表面と構造を見るのに対して、同氏の研究では、コーティングもドープ（dope）もされていないナノ粒子を使い、合成のパラメータと合成方法だけを変えてみた結果、癌細胞がナノ粒子によって選別される様子が観察できたと報告した。

ウィスコンシン州にあるマーケッテ大学（Marquette University）のクラシミラ・フリストヴァ氏（Krassimira Hristova）は、真核細胞（eukaryotic）に対する酸化銅（CuO）のナノ粒子の毒性研究について発表した。酸化銅のナノ粒子は、酸化物のナノ粒子（nano-oxide）の中で、３番目に多く消費者製品に使われ、製造工程での暴露と環境への影響について懸念があるため、詳しく調べるべき物質であると説明した。実験の結果、市販の酸化銅ナノ粒子は、殆どが 11 ナノメートル～28 ナノメートルの球状であり、電子走査顕微鏡を使って、それらの粒子が、細胞の表面に凝集体（アグロメレート）になる様子を

観察できたことから、細胞膜の新陳代謝がナノ粒子により阻害されることがわかったという。更に、細胞膜に与えるストレスには、酸化銅ナノ粒子から放出された銅イオンが深く影響していることがわかった。

バージニア工科大学（Virginia Tech）のマージョリー・ウィルナー氏（Marjorie Wilner）は、糖鎖に結合活性を示すタンパク質であるレクチンで、癌細胞が検知できるという説を、表面増強ラマン分光法（Surface Enhanced Raman Spectroscopy：SERS）を使って検証した実験について発表した。その結果、レクチンで癌細胞が検知できることが観察できたという。また SERS は、一つの細胞レベルでの観察を可能にし、ナノテク・ナノマテリアルの研究に有用であると報告した。この研究は、NSF の助成金を受けている。

（2） MARINA Workshop

（ア） 概要

期間：2016 年 1 月 25 日

場所：東京理科大学神楽坂キャンパス守屋メモリアルホール（日本・東京）

MARINA は、過去４年間にわたり、ナノ材料のリスクマネージメント手法の開発と検証を行ってきた多国籍間の取組みであり、いくつかの日本人研究者グループも参加し、このプロジェクトで重要な役割を担い、洞察力と専門知識を提供してきた。日本のナノ材料の研究者及び開発者は、この新規技術領域の先駆者の中にいるので、非常に重要なことである。

MARINA の中では、柔軟性があって効果的な RA 戦略が人の健康における様々なライフサイクルステージ間の ENM の多様な特性の影響を環境リスクと結び付けて考慮しながら、開発された。MARINA はナノ材料のリスクアセスメントとマネジメントに関して、全部で４つの中心的テーマに取組んだ：材料、暴露、有害性、リスク。

このワークショップの目的は、MARINA プロジェクトのいくつかの重要な知見を提示することであり、特に、日本の研究者と日本の産業に対して重要性の高い見地に注目した。発表者は、今回注目している領域において有名な研究者であり、その多くは、MARINA プロジェクトに活発に関与している。

以下、MARINA ワークショップのプログラムを示す。

時間	発表者と発表内容
9:00-9:15	Opening (Gaku Ichihara and Michael Riediker)
9:15-10:00	Risk assessment framework and Occupational exposure Limit (Prof. Toru Takebayashi)
10:00-10:30	(Coffee / tea break)
10:30-11:15	Overview of the MARINA project and th tiered risk assessment approach (Dr. Michael Riediker)
11:15-11:50	Synthesis of flluerene nanowiskers with controlled sizes and their physical properties (Dr. Kunichi Miyazawa)

	Toxicology: in vitro
11:50-12:25	The interaction between nanomaterials and cells (Dr. Akiyoshi Taniguchi)
12:25-13:25	(Lunch)
13:25-13:40	Remarks of President Fujishima (Tokyo University of Science)
13:40-14:25	Long-term inhalation toxicity of carbon nanotubes; whole body inhalation for human-relevant exposure scenario (Dr. Jun Kanno)
14:25-15:00	Cardiovascular and autonomic nerveous system effects of manufactured nanomaterials (Prof. Gaku Ichihara)
15:00-15:30	(Coffee / tea break)
	Exposure:
15:30-16:15	Tiered exposure assessment strategy (Dr. Michael Riediker)
16:15-16:50	Exposure Evaluation at Job Site and Future Issues (Dr. Takahiro Kobayashi)
16:50-17:20	Concluding panel discussion (Michael Riediker and Gaku Ichihara)

（イ） 発表および議論の概要

(i) Dr. Michael Riedker（IOM）によるオープニングの挨拶とプレゼンテーション "Overview of the MARINA project and the tiered risk assessment approach"

- MARINA には 50 のプロジェクトがある。統合的アプローチを段階的に進めており、新たに tiered approach によるリスク評価戦略（RAS; Risk Assessment Strategy）の開発を進めている。
- RAS 開発の中身については、例えば、基本情報として、化学的特性、物理学的特性、基本的な挙動（溶解度や分散性、疎水性、など）、反応、などの情報を収集することが必要であり、その後、grouping と readacross を行う。grouping と readacross では、phase I で問題のフレーミングを行い、phase II でリスク評価を行う。
- RAS はナノ材料のリスク評価を行うために必要な情報を効果的に収集するためのバックボーンを提供する。
- 労働環境の評価を行うためには、リスクの全体像を理解し、それらのリスクをマッピングした上で、コミュニケーションをとることが必要である。労働環境の評価には、規制や施設管理、訓練、開発されたプロセス、企業理念、等が関係してくる。

(ii) Prof. Toru Takebayashi (Keio Univ.)によるプレゼンテーション "Risk assessment framework and Occupational exposure Limit"

- SOH OEL(-M)に関する用量-反応関係と閾値から、労働者の健康を保護し、健康リスクを削減するためには、適切な OEL の開発が必要である。
- OEL では、経口負荷と用量メトリックスが課題である。

- 多くのケースでは、限られたデータが利用されており、完全に定量的なリスク評価ができていない。
- 可能性のあるフレームワークの１つとして、完全に定量的なリスク評価を選択したリファレンス物質と、リファレンス物質との比較分析により簡便化したリスク評価を組合せがある。
- 欧州の場合は基本的には企業がボランティアベースで実施し、政府や規制は次の段階に位置付けられる。それに対して、日本の場合は、全て政府が基本となっており、違いがある。

(iii) Dr. Kunichi Miyazawa (NIMS) によるプレゼンテーション "Synthesis of fullerene nanowhiskers with controlled sizes and their physical properties"

- C_{60} フラーレン・ナノチューブを重合した。合成されたフラーレン・ナノワイヤーの強度は約 10MPa で､重合により GPa まで強度が増すことが期待される。

(iv) Dr. Akiyoshi Taniguchi (NIMS) によるプレゼンテーション "The interaction between nanomaterials and cells"

- 日本人を対象に、ナノ材料の安全性に関するイメージについてアンケート調査を行ったところ、2005-2009 年には 30%が very bad / bad であり、80%が very good / nice と回答したが、一方で 2007 年に実施した DNA 組換え技術についてのアンケートでは、20%弱が very nice / nice、60%弱が very bad / bad と異なる結果となっている。ベネフィットとリスクのバランスについては、薬物については effect>side effect、ナノ材料については benefit>risk、との関係になっている。
- In vitro ナノ毒性に関しては、in vitro と in vivo の差異が問題となっている。
- 非常に高濃度のナノ材料に細胞を暴露して場合に、低用量のナノ材料が細胞に与える影響はどうなるのか、を調べるために、多用途に用いられている TiO2 を使って実験を行った。ヒトに対する潜在的な健康リスクについては、低用量ナノ粒子は細胞内に内在化した。低用量と高用量のナノ粒子での細胞生存率の違いは、TiO_2 ナノ粒子では時間とともに生存率はなだらかな増加を示したのに対して、TiO2-PEG ナノ粒子では、暴露初期に急激な増加を示した。100μg/ml 程度の低用量ナノ粒子は細胞成長を誘発し、細胞サイクルも誘発した。このことから、細胞の取組みが少ないと細胞毒性が低くなるという仮定や、ナノ粒子が HGFRs の局在化に変化を与え、HGFRs の強凝集体の形成を導くという仮定も考えられたが、最終的には、HGFRs が単独の場合は刺激は小さいが、HGFRs が強凝集化することで強い刺激となり、あらゆる増殖を促進すると仮定した。

- 非細胞毒性効果は細胞に対して問題がないことを意味するのか。その場合、ナノ材料は細胞応答にどのような影響を与えるのか。これを調べるために、刺激因子として、成長因子 EGF とナノ粒子を選択して実験を行った。ナノ粒子には、ポリスチレンナノ粒子を持市多。また、細胞は A431 細胞株を用いた。50nm のポリスチレンナノ粒子でも、100nm のポリスチレンナノ粒子でも、細胞生存率はほぼ 100%で、A431 細胞株の生存率に対して影響はなかった。ナノ粒子は低濃度でも高濃度でも A431 細胞の EGF 受容体を阻害した。また、50nm も 100nm もポリスチレンナノ粒子は A431 細胞内に局在化していた。

(v) President Fujishima (Tokyo University of Science)による挨拶

- President Fujishima より歓迎の挨拶があった。

(vi) Dr. Jun Kanno (NIMS) によるプレゼンテーション "Long-term inhalation toxicology of carbon nanotubes; whole body inhalation for human-relevant exposure scenario"

- 粒子状物質でヒトへの慢性毒性を引き起こす物質としては、アスベスト、トロトラスト、溶接ヒュームがあり、アスベストは中皮腫／肺がんを、トロトラストは網内径に永久的に残ること、溶接ヒュームは心疾患を誘発することが知られている。
- Takagi et al. Cancer Science, 2012 によれば、低用量群マウスの 80%が早期に病変を発症することが報告されている。しかし、MWCNT の全身吸入暴露による慢性毒性についてはまだ試験が行われておらず、わかっていない。そこで、MHLW では、全身への吸入暴露試験を行うための方法として、Taquann 法を開発し、Mitsui-7 を用いて実験を行った。従来法では、強弱凝集体を含むエアロゾルをラットに吸入させていたため、実際のヒトの吸入の状況とは異なっていたが、開発した手法により、凝集体を含まないエアロゾルをラットに吸入させることができるようになった。よく分散した単繊維エアロゾルを準備するために、分散剤を用いず、サイズも変化しないようにした。
- 気管支／気管支の変化については、明確な影響はなく、加齢による変化がカウントされた。粘膜毛様体除去は 13 週目まで活発であった。
- 肺胞の変化は、高濃度の場合には、粒子が病巣肝炎を誘発し、低濃度では病巣肝炎の密集した病変、つまり肝炎の分散を確認した。全体としては、肉芽腫の形成のない進行性の肺線維症を発症した。
- 転座はほとんどの場合、急に起き、局所リンパ節の沈着と、胸膜腔 - 頭頂胸膜病変、循環による全身影響、を観察した。慢性吸入毒性因子は、生物濃縮は低い急性毒性と、重度／進行性の慢性毒性、に影響し、溶解性のものは急性毒性

を誘発することが可能である。形状やサイズは食作用の遅れを引き起こすが、肉芽腫は形成しない。分散状態は、気管内投与により、弱凝集体による異物肉芽腫を誘発する傾向があり、よく分散した吸入では、肉芽腫性病変を誘発しない可能性がある。

- 吸入暴露による累積肺負荷量は、ガス状で毎日吸入した場合よりも粒子状で毎日吸収した場合は半分になるため、実験初期に短時間で目標とする負荷量に到達させることで、肺に対して一定量の負荷を維持することができる。毒性のエンドポイントと投与計画は、肺線維症／発がんは、沈着した物質により誘発され、免疫病（喘息）は、沈着した物質と転移した物質の両方により誘発する可能性が考えられる。
- 慢性吸入毒性は、生物濃縮、サイズ／形状、肺での分散状態、投与計画、毒性のエンドポイント等の因子の関数としてあらわされる。これまで行われているナノ材料を用いた in vivo での全身慢性毒性試験の多くは、十分な特徴づけはまだできていない。全身吸入試験を行うナノ材料物質の選定／優先順位付けが重要となる。

(vii) Prof. Gaku Ichihara (TUS) によるプレゼンテーション "Cardiovascular and autonomic nerveous system effects of manufactured nanomaterials"

- 米国の疫学研究の成果によれば、肺がんの発症とその他の致命的な呼吸器疾患のリスクは、リフェレンスに比べて、バルクの TiO_2 に暴露した作業者で有意に高くないことを示した。他方、全ての心疾患の死亡率には統計的に有意な違いはなかったが、心血管患者の死亡率はバルク TiO_2 への暴露で増加した。
- 中国・上海では TiO_2 の出荷を行っている工場があり、この工業の作業者は高濃度の TiO_2 に暴露していることが以前の調査で示唆されている。そこで、本調査では、作業者の呼吸器と心血管の状態について 16 人の男性作業者を対象として調査した。調査は、質問票によるインタビューと、物理試験、Chest X 線、スパイロメーターによる呼吸器機能、ECG、心エコー検査、HolterECG を行った。
- ４人の労働者で心拍変動（HRV）が確認され、暴露後 1 分に心拍数が大きく影響をうけた。

(viii) Dr. Michael Riediker (IOM) によるプレゼンテーション "Tiered exposure assessment strategy"

- 作業環境におけるナノ材料のリスク評価に関しては、放出から暴露は詳細には、「release（放出）→emission（排出）→transmission（伝達）→immision（侵入）」に分けられ、release からは release rate[p/min]が、immision からは

exposure concentration[p/cm3]が導かれるが、各々の単位は異なっている。

- 作業環境のリスク評価を行うためには、ナノコンポジットから大気中に排出される基となる物質（ナノフィラー：金属、金属酸化物、炭素材）や材料（マトリックス：セラミック、セメント、ポリマー）、活動（メカニズム的、化学的、環境的、混合プロセス）を理解し、そこからでてくるナノ物質の形態・状態を特定することが必要であり、作業プロセス別に、作業空間のどの部分にどのようなナノ材料が飛散している可能性があるかと特定することが必要である。
- 作業プロセス別に放出される粒子濃度の特徴づけ等を行い、放出についてのフレームワークを作成する。このようにして作成されたフレームワークのうち、MARINA プロジェクトが対象としているのは、暴露評価に関する部分であり、暴露シナリオに関するライブラリーとして、様々なプロジェクトと協力してデータベースの充実を進めている。

(ix) Dr. Takahiro Kobayashi (NIES) によるプレゼンテーション "Exposure Evaluation at Job Site and Future Issues"

- 暴露評価についての将来の課題は、ナノ材料のライフサイクルアナリシスが必要であること、暴露評価がヒト体内への取込みに影響すること、データの外挿においては、ヒト健康へのナノ材料の影響予測において、in vivo から in vitro への外挿はハイスループット・アッセイシステムを開発するのに非常に重要である。

(x) Michael Riediker と Gaku Ishihara による Concluding panel discussion

- 全体のまとめとともに、会場から、民間企業において、作業者の安全管理に関する情報共有がなされた。

(3) Seminar on Risk Assessment and Regulatory Programmes for Nanomaterials

(ア) 概要

期間：2015 年 11 月 2 日

場所：OECD Conference Centre（フランス・パリ）

OECD の第 15 回工業ナノマテリアル作業部会（WPMN）の開催に合わせ、ナノマテリアルの有害性やリスク評価アプローチ、リスクマネージメントに係る実施結果、について、これらの活動に取組む OECD 加盟国から報告があり、その後、全体での議論が行われた。

プログラムを以下に示す。

Progrum		
12:00 – 12:15	Welcome and Opening Remarks	Chair: Jim Alwood (US EPA)

SESSION 1: HAZARD/RISK ASSESSMENT APPROACHES		
12:15 – 12:45	Nanomaterials in Consumer Products	Kenneth Moss (US EPA)
12:45 – 13:15	Canada's approach to prioritizing nanomaterials for regulatory risk assessments	Brad Fisher (Environment Canada)
Break 13:15 – 13:30		
13:30 – 14:00	Denmark – Assessing Risks of Nanomaterials	Flemming Ingerslev, (Denmark)
14:00 – 14:30	Industry Perspectives on Risk Assessment/Risk Management	Shaun Clancy (Evonik, BIAC)
Break 14:30 – 15:00		
SESSION 2:RISK MANAGEMENT EXPERIENCES		
15:00 – 15:30	EU (ECHA) Implementation of REACH – Experiences gained	Jenny Holmqvist (EU ECHA)
15:30 – 16:00	Information Gathering Rule	Jim Alwood (US EPA)
Break 16:30 – 16:50		
SESSION 3: DISCUSSION/SUMMARY		
16:50 – 17:50	Discussion and Summary	Chair: Jim Alwood (US EPA)
17:50 – 18:00	Wrap-up and Closing Remarks	

（イ） 発表および議論の概要

(i) Nanomaterials in Consumer Products： Kenneth Moss (US EPA)

米国 Moss 氏から、消費者製品中のナノマテリアルの状況について報告があった。米国には、連邦規制機関から独立した、消費者製品安全委員会（CPSC）があり、消費者製品と関連のある損傷の不合理なリスクを低減することを使命として活動している。

関連法規制としては、CPSA（Consumer Product Safety Act）、FHSA（Federal Hazardous Substances Act）、CPSIA（Consumer Product Safety Improvement Act of 2008）、LHAMA（Labeling of Hazardous Art Materials Act）、PPPA（Poison Prevention Packaging Act）がある。FHSA では、有な化学物質または有害性のある物質を含む製品を対象とし、暴露も考慮している。また、ケースバイケースで有害性評価の実施も要求している。また、玩具などの子供が使用する商品には有害性のある物質を含むことを禁止している。

CPSC は 2005 年にナノマテリアル宣言を出した。そこで、CPSC の既存のステータス、規制、ガイドラインの基に、ナノマテリアルの潜在的な安全性と健康リスクを評価すること、CPSC のスタッフは、FHSA の基に、製品による消費者への潜在的な慢性的健康影響を評価すること、解析は得意な暴露とリスク評価戦略が要求される可能性があること、を述べている。

リスクベースでのナノマテリアルによる影響に取組むアプローチには、有害性の特定、用量反応、暴露評価、があり、有害性の特定では、ナノマテリアルに関する毒性データの利用と、消費者暴露に係る毒性データと消費者が製品を利用するシナリオとの関係について検討が必要である。用量反応では、人の暴露と取込みに関する閾値、ADI（1 日摂取許容量）が重要である。暴露評価では、放出を人への暴露について特定し、定量化する手法が必要となる。

CPSC ナノテクノロジー・イニシアティブに関しては、2011 年に CPSC はナノマテリアルの潜在的な健康影響に取組むための公的研究プログラムを開発し、連邦のパートナーと省庁間の同意のもとで共同研究プロジェクトを進めてきた。そこには、学術界の研究者も関与している。CPSC の研究活動の目的は、製品中のナノマテリアルの用途を特定すること、製品からの放出を定量し、特徴づけるための頑健な手法を開発すること、その後の人への暴露を推定すること、予測モデルを開発すること、である。省庁間研究の事例としては、エアロゾル・スプレーからのナノマテリアルの放出に関するものがある。この研究では、NIOSH と interagency 同意（IAG）をした。選択した消費者製品からのナノスケールの TiO_2 の放出に係る研究を行い、製品中のナノマテリアルを特定することに成功した。また、産業界が製品試験に利用するための手法を開発した。さらに、他のナノマテリアルにも手法を改良できるように、追加的な研究によるフォローアップを行っている。そのほか、テキスタイルと子供用製品のナノ銀に関する研究を CPSC と EPA、NIOSH の共同で実施したものもある。

(ii) Canada's approach to prioritizing nanomaterials for regulatory risk assessments : Brad Fisher (Environment Canada)

カナダ Fisher 氏から、カナダにおけるナノマテリアルに関する化学物質の枠組みと、カナダ commerce でのナノマテリアルの評価に関して提案されているアプローチ、情報収集、次なるステップ、現在と将来の課題、について報告があった。

カナダにおける化学物質の枠組みは、Canadian Environmental Protection Act（1999）に基づき、国内物質リスト（DSL）にあるかどうかを基に、既存と新規に化学物質を区分する。新規化学物質は、DSL にはなく、上市前に人と環境へのリスク評価が必要である。既存化学物質については、DSL にあり、上市後のリスク評価が優先されていた。

カナダ保健省による、ナノマテリアルの作業定義は、カナダ保健省が 2011 年 10 月 6 日に"Polisy Satement on Helath Canada's Working Definition for nanomaterial"を adopt した。カナダ保健省は、様々な人工的な化学物質や製品、コンポーネント材料、ingredient、デバイス、ナノマテリアルの構造を対象として考慮している。ナノマテリアル構造とは、内部または表面構造がナノスケールか、少なくとも外径の 1 つがナノスケールか、それに含まれるもの、全ての径がナノスケールより小さいか大きくて、1 つあるいは複数のナノ

スケール特性／現象を示すもの、である。この定義は、the Chemials Framework in Canada に基づくナノマテリアルの定義に関する基礎として使用される。

新規化学物質は、100kg／年、あるいは 10,000kg／年のようなトリガーとなる量以上に製造または輸入する場合に届出を提出しなければならない。カナダ環境省と保健省は協力して、上市前のリスク評価の実施を行い、問題が特定されるかどうか、届出された物質についての管理手法を強制するかもしれない。例えば、58 のナノ関連リスク評価は、32 の物質特定管理手法を使って完全な形で実施された。既存ナノマテリアルについては、DSL にある CAS　No.のある物質は、カナダ商業でのナノスケール形態のものもあるが、DSL のナノスケール形態ではないナノマテリアルもあり、そうした物質は、新規物質プログラムに基づき届出されないか、既存化学物質の枠組みに基づく評価が行われない。カナダでは、カナダ商業ですでにナノマテリアルの遺産に取組むアプローチを、化学物質マネージメント・プランの一部として開発を進めている。

既存ナノマテリアルについて提案されているアプローチは 2015 年２月に、カナダが Proposed Approach to Address Nanoscale Forms of Substances on the Domestic Substances List に関する consultation document を公表した。段階的アプローチは、カナダの既存ナノマテリアルのレファレンス・リストを設置すること、明確で透明性のあるクライテリアに基づくアクションに係る既存ナノマテリアルを優先順位づけすること、さらなる作業のために特定されたナノマテリアルについての適切なアクションを行うこと、である。そのほか、人の健康及び環境への潜在的なリスクに取組むための既存のアプローチを考慮すること、ステークホルダー関与のために設置されたメカニズムを活用すること、国内及び国際的に増えていく科学的知見と経験を利用していく、がアプローチとして提案されている。

既存ナノマテリアルのリスト化を始めたところであり、現在、206 の物質がナノマテリアルとしてリスト化された。有機顔料やポリマー、天然の物質は対象外としている。

情報収集に係る次期アプローチとして、CEPA1999 を基に公表された基礎的義務情報取集調査が、2015 年７月に公表され、物質の特性、量、用途に関する情報を収集し、カナダ商業におけるナノマテリアルのリスト開発に関する情報を示し、将来の活動の優先順位づけ情報を提供した。リスク評価情報を提供するためには、さらにターゲットに絞った情報収集が必要である。

義務情報収集調査では、206 のナノマテリアルの参照リストにあり１－100nm の包括的範囲にあり、2014 年の１年間に 100kg を超える製造または輸入が行われた物質かどうかについての報告要件がある。また、物質の特性、量、用途、物理化学的特性や暴露、毒性に関する研究結果が公表されているか否かについての情報の提出が要求される。人工的なアイテムは報告対象ではない。

今後については、義務情報収集調査に対する対応期限が 2016 年２月となっている。ステークホルダーワークショップが 2016 年春に予定されている。また、国際的な議論やステー

クホルダーとの議論を継続的に実施し、カナダの既存ナノマテリアルに係るアプローチの開発を進めていく予定である。

現在及び将来の課題については、まず情報収集については、十分な情報を収集することと、最小の負担で報告し続けることのバランスが必要である。また、報告者に対して、明確なガイダンスを提供することが必要である。次に、ナノマテリアルのグルーピングについては、優先順位づけに関するグルーピングとリスクアセスメント目的でのグルーピングがあるが、前者については、206 の個別ナノマテリアルの優先順位づけと評価は実質的あるいは実現可能であり、従来型の化学物質からのグルーピング原則を用いることが効果的である。しかし、ナノマテリアルに関する妥当性はいまだに不明である。後者については、優先順位づけのために使用するグルーピングは、リスクアセスメントに適用することはできないため、与えられたグループ内のナノマテリアルのリードアクロスができるように、グルーピング戦略を開発することが必要である。ナノマテリアルの有害性エンドポイントのためのグルーピングに基づくこれらの化学物質の関連性はまだわかっていない。リスクアセスメント手法については、研究データをラボレベルから現実世界にスケールアップしていくことが必要であり、暴露と放出に係るシナリオをナノマテリアルに合わせて改良していくことも必要であり、SG-08 と暴露評価に関するタスクフォースで取組んでいる。また、ナノマテリアルに既存試験法を適用することも必要であり、SGTA で検討している。従来のリスクアセスメントからの知見や経験の活用や、ナノ特有の挙動に係るアプローチを開発することも必要である。

(iii) Denmark – Assessing Risks of Nanomaterials：Flemming Ingerslev, (Denmark)

Ingerslev 氏からは、ナノマテリアルに関するデンマーク・アクション・プラン、各種プロジェクト（ナノマテリアルの利用と現状、特定のナノ製品の評価、ナノ製品中のナノマテリアルの暴露と運命、ナノマテリアルの消費者リスク及び環境リスク）について報告があった。

デンマークの状況については、化学産業は制限されていて、消費者影響は高く、外因性内分泌かく乱化学物質や喘息、アレルギー、多種化学物質過敏症（MSC）などの問題に着目している。ナノマテリアルは化学物質規制でカバーされており、化学物質規制は EU で調和したものであり、独立したデンマーク規制はほぼ不可能である。

デンマーク議会では、2006 年から現在までに、環境、研究、労働、等の大臣に 30-50 の質問があり、2008-2010 年には３度、議会で討論が行われた。主なテーマは、予防的手法の利用（原則）、研究の増加、ナノマテリアルの登録、ナノマテリアルの規制（REACH 等）である。

2012-2015 年のナノマテリアルに関するデンマークイニシアチブとしては、以前の政府のプログラムの一部の実施や、Better Control of Nanomaterials and their Safety における国家予算同意 2012 がある。デンマークナノイニシアチブに基づくプロジェクトには、利

用／発生に係るものとして、データベース（ガイダンスドキュメントとヘルプデスク、プリンターのトナーカートリッジからの放出、選定された消費者製品からの放出）や補足的調査（食品、食品接触材料、化粧品、殺虫剤、顔料、廃棄物中のナノマテリアル）に関するもの、特定製品の評価（光触媒である酸化チタンを用いた製品、ナノマテリアルを用いたエアロゾル製品、ナノ銀を用いたテキスタイル）に関するもの、プロセスと挙動（経口と経皮取込み、環境中での挙動プロセス、人暴露）に関するもの、影響とリスク（生態毒性、毒性、環境リスク、消費者リスク）に関するものがあり、これらをもとに、消費者と環境に対する暴露と最終的な結果を検討することになる。

ナノ製品の登録は、製造者及び輸入者に対して一般公衆への販売を意図した混合物及び商品を登録を要求することを目的としている。ナノ製品の登録における義務的事項は、会社名、製品情報（名称、量、用途、専門的用途の有無）、ナノマテリアルに係る情報（名称、REACH 登録、製品事故）、化学的情報（IUPAC、CAS no.、EU no.、構造）であり、任意事項は、記述カテゴリーの利用（PC、PROC、ERC、AC）、製品あるいは混合物中のナノマテリアルの含量（g または%）、ナノマテリアルの物理学的情報（粒子サイズ、サイズ分布、強／弱凝集体、形状、比表面積、結晶状態、表面化学、表面電荷）である。

消費者及び環境への影響とリスクに関するプロジェクトに、「デンマーク市場におけるナノ製品の消費者リスク評価」があり、そこでの課題は、①ナノ消費者製品に関する情報が少ないこと、②ナノ消費者製品に関する情報は、しばしばクレームが基になっていること、③潜在的に非常に多くの製品があること、④暴露データが不足していること、⑤製品マトリックスにおけるナノマテリアルに関する有害性データが不足していること、⑥ナノマテリアルの特性／特徴づけが不足していること、⑦ナノマテリアルに特有のアセスメント・ファクター（AFs）が不足していること、⑧マトリックスに基づく表面積／数に関するデータが不足していること、である。また、「ナノマテリアルーデンマークの環境中での発生と影響」プロジェクトの課題は、①プロジェクトのためのナノマテリアルの選定、②ナノマテリアルに関する環境中挙動プロセスに関する情報の更新、③デンマークの環境へのナノマテリアルの放出に係る供給源、④デンマークにおける環境中暴露の評価、⑤環境影響の予測（PNEC）、⑥環境リスクの評価、である。

アクション・プランに関する結論は、ナノ製品を登録することは困難であり、デンマークで確認された製品はわずかである、問題として特定される特有の製品はない、一般にはリスクはない、吸入シナリオはリスクとの関係がある（ただし、ナノ特有ではない）、意思決定に関する政治的なフォローアップがまだ必要である。

(iv) Industry Perspectives on Risk Assessment/Risk Management : Shaun Clancy (Evonik, BIAC)

BIAC からは、リスクベースアプローチ、理事会勧告に関する取組み状況について報告があった。

化学物質の管理は、有害性と暴露の両面から管理するのが健全な管理であり、化学物質管理を行うためには、さらなる有害性情報が必要である。有害性情報は暴露情報に比べれが比較的多い。さらなる暴露情報の生成に関して関心が寄せられているものの、そうした情報を収集するのは非常に高額となり、試験は、結果を実行し進展させていくために長期間を要する可能性がある。コストと時間は、試験が実行されることを推奨する。スクリーニング試験や短期間での試験に対して WPMN の注目が増しており、これらの試験は有益である。ナノマテリアルのグループ化の方法の検討やグルーピングをサポートする試験戦略は継続して行われるべきである。

ライフサイクルにおける暴露情報も必要である。効果的なリスク評価には、十分な暴露情報が必要とされ、特に、有意な量で使用されるナノマテリアルに関する情報である。また、暴露情報を生成する手法に関して WPMN がますます注目することで、リスクアセスメントとリスクマネージメントの改良を支援することになるだろう。短期では、WPMN は、手法や装置の必要性等の暴露を決定し評価するために測定されるべきファクターを特定することができた。WPMN ドシエで取組む材料に関する暴露情報についての文献調査は有益であった。SG8 の活動はどうか。NanoRelease はよい事例かもしれない。

WPMN の活動を優先順位づけするために既存情報を有効活用することが必要である。規制対象のナノマテリアルの中には、長期にわたって安全に利用されてきた記録のあるものがある。このことは、これらの材料があらゆる用途について安全であると考えるべきであるとか、追加的な情報が必要ではない、ということを示しているのではない。これらの材料の用途に関するリスクは、新規ナノマテリアルに対してより注意して管理することが必要であることを示している。

BIAC としては、さらなる暴露情報が必要であり、加速された代替試験を必要としている。また、手法の特定も必要である。WPMN の作業の優先順位づけを行うために、既存の情報を有効活用すべきである、との提案があった。

(v) EU (ECHA) Implementation of REACH – Experiences gained：Jenny Holmqvist (EU ECHA)

Holmqvist 氏からは、ECHA の活動について、ナノマテリアルがなぜ重要なのか、ECHA が REACH の施行でどんな経験があるか、今後 3 年間の作業計画、についての報告があった。

ナノマテリアルは戦略的に依然として重要であり、他の問題と分離して考えるべきことではなく、他の化学物質グループにも影響を与える事項である。REACH の成功もまた、新規の化学物質に係る効果的履行に依存するものである。また、メンバー国レベルでは関心が高い事項である。しかし、ECHA の活動能力は、ナノマテリアルの不確実性により妨げられている。特に、REACH 附属書の改訂が遅いことも原因である。また、ナノマテリアルの定義の継続的なアピールと見直しが行われていることも原因である。

現在の REACH の状況としては、リスクを特定し、そのリスクに対処することは、市場にある化学物質に関する情報が不足し、公的機関との立証責任があり、効率的に問題のある化学物質を管理するための手法が限られているために、困難である。

ECHA の観察によれば、実行活動はまだ、化学物質の特徴づけと特定による、ナノ形態の存在を区別することが中心である。また、限られた情報に基づいて、ナノ固有の特性や研究、リスクアセスメントが行われている。さらに、ほとんどの届出物質はナノ形態を示さず、ナノ形態を有する物質で届出されているものは全部で 9 つだけである。この理由は、2011 年に EU レベルでナノ定義に関する勧告が出されたが、法律にはナノマテリアルの明確な基準がまだなく、市場がなくなることやそれ自体が危険であると認知されることを恐れて登録者間の潜在的な競争問題があるのかもしれない。

ECHA のナノマテリアルに関する今後 3 年間の作業計画では、不確実性はあるものの、ナノ形態の化学物質に関する REACH、CLP、BPR を履行し続ける。これは、ECHA の戦略目的の履行の成功に貢献するものである。その目的とは、産業界によって届けられたデータの質を高め、問題となる化学物質に取組み、この分野における規制科学の継続的な進展を遂げ、EU 市場におけるナノマテリアルのリスクとベネフィットを取り巻く透明性を強化することであり、これらの目的を統合した手法で達成する。

既存のガイダンスの側面を区別するために、既存の法律記載の内容を基にナノ形態、HH と ENV の解釈、リードアクロスなどで、優先順位づけが行われている。例えば、一般的なガイダンスは、結論づけに約 1 年を要する。ナノマテリアルの要件に関するガイダンスは、複数の困難な問題に対処することが必要である可能性が最も高い。IUCLID の修正も行われている。また、Web 等を通じて登録者とのアウトリーチコミュニケーションも必要であるし、2018 年の登録 DL 前にガイドラインの停止を行うことも重要である。

安全な使用を可能にするためのデータの質の向上に当たっては、ドシエと化学物質評価がある。化学物質の評価の取組みとしては、CoRAP により、銀（2014）、SAS（2014）、TiO_2（2016）、ZnO（2017）、CeO（2017）、MWCNT（2017）、カーボンブラック（2018）、ジ-三酸化アンチモン（2018）がある。また、調和された分類と CLP 下で期待されているラベル化に関する最初の提案が行われている。

規制の履行と国際的な活動との相乗効果において、OECD の優先順位は最も高い。テストガイドラインは化学に係る規制を支えているし、スポンサーシッププログラムからのデータの評価や、リードアクロス、グルーピング、カテゴライゼーション、が行われているし、in vitro スクリーニング手法は益々重要となっているためである。また、ナノマテリアルの GHS クライテリアの適用の UN 評価もある。

広報手段として ECHA のナノマテリアル作業グループがある。この作業グループは、メンバー国メンバー、COM サービス、ステークホルダーから構成され、EU レベルでナノマテリアルの有害性及びリスク評価に関連した技術的な検討を行うための固有のプラットフォームであり、年 2 回の頻度で会合を行っている。

ナノマテリアルに関する透明性については、REACH は EU レベルでの化学物質のリスクとリスクマネージメントに係る情報増加を促進してきた。化学物質に関する情報とそれらの安全な使用に関するコミュニケーションは ECHA にとって戦略的な関心事である。追加的な手法では、EU 市場（REACH 登録、CLP 通知、PBR 認可）での化学物質の監視に係る既存法的枠組みをできるだけ利用するべきである。また、ECHA では、2016 年に新しい普及ポータルを公表し、シナジーの機会を創出する予定である。さらには、EU 市民が利用可能な既存データベースの最適化と創出を行っていく。

結論としては、EHCA は化学物質の有害性／リスクアセスメント手法を取り巻く増加する国際的な調和を支援する。また、EHCA は TGs の改訂などの現在進行中の OECD 作業に価値のあるナノマテリアルの潜在的なリスクに係る多くの経験を獲得してきた。REACH の履行に直接関連して、ECHA は既存の法的枠組みとの技術的な収束を保証するために、WPMN が重要であると理解している。

（vi） Information Gathering Rule：Jim Alwood (US EPA)

Alwood 氏からは、TSCA のセクション 8(a)の、ナノスケール物質として製造／加工される化学物質に関する規則提案、について報告があった。

TSCA セクション 8(a)の権限については、EPA に TSCA の任務を遂行するために記録を保持し、データを報告するためにメーカーや化学物質のプロセッサを必要とする広範な権限を与えることとされており、規則は、標準化された報告ルールを使用することによって得ることができる化学物質固有のルールや情報を介して、ニーズに合わせて調整することができる。

規則発行の目標は、EPA は、現在の商業目的でのナノスケール物質に関する基本的情報を持っていることを確認する。具体的な商業目的は、ナノスケース材料がどんな商業目的のために利用されているのかについての理解を増し、リスクの特徴づけのための EPA の取組みを知らせ、リスクを評価し、適切なリスクマネージメントの決定を行う能力を強化するためである。EPA は規則の対象となっている全てのナノスケース材料について提出されたデータの見直しを行い、さらなるアクションあるいは追加的なデータが必要かどうかを検討するだろう。

TSCA セクション 8(a)では、規則対象者により、知られているあるいは合理的に確認できる情報を要求する。また、特定のデータあるいは最小のデータセットを開発する目的の人にはこれらを要求しない。提案規則は、利用可能な情報を 1 度だけ報告することを要求することになる。規則では、電子媒体での報告を提案している。提出されたデータは機密性を主張することができる。セクション 8(a)の報告に係る一般的免除規定には、商品の一部としての研究、開発、輸入／加工が含まれる。既存のナノスケール材料と、ナノスケール材料の新規個別形態について報告が求められる。既存のナノ材料については、規則の最終有効日漸年間に、ナノスケール材料の個別形態を製造する者及び加工する者に対してデ

ータの報告が求められる。報告は規則最終有効日の６か月以内に提出されなければならない。ナノ材料の新規個別形態については、製造または加工しようとする日の少なくとも 135 日前までに同様の情報を報告する。

要求される情報は、特定の化学的同一性、材料特性評価、物理化学的特性、生産量、用途、製造及び加工の方法、暴露及び放出情報、環境及び人の健康への影響に関する既存データである。

規則の対象となる化学物質は、25℃、大気圧で、固体の化学物質で、1 次粒子、強凝集体、弱凝集体のサイズが 1-100nm の形態で製造（輸入を含む）あるいは加工され、それらのサイズによる特異的で新規の特徴が表れるものである。報告する化学物質の定義には、上記のサイズ特性を有していても、微量のために、粒子サイズによる特異的で新規の特徴や特性が現れない化学物質は対象にならない。また、1 nm 以下のイオン形態で水中で解離する化学物質と生物学的な物質（DNA や RNA、タンパク質、等）は対象外である。また、表面フィルムの一部としてナノスケースで製造される ZbO、ナノクレイ、化学物質は対象外である。さらに、2005 年１月１日以降 TSCA セクション 5 のレビューを完了している化学物質も対象外としている。小規模の企業も対象外としている。

課題はいくつかある。報告対象の化学物質を特定すること、報告する化学物質のナノスケール形態間の区別を行うこと、製造または加工開始の少なくとも 135 日前に個別形態について報告すること、監督官庁の経済分析に関する考慮事項、電子形式での報告、定期的な報告に関する潜在的な将来の規則制定の検討、などである。

今後、EPA は、より良い条件独特で新規な特性と微量を定義する必要があり、規則を一度撤回し、よりよい定義があればそうした規則を提案することが必要である。また、化学物質の新規個別形態の報告のために、135 日の要件を排除あるいは変更することが必要である。また、本規則は製造者と輸入者のみに適用されるべきであり、特定の有害性あるいはリスクを有する化学物質に焦点を当てるべきである。規則は、カナダの、ナノマテリアルに関する情報を収集するという提案と足並みをそろえるべきである。そのほか、EPA は 1-100nm の粒子の次元数を明確にするべきであり、粒子と、粒子サイズの決定方法（重量、数、用量、等）について最適な定義を行うべきである、等の米国 EPA としての意見を発表した。

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	Danish Ministry of the Environment Environmental Protection Agency	Hazard assessment of nanomaterials in consumer products （消費者製品のナノマテリアルの有害性評価）	2015.03
2	Danish Ministry of the Environment Environmental Protection Agency	Exposure assessment of nanomaterials in consumer products （消費者製品中のナノマテリアルの暴露評価）	2015.03
3	National Institute for Public health and the Environment Ministry of Health, Welfare and Sport	Grouping nanomaterials（summary 部分） （ナノマテリアルのグループ化）	2015.06
4	National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH)	Carbon Nanotube and Nanofiber Exposure Assessments: An Analysis of 14 Site Visits （カーボンナノチューブとナノファイバーの暴露評価：14 歳と訪問による分析）	2015.07

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） 消費者製品のナノマテリアルの有害性評価

- タイトル：Hazard assessment of nanomaterials in consumer products
- 機関:デンマーク環境保護庁（Danish Ministry of the Environment, Environmental Protection Agency）
- 報告年：2015 年 3 月
- 要約：本報告書の目的は、消費者製品におけるナノマテリアルの有害性評価を実施することにある。ナノマテリアルが最終用途、即ち基材の一部として使用される場合、消費者はナノマテリアルに曝露する可能性があり、そのため、本報告書は、ナノマテリアルが消費者製品の基材の一部に使用された際の有害性に焦点を絞っている。基材の一部としてのナノマテリアルの有害性に関する研究は報告例が少なく、基材の一部として使用された際のナノマテリアルに対する導出無影響量（DNEL）は確定していない。ナノマテリアルを含有する固相マトリックスからの研磨ダストおよび

スプレー製品への経肺曝露に関する研究は数少ないが公表されている。ナノマテリアルが固相マトリックスの一部として使用される際の有害性の増加は観察されておらず、毒性については基材が最も重要であった。ナノマテリアルが液相マトリックス（例えば、スプレー製品）の一部として使用される時、その有害性が常に隠されるとは限らないとする研究も少しある。CB 含有のマスカラと nano-ZnO 含有の日焼け止め剤を皮膚投与した結果、経皮吸収は全くないか非常に穏やかであった。 消化管吸収と毒性に関する研究は、数が少ないため結論には至っていない。ナノマテリアルに曝露した消費者に対する有害性を明らかにするためには、さらに研究が必要である。消費者製品の一部に使用された際のナノマテリアルの有害性に関する知見が乏しいため、最悪のシナリオで生じる有害性を予測するために遊離ナノマテリアルの有害性が用いられる。しかし、遊離ナノマテリアルの有害性データを使用することは、知識のギャップがあるため問題があるかもしれない。一般に、長期毒性の研究が欠如している。絶えず新しいナノマテリアル（新しい表面修飾など）が導入されており、全てのナノマテリアルについて調べることは不可能となっている。そのため、最近の研究戦略で強調されるのは、有害性の予測に必要なツールが分類と優先順位であるということである。

（2） 消費者製品中のナノマテリアルの暴露評価

- タイトル：Exposure assessment of nanomaterials in consumer products
- 機関：デンマーク環境保護庁（Danish Ministry of the Environment, Environmental Protection Agency）
- 報告年：2015 年 3 月
- 要約：本レポートは環境分野の研究開発プロジェクトから出される 4 連続報の一部であり、デンマーク市場の製品に含まれるナノマテリアルへの消費者暴露とリスク評価に取り組んでいる。消費者製品中ナノマテリアルの存在および暴露について取り組むと共に、暴露とリスクを評価するために利用可能な方法論とツールの分析に対しても取り組んでいる。製品活動を開始するため、消費者へのナノマテリアルの暴露について記述した関連データソースを特定し、「食物と飲料；化粧品；洗浄剤；コーティング／含浸剤；メンテナンス製品（自動車、ボート）；繊維製品；建設材料；医療器材；エアクリーナー；燃料および潤滑油添加剤；電子デバイス；電化製品（例：冷蔵庫）」の製品カテゴリー内の製品からデータを収集した。次に、選択された関連性のある暴露およびリスク評価ツールを概観すると共に、それらのツールが暴露評価、有害性評価モジュールそして／またはリスク評価モジュールを含んでいるか否かについて検討した。消費者暴露を決定づける最も重要な因子／パラメータを特定すると共に、種々の製品カテゴリーおよび製法ごとに異なる暴露経路および使用シナリオに関して詳述した。科学文献やレポートから知識を獲得するため文献調査を実施した。その

後、種々のナノ製品を代表する 20 の代表的消費者暴露シナリオの草案テーブルを作成した。最後に、既存の方法およびツールの評価から得られた既存情報とデンマーク EPA および外部専門家グループとの討論から得られた専門知識に基づき、各シナリオに対するケースバイケースの評価を、不確実性についての慎重な記述も含めて実施した。

（3） ナノマテリアルのグループ化

- タイトル：Grouping nanomaterials　（Summry 部分）
- 機関名：オランダ公衆衛生環境研究所（National Institute for Public health and the Environment, Ministry of Health, Welfare and Sport）
- 報告年：2015 年 6 月
- 要約： 本レポートは、ナノマテリアルへの暴露によってもたらされる人間の健康と環境へのリスクをキャラクタライズすることに関して、ナノマテリアルに対するテスト戦略を開発しようとするプロジェクトについて説明したものである。本プロジェクトでは、４つのステップ（化学物質の特定、粒子特徴づけ、輸送挙動、活性と反応）で構成されるテスト戦略を開発した。最初のステップ間には物理化学的データがコンパイルされる。第２ステップでは適切なラボテストを行う。最後に、ナノ銀とナノ二酸化チタンに関するテスト戦略をケーススタディとして示した。

（4） カーボンナノチューブとナノファイバーの暴露評価：14 サイト訪問による分析

- タイトル： Carbon Nanotube and Nanofiber Exposure Assessments: An Analysis of 14 Site Visits
- 機関名：国立労働安全衛生研究所（National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH)）
- 報告年：2015 年 7 月
- 要約：最近の研究結果は、カーボンナノチューブ （CNT） とカーボンナノファイバー （CNF） の暴露から生じることがある幅広い健康影響の可能性を示唆している。呼応して、国立労働安全衛生研究所（NIOSH）は CNT と CNF の推奨暴露限度 （REL） を設定:吸入径の元素状炭素（EC）の８ 時間加重平均（TWA）として 1μg m^{-3}。本研究の目的は、米国の CNT と CNF メーカーとユーザーの間で業界の暴露評価を行うことだった。CNT（13 サイト）と CNF（1 サイト）に対する暴露を評価するために 14 の合計サイトを訪れた。NIOSH 法 5040 を使用し、EC の吸引性（inhalable）と吸入性（respirable）両方の質量濃度のために、個人的な呼吸ゾーン（PBZ）と領域サンプルを採取した。吸引性 PBZ サンプルは 9 つのサイトで採取され、残りの 5 つのサイトで吸引性と吸入性の PBZ サンプルが並べて採取された。また、透過電子顕微鏡（TEM）PBZ とエリアサンプルは吸引性サイズ

フラクションで採取し、CNT と CNF アグロメレートと線維性暴露を定量化し、大きさを決めるために分析した。吸入性（respirable）EC PBZ 濃度は 0.02 ～ 2.94μg m^{-3} で、0.34μg m^{-3} の幾何学的平均値（GM）を持つと 0.16μg m^{-3} の 8h-TWA をもっていた。EC の吸引性フラクションで PBZ サンプルは、0.01 ~79.57μg m^{-3} の範囲を持ち、 1.21μg m^{-3} の GM を持っていた。TEM によって分析された PBZ サンプルは cm^3 あたり 0.0001～1.613 CNT 又は CNF 構造の範囲を持つ濃度を示し、0.008 の GM と 0.003 の 8h- TWA を持っていた。最も一般的な CNT 構造サイズは、> 5μm のアグロメレートだけでなく、2-5μm のより大きなアグロメレートであることがわかった。EC の質量のための吸引性サンプルと TEM による構造カウントの間に統計的に有意な相関が認められた（(Spearman p = 0.39,P < 0.0001)。全体として、EC PBZ とエリア TWA サンプルは NIOSH REL (吸入性（respirable）径フラクションで、96% が< 1μg m^{-3}) を下回った一方、吸引性 PBZ EC サンプルの 30% が > 1μg m^{-3} であることがわかった。より大きなアグロメレートに関連付けられている健康への影響についての詳細が分かるまで、吸入性と吸引性フラクションの両方で EC を監視することによって浮遊 CNT と CNF 材料への労働者の暴露を評価するが賢明と思われる。CNT と CNF の存在を確認するために、同時 TEM サンプルを採取すべきである。