

リスク評価候補物質選定参考資料（案）

<フラーレン>

<目 次>

1 同じ化学組成の物質等と異なる有害性が認められるかどうか フラーレンに関する有害性情報	-----	2
2 技術的な観点から、当面、リスク評価が実施可能であるかどうか （１）有害性評価の観点から評価値の設定が可能であるかどうか ① 関係機関における許容濃度等の設定状況	-----	1 6
② 評価値の設定に利用可能な試験データの状況	-----	1 8
（２）ばく露実態の把握が可能であるかどうか ① 公表されている主要な測定方法の状況	-----	1 9
② 労働現場におけるばく露実態調査の例	-----	2 1

1 同じ化学組成の物質等と異なる有害性が認められるかどうか

（フラーレンの有害性に関する情報）

フラーレンは、ナノサイズ以外の炭素の単体とは著しく異なる物理化学的特性を有することから、フラーレンに関する有害性情報のみを整理した。

ア 対象とした有害性の種類

動物試験の情報を整理した。（ヒトの疫学調査及び臨床事例の情報は下記イの資料からは得られなかった。）

イ 作成に用いた資料

- ①「ナノマテリアルに係る有害性等の情報収集報告書」（平成23年3月中央労働災害防止協会（22年度委託調査報告書））
フラーレンの有害性に関する情報を要約して、表に記載。（「出典」の右肩の1）
- ②「ナノ材料リスク評価書「フラーレン（C₆₀）」」（平成23年7月）（経済産業省委託研究（NEDOプロジェクト）報告）
上記①を補足するために、フラーレンの有害性に関する情報を要約して、表に記載。（「出典」の右肩の2）

区 分	出 典 及 び 試 験 方 法	試 験 結 果
1 発がん性 (動物試験)	[出典] Nelson <i>et al.</i> (1993)¹⁾ [試料] ベンゼンに溶解したフラレン混合物 (C₆₀:C₇₀ 6:1) [動物種] 雌 ICR マウス [投与方法] 皮膚に単回投与、24 週間投与 (週 2 回) [用量] 200 μ g	・単回塗布の結果、皮膚腫瘍プロモータ物質である TPA に比べて、フラレン 塗布マウス表皮の OCD 活性と DNA 合成の亢進は低かった。 ・フラレンの腫瘍プロモーション活性を 2 段階イニシエーション/プロモーション試験で検討したところ、TPA を塗布したマウスの表皮には皮膚腫瘍が誘発されたが、24 週間フラレンを塗布したマウスの皮膚には腫瘍は発生しなかった。 ・以上から、フラレン混合物には<u>腫瘍プロモーション活性はないと結論づけた。</u>
	[出典] Takagi <i>et al.</i> (2008)^{1) 2)} [試料] メチルセルロース溶液に分散し、Tween80 を添加して調製したフラレン [動物種] p53+/-ノックアウトマウス (雄性) [投与方法] 腹腔内投与 [用量] 3 mg	・25 週間後に解剖した結果、<u>腫瘍の発生はみられなかった。</u> (陽性対照としたクロシドライト投与群では、18 例中 14 例が中皮腫を発症)
2 生殖・発生 毒性 (動物試験)	[出典] Tsuchiya <i>et al.</i> (1996)^{1) 2)} [試料] PVP 水溶液に溶かしたフラレン [動物種] 妊娠 10 日目の ICR マウス [投与方法] 腹腔内注射 18 時間後に胚を取り出し、中脳を検査 [用量] 25-135mg/kg	・フラレンばく露によって胚の形態異常 (<u>頭部肥大</u>) が <u>25mg/kg 投与から出現し、神経管の異常も見られた。</u>

区 分	出 典 及 び 試 験 方 法	試 験 結 果
3 神経毒性 (動物試験)	[出典] Quick <i>et al.</i> (2008) ¹⁾ [試料] カルボキシル化フラーレン (e,e,e-C₆₀(C(COOH₂)₃)(C₃)) [動物種] C57BL/6 マウス (12 ヶ月齢) [投与方法] 飲水投与 [用量] 10mg/kg/日	・ C₃ 投与による毒性は認められなかった。 ・ 平均生存期間の延長が認められたが、体重と摂餌量への影響はなかった。 ・ 加齢により増加する脳内の酸化ストレスが抑制される他、モリス水迷路による空間認識能と学習能が回復した。 ・ これより、ミトコンドリアにおけるフリーラジカル産出抑制作用によると考察され、<u>飲水投与された C₃ が脳一血液関門を通過し、脳内で抗酸化作用を発揮することが示唆された。</u>
	[出典] Yamada <i>et al.</i> (2008) ¹⁾ [試料] フラーレン (試験液の調整法に関する記載無し) [動物種] ラット [投与方法] 右側脳室内注入、腹腔内注射 [用量] 0.25mg/100g	・ 脳内注射により翌日に運動活性が増加し、30 日後でも認められた。 ・ また、脳内のセロトニンとドーパミンの代謝回転が増加した。 ・ 同量の腹腔内注射では、運動量の変化が 30 日後に低下しただけで、注射直後には変化はみられなかった。また、脳内ドーパミンの代謝回転は、逆に低下した。 ・ フラーレンは、腹腔内注射では脳一血液関門を通過せず、脳機能に対して影響しないが、<u>脳内注入により神経伝達物質の代謝に影響し、モノアミン系物質の代謝異常が運動活性に影響したと考察されている。</u>

区 分	出 典 及 び 試 験 方 法	試 験 結 果
3 神経毒性 (動物試験) (つづき)	[出典] Yamada <i>et al.</i> (2010)¹⁾ [試料] リンゲル液に溶解した水酸化フラーレン(C₆₀(OH)₂₄) [動物種] ラット [投与方法] 右側脳室内注入 [用量] 0.25 mg/100g	・ 注入翌日に著しい体重減少が認められたが、30 日後には対照群と同レベルに回復した。 ・ 運動活性の低下が注入翌日に認められたが、7 日後には逆に著しく増加し、30 日後には回復傾向が認められた。 ・ 注入翌日には脳内セレトニン、ノルエピネフリン等の上昇があり、30 日後でも軽度ながら増加が認められた。 ・ <u>水酸化フラーレンの脳機能と行動に対する影響はフラーレンよりも強いが、持続性はないとした。</u> ・ 水酸化フラーレンはフラーレンよりも水溶性が高く、溶液中に均一にナノレベルで分解しやすく、フラーレンよりも脳-血液関門を通過しやすいと考察した。
4 肺毒性 (動物試験) ①吸入ばく露	[出典] Baker <i>et al.</i> (2008)^{1) 2)} [試料] フラーレンのナノ粒子・エアロゾル (粒径 55nm) 及びミクロ粒子・エアロゾル (粒径 0.93 μm) [動物種] 雄 F344 ラット(10 週齢) [投与方法] 鼻部吸入ばく露 3 時間/日、10 日間連続 ばく露終了直後、1, 5, 7 日後 観察 [用量] ナノ粒子・エアロゾル 2.22mg/m³ ミクロ粒子・エアロゾル 2.35mg/m³	・ 体重や臓器重量に有意な変化は確認されなかった。 (肺毒性であるので、BALF 中の肺炎症反応指標のほうが重要である。) ・ 血液検査、血液生化学検査に軽度の変化が認められたが、フラーレンのばく露との関連性は明確ではなかった。 ・ BALF 中のマクロファージはフラーレンを貪食し、ミクロ粒子・エアロゾルばく露群よりもナノ粒子・エアロゾルばく露群の方が多くの粒子を含有していた。 ・ 肺に炎症像は認められなかったが、<u>ナノ粒子・エアロゾルのばく露により BALF 中好中球数や蛋白濃度の増加が認められた。</u> ・ フラーレンの半減期 (ナノ粒子:26 日、ミクロ粒子:29 日) から、ばく露期間を延長すれば、フラーレンばく露に関連する毒性所見が見いだされるかもしれないと考察された。

区 分	出 典 及 び 試 験 方 法	試 験 結 果
4 肺毒性 (動物試験) ①吸入ばく露 (つづき)	[出典] Yokoyama <i>et al.</i> (2009)²⁾ [試料] 0.1%Tween80 を用いて水中に分散させた C₆₀ を気中へ噴霧させて生成した C₆₀ 粒子 動的光散乱平均径 約 20 nm、 気中分散粒子平均径 86nm [動物種] 雄 ICR マウス (約 30g) [期間] 3 時間 [用量] 0.35mg/m³ (1.6 × 10⁵/cm³)	・ 700MHz の電子常磁性体共鳴計測により、<u>肺中の酸化還元能を調べたところ、C₆₀ では酸化還元能は確認できなかった。</u>(陽性対照として用いた酸化ニッケルでは、酸化還元能が確認できた。)
	[出典] Fujita <i>et al.</i> (2009)¹⁾ [試料] ネブライザー法で発生させたフラーレンのナノ粒子 ・エアロゾル [動物種] 雄 Wistar ラット [期間] 6 時間／日、週 5 日、4 週間の全身ばく露 ばく露終了後 3 日、4 週間及び 3 ヶ月に解剖 [用量] 0.12mg/m³ (4.1 × 10⁴ 個/cm³)	・ 肺胞マクロファージ及び上皮細胞にフラーレンの沈着が認められた。 ・ 肝臓、腎臓、脳、精巣、鼻孔等に異常は認められなかった。 ・ DNA マイクロアレイ解析により、ここで用いられたような <u>低いばく露濃度 (Baker <i>et al.</i> (2008) の約 1/20) でもケモカイン遺伝子、酸化ストレスに関わる酵素遺伝子の発現亢進が認められた。</u>

区 分	出 典 及 び 試 験 方 法	試 験 結 果
4 肺毒性 (動物試験) ①吸入ばく露 (つづき)	[出典] Morimoto <i>et al.</i> (2010) ^{1) 2)} [試料] 0.1%Tween80 を用いて水中に分散させた C₆₀ を気中へ噴霧させて生成した C₆₀ 粒子 (平均粒径 96nm (mobility 径) : 粒径約 30nm の粒子の凝集体) [動物種] 雄 Wistar ラット (9 週齢、300g) [期間] 6 時間/日、週 5 日、4 週間の全身ばく露 ばく露終了後 3 日、4 週間及び 3 ヶ月に BALF を採取 [用量] 0.12mg/m³ (4.1 × 10⁴ 個/cm³)	・ <u>肺湿重量、BALF の所見 (総細胞数・好中球数)、肺組織における HO-1 遺伝子発現では、どのばく露群においても陰性対照と違いは認められなかった。</u> ・ 病理組織学検査の結果、3 日ばく露群にのみに肺泡マクロファージの軽度な浸潤と 肺泡マクロファージ中に色素様物質の沈着が認められた。 ・ TEM 観察により、これはファゴリソソームへのフラレン粒子の取り込みであることが確認された。 ・ 他のばく露群には、いずれの時点においても対照群との差はみられなかった。
4 肺毒性 (動物試験) ②気管内投与	[出典] Sayes <i>et al.</i> (2007) ^{1) 2)} [試料] フラレン (C₆₀) ナノ粒子 (粒径 160 ± 50nm) 水酸化フラレン (C₆₀(OH)₂₄) ナノ粒子 それぞれを純水に懸濁 [動物種] 雄 SD CD ラット (約 7 週齢、220-240g) [期間] 単回投与から 24 時間、1 週間、1 ヶ月、3 ヶ月後 [用量] 0.2,0.4,1.5,3.0 mg/kg	・ BALF 中の LDH, MTP, AlkP には有意な変化はなかった。 ・ <u>BALF 中の炎症性反応 (好中球数増加) は注入後 24 時間に亢進したが、一過性のものではあった。</u> ・ 気管と気管支上皮細胞の増殖性亢進もなく、肺の病理組織所見にも異常は見られなかった。 ・ 総グルタチオン酸は各群で変化はなかった。 ・ 以上により、どちらのフラレン・ナノ粒子も、共にほとんど肺への有害影響を示さないと考えられた。 ・ BALF の脂質過酸化は 1.5, 3.0mg/kg 分散液の投与後 1 日及び 3 ヶ月後に有意な上昇を示した。

区 分	出 典 及 び 試 験 方 法	試 験 結 果
4 肺毒性 (動物試験) ②気管内投与 (つづき)	[出典] Jacobsen <i>et al.</i> (2009)^{1) 2)} [試料] 平均ゼータサイズ体積径が 211nm(ピークは 122nm と 164nm) のフラーレン (純度 99%) を含む懸濁液 (10%BALF を含む生理食塩液) [動物種] アポリポプロテイン E 欠損 (ApoE^{-/-}) マウスおよびその野生型マウス (C57BL/6) [期間] 投与から 3 時間及び 24 時間後 [用量] 54 μ g	・ <u>3 時間後には、肺細胞の Mcp-1 が、24 時間後にも、Mip-2、Mcp-1、IL-6 が対照群と比べて有意に上昇していたが、SWCNT や CB より遙かに変化は小さく、金粒子と同程度であった。</u> ・ 本試験の結果では肺への毒性は非常に小さかったが、もし凝集体が小さいサイズにかい離した場合には細胞膜を通して全身に移行する可能性もあるとしている。
	[出典] Xu JY <i>et al.</i> (2009)¹⁾ [試料] 水酸化フラーレン (C₆₀(OH)_x) (x=22,24)) [動物種] SD ラット [投与期間] 3 日間 [用量] 1, 5, あるいは 10mg、1 回/日	・ <u>5mg 以上の水酸化フラーレン注入群では、肺で細胞浸潤と間質浮腫が認められた。</u> また、BALF 中好中球数と細胞マクロファージ数の増加、血液中好中球数の増加、BALF 中 LDH、アルカリフォスファターゼ、酸性フォスファターゼ、蛋白質、マロンジアルデヒド、NO 合成酵素量の増加、還元型グルタチオン、スーパーオキシドジスムターゼ濃度の低下、IL-1 β、TNF-α、IL-6 活性の増加等が認められた。 ・ 1mg 群ではこれらの影響は認められなかった。 ・ 5mg 群では凝集等により肺での残存量が増えたため取り込まれやすくなったことから、炎症が促進されたと考察された。

区 分	出 典 及 び 試 験 方 法	試 験 結 果
4 肺毒性 (動物試験) ②気管内投与 (つづき)	[出典] Morimoto <i>et al.</i> (2010) ^{1) 2)} [試料] ビーズミル法で微細化した C₆₀ の分散液 [動物種] 雄 Wistar ラット (9 週齢) [期間] 単回投与から 3 日、1 週間、1 ヶ月、3 ヶ月、6 ヶ月後 [用量] 0.1、0.2、1 mg	・ 1mg 群では、ばく露後 3 日から 1 週間に肺組織中の好中球ケモカイン遺伝子の発現が一過性に増加した。また、顆粒を含む好中球が認められた。¹⁾ ・ なお、1mg 群では肺胞マクロファージのファゴソーム内にフラレンの微粒子が認められたが、核内には存在しなかった。¹⁾ ・ <u>炎症と関連する血液細胞（白血球数や好中球数）の変化は認められず、その他の臓器（大脳・小脳、鼻孔、精巣、肝臓、腎臓、脾臓）では特に異常所見はみられなかった。</u>
	[出典] Park <i>et al.</i> (2010) ^{1) 2)} [試料] トルエンを飛ばし、PBS で希釈した C₆₀ (平均粒径:46.7 ± 18.6nm) [動物種] ICR マウス (25 ± 1g) [期間] 投与から 1 日後、7 日後、14 日後、28 日後 [用量] 0.5、1.0、2.0 mg/kg	・ BALF 中の細胞にアポロシスによると考えられる G1 期画等の増加がみられた。 ・ 1.0mg/kg 以上の投与では、用量反応的なサイトカイン値の増加がみられた。 ・ 2.0mg/kg 投与群では、IL-6 が 14 日後まで、IFN-γ が 28 日後まで有意に上昇していた。 ・ 血中 IgE は 2.0mg/kg 投与群で 7 日後まで上昇していたが、BALF 中の IgE には有意な上昇はみられなかった。 ・ これらにより、<u>マウスの肺において炎症を引き起こす可能性があると</u>した。

区 分	出 典 及 び 試 験 方 法	試 験 結 果
5 遺伝毒性 (動物試験)	[出典] Folkmann <i>et al.</i> (2009) ¹⁾ [試料/投与量] 生理食塩液またはコーンオイルに 10 時間/日、5 日間超音波処理にて懸濁させたフラーレン 生理食塩水中の粒径 低用量 [0.064mg/kg] : 405nm 高用量 [0.64kg/kg] : 621 と 5117nm コーンオイル中の粒径 低用量 [0.064mg/kg] : 234nm 高用量 [0.64kg/kg] : 40, 713 および 3124nm [動物種] 雌 F344 ラット [投与方法] 強制経口投与 [試験期間] 投与から 24 時間	・ フラーレンばく露により肝臓と肺において <u>8-oxodG 量が増加したが、これはフラーレンの直接的な DNA 傷害作用によって起こると考察された。</u>
	[出典] Shinohara <i>et al.</i> (2009) ¹⁾ [試料] 0.1%Tween80 に分散させたフラーレン (純度 99.5 %以上、平均粒径 33nm) [投与方法] 強制経口投与 [試験方法] 化審法および OECD 試験ガイドラインに準拠したマウス小核試験 [用量] 22,45 および 88mg/kg、2 回	・ フラーレンは<u>最高用量(88mg/kg)でも陰性</u>であった。

区 分	出 典 及 び 試 験 方 法	試 験 結 果
5 遺伝毒性 (動物試験) (つづき)	[出典] Totsuka <i>et al.</i> (2009)¹⁾ [試料] 0.05%Tween80-生理食塩液に超音波処理(15-20 分) して調整した分散液 [動物種] C57BL/6J マウスあるいは gpt delta 遺伝子トランスジ ェニックマウス [投与方法] 気管支内に注入 [用量] 0.2mg	・ C57BL/6J マウスの全肺における DNA 損傷を抽出したところ、<u>肺組織での DNA 損傷の増加</u>が認められた。 ・ gpt delta マウスからゲノム DNA を抽出したところ、点突然変異の増加が認められたが、肺でのレポータ遺伝子の欠失頻度および腎臓での点突然変異頻度には対照群との間に差はなかった。
6 その他の有害性 (ヒト)	[出典] Huczko <i>et al.</i> (1999) [対象とした有害性] 皮膚刺激性 [試料] フラーレンすす {対象} 皮膚刺激性物質や皮膚アレルギー物質に感受性のある 30 人の志願者 [試験方法] 水に分散したフラーレンすすを濾紙に浸み込ませて皮膚に適用し、96 時間観察	・ <u>皮膚刺激性は認められなかった。</u>
	[出典] Aoshima <i>et al.</i> (2009) [対象とした有害性] 皮膚刺激性 [試料] フラーレン混合物 (C 60、C 70) 純度 99.5 % [対象] 男性 21 人、女性 24 人	・ <u>皮膚刺激性は陰性と判定された。</u>

区 分	出 典 及 び 試 験 方 法	試 験 結 果
6 その他の有害性(動物試験)	[出典] Chen <i>et al.</i> (1998) ¹⁾ [試料] 多価アルキルスルホン化フラーレン [動物種] 雌 SD ラット [投与方法] 単回投与および 12 日間連続投与 [用量] 50 mg/kg	・ 死亡するものはなかった。 ・ <u>経口投与では無毒性</u>であるとした。
	[出典] Mori <i>et al.</i> (2006) ¹⁾ [試料] fullerite (C ₆₀ と C ₇₀ の混合物) [動物種] 雌雄 SD ラット [投与方法] 経口投与 [用量] 2000 mg/kg	体重やその他の異常は認められなかった。 フラーレン (fullerite) の最低致死用量は 2000mg/kg 以上であり、 <u>低毒性物質</u> とされた。
	[出典] Yamago <i>et al.</i> (1995) ¹⁾ [試料] フラーレン・コハク酸誘導体 [動物種] ddY 雌マウス [投与方法] 腹腔内注射 (観察期間 1 週間) [用量] 200-500mg/kg	・ 注射後、<u>もがき等の急性症状を呈した。</u> ・ <u>500mg/kg</u> では体重減少もあったが、1 週間の<u>観察期間中死亡するものはなかった。</u>

区 分	出 典 及 び 試 験 方 法	試 験 結 果
6 その他の有害性(動物試験) (つづき)	[出典] Moussa <i>et al.</i> (1996) ¹⁾ [試料] 0.02%Tween80 生理食塩液中にフラーレン (純度 99 %、最終濃度 10%) を加え、さらにカルボキシメチルセルロース (最終濃度 2 %) を加えた懸濁液 [動物種] 雄マウス [投与方法] 腹腔内注射 (観察期間 14 日間) [用量] 2.5, 4, 5g/kg	・ 注射したマウスに<u>死亡はなく、毒性症状も認められなかった。</u>
	[出典] Tabata <i>et al.</i> (1997) ¹⁾ [試料] フラーレンー PEG 結合物 (分子量約 26000) [動物種] 担癌 CDF1 雌マウス [投与方法] 単回腹腔内注射 静脈内注射 [用量] 1.8-1800 mg/kg	・ 1800mg/kg の単回腹腔内注射では<u>一時的な体重減少がみられたが、180mg/kg 以下では、15 日間の体重変動に影響はなかった。</u> ・ 静脈内注射でも、血漿中の AST、ALT、BUN の増加は認められなかった。

区 分	出 典 及 び 試 験 方 法	試 験 結 果
6 その他の有害性(動物試験) (つづき)	[出典] Ueng <i>et al.</i> (1997) ¹⁾ [試料] 水に溶解した水酸化フラーレン (C₆₀O₅(OH)₁₈) [動物種] 雄性 ICR [投与方法] 腹腔内注射 (観察期間 2 週間) [用量] 0.01-1.0 g/kg	・ <u>0.1-1.0g/kg では用量に相関して死亡した。</u> ・ また、<u>用量に相関して肝臓の相対重量の増加がみられた。</u> ・ 0.5 及び 1.0g/kg の投与により、肝臓ミクロソームでのチトクローム P450 等の P450-依存性モノオキシゲナーゼの非活性 (nmol/mg 蛋白) の低下がみられた。 ・ in vitro での酵素阻害試験により、水酸化フラーレン自身に上記のミクロソーム酵素に対する直接の阻害作用があることが分かった。 ・ ラットのミトコンドリアを用いた in vitro 試験で、水酸化フラーレンによりミトコンドリア機能が直接阻害されることが明らかとなった。
	[出典] Chen <i>et al.</i> (1998) ¹⁾ [試料] アルキルスルホン化フラーレン スルホン化フラーレン [動物種] 雌 SD ラット [投与方法] 腹腔内注射 静脈注射 [用量] 50 mg/kg	・ アルキルスルホン化フラーレンを腹腔内注射すると 30 時間以内に死亡し、<u>LD₅₀ 値は約 600mg/kg であったと報告した。</u> ・ スルホン化フラーレンは、ラットの腹腔内あるいは静脈内注射されると腎臓から速やかに排泄された。 ・ 500mg/kg の単回腹腔注射あるいは 100mg/kg の静脈内注射により腎臓にはファゴリソソーム腎症が認められ、<u>上記フラーレン誘導体の標的臓器と考えられた。</u>

区 分	出 典 及 び 試 験 方 法	試 験 結 果
6 その他の有害性(動物試験) (つづき)	[出典] Gharbi <i>et al.</i> (2005)¹⁾ [試料] 0.02%Tween80 生理食塩液中にフラーレン (純度 99 %、最終濃度 10%) を加え、さらにカルボキシメチルセルロース (最終濃度 2 %) を加えた懸濁液 [動物種] ラット [投与方法] 腹腔内注射 [用量] 0.5g/kg 単回 0.25 ~ 2 g/kg 単回又は 14 日間連続	・ <u>肝臓中にフラーレンが蓄積されることが認められた。</u> ・ 肝臓の光学顕微鏡及び TEM による観察を行った結果、マウスでの所見 (Moussa <i>et al.</i>, 1996) と異なり、肝臓脂肪蓄積細胞の肥大あるいは過形成を引き起こさなかった。これは、フラーレンが網内系に取り込まれたことによると考えられている。 なお、マウスでは、網内系細胞はフラーレン粒子を取り込まなかったが、肝細胞には 50nm 以下の粒径のフラーレン結晶が認められ、<u>肝細胞によく取り込まれることが分かった。</u> ・ フラーレンのラット腹腔内注射 (0.5-2g/kg) では単回あるいは 14 日間連続注射でも血清 ALT 活性の上昇はなく、<u>急性毒性あるいは亜急性毒性は認められなかった。</u>
	[出典] Huczko <i>et al.</i> (1999)¹⁾ [試料] フラーレンすす [動物種] ウサギ [投与方法] 水に分散し (14.8% w/w)、0.2mL を点眼 [試験方法] Draize 法 (観察期間 72 時間)	・ フラーレンの<u>眼刺激性は認められなかった。</u>
	[出典] Aoshima <i>et al.</i> (2009)¹⁾ [試料] フラーレン混合物 (C₆₀ 及び C₇₀) (純度 99.9%) (ウサギ眼刺激性及びヒト皮膚刺激性以外の試験では、ポリエチレングリコールに分散して用いた。) [試験内容] ウサギ一次及び累積皮膚刺激性、ウサギ眼刺激性、モルモット皮膚感作性、モルモット皮膚毒性	・ <u>ウサギ眼刺激性試験で不溶性微粉末の点眼による非特異的な刺激反応が認められ、minimally irritating と判定された。</u> ・ <u>皮膚刺激性、感作性、光皮膚毒性は認められなかった。</u>

2 技術的な観点から、当面、リスク評価が実施可能であるかどうか

(1) 有害性評価の観点から評価値の設定が可能であるかどうか

① 関係機関における許容濃度等の設定状況

関係機関が公表している主なものとしては、以下に示すNEDOプロジェクト報告書における提案

	経済産業省委託研究(NEDOプロジェクト)提案(2011)										
設定の考え方	当面15年程度の垂漫性のばく露期間を想定した許容ばく露濃度(10年程度での見直しを前提)										
許容濃度等	許容ばく露濃度(PL(Period Limited)) 0.39 mg/m³ 下欄の計算方法により算出 気中の凝集粒子(二次粒子)の粒径が幾何平均値 96 nm、幾何標準偏差 2.0の場合 (走査型移動度粒径測定器(SMPS)による測定) この数値をもとに、MPPDモデルで求めた肺胞沈着率(f)を使用して、以下の式により許容ばく露濃度を算出することを提案 $0.39 \times \frac{0.0913}{f_{\text{work}, n=x, \text{GSD}=y}} \text{ mg/m}^3$ n: 幾何平均粒子径 GSD: 幾何標準偏差 ○ 粒形範囲区分ごとの許容ばく露濃度の計算例 <table> <thead> <tr> <th>粒径(nm)</th> <th>PL (mg/m³)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>10-50</td> <td>7.6×10^{-2}</td> </tr> <tr> <td>50-100</td> <td>0.11</td> </tr> <tr> <td>100-2,000</td> <td>0.30</td> </tr> <tr> <td>2,000-10,000</td> <td>0.80</td> </tr> </tbody> </table> 1日8時間、週5日、15年程度の作業期間を想定	粒径(nm)	PL (mg/m ³)	10-50	7.6×10^{-2}	50-100	0.11	100-2,000	0.30	2,000-10,000	0.80
粒径(nm)	PL (mg/m ³)										
10-50	7.6×10^{-2}										
50-100	0.11										
100-2,000	0.30										
2,000-10,000	0.80										

評価のエンドポイント	肺の炎症
計算の根拠とした試験	ラットを試験対象とした、以下の2つの気管内投与試験と1つの吸入ばく露試験を検討して、NOAEL0.7mg/lungを算出 • Sayes et al.(2007) 単回気管内投与(観察期間3ヶ月) この試験結果を用いてNOAEL0.7mg/lungを算出 • Morimoto et al.(2010) 単回気管内投与(観察期間6ヶ月) この試験結果を用いてLOAEL1.0mg/lungを算出 • Morimoto et al.(2010) 4週間吸入ばく露(観察期間3ヶ月) この試験結果のNOAELである0.12mg/m³でのばく露が90日間続いた場合の肺内保持量は0.019mg/lungとなると計算
計算方法の概要	上記によるNOAEL(肺内保持量)を気中濃度に換算したうえで、ヒトでのばく露濃度に換算
計算内容	上記試験におけるラットのNOAELを気中濃度に換算 0.7mg/lung → 3.1 mg/m³ (Shinohara et al.(2010)、Morimoto et al.(2010)から、肺のクリアランス速度定数、沈着率、呼吸量を推計) 以下についてラットとヒトの差を補正 • 呼吸量 • 1日のばく露時間及び1週のばく露日数 • 肺への沈着率 • 体重(肺表面積のかわり) 3.1mg/m³ → 3.5mg/m³ 以下により不確実係数積＝9を採用 • 種間差 3 - TK1

TD1

肺保持量でなく肺沈着速度を使用したこと、及び肺胞表面積でなく体重を使用したことに関して 3

・投与方法、期間に係る不確実係数 3
(ばく露期間、気管内投与試験から吸入ばく露試験への外挿を考え合わせ。)

$$3.5 \div 9 = 0.39\text{mg/m}^3$$

- ② 評価値の設定に利用可能な試験データの状況
有害性に関する動物試験のデータは、本資料の1を参照。

(2)ばく露実態の把握が可能であるかどうか。

① 公表されている主要な測定手法の状況(CNTに同じ)

文 献 名	目 的 等	測 定 手 法 の 概 要
OECD Joint Meeting of the Chemical Committee and the Working Party on Chemicals,Pesticides and Biotechnology “Emmision Assessment for Identification of Sources and Release of Airborne Manufactured Nanomaterials i n the Workplace :Compilation of Existing Guidance”(2009)	OECD工業用ナノマテリアル作業部会プロジェクト8の取組の一環として、労働現場におけるナノマテリアルのsimple semi-quantitative de terminationを示したもの(対象はナノマテリアル全体)	・CPC及びOPCによる測定によって、バックグラウンドに対する気中粒子数の増加を求める。 ・バックグラウンドに対し、気中の粒子数が10%以上増加している場合は、フィルターによるサンプリングを行い、電子顕微鏡(TEM又はSEM)により粒子の識別及び重量濃度の測定を行う。 ・必要に応じ、比較的大きな粒子を取り除くために、カスケードコンパクターやサイクロンを用いる。
NIOSH “Nanoparticle Emission Assessment Technique for Identification of Sources and Releases of Engineered Nanomaterials”(2009)	「安全なナノテクノロジーへのアプローチ(Approaches to Safe Nanotechnology)」の付属書として、ナノマテリアル全体を対象としたInitial Assessment の手法を示している。	・半定量的なアプローチとして、CPC、OPCによる粒子個数濃度の測定とフィルターによるサンプリングの組合せを示している。 ・粒子個数濃度を測定し、バックグラウンドの濃度からの高まりが見られる場合は、フィルターによるサンプリングを行う。 ・フィルターによるサンプルを用いて、電子顕微鏡による粒子の識別と特性の把握を行い、一方で、重量濃度の把握のための分析を行う。 ・気中のフラーレンは、石英フィルター等を用いて捕集し、フィルターからトルエンにより抽出する。 フラーレンの分析は、多くの場合、HPLC(高速液体クロマトグラフィー)を用いて行われている。 ・粒子の計測としては、OPC、CPC、DMA、SMPS、APSによる粒径 ・個数濃度の測定とSEMやTEMによる電子顕微鏡観察がある。

NEDOプロジェクト報告書(2011)	フラーレンに関する基本的情報として、主要な測定法を紹介している。	・気中のフラーレンは、石英フィルター等を用いて捕集し、フィルターからトルエンにより抽出する。 フラーレンの分析は、多くの場合、HPLC(高速液体クロマトグラフィー)を用いて行われている。 ・粒子の計測としては、OPC、CPC、DMA、SMPS、APSによる粒径 ・個数濃度の測定とSEMやTEMによる電子顕微鏡観察がある。
----------------------------	---	---

② 労働現場等におけるばく露実態調査の例

出 典	ナノ粒子の測定に使用した機器等	測 定 結 果 の 概 要
Fujitani et al.(2008) ¹⁾	光散乱式粒子計数器 (OPC) 走査型移動度粒径測定器 (SMPS)	フラーレンを製造する作業場において、粒子の個数濃度を測定 フラーレン分子の直径は0.7 nm であるが、当該作業場の製品は公称値20 μm 程度の粉体。 製造は密閉系。貯蔵タンクに製品を溜めてから、作業員が囲い込みされた空間で袋詰め作業と秤量をおこない、その後、電気掃除機により掃除。 作業場には排気設備があり、空気の交換速度は11 回/時であった。 300 nm未満の粒子の個数はSMPS の測定値から、300 nm 以上の粒子の個数はOPC の測定値から求めた。 袋詰め位置から1.5 m の位置でのフラーレンの個数濃度は、50 nm 以下の粒径では袋詰め作業時、掃除機使用下では通常の作業よりも激しく振動させた場合 1.6×10⁴ 個/cm³ 程度（作業がない時 1.0×10⁴ 個/cm³ より増加） 50-100、100-2000、2000 nm 以上では作業の有無で個数濃度には変化が認められなかった。 一方、質量濃度に対応する体積濃度で、2000 nm 以上の粒子は、 作業のない時には 1×10¹⁰ nm³/cm³ 通常の作業で 5×10¹⁰、 激しく振動させると 1-5×10¹² nm³/cm³ と2 桁程度増大 100-200 nmと50 nm 以下の粒子でも若干の体積濃度の増加が認められたが、50-100 nm 粒子は増加しなかった。 屋外の個数濃度は10-50 nm の粒子で3×10⁴ 個/cm³ と作業場より著しく高い値であった。 なお、電子顕微鏡観察の結果では3-10 μm の粒子が多く観察され、フラーレンは aggregation/agglomeration として存在しているものと考えられた。

出 典	ナノ粒子の測定に使用した機器等	測 定 結 果 の 概 要
Johnson et al. (2010) ¹⁾	光散乱式粒子計数器 (OPC) 凝縮粒子計数器(CPC)	模擬的実験室レベルの作業で、フラーレン粒子が発生するかどうかを確認。発生源のできるだけ近く(ビーカーや天秤の直上)で測定。 フラーレンは秤量時に、300nm で53000 個/cm³、500 nm で3900 個/cm³ の粒子が発生。 超音波で100 mg/L の分散液(水はイオン交換水)を調製する際には、300 nm で24000 個/cm³、500 nm で6500 個/cm³ の粒子が発生した。 電子顕微鏡観察では、秤量時のフラーレンは径が300 nm 程度であったが、水に分散した場合には200 nm 程度であった。フラーレンが、水と共に空気中に飛散する可能性が示唆された。
Yeganeh et al. (2008) ²⁾	光散乱エアロゾル光度計 走査型移動度粒径測定器 (SMPS) 凝縮粒子計数器(CPC)	米国内フラーレン製造工場(アーク放電による製造)でPM2.5濃度(光散乱エアロゾル光度計)、164-673 nm、4-160 nm 粒子の個数濃度(SMPS、CPC)を計測。2日間、12回の製造工程の間で、反応装置の入ったフード内(反応装置の開口部から20 cm)、フードのすぐ外(反応装置から50 cm、高さ150 cm)、フードの外(実験室内のバックグラウンド、反応装置から200 cm、高さ150 cm)で測定 平均PM2.5 濃度と平均粒子個数濃度に工場内外で違いはなかった。 しかし、掃除の準備など、作業者が物理的な操作をする際に、フード内外で短時間PM2.5 濃度と粒子個数濃度が大きく上昇。(多くが100~sub nm)

甲田ら (2008)²	粒子カウンター	日本国内の金属内包フラーレン(Li@C₆₀)製造事業所で、フラーレン濃度、粒子濃度を測定 合成されたLi@C₆₀、を基盤から掻き取る際にC₆₀ あるいはLi@C₆₀ 由来の粒子が放出されていることがわかった。 ただし、数千nm の粒子は顕著に観察されたが、100 nm以下の粒子はわずかなピークの観測。 作業が行われなかった日のC₆₀ 濃度は定量下限付近 作業を行った日のC₆₀ 濃度は十分定量可能な濃度。 粒径1,000 nmより大きな粒子中のC₆₀ 濃度が高かったが、1,000 nm以下の粒子中からはほとんどC₆₀ が観察されなかった。 表金属内包フラーレン製造現場において粒子として捕集された気中C₆₀濃度 <table data-bbox="1140 641 1877 1120"> <tr> <th rowspan="2">粒子径 (nm)</th><th colspan="2">空気中の濃度[$\mu\text{g}/\text{m}^3$]</th></tr> <tr> <th>作業日</th><th>非作業日</th></tr> <tr> <td>> 2,500nm</td><td>1.65</td><td>0.04</td></tr> <tr> <td>1,000–2,500 nm</td><td>0.32</td><td>N.D.</td></tr> <tr> <td>500–1,000 nm</td><td>0.08</td><td>N.D.</td></tr> <tr> <td>250–500 nm</td><td>0.03</td><td>N.D.</td></tr> <tr> <td>< 250</td><td>N.D.</td><td>N.D.</td></tr> </table> N.D.は検出下限値以下、0.03～0.08 $\mu\text{g}/\text{m}^3$は定量下限値以下	粒子径 (nm)	空気中の濃度[$\mu\text{g}/\text{m}^3$]		作業日	非作業日	> 2,500nm	1.65	0.04	1,000–2,500 nm	0.32	N.D.	500–1,000 nm	0.08	N.D.	250–500 nm	0.03	N.D.	< 250	N.D.	N.D.
粒子径 (nm)	空気中の濃度[$\mu\text{g}/\text{m}^3$]																					
	作業日	非作業日																				
> 2,500nm	1.65	0.04																				
1,000–2,500 nm	0.32	N.D.																				
500–1,000 nm	0.08	N.D.																				
250–500 nm	0.03	N.D.																				
< 250	N.D.	N.D.																				

Shinohara et al. (2009) ²	凝縮核粒子計測器 (CNC) 光散乱式粒子計数器 (OPC)	上記甲田らと同じ事業所(Li@C₆₀を基盤から掻き取る作業の密閉化後に測定)核粒子計測器(CNC)で10～>1,000 nm の粒子の総個数濃度を、光散乱式粒子計数器(OPC)で300～10,000 nm の粒径別個数濃度を計数し、石英フィルター及びカスケードインパクターを用いた捕集とHPLC分析により、全粒子中のC₆₀濃度を測定 合成装置近傍(20～60 cm)では、合成装置を開放し、合成装置内から未反応のC₆₀やLi内包C₆₀が付着した基盤(皿)を回収してデシケーターへ入れる作業(回収作業)が行われた時間帯に500nm以上もしくは1,000nmより大きな粒子の個数濃度(OPCの値)の上昇が見られた。 回収作業・装置運転・その他の作業時間を通して3日間(18時間)測定した作業環境中の平均C₆₀濃度は、合成装置の横で0.13 μg/m³、秤量機の横で0.040 μg/m³であった。回収作業時(約30分)の全粒径のフラーレン濃度は、平均0.44 μg/m³(0.22 μg/m³&2回目0.66 μg/m³)であり、装置運転中(約2時間)の全粒径のフラーレン濃度は、平均0.0057 μg/m³(0.0045 μg/m³&2回目0.0069 μg/m³)であった。C₆₀はそのほとんどがサブミクロンからミクロンサイズであった(2,500nmを超える粒子中のC₆₀は、全C₆₀の26～54wt%)が、250 nmより小さな粒子も4.3～30wt%であり、ある程度のC₆₀ナノ粒子が気中に存在することが確認された。また、C₆₀濃度は非常に低く、どのサンプルでもC₆₀ナノの2.0%以下であった。甲田らの調査と比べて、作業環境中濃度が大きくさがっていることが確認された。																																										
<table><tr><th rowspan="3">粒径 (nm)</th><th colspan="5">気中濃度[μg/m³]</th></tr><tr><th colspan="3">合成装置横</th><th colspan="2">秤量横</th></tr><tr><th>労働時間中 (6時間×3時間)</th><th>取扱作業中 (30分)</th><th>合成中 (2時間)</th><th>労働時間中 (6時間×3時間)</th><th>取扱作業中 (30分)</th></tr><tr><td><250 nm</td><td>0.0023</td><td>0.064</td><td rowspan="5">測定せず</td><td>0.00083</td><td>0.014</td></tr><tr><td>250-500 nm</td><td>0.0014</td><td>Date lost</td><td>0.00065</td><td>0.0040</td></tr><tr><td>500-1,000 nm</td><td>0.0038</td><td>0.11</td><td>0.0029</td><td>0.0028</td></tr><tr><td>1,000-2,500 nm</td><td>0.0040</td><td>0.056</td><td>0.0032</td><td>N.D.</td></tr><tr><td>2,500-10,000 nm</td><td>0.0092</td><td>0.080</td><td>0.0049</td><td>0.025</td></tr></table>			粒径 (nm)	気中濃度[μg/m ³]					合成装置横			秤量横		労働時間中 (6時間×3時間)	取扱作業中 (30分)	合成中 (2時間)	労働時間中 (6時間×3時間)	取扱作業中 (30分)	<250 nm	0.0023	0.064	測定せず	0.00083	0.014	250-500 nm	0.0014	Date lost	0.00065	0.0040	500-1,000 nm	0.0038	0.11	0.0029	0.0028	1,000-2,500 nm	0.0040	0.056	0.0032	N.D.	2,500-10,000 nm	0.0092	0.080	0.0049	0.025
粒径 (nm)	気中濃度[μg/m ³]																																											
	合成装置横			秤量横																																								
	労働時間中 (6時間×3時間)	取扱作業中 (30分)	合成中 (2時間)	労働時間中 (6時間×3時間)	取扱作業中 (30分)																																							
<250 nm	0.0023	0.064	測定せず	0.00083	0.014																																							
250-500 nm	0.0014	Date lost		0.00065	0.0040																																							
500-1,000 nm	0.0038	0.11		0.0029	0.0028																																							
1,000-2,500 nm	0.0040	0.056		0.0032	N.D.																																							
2,500-10,000 nm	0.0092	0.080		0.0049	0.025																																							

		全粒子(10,000 nm 以上も含む)	0.13	0.22 0.66	0.0045 0.0069	0.040	測定せず	
N.D. : 検出下限値以下(0.001 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)								

＜上表の作成に当たって用いた資料＞

- ①「ナノマテリアルに係る有害性等の情報収集報告書」(平成23年3月中央災害防止協会(22年度委託調査報告書))
「出典」の右肩の1)
- ②「ナノ材料リスク評価書「フラーレン」」(平成23年8月)(経済産業省委託研究(NEDOプロジェクト)報告)
「出典」の右肩の2)

注:上記①、②については、測定機器が明記されている調査結果を抜粋した。

NEDOプロジェクトからの引用

篠原直秀 編 (2011) ナノ材料リスク評価書 ―フラーレン(C₆₀)―、最終報告版:2011.7.22、
NEDOプロジェクト(P06041)「ナノ粒子特性評価手法の研究開発」