

## 産業用ナノマテリアルの健康影響評価法開発における課題と慢性影響研究の重要性

広瀬明彦<sup>#</sup>, 西村哲治, 菅野 純

## Research strategy for evaluation methods of the manufactured nanomaterials in NIHS and importance of the chronic health effects studies

Akihiko Hirose<sup>#</sup>, Tetsuji Nishimura, Jun Kanno

Manufactured nanomaterials are one of the most important substances for the nanotechnology. The nanomaterials possess different physicochemical properties from bulk materials. The new properties may lead to novel biological effects and also may or may not cause unknown adverse effects. However, the toxicological evidences are very limited, and there are no standardized evaluation methods at present. Some domestic and international activities are ongoing, in order to share the information or to standardize the methods. In 2005, our institute launched the research on the establishment of health risk assessment methodology of manufactured nanomaterials by funding from the research grants of the Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare. The project contains four themes. The first is development of measurement methods of nanomaterials from biological samples. The second is development of dispersion methods in *in vitro* systems. The third is development of inhalation exposure systems. And the last is development of *in vivo* systems for evaluating long-term health effects. As evaluation materials, fullerene, titanium oxide and multi-walled carbon nanotubes were chosen because of their high production volumes.

In the course of the research project, we revealed that the nanomaterials were competent to cause chronic effects, by analyzing intraperitoneal administration studies and carcinogenic promotion studies. These studies suggested that even aggregated nanomaterials were crumbled into nano-sized particles inside the body during the long-term, and the particles were transferred to other organs. Additionally, long lasting particles/fibers in the particular tissues may cause chronic adverse effects. The physico-chemical properties or toxicity mechanism related with these chronic effects were considered to be different from those properties or mechanism related to acute toxicity. Therefore, we suggested that the toxicological characterization of chronic effects by nanomaterials would be important for the future research. Also, investigations of the toxicokinetic properties and biological interaction with nanomaterials are important to predict the chronically targeted tissues after exposure.

Keywords: manufactured nanomaterials, fullerene, titanium oxide, multi-walled carbon nanotube, chronic effects

## はじめに

ナノテクノロジーは、「ナノメートルサイズのスケールで物質の構造・配列を制御することで、新機能や優れた特性を持つ物質を作り出す技術」とされ、国家戦略としてその技術開発が進められており、ナノ物質（ナノマテリアル）として定義される新規物質・材料は、このナノテクノロジーの中心的な役割を担っている。産業用として生産されるナノマテリアルは、一般に少なくとも大ききの一次元が100ナノメートル以下である物質として定義されているが、このような化合物は典型的にナノ構造依存的な性状（化学的、機械的、電気的、光学的、磁

氣的、生物学的）を有している。これらの特徴によりナノマテリアルは、商業的あるいは医学的な有益性あるいは効率化の目的のために、電磁光学、構造材料を中心としてとして一般家庭用品から食品にいたるまでの新しい応用の展望が期待され、薬物輸送を含む医療への展開も期待されている。このように様々な分野に応用が見込まれるため、ナノマテリアルも様々な種類のもが開発されてきており、その分類法も様々ではあるが、基となる化学物質の種類から以下のように分類できると考えられる。

- ・酸化金属・金属:二酸化珪素(SiO<sub>2</sub>), 二酸化チタン(TiO<sub>2</sub>), アルミナ(Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), 酸化鉄(Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), 酸化亜鉛(ZnO), 酸化インジウム-スズ (ITO) など
- ・炭素系:フラーレン, カーボンナノチューブ (CNT), カーボンファイバーなど

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed:

Akihiko HIROSE; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya, Tokyo 158-8501, Japan; Tel: 03-3700-9878; Fax: 03-3700-1408; E-mail: hirose@nihs.go.jp

- ・ナノクレイ:特殊な層構造を持たせたケイ酸塩
- ・有機ナノ粒子:ナノ粒子化された薬品・化合物（医薬品、ビタミン、色素など）ポリマー、高分子、ミセル、リポソームなど

その他、ナノコンポジットとして、ナノ粒子を特殊な役割のために構成成分としてポリマーやセラミック、金属マトリックス製品中に再配合することもある。

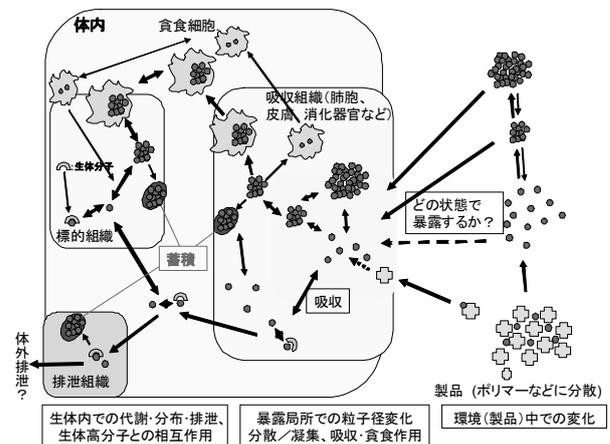
このようなナノマテリアルの多方面にわたる利用拡大は、我々がこれらの物質に直接、あるいは商品を通して間接的に接する機会が増えてくることを意味している。そうすると、本来の目的や使用方法以外による接触や暴露も増える可能性が高くなる他、本来の使用方法でも想定外の長期間暴露、さらには物質、商品等が廃棄された後の環境経路による暴露の機会も増すことが想定される。しかし、これらの特定の機能を意図して合成された純粋な単体としてのナノ物質が生体に及ぼす影響については多くの点で未知である。従って、ナノマテリアルが本格的にその使用が拡大する前に、ナノマテリアルの有用性だけでなく安全性に関する知見も十分に蓄積し、ナノマテリアルの利用が安心して進められるように対応することが求められている。

### 体内動態（ADME）情報の重要性

一般的に、化学物質の健康影響評価（リスクアセスメント）の基本的なフレームは、有害性評価と暴露評価、および各々の評価内容を比較・統合化する過程のリスク判定のコンポーネントから成り立っている。さらに有害性評価は、有害性の確認（hazard identification）と用量反応評価（dose-response assessment）に分けられる。この基本フレーム自体は、ナノマテリアルの健康影響評価に適用できるものであると考えられる<sup>15)</sup>が、ナノマテリアルに特徴的な新たな物理化学的性質を鑑みると、体内動態（吸収absorption, 分布distribution, 代謝metabolism, 排泄excretion (ADME) 情報は、一般の化学物質より重要な意味を持つと考えられる。例えば、粒子サイズの微小化はそれまでその大きさのために生体内に侵入することはないと考えられていた物質が、生体内に侵入が可能になり生体組織との新たな反応性を示すようになる。重量あるいは1粒子あたりの表面積が増大することにより相対的に増加した表面活性のため、それまで反応性が乏しいために無害であると考えられた粒子であっても、生理学的反応を示すようになることなどが推測される。また、用量反応評価や暴露評価においては、従来使われてきている重量よりも表面積や表面活性の強さなどの別のスケールを用いて記述した方が適切な定量的評価が可能になることも指摘されている。このことは、ナノマテリアルによる生体影響はその構成成分である化学物質特

有の性質として一義的に決定されるものではなく、粒子の大きさや形状にも依存することを示めている。また、暴露時における暴露環境（分散状態であるか凝集状態であるか）や暴露経路（吸入、経口、経皮など）との組み合わせによって生体侵入時あるいは侵入後の粒子の体内挙動は異なってくるのが想定され（図1）、有害性影響評価では一般の化学物質に比べて、粉体毒性を含む多くの要因を考慮しなければならないこと意味している。また、ナノマテリアルの凝集しやすい性質は、分布される組織によって蓄積性の動態を示すことが予想される。したがって、ナノマテリアルの場合にはADMEの性質の違いにより毒性（生体影響）の質や強さも大きく変える可能性を持っており、これらの情報は、一般の化学物質より大きな意味合いを持つようになると考えられる。

図 1. 想定される暴露状態と吸収後の体内動態



### 生体試料中の検出法の開発の必要性

ADME情報を取得するためには、影響発現部位もしくは作用を及ぼすと想定される部位にナノマテリアルの存在を示すことが必要であり、まず生体試料中で検出、同定・定量できる方法を確立しなくてはならない。存在の検出には、存在量を定量する目的と、生体内の存在状態を同定する目的がある。存在量を定量する目的として、対象物質を生体試料から分離・単離し、検出する方法をとることができる。たとえば、金属ナノ粒子は生体試料を硝酸加熱分解後、燃焼灰化した試料中の金属元素の量を誘導結合プラズマ-質量分析計で分析する方法を採ることができ、フラーレンの場合は、生体試料から抽出後、液体クロマトグラフィー質量分析計で分析する方法が有用である。しかし、これらの方法では、ナノマテリアルの存在やその量を評価することは可能であるが、生体内でも実際にナノの状態が存在しているのか、あるいは再凝集などはしていないかなど、標的組織にお

ける最終的な生体内反応に影響を及ぼすと考えられる実際のナノマテリアルの存在状態を把握することはできない。最終的には、組織標本の電顕などによる確認が必要である。一方、カーボンナノチューブでは、機器による定量測定が困難であり、測定組織を硝酸加熱分解と加熱灰化で処理し、透過型電子顕微鏡で本数や形態を、手で計測する方法以外に確実に測定する方法はない状況である。将来的には、生体内に取り込んだ後、感度良く、精度高く検出できる方法を開発するために、対象物質に標識を付けて分析する方法の開発も有効であると考えられるが、標識化することによりナノマテリアルの吸収性や生体反応に影響を及ぼす可能性を考慮しなければならない。

### 影響評価法確立の必要性

粒子のナノサイズ化による表面活性の増大は、一般的に粒子の凝集性を増強することが知られており、この凝集性は上記の体内動態を大きく左右する因子であるだけでなく、生体影響を評価するための試験系開発においても重要な制御因子である。*in vitro*試験系では、水系の培養液を用いた試験法になるため、水難溶性で凝集しやすいナノマテリアルを培養液中に凝集することなく、均一に分散させることが最も重要な課題となる。分散剤として、界面活性剤や親水・疎水両領域をもつ媒体となる物質の共存が必要となるが、評価対象の物質以外に共存する物質や溶媒が生体に影響を及ぼす可能性を考慮して、生体影響の少ない物質を使用するか、もしくは影響の出にくい量（濃度）の使用を考えなければならない。例えば、フラーレンはトルエンにある程度まで容易に溶解するが、有機溶媒の毒性や溶媒自身の溶解性のためにトルエン溶液の暴露において量的な制限がかかる。分散剤として有効な界面活性剤も、高濃度では細胞溶解性があるため制限があり、細胞の生理作用や検出する測定系に影響を与えない適切な濃度の選択が必要である。一方、生体成分に近い分散剤としては、血液中脂質やリポタンパク質がある。これらは、細胞毒性等の影響を及ぼす可能性が低く、培養の重要成分として添加されていることから優れた分散剤と言えるが、培養液当たりの添加濃度には制限がある。また、人工脂質二重膜構造のリポソームも有用な分散剤であると考えられるが、リポソーム自身にも使用する細胞によっては毒性を示すことがある。しかし、リポソーム膜と細胞膜の相互作用により、ナノマテリアルを細胞膜中に導入して、評価する手法としては有用性が高いと考えられる。また、水系への分散性をあまり考慮しなくてもよい*in vitro*系として、経皮暴露の三次元皮膚モデルの系が皮膚透過性や細胞内分布、細胞レベルの作用機構を解明するために有力な手段となると

期待される。

最終的な生体影響評価をするためには*in vivo*の実験動物を用いた研究が必要である。しかし、投与時の溶媒や分散状態が吸収性や生体反応にも影響を及ぼすと考えられ、*in vivo*系でも適切に分散した投与方法の検討が必要である。経口暴露媒体としては、消化管系へ過度な刺激を与えることは望ましくないため、可能な限り、通常使用している溶媒を用いての分散が検討される。溶剤の候補として、食品中油脂、スクアラン、膜構成脂質成分、血清中脂質、リポタンパク質、リポソーム、低刺激の有機溶媒等の使用が検討される。水溶液として投与するためには、界面活性剤（Tween20やTriton X-100等）、 $\gamma$ -シクロデキストリン等の包接体を用いて水に分散させる方法もある。フラーレンでは、コーン油に溶解して経口投与することが可能であることが知られている。経皮暴露の場合は、経口暴露の場合と異なり対象が皮膚であるため、溶剤の種類が異なる。溶媒として、揮発性の高いトルエンやキシレン等の有機溶媒と揮発性の低い有機溶媒、もしくは界面活性剤などの分散剤を用いた水溶液が検討されるが、塗布時あるいは塗布後の皮膚表面での凝集性や、ナノマテリアルの残留性や浸透性が変化することを考慮しなくてはならない。

### 吸入暴露試験系の開発の必要性

現在のところ、生体内吸収の観点から最も可能性の高い暴露経路は吸入暴露であると考えられている。これまで、ナノマテリアルに限らず微粒子の吸入暴露研究は、金属、鉱物粒子、排ガス粒子などを中心に数多く行われているところであり、生体影響についても、これらの過去の知見が有用であることは明らかである。しかし、実験的検証を行う際には、先に述べたナノマテリアルに特有の凝集しやすい性質をどのように扱うかについての検討が必要となる。特に凝集体が大きいままであると、肺組織中の細気管支等を詰まらせることによる物理的な二次影響を見ることになり、少なくとも肺胞まで到達可能な分散技術は必要であると思われる。実験的暴露方法には、一個体ずつ暴露する吸引法や気管内投与法と、吸入設備を用いる吸入暴露法がある。どちらを採用するにしても、ナノマテリアルの吸入暴露試験系として、特に凝集しやすい特有の性状のため新たな分散法の開発が必要である。特に吸引・気管内投与の場合には、投与溶媒の選択、エアロゾル化するための技術と分散媒体の選択が必要である。分散媒体としてTween等の界面活性剤や肺サーファクタントの使用が見込まれている。吸入設備の開発においても、粉体をより微細にする方法やエアロゾル化による粒子発生装置の開発が必要である。

一方、繊維状粒子については、これまでアスベストや

アスベスト代替物である人工繊維による研究で蓄積された情報が有益であると考えられる。アスベスト様繊維については、肺がんや中皮腫、肺線維症の誘発は重要な影響であり、これらも吸入暴露実験による実験的検証が可能であるが、中皮腫誘発性に関して腹腔内投与による試験も有用で感受性の高い試験であるとされている。その強さを規定している最も重要な因子は、特有の繊維の径と長さに加えて、数〜数十年にわたる生体内における残留性であると考えられている。そのため、現時点では*in vitro*試験系や短期動物試験により実証することが困難であり、長期の動物試験が必須となるが、この問題に関する詳細な議論は後述する。

### ナノマテリアルに関する有害影響情報の現状

非常に多岐にわたる工業用ナノ粒子を一括して生体影響を検討することは実質的には不可能であると考えられ、そのため安全性評価を念頭においた各ナノマテリアルの国際的な標準化作業も進んでいる。将来的には、これらの標準化されたナノマテリアルに関する評価が進んでいくものと考えられるが、現時点では、個別の物質についての断片的な生体影響に関する情報しか得られていない。しかも、生産量や使用量を反映して、二酸化チタンやフラーレン、カーボンナノチューブといった物質に関する情報に限られているというのが状況である。

**二酸化チタン:**酸化チタン自体は、古くから白色顔料として使われてきており、着色の目的で食品添加物としても使用されてきている。顔料としては、一次粒径は2〜300ナノメートルぐらいであるが、通常大きな凝集・集合体を形成している。近年は、紫外線防御や光触媒活性を目的としたより一次粒径の小さいナノ粒子(1-50ナノメートル)が使用されるようになってきた。工業的製品の多くは粒子の形状としてルチル型とアナターゼ型に分類され、アナターゼ型の光触媒作用がより強いと考えられている。顔料としての使用が主流であった1989年のIARCの発がん性評価では、ラットへの吸入実験で高用量群においてのみ肺線維腫の増加が認められる<sup>6)</sup>ものの、経口、皮下、気管内および腹腔内投与のいずれにおいても動物実験において催腫瘍性が認められず、不十分な疫学データのためグループ3に分類された<sup>7)</sup>。しかし、その後、顔料タイプおよびナノ粒子の両方において、吸入および気管内投与によるラットでの肺がん発生率の増加を示す報告を考慮し、2006年2月のIARCの評価では、Group2Bに変更された<sup>8)</sup>。ナノサイズの粒子(*ultrafine particle*)とサブミクロンサイズの粒子(*fine particle*)の吸入暴露による炎症性を比較した研究からは、ナノサイズ粒子による炎症反応の方が強いとする研究が報告されている<sup>9, 10)</sup>が、二酸化チタンを気管内滴下した研究では、

顔料系のサイズとナノサイズの粒子で炎症反応に違いのないことも報告されている<sup>11)</sup>。しかし、ルチル型とアナターゼ型を比較した研究では、粒子サイズが同等でもアナターゼ型の方が、炎症反応が強く、表面活性の違いが重要な因子であることも示唆されている<sup>12)</sup>。一方酸化チタンは、日焼け止め剤の中に紫外線防護の目的で使用され、近年は使用時の透明性を高める等の目的でナノサイズ化されたものが使用されており、ナノサイズ粒子の皮膚暴露による影響は、検討すべき暴露経路の一つである。しかし、局所刺激や感作性、全身影響に関してサイズの違いによる影響を検討した報告はなく、吸収性に関して行われた少数の研究がある。日焼け止め剤中の二酸化チタンが、角質層や毛嚢の中に浸透していることを示した報告があるが、この毛嚢への浸透部分は角質層に覆われている部分のみであった<sup>13)</sup>。また別の報告では、二酸化チタンナノ粒子による皮膚への透過性はほとんど示されていない<sup>14)</sup>。しかし、5-20nmというような超微細二酸化チタンが皮膚を透過し、皮内の免疫系と相互作用する可能性は指摘されており<sup>15)</sup>、今後、慢性暴露による影響を考慮した研究が必要であると考えられる。

**フラーレン:**フラーレンは、空気から分子酸素を容易に吸着させることができ、光照射により得た余分な励起エネルギーを近くの酸素分子に渡し、反応性の高い一重項酸素を生成することが知られている。遺伝子突然変異誘発性に関しては、可視光線照射時と代謝活性化系存在時にいくつかのサルモネラ菌種で変異原性が示された<sup>16)</sup>。発生した一重項酸素から間接的にラット肝臓ミクロゾームの作用により生成した過酸化脂質が酸化的DNAを引き起こしたことが示唆されている。しかし、マクロファージを用いた初期の実験では、フラーレンによる活性酸素生成に対する影響はほとんど認められていない<sup>17)</sup>。フラーレンの毒性に関する報告は、ほとんどが修飾されたフラーレンに関するもので、未修飾のフラーレンに関する情報は少ない。未修飾のフラーレンと水酸化フラーレンの*in vitro*での細胞障害性に関する研究では、未修飾のフラーレンの方が細胞毒性の強いことが示されている<sup>18, 19)</sup>が、両フラーレンに関して3mg/kgまでのラットへ気管内滴下による*in vivo*単回投与実験では、どちらも一過性の炎症反応を示し、その反応性には違いが認められなかった<sup>20)</sup>。経口投与した未修飾のフラーレンの毒性影響を調べた報告はないが、フラーレンはマウスの皮膚塗布に対しての局所炎症作用や発がん促進作用を示さないことが報告されている<sup>21)</sup>。また、UVA照射下でC60フラーレンのトルエン溶液をマウスの皮膚に反復投与した実験では、紅斑はみられたが、皮膚がんはみられなかった<sup>22)</sup>。未修飾フラーレンについては、溶媒や培地への分散化が極めて困難であり、*in vitro*系では使用した

溶媒や分散剤の影響を受ける他、*in vivo*系における情報も少なく、系統だった毒性研究の進展が望まれる。

**カーボンナノチューブ (CNT):** CNTは単層または複層の形状を持ち、それぞれSWCNTおよびMWCNTとして分類されるが、その製法により層の数や構造、繊維の長さ、使用する触媒金属などが異なる様々な種類が存在する。また、ある種のMWCNTの形状がアスベストに類似していることから、その潜在的な懸念について関心が持たれている。まず、SWCNTについて、ラット及びマウスに気管内投与し、肺への影響を検討した実験において、肉芽腫形成と間質性炎症を引き起こすことが報告された<sup>23, 24)</sup>。Warheitらのラットの実験では多発性肉芽腫が観察され、高倍率の検査によりナノチューブの固まりの周りを覆う単核性の肉芽腫が認められた。この変化は用量非依存的で生体の単なる異物反応と捉えることができ、生理学的関連性を持たないかもしれないと考えられている。また、Lamらのマウスを用いた気管内投与実験では、慢性暴露で傷害性のあるクオーツ粒子より炎症反応の強いことが示された。一方、SWCNTを咽頭吸引によりマウスに暴露させた実験では、BALの炎症細胞、炎症サイトカイン、蛋白質の迅速な増加により、SWCNTが急性炎症反応を起こすことを示したが、SWCNTのマクロファージとの反応性は一過性で、炎症性細胞浸潤を伴わない間質の線維化が認められている<sup>25)</sup>。さらに、咽頭に滴下した実験では、大動脈ミトコンドリアのグルタチオン量、蛋白カルボニル化活性の変化を伴うミトコンドリアDNA障害が示され、ApoE-ノックアウトマウスで、アテローム性動脈硬化症の進行を増強することが示され、体循環に吸収されて、全身影響を示す可能性が示唆されている<sup>26)</sup>。ラットに気管内投与したMWCNTは、投与後60日後にも肺に残存し、濃度依存性の炎症反応を起こしコラーゲンリッチな肉芽腫を形成した。この実験では、平均5.9 $\mu\text{m}$ と0.9 $\mu\text{m}$ に粉碎したMWCNTの投与による比較研究が行われ、粉碎前のMWCNTの多くが気道に蓄積し炎症を示していたが、粉碎した方は肺胞域に達し肺実質における肉芽腫を形成していた<sup>27)</sup>。マウスにMWCNT (200-400 $\mu\text{g}$ )を気管内滴下した実験では、肺の炎症反応は一過性で弱かったが、投与に依存した血小板の活性化と凝固作用の活性化を促進している可能性が示唆された<sup>28)</sup>。一方、アスベストとの形状の類似性から想定される吸入暴露による発がん性や中皮腫の誘発性の懸念については、最近腹腔内投与により中皮腫誘発性を示唆する3つの研究結果が報告された<sup>29-31)</sup>。これらの腹腔内投与による研究は、過去に行われた一連の研究を参考として実施されているが、アスベスト様の繊維状粒子による中皮腫誘発性に特化した評価系であるので、その妥当性や結果の詳細については後述

する。

その他の工業用ナノマテリアルに関する研究は、さらに断片的な研究しか報告されていない。しかし、上記3種のナノマテリアルに関する報告を見る限りにおいても、粒子の大きさや表面積だけでなく、表面活性や形状に依存した毒性研究が必要であることが示されている。

### 健康影響評価法開発における課題

ナノマテリアルの直接的または間接的な暴露による生体影響や環境に対する研究情報は現在のところ上記のように限られており、影響を定量的に評価する指針も定まっていない。また、評価するための安全性試験法に関して、ナノマテリアルの物理化学的特長を考慮すると、試料の投与方法、投与形態、存在状態の要素がこれまでの化学物質の評価方法に比べて重要性が高いと考えられる他、物性に基づいて基礎的な研究も必要であると思われる。また、ナノマテリアルの定義や応用分野の広さから、今後、対象となる物質は、多種多様の組成と構造を持つことが考えられ、全ての対象について標準的な生体影響試験法を策定することは困難で、実際にはケースバイケースの対応が必要になると考えられる。しかし、ナノマテリアルの物理化学的特長を考慮して、個別の生体影響試験において、その後の影響評価に適切に使用するために予め測定しておくべき項目や、分散法を主とした暴露法などにおける改良点や検討項目について整理しておくことは可能であると考えられ、標準的な毒性手法を適用する場合のガイダンスや最適手法についての国際的な議論が進みつつある。この点に関しては、後述するようにOECDなど国際機関が中心となって、様々な形で情報共有や共同プロジェクトが進められている。

### 国立医薬品食品衛生研究所の厚生労働科学研究班における取り組み

このような状況の下、我々が所属する研究班では、評価法の確立のための総合的な基盤研究を行うことを目的とした研究を進めてきた。まずは、高生産量のナノマテリアルを検証物質として選び、*in vivo*生体影響評価手法の開発、ナノ粒子の吸入毒性評価手法の開発、暴露測定法および動態解析法の開発、*in vitro*試験系の開発および、国際動向調査の5部門による研究を行ってきた。その結果、*in vivo*試験法では、p53(+/-)マウスに多層カーボンナノチューブ (MWCNT) を腹腔内投与することにより、中皮腫が発生することを確認すると共に、経気管肺内噴霧法を用いた酸化チタンによるc-Ha-rasラットとフラーレン (C60) による通常ラットへの発がんプロモーション作用を見いだした。吸入試験法では、MWCNTのTween20を用いたミスト状態での安定した暴露実験が可能なこと

を確認した。暴露測定法および動態解析では、フラーレンのラットへの強制単回経口投与と、MWCNTの気管内投与による生体試料での定量的な検出が可能であることを確認した。*in vitro*試験法の研究においては、リポソーム懸濁フラーレンの暴露により、小核誘発性、神経細胞機能蛋白質に対する影響、Caco-2細胞を使った細胞透過性、マクロファージ細胞からのサイトカイン放出に関して、特に強い影響が見られなかったことを確認してきた。国際動向調査においては、OECDに設置されたワーキンググループ内での討議で、加盟各国でのボランティアな初期評価研究を進めることが合意されており、本研究班の成果も積極的に取り入れていくべきことが示された。

これらの研究成果をとおして、MWCNTの吸入暴露システムや生体内検出法や*in vitro*試験法のための基礎的技術を確認することを可能にすると共に、MWCNT腹腔内投与での繊維状粒子として観察された事象や気管内投与による発がんプロモーション作用の結果により、*in vivo*長期暴露研究の必要性を強く示すことができたと考えている。

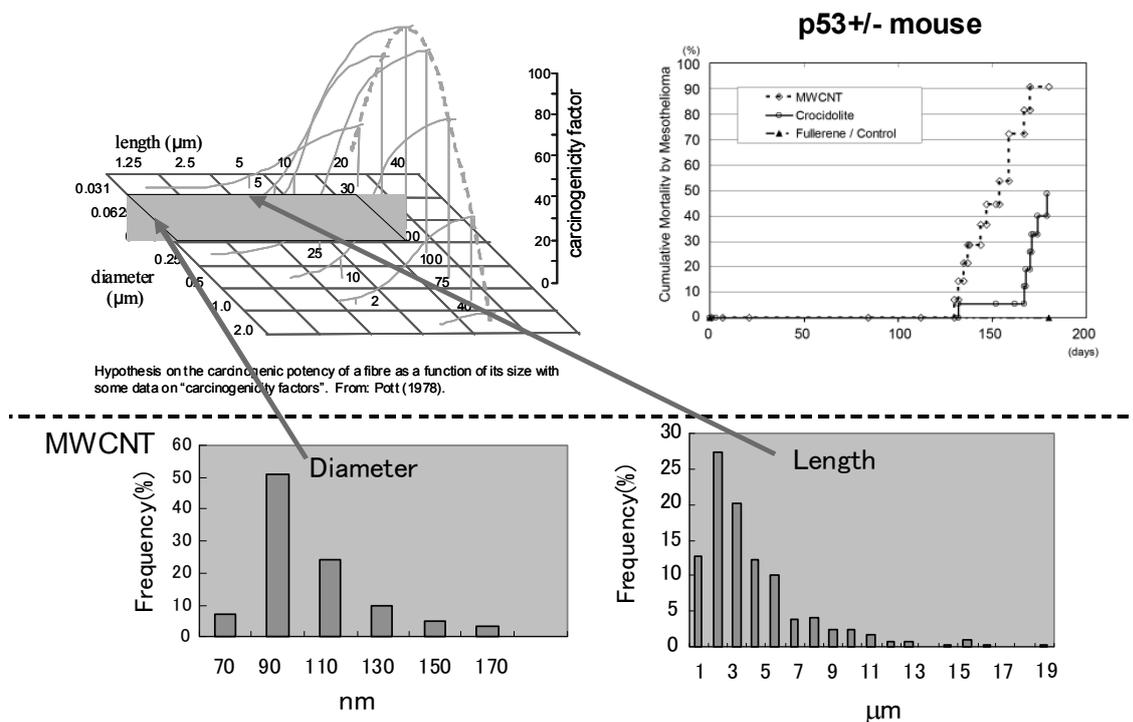
#### アスベスト様サイズの繊維状粒子の腹腔内投与試験の妥当性

我々のMWCNT腹腔内投与研究を含めて、最近報告されている様々な長さを持つカーボンナノチューブ類の中皮腫誘発性研究については、アスベスト様の繊維状粒子

に関する過去の研究を参考としてデザインされている。ここでは、これらの研究が行われた理由を説明するために、まず過去の経緯についての概説を行う。

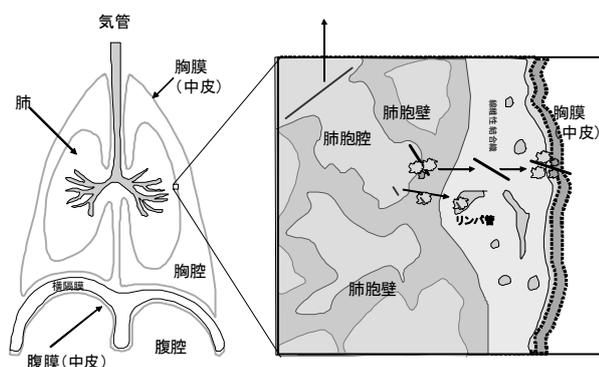
アスベストなどの繊維状粒子の吸入暴露による肺発がん性ポテンシャルは、繊維径と長さおよび体内残留性に依存することが知られている。Davis(1989)ら<sup>32)</sup>のラットを使った吸入実験では、20 $\mu\text{m}$ 以上の繊維数の多いクリソタイルでアスベスト線維症と発がん性が強くなる傾向が示唆された。それまでの様々な治験をもとにPott(1978)<sup>33)</sup>は、繊維系と繊維長を関数として発がんポテンシャルの強さを示す仮説を提唱した(図2)。一方、アスベストによる実験動物による中皮腫の誘発は、最初にラットへの胸腔内へのアスベスト埋入実験によって、Wangerによって証明された。さらに、Stanton(1981)ら<sup>34)</sup>による様々な径と長さの分布を持つアスベストを含む鉱物系繊維を胸膜に埋入した実験により、径が1.5 $\mu\text{m}$ 以下で、長さが4 $\mu\text{m}$ 以上の繊維の割合が多いものが、発がん性の強いことが示唆されている。これらの知見をもとに、WHO(1986)<sup>35)</sup>では、繊維長、径および化学組成は体内での沈着、クリアランス、移動に重要な因子であり、胸腔内あるいは腹腔内へ直接投与して中皮腫を誘発させる一連の研究結果からは、繊維長と径が主要な因子であるとした。

図2. 腹腔内投与による中皮腫誘発作用の検討



この形状に依存した繊維性粒子の発がん性などの慢性影響は、肺の中での体内残留性に関連していると考えられている。WHOでは、PCOMサンプラーでカウント可能な、繊維長 $5\mu\text{m}$ 以上で、繊維径が $3\mu\text{m}$ 以下で且つ、繊維長:繊維径のアスペクト比3:1以上の粒子 (WHO fiber) を、職域環境でのモニター粒子として推奨してきた。これは、繊毛のある気道を通り抜けて、胚胞まで到達できる粒子 (respirable)は空気力学的な繊維径が $5 \sim 10\mu\text{m}$ 以下とされているが、繊維長は空気力学的な繊維径に影響を与えないことが示されている<sup>36, 37)</sup>ことや、 $5\mu\text{m}$ 以上の大きさの繊維は、マクロファージで除去するには大きすぎることによるものであると解釈されている。その結果、これらの繊維状粒子の肺胞域への到達性と、生理学的な難除去性が、繊維長の長い繊維の有害性を示す根拠の一つであるとされている (図3)。

図3. 繊維状粒子の肺胞域への到達性と生理学的難除去性



アスベストや鉍物系の繊維以外の人工的なガラス質繊維を用いた試験でも、繊維長に依存した発がんポテンシャルを示す結果が得られている。しかし、同じ形状を持つ繊維でもその化学組成の違いで、発がん・慢性影響に違いがあることが示された。また、アスベストの一種クリソタイル(白石綿)も不純物の少ないものは、クロソライトやアモサイトよりも、繊維数あたりの催腫瘍性が弱いことが知られている<sup>38)</sup>。化学組成の内、鉄原子が、活性酸素発生に強く関わっており、発がん機序の因子と考えられている、実際、クリソタイルを含めたアスベストや人工ガラス質繊維の不純物としても混在している。しかし、その混在量は、同じ物質でもサンプルごとに異なるほか、どのタイプの鉄原子が発がん性に関わっているかは依然不明であり、鉄の混在量と活性酸素の発生量に明らかな相関関係は認められていない<sup>39)</sup>。鉄含量は中皮腫誘発の増強要因であるが、絶対要因ではない。

一方、体内残量性は慢性影響に関して、形状因子(繊維長と径)の以外に他に最も重要であると認識されてい

る因子としては、化学組成に基づく繊維の体内での耐久性 (durability) が知られている<sup>40)</sup>。形状的には、体内残留性が高いと思われる形状の物質でも、長期間体内に残留している間に、粒子表面の収縮や侵食などにより、繊維が分解されたり短くなったりすることにより、物質の組成によっては、肺胞内から除去されていくメカニズムのあることが示唆されている。実際、肺内からの繊維(特に繊維長の長い( $20\mu\text{m}$ 以上)繊維)の排出半減期の長さが、肺への障害性と相関していることが、人工ガラス質繊維を用いた研究で示されている<sup>41)</sup>。一方、腹腔内投与による中皮腫の誘発の強さも、繊維長の長い繊維の肺からの排出半減期の長さによく相関していることが示されている<sup>42)</sup>。1997年のECのガラス性繊維の有害性物資の分類、包装、表示に関する指定 (EC Commission directive 97/69/EC)<sup>43)</sup>の中では、上記のような知見を受けて、腹腔内投与あるいは吸入試験での発がん性試験での知見に加えて、 $20\mu\text{m}$ 以上の繊維の肺からの消失半減期(吸入の場合10日、気管内投与の場合40日より短い場合は発がん物質としての表示から除外している)を基準として採用している。

最近のアスベスト代替繊維の評価に関するWHO/IPCSの2005年のワークショップ (WHO Workshop on Mechanisms of Fibre Carcinogenesis and Assessment of Chrysotile Asbestos Substitutes. 8-12 November, 2005, Lyon, France)でもサマリーレポートのなかで、

「物理化学的性質として、化学組成は、繊維の構造と物理化学的性質(表面積や表面活性)を決定する主要因子であり、繊維粒子成分から発生するフリーラジカルはDNA障害や変異原性を引き起こす。また、繊維表面の物理化学的性質は炎症反応を決定する因子となる。また、繊維の半径・長さと蓄積性に関しては、繊維の長さ依存して生体内残留性が大きくなれば、繊維粒子による発がん性が強くなる傾向にあるとされているが、これはガラス製の繊維によって確認されている事項であり、他の種類の繊維状粒子でも証明されている訳ではない。」

という有害性評価に関するコメントが参加者によるコンセンサスとしてまとめられている。

以上のようにこれまで繊維状粒子と中皮腫の誘発能に関しては、繊維の径と長さ、構成成分、生体内半減期等様々な因子を用いた数多くの研究がなされてきており、アスベストとガラス性繊維に関してはある程度のコンセンサスが得られているものの、繊維性粒子全体の評価としては、依然、明確な国際的コンセンサスは確立していない状況である。しかし、frustrated phagocytosisを仮説とし、組成に関わらず粒子のサイズと形状を重視する考

えも否定されていない。

合成有機繊維やカーボンナノチューブ等の新しい素材の繊維性粒子に関しては、上記のような知見が当てはまるかどうかについては確認の必要性が提言されていた<sup>44)</sup>。そこで、我々の研究班では、炭素原子が主成分であるカーボンナノチューブについて、その形状（繊維長や径）から予想される中皮腫誘発能を検証することとした。

#### 繊維長の長いタイプのMWCNTの腹腔内投与試験の結果

我々の研究で使用した多層カーボンナノチューブ(MWCNT)について、その繊維径と長さを測定したところ図2の結果を得ている。これらの大きさは、初期に提唱された発がんポテンシャルを示す大きさのレンジと重なることが示された。その発がん性を評価するにあたり、暴露経路を考慮すると吸入暴露による実験が適切であるとは考えられたが、カーボンナノチューブは、凝集しやすい性質を持っており、研究班がスタートした直後においては、液体等に分散するなどして気管内投与を行うことを念頭においても、適切に分散して投与/吸入暴露を行う手法が存在していなかった。また吸入暴露による検証の必要性についても、論議の分かれるところであり、過去の吸入暴露実験による齧歯類の発がん感受性が人のそれに対して著しく低く、発がんポテンシャルを過小評価する可能性、そして、むしろ齧歯類における腹腔内投与結果との対応の方が、人における発がんポテンシャルを正当に評価するのではないかと指摘もあるため、上述した腹腔内投与法の妥当性に鑑み、最初の試験の暴露経路として検出力の高い腹腔内暴露を選定した。しかし、最も発がんポテンシャルの強いアスベスト（クロシドライト）を用いた腹腔内投与研究でも、中皮腫の誘発には、1年以上の期間が必要であることが知られていたため、より短期間での検出法を検討した。その結果、P53(+/-)ヘテロノックアウトマウスを使った腹腔内投与手法により、アスベストによる中皮腫誘発を約半年まで短縮できる研究が報告<sup>45, 46)</sup>されており、この手法を用いてナノチューブとフラーレンを検討することとした。P53(+/-)マウスを用いたオリジナルの手法では、200 $\mu$ g (5.8 $\times 10^8$  fibre) を週に一回35週間腹腔内投与しているが、複数回投与による繊維長非依存的な毒性を回避するために単回投与で行うこととした。また、未だ最終化はされていないが、1997年にECのEuropean Chemical Bureauの合同研究センター (Joint Research Center) で作成されたManMadeMineralFibres (MMMF) 試験法のドラフト案<sup>47)</sup>では、繊維数として1 $\times 10^9$  WHO fiber/ratの単回投与を標準としている。また、Rollerら (1997)<sup>48)</sup>の様々な繊維粒子を腹腔内投与した際の用量（繊維数）依存性からは、10<sup>9</sup> fiber/animal程度を投与すれば、様々な繊維で

の中皮腫の発生を捉え得ることが示されている。研究結果としては、p53のヘテロノックアウトマウスに3mg/miceを腹腔内単回投与した場合に、投与後半年までの間に、ほとんどのマウスに中皮腫の発生が認められた<sup>30)</sup>。(尚、現在解析中の追加試験では、1000分の一の用量である3 $\mu$ g/mouseの腹腔内投与でも、中皮腫の発生することを確認している)。同時に投与したクロシドライト (3mg/mice) においても、ほとんどのマウスに中皮腫を誘発したが、未修飾フラーレンを同用量 (3mg/mouse) 投与した場合は、対象群と同様に中皮腫の発生を認めなかった。

ほぼ同時期に発表された別の研究では、長さの違う4種類のMWCNTを50 $\mu$ g/kgの用量で腹腔内単回投与して、7日後の中皮細胞の増殖性を検証したところ、長いタイプの2種類について腹腔側にCNTを取り込んだ群においてのみ細胞が集合した肉芽の形成が認められた<sup>29)</sup>。この結果は、我々の結果を支持する結果である<sup>49)</sup>。さらに、我々が用いた長いタイプのMWCNTは、野生型のラットを用いた腹腔（陰嚢腔）内投与研究によっても、中皮腫を誘発する能力を持つことが明らかにされた<sup>31)</sup>。尚、短いタイプやその他の様々な形状のMWCNTにおける慢性毒性は別途検証する必要がある。

#### 慢性影響研究の重要性

p53のヘテロノックアウトマウスにナノマテリアルを腹腔内投与した我々の研究では、分散したMWCNT繊維が食細胞によって貪食された像として認められ、繊維を含んだ細胞が腹膜の病変部のみならず肝類洞内又は肝葉間の線維性中隔に沿って及び腸間膜リンパ節の中にも認められることが示されている。また、中皮腫誘発性を示さなかったフラーレンについては、腹膜において小さな暗褐色斑を漿膜表面に認めるのみであったが、この暗褐色斑は投与したフラーレン凝集塊のサイズと形が一致しており、その裂隙の辺縁が褐色に染まった像が捕らえられている。これは、食細胞によるフラーレン粒子の表面の生体による細分散の可能性を示唆しているものと推定された。この実験を再解析した結果、フラーレン投与群において、体重増加抑制、腎の巣状萎縮、組織学的に尿細管上皮の空胞変性（PAS染色陰性、脂肪染色陰性）～尿細管の萎縮と円柱形成によるネフロン萎縮ないし脱落が誘発されていることが示唆され、現在、追試による確認を進めている。少なくともフラーレン凝集体が貪食細胞等により細粒化され、全身に再分布して影響を引き起こした可能性が示唆された。

以上のことは、アスベスト様の繊維状粒子の慢性暴露による中皮腫誘発性だけではなく、体内に取り込まれ得るサイズのナノマテリアルの長期体内残留とそれに対

する生体反応の様式が、慢性的に身体に大きく影響することを示唆しており、ナノマテリアルの未知の生体影響を検索していくための慢性影響研究は、より重要な研究テーマとして取り上げるべきであると考えられる。

#### おわりに

産業用ナノマテリアルはナノテクノロジーの中心的新規物質として、近年急速にその種類や生産量が増加しつつあるが、産業用途として期待されている物理化学特性は、同一化学組成を持つ大きな構造体とは異なる生理活性やヒト健康影響に対する懸念をもたらす可能性を含んでいる。このような懸念に対して、ナノマテリアルの特性を考慮した有害性評価手法の開発と評価の実施が急務となっており、我々は、本問題に対処するための体内動態モニタリング法、*in vitro*及び*in vivo*の評価法開発の為に基礎的研究を進めてきたところである。ナノマテリアルによる健康影響評価法について論点の整理では、基本的な評価概念については、従来の化学物質と同様であると考えられものの、ナノマテリアル特有の物理化学的性状のため、特に分散法や体内蓄積性といった観点で新しい技術の導入や手法開発が必要であることが示された。一方、ナノマテリアルの想定された体内動態に従い最も懸念された慢性影響として、繊維状粒子による中皮腫形成について、アスベスト同様の大きさや形の繊維を含むカーボンナノチューブが腹腔内投与試験よりそのポテンシャルを持つことを明らかにしてきた。加えて、この研究は短い繊維状のナノチューブやフラーレンが、細胞による食食作用等を介して体内に再分布する可能性を示唆した。これらのことは、ナノマテリアルの長期体内残留とそれに対する生体反応の様式が、慢性影響に大きく影響することを示唆すると共に、表面活性の高いナノマテリアルと体内成分（細胞を含む）との基礎的な相互作用、体内残留様式、及び慢性有害性影響の同定が、ナノマテリアルの健康影響評価研究の中で最も重要な検討事項であることを示したものであると考えている。多くの点で未確定の部分が多いナノマテリアルの健康影響評価において、*in vitro*及び*in vivo*の評価などの様々なアプローチが必要であることに異論の余地はないところである。しかし、闇雲にあらゆるエンドポイントやスクリーニング手法の検証を進めることより、回り道のようにみえるかもしれないが、想定される重要な*in vivo*影響を同定し、その影響の発現メカニズムや検出マーカーを検索しながら評価手法を整備していくことの方が、より早く評価手法の確立に繋がるのではないかと考えている。

1) SCENIHR (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks), The appropriateness

of existing methodologies to assess the potential risks with engineered and adventitious products of nanotechnologies. Adopted during the 10th plenary 26 March 2006 after public consultation. SCENIHR 002/05 (2006).

- 2) SCENIHR (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks), Opinion On The Appropriateness Of The Risk Assessment Methodology In Accordance With The Technical Guidance Documents For New And Existing Substances For Assessing The Risks Of Nanomaterials. Adopted during the 19th plenary 21-22 June 2007 after public consultation (2007).
- 3) FSA (Food Safety Authority of Ireland), The Relevance for Food Safety of Applications of Nanotechnology in Food and Feed (2008).
- 4) COT, UK Committees on toxicity, mutagenicity and carcinogenicity of chemicals in food, consumer products and the environment (COT, COM, COC). Joint statement on nanomaterial toxicology (2005).
- 5) COT, UK Committee on toxicity, of chemicals in food, consumer products and the environment. COT Addendum to joint statement of the Committees on toxicity, mutagenicity and carcinogenicity of nanomaterial toxicology. COT Statement 2007/01, March 2007 (2007).
- 6) Lee, K.P. Trochimowicz, H.J. and Reinhardt, C.F.:Toxicol. Appl. Pharmacol. 79, 179-92 (1985)
- 7) IARC:IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. 46, 1-458 (1989)
- 8) IARC. Summaries and Evaluation. Carbon Black, Titanium Dioxide and Non-Asbestiform Talc. 2006; Available from: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Meetings/93-titaniumdioxide.pdf>.
- 9) Donaldson, K. Stone, V. Clouter, A. Renwick, L. and MacNee, W.:Occup. Environ. Med. 58, 211-6, 199 (2001)
- 10) Oberdorster, G. Maynard, A. Donaldson, K. Castranova, V. Fitzpatrick, J. Ausman, K. Carter, J. Karn, B. Kreyling, W. Lai, D. Olin, S. Monteiro-Riviere, N. Warheit, D. and Yang, H.:Part Fibre Toxicol. 2, 8 (2005)
- 11) Warheit, D.B. Webb, T.R. Sayes, C.M. Colvin, V.L. and Reed, K.L.:Toxicol. Sci. 91, 227-36 (2006)
- 12) Warheit, D.B. Webb, T.R. Reed, K.L. Frerichs, S. and Sayes, C.M.:Toxicology. 230, 90-104 (2007)
- 13) Lademann, J. Weigmann, H. Rickmeyer, C.

- Barthelmes, H. Schaefer, H. Mueller, G. and Sterry, W.:*Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 12, 247-56 (1999)
- 14) Pflucker, F. Wendel, V. Hohenberg, H. Gartner, E. Will, T. Pfeiffer, S. Wepf, R. and Gers-Barlag, H.:*Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 14 Suppl. 1, 92-7 (2001)
- 15) Kreilgaard, M.:*Adv Drug Deliv Rev.* 54 Suppl. 1, S77-98 (2002)
- 16) Sera, N. Tokiwa, H. and Miyata, N.:*Carcinogenesis.* 17, 2163-9 (1996)
- 17) Baierl, T. Drosselmeyer, E. Seidel, A. and Hippeli, S.:*Exp Toxicol. Pathol.* 48, 508-11 (1996)
- 18) Sayes, C. Fortner, J. Guo, W. Lyon, D. Boyd, A. Ausman, K. Tao, Y. Sitharaman, B. Wilson, L. Hughes, J. West, J. and Colvin, V.:*Nano Lett.* 4, 1881-1887 (2004)
- 19) Isakovic, A. Markovic, Z. Todorovic-Markovic, B. Nikolic, N. Vranjes-Djuric, S. Mirkovic, M. Dramicanin, M. Harhaji, L. Raicevic, N. Nikolic, Z. and Trajkovic, V.:*Toxicol. Sci.* 91, 173-83 (2006)
- 20) Sayes, C.M. Marchione, A.A. Reed, K.L. and Warheit, D.B.:*Nano Lett.* 7, 2399-406 (2007)
- 21) Moriguchi, T. Yano, K. Hokari, S. and Sonoda, M.:*Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures.* 7, 195 - 209 (1999)
- 22) Moriguchi, T. Yano, K. Hokar, S. and Sonda, M.:*Fullerene Science and Technology.* 7, 195-209 (1999)
- 23) Warheit, D.B. Laurence, B.R. Reed K, L. Roach, D.H. Reynolds, G.A.M. and Webb, T.R.:*Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology.* 77, 117-125 (2004)
- 24) Lam, C.-W. James, J.T. McCluskey, R. and Hunter, R.L.:*Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology.* 77, 126-134 (2004)
- 25) Shvedova, A.A. Kisin, E.R. Mercer, R. Murray, A.R. Johnson, V.J. Potapovich, A.I. Tyurina, Y.Y. Gorelik, O. Arepalli, S. Schwegler-Berry, D. Hubbs, A.F. Antonini, J. Evans, D.E. Ku, B.-K. Ramsey, D. Maynard, A. Kagan, V.E. Castranova, V. and Baron, P.:*American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology.* 289, L698-708 (2005)
- 26) Li, Z. Hulderman, T. Salmen, R. Chapman, R. Leonard, S.S. Young, S.-H. Shvedova, A. Luster, M.I. and Simeonova, P.P.:*Environmental health perspectives.* 115, 377-382 (2007)
- 27) Muller, J. Huaux, F. Moreau, N. Misson, P. Heilier, J.-F. Delos, M. Arras, M. Fonseca, A. Nagy, J.B. and Lison, D.:*Toxicology and applied pharmacology.* 207, 221-231 (2005)
- 28) Nemmar, A. Hoet, P.H.M. Vandervoort, P. Dinsdale, D. Nemery, B. and Hoylaerts, M.F.:*Journal of thrombosis and haemostasis : JTH.* 5, 1217-1226 (2007)
- 29.) Poland, C.A. Duffin, R. Kinloch, I. Maynard, A. Wallace, W.A. Seaton, A. Stone, V. Brown, S. Macnee, W. and Donaldson, K.:*Nat Nanotechnol.* 3, 423-8 (2008)
- 30) Takagi, A. Hirose, A. Nishimura, T. Fukumori, N. Ogata, A. Ohashi, N. Kitajima, S. and Kanno, J.:*J Toxicol. Sci.* 33, 105-16 (2008)
- 31) Sakamoto, Y. Nakae, D. Fukumori, N. Tayama, K. Maekawa, A. Imai, K. Hirose, A. Nishimura, T. Ohashi, N. and Ogata, A.:*J Toxicol. Sci.* 34, 65-76 (2009)
- 32) Davis, J.M.:*IARC Sci Publ.* 33-45 (1989)
- 33) Pott, F.:*Staub, Reinhaltung der Luft.* 38, 486-490 (1978)
- 34) Stanton, M.F. Layard, M. Tegeris, A. Miller, E. May, M. Morgan, E. and Smith, A.:*J Natl Cancer Inst.* 67, 965-75 (1981)
- 35) WHO, ASBESTOS AND OTHER NATURAL MINERAL FIBRES (ENVIRONMENTAL HEALTH CRITERIA 53) (1986).
- 36) Timbrell, V.:*J. Occup. Health Soc. Aust.* 3, 3-12 (1983)
- 37) HSE, An inventory of fibres to classify their potential hazard and risk (2006).
- 38) Bernstein, D.M. Rogers, R. and Smith, P.:*Inhal. Toxicol.* 15, 1247-74 (2003)
- 39) WHO, Consensus report of 'IARC Scientific publication No.140' (1999).
- 40) Bignon, J. Saracci, R. and Touray, J.C.:*Environ Health Perspect.* 102 Suppl. 5, 3-5 (1994)
- 41) Hesterberg, T.W. Chase, G. Axten, C. Miller, W.C. Musselman, R.P. Kamstrup, O. Hadley, J. Morscheidt, C. Bernstein, D.M. and Thevenaz, P.:*Toxicol. Appl. Pharmacol.* 151, 262-75 (1998)
- 42) Bernstein, D.M. Riego Sintes, J.M. Ersboell, B.K. and Kunert, J.:*Inhal. Toxicol.* 13, 823-49 (2001)
- 43) EC:Official Journal of the European Communities, (1997)
- 44) Donaldson, K. and Tran, C.L.:*Mutat Res.* 553, 5-9 (2004)

- 45) Marsella, J.M. Liu, B.L. Vaslet, C.A. and Kane, A.B.:*Environ. Health Perspect.* 105 Suppl 5, 1069-72 (1997)
- 46) Vaslet, C.A. Messier, N.J. and Kane, A.B.:*Toxicol. Sci.* 68, 331-8 (2002)
- 47) ECB, METHODS FOR THE DETERMINATION OF THE HAZARDOUS PROPERTIES FOR HUMAN HEALTH OF MAN MADE MINERAL FIBRES (MMMF) (1999).
- 48) Roller, M. Pott, F. Kamino, K. Althoff, G.H. and Bellmann, B.:*Environ. Health Perspect.* 105 Suppl. 5, 1253-6 (1997)
- 49) Kane, A.B. and Hurt, R.H.:*Nat. Nanotechnol.* 3, 378-9 (2008)