

第2章 ナノマテリアルの安全性等に関する文献調査

前年度、前々年度に引き続き、ナノマテリアルの安全性等に関する文献調査を実施し、抽出した 77 報について内容解析を行なった。被検試料として酸化チタン、多層カーボンナノチューブ、鉄ナノ粒子およびシリカ微粒子の採用が多く、報告内容については in vivo の試験結果報告例が前年度からの傾向を維持して増加していることが明らかとなった。また、生体に対する毒性情報に加えて、種々の形態観察結果や ADME 等の情報を提示する報告例が増加しており、ナノマテリアルの安全性に関する研究が環境・衛生・安全 (EHS) 研究推進にシフトしつつあることを強く示唆する結果となった。

2.1 調査の目的、範囲、対象および方法

ナノマテリアルの安全性および有害性等に関する原著文献 (文献レビュー等は除く) を、データベース検索により調査した。なお業務の継続性を考慮して、昨年度実施された当該調査の手法を踏襲した方法を採用した。

文献は、商用データベース JDream II の JSTPlus 及び JMEDPlus ファイル、商用データベース STN の TOXICENTER 及び MedLine を用いて検索した。検索対象は、昨年度の調査以降 2008 年 11 月から 2009 年 10 月末日までに、各データベースに情報が収載された論文とした。

検索式は、JDream II、STN の TOXICENTER、MedLine について、キーワード概念に相当する各データベースの辞書に登録されているキーワードを使用した。それぞれのデータベースで使用したナノマテリアルに関するキーワード (L1)、毒性試験に関するキーワード (L2)、ADME に関するキーワード (L3) の検索式について、表 2.1 にまとめた。検索式は、「(L1 and L2) or (L1 and L3)」として、設定したキーワードが抄録に含まれる原著文献を検索した。

データベース毎の重複を排除し、JSTPlus : 1761 件、JMEDPlus : 133 件および STN : 3392 件の結果が得られた。得られた文献の抄録を解析し、本調査において重要と判断した論文 77 報を抽出した。

表 2.1 検索データベース別キーワード検索式

データベース	キーワード種	検索式
JDream II	L1	ナノマテリアル+ナノ粒子+ナノ材料+超微粒子+ナノ複合材料+ナノ構造+量子ドット+フラーレン+ナノチューブ+カーボンブラック+デンドリマ+ナノクレイ+(銀+シルバー+酸化チタン+二酸化チタン+2 酸化チタン+酸化アルミニウム+酸化セリウム+酸化亜鉛+二酸化けい素+ポリスチレン)*(ナノ+微粒子+"nm")
	L2	毒性評価+毒性+リスク+安全評価+健康被害+ハザード+安全性+発癌物質+変異誘発+変異誘発物質+最大無作用量+最小影響量+活性酸素+酸化ストレス+異物反応+異物肉芽+マクロファージ+炎症+体内負荷量+生体内蓄積+残留性
	L3	(ADME+生体内分布+代謝+排泄+投与経路+吸入+気管+経口投与+経皮投与+皮下投与+皮膚+心臓+血管+神経系+肺+生殖+沈着+生体内蓄積+残留性)#(DDS/TI+遺伝子デリバリ/TI+ドラッグデリバリ/TI)
STN (TOXICENTER)	L1	nanomaterial OR Nanostructures+NT/CT OR Fullerenes OR Carbon (1W) tube OR carbon black OR dendrimer OR nanoclay OR (Silver OR 7440-22-4 OR Ag OR iron OR Fe OR 7439-89-6 OR titanium dioxide OR TiO2 OR 13463-67-7 OR 7440-32-6 OR Al2O3 OR aluminium oxide OR 11092-32-3 OR 1344-28-1 OR Ce2O3 OR CeO2 OR cerium oxide OR 1306-38-3 OR ZnO OR zinc oxide OR 1314-13-2 OR SiO2 OR silicon dioxide OR 7631-86-9 OR polystyrene) AND (nm OR nano OR nanosize OR nano size OR nanoscale)
	L2	toxicity tests+NT/CT OR Toxicology OR toxicity OR toxic OR adverse event OR adverse effect OR risk+NT/CT OR assessment OR Hazard OR safety OR carcinogen##### OR mutagens OR DNA damage OR cytotoxicity OR Reactive Oxygen Species OR oxidative stress OR Macrophage OR inflammation OR granulocyte OR Body Burden OR bioaccumulat### OR accumulat###
	L3	(pharmacokinetics OR Drug Administration Routes+NT/CT OR Inhalation Exposure OR intratracheal OR aspiration OR oral OR gavage OR Nutritional Support+NT/CT OR Cutaneous Administration/MeHS OR skin OR cardiovascular OR nervous OR neurological OR lung OR pulmonary OR reproductive OR deposition OR permeation OR bioaccumulat### OR accumulat###) NOT (Gene Delivery/TI OR drug delivery/TI OR DDS/TI)

表 2.1 検索データベース別キーワード検索式 (続き)

データベース	キーワード種	検索式
STN (MedLine)	L1	nanomaterial OR Nanocomposites OR Nanostructures+NT/CT OR quantum dot OR Fullerenes OR nanotubes OR Carbon (1W) tube OR carbon black OR dendrimer OR nanoclay OR (Silver OR 7440-22-4/RN OR Ag OR iron OR Fe OR 7439-89-6/RN OR titanium dioxide OR TiO2 OR 13463-67-7/RN OR 7440-32-6/RN OR Al2O3 OR aluminium oxide OR 11092-32-3/RN OR 1344-28-1/RN OR Ce2O3 OR CeO2 OR cerium oxide OR 1306-38-3/RN OR ZnO OR zinc oxide OR 1314-13-2/RN OR SiO2 OR silicon dioxide OR 7631-86-9/RN OR polystyrene) AND (nm OR nano OR nanosize OR nano size OR nanoscale)
	L2	Toxicology OR toxicity OR toxic OR adverse event OR adverse (1W) effect OR risk OR assessment OR Hazard OR safety OR carcinogenicity OR mutagenicity OR genotoxicity OR cytotoxicity OR Reactive Oxygen Species OR Macrophage OR inflammation OR granulocyte Polymorphonuclear leukocyte OR Body Burden OR bioaccumulat### OR accumulat###
	L3	(ADME OR pharmacokinetics OR Inhalation OR intratracheal OR aspiration OR oral OR gavage OR drug delivery system (L) intragastric/AB OR dermal OR subcutaneous OR cutaneous OR skin OR cardiovascular OR nervous OR neurological OR lung OR pulmonary OR reproductive OR bioaccumulat#### OR accumulat####) NOT (Gene Delivery/TI OR drug delivery/TI OR DDS/TI)

2.2 文献解析結果

ナノマテリアルの安全性を議論するに当たって、試験に供された試料の由来、サイズ、グレードおよびその調製方法に関する情報は重要なファクターである。また、各文献に記載されている種々の試験がいずれの **endpoint** に該当するかを明確にすることも安全性評価の精度および継続性を確保する上で重要である。

以上の観点から、前項記載の方法で抽出した 77 報の文献について解析した。解析結果の整理に当たって、試験目的、実験方法、対象 **endpoint**、被検試料、**in vitro** (条件、細胞種)、**in vivo** (条件、投与経路) および結果を大項目とした。

また、対象となるナノマテリアルごとに結果をまとめ、その中で報告内容に即して「**in vitro**」から「**in vivo**」となるよう配列した。

各文献内容の詳細については、「2.4 文献書誌情報」から原典を参照されたい。

解析結果報告に使用した略号・略記を表 2.2 にまとめた。

表 2.2 略号・略記一覧

略号	正式名称	日本語名称
ABB	Air-blood barrier	空気血液関門
ACP	Acid phosphatase	酸性フォスファターゼ
ALT	Alanine aminotransferase	アラニンアミノ基転移酵素
ANA	anti-Nuclear antibodies	抗核抗体
ANCA	anti-Neutrophil cytoplasmic antibody	抗好中球細胞質抗体
AO/EO assay	Acridine orange/ ethidium bromide assay	アクリジンオレンジ/エチジウムブロマイドアッセイ
APS	Aerodynamic particle sizer	エアロダイナミック・パーティクル・サイザー
AST	Aspartate aminotransferase	アスパラギン酸アミノ基転移酵素
BAL	Bronchoalveolar lavage	気管支肺胞洗浄
BALF	Bronchoalveolar lavage fluid	気管支肺胞洗浄液
BEGM	Bronchial epithelium growth media	気管支上皮細胞用増殖培地
BET	Brunauer, Emmett and Teller	吸着等温式
BUN	Blood urea nitrogen	尿素窒素
C-ANCA	Cytoplasmic anti-neutrophil antibody	抗好中球細胞質抗体
CBMN assay	Cytokinesis blocked micronucleus assay	細胞質分裂阻害小核アッセイ
CFU	Colony Forming unit	コロニー形成細胞
CFU-Eo	Colony Forming unit-eosinophil	好酸球系前駆細胞
CFU-G	Colony-forming unit granulocyte	顆粒球系前駆細胞
CFU-GM	Colony forming unit-granulocyte, macrophage	顆粒球・マクロファージ系前駆細胞
CFU-M	Colony-forming unit macrophage	マクロファージ系前駆細胞
cNOS	Constitutive nitric oxide synthase	構成型一酸化窒素合成酵素
Cryo-TEM	Cryo-Transmission Electron Microscopy	クライオ透過型電子顕微鏡
CVD	Chemical vaporization deposition	化学気相蒸着
DEP	Diesel exhaust particle	ディーゼル排気粒子
DLS	Dynamic light scattering	動的光散乱
DSC	Differential scanning calorimetry	示差走査熱量測定
EC50	Half maximal (50%) effective concentration	遊泳阻害半数影響濃度
ED	Embryonic day	懐胎
EDS	Energy dispersive X-ray spectrometer	エネルギー分散形 X 線分光器
EDX	Energy-dispersive X-ray spectroscopy	エネルギー分散型 X 線分析
EELS	Electron energy-loss spectroscopy	電子エネルギー損失分光法
ESCA	Electron Spectroscopy for Chemical Analysis	X 線光電子分析装置
ESR	Electron Spin Resonance	電子スピン共鳴
ETAAS	Electro thermal atomic absorption spectroscopy	電熱原子吸光分光法
Ex/Em	Excitation/emission wavelengths	励起/蛍光波長
FE-SEM	Field emission scanning electron microscopy	電界放射型走査電子顕微鏡
FIB system	Focused ion beam system	集束イオンビーム装置
FPG	Formamidopyrimidine-DNA glycosylase	ホルムアミドピリミジン DNA グリコシラーゼ

表 2.2 略号・略記一覧 (続き)

略号	正式名称	日本語名称
FSP	Flame spray pyrolysis	噴霧火炎法
FTIR	Fourier Transform Infrared spectroscopy	フーリエ変換型赤外分光
GFAAS	Electro thermal atomic absorption spectroscopy	黒鉛炉原子吸光法
GO	Gene Ontology	遺伝子オントロジー
GSD	Geometric standard deviation	幾何標準偏差
GST	Glutathione S-transferase	グルタチオン S-トランスフェラーゼ
HiPco	the high pressure CO disproportionation process	HiPco 法
HO-1	Heme oxygenase-1	ヘムオキシゲナーゼ-1
HRSEM	High Resolution Scanning Electron Microscope	高分解能走査電子顕微鏡
HRTEM	High-resolution transmission electron microscopy	高分解能透過電子顕微鏡
HSP70	Heat shock protein 70	熱ショックタンパク質 70
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells	ヒト臍帯静脈内皮細胞
ICP-AES	Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry	誘導結合プラズマ発光分光
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer	誘導結合プラズマ質量分析装置
ICP-OES	Inductively coupled plasma-optical emission spectroscopy	誘導結合プラズマ発光分光
JNK	Jun N-terminal kinase	Jun N 末端キナーゼ
LAL	the Limulus ameocyte lysate	カブトガニ血球抽出液
LDH	Lactate dehydrogenase value	乳酸脱水素酵素値
LGS	Leaky gut Syndrome	リーキーガットシンドローム
LSM	Laser Scanning Microscopy	走査型レーザー顕微鏡
MI	Mitotic index	分裂指数
MMAD	Mass median aerodynamic diameter	空気動学的粒径
MN-PCE	Micronucleated polychromatic erythrocyte	小核を有する多染性赤血球
MPO	Myeloperoxidase	ミエロペルオキシダーゼ
mTOR	Mammalian target of rapamycin	哺乳類のラパマイシン標的タンパク質
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level	無有害性影響量
Nrf-2	NF-E2-related factor 2	NF-E2 関連因子 2
NRU assay	Neutral red uptake assay	ニュートラルレッドアッセイ
PALS	Phase analysis light scattering	PALS 分析(PALS 法)
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell	ヒト末梢血単核細胞
PCE	Polychromatic erythrocyte	多染性赤血球
PCS	Photon correlation spectroscopy	光子相関分光法
PDI	Polydispersity index	多分散度
PMA	Phorbol myristate acetate	ホルボルミリスタートアセテート
PMNs	Polymorphonuclear cell	多核白血球
poly-APS	polymeric Alkylpyridinium salts	ポリマー性 3-アルキルピリジニウム塩
RES	Reticuloendothelial system	細網内皮系
ROS	reactive oxygen species	活性酸素種
RT-PCR	Reverse transcription-polymerase chain reaction	逆転写ポリメラーゼ連鎖反応
sc-CO2	Supercritical CO2	超臨界二酸化炭素

表 2.2 略号・略記一覧 (続き)

略号	正式名称	日本語名称
SEM	Scanning electron microscopy	走査型電子顕微鏡
SFRD	Supercritical fluid reactive deposition	超臨界流体反応性蒸着
siRNA	small interfering RNA	低分子干渉 RNA
SPION	Super Paramagnetic Iron-Oxide	超常磁性酸化鉄ナノ粒子
SPME	Solid Phase Micro Extraction	固相マイクロ抽出
STEM	Scanning transmission electron microscopy	走査透過電子顕微鏡
TBARS	Thiobarbituric Acid Reactive Substances	チオバルビツール酸反応物質
TEER (TER)	Transepithelial electrical resistance	膜抵抗値
TEM	Transmission Electron Microscopy	透過型電子顕微鏡
TGA	Thermogravimetric analysis	熱重量測定
VSM	Vibrating Sample Magnetometer	試料振動形磁力計
XDC	X-ray Disc Centrifugation	ディスク高速遠心沈降法(X線透過型)
XRD	X-ray diffraction	X線回折

2.2.1 フラーレン

文献 No.	47	
書誌情報	S. Kato et al., Basic Clin. Pharm. Toxicol., 104(6), 483, 2009.	
試験目的	細胞毒性評価、皮膚毒性評価、遺伝毒性評価	
実験方法	復帰突然変異試験、光細胞毒性試験、皮膚生検による毒性評価。復帰突然変異試験：ネズミチフス菌、大腸菌を使用。LF-SQ 濃度：0～5000µg/plate の 6 濃度。S9 mix 存在下および非存在下で 48hrs 培養後、生育状態を観察してコロニー計数。光細胞毒性試験：マウス線維芽細胞を用いた。LF-SQ の濃度は 0～1000µg/mL の 13 濃度。UV 照射時間は 50 分。NR の細胞内取り込みを指標に細胞生存率を算出し、IC ₅₀ から細胞傷害を計測。UV 照射時と未照射時の PIF (photo-irradiation factor) を算出し、光毒性の有無を判定した。皮膚生検：白人女性 3 人から皮膚を採取。Bronaugh's diffusion chamber を用いて 3hrs 培養後、LF-SQ を 24hrs 暴露。LF-SQ 濃度：2.23、22.3、223 ppm の 3 濃度 x 各 17.7µl 投与。表皮と真皮に分別し、HPLC を行った。	
対象 endpoint	in vitro 急性毒性、皮膚刺激性、生殖細胞変異原性	
被検試料	物質名	1. フラーレン (LF-SQ) 2. フラーレン (Buckmister fullerene : 皮膚生検の HPLC コントロール)
	詳細	1. Vitamin C60 BioResearch 社、highly purified and organic solvent-free fullerenes を、下記の方法で調製。 2. Sigma-Aldrich 社の Buckmister fullerene、純度：99.5%
	調製方法	1. オリーブオイル由来のスクワランに懸濁し、C ₆₀ を 220-500 ppm 含む Lipo Fullerene (LF-SQ) とした。10 分超音波処理を行い、0.1µm 孔のフィルターを過後、実験方法記載の投与濃度に調製した。
	暴露前観察方法	HPLC
In vitro	条件等	1. Salmonella typhimurium (strains TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537)
		2. Escherichia coli (WP2uvrA (pKM101))
		3. mouse fibroblast cell (Balb/3T3)
		4. three Caucasoid women
細胞種	1. ネズミチフス菌、histidine-demanding strains	
	2. 大腸菌、tryptophan-demanding strain	
	3. マウス繊維芽細胞	
	4. ヒト皮膚	
In vivo	条件等	—
	投与経路	—
結果	光細胞毒性試験：UV 照射時と未照射時の生存率に有意差はみられず、IC ₅₀ の算出は不可能だった。 復帰突然変異試験：LF-SQ の影響による成長阻害はみられなかった。S9 mix 添加の有無による差も認められなかった。 皮膚生検：最高用量群の表皮のみで C ₆₀ が検出された。	

文献 No.	15	
書誌情報	P. Spohner et al., Environ. Pollut., 157, 1134, 2009.	
試験目的	細胞毒性評価、環境毒性評価	
実験方法	<p>MTT assay、oxidative stress assay についてはヒト肺上皮培養細胞を、OECD 202 についてはオオミジンコを用いて毒性を評価した。MTT assay : total DNA を Hoechst 33258 にて定量後、MTT assay を行った。nC₆₀-THF 懸濁液および nC₆₀-H₂O 懸濁液の濃度は、0~60 mg/mL の 6 濃度。wash1~3 の濃度は、0~75% of total volume の 6 濃度。暴露 6 日目の細胞生存率を測定。</p> <p>oxidative stress assay: Voelkel ら (2003) の方法に従い ROS 産生量を測定。OECD 202 : 1 グループ 10 匹。nC₆₀-THF 懸濁液および nC₆₀-H₂O 懸濁液の濃度は、6、12、24µg/mL。0、18、24、48hrs 後に EC₅₀ を算定。</p>	
対象 endpoint	in vitro 急性毒性、急性毒性	
被検試料	物質名	C ₆₀ (フラーレン)
	詳細	Sigma-Aldrich 社、純度 : >98%、
	調製方法	nC ₆₀ -THF 懸濁液: Deguchi ら (2001) の方法に従い、C ₆₀ を THF に懸濁。MilliQ 水で 3 回洗浄し、wash1、wash2、wash3 の 3 種類を調製。nC ₆₀ -H ₂ O 懸濁液: Cheng ら (2004)、Brant ら (2005) の方法に従い、C ₆₀ を MilliQ 水に懸濁し、上清を使用。
	暴露前観察方法	UV-VIS、SEM、PCS、SPME、ゼータ電位粒子測定
In vitro	条件等	human lung epithelial cell line A549 (CCL-185)
	細胞種	ヒト肺上皮
In vivo	条件等	<i>Daphnia magna</i> (オオミジンコ)、生後 24hrs 以内
	投与経路	培養液
結果	<p>nC₆₀-H₂O 懸濁液中の nC₆₀凝集は、nC₆₀-THF 懸濁液中の nC₆₀凝集に比べて大きく、448.2 ± 33.1 nm であった。濃度 25%以上の wash1、wash2 を用いた total DNA 量および MTT assay による細胞生存率は、いずれも 0% であった。他の試験結果は、いずれも陰性であり、有意差はみられなかった。環境毒性試験 (オオミジンコ遊泳阻害試験) では、nC₆₀-THF 懸濁液による毒性はみられず、また、高濃度 THF を添加した追加試験でも、細胞生存率に差はみられなかった。</p>	

文献 No.	31	
書誌情報	J. K. Folkmann et al., Environ. Health Perspect., 117(5), 2009.	
試験目的	発がん性評価、細胞毒性評価	
実験方法	単回強制経口投与。各被検試料懸濁液の濃度：0.064、0.64 mg/kg b.w. in 200µl。84 匹。24hrs 後に計画屠殺。肝臓、肺、大腸組織を摘出。以下の測定により酸化ストレスによる DNA 損傷レベルを評価した。1) 8-oxodG 測定、2) 8-oxodG によって誘導される OGG1、NEIL1、MUTYH、NUDT1、HO1 の mRNA 発現による、DNA 修復制御の変化を測定。	
対象 endpoint	急性毒性、生殖細胞変異原性、発がん性、特定標的臓器毒性	
被検試料	物質名	1. フラーレン 2. 単層カーボンナノチューブ (SWCNT)
	詳細	1. Sigma-Aldrich 社、大きさ：0.7 nm、純度：99.9% 2. Thomas Swan 社、大きさ：0.9-1.7 nm、長さ：<1µm、触媒残渣：2% iron、cobalt、nickel、maganese
	調製方法	各被検試料を生理食塩水もしくは Sigma-Aldrich 社製コーンオイルに懸濁し超音波処理を行った後、実験方法の項に記述されている投与濃度に調製した。
	暴露前観察方法	動的光散乱法
In vitro	条件等	—
	細胞種	—
In vivo	条件等	ラット (Fisher 344、雌、9 週齢)
	投与経路	oral gavage (intragastric)
結果	SWCNT では、肝臓、肺において 8-oxodG レベルは有意に上昇した。フラレンでは、肝臓においては、いずれの濃度でも 8-oxodG レベルは有意に上昇していたが、肺においては高用量群のみで 8-oxodG レベルの有意な上昇が認められた。mRNA 発現レベルは、懸濁液の差異による影響を受けなかった。OGG1 発現上昇は、フラレン高用量群の肝臓においてのみ有意であった。フラレンの肝臓における OGG1 mRNA 発現上昇と、肺における 8-oxodG レベルの上昇については、明確に用量依存性であった。	

文献 No.	43	
書誌情報	H. Aoshima et al., J. Toxicolo. Sci., 34(5,) 555, 2009.	
試験目的	皮膚毒性評価、眼毒性評価	
実験方法	皮膚一次刺激性、連続皮膚刺激性、眼刺激性についてはウサギを、皮膚感作性、皮膚光感作性、接触光毒性についてはモルモットを用いた。ヒトに対する皮膚刺激性試験として、パッチテストを行った。全ての試験は GLP 準拠で行った。皮膚一次刺激性試験：Draize 試験、3 匹、HPFs 0.5 g in 0.3 ml PG。連続皮膚刺激性試験：Draize 試験、5 匹、HPFs 20 mg in 0.2 ml PG を 2 回暴露。眼刺激性：Kay and Calendra ら (1962) の方法に従った。6 匹、HPFs 0.1 g。皮膚感作性試験：厚生省薬務局医薬品毒性試験法ガイドライン (1989) に従った。30 匹、HPFs 50 mg。皮膚光感作性試験：厚生省薬務局医薬品毒性試験法ガイドライン (1989) に従った。20 匹、HPFs 50 mg。接触光毒性試験：Morikawa ら (1974) の方法に従った。10 匹、HPFs 7.5mg。パッチテスト：Finn Chamber を用いて行った。成人ヒト男性 (21 人)、女性 (24 人)。HPFs 0.01 g。	
対象 endpoint	急性毒性、皮膚刺激性、眼刺激性、皮膚感作性	
被検試料	物質名	フラーレン
	詳細	Vitamin C60 BioResearch 社の highly purified fullerenes (HPFs)、C ₆₀ と C ₇₀ の混合物、fullerite、sublimed technical grade、純度：99.5%
	調製方法	各試験に対して、実験方法の項に記述されている投与濃度に調製した。
	暴露前観察方法	—
In vitro	条件等	—
	細胞種	—
In vivo	条件等	1. ウサギ (Kbl:JW、雄、11 週齢)
		2. モルモット (Hartley guinea pigs、雄、6 週齢)
		3. ヒト男性 (21 人)、女性 (24 人)、22-56 歳。
	投与経路	1. dermal、ocular
		2. dermal
		3. dermal
結果	実験動物を用いた試験では、HPFs は眼刺激性以外の全ての試験で陰性であった。ヒトに対するパッチテストでも HPFs は陰性であり、皮膚反応はみられなかった。眼刺激性試験では、HPFs 暴露 1hr 後および 24hrs 後の、眼を洗浄しなかったウサギ全てに、結膜発赤、角膜上皮欠損の症状が認められた。しかし、48hrs 後ではいずれの症状も認められなかった。	

文献 No.	48	
書誌情報	M. Naota et al., Toxicol. Pathol., .37, 456., 2009.	
試験目的	肺毒性評価、細胞毒性評価	
実験方法	フラーレン粒子を、カニューレにより単回強制気管内投与。投与時間は3分。0、5分、1hr、6hrs、24hrs、7日後に計画屠殺。1グループ3匹、6グループ。コントロールは、計画屠殺時間毎に各1匹配分。フラーレン粒子の用量設定は下記の通り。0、5min後計画屠殺した群：625 μ g/0.05 ml。1hr、6hrs、24hrs、7日後に計画屠殺した群：1000 μ g/0.05 ml。TEMによる組織学的解析を行い、毒性を評価した。	
対象 endpoint	急性毒性、発がん性、特定標的臓器毒性	
被検試料	物質名	フラーレン
	詳細	Material Technologies Research社、直径：0.68 nm
	調製方法	PBS に懸濁し、オートクレーブで滅菌処理を行った。それぞれ実験方法の項に記述されている投与濃度に調製した後、投与直前に超音波処理、vortex を行った。
	暴露前観察方法	—
In vitro	条件等	—
	細胞種	—
In vivo	条件等	マウス (ICR、雌、10 週齢もしくは 11 週齢、平均体重 29-34 g)
	投与経路	intratracheal instillation
結果	TEM 解析の結果、I 型肺胞上皮細胞内と血管内皮細胞内に、多様な大きさの小空胞 (カベオラ) があり、その数が増加していることが認められた。このカベオラ内には、様々な大きさのフラーレン粒子の凝集が認められた。さらに、様々な大きさの粒子が、空気血液関門 (ABB) 構造の至るところに存在することを確認した。肺胞腔内表面に接着している活性化した肥大マクロファージの増加がみられたが、他の炎症兆候はみられなかった。組織損傷および病理組織学的変化は、いずれの検体においても認められなかった。	

文献 No.	58	
書誌情報	J. Valant et al., J. Hazard. Mater., 171, 160, 2009.	
試験目的	細胞毒性評価	
実験方法	AO/EB assay の in vivo での応用と、ナノ粒子の細胞膜不安定化への関与を考察するために、AO/EB assay を以下の条件で行った。1 グループ 6 匹。ナノ粒子を含む AO/EB 混合染色液を、それぞれ体重の 1/10 量 (約 3µl)、3 回直接経口投与。ナノ粒子の投与濃度は各 1000µg/mL。最終投与 10 分後に解剖、肝臓を摘出。色と形状を記録し、蛍光顕微鏡下で生体内消化系における色素分布を測定した。同試験系のポジティブコントロールとしては、細胞膜の浸透性上昇に関与することが知られている Cu ²⁺ 、サポニン、poly-APS を用いた。染色液の液量、投与量等の詳細はナノ粒子と同様。Cu ²⁺ は Cu(NO ₃) ₂ として投与、投与濃度は 1~1000µg/mL の 4 濃度。サポニンの投与濃度：0.0005、50、200 mg/mL。poly-APS の投与濃度：0.022、1.1、2.2 mg/mL。	
対象 endpoint	急性毒性	
被検試料	物質名	1. C ₆₀ (フラーレン)
		2. 酸化チタン (TiO ₂)
		3. 酸化亜鉛 (ZnO)
		4. バルク酸化亜鉛 (bulk ZnO)
	詳細	1. Sigma-Aldrich 社
		2. Sigma-Aldrich 社、大きさ：<25nm、形状：powder、anatase crystalline structure、純度：99.7%、surface area：200-220m ² /g
		3. Sigma-Aldrich 社
4. Sigma-Aldrich 社		
調製方法	1. 30 分超音波処理を行った後、滅菌水に懸濁。凝集を観察。 2-3. 培養液、もしくは滅菌水に懸濁して凝集を観察。ナノ粒子超音波処理の有無により、それぞれ以下の 2 種類の試料を調製した。 TiO ₂ N：培養液に懸濁、未処理、TiO ₂ S：培養液に懸濁、30 分超音波処理 ZnON：培養液に懸濁、未処理、ZnOS：培養液に懸濁、30 分超音波処理	
暴露前観察方法	TEM、動的光散乱法、BET analysis、原子吸光分析法	
In vitro	条件等	—
	細胞種	—
In vivo	条件等	adult <i>Porcellio scaber</i> (ワラジムシ)、体重：>30 mg
	投与経路	oral (directly)
結果	本試験に用いた、bulk ZnO 以外の全てのナノ粒子は、細胞膜の不安定化に関与していた。超音波処理済の被検試料投与群では、細胞膜の透過性はいずれも有意に上昇しており、C ₆₀ 投与群で最も顕著であった。	

2.2.2 単層カーボンナノチューブ

文献 No.	14	
書誌情報	B. J. Panessa-Warren et al., Environ. Pollut., 157, 1140, 2009.	
試験目的	細胞毒性評価	
実験方法	被検試料として、未処理、酸処理済、H ₂ SO ₄ /H ₂ O ₂ 処理済、～7 年水性時効処理済の SWCNT を作成し、物理化学的特性測定を実施。これを、Panessa-Warren ら (2006, 2008) の方法に従いヒト上皮細胞単層に暴露。暴露濃度は、10、100 mg/L in 2μl。細胞生存率分析(生体染色)、ナノ粒子の結合/局在の超微形態学的解析 (TEM、FESEM) を行った。	
対象 endpoint	in vitro 急性毒性	
被検試料	物質名	1. SWCNT (‘As-prepared’ Carbolex)
		2. SWCNT (Air-oxidized Carbolex)
		3. SWCNT (Acid/peroxide treated Carbolex Newly prepared in fresh water)、Acid/peroxide : H ₂ SO ₄ /H ₂ O ₂
		4. SWCNT (Aged in fresh water 7yr)
	詳細	1. Lexington 社 Carbolex、直径：1.4-1.5 nm、長さ：0.4-1μm、純度：70-90%、触媒残渣：Ni 23.2 ± 3.0%、Y 4.8 ± 1.5%、凝集体：なし
		2. Lexington 社 Carbolex を、Colomer ら (1999)、Perk ら (2006) の方法で酸処理し。直径：2.1-2.3 nm、長さ：0.18-0.4μm、純度：70-90%、触媒残渣：Ni 5.9 ± 1.4%、Y 0.9 ± 0.6%、凝集体：なし
3. Lexington 社 Carbolex を、Liu ら (1998)、Panessa-Warren ら (2008) の方法で処理。直径：1.4 nm、長さ：0.0132-0.0338μm、触媒残渣：Ni 0%、Y 0%、凝集体：disrupted, easily、20-300 nm		
4. Lexington 社 Carbolex を、Liu ら (1998)、Panessa-Warren ら (2008) の方法で処理し、～7 年水性時効処理。触媒残渣：Ni 0%、Y 0%、凝集体：aggregates、300-500 nm		
調製方法	各被検試料を MilliQ 水もしくは PBS に懸濁し、それぞれ vortex、超音波処理を行った後、実験方法の項に記述されている投与濃度に調製した。	
暴露前観察方法	TEM、FESEM、UV-VIS、X 線微量分析、FTIR	
In vitro	条件等	human lung epithelial cell monolayers (NCI-H292)
	細胞種	ヒト肺
In vivo	条件等	—
	投与経路	—
結果	未処理 SWCNT は、各処理済 SWCNT に比べて、金属触媒残渣を多く含んでいるが、FTIR ではナノ粒子格子表面の酸化はみられなかった。また、ヒト上皮細胞単層に対する細胞毒性は、各処理済 SWCNT より低かった。金属触媒残渣除去の程度は、酸処理済、H ₂ SO ₄ /H ₂ O ₂ 処理済被検試料では異なるが、細胞毒性の差はみられなかった。格子表面の酸化程度の上昇と、細胞毒性上昇には相関がみられた。淡水水性時効処理済 SWCNT による、細胞膜損傷の低下および細胞生存率の上昇はみられなかった。しかし、生理食塩水水性時効処理済 SWCNT では、細胞膜損傷の低下および細胞生存率の上昇が認められた。	

文献 No.	34	
書誌情報	A. E. Porter et al., ACS Nano, 3(6), 1485, 2009.	
試験目的	細胞毒性評価	
実験方法	Porter ら (2006) の方法に従った。精製および未精製 SWCNT の濃度は 0 ~10µg/ml の 7 濃度。無血清培地で培養。4 日暴露。ヒト単球由来マクロファージ (HMMs) を用いて neutral red assay (NR assay)、MTT assay、ラマン分光法、TEM を行った。	
対象 endpoint	in vitro 急性毒性	
被検試料	物質名	1. 購入未精製 SWCNT (unpurified SWCNT) 2. 水溶性の精製 SWCNT
	詳細	1. Carbon Nanotechnologies 社より、chemical vaporization deposition (CVD) method によって合成された SWCNT を購入。purified HiPco、15 wt % ash content、直径 : 0.9-1.2nm
	調製方法	1. 超音波処理済テトラヒドロフランに懸濁。10 分超音波処理を行った後、直ちに培養液にて希釈し、Figure SE1 に記述されている投与濃度に調製した。 2. 論文中に記載された方法で熱処理、酸処理を行うことにより、不純物を除去。水溶性の精製 SWCNT を調製した。これを 1g/L の濃度で滅菌水に懸濁し、10 分超音波処理を行った後、培養液にて希釈し、実験方法の項に記述されている投与濃度に調製した。
	暴露前観察方法	high-resolution (HR) TEM、EELS
In vitro	条件等	human monocyte derived macrophage cells (HMMs)
	細胞種	ヒト肺由来単球マクロファージ
In vivo	条件等	—
	投与経路	—
結果	精製 SWCNT 処理群においては、NR assay では生存率に有意差はみられなかった。しかし、MTT assay では、処理群と非処理群との間に有意差が認められた。未精製 SWCNT 処理群においては、NR assay、MTT assay のいずれも、処理群と非処理群との間に生存率の差が認められた。ラマン分光法により、精製 SWCNT は酸処理されているため、未精製 SWCNT よりも多くの官能基を、carbon wall 上に持つことが確認された。また、TEM により、精製 SWCNT 処理群では、未精製 SWCNT 処理群に比べ、細胞内凝集が少なかったことが確認された。	

文献 No.	67	
書誌情報	H. Yang et al., J. Appl. Toxicol., 29, 69, 2009.	
試験目的	細胞毒性評価、遺伝毒性評価	
実験方法	被検試料濃度 0-100µg/mL。24hrs 暴露。初代マウス胚線維芽細胞を用いて細胞生存率の測定 (MTT assay、WST assay、LDH 活性測定)、ROS 産生量測定、oxidative stress assay (GSH、SOD、MDA 測定)、comet assay による in vitro 遺伝毒性試験を行った。	
対象 endpoint	in vitro 急性毒性、生殖細胞変異原性	
被検試料	物質名	1. カーボンブラック (CB) 2.カーボンナノチューブ (CNTs) 3. 二酸化ケイ素 (SiO ₂) 4. 酸化亜鉛 (ZnO)
	詳細	1. Nano-Innovation 社、大きさ : 12.3 ± 4.1 nm、形状 : Sphere、純度 : >99.4% 2. COCC, Chinese Academy of Science、直径 : 8 nm、長さ : <5µm、形状 : Rope-Shaped、純度 : >99.9% 3. Runhe 社、大きさ : 20.2 ± 6.4 nm、形状 : Crystal structure、純度 : >99.0% 4. Nanuo 社、大きさ : 19.6 ± 5.8 nm、形状 : Crystal structure、純度 : >99.9%
	調製方法	各被検試料を 4 hrs、180 °C で加熱。FBS に懸濁。Lam ら (2004)、Leong ら (1998) の方法に従い調製。培養液にて希釈した。
	暴露前観察方法	TEM、ラマン分光法
In vitro	条件等	primary mouse embryo fibroblast cells (BALB/3T3)
	細胞種	初代マウス胚線維芽細胞
In vivo	条件等	—
	投与経路	—
結果	MTT assay、WST assay では、生存率の低下は用量依存的に有意であった。特に ZnO 処理群においては、他の被検試料処理群と比べて、非常に高い細胞毒性が認められ、oxidative stress assay についても、活性酸素の発生が有意に認められた。CNTs 処理群の細胞毒性は、ZnO 処理群に比べ中程度であった。しかし、comet assay では、他の被検試料処理群と比べて、DNA 損傷の度合いは有意に大きかった。	

文献 No.	56	
書誌情報	A.R. Murray et al., Toxicology, 257, 161, 2009.	
試験目的	皮膚毒性評価、細胞毒性評価	
実験方法	<p>in vitro : マウス上皮細胞を用いて、部分精製 SWCNT、未精製 SWCNT、コントロール (PBS)の各データを比較して細胞毒性を評価。細胞生存率、AP-1 および NFκB 活性、ROS 産生量、フローサイトメトリーによる炎症性メディエーター (サイトカイン)を測定。ROS 産生量は ESR により測定。各 SWCNT の濃度 : 0.06~0.24 mg/mL。24hrs 暴露。</p> <p>ヒト皮膚細胞由来の人工皮膚を用いて、未精製 SWCNT 暴露によって誘導される、細胞形態変化および炎症性メディエーター (サイトカイン)を測定。未精製 SWCNT とコントロールの各データを比較して細胞毒性を評価。SWCNT の濃度 : 75µg/150µl、18 hrs 暴露。</p> <p>in vivo : 未精製 SWCNT とコントロールの各データを比較して細胞毒性を評価。未精製 SWCNT は脱イオン水に懸濁し、マウス背面に塗布。5 日暴露。暴露濃度は 40~160 g/mouse。最終暴露 24hrs 後に屠殺し、皮膚を採取。生化学的、組織学的解析を行った。生化学的解析 : 可溶性コラーゲン定量、LAL assay による LPS 量測定、ELISA による MPO 活性およびタンパク質カルボニル化測定、総タンパク量および GSH 量測定。フローサイトメトリーによる炎症性メディエーター (サイトカイン) 測定。</p>	
対象 endpoint	in vitro 急性毒性、急性毒性、皮膚刺激性	
被検試料	物質名	1. 購入未精製 SWCNT (unpurified SWCNT) 2. 部分精製 SWCNT
	詳細	1. Carbon Nanotechnologies 社 (HiPco 法 SWCNT。触媒残渣として、30% (wt) iron を含む。直径 : <1 nm) 2. 純度 : 99.7%、触媒残渣 : 0.23% (wt) iron
	調製方法	1. ー 2. 酸処理により、部分精製 SWCNT を調製。
	暴露前観察方法	ー
In vitro	条件等	1. EpiDerm FT full thickness normal (non-transformed), organotypic in vitro skin tissue model 2. murine epidermal cells (JB6 P+)
	細胞種	1. ヒト皮膚細胞由来の人工皮膚 2. マウス皮膚
In vivo	条件等	マウス (SKH-1 Hairless、雌、3-4 週齢、16-18 g、immune-competent)
	投与経路	経皮
結果	<p>in vitro : マウス上皮細胞においては、未精製 SWCNT 0.12 mg/mL 処理群で、ESR で検出可能なヒドロキシラジカルが産生された。また、AP-1 活性化は部分精製 SWCNT 暴露細胞および非処理群に比べて有意であり、かつ用量依存性であった。部分精製 SWCNT 処理群においては、AP-1 活性化に有意差はみられなかった。NFκB の活性化は有意かつ用量依存性であり、どちらの処理群でもみられた。ヒト皮膚細胞由来の人工皮膚においては、未精製 SWCNT 処理群で、表皮の肥厚、炎症誘発性サイトカインの有意な放出の増加およびコラーゲンの増加、これに伴って生じる皮膚線維芽細胞の蓄積と活</p>	

	<p>性化がみられた。</p> <p>in vivo : 未精製 SWCNT の局所暴露は、酸化ストレス、グルタチオンの枯渇、チオールとカルボニルの酸化、MPO 活性の上昇、皮膚細胞数の増加、PMNs とマスト細胞の蓄積による表皮の肥厚を有意に引き起こした。用量依存的であり、特に 160 g 処理群において非処理群との差は明確であった。</p>
--	--

文献 No.	17	
書誌情報	A. Erdely et al., Nano Lett., 9(1), 36, 2009.	
試験目的	肺毒性評価、細胞毒性評価	
実験方法	Rao ら (2003) の方法に従い単回吸入暴露。被検試料は各 40µg/mouse 投与。暴露 4hrs 後に計画屠殺。肺、循環血液、大動脈、心臓、肝臓、腎臓を摘出。BAL および血液中の細胞数算定、LDH を測定。炎症、酸化ストレス、血液凝固、組織修復等に関わる遺伝子発現を TaqMan array を用いた real-time RT-PCR、多重免疫アッセイ、ELISA により測定。組織別のデータを比較・検討し、被検試料の肺毒性、細胞毒性を評価した。被検試料投与条件は、MWCNT : 7 匹、SWCNT : 5 匹、UFCB : 5 匹、コントロール : 7 匹。	
対象 endpoint	急性毒性、特定標的臓器毒性	
被検試料	物質名	1. MWCNT 2. SWCNT 3. ultrafine carbon black (UFCB)
	詳細	1. Mitsui 社、直径 : <80nm、長さ : 10-20µm 2. Carbon Nanotechnologies 社、直径 : 0.8-1.2 nm、長さ : 0.1-1µm 3. Degussa 社の Printex 90、直径 : 14 nm
	調製方法	1~3. Porter ら (2008) の方法に従い調製した。
	暴露前観察方法	TEM、ICP-MS、
In vitro	条件等	—
	細胞種	—
In vivo	条件等	マウス (C57BL/6、雄、10 週齢)
	投与経路	pharyngeal aspiration (吸入暴露)
結果	各処理群の BAL 中、血液中の好中球、好酸球は増加し、血液中のリンパ球は減少した。BAL 中の好中球数は、vehicle 処理群では正常値であったが、他の処理群、特に CNT 処理群では有意に増加した。血液中の好中球も、CNT 処理群では有意に増加した。また、BAL 中の LDH 活性は、MWCNT 処理群で有意に増加した。CNT 処理群の肺組織においては、炎症、酸化ストレス、血液凝固、組織修復に関わる遺伝子の発現上昇が明確であり、MWCNT 処理群では、SWCNT 処理群に比べ、定量的に高い発現がみられた。vehicle 処理群の大動脈と比べ、他処理群の大動脈においては、MT1、MT2、Hif-3α、Arg II、S100a8 の有意な発現上昇がみられた。これは、MWCNT 処理群 > SWCNT 処理群 > UFCB 処理群の順に顕著であった。さらに、MWCNT 処理群の心臓、肝臓、腎臓においても、この 5 遺伝子の有意な発現上昇が認められた。他の測定結果も、肺と体循環の緊密な連携を示唆するものであった。	

文献 No.	31	
書誌情報	J. K. Folkmann et al., Environ. Health Perspect., .117,(5), 2009.	
試験目的	発がん性評価、細胞毒性評価	
実験方法	単回強制経口投与。各被検試料懸濁液の濃度：0.064、0.64 mg/kg b.w. in 200µl。84 匹。24hrs 後に計画屠殺。肝臓、肺、大腸組織を摘出。以下の測定により酸化ストレスによる DNA 損傷レベルを評価した。1) 8-oxodG 測定、2) 8-oxodG によって誘導される OGG1、NEIL1、MUTYH、NUDT1、HO1 の mRNA 発現による、DNA 修復制御の変化を測定。	
対象 endpoint	急性毒性、生殖細胞変異原性、発がん性、特定標的臓器毒性	
被検試料	物質名	1. フラーレン 2. 単層カーボンナノチューブ (SWCNT)
	詳細	1. Sigma-Aldrich 社、大きさ：0.7 nm、純度：99.9% 2. Thomas Swan 社、大きさ：0.9-1.7 nm、長さ：<1µm、触媒残渣：2% iron、cobalt、nickel、maganese
	調製方法	各被検試料を生理食塩水もしくは Sigma-Aldrich 社製コーンオイルに懸濁し超音波処理を行った後、実験方法の項に記述されている投与濃度に調製した。
	暴露前観察方法	動的光散乱法
In vitro	条件等	—
	細胞種	—
In vivo	条件等	ラット (Fisher 344、雌、9 週齢)
	投与経路	oral gavage (intra gastric)
結果	SWCNT 処理群では、肝臓、肺において 8-oxodG レベルは有意に上昇した。フラレン処理群では、肝臓においては、いずれの濃度でも 8-oxodG レベルは有意に上昇していたが、肺においては、高用量群のみで 8-oxodG レベルの有意な上昇が認められた。mRNA 発現レベルは、懸濁液の差異による影響を受けなかった。OGG1 発現上昇は、フラレン高用量群の肝臓においてのみ有意であった。フラレン処理群の肝臓における OGG1 mRNA 発現上昇と、肺における 8-oxodG レベルの上昇については、明確に用量依存性であった。	

文献 No.	54	
書誌情報	H. Tong et al., Toxicol. Appl. Pharmacol., 239(3), 224, 2009	
試験目的	心肺毒性評価	
実験方法	Gilmour ら (2004) の方法に従い、調製、単回吸入暴露。懸濁液の濃度は 10、40µg/mouse in 50µl。LPS のみ 2µg/mouse in 50µl。暴露 24hrs 後に計画屠殺。肺の炎症反応および心臓作用について、BAL および心臓灌流の生化学的検査によって比較検討し、心肺毒性を評価した。組織学的変化については、同じ試験系で追試を行い、肺および心臓を摘出して測定した。	
対象 endpoint	急性毒性、特定標的臓器毒性	
被検試料	物質名	1. 単層カーボンナノチューブ (SWCNT)
		2. 酸処理 SWCNT (AF-SWCNT)
		3. ultrafine carbon black (UFCB)
		4. 酸処理 UFCB (AF-UFCB)
	詳細	1. Sigma 社、catalogue number : 636797
2. 1. SWCNT を Saxena ら (2007) の方法に従い酸官能化		
3. Dr. Vickie Stone からの寄贈品		
4. 3. UFCB を Saxena ら (2007) の方法に従い酸官能化		
調製方法	AF-SWCNT、AF-UFCB については粒子サイズ、粒度分布測定をゼータ電位粒子測定装置により実施。Saxena ら (2007) の方法に従い、各被検試料を超音波処理後生理食塩水に懸濁し、実験方法の項に記述されている投与濃度に調製した。	
暴露前観察方法	thermo-optical method、ICP-OES、US EPA Method 3050B (measured gravimetrically)、TEM、BET analyses、Zetasizer Nano ZS	
In vitro	条件等	—
	細胞種	—
In vivo	条件等	マウス (CD-1、雌、12-16 週齢、平均体重 30.8 ± 0.7 g)
	投与経路	Inhalation (pharyngeal aspiration route)
結果	AF-SWCNT、UFCB、AF-UFCB の 40µg 処理群では、肺における好中球の割合が増大した。低用量群では、有意差はみられなかった。各処理群では、用量依存的に、肺の末梢気道および間質領域に凝集がみとめられた。高用量群では、末梢気道間、間質において細胞浸潤および浮腫が認められた。AF-SWCNT の 40µg 処理群では、灌流心臓における心機能回復の低下、梗塞面積の増大、冠動脈血流予備能の上昇は、他処理群とコントロールに比べて、いずれも有意であった。局所的な心筋線維化もみられた。光学顕微鏡下では心組織にナノ粒子はみられなかった。	

2.2.3 多層カーボンナノチューブ

文献 No.	10	
書誌情報	X. WANG et al., J. Nanosci. Nanotech., 9(5), 3025, 2009.	
試験目的	細胞毒性評価	
実験方法	直径の異なる MWCNT を用いて細胞生存率、貧食活性、アポトーシスの差異を比較検討。MWCNT の濃度は 0~20µg/mL の 5 濃度。3hrs 暴露後の MTT assay、6hrs 暴露後の TEM での微細構造観察、12hrs および 24hrs 暴露後のフローサイトメトリーにより評価。	
対象 endpoint	in vitro 急性毒性	
被検試料	物質名	1. MWCNT 2. 石英 : Quartz (コントロール)
	詳細	Shenzhen Nanotech Port 社、直径 : 10-20 nm、長さ : 1-5µm、純度 : >95% (MWNT10)
		Shenzhen Nanotech Port 社、直径 : 40-60 nm、長さ : 1-5µm、純度 : >95% (MWNT40)
		Shenzhen Nanotech Port 社、直径 : 60-100 nm、長さ : 1-5µm、純度 : >95% (MWNT60)
	調製方法	The National Institute for Occupational Health and Poison Control 社、直径 : <5µm、純度 : 99% (コントロール)
	暴露前観察方法	Shenzhen Nanotech Port 社より、chemical vaporization deposition (CVD) method によって合成された pristine MWCNT を 3 種類購入。それぞれ 20 分超音波処理を行った後、TEM、TGA、ICP-MS、BET analyses により MWNT10、MWNT40、MWNT60 の 3 種類の試料に分類、調製した。
In vitro	条件等	TEM、TGA、BET analyses、ICP-MS
	細胞種	モルモット肺胞マクロファージ
In vivo	条件等	モルモット肺
	投与経路	—
結果	MWCNT の細胞毒性は、濃度条件が同じ場合は直径の大きさに相関がみられた。また、直径の大きさが同じ場合は濃度に相関が認められた。肺胞マクロファージ貧食活性低下は MWCNT の濃度に依存しており、アポトーシスがみられた部位ではより顕著であった。	

文献 No.	57	
書誌情報	U. Wirmitzer et al., Toxicol. Lett., 186, 160, 2009.	
試験目的	遺伝毒性評価 (細胞毒性評価)	
実験方法	<p>MWCNT の凝集体について、OECD TG 473、471 を行い、環境毒性を評価。OECD TG 473 においては、以下の条件で行った。1) MWCNT 濃度：0～10µg/mL の 4 濃度。S9 mix 存在下および非存在下で 4hrs 培養、18hrs 後に生育状態を観察し、変異株を計測。2) MWCNT 濃度：10µg/mL。S9 mix 存在下および非存在下で 18hrs 培養、30hrs 後に生育状態を観察し、変異株を計測。3) MWCNT 濃度：0～10µg/mL の 4 濃度。S9 mix 非存在下で 18hrs 培養後に生育状態を観察し、変異株を計測。</p> <p>OECD TG 471 においては、0～5000µg/plate の濃度、S9 mix 存在下および非存在下で 48hrs 培養後、生育状態を観察しコロニーを計数した後に集菌。</p>	
対象 endpoint	in vitro 急性毒性、生殖細胞変異原性	
被検試料	物質名	MWCNT
	詳細	Bayer MaterialScience 社の Baytubes、純度：>95%
	調製方法	脱イオン水 に懸濁して 10 mg/mL に濃度調整後、超音波処理を 30 分行った。レーザー回析により、それぞれの実験条件下での粒子サイズの分布を測定した。
	暴露前観察方法	レーザー回析
In vitro	条件等	1. OECD TG 473 : Chinese hamster lung fibroblasts V79 cell 2. OECD TG 471 : Salmonella typhimurium (strains TA 1535, TA 100, TA 1537, TA 98, TA 102)
	細胞種	1. OECD TG 473 : チャイニーズハムスター肺線維芽細胞 2. OECD TG 471 : ネズミチフス菌
In vivo	条件等	—
	投与経路	—
結果	OECD TG 473 においては、細胞毒性および染色体異常はみとめられなかった。OECD TG 471 においては、細菌に対する毒性および変異原性はみとめられなかった。	

文献 No.	69	
書誌情報	L. Tabet et al., J.Toxicol. Environ. Health. Part A;72, 60, 2009.	
試験目的	細胞毒性評価	
実験方法	細胞生存率、アポトーシス、酸化ストレス、細胞内取り込みを比較検討し、細胞毒性を評価。被検試料を下記の濃度で暴露。MWCNT : 0~100µg/mL。白石綿、青石綿、CB nanoparticles : 100µg/mL。6、24、48、72hrs 暴露。48、72hrs 培養。	
対象 endpoint	in vitro 急性毒性	
被検試料	物質名	1. MWCNT 2. 青石綿 (アスベスト) 3. 白石綿 (アスベスト) 4. カーボンブラック (CB nanoparticles)
	詳細	1. ARKEMA 社の Graphistrength C100、直径 : 12 nm、長さ : 0.1-13µm 2. UICC 社、直径 : 20 nm 3. UICC 社、直径 : 80 nm 4. Degussa/Evonik 社の FR101 を購入、直径 : 95 nm
	調製方法	MWCNT、青石綿、白石綿についてそれぞれ懸濁液を調製した。MWCNT はジパルミトイルレシチン (DPL)、PBS、エタノールに懸濁。青石綿、白石綿は培養液に懸濁。CB は PBS に懸濁。それぞれ vortex、超音波処理を行った。
	暴露前観察方法	TEM、ICP-MS、ESCA、SEM、BET analyses、Knudsen flow reactor、レーザー回折
	条件等	1. A549 2. MeT5A
In vitro	細胞種	1. ヒト肺上皮細胞 2. ヒト中皮細胞 (アスベスト感受性)
	条件等	—
In vivo	投与経路	—
	結果	MWCNT 投与群では A549、MeT5A いずれの細胞表面にも凝集がみられた。PBS 処理群でみられた凝集は、エタノール、DPL 処理群でみられた凝集に比べて有意に大きかった。100µg/mL の濃度では代謝活性低下がみられたが、膜透過性、アポトーシスに変化はみられなかった。青石綿、白石綿投与群では、被検試料は細胞に貫通し、代謝活性低下、アポトーシスの増加がみられたが、膜透過性に変化はみられなかった。CB 投与群では、有害事象はみられなかった。

文献 No.	25	
書誌情報	M. Chiaretti et al., J. Phys.: Condens. Matter, 20(474203),1, 2008.	
試験目的	細胞毒性評価、発がん性評価	
実験方法	<p>in vitro : ヒト由来の培養細胞を 3 系統用いて、それぞれ細胞増殖アッセイを行った。MWCNT の濃度は 0~0.1 mg/ml。24、72hrs 培養。</p> <p>in vivo : 単回投与試験と反復投与試験をそれぞれ行った。単回投与試験では、MWCNT を腹腔内投与後 7 日間観察し、計画屠殺。Irwin test、体重測定、免疫学的検査、組織学的検査により毒性を評価。被検試料投与条件は以下の通り。1 グループ 3~5 匹。10、20、40 mg/kg b.w.。反復投与試験では、1 日に一度 5 mg/kg b.w.、連続した 7 日間腹腔内投与を行った。最終投与日の翌日に計画屠殺。体重測定、免疫学的検査、組織学的検査により毒性を評価。1 グループ 4 匹。</p>	
対象 endpoint	in vitro 急性毒性、急性毒性、発がん性、特定標的臓器毒性	
被検試料	物質名	MWCNT
	詳細	Sigma-Aldrich 社、product number : 659258、直径 : 110-170 nm、長さ : 5-9µm、純度 : >90%
	調製方法	<p>in vitro : オートクレーブで滅菌後、滅菌水に分散。遠心、超音波処理、懸濁。</p> <p>in vivo : オートクレーブで滅菌後、生理食塩水に分散し、90 分超音波処理。その後、単回投与試験、反復投与試験について、懸濁液を変えることで以下の 2 種類の試料を調製した。単回投与試験 : Tween-80 (5%)、PEG 400 (5%)、メチルセルロース(MTC 0.5%) 混合液に懸濁。反復投与試験 : Tween-80 (2.5%)、MTC (0.5%)混合液に懸濁。</p>
	暴露前観察方法	TEM、SEM
In vitro	条件等	
	細胞種	1. ヒト結腸癌由来 (Caco-2)
		2. ヒト動脈平滑筋細胞 (hSMCs)
3. ヒト乳癌由来 (MCF-7)		
In vivo	条件等	マウス (CD1 Swiss、雄、27-32 g)
	投与経路	腹腔内投与
結果	<p>in vitro : Caco-2 については、細胞増殖に関する変化はみられなかった。hSMCs については、最高用量群で投与 72hrs 後に細胞増殖の減少がみられた。MCF-7 については、全ての用量群で有意な細胞増殖阻害がみられた。</p> <p>in vivo : 単回投与試験、反復投与試験については、いずれも自律神経系、行動系の有意な差はみられず、組織学的検査においても変化はみられなかった。ANA、anti-ENA、anti-CL、C-ANCA、P-ANCA によるスクリーニングは陰性であり、抗原抗体反応はみられなかった。被検試料投与による免疫グロブリン量の変化もみられなかった。</p>	

文献 No.	66	
書誌情報	G. Bardi et al., Nanomedicine: Nanotech Biol. Medicine, 5(1), 96, 2009.	
試験目的	細胞毒性評価	
実験方法	<p>in vitro : マウス皮質ニューロンを用いて MTT assay、アポトーシスアッセイを行った。PF127 の濃度 : 0.001%~0.05%、MWCNT の濃度 : 0.5mg/ml。</p> <p>in vivo : マウス脳内に PF127-MWCNT 混合溶液を定位注入した。0.1M PBS、4%パラホルムアルデヒドを用いて固定した後、FIB system により脳組織切片を作成し、蛍光顕微鏡観察を行った。注入液量 : 1μl、PF127 の濃度 : 0.1%、MWCNT の濃度 : 35μg/mL。</p>	
対象 endpoint	in vitro 急性毒性、急性毒性、特定標的臓器毒性	
被検試料	物質名	MWCNT
	詳細	Nanothinx 社、直径 : 10-30 nm、長さ : 2 μ m、純度 : 97.06%、metal particles : 2.94%、amorphous carbon and other carbon impurities : <1%
	調製方法	MWCNT の表面を Sigma 社ブルロニック F 127 (PF127) によりコーティング処理。
	暴露前観察方法	—
In vitro	条件等	primary mouse cortical neurons in culture
	細胞種	初代マウス大脳皮質
In vivo	条件等	マウス
	投与経路	intracerebral injection
結果	<p>in vitro : PF127 の濃度が 0.01%以下の条件で、投与後 24 時間以内にアポトーシスが誘導された。しかし、MWCNT 存在条件下では、アポトーシスは誘導されなかった。</p> <p>in vivo : 処理群、非処理群のいずれにおいても病変はみられなかった。</p>	

文献 No.	5	
書誌情報	L. A. Mitchell et al., Nature Nanotech., 4, 451, 2009.	
試験目的	細胞毒性評価、肺毒性評価、脾臓毒性評価	
実験方法	1日に一度6hrs、エアロゾルとして14日吸入暴露。MWCNTの濃度は0、0.3、1 mg/m ³ 、1グループ7匹。3系統の雄マウスを用いた。最終暴露18hrs後に計画屠殺。肺、脾臓を摘出。BALFの検査、フローサイトメトリー、ELISA、EIA、real-time RT-PCR法、Jerne-Nordin plaque assayを行い、肺毒性、脾臓毒性を評価した。	
対象 endpoint	急性毒性、特定標的臓器毒性	
被検試料	物質名	MWCNT
	詳細	Shenzhen Nanotech Port 社、直径：10-20 nm、長さ：5-15µm、純度：97%、比表面積：100 m ² /g、触媒残渣：0.5% iron、0.5% nickel
	調製方法	—
	暴露前観察方法	BET analysis、TEM、SEM、LAL assay
In vitro	条件等	—
	細胞種	—
In vivo	条件等	マウス (C57Bl/6、雄、8週齢)
		マウス (wild-type B6;129P2 (COX-2+/+)、雄、9週齢)
		マウス (B6;129P2-PTGS2tm1Unc (referred to as COX-2 knockout or COX-2 ^{-/-} mice)、雄、9週齢)
	投与経路	吸入
結果	BALFを用いた細胞培養の結果、最高用量群であるMWCNT 1 mg/m ³ 投与群においては、培養開始30日後の免疫抑制効果は有意であった。T細胞依存性抗体産生は有意に減少しており、B細胞マイトジェン産生減少も認められた。COX-2およびPTGES2の遺伝子発現上昇は、脾臓において認められたが、肺においては認められなかった。COX-2ノックアウトマウスにおいては、T細胞依存性抗体産生等の、MWCNT投与による影響は認められなかった。他の測定結果も、肺と脾臓の緊密な連携を示唆するものであった。	

文献 No.	9	
書誌情報	G. Qu et al., Carbon, 47, 2060, 2009.	
試験目的	発がん性評価	
実験方法	1 グループ 30 匹 (雄雌各 15 匹)、5 グループ。単回投与後 28 日間観察。7、14、21、28 日目に体重を測定。28 日目に眼静脈より血液採取、生化学的検査 (血清中の ALT、AST、CR、BUN 量測定)。1、7、28 日目に剖検。被検試料投与条件は以下の通り。MWCNT-COOH 1 : 1 mg/mL in 100µl、MWCNT-COOH 2 : 1 mg/mL in 100µl、PBS : 100µl (コントロール)、PBS with 1% Tween 80 : 100µl (コントロール)。	
対象 endpoint	急性毒性、発がん性、特定標的臓器毒性	
被検試料	物質名	MWCNT
	詳細	Chengdu Organic Chemicals 社より、chemical vaporization deposition (CVD) 法によって合成された pristine MWCNT を購入。直径 : 20-40 nm、長さ : 0.3-10µm、純度 : >95%、触媒残渣 : <0.2%
	調製方法	酸化反応によりカルボキシル基を導入。その後、洗浄、遠心により不純物を除去。ICP-MS により Ni、Fe 含有量は<0.001%であることを確認。精製後の直径 : 40 nm、長さ : 0.5-5µm、純度 : >95%、触媒残渣 : <0.2%。懸濁溶液を変えることで以下の 2 種類の試料を調製した。MWCNT-COOH 1 : PBS に懸濁(1 mg/mL)、MWCNT-COOH 2 : PBS with 1% Tween80 に懸濁(1 mg/mL)。
	暴露前観察方法	ICP-MS
In vitro	条件等	—
	細胞種	—
In vivo	条件等	マウス (BALB/C、雌雄、20-22 g)
	投与経路	a single dose intravenous injection (the tail caudal vein)
結果	体重測定、血液検査の結果、処理群と非処理群との間に差はみられなかった。剖検の結果、肺においては、MWCNT-COOH 1 処理群では、投与後 1、7、28 日目で凝集、蓄積、28 日目で炎症反応がみられた。しかし、MWCNT-COOH 2 処理群ではみられなかった。肝臓においては、MWCNT 処理群ではいずれも 1、7 日目で凝集、蓄積がみられた。MWCNT-COOH 2 処理群では、28 日目の凝集、蓄積はみられなかった。	

文献 No.	12	
書誌情報	J. G. Li et al., J. Nanosci. Nanotech, 9, 1384-, 2009.	
試験目的	肺毒性評価	
実験方法	2日に一度 32.61 mg/m ³ 、6hrs、エアロゾルとして暴露。1グループ9匹。30日観察期間中15日暴露、60日観察期間中30日暴露、コントロールの3グループについて気管支肺胞洗浄液 (BALF) の生化学的検査と病理学検査を行い、肺毒性を評価した。	
対象 endpoint	急性毒性、特定標的臓器毒性	
被検試料	物質名	MWCNT
	詳細	Shenzhen Nanotech Port 社、直径：50 nm、長さ：10μm、純度：>95%
	調製方法	購入後未調製の MWCNT を使用。
	暴露前観察方法	SEM
In vitro	条件等	—
	細胞種	—
In vivo	条件等	マウス (Kunming、雌、30 g)
	投与経路	inhalation
結果	30日観察期間中15日暴露のグループでは肺毒性は示唆されなかった。しかし、60日観察期間中30日暴露のグループでは肺毒性が示唆された。BALFの総タンパク量、ALP、ACP、LDHの増加に有意差が認められ、さらに病理学検査においてもMWCNTの付着は他のグループに比べて顕著であった。肺胞壁における凝集は気管支壁における凝集よりも小さかった。気管支壁、肺胞壁の肥厚も認められた。	

文献 No.	13	
書誌情報	X. Deng et al., Carbon, 47, 1421, 2009.	
試験目的	脾臓毒性評価	
実験方法	以下の方法により、脾臓における毒性と RES の貧食活性を評価した。1 グループ 6 匹。S-MWCNT の投与濃度は 60 mg/kg b.w.、100 mg/kg b.w.。投与後 2 ヶ月間観察。1、7、15、30、60 日目に体重と脾臓重量を測定。その後脾臓を用途別に分け、組織病理学検査、電子顕微鏡診断、oxidative stress assay (GSH、SOD、MDA 測定)を行った。1、7、15 日目に carbon clearance 測定を行った。	
対象 endpoint	急性毒性、特定標的臓器毒性	
被検試料	物質名	S-MWCNT
	詳細	Shenzhen Nanoharbor 社より、chemical vaporization deposition (CVD) method によって合成された pristine MWCNT を購入。TEM、TGA、ICP-MS により解析した後、Deng ら (2007) の方法に従い、タウリンを付加し水溶性の S-MWCNT を調製した。精製後の直径：12.6±3.2 nm、長さ：269±160 nm、純度：>95%
	調製方法	1. 精製後、実験方法の項に記述されている投与濃度に調製した。
	暴露前観察方法	TEM、TGA、ICP-MS
In vitro	条件等	—
	細胞種	—
In vivo	条件等	マウス (Kunming、雌、5 週齢、22-25 g)
	投与経路	intravenous injection
結果	RES の貧食活性、oxidative stress assay については、処理群と非処理群との間に差はみられなかった。組織病理学検査については、S-MWCNT による脾臓の損傷は認められなかった。暴露後の時間経過により、S-MWCNT の脾臓における蓄積部位は、赤脾髄から白脾髄へ移動した。	

文献 No.	17	
書誌情報	A. Erdely et al., Nano Lett., 9(1), 36, 2009.	
試験目的	肺毒性評価、細胞毒性評価	
実験方法	Rao ら (2003) の方法に従い単回吸入暴露。被検試料は各 40µg/mouse 投与。暴露 4hrs 後に計画屠殺。肺、循環血液、大動脈、心臓、肝臓、腎臓を摘出。BAL および血液中の細胞数算定、LDH を測定。炎症、酸化ストレス、血液凝固、組織修復等に関わる遺伝子発現を TaqMan array を用いた real-time RT-PCR、多重免疫アッセイ、ELISA により測定。組織別のデータを比較・検討し、被検試料の肺毒性、細胞毒性を評価した。被検試料投与条件は、MWCNT : 7 匹、SWCNT : 5 匹、UFCB : 5 匹、コントロール : 7 匹。	
対象 endpoint	急性毒性、特定標的臓器毒性	
被検試料	物質名	1. MWCNT 2. SWCNT 3. ultrafine carbon black (UFCB)
	詳細	1. Mitsui 社、直径 : <80nm、長さ : 10-20µm 2. Carbon Nanotechnologies 社、直径 : 0.8-1.2 nm、長さ : 0.1-1µm 3. Degussa 社の Printex 90、直径 : 14 nm
	調製方法	1.-4. Porter ら (2008) の方法に従い調製した。
	暴露前観察方法	TEM、ICP-MS、
In vitro	条件等	—
	細胞種	—
In vivo	条件等	マウス (C57BL/6、雄、10 週齢)
	投与経路	pharyngeal aspiration (吸入暴露)
結果	各処理群の BAL 中、血液中の好中球、好酸球は増加し、血液中のリンパ球は減少した。BAL 中の好中球数は、vehicle 処理群では正常値であったが、他の処理群、特に CNT 処理群では有意に増加した。血液中の好中球も、CNT 処理群では有意に増加した。また、BAL 中の LDH 活性は、MWCNT 処理群で有意に増加した。CNT 処理群の肺組織においては、炎症、酸化ストレス、血液凝固、組織修復に関わる遺伝子の発現上昇が明確であり、MWCNT 処理群では、SWCNT 処理群に比べ、定量的に高い発現がみられた。vehicle 処理群の大動脈と比べ、他処理群の大動脈においては、MT1、MT2、Hif-3α、Arg II、S100a8 の有意な発現上昇がみられた。これは、MWCNT 処理群 > SWCNT 処理群 > UFCB 処理群の順に顕著であった。さらに、MWCNT 処理群の心臓、肝臓、腎臓においても、この 5 遺伝子の有意な発現上昇が認められた。他の測定結果も、肺と体循環の緊密な連携を示唆するものであった。	

文献 No.	19	
書誌情報	Y. Sakamoto et al., J. Toxicol. Sci., 34(1), 65, 2009.	
試験目的	発がん性評価	
実験方法	MWCNT、青石綿、カルボキシメチルセルロース (CMC) をそれぞれ単回投与後 52 週間観察し、剖検により発がん性を評価。被検試料投与条件は以下の通り。MWCNT : 1 mg/kg b.w.、7 匹、青石綿 : 2 mg/kg b.w.、10 匹 (コントロール)、CMC : 2 ml/kg b.w.、5 匹 (コントロール)。	
対象 endpoint	発がん性	
被検試料	物質名	1. MWCNT 2. 青石綿 (コントロール) 3. CMC (コントロール)
	詳細	1. MITSUI MWCNT-7、 lot number : 060125-01k 2. UICC-grade, stocked at the Tokyo Metropolitan Institute of Public Health 3. Kanto Chemical 社、2% CMC
	調製方法	Takagi ら (2008a) の方法に従い調製。MWCNT、青石綿を、それぞれ 5% Triton X-100 に懸濁後、SEM により粒子幅と長径を測定した。ICP-MS、イオンクロマトグラフィー により不純物の測定を行った後 2% CMC に懸濁し、実験方法の項に記述されている投与濃度に調製した。
	暴露前観察方法	SEM、TEM、ICP-MS、イオンクロマトグラフィー、光学顕微鏡
In vitro	条件等	—
	細胞種	—
In vivo	条件等	ラット (Fisher 344 DuCrIj、雄、12 週齢、平均 235 g)
	投与経路	a single intrascrotal injection
結果	MWCNT 暴露のラット 6/7 匹に腹腔内播種性中皮腫の症状がみられた。これらは 37-40 週の間にて全て死亡した。青石綿暴露、CMC 暴露のラットに変化はみられなかった。	

文献 No.	26	
書誌情報	A. Liu et al., J. Nanoparticle Res., 10, 1303, 2008.	
試験目的	肺毒性評価	
実験方法	Lam ら (2004) の方法を用いた。MWCNT の濃度は 0、1、3、5、7 mg/kg。暴露後 1、7、30、90 日目に剖検。TEM、光学顕微鏡観察により、in vivo でのナノ粒子の分布、標的臓器における time-effects nanotoxicity、dose-effects nanotoxicity を評価した。	
対象 endpoint	急性毒性、特定標的臓器毒性	
被検試料	物質名	MWCNT
	詳細	Shenzhen Nanotech Port 社、直径：40-60 nm、長さ：0.5-500µm、純度：95%、agraphitic carbon：<0.2%
	調製方法	生理食塩水、1% Tween-80 に懸濁して 60 分超音波処理。
	暴露前観察方法	X線回折、TEM
In vitro	条件等	—
	細胞種	—
In vivo	条件等	ラット (Vister、雄、250-300 g)
	投与経路	intratracheal instillation
結果	本試験において、気管内投与による MWCNT の肺への暴露による影響は、用量依存性、投与時間依存性であった。暴露後 90 日目の組織を、光学顕微鏡下で濃度毎に観察した結果、1 mg/kg 処理群よりも、3-7 mg/kg 処理群の方が肺胞中隔は肥厚しており、損傷した肺胞の数も多く、炎症の度合いも深刻なものであった。また、3 mg/kg 処理群について、光学顕微鏡下で暴露後の経過時間毎に比較した結果、暴露後 1 日目よりも 7 日後の組織の方が肺胞中隔は肥厚していた。暴露後 90 日後の組織では、肺の損傷はより深刻なものであった。	

文献 No.	76	
書誌情報	D. Elgrabli et al., Toxicology, 253, 131, 2008.	
試験目的	肺毒性評価	
実験方法	Elgrabli ら(2007) の方法に従い、気管内投与。6h/days、MWCNT-BSA 懸濁液の濃度は 0、1、10、100µg/rat in 150µl。1 グループ 6 匹。暴露後 1、7、30、90、180 日目に whole-body plethysmography 法による測定、可溶性コラーゲンの定量、Bradford 法によるタンパク質定量、サイトカイン発現の RT-qPCR 法および luminex 法による測定、組織病理学的観察を行った。肺における炎症、アポトーシス、繊維症、呼吸パラメーター、肉芽腫形成を肺毒性評価の指標とした。	
対象 endpoint	急性毒性、発がん性、特定標的臓器毒性	
被検試料	物質名	MWCNT
	詳細	Sigma-Aldrich 社、product number: 636649、直径: 20-50 nm、長さ: 0.5-2µm
	調製方法	Elgrabli ら(2007) の方法に従い、BSA に懸濁し、超音波処理。MWCNT-BSA とした。調製した凝集体の 80%が <10µm であり、吸入可能な大きさであった。また、凝集体の 98%が直径 <30µm であった。
	暴露前観察方法	—
In vitro	条件等	—
	細胞種	—
In vivo	条件等	ラット (Sprague-Dawley、雄、180-220 g)
	投与経路	intratracheal instillation
結果	光学顕微鏡による観察では、100µg 投与、暴露後 30、90、180 日目のラット、および 10µg 投与、暴露後 30、90 日目のラットに、肺胞マクロファージのアポトーシスがみとめられた。caspase 3/7 活性測定結果も、肺胞マクロファージのアポトーシスが起きていることを裏付けるものであった。	

2.2.4 酸化チタン微粒子

文献 No.	30	
書誌情報	X. Hu et al., Sci. Total Environ.,40(7), 3070, 2009	
試験目的	細胞毒性	
実験方法	各暴露濃度範囲(mg/L) : CuO(25-200)、ZnO(50-150)、Al ₂ O ₃ (600-1200)、La ₂ O ₃ (200-600)、Fe ₂ O ₃ 、SnO ₂ 、TiO ₂ (600-1200)で、2 時間培養、LD50、La ₂ O ₃ の代謝率(¹⁴ C-グルコースの無機化)	
対象 endpoint	LD50 (fatal to 50% of the bacterium E. coli)	
被検試料	物質名	1. 酸化亜鉛 (ZnO) 2. 酸化銅 (CuO) 3. 酸化アルミニウム (Al ₂ O ₃) 4. 酸化ランタン (La ₂ O ₃) 5. 酸化鉄 (Fe ₂ O ₃) 6. 酸化スズ (SnO ₂) 7. 酸化チタン (TiO ₂)
	詳細	1~7. Sigma-Aldrich 社、粒径 : 30-40 nm
	調製方法	MilliQ 水で 20 分間超音波処理
	暴露前 観察方法	記載なし
	In vitro	条件等 細胞種
In vivo	条件等 投与経路	— —
結果	LD50 値(mg/L)は、CuO(64.5)、ZnO(21.1)、Al ₂ O ₃ (326.1)、La ₂ O ₃ (456.9)、Fe ₂ O ₃ (638.3)、SnO ₂ (1045.6)、TiO ₂ (1104.8)で、ZnO が最も E. coli に対して毒性が強かった。CuO は E. coli の生菌数を有意に減少させ、SnO ₂ は僅かに、Fe ₂ O ₃ 、La ₂ O ₃ 、Al ₂ O ₃ は中程度の細胞毒性を示した。La ₂ O ₃ を用いた ¹⁴ C-グルコースの無機化試験結果と細菌の生存力試験の結果は対応しており、各々の LD50 値は類似していた。	

文献 No.	32	
書誌情報	B. C. Schanen et al., Am. Chem. Soc., 3(9), 2523, 2009	
試験目的	免疫学的炎症の誘発	
実験方法	細胞培養：暴露濃度：0-100 μ M、48 時間暴露、生存率、サイトカイン産生、ROS 生産量、成熟マーカー、ナイーブ CD4 ⁺ T 細胞の増殖反応と T 細胞の活性評価	
対象 endpoint	免疫学的炎症性応答	
被検試料	物質名	1. 二酸化チタン(TiO ₂) アナターゼ型
		2. 二酸化チタン(TiO ₂) ルチル型
		3. 二酸化チタン(TiO ₂) ナノチューブ
	詳細	1. in-house product 粒径：7-10 nm
		2. in-house product(合成したアナターゼ型を 800°C で 2 時間焼成し X 線で構造確認) 粒径：15-20 nm
調製方法	3. in-house product(合成したアナターゼ型を水熱法により水酸化ナトリウム水溶液中で 120-150°C で 20-24 時間処理して合成) 直径：10-15 nm、長さ：70-150 nm	
暴露前観察方法	培養直前に DPBS にナノマテリアルを加え、超音波攪拌分散	
In vitro	条件等	XRD、HRTEM
	細胞種	ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)、ヒト末梢血単核細胞(PBMC)
In vivo	条件等	ヒト
	投与経路	—
結果	HUVEC および PBMC 細胞において、TiO ₂ ナノ粒子は細胞の代謝活性を抑制するが、明らかに細胞破壊・壊死を引き起こすわけではないことがわかった。先天性免疫応答では、炎症性サイトカイン分泌物の有意な増加が見られた。対照群及び TiO ₂ ミクロ粒子(>1 μ m)と違い、TiO ₂ ナノ粒子は ROS 生産量が明らかに増加した。また、TiO ₂ ナノ粒子は TiO ₂ ミクロ粒子と比べ、成熟マーカーの発現を約 15%増加させ、CD4 ⁺ T 細胞の活性及び増殖を効率的に誘導した。	

文献 No.	44	
書誌情報	Z. Pan et al., <i>small</i> , 5(4), 511, 2009	
試験目的	細胞毒性と細胞保護について	
実験方法	暴露濃度 ; ルチル型 : 0-0.8 mg/mL、アナターゼ型 : 0-0.5 mg/mL、細胞面積、細胞増殖(細胞数)、細胞遊走、コラーゲン収縮活性、アクチンのウェスタンブロット検出、培養細胞の TEM 画像、顕微鏡画像、フローサイトメトリー、ROS 生産量	
対象 endpoint	細胞損傷性	
被検試料	物質名	1. TiO ₂ 、超微細ルチル型 2. TiO ₂ 、分散アナターゼ型 3. TiO ₂ 、超微細ルチル型、コーティングあり
	詳細	1. US Cosmetics、光活性化がない場合生体適合性材料、平均粒子径 : 15.0±3.5 nm、アスペクト比 : 約 3.92 2. US Cosmetics、光活性化がない場合生体適合性材料、平均粒径 : 200±13 nm 3. ルチル型 TiO ₂ を抗酸化/アニオン性ポリマー分子と疎水性ポリマー分子でコーティングしたもの
	調製方法	full-Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)に分散させ、使用前に均質になるよう超音波処理後、スターラーで攪拌
	暴露前観察方法	SEM、TEM、XRD、蛍光測定
In vitro	条件等	皮膚線維芽細胞
	細胞種	ヒト(女性)
In vivo	条件等	—
	投与経路	—
結果	ルチル型もアナターゼ型も細胞機能に損傷を与えた。TiO ₂ ナノ粒子暴露により細胞面積、細胞増殖(細胞数)、動き(mobility)およびコラーゲン収縮活性が減少した。容易に細胞膜を通過して小胞内に隔離され、最終的に破壊される。ポリマーコーティングした粒子は細胞に付着せず、細胞内に浸透しなかったため、ROS 生産量が減少し正常な細胞機能を示した。	

文献 No.	62	
書誌情報	L. Bregoli et al., Toxicology, 262, 121 (2009)	
試験目的	細胞毒性	
実験方法	7種のナノ粒子についてCFUアッセイ(プレート法)、濃度5、25、100ppmで暴露し、14日間培養後顆粒球単球前駆細胞(CFU-G/CFU-M/CFU-GM/CFU-Eo)及び赤血球前駆細胞(BFU-E)測定、Sb ₂ O ₃ を液体培養(K562, HL-60, CEM, CEM-R, Thp-1, Jurkat, and Molt-4)で増殖・分化アッセイ、暴露濃度5ppm、フローサイトメトリー分析、定量PCR、STEM分析、光学顕微鏡	
対象 endpoint	細胞増殖能、細胞形成能	
被検試料	物質名	1. 酸化鉄(Fe ₃ O ₄)
		2. 酸化鉄(Fe ₂ O ₃)
		3. 銀(Ag)
		4. 金(Au)
		5. 酸化アンチモン(Sb ₂ O ₃)
		6. コバルト(Co)
		7. 酸化チタン(TiO ₂)
	詳細	1. Nanoamor 社、粒径：20-30 nm
		2. Nanoamor 社、粒径：55-65 nm
		3. Nanoamor 社、粒径：90-210 nm
4. Nanoamor 社、粒径：50-100 nm		
5. Nanoamor 社、粒径：41-91 nm		
6. Fluka Chemical 社、粒径：50-200 nm		
7. TAL Materials 社、粒径：20-160 nm		
調製方法	脱パイロジェン処理(189°C×90分)後、培地を滴下し15分間超音波処理	
暴露前観察方法	DLS	
In vitro	条件等	9人の健常ドナーのヒト骨髄から得られたCD34 ⁺ 細胞 ヒト造血系細胞株(K562、HL-60、CEM、CEM-R、Thp-1、Jurkat、Molt-4)
	細胞種	細胞
In vivo	条件等	—
	投与経路	—
結果	CFUアッセイで、Coナノ粒子は顆粒球単球前駆細胞及び赤血球前駆細胞共に用量依存的な毒性を示した。Sb ₂ O ₃ ナノ粒子5ppmで赤血球前駆細胞の生育阻害が見られた。暴露濃度5~100ppmで他のナノ粒子はコロニー増殖・分化に大きな影響を示さなかった。STEM測定で、Sb ₂ O ₃ ナノ粒子の細胞への蓄積は見られず、細胞膜に近接したナノ粒子が検出された。また殆どの細胞片がアポトーシス小体として存在することが観察された。一方、分化時期に5ppmのSb ₂ O ₃ ナノ粒子を暴露したところ、僅かな増殖率の低下が見られたが、分化への影響は見られず、造血前駆細胞にも毒性は見られなかった。CFUアッセイ及び7種の液体培養アッセイで、細胞株増殖率に統計学的有意な影響は見られなかった。Sb ₂ O ₃ ナノ粒子はThp-1のPMAによるマクロファージ分化を阻害した。	

文献 No.	64		
書誌情報	H. L. Karlsson et al., Toxicol. Lett., 188 (2009) 112		
試験目的	細胞毒性、DNA 損傷		
実験方法	細胞毒性アッセイは被検試料 40、80 μ g/mL で 18 時間曝露。ミトコンドリア脱分極分析は被検試料 80 μ g/mL(CuO のみ 10、20、30、40 μ g/mL 追加)で 16 時間曝露。コメットアッセイ(FPG 酵素含有または含まない)は被検試料 40、80 μ g/mL で 4 時間曝露。		
対象 endpoint	In vitro 細胞毒性		
被検試料	物質名	1. 酸化鉄(III)ナノパウダー (Fe ₂ O ₃ nano) 2. 酸化鉄(III)パウダー (Fe ₂ O ₃ micro)、<5 μ m、純度：99%以上 3. 酸化鉄(II,III)ナノパウダー (Fe ₃ O ₄ nano)、純度：98%以上 4. 酸化鉄(II,III)パウダー (Fe ₃ O ₄ micro)、<5 μ m、純度：98%以上 5. 酸化チタン(IV)ナノパウダー (TiO ₂ nano)、純度：99.9%、ルチル型とアナターゼ型の混合物 6. 酸化チタン(IV)パウダー (TiO ₂ micro)、<5 μ m、純度：99.9%、少量のアナターゼ型を含むルチル型 7. 酸化銅(II)ナノパウダー (CuO nano) 8. 酸化銅(II)パウダー (CuO micro)、<5 μ m、純度：98%	
	詳細	1. Sigma-Aldrich 社、平均粒径：29 nm、比表面積：40 m ² /g 測定値：一次粒子(TEM)：30-60 nm、溶液中のサイズ：1.6 μ m(DLS) 2. Sigma-Aldrich 社、平均粒径：<1 μ m 測定値：一次粒子(TEM)：0.15-1 μ m、比表面積：5.4 m ² /g(BET) 3. Sigma-Aldrich 社、平均粒径：20-30 nm 測定値：一次粒子(TEM)：20-40 nm、溶液中のサイズ：<200 nm(DLS)、比表面積：42 m ² /g(BET) 4. Sigma-Aldrich 社、平均粒径：0.5 μ m 測定値：一次粒子(TEM)：0.1-0.5 μ m、比表面積：6.8 m ² /g(BET) 5. Sigma-Aldrich 社、平均粒径：63 nm、比表面積：24m ² /g 測定値：一次粒子(TEM)：20-100 nm、溶液中のサイズ：300 nm(DLS) 6. Sigma-Aldrich 社、平均粒径：1 μ m 測定値：一次粒子(TEM)：0.3-1 μ m、比表面積：2.5 m ² /g(BET) 7. Sigma-Aldrich 社、平均粒径：42 nm、比表面積：23 m ² /g 測定値：一次粒子(TEM)：20-40 nm、溶液中のサイズ：200 nm(DLS) 8. Sigma-Aldrich 社、平均粒径：3 μ m 測定値：一次粒子(TEM)：0.5-10 μ m、比表面積：1.5 m ² /g(DLS)	
	調製方法	DMEM に被検試料を懸濁させ、20 秒ボルテックス後、超音波処理	
	暴露前観察方法	DLS	
	In vitro	条件等	ヒト II 型肺胞上皮細胞株(A549)
		細胞種	肺・気管
	In vivo	条件等	—
		投与経路	—
	結果	細胞培養液中のナノ粒子に凝集が見られたが、Fe ₂ O ₃ ナノ粒子を除くマイクロ粒子の一次粒子よりは小さかった。細胞毒性評価で、CuO ナノ粒子はマイクロ粒子に比べ非常に細胞毒性が強かったが、他の金属酸化物にナノ粒子とミク	

ロ粒子の毒性に有意な違いは見られなかった。ミトコンドリア脱分極細胞数は CuO 暴露群で用量に依存して増加しており、特にナノ粒子がマイクロ粒子より高く増加した。DNA 損傷性をナノ粒子とマイクロ粒子で比較すると、Fe₂O₃ と TiO₂ はマイクロ粒子暴露群が、CuO ではナノ粒子暴露群でより損傷性が強かった。酸化的 DNA 損傷は CuO 及び Fe₃O₄ ナノ粒子暴露群のみ対照群と比べ有意な増加を示した。

文献 No.	75	
書誌情報	T. Xia et al., ACS Nano, 2008, 2 (10), 2121	
試験目的	細胞毒性のメカニズム、酸化ストレスと物理化学的性状の関連性	
実験方法	細胞死及び生存率評価(各ナノ粒子濃度 25µg/mL で 1~16 時間暴露、濃度 6~100µg/mL で 16 時間暴露、ZnO ナノ粒子濃度 12.5~50µg/mL と相当濃度の ZnSO ₄ (150~600µM)で 6 時間暴露)、H ₂ O ₂ 発生量(非生物系試験: 暴露濃度 10µg/mL)。以下、濃度 25µg/mL で 1~16 時間暴露での ROS 生成量(H ₂ O ₂ 及び O ^{2•-})、酸化ストレスの 1-3 Tiers 評価(Tier 1: HO-1 発現、Tier 2: JNK 活性、TNF-α 及び IL-8 産生、Tier 3: [Ca ²⁺]量及びミトコンドリア膜電位)、CeO ₂ の細胞保護評価(CeO ₂ を 25µg/mL 濃度で 24 時間細胞処理後、25µg/mL の DEP で 16 時間暴露し、細胞死を測定)、細胞プロセッシング及び影響評価(電子顕微鏡、共焦点顕微鏡)	
対象 endpoint	細胞生存率、酸化ストレスバイオファクター	
被検試料	物質名	1. 酸化チタンナノ粒子(TiO ₂) 2. 酸化亜鉛ナノ粒子(ZnO) 3. 酸化セリウムナノ粒子(CeO ₂)
	詳細	1.チタン(IV)テトライソプロポキシド(アルドリッチ社、純度:97%)と m-キシレンより FSP 反応器で合成。一次粒子径: 11 nm、単結晶、アナターゼ型/ルチル型=80:20 の混合物、粒径(nm): 612(水)、284(DMEM)、493(BEGM 中)、ゼータ電位(mV): -8(水)、-10(DMEM)、-9(BEGM) 2.ナフテン酸亜鉛(アルドリッチ社、Zn<8 wt%)と m-キシレンより FSP 反応器で合成。一次粒子径: 13 nm、単結晶、紅亜鉛鉱、粒径(nm): 413(水)、36(DMEM)、184(BEGM)、ゼータ電位(mV): -15(水)、-5(DMEM)、-16(BEGM 中) 3.トリス(2-エチルヘキサン酸)セリウム(III)、49%含有 2-エチルヘキサン酸(Alfa Aesar 社、Ce: 12%)と m-キシレンより FSP 反応器で合成。一次粒子径: 8 nm、単結晶、立方晶系、粒径(nm): 2610(水)、323(DMEM)、596(BEGM)、ゼータ電位(mV): +15(水)、-10(DMEM)、-10(BEGM)
	調製方法	保存液を培養液に加え、細胞暴露前に 10 秒間超音波処理
	暴露前観察方法	BET、XRD、TEM、DLS、ZetaPALS(粒径、ゼータ電位)
In vitro	条件等	
	細胞種	1. マウスマクロファージ(RAW 264.7) 2. ヒト気管支上皮細胞(BEAS-2B)
In vivo	条件等	—
	投与経路	—
結果	ZnO ナノ粒子は RAW 264.7 細胞、BEAS-2B 細胞ともに用量及び時間に依存して細胞毒性を誘発し、ROS 産量、酸化的損傷、炎症反応及び細胞死を引き起こしたが、TiO ₂ と CeO ₂ ナノ粒子は毒性を示さなかった。酸化ストレスについて段階的に評価したところ、ZnO は HO-1 の発現、Nrf2 及び NQO-1 の増加(Tier 1)、リン酸化 JNK の活性化、TNF-α 及び IL-8 の増加(Tier 2)、細胞内遊離[Ca ²⁺]濃度の上昇、ミトコンドリア損傷(Tier 3)で損傷応答を示した。また、選択的細胞プロセッシングと細胞超微細構造への影響評価で、ZnO は培養液やエンドソームで溶解することが示され、非溶解 ZnO ナノ粒子は	

BEAS-2B 細胞のカベオラに入り毒性とカベオラの凝集の関連性が示され、RAW 264.7 細胞ではリソソームに入り酸性下で粒子の溶解による Zn^{2+} の確認、リソソーム凝集が観察された。対照的に蛍光ラベル化した CeO_2 ナノ粒子は BEAS-2B 細胞のカベオリン-1 陽性及び RAW 264.7 細胞後期エンドソーム(LAMP-1)コンパートメントにそのままの形で吸収され炎症や細胞毒性を示さず、ROS 生成を抑制し、外因性酸化ストレスから細胞を防御した。 TiO_2 は CeO_2 と同様の吸収経路を示したが、有害性や細胞保護影響を示さなかった。細胞毒性における ZnO ナノ粒子と Zn^{2+} イオンの関連性は、培養液に溶解した Zn^{2+} がリソソームでの吸収及び金属イオン封鎖により明らかな原因のひとつであることが示唆された。

文献 No.	21	
書誌情報	H. W. Kim et al., J. Nanoparti. Res., 11,(1) , 55 (2009)	
試験目的	細胞毒性評価、肺炎症の評価	
実験方法	in vitro : 細胞毒性評価 ; 0~520 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ で 24 時間培養後、MTS アッセイ及び LDH アッセイ評価、細胞アポトーシス評価 ; DNA 断片化検出(2 \times 52 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、24 時間培養後アガロースゲル電気泳動法評価)、免疫蛍光顕微鏡観察(200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 6 時間暴露)。in vivo : 0~5 mg/kg/day で 5 日間連続して口咽頭に吸入暴露し 2 日後屠殺、BAL 検査、病理検査	
対象 endpoint	in vitro 細胞毒性、in vivo BAL 細胞毒性、病理学的所見	
被検試料	物質名	1. Micro-SiO ₂ (mSiO ₂) 2. Nano-SiO ₂ (nSiO ₂) 3. Micro-TiO ₂ (mTiO ₂) 4. Nano-TiO ₂ (nTiO ₂)
	詳細	1. Sigma-Aldrich 社、粒径 : 1-5 μm 、比表面積 : 5.1 m ² /kg(BET)、石英(q-quartz) 2. Sigma-Aldrich 社、粒径 : 14 nm、比表面積 : 77.7 m ² /kg(BET)、アモルファス 3. Sigma-Aldrich 社、粒径 : 1 μm 、比表面積 : 5.8 m ² /kg(BET)、ルチル型 4. デガッサ社、粒径 : 30 nm、比表面積 : 35.7 m ² /kg(BET)、ルチル型
	調製方法	in vitro : DPBS に 2 分間超音波処理した懸濁液を調製後、SFM 培養液で希釈、in vivo : DPBS に懸濁
	暴露前観察方法	記載なし
	In vitro	条件等 細胞種
In vivo	条件等 投与経路	マウス(Balb/C、雄、6 週齢、19-24 g) 咽頭
結果	in vitro 試験で、粒状物質暴露群に用量相関的な細胞生存率の減少、LDH 値の減少が見られた。Nano-SiO ₂ 暴露群は Micro-SiO ₂ 暴露群と比べ明らかに細胞生存率が減少し、高用量 Nano-SiO ₂ 暴露群の LDH 値は有意な減少を示した。一方、in vivo 試験で BAL 液中のナノ粒子に軽度の凝集が見られた。SiO ₂ 暴露群で総細胞数、マクロファージ、好中球数が著増し、特に Nano-SiO ₂ が顕著であった。TiO ₂ 暴露群は、SiO ₂ 暴露群に比べ緩やかな増加を示したが、Micro-TiO ₂ 高用量暴露群は好中球数を除き、SiO ₂ 暴露群と同様の増加を示した。病理学的所見で、ナノ粒子暴露群はマイクロ粒子暴露群に比べ、細胞毒性が強く、用量に依存して肺の損傷及び好中球浸潤が多く見られた。	

文献 No.	1	
書誌情報	M. Yokohira et al., J. Toxicol. Pathol., 22, 71-, 2009	
試験目的	肺の発がん性バイオアッセイ	
実験方法	グループ 1-6 : 0.1% DHPN 含有水を 2 週間投与、4 週目に以下被検試料 0.5mg/ラットを 0.2 mL の生理食塩水に懸濁させ気管内注入、グループ 1,7 : 石英、グループ 2,8 : CuO micro、グループ 3,9 : CuO nano、グループ 4,10 : TiO ₂ micro、グループ 5,11 : TiO ₂ nano、(グループ 6 : DHPN 対照群、グループ 12 : 未処理対照群)、30 週目に屠殺、検査項目 : 体重、臓器重量(絶対、相対)、一般所見、剖検所見、病理検査	
対象 endpoint	肺の発がん性	
被検試料	物質名	1. 二酸化チタン(TiO ₂ micro)
		2. 二酸化チタン(TiO ₂ nano)
		3. 酸化銅(CuO micro)
		4. 酸化銅(CuO nano)
		5. 石英粉塵(Quartz dust : DQ-12)
	詳細	1. 和光純薬工業(株)、粒径 : < 5 μ m、ルチル型、(Lot. TCG4139)
		2. 和光純薬工業(株)、粒径 : 80 nm、(Lot. DPN0960)
3. Sigma-Aldrich 社、粒径 : < 5 μ m		
4. Sigma-Aldrich 社、粒径 : 33 nm		
5. Deutsche Montan Technologies 社、粒径 : < 7 μ m		
調製方法	生理食塩水に懸濁	
暴露前観察方法	記載なし	
In vitro	条件等	—
	細胞種	—
In vivo	条件等	ラット(F344/DuCrIcrj、雄、4 週齢)
	投与経路	気管内注入
結果	ナノ粒子暴露群の影響として、剖検所見で DHPN 無投与の CuO 暴露群で肺表面に軽度の結節性変化が見られたが、TiO ₂ 投与群に変化はなかった。病理学的所見で、DHPN 投与群全ての肺に過形成、腺腫、腺癌が見られた。また CuO 及び TiO ₂ ナノ粒子投与群のほうがそれらのマイクロ粒子投与群に比べ腫瘍性病変の数や面積に増加傾向が見られた。DHPN 無投与群では CuO 暴露群の肺に軽度の炎症性変化が見られたが、TiO ₂ 投与群に変化はなかった。	

文献 No.	2	
書誌情報	M. Shimizu et al., Particle and Fibre Toxicol., 6(20), 1, 2009,	
試験目的	遺伝子発現に対する影響	
実験方法	1µg/µL TiO ₂ 懸濁液 100µL を妊娠マウス（妊娠 6 日目、9 日目、15 日目）に投与。懐胎 16 日目(ED 16)の雄胎仔および生後 2 日、7 日、14 日および 21 日の雄から脳組織を採取・抽出し、遺伝子オントロジー(GO)および Medical Subject Headings (MeSH)による DNA マイクロアレイ分析で仔に対する影響を評価。	
対象 endpoint	発生毒性、遺伝毒性	
被検試料	物質名	二酸化チタン(TiO ₂)
	詳細	Sigma-Aldrich 社、粒径：25-70 nm, 比表面積：20-25 m ² /g, アナターゼ型
	調製方法	0.05 %(v/v)の Tween 80 を含む生理食塩水に 1µg/µL 濃度で TiO ₂ を超音波処理して懸濁液調製
	暴露前観察方法	記載なし
In vitro	条件等	—
	細胞種	—
In vivo	条件等	妊娠マウス(Pregnant ICR mice)
	投与経路	皮下
結果	GO terms による遺伝子発現の分析で、アポトーシスに関連した新生仔の脳に変異が見られ、脳発達に関連する遺伝子発現で早い時期に変異が観察された。酸化ストレス反応に関連する遺伝子は 2~3 週齢のマウスの脳で変異が観察された。神経伝達と精神疾病に関連する遺伝子の発現は MeSH terms で観察された。	

文献 No.	20	
書誌情報	K. Takeda et al., J. Health Sci., 55(1), 95 (2009)	
試験目的	出生前暴露における仔の生殖器および中枢神経への影響	
実験方法	1mg/mL TiO ₂ 懸濁液 100μL を交尾後 3、7、10、14 日目に投与。4 日または 6 週齢の雄仔動物の体重および生殖器臓器重量を測定。TEM、FE-SEM 及び FE-SEM/EDS 測定(精巣、脳組織)、精液の運動性と形態学評価、精子生産量、精巣の形態学的観察、アポトーシス評価	
対象 endpoint	発生毒性	
被検試料	物質名	二酸化チタン(TiO ₂)
	詳細	Sigma-Aldrich 社、粒径：25-70 nm、比表面積：20-25 m ² /g、アナターゼ型、純度：99.9%
	調製方法	0.05 % Tween 80 を含む生理食塩水に 1mg/mL 濃度の TiO ₂ 懸濁液
	暴露前観察方法	FE-SEM
In vitro	条件等	—
	細胞種	—
In vivo	条件等	妊娠マウス(Pregnant ICR mice)
	投与経路	皮下
結果	TiO ₂ 暴露群では、対照群に比べ有意な体重及び表皮相対重量の減少が見られたが、他の生殖器系臓器の相対重量に有意な変化は見られなかった。仔の脳や精巣に粒子の凝集が見られた。精巣に異常が見られ、精子生産量、精巣上体精子運動およびセルトリ細胞数は対照群に比べ有意に低値を示した。精子形態学に有意な差はなかった。脳内血管の周囲に未同定粒状物質を含むにアポトーシス像が認められた。また小血管の詰りや血管周囲に浮腫が見られた。	

文献 No.	35	
書誌情報	D. Drobne et al., Environ. Pollut., 157, 1157, 2009	
試験目的	生体系への反応	
実験方法	濃度 0-1000 ug TiO ₂ /g dry food を 3 日または 14 日間暴露(乾燥させた葉にペイントブラシで分散)、餌の消化率、摂餌効率、カタラーゼ活性、グルタチオン・S-トランスフェラーゼ活性(microtiter plates 法)、死亡数、体重	
対象 endpoint	グルタチオン・S-トランスフェラーゼ活性、カタラーゼ活性、死亡数	
被検試料	物質名	1. 二酸化チタン(TiO ₂) 2. 二酸化チタン(TiO ₂)
	詳細	1. Sigma-Aldrich 社、粒径：<25 nm、比表面積：200-220 m ² /g、アナターゼ型(入手先のデータ)；BET；粒径：10 nm、比表面積：145 m ² /g、TEM(水分散状態)；単一粒子粒径：10-20 nm、単一粒子形状：丸状及び細長い、密集した凝集体(N)及び緩い凝集体(S)が存在、DLS(水分散状態の凝集体のサイズ)；非超音波処理：750-950 nm、超音波処理：400-460 nm 2. Sigma-Aldrich 社、アモルファス液体メジウム(水に 5 wt%で分散)、粒径：<50 nm(XRD), <75 nm(BET)、ルチル型とアナターゼ型の混合物(入手先のデータ)；BET；粒径：40 nm、比表面積：40 m ² /g、TEM(水分散状態)；単一粒子粒径：10-120 nm、単一粒子形状：丸状、緩い凝集体(N)が存在、DLS(水分散状態の凝集体のサイズ)；非超音波処理：100-200 nm
	調製方法	あらかじめ超音波をかけたものとかけないもの各々を再蒸留水(pH 5.7)にボルテックスで分散。
	暴露前観察方法	BET、TEM、DLS
In vitro	条件等	—
	細胞種	—
In vivo	条件等	P. scaber Latreille (ワラジムシ)
	投与経路	混餌
結果	2 種粒径とも、暴露期間 3 日間及び 14 日間で死亡数、体重変化、グルタチオン・S-トランスフェラーゼ活性に影響はなかった。暴露期間に依存してカタラーゼ活性及び摂餌パラメーター(餌の消化率及び摂餌効率)に影響が見られた。TiO ₂ (<25 nm)ナノ粒子はカタラーゼ活性及び摂餌パラメーターに用量相関性に閾値のようなものが見られたが、TiO ₂ (<75 nm)ナノ粒子には見られなかった。さらに超音波前処理をした被検試料暴露群で餌の消化率に向上が見られたが、超音波前処理をしないもので同様の影響は見られなかった。カタラーゼ活性の増加は超音波処理のあるなしにかかわらず増加した。	

文献 No.	39	
書誌情報	G. Liang et al., J. Toxicol. Environ. Health, Part:A, 72, 740, (2009)	
試験目的	酸化ストレスとの相互作用を伴う肝臓及び腎臓機能に対する影響	
実験方法	暴露濃度：0-50 mg/kg、暴露期間：単回投与、1週間後に屠殺、肝臓及び腎臓機能：TP, ALB, ALT, AST, BUN, CR、肝臓及び腎臓の相対重量、酸化ストレス酵素(血漿、肝臓及び腎臓中のSOD、GSH-PX、MDA)、病理検査	
対象 endpoint	急性毒性、肝臓および腎臓機能	
被検試料	物質名	1. 二酸化チタン(TiO ₂ -S50) 2. 二酸化チタン(TiO ₂ -S210)
	詳細	1. Degussa Corporation、平均粒径：<21 nm(TEM)、比表面積：50 m ² /g(BET) 2. Hongsheng Materials Technology Company Lid.、平均粒径：5 nm(TEM)、比表面積：210 m ² /g(BET)
	調製方法	0.15%(w/w)の塩化ナトリウム水溶液にナノ粒子を分散させ、超音波処理を15-20分行い、十分分散させるためさらに2-3分機械的に振動させた。
	暴露前観察方法	記載なし
In vitro	条件等	—
	細胞種	—
In vivo	条件等	ラット(Sprague-Dawley、雌雄、180~200 g)
	投与経路	気管
結果	TiO ₂ -S210 と TiO ₂ -S50 共に肝臓機能(AST, ALT)、腎臓機能(BUN, CR)に顕著な影響は見られず、これらの病理所見においても有意な病変は見られなかった。TiO ₂ -S210 は SOD 活性、GSH-PX 活性が対照群または TiO ₂ -S50 投与群と比べ有意な減少を示し、肝臓中の MDA 値は両粒径とも対照群に比べ有意な増加を示した。腎臓中 MDA 値は TiO ₂ -S210 のみ有意な増加を示した。	

文献 No.	51	
書誌情報	J. Chen et al., J. Appl. Toxicol., 29: 330, 2009	
試験目的	体内動態	
実験方法	暴露濃度 0-2592 mg/kg で腹腔内単回投与、7 日目及び 14 日目に屠殺、血清生化学検査、各臓器への蓄積(ICP-MS)、病理検査、肝臓及び腎臓機能（投与後 24 時間、48 時間）	
対象 endpoint	急性毒性、動態、病理学的所見	
被検試料	物質名	合成二酸化チタン(TiO_2)、アナターゼ型、平均結晶サイズ：3.6 nm、平均粒径：80-110 nm(主に 100 nm)
	詳細	ゾルゲル法で TiO_2 を合成
	調製方法	酸性条件化ゾルゲル法で、 $\text{Ti}(\text{OC}_4\text{H}_9)_4$ を加水分解して重縮合して合成
	暴露前観察方法	TEM、XRD
In vitro	条件等	—
	細胞種	—
In vivo	条件等	マウス(ICR、雌雄、約 4 週齢、 20 ± 2 g)
	投与経路	腹腔
結果	受動的行動、食欲減退、振戦、嗜眠が見られ、血清生化学検査で BUN に有意な影響が見られなかったが、ALT、AST のわずかな上昇が見られた。 TiO_2 の蓄積は脾臓が最も多く、肝臓、腎臓及び肺にも沈着していた。病理検査で、 TiO_2 が脾臓に入り、病変がおきていた。肺血管に TiO_2 が詰まり血栓が見られた。さらに肝細胞壊死やアポトーシス、肝線維症、腎糸球体腫張、間質性肺炎、肺胞隔壁の肥厚が高用量投与群に見られた。	

文献 No.	58	
書誌情報	J. Valant et al., J. Hazardous Mater., 171, 160, 2009.	
試験目的	細胞毒性評価	
実験方法	AO/EB assay の in vivo での応用と、ナノ粒子の細胞膜不安定化への関与を考察するために、AO/EB assay を以下の条件で行った。1 グループ 6 匹。ナノ粒子を含む AO/EB 混合染色液を、それぞれ体重の 1/10 量 (約 3µl)、3 回直接経口投与。ナノ粒子の投与濃度は各 1000µg/mL。最終投与 10min 後に解剖、肝臓を摘出。色と形状を記録し、蛍光顕微鏡下で生体内消化系における色素分布を測定した。同試験系のポジティブコントロールとしては、細胞膜の浸透性上昇に関与することが知られている Cu ²⁺ 、サポニン、poly-APS を用いた。染色液の液量、投与量等の詳細はナノ粒子と同様。Cu ²⁺ は Cu(NO ₃) ₂ として投与、投与濃度は 1~1000µg/mL の 4 濃度。サポニンの投与濃度は 0.0005、50、200 mg/mL。poly-APS の投与濃度は 0.022、1.1、2.2 mg/mL。	
対象 endpoint	急性毒性	
被検試料	物質名	1. C ₆₀ (フラーレン)
		2. 酸化チタン (TiO ₂)
		3. 酸化亜鉛 (ZnO)
		4. バルク酸化亜鉛 (bulk ZnO)
被検試料	詳細	1. Sigma-Aldrich 社
		2. Sigma-Aldrich 社、大きさ : <25nm、形状 : powder、anatase crystalline structure、純度 : 99.7%、surface area : 200-220m ² /g
		3. Sigma-Aldrich 社
		4. Sigma-Aldrich 社
被検試料	調製方法	1. 30 分超音波処理を行った後、滅菌水に懸濁。凝集を観察。 2-3. 培養液、もしくは滅菌水に懸濁して凝集を観察。ナノ粒子超音波処理の有無により、それぞれ以下の 2 種類の試料を調製した。 TiO ₂ N : 培養液に懸濁、未処理、TiO ₂ S : 培養液に懸濁、30 分超音波処理 ZnON : 培養液に懸濁、未処理、ZnOS : 培養液に懸濁、30 分超音波処理
	暴露前観察方法	TEM、動的光散乱法、BET analysis、原子吸光分析法
In vitro	条件等	—
	細胞種	—
In vivo	条件等	adult <i>Porcellio scaber</i> (ワラジムシ)、体重 : >30 mg
	投与経路	oral (directly)
結果	本試験に用いた、bulk ZnO 以外の全てのナノ粒子は、細胞膜の不安定化に関与していた。超音波処理済の被検試料投与群では、細胞膜の透過性はいずれも有意に上昇しており、C ₆₀ 投与群で最も顕著であった。	

文献 No.	65	
書誌情報	N. Kobayashi et al., Toxicol., 264, 110 (2009)	
試験目的	生物学的反応	
実験方法	<p>実験 1 ; 被験物質 : 一次粒子径の違うナノ粒子 3 種を濃度 5 mg/kg で、単回投与、投与後 24 時間~1 ヶ月目に検査。</p> <p>実験 2 ; 被験物質 : 一次粒子径は同じで、液体中違う凝集をしたナノ粒子 3 種を濃度 5 mg/kg で、単回投与、投与後 24 時間~91 日目に検査。</p> <p>実験 1、2 共に体重、肺重量、BAL 検査、炎症バイオマーカーの評価、肺及び他の組織(肝臓、脾臓、大脳)の病理検査</p>	
対象 endpoint	急性毒性、肺の炎症応答	
被験試料	物質名	<p>1. 二酸化チタン(TiO₂)(製品名 : ST-01, ultrafine(UF))</p> <p>2. 二酸化チタン(TiO₂)(製品名 : ST-21, superfine(SF))</p> <p>3. 二酸化チタン(TiO₂)(製品名 : ST-41, fine(F))</p>
	詳細	<p>1. 石原産業株式会社、ST-01(実験 1 用) ; UF : アナターゼ型、一次粒子径 : 4.9 nm、比表面積 : 316 m²/g、二次粒子径 : 19 nm(13.5-31.3) (実験 2 用) 3 種の凝集法の違う試料 ; UF1、UF2、UF3 は ST-01 より調製(調製方法に記載) : アナターゼ型、一次粒子径 : 4.9 nm、比表面積 : 316 m²/g(共通)、二次粒子径 : UF1 は 18.0 nm(14.8-23.9)、UF2 は 64.5nm(35.8-113.8)、UF3 は 299.2 nm(216.4-422.0)</p> <p>2. 石原産業株式会社、ST-21(実験 1 用) ; SF : アナターゼ型、一次粒子径 : 23.4 nm、比表面積 : 66.0 m²/g、二次粒子径 : 28.4 nm(19.2-43.9)</p> <p>3. 石原産業株式会社、ST-41(実験 1 用) ; F : アナターゼ型、一次粒子径 : 154.2 nm、比表面積 : 10.0 m²/g、比表面積 : 10.0 m²/g、二次粒子径 : 176.3 nm(109.9-311.9)</p>
	調製方法	<p>蒸留水に分散剤として第二リン酸ナトリウム(DSP)を添加(実験 1 用) ; UF : DSP 添加後、ビーズミルで攪拌し、遠心分離(8000g, 1h)、DSP 濃度は 2 mg/mL、SF : DSP 添加後、ビーズミルで攪拌し、1µm 孔径フィルターろ過後のろ液で DSP 濃度は 2 mg/mL、F : DSP 添加後、ビーズミルで攪拌し、1µm 孔径フィルターろ過後のろ液で DSP 濃度は 1 mg/mL(実験 2 用) ; UF1 : ST-01 をビーズミルで攪拌後遠心分離(16000g, 1h)し上澄みを回収したもので DSP 濃度は 2 mg/mL、UF2 : ST-01 を超音波処理で分散後、0.1-1µm 孔径のろ過後のろ液で DSP 濃度は 3.4 mg/mL、UF3 : ST-01 をビーズミルで攪拌後、1µm 孔径のろ過後のろ液を遠心分離(1000g, 1h)し上澄みを回収したもので DSP 濃度は 13 mg/mL</p>
	暴露前観察方法	DSL、TEM、XRF、pH
In vitro	条件等	—
	細胞種	—
In vivo	条件等	ラット(Crl: CD (SD)、雄、8 週齢、279~335 g)
	投与経路	気管
結果	<p>実験 1 で、投与後 1 週間以内では、炎症バイオマーカー及び組織の炎症反応は、UF>SF>F の順だったことから、肺の炎症反応は粒径に依存(粒径が小さいほど強く肺の炎症反応を誘発)していた。投与後 1 ヶ月以上の影響として、全ての TiO₂ 暴露群で肺の炎症反応が著しく回復し、粒径の違いによる差異はなかった。実験 2 で、炎症バイオマーカーと組織の炎症反応が見られたのは</p>	

	<p>投与から 24 時間後のみで、他の観察時間に有意な差異は見られなかった。 また、投与から 1 ヶ月後の炎症反応は全ての TiO₂ 暴露群で回復が見られた。 よって同じ一次粒子で違う凝集をした物質の肺に対する炎症反応に明らかな 相関性は見られなかった。</p>
--	---

文献 No.	77	
書誌情報	J. Wang et al., Toxicology, 254, 82 (2008)	
試験目的	経時的転移と中枢神経系への影響	
実験方法	2、10、30 日間 1 日おきに約 500 μ g/マウス量を鼻腔内投与。嗅球、大脳皮質、海馬及び小脳を含むサブユニット(sub-brain)中及び脳全体の TiO ₂ 含有量、血清中バイオマーカー(肝機能、腎機能、コレステロール)、脳中の酵素活性(GSH-Px、GST、SOD、GSH、MDA)、病理検査(心臓、肝臓、脾臓、腎臓、肺、脳)、TEM(海馬、嗅球)、サイトカイン(血清、脳)	
対象 endpoint	病理学的所見、中枢神経系損傷	
被験試料	物質名	1. 酸化チタン (TiO ₂ : ナノサイズ)、80 nm 2. 酸化チタン (TiO ₂ : commercial fine)、155 nm
	詳細	1. Hangzhou Dayang Nanotechnology 社、粒径 : 80 nm(平均サイズ : 71.4 \pm 23.5 nm、ルチル型、細孔径 : 16.6 nm、純度 : 99%以上) 2. Zhonglian Chemical Medicine 社、粒径 : 155 nm(平均サイズ : 155.0 \pm 33.0 nm、アナターゼ型、細孔径 : 16.7 nm)
	調製方法	凝集を防ぐため、投与 2 分前に試料を Milli-Q 水に分散させ、超音波に続いてボルテックスして調製。
	暴露前観察方法	ICP-MS、蛍光 X 線
In vitro	条件等	—
	細胞種	—
In vivo	条件等	ラット(CD-1、雌)
	投与経路	鼻腔
結果	投与された TiO ₂ 粒子は嗅球を經由して直接脳への移行を示し、特に海馬領域に沈着が観察された。30 日間 TiO ₂ 粒子投与後に MDA 値の経時的増加が見られ、その傾向は 155 nm 粒子のほうが 80 nm 粒子より顕著であった。病理検査で、腎臓に重度の腎糸球体萎縮、浸潤等見られたが、心臓、肝臓及び脾臓に変化はなかった。また嗅球で神経細胞数の増加と神経層の神経細胞に不規則な配列、核にクロマチン凝縮分布と少量のミトコンドリアの増加が見られ、海馬神経細胞にも変性、ミトコンドリアの減少と粗面小胞体及び遊離リボソームの増加が細胞質に見られた。免疫応答評価で、155 nm TiO ₂ 粒子暴露群で脳内 TNF- α 、IL-18 値の有意な上昇が見られた。	

2.2.5 酸化亜鉛微粒子

文献 No.	23	
書誌情報	W. Lin et al., J. Nanoparticle Res., 11, 25 (2009)	
試験目的	細胞毒性、DNA 損傷、酸化ストレス	
実験方法	濃度 0~25µg/mL で暴露時間 0~48 時間での細胞生存率評価、濃度 10、12、14µg/mL で暴露時間 24 時間での酸化ストレス(ROS、GSH、脂質過酸化物)及び細胞膜損傷 (LDH 活性)、暴露量 0~14µg/mL で DNA 損傷評価(コメットアッセイ)、NAC(0~0.5 mM)を添加した場合及び遊離 Zn ²⁺ (ZnSO ₄)暴露量 0~16µg/mL での細胞生存率評価	
対象 endpoint	酸化ストレスバイオマーカー、DNA 損傷、細胞生存率	
被検試料	物質名	1. 酸化亜鉛粒子(ZnO) : 70 nm 2. 酸化亜鉛粒子(ZnO) : 420 nm
	詳細	1. Sigma-Aldrich 社、純度 : >99.98%、粒径 : 70±13、比表面積 : 12.16 m ² /g、六方晶系、金属不純物含有量 : 169.5 ppm 2. Sigma-Aldrich 社、純度 : >99.98%、粒径 : 420±269、比表面積 : 8.61 m ² /g、六方晶系、金属不純物含有量 : 56.6 ppm
	調製方法	試験毎に血清を含む細胞培養液に粒子を加え、超音波で 5 分間処理して分散させ、血清を含む培地で目的濃度に調製
	暴露前観察方法	TEM、BET、XRD、ICP-MS、DLS
In vitro	条件等	ヒト気管支肺癌由来細胞(A549)
	細胞種	肺・気管
In vivo	条件等	—
	投与経路	—
結果	細胞生存率は ZnO 粒子の暴露量及び暴露時間に依存して有意に減少した。両粒径ともに暴露量 8-18µg/mL と狭い範囲で細胞毒性が見られた。また、質量基準及び比表面積基準暴露量に対し、70 nm と 420 nm ZnO 粒子で誘引された細胞毒性パターンに違いが見られた。細胞内酸化ストレスを示す ROS 値及び脂質過酸化物量の増加、GSH 値の減少、LDH 値の上昇及び酸化的 DNA 損傷の増加が見られた。ZnO 粒子が誘引する細胞毒性を抗酸化剤 NAC 投与により細胞生存率減少を阻害することができた。また、遊離 Zn ²⁺ 及び ZnO に含まれる金属不純物が主なる ROS 誘引物質でないことが示された。	

文献 No.	30		
書誌情報	X. Hu et al., Sci. Total Environ., 407, 3070 (2009)		
試験目的	細胞毒性		
実験方法	各暴露濃度範囲(mg/L) : CuO(25-200)、ZnO(50-150)、Al ₂ O ₃ (600-1200)、La ₂ O ₃ (200-600)、Fe ₂ O ₃ 、SnO ₂ 、TiO ₂ (600-1200)で、2時間培養、LD50、La ₂ O ₃ の代謝率(¹⁴ C-グルコースの無機化)		
対象 endpoint	LD50 (fatal to 50% of the bacterium E. coli)		
被検試料	物質名	1. 酸化亜鉛 (ZnO) 2. 酸化銅 (CuO) 3. 酸化アルミニウム (Al ₂ O ₃) 4. 酸化ランタン (La ₂ O ₃) 5. 酸化鉄 (Fe ₂ O ₃) 6. 酸化スズ (SnO ₂) 7. 酸化チタン (TiO ₂)	
	詳細	1~7. Sigma-Aldrich 社、粒径 : 30-40 nm	
	調製方法	MilliQ 水で 20 分間超音波処理	
	暴露前観察方法	記載なし	
	In vitro	条件等	E. coli(Migula)
		細胞種	細菌
	In vivo	条件等	—
投与経路		—	
結果	LD50 値(mg/L)は、CuO(64.5)、ZnO(21.1)、Al ₂ O ₃ (326.1)、La ₂ O ₃ (456.9)、Fe ₂ O ₃ (638.3)、SnO ₂ (1045.6)、TiO ₂ (1104.8)で、ZnO が最も E. coli に対して毒性が強かった。CuO は E. coli の生菌数を有意に減少させ、SnO ₂ は僅かに、Fe ₂ O ₃ 、La ₂ O ₃ 、Al ₂ O ₃ は中程度の細胞毒性を示した。La ₂ O ₃ を用いた ¹⁴ C-グルコースの無機化試験結果と細菌の生存力試験結果は対応しており、各々の LD50 値は類似していた。		

文献 No.	55	
書誌情報	V. Sharma et al., Toxicol. Lett., 185, 211 (2009)	
試験目的	遺伝毒性、細胞毒性	
実験方法	細胞毒性は濃度 0.008~20 μ g/mL で 3、6、24、48 時間暴露後、MTT アッセイ、NRU アッセイ、LDH 活性放出アッセイで評価。細胞形態は濃度 8 μ g/mL で 6、24、48 時間暴露及び濃度 5 μ g/mL で 24、48 時間暴露した A431 細胞を観察、濃度 0.001、0.008、0.08、0.8、5 μ g/mL で 6 時間暴露したときの細胞生存率測定及びコメットアッセイ、濃度 0.001、0.008、0.08、0.8 μ g/mL で 24 時間暴露したときの酸化ストレス評価、GSH 量、脂質過酸化物量、カタラーゼ活性、SOD 活性測定	
対象 endpoint	酸化ストレスマーカー、DNA 損傷、細胞生存率、細胞形態	
被検試料	物質名	酸化亜鉛(ZnO)ナノパウダー、平均粒径：50~70 nm(BET)
	詳細	Sigma-Aldrich 社、純度：>99%、流体力学的平均粒径：165 nm、平均粒径：30 nm(TEM)、ゼータ電位：-26 mV
	調製方法	Milli-Q 水に懸濁させ、保存懸濁液を 10 分間プローブ超音波処理、DMEM で暴露濃度に希釈
	暴露前観察方法	DLS、ゼータ電位(PALS)、TEM
In vitro	条件等	ヒト表皮細胞株 (A431)
	細胞種	皮膚
In vivo	条件等	—
	投与経路	—
結果	MTT、LDH 活性及び MRU アッセイ結果、ZnO ナノ粒子暴露により細胞毒性が暴露量及び暴露時間に依存して見られた。また、ZnO ナノ粒子暴露により細胞形態に変化が見られ、正常形態を持つ細胞の減少が 6 時間 8 μ g/mL 暴露濃度でも観察された。酸化ストレスマーカーの脂質過酸化物の増加、酸化系応答をする GSH、SOD 及びカタラーゼの減少が 24 時間 0.008 μ g/mL 以上の暴露濃度で見られた。ZnO ナノ粒子暴露により DNA 損傷を誘発することがコメットアッセイの結果、オリブテイルモーメントが対照群に比べ有意な変化を示すことから明らかになった。	

文献 No.	67	
書誌情報	H. Yang et al., J. Appl. Toxicol., 29, 69, 2009.	
試験目的	細胞毒性評価、遺伝毒性評価	
実験方法	被検試料濃度 0-100µg/mL。24hrs 暴露。初代マウス胚線維芽細胞を用いて細胞生存率の測定 (MTT assay、WST assay、LDH 活性測定)、ROS 産生量測定、oxidative stress assay (GSH、SOD、MDA 測定)、comet assay による in vitro 遺伝毒性試験を行った。	
対象 endpoint	in vitro 急性毒性、生殖細胞変異原性	
被検試料	物質名	1. カーボンブラック (CB)
		2. カーボンナノチューブ (CNTs)
		3. 二酸化ケイ素 (SiO ₂)
		4. 酸化亜鉛 (ZnO)
	詳細	1. Nano-Innovation 社、大きさ: 12.3 ± 4.1 nm、形状: Sphere、純度: >99.4% 2. COCC, Chinese Academy of Science、直径: 8 nm、長さ: <5µm、形状: Rope-Shaped、純度: >99.9% 3. Runhe 社、大きさ: 20.2 ± 6.4 nm、形状: Crystal structure、純度: >99.0% 4. Nanuo 社、大きさ: 19.6 ± 5.8 nm、形状: Crystal structure、純度: >99.9%
調製方法	各被検試料を 4 hrs、180 °C で加熱。FBS に懸濁。Lam ら (2004)、Leong ら (1998) の方法に従い調製。培養液にて希釈した。	
暴露前観察方法	TEM、ラマン分光法	
In vitro	条件等	primary mouse embryo fibroblast cells (BALB/3T3)
	細胞種	初代マウス胚線維芽細胞
In vivo	条件等	—
	投与経路	—
結果	MTT assay、WST assay では、生存率の低下は用量依存的に有意であった。特に ZnO 処理群においては、他の被検試料処理群と比べて、非常に高い細胞毒性が認められ、oxidative stress assay についても、活性酸素の発生が有意に認められた。CNTs 処理群の細胞毒性は、ZnO 処理群に比べ中程度であった。しかし、comet assay では、他の被検試料処理群と比べて、DNA 損傷の度合いは有意に大きかった。	

文献 No.	75	
書誌情報	T. Xia et al., ACS Nano, 2 (10), 2121, 2008	
試験目的	細胞毒性のメカニズム、酸化ストレスと物理化学的性状の関連性	
実験方法	細胞死及び生存率評価(各ナノ粒子濃度 25µg/mL で 1~16 時間暴露、濃度 6~100µg/mL で 16 時間暴露、ZnO ナノ粒子濃度 12.5~50µg/mL と相当濃度の ZnSO ₄ (150~600µM)で 6 時間暴露)、H ₂ O ₂ 発生量(非生物系試験: 暴露濃度 10µg/mL)。以下、濃度 25µg/mL で 1~16 時間暴露での ROS 生成量(H ₂ O ₂ 及び O ^{2•-})、酸化ストレスの 1-3 Tiers 評価(Tier 1: HO-1 発現、Tier 2: JNK 活性、TNF-α 及び IL-8 産生、Tier 3: [Ca ²⁺]量及びミトコンドリア膜電位)、CeO ₂ の細胞保護評価(CeO ₂ を 25µg/mL 濃度で 24 時間細胞処理後、25µg/mL の DEP で 16 時間暴露し、細胞死を測定)、細胞プロセッシング及び影響評価(電子顕微鏡、共焦点顕微鏡)	
対象 endpoint	細胞生存率、酸化ストレスバイオファクター	
被検試料	物質名	1. 酸化チタンナノ粒子(TiO ₂) 2. 酸化亜鉛ナノ粒子(ZnO) 3. 酸化セリウムナノ粒子(CeO ₂)
	詳細	1.チタン(IV)テトライソプロポキシド(アルドリッチ社、純度:97%)と m-キシレンより FSP 反応器で合成。一次粒子径: 11 nm、単結晶、アナターゼ型/ルチル型=80:20 の混合物、粒径(nm): 612(水)、284(DMEM)、493(BEGM 中)、ゼータ電位(mV): -8(水)、-10(DMEM)、-9(BEGM) 2.ナフテン酸亜鉛(アルドリッチ社、Zn<8 wt%)と m-キシレンより FSP 反応器で合成。一次粒子径: 13 nm、単結晶、紅亜鉛鉱、粒径(nm): 413(水)、36(DMEM)、184(BEGM)、ゼータ電位(mV): -15(水)、-5(DMEM)、-16(BEGM 中) 3.トリス(2-エチルヘキサン酸)セリウム(III)、49%含有 2-エチルヘキサン酸(Alfa Aesar 社、Ce: 12%)と m-キシレンより FSP 反応器で合成。一次粒子径: 8 nm、単結晶、立方晶系、粒径(nm): 2610(水)、323(DMEM)、596(BEGM)、ゼータ電位(mV): +15(水)、-10(DMEM)、-10(BEGM)
	調製方法	懸濁液を培養液に加え、細胞暴露前に 10 秒間超音波処理
	暴露前観察方法	BET、XRD、TEM、DLS、ZetaPALS(粒径、ゼータ電位)
	条件等	
In vitro	細胞種	1. マウスマクロファージ(RAW 264.7) 2. ヒト気管支上皮細胞(BEAS-2B)
	条件等	—
In vivo	条件等	—
	投与経路	—
結果	ZnO ナノ粒子は RAW 264.7 細胞、BEAS-2B 細胞ともに用量及び時間に依存して細胞毒性を誘発し、ROS 産量、酸化的損傷、炎症反応及び細胞死を引き起こしたが、TiO ₂ と CeO ₂ ナノ粒子は毒性を示さなかった。酸化ストレスについて段階的に評価したところ、ZnO は HO-1 の発現、Nrf2 及び NQO-1 の増加(Tier 1)、リン酸化 JNK の活性化、TNF-α 及び IL-8 の増加(Tier 2)、細胞内遊離[Ca ²⁺]濃度の上昇、ミトコンドリア損傷(Tier 3)で損傷応答を示した。また、選択的細胞プロセッシングと細胞超微細構造への影響評価で、ZnO は培養液やエンドソームで溶解することが示され、非溶解 ZnO ナノ粒子は	

BEAS-2B 細胞のカベオラに入り毒性とカベオラの凝集の関連性が示され、RAW 264.7 細胞ではリソソームに入り酸性下で粒子の溶解による Zn^{2+} の確認、リソソーム凝集が観察された。対照的に蛍光ラベル化した CeO_2 ナノ粒子は BEAS-2B 細胞のカベオリン-1 陽性及び RAW 264.7 細胞後期エンドソーム(LAMP-1)コンパートメントにそのままの形で吸収され炎症や細胞毒性を示さず、ROS 生成を抑制し、外因性酸化ストレスから細胞を防御した。 TiO_2 は CeO_2 と同様の吸収経路を示したが、有害性や細胞保護影響を示さなかった。細胞毒性における ZnO ナノ粒子と Zn^{2+} イオンの関連性は、培養液に溶解した Zn^{2+} がリソソームでの吸収及び金属イオン封鎖により明らかな原因のひとつであることが示唆された。

文献 No.	58	
書誌情報	J. Valant et al., J. Hazardous Mater., 171, 160, 2009.	
試験目的	細胞毒性評価	
実験方法	AO/EB assay の in vivo での応用と、ナノ粒子の細胞膜不安定化への関与を考察するために、AO/EB assay を以下の条件で行った。1 グループ 6 匹。ナノ粒子を含む AO/EB 混合染色液を、それぞれ体重の 1/10 量 (約 3µl)、3 回直接経口投与。ナノ粒子の投与濃度は各 1000µg/mL。最終投与 10min 後に解剖、肝臓を摘出。色と形状を記録し、蛍光顕微鏡下で生体内消化系における色素分布を測定した。同試験系のポジティブコントロールとしては、細胞膜の浸透性上昇に関与することが知られている Cu ²⁺ 、サポニン、poly-APS を用いた。染色液の液量、投与量等の詳細はナノ粒子と同様。Cu ²⁺ は Cu(NO ₃) ₂ として投与、投与濃度は 1~1000µg/mL の 4 濃度。サポニンの投与濃度は 0.0005、50、200 mg/mL。poly-APS の投与濃度は 0.022、1.1、2.2 mg/mL。	
対象 endpoint	急性毒性	
被検試料	物質名	1. C ₆₀ (フラーレン)
		2. 酸化チタン (TiO ₂)
		3. 酸化亜鉛 (ZnO)
		4. バルク酸化亜鉛 (bulk ZnO)
被検試料	詳細	1. Sigma-Aldrich 社
		2. Sigma-Aldrich 社、大きさ : <25nm、形状 : powder、anatase crystalline structure、純度 : 99.7%、surface area : 200-220m ² /g
		3. Sigma-Aldrich 社
		4. Sigma-Aldrich 社
被検試料	調製方法	1. 30 分超音波処理を行った後、滅菌水に懸濁。凝集を観察。 2-3. 培養液、もしくは滅菌水に懸濁して凝集を観察。ナノ粒子超音波処理の有無により、それぞれ以下の 2 種類の試料を調製した。 TiO ₂ N : 培養液に懸濁、未処理、TiO ₂ S : 培養液に懸濁、30 分超音波処理 ZnON : 培養液に懸濁、未処理、ZnOS : 培養液に懸濁、30 分超音波処理
	暴露前観察方法	TEM、動的光散乱法、BET analysis、原子吸光分析法
In vitro	条件等	—
	細胞種	—
In vivo	条件等	adult <i>Porcellio scaber</i> (ワラジムシ)、体重 : >30 mg
	投与経路	oral (directly)
結果	本試験に用いた、bulk ZnO 以外の全てのナノ粒子は、細胞膜の不安定化に関与していた。超音波処理済の被検試料投与群では、細胞膜の透過性はいずれも有意に上昇しており、C ₆₀ 投与群で最も顕著であった。	

2.2.6 二酸化ケイ素（シリカ）微粒子

文献 No.	24	
書誌情報	K. O. Yu et al., J. Nanoparticle Res., 11, 15 (2009)	
試験目的	細胞内への取り込み・局在・細胞毒性	
実験方法	暴露濃度：0~200µg/mL、24 時間培養、TEM、LDH 値、MTT アッセイ、グルタチオン減少量、ROS 産量	
対象 endpoint	細胞膜完全性、ミトコンドリア機能	
被検試料	物質名	1. ナノサイズシリカ (SiO ₂ A)
		2. ナノサイズシリカ (SiO ₂ B)
		3. ナノサイズシリカ (SiO ₂ C)
		4. ナノサイズシリカ (SiO ₂ D)
	詳細	1. in-house product(引用文献記載の手法により合成)、粒径：30 nm(DLS)、アモルファス
2. in-house product(引用文献記載の手法により合成)、粒径：48 nm(DLS)、アモルファス		
3. in-house product(引用文献記載の手法により合成)、粒径：118 nm(DLS)、アモルファス		
4. in-house product(引用文献記載の手法により合成)、粒径：535 nm(DLS)、アモルファス		
調製方法	合成により得られた脱イオン水中のナノサイズシリカを 5 分間攪拌後、培地と混合	
暴露前観察方法	DLS、TEM	
In vitro	条件等	マウス角化細胞(HEL-30)
	細胞種	皮膚
In vivo	条件等	—
	投与経路	—
結果	<p>水に分散させたナノマテリアルを TEM と DLS で粒径を測定したところ、類似した結果を示した。細胞暴露により全てのサイズのナノマテリアルが細胞内に取り込まれ、細胞質の中に局在した。LDH 漏出量は 30 nm と 48 nm ナノマテリアルでは、用量と粒径に依存して増加したが、118 nm と 535 nm ナノマテリアルでは LDH 漏出は見られなかった。MTT アッセイで 30 nm と 48 nm ナノマテリアルは 118 nm と 535 nm ナノマテリアルに比べ高濃度暴露の際、MTT 量が有意に減少した。GSH 減少量は 30 nm ナノマテリアルを 50µg/mL 以上で暴露した場合に有意な減少が見られたが、他のサイズのナノマテリアルで暴露した際には GSH 量に変化は見られなかった。ROS 産量について、コントロール群と比較して有意な変化をもつものはなかった。</p>	

文献 No.	27	
書誌情報	D.M. Souza et al., J. Non-Cryst. Sol., 354, 4894 (2008)	
試験目的	生体適合性	
実験方法	暴露濃度 $2.7 \times 10^{-3} \text{g/mL}$ 、 $2.1 \times 10^{-4} \text{g/mL}$ で 2 時間暴露、MTT アッセイ、SIRCOL アッセイ	
対象 endpoint	細胞毒性	
被検試料	物質名	1. シリカ被覆マグネタイトナノ粒子(MtSi) 2. シリカガラス
	詳細	1. 塩化鉄(FeCl_3)よりマグネタイト(Mt)を合成し、ゾル-ゲル法で Mt 懸濁液にテトラエトキシシラン(TEOS)を添加しシリカを被覆したマグネタイトナノ粒子(MtSi)を合成、アモルファスシリカ層、粒径：10 nm 2. TEOS より合成
	調製方法	培養液に懸濁
	暴露前観察方法	FTIR、XRD、ゼータ電位、pH、磁力計
	調製方法	培養液に懸濁
In vitro	条件等	初代培養骨芽細胞(ラット頭蓋冠由来(Wistar、1-5 日齢))
	細胞種	その他の細胞
In vivo	条件等	—
	投与経路	—
結果	MtSi ナノ粒子暴露により骨芽細胞生存率は対照群に比べ約 20%減少したが、コラーゲン分泌量に変化はなかった。	

文献 No.	33	
書誌情報	I. Stayton et al., Anal. Bioanaly. Chem., 394, 95 (2009)	
試験目的	細胞内へのナノ粒子の吸収及び排出	
実験方法	暴露量 5.0×10^8 個/mL 培養液で A549 細胞暴露、0~32 時間暴露時のタンパク質吸着量、2~10 時間暴露時の細胞内吸収率(経時変化)を完全な培地にてプロテイン(ヒストン : PI=10.7、BSA : PI=4.8、ヘモグロビン : PI=7.1)被覆及び凝集させた状態のナノ粒子で測定、また FBSLi を含まない培地及び完全な培地の両方で未被覆ナノ粒子の吸収率測定、細胞内からのナノ粒子排出量測定、細胞内に吸収されたナノ粒子の顕微鏡像解析	
対象 endpoint	タンパク質の吸着、細胞内吸収及び排出	
被検試料	物質名	1. 蛍光体ナノサイズシリカ(CdS-CdSe コアシェルをシリカでコーティングしたもの) 2. アモルファスシリカ(Plain amorphous silica)
	詳細	1. in-house product(Wang らの方法により合成)、粒径 : 13 ± 3.3 nm, シリカ層 : 約 3 nm、アモルファス 2. Degussa 社、粒径 : 15 nm、アモルファス
	調製方法	培地(FBS 有無)に分散させ 15 分間超音波処理
	暴露前観察方法	TEM、UV-vis、分光蛍光光度計、ゼータ電位
	In vitro	条件等 細胞種
In vivo	条件等	—
	投与経路	—
結果	シリカナノ粒子へのタンパク質吸着は非常に速く 2 時間で吸着量が最大となり、約 15 時間後に平衡化した。3 種のタンパク質で被覆したシリカナノ粒子と凝集させた状態のナノ粒子の経時による細胞内吸収率は暴露時間 2~8.5 時間で吸収率は類似傾向を示したが、ヒストンのみ 6 時間まで同様の傾向を示し、その後著しく減少した。FBS を含まない培地での未被覆ナノ粒子の細胞内吸収率はタンパク質被覆粒子の約 3 倍であった。また粒子は経時につれ排出されたが、吸収速度より遅く 24 時間で完全に排出されなかった。単一細胞レベル解析で、培養液に血清が存在すると粒子の凝集体が細胞膜にゆるく結合しているのが観察されたが、血清がない培養液ではペトリ皿に付着し小さな凝集を形成していた。	

文献 No.	37		
書誌情報	D. Napierska et al., , small, 5(7), 846, 2009		
試験目的	細胞毒性		
実験方法	細胞毒性評価(生存率)(暴露濃度 1~2000 μ g/mL で 24 時間暴露、MTT アッセイ、LDH アッセイ)、細胞完全性評価(暴露濃度 TC ₂₅ 値、2~24 時間暴露培養、LDH 流出量)、アポトーシス及び壊死測定(暴露濃度 TC ₅₀ 値、24 時間暴露、フローサイトメトリー)		
対象 endpoint	ミトコンドリア機能、細胞膜完全性		
被検試料	物質名	1~3. 超微粒子シリカ (ultrafine silica)(S-16, S-19, S-60) 4~5. 微粒子シリカ (fine silica)(S-104, S-335) 6~7. ナノサイズシリカ(silica nanoparticles)(L-14, L-15)	
	詳細	1~3. Stöber 法により合成、アモルファス、粒径：16.4、19.4、60.4 nm、外表面積(各々)：183、145、33 m ² /g 4~5. Stöber 法により合成、アモルファス、粒径：104.4、335 nm、外表面積(各々)：28、7.7 m ² /g 6~7. Sigma-Aldrich 社、Ludox シリーズ、粒径：13.8、14.7 nm、外表面積(各々)：196、179 m ² /g	
	調製方法	水に懸濁した粒子を培地で希釈し攪拌	
	暴露前観察方法	X-Ray、SEM、TEM、DLS	
	In vitro	条件等	ヒト臍帯静脈内皮細胞 EAHY926
		細胞種	その他細胞
In vivo	条件等	—	
	投与経路	—	
結果		Stöber シリカも Ludox シリカも用量に依存して細胞生存率が減少した。また、単分散シリカの細胞毒性は粒径が大きくなるほど高く、違う系統の Stober 粒子と Ludox 粒子で細胞毒性に有意差はなかった。培養時間依存性については、LDH 活性の顕著な増加が小さい粒径で見られ、大きい粒径暴露群は観察中連続増加を示した。TC ₅₀ 値を表面積で表したとき、粒径が違っていても同様の活性を示した。	

文献 No.	38	
書誌情報	F. Wang et al., Toxicol. in Vitro, 23, 808 (2009)	
試験目的	細胞毒性、酸化ストレス	
実験方法	細胞毒性評価で用量依存性は暴露濃度 0~1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 24 時間暴露、培養時間依存性は 0~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 12~48 時間暴露し MTT アッセイで評価、細胞形態の観察、ROS 生成量、GSH 量、脂質過酸化物量(TBARS アッセイ)、フローサイトメトリー評価及び総タンパク濃度は暴露濃度 0~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲で 24 時間暴露	
対象 endpoint	細胞生存率、ミトコンドリア機能	
被検試料	物質名	1. SiO ₂ ナノマテリアル 2. SiO ₂ ナノマテリアル
	詳細	1. 華東理工大学研究所、粒径：20 nm 2. 華東理工大学研究所、粒径：30 nm
	調製方法	脱イオン水に懸濁後保存。用事調製で培養液に懸濁。
	暴露前観察方法	記載なし
In vitro	条件等	ヒト胚性腎細胞株(HEK293)
	細胞種	腎臓
In vivo	条件等	—
	投与経路	—
結果	シリカナノ粒子暴露により用量依存的に細胞生存率が減少し、24 時間暴露時の LD50 値は 80.2 \pm 6.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (20nm)、140.3 \pm 8.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (50 nm)であった。形態変化として細胞収縮、異形及び核濃縮のようなアポトーシスの特徴が見られた。細胞内 ROS 生成量の増加と GSH 量の減少が見られた。TBARS 量の増加は脂質過酸化反応の上昇を示した。フローサイトメトリー分析で G2/M 期阻害を起しアポトーシスに関連した sub-G1 population の増加が用量に依存して起こった。	

文献 No.	40	
書誌情報	M. Fisichella et al., <i>Toxicol. in Vitro</i> , 23, 697 (2009)	
試験目的	細胞毒性、MTT アッセイの有効性	
実験方法	暴露濃度 0~50 μ g/mL で 4 時間又は 24 時間暴露後 MTT アッセイ、WST-1 アッセイ、LDH アッセイ及びフローサイトメトリー、暴露濃度 0~50 μ g/mL で 4 時間暴露後 MTT ホルマザンエキソサイトーシス試験、TEM	
対象 endpoint	細胞生存率	
被検試料	物質名	MSN(化学修飾物質；正に帯電した物質：MSN- NH ₂ 、負に帯電した物質：MSN-AMF)
	詳細	メソポーラスアモルファスシリカナノ粒子(MSN)(MCM-41 型)表面をアミノ基で修飾(MSN-NH ₂)し、フルオレセインを導入したものの(MSN-AMF)。MSN; 粒径 約 5 nm(TEM、中性子散乱)、比表面積 350cm ² /g、残存シラノール基(NMR)
	調製方法	記載なし
	暴露前観察方法	記載なし
In vitro	条件等	
	細胞種	1. ヒト子宮頸癌細胞株(HeLa cells) 2. 二次培養アストロサイト
In vivo	条件等	—
	投与経路	—
結果	HeLa 細胞を用いた MSN-AMF の MTT アッセイで用量に依存した細胞毒性影響が見られたが、HeLa 細胞とアストロサイトを用い、フローサイトメトリー、LDH 流出量、WST-1 アッセイで評価したところ、細胞生存率に変化は見られなかった。MTT ホルマザンエキソサイトーシスへの影響についての評価で、MSN-AMF は非常に高い影響を与えることを示し、細胞表面膜外のホルマザン結晶増加はシリカナノ粒子の吸収とエキソサイトーシスの増加に関連することを示した。なお、これらの影響がナノ粒子の表面修飾による静電相互作用によるものかMSN- NH ₂ についても評価したが、MSN-AMF 同様の結果が得られた。	

文献 No.	67	
書誌情報	H. Yang et al., J. Appl. Toxicol., 29, 69, 2009.	
試験目的	細胞毒性評価、遺伝毒性評価	
実験方法	被検試料濃度 0-100µg/mL。24hrs 暴露。初代マウス胚線維芽細胞を用いて細胞生存率の測定 (MTT assay、WST assay、LDH 活性測定)、ROS 産生量測定、oxidative stress assay (GSH、SOD、MDA 測定)、comet assay による in vitro 遺伝毒性試験を行った。	
対象 endpoint	in vitro 急性毒性、生殖細胞変異原性	
被検試料	物質名	1. カーボンブラック (CB) 2. カーボンナノチューブ (CNTs) 3. 二酸化ケイ素 (SiO ₂) 4. 酸化亜鉛 (ZnO)
	詳細	1. Nano-Innovation 社、大きさ : 12.3 ± 4.1 nm、形状 : Sphere、純度 : >99.4% 2. COCC, Chinese Academy of Science、直径 : 8 nm、長さ : <5µm、形状 : Rope-Shaped、純度 : >99.9% 3. Runhe 社、大きさ : 20.2 ± 6.4 nm、形状 : Crystal structure、純度 : >99.0% 4. Nanuo 社、大きさ : 19.6 ± 5.8 nm、形状 : Crystal structure、純度 : >99.9%
	調製方法	各被検試料を 4 hrs、180 °C で加熱。FBS に懸濁。Lam ら (2004)、Leong ら (1998) の方法に従い調製。培養液にて希釈した。
	暴露前観察方法	TEM、ラマン分光法
In vitro	条件等	primary mouse embryo fibroblast cells
	細胞種	BALB/3T3
In vivo	条件等	—
	投与経路	—
結果	MTT assay、WST assay では、生存率の低下は用量依存的に有意であった。特に ZnO 処理群においては、他の被検試料処理群と比べて、非常に高い細胞毒性が認められ、oxidative stress assay についても、活性酸素の発生が有意に認められた。CNTs 処理群の細胞毒性は、ZnO 処理群に比べ中程度であった。しかし、comet assay では、他の被検試料処理群と比べて、DNA 損傷の度合いは有意に大きかった。	

文献 No.	21	
書誌情報	H. W. Kim et al., J. Nanoparticle Res., 11,(1) , 55 (2009)	
試験目的	細胞毒性評価、肺炎症の評価	
実験方法	in vitro : 細胞毒性評価 ; 0~520 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ で 24 時間培養後、MTS アッセイ及び LDH アッセイ評価、細胞アポトーシス評価 ; DNA 断片化検出(2 \times 52 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、24 時間培養後アガロースゲル電気泳動法評価)、免疫蛍光顕微鏡観察(200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 6 時間暴露)。in vivo : 0~5 mg/kg/day で 5 日間連続して口咽頭に吸入暴露し 2 日後屠殺、BAL 検査、病理検査	
対象 endpoint	in vitro 細胞毒性、in vivo BAL 細胞毒性、病理学的所見	
被検試料	物質名	1. Micro-SiO ₂ (mSiO ₂)
		2. Nano-SiO ₂ (nSiO ₂)
		3. Micro-TiO ₂ (mTiO ₂)
		4. Nano-TiO ₂ (nTiO ₂)
	詳細	1. Sigma-Aldrich 社、粒径 : 1-5 μm 、比表面積 : 5.1 m ² /kg(BET)、石英(q-quartz)
		2. Sigma-Aldrich 社、粒径 : 14 nm、比表面積 : 77.7 m ² /kg(BET)、アモルファス
3. Sigma-Aldrich 社、粒径 : 1 μm 、比表面積 : 5.8 m ² /kg(BET)、ルチル型		
4. Degussa 社、粒径 : 30 nm、比表面積 : 35.7 m ² /kg(BET)、ルチル型		
調製方法	in vitro : DPBS に 2 分間超音波処理した懸濁液を調製後、SFM 培養液で希釈、in vivo : DPBS に懸濁	
暴露前観察方法	記載なし	
In vitro	条件等	
	細胞種	マウスマクロファージ(RAW264.7)
In vivo	条件等	マウス(Balb/C、雄、6 週齢、19-24 g)
	投与経路	咽頭
結果	in vitro 試験で、粒状物質暴露群に用量相関的な細胞生存率の減少、LDH 値の減少が見られた。Nano-SiO ₂ 暴露群は Micro-SiO ₂ 暴露群と比べ明らかに細胞生存率が減少し、高用量 Nano-SiO ₂ 暴露群の LDH 値は有意な減少を示した。一方、in vivo 試験で BAL 液中のナノ粒子に軽度の凝集が見られた。SiO ₂ 暴露群で総細胞数、マクロファージ、好中球数が著増し、特に Nano-SiO ₂ が顕著であった。TiO ₂ 暴露群は、SiO ₂ 暴露群に比べ緩やかな増加を示したが、Micro-TiO ₂ 高用量暴露群は好中球数を除き、SiO ₂ 暴露群と同様の増加を示した。病理学的所見で、ナノ粒子暴露群はマイクロ粒子暴露群に比べ、細胞毒性が強く、用量に依存して肺の損傷及び好中球浸潤が多く見られた。	

文献 No.	42	
書誌情報	H. Nishimori et al., Eur. J. Pharmac. Biopharmac., 72, 626 (2009)	
試験目的	慢性毒性、特定標的臓器	
実験方法	暴露濃度 10、30 mg/kg で週 2 回 4 週間投与、病理検査 (肝臓、脾臓、肺、腎臓、脳、心臓)、生化学検査(ALT、BUN)、肝臓中ヒドロキシプロリン(HYP)量測定	
対象 endpoint	臓器損傷	
被検試料	物質名	表面未修飾ナノシリカ(SP70)(粒径 : 70 nm)
	詳細	Micromod Partikeltechnologie 社、平均粒径 : 55.7nm、球状ノンポーラス
	調製方法	水に懸濁した状態の本物質を使用前に超音波で分散させ水で希釈
	暴露前観察方法	電子顕微鏡法
In vitro	条件等	—
	細胞種	—
In vivo	条件等	マウス(BLAB/c、雄、8 週齢)
	投与経路	静脈内投与
結果	投与期間を通じて、SP70 投与に伴う有意な体重減少、外見上の異常は見られなかった。病理検査の結果、肝臓ではマクロファージの増加、脾臓では巨核球の増加が観察されたが、肺、腎臓、脳、心臓に投与による影響はなかった。また、急性毒性をほとんど示さない 10、30 mg/kg の投与量においても、ALT 値、ヒドロキシプロリン量の有意な上昇が認められた。BUN 値には変化なし。	

文献 No.	46	
書誌情報	H. Nishimori et al., Eur. J. Pharmac. Biopharmac., 72, 496 (2009)	
試験目的	急性毒性、反復投与毒性	
実験方法	急性毒性：暴露濃度 10~100 mg/kg、病理検査（肝臓、脾臓、肺、腎臓）、生化学検査(ALT、BUN)、ELISA 法(IL-6、TNF- α)、塩化ガドリニウムアッセイ、シクロフォスファミド (CPA) アッセイ、暴露濃度 0、10、30 mg/kg で週 2 回投与で 4 週間暴露、病理検査（肝臓、脾臓、肺、腎臓、脳、心臓）、生化学検査(ALT、BUN)、ヒドロキシプロリン(HYP)アッセイ 肝慢性毒性：暴露濃度 10、30 mg/kg で週 2 回 4 週間投与、病理検査、生化学検査(ALT)、ヒドロキシプロリン量	
対象 endpoint	肝損傷	
被検試料	物質名	1. ナノシリカ(SP70)(粒径：70 nm) 2. ナノシリカ(SP300)(粒径：300 nm) 3. ナノシリカ(SP1000)(粒径：1000 nm)
	詳細	1. Micromod Partikeltechnologie 社、平均粒径：75.7 nm、球状ノンポーラス 2. Micromod Partikeltechnologie 社、平均粒径：311 nm、球状ノンポーラス 3. Micromod Partikeltechnologie 社、平均粒径：830 nm、球状ノンポーラス
	調製方法	水に懸濁した状態の本物質を使用前に 5 分間ボルテックス分散。凝集なし
	暴露前観察方法	電子顕微鏡法
	調製方法	水に懸濁した状態の本物質を使用前に 5 分間ボルテックス分散。凝集なし
In vitro	条件等	—
	細胞種	—
In vivo	条件等	マウス(BLAB/c、雄、8 週齢)
	投与経路	静脈内投与
結果	急性肝障害が観察された SP70 投与でのみ炎症性サイトカインの上昇が観察され、血中 IL-6、TNF- α 濃度の上昇は ALT 値増加と同様の経時変化を示した。肝類洞内皮細胞阻害剤 CPA 処理により SP70 投与に伴う ALT 値上昇が抑制され、肝クッパー細胞阻害剤塩化ガドリニウム投与により ALT 値上昇が亢進していた。尚、いずれの実験においても BUN 値に変動なし。SP70 投与における肝慢性損傷評価で、用量に依存して肝細胞変性、ALT 値の上昇が見られ、ヒドロキシプロリン量の上昇も見られた。	

文献 No.	74	
書誌情報	S. J. So et al., J. Nanosci. Nanotech., 8, 5367, 2008	
試験目的	混餌(腸管に接触)によるナノ粒子の影響	
実験方法	ナノ粒子及びマイクロ粒子とも混餌(1%)を 10 週間投与(全摂餌量 140 g/kg)、血液形態学的検査、生化学検査、H&E 染色、シリコン(Si)量(肺、肝臓)(Balb/c マウスのみ)	
対象 endpoint	肝臓影響	
被検試料	物質名	1. ミクロサイズシリカ 2. ナノサイズシリカ
	詳細	1. 粉殻を処理して調製、粒径：0.5～30µm、純度：>99.8% 2. 1.で調製されたマイクロサイズシリカを超音波処理し、安定化させ調製、粒径：30～90 nm
	調製方法	暴露するナノ粒子とマイクロ粒子をそれぞれ 1%濃度となるよう混餌
	暴露前 観察方法	記載なし
In vitro	条件等	—
	細胞種	—
In vivo	条件等	マウス(Adult Balb/c、雌雄、20～30g)、マウス(C57BL/6J、雌雄、8 週齢)
	投与経路	混餌/経口
結果	Balb/c および C57BL/6J ともに、ナノ粒子投与群とマイクロ粒子投与群とで AST 値と ALT 値に有意な差が見られた。ナノ粒子投与群に脂肪肝が見られた。Balb/c マウスの各投与群毎選別した個体の評価で、ナノ粒子投与群の Si 量はマイクロ粒子投与群より低く ALT 値と AST 値は高値を示した。	

2.2.7 金属および金属酸化物微粒子

a) 銀ナノ粒子

文献 No.	52	
書誌情報	S. Arora et al., Toxicol. Appl. Pharmac., 236(3), 310, 2009	
試験目的	細胞毒性評価	
実験方法	銀ナノ粒子濃度：0～500 μ g/mL。24hrs 暴露。マウス皮膚線維芽細胞、マウス肝細胞を用いて細胞生存率の測定および IC ₅₀ 算定 (XTT assay)、位相差顕微鏡による形態学的解析を行った。その後、算定した各 1/2 IC ₅₀ の濃度で、上記 2 種の細胞をそれぞれ暴露し、以下の試験を行った。 1) TEM による形態学的、組織学的解析、2) Bradford 法によるタンパク質定量、3) oxidative stress assay (GSH、SOD、脂質過酸化測定)、4) Caspase-3 colorimetric assay、AO/EB assay によるアポトーシスアッセイ。	
対象 endpoint	in vitro 急性毒性、	
被検試料	物質名	銀ナノ粒子
	詳細	World Patent application under PCT No. WO/2006/ 001033に従い、銀ナノ粒子を合成。大きさ：7-20 nm (>90% particles in the size range)、平均サイズ：16.6 nm
	調製方法	培養液に懸濁。各試験に対して、実験方法欄記載の投与濃度に調製した。
	暴露前観察方法	TEM、動的光散乱法
In vitro	条件等	1. primary dermal fibroblasts (Swiss albino mice、1 day old) 2. primary liver cells (Swiss albino mice、1 day old)
	細胞種	1. マウス皮膚線維芽 2. マウス肝臓
In vivo	条件等	—
	投与経路	—
結果	マウス皮膚線維芽細胞の IC ₅₀ は 61 μ g/mL、マウス肝細胞の IC ₅₀ は 449 μ g/mL であり、いずれも有意であった。TEM 暗視野法解析により、電子密度が明らかになり、また、ミトコンドリア内部および細胞質内部に、銀ナノ粒子の球状の凝集体が認められた。マウス皮膚線維芽細胞においては、GSH の増加、脂質過酸化の枯渇が有意に認められた。また、マウス肝細胞においては、SOD および GSH レベルの増加が有意に認められた。アポトーシスアッセイの結果、アポトーシス発現時の銀ナノ粒子濃度は、壊死発現時における濃度に比べて有意に低く、マウス皮膚線維芽細胞においては約 1/32、マウス肝細胞においては約 1/40 であった。	

文献 No.	53	
書誌情報	P. V. AshaRani et al., ACS Nano, 3(2), 279, 2009.	
試験目的	細胞毒性評価、遺伝毒性評価	
実験方法	各試験には全てデンプン処理済銀ナノ粒子を用いた。細胞の形態学的観察、生存率、代謝活性、酸化ストレスの変化により毒性を評価。形態学的観察：被検試料濃度は 100µg/mL。48hrs 暴露後、同じ超薄切片を用いて TEM による組織学的解析、STEM による元素マッピング実施。細胞生存率測定：被検試料濃度：25～400µg/mL の 5 濃度。24、48、72hrs 暴露後 ATP 定量を行い、細胞生存率を測定した。代謝活性測定：被検試料の濃度は 25～400µg/mL の 5 濃度。24、48、72hrs 暴露後、代謝活性を測定。細胞周期解析：被検試料の濃度は 25～400µg/mL の 5 濃度。48hrs 暴露後、アネキシン V/PI 染色、フローサイトメトリーにより、細胞周期の解析実施。ROS 産生量測定：被検試料濃度：25～200µg/mL の 4 濃度。2、5hrs 暴露後、フローサイトメトリーにより、ROS 産生量測定を行い、酸化ストレス変化を測定。CBMN assay：被検試料濃度：100、200µg/mL。48hrs 暴露後、Poonepalli ら (2005) の方法に従い細胞を染色し、染色体異常を測定。comet assay：被検試料濃度：25～400µg/mL の 5 濃度。各暴露時間後の DNA 損傷を測定し、in vitro 遺伝毒性を評価。	
対象 endpoint	in vitro 急性毒性、生殖細胞変異原性	
被検試料	物質名	銀ナノ粒子
	詳細	Sigma-Aldrich 社。Raveendran ら (2003) の方法に従い、銀ナノ粒子表面にデンプンコーティング処理を行い、被検試料とした。大きさ：6-20 nm
	調製方法	コーティング処理後、超純水に懸濁し、超音波処理。各試験に対して、実験方法記載の投与濃度に調製した。
	暴露前観察方法	TEM、UV 吸収スペクトル
In vitro	条件等	
	細胞種	ヒト胎児肺線維芽(IMR-90) ヒト神経膠腫 (グリオーマ、U251))
In vivo	条件等	—
	投与経路	—
結果	銀ナノ粒子処理群では、細胞内 ATP の減少、ミトコンドリアの損傷が有意に認められた。また、高濃度処理群の G ₂ /M 期において、細胞周期の停止が有意に認められた。CBMN assay、comet assay により濃度依存的な DNA 損傷が有意に認められ、特に U251 細胞を用いた処理群において顕著であった。アネキシン V/PI 染色では、過剰なアポトーシスおよび壊死はみられなかった。TEM 解析により、ミトコンドリアおよび核内部に銀ナノ粒子が認められた。	

文献 No.	62		
書誌情報	L. Bregoli et al., Toxicology 262 (2009) 121		
試験目的	細胞毒性		
実験方法	7種のナノ粒子についてCFUアッセイ(プレート法)、濃度5、25、100ppmで暴露し、14日間培養後顆粒球単球前駆細胞(CFU-G/CFU-M/CFU-GM/CFU-Eo)及び赤血球前駆細胞(BFU-E)測定、Sb ₂ O ₃ を液体培養(K562, HL-60, CEM, CEM-R, Thp-1, Jurkat, and Molt-4)で増殖・分化アッセイ、暴露濃度5ppm、フローサイトメトリー分析、定量PCR、STEM分析、光学顕微鏡		
対象 endpoint	細胞増殖能、細胞形成能		
被検試料	物質名	1. 酸化鉄(Fe ₃ O ₄) 2. 酸化鉄(Fe ₂ O ₃) 3. 銀(Ag) 4. 金(Au) 5. 酸化アンチモン(Sb ₂ O ₃) 6. コバルト(Co) 7. 酸化チタン(TiO ₂)	
	詳細	1. Nanoamor 社、粒径：20-30 nm 2. Nanoamor 社、粒径：55-65 nm 3. Nanoamor 社、粒径：90-210 nm 4. Nanoamor 社、粒径：50-100 nm 5. Nanoamor 社、粒径：41-91 nm 6. Fluka Chemical 社、粒径：50-200 nm 7. TAL Materials 社、粒径：20-160 nm	
	調製方法	脱パイロジェン処理(189°C×90分)後、培地を滴下し15分間超音波処理	
	暴露前観察方法	DLS	
	In vitro	条件等	9人の健常ドナーのヒト骨髄から得られたCD34 ⁺ 細胞 ヒト造血系細胞株(K562、HL-60、CEM、CEM-R、Thp-1、Jurkat、Molt-4)
		細胞種	細胞
	In vivo	条件等	—
		投与経路	—
	結果	CFUアッセイで、Coナノ粒子は顆粒球単球前駆細胞及び赤血球前駆細胞共に用量依存的な毒性を示した。Sb ₂ O ₃ ナノ粒子5ppmで赤血球前駆細胞の生育阻害が見られた。暴露濃度5~100ppmで他のナノ粒子はコロニー増殖・分化に大きな影響を示さなかった。STEM測定で、Sb ₂ O ₃ ナノ粒子の細胞への蓄積は見られず、細胞膜に近接したナノ粒子が検出された。また殆どの細胞片がアポトーシス小体として存在することが観察された。一方、分化時期に5ppmのSb ₂ O ₃ ナノ粒子を暴露したところ、僅かな増殖率の低下が見られたが、分化への影響は見られず、造血前駆細胞にも毒性は見られなかった。CFUアッセイ及び7種の液体培養アッセイで、細胞株増殖率に統計学的有意な影響は見られなかった。Sb ₂ O ₃ ナノ粒子はThp-1のPMAによるマクロファージ分化を阻害した。	

文献 No.	71	
書誌情報	F. F. Larese et al., Toxicology, 255, 33, 2009.	
試験目的	in vitro 皮膚毒性評価	
実験方法	<p>Franz diffusion cell method を用いて、以下 4 つの薬物透過性試験を行った。</p> <p>1) 8 つのチャンバーに、銀ナノ粒子を注入。濃度は 70$\mu\text{g}/\text{cm}^2$。合成汗で 1/10 に希釈し、生体内環境近似条件でヒト腹部皮膚由来細胞を培養。24hrs 後、GFAAS による各 receiving chamber の銀ナノ粒子濃度測定、TEM による皮膚組織解析を行った。</p> <p>2) Bronough ら (1985) の方法に従い、試験 1) を反復した。</p> <p>3) 5 つのチャンバーに、銀ナノ粒子を注入。濃度は 70$\mu\text{g}/\text{cm}^2$。合成汗で 1/10 に希釈し、生体内環境近似条件でヒト腹部皮膚由来細胞を培養。4、8、20、24hrs 後に、ETAAS を用いて、各 receiving chamber の銀ナノ粒子濃度測定、TEM による皮膚組織解析を行った。</p> <p>4) Bronough ら (1985) の方法に従い、試験 3) を反復。4、8、20、24hrs 後に、ETAAS を用いて、各 receiving chamber の銀ナノ粒子濃度測定、TEM による皮膚組織解析を行った。</p>	
対象 endpoint	in vitro 皮膚毒性試験	
被検試料	物質名	銀ナノ粒子
	詳細	調製後の大きさ : 25 \pm 7.1 nm (25-75th percentiles 19.5-29.3, min. 9.8 nm, max. 48.8 nm with 5% larger than 36.6 nm)
	調製方法	Graf ら (2003) の方法に従い調製。水溶液に分散して凝集を作成し、PVP でコーティング、99%エタノールに溶解。TEM で粒子の状態を観察・測定。
	暴露前観察方法	TEM
In vitro	条件等	医療用廃棄物
	細胞種	ヒト腹部皮膚
In vivo	条件等	—
	投与経路	—
結果	<p>銀ナノ粒子は、無傷および損傷ヒト皮膚を有意に透過していた。1) 、2) の結果では、24hrs 後の無傷ヒト皮膚に接していた receiving chamber の平均濃度は 0.46 ng/cm² であった。24hrs 後の損傷ヒト皮膚に接していた receiving chamber の平均濃度は 2.32 ng/cm² であった (最低濃度 : 0.43 ng/cm²、最高濃度 : 11.6 ng/cm²)。3) 、4) の結果では、無傷ヒト皮膚に接していた receiving chamber の平均濃度に経時的变化はみられなかった。しかし、損傷ヒト皮膚に接していた receiving chamber の平均濃度は時間依存性であった。</p>	

文献 No.	49	
書誌情報	J. H. Sung et al., J. Soc.Toxicol., 108(2), 452, 2009.	
試験目的	細胞毒性評価、肺毒性評価、全身毒性評価	
実験方法	銀ナノ粒子について OECD TG 413 を行い、肺毒性を評価。6hrs/day、5days/week、エアロゾルとして 13 週間 (90 日) 反復吸入暴露。銀ナノ粒子の濃度は下記の通り。コントロール：fresh-air、低用量群：0.6×10 ⁶ particle/cm ³ 、49µg/m ³ 、中用量群：1.4×10 ⁶ particle/cm ³ 、133µg/m ³ 、高用量群：3.0×10 ⁶ particle/cm ³ 、515µg/m ³ 。1 グループ 10 匹。週毎に、死亡率測定、医学的観察、体重測定、摂餌量、肺機能検査を行った。暴露試験開始後 90 日目に、血液採取。その後計画屠殺し、21 種類の器官を摘出。光学顕微鏡による組織病理学的解析、血液学的検査、臨床化学検査、体重測定を行った。また、Sung ら (2008) の方法に従い、組織内銀ナノ粒子濃度 (分布) を測定した。摘出器官：副腎、膀胱、精巣、卵巣、子宮、精巣上体、精囊、心臓、胸腺、甲状腺、気管支、食道、舌、前立腺、肺、鼻腔、腎臓、脾臓、肝臓、膵臓、脳	
対象 endpoint	急性毒性、特定標的臓器毒性 (反復暴露)	
被検試料	物質名	銀ナノ粒子
	詳細	平均直径：18-19 nm、
	調製方法	Ji ら(2007)、Jung ら(2006)の方法に従い調製。
	暴露前観察方法	TEM、X線回折
In vitro	条件等	—
	細胞種	—
In vivo	条件等	ラット (Slc:SD、雌雄、8 週齢、253.2g (雄)、162.6g (雌))
	投与経路	inhalation
結果	摘出した組織の重量比から、銀ナノ粒子の分布を算出したところ、雌雄ラットにおいては、全身での銀ナノ粒子の分布が認められた。特に、肺内、血液中、肝臓内の銀ナノ粒子濃度は有意に高く、用量依存的に有意に増加した。また、嗅球内濃度は脳内濃度より高く、用量依存的に有意に増加した。腎臓内の銀ナノ粒子濃度は雌雄で異なり、雄ラットにおいては用量依存的に有意に増加した。組織病理学的解析では、銀ナノ粒子投与により、肺胞の慢性炎症、炎症細胞血管周囲の浸潤、軽度の肉芽腫病変等の、組織障害の用量依存的な増加が認められた。雄ラットにおいては、肝臓で、軽度の胆管増殖が中・高用量群で、用量依存的に認められた。肺で、軽度の肺胞の慢性炎症が全投与群で用量依存的に認められた。雌ラットにおいては、肝臓で、軽度の胆管増殖が全投与群で用量依存的に認められた。肺で、軽度の肺胞の慢性炎症、および炎症細胞血管周囲の浸潤が全投与群で用量依存的に認められた。	

b) 鉄ナノ粒子

文献 No.	4	
書誌情報	C. R. Keena et al., Environ. Sci. Technol., 43(12), 4555 (2009)	
試験目的	細胞毒性	
実験方法	暴露濃度 50~250 μ M(Fe 濃度として)で1時間暴露、LDH 値測定、細胞膜損傷、ROS 生成量	
対象 endpoint	細胞生存率	
被検試料	物質名	1. ゼロ価鉄(nZVI; Fe0(s))
		2. 第一鉄(Fe[II])
		3. weathered nZVI
	詳細	1. 合成して調製、一次粒子径 : 10~100 nm、比表面積 : 33.5 m ² /g
		2. 硝酸水溶液に硫酸鉄(II)を溶解させて調製
調製方法	3. 使用前に希釈した nZVI 溶液を 4 時間空気飽和 PBS 溶液中で酸化して調製	
暴露前観察方法	PBS 中に添加	
In vitro	条件等	比色法(Fe 量)、UV-vis 分光法(過酸化物質濃度)、DPD 法(過酸化水素量)、HPLC 法 (反応・誘導体化後にオキシダント生成物の定量と定性)
	細胞種	ヒト気管支上皮細胞(16HBE14o)
In vivo	条件等	肺・気管
	投与経路	—
結果	nZVI と Fe[II]暴露群は用量に相関して細胞生存率が減少し、weathered nZVI 暴露群では細胞毒性がわずかに見られた。ROS 生産量増加はこの結果と同様の傾向を示した。	

文献 No.	11	
書誌情報	J. K. Hsiao et al., J. Nanosci.Nanotechnol., 9, 1388, 2009	
試験目的	マクロファージの挙動変化	
実験方法	暴露濃度 0~100µg Fe/mL で 24、48、72 時間暴露、形態変化観察、MRI、フローサイトメトリー、ELISA 法(IL-18、TNF-α)、一酸化窒素(NO)生成量、	
対象 endpoint	食作用、サイトカイン生成量、一酸化窒素生成量	
被検試料	物質名	フェルカルボトラン(磁性酸化鉄ナノ粒子：NMPs)
	詳細	超常磁性酸化鉄(SPIOs)
	調製方法	記載なし
	暴露前 観察方法	記載なし
In vitro	条件等	
	細胞種	マクロファージ(RAW264.7)
In vivo	条件等	—
	投与経路	—
結果	NMPs 暴露量と培養時間に依存してマクロファージによる貪食が見られた。100µgFe/mL 暴露群でコントロール群に比べ有意な食作用活性の減少、TNF-α と IL-18 分泌量の減少が見られたが、一方で NO 生成量の有意な増加が見られた。	

文献 No.	27	
書誌情報	D.M. Souza et al., J. Non-Cryst. Sol., 354 (2008) 4894	
試験目的	生体適合性	
実験方法	暴露濃度 2.7×10 ⁻³ g/mL、2.1×10 ⁻⁴ g/mL で 2 時間暴露、MTT アッセイ、SIRCOL アッセイ	
対象 endpoint	細胞毒性	
被検試料	物質名	1. シリカ被覆マグネタイトナノ粒子(MtSi)
		2. シリカガラス
	詳細	1. 塩化鉄(FeCl ₃)よりマグネタイト(Mt)を合成し、ゾルゲル法で Mt 懸濁液にテトラエトキシシラン(TEOS)を添加しシリカを被覆したマグネタイトナノ粒子(MtSi)を合成、アモルファスシリカ層、粒径：10 nm
		2. TEOS より合成
	調製方法	培養液に懸濁
暴露前 観察方法	FTIR、XRD、ゼータ電位、pH、磁力計	
In vitro	条件等	
	細胞種	初代培養骨芽細胞(ラット頭蓋冠由来(Wistar、1-5 日齢))
In vivo	条件等	—
	投与経路	—
結果	MtSi ナノ粒子暴露により骨芽細胞生存率は対照群に比べ約 20%減少したが、コラーゲン分泌量に変化はなかった。	

文献 No.	30		
書誌情報	X. Hu et al., Sci. Total Environ., 407, 3070 (2009)		
試験目的	細胞毒性		
実験方法	各暴露濃度範囲(mg/L) : CuO(25-200)、ZnO(50-150)、Al ₂ O ₃ (600-1200)、La ₂ O ₃ (200-600)、Fe ₂ O ₃ 、SnO ₂ 、TiO ₂ (600-1200)で、2時間培養、LD50、La ₂ O ₃ の代謝率(¹⁴ C-グルコースの無機化)		
対象 endpoint	LD50 (fatal to 50% of the bacterium E. coli)		
被検試料	物質名	1. 酸化亜鉛 (ZnO) 2. 酸化銅 (CuO) 3. 酸化アルミニウム (Al ₂ O ₃) 4. 酸化ランタン (La ₂ O ₃) 5. 酸化鉄 (Fe ₂ O ₃) 6. 酸化スズ (SnO ₂) 7. 酸化チタン (TiO ₂)	
	詳細	1~7. Sigma-Aldrich 社、粒径 : 30-40 nm	
	調製方法	MilliQ 水で 20 分間超音波処理	
	暴露前 観察方法	記載なし	
	In vitro	条件等	E. coli(Migula)
		細胞種	細菌
	In vivo	条件等	—
投与経路		—	
結果	LD50 値(mg/L)は、CuO(64.5)、ZnO(21.1)、Al ₂ O ₃ (326.1)、La ₂ O ₃ (456.9)、Fe ₂ O ₃ (638.3)、SnO ₂ (1045.6)、TiO ₂ (1104.8)で、ZnO が最も E. coli に対して毒性が強かった。CuO は E. coli の生菌数を有意に減少させ、SnO ₂ は僅かに、Fe ₂ O ₃ 、La ₂ O ₃ 、Al ₂ O ₃ は中程度の細胞毒性を示した。La ₂ O ₃ を用いた ¹⁴ C-グルコースの無機化試験結果と細菌の生存力試験結果は対応しており、各々の LD50 値は類似していた。		

文献 No.	45	
書誌情報	M. Mahmoudi et al., J. Colloid and Interface Sci, 336 (2009) 510	
試験目的	細胞毒性	
実験方法	MTT アッセイ(攪拌速度 2880 rpm 以上で調製した PVA 被覆 SPION を暴露濃度 0~20 mM で 3、24、48 時間暴露)、形態学検査(形状の違う 3 種の粒子を濃度 0~800 mM で暴露)	
対象 endpoint	細胞生存率・増殖、細胞損傷	
被検試料	物質名	ポリビニルアルコール (PVA) 被覆(r=0~5)超常磁性酸化鉄ナノ粒子 (SPION)、12 種
	詳細	水酸化ナトリウムとポリビニルアルコール (PVA、Mw=30,000-40,000) 水溶液に塩化鉄(モル比 $Fe^{2+} : Fe^{3+}=1 : 2$)を加えアルゴン雰囲気下で共沈法により合成後、10,000g で遠心分離し、脱イオン水に再懸濁。なお、PVA/鉄重量比 r=0~5、攪拌速度：720-4320 rpm 条件を組み合わせる 12 種合成。
	調製方法	培地に懸濁
	暴露前観察方法	TEM、SEM、HRSEM、XRD、TGA、粒度分布測定、VSM
In vitro	条件等	マウス結合組織細胞(L929 線維芽細胞株)
	細胞種	皮膚
In vivo	条件等	—
	投与経路	—
結果	PVA 被覆 SPION は細胞に対する毒性影響が低く、r 比(PVA/鉄重量比)の増加に伴い流体力学的粒径が大きくなり細胞生存率も増加した。光学顕微鏡観察から細胞損傷は SPION の存在によることが明白であった。形態学検査でナノ粒子暴露により細胞収縮、変形、及びナノ粒子と細胞の相互関係が観察された。また細胞内に内在するナノ粒子量は、コーティング、形状及び粒径とよく相関しており、特に小さな粒径は細胞内に存在し、大きな粒径は内在しなかった。	

文献 No.	62	
書誌情報	L. Bregoli et al., Toxicology 262 (2009) 121	
試験目的	細胞毒性	
実験方法	7種のナノ粒子についてCFUアッセイ(プレート法)、濃度5、25、100ppmで暴露し、14日間培養後顆粒球単球前駆細胞(CFU-G/CFU-M/CFU-GM/CFU-Eo)及び赤血球前駆細胞(BFU-E)測定、Sb ₂ O ₃ を液体培養(K562, HL-60, CEM, CEM-R, Thp-1, Jurkat, and Molt-4)で増殖・分化アッセイ、暴露濃度5ppm、フローサイトメトリー分析、定量PCR、STEM分析、光学顕微鏡	
対象 endpoint	細胞増殖能、細胞形成能	
被検試料	物質名	1. 酸化鉄(Fe ₃ O ₄)
		2. 酸化鉄(Fe ₂ O ₃)
		3. 銀(Ag)
		4. 金(Au)
		5. 酸化アンチモン(Sb ₂ O ₃)
		6. コバルト(Co)
		7. 酸化チタン(TiO ₂)
	詳細	1. Nanoamor 社、粒径：20-30 nm
		2. Nanoamor 社、粒径：55-65 nm
		3. Nanoamor 社、粒径：90-210 nm
4. Nanoamor 社、粒径：50-100 nm		
5. Nanoamor 社、粒径：41-91 nm		
6. Fluka Chemical 社、粒径：50-200 nm		
7. TAL Materials 社、粒径：20-160 nm		
調製方法	脱パイロジェン処理(189°C×90分)後、培地を滴下し15分間超音波処理	
暴露前観察方法	DLS	
In vitro	条件等	9人の健常ドナーのヒト骨髄から得られたCD34 ⁺ 細胞 ヒト造血系細胞株(K562、HL-60、CEM、CEM-R、Thp-1、Jurkat、Molt-4)
	細胞種	細胞
In vivo	条件等	—
	投与経路	—
結果	CFUアッセイで、Coナノ粒子は顆粒球単球前駆細胞及び赤血球前駆細胞共に用量依存的な毒性を示した。Sb ₂ O ₃ ナノ粒子5ppmで赤血球前駆細胞の生育阻害が見られた。暴露濃度5~100ppmで他のナノ粒子はコロニー増殖・分化に大きな影響を示さなかった。STEM測定で、Sb ₂ O ₃ ナノ粒子の細胞への蓄積は見られず、細胞膜に近接したナノ粒子が検出された。また殆どの細胞片がアポトーシス小体として存在することが観察された。一方、分化時期に5ppmのSb ₂ O ₃ ナノ粒子を暴露したところ、僅かな増殖率の低下が見られたが、分化への影響は見られず、造血前駆細胞にも毒性は見られなかった。CFUアッセイ及び7種の液体培養アッセイで、細胞株増殖率に統計学的有意な影響は見られなかった。Sb ₂ O ₃ ナノ粒子はThp-1のPMAによるマクロファージ分化を阻害した。	

文献 No.	64		
書誌情報	H. L. Karlsson et al., Toxicol. Lett. 188 (2009) 112		
試験目的	細胞毒性、DNA 損傷		
実験方法	細胞毒性アッセイは被検試料 40、80µg/mL で 18 時間曝露。ミトコンドリア脱分極分析は被検試料 80µg/mL(CuO のみ 10、20、30、40µg/mL 追加)で 16 時間曝露。コメットアッセイ(FPG 酵素含有または含まない)は被検試料 40、80µg/mL で 4 時間曝露。		
対象 endpoint	In vitro 細胞毒性		
被検試料	物質名	1. 酸化鉄(III)ナノパウダー (Fe ₂ O ₃ nano) 2. 酸化鉄(III)パウダー (Fe ₂ O ₃ micro)、<5µm、純度：99%以上 3. 酸化鉄(II,III)ナノパウダー (Fe ₃ O ₄ nano)、純度：98%以上 4. 酸化鉄(II,III)パウダー (Fe ₃ O ₄ micro)、<5µm、純度：98%以上 5. 酸化チタン(IV)ナノパウダー (TiO ₂ nano)、純度：99.9%、ルチル型とアナターゼ型の混合物 6. 酸化チタン(IV)パウダー (TiO ₂ micro)、<5µm、純度：99.9%、少量のアナターゼ型を含むルチル型 7. 酸化銅(II)ナノパウダー (CuO nano) 8. 酸化銅(II)パウダー (CuO micro)、<5µm、純度：98%	
	詳細	1. Sigma-Aldrich 社、平均粒径：29 nm、比表面積：40 m ² /g 測定値：一次粒子(TEM)：30-60 nm、溶液中のサイズ：1.6µm(DLS) 2. Sigma-Aldrich 社、平均粒径：<1µm 測定値：一次粒子(TEM)：0.15-1µm、比表面積：5.4 m ² /g(BET) 3. Sigma-Aldrich 社、平均粒径：20-30 nm 測定値：一次粒子(TEM)：20-40 nm、溶液中のサイズ：<200 nm(DLS)、比表面積：42 m ² /g(BET) 4. Sigma-Aldrich 社、平均粒径：0.5µm 測定値：一次粒子(TEM)：0.1-0.5µm、比表面積：6.8 m ² /g(BET) 5. Sigma-Aldrich 社、平均粒径：63 nm、比表面積：24m ² /g 測定値：一次粒子(TEM)：20-100 nm、溶液中のサイズ：300 nm(DLS) 6. Sigma-Aldrich 社、平均粒径：1µm 測定値：一次粒子(TEM)：0.3-1µm、比表面積：2.5 m ² /g(BET) 7. Sigma-Aldrich 社、平均粒径：42 nm、比表面積：23 m ² /g 測定値：一次粒子(TEM)：20-40 nm、溶液中のサイズ：200 nm(DLS) 8. Sigma-Aldrich 社、平均粒径：3µm 測定値：一次粒子(TEM)：0.5-10µm、比表面積：1.5 m ² /g(DLS)	
	調製方法	DMEM に被検試料を懸濁させ、20 秒ボルテックス後、超音波処理	
	暴露前観察方法	DLS	
	In vitro	条件等	ヒト II 型肺胞上皮細胞株(A549)
		細胞種	肺・気管
	In vivo	条件等	—
		投与経路	—
	結果	細胞培養液中のナノ粒子に凝集が見られたが、Fe ₂ O ₃ ナノ粒子を除くマイクロ粒子の一次粒子よりは小さかった。細胞毒性評価で、CuO ナノ粒子はマイクロ粒子に比べ非常に細胞毒性が強かったが、他の金属酸化物にナノ粒子とミク	

ロ粒子の毒性に有意な違いは見られなかった。ミトコンドリア脱分極細胞数は CuO 暴露群で用量に依存して増加しており、特にナノ粒子がマイクロ粒子より高く増加した。DNA 損傷性をナノ粒子とマイクロ粒子で比較すると、Fe₂O₃ と TiO₂ はマイクロ粒子暴露群が、CuO ではナノ粒子暴露群でより損傷性が強かった。酸化的 DNA 損傷は CuO 及び Fe₃O₄ ナノ粒子暴露群のみ対照群と比べ有意な増加を示した。

文献 No.	50	
書誌情報	M.-T. Zhu et al., Toxicol. Sci., 107(2), 342 (2009)	
試験目的	ナノ粒子の体内動態	
実験方法	<p>in vitro : RAW264.7 に暴露濃度 10μg/mL で 1、4、24、48 時間暴露。U937 に暴露濃度 0.2、2、20μg/mL で 6、24 時間暴露。鉄含有量測定(ICP-MS)、擬似体液 (偽胃液、ファゴリソソーム偽液) への溶解度測定を実施。</p> <p>in vivo : $^{59}\text{Fe}_2\text{O}_3$ 40μL を気道内注入で単回投与後、1、7、21、50 日目に屠殺、病理検査及び TEM 観察(Fe_2O_3 投与量 40μL)、動態検査</p>	
対象 endpoint	体内分布、代謝、排泄	
被検試料	物質名	Fe_2O_3 ナノ粒子
	詳細	Nanjing Haitai Nanomaterial 社、粒径 : 144 \pm 36 nm(DLS)、 α - Fe_2O_3 、菱面体晶、比表面積 : 53.27 m 2 /g、純度 : 99.46%(Cu 4.98%、Cr 0.10%、Zn 0.20%、Mn 0.07%含有)
	調製方法	重水素原子炉で Fe_2O_3 に中性子を照射シラベル化する。2 週間の崩壊後 $^{59}\text{Fe}_2\text{O}_3$ ナノ粒子を 100mg/mL の濃度で生理食塩水に分散させ、使用時(暴露前)、10 分間超音波処理し、5 分間ボルテックスする。なお、in vitro 試験ではラベル化しない Fe_2O_3 ナノ粒子を使用
	暴露前観察方法	TEM、ICP-AES、XRD、DLS
In vitro	条件等	マウスマクロファージ(RAW264.7)、ヒト単球系細胞株(U937)
	細胞種	マクロファージ
In vivo	条件等	ラット(Sprague-Dawley、雄、250 \pm 10 g)
	投与経路	気道内
結果	<p>気道内単回投与により肺に沈着した $^{59}\text{Fe}_2\text{O}_3$ ナノ粒子はゆっくり排泄され、凝集したナノ粒子の肺胞マクロファージ貪食及び貪食されず肺胞上皮内部に取り込まれたナノ粒子が観察された。in vitro の Fe_2O_3 ナノ粒子の溶解性評価で、RAW264.7 細胞への溶解性は僅かで、U937 細胞では暴露濃度と培養時間に依存していた。また偽胃液には 0.15\pm0.03%、ファゴリソソーム偽液には 3.96\pm0.47%溶解し、生理食塩水には溶解しなかった。in vivo 試験では、^{59}Fe の血中動的挙動は、10 分以内に血中に存在し、血中消失半減期は 22.8 日だった。また肺のクリアランス速度は 3.06μg/日であった。肺以外へのナノ粒子の移動は、単球食細胞が多い肝臓、脾臓、腎臓、睾丸に多く見られた。また、尿や糞として $^{59}\text{Fe}_2\text{O}_3$ ナノ粒子は排泄され、尿中 ^{59}Fe はゆっくりと減少し、糞中 ^{59}Fe 量は急速に減少した。</p>	

文献 No.	16	
書誌情報	R. S. Slesinski and D. Turnbull, Int'l J. Toxicol., 27, 427 (2008)	
試験目的	慢性吸入暴露による毒性評価	
実験方法	13 週間試験では曝露濃度 1、5、25 mg/m ³ で全身暴露、チャンバーにて 6 時間/日で 5 日/週吸入曝露、104 週間試験では曝露濃度 1、4、16 mg/m ³ で全身暴露チャンバーにて 6 時間/日で 5 日/週吸入曝露、検査項目：血液形態学的検査、生化学検査、肺負荷量測定、剖検及び病理検査	
対象 endpoint	肺の腫瘍性影響、呼吸器系への非腫瘍性影響	
被検試料	物質名	コピートナー
	詳細	キャノン社、平均粒径：5.1µm、組成：45-50%の酸化鉄(Fe ₃ O ₄ (CAS No. 1317-61-9))、45-50%のスチレンアクリル樹脂(ガラス転移温度 60°C、バインダー)、< 5%の外部添加物(主成分は疎水性ヒュームド非晶質シリカ(CAS No.112945-52-5)(粒径：<0.1µm)、表面処理用)
	調製方法	single Wright Dust Feed Mechanism を用いて各濃度のエアゾールを発生
	暴露前観察方法	MMAD、SEM、TEM、IR、DSC、TGA
In vitro	条件等	—
	細胞種	—
In vivo	条件等	ラット(Han Wistar HsdBrl:WH、雌雄、13 週間試験用：8-10 週齢、雄 241-292g、雌 170-207g、104 週間試験用：6-7 週齢、雄 147-207g、雌 101-171g)
	投与経路	全身
結果	104 週間試験での被検試料粒度分布は MMAD 5.1-5.8µm(80.5-91.7%)、MMAD<0.7µm(8-18%)であった。病理検査で肺や肺関連リンパ組織に明らかな多量のブラックトナー粒子の沈着が見られた。また、肺へのトナー負荷量は用量に依存して増加し、26 週以降はおおよそ一定であった。13 週間試験で肺や気管支リンパ節にトナー暴露特有の変化は見られなかったが、暴露 13 週後も回復群で沈着したトナーが明らかに除去されていないことがわかった。104 週間試験で雌雄とも肺重量が有意に増加し、病理検査で呼吸器系に用量相関的な変化が見られた。所見として肺、気管支及び縦隔リンパ節に黒色素沈着したマクロファージが見られ、血管周囲性/細気管支周囲炎症細胞浸潤の増加、肺泡マクロファージとリンパ球性間質性浸潤で特徴付けられる肺胞管の炎症、気管支関連リンパ組織の細胞充実性の増加、肺泡線毛細胞化生が少数例見られた。用量依存性の腫瘍性所見はなく、高用量群にも肺癌所見は見られなかった。	

文献 No.	18	
書誌情報	A. R. Jalilian et al., Radiochemica Acta, 97(1), 51 (2009)	
試験目的	ラベル化した SPION の安定性及び生体内分布	
実験方法	10 μ Ci 放射能を含む ^{67}Ga -SPION 溶液 0.1 mL を尾静脈注射後、1 時間又は 24 時間後に屠殺、各組織と糞重量測定、比放射能測定、コントロール群は Ga^{3+} カチオン($^{67}\text{Ga}\text{-GaCl}_3$)投与	
対象 endpoint	生体内分布(蓄積した臓器)	
被検試料	物質名	1. 超常磁性酸化鉄ナノ粒子(SPION) 2. ^{67}Ga でラベル化された超常磁性酸化鉄ナノ粒子(^{67}Ga -SPION)
	詳細	1. 蒸留水に $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}=2$ molar 比率となるよう各々の塩化物を溶解させ、水酸化ナトリウムを添加し共沈法で SPION を調製後、中和・均一化し脱イオン化水に再懸濁して調製、粒径：5 nm 2. 上記方法の改良法で ^{67}Ga 塩化物溶液を窒素気流下エバポレート後、調製した鉄塩化物溶液を加え、沈殿・中和して調製、粒径： $<0.22\mu\text{m}$ 、純度 $>96\%$ (TLC)
	調製方法	SPION の ^{67}Ga ラベル化操作で得られた溶液を使用
	暴露前観察方法	TEM、HRSEM、XRD、FTIR、TGA、DSC、VSM、TLC
In vitro	条件等	—
	細胞種	—
In vivo	条件等	正常ラット(雄)(normal rat)
	投与経路	静脈内投与
結果	SPION の構造解析で明らかな超常磁性挙動を示すことがわかり、ラベル化された ^{67}Ga -SPION の純度は 96%以上(TLC)で合成から 4 日後も安定であった。生体内分布の評価で、投与 1 時間後、腎臓には遊離 Ga が、 ^{67}Ga -SPION の 2 倍存在した。また明らかな吸収量の違いとして肝臓、肺、脾臓に ^{67}Ga -SPION が遊離 Ga のそれぞれ 22-24 倍、3 倍、5 倍量存在し、このパターンは投与 24 時間後の結果でも殆ど変化がなかった。	

文献 No.	22	
書誌情報	B. Wang et al., J. Nanoparticle Res., 11, 41 (2009)	
試験目的	神経毒性	
実験方法	2つの鼻孔より鼻腔内注入により被検試料 130 μ g を1日おきに投与。最初の投与から12時間、72時間、14日及び30日後に評価、GSH-Px、Total GSH、GSSG、GSH/GSSG、CuZn-SOD、Mn-SOD、TBARS量、神経伝達物質濃度、TEM画像	
対象 endpoint	酸化ストレス指標、脳神経細胞損傷	
被検試料	物質名	1. 21 nm \cdot Fe ₂ O ₃ ナノ粒子 2. 280 nm \cdot Fe ₂ O ₃ サブミクロン粒子
	詳細	1. Nanjing Haitai Nanomaterial 社、一次粒子径：21 \pm 6 nm、ほぼ球状、純度>99%(不純物としてわずかに遷移金属を含む)、 α 型、試験懸濁液中平均粒径：21 \pm 4 nm(ほぼ単分散) 2. Chengdu Shi-Jia-Wei-Er 社、一次粒子径：280 \pm 80 nm、ほぼ球状、純度>99%(不純物としてわずかに遷移金属を含む)、 α 型、試験懸濁液中粒径：44-102 nm(ca.10%)、113-291 nm(ca. 90%)
	調製方法	0.1%のSCMCを含む生理食塩水に懸濁させ、5-7分超音波処理。使用前毎にボルテックスで攪拌
	暴露前観察方法	TEM、ICP-AES、XRD、粒径測定器
In vitro	条件等	—
	細胞種	—
In vivo	条件等	マウス(CD-ICR、雄、4週齢、20-22g)
	投与経路	鼻腔
結果	嗅球もしくは海馬でGSH-Px活性、Cu,Zn-SOD活性及びcNOS活性が有意に増加し、GSH値、GSH/GSSG比が有意に減少した。これらの変化はナノ粒子投与群のほうがセミマイクロ粒子投与群より大きく、用量依存性も強かった。また脳神経細胞の微細構造変化として、ナノ粒子投与群の嗅球に神経細胞中の樹状突起変性、膜構造の破壊、リゾソームの増加が見られ、海馬に粗面小胞体のわずかな拡張及びリゾソームの増加が見られた。マイクロ粒子投与群では、嗅球にわずかなミトコンドリアの膨化が見られ、海馬にいくつかの空胞が見られた。	

文献 No.	61	
書誌情報	J. Pauluhn, Toxicology, 259, 140 (2009)	
試験目的	肺のトキシコダイナミクス及びトキシコキネティクス	
実験方法	鼻部吸入暴露で濃度 0.4~96 mg/m ³ (投与群表記: 0.4~100 mg/m ³ の 7 濃度) で 6 時間/日、5 日/週で 4 週間暴露。肺重量測定、最終暴露から 4 週間後に BAL 検査、観察期間: 最終暴露後 3~6 ヶ月	
対象 endpoint	肺損傷性、動態、クリアランス	
被検試料	物質名	1. Boehmite : AlOOH-40(γ -AlO(OH))、商品名 : Pural® 200
		2. Boehmite : AlOOH-10 (γ -AlO(OH))、商品名 : Disperal®
		3. Magnetite (Fe ₃ O ₄)、商品名 : Ferroxide®Black 88P
	詳細	1. Sasol 社、バルク、金属含有量: 43.9%、比表面積: 105 m ² /g(BET)、比重: 2.9 g/cm ³ 、嵩比重: 0.51 g/cm ³ 、一次粒子径: \approx 40 nm、MMAD(GSD) \approx 0.6 μ m(2.6)
		2. Sasol 社、バルク、金属含有量: 39.4%、比表面積: 182 m ² /g(BET)、比重: 2.9 g/cm ³ 、嵩比重: 0.46 g/cm ³ 、一次粒子径: \approx 10 nm、MMAD(GSD) \approx 1.7 μ m(2.7)
3. Rockwood 社、顔料グレード、金属含有量: 69.5%、比表面積: 10.5 m ² /g(BET)、比重: 4.6-4.8 g/cm ³ 、嵩比重: 0.6-0.8 g/cm ³ 、一次粒子径: 300-600 nm、MMAD(GSD) \approx 1.5 μ m(2.1)		
調製方法	AlOOH-10 nm のみボールミルで微粉化。ナノ粒子をサイクロンとプルプッシュ希釈システムを用いターゲット粒径及び濃度にしてから鼻部吸入暴露チャンバーに導入	
暴露前観察方法	BET	
In vitro	条件等	—
	細胞種	—
In vivo	条件等	ラット(Wistar Bor:WISW)、雄、約 2 ヶ月齢、約 230g)
	投与経路	鼻部
結果	肺に沈着した粒子の半減期は暴露濃度が高いほど長く、肺負荷量に相関性が見られた。AlOOH-10 暴露群は、Fe ₃ O ₄ 及び AlOOH-40 暴露群よりクリアランスの減少がより明らかであった。Fe ₃ O ₄ 100 mg/m ³ 暴露群で分時呼吸量が 15%まで減少した。AlOOH 暴露群は濃度 28 mg/m ³ で肺重量、BAL の LDH、タンパク質、全細胞数及び好中性顆粒球数に経時に応じ明らかな変化が見られた。全細胞数及び絶対/相対好中性顆粒球数と暴露実濃度、表面積濃度(比表面積×暴露実濃度)及び肺負荷量との相関性を比較すると質量基準暴露指標との相関性が最もよかった。	

c) 酸化アルミニウム (アルミナ) 微粒子

文献 No.	30	
書誌情報	X. Hu et al., Sci. Total Environ.,407, 3070 (2009)	
試験目的	細胞毒性	
実験方法	各暴露濃度範囲(mg/L) : CuO(25-200)、ZnO(50-150)、Al ₂ O ₃ (600-1200)、La ₂ O ₃ (200-600)、Fe ₂ O ₃ 、SnO ₂ 、TiO ₂ (600-1200)で、2 時間培養、LD50、La ₂ O ₃ の代謝率(¹⁴ C-グルコースの無機化)	
対象 endpoint	LD50 (fatal to 50% of the bacterium E. coli)	
被検試料	物質名	1. 酸化亜鉛 (ZnO)
		2. 酸化銅 (CuO)
		3. 酸化アルミニウム (Al ₂ O ₃)
		4. 酸化ランタン (La ₂ O ₃)
		5. 酸化鉄 (Fe ₂ O ₃)
6. 酸化スズ (SnO ₂)		
7. 酸化チタン (TiO ₂)		
詳細	1~7. Sigma-Aldrich 社、粒径 : 30-40 nm	
調製方法	MilliQ 水で 20 分間超音波処理	
暴露前 観察方法	記載なし	
In vitro	条件等	E. coli(Migula)
	細胞種	細菌
In vivo	条件等	—
	投与経路	—
結果	LD50 値(mg/L)は、CuO(64.5)、ZnO(21.1)、Al ₂ O ₃ (326.1)、La ₂ O ₃ (456.9)、Fe ₂ O ₃ (638.3)、SnO ₂ (1045.6)、TiO ₂ (1104.8)で、ZnO が最も E. coli に対して毒性が強かった。CuO は E. coli の生菌数を有意に減少させ、SnO ₂ は僅かに、Fe ₂ O ₃ 、La ₂ O ₃ 、Al ₂ O ₃ は中程度の細胞毒性を示した。La ₂ O ₃ を用いた ¹⁴ C-グルコースの無機化試験結果と細菌の生存力試験結果は対応しており、各々の LD50 値は類似していた。	

文献 No.	7	
書誌情報	A. Balasubramanyam et al., Muta. Res., 676, 41 (2009)	
試験目的	遺伝毒性、体内蓄積性	
実験方法	各物質共投与量 500、1000、2000 mg/kg bw を強制経口投与後、30、48 時間後にサンプリングし、骨髄細胞を用いた小核試験 OECD 474 及び投与後 18、24 時間後にサンプリングし、骨髄細胞を用いた染色体異常試験 (染色体異常、分裂指数 : MI) OECD475、組織、血中、尿及び糞中アルミニウム(Al) 含有量測定(暴露 14 日後)	
対象 endpoint	MN-PCE、分裂指数、異数性、染色体異常、体内蓄積量	
被検試料	物質名	1. 酸化アルミニウム-バルク(Al_2O_3 -B) 2. 酸化アルミニウム-30 nm(Al_2O_3 -30) 3. 酸化アルミニウム-40 nm(Al_2O_3 -40)
	詳細	1. シグマアルドリッチ社、粒径 : 50-200 nm、純度 : >90% 2. NovaCentrix 社、粒径 : 39.85±31.33 nm(TEM) 3. NovaCentrix 社、粒径 : 47.33±36.13 nm(TEM)
	調製方法	1% Tween 80 を含む再蒸留水にナノ粒子を加え、10 分間超音波処理して分散させ、使用前に攪拌。
	暴露前観察方法	TEM
In vitro	条件等	—
	細胞種	—
In vivo	条件等	ラット(albino Wistar、雌、4~5 週齢、90~100 g)
	投与経路	経口
結果	小核試験で、 Al_2O_3 -30、 Al_2O_3 -40 暴露群とも対照群に比べ MN-PCE が統計学的に有意に増加したが、 Al_2O_3 -B 暴露群には見られなかった。染色体異常試験で、 Al_2O_3 -30、 Al_2O_3 -40 暴露群で異数性増加や構造変化(染色分体切断、同位染色分体切断、染色体断片、微小染色体、転座)が見られ、ギャップの有無に関わらず染色体異常を誘発したが、 Al_2O_3 -B 暴露群に染色体異常の誘発は見られなかった。一方、暴露後の Al 含有量測定結果、3 種 Al_2O_3 暴露群とも全ての組織や血液に Al の蓄積が見られた。 Al_2O_3 -30 及び Al_2O_3 -40 暴露群は対照群に比べ有意に Al 濃度が高く粒径が小さい程蓄積量が多く、腎臓への蓄積量が最も高い対し、 Al_2O_3 -B 暴露群では有意性のある Al 濃度高値は見られず、脾臓への蓄積量が最も高かった。	

文献 No.	59	
書誌情報	J. Pauluhn, Toxicol. Sci., 109(1) 152 (2009)	
試験目的	キネティクス、肺毒性	
実験方法	鼻部吸入暴露で濃度 0、0.4、3、28 mg/m ³ で 6 時間/日、5 日/週で 4 週間暴露。肺及び肺門リンパ節重量測定、BAL 検査、病理検査、Al 含有量測定、観察期間：最終暴露後 3 ヶ月	
対象 endpoint	肺損傷性、動態、クリアランス	
被検試料	物質名	1. Boehmite : AlOOH-40 nm(γ -AlO(OH))、商品名 : Pural 200 2. Boehmite : AlOOH-10 nm (γ -AlO(OH))、商品名 : Disperal
	詳細	1. Sasol 社、バルク、アルミニウム含有量: 43.9%、比表面積: 105 m ² /g(BET)、比重: 2.85 g/cm ³ 、嵩比重: 0.51 g/cm ³ 、一次粒子径: \approx 40 nm、MMAD(カスケードインパクトター/APS) : \approx 0.6 μ m(2.6)/ \approx 0.9 μ m(1.6-2.1)、細孔体積: min. 0.7 mL/g、斜方晶系
		2. Sasol 社、バルク、アルミニウム含有量: 39.4%、比表面積: 182 m ² /g(BET)、比重: 2.85 g/cm ³ 、嵩比重: 0.46 g/cm ³ 、一次粒子径: \approx 10 nm、MMAD(GSD) (カスケードインパクトター/APS) : \approx 1.7 μ m(2.7)/ \approx 2.3 μ m(1.8)、細孔体積: 0.5 mL/g、斜方晶系
	調製方法	AlOOH-10 nm のみボールミルを用い 400 回転/分で 10 分間微粉化。両ナノ粒子をサイクロンとプルプッシュ希釈システムを用いターゲット粒径及び濃度にしてから鼻部吸入暴露チャンバーに導入
	暴露前観察方法	SEM
In vitro	条件等	—
	細胞種	—
In vivo	条件等	ラット(Wistar Bor:WISW)、雄、約 2 ヶ月齢
	投与経路	鼻部
結果	BAL 検査で LDH、 β -NAG、タンパク質、 γ -GT、全細胞数及び好中性顆粒球の有意な増加と肺及び肺門リンパ節重量の有意な増加が 28 mg/m ³ 暴露群に見られた。病理検査で貧溶解性 AlOOH 暴露による影響は 28 mg/m ³ 暴露群のみに見られ、拡張及び泡沫状の肺泡マクロファージが見られ、細気管支上皮細胞、炎症性細胞及び限局性中隔肥厚細胞数が僅かに増加した。肺の炎症応答は主に一次粒子径よりむしろ凝集した粒子のサイズに依存性が見られた。肺組織中の Al 蓄積量は同濃度暴露したにもかかわらず AlOOH-40 nm のほうが、AlOOH-10 nm 暴露群より高かった。高い肺負荷量であるにもかかわらず肺以外の臓器負荷量の増加は起こらなかった。	

文献 No.	61	
書誌情報	J. Pauluhn, Toxicology 259 (2009) 140	
試験目的	肺のトキシコダイナミクス及びトキシコキネティクス	
実験方法	鼻部吸入暴露で濃度 0.4~96 mg/m ³ (投与群表記: 0.4~100 mg/m ³ の 7 濃度) で 6 時間/日、5 日/週で 4 週間暴露。肺重量測定、最終暴露から 4 週間後に BAL 検査、観察期間: 最終暴露後 3~6 ヶ月	
対象 endpoint	肺損傷性、動態、クリアランス	
被検試料	物質名	1. Boehmite : AlOOH-40(γ -AlO(OH))、商品名 : Pural® 200
		2. Boehmite : AlOOH-10 (γ -AlO(OH))、商品名 : Disperal®
		3. Magnetite (Fe ₃ O ₄)、商品名 : Ferroxide®Black 88P
	詳細	1. Sasol 社、バルク、金属含有量: 43.9%、比表面積: 105 m ² /g(BET)、比重: 2.9 g/cm ³ 、嵩比重: 0.51 g/cm ³ 、一次粒子径: \approx 40 nm、MMAD(GSD) \approx 0.6 μ m(2.6)
		2. Sasol 社、バルク、金属含有量: 39.4%、比表面積: 182 m ² /g(BET)、比重: 2.9 g/cm ³ 、嵩比重: 0.46 g/cm ³ 、一次粒子径: \approx 10 nm、MMAD(GSD) \approx 1.7 μ m(2.7)
3. Rockwood 社、顔料グレード、金属含有量: 69.5%、比表面積: 10.5 m ² /g(BET)、比重: 4.6-4.8 g/cm ³ 、嵩比重: 0.6-0.8 g/cm ³ 、一次粒子径: 300-600 nm、MMAD(GSD) \approx 1.5 μ m(2.1)		
調製方法	AlOOH-10 nm のみボールミルで微粉化。ナノ粒子をサイクロンとプルプッシュ希釈システムを用いターゲット粒径及び濃度にしてから鼻部吸入暴露チャンバーに導入	
暴露前観察方法	BET	
In vitro	条件等	—
	細胞種	—
In vivo	条件等	ラット(Wistar Bor:WISW)、雄、約 2 ヶ月齢、約 230g)
	投与経路	鼻部
結果	肺に沈着した粒子の半減期は暴露濃度が高いほど長く、肺負荷量に相関性が見られた。AlOOH-10 暴露群は、Fe ₃ O ₄ 及び AlOOH-40 暴露群よりクリアランスの減少がより明らかであった。Fe ₃ O ₄ 100 mg/m ³ 暴露群で分時呼吸量が 15%まで減少した。AlOOH 暴露群は濃度 28 mg/m ³ で肺重量、BAL の LDH、タンパク質、全細胞数及び好中性顆粒球数に経時に応じ明らかな変化が見られた。全細胞数及び絶対/相対好中性顆粒球数と暴露実濃度、表面積濃度(比表面積×暴露実濃度)及び肺負荷量との相関性を比較すると質量基準暴露指標との相関性が最もよかった。	

d) 酸化セリウム微粒子

文献 No.	8	
書誌情報	B. Rothen-Rutishauser et al., Environ. Sci. Technol., 2009, 43(7), 2634	
試験目的	細胞毒性評価	
実験方法	グローブボックス中に培養プレートを入れ、プレートの開閉時間で暴露量を調整し、暴露後 24 時間培養。10、20、30 分暴露の時間相当暴露量は、各 0.012、0.019 および 0.024 mg/cm ² 。TEER 測定、LDH 値、酸化ストレス、粒子沈着測定(TEM)、細胞の形態学検査(LSM)	
対象 endpoint	生存率、細胞損傷、TJ バリア機能、DNA 損傷	
被検試料	物質名	セリア(CeO ₂ : 酸化セリウム)
	詳細	グローブボックスでトリス(2-エチルヘキサン酸)セリウム(III)とキシレン(重量比 2 : 1)をフレーム溶射熱分解して合成、平均一次粒子径 : 5-20 nm、炭素含有量 : <0.1 wt%、立方格子(フッ化カルシウムタイプ)、流体力学粒径 : 19 nm、幾何学標準偏差 : 1.49
	調製方法	グローブボックス中で合成したエアロゾルをそのまま暴露
	暴露前観察方法	トライスターを用いた窒素吸着法による比表面積測定、XDC、XRD
In vitro	条件等	II 型肺胞上皮細胞(A549)
	細胞種	肺・気管
In vivo	条件等	—
	投与経路	—
結果	セリアナノ粒子暴露群は対照群と比べ LDH 値に有意な差は見られなかった。F-アクチン細胞骨格の LSM 像から 20 分及び 30 分暴露群で細胞表面が平滑であることが観察されたが、細胞の単層の高さに変化なく形態学的影響は見られなかった。30 分暴露群で対照群に比べ A549 細胞中の平均全層板小体量が有意な低値を示し、TJ 蛋白オクルディンの分析で細胞質の染色が限界状態であることが観察され、TEER 測定で TEER 値の有意な減少が見られた。また 20 分及び 30 分暴露群で対照群に比べ 8-オキシグアニン陽性細胞の有意な増加が見られた。	

文献 No.	75	
書誌情報	T. Xia et al., ACS Nano, 2008, 2(10), 2121	
試験目的	細胞毒性のメカニズム、酸化ストレスと物理化学的性状の関連性	
実験方法	細胞死及び生存率評価(各ナノ粒子濃度 25µg/mL で 1~16 時間暴露、濃度 6~100µg/mL で 16 時間暴露、ZnO ナノ粒子濃度 12.5~50µg/mL と相当濃度の ZnSO ₄ (150~600µM)で 6 時間暴露)、H ₂ O ₂ 発生量(非生物系試験: 暴露濃度 10µg/mL)。以下、濃度 25µg/mL で 1~16 時間暴露での ROS 生成量(H ₂ O ₂ 及び O ^{2•-})、酸化ストレスの 1-3 Tiers 評価(Tier 1: HO-1 発現、Tier 2: JNK 活性、TNF-α 及び IL-8 産生、Tier 3: [Ca ²⁺]量及びミトコンドリア膜電位)、CeO ₂ の細胞保護評価(CeO ₂ を 25µg/mL 濃度で 24 時間細胞処理後、25µg/mL の DEP で 16 時間暴露し、細胞死を測定)、細胞プロセッシング及び影響評価(電子顕微鏡、共焦点顕微鏡)	
対象 endpoint	細胞生存率、酸化ストレスバイオファクター	
被検試料	物質名	1. 酸化チタンナノ粒子(TiO ₂) 2. 酸化亜鉛ナノ粒子(ZnO) 3. 酸化セリウムナノ粒子(CeO ₂)
	詳細	1.チタン(IV)テトライソプロポキシド(アルドリッチ社、純度:97%)と m-キシレンより FSP 反応器で合成。一次粒子径: 11 nm、単結晶、アナターゼ型/ルチル型=80:20 の混合物、粒径(nm): 612(水)、284(DMEM)、493(BEGM 中)、ゼータ電位(mV): -8(水)、-10(DMEM)、-9(BEGM) 2.ナフテン酸亜鉛(アルドリッチ社、Zn<8 wt%)と m-キシレンより FSP 反応器で合成。一次粒子径: 13 nm、単結晶、紅亜鉛鉱、粒径(nm): 413(水)、36(DMEM)、184(BEGM)、ゼータ電位(mV): -15(水)、-5(DMEM)、-16(BEGM 中) 3.トリス(2-エチルヘキサン酸)セリウム(III)、49%含有 2-エチルヘキサン酸(Alfa Aesar 社、Ce: 12%)と m-キシレンより FSP 反応器で合成。一次粒子径: 8 nm、単結晶、立方晶系、粒径(nm): 2610(水)、323(DMEM)、596(BEGM)、ゼータ電位(mV): +15(水)、-10(DMEM)、-10(BEGM)
	調製方法	懸濁液を培養液に加え、細胞暴露前に 10 秒間超音波処理
	暴露前観察方法	BET、XRD、TEM、DLS、ZetaPALS(粒径、ゼータ電位)
	条件等	
In vitro	細胞種	1. マウスマクロファージ(RAW 264.7) 2. ヒト気管支上皮細胞(BEAS-2B)
	条件等	—
In vivo	条件等	—
	投与経路	—
結果	ZnO ナノ粒子は RAW 264.7 細胞、BEAS-2B 細胞ともに用量及び時間に依存して細胞毒性を誘発し、ROS 産量、酸化的損傷、炎症反応及び細胞死を引き起こしたが、TiO ₂ と CeO ₂ ナノ粒子は毒性を示さなかった。酸化ストレスについて段階的に評価したところ、ZnO は HO-1 の発現、Nrf2 及び NQO-1 の増加(Tier 1)、リン酸化 JNK の活性化、TNF-α 及び IL-8 の増加(Tier 2)、細胞内遊離[Ca ²⁺]濃度の上昇、ミトコンドリア損傷(Tier 3)で損傷応答を示した。また、選択的細胞プロセッシングと細胞超微細構造への影響評価で、ZnO は培養液やエンドソームで溶解することが示され、非溶解 ZnO ナノ粒子は	

BEAS-2B 細胞のカベオラに入り毒性とカベオラの凝集の関連性が示され、RAW 264.7 細胞ではリソソームに入り酸性下で粒子の溶解による Zn^{2+} の確認、リソソーム凝集が観察された。対照的に蛍光ラベル化した CeO_2 ナノ粒子は BEAS-2B 細胞のカベオリン-1 陽性及び RAW 264.7 細胞後期エンドソーム(LAMP-1)コンパートメントにそのままの形で吸収され炎症や細胞毒性を示さず、ROS 生成を抑制し、外因性酸化ストレスから細胞を防御した。 TiO_2 は CeO_2 と同様の吸収経路を示したが、有害性や細胞保護影響を示さなかった。細胞毒性における ZnO ナノ粒子と Zn^{2+} イオンの関連性は、培養液に溶解した Zn^{2+} がリソソームでの吸収及び金属イオン封鎖により明らかな原因のひとつであることが示唆された。

e) 白金ナノ粒子/コロイド

文献 No.	41	
書誌情報	J. Pelka et al., Chem. Res. Toxicol., 22, 649 (2009)	
試験目的	細胞毒性評価	
実験方法	濃度 0.0001~1000 ng/cm ² で 3 時間暴露後、酸化ストレス評価で ROS 生成量及び Nrf-2 発現量測定。同濃度で 3、24 時間暴露後の GSH 濃度、細胞生存率測定。DNA 損傷をコメットアッセイと DNA 修復酵素 FPG を組み合わせて評価	
対象 endpoint	ROS 生成量、Nrf-2 移行、GSH 濃度、DNA 損傷	
被検試料	物質名	1. 白金ナノ粒子(Pt<100 nm、Pt/CD0) 2. 白金ナノ粒子(Pt<20 nm、Pt/CD2) 3. 白金ナノ粒子(Pt≥100 nm、Pt/CD3)
	詳細	1. Pt(COD)Me ₂ (COD : 1,5-シクロオクタジエン)と β-シクロデキストリン(β-CD)を高圧反応器中、別々の開放系容器に入れ 353 K、15.5 MPa で 20 時間 SFRD 技術で調製し、減圧前に還元剤である水素を添加して合成。平均粒径(d50) : 20.6 nm、d10 : 5.9 nm、d90=66.3 nm(d10 : 粒径が小さい方から累積 10%に相当、d90 : 残りの累積が 90%に相当)、Δ : 2.9(= d90-d10)/d50(粒度分布) 2. Pt(COD)Me ₂ と β-CD を物理的に混ぜ反応器に入れ、Pt/CD0 と同様に合成。平均粒径(d50) : 7.7 nm、d10 : 4.7 nm、d90=12.2 nm、Δ : 1.0 3. Pt(COD)Me ₂ と β-CD を sc-CO ₂ 中で混合物を調製し、Pt/CD0 と同様に合成。平均粒径(d50) : 155 nm、d10 : 88.4 nm、d90=210 nm、Δ : 0.8
	調製方法	超音波で懸濁
	暴露前観察方法	TEM、HRTEM、SEM、EDX、
	調製方法	超音波で懸濁
In vitro	条件等	ヒト大腸癌細胞(HT29)
	細胞種	その他細胞
In vivo	条件等	—
	投与経路	—
結果	酸化ストレス評価で Pt ナノ粒子暴露により ROS 生成は誘引されず、核内の Nrf-2 量に有意な増加も見られなかった。Pt(<20 nm)で有意な全グルタチオン量の減少が見られ、減少率は粒度分布と暴露時間に依存していた。DNA 損傷評価で、粒度分布と暴露培養時間に依存して DNA 鎖切断の増加が見られ、FPG 酵素処理により増加する DNA 損傷が Pt(<20 nm)及び Pt(<100 nm) 暴露群で見られた。	

f) その他の金属および金属酸化物微粒子

文献 No.	30	
書誌情報	X. Hu et al., Sci. Total Environ., 407, 3070- (2009)	
試験目的	細胞毒性	
実験方法	各暴露濃度範囲(mg/L) : CuO(25-200)、ZnO(50-150)、Al ₂ O ₃ (600-1200)、La ₂ O ₃ (200-600)、Fe ₂ O ₃ 、SnO ₂ 、TiO ₂ (600-1200)で、2 時間培養、LD50、La ₂ O ₃ の代謝率(¹⁴ C-グルコースの無機化)	
対象 endpoint	LD50 (fatal to 50% of the bacterium E. coli)	
被検試料	物質名	1. 酸化亜鉛 (ZnO)
		2. 酸化銅 (CuO)
		3. 酸化アルミニウム (Al ₂ O ₃)
		4. 酸化ランタン (La ₂ O ₃)
		5. 酸化鉄 (Fe ₂ O ₃)
6. 酸化スズ (SnO ₂)		
7. 酸化チタン (TiO ₂)		
詳細	1~7. Sigma-Aldrich 社、粒径 : 30-40 nm	
調製方法	MilliQ 水で 20 分間超音波処理	
暴露前 観察方法	記載なし	
In vitro	条件等	E. coli(Migula)
	細胞種	細菌
In vivo	条件等	—
	投与経路	—
結果	LD50 値(mg/L)は、CuO(64.5)、ZnO(21.1)、Al ₂ O ₃ (326.1)、La ₂ O ₃ (456.9)、Fe ₂ O ₃ (638.3)、SnO ₂ (1045.6)、TiO ₂ (1104.8)で、ZnO が最も E. coli に対して毒性が強かった。CuO は E. coli の生菌数を有意に減少させ、SnO ₂ は僅かに、Fe ₂ O ₃ 、La ₂ O ₃ 、Al ₂ O ₃ は中程度の細胞毒性を示した。La ₂ O ₃ を用いた ¹⁴ C-グルコースの無機化試験結果と細菌の生存力試験結果は対応しており、各々の LD50 値は類似していた。	

文献 No.	62		
書誌情報	L. Bregoli et al., Toxicology 262 (2009) 121		
試験目的	細胞毒性		
実験方法	7種のナノ粒子についてCFUアッセイ(プレート法)、濃度5、25、100ppmで暴露し、14日間培養後顆粒球単球前駆細胞(CFU-G/CFU-M/CFU-GM/CFU-Eo)及び赤血球前駆細胞(BFU-E)測定、Sb ₂ O ₃ を液体培養(K562, HL-60, CEM, CEM-R, Thp-1, Jurkat, and Molt-4)で増殖・分化アッセイ、暴露濃度5ppm、フローサイトメトリー分析、定量PCR、STEM分析、光学顕微鏡		
対象 endpoint	細胞増殖能、細胞形成能		
被検試料	物質名	1. 酸化鉄(Fe ₃ O ₄) 2. 酸化鉄(Fe ₂ O ₃) 3. 銀(Ag) 4. 金(Au) 5. 酸化アンチモン(Sb ₂ O ₃) 6. コバルト(Co) 7. 酸化チタン(TiO ₂)	
	詳細	1. Nanoamor 社、粒径：20-30 nm 2. Nanoamor 社、粒径：55-65 nm 3. Nanoamor 社、粒径：90-210 nm 4. Nanoamor 社、粒径：50-100 nm 5. Nanoamor 社、粒径：41-91 nm 6. Fluka Chemical 社、粒径：50-200 nm 7. TAL Materials 社、粒径：20-160 nm	
	調製方法	脱パイロジェン処理(189°C×90分)後、培地を滴下し15分間超音波処理	
	暴露前観察方法	DLS	
	In vitro	条件等	9人の健常ドナーのヒト骨髄から得られたCD34 ⁺ 細胞 ヒト造血系細胞株(K562、HL-60、CEM、CEM-R、Thp-1、Jurkat、Molt-4)
		細胞種	細胞
	In vivo	条件等	—
		投与経路	—
	結果	CFUアッセイで、Coナノ粒子は顆粒球単球前駆細胞及び赤血球前駆細胞共に用量依存的な毒性を示した。Sb ₂ O ₃ ナノ粒子5ppmで赤血球前駆細胞の生育阻害が見られた。暴露濃度5~100ppmで他のナノ粒子はコロニー増殖・分化に大きな影響を示さなかった。STEM測定で、Sb ₂ O ₃ ナノ粒子の細胞への蓄積は見られず、細胞膜に近接したナノ粒子が検出された。また殆どの細胞片がアポトーシス小体として存在することが観察された。一方、分化時期に5ppmのSb ₂ O ₃ ナノ粒子を暴露したところ、僅かな増殖率の低下が見られたが、分化への影響は見られず、造血前駆細胞にも毒性は見られなかった。CFUアッセイ及び7種の液体培養アッセイで、細胞株増殖率に統計学的有意な影響は見られなかった。Sb ₂ O ₃ ナノ粒子はThp-1のPMAによるマクロファージ分化を阻害した。	

文献 No.	64		
書誌情報	H. L. Karlsson et al., Toxicol. Lett., 188 (2009) 112		
試験目的	細胞毒性、DNA 損傷		
実験方法	細胞毒性アッセイは被検試料 40、80µg/mL で 18 時間曝露。ミトコンドリア脱分極分析は被検試料 80µg/mL(CuO のみ 10、20、30、40µg/mL 追加)で 16 時間曝露。コメットアッセイ(FPG 酵素含有または含まない)は被検試料 40、80µg/mL で 4 時間曝露。		
対象 endpoint	In vitro 細胞毒性		
被検試料	物質名	1. 酸化鉄(III)ナノパウダー (Fe ₂ O ₃ nano) 2. 酸化鉄(III)パウダー (Fe ₂ O ₃ micro)、<5µm、純度：99%以上 3. 酸化鉄(II,III)ナノパウダー (Fe ₃ O ₄ nano)、純度：98%以上 4. 酸化鉄(II,III)パウダー (Fe ₃ O ₄ micro)、<5µm、純度：98%以上 5. 酸化チタン(IV)ナノパウダー (TiO ₂ nano)、純度：99.9%、ルチル型とアナターゼ型の混合物 6. 酸化チタン(IV)パウダー (TiO ₂ micro)、<5µm、純度：99.9%、少量のアナターゼ型を含むルチル型 7. 酸化銅(II)ナノパウダー (CuO nano) 8. 酸化銅(II)パウダー (CuO micro)、<5µm、純度：98%	
	詳細	1. Sigma-Aldrich 社、平均粒径：29 nm、比表面積：40 m ² /g 測定値：一次粒子(TEM)：30-60 nm、溶液中のサイズ：1.6µm(DLS) 2. Sigma-Aldrich 社、平均粒径：<1µm 測定値：一次粒子(TEM)：0.15-1µm、比表面積：5.4 m ² /g(BET) 3. Sigma-Aldrich 社、平均粒径：20-30 nm 測定値：一次粒子(TEM)：20-40 nm、溶液中のサイズ：<200 nm(DLS)、比表面積：42 m ² /g(BET) 4. Sigma-Aldrich 社、平均粒径：0.5µm 測定値：一次粒子(TEM)：0.1-0.5µm、比表面積：6.8 m ² /g(BET) 5. Sigma-Aldrich 社、平均粒径：63 nm、比表面積：24m ² /g 測定値：一次粒子(TEM)：20-100 nm、溶液中のサイズ：300 nm(DLS) 6. Sigma-Aldrich 社、平均粒径：1µm 測定値：一次粒子(TEM)：0.3-1µm、比表面積：2.5 m ² /g(BET) 7. Sigma-Aldrich 社、平均粒径：42 nm、比表面積：23 m ² /g 測定値：一次粒子(TEM)：20-40 nm、溶液中のサイズ：200 nm(DLS) 8. Sigma-Aldrich 社、平均粒径：3µm 測定値：一次粒子(TEM)：0.5-10µm、比表面積：1.5 m ² /g(DLS)	
	調製方法	DMEM に被検試料を懸濁させ、20 秒ボルテックス後、超音波処理	
	暴露前観察方法	DLS	
	In vitro	条件等	ヒト II 型肺胞上皮細胞株(A549)
		細胞種	肺・気管
	In vivo	条件等	—
		投与経路	—
	結果	細胞培養液中のナノ粒子に凝集が見られたが、Fe ₂ O ₃ ナノ粒子を除くマイクロ粒子の一次粒子よりは小さかった。細胞毒性評価で、CuO ナノ粒子はマイクロ粒子に比べ非常に細胞毒性が強かったが、他の金属酸化物にナノ粒子とミク	

ロ粒子の毒性に有意な違いは見られなかった。ミトコンドリア脱分極細胞数は CuO 暴露群で用量に依存して増加しており、特にナノ粒子がマイクロ粒子より高く増加した。DNA 損傷性をナノ粒子とマイクロ粒子で比較すると、Fe₂O₃ と TiO₂ はマイクロ粒子暴露群が、CuO ではナノ粒子暴露群でより損傷性が強かった。酸化 DNA 損傷は CuO 及び Fe₃O₄ ナノ粒子暴露群のみ対照群と比べ有意な増加を示した。

文献 No.	72	
書誌情報	S. Bastian et al., Environ. Health Perspec., 117(4), 530, 2009	
試験目的	細胞毒性評価	
実験方法	塩化コバルト (CoCl ₂) またはタングステン(VI)酸ナトリウム二水和物 (Na ₂ WO ₄ · 2H ₂ O) 濃度が最大 10%v/v となるよう培養液に添加し、WC 濃度 7.5、15、30µg/mL、WC-Co 濃度 8.25、16.5、33 (Co 最大含有量は 51µM) µg/mL で 1 時間～3 日間暴露。生存率、光学顕微鏡検査	
対象 endpoint	細胞生存率、細胞膜完全性	
被検試料	物質名	1. タングステンカーバイドナノ粒子(WC) 2. コバルトドーブタングステンカーバイドナノ粒子(WC-Co)
	詳細	1. ボールミルを用いた化学プロセスにより調製、比表面積 : 6.9 m ² /g(BET)、平均粒径 : 145±5 nm、PDI : 0.2、ゼータ電位 : -35 mV 2. ボールミルを用いた化学プロセスにより調製、Co 含有量は 10wt%、比表面積 : 6.6 m ² /g(BET)、平均粒径 : 145±5 nm、PDI : 0.2、ゼータ電位 : -50 mV
	調製方法	純水に懸濁させ、凝集しないよう超音波処理。WC-Co は静電的に安定化させるため、懸濁液に Graham's salt(ポリリン酸)添加。
	暴露前観察方法	ゼータ電位、BET、DLS、PCS、ICP-OES
In vitro	条件等	ヒト大腸癌細胞(CaCo-2)、ヒトケラチノサイト(HaCaT)、ヒト肺ガン細胞(A549)、オリゴデンドロサイト細胞(OLN-93)、初代神経細胞・初代アストロサイト細胞(妊娠 18 日目のラット(Wistar) 胎児の皮質より調製)
	細胞種	その他細胞、肺・気管
In vivo	条件等	—
	投与経路	—
結果	WC ナノ粒子暴露群は試験に用いた全ての細胞に毒性を示さなかったが、WC-Co ナノ粒子暴露群は細胞毒性を誘発し、その感受性は初代アストロサイト>CaCo-2>OLN-93>HaCaT>A549>初代神経細胞の順であった。Co イオンの毒性評価で、CoCl ₂ 、WC+CoCl ₂ ともに CoCl ₂ 濃度 100µM 以上で評価した CaCo-2、HaCaT、A549 に細胞生存率の減少が見られた。また、前述で毒性が見られた WC-Co 濃度 51µM 暴露群と CoCl ₂ (50µM)及び CoCl ₂ (50µM)+WC(15µg/L)暴露群を比較すると、WC-Co 暴露群で細胞生存率の明らかな減少が見られた。一方、タングステンイオンの毒性影響を OLN-93 及びアストロサイト細胞で評価したところ、42µM(タングステン溶液濃度 : 28%)まで細胞毒性は見られなかった。	

文献 No.	1	
書誌情報	M. Yokohira et al., J. Toxicol. Pathol.,;22: 71 (2009)	
試験目的	肺の発がん性バイオアッセイ	
実験方法	グループ 1-6 : 0.1% DHPN 含有飲料水を 2 週間投与、4 週目に以下被検試料 0.5mg/ラットを 0.2 mL の生理食塩水に懸濁させ気管内注入、グループ 1,7 : 石英、グループ 2,8 : CuO micro、グループ 3,9 : CuO nano、グループ 4,10 : TiO ₂ micro、グループ 5,11 : TiO ₂ nano、(グループ 6 : DHPN 対照群、グループ 12 : 未処理対照群)、30 週目に屠殺、検査項目 : 体重、臓器重量(絶対、相対)、一般所見、剖検所見、病理検査	
対象 endpoint	肺の発がん性	
被検試料	物質名	1. 二酸化チタン(TiO ₂ micro)
		2. 二酸化チタン(TiO ₂ nano)
		3. 酸化銅(CuO micro、CAS 1317-38-0)
		4. 酸化銅(CuO nano、CAS 1317-38-0)
		5. 石英粉塵(Quartz dust : DQ-12)
	詳細	1. 和光純薬工業(株)、粒径 : < 5µm、ルチル型、(Lot. TCG4139)
2. 和光純薬工業(株)、粒径 : 80 nm、(Lot. DPN0960)		
3. Sigma-Aldrich 社、粒径 : < 5µm		
4. Sigma-Aldrich 社、粒径 : 33 nm		
5. Deutsche Montan Technologies 社、粒径 : < 7µm		
調製方法	生理食塩水に懸濁	
暴露前観察方法	記載なし	
In vitro	条件等	—
	細胞種	—
In vivo	条件等	ラット(F344/DuCrIcrj、雄、4 週齢)
	投与経路	気管内注入
結果	ナノ粒子暴露群の影響として、剖検所見で DHPN 無投与の CuO 暴露群で肺表面に軽度の結節性変化が見られたが、TiO ₂ 投与群に変化はなかった。病理学的所見で、DHPN 投与群全ての肺に過形成、腺腫、腺癌が見られた。また CuO 及び TiO ₂ ナノ粒子投与群のほうがそれらのマイクロ粒子投与群に比べ腫瘍性病変の数や面積に増加傾向が見られた。DHPN 無投与群では CuO 暴露群の肺に軽度の炎症性変化が見られたが、TiO ₂ 投与群に変化はなかった。	

文献 No.	29	
書誌情報	G. Sonavane et al., Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 66 (2008) 274-280	
試験目的	生体内分布	
実験方法	静脈内単回投与で各粒径ナノ粒子懸濁液を 1 g/kg 暴露。投与 24 時間後に屠殺。各臓器及び組織中の金ナノ粒子含有量測定(ICP-MS)	
対象 endpoint	臓器・組織中金蓄積量	
被検試料	物質名	金ナノ粒子(粒径：15 nm)
		金ナノ粒子(粒径：50 nm)
		金ナノ粒子(粒径：100 nm)
		金ナノ粒子(粒径：200 nm)
	詳細	テトラクロロ金(III)酸四水和物($\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)とクエン酸ナトリウムを用い還元により合成(Turkevich らの方法の変法)、平均粒径：15±2.30 nm、多分散指数：0.44±0.05、球状
		上記により自製、粒径：50±5.65 nm、多分散指数：0.42±0.08、球状
上記により自製、粒径：100±5.56 nm、多分散指数：0.36±0.07、球状		
上記により自製、粒径：200±7.56 nm、多分散指数：0.32±0.06、球状		
調製方法	0.5%(w/v) アルギン酸ナトリウム含有水溶液に懸濁させ、0.22µm Millipore フィルターで使用前にろ過し、懸濁させ 2 分間超音波処理。	
暴露前観察方法	粒度分布及びゼータ電位(Zetasizer 3000HSA、Malvern Instruments, Ltd.)、SEM、ICP-MS	
In vitro	条件等	—
	細胞種	—
In vivo	条件等	マウス(ddY、雄、6~8 週齢、25~30 g)
	投与経路	その他
結果	金ナノ粒子の静脈内投与における体内分布量は粒径に依存しており、15 nm ナノ粒子は主に肝臓、肺、腎臓に分布し、少量だが血液、脾臓、脳、心臓及び胃で見られた。50、100 nm ナノ粒子は、肝臓、続いて肺、脾臓、脳及び腎臓に多く、少量だが脾臓、血液(100 nm では検出せず)及び胃にも見られた。50、100 nm ナノ粒子暴露群の組織中金蓄積量は 15 nm ナノ粒子暴露群より少なかった。200 nm ナノ粒子暴露群では、肝臓に多く蓄積が見られ、続いて脾臓、肺、腎臓、心臓、ごく僅かに脳、血液、胃及び脾臓に見られた。金ナノ粒子の粒径が増加すると脾臓への蓄積が増加し、脳への蓄積が減少した。	

2.2.8 その他のナノマテリアル

a) カーボンブラック (CB)

文献 No.	67	
書誌情報	H. Yang et al., J. Appl. Toxicol., 29, 69, 2009.	
試験目的	細胞毒性評価、遺伝毒性評価	
実験方法	被検試料濃度 0-100µg/mL。24hrs 暴露。初代マウス胚線維芽細胞を用いて細胞生存率の測定 (MTT assay、WST assay、LDH 活性測定)、ROS 産生量測定、oxidative stress assay (GSH、SOD、MDA 測定)、comet assay による in vitro 遺伝毒性試験を行った。	
対象 endpoint	in vitro 急性毒性、生殖細胞変異原性	
被検試料	物質名	1. カーボンブラック (CB)
		2. カーボンナノチューブ (CNTs)
		3. 二酸化ケイ素 (SiO ₂)
		4. 酸化亜鉛 (ZnO)
	詳細	1. Nano-Innovation 社、大きさ: 12.3 ± 4.1 nm、形状: Sphere、純度: >99.4% 2. COCC, Chinese Academy of Science、直径: 8 nm、長さ: <5µm、形状: Rope-Shaped、純度: >99.9% 3. Runhe 社、大きさ: 20.2 ± 6.4 nm、形状: Crystal structure、純度: >99.0% 4. Nanuo 社、大きさ: 19.6 ± 5.8 nm、形状: Crystal structure、純度: >99.9%
調製方法	各被検試料を 4 hrs、180 °C で加熱。FBS に懸濁。Lam ら (2004)、Leong ら (1998) の方法に従い調製。培養液にて希釈した。	
暴露前観察方法	TEM、ラマン分光法	
In vitro	条件等	primary mouse embryo fibroblast cells (BALB/3T3)
	細胞種	初代マウス胚線維芽細胞
In vivo	条件等	—
	投与経路	—
結果	MTT assay、WST assay では、生存率の低下は用量依存的に有意であった。特に ZnO 処理群においては、他の被検試料処理群と比べて、非常に高い細胞毒性が認められ、oxidative stress assay についても、活性酸素の発生が有意に認められた。CNTs 処理群の細胞毒性は、ZnO 処理群に比べ中程度であった。しかし、comet assay では、他の被検試料処理群と比べて、DNA 損傷の度合いは有意に大きかった。	

文献 No.	69	
書誌情報	L. Tabet et al., J. Toxicol. Environ. Health. Part A, 72, 60, 2009.	
試験目的	細胞毒性評価	
実験方法	細胞生存率、アポトーシス、酸化ストレス、細胞内取り込みを比較検討し、細胞毒性を評価。被検試料を下記の濃度で暴露。MWCNT : 0~100µg/mL。白石綿、青石綿、CB nanoparticles : 100µg/mL。6、24、48、72hrs 暴露。48、72hrs 培養。	
対象 endpoint	in vitro 急性毒性	
被検試料	物質名	1. 多層カーボンナノチューブ (MWCNT)
		2. 青石綿 (アスベスト)
		3. 白石綿 (アスベスト)
		4. カーボンブラック (CB) nanoparticles
	詳細	1. ARKEMA 社の Graphistrength C100、直径 : 12 nm、長さ : 0.1-13µm
2. UICC 社、直径 : 20 nm		
3. UICC 社、直径 : 80 nm		
4. Degussa/Evonik 社の FR101 を購入、直径 : 95 nm		
調製方法	MWCNT、青石綿、白赤面についてそれぞれ懸濁液を調製した。MWCNT はジパルミトイルレシチン (DPL)、PBS、エタノールに懸濁。青石綿、白石綿は培養液に懸濁。CB は PBS に懸濁。それぞれ vortex、超音波処理を行った。	
暴露前観察方法	TEM、ICP-MS、ESCA、SEM、BET analyses、Knudsen flow reactor、レーザー回折	
In vitro	条件等	1. A549 2. MeT5A
	細胞種	1. ヒト肺上皮細胞 2. ヒト中皮細胞 (アスベスト感受性)
In vivo	条件等	—
	投与経路	—
結果	MWCNT 投与群では A549、MeT5A の細胞表面に凝集がみられた。PBS 処理群でみられた凝集は、エタノール、DPL 処理群でみられた凝集に比べて有意に大きかった。100µg/mL の濃度では代謝活性低下がみられたが、膜透過性、アポトーシスに変化はみられなかった。青石綿、白石綿投与群では、被検試料は細胞に貫通し、代謝活性低下、アポトーシスの増加がみられたが、膜透過性に変化はみられなかった。CB 投与群では、有害事象はみられなかった。	

文献 No.	17	
書誌情報	A. Erdely et al., Nano Letters, 9(1), 36, 2009.	
試験目的	肺毒性評価、細胞毒性評価	
実験方法	Rao ら (2003) の方法に従い単回吸入暴露。被検試料は各 40µg/mouse 投与。暴露 4hrs 後に計画屠殺。肺、循環血液、大動脈、心臓、肝臓、腎臓を摘出。BAL および血液中の細胞数算定、LDH を測定。炎症、酸化ストレス、血液凝固、組織修復等に関わる遺伝子発現を TaqMan array を用いた real-time RT-PCR、多重免疫アッセイ、ELISA により測定。組織別のデータを比較・検討し、被検試料の肺毒性、細胞毒性を評価した。被検試料投与条件は、MWCNT : 7 匹、SWCNT : 5 匹、UFCB : 5 匹、コントロール : 7 匹。	
対象 endpoint	急性毒性、特定標的臓器毒性	
被検試料	物質名	1. 多層カーボンナノチューブ (MWCNT) 2. 単層カーボンナノチューブ (SWCNT) 3. ultrafine carbon black (UFCB)
	詳細	1. Mitsui 社、直径 : <80nm、長さ : 10-20µm 2. Carbon Nanotechnologies 社、直径 : 0.8-1.2 nm、長さ : 0.1-1µm 3. Degussa 社の Printex 90、直径 : 14 nm
	調製方法	1.~3. Porter ら (2008) の方法に従い調製した。
	暴露前観察方法	TEM、ICP-MS、
In vitro	条件等	—
	細胞種	—
In vivo	条件等	マウス (C57BL/6、雄、10 週齢)
	投与経路	pharyngeal aspiration (吸入暴露)
結果	各処理群の BAL 中、血液中の好中球、好酸球は増加し、血液中のリンパ球は減少した。BAL 中の好中球数は、vehicle 処理群では正常値であったが、他の処理群、特に CNT 処理群では有意に増加した。血液中の好中球も、CNT 処理群では有意に増加した。また、BAL 中の LDH 活性は、MWCNT 処理群で有意に増加した。CNT 処理群の肺組織においては、炎症、酸化ストレス、血液凝固、組織修復に関わる遺伝子の発現上昇が明確であり、MWCNT 処理群では、SWCNT 処理群に比べ、定量的に高い発現がみられた。vehicle 処理群の大動脈と比べ、他処理群の大動脈においては、MT1、MT2、Hif-3α、Arg II、S100a8 の有意な発現上昇がみられた。これは、MWCNT 処理群 > SWCNT 処理群 > UFCB 処理群の順に顕著であった。さらに、MWCNT 処理群の心臓、肝臓、腎臓においても、この 5 遺伝子の有意な発現上昇が認められた。他の測定結果も、肺と体循環の緊密な連携を示唆するものであった。	

文献 No.	54	
書誌情報	H. Tong et al., Toxicol. Appl. Pharmacol., 239(3), 224, 2009	
試験目的	心肺毒性評価	
実験方法	Gilmour ら (2004) の方法に従い、調製、単回吸入暴露。懸濁液の濃度は 10、40µg/mouse in 50µl。LPS のみ 2µg/mouse in 50µl。暴露 24hrs 後に計画屠殺。肺の炎症反応および心臓作用について、BAL および心臓灌流の生化学的検査によって比較検討し、心肺毒性を評価した。組織学的変化については、同じ試験系で追試を行い、肺および心臓を摘出して測定した。	
対象 endpoint	急性毒性、特定標的臓器毒性	
被検試料	物質名	1. 単層カーボンナノチューブ (SWCNT)
		2. 酸処理 SWCNT (AF-SWCNT)
		3. ultrafine carbon black (UFCB)
		4. 酸処理 UFCB (AF-UFCB)
	詳細	1. Sigma 社、catalogue number : 636797
2. 1. SWCNT を Saxena ら (2007) の方法に従い酸官能化		
3. Dr. Vickie Stone からの寄贈品		
4. 3. UFCB を Saxena ら (2007) の方法に従い酸官能化		
調製方法	AF-SWCNT、AF-UFCB については粒子サイズ、粒度分布測定をゼータ電位粒子測定装置により実施。Saxena ら (2007) の方法に従い、各被検試料を超音波処理後生理食塩水に懸濁し、実験方法の項に記述されている投与濃度に調製した。	
暴露前観察方法	thermo-optical method、ICP-OES、US EPA Method 3050B (measured gravimetrically)、TEM、BET analyses、Zetasizer Nano ZS	
In vitro	条件等	—
	細胞種	—
In vivo	条件等	マウス (CD-1、雌、12-16 週齢、平均体重 30.8 ± 0.7 g)
	投与経路	Inhalation (pharyngeal aspiration route)
結果	AF-SWCNT、UFCB、AF-UFCB の 40µg 処理群では、肺における好中球の割合が増大した。低用量群では、有意差はみられなかった。各処理群では、用量依存的に、肺の末梢気道および間質領域に凝集がみとめられた。高用量群では、末梢気道間、間質において細胞浸潤および浮腫が認められた。AF-SWCNT の 40µg 処理群では、灌流心臓における心機能回復の低下、梗塞面積の増大、冠動脈血流予備能の上昇は、他処理群とコントロールに比べて、いずれも有意であった。局所的な心筋線維化もみられた。光学顕微鏡下では心組織にナノ粒子はみられなかった。	

b) ポリスチレン微粒子 (PSt)

文献 No.	3	
書誌情報	E. Fröhlich et al., J. Toxicol. Sci., 34(4), 363 (2009)	
試験目的	細胞毒性	
実験方法	粒径測定(0~10%FBS を含む培地に懸濁)、細胞培養は暴露濃度 31.25~500µg/mL で4、24 時間暴露後、スクリーニングアッセイ (ATP 量、ホルマザン法、ニュートラルレッド取込み、sulfo-ローダミン B 染色、ロイシン取込み)、アポトーシス、細胞膜損傷、増殖性、酸化ストレス、細胞内吸収と局在化の測定・観察を実施。	
対象 endpoint	細胞損傷	
	物質名	1. カルボキシル化ポリスチレンラテックスビーズ(carboxyl PS)
		2. カルボキシル変性ポリスチレンラテックスビーズ (carboxyl modified PS)
		3. アミジン化ポリスチレンラテックスビーズ(Amidine PS)
		4. (505/515)蛍光標識されたカルボキシル化ポリスチレン粒子
		5. (580/605)蛍光標識されたカルボキシル化ポリスチレン粒子
	詳細	1. インビトロジェン社、粒径：20、40、60、80、100、200nm (蒸留水分散状態での粒径：26、34、62、82、93、160 nm)
		2. インビトロジェン社、粒径：20 nm (蒸留水分散状態での粒径：24 nm)
3. インビトロジェン社、粒径：200 nm (蒸留水分散状態での粒径：220 nm)		
4. インビトロジェン社、FluoSpheres シリーズ、粒径：20、40、200 nm		
5. インビトロジェン社、FluoSpheres シリーズ、粒径：20、40、200 nm		
調製方法	FBS を 0~10%含む DMEM に粒子を懸濁	
暴露前観察方法	DLS、ゼータ電位	
In vitro	条件等	ヒト臍帯静脈内皮細胞株(EAhy926)
	細胞種	その他細胞
In vivo	条件等	—
	投与経路	—
結果	FBS を含む培地に分散した粒子は凝集により粒径を増加させ、負に帯電したカルボキシル化表面電荷を減少させた。20 nmPS 粒子はアポトーシスとネクローシスにより細胞損傷を起こしたが、≥40 nm 以上の PS 粒子は細胞毒性を示さなかった。酸化ストレス評価で 20 nm と 200 nm 暴露群で同程度のラジカルを発生した。細胞内への取り込み及び局在化評価で、粒径に相関してエンドソームとリソソームに粒子が取り込まれた。	

文献 No.	63	
書誌情報	K. Sarlo et al., Toxicology, 263 (2009) 117	
試験目的	投与経路及び投与回数における体内動態、標的臓器	
実験方法	尾静脈注入暴露による単回投与試験の暴露量は 20 nm で 1×10^{14} 個、100 nm で 1.1×10^{13} 個、1000 nm で 1.2×10^{10} 個で観察期間は最長 90 日間、咽頭吸引暴露による単回投与試験の暴露量は 20 nm で 1×10^{14} 個、100 nm で 5×10^{12} 個、1000 nm で 7×10^9 個で観察期間は最長 90 日間、反復投与試験の全暴露量は 20 nm で 4×10^{14} 個、100 nm で 2.2×10^{13} 個、1000 nm で 2.2×10^9 個で投与回数は 10 回、観察期間は最終暴露時から最長 120 日間、反復投与試験のみ体重、BALF 検査、生化学検査、病理検査	
対象 endpoint	動態・クリアランス、病理所見	
被検試料	物質名	(755/715)蛍光標識ポリスチレンラテックススフェア
	詳細	インビトロジェン社、粒径：20 nm、100 nm、1000 nm(3 種)
	調製方法	滅菌水に懸濁後投与前に最低 15 分以上超音波処理
	暴露前観察方法	DLS、Cryo-TEM、ゼータ電位
In vitro	条件等	—
	細胞種	—
In vivo	条件等	ラット(F344、雌、120～130 g)
	投与経路	尾(静脈注入)、咽頭(吸引)
結果	<p>静注単回投与では 3 粒径とも肝臓、脾臓次いで肺に多く沈着した。100、1000 nm 粒子は経時的に脾臓中の粒子数割合が増加したが、20 nm 粒子では減少した。一方、咽頭吸入投与では 3 粒径とも肺に多く沈着し、急性試験では肺への残存率は 20 nm 粒子が他の粒径に比べ有意に減少していた。また、反復試験結果は、肺以外の臓器中 100、1000 nm 粒子残存数は経時的に有意に減少したが、20 nm 粒子では増加した。3 粒径とも胸腺中残存数の増加が見られ、投与後 1～7 日目に各粒子が腸及び糞中に見られた。20 nm 粒子は少量だが腎臓中にも見られた。僅かに、血液、骨髄にも粒子が見られたが、眼、筋肉、皮膚、舌及び尿では検出されなかった。病理試験結果、肺胞マクロファージの増加、肺胞腔内炎症性細胞、肺胞中隔の単核細胞浸潤、血管周囲の炎症性細胞が 3 粒径投与群共見られた。それらの変化は軽度で 1000 nm 投与群より 20、100 nm 投与群で症状が長く観察された。</p>	

文献 No.	68	
書誌情報	K. Inoue et al., Toxicol. Appl. Pharmacol., 234 (2009) 68	
試験目的	LPS 及び OVA により誘引された肺炎症に及ぼす影響	
実験方法	LPSとの関連性評価：LPS(75µg/body)とナノ粒子(125、250µg/body)を vehicle群、ナノ粒子群、LPS群、LPS+ナノ粒子群に分け単回気管内投与。OVAとの関連性評価：投与群はvehicle群、ナノ粒子群、OVA群、OVA+ナノ粒子群に分け、OVA(1µg/body)を隔週、ナノ粒子(50、100µg/body)を毎週1回/週で6週間反復気管内投与。検査項目：BAL検査、肺水分量、肺組織のサイトカイン・ケモカイン発現、血漿凝固パラメーター検査、病理検査	
対象 endpoint	病理学的所見、炎症性サイトカイン、ケモカイン	
被検試料	物質名	蛍光ラテックス粒子(micromer®-blue F plain)
	詳細	Micromod 社、粒径：25、50、100 nm、球状
	調製方法	0.05% Tween 80 を含む PBS(pH 7.4)に懸濁させ、3 分間超音波処理
	暴露前 観察方法	メーカー開示データ使用
In vitro	条件等	—
	細胞種	—
In vivo	条件等	マウス(ICR、雄、6 週齢、29~33 g)
	投与経路	気管
結果	単回投与試験では、全粒径でラテックスナノ粒子投与により LPS で誘引された肺の炎症が増悪し、炎症性サイトカインの発現増強の傾向が見られた。特に 50 nm 以下ナノ粒子+LPS 投与群はフィブリノゲン、マクロファージ走化性因子、ケラチノサイト由来ケモカイン及びフォン・ウィルブランド因子(vWF)が LPS 単独群と比べ有意に増加した。また、これらの影響は粒径が小さいほど変化が大きかった。反復投与試験で、病理所見において全粒径で好酸球性肺炎症や IgG ₁ 及び IgE 抗体に特徴づけられるアレルギー性喘息の有意な増悪は見られなかったが、50 nm 以下のナノ粒子は好中球性肺炎症を有意に引き起こし増悪させた。	

c) デンドリマー

文献 No.	70	
書誌情報	C. Li et al., J. Molecul. Cell Biol., 1, 37 (2009),	
試験目的	急性肺損傷、細胞死のメカニズム	
実験方法	<p>in vitro : 濃度 100µg/mL で 24 時間暴露の細胞生存率、アポトーシス誘発性及びカスパーゼ-3 活性評価、オートファジー誘発性及び細胞生存率評価(G3、G5.5 濃度 100µg/mL 及び G3+3MA(3-メチルアデニン)10mM または 3mM で 24 時間暴露)、微小管結合タンパク質 1 単鎖 3(LC3)の発現(G3、G5.5 濃度 30µg/mL 及び G3+3MA 濃度 10mM で 24 時間暴露)、LC3-II 測定(濃度 100µg/mL で 4 時間暴露)、G3 濃度 100µg/mL で 24 時間暴露後、コントロール siRNA または ATG6 siRNA トランスフェクション後の細胞生存率、G5.5(100µg/mL)、G4(100µg/mL)、G5(20µg/mL)、G6(20µg/mL)、G7(20µg/mL)、G8(20µg/mL)で 4 時間暴露の LC3-II 発現及び 24 時間暴露(3MA(3mM または 1mM)の有無)による細胞生存率、G3 濃度 100µg/mL で 24 時間暴露時の mTOR 及び S6 のリン酸化レベル評価、LC3 凝集への TSC2 細胞の影響、Akt のリン酸化レベルの評価</p> <p>in vivo : 濃度 50 mg/kg の G5.5、G3 を気管内投与 4 時間後に屠殺、肺の湿重量/乾重量比測定、エラスタンス変化、生存率、病理検査</p>	
(対象 endpoint)	細胞生存率、オートファジー誘発性、病理組織、肺の湿重量/乾重量比、肺エラスタンス、マウス生存率	
被検試料	物質名	PAMAM デンドリマー(Polyamidoamine dendrimer): 第 1~8 世代(G1、G2、G3、G3.5、G4、G4.5、G5、G5.5、G6、G7、G7.5、G8)
	詳細	Sigma-Aldrich 社、PAMAM デンドリマーメタノール溶液として購入
	調製方法	クリーンベンチで 24 時間風乾させメタノール除去後、PBS に溶解
	暴露前観察方法	記載なし
In vitro	条件等	ヒト肺腺癌細胞(A549)
	細胞種	肺・気管
In vivo	条件等	マウス(Balb/c、雄、6~10 週齢)
	投与経路	気管
結果	<p>PAMAM デンドリマーナノ粒子の A549 細胞暴露により、殆どのカチオン性 PAMAM デンドリマー (G3、G4、G5、G6、G7、G8) 暴露群で細胞死が見られたが、アニオン性 PAMAM デンドリマー暴露群には見られなかった。PAMAM G3 暴露で細胞にアポトーシスは見られず、オートファジーの誘発が見られた。また、オートファジーを形成する ATG6(ベクリン 1)の阻害剤である 3MA 及びノックダウンする siRNA を用いた評価では、両方とも PAMAM G3 暴露で減少した細胞生存率を増加させ、オートファジーと細胞死の関連性を示した。さらに、PAMAM G3 暴露で誘発されるオートファジーが Akt-TSC2-mTOR シグナル伝達経路を通じて細胞死を引き起こすことが示唆された。一方 PAMAM G3 をマウスに気管内投与したところ、病理組織、肺組織の湿重量/乾重量比の増加で特徴付けられる肺炎症性の有意な増加が見られた。また 3MA 投与による湿重量/乾重量比増加の改善、肺エラスタンス変化の回復及びマウスの生存率の明らかな改善が見られた。</p>	

d) 量子ドット (Quantum Dot : QD)

文献 No.	36	
書誌情報	B. A. Koeneman et al., Toxicol. in Vitro, 23, 955, 2009.	
試験目的	細胞毒性評価	
実験方法	<p>細胞毒性を、ヒト培養細胞 Caco-2 を用いて評価。QDs を $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$-free PBS に懸濁して使用。濃度は 0.01~1000 mg/L。14~21 日培養した Caco-2 細胞に添加後、24hrs 培養し毒性を評価した。ポジティブコントロールとして塩化カドミウム (濃度 : 0.01~1000 mg/L) を用いた。</p> <p>mass concentration analysis : Water ら (1998) の標準法に従った。硝酸で QDs を断片化し、ICP-AES によりカドミウム濃度を測定。</p> <p>免疫細胞学的解析 : Koeneman ら (2004) の方法に従った。γ-カテニンを一次抗体として添加し、4°C で 1 晩培養。HBSS で洗浄後、二次抗体を添加し、4°C で 1 晩培養。HBSS で洗浄後共焦点顕微鏡により細胞を観察し、Alexa 488 の蛍光を解析した。</p> <p>cells grown on inserts for TEER measurements : コラーゲン処理した Caco-2 を 14~21 日培養した後、膜抵抗値 (TEER) を測定し、量子ドットの Caco-2 細胞単層膜構造に対する影響を解析した。</p> <p>細胞生存率測定 : Koeneman ら (2004) の方法に従い生細胞および死細胞をそれぞれ染色し、共焦点顕微鏡により細胞を観察し、細胞生存率を測定した。</p>	
対象 endpoint	in vitro 急性毒性	
被検試料	物質名	量子ドット (Water soluble quantum dots (QDs))
	詳細	American Dye Source社、
	調製方法	QDs が持つテルル化カドミウムコアを、親水性キャッピングリガンドであるチオグリコール酸ナトリウムによりコーティング処理。stock suspension は、水に懸濁して調製。カドミウム 0.25 wt%、pH 10~11 とした。また、 Ca^{2+} および Mg^{2+} の量子ドットに対する凝集効果を測定するために、 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -free PBS に懸濁、調製した。
	暴露前観察方法	動的光散乱法
In vitro	条件等	Caco-2
	細胞種	ヒト結腸癌由来
In vivo	条件等	—
	投与経路	—
結果	TEER による測定においては、凝集 QDs による毒性はみられなかった。塩化カドミウムの 1mg/L 処理群、QDs の 0.1mg/L および 1mg/L 処理群において膜透過性の時間依存的減少がみられたが、QDs 高濃度処理群 (10 mg/L、1000 mg/L 処理群) においてはみられなかった。	

文献 No.	73	
書誌情報	C.-H. Lin et al., Nanotechnol., 20, 215101, 2009.	
試験目的	薬物動態プロファイル、細胞毒性評価、肝臓毒性評価、腎臓毒性評価	
実験方法	1 グループ 6 匹。静脈注射により単回暴露。QD705 および QD-ORG の投与濃度は各 40 pmol。ポジティブコントロールとして塩化カドミウムを用いた (用量は 41µg)。各 100µl/mouse 投与。被検試料投与 1day、1、2、4、16weeks 後に計画屠殺。体重測定後、血液採取、脾臓、肝臓、腎臓を含む各器官を摘出。臓器重量測定および TaqMan array による RT-PCR、ICP-MS による Cd/Te 比測定を行った。また、各組織を抗 MT-1/2 を用いて標識し、光学顕微鏡観察による免疫組織化学的解析を行った。さらにマウス RAG 細胞の培養を行い、in vitro でのメタロチオネイン MT-1 発現解析を行った。QD705 コアの Cd/Te 比は、通常 69:1 であるが、QD705 が分解されると有意に増大する。また、遊離カドミウムは組織中のメタロチオネイン発現を誘導する。これを利用し、1) 各組織中のカドミウムおよびテルルの濃度を測定し、2) メタロチオネインの発現プロファイルを行うことで、QD705 の安定性および生体内運命を考察した。	
対象 endpoint	急性毒性、特定標的臓器毒性	
被検試料	物質名	1. 量子ドット (Quantum Dot 705 : (QD705)) 2. 量子ドット (Quantum Dot 705-organic : QD-ORG)
	詳細	1. Invitrogen 社から購入。Cd/Se/Te コアは、ZnS shell を有し、methoxy-PEG-5000 によってコーティング処理されている。直径:約 20 nm、Cd/Se/Te コアの成分割合 : 56.16 ± 8.54 % Cd、5.80 ± 3.60 % Se、0.92 ± 0.20 % Te
		2. Invitrogen 社から購入。Cd/Se/Te コアは、methoxy-PEG-5000 コーティング未処理。直径:約 20 nm、Cd/Se/Te コアの成分割合 : 56.16 ± 8.54 % Cd、5.80 ± 3.60 % Se、0.92 ± 0.20 % Te
	調製方法	—
	暴露前観察方法	—
In vitro	条件等	
	細胞種	
In vivo	条件等	マウス (ICR、雄、8 週齢)
	投与経路	single intravenous dose (injected via tail vein)
結果		暴露 4 週間後の体内カドミウム分布濃度は、QD705 処理群と塩化カドミウム処理群とでは、全く異なっていた。QD705 処理群では肝臓>腎臓>脾臓の順に高く、塩化カドミウム処理群では腎臓>脾臓>肝臓の順に高かった。また、QD705 由来のカドミウムの方が、より長く体内に残存していた。暴露 16 週間後もほとんどの遊離カドミウムが排泄されずに残存しており、特に腎臓での蓄積率は暴露 4 週間後の 2 倍となっていた。QD705 処理群の Cd/Te 比は、腎臓において有意な時間依存的増加を示した。in vivo でのメタロチオネイン MT-1 発現解析の結果も、腎臓における MT-1 mRNA の時間依存的増加が有意であることを示していた。

文献 No.	28	
書誌情報	P. Lin et al., Environ. Sci. Technol., 42(16), 6264, 2008.	
試験目的	薬物動態プロファイル、細胞毒性評価、肝臓毒性評価、腎臓毒性評価	
実験方法	<p>1 グループ 6 匹。静脈注射により単回暴露。QD705 の投与濃度は各 40 pmol。各 100µl/mouse 投与。1hr、4hrs、24hrs、3、7、14、28days、6 ヶ月後に計画屠殺。体重測定後、血液採取、脾臓、肝臓、腎臓を摘出し、臓器重量の測定および TEM による組織学的解析を行った。また、Mass balance 試験については、QD705 投与 24hrs、28days、6 ヶ月後に行った。カドミウムは QD705 の主要成分であるため、カドミウムの測定により、間接的に QD705 を定量することが可能である。ICP-MS を用いて、各組織、尿および糞便中のカドミウム (Cd111) を測定した。</p> <p>組織別のデータを比較・検討し、被検試料の毒性を評価。薬物動態プロファイルを行った。</p>	
対象 endpoint	急性毒性、特定標的臓器毒性	
被検試料	物質名	量子ドット (Quantum Dot 705 : QD705)
	詳細	Quantum Dot Corporation 社。CdSeTe core (with approximately 46% Cd、10% Se、1% Te) は ZnS shell を有し、methoxy-PEG-5000 によりコーティング処理されている。大きさ：約 18.5 nm、分子量：1.5 × 10 ⁶ g/mol
	調製方法	生理食塩水に懸濁、調製した。
	暴露前観察方法	Giepmans ら (2005) の方法に従った。
In vitro	条件等	—
	細胞種	—
In vivo	条件等	マウス (ICR、雄、8 週齢、32.9-38.7 g)
	投与経路	single intravenous dose (injected via tail vein)
結果	<p>QD705 投与群において、28 日後と 6 カ月後では、QD705 の分解および代謝レベルに差が認められた。QD705 の残留および蓄積は、少なくとも投与 28 日後までは脾臓、肝臓、腎臓にほとんど認められなかった。光学顕微鏡観察では脾臓、肝臓、腎臓の、QD705 投与による大きな組織学的変化は認められなかった。しかし、電子顕微鏡観察下では腎尿細管上皮細胞において、QD705 投与 28 日後と 6 カ月後の間に明確なミトコンドリアの変化を認めた。</p>	

e) その他のナノマテリアル

文献 No.	6	
書誌情報	J. Sun and, T. Ding, IEEE Trans. Nanobiosci., 8(1), 78, 2009	
試験目的	DNA 損傷経路	
実験方法	ナノ粒子濃度 10~200µg/mL の 4 濃度で 24 時間暴露、RT-PCR 法により P53、P21、Gadd45 及び HSP70 の発現を測定。	
対象 endpoint	P53、P21、Gadd45 及び HSP70 発現	
被検試料	物質名	1. ヒドロキシアパタイト(HAP) 2. リン酸三カルシウム(TCP)
	詳細	1. 中国科学院 上海珪酸塩研究所、粒径：30~80 nm 2. 中国科学院 上海珪酸塩研究所、粒径：30~80 nm
	調製方法	ナノ粒子パウダーを 10 分間超音波処理後 10%ウシ胎児血清含有 RPMI-1640 に加え懸濁
	暴露前観察方法	記載なし
In vitro	条件等	腹腔マクロファージ(SD ラットに 6%スターチブロスを注入し、腹腔洗浄液として腹腔マクロファージを採取)
	細胞種	マクロファージ
In vivo	条件等	—
	投与経路	—
結果	P53 の発現は HAP ナノ粒子の暴露濃度に依存して増加したが、TCP ナノ粒子は暴露濃度が増すと減少を示し、10µg/mL 濃度で明らかな P53 発現を引き起こした。P21 の発現は両ナノ粒子とも 100µg/mL に到達するまで段階的に増加し、200µg/mL 暴露濃度群は対照群と近似していた。また、Gadd45 の発現に HAP は影響を示さなかったが、TCP ナノ粒子 20µg/mL 濃度で明確に Gadd45 の発現を示した。さらに HAP ナノ粒子暴露による HSP70 の発現は P53 と類似しており、濃度に依存して増加したが、TCP ナノ粒子暴露では 20µg/mL 濃度をピークに濃度が増加すると段階的に減少した。	

文献 No.	10	
書誌情報	X. Wang et al., J. Nanosci. Nanotechnol., 9(5), 3025, 2009.	
試験目的	細胞毒性評価	
実験方法	直径の異なる MWCNT を用いて細胞生存率、貧食活性、アポトーシスの差異を比較検討。MWCNT の濃度は 0~20µg/mL の 5 濃度。3hrs 暴露後の MTT assay、6hrs 暴露後の TEM での微細構造観察、12hrs および 24hrs 暴露後のフローサイトメトリーにより評価。	
対象 endpoint	in vitro 急性毒性	
被検試料	物質名	1. 多層カーボンナノチューブ (MWCNT) 2. 石英 : Quartz (コントロール)
	詳細	Shenzhen Nanotech Port 社、直径 : 10-20 nm、長さ : 1-5µm、純度 : >95% (MWNT10)
		Shenzhen Nanotech Port 社、直径 : 40-60 nm、長さ : 1-5µm、純度 : >95% (MWNT40)
		Shenzhen Nanotech Port 社、直径 : 60-100 nm、長さ : 1-5µm、純度 : >95% (MWNT60)
		The National Institute for Occupational Health and Poison Control 社、直径 : <5µm、純度 : 99% (コントロール)
調製方法	Shenzhen Nanotech Port 社より、chemical vaporization deposition (CVD) method によって合成された pristine MWCNT を 3 種類購入。それぞれ 20 分超音波処理を行った後、TEM、TGA、ICP-MS、BET analyses により MWNT10、MWNT40、MWNT60 の 3 種類の試料に分類、調製した。	
暴露前観察方法	TEM、TGA、BET analyses、ICP-MS	
In vitro	条件等	モルモット肺胞マクロファージ
	細胞種	モルモット肺
In vivo	条件等	—
	投与経路	—
結果	MWCNT の細胞毒性は、濃度条件が同じ場合は直径の大きさに相関がみられた。また、直径の大きさが同じ場合は濃度に相関が認められた。肺胞マクロファージ貧食活性低下は MWCNT の濃度に依存しており、アポトーシスがみられた部位ではより顕著であった。	

文献 No.	69	
書誌情報	L. Tabet et al., J. Toxicol. Environ. Health. Part A, 72, 60, 2009.	
試験目的	細胞毒性評価	
実験方法	細胞生存率、アポトーシス、酸化ストレス、細胞内取り込みを比較検討し、細胞毒性を評価。被検試料を下記の濃度で暴露。MWCNT : 0~100µg/mL。白石綿、青石綿、CB nanoparticles : 100µg/mL。6、24、48、72hrs 暴露。48、72hrs 培養。	
対象 endpoint	in vitro 急性毒性	
被検試料	物質名	1. 多層カーボンナノチューブ (MWCNT) 2. 青石綿 (アスベスト) 3. 白石綿 (アスベスト) 4. CB nanoparticles
	詳細	1. ARKEMA 社の Graphistrength C100、直径 : 12 nm、長さ : 0.1-13µm 2. UICC 社、直径 : 20 nm 3. UICC 社、直径 : 80 nm 4. Degussa/Evonik 社の FR101 を購入、直径 : 95 nm
	調製方法	MWCNT、青石綿、白石綿についてそれぞれ懸濁液を調製した。MWCNT はジパルミトイルレシチン (DPL)、PBS、エタノールに懸濁。青石綿、白石綿は培養液に懸濁。CB は PBS に懸濁。それぞれ vortex、超音波処理を行った。
	暴露前観察方法	TEM、ICP-MS、ESCA、SEM、BET analyses、Knudsen flow reactor、レーザー回折
	条件等	1. A549 2. MeT5A
In vitro	細胞種	1. ヒト肺上皮細胞 2. ヒト中皮細胞 (アスベスト感受性)
	条件等	—
In vivo	投与経路	—
	結果	MWCNT 投与群では A549、MeT5A の細胞表面に凝集がみられた。PBS 処理群でみられた凝集は、エタノール、DPL 処理群でみられた凝集に比べて有意に大きかった。100µg/mL の濃度では代謝活性低下がみられたが、膜透過性、アポトーシスに変化はみられなかった。青石綿、白石綿投与群では、被検試料は細胞に貫通し、代謝活性低下、アポトーシスの増加がみられたが、膜透過性に変化はみられなかった。CB 投与群では、有害事象はみられなかった。

文献 No.	1	
書誌情報	M. Yokohira et al., J. Toxicol. Pathol., 22: 71, 2009	
試験目的	肺の発がん性バイオアッセイ	
実験方法	グループ 1-6 : 0.1% DHPN 含有飲料水を 2 週間投与、4 週目に以下被検試料 0.5mg/ラットを 0.2 mL の生理食塩水に懸濁させ気管内注入、グループ 1,7 : 石英、グループ 2,8 : CuO micro、グループ 3,9 : CuO nano、グループ 4,10 : TiO ₂ micro、グループ 5,11 : TiO ₂ nano、(グループ 6 : DHPN 対照群、グループ 12 : 未処理対照群)、30 週目に屠殺、検査項目 : 体重、臓器重量(絶対、相対)、一般所見、剖検所見、病理検査	
対象 endpoint	肺の発がん性	
被検試料	物質名	1. 二酸化チタン(TiO ₂ micro)
		2. 二酸化チタン(TiO ₂ nano)
		3. 酸化銅(CuO micro、CAS 1317-38-0)
		4. 酸化銅(CuO nano、CAS 1317-38-0)
		5. 石英粉塵(Quartz dust : DQ-12)
	詳細	1. 和光純薬工業(株)、粒径 : < 5 μ m、ルチル型、(Lot. TCG4139)
		2. 和光純薬工業(株)、粒径 : 80 nm、(Lot. DPN0960)
3. Sigma-Aldrich 社、粒径 : < 5 μ m		
4. Sigma-Aldrich 社、粒径 : 33 nm		
5. Deutsche Montan Technologies 社、粒径 : < 7 μ m		
調製方法	生理食塩水に懸濁	
暴露前観察方法	記載なし	
In vitro	条件等	—
	細胞種	—
In vivo	条件等	ラット(F344/DuCrIcrj、雄、4 週齢)
	投与経路	気管内注入
結果	ナノ粒子暴露群の影響として、剖検所見で DHPN 無投与の CuO 暴露群で肺表面に軽度の結節性変化が見られたが、TiO ₂ 投与群に変化はなかった。病理学的所見で、DHPN 投与群全ての肺に過形成、腺腫、腺癌が見られた。また CuO 及び TiO ₂ ナノ粒子投与群のほうがそれらのマイクロ粒子投与群に比べ腫瘍性病変の数や面積に増加傾向が見られた。DHPN 無投与群では CuO 暴露群の肺に軽度の炎症性変化が見られたが、TiO ₂ 投与群に変化はなかった。	

文献 No.	19	
書誌情報	Y. Sakamoto et al., J. Toxicol. Sci., 34(1), 65, 2009.	
試験目的	発がん性評価	
実験方法	MWCNT、青石綿、カルボキシメチルセルロース (CMC) をそれぞれ単回投与後 52 週間観察し、剖検により発がん性を評価。被検試料投与条件は以下の通り。MWCNT : 1 mg/kg b.w.、7 匹、青石綿 : 2 mg/kg b.w.、10 匹 (コントロール)、CMC : 2 ml/kg b.w.、5 匹 (コントロール)。	
対象 endpoint	発がん性	
被検試料	物質名	1. 多層カーボンナノチューブ (MWCNT) 2. 青石綿 (コントロール) 3. CMC (コントロール)
	詳細	1. MITSUI MWCNT-7、 lot number : 060125-01k 2. UICC-grade, stocked at the Tokyo Metropolitan Institute of Public Health 3. Kanto Chemical 社、2% CMC
	調製方法	Takagi ら (2008a) の方法に従い調製。MWCNT、青石綿を、それぞれ 5% Triton X-100 に懸濁後、SEM により粒子幅と長径を測定した。ICP-MS、イオンクロマトグラフィー により不純物の測定を行った後 2% CMC に懸濁し、実験方法の項に記述されている投与濃度に調製した。
	暴露前観察方法	SEM、TEM、ICP-MS、イオンクロマトグラフィー、光学顕微鏡
In vitro	条件等	—
	細胞種	—
In vivo	条件等	ラット (Fisher 344 DuCrIj、雄、12 週齢、平均 235 g)
	投与経路	a single intrascrotal injection
結果	MWCNT 暴露のラット 6/7 匹に腹腔内播種性中皮腫の症状がみられた。これらは 37-40 週の間にて全て死亡した。青石綿暴露、CMC 暴露のラットに変化はみられなかった。	

2.3 第2章まとめ

2.1 項記載の通り、今回の調査において解析の対象となった論文は 77 報である。全体の傾向としては、前々年度（平成 19 年度）調査では調査範囲 4 年間で 103 報、前年度（平成 20 年度）調査では約 1 年間で 53 報が対象であったことから、ナノマテリアルの安全性に関する論文は年を追うごとに増加していることがわかる。

試験方法に関して今回の調査では、*in vitro* : 41 報、*in vivo* : 41 報（重複 10、複数物質含む）となっており、報告数の増加とともにより現実に近い試験（研究）が実施されていることがうかがえる。さらに、毒性（生体影響）の報告に加え、*in vitro* では種々の形態観察結果、*in vivo* での ADME 等の情報を提示する論文が増加している（試験に供されたナノマテリアルを基準として、のべ 45 報/総数 111 報）ことが、今回の調査結果の特徴であり、今後この傾向は続くと考えられる。表 2.3 に各論文で報告された毒性情報の概要をまとめた。

試験に供されたナノマテリアルとしては、酸化チタン、多層カーボンナノチューブ、鉄ナノ粒子、二酸化ケイ素（シリカ）がそれぞれ 10 報を超えており、単層カーボンナノチューブ、フラーレン、酸化亜鉛がそれらに続いていた。

OECD-WPMN のスポンサーシッププログラムの対象物質のうち、プログラム開始時からスポンサーのついたナノマテリアル（例えば、単層/多層カーボンナノチューブや酸化チタンなど）では、これまでの *in vitro* 主体の研究から *in vivo* による評価報告例が増加していた。第 3 章で述べるとおり、各国・各国際機関のナノマテリアルの安全性確保に関する活動方針が、ナノマテリアルの物性評価や試験方法の開発から、環境・衛生・安全（EHS）の研究推進にシフトしていることから、ナノマテリアルの安全性に関する研究が新たな段階に至っていることがうかがえる。

以下にナノマテリアルごとの論文内容を *in vivo* の結果を中心にまとめた。

a) 全体

今回の調査では、疫学的研究（ヒトへの暴露）に該当する報告は無かった。

二酸化ケイ素（シリカ）ナノ粒子を試験試料として、各種タンパク質存在下における *in vitro* 試験時のナノマテリアルの分散/凝集状態に応じて細胞内への取り込み機構が異なり、それにより毒性発現機序が異なる可能性を示唆する報告があった。

b) フラーレン

ラットへの経口投与により、肝臓および肺において発がん性・細胞毒性が認められた報告がある。また、ワラジムシの細胞膜を不安定にし細胞膜透過性に影響するという報告もある。一方、マウスへの気管内投与では組織損傷や病理組織学的な変化が認められなかった事例や、ウサギ・モルモットでは眼刺激性以外の眼毒性や皮膚毒性（ヒト含む）はないとする報告もある。試料の調製方法（コーティング方法など）の差異が試験結果に影響していることが示唆される。

c) 単層カーボンナノチューブ

マウスへの吸入曝露およびラットへの経口投与で、肺および体循環系（心臓、肝臓、腎臓）における細胞毒性が報告されている。また、マウスでは用量依存的な皮膚毒性についても報告されている。

d) 多層カーボンナノチューブ

マウスへの吸入曝露により、肺、肝臓、脾臓などでの細胞毒性発現が複数報告されている。また、複数のラット気管内投与の試験例では、肺毒性が示されている。一方、マウス腹腔内投与では、単回曝露/反復曝露ともに血中生化学項目測定値にコントロールとの優位差がない等の報告例がある。また、ヒト由来細胞を用いた試験やマウス脳内への定位注入試験では、明確な細胞毒性を示さなかった知見も報告されている。多層カーボンナノチューブは世界各国で商品化されており、試験に供された試料の多様さが試験結果に影響しているものと考えられる。標準物質選定方法の国際標準化が待たれるところである。

e) 酸化チタン微粒子

マウスでは、吸引による肺への移行やそれに伴う免疫応答能への影響、および腫瘍性病変の発現などが報告されている。また、妊娠マウスへの皮下投与で新生仔の肺に変異が観察されたり、出生前曝露により仔の生殖器・中枢神経に影響を与えるなどの報告がある。マウスへの気管内注入試験ではマイクロ酸化チタンに比して、ナノ酸化チタンが有意に免疫学的炎症を誘発することが報告されている。また、ナノ酸化チタンの構造体間（ルチル型/アナタース型）での毒性発現機序の違いも報告されている。ラットによる肺病変観察ではマイクロ粒子よりもナノ粒子で有意に毒性が強く、反対に *in vitro* のヒト由来細胞を用いた試験では、DNA 損傷性ではナノ粒子よりもマイクロ粒子で毒性が強いなど複数の論文で被検試料の粒径依存性が示唆されている。酸化チタンの物性から考えると二次凝集体形態の多様さが試験結果に影響していると考えられる。本物質についても標準物質選定方法の国際標準化が待たれるところである。

f) 二酸化ケイ素（シリカ）

マウスの口咽頭吸入曝露により肺への影響が観察された事例がある。また、同じくマウスによる試験で、静脈投与により肝臓・脾臓に病理所見が観察されながら、肺・腎臓・脳・心臓には影響していないという知見もある。サイズ効果では、マウスへの吸入曝露でナノ粒子はマイクロ粒子に比して細胞毒性が強く、用量依存的に肺損傷および好中球浸潤が観察されている。また、複数の論文で、用量依存的な病変・所見が観察されている。

g) 鉄ナノ粒子

ラットへの慢性吸入曝露により、肺や肺関連リンパ組織に沈着等の病理所見が観察され、肺損傷に至った例も報告されている。また、マウス鼻腔内注入により脳に対する神経毒性を呈した事例が報告されている。サイズ効果では、*in vitro* のヒト由来細胞を用いた試験でナノ粒子よりもマイクロ粒子で DNA 損傷性が強いことが報告されている。また、病変等に対する用量依存性が複数の論文で指摘されている。

h) その他のナノマテリアル

- ・ 銀ナノ粒子：ラットへの反復吸入暴露による全身毒性惹起が報告され、肺・血液・肝臓に対しては用量依存性が認められたという知見がある。
- ・ 酸化亜鉛：バルク酸化亜鉛に比してナノ酸化亜鉛がワラジムシ細胞膜の不安定化により強く寄与することが報告されている。
- ・ 酸化アルミニウム：ラットへの経口投与により体内蓄積性および遺伝毒性が報告されている。また、ラット鼻部吸入暴露により肺毒性を呈する報告が複数ある。
- ・ カーボンブラック：マウスへの単回吸入により肺毒性が認められた報告が複数ある。毒性の程度は MWCNT よりは軽微であることが言及されている。
- ・ ポリスチレン微粒子：ラットへの咽頭吸入により肺への沈着や炎症性細胞の増加等の病理所見が報告されている。マウスでは気管内投与による肺炎惹起の報告例もある。
- ・ デンドリマー：マウスへの気管内投与により、肺炎症性を示す病理所見が報告されている。
- ・ 量子ドット：マウスへの静脈注射により肝臓および腎臓への毒性が認められた報告があるが、溶出したコア成分（カドミウム）本来の毒性によるとの判断がされている。カドミウムを含まない量子ドットに関する安全性報告例は今回の調査では確認できていない。
- ・ 酸化銅：ラットへの期間内注入では、マイクロ粒子に比してナノ粒子が有意に強い細胞毒性を示した報告がある。

表 2.3. 文献解析毒性情報一覧

ナノマテリアル		文献 No.	毒性情報		
			in vitro	in vivo	その他
1	フラーレン	15	※	○	—
		31	—	※	—
		43	—	○	—
		47	○	—	—
		48	—	○	△
		58	—	※	△
3	単層カーボンナノチューブ	14	※	—	△
		17	—	※	—
		31	—	※	—
		34	※	—	△
		54	—	※	△
		56	※	※	△
4	多層カーボンナノチューブ	67	※	—	△
		5	—	※	—
		9	—	○	△
		10	※	—	△
		12	—	※	△
		13	—	○	△
		17	—	※	—
		19	—	※	△
		25	※	○	△
		26	—	※	△
		57	○	—	—
		66	○	○	—
		69	※	—	△
76	—	※	—		
5	銀ナノ粒子	62	○	—	—
		49	—	※	△
		52	※	—	△
		53	※	—	△
		71	○	—	△

【凡例】 — : 記載なし、○ : 毒性 (生体影響) なし、※ : 毒性 (生体影響) あり、△[その他] : in vitro (蛍光標識、電子顕微鏡等での観察結果等)、in vivo (ADME 等) の記載あり

表 2.3. 文献解析毒性情報一覧 (続き)

ナノマテリアル		文献 No.	毒性情報		
			in vitro	in vivo	その他
6	鉄ナノ粒子	4	※	—	—
		11	※	—	—
		27	※	—	—
		30	※	—	—
		45	※	—	△
		62	○	—	—
		64	※	—	—
		50	—	—	△
		16	—	※	—
		18	—	—	△
		22	—	※	—
		61	—	※	—
7	カーボンブラック	17	—	※	—
		54	—	※	△
		67	※	—	△
		69	○	—	△
8	酸化チタン	30	※	—	—
		32	※	—	—
		44	※	—	—
		62	○	—	—
		64	※	—	—
		75	○	—	△
		21	※	※	—
		1	—	※	—
		2	—	※	—
		20	—	※	—
		35	—	※	—
		39	—	※	—
		51	—	※	△
		58	—	※	△
65	—	※	—		
77	—	※	—		
10	酸化アルミニウム (アルミナ)	30	※	—	—
		7	—	※	—
		59	—	※	—
		61	—	※	—
11	酸化セリウム	8	※	—	—
		75	○	—	△

【凡例】 — : 記載なし、○ : 毒性 (生体影響) なし、※ : 毒性 (生体影響) あり、△[その他] : in vitro (蛍光標識、電子顕微鏡等での観察結果等)、in vivo (ADME 等) の記載あり

表 2.3 文献解析毒性情報一覧 (続き)

ナノマテリアル		文献 No.	毒性情報		
			in vitro	in vivo	その他
12	酸化亜鉛	23	※	—	—
		30	※	—	—
		55	※	—	—
		58	—	※	△
		67	※	—	△
		75	※	—	△
13	二酸化ケイ素 (シリカ)	24	※	—	△
		27	※	—	—
		33	—	—	△
		37	※	—	—
		38	※	—	—
		40	※	—	—
		21	※	※	—
		42	—	※	—
		46	—	※	—
		67	※	—	△
14	ポリスチレン	3	※	—	△
		63	—	※	△
		68	—	※	△
15	デンドリマー	70	※	※	—
21	白金ナノ粒子/コロイド	41	※	—	—
22	量子ドット	28	—	※	△
		36	※	—	△
		73	○	※	△

【凡例】 — : 記載なし、○ : 毒性 (生体影響) なし、※ : 毒性 (生体影響) あり、△[その他] : in vitro (蛍光標識、電子顕微鏡等での観察結果等)、in vivo (ADME 等) の記載あり

表 2.3 文献解析毒性情報一覧 (続き)

ナノマテリアル		文献 No.	毒性情報		
			in vitro	in vivo	その他
24	銅	1	※	—	—
		30	※	—	—
		64	※	—	—
	Quartz	10	※	—	△
	アスベスト	69	※	—	△
	青石綿	19	—	○	△
	ランタン	30	※	—	—
	スズ	30	※	—	—
	金	62	○	—	—
	アンチモン	62	※	—	—
	コバルト	62	※	—	—
	タングステンカーバイド	72	○	—	—
	コバルトドーブ タングステンカーバイド	72	※	—	—
	金	29	—	—	△
	ヒドロキシアパタイト	6	※	—	—
	リン酸三カルシウム	6	※	—	—
	クオーツ	1	※	—	—

【凡例】 — : 記載なし、○ : 毒性 (生体影響) なし、※ : 毒性 (生体影響) あり、△[その他] : in vitro (蛍光標識、電子顕微鏡等での観察結果等)、in vivo (ADME 等) の記載あり

2.4 文献書誌情報

本章で解析の対象とした各文献の書誌情報を以下に示す。文献 No.は「2.2 文献解析結果」表中の文献 No.に対応している。

1. Masanao Yokohira, Nozomi Hashimoto, Keiko Yamakawa, Satoshi Suzuki, Kousuke Saoo, Toshiya Kuno, and Katsumi Imaida, Lung Carcinogenic Bioassay of CuO and TiO₂ Nanoparticles with Intratracheal Instillation Using F344 Male Rats, *J Toxicol Pathol* 2009; 22: 71-78
2. Midori Shimizu, Hitoshi Tainaka, Taro Oba, Keisuke Mizuo, Masakazu Umezawa and Ken Takeda, Maternal exposure to nanoparticulate titanium dioxide during the prenatal period alters gene expression related to brain development in the mouse, *Particle and Fibre Toxicology* 2009, 6:20, 1-8 (2009)
3. Eleonore Froehlich, Claudia Samberger, Tatjana Kueznik, Markus Absenger, Thomas R Pieber, Cytotoxicity of nanoparticles independent from oxidative stress, *J Toxicol Sci.*, 34(4), 363-375 (2009)
4. Christina R. Keenan, Regine Goth-Goldstein, Donald Lucas, David L. Sedlak, Oxidative Stress Induced by Zero-Valent Iron Nanoparticles and Fe(□) in Human Bronchial Epithelial Cells, *ENVIRONMENTAL SCIENCE & TECHNOLOGY*, 43, (12), 4555–4560, (2009)
5. L. A. Mitchell, F. T. Lauer, S. W. Burchiel, J. D. McDonald, Mechanisms for how inhaled multiwalled carbon nanotubes suppress systemic immune function in mice., *Nature Nanotechnology*, 4, 451-456, 2009
6. Jiao Sun, Tingting Ding, Differences in DNA Damage Pathways Induced by Two Ceramic Nanoparticles, *IEEE TRANSACTIONS ON NANOBIOSCIENCE*, 8 (1), 78-82, 2009
7. A. Balasubramanyan, N. Sailaja, M. Mahboob, M.f. Rahman, S. Misra, Paramjit Grover, Saber M. Hussain, Evaluation of genotoxic effects of oral exposure to Aluminum oxide nanomaterials in rat bone marrow, *Mutat Res/Genetic Toxicol. Environ. Mutagenesis*, 676, 41-47 (2009)
8. B. Rothen-Rutishauser, Blank, C. Mhlfeld, C. Brandenberger, D. O. Raemy, P. Gehr, R. N. Grass, L. K. Limbach, W. J. Stark, Direct Combination of Nanoparticle Fabrication and Exposure to Lung Cell Cultures in a Closed Setup as a Method To Simulate Accidental Nanoparticle Exposure of Humans, *Environ Sci Technol*, 43(7), 2634-2640 (2009)
9. Qu Guangbo, Bai Yuhong, Zhang Yi, Yan Bing, Jia Qing, Zhang Weidong, The effect of multiwalled carbon nanotube agglomeration on their accumulation in and damage to organs in mice., *Carbon* 47, 2060-2069, 2009
10. Wang X., Jia G., Wang H., Nie H., Yan L., Wang S., Deng X. Y., Diameter Effects on Cytotoxicity of Multi-Walled Carbon Nanotubes., *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 9, 3025-3033, 2009
11. J. K. Hsiao, T. I. Weng, M. F. Tai, Y. F. Chen, Y. H. Wang, C. Y. Yang, J. L. Wang, H. M. Liu, Cellular Behavior Change of Macrophage After Exposure to Nanoparticles, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 9, 1388–1393, 2009
12. Li J.G., Li Q.N., Xu J.Y., Cai X.Q., Liu R.L., LiY.J., Ma J.F., Li W.X., The Pulmonary Toxicity of Multi-Wall Carbon Nanotubes in Mice 30 and 60 Days After Inhalation Exposure., *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 9, 1384-1387, 2009
13. Deng Xiaoyong, Wu Fei, Liu Zhen, Luo Man, Li Ling, Ni Qingshun, Jiao Zheng, Wu Minghong, Liu Yuanfang, The splenic toxicity of water soluble multi-walled carbon nanotubes in mice., *Carbon* 47, 1421-1428, 2009
14. Barbara J. Panessa-Warren, Mathew M. Maye, John B. Warren, Kenya M. Crosson, Single walled carbon nanotube reactivity and cytotoxicity following extended aqueous exposure., *Environmental Pollution*, 157, 1140-1151, 2009.

15. P. Spohn, C. Hirsch, F. Hasler, A. Bruinink, H.F. Krug, P. Wick, C₆₀ fullerene: A powerful antioxidant or a damaging agent? The importance of an in-depth material characterization prior to toxicity assays, *Environmental Pollution*, 157, 1134-1139, 2009.
16. Ronald S. Slesinski, Duncan Turnbull, Chronic Inhalation Exposure of Rats for up to 104 Weeks to a Non-Carbon-Based Magnetite Photocopying Toner, *International Journal of Toxicology*, 27, 427-439, (2008)
17. A. Erdely, T. Hulderman, R. Salmen, A. Liston, P. C. Zeidler-Erdely, D. Schwegler-Berry, V. Castranova, S. Koyama, Y.-A. Kim, M. Endo, P. P. Simeonova, Cross-Talk between Lung and Systemic Circulation during Carbon Nanotube Respiratory Exposure. Potential Biomarkers., *Nano Letters*, 9(1), 36-43, 2009
18. A. R. Jalilian, A. Panahifar, M. Mahmoudi, M. Akhlaghi, A. Simchi, Preparation and biological evaluation of [⁶⁷Ga]-labeled-superparamagnetic nanoparticles in normal rats, *Radiochemica Acta*, 97,(1), 51-56 (2009)
19. Yoshimitsu Sakamoto, Dai Nakae, Nobutaka Fukumori, Kuniaki Tayama, Norio Ohashi, Akio Ogata, Akihiko Maekawa , Induction of mesothelioma by a single intrascrotal administration of multi-wall carbon nanotube in intact male Fischer 344 rats., *The Journal of Toxicological Sciences*, 34,(1), 65-76, 2009
20. K. Takeda, K. Suzuki, A. Ishihara, M. Kubo-Irie, R. Fujimoto, M. Tabata, S. Oshio, Y. Nihei, T. Ihara, and M. Sugamata, Nanoparticles Transferred from Pregnant Mice to Their Offspring Can Damage the Genital and Cranial Nerve Systems, *Journal of Health Science*, 55 (1), 95-102 (2009)
21. Hye Won Kim, Eun-Kyung Ahn, Bo Keun Jee, Hyoungh-Kyu Yoon, Kweon Haeng Lee, Young Lim, Nanoparticulate-induced toxicity and related mechanism in vitro and in vivo, *Journal of Nanoparticle Research*, 1,(1) , 55-65 (2009)
22. B. Wang, W. Feng, M. Zhu, Y. Wang, M. Wang, Y. Gu, H. Ouyang, H. Wang, M. Li, Y. Zhao, Z. Chai, H. Wang, Neurotoxicity of low-dose repeatedly intranasal instillation of nano- and submicron-sized ferric oxide particles in mice, *Journal of Nanoparticle Research*, 11, 41-53, (2009)
23. Weisheng Lin, Yi Xu, Chuan-Chin Huang, Yinfa Ma, Katie B. Shannon, Da-Ren Chen, Yue-Wern Huang, Toxicity of nano- and micro-sized ZnO particles in human lung epithelial cells, *Journal of Nanoparticle Research*, 11, 25–39, (2009)
24. Kyung O. Yu, Christin M. Grabinski, Amanda M. Schrand, Richard C. Murdock, Wei Wang, Baohua Gu, John J. Schlager, Saber M. Hussain, Toxicity of amorphous silica nanoparticles in mouse keratinocytes, *Journal of Nanoparticle Research*, 11, 15–24 (2009)
25. M. Chiaretti, G. Mazzanti, S. Bosco, S. Bellucci, A. Cucina, F. Le Foche, G. A. Carru, S. Mastrangelo, A. Di Sotto, R. Masciangelo, A. M. Chiaretti, C. Balasubramanian, G. De. Bellis, F. Micciulla, N. Porta, G. Deriu, A. Tiberia, Carbon nanotubes toxicology and effects on metabolism and immunological modification in vitro and in vivo., *J. Phys.: Condens. Matter*, 20, 474203, 1-10, 2008
26. Liu Aihong, Sun Kangning , Yang Jiafeng, Zhao Dongmei, Toxicological effects of multi-wall carbon nanotubes in rats., *J. Nanoparticle Res.*, 10, 1303-1307, 2008
27. D. M. Souza, A. L. Andrade, J. D. Fabris, P. Valério, A. M. Góes, M. F. Leite, R.Z. Domingues, Synthesis and in vitro evaluation of toxicity of silica-coated magnetite nanoparticles, *Journal of Non-Crystalline Solids*, 354 (2008) 4894-4897
28. P. Lin, J.-W. Chen, L. W. Chang, J.-P. Wu, L. Redding, H. Chang, T.-K. Yeh, C. S. Yang, M.-H. Tsai, H.-J. Wang, Y.-C. Kuo, R. S. H. Yang, Computational and Ultrastructural Toxicology of a Nanoparticle, Quantum Dot 705, in Mice., *Environmental Science & Technology*, 42(16), 6264-6270, 2008
29. Ganeshchandra Sonavane, Keishiro Tomoda, Kimiko Makino, Biodistribution of colloidal gold nanoparticles after intravenous administration: Effect of particle size, *Colloids Surf B*, 66(2), 274-280 (2008)
30. Xiaoke Hu, Sean Cook, Peng Wang, Huey-min Hwang, In vitro evaluation of cytotoxicity of engineered metal oxide nanoparticles, *Science of the Total Environment* 407 (2009) 3070-3072

31. Janne K. Folkmann, Lotte Risom, Nicklas R. Jacobsen, Håkan Wallin, Steffen Loft, Peter Møller, Oxidatively Damaged DNA in Rats Exposed by Oral Gavage to C₆₀ Fullerenes and Single-Walled Carbon Nanotubes., *Environmental Health Perspectives*, 117(5), 2009.
32. Brian C. Schanen, Ajay S. Karakoti, Sudipta Seal, Donald R. Drake III, William L. Warren, and William T. Self, Exposure to Titanium Dioxide Nanomaterials Provokes Inflammation of an in Vitro Human Immune Construct, (Article) *American Chemical Society*, 3 (9), 2523-2532 (2009)
33. Isaac Stayton, Jeffrey Winiarz, Katie Shannon, Yinfu Ma, Study of uptake and loss of silica nanoparticles in living human lung epithelial cells at single cell level, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2009) 394, 95–1608
34. Alexandra E. Porter, Mhairi Gass, James S. Bendall, Karin Muller, Angela Goode, Jeremy N. Skepper, Paul A. Midgley, Mark Welland, Uptake of Noncytotoxic Acid-Treated Single-Walled Carbon Nanotubes into the Cytoplasm of Human Macrophage Cells., *ACS Nano*, 3(6), 1485-1492, 2009
35. Damjana Drobne, Anita Jemec, Ziva Pipan Tkalec, In vivo screening to determine hazards of nanoparticles : Nanosized TiO₂, *environmental Pollution*, 157, (2009) 1157-1164
36. Brian A. Koeneman, Yang Zhang, Kiril Hristovski, Paul Westerhoff, Yongsheng Chen, John C. Crittenden, David G. Capco, Experimental approach for an in vitro toxicity assay with non-aggregated quantum dots., *Toxicology in Vitro*, 23, 955–962, 2009
37. Dorota Napierska, Leen C. J. Thomassen, Virginie Rabolli, Dominique Lison, Laetitia Gonzalez, Micheline Kirsch-Volders, Johan A. Martens, Peter H. Hoet, Size-Dependent Cytotoxicity of Monodisperse Silica Nanoparticles in Human Endothelial Cells, *small* 2009, 5, (7), 846–853
38. Fen Wang, Feng Ga, Minbo Lan, Huihui Yuan, Yongping Huang, Jianwen Liu, Oxidative stress contributes to silica nanoparticle-induced cytotoxicity in human embryonic kidney cells, *Toxicology in Vitro* 23 (2009) 808–815
39. Geyu Liang, Yuepu Pu, Lihong Yin, Ran Liu, Bing Ye, Yaoyao Su, and Yanfen Li, Influence of Different Sizes of Titanium Dioxide Nanoparticles on Hepatic and Renal Functions in Rats with Correlation to Oxidative Stress, *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 72, 740-745, (2009)
40. Matthieu Fisichella, Hinda Dabboue, Sanjib Bhattacharyya, Marie-Louise Saboungi, Jean-Paul Salvetat, Tobias Hevor, Martine Guerin, Mesoporous silica nanoparticles enhance MTT formazan exocytosis in HeLa cells and astrocytes, *Toxicology in Vitro* 23 (2009) 697–703
41. P. Joanna, G. Helge, E. Melanie, T. Michael, C. Marlene, B. Stefan, M. Thierry, B. Holger, S. Winfried, Z. Volker, B. Patrice, S. Reinhard, G. Dagmar, M. Doris, Cellular uptake of platinum nanoparticles in human colon carcinoma cells and their impact on cellular redox systems and DNA integrity., *Chem. Res. Toxicol.*, 22(4), 649-59 (2009)
42. Hikaru Nishimori, Masuo Kondoh, Katsuhiro Isoda, Shin-ichi Tsunoda Yasuo Tsutsumi, Kiyohito Yagi, Histological analysis of 70-nm silica particles-induced chronic toxicity in mice, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 72 (2009) 626–629
43. Hisae Aoshima, Yasukazu Saitoh, Shinobu Ito, Shuichi Yamana, Nobuhiko Miwa, Safety evaluation of highly purified fullerenes (HPFs): based on screening of eye and skin damage. *The Journal of Toxicological Sciences*, 34(5), 555-562, 2009.
44. Zhi Pan, Wilson Lee, Lenny Slutsky, Richard A. F. Clark, Nadine Pernodet, and Miriam H. Rafailovich, Adverse Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles on Human Dermal Fibroblasts and How to Protect Cells, *small* 2009, 5(4), 511–520
45. M. Mahmoudi, A. Simchi, A.S. Milani, P. Stroeve, Cell toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles, *Journal of Colloid and Interface Science*, 336 (2009) 510–518

46. Hikaru Nishimori, Masuo Kondoh, Katsuhiro Isoda, Shin-ichi Tsunoda, Yasuo Tsutsumi, Kiyohito Yagi, Silica nanoparticles as hepatotoxicants, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 72 (2009) 496–501
47. Shinya Kato, Hisae Aoshima, Yasukazu Saitoh, Nobuhiko Miwa, Biological Safety of LipoFullerene composed of Squalane and Fullerene-C60 upon Mutagenesis, Photocytotoxicity, and Permeability into the Human Skin Tissue., *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 104(6), 483-487, 2009.
48. M. Naota, A. Shimada, T. Morita, K. Inoue, H. Takano, Translocation Pathway of the Intratracheally Instilled C60 Fullerene from the Lung into the Blood Circulation in the Mouse: Possible Association of Diffusion and Caveolae-mediated Pinocytosis., *Toxicologic Pathology*, 37, 456-462, 2009.
49. J. H. Sung, J. H. Ji, J. D. Park, J. U. Yoon, D. S. Kim, K. S. Jeon, M. Y. Song, J. Jeong, B. S. Han, J. H. Han, Y. H. Chung, H. K. Chang, J. H. Lee, M. H. Cho, B. J. Kelman, I. J. Yu, Subchronic Inhalation Toxicity of Silver Nanoparticles., *Toxicological Sciences*, 108(2), 452-461, 2009.
50. M.-T. Zhu, W.-Y. Feng, Y. Wang, B. Wang, M. Wang, H. Ouyang, Y.-L. Zhao, Z.-F. Chai, Particokinetics and Extrapulmonary Translocation of Intratracheally Instilled Ferric Oxide Nanoparticles in Rats and the Potential Health Risk Assessment, *Toxicological Sciences*, 107(2), 342-351 (2009)
51. Jinyuan Chen, Xia Dong, Jing Zhao and Guping Tang, In vivo acute toxicity of titanium dioxide nanoparticles to mice after intraperitoneal injection, *Journal of Applied Toxicology*, 2009, 29, 330–337
52. S. Arora, J. Jain, J.M. Rajwade, K.M. Paknikar, Interactions of silver nanoparticles with primary mouse fibroblasts and liver cells., *Toxicology and Applied Pharmacology*, 236(3), 310-318, 2009
53. P. V. AshaRani, Grace Low Kah Mun, Manoor Prakash Hande, Suresh Valiyaveetil, Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver Nanoparticles in Human Cells., *ACS Nano*, 3(2), 279-290, 2009.
54. Haiyan Tong, John K. McGee, Rajiv K. Saxena, Urmila P. Kodavanti, Robert B. Devlin, M. Ian Gilmour, Influence of acid functionalization on the cardiopulmonary toxicity of carbon nanotubes and carbon black particles in mice., *Toxicology and Applied Pharmacology*, 239(3), 224-232, 2009
55. Vyom Sharma, Ritesh K. Shukla, Neha Saxena, Devendra Parmar, Mukul Das, Alok Dhawan, DNA damaging potential of zinc oxide nanoparticles in human epidermal cells, *Toxicology Letters*, 185 (2009) 211–218
56. A. R. Murray, E. Kisin, S. S. Leonard, S. H. Young, C. Kommineni, V. E. Kagan, V. Castranova, A. A. Shvedova, Oxidative stress and inflammatory response in dermal toxicity of single-walled carbon nanotubes. *Toxicology*, 257, 161-171, 2009.
57. Wirmitzer U., Herbold B., Voetz M., Ragot J, Studies on the in vitro genotoxicity of baytubes, agglomerates of engineered multi-walled carbon-nanotubes (MWCNT)., *Toxicology letters*, Vol. 186, No. 3, 160-165., 2009
58. Janez Valant, Damjana Drobne, Kristina Sepcic, Anita Jemec, Ksenija Kogej, Rok Kostanjsek, Hazardous potential of manufactured nanoparticles identified by in vivo assay., *Journal of Hazardous Materials*, 171, 160-165, 2009.
59. Pauluhn Jurgen, Pulmonary toxicity and fate of agglomerated 10 and 40 nm aluminum oxyhydroxides following 4-week inhalation exposure of rats: toxic effects are determined by agglomerated, not primary particle size, *Toxicol. Sci.*, 109(1), 152-67 (2009).
60. D.Saini, R. M. Buller, A. S. Biris, P. Biswas, Characterization of a Nose-Only Inhalation Exposure System for Ectromelia Virus Infection of Mice, *Particulate Sci. Technol.*, 27(2), 152-165 (2009)
61. Pauluhn Jurgen, Retrospective analysis of 4-week inhalation studies in rats with focus on fate and pulmonary toxicity of two nanosized aluminum oxyhydroxides (boehmite) and pigment-grade iron oxide (magnetite), *Toxicol.*, 259(3), 140-8 (2009).
62. Lisa Bregoli, Francesca Chiarini, Andrea Gambarelli, Gianluca Sighinolfi, Antonietta M. Gatti, Patrizia Santi, Alberto M. Martelli, Lucio Coccoa, Toxicity of antimony trioxide nanoparticles on human hematopoietic progenitor cells and comparison to cell lines, *Toxicology* 262 (2009) 121–129

63. Sarlo K., Blackburn K. L., Clark E. D., Grothaus J., Chaney J., Neu S., Flood J., Abbott D., Bohne C., Casey K., Fryer C., Kuhn M., Tissue distribution of 20 nm, 100 nm and 1000 nm fluorescent polystyrene latex nanospheres following acute systemic or acute and repeat airway exposure in the rat., *Toxicology*, 263(2-3), 117-26 (2009).
64. Hanna L. Karlsson, Johanna Gustafsson, Pontus Cronholm, Lennart Möller, Size-dependent toxicity of metal oxide particles—A comparison between nano- and micrometer size, *Toxicology Letters* 188 (2009) 112–118
65. Norihiro Kobayashi, Masato Naya, Shigehisa Endoh, Junko Maru, Kazuhiro Yamamoto, Junko Nakanishi, Comparative pulmonary toxicity study of nano-TiO₂ particles of different sizes and agglomerations in rats: Different short- and long-term post-instillation results, *Toxicology* 264 (2009) 110–118
66. Bardi Giuseppe; Tognini Paola; Ciofani Gianni; Raffa Vittoria; Costa Mario; Pizzorusso Tommaso, Pluronic-coated carbon nanotubes do not induce degeneration of cortical neurons in vivo and in vitro., *Nanomedicine : Nanotechnol., Biol. Medicine*, 5(1), 96-104 (2009).
67. Hui Yang, Chao Liu, Danfeng Yang, Huashan Zhang, Zhuge Xi, Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition., *Journal of Applied Toxicology*, 29, 69–78, 2009.
68. Inoue Ken-ichiro; Takano Hirohisa; Yanagisawa Rie; Koike Eiko; Shimada Akinori, Size effects of latex nanomaterials on lung inflammation in mice., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 234(1), 68-76 (2009)
69. Tabet Lyes; Bussy Cyrill; Amara Nadia; Setyan Ari; Grodet Alain; Rossi Michel J; Pairon Jean-Claude; Boczkowski Jorge; Lanone Sophie, Adverse effects of industrial multiwalled carbon nanotubes on human pulmonary cells., *Journal of toxicology and environmental health. Part A*, 72(2), 60-73. 2009
70. C. Li, H. Liu, Y. Sun, H. Wang, F. Guo, S. Rao, J. Deng, Y. Zhang, Y. Miao, C. Guo, J. Meng, X. Chen, L. Li, D. Li, H. Xu, H. Wang, B. Li, C. Jiang, PAMAM Nanoparticles Promote Acute Lung Injury by Inducing Autophagic Cell Death through the Akt-TSC2-mTOR Signaling Pathway, *Journal of Molecular Cell Biology* (2009), 1, 37–45
71. Francesca Filon Larese, Flavia D'Agostin, Matteo Crosera, Gianpiero Adami, Nadia Renzi, Massimo Bovenzi, Giovanni Maina, Human skin penetration of silver nanoparticles through intact and damaged skin., *Toxicology*, 255, 33-37, 2009.
72. S. Bastian, W. Busch, D. Kuhnel, A. Springer, T. Meissner, R. Holke, S. Scholz, M. Iwe, W. Pompe, M. Geilinsky, A. Potthoff, V. Richter, C. Ikonomidou, K. Schirmer, Toxicity of Tungsten Carbide and Cobalt-Doped Tungsten Carbide nanoparticles in Mammalian Cells in Vitro, *Environ. Health Persp*, 117(4), 530-536, 2009.
73. Lin Chia-Hua; Chang Louis W; Chang Han; Yang Mo-Hsiung; Yang Chung-Shi; Lai Wan-Hau; Chang Wan-Hsuan; Lin Pinpin, The chemical fate of the Cd/Se/Te-based quantum dot 705 in the biological system: toxicity implications., *Nanotechnol.*, 20(21), 215101(2009).
74. Soo Jeong So, Ik Soon Jang, Chong Soo Han, Effect of Micro/Nano Silica Particle Feeding for Mice, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 8, 5367–5371, 2008
75. Tian Xia, Michael Kovoichich, Monty Liong, Lutz Mädler, Benjamin Gilbert, Haibin Shi, Joanne I. Yeh, Jeffrey I. Zink, Andre E. Nel, Comparison of the Mechanism of Toxicity of Zinc Oxide and Cerium Oxide Nanoparticles Based on Dissolution and Oxidative Stress Properties, *ACS Nano*, 2008, 2 (10), 2121–2134
76. Elgrabli D; Abella-Gallart S; Robidel F; Rogerieux F; Boczkowski J; Lacroix G., Induction of apoptosis and absence of inflammation in rat lung after intratracheal instillation of multiwalled carbon nanotubes., *Toxicology*, 253(1-3), 131-136, 2009.
77. J. Wang, Y. Liu, F. Jiao, F. Lao, W. Li, Y. Gu, Y. Li, C. Ge, G. Zhou, B. Li, Y. Zhao, Z. Chai, C. Chen, Time-dependent translocation and potential impairment on central nervous system by intranasally instilled TiO₂ nanoparticles, *Toxicology* 254 (2008) 82–90

