

2. ナノマテリアルの安全性等に関する文献調査

(1) 検索方法

① 使用する DB: PubMed

② 検索キーワード

以下のキーワード及びその組み合わせを使用する。

Y; Nanomaterial or Nanoparticle or Nanosize or Ultrafine or Ultrafineparticle or Nanostructure

Z; arcinogenicity or toxicity or cytotoxicity or toxicology or biochemical activity or biological activity or biological interaction or biocompatibility

A; Fullerene(s) or C60 or C70

B; Carbon nanotube(s), Single wall(ed) carbon nanotube(s), SWNT, SWNTs, SWCNT, SWCNTs, Multiwall (ed)carbon nanotube(s), MWNT, MWNTs, MWCNT, MWCNTs, Carbon nanohorn, carbon and nanotube

C; Titanium dioxide, Titanium Oxide, TiO₂

D; Zinc Oxide or ZnO

E; Silica or Silicon Oxide or Silicon Dioxide or SiO₂ or Amorphous Silica

F; Silver or Nanosilver or Ag

③検索式

CNTおよびフラーレン: (A or B) and Z、
および

その他のナノ物質: (C or D or E or F) and Y and Z

④検索期間

2011/3/01～2011/12/31

⑤手順

まず、題名のみを上記の方法で検索し、題名から内容を判断して、必要な論文の書誌事項、要旨を出力し、最終判断し、論文を複写する。

(2) 文献分類表

収集した文献の分野をまとめて、表2-1に示す。

表 2-1 調査した文献分類表

ナノマテリアル	in vivo						in vitro	環境生物	小計
	吸入	気管注入	静注	腹腔	皮膚	経口			
C60(水酸化フラーレン含む)	1	1					2	5	9
SWCNT	1	6		1			8	1	17
MWCNT	1	5	2	3			7	1	19
TiO ₂	1				3	1	3	2	10
ZnO	1	2			2		1		6
Ag	1	2			2	2	4		11
シリカ			2		1		4		7
ナノカーボン	CNF						1		1
	グラフェン						1		1
	混合CNT						1		1
	CB						1		1
酸化鉄		1					1		2
酸化ニッケル		1					1		2
酸化銅		1					1		2
ポリスチレン							1		1
デントリマー			1			1			2
合計	6	19	5	4	8	4	37	9	92

注)ナノカーボン以下の材料は検索対象物質との比較で論文中出现した材料である。

(3) 文献サマリー

フラーレン

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調整法/試験用量	試験生物/投与方法 期間/試験方法	試験結果	結論
01	K. A. Brausch, T. A. Anderson, P. N. Smith, J. D. Maul Environmental toxicology and chemistry, 30, pp878-884 (2011)	The effect of fullerenes and functionalized fullerenes on Daphniamagna phototaxis and swimming behavior (オオミジンコの 走光性と遊泳行 動に対するフラ ーレンと機能化 フラーレンの効 果)	●対象物質 ・フラーレン *種類 フラーレン(C60) *購入先 Sigma-Aldrich Chemical (U.S.A.) ・機能化フラーレン *種類 (1,2 メタノフラーレン C60) -61-カルボン酸(f-C60) *購入先 Sigma-Aldrich Chemical (U.S.A.) ●試料調整法 ・C60 原液調整法 C60 を紫外線照射下水中で攪拌 し、得られた懸濁液を沈降させ、 上澄み液を静かに移す。再構成 した適度に硬質の水(RM- HW)を取得するため懸濁した C60 を含む得られた上澄み液に塩類 を添加する。この溶液の濃度を確 認して原液として使用する。 ・f-C60 原液調整法 f-C60 にアセトンを加え、超音波 分解後、RMHW で容量を増し、次 に sonic dismembertor(超音波ホ モジナイザー)で 2 回処理を行う。 ●試験用量(暴露濃度) ・C60 545.4 $\mu\text{g/L}$ f-C60 545.6 $\mu\text{g/L}$ と 823 $\mu\text{g/L}$ ●Control ・C60 実験に対して 水 ・f-C60 実験に対して 溶媒	●試験生物 ・名称 オオミジンコ ・入手先 Texas Tech University (U.S.A.) ・種類 性的に成熟体、 ●投与方法 試験生物(オオミジンコ)をガラス 容器内で調整液と混合する ●期間 ・垂直移動実験 順応時間 20 分、 飼料添加、垂直位置測定 5,10,15,20,30,45,60 分 ・垂直移動実験 測定前 1 時間暴露 ●試験方法 ・化学分析 * C60 と f-C60 投与濃度 高機能 液体クロマトグラフィー使用 *粒子サイズ 動的光散乱粒径分 析計使用 ・垂直移動実験 オオミジンコを 4 時間暗闇の試験 管内にナノ物質に暴露させる。4 時間後光をつけ 5 分間毎にオオミ ジンコの位置を測定し、20 分後餌 を与える。その後更に 20 分間 5 分間毎に 60 分までオオミジンコの 位置を測定する。 ・遊泳行動実験 オオミジンコの遊泳行動は毒性物 質に応答する 8 個のパラメーター	●対象物質の凝集体の粒径 ・C60 117.0 \pm 50.0 nm ・f-C60 1040 \pm 0.060 nm ●垂直移動 垂直位置に及ぼす C60 の全グループの影響は顕 著ではなかった。しかし垂直位置に対する時間の 影響は観察された。これに加えて時間と C60 の存 在との間に著しい相互作用が存在することが確認 された。飼料を与えない場合、オオミジンコが暴露 容器の底部に位置した。飼料を与えるとオオミジ ンコは C60 ならびに Control で処理した場合垂直位置 は向上した。時間と C60 の相互作用はオオミジン コの応答が C60 と Control との間では時間とともに異 なっていることを示している。 垂直位置に及ぼす f-C60 グループの影響は顕著で はなかった。垂直位置に対する時間の影響は顕著 であったが、時間と f-C60 の存在との間には相互 作用効果は確認されなかった。C60 による実験と同 様に飼料を与えた場合オオミジンコの垂直位置は 上昇した。しかしながら時間と f-C60 の相互作用の 欠落は時間とともにオオミジンコの飼料に対する応 答が f-C60 の存在に影響されなかつたことを示して いる。 ●遊泳行動 速度、垂直分散度、正味角、典型的な上向き角、 典型的な下向き角は分散分析に使用する仮定は 適用できない。他のすべての評価値は分散分析に 使用する仮定は適用できる。速度は Control 中 では 2.483 mm/s、 C60 では 545.4 $\mu\text{g/L}$ で暴露されたオオミジンコ では 1.519 mm/s であった。545.6 $\mu\text{g/L}$ と 823.9	●暴露濃度 823 $\mu\text{g/L}$ までは f-C60 はオオ ミジンコの挙 動には殆どあ るいは全く影 響を及ぼさな いことは明ら かである。し かしながら C60 の暴露で は挙動に変化 が見られる。 ●本実験結果と 以前の実験 結果によれば C60 は垂直 移動や遊 泳速度のよう なオオミジ ンコの挙動に 影響を及ぼ しているかも しれない。遊 泳速度と垂 直移動が変 わった場合 捕食リスクが 変わるかどう かを決定す るため更なる

			<p>(正味角、平均回転角、湾曲度、曲率係数、速度、垂直変化度など)で評価した。</p> <p>このため Canon powershot digital camera, video Camera, ALEMBIC AVISplitter, Stereo microscope camera などを使用した。</p>	<p>$\mu\text{g/L}$ 濃度の f-C60 に暴露されたオオミジンコでは速度は低下した(夫々2.053 と 2.046 mm/s)がこの低下率は顕著ではない。垂直分散度、正味角、湾曲度、平均回転角、曲率係数、典型的な上向き角と典型的な下向き角は処理中では変化していない。それぞれの処理の間では試験生物のサイズは著しくは変化していない。したがってサイズは観察された差では寄与因子ではないようである。平均サイズでは Control、C60 $545.4\mu\text{g/L}$、f-C60 $545.6\mu\text{g/L}$ と $823.9\mu\text{g/L}$ ではそれぞれ 3.02 mm、3.16 mm、3.17 mm、3.03 mm であった。</p>	<p>研究が必要である。</p> <p>●オオミジンコの挙動に及ぼす C60 の影響に関する機構は水性動物に対するナノ物質のリスクを完全に理解確認することが必要である。</p>
--	--	--	---	--	--

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調整法/試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論						
02	S. Matsuda, S. Matsui, Y. Shimizu, T. Matsuda, Environmental Science & Technology, 45, pp 4133-4138 (2011)	Genotoxicity of colloidal fullerene C ₆₀ (コロイド状フ ラーレン C ₆₀ の 遺伝毒性)	<p>●対象物質 水性フラーレン懸濁液(aqu-フラー レン C₆₀)</p> <p>●試料調整法 京都大学 Dr. H. Tsue より提供された C₆₀を精製、乾燥した C₆₀を THF に溶 解、窒素流通により脱ガス、溶液を 攪拌後ろ過し、水添加と蒸発を 2 回 行い、最後に溶液を所定の容積まで 濃縮し、溶液中の不溶性 C₆₀をろ過 により除去。</p> <p>●特性 ・aqu-C₆₀ の粒度分布と平均粒径 粒度分布 59~241 nm;平均粒径 117 nm ・水、LB(Luria-Bertani)培養液 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)中の懸濁液での粒度分布 (濃度はすべて 2.3 mg/L)夫々80~ 280 nm, 200~580 nm, 200~600 nm 平均粒径 水中 122 nm ;LB 培養 液中 320 nm;DMEM 中 330 nm</p> <p>●Control umn テスト用 ・Positive control 4-NQO(S9 非存在時) と 2-AA(S9 存在時) ・Negative control DMSO</p> <p>●検定用試験(aqu-C₆₀ 濃度) ・細菌の遺伝毒性試験 0~ 0.43 mg/L</p> <p>●遺伝毒性試験用量(aqu-C₆₀ 濃度) ・Bacillus subtilis (枯草菌)Rec-Assey 0.048 mg/L</p>	<p>●試験生物 ・Bacillus subtilis H17 (Rcct) Bacillus subtilis M45 (Rec-) ・umu テスト ネズミチ フス菌 TA11535 /pSK1002 ・³²P-ポストラベリング ヒト肝細胞癌細胞 (HepG2) ・酸化的 DNA 付加物形 成 * 8-oxodG HepG2 * CdG HepG2</p> <p>●投与方法 細菌および細胞培養 aqu-C₆₀ 中に上記の試 験用細菌または細胞 を添加し培養</p> <p>●期間 ・aqu-C₆₀ 暴露 24 また は 72 時間</p> <p>・MTS 検定 24 または 72 時間</p> <p>・Bacillus subtilis Rec- Assey 5 時間</p> <p>●試験方法 ・細胞生存率測定 MTS 検定法利用 ・DNA 付加物形成定量 化 LC/MS/MS 実験 実施</p>	<p>●細菌の遺伝毒性試験 aqu-C₆₀ は Rec+株の生存に 0.43 mg/L でさえ影響を及ぼ さなかったが Rec-strain の生存は濃度依存にする形で低 下した。最高濃度(0.43 mg/L)で Rec-株の生存率(67.7%) は Rec+株の生存率(96.7%)に比して著しく低い。umn テスト では RGA(relative β-galactosidase 活性)値は試験化学 物質による遺伝毒性の比較強度を表す。4-NQO と 2-AA (夫々S9非存在時とS9存在時の実験での Positive control) 使用時の RGA 値は暴露依存性のある増加傾向を示した。 S9非存在時の実験では aqu-C₆₀ 処理による RGA 計算値は 暴露依存的に増加し、濃度最高時(0.43 mg/L)で著しく増加 した。しかしながら RGA 計算値の増加は S9 存在時の実験 ではあまり明確ではなかった。Bacillus subtilis Rec-Assey および umn テストでは aqu-C₆₀ は細菌性細胞中で遺伝毒性 を引き起こすことを示している。</p> <p>●哺乳類細胞増殖に及ぼす aqu-C₆₀ の影響 細胞生存能力検定のためヒト肝細胞癌細胞 HepG2 細胞を 使用。0.46mg/L aqu-C₆₀ で 24 および 72 時間処理後 MTS Assey で光吸収度測定。24 時間処理では細胞生存能力に は変化なく、一方 72 時間処理後では細胞増殖には顕著な 抑制効果が示された。</p> <p>●酸化的 DNA 付加物および巨大 DNA 付加物の定量化 酸化的 DNA 付加物の候補物質として 8-oxodG、CdG₁、CdG₂ を選択した。CdG₁ と CdG₂ のレベルは aqu-C₆₀ 処理後 Control 物質と比較して 8-oxodG 症状のレ ベルは僅かであるが顕著でない程度の向上が確認された。 同一の条件で HepG2 の細胞生存率は変化しなかった。ま た aqu-C₆₀ で引き起こされる巨大 DNA 付加物は検出されな かった。</p> <p>●aqu-C₆₀ 懸濁液の遺伝毒性試験結果</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>細胞株または組織</th> <th>結果</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>枯草菌 H17 と M45</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>ネズミチフス菌</td> <td>+</td> </tr> </tbody> </table>	細胞株または組織	結果	枯草菌 H17 と M45	+	ネズミチフス菌	+	<p>●aqu-C₆₀ は DNA 障害を 起こす可能 性があるが DNA 障害は C₆₀ そのも のによる共 有性 DNA 付加物形成 に起因する ものではない。</p> <p>●aqu-C₆₀ が 引き起こす DNA 障害と その結果生 ずる突然変 異発生の 機構の解 明は今後 の研究が 必要である。</p>
細胞株または組織	結果											
枯草菌 H17 と M45	+											
ネズミチフス菌	+											

		・umu テスト(変異原性試験) 0.43 mg/L ・ ³² p-ポストラベリング 0.46 mg/L ・酸化的 DNA 障害 * 8-oxodG 0.46 mg/L * CdG 0.46 mg/L		TA11535 /pSK1002 ³² p-ポストラベリング HepG2 — 酸化的 DNA 付加物形成 8-oxodG HepG2 ± CdG HepG2 — +正/顕著な増加: -負/変化なし: ± 増加の傾向あり、 ただし顕著ではない。	
--	--	---	--	--	--

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調整法/試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
03	T. B. Henry, E. J. Petersen, R. N. Compton Current opinion in Biotechnology,22, pp533-537 (2011)	Aqueous fullerene aggregates (nC ₆₀) generate minimal reactive oxygen species and are of low toxicity in fish: a revision of previous reports (水性フラーレン 凝集体 (nC60) は最小限の反 応性酸素種を 発生し魚類に低 毒性である:これ まで報告された 数多くの報告の 改定)	●対象物質/試料調整法/試験用 量 総説のため記載できない	●試験生物/投与方法・ 期間/試験方法 総説のため記載できな い	この総説で討議されている課 題は (1)水中で ROS の発生のため の C60 の潜在性 (2)魚類中での C60 毒性の 明確化 (3)環境の運命に影響を及 ぼす nC60 の能力と共汚染物 質の生物学的利用である。	●この総説の目的は ROS 発生と魚類にお ける毒性の誘起に関連するフラーレン類 (nC60)の水性凝集体に対する潜在性に関 するこれまでの報告書における不一致を 明確にすることである。 ●水性(nC60)の ROS 産出と毒性の評価法は 時間とともに進展し、初期の研究における 欠点は nC60 の ROS 発生と毒性の故意で はない間違った報告を行なっていること である。これらの報告書のいくつかは引き続 き C60 の環境効果の誤認を続けている。 2007~2011 間の批判的な証拠は水性 nC60 が ROS 産出のため最小限の潜在性 があり酸化ストレスは環境的に関連する nC60 による暴露により引き起こされるもの ではないことを示している。 ●将来の研究では現在の証拠は nC60 が低 毒性を示していることを認めること、また魚 類中の毒性は実験的技量で得られた人為 的な結果によって妥協されたと見られる方 法に基づいた nC60 の結果であるとする引 用文献を使用することは控える必要があ る。 ●魚類中の nC60 の低毒性に係わらず浮上 する注目点は他の人為的な粒子状物質で 観察されると同様な様態で nC60 が水の環 境中で共汚染物質の環境での命運、移動 や生物学的利用に影響を及ぼすことが できることである。

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調整法/試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
04	N. Shinohara, M. Gamo, J. Nakanishi Toxicological Sciences.123, pp 576 - 589 (2011)	Fullerene C ₆₀ :inhalati- on hazard assessment and derivation of a period-limited acceptable exposure level (フラーレン C ₆₀ : 期間限定許容 可能暴露レベル 吸入ハザード評 価とその導出)	●対象物質 C ₆₀ 17 文献にのぼる C ₆₀ の暴露実験 データを選択抽出して、これを参 照しヒトの健康に対する吸入危険 レベルを算定している。 ●試料調整法 各文献に詳細に記載されている データを抜粋表示している。 ●試験用量 各文献に詳細に記載されている データを抜粋表示している。	●試験生物 各種ラットとマウス ●投与方法・期間 各文献に詳細に記載さ れているデータを抜粋表 示している。 ●試験方法 各文献に詳細に記載さ れているデータを抜粋表 示している。	●吸引暴露試験結果に基づいてラットの肺毒性の C ₆₀ の無毒性効果レベル NOAEL を決定する。 ●気管支内注入試験結果に基づいてラットの肺毒 性の C ₆₀ の無毒性効果レベル NOAEL を決定する。 ●ラットの NOAEL 値を含むヒト(健常な労働者およ びに一般の社会人)に対する NOAEL の推定式を 確立する。推定式はパラメータとして 1 日の暴露 時間、週間暴露時間、肺での沈着重量率、呼吸速 度と体重を含んでいる。また幾何学的平均径 96 nm、幾何学的標準偏差 2.0 の C ₆₀ 粒子に対して成 立する。 ●2 次粒径サイズ依存 NOAEL の決定 肺胞での 沈着重量率は 2 次粒径サイズに依存するもので、 これを考慮に入れた NOAEL 推定式を得た。 ●時限許容暴露レベル(AEL-(PL)) 観念の導入 労働者の勤務年月は 30~40 年として C ₆₀ 粒子に曝 される実勤務年月をその 2 または 3 分の 1 と仮定し てヒトの NOAEL 値を基に PL 値を算出する。 ●不確実性因子の決定 ラットによる暴露実験値 を外挿してヒトに適用する場合や薬物動態学の見 地から補正係数、不確実性因子を導入し、1 [~] 3 と した。 ●幾何学的平均径 96 nm の C ₆₀ 粒子の AEL-(PL) の推定値 健常な労働者に対しては 0.39 mg/m ³ で 一般の社会人には 1.4x10 ⁻² mg/m ³ である。粒子 のサイズが異なる C ₆₀ に対する AEL-(PL) の推定値 の算定式も誘導された。	●本研究では使用可 能な限定された C ₆₀ の動物毒性デー タを精査し、これに基 づいてヒトに対して 暴露可能レベルを 決定することを試み た。肺に対する C ₆₀ の影響に関して利 用できる毒性情報 の概要を含め初期 の有害評価結果を 示した。 ●吸入暴露と気管支 内注入試験での C ₆₀ の肺滞留データを用 いてラットの肺毒 性に関する C ₆₀ の無 毒性効果レベル (NOAEL) を推定し、 ラットの肺毒性に対 する NOAEL は 3.1 mg/ m ³ と推定され た。この値は亜慢性 毒性に対する推定 値であり、これを基 に 15 年暴露に対す るヒトの時限許容暴 露レベル(AEL- (PL)) が提案され た。

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調整法/試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
05	J.G. Saathoff, A.O. Inman, X.R. Xia, J.E. Riviere, N.A. Monteiro- Riviere Toxicology in Vitro, 25,pp 2105-2112 (2011)	In vitro toxicity assessment of three hydroxylated fullerenes in human skin cells (ヒトの皮膚細 胞における3 種の水酸化フ ラーレンの試 験管内毒性評 価)	●対象物質 低位 C60(OH)20,中位 C60(OH)24,高位 C60(OH)32 ●水酸化(フラレノール)の特性 ・C60(OH)x の x の決定 XPS と ATR-FTIR 使用 低位 19-20,中位 23-24, 高位 32-33 ・平均粒径 DLS 使用 低位 37.0 nm 中位 97.0 nm, 高位 274.5 nm ●試料調整法 ・C60(OH)24 Liら(1993) が報告した Phase transfer(相関 移動)法により C60 を NaOH と相 関移動剤を用いて水酸化する ・C60(OH)20 と C60(OH)32 の作成 には C60(OH)24 の作成法を修 正(最終段階で H2O2 を添加して 洗浄乾燥を行なう) ●試験用量 濃度範囲 0.000544 ~ -42.5 μg/ ml ●Controls ・ NP control aB 検定法用媒体 に暴露した3種のフラレノールで 細胞含まず ・Cell control HEK-還元 aB 検定 法用媒体に暴露した3種のフラ レノール	●試験生物 ヒト上皮ケラチノサイト(角 化細胞)(HEK) ●密集度 70%の細胞培養 一次新生 HEK をケラチノ サイト増殖媒質(KGM-2)内 で密集度 70%に達するまで 増殖させる ●HEK の C60(OH)x 処理 密集度 70%の HEK を C60(OH)20 、 C60- (OH)24、 C60(OH)32 の原液を用いて KGM-2 中 で暴露する 暴露条件は濃度範囲 0.000544 ~ 42.5 μg/ ml ●暴露期間 24 と 48 時間 ●試験方法 ・Alamar Blue(aB)生存率検 定法(Alamar Blue 色素の酸 化還元反応を利用して細 胞増殖や細胞毒性を迅速 且つ高感度に定量する方 法) 細胞生存率測定に使用 ・NP と aB 検定液の相互作 用決定 蛍光スペクトル測定 ・サイトカイン放出の定量 Bio-Plex suspension array	●水酸化フラレノールの特性 水酸化フラレノールのサイズは使用媒体、測 定法、濃度などの測定条件により凝集度が 異なるため著しく異なる場合がある。 ●aB 細胞生存率検定 暴露 24 または 48 時間の場合 C60(OH)20 と C60(OH)24 は Control 群に比較して生存率 は変化しなかった。ただ C60(OH)- 32 では 濃度 42.5 μg/ml、24 時間暴露後の場合の み細胞生存率は数理統計学的に有意に低 下した。 ●Control 実験 NP control では 24 と 48 時間の処理でフラ レノールと aB 検定法用媒体間には相互作用 なし。Cell control では NP と還元 aB 検定 法用媒体間にわずかの相互作用を示す。こ れらの NP と検査用色素間の相互作用の欠 如はこの方法による3種のフラレノールの細 胞毒性の検定に適切であることを示唆した。 ●蛍光スペクトル 各 NP 濃度での蛍光強度と各フラレノール間 の蛍光強度の差は最小であり aB 媒体 では障害は最小になることを示している。 ●サイトカイン放出 C60(OH)20 で処理した HEK では標準化 IL-8 は 24 と 48 時間ではコントロール群使用と比 較して有意な差はなかった。一方 C60(OH)24 と C60(OH)32 で処理した場合 24 ならびに 48 時間、42.5 μg/ml では IL-8 放出は顕著に減少した。一方 C60(OH)32 で処理した場合 24 時間、0.34 μg/ml では IL-8 放出は著しく増加した。	●フラレノール(複数の水酸 化基導入フラレノール誘導 体)の有害性を究明するた め、ヒトの表皮ケラチノサイ トを3種の水酸化フラレノ ールで処理した。その条件 は濃度範囲 0.000544-42.5 μg/ml、暴露時間は 24 と 48 時間である。 ●実験に使用した最高濃度 42.5 μg/ml で C60(OH)32 による HEK 毒性は最高と なることが確認され、24 時 間暴露で細胞生存率は control に比較して、18.5% 減少した。 ●水酸化度が細胞媒体内で NP の凝集に影響を及ぼ し、これが結局 C60(OH)x の細胞毒性に影響するこ となる。この事実は暴露 の最高レベルのみで明確 である。 ●IL-8 放出の抑制は水酸化 と濃度で増加することが見 られている。 ●本研究で得られた実験結 果は同種の NP をまたぎ いろいろな特性の外伸を行 なう場合、表面化学と濃度 に依存することを示唆して いる。この際これらの特性は

				<p>system 使用 ・フラレノールの細胞摂取 透過型電子顕微鏡使用</p>	<p>●TEMによるフラレノールの細胞摂取観察 3種のフラレノールに暴露された非染色 HEKのTEMによる観察はNPの細胞内への 摂取や局所化に著しい差のあることを示して いる。HEK control 群はNP凝集の存在しな い通常の細胞組織を示している。24時間 C60(OH)20で処理したHEKでは細胞質の液 胞内に凝集体があり、またC60(OH)24では その凝集体が細胞内と細胞膜に局所的に接 着していることが見られる。またC60(OH)32 では細胞内に比較的小さな凝集体と細胞膜 の周辺に沿った接着体となっている。</p>	<p>凝集度に、したがって凝集 度に係わる生化学効果に 影響を及ぼすものと考えら れる。</p>
--	--	--	--	--	---	---

SWCNT

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調整法/試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
06	J. G. Teeguarden, B-J. Webb-Robert- son, K. M. Waters, A. R. Murray, E.R. Kisin, S. M. Varnum, J. M. Jacobs, J. G. Pounds, R. C. Zanger, A. A. Shvedova Toxicological Sciences,120, pp 123-135 (2011)	Comparative proteomics and pulmonary toxicity of instilled single-walled carbon nanotubes, crocidolite asbestos, and ultra- fine carbon black in mice Toxicological Sciences,120, pp 123-135 (2011)	●対象物質 ・単層カーボンナノチューブ(SWCNT) *製造元 CNI Inc. (U.S.A.) *合成法 CO 不均化法。合成後酸 処理で金属不純物除去 *組成 元素炭素 99.7 wt%:Fe :0.23 wt% *特性 ナノチューブサンプルの直径 0.4~1.2 nm:長さ 0.5~1 から 2 µm:比表面積 1040 m ² /g ・標準クロシドライト AB *入手先 A Union for Inter- national Cancer Control (U.S. A) *Fe 含量 18% *特性 平均径 210 nm:長さ 0.8~ 12 µm:表面積 8.3 m ² /g ・超微細カーボンブラック(U-FCB) *特性 平均径 14.3 nm:表面積 253.9 m ² /g ●試料調整法 SWCNT、AB、UFCB の PBS(リン 酸緩衝生理食塩中での懸濁液:濃 度 40µg/ 50µl PBS) ●試験用量 繰り返し投与 40µg/マウス、2回/1 週、3週間 ●Control 無菌の Ca ²⁺ と Mg ²⁺ フリ ーリン酸緩衝生理食塩水	●試験生物 ・種類 C57BL/6 マウス ・性別 雌 ・週齢 8~10 週 成体 ・体重 20±1.9 g ・入手先 Jackson Laboratories (U.S. A.) ・その他 病原菌含まず ●投与方法 マウスの咽頭より肺内に吸引 する ●期間 投与 3 週間最終投与後 24 時間後に解剖 ●試験方法 ・BAL 細胞計数と分別 細胞(全細胞、マクロファ ー、PMN)の計数は電子細 胞計数器使用 ・肺の観察評価 顕微鏡使用 ・肺コラーゲン測定 Sircol Collagen Assay kit 使 用 ・サイトカイン解析 ELISA 利用 ・プロテインの機能と構造など の解析 プロテオミクスの利用	SWCNT と AB に対する応答が同一であるか 異なっているかを決定するため、SW- CNT、AB と UFCB を繰り返して C57BL- /6 マウスに投与した際の肺応答を HPCL- FTICR-MS プロテオミクス、病理組織学と気 管支肺胞洗浄サイトカイン分析を使用して比 較した。マウスは対象物質の懸濁液を 3 週 間各週 2 回咽頭吸引で投与した。病理組織 学見地からは炎症と線維性反応の発生日と 過酷度は SWCNT で処理されたマウスの場合 最高であった。SWCNT 処理は識別された 肺組織プロテイン類の多数では最高の変化 をもたらした。影響されたプロテイン類の数 の傾向(SWCNT、AB と UFCB ではそれぞれ 376、231、184)は、炎症(サイトカイン)の 3 種の生化学アッセイでのこれらの物質の潜 在力に従っている。SWCNT 処理は独自に 109 のプロテイン類に影響を与えたが、これ らのプロテイン類は主として AB 処理によって 影響を受けた細胞プロセスも同様に示して おり、これは AB と SWCNT に対する組織レ ベルの応答での広範な類似性の証拠である。 炎症の 2 種の高感度マーカー(そのうちの 一つ(S100a9)は AB に暴露されたヒトで観察さ れている)が発見され、SWCNT 暴露に対するヒ トの応答の見込みのある生体指標(バイオマ ーカー)であるかも知れない。	●プロテオーム解析 結果は SWCNT と クロシドライト AB に対する肺組織と 肺浸潤応答は類 似しているが、いく つかの組織病理 学的評価指標値 に見られるように SWCNT の大量投 与に対する応答 は AB または UFCB の応答に比 較して一般に大で あるという広く適 用できる結論を支 えている。

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調整法 / 試験用量	試験生物/投与方法 期間/試験方法	試験結果	結論
07	E-J.Park, J.Roh, S-N.Kim, M-S.Kang, Y-A.Han, Y.Kim, J.T.Hong K.Choi Archives of Toxicology, 85, pp 1121-1131 (2011)	A single intratracheal instillation of single-walled carbon nanotubes induced early lung fibrosis and subchronic tissue damage in mice (マウスに早期 の肺線維症と亜 慢性組織損傷を 引き起こす単層 カーボンナノチ ューブの単回気 管内注入)	●対象物質 ・種類 SWCNT ・入手先 Hanhwa Nanotec (Korea) ・寸法 直径:1.2 nm:長 さ 2~10 μm ・金属不純物含量 約 10% ●試料調整法 SWCNT を脱イオン化 水中で超音波処理 により分散させ、 sodium dodecyl sulfate 添加、PBS で 希釈 ●試験用量 100 μg/kg ●Control 媒体コントロール液 使用	●試験生物 ・種類 ICR マウス ・週齢 6 週(40~42 日齢) ・体重 26±1g ●投与方法 単回で軽度の麻酔下気管内に注入 ●期間 注入後 1,7,14, 28 日で解剖、サンプル採 取し測定と検査実施 ●サンプル採取 ・血液 上記のサンプル採取時点で伏在 静脈より 1.2 ml の血液採取、BAL 細胞 計数、細胞表現型、サイトカイン、コラー ゲンの分析に使用 ・BAL 液 気管内にカニューレを挿入し 1 ml の無菌 PBS(0.15 M, pH 7.2)で洗浄 ●試験方法 ・BAL 液分析 血球計数器使用、肺胞マクロファ ージ、好中球、リンパ球の分布評価 ・サイトカインの測定 BAL 液と漿液の上澄み液中の各種の サイトカインの濃度を ELISK Kit で決定 ・免疫学的マーカー診断 フローサイトメトリー適用 ・コラーゲン測定 濃度を ELISK Kit で測定 ・組織内のプロテインの発現 濃度を Bradford 法使用 ・病理組織学的解析 所定の解析法利用	●BAL 液中細胞分布 BAL 液で回収された全細胞数はコントロール処理の場 合に比較して 1 日の時点では顕著には増加しなかつた が、7 日の時点では著しく増加した。炎症の初期段階を特 徴づける好中球の%組成は 1 日時点で最高値を示した。 マクロファージの分布比は 7 日で再び増加した。リンパ球 の分布比はコントロール処理の場合に比較して 1~28 日 の順で増加した。 ●BAL 中のサイトカイン 炎症反応を確認するため炎症サイトカインの濃度測定。 促進性炎症サイトカイン(IL-1, TNF-α, IL-6), Th0 サイトカ イン(IL-2), Th1 型サイトカイン(IL-12, INF-γ), Th2 型サイ トカイン(IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17)の濃度測定。炎症 促進性サイトカイン(IL-β, TNF-α, IL-6)は投与後 1 日で 急速に上昇、試験中高レベルを保つ。IL-2 は 7 日に最大 値に IL-12 と IL-10 は 1 日で急速に増加、28 日まで同様 のレベルを保つ。INF-γ と IL-4 とは 1 日で最大値に達し、 IL-5 は 7 日最高値を示し、IL-13 と IL-17 とは時間に依存 して増加する。 ●血液中のサイトカイン IL-6 のレベルは 7 日で最高値に、IL-12 のそれは 14 日 で最高値に至る。IL-17 は実験期間中上昇する。IL-1, TNF-α, IL-2, INF-γ, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 はいずれの 時点でも検出されなかつた。 ●TGF-β とコラーゲンの分泌 BAL 液中の TGF-β の濃度は 1~28 日であまり変動は ないが、コントロール処理よりかなり高い値を示す。血液 中の TGF-β の濃度は 7 日で最高値に達する。BAL 液中 と血液中のコラーゲンの濃度は夫々 14 日と 7 日に最高値 に達する。コントロール群の値はこれら最高値に比して著 しく低い。 ●リンパ球表現型 血液中の T 細胞の比率は 1 日の時点で著しく増加した	●単層カーボン ナノチューブ をマウスに単 回で気管内に 注入を行なう と早期の肺線 維症と亜慢性 組織損傷を引 き起こす。

					<p>が血液中の B 細胞の比率は 7,14,28 日の時点でコントロール値より急激に上昇した。</p> <p>●病理組織学的解析 肺組織の病理組織学的変化が起っている。SWCNT 投与後 7 日までに線維性の病変が起っている。しかし症状の重症度は日時と共に低下している</p> <p>●SWCNT によるプロテインの発現 細胞死一関連プロテイン p-53、caspase -3 と炎症プロテイン(COX-2, iNOS)は 7 日と 14 日で誘発は最高となる。組織損傷関連プロテイン COLIA1、MMP-2, MMP- 9 と mesothelin は 28 日まで著しく上昇した。</p>	
--	--	--	--	--	--	--

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調整法/試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
08	T. W. K. Fraser, H. C. Reinardy, B. J. Shaw, T. B. Henry, R. D. Handy Nanotoxicology, 5, pp 98-108 (2011)	Dietary toxicity of single-walled carbon nanotubes and fullerenes (C ₆₀) in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). (ニジマスでの 単層カーボンナ ノチューブおよ びフラーレン (C ₆₀)の飼料毒 性)	●対象物質 ・SWCNT *入手先 Cheap Tubes Inc. (U.S.A.) *特性 平均外径 1.1 nm:長さ 5~30 μm:炭素最低含量 96.3%: 最高不純物含量 Al 0.08 Cl 0.41 Co 2.91 S 0.29%(これらの不純物 は原液には検出されない) ・フラーレン *入手先 SER Research (U.S.A.) *純度 99.9% ●試料調整法 ・SWCNTとC ₆₀ (CN)の原液調整 5g/lの各CNの原液は2%のドデシル 硫酸ナトリウム(SDS、20g/l)を含む Millipore製超純水と混合して作成さ れる。混合後、2.5時間超音波処理、 3.5~5.5時間攪拌する。餌料作成法 で飼料ペレット内にCNを分散させ ることが確実に効果的であるよう にするため、餌料マーカ-酸化イ ットリウム(15g/l)を添加して15分 間超音波処理を行い、その後4.5 時間攪拌する。 ・SWCNTとC ₆₀ を含む餌料原液 市販の飼料(脂質、プロテイン、灰 分、繊維分、リン化合物を含む)と 牛ゼラチン溶液を混合し、混合後 ゼラチン被覆したペレットを作成 し、乾燥する ・CNを含まない餌料原液 SWCNTとC ₆₀ の原液を添加せず 上記の市販の魚食より調整する	●試験生物 ・Juvenile ニジマス *入手先 Hatchlands Trout Farm Rattery (U.K.) *性別 雌 *体重 17.7 g(週0時) ●投与方法 調整した飼料をニジ マスに投与する ●投与期間0,2,4,6,8週 ●試験方法 ・血漿分析解析 *血漿Na ⁺ 、K ⁺ 含量 Corning 480 flame photometer 使用 *浸透圧測定 Osmomat 030 Cry scopic Osmometer 使用 *血漿プロテイン分析 Bio-Rad protein assay kit II 使用 *血漿グルコース分析 Sigma Diagnostics procedure No.315 glucose 使用 *組織イオン分析 プラズマ質量分析計 使用	●炭素ナノ粒子への飼料暴露 8週間にわたる検査では死亡率と罹患率はなく、 また飼料の味覚には差は認められなかった。 ●成長と栄養成績 実験中処理を受けた全ニジマスは成長し、平均 最終体重と飼料消費量には差はなかった。 ●血漿解析と組織金属イオン濃度 CNへの暴露は血漿Na ⁺ 、K ⁺ 、血漿プロテインあ るいはグルコースのレベルは暴露中平均値を保 ち、すべての処理に対して統計的に著しい効果 を示さなかった。実験中イオン濃度(Ca ⁺² 、Mg ⁺² 、 Na ⁺ 、K ⁺)は大概の組織(腸、肝臓、脳、脾臓と筋 肉)で著しく低下したが、これらの差は処理には 関連していない。 ●Na ⁺ K ⁺ -ATP(アデノシン三リン酸加水分解酵 素) エラ、腸、および脳でのNa ⁺ K ⁺ -活性はCNsへの 飼料暴露に影響されなかった。また実験中活性 レベルには著しい変化はなかった。 ●TBARS(チオバルビツール酸反応性物質)と全 グルタチオン(GSH) 脳のTBARSは4週間SWCNTへ暴露されたニジ マスでは著しく高かった。しかしながらこの値は 他の時間点でコントロール魚により測定された脳 のTBARS値とは著しくは違わなかった。他のい ずれの暴露時間といずれの組織でTBARSに対 する他の処理効果は確認されなかった。すべて の処理とコントロールにわたって時間とともに TBARSはエラと肝臓では減少した。腸では処理 ならびに時間効果はTBARSでは観察されなかつ た。実験中GSHレベルはエラ内と脳内では時間 とともに著しく低下したが、肝臓内では増加した。 一方腸内では時間効果は確認されなかったが	●本研究の目的は2種 のカーボンナノ物質 (CN(SWCNTとC ₆₀)) の形状が毒性に影響 を及ぼすかどうかを決 定するためその毒性 を比較することであ った。Juvenile ニジマス にコントロール飼料 (CN無添加)、500 mg/kg SWCNTを補足 した飼料、500 mg/kg C ₆₀ を補足した飼料を6 週間与えた。ニジマス の成長、血液、組織イ オン濃度、組織病理、 浸透性調節や生化学 が評価した。4週間(2 または6週間ではな く)のSWCNT暴露で 脳TBARS(脂質過酸 化の兆候)はコントロ ールとC ₆₀ の暴露に比 較して著しい上昇が確 認された。他の処理に 関連した顕著な差異 は観察されていない。 本研究の結果ではニ ジマスでのSWCNTと C ₆₀ に対する飼料暴露 では明確な毒性を引 き起こさなかった。

		<p>●試験用量</p> <ul style="list-style-type: none"> ・SWCNT 500 mg/kg ・C₆₀ 500 mg/kg <p>●Control 飼料 ニジマス飼料(炭素ナノ物質含まず)</p>		<p>GSHに及ぼす効果はCN暴露には関連はなかった。</p> <p>●組織病理学的検討</p> <p>すべての処理を受けたニジマスのエラにはわずかの通常目立たない病班(浮腫、異常増殖や大動脈瘤など)の発生が認められた。腸には処理とは関係しないわずかの壊死細胞を含む小型の病班が存在した。すべてのCNT処理とコントロール魚では脳には時折細胞内に凝集した核の病巣はあるが、明らかな病班はない。C₆₀処理した2匹のニジマスでは単一重要な病班(有色素マクロファージ凝集体、炎症細胞の存在や壊死した肝細胞、繊維状結合組織や肉芽組織)が確認された。有色素マクロファージ凝集体はSWCNTで処理された2匹のニジマスの肝臓でも存在した。</p>	
--	--	---	--	--	--

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調整法/ 試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
09	P. Ravichandran, S. Baluchamy, R.Gopikrishnan, S. Biradar, V.Ramesh, V. Goornavar, R. Thomas, B.L. Wilson, R. Jeffers, J. C. Hall, G. T. Ramesh The Journal of Biological Chemistry. 286, pp 29725-29733 (2011). First Published on June 24, 2011,	Pulmonary biocompatib- ility assess- ment of inhaled single-wall and multi- wall carbon nanotubes in BALB/c mice (BALB/c マウ スが吸入した 単層および多 層カーボンナ ノチューブの 肺生体適合 性)	●対象物質 ・種類 SWCNT と MWCNT ・提供社や特性など SWCNT MWCNT 提供社 Aldrich Sigma 直径(nm) 1~2 20~50 壁厚(nm) 0.8~1.6 1~2 長さ(μm) 0.5~2.0 6~13 純度(%) >90% >99% 製法 CCVD CCVD 触媒 Fe Ni ●試料調整法 SWCNT あるいは MWCNT を 無菌生体適合性非イオン性表 面活性剤 1wt% Tween 20 中で 超音波処理を行い懸濁液作 成、噴霧器を使用してエアロゾ ルを取得する ●試験用量 エアロゾル化 SWCNT または MWCNT 20 min/日 (5 μg/g マ ウス)連続 7 日 エアロゾル中の SWCNT と MWCNT の平均濃度 93±2 μg/ml ●Control 無菌 1wt%Tween 20 を含有す る無菌 PBS(pH 7.4)	●試験生物 ・種類 BALB/c マウス ・性別 雄 ・週齢 2~3 週 ・体重 20±2 g ●投与方法 ・エアロゾル化 SWCNT と MWCNT と を鼻限定暴露 ・PBS 鼻限定暴露 ●期間 連続 7 日 ●試験方法 ・肺の病理組織学的検討 所定の方 法利用 ・肺組織検討 透過型電子顕微鏡利 用 ・BALF 分析 光学顕微鏡使用 ・BAL 中の LDH 活性 の測定 分光光度法利用 ・BAL 中の全プロテインの推定 改 良 Bradford 検定法利用 ・コラーゲン測定 Sircol Collagen Assay キット利用 ・ROS 測定 蛍光法利用 ・LPO 測定 液吸光度測定 ・SOD 測定 全 SOD 評価法利用 ・カタラーゼ活性測定 カタラーゼ評 価法利用 ・グルタチオン活性測定 直接吸光 度法利用 ・カスパーゼ活性測定 光学的方法 利用 ・任意のタンパク質存在の検出 標 準 western blot analysis 法の利用	●顕微鏡による観察は吸入された SWCNT または MWCNT はマウスの肺内に均一に分 布していることを示す。 ●SWCNT または MWCNT に暴露されたマウ スから回収された気管支肺泡洗浄多形核 白血球の全数は SWCNT(1.2x10 ⁶)と MWCNT(9.87x10 ⁵)の場合 Control 暴露マウ ス(5.46x10 ⁵)より著しく大である。 ●SWCNT または MWCNT を吸引したマウス で肺線維症が急速に発達することはコラー ゲンレベルが顕著に上昇することで確認さ れている。 ●SWCNT または MWCNT を吸入したマウス では Control 暴露マウスに比較して LDH レ ベルはそれぞれ 2 および 2.4 倍向上した。 ●マウスに SWCNT または MWCNT を暴露し た場合、Control 暴露の場合と比較して抗 酸化物質(グルタチオン、スーパーオキシド ジスムターゼ)とカタラーゼ活性の顕著な低 下ならびに、酸化物質(ミエロパーオキシダー ゼ、酸化ストレス脂質過酸化生成物質) の発生が見られる。 ●SWCNT または MWCNT 暴露マウスでは Control 暴露マウスと比較してカスパーゼ 3 やカスパーゼ 8 活性のようにアポトーシ ス関連プロテインは著しく増加する。 ●吸入された SWCNT または MWCNT は肺組 織内での炎症、線維症、酸化物質と酸化物 質レベルの交代、アポトーシス関連プロテ インを誘発し、これらが細胞死を引き起こす ことになる。	●吸入された SWCNT と MWCNT は肺胞マ クロファージが活性 化された肺中で炎 症反応を引き起こ し、気管支肺泡洗浄 液に免疫細胞を引 き付ける。この結果 肺線維症が急速に 発達する。本研究は 吸入された SWCNT と MWCNT が酸化的 ストレスを高め脂質 過酸化を誘起し、こ れにより抗酸化物 防御機構を崩壊さ せ、開始剤と作働体 を活性化する。これ により SWCNT や MWCNT の吸入に引 き続きマウスではア ポトーシスが起るか もしれない。更なる 長期にわたる評価 が実施されるまでカ ーボンナノチューブ の吸入を最小にす るためナノチューブ を注意深く取り扱う 必要があることを本 研究は示唆してい る。

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調整法/試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
10	Y. Morimoto, M. Hirohashi, N. Kobayashi, A. Ogami, M. Horie, T. Oyabu, T. Myojo, M. Hashiba, Y. Mizuguchi, T. Kambara, B.W. Lee, E. Kuroda, M. Shimada, W-N. Wang, K. Mizuno, K. Yamamoto, K. Fujita, J. Nakanishi, I. Tanaka. Nanotoxicology : Early Online 1-10. Posted on 26 Sep 2011.	Pulmonary toxicity of well- dispersed single-wall carbon nanotubes after inhalation (高度に分散 した単層カー ボンナノチュ ーブ吸入後の 肺毒性)	●対象物質 種類 SWCNT ・入手先 産業技術総合研究所 ・製造法 水支援接触化学気相蒸着法 ・特性 *バルク SWCNT の特性 一次径 3.0 nm BET 表面積 1064m ² /g D/G 比 0.14 非結晶炭素含量 <2.3% 全金属含有量 0.05% 各金属含有量 Fe, Ni, Cr, Mn, Al, 夫々145, 103, 34, 2, 12 ppm *懸濁液中の SWCNT の特性 束状平均直径 12.0 nm 幾何学的平均長さ 0.32 μm 束状長さ中央値 0.2 μm 束状長さ AFM 測定最長値 ~1 μm D/G 比 0.19 pH 7.2 *暴露チャンバー内の SWCNT の特性 質量濃度(mg/m ³) 低 0.03 高 0.13 数濃度(粒子数/cm ³) 低 5.0x10 ⁴ 高 6.6x10 ⁴ 幾何学的平均長さ(μm) 0.7 幾何学的平均幅 (μm) 0.2 ●試料調整法 ・SWCNT エアロゾル 1% Tween80 中に分散させた SWCNT を薄膜フィルターで分離、蒸留 水中に再分散させ、加圧噴霧器と噴霧	●試験生物 種類 Wistar ラット 性別 雄 週齢 8週 ●投与方法 空気中に懸濁した SWCNT エアロゾルま たは Negative control Tween80 エアロゾルを 暴露チャンバー内で Wistar ラットに全身暴 露で吸入させる ●暴露関連期間 高低濃度 SWCNT と Negative control すべ て同一 ・暴露期間 6 時間/日 5 日/週 4 週間 ・暴露後観察期間 3 日、 1 カ月、3 カ月で解剖 ●試験方法 ・BALF 使用によるプロ テイン濃度測定 BCA Protein Assay Kit 使用 ・CINC 類濃度の測定 Quantikine Rat 使用 ・HO-1 濃度の測定 HO-1 ELISA Kit 使用 ・ALP 放出 LabAssay ALP 使用 ・肺の組織病理学的変 化	●BALF 中の細胞数と ALP 放出 高低両濃度の SWCNT 暴露で BALF 中の全細胞数と好 中球数 Negative control 添加に比較して顕著には増加 しない。SWCNT 暴露では ALP 放出は見られなかった。 ●肺胞マクロファージ中の SWCNT 高低両濃度の SWCNT 暴露後観察期間 3 日で肺胞マク ロファージ中に SWCNT の存在が確認されその量は暴 露濃度に依存する。暴露後観察期間 3 カ月で肺胞マ クロファージの貪食作用が確認されており、観察時間を 延長するにつれて貪食作用は低下する。 ●肺中の CINC 類の濃度 肺組織中の CINC-1 濃度は全暴露後観察期間にわた って SWCNT 暴露と Tween 暴露との間には差はない。 SWCNT 暴露で肺組織中の CINC -1 および CINC-2 の 濃度は顕著には増加しない。肺組織中の CINC-3 濃度 は全暴露後観察期間にわたる 3 暴露種に対して差はな い。 ●肺および BALF 中の HO-1 濃度 肺組織中の HO-1 濃度は全暴露後観察期間にわたる 2 種の SWCNT 濃度に対して顕著には増加しない。 SWCNT 暴露に対して BALF 中の HO-1 濃度は暴露後 観察期間中一時的に低下することが観察されたが、濃 度は全観察期間にわたって一貫した変化は起っていない。 ●肺の組織病理学的変化 両 SWCNT 濃度レベルで全観察期間にわたって浸潤肺 胞スペース、肉芽腫性病変部、間質コラーゲン沈積箇 所や気腫性変化部には好中球浸潤は見られない。 SWCNT を消化した肺胞マクロファージが僅かに見られ ている。全暴露後観察期間で Tween の暴露では病理学的変化は起っていない。 ●TEM による肺胞マクロファージの形態学的特性 SWCNT は肺胞マクロファージ中の多量のファゴリリソ-	●高低両濃度の SWCNT の暴露 で BALF 中の全 細胞数と好中球 数ならびに肺中 と BALF 中での サイトカイン誘 導好中球化学 誘発物質(CINC 類)の濃度の増 加は起らなかつ た。 ●SWCNT の高低 両濃度の暴露で 好中球の肺浸潤 は確認できなかつ た。 ●本研究で使用し た実験条件では 高分散した SWCNT は肺中 で好中球炎症を 引き起こさなかつ た。

		<p>乾燥器を備えた吸入系に導入する。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・Negative control Tween80 エアロゾル ・製法 Tween80 溶液を使用し噴霧器と噴霧乾燥器で乾燥後吸入系に導入する。 <p>●Control</p> <ul style="list-style-type: none"> Negative control Tween80 エアロゾル ・平均粒径 62 nm ・平均質量濃度 0.38 mg/m³ ・平均粒子数 5.6 x10⁴ 粒子数/cm³ 	<p>光学顕微鏡使用</p> <ul style="list-style-type: none"> ・肺胞マクロファージの特性 <p>TEM 使</p>	<p>ム(食胞とリソームの融合した小胞)内に存在している。個々に分離したまた凝集した SWCNT が肺胞マクロファージ内あることが確認されている。</p> <p>SWCNT は細胞核や細胞小器官内には見られない。</p>	
--	--	---	---	--	--

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調整法/試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
11	N. Kobayashi, M. Naya, K. Mizuno, K. Yamamoto, M. Ema, J. Nakanishi Inhalation Toxicology, 23, pp 814 -828 (2011)	Pulmonary and systemic responses of highly pure and well-dispersed single-wall carbon nanotubes after intra tracheal instillation in rats (高純度で良好に分散した 単層カーボン ナノチューブ のラットの気 管内注入後の 肺および全身 の反応)	●対象物質 ・SWCNT *製法 産業技術総合研究所で開発された蒸気支援超成長 CVD 法で合成(スーパーグロース法) *特性 径 1~3nm:炭素純度 >99.98%:比表面積>1000 m ² /g ・結晶性シリカ *購入先 U.S. Silica Co. (U.S.A.) *種類 Min-U-Sil 5 結晶性シリカ 粒子 ●試料調整法 ・SWCNT 懸濁液 SWCNT(0.04, 0.2, 1.0 または 2.0 mg/kg)と 10 mg/mL の Tween 80 とを 10 mM の PBS に添加、Milli-Q 水に溶解し、超音波処理により懸濁液を作成し気管内注入に使用する。 ・結晶性シリカ懸濁液 SWCNT 懸濁液作成と同様な方法で作成。 ●試験用量 ・SWCNT 0.04, 0.2, 1.0, 2.0 mg/kg ・結晶性シリカ 5.0 mg/kg ●Control ・Positive 結晶性シリカ懸濁液 ・Negative PBS(10mM)中に Tween 80(10 mg/mL)	●試験生物 ・種類 ラット ・購入先 Charles River Laboratories, Japan (日本) ・性別 雄 ・週齢 7 週齢 ・体重(使用前)277~327 g ●投与方法 実験1:ラットにエーテルで麻酔をかけ 0.2 と 2.0 (mg/kg 体重)に相当する SW- CNT 懸濁液と 5.0 (mg/ kg 体重)に相当する結晶性シリカ懸濁液(Positive control)または Tween 80 溶液(Negative control)を口より気管内に注入する。 実験 2: ラットに 0.04, 0.2, 1.0 (mg/kg 体重)に相当する SW- CNT 懸濁液と Control 溶液を気管内に注入する。 ●期間 実験1:注入後 24 時間、3 日、1 週間、1 カ月、3 カ月に測定 実験 2: 注入後 3 日、1 週間、1 カ月、3 カ月、6 カ月に測定 ●試験方法 ・BALF 炎症細胞数の測定 自動赤血球分析計利用 ・BALF バイオマーカーの測定 LDH と全プロテイン濃度測定は自動生化学分析計使用。インターロイキン類は Rat Cytokine 10-Plex A Panel Kit と Bio-Plex	●SWCNT の特性測定結果 ・バルク SWCNT 特性 数値 測定法 管径 3.0 nm TEM 最大管長 1200 μm マイクロメータ BET 表面積 1064 m ² /g N ₂ ガス吸収 D/G 比 0.14 ラマン分光法 無定形炭素含量<2.3% TGA 全金属含量 0.05% 各金属含量 Fe 145: Ni 103: Cr 34: Mn 2: Al 12 ppm 試験溶液中での分散 SWCNT 特性 数値 測定法 束径 12.0 nm AFM 束長 0.32 μm D/G 比 0.19 ラマン分光法 pH 7.2 pH 計 ●左記の 2 種の実験条件での実験結果。 評価項目 SWCNT 暴露 G シリカ暴露 G 重量(mg/kg) 0.04 0.2 1.0 2.0 5.0 暴露 表面積(m ² /kg) 0.04 0.2 1.0 2.0 0.025 数(粒子/kg)x 10 ¹² 1.8 8.8 44 88 0.00073 臨床兆候 — — — — — 体重 — — — — — 肺重量 — + ++ +++ — 炎症細胞 — + ++ ++++	ラットに対して高純度で良好に分散した SWCNT の気管内注入では注入量に依存して肺で炎症反応が引き起こされた。しかしながら肝臓、腎臓、脾臓や大脳ではこの炎症反応は起らなかった。進行性の肺組織肥厚は SWCNT 暴露グループの最高暴露レベル(2mg/kg)で確認された。しかしながら全暴露グループで注入 6 カ月後まで線維症、非定型病変あるいは腫瘍関連の発現は確認されなかった。SWCNT では肺沈着 0.04 mg/kg(2.2x10 ¹² 繊維/kg)で肺炎症は発生しなかった。本研究は高純度で良好な分散状態にある SWCNT の無毒性量(NOEL)の判定に使用することが出来る。

			Sus pension Array System 使用。細胞割合 TaqMan®One-Step RTPCR Master Mix Reagent Kit と ABI PRISM®7700 Sequence Direction System 使用 ・肺組織処理と観察 TEM 使用	+++ BALF LDH/プロテインー - + ++ ++++ IL-1β - + ++ +++ ー 病理組 肺炎症 - + ++ ++++ +++ 織学 炎症反応 (他の組織) - - - - ー ++++ 最大の変化あり: +少し変化あり: -有意な変化なし	
--	--	--	---	---	--

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調整法/試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
12	W-Y. Hsieh, C-C. Chou, C-C. Ho, S-L. Yu, H-Y. Chen, H-Y E. Chou, J J. Chen, H-W. Chen P-C Yang American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 46 , pp 257-267 (2012)	Single-walled carbon nanotubes induce air- way hyper- reactivity and paren- chymal injury in mice (単層カーボン ナノチューブ はマウスで気 道過敏性と実 質的な損傷を 引き起こす)	●対象物質 SWCNT ・特性 *平均直径 2~10 nm(TEM) *長さ 0.3~6 μm (TEM,SEM) *純度 C 94.08%:O 5.31%:Ca: 0.37% Mg:0.17% *表面積 480 m ² /g ・製造法 CoMoCat 法 ・購入先 McCarty 社(U.S.A) ●試料調整法 試験用量(下記に記載)SWCNT を 50 μL Pluronic F-68 中に懸濁 ●試験用量 低用量 0.0003, 0.0015,0.015, 0.3 mg/マウス 高用量 0.1, 0.5 mg/マウス ●Control ・フラレン(C60:純度>99.85 :購入先 Sigma-Aldrich 社 (U.S.A) ・ナノダイヤモンド(ND) ・食塩水 ・Pluronic F-68	●試験生物 ICR マウス ・週齢 5~6週齢 成体 ・体重 30 g ・購入先 Laboratory Animal Center of National Taiwan University College of Medicine (Taiwan) ●投与方法 気管内注入 ●試験方法 ・マウス内の気道反応 性の測定 全身プレチ スモグラフィーを使 用、Flexivent system で確認する。 ・遺伝子発現プロフィー array 解析の利用	本研究結果は単一の SWCNT の気管支内へ の注入が気道の過反応と気流の閉塞を引き 起こすことを示した。またこれまで発見した 暴露後 7 日から 6 か月に至り持続する実質 的な損傷で肉芽腫性の変化が生ずることを 確認している。マウスモデルの中での不可 逆的な肺病理学と実質的な気道変化はヒト での閉鎖的な気道疾患に似た症状を起こし ている。トランスクリプトミク(転写学的)解析 はプロティナーゼ(タンパク質分解酵素) (cathepsin KとMMP- 12)、ケモカイン(CCL2 とCCL3)といくつかのマクロファージレセプター (Toll-like receptor 2、MSR 1)を上方調節 するかもしれない。経路解析はNF-κBが炎 症反応に関係がありまた組織リモデリングに 影響を及ぼす下流シグナルが病理過程を示 すことを示した。in vivo で投与した場合 NF-κB インヒビター(PDTC)は SWCNT 誘引 気道過反応、慢性気道炎症と cathe- psin K と MMP12 の発現を減衰させた。一方 cathepsin K インヒビターは SWC- NT 処理グループでは気道過反応と肉芽腫性変化を部 分的に弱める。SWCNT による cathepsin K と MMP12 の上方調節は肺上皮細胞/間葉細胞 と BAL マクロファージとの in vitro 共培養 により確認された。しかし共培養なしのマク ロファージ中では SWCNT 誘起 cathepsin K と MMP12 は細胞型固有と細胞-細胞相互 依存の両者であることを示している。	簡単な注入の手順に基づい て SWCNT で引き起こされた 気道の疾患と実質的な損傷 は、いくつかのケモカインとタ ンパク質分解酵素を経過し て、マクロファージと上皮細胞 の相互作用をもたらすかも知 れない。他のモデルを用いた 追加研究、特に吸入は将来 ナノ粒子に引き起こされる肺 疾患に対して更に関連するま た更なる情報を提供するであ ろう。

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調整法/試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
13	M. L. Di Giorgio, S. Di Bucchianico, A. M. Ragnelli, P. Aimola, S. Santucci, A. Poma Mutation Research, 722 , pp 20-31 (2011)	Effects of single and multi walled carbon nano- tubes on macrophage- s: cyto and genotoxicity and electron microscopy (単層および 多層カーボン ナノチューブ のマクロファ ージに及ぼす 影響:細胞毒 性並びに遺伝 毒性と電子顕 微鏡)	●対象物質 ・種類 SWCNT、MWCNTとCB(カー ボンブラック) (SWCNTとMWCNT=CNT) ・購入先 CNT Sigma社(U.S.A.) CB Evonik-Degussa社(独) ・特性(実験に使用した対象物質の) * CNT SWCNT MWCNT 外径(nm) 0.7~1.2 10~25 長さ(μm) 0.5~100 0.5~100 密度(g/cm ³) 1.7 2.1 25°C 表面積(m ² /g) 400 - 化学組成(wt%) 炭素 >95 >.96 Ni ~1.5 ~1.5 Yttrium ~0.2 * CB 粉末 平均直径(nm) 14 表面積(m ² /g) 300 ●試料調整法 ・入手したSWCNT、MWCNTとCB 秤量後漿液フリー培養液中に 懸濁させ、使用直前に凝集を防ぐた め超音波処理を行う ・細胞 白血病ウイルス変換マウスマクロ ファージ細胞株 Raw 264.7をL-グル タミンやペニシリン/ストレプトマイシ ンなどを添加したDMEM中で培養 ●試験用量 ・CNTの暴露後のRaw 264.7細胞の 組織観察 CNT 10 μg/ml	●試験生物 マウスマクロファージ 細胞株 Raw 264.7 ●投与方法 SWCNT、MWCNTや CBを培養したマウスマ クロファージ細胞株 Raw 264.7に添加する ●期間 ・CNTの暴露後のRaw 264.7細胞の組織観 察 ・細胞の超微細構造の 観察 ・CNT暴露による壊死 の観察 ・CNTの遺伝子毒性 ⇒各 24,48,72時間 ●試験方法 ・CNTの特性測定 TEMとAFM ・CNT暴露後のRaw 264.7細胞の組織観 察 SEMとAFM ・細胞の超微細構造の 観察 TEM ・CNT暴露による壊死 の観察 トリパンプルー色素 排除試験法とMTS 検定 ・CNTの遺伝子毒性	●CNTの暴露後のRaw 264.7細胞の組織観察 MWCNTによるRaw 264.7細胞処理では細胞膜 はなお微絨毛構造と襞の着いた膜で覆われてい るので細胞の組織には影響はない。SWCNTの 24時間処理の場合のみ微絨毛構造と襞の付着 した細胞膜の数は低下し、細胞膜組織が変化し ている。 ●細胞の超微細構造の観察 24時間の MWCNTの処理ではRaw 264.7細胞の食作用活 性は向上し、内化したMWCNTを含む細胞質 の突出と多くのファゴリソームが存在しているこ とが確認され、またいくつかの場合細胞質内に損 傷したファゴリソームと自由に分散したMWCNT が観察されている。またMWCNTは核酸内で結 合していることも見られる。SWCNTもまた細胞内 に侵入していることが確認されているが、CNTが 細胞膜を通過してマクロファージ内は入るかどう かは明確ではない。 ●CNT暴露による壊死の観察 CNT毒性の検討 とTEMによる観察ではCNTとの培養が結局のと ころ細胞壊死とアポトーシスを引き起こす。 ●CNTの遺伝子毒性 いろいろな濃度でCNTと CBで48時間処理した場合、細胞小核が投与量 依存的に形成される。MWCNTは低濃度で SWCNTとCBでは高濃度でDNA損傷が引き起さ れる。 ●細胞内ROSの生成 SWCNTと/またはM WCNTは僅かな暴露でさえROSの生成の産生を 促進する。 ●炎症反応の検出 CNTとCBは10または50 μg/mlの処理ではTNF-αはRaw 264.7細胞か らTNF-αの放出は起らなかったがLPSで処理し た細胞では0.05および0.1 μg/mlの濃度で著し	本研究ではマウスのマク ロファージ細胞株 Raw 264.7をCNTとCBで処 理しその際引き起こされ る炎症反応、TNF-αの 放出、細胞内のROS産 出、細胞死(壊死とアポト ーシ)、染色体の異常、 超微形態的变化などにつ いて検討した。CNTと CBは細胞株 Raw 264.7 に対して細胞および遺伝 子毒性を示すことが確認 された。CNT暴露はROS 放出、細胞壊死、染色体 変化を引き起こしたが、 炎症反応を誘起しない。 これに加えCNTは超微 細形態的損傷とアポトー シスを引き起こした。また CNTは細胞膜を透過し、 各MWCNTは細胞核膜 に結合するように見られ る。

		<ul style="list-style-type: none"> ・CNT 暴露による壊死の観察 CNT 0.25,10,25,50,100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ・CNT の遺伝子毒性 1, 3, 10, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ●Control ・Positive control *CB *H₂O₂ で処理した細胞、バクテリアエンドトキシンリポポリサッカライド (LP S) で処理した細胞 ・Negative control 未処理マウスマクロファージ細胞株 Raw 264.7 	<ul style="list-style-type: none"> コメットアッセイなど 他 2 種 ・細胞内 ROS の生成 蛍光のフローサイトメトリー分析法による測定 ・炎症反応の検出 TNF-α の測定 	<ul style="list-style-type: none"> い量の TNF-α が放出した。 	
--	--	---	--	--	--

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調整法/試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論																												
14	R. Baktur, H. Patel, S. Kwon Toxicology in Vitro. 25, pp1153-116 0 (2011)	Effect of exposure conditions on SWCNT- induced. In- flamatory response in human alveolar epithelial cells (ヒトの肺胞表 皮細胞におけ る単層カーボ ンナノチュー ブ誘起炎症反 応に対する暴 露条件の影 響)	<ul style="list-style-type: none"> ●対象物質 ・種類 HiPco 法で合成した SWCNT ・購入先 Cheap Tubes Inc. (U.S.A.) ・特性 *残存金属含量 3-12% *直径 0.8~1.2 nm;長さ 100~1000 nm ●試験目的 ●試料調整法 SWCNT を蒸留水に添加し超音波処理後、溶液中の SWCNT の凝集を防止するため非毒性表面活性剤 PVP 加え原液 SWCNT 懸濁液を作成 ●試験用量 ・SWCNT 誘起 IL-8 発現と細胞増殖に及ぼす血清の影響の検討:血清フリーおよび血清含有 SWCNT 原液懸濁液の濃度 4 および 8μg/ml ・SWCNT 誘起 IL-8 発現と細胞増殖に及ぼす暴露時間の影響の検討:SWCNT 原液懸濁液の濃度 2,4,8,20 40 および 80μg/ml ・SWCNT 誘起 IL-8 発現と細胞増殖に及ぼす暴露と回復時間の影響の検討:SWCNT 原液懸濁液の濃度 4 および 40μg/ml ・SWCNT 暴露時静的および動的細胞成長環境の利用:SWCNT 原液懸濁液の濃度 5,10 および 20 μg/ml 	<ul style="list-style-type: none"> ●試験生物 ・種類 ヒトの肺胞表皮細胞(A549) ・購入先 The American Type Culture Collection (U.S.A.) ●投与方法 試料調整法で記した原液 SWCNT 懸濁液をウシ胎仔血清フリーまたは含有する細胞培養媒体(F-12K)に添加 ●期間(時間) ・血清の影響の検討:0,1,3,6 および 24 時間 ・暴露時間の影響の検討:0,1,3,6 および 24 時間 ・暴露と回復時間の影響の検討:6 および 24 時間 暴露時静的および動的細胞成長環境の利用:24 時間 ●試験方法 ・細胞増殖 BCA 全プロテインキット使用 ・IL-8 発現 IL-8 レベルを A549 の上澄みから specific sandwich ELISA で測定 	<ul style="list-style-type: none"> ●血清含有媒体中で SWCNT に A549 細胞を暴露した場合、暴露時間の増加に伴って IL-8 の発現は劇的に上昇する。 ●SWCNT 濃度 4 および 8μg/ml で暴露 24 時間後では IL-8 レベルはコントロール暴露レベル(1 時間暴露)に比較して著しく高い。 ●SWCNT 濃度 4 および 8μg/ml で暴露時間が増加しても細胞増殖の差はあまりない。濃度 4μg/ml では血清含有媒体中の細胞増殖は血清フリー媒体中に比較して高い。 ●細胞を色々な濃度(2,4,8,20,40,80μg/ml)の SWCNT に暴露した場合、夫々の濃度で 2~24 時間にわたる各暴露時間に対して比較したところ暴露時間の増加により IL-8 の発現は著しく増加した。同一の条件で細胞の増殖状態を比較したところ SWCNT の殆ど全ての濃度で細胞増殖のレベルは著しくは変化しない。 ●SWCNT 誘起 IL-8 発現と細胞増殖に対する回復時間の影響 <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>濃度(μg/ml)</th> <th>除去時間(hr)</th> <th>コントロー</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>IL-8 レベル</td> <td>4</td> <td>72, 96</td> <td>著しく上</td> </tr> <tr> <td>昇</td> <td>40</td> <td>72, 96</td> <td>上昇停</td> </tr> <tr> <td>止</td> <td>(コントロール 濃度 4μg/ml 暴露時間 6 時間)</td> <td>4. 40 24</td> <td>著しく上</td> </tr> <tr> <td>昇</td> <td>(コントロール 濃度 4 と 40μg/ml 暴露時間 24 時間)</td> <td>4 48 ,96</td> <td>著しく上</td> </tr> <tr> <td>昇</td> <td>(コントロール 濃度 4μg/ml 暴露時間 0 時間)</td> <td>4. 40 24</td> <td>著しく減</td> </tr> <tr> <td>少</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>		濃度(μg/ml)	除去時間(hr)	コントロー	IL-8 レベル	4	72, 96	著しく上	昇	40	72, 96	上昇停	止	(コントロール 濃度 4μg/ml 暴露時間 6 時間)	4. 40 24	著しく上	昇	(コントロール 濃度 4 と 40μg/ml 暴露時間 24 時間)	4 48 ,96	著しく上	昇	(コントロール 濃度 4μg/ml 暴露時間 0 時間)	4. 40 24	著しく減	少				<ul style="list-style-type: none"> ●各種の条件下 SWCNT にヒトの A549 を暴露した場合細胞内での IL-8 の発現に及ぼす SWCNT の影響が明らかになった。 ●血清の存在下あるいは非存在下 IL-8 発現状態は異なる。血清の存在下では IL-8 発現は増進する。 ●A549 細胞を低濃度の SWCNT に暴露した場合、SWCNT を媒体から除去した後も IL-8 の発現は引き続き増加する。 ●動的な細胞成長条件下での SWCNT の暴露では IL-8 の発現には変化が起る。
	濃度(μg/ml)	除去時間(hr)	コントロー																															
IL-8 レベル	4	72, 96	著しく上																															
昇	40	72, 96	上昇停																															
止	(コントロール 濃度 4μg/ml 暴露時間 6 時間)	4. 40 24	著しく上																															
昇	(コントロール 濃度 4 と 40μg/ml 暴露時間 24 時間)	4 48 ,96	著しく上																															
昇	(コントロール 濃度 4μg/ml 暴露時間 0 時間)	4. 40 24	著しく減																															
少																																		

				<p>(暴露時間 0 時間)</p> <p>●SWCNT 誘起 IL-8 発現と細胞増殖に対する動的環境の影響</p> <p>・IL-8 発現</p> <p>24 時間の SWCNT 暴露で動的細胞成長条件により成長した A549 は静的条件で成長した細胞に比較してすべての暴露濃度で IL-8 レベルは著しく向上する。</p> <p>動的細胞成長条件では SWCNT 全濃度での IL-8 レベルはコントロール値(濃度 0μg/ ml: 24 時間の Cyclic Stretching 後)より著しく高い。</p> <p>静的細胞成長条件では SWCNT 濃度 20 μg/ ml で IL-8 レベルはコントロール値(濃度 0μg/ ml: 静的条件)より著しく高い。</p> <p>・細胞増殖</p> <p>動的細胞成長で 24 時間の Cyclic Stretching 後 SWCNT が媒体中に存在するかどうかに関わらず増殖が確認されている。</p> <p>静的長条件での細胞成長は動的成長とは同一ではない。</p> <p>SWCNT 非存在(0μg/ ml)あるいは存在下(20μg/ ml)細胞増殖は引き起こされる。</p> <p>SWCNT 5 および 10μg/ ml では静的と動的で成長には著しい差は認められない。</p>	
--	--	--	--	--	--

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調整法/試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
15	S. Wadhwa, C .R.P. O'Hare, A. Mathur, S.S. Roy, P.S.M. Dunlop, J.A. Byrne, G. Burke, B. Meenan, J.A. McLaughlin Journal of Hazardous Materials, 191, pp 56-61 (2011)	Comparative in vitro cytotoxicity study of carbon nanotubes and titania nanostructures on human lung epithelial cells (ヒトの肺上皮細胞に対するカーボンナノチューブとチタニアナノ構造体の細胞毒性の比較研究)	<ul style="list-style-type: none"> ●対象物質 ・単層カーボンナノチューブ (SWCNT) *購入先 Carbolex Inc.Ltd. (U.S.A) *純度 ~99% 不純物(鉄触媒) < 1% ・多層カーボンナノチューブ (MWCNT) *製法 組織内で MPCVD 法利用 *触媒(Co)含量 < 1% ●チタニアナノチューブ(TiNT) ・合成法 TiO₂(DeGussa P25)のナノ粒子(アナターゼ約 70%、ルチル 30%; 結晶サイズ~23 nm; 比表面積 51m²/g)の熱水処理により合成、洗浄後焼鈍(400°C,2h) ●対象物質の物性測定 ・SWCNT および MWCNT SEM、TEM、ラマン分光法 ・チタニア HRTEM、XRD ●試料調整法 ・細胞毒性測定濃度(試験用量) *CNT(SWCNT または MWCNT) PBS 中の CNT 濃度 0.01、0.05、0.11 mg/mL *チタニアの構造体(TiNT または TiO₂) 燐酸塩緩衝食塩 PBS 中濃度 0.1、0.5、1.1 mg/ mL ●コントロール TCP と PBS 	<ul style="list-style-type: none"> ●試験生物 ・種類 A549 ヒト肺腺癌細胞株 ・購入先 American Type Culture Collection (U.S.A.) ●細胞培養方法と対象物質添加処理 細胞は 10%の胎児子牛血清で補填した最小必須培地(MEM)中で培養。37°Cで CO₂を含む増湿雰囲気中で保持、EDTA を添加して二次培養を行なう。37°C、5%CO₂の雰囲気中で 3 時間培養し細胞を粘着させる。濃度 0.1 mg/mL のチタニアナノ構造体、SWCNT または MWCNT 20μL を加え(最終濃度 10μg/ mL)培養器に移す。 ●期間 細胞生存率測定のための培養期間は 1、3、7 日 ●試験方法 ・細胞生存率の測定 市販の MTT 評価キット利用 	<ul style="list-style-type: none"> ●チタニアナノ構造体とカーボンナノチューブの物性測定 ・チタニアナノ構造体 *焼鈍体の組成 ナノチューブ 30%と 70%ロッドよりなる凝集体 *ナノチューブ(TiNT) 非対象多層、一方で3層、他方で5層、内径 5 nm、外径 8~10 nm *ナノ粒子 結晶サイズ~23 nm の粒子の凝集体 ・MWCNT *CNT フィルム MWCNT が縦に整列したフィルム 高さ 25~30μm *ナノチューブ 壁数 2~3で径 10~30 nm 壁間隔 0.34 nm ・SWCNT *形状 束状 長さ 5~10 nm 径 0.5~3 nm ●細胞生存率解析 SWCNT、MWCNT、TiNT、TiO₂ 溶液を A549 培養物に添加した場合の状況を MTT アッセイで検定。A549 の生存率を検討した。処理時間は 1、3、7 日。SWCNT、MWCNT、TiNT、TiO₂ 濃度は 0.1、0.5、1.1 mg/ mL。Control として TCP と PBS 使用した。 (1) TiNT と TiO₂ の場合 1 日後ではすべてのサンプルで細胞生存率は PBS 処理に比較して増加した。TiNT では 0.1、0.5、1.1 mg/ mL 処理の場合細胞生存率は著しく向上した。TiO₂ 0.5mg/ mL 処理の場合細胞数は最高の上昇を示した。3 日後では生存率は Control と TiO₂0.5mg/ mL 処理の間に著しい差が見られた。チタニアナノチューブでは 7 日を含めその他の処理期間と濃度条件で細胞生存率には著しい向上も低下も見られなかった。 (2) SWCNT と MWCNT 処理に対しては 1 日後で 	チタニアナノチューブ、チタニアナノ粒子とカーボンナノチューブの細胞毒性効果を検討するため A549 肺上皮細胞の 1 週間以上にわたる暴露を行なった。チタニアナノ構造体の存在ではほぼすべての暴露量でコントロール処理の場合と比較して細胞生存率は上昇した。一方 CNT が存在する場合はいくつかの場合著しい毒性効果を示した。ここで行なった細胞培養解析は熱水処理合成したチタニアナノチューブは非細胞毒性であることを示唆している。毒性とナノ物質の命運に係わる機構解明のため更なる研究が必要である。

				<p>は0.11 mg/mL MWCNT 処理を除いて全条件で生存率の低下はおこらなかった。3日後では生存細胞数は全条件にわたって顕著に低下した。7日後ではPBS 処理に比較して細胞活性低下に関して同様の傾向が見られた。</p> <p>SWCNT では1日後では全処理条件に対してMWCNT 処理の場合と同様な有意ではない細胞毒性を示した。7日以上での暴露量依存性を比較するとSWCNT では0.11 mg/mL の場合毒性は最低となる。1日後処理ではMWCNT はSWCNT に比較して毒性は高い。これはMWCNT がSWCNT に比べ構造的な欠陥や不純物含量が多いためと考えられる。</p> <p>(3) TiNT とMWCNT では濃度 0.1 mg/ mL 処理期間 1, 3, 7 日で生存率はControl に比較して著しく低下したり上昇したりする。</p>	
--	--	--	--	---	--

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調整法/試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
16	C-W. Nam, S-J. Kang, Y-K. Kang, M-K. Kwak Archives of Pharmacol Research, 34 , pp 661 -669 (2011)	Cell growth inhibition and apoptosis by SDS-solubil- ized carbon nanotubes in normal rat kidney epithelial cells (正常ラット腎臓 上皮細胞におけ るドデシル硫酸 ナトリウム(SDS) 可溶化単層カー ボンナノチュー ブによる細胞成 長抑止とアポ トーシス)	●対象物質 ・SWCNT *種類 ASP-100F *購入先 Hanhwa Nanotech (Korea) *製造法 アーク放電法 *純度 SWCNT 60~70 重量% *金属触媒含量 10wt% *グラファイト含量 20wt% ●試料調整法 SWCNT 懸濁液の調整法 ドデシル硫酸ナ トリウム(SDS)水溶液と SWCNT とを混合し超 音波処理と遠心分離を行なう。これらの処理 で上記の金属不純物とグラファイトは分離除 去される。 ●試験用量 ・MTT 検定法 SDS-SWCNT 濃度 0.5, 1, 2, 4, 8, 10 μg/mL 24 時間培養: 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 μg/mL 48 時間培養 ・細胞毒性検定法 SDS-SWCNT 濃度 0.5, 1, 2, 4, 8, 10 μg/mL 24 時間培養 ・細胞周辺解析 SDS-SWCNT 濃度 0, 8, 10 μg/mL 24 時 間培養 ・全タンパク抽出物の作成 SDS-SWCNT 濃度 0, 8 μg/mL 24 時間 培養 ・単細胞電気泳動法(Comet 検定法) SDS-SWCNT 濃度 8 μg/mL 24 時間培養 ●Control SDS 水溶液	●試験生物/ ・種類 標準的ラット腎 臓上皮細胞(NRK 52E) *入手先 American Type Cultures Colle- ction (U.S.A.) *培養法 L-グルタミ ン、グルコース、so- dium pyruvate、ウシ胎 仔血清、ペニシリン/ス トレプトマイシン含む DMEM (Dulbeco's Modified Eagle's Medium)中で成長させ る。 ・核プロテインの作成 粗細胞核断片を均質 化緩衝液中に溶解し、 遠心分離を行なう。 ●試薬 ・対抗抗体: CDK2, CDK6, phospho-Rb (Ser807/811), 開裂 caspase-3 (Asp175) ・抗体: β-tubulin, lamin B, PARP, p27, p21, p53 ●期間 ・MTT 検定法 24 また は 48 時間培養、MTT 溶液添加後更に 4 時 間培養 ・細胞毒性検定法 24 時間培養	●NRK 52E 中での SDS-SWCNT により減少した 生存細胞数 SDS-SWCNT 処理(濃度 0.5~10 μg/mL)により 細胞数は著しく減少(0.5~8 μg/mL で 40~50% 抑制)。10 μg/mL で生存細胞数は最大の減少と なり、16%のみ生存。SWCNT の毒性効果は暴露 時間が長くなると増加する。生存細胞数の SDS-SW- CNT 媒介現象は成長抑制か細胞死 によると考えられる。SDS-SWCNT 処理後の媒体 中のタンパク質分解酵素の活性の測定は SDS-SWCNT は 0.5~8 μg/mL の濃度範囲では 毒性マーカーに影響を及ぼさないが 10 μg/mL では SDS-SWCNT は細胞外のタンパク質分解酵 素の活性を顕著に増加させる。これらの結果は SDS-SW- CNT は細胞成長を抑制し腎臓上皮 細胞の細胞毒性を引き起こす。 ●SDS-SWCNT 誘起された細胞周期停止とアポ トーシス 8 μg/mL 濃度の SDS-SWCNT の 24 時間処理で は G ₀ /G ₁ 相で SDS-SWCNT は細胞周期停止を引 き起こした(SDS-SWCNT 処理グループにおける G ₀ /G ₁ 相中での細胞の%個体数 65%: SDS Control グループにおける G ₀ /G ₁ 相中での細胞 の%個体数 45%)。8 μg/mL 濃度の SDS-SWCNT の処理の場合 G ₁ 副相での細胞数は SDS Control に比べて(2.5%)僅かに増加した(9%)。アポトーシ スの細胞数は 10 μg/mL の場合著しく増加し た。これらの実験結果は SDS-SWCNT は細胞成 長停止と細胞死を引き起こす。 ●SWCNT による細胞周期関連とアポトーシス関 連タンパク質の変化 CDK2 と CDK6(細胞周期の誘因体)に対するプ ロテインレベルがイムノブロット法解析法で決定	SDS 可溶化 SWCNT は比較的 低濃度で細胞の 増殖を抑制しラッ トの腎臓上皮細胞 におけるアポトー シスを誘起する。 この現象は SWC- NT によって引き起 こされ DNA 損傷、 p53 活性、Rb リン 酸化反応の抑制と アポトーシス経路 の活性化によって 説明することがで きる。この実験結 果はいろいろな生 物医学的治療で の有望な応用を持 つ合成洗剤可溶 化 SWCNT の潜在 的毒性に関する支 援を行なうもので ある。

			<ul style="list-style-type: none"> ・細胞周辺解析 24 時間培養、集菌後最短 4 時間エタノール中で固定 ・全プロテイン抽出物の作成 24 時間培養 ・単細胞電気泳動法 (Comet 検定法) 24 時間培養 ●試験方法 ・細胞数の測定 MTT 法利用 ・細胞毒性 CytoTox-Fluor™ 使用 ・タンパク質濃度測定 BCA プロテイン検定キット使用 ・プロテインの検定 イムノプロット法解析使用 ・DNA 損傷の測定 Comet 検定法と OMT(Olive tail moment Comet 検定法で使用する遺伝子毒性を検定するための強力な解析法) 使用 	<p>された場合、8 μg/ mL 濃度の SDS-SWCNT はプロテインレベルを 60%まで抑圧した。細胞周期進行のマーカーの一つとして phosphorylated-Rb (Ser807/811)のレベルは SDS-SW- CNT 処理によって著しく低下した。この結果は SDS-SWCNT 処理は細胞周期の抑止と細胞成長の抑制を引き起こすとした我々の以前の研究結果を支援している。</p> <p>更にアポトーシス関連プロテインを観察した場合、caspase-3 の亀裂は増加したが亀裂した PARP レベルは 8 μg/ mL 濃度の SDS-SWCNT 処理では変化しなかった。</p> <p>DNA 損傷に応答する因子である p21 および p53 のプロテインレベルは SDS-SW- CNT 処理ではそれぞれ 95%と 149%増加したが p27 の場合は著しい変化はみられなかった。</p> <p>●腎臓上皮細胞での SDS-SWCNT 誘起 DNA 損傷</p> <p>SDS-SWCNT によって誘起される細胞周期関連とアポトーシスの機構を確認するため Comet 検定法を使用して DNA 損傷に及ぼす SWCNT の影響を検討した。8 μg/ mL 濃度の SDS-SWCNT グループで処理した場合 DNA の核はほぼ破壊され、またその尾部は引き伸ばされた。OTM の計算値は SDS-SWCNT で処理した細胞内では SDS Control 内の値に比較して著しく増加した。この結果は SDS-SWCNT 誘起細胞成長は阻止され、またアポトーシスは DNA の破損と密接に関連していることを示している。</p>
--	--	--	--	---

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調整法/試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
17	K. Hitoshi, M. Katoh, T. Suzuki, Y. Ando, M.Nadai The Journal of Toxicologic al Sciences, 36, pp 379- 387 (2011)	Differential effects of single-walled carbon nanotubes on cell viability of human lung and pharynx carcinoma cell lines (ヒトの肺癌細胞 株と咽頭癌細胞 株の細胞生存 に及ぼす単層カ ーボンナノチュ ープの異なった 影響)	●対象物質 ・種類 SWCNT(SO- SWCNT と FH-P- SWCNT) *入手先 Meijo Nano Carbon Co. Ltd. (日 本) *物性 SO- SWCNT 径 1.27~1.42 nm 長さ 1.5 μm SO- SWCNT 純度 >90% 金属触媒残渣 Ni 1.03%; Yttrium 0.26% FH-P- SWCNT 径 0.88~1.42 nm 長さ 5~10 μm FH-P- SWCNT 純度 >90% 金属触媒残渣 Iron 2.32% *測定法 径 ラマン分光計;長さ TEM;SWCNT 純度 重量示差熱分析計;金属触媒残 渣 SEM ●Control 細胞と Control SWCNT ●試料調整法 10%ウシ胎児血清(FBS)を含有する最 少必須媒体(MEM)中で超音波ホモジナ イザーを使用して SO- SWCNT あるいは FH-P- SWCNT を 1mg /ml までの 濃度で分散させる。 ●試験用量 SO- SWCNT と FH-P- SW- CNT 0.1, 0.4, 1.0 mg/ml	●試験生物 ・種類 ヒト A549 肺癌細胞 株とヒト Fa- Du 咽頭癌細胞株 ・入手先 * A549 DS Pharma Biomedical (日本) *FaDu American Type Cell Culture (U.S.A.) ・培養法 A549 と FaDu とは 5%CO ₂ を含む増湿した 37°Cの雰囲気です それぞ れ 10% FBS を含有する DMEM と MEM 中で培養 する ●投与方法 細胞を培養して採取後 SWCNT 懸濁液を添加暴 露する ●暴露期間 3, 12, 24 時間 ●試験方法 ・SWCNT の分散状態 光 学顕微鏡使用 ・細胞生死判別試験 細胞膜バイオマス(CV 検 定)、ATP 含量(CTG 検 定)、細胞内代謝能力 (CTB 検定)使用 ・細胞アポトーシス検定 caspase-3/7 検定法と GSH 検定法利用	●SWCNT の分散状態 10%FBS を含有する MEM 中の SO- SWCNT と FH-P- SWCNT の分散状態を肉眼で観 察。両 SWCNT は培養媒体中で一つの束を 形成する。SO- SWCNT の束状体は円筒で あり、FH-P- SWCNT のそれは繊維状であ る。両者の形状とサイズは暴露 24 時間にわ たって変わらず、暴露期間内では付加的な 凝集は起っていないことを示している。 ●細胞生死判別試験 ・CV 検定 1.0 mg/ml SO- SWCNT に A549 を 24 時間暴露した後細胞膜バイオマスはコ ントロール細胞に比較して 43%減少した。 FaDu では 90%以上残留していた。1.0 mg/ml FH-P- SWCNT を 24 時間間暴露した場合 A549 の細胞膜バイオマスは 78%に低下し、 一方 FaDu 細胞では 90%以上残っていた。細 胞膜バイオマスの暴露依存性低下は A549 には確認されたが、FaDu 細胞には見られな い。 ・CTG 検定 1.0 mg/ml SO- SWCNT に A549 または FaDu を暴露 24 時間後、細胞の ATP 含量はそれ ぞれ 40%と 54%であった。FH-P- SWCNT の 暴露の場合細胞の ATP 含量はそれぞれ 62%と 80%に低下した。ATP 含量依存の低下 は両細胞では確認できなかった。 ・CTB 検定 1.0 mg/ml SO- SWCNT に対する A549 と FaDu 細胞の 24 時間暴露後では細胞内代謝 能力はそれぞれ 24%と 38%に減少した。 FH-P- SWCNT に暴露した場合、細胞内代 謝能力はそれぞれ 16%と 38%になった。代	本研究では 2 種類の SW C- NT の暴露に対して A549 と FaDu とは異なった反応を示 すことが明確に示されたが、 ここではおそらく細胞が違っ た機能を所有することによる ものとも考えられる。また最も 重要な点は実験結果が各 SWCNT の物理化学的特性に 由来する分散状態によると判 断されることである。生体系 に及ぼす SWCNT の影響の 広範な特徴を理解するため、 使用する SWCNT の物理化学 的特性に加えて SWCNT の分 散状態を示すことを推奨した い。ATP 含量と細胞内代謝 能力は細胞膜バイオマスと 比較して細胞生存に対するよ り高感度なマーカーと見られ る。従って細胞に及ぼす 2 種 類の SWCNT の影響は主とし て ATP 含量と細胞内代謝能 力により検定されるべきであ る。もしこれらのパラメータ が効果的であるならば、細胞 生存の機構をさらに解明す るため他の評価法を追加す ることが必要となる。

			<p>・ A549 内の SWCNT 内の 内在化 電子顕微鏡使用</p>	<p>謝能力の暴露依存低下は両細胞で確認された。</p> <p>・caspase-3/7 検定 1.0 mg/ml SO- SWCNT に A549 または FaDu を暴露 24 時間後、caspase-3/7 活性はそれぞれ 46%と 59%に減少した。</p> <p>・GSH 検定 A549 の 3, 12, 24 時間 SO- SWCNT と FH-P- SWCNT に暴露した後 GSH レベルは暴露時間に依存して減少した。これに反して FaDu の GSH レベルは 24 時間間では両 SWCNT では不変のように見られる。</p> <p>・ A549 内の SWCNT 内の内在化 SO- SWCNT と FH-P- SWCNT に暴露した A549 には濃厚な黒色の凝集物が見られる。この物質は両 SWCNT の束状体と考えられる。束状物の塊は A549 の細胞質内に観察された。細胞組織は両 SWCNT の暴露によっては影響を受けないことを確認している。</p>	
--	--	--	---	--	--

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調整法/試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論																																				
18	A.Bianco, K.Kostarelos, M.Prato Chemical Communications , 47, pp 10182-10188 (2011)	Making carbon nanotubes biocompatible and biodegradable. (カーボンナノチ ューブを生体適 合性で生分解性 にする)	●対象物質 SWCNT と MWCNT(CNT) ●試料調整法や試験用量など 「総説」であるので詳細な記載なし	●試験生物、投与方法、 期間、試験方法など 「総説」であるので詳細 な記載なし	●生体適合性 ・ナノ物質の生体適合性に言及しました検討する問題 (1)急性の有害反応(アポトーシス、細胞分離、組織 壊死など)の誘起を除外して生物環境と相互作用を 起こす能力、(2)単純な免疫反応性しかし急性炎症 性は除外、(3)化学成分代謝による中毒は除く(4) 体内での物質の堆積に至る無害のあるいは長期に わたる組織蓄積 ・CNT の生体適合性変化に関連する化学構造と種類 (1)構造 1次、2次および3次機能化 (2)結合形態 共有および非共有結合性 (3)種類 COOH、アミノ基など ●生分解性 CNT 酸化的分解反応に及ぼす表面機能化グルー プの成功例 <table border="1"> <thead> <tr> <th>CNT</th> <th>機能化</th> <th>反応環境</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>SWCNT</td> <td>COOH</td> <td>HRP/MPO</td> </tr> <tr> <td>SWCNT</td> <td>COOH/Phs</td> <td>MPO</td> </tr> <tr> <td>SWCNT</td> <td>COOH</td> <td>PSF</td> </tr> <tr> <td>SWCNT</td> <td>COOH</td> <td>HRP/PSF</td> </tr> <tr> <td>MWCNT</td> <td>COOH</td> <td>HRP/PSF</td> </tr> <tr> <td>MWCNT</td> <td>COOH</td> <td>HRP</td> </tr> <tr> <td>MWCNT</td> <td>N-doped</td> <td>HRP</td> </tr> <tr> <td>MWCNT</td> <td>CONH-</td> <td>HRP/PSF/MPO</td> </tr> <tr> <td></td> <td>(CH₂CH₂O)₂CH₂CH₂-NH₃⁺</td> <td></td> </tr> <tr> <td>MWCNT</td> <td>COOH+</td> <td>HRP/PSF</td> </tr> <tr> <td></td> <td>1,3-dipolar cycloaddition</td> <td></td> </tr> </tbody> </table> HRP: horseradish peroxidase, MPO: myeloperoxidase, PSF: phagolysosomal simulating fluid, Phs: Phosphatidyl serine	CNT	機能化	反応環境	SWCNT	COOH	HRP/MPO	SWCNT	COOH/Phs	MPO	SWCNT	COOH	PSF	SWCNT	COOH	HRP/PSF	MWCNT	COOH	HRP/PSF	MWCNT	COOH	HRP	MWCNT	N-doped	HRP	MWCNT	CONH-	HRP/PSF/MPO		(CH ₂ CH ₂ O) ₂ CH ₂ CH ₂ -NH ₃ ⁺		MWCNT	COOH+	HRP/PSF		1,3-dipolar cycloaddition		生体適合性は CNT の表 面を機能化することによ って構築することが出来 る。具体的には表面への 親水性部分の導入は CNT の生化学的反応性 を低下させ生理学的環 境(循環系や軟組織)に 沿った移動を容易にする ものである。生分解性も また化学的機能化と酸 化酵素により CNT を退 化させることが出来る構 造的な欠陥の導入によっ て構築されるものであ る。基本となる CNT の機 能化には欠陥群化学、 共有側壁化学、さらに高 分子体、バイオ高分子 体、表面活性剤や他の 両親媒性分子などによる 非共有包装などを含む いろいろな方策が検討さ れている。
CNT	機能化	反応環境																																								
SWCNT	COOH	HRP/MPO																																								
SWCNT	COOH/Phs	MPO																																								
SWCNT	COOH	PSF																																								
SWCNT	COOH	HRP/PSF																																								
MWCNT	COOH	HRP/PSF																																								
MWCNT	COOH	HRP																																								
MWCNT	N-doped	HRP																																								
MWCNT	CONH-	HRP/PSF/MPO																																								
	(CH ₂ CH ₂ O) ₂ CH ₂ CH ₂ -NH ₃ ⁺																																									
MWCNT	COOH+	HRP/PSF																																								
	1,3-dipolar cycloaddition																																									

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調整法/試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
19	E.R. Kisin, A.R. Murray, L. Sargent, D. Lowry, M. Chirila, K.J. Siegrist, D. Schwegler-Berry, S. Leonard, V. Castranova, B. Fadeel, V.E. Kagan, A.A. Shvedova Toxicology and Applied Pharmacology, 252 , pp 1-10 (2011)	Genotoxicity of carbon nanofibers: Are they potentially more or less dangerous than carbon nanotubes or asbestos? (カーボンナノ ファイバーの 遺伝毒性:カ ーボンナノフ ァイバーはカー ボンナノチュ ーブやアスベ ストより潜在 的に多かれ少 なかれ危険で あるのか)	●対象物質 ・カーボンナノファイバー(CNF) *購入先 Pyrograph Products, Inc. (U.S.A.) *精製法 蒸気成長したカーボン ナノファイバーを 3000°Cで加熱 処理し、Pyrograph®-III の表面に 存在する化学的に蒸着した炭素 を黒鉛化した鉄触媒を除去す る ・SWCNT *合成法 HiPco 法で合成 *購入先 CNI Inc. (U.S.A.) *精製法 酸処理で金属含有物除 去 ・AUICC 標準クロシドライトアスベ スト ●試験用量 ・毒性検定 V79 細胞使用 CNF, SWCNT, アスベスト 0, 3, 12, 48 µg/cm ² ・Comet 検定法 V29 細胞使用 0, 3, 12, 48 µg/cm ² ・小核検定 0, 3, 12, 48 µg/cm ² ・クロマチン全動原体シグナル検 出 2, 4, 24 µg/cm ² ・ヒト末梢気管支上皮細胞(SAEC) 2, 4, 24 µg/cm ² ●Control ・Positive control AUICC 標準ク ロシドライトアスベスト ・Positive control (Comet 検定) MNNG ・Positive control PBS	●試験生物 ・チャイニーズハムスター 肺線維芽(V79) 細胞株 ・RAW264.7 マクロファージ ・ヒト末梢気管支上皮細胞 (SAEC) ●細胞培養 ・V79 細胞株 V79 細胞を Earle 塩、L-グ ルタミンを添加した抗生 物質とウシ胎仔血清を補 足した MEM 媒体中に播種 し、37°C加湿した CO ₂ 下に保つ。細胞毒性および 遺伝毒性試験に使用。 ・RAW264.7 マクロファージ 37 °C 加湿 雰囲気 (5% CO ₂ +95%空気) 下加熱不活 性化した FBS、ペニシリン、 ストレプトマイシンを補足し た DMEM 中で育成する。 ROS 産出の評価と細胞組 織の変化の観察に使用する。 ・ヒト末梢気管支上皮細胞 (SAEC) 購入先 (Cabrex media 社、 U.S.A.) の処方に従い培養 し、MN 内のクロマチン 動原体シグナルの検出に 使用。 ●投与方法 3 種繊維物質と V79 細胞株	●繊維対象物質の特性測定 CNF クロシドライト SWCNT アスベスト 長さ µm 0.6~12 1~3 鉄含量% 1.4 18 0.23 表面積 m ² /g 35-45 8.3 1040 直径 nm 60-150 210 1-4 アスペクト比 500 30 1000 積分強度比 0.95 N/A 0.05 グラファイト比 0.51 N/A 0.95 ●細胞による摂取と反応性中間体の発生 細胞による摂取と細胞損傷の評価にはネズ ミ属 RAW264.7 マクロファージ株使用、 CNF(暴露条件 24 時間 24 µg/cm ²)は細胞構 造内に侵入し、細胞組織に超構造変化が 引き起こされた。SWCNT の場合も同様な 超構造変化が発生している。CNF とアスベ ストではマクロファージでの内在化が確認さ れたが SWCNT の場合は確認されていな い。アスベスト暴露の場合は細胞内に存在 しているにも拘らず通常の細胞構造を示し ている。3種の繊維物質の処理によりフリ ーラジカルが発生するかどうかを評価する ため ESR を使用、これらの繊維物質に RAW264.7 細胞を 5 分間暴露したが ESR の シグナル測定によればアスベスト、CNF の 順でシグナル強度は高いが SWCNT 暴露で はコントロール値とほぼ同一である。 ●毒性評価 MEM 中の V79 細胞株を CNF、SWCNT 、アスベストに暴露(暴露時間 3、24 時間)後 細胞数を数えた。その結果これらの繊維物 質による V79 の生存率は暴露量と暴露時間 により著しく減少した。高濃度(本研究では炭素ベース カーボンナノファイバー の細胞毒性と遺伝毒性 の潜在性を検討し、また この物質とクロシドライト アスベストおよび SWCNT の影響とを比較した。肺 線維芽(V79)細胞株の遺 伝毒性は 2 種の補完的 な検定法、Comet 検定法 と小核 (MN) 試験法で 検定した。異数性誘発か または染色体異常誘発 性の機構を示す MN 内 でのクロマチン全動原体シ グナルを検出するため蛍 光 in-situ ハイブリダイゼ ーションを使用した。細 胞毒性試験では V79 細 胞の生存能力の暴露濃 度および暴露時間依存 低下は試験物質に対し てアスベスト>CNF> SWCNT の順であることを 示した。更に CNF または アスベストの暴露後ネズ ミ RAW 264.7 では細胞 への取り込みと酸素ラジ カルの発生が見られた が、SWCNT 暴露後では この現象は起らなかった。 DNA 損傷と小核の誘 発はここで使用したすべ て試験物質の暴露後に

			<p>や RAW264.7 マクロファージと混合培養</p> <p>●期間(時間)</p> <p>・毒性検定 3, 24 時間</p> <p>・Comet 検定法 3, 24 時間</p> <p>・小核検定 24 時間</p> <p>・クロマチン全動原体シグナル検出 24 時間 (CNF 使用時)</p> <p>●試験方法</p> <p>・3 種繊維物質の特性(積分強度比とグラファイト比)測定 ラマン分光法利用</p> <p>・3 種繊維物質よりのフリーラジカルの発生 ESR の使用</p> <p>・毒性検定 ヘマサイトメータと光学顕微鏡使用</p> <p>・遺伝毒性検定 Comet 検定法使用</p> <p>・小核検定 小核分析は HELIX 社 (U.S.A)委託</p> <p>・クロマチン全動原体シグナル検出 Zeiss Axiophot 顕微鏡使用</p>	<p>12, 48 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) 24 時間暴露ではアスベストと CNF では SWCNT に比較して高度の毒性効果を示した。</p> <p>●繊維物質の遺伝毒性</p> <p>3種の繊維物質は in vitro で遺伝毒性を示す。CNF の遺伝毒性はアスベストと同等であり、SWCNT よりは強力である。本実験結果は(1)ここで使用したナノサイズの繊維物質は 2 種の異なった機構、つまり最初 ROS が産出し、次にこれが DNA と容易に反応する、(2)DNA/染色体とまたは細胞有糸分裂装置を物理的に妨害する、ことによって遺伝毒性を誘起するという仮説を支持するものである。カーボンナノファイバーの表面に存在する鉄のいろいろの量によって ROS 産出とこれにひき続く毒性反応が引き起こされる傾向にあるものと考えられる。</p>	<p>発生しており、CNF が最強の影響を及ぼしている。CNF は主要なヒトの末梢気道上皮細胞に主として動原体陽性小核を誘起しており、これは異数性誘発の事態を示している。</p>
--	--	--	---	--	---

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調整法/試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
20	K. Medepalli, B..Alphenaar A. Raj P. Sethu Nanomedicine,Nanotechnology,Biology, and Medicine,7, pp 981-991 (2011)	Evaluation of the direct and indirect response of blood leukocytes to carbon nanotubes (CNTs) (カーボンナノ チューブに対 する血液白血 球の直接と間 接反応の評 価)	●対象物質 ・SWCNT *種類 CoMoCAT *入手先 Southwest Nanotech- nologies (U.S.A) ●Control マクロファージのない血液 ●SWCNT-DNA 複合溶液の作成 SWCNT を水性の ss- DNA(単鎖 DNA)溶液で混合し、混合液を超 音波遠心処理する。次にサンプ ルを遠心分離し、ssDNA 溶液中 に単独に分離した SWCNT を含む 上澄み液を集め PBS かまたは細胞 培地内で再懸濁する。更に ss- DNA で包まれた SWCNT は蛍光 顕微鏡検査法を用いて撮像す る。 ・血液の分離 血液は静脈穿刺によって健康な ボランティアから引き抜く。血液の サンプルは抗凝血剤としてヘパリン でバキュテナー(真空パック装 置)内に収集する。 ・単球の分離 末梢血単核細胞(PBMCs、単球、 リンパ球)の分離は密度勾配遠 心分離で実施する。	・フローサイトメトリー分析 色々な亜集団をフローサイト メトリーで測定。データは WinMDIsoftware を使用して 解析 ・血液での SWCNTs の直接の 相互作用 ssDNA 中で懸濁した SWCNTs を全血液に直接に 加え培養器に保つ。Positive と Negative control 実験を血 液単独で SW- CNTs なしで、 PMA ありとなしで実施。血液 中の白血球は NH ₄ Cl 溶菌で 分離し、活性化マーカーで染 色しフローサイトメーターで解 析。 ・血液での SWCNTs の間接の 相互作用 細胞はトリプシン処理し、培 地内で再再懸濁し、血液と混 合し、 マクロファージを含む血液と 混合し、細胞を培養する。マ クロファージのない血液は control として利用。 血液からの細胞は、上記同 様に処理。	In vitro で CNT に対する血液白血球の急性 な応答を評価するために下記の 2 件の特別 な事象を再現した。 (1)血液循環で CNT の存在により起るかも 知れない直接の暴露の事象 (2)抗原の提示細胞を經由して血液白血球 に対する CNT の提案。 異なった白血球の亜集団の活性化に対する 潜在力はその結果フローサイトメトリーを使 用して色々な早期の活性化を解明すること によって評価した。遺伝子と薬物送達に対す る関連性を確実にするためここでの実験で はグアニン-チミン(GT)反復配列からなる単 鎖の(ss)-DNA 断片で機能化した単層カーボ ンナノチューブ(SWCNT)を利用した。ここで SWCNT はバイオ分子に対するバックボーン としてまた集合体を防ぐ界面活性剤として役 立つ潜在力を持っている。 この研究の結果は(ss)-DNA で機能化した SWCNT は、早期の白血球活性マーカーの 発現によって立証されるように、直接かまた は間接の相互反応により血液白血球から急 性の免疫反応を引き起こさないことを示して いる。	●CNTs は細胞質と細胞核内に細胞膜を通し ての遺伝子と薬剤の 移動に対して著しい可 能性を持っている。し かしながら CNTs の毒 性と血液白血球から免 疫反応を引き起こす可 能性も評価する必要 がある。この評価のた めに本研究では in vitro で体内で CNTs の 存在によりおこる 2 つ の潜在性のある事象 を再現した。血液白血 球は分離され早期の 活性化のマーカーの 発現に対して評価され た。結果は相互作用の 種類に従って最小の 白血球の活性化を示 している。

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調整法/試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
21	J. Yuan, H.Gao, C.H. Ching Toxicology Letters, 207 , pp 213-221 (2011)	Comparative protein profile of human hepatoma HepG2 cells treated with graphene and single-walled carbon nanotubes: An iTRAQ-coupled 2D LC-MS/MS proteome analysis (グラフェンと 単層カーボン ナノチューブ で処理したヒト の肝臓癌細胞 HepG2 の相対 的分析結果: iTRAQ 結合 2DLC-MS /MS(液体クロ マトグラフィー 質量分析法) プロテオーム 解析	●対象物質 ・SWCNTs HiPco 法を利用し CVD 法で製造、精製するため炭 素質と触媒不純物を除去。 直径 0.8~1.2 nm ・グラフェン 合成した黒鉛粉末から酸化黒鉛 を合成し、超音波で酸化黒鉛を 剥離し、化学的に還元を行なつ てグラフェン水溶液を得る。 ●細胞培養 ヒトの肝臓癌 HepG2 細胞は Dulbecco's modified Eagle's 媒 体で培養する。SWCNTs と グラフェンは凝集する傾向があ り細胞の表面で落ち着く傾向が あるので、媒体を含む界面活性 剤を SWCNTs とグラフェンを分 散するために用いる。 ●細胞の溶菌、プロテインの消化 と iTRAQ 試薬のラベル付け ナノ物質に暴露された後細胞は 捕集され、溶解される。サンプル は遠心分離し、上澄みを採取 し、定量化し、精製化する。精製 化されたプロテインは再懸濁し、 還元させる。プロテインをペプタ イドに消化させる。 消化させたプロテインは iTR- AQ タグでラベル化される。 ●Control cell HepG2 細胞	●試験生物 肝臓癌 HepG2 細胞 ●投与方法 肝臓癌 HepG2 細胞 を SWCNTs あるいは グラフェンで処理(暴 露) ●期間(暴露) 48 時間 ●試験方法 ・MTT 検定 細胞の代謝活性を検 定するために MTT 検 定法を使用。 ・オンラインの 2DLC -MS/MS 分析 Agilent 1200 series 液 体クロマトグラフ と HPCL-Chip cube で 結合された 6530 Q-TOF mass spec- trometer で分析実 施。	●本研究では生物系と分子レベルでのナノ 物質類の間での相互関係を特徴づける目的 を持ち、グラフェンと SWCNTs で処理した場 合のヒトの肝臓癌 HepG2 細胞のプロテイン のプロファイルの変化を分析するため iTRAQ 結合 2DLC-MS/MS の手段を適用し た。 ●代謝経路、細胞骨格形成と細胞の成長に 含まれた、全体として 37 の異なったタンパク 質発現が確認された。プロテインのプロファ イル(形状)に基づいて解析すると、SWCNTs は細胞内の代謝のルート、プロテインの合成 と細胞骨格系を著しく妨害した。更にデータ は SWCNTs が酸化ストレスを、それによる活 性化 p-53 で仲介された DNA 損傷チェックポ イントのシグナルとアポトーシスに至る変化 を引き起こすことを示唆している。 ●しかしながら、グラフェンで処理された細 胞に対しては、単なるプロテインレベルの中 位の変化が観察された。グラフェンは毒性が 少なく、生物医学の応用に対して有望な候 補であるかもしれない。我々はタンパク質発 現レベルでの細胞応答の系統的な特性化 はナノ物質の生体適合性を評価するため極 めて重要であると想定している。	●iTRAQ 結合 2DLC-MS /MS(液体クロマトグラフィー 質量分析法) プロテオーム解 析はナノ物質の応答での細 胞機能を研究するために有 効である。 ●プロテオームレベルで細胞 機能を詳しく見ることにより、 グラフェンと SWCNTs で処理 した細胞間の細胞応答の明 確なパターンを確認するこ とができる。プロテオームレ ベルでの細胞機能の規則的な 特性は分子レベルでの相互 作用のより詳細な理解を提 供する。 ●本研究で確立したプロテイン のプロファイル(形状)はグラ フェンと SWCNTs と関連す るナノ物質のバイオ適合性を 評価するため非常に重要で あろう。

DWNT

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調整法/試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
22	F. Mouchet, P. Landois, V. Datsyuk, P. Puech, E. Pinelli, E. Flahaut, L. Gauthier Environmental Toxicology, 26, pp 136-145 (2011)	International amphibian micron- nucleus standardized procedure (ISO 21427- 1) for <i>in</i> <i>vivo</i> evaluation of double-wall- ed carbon nanotubes toxicity and genotoxicity in water (水中における2 層カーボンナ ノチューブの毒性 と遺伝毒性の <i>in</i> <i>vivo</i> 評価に関す る国際的両生類 小核標準手順 (ISO21- 427-1))	●対象物質 ・CNT *製法 MgO-基盤触媒上で H ₂ - CH ₄ 混 合物を分解する CCVD (接触化学気相 蒸着法)使用。ここで得られるカーボンナ ノチューブを CNT という。 *特性 炭素含量 約 90 wt% (97.7 mol % 以上): C と Co のみを含む: BET 比表面積 800 ~900 m ² /g: D と G バンド比 10%に近く 良好な構造的品質を持つ: Co はCに封 印されている: CNT の径 0.7~2.2 nm: 高密度の CNT の束よりなり、多数の枝 を所有する: 束径 10~20 nm: 多数の個 別の CNT が存在する。 ●試料調整法 ・CNT の調整 CNT を HCl で洗浄し触媒を除去した後 HRTEM で観察し、CNT 表面は汚れのな いことを確認する。CNT は主として分離 しており、この状態で得られた CNT は2 層カーボンナノチューブ(DWNT) 80%、 SWCNT 15%、3 層カーボンナノチューブ 5%から構成される。DWNT の外径は 1~ 3 nm。 ・アフリカツメガエルの育成と増殖 ・アフリカツメガエル雄に PMS- G500 の 50IU を、雌に HCG の 750 IU を注入し産 卵させる。各ペヤを活性チャコールでろ 過した水道水中に合わせ配置する。24 時間、ペヤを分離し生存能力のある卵 を活性チャコールでろ過した通常の水道	●試験生物 アフリカツメガエル の幼虫(雄と雌) ●投与方法 アフリカツメガエル の幼虫は DWNT 濃度 0.1,1,10,50 mg/L で 12 日間 GA 使用し(実験 1)、または GA 使用せ ず(実験 2)暴露される ●試験方法 ・CNT に暴露された幼 虫の急性毒性(死また は異常挙動)試験 目視検査 ・小核試験 ・遺伝毒性検定 ・幼虫の腸サンプルの 検討 ラマン分光分析解析	●実験1および2のアフリカツメガエル幼虫 の急性毒性試験結果 実験1毒性(幼虫の死亡率と成長率) 実験2遺伝毒性(小核赤血球の発現) DWNT 濃度 (mg/L):死亡率 (%):成長率 (%) “-” Negative control グループに比較して 急性毒性の兆候なし 外観検査 *減少または停止したサイズ 貧血症(鉄の欠乏)の兆候 *の数は増加する影響の強度を示す NC Negative control GAC アラビアゴム control (50 mg/ L) 実験1 DWNT 濃度 NC 0.1 1 10 50 死亡率 0 0 0 5 15 外観検査 - - * *** 成長率 100 121 92 37 0 実験2 DWNT 濃度 NC GAC 0.1 1 10 50 死亡率 0 0 0 0 0 外観検査 - - * *** 成長率 100 91 100 95 29 5 ●半静電暴露による幼虫における小核評価 の結果 MNE% 1000 当りの小核赤血球の数 DWNT 濃度 (mg/L) 実験1 濃度 NC CP 0.1 1 10 MNE 6 30 5 8 6 実験2 濃度 NC CP GAC 0.1 1 10 MNE 17 10.2 2 2 3 2	本件研究では管理された実 験条件(ISO,2006)のもとで 12 日間の暴露後 2 種の異なっ た評価項目により両生類アフ リカツメガエルの幼虫におけ る DWNT の生態(遺伝)毒性 を評価した。ここでは流動す る血液の赤血球中に観察され た染色体異常誘発および または異数性誘発性の影響 の表現として毒性と遺伝毒性 を評価するものである。研究 結果はこの研究で用いた DWNT の潜在的なリスクを強 調する。これは(1)GA(アラビ アゴム)を使用するかあるいは 未使用で 10 および 50 mg/L で DWNT に暴露された 幼虫で毒性が観察されたこと また(2) GA を使用した 1 mg/ L の DWNT に暴露された幼虫 で遺伝毒性が観察されたこと による。これまで発表された 研究では DWNT は幼虫に摂 取されることが示されている ので一度環境に放出された 場合、DWNT が食物連鎖でそ の後発見されるかもしれない 可能性を考慮しないことは出 来ない。

		<p>水を含む水槽に実験に適切な成長状態に達するまで保持する。</p> <p>●試験用量(暴露量)</p> <p>・実験1および2のアフリカツメガエル幼虫の急性毒性試験</p> <p>実験1および2</p> <p>DWNT 濃度 0.1、1、10、50 (mg/L)</p> <p>・実験1および2の半静電暴露による幼虫における小核評価</p> <p>DWNT 濃度 0.1、1、10(mg/L)</p> <p>●Control</p> <p>・Positive control</p> <p>*CP monohydrated cyclophosphamide</p> <p>・Negative control</p> <p>*NC(RW 栄養塩(CaCl₂·2H₂O, MgSO₄, NaHCO₃, KCl)を添加した蒸留水道水</p> <p>*GA(アラビアゴム)</p>			
--	--	--	--	--	--

MWCNT

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調整法/試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
23	T. Tsukahara, M. Haniu Molecular and Cellular Biochemistry, 352 , pp 57-63 (2011)	Cellular cytotoxic response induced by highly purified multi-wall carbon nanotube in human lung cells (ヒト肺細胞中 で高度に精製 された多層カ ーボンナノチ ューブに誘起 された細胞毒 性反応)	●対象物質 ・種類 MWCNT(HTT2800) Mitsui MWCNT-80 ・寸法 アスペクト比 100~150 nm: 長さ 10~20 μm ●試料調整法 HTT2800 をゼラチン 0.1%含有する リン酸塩緩衝生理食塩水(PBS, pH 7.4)中で分散させ、使用前に超音 波処理により凝集物を破壊する ●試験用量および試験時間 HTT2800 濃度と試験時間は各試 験により異なる ・BEAS-2B 細胞中での HTT2800 摂 取 HTT2800 30μg/ml 12 または 24 時 間 ・HTT280 の急性細胞毒性 0.1~100 μg/ml 24 または 72 時間 ・ROS 生成 HTT2800 0.1~30μg/ml 24 時間 ●HTT2800 暴露後開裂された caspase-3 の検出 0.1~30 μg/ml と 30~100μg/ml ・炎症反応 30μg/ml 24 時間 ●Control Positive control H ₂ O ₂ (100 μM) Negative control(媒体 0.1%ゼラチ ン)	●試験生物 ・種類 ヒト気管支表皮細胞 (BEAS-2B) ・購入先 American Type Culture Coll- ection ・細胞培養法 BEAS-2B を 10% FBS、ペニ シリン(100U/ml)とストレプトマ イシン(100 μg /ml)を含む DMEM 媒質中に保持、成長さ せる ●試験方法 ・BEAS-2B 細胞中での HTT2800 の細胞摂取検定 BEAS-2B を HTT- 2800 と 培養、染色後細胞を光学お よび蛍光顕微鏡で分析 ・細胞生存率 アラマーブルー検定法使 用 ・LDH 放出検定 LDH 活性を LDH 細胞検定 キットで評価 ・ROS の測定 フローサイトメトリー法使用 ・プロテイン解析 ウエスタンブルー法使用 ・培地上澄み液中のサイトカ インの検定 Cytometric bead array flex set 使用	●BEAS-2B 細胞中での HTT2800 摂取 HTT2800 は細胞内に取り込まれ、その粒 子は細胞質領域に内在されている。細胞核 の染色により細胞核の周辺にHTT2800 が凝 集していることが観察されおり、気球状の核 形態を示し、これが典型的な壊死による細 胞死と関連している。 ●HTT280 の急性細胞毒性 ミトコンドリア機能の検討では細胞代謝は HTT2800 処理によって明らかに低下した。 HTT2800 10μg/ml (IC ₅₀ = 15μg/ml)程度の低 暴露濃度で細胞生存率は暴露量に依存して 減少した。LDH の放出は暴露量に依存して 増加する。 ●ROS 生成 HTT2800 濃度 0.1~30μg/ml 間 24 時間暴露で 明確な DCF 応答は見られない。 ●HTT2800 暴露後開裂された caspase-3 の 検出 HTT2800 は一般的に見られる caspase-3 のアポトーシス分裂を引き起こさなかった。こ の結果は HTT2800 がヒト気管支表皮細胞の 細胞膜に細胞膜が引き裂かれるような壊死 効果を引き起こしていることを示している。 ●炎症反応 細胞上澄み液中の IL-6 と IL-8 量は HTT- 2800 との 24 時間培養後顕著に上昇する。 他のサイトカイン(IL-12, TNF-α, IL-10, IL-1β)は HTT2800 暴露後検出されなかつ た。	ヒト気管支表皮細胞 を高度に精製された MWCNT に暴露し細 胞摂取、ミトコンド リアの機能、細胞の LDH 放出、細胞死の シグナル伝達、活性 酸素種(ROS)の発生 や炎症促進性のサイ トカインの放出を 評価した。暴露細胞 は MWCNT の摂取、 細胞死の増加、DNA 損傷の増進、サイト カイン放出の誘発を 示したが、暴露細胞 は明確な細胞内 ROS 発生を示してい ない。これらの細胞 内ならびに分子内に 関する研究成果は HTT2800 が BEAS-2B 細胞内で 潜在的に炎症反応 を引き起こす可能性 のあることを示して いる。

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調整法/試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
24	A. R. Burke, R. N. Singh, D. L. Carrol J. D. Owen, N. D. Kock, R. D' Agostino, F. M.Torti, S. V. Torti Biomaterials,32, pp 5970-5978 (2011)	Determinants of the thrombogenic potential of multiwalled carbon nanotubes (多層カーボン ナノチューブの 血栓形成可能 性に対する決定 因子)	●対象物質 ・純粋な多層カーボンナノチューブ (PD15L1-5) ・カルボキシル化多層カーボンナノチューブ(PD15L1-5-COOH) ・アミド機能化多層カーボンナノチューブ(PD15L1-5-NH ₂) ・購入場所 Nano Lab (U.S.A.) ●MWCNT の特性値 すべての MWCNT に対して ・アスペクト比 同一 ・長さ中央値 約 490~580 nm ・直径範囲 26~33 nm ●試料調整法 ・溶媒として無菌食塩水を使用して PD15L1-5(コーティングされていない MWCNT)懸濁液を作成、使用前オートクレーブ処理を行う。 ・溶媒として 1%PluronicF127 または DSPE-PEG を含む無菌食塩水を使用して PD15L1-5- COOH または PD15L1-5-NH ₂ 懸濁液を作成、超音波処理を行い、使用前オートクレーブ処理を行う ●試験用量 In vitro ・固有の血液凝固カスケードに関する MWCNT の影響 Pluronic または DSPE-PEG 中に懸濁させた純粋な、カルボキシル化、アミド機能化 MWCNT10、50、100 µg/mL ・因子 IX と MWCNT との相互作用 Positive control カオリン、Pluronic ま	In vitro ●試験生物 血小板 ●投与方法 ・血小板活性化と血小板の凝集: PRP(多血小板血漿)を無被覆、Pluronic F127 または DSPE-PEG で被覆した MWCNT(純粋な、カルボキシル化、アミド機能化)で培養する In vivo ●試験生物 マウス ●投与方法 ・in vivo での MWCNT の血栓形成 静脈内注入 ●期間 MWCNT の血栓形成 3, 24, 48 時間 ●試験方法 ・血小板活性化 PRP を培養、FITC 共役 CD62P でラベル化し、フォルムアルデヒド内で固定化。PBS 内で希釈後分析する。 ・血小板凝集 PRP を培養、FITC 共役 CD62P でラベル化し、フォルムアルデヒド内で固定化。PBS 内で希釈後サンプルを遠心分離、洗浄、再懸濁、スライドに乗せ共焦点蛍光顕微鏡を使用して画像作成 ・活性化部分トロンボプラスチン時間 aPTT 検定法利用	本研究では in vitro と in vivo での各種の MWCNT の血栓性活性を比較し、またこれらの MWCNT の機能化が血栓性活性に及ぼす影響を評価した。In vitro では活性化部分トロンボプラスチン時間(aPTT)検定法での測定として MWCNT は凝血の固有経路を活性化している。アミド化またはカルボキシル化による機能化はこの凝血促進活性を増進する。機構的研究は因子 IX に著しく依存する一つの非古典的な機構により固有な経路の発展を助長することを示している。MWCNT は因子 IXa と優先的に関連し、酵素活性を引き起こす基盤を提供するかもしれない。このような凝血カスケードに対する効果に加えて MWCNT は in vitro では血小板を活性化するが、この際アミド化した MWCNT はカルボキシル化あるいは純粋な MWCNT より強力な血小板活性化を示すが、この対照的な傾向は in vitro の検討で得られたものであり、ここでは機能化は凝血促進活性を誘発するよりはむしろ低下させる傾向にある。従ってマウスへの MWCNT の全身注入によれば純粋な MWCNT では血小板総数は減少し vWF と D-dimer は増加する。対照的にカルボキシル化 MWCNT は in vitro では凝血を促進する傾向を殆ど示さず、血小板には軽度のまた過渡的な減少が誘発された。アミド機能化 MWCNT は血小板数に対して統計的に有意な変化を引き起こしていない。カルボキシル化とアミド化 MWCNT ではマウス血小板内では vWF と D-dimer は増加していない。	In vitro で観察された 3 種の MWCNT (純粋な、カルボキシル化およびアミド機能化 MWCNT) の凝血促進傾向はかならずしも in vivo で繰り返すことは出来ない。さらに機能化は in vivo での MWCNT の凝血促進活性を著しく弱力化することができる。

		<p>たは DSPE-PEG 中に懸濁させた純粋な、カルボキシル化、アミド機能化 MWCNT 100、250 µg/mL</p> <p>・血小板活性化に及ぼす MWCNT の影響</p> <p>Pluronic または DSPE-PEG 中に懸濁させた純粋な、カルボキシル化、アミド機能化 MWCNT 0、50、100 µg/mL</p> <p>In vivo</p> <p>・MWCNT の血栓形成</p> <p>1%Pluronic または 1%DSPE-PEG 中に懸濁させた純粋な、カルボキシル化、アミド機能化 MWCNT 250 µg</p> <p>●Control</p> <p>・固有の血液凝固カスケードに関する MWCNT の影響</p> <p>Positive control カオリン</p> <p>・血小板活性化に関する MWCNT の影響</p> <p>Positive control 未処理、PluronicF127 ビークル、PEG ビークル、ADP 活性化、ホルマリン固定化</p>	<p>・因子 IX と IXa のナノチューブ結合 Ca^{+2} と BSA を含む TBS 緩衝液内で個々に再構築した純粋なヒトの IX または IXa を PluronicF127 または DSPE-PEG で希釈し、これを培養し、次に遠心分離して、ゲルを作成、化学ルミネッセンス法で薄膜とし LAS 3000 を用いて画像とし Image J software package により 相対的バンド強度を決定する</p> <p>・マウスモデル</p> <p>基底線血小板数を確立するため尾静脈より血液採取し、血小板数を Beckman Coulter Z2 particle counter 使用</p> <p>・マウス D-dimer と vWF ELISA ELISA kit 使用</p> <p>・組織学と解析</p> <p>マウスの腎臓、肝臓、肺、心臓、脾臓のスライド作成し観察</p>		
--	--	---	--	--	--

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調整法/試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
25	M. Pacurari, Y. Qian, D.W. Porter, M. Wolfarth, Y. Wan D. Luo, M. Ding V. Gastranova, N.L. Guo Toxicology and Applied Pharmacology, 255, pp 18-31 (2011)	Multi-walled carbon nanotube-induced gene expression in the mouse lung: Association with lung pathology (マウスの肺に於 いて多層カーボン ナノチューブが誘 発した遺伝子発 現:肺の病理学と の関連性)	●対象物質 ・MWCNT(MWCNT-7) *入手先 Mitsui & Company(日 本) *構造 バルクの MWCNT は 20 から 50 壁を持つ典型的な結晶構造 *金属含有量 0.78% で Na 0.41%と Fe 0.32%を含み、他の金属は 0.02%以上ではない *分散状態 MWCNT は分散媒 (DM)中で分散状態にある *寸法 MWCNT の長さ中央値 3.86 μm :数平均幅 49 nm *Zeta potential (DM)中での値 -11 mV ●試料調整法 MWCNT を分散媒(DM)中で分散 状態にする ●試験用量 MWCNT 10, 20, 40, 80 μg /マウ ス ●Control Vehicle control 分散媒(DM)	●試験生物 ・種類 C57BL/6 マウス ・入手先 Jackson Laboratories (U.S.A.) ・週齢 7 週 ●投与方法(暴露方法) DMに分散したDMまた は MWCNT(暴露量 10, 20, 40, 80 μg /マウス) をイソフルンで麻酔 したマウスの咽頭に 吸引暴露する ●期間 7, 56 日 ●試験方法 ・RNA(リボ核酸)抽出 RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit 使用 ・定量的実時間処理 PCR(qPCR) TaqMan low density array 使用	本研究では以前判明された肺癌の前兆となるバ イオマーカーと関連した癌のシグナルを発生する 経路が十分に分散した MWCNT の咽頭吸引をう けたマウス内でいかに影響をうけているかを調 査することを追求した。全体で 63 確認された肺 癌の前兆となるバイオマーカー遺伝子と主要な シグナルを発生するバイオマーカー遺伝子は定 量化した PCR 検定法を使用して 0, 10, 20, 40, 80 μg の MWCNT を暴露したマウスの肺内で 7 と 56 日の暴露後に分析された。7 と 56 日の暴露後 1 組の 7 遺伝子および 11 遺伝子では夫々MWC- NT 対コントロールグループに暴露したマウスの 肺内では異なった発現を示した。これに加えて階 層的な遺伝子のクラスターリング解析ではこれら の重要な遺伝子は処理したグループからコントロ ールグループを時間系列を超えて分離すること ができた。さらに重要な遺伝子の 2 組からの 4 遺 伝子(99 を含むコイルドコイル領域(Ccdc99)、筋 肉切片ホメオボックス 遺伝子-2 (Msx2)、酸化窒素生成酵素-2 (Nos2)、 無翅類抑制性因子-1(Wif1))は両時間点で重要 な mRNA 表現振動を示した。またこれら 4 重複し た暴露 7 日後では遺伝子の表現変化は暴露 56 日後では弱力化したことが発見された。Ingenuity Path- way Analysis (IPA)は幾つかの発癌性に関 連するシグナル発生経路と発癌現象そのものは 7 と 11 との遺伝子兆候に関連している。本研究 は MWCNT の暴露はマウスの肺における肺癌バ イオマーカーの小集団に影響を及ぼすことを確 認している。	この研究から得られた結 果は MWCNT の暴露は マウスの肺における肺癌 バイオマーカー遺伝子発 現に変化を引き起こすこ とをしめしている。 これは MWCNT で誘発さ れた肺炎症、損傷、繊維 性の反応と発癌現象の 間の潜在的な関連性が あることを示している。 IPA の結果はまた MWCNT の暴露はいくつ かの疾患に関連するシ グナル伝達の変換経路 の修正を引き起こすこ とを示している。 これらの発見を踏まえて 肺の腫瘍とまたは中皮 腫の可能な誘発を観測 するため MWCNT の長期 の吸入研究が必要とさ れている。

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調整法/試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
26	Y. Morimoto, M. Hirohashi, A. Ogami, T. Oyabu,, T. Myojo, M. Todoroki, M. Yamamoto, M. Hashiba,, Y. Mizuguchi, B W. Lee, E. Kuroda, M. Shimada, W-N. Wang, K. Yamamoto, K. Fujita, S. Endoh, K. Uchida, N. Kobayashi, K. Mizuno, M. Inada, H. Tao, T. Nakazato, J. Nakanishi, I. Tanaka Nanotoxicolog y. 2011 Jun 29. [Epub ahead of print]	Pulmonary toxicity of well-dispersed multi-wall carbon nanotubes following inhalation and intra- tracheal instillation (吸入と気管内 注入による高度 に分散した多層 カーボンナノチ ューブの肺毒 性)	●対象物質 ・種類 MWCNT ・入手先 Nikkiso Co., Ltd.(日本) ・製造法 接触化学気相蒸着法 ・特性 *バルク MWCNT 直径(幾何平均値)44 nm BET 表面積 69m ² /g D/G 比 0.078 25.6 nm ピークでの半値幅 1.01 nm 金属含有量 Li, Al, Ca, Fe, Cd 夫々0.5, 80, 176, 53, 16 ppm *溶液中分散 MWCNT 直径(幾何平均値)48 nm 平均長さ 0.94 μm 最小最大長さ 0.22, 8.91μm D/G 比 0.174 25.6 nm ピークでの半値幅 0.93 nm *暴露器内での MWCNT エアロゾ ル 直径(幾何平均値)63 nm 平均長さ 1.1 μm 重量濃度 0.37 mg/m ³ ●試料調整法 MWCNT をフラクトーズと混練し混 練物をボールミルで粉碎後熱水 に浸し、次にろ過とすすぎでフラク トーズを分離し、得られた MWCNT を分散液(Triton X-100 の 0.5 mg/mL 水性懸濁液)中に分散さ せ懸濁液を調整する。ここで得ら	●試験生物 ・種類 Wistar ラット ・性別 雄 ・週齢 8週 ●投与方法 ・気管内注入 * MWCNT 0.2 mg (0.66 mg/kg)ま たは 1 mg (3.3 mg /kg)の MWCNT を 0.05% TritonX を含 む蒸留水中で懸濁さ せ Wistar ラットに 気管内に注入する *Negative control 群 0.05% Triton X を含 有する蒸留水を 気管内に注入 ・吸入 気管内注入法で作成 された MW- CNT 懸濁 液を噴霧器で処理し てエアロゾルを作成し 暴露チャンバー内で Wistar ラットに全身 暴露で吸入させる ●暴露関連期間 ・気管内注入法 単回暴露 暴露後観 察期間 3 日、1 週 間、1 カ月、3 カ月、6 カ月で解剖 ・吸入法	●気管内注入法 ・BALF 中の全細胞数と ALP 放出 * MWCNT 0.2 と 1mg 暴露後観察期間 3 日で全細胞数著しく増加。 * 好中球数 MWCNT 1mg 暴露後 3 日と 1 カ月で著しく増加。0.2 mg 暴露後観察期間 3 日で過渡的に増加。 *ALP MWCNT 1mg 暴露後観察期間 1 週間、3 カ月で著しく増加。 0.2 mg 暴露後観察期間 3 日、3 カ月で著しく増加。 ・肺中の CINC 濃度と BALF 中の MPO 濃度 *肺組織中の CINC-1 濃度: MWCNT 1mg 暴露後観察期間 3 日~3 カ月 Negative control に比較して一貫して増加。0.2 mg、暴露後 3 日で一時増加。 *CINC-2 濃度: MWCNT 1mg 暴露後観察期間 1 カ月、3 カ月で著し く増加。0.2 mg では顕著な増加はみられない。 *CINC-3 濃度 MWCNT 0.2 および 1mg では暴露後観察期間、全 時間にわたって顕著な増加はみられない。 * MPO 濃度: MWCNT 1mg 暴露後観察期間 3 日、1 カ月 negative control に比較して著しく増加。0.2 mg、暴露後 3 日、1 カ月、3 カ月 で著しく増加。 ・肺の組織病理学的変化 1mg の MWCNT 暴露の場合好中球、好酸球と肺泡マクロファージ が肺泡管と肺泡スペースから終端細気管支に連続して侵入してい る。この侵入程度は観察期間中時間が経過するにつれて減少す るが、少なくとも 6 カ月間続く。3 カ月と 6 カ月では侵入するのは主 に肺泡マクロファージによってであるが好中球と好酸球は殆ど観 察されていない。小さい肉芽腫性病変と過渡的なコラーゲン沈着 が見られた。0.2mg の MWCNT 暴露の場合肉芽腫性病変は見られ ない。僅かなまた過渡的な炎症細胞の侵入が観察されている。 ・TEM による肺泡マクロファージの形態学特性 肺泡マクロファージ内では MWCNT がファゴリリソーム(食泡とリソ ームの融合した小胞)中に存在しており、この傾向は MW- CNT 1mg の暴露時に特に著しい。いくつかの MWCNT の凝集体がファゴリ リソーム内に、いくつかの MWCNT が独立分離して存在している。高 濃度の暴露の場合を含んで MWCNT は核細胞や細胞小器官内に	●高度に分散 した MWCNT の暴露により 炎症も含め肺 症状を引き起 こす。 ●気管内注入 法では高濃度 暴露時には持 続的な肺炎症 と CINC-1 の 発現が確認さ れ、低濃度暴 露では一時的 な肺炎症が起 るに過ぎない。 ●吸入法では 一時的且つ最 小限の肺炎症 と CINC- 1~3 の発現が起る ことが認めら れた。 ●吸入法暴露 は肺中に比較 的少量の MWCNT を配 送する。従っ て気管内注入 法に比較して 僅かな肺炎症 反応の発生が

		<p>れた MWCNT 懸濁液は気管内注入試験と吸入法のためのエアロゾル化に用いられる。</p> <p>●Control</p> <p>・気管内注入法 Negative control 蒸留水中に 0.05% Triton X 添加</p> <p>・吸入法 Triton X 混入(濃度 0.08 mg/m³)</p> <p>●試験用量</p> <p>・気管内注入法 MWCNT 0.2 mg (0.66 mg/kg)または 1 mg (3.3 mg/kg)</p> <p>・吸入法 MWCNT 0.37 mg/m³ エアロゾル (Triton X 0.47 mg/m³ 混入)</p> <p>●試験条件に用いた変数と変量</p> <p>・気管内注入法 MWCNT の暴露後観察期間、暴露量、Control</p> <p>・吸入法 比較した生物(無暴露生物、Triton X 暴露生物、MWCNT、暴露生物)、MWCNT の暴露後観察期間</p>	<p>暴露期間 6 時間/日 5 日/週 4 週間、暴露後観察期間 3 日、1 カ月、3 カ月で解剖</p> <p>●試験方法</p> <p>・プロテイン濃度 BCA Protein Assay Kit 使用</p> <p>・ケモカイン濃度 Quantikine Rat 使用</p> <p>・BALF 上澄み液内放出 ALP と MPO の測定 LabAssayTM ALP と Rat MPO ELISA Kit 使用</p> <p>・肺の組織病理学的変化 光学顕微鏡使用</p> <p>・肺胞マクロファージの特性 TEM 使用</p>	<p>は存在していない。内部および多層構造が保持されており、分解は観察されていない。</p> <p>●吸入法</p> <p>・BALF 中の全細胞数と ALP 放出</p> <p>*無暴露群、Triton 暴露群と MWCNT 暴露群間では全細胞数には差はなかった。</p> <p>*MWCNT 群では BALF 中の ALP 放出は全暴露後観察期間にわたって著しい増加は起っていない。</p> <p>・肺中の CINC 濃度と BALF 中の MPO 濃度</p> <p>*肺組織中の CINC-1 濃度: 暴露後観察期間 3 日で MWCNT 暴露群中の CINC-1 濃度は無暴露群に比較して CINC-1 濃度は著しく増加した。Triton 暴露群では暴露後観察期間 3 日と 1 カ月で CINC-1 濃度は著しく減少し、無暴露群の暴露後観察期間 3 カ月のレベルに接近する。</p> <p>* CINC-2 濃度: MWCNT 暴露群では暴露後 3 日での無暴露群の濃度に比較して著しく増加する。</p> <p>*肺組織中の CINC-3 濃度: MWCNT 暴露群は暴露後観察期間 3 日での無暴露群の濃度に比較し顕著且つ一時的な増加を示した。</p> <p>* MPO 濃度: MWCNT 暴露群は暴露後観察期間 3 日での無暴露群の濃度に比較し著しい増加を示した。</p> <p>・肺の組織病理学的変化</p> <p>一つの MWCNT 暴露群では観察期間中肺胞スペース内への好中球の侵入、肉芽腫性病変や内質コラーゲンの沈着は観察されなかった。ごく少量であるが MWCNT を摂取した肺胞マクロファージが確認されている。Triton 暴露群と無暴露群に対しては実質的には同一の結果が得られ全観察期間異常なことは観察されていない。</p> <p>・TEM による肺胞マクロファージの形態学的特性</p> <p>肺胞マクロファージでは MWCNT がファゴリリソーム内に見られる。いくつかの MWCNT は凝集し、またいくつかは独立分離している。MWCNT は細胞核と細胞小器官には見られない。</p>	<p>確認された。</p> <p>●気管内注入法と吸入法の暴露では好中球性の炎症を引き起こす可能性がある。</p>
--	--	--	--	--	---

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調整法/試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
27	A. Erdely, A. Liston, R. Salmen-Muniz, T. Hulderman, S-H. Young, P. C. Zeidler-Erdely, V. Gastranova, P.P. Simeonova Journal of Occupational & Environmental Medicine. 53 , S80- S86 (2011).	Identification of systemic markers from a pulmonary carbon nanotube exposure (肺のカーボ ンナノチュー ブ暴露からの 全身性マーカ ーの識別)	●対象物質 ・MWCNT *種類 MWCNT-7 *入手先 Mitsui Company(日本) *特性 平均直径 49 nm:長さ 3.9 μm: 鉄含量 0.27% ・SWCNT *入手先 Carbon Nanotechnology, Inc. (U.S.A.) *特性 直径 0.1 nm:長さ 1 μm: 鉄含量 8.8% ●試料調整法 MWCNT または SWCNT を分散媒 体(DM:0.6 mg/mL 血清アルブミ ン、0.01 mg/ mL 1,2- dipalmitoy-sn-glycero-3 -phosphocholine を含むリン酸塩緩 衝液)中に分散させる。 ●試験用量 MWCNT または SWCNT 40μg ●Control 分散媒体(DM) 0.6 mg/mL 血清アルブミン、0.01 mg/ mL 1,2- dipalmitoy-sn -glycero-3-pho-sp-hocholine を 含むリン酸塩緩衝液	●試験生物 ・種類 C57BL/6 マウス ・性別 雄と雌 ・平均週齢 10 週 ・入手先 Jackson Laboratory (U.S.A.) ●投与方法 MWCN T または SWCNT の分散液を マウスに咽頭吸引さ せる。 ●期間 24 時間、7 日、28 日 ●試験方法 ・血液と気管支洗浄細 胞の測定 フローサイトメリー ・遺伝子発現変化の測 定 TaqMan array profile 利用 ・血清抗原測定 RodentMap v2.0 使用 ・PAI-1 レベル ELISA 使用 ・プロテオミクスとその 解析 Isobaric Tags for Relative and Absolu- te Quantitation technology 利用	●24 時間時点で C 反応性タンパク、ハプトグロビン、血 清アミロイド P を含む急性期プロテインのレベルは血清 中では向上した。更なる解析は肝臓中では血清アミロ イド A1 (SAA-1)、SAP とハプトグロビン遺伝子発現は著 しく上昇を示しており、これは急性期反応を裏つけてい る。更に 24 時間時点では CCL7 やコロニー刺激因子1 (CSF1-マクロファージ)のようなマクロファージの活性化 や健康回復に関連するプロテイン、好中球やリンパ球 化学誘引物質、CXCL2 や lymphotactine は MWCNT の 暴露により減少した。プラスミノゲン活性体抑制剤 (PAI-1)の原形質レベルは CN- T の 4 時間暴露では上 昇を示した(Erdely ら 2009 に発表)が 24 時間暴露では 引き続き上昇する。 24 時間暴露では MMP-9 レベルは MWCNT での Control レベルに戻っている。TIMP-1 では MWCNT およ び SWCNT 暴露で上昇している。MWCNT 暴露では 4 と 24 時間暴露では MMP-9 と TIMP-1 ならびにこれらの比 に関しては著しい時間依存上昇が見られる。 ●大動脈遺伝子発現レベルは 4 時間暴露の場合上昇 したが 24 時間暴露の場合は低下するかベースラインに 戻っている。MWCNT の 24 時間暴露では MT-1 と Hif-3α のレベルは上昇したままであり、TIMP-4 では SWCNT の 4 および 24 時間両暴露でレベルは上昇し た。MWCNT の 24 時間暴露では 4 時間暴露に比べて TIMP-4 の更なるレベルの上昇が確認された。24 時間 暴露での心臓と肝臓からの遺伝子表現の解析は 4 時 間暴露で上昇した遺伝子表現レベルからは低下を示し た。 ●分離した全血液細胞 RNA(リポ核酸)から採取した以 前のデータ(Erdely ら 2009 に発表)は MWCNT の 4 時 間暴露ではいくつかのストレス反応と炎症関連の遺伝 子は増加したことを示した。今回の 24 時間暴露では約 100 種の遺伝子では増加は起っていない。血液格差の	MWCNT および SWCNT に対する 暴露は測定可能 な全身炎症性 反応をもたらす。 初期の影響は血 液細胞中に主要 なサトカインと炎 症遺伝子発現の 血清レベルの上昇 を含んでいる。こ れに続いて初期の 炎症マーカーの減 少と予想された急 性期反応が起る。 暴露 24 時間以上 では一貫性のある 好酸球性応答と免 疫活性に関連する 一連のプロテイン が明白となる。肺 の CNT 暴露の評 価値測定を示す既 存の文献と充分関 係しているマーカ ーは主として有害 な心臓血管の影響 と関連してい る。 しかしここではマ ーカークの 特異性についての 研究が欠けてい

				<p>解析が全ての時間点で行なわれたが一貫した特長は好酸球での増加である。この増加は 24 時間暴露から 28 日暴露まで継続し、7 日暴露の場合、増加は最も顕著であった。BAL 中では増加した好酸球は 24 時間暴露にみられ、これは血液好酸球中での初期の低下を説明することが出来た。MWCNT の 28 日暴露では BAL 中の好酸球は引き続き増加下し、他の細胞形に関しては 24 時間暴露で全リンパ球と単球では著しい低下が見られたが、3 日後にはもとのレベルに戻っている。血液好中球は雄で 4 時間、雌では 3 日と 7 日暴露時で増加した。</p> <p>●SWCNT と MWCNT とを使用した 4 時間と 24 時間暴露では肺の遺伝子表現変化を比較した。4 時間暴露では著しい炎症が確認された。MWCNT では SWCNT の場合と比較して 4 時間の強烈な反応は 24 時間まで保持された。マクロファージの機能に関連するいくつかの遺伝子は 4 時間暴露に比較して 24 時間時では増加した。</p> <p>マクロファージ依存の遺伝子表現は 4 時間と 28 日の場合と比較して 7 日暴露の場合ずっと卓越している。LDH 活性は MWCNT と SWCNT の暴露に対して時間依存的に著しく増加した。</p> <p>●暴露 28 日までには主要な炎症血清プロテイン類、PAI-I と血液遺伝子発現はベースラインに戻った。血清のプロテオミック解析は炎症と本質的な免疫応答(補体 C3、アポリポタンパク質 A-I と A-II、ヘモグロビンサブユニット(α、β-1、α-2-マクログロブリン(A2M)、serotransferrin、肝臓カルボキシルエステラーゼ N(LCN))に関連する急性期プロテインレベルの上昇を示した。</p>	<p>る。多くのマーカー(IL-6、急性期プロテイン類、PAI-I)他の肺暴露からは簡単には分離されないであろう。</p>
--	--	--	--	--	---

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調整法/試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
28	R.R. Mercer, A.F. Hubbs, J.F. Scabillon, L.Wang, L.A. Battelli, S. Friend, V. Gastranova, D. W. Porter Particle and Fibre Toxicology. 8, 21 (2011)	Pulmonary fibrotic response to aspiration of multi-walled carbon nanotubes (多層カーボンナノ チューブの吸引に よる肺線維症反 応)	●対象物質 ・Multi-walled carbon nanotube *入手先 Mitsui&Company *混入微量金属 0.78%(主混入成分 Na 0.41%; Fe 0.32%) *寸法 分散媒中で懸濁状態の MWCNT(走査型電子顕微鏡 使 用)長さ中央値 3.86 μm ; 数平均 直径 49 \pm 13.4 nm *BET 法平均表面積 26 m ² /g ・Single-walled carbon nanotube *寸法 直径 1~4 nm その他詳細 Mercer R.R. et al. Am. J., Physiol. Lung Cell Mol. Physiol., 294, L87-L97 (2008) 参 照のこと ・コントロール 下記の懸濁溶媒使用 *懸濁溶媒 Ca ⁺² とMg ⁺² リン酸塩— 緩衝生理食塩水 (PBS) pH 7.4、 補助物質 D-グルコース 5.5 mM、マウス血清アルブミン 0.6 mg/ml、DPPC(1,2 dipalmitoyl-sn- glycero-3- phosphocholine) 0.01 mg/ml を含 む ●試料調整法 懸濁溶媒を使用し てMWCNTの懸濁液作成 ●試験用量 暴露量 10, 20, 40, 80 μg /マウス	●試験生物 C57BL/6J マウス ・7 週齢 ・雄 ・体重 *MWCNT 暴露量 80 μg のグループ 1日 21.1 \pm .2g 7日 22.5 \pm .8g 28日 23.5 \pm .5g 56日 26.5 \pm .8 g *分散媒暴露グループ 1日 21.9 \pm 7g 56日 26.9 \pm 7g ●投与方法 コントロールとして懸濁 溶媒 (PBS) または MWCNTのPBS懸濁液 を咽頭吸引により投与 する ●暴露期間 1, 7, 28, 56 日 ●試験方法 ・肺組織の観察 FESEM、暗視野顕微鏡 法と光学顕微鏡法使 用 ・連結組織反応(コラー ゲン組織) Sirius Red 染色法 使用	●暴露後 56 日では MWCNT の肺胞マク ロファージ、肺胞組織および肉芽腫性病変 部での負荷は夫々 68.7 \pm 3.9, 7.5 \pm 1.9 および 22.0 \pm 5.1%である。 ●胸膜下組織が MWCNT の肺負荷の 1.6% を含んでいる。 ●気道には咽頭吸引後 1 時間および 1 日 後では MWCNT が存在するが、7, 28 また は 56 日後では存在しない。 ●肺胞間質の結合組織の厚みは暴露日 数に依存して次第に増加する。暴露量 80 μg の場合、暴露後 1, 7, 28 および 56 日で厚みは夫々 0.12 \pm 0.01, 0.12 \pm 0.01, 0.16 \pm 0.01 および 0.19 \pm 0.01 μm であ った。 ●肺胞隔膜の結合組織の平均厚みは暴 露日数 56 日でコントロール暴露と MWCNT 暴露量 10, 20, 40, 80 μg の場合夫々 0.11 \pm 0.01, 0.14 \pm 0.02, 0.14 \pm 0.01, 0.16 \pm 0.01 および 0.19 \pm 0.01 μm であ った。 ●MWCNT では肺胞間質のコラーゲン含 量の増加は暴露時間および暴露量依存し て増加する。 ●SWCNT は MWCNT に比較してより顕著 な間質線維形成反応を示す。暴露量 SWCNT 10 μg 、MWCNT 80 μg 暴露期 間 28 日で肺胞間質結合組織の厚みのコ ントロール暴露基準増加感度は SWCNT では 0.11 $\mu\text{m}/\mu\text{g}$ に対し MWCNT では 0.013 $\mu\text{m}/\mu\text{g}$ 。	●MWCNT を肺に暴露した場 合、MWCNT の肺内分布なら びに肺胞間質反応に対する 暴露量と暴露時間の相関を 究明した。 ●MWCNT 肺負荷の大部分 は暴露の初期にもまた長期 的にも肺胞マクロファージが 占める。肺胞隔壁にその約 8%が配送される。胸膜下組 織に対しては比較的少ない が潜在的には重篤な負荷で ある。 ●肺胞組織に送られる肺負 荷は比較的 low 率ではあるが 肺胞隔膜の結合組織の平均 厚さはコントロール暴露の場 合と比較して著しく増大して いる。 ●MWCNT は肺の肺胞組織 で進行性線維症を引き起こ す可能性がある。 ●FESEM と暗視野顕微鏡検 査によれば間質腔に侵入し た SWCNT と MWCNT 凝集体 のサイズは同程度である。 ●SWCNT と MWCNT の肺胞 間質反応には表面反応が関 与していると考えられる。

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調整法/試験用量	試験生物/投与方法 期間/試験方法	試験結果	結論
29	C. Ronzani, J.L. Vonesch, C.Spiegelhalter L.Lebeau, F. Pons Arch Toxicology, 86, pp 137-149 (2011).	Lung deposition and toxicological responses evoked by multi-walled carbon nanotubes dispersed in a synthetic lung surfactant in the mouse (マウスでの 肺沈着と一種 の合成肺界面 活性剤中に分 散させた多層 カーボンナノ チューブによ り誘発した毒 性反応)	●対象物質 ・種類 MWCNT 入手先 Arkema 社(フランス) ・特性 *平均凝集サイズ 200~500 μm *炭素含量 92.75% *フリー無定形炭素 検出できず *金属含有量 Al 2.40%,Fe 2.21 %,他金属<0.1% *壁数 5~15 *平均外径 10~15 nm *長さ 0.10~10 μm *エンドトキシン<0.0005EU / mg ・合成法 化学蒸着法 ●試験用量 単回および反復投与 1.5, 6.25, 25 μg ●試料調整法 ・肺界面活性剤 DPPC,PG,Chol と BSA を (70:10:10:10% 重量比)でクロロホルム-メタノール(9:1)に溶解し、 溶媒を蒸発後、残渣を 145mM NaCl を含む 10mMH- EPES 緩衝 液中に DPPC 1 mg/ml の最終濃 度で懸濁させ、得られた懸濁液の 超音波処理を行なう。 ・MWCNT 分散用媒体 比較のため使用する分散媒は食 塩水 (0.9%NaCl) や 0.1% DPPC,0.5% BSA,1%Pluronic® F68, や 1%sodium dodecyl sulfate (SDS),を含有する食塩水	●試験生物 ・種類 BALB/c マウス ・購入先 Charles River Laboratories(フランス) ・性別 雄 ・週齢 9週 ●投与方法と期間 麻酔適用下鼻腔内注 入により肺内に投与 単回投与 投与 24 時 間後使用 反復投与 0,7,14 日に 投与し 21 日に使用 ●試験方法 ・MWCNT の分散特性 肉眼観察、光学顕微 鏡、動的光散乱法、 TEM 使用 ・界面活性剤で分散し た MWCNT のマウス肺 中の沈着状況 組織 構造解析、TEM、光学 顕微鏡 ・界面活性剤 MWCN- T に应答する肺炎症 光学顕微鏡 ・界面活性剤 MWCN- T に暴露されたマウスの 肺組織の病理組織学 的検討 光学顕微鏡	●合成界面活性剤中での MWCNT の分散 光学顕微鏡で観察によれば MWCNT は界面活性剤中では BSA、Pluronic® F68 または SDS の使用の場合と同様に分散し ている。これに対して分散液が食塩水のみあるいは DPPC を含 有した食塩水の場合は分散は起らない。いずれの場合も MWC- NT の粗い凝集が発生している。合成界面活性剤と BSA では凝 集体のサイズは SDS と Pluronic® F68 の場合に比べて小さい。 界面活性剤と BSA の使用時に DLS で検討した結果、界面活性 剤では多分散性を示し平均サイズは 150 nm と 500 nm であり、 BSA の場合は固体群の単一平均粒径は 1000 nm である。TEM による検討では界面活性剤中に分散した MWCNT では束状体を 示した。BSA では MWCNT は鞘により囲まれており、界面活性剤 の場合と比較してかなり大きなまた高密度の束を形成している。 24 時間後の観察では界面活性剤使用の際 MWCNT は安定して おり BSA では沈降している。以上より界面活性剤は良好な分散 剤と考えられる。 ●マウス気道での界面活性剤 MWCNT の沈着 単回ならびに反復投与したマウスの組織と細胞レベルの沈着状 況を検討した。マウスに 6.25 μg の界面活性剤 MWCNT を投与 し、単回投与では 24 時間後、反復投与では 7 日後に BALF と肺 組織を採取し、組織学的検討ならびに TEM 解析を実施。肺組織 部分の組織学的解析では界面活性剤 MWCNT が分散している ことを確認している。単回および反復投与では MWCNT による 閉塞は起っていない。両投与後取得した BALF 中より得た細胞 の顕微鏡観察では MWCNT が搭載されたマクロファージが存在 している。両投与で繊毛の生育した気道上皮を覆う粘液層内、 気道空腔内に侵入した好中球内、また 2 型の肺胞上皮細胞中 に MWCNT が存在していることが確認されている。 ●界面活性剤 MWCNT に应答する肺炎症 マウスに食塩水、界面活性剤または単回および反復投与では 6.25 μg の界面活性剤 MWCNT を投与し、単回および反復投与 時々々 24 時間後、7 日後に BALF を採取し、細胞数を数え、また BALF 中の炎症媒体量を定量化した。単回ならびに反復投与时 で界面活性剤投与時のみ食塩水に比較して BALF の細胞充実	●本研究で作 成した界面活 性剤は多くの 文献に発表さ れている分散 剤と比較して 生体適合性も あり、MWCNT の分散にかな り効果的であ る。この界面 活性剤で分散 された MWCNT を単 回および反復 投与した際、 気道全体にわた って分布 し、また肺胞 マクロファージ と肺胞上皮細胞 中に、また 侵入した好中 球中に観察さ れている。 ●MWCNT を 単回投与した マウスではコ ントロールに 比べて BALF 中に好中球の 侵入と高濃度 の TNF-α、ケ ラチノサイト誘

		<p>・MWCNT の分散液 1 mg の MWCNT を 4ml の肺界面活性剤あるいは他の分散用媒体に添加し超音波処理を行う</p> <p>●Control 上記の MWCNT 分散用媒体</p> <p>DPPC:dipalmitoyl phosphatidylcholine PG:phosphatidylglycerol Chol:cholesterol BSA:bovine serum albumin</p>		<p>度とサイトカイン含有量に変化はなかった。これは界面活性剤の生体適合性によるものと考えられる。MWCNT を反復投与した場合マウス中に好中球と好酸球と同様にマクロファージ数が増加した。界面活性剤に比較して MWCNT の単回投与の場合もこれと同様にマウスの BALF 中で好中球、マクロファージ化学誘引物質(TNF-α, KC, IL-17)のレベルが著しく向上した。</p> <p>●界面活性剤 MWCNT に暴露されたマウスの肺組織の病理組織学的検討</p> <p>合成界面活性剤の単独での単回および反復投与ではマウスの肺には組織病理学的変化を引き起こさない。これに対して 6.25 μg の界面活性剤分散 MWCNT の単回および反復投与したマウスの肺組織の病理組織学的検討は気管支周辺と血管周辺の細胞浸潤の存在を明らかにしており、これで BALF 中に見出された炎症反応を確認した。</p> <p>●界面活性剤分散 MWCNT を投与したマウスの肺組織における気管の再形成</p> <p>界面活性剤分散 MWCNT が気管の再形成を引き起こすかどうかを調べるためマウスに MWCNT の反復投与(1.5, 6.25, 25 μg)を行なった。この MWCNT にマウスを反復暴露した場合界面活性剤と比較して細胞浸潤と BALF 中の KC レベルの向上により特徴づけられる炎症反応を引き起こす。この炎症反応の誘起度は暴露依存である。マウスでは線維形成反応は先ず肺均等質の全溶解性コラーゲンと BALF 中の T- GF-β 1 を定量的に評価し、次に界面活性剤分散 MWCNT に暴露されたマウスでは全溶解性コラーゲンのレベルは暴露依存で向上することが判明した(25 μg の暴露で最高値を示す)。BALF 中の全 TGF-β 1 もまた暴露濃度に依存して上昇した。MW CNT の最高濃度での暴露を行なったマウスでは細気管支と血管の周辺に緩やかなコラーゲンの沈着が認められた。コラーゲンの沈着は肺胞組織や肉芽腫内には確認されなかった。コラーゲンの発見と関連して MWCNT の 25 μg の暴露では肺部での粘膜異常増殖が起っている。</p>	<p>導ケモカイン (KC)とインターロイキン (IL)-17 を示している。</p> <p>●MWCNT の反復投与後には BALF 中のマクロファージ数、KC、TGF-β 1 レベルとコラーゲンの増加と肺組織内の粘液異状増殖が確認された。これらを合わせてここで使用した肺界面活性剤は実験室動物に対する純粋な MWCNT の毒性の影響の研究に役立つ有効な材料である。</p>
--	--	--	--	--	---

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調整法/試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
30	A.K. Patlolla, A.Berry, P.B. Tchounwou Molecular and Cellular Biochemistry, 358, pp 189-199 (2011)	Study of hepatotoxicity and oxidative stress in male Swiss-Webster mice exposed to functionalized multi-walled carbon nanotubes (機能化多層カーボンナノチューブに暴露した雄スイス-Webster マウスの肝臓毒性と酸化ストレスに関する研究)	<p>●対象物質</p> <ul style="list-style-type: none"> ・MWCNT *合成場所 Nano Lab Inc. (U.S.A.) *合成法 接触化学気相蒸着法 *特性 外径 15~30 nm:長さ 15~20 μm:純度 >95% <p>CNT の比表面積 未精製物 41m²/g :精製物 42 m²/g</p> <p>●試料調整法</p> <ul style="list-style-type: none"> ・機能化 MWCNT MWCNT 合成後、アルゴン下で加熱により Fe 不純物抽出、硫酸/硝酸中で還流処理を行ない MWCNT の表面に 2~7wt% の COOH 基が付着した MWCNT を取得する ・MWCNT 分散液 *作成法 MWCNT を 1% の Tween-80 を含む無菌生理食塩水中で懸濁させ超音波処理を行い、さらに超音波液体処理機により分散液とする *サイズ 60 分の超音波処理での長尺物は長さ 12 μm:機能化後では直径 11.5 nm ●Control Negative control 生理食塩水 Positive control カーボンブラック(CB)、0.75 mg/kg ●/試験用量 0.25, 0.5 または 0.75 mg/kg/日 	<p>●試験生物</p> <ul style="list-style-type: none"> ・種類 スイス-Webster マウス ・性別 雄 ・週齢 5~7 ・平均体重 30±2g <p>●投与方法</p> <ul style="list-style-type: none"> ・投与物種類 精製し機能化した MWCNT, Positive control, Negative control ・方法 腹腔内注射 <p>●投与期間 24 時間間隔で 5 日連続</p> <p>●試験方法</p> <ul style="list-style-type: none"> ・肝臓ホモジネート、(均等質)の作成 肝臓を切除後、洗浄、均質化、超音波処理、遠心分離し、上澄み液を取得する ・ROS 検定 DCFH-DA (ROS 蛍光分析用プローブ) 使用 ・ヒドロ過酸化物 LHP 検査法利用 ・ALT (Alanine aminotransferase アラニンアミノ基転移酵素) Reitman らの方法使用 ・AST (Aspartate aminotransferase アスパラギン酸アミノ基転移酵素) 分析法利用 ●ALP (Alkaline phosphatase アルカリホスファターゼ) Kay らの方法利用 	<p>●ROS 精製/機能化 MWCNT を投与した結果コントロール群投与と比較して ROS レベルは数理統計的に有意に上昇。肝臓内の全タンパク質レベルは生理食塩水、CB、MWCNT (0.25, 0.5 または 0.75 mg/kg) の順で 125, 113, 109, 107, 105 mg/g 組織と低下。</p> <p>●ヒドロ過酸化物 肝臓ホモジネート中のヒドロ過酸化物のレベルはコントロール群と比較して数理統計的に有意に上昇した。</p> <p>●ALT マウス漿液中の ALT 活性はコントロール群と比較して数理統計的に有意に上昇した。</p> <p>●AST マウス漿液中の AST 活性は投与量に依存して上昇するが、コントロール群と比較して数理統計的に有意には上昇しない。</p> <p>●ALP マウス漿液中の ALP 活性はコントロール群と比較して数理統計的に有意に上昇した。</p>	<p>●本研究の目的はマウスの腹腔内に精製/機能化 MW- CNT を注入した場合、いろいろな肝臓毒性と酸化的ストレスバイオマーカー (OS, LHP, ALT, AST, ALP と肝臓の組織) に及ぼす MWCNT の影響を検討することである。</p> <p>●カルボキシル基で機能化された MWCNT を暴露した場合コントロール暴露と比較してマウスの体重は減少、活性酸素種 (ROS) を誘発し、ALT、AST と ALP の活性、脂質ヒドロペルオキシドの濃度は向上する。</p> <p>●MWCNT 暴露の肝臓の病理組織学はコントロール暴露と比較して肺組織の変化に顕著な影響を及ぼしていることを示している。</p> <p>●細胞研究結果では精製し機能化した MWCNT は酸化的ストレス機構の活性化によりスイス-Webster マウスの肝臓毒性を引き起こす可能性のあることを示唆している。</p>

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調整法/試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論																																
31	S. Jain, V.S. Thakare, M. Das, C. Godugu, A.K. Jain, R. Mathur, K. Chuttani, A.K. Mishra Chemical Research Toxicology, 24 (11), pp 2028-2039 (2011)	Toxicity of multiwalled carbon nanotubes with end defects critically depends on their functionalization density (末端欠陥を有 する多層カーボ ンナノチューブ の毒性はその 機能化密度に 著しく依存する)	<p>●対象物質</p> <p>・未処理 MWCNT(p-MWCNT) Nanovatec Pvt. Ltd.(U.S.A.)よりの 贈与品。</p> <p>・機能化 MWCNT(f-MWCNT)</p> <p>●試料調整法</p> <p>*p-MWCNT の機能化 p-MWCNT (50 mg)を王水(20ml)中で超音波 法により分散させ解束し、得られ た一様な分散液を攪拌下 (900rpm)で 1,2,4,6,または 8 時間 還流して還流時間の差より表面 酸化度の異なる機能化(カルボキ シル化 f-MWCNT)を取得</p> <p>f-MWCNT の調整</p> <p>酸中の f-MWCNT を希釈後、遠 心分離法で母液より分離し、洗 浄、更にアセトン中に分散させ、 分散液を遠心分離して得られた 固体を乾燥</p> <p>●p-および f-MWCNT の特性</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>酸化時間</th> <th>長さ</th> <th>サイズ</th> <th>置換基密度</th> </tr> <tr> <th>hr</th> <th>μm</th> <th>nm</th> <th>μ mol/mg</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>凝集体</td> <td>凝集体</td> <td>0.00</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>凝集体</td> <td>凝集体</td> <td>2.23</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>1~2</td> <td>516.6</td> <td>2.27</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>.6~2.3</td> <td>423.6</td> <td>3.40</td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>0.3~1</td> <td>272.4</td> <td>6.00</td> </tr> <tr> <td>8</td> <td><1</td> <td>93.26</td> <td>>6.00</td> </tr> </tbody> </table> <p>置換基 COOH</p> <p>●試験用量</p> <p>投与量 p-および f-MWCNT 共に単 回投与 10 mg/ kg</p>	酸化時間	長さ	サイズ	置換基密度	hr	μm	nm	μ mol/mg	0	凝集体	凝集体	0.00	1	凝集体	凝集体	2.23	2	1~2	516.6	2.27	4	.6~2.3	423.6	3.40	6	0.3~1	272.4	6.00	8	<1	93.26	>6.00	<p>●試験生物</p> <p>・スィスマウス</p> <p>・体重~25g</p> <p>●投与方法 尾静脈 注 射を行なう。投 与 に 際 し て は p-MWCNT は 0.1%プロ ニック酸に溶解し、 f-MWCNT は生理食塩 水中に懸濁させる。</p> <p>●暴露期間 7,15,28 日</p> <p>●試験方法</p> <p>・血清生化学パラメータ ーと炎症指数 AST と ALT Accurex,Bi- omedical Pvt. Ltd.社製 (ABPL)キット使用。 TNF-α と IL-6 レベル e-Bio science Inc.社製 キット使用・酸化ストレ スパラメーター MDA 量 TB- ARS の形態で 測定・肝臓中の GS- H レベルと SOD 活性の 測定 ABPL社製分光 光学診断キット使用・肝 臓の組織病理学検査 光学顕微鏡使用・腎臓 毒性パラメーターの測 定 血清アルブミンと BUNレベル ABPL 社製 キット使用</p>	<p>●p-MWCNT のアスペクト比、表面疎水性、金属不 純物含有量いずれも高レベルであり、このためマ ウスに投与した際著しい肝臓毒性と酸化性障害を もたらす。ただ酸化性障害は投与 28 日後に回復す る。</p> <p>●f-MWCNT は短長でまた高表面親水性、高水溶 液分散性であり p-MWCNT に比較して低毒性で良 好な生体適合性を示す。</p> <p>●各種の生化学的パラメーターと炎症指標の精 査と肺の組織病理学的検査により下にその詳細 を示すように機能化度の上昇により MWCNT による 毒性の発生は規則的に減少することが判明した。 特に最短 1 日の機能化で得られる f-MWCNT と p-MWCNT の生化学的パラメーター値と炎症指標 値の差が既に著しい場合が多い。</p> <p>●p-MWCNT の強酸類による 4 時間の還流で得ら れた f-MWCNT は肝臓でわずかながらの蓄積と炎 症を誘起したが、長さの短縮度と機能化度により完 全な親水性と生体適合性が得られた状態にある。</p> <p>●Tc-99m 標識化 MWCNT を静脈注射したマウス の生体内分布の検討結果、肝臓、腎臓、脾臓およ び肺など細網内皮系 (RES) 器官からのクリアラン ス度は明らかに MWCNT の機能化密度に左右され る。</p> <p>●十分に分散した短長(<500 nm)で高酸化度(表面 カルボキシル密度>3 μ mol/mg)の MWCNT は RES 器官内には滞留せず明確な腎臓毒性を誘起するこ となく腎臓排出通路を経て全身循環系から迅速に 除去される。大寸法でまた低機能化度の p-と f-MWCNT は腎臓系の排出経路を通らず胆管經由 糞内に排泄される。</p>	<p>●色々な毒性パラメーター の詳細な解析結果は MWCNT による毒性の発生 は決定的に機能化密度に 依存する。表面のカルボキ シル基の密度が向上する と毒性は低下する。</p> <p>●p-MWCNT を強酸で 4 時間の還流で達成できる 短長化度と機能化度により CNT は完全な親水性なら びに生物適合性を示し、ま た最小量の組織集積と炎 症を引き起こすに過ぎな い。</p> <p>●4時間酸化した CNT を投 与したマウスは他の投与グ ループのマウスと比較して 最低の毒性レベルを示し た。この時間以上に酸化時 間を延長しても生物適合性 の向上あるいは毒性の低 下の著しい改善は期待で きない。</p> <p>●興味深いことは CNT に より誘起された酸化性損傷 度は機能化密度に依存し ないことである。p-MWCNT と関連している金属不純物 が原因で p-MWCNT により 酸化性ストレスが誘起され た推定される。</p>
酸化時間	長さ	サイズ	置換基密度																																			
hr	μm	nm	μ mol/mg																																			
0	凝集体	凝集体	0.00																																			
1	凝集体	凝集体	2.23																																			
2	1~2	516.6	2.27																																			
4	.6~2.3	423.6	3.40																																			
6	0.3~1	272.4	6.00																																			
8	<1	93.26	>6.00																																			

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調整法/試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
32	M. M. Alloy, A. P. Roberts Ecotoxicology and Environmental Safety, 74 , pp 1839- 1843 (2011)	Effects of suspended multi-walled carbon nanotubes on daphnid growth and reproduction (ミジンコの成 長と繁殖に対 する懸濁多層 カーボンナノ チューブの影 響)	<ul style="list-style-type: none"> ●対象物質 ・MWCNT *購入先 NanoAmor 社(U.S.A.) *原料特性 純度 >.95% 外径 20~30 nm 長さ 0.5~2 μm ・水調整用試薬 *購入先 Fisher Scientific 社(U.S.A.) *試薬名 重炭酸ナトリウム、硫酸カルシウム 二水塩、無水マグネシウム硫酸塩、塩化マ グネシウム *その他 National organic matter(天然有機 物)NOM ・水 *Reconstituted moderately hard water(RHW) *純水 * MilliQ 水 ・天然有機物(NOM) ・MWCN の懸濁液希釈液 NOM に RHW 添加、濃度 15 NOM mg/L ●Control NOM 非含有 RHW NOM 溶液 ●試料調整法 MWCNT 重量測定後、NOM 液と混合し、遠心 分離、超音波処理、NOM 液を加え濃度調整後 NaOH や HCl で pH 調整を行なう ●試験用量 ・成長暴露 4.2 または 8.4 mg/L ・繁殖暴露 *c.dubia: 0.48, 2.38, 4.77 mg/L 7 日 	<ul style="list-style-type: none"> ●試験生物 ミジンコ(c.dubia) オオミジンコ(d.magna) ●投与方法 温度湿度制御室内で ミジンコと試験液とを混 合 ●期間 繁殖試験 c.dubia 7 日 d.magna 21 日 ●試験方法 ・MWCNT 濃度測定 UV-vis 分光法利用 ・MilliQ 水中に懸濁さ れた MWCNT 凝集体 の平均粒径測定 SEM ・NOM 溶液および RHW 中に懸濁された MWCNT 凝集体の平 均粒径測定 DLS ・ζポテンシャル測定 Malvern instrumen- ts Zeta Sizer 使用 ・バイオ(生存、成長繁 殖)検定 EPA 標準法使用 	<ul style="list-style-type: none"> ●MWCNT の凝集体の SEM ならびに DLS によ る平均粒径と ζポテンシャル (懸濁用に SEM では MilliQ 水、DLS では NOM 溶 液使用) pH SEM 径 DLS 径 ζポテンシャル (μm) (nm) (mV) 6 9.2 129.1 -21.7 7 6.5 149.2 -23.3 8 2.3 142.4 -25.8 ●凝集体の平均サイズは pH により変化する。し かし平均サイズの変化はミジンコの成長には影 響を及ぼさない。 ●生存 一例を除いてコントロールと暴露実験の間に有 意差なし ●成長 NOM 溶液中で懸濁させた MWCNT で d.magna を処理した場合その成長は著しく低下した。平均 乾燥重量をコントロールと比較した場合 MWCNT 5 mg /L 濃度では 22%、また 10 mg/L 濃度では 23%減少した。 ●繁殖 MWCNT 暴露はミジンコの繁殖に有害である。暴 露に対して d.magna は c.dubia より敏感である。 c.dubia では MWCNT の濃度が増加する(0.5, 2.5, 5 mg/L)とコントロールと比較して繁殖は顕著 に低下した。また d.magna でも MWCNT の濃度が 増加すると繁殖は顕著に低下した。最低濃度 (0.125 mg/L)ではコントロール値に比べてあまり 変化はない。濃度 0.25, 0.5, 1.0 mg/L ではコント ロール値との差は大である。c.dubia の場合 MWCNT の濃度が同一であれば pH は繁殖に著 しい影響を及ぼす。 	<ul style="list-style-type: none"> ●MWCNT は実験 で使用した暴露濃 度レベルで草食動 物性プランクトン の成長と繁殖に影 響を及ぼす。 ●毒性作用の疑 わしく思われる様 式は摂食抑制で あり、これが栄養 摂取の欠落につな がる。 ●pH の変化は MWCNT 凝集体の サイズ変化を引き 起こすにも係わら ず急性および慢性 試験で観察された 毒性を著しく変え るものではない。 ●毒性作用の形 態とミジンコが餌 にするかもしれない 広範な粒子範 囲が知られている のでおそらく粒径 変化は毒性の発 現に生理学的関 連性はないよう である。

			<p>*d.magna:0.12,0.24,0.48,0.95 mg/L 21 日</p> <p>・急性暴露 pH 6 と pH 8 0:0.4,0.8,1.7, 3.4 mg/L pH 7:0.4,0.8,1.7,3.4,8.4 mg/ L</p> <p>・慢性暴露 * c.dubia:0.4,2.1,4.2 mg/L * d.magna:0.11,0.21,0.84 mg/ L ●pH 6,7,8</p>			
--	--	--	--	--	--	--

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調整法/試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
33	X. Wang, P. Katwa, R. Podila, P. Chen, P.C. Ke, A.M. Rao, D.M. Walters, C.J. Wingard, J.M. Brown Particle and Fibre Toxicology. 8, 24 (2011)	Multi-walled carbon nanotube instillation impairs pulmonary function in C57BL/6 mice (多層カーボ ンナノチュー ブの注入によ る 57BL/6 マ ウスの肺機能 の低下)	●対象物質 ・Multi-walled carbon nanotube *入手先 NanoTech Labs, Inc(U.S.A) *純度(熱重量測定による)~5 wt%の Fe を含有する *寸法(電子顕微鏡使用)長さ 数 μm ; 直径 2 峰性分布を示 し、ピーク位置~12.5 および 25 nm * BET 法表面積 $113.103\text{m}^2/\text{g}$ * BJH 法細孔容積 $0.688\text{m}^2/\text{g}$ *水力学的径 10%界面活性剤 添加生理食塩水の MWCNT 懸濁液使用 2 主ピーク 200±50 nm と 1000±150 nm を示す *上記懸濁液のゼータポテンシ ヤル-44.6 mV 極めて安 定したコロイド状態にある ・コントロール 10%の界面活性剤 を含有した生理食塩水 ●試料調整法 MWCNT を濃度 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ で 10%界面活性剤を 含有する生理食塩水中(コント ロール液)に分散し、混合液を 超音波処理法により攪拌して 懸濁液を得る ●試験用量 1,2 または 4 mg/kg マウス	●試験生物 C57BL/6 マウス ・9~10 週齢 ・雄 ・平均体重 $27.4\pm 0.58\text{g}$ ●投与方法 コントロールとして懸濁溶媒 (PBS)または MWCNT の PBS 懸濁液を咽頭吸引により投 与する ●暴露期間 30 日 ●試験方法 ・C57BL/6 マウスの口腔咽頭 に MWCNT を投与 ・炎症細胞の潜入、コラーゲン 濃度と組織学的検討により 肺炎症と線維症の評価実 施 ・肺機能は FlexiVent system を使用して評価 ・Ccl3、Ccl11、Mmp13 と IL-33 のレベルは RT-PCR と ELISA により測定	●MWCNT はマウスの肺内に炎症と 肉芽腫を誘発する。 ●MWCNT の注入により肺機能は暴 露量に比例して低下する。また肺細胞 (マクロファージ、上皮細胞、好中球、 好酸球、リンパ球)の個体数はコント ロール注入の場合と比較して MWCNT の注入量の増加に伴い増大する。特 に注入量 4 mg/kg 時の各肺細胞体数 の増加率は著しい。 ●MWCNT を投与されたマウスは肺組 織内の炎症細胞浸潤、コラーゲン沈 着、肉芽腫の形成が投与量の増加に 伴い増大することを示した。これは耐 性と組織減衰の増加や肺適応性の減 少によって評価される低下した肺機能 に関連している。 ●MWCNT を肺に暴露した場合サイト カイン(IL-33)とケモカイン(Ccl3 と Ccl11)とによって示される炎症の兆候 と肺内で観察される炎症性と線維性 変化を促進するプロテアーゼ(タンパ ク質分解酵素 Mmp13)の産出を引き 起こす。	●MWCNT の注入により免疫 細胞の潜入とコラーゲン沈着 の増加および肉芽腫反応が 起る。 ●本研究では低下した肺機 能によって見られる有害な肺 再形成のおこる証拠を示して いる。またこれより Ccl3、 Ccl11、Mmp13 と IL-33 の発 現の増加により MWCNT—誘 発肺再形成機構を確認する ことを開始している。 ●本研究結果は MWCNT の 暴露により健康被害が引き 起こされる可能性のあること を強調した。 ●MWCNT の環境や職業暴 露に起因する肺機能の低下 に関連する高いリスクが潜 んでいることを示唆したい。

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調整法/試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
34	J.S.Kim, K.Lee, Y.H.Lee, H.S.Cho, K.H.Kim, K.H.Choi, S.H.Lee, K.S.Song, C.S.Kang, I.J.Yu Arch Toxicology. 85, pp775- 786. (2011)	Aspect ratio has no effect on genotoxicity of multi-wall carbon nanotubes (アスペクト比 は多層カーボ ンナノチュー ブの遺伝毒性 に無影響)	<ul style="list-style-type: none"> ●対象物質 <ul style="list-style-type: none"> ・原料種類 市販 MWCNT, CM-95 ・購入先 Hanwha Nanotech (Incheon, Korea) ・寸法 直径 10~15 nm; 長さ~20µm ・純度 C 95% Fe 約5% ・in vivo および in vitro 毒性試験に使用した MWCNT の寸法 <ul style="list-style-type: none"> *高アスペクト比 MWCNT 直径 10~15 nm; 長さ~10µm *低アスペクト比 MWCNT 直径 10~15 nm; 長さ~150 nm ●試料調整法 <ul style="list-style-type: none"> ・低アスペクト比 MWCNT 全 MWCNT 不純物を除去し、高アスペクト比 MWCNT を強酸で酸化、超音波処理、ろ過、中和、乾燥し低アスペクト比 MWCNT を取得する ・MWCNT 分散液 MWCNT を分散溶媒 (Ca⁺² と Mg⁺² フリーリン酸塩—緩衝生理食塩水 (PBS) pH7.4、補助物質 D-グルコース 5.5 mM、マウス血清アルブミン 0.6 mg/ml、DPPC (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) 0.01 mg/ml を含む) に分散させる。これを MWCNT の DPPC 分散液という。 ●Control <ul style="list-style-type: none"> ・微生物復帰突然変異試験 (Ames 試験) negative, positive 菌株 specific S9-specific control 物質 ・in vitro 染色体異常試験 positive control: マイトマイシン 	<ul style="list-style-type: none"> ●試験生物 <ul style="list-style-type: none"> ・微生物復帰突然変異試験 (Ames 試験) ネズミチフス菌株または大腸菌 ・in vitro 染色体異常試験 チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO-K1 細胞) ・in vivo 細胞小核検定法 *種類 病原菌フリー ICR マウス *性別 雄 *週齢 7 ●投与方法 (in vivo) 腹腔内投与 ●試験方法 <ul style="list-style-type: none"> ・微生物復帰突然変異試験 (Ames 試験) 4 種のネズミチフス菌株または 1 種の大腸菌を培養液に懸濁させ MWCNT の DPPC 分散液、S9 mix、リン酸塩緩衝液を添加。復帰突然変異株コロニー数を決定する ・in vitro 染色体異常試験 CHO-K1 細胞に試験物質を短期間 6 時間、長期間 24 時間暴露。細胞毒性を trypan blue 色素排除試験で決定 ・in vivo 細胞小核試験法 MWCNT を病原菌フリー 	<ul style="list-style-type: none"> ●微生物復帰突然変異試験 高および低アスペクト比 MWCNT による変異性発現の可能性の評価ではこの試験で使用した MWCNT はいずれの暴露レベル、また何れの菌種でも代謝活性系 (S9 mix) の存在下あるいは不在化では細胞毒性を引き起こさなかった。この実験で使用した細菌株に対しても復帰突然変異株コロニーの暴露依存増加はみられなかった。 ●in vitro 染色体異常試験 高アスペクト比 MWCNT で S9 mix (代謝活性系酵素液) 使用せず 24 時間、S9 mix 使用せず 6 時間、S9 mix 使用 6 時間暴露の場合、3.125 ~ 50 µg/ml で細胞成長は暴露に依存して低下した。また 100~200 µg/ml で細胞毒性効果があることが見られた。F-12 媒体中 100 µg/ml とそれ以上の濃度で高アスペクト比では MW-CNT は著しく凝集するため低度の細胞毒性が発生するかまたは細胞毒性が発生しない。成長障害 50% (GI₅₀) に基づく高アスペクト比 MWCNT (GI₅₀=1.294, 12.94, 41.90 µg/ml) では S9 mix 使用せず 24 時間、S9 mix 使用せず 6 時間、S9 mix 使用 6 時間暴露の場合の低アスペクト比 MWCNT (60.20, 40.48, 93.19 µg/ml) より毒性は高い。哺乳類では酸化鉄は細胞成長に対して毒性を引き起こすことはない判断される。CHO-K1 細胞では negative control 群と比較した場合、高および低アスペクト比 MWCNT 処理ではいずれの暴露レベルでも代謝活性のあるなしに拘らず染色体異常を持つ細胞数の著しい増加は見られなかった。S9 mix の存在ならびに非存在で negative control 群と比較した場合、高および低アスペクト比 MWCNT は倍数性あるいは核内倍加を用いた細胞数の増加は起こさなかった。 ●in vivo 細胞小核試験 	<ul style="list-style-type: none"> ●市販の MWCNT の投与で細菌復帰突然変異試験法、in vitro 染色体異常試験法と in vivo 細胞小核検定法による検定では遺伝毒性は起っていない。 ●MWCNT 処理は哺乳動物の細胞増殖と細胞生存能力に悪影響をおよぼす。 ●高アスペクト比 MWCNT は低アスペクト比 MWCNT より毒性は高い。 ●高アスペクト比 MWCNT は直接には遺伝子毒性や代謝活性化媒介遺伝毒性を引き起こさないが遺伝子毒性は間接的に酸化ストレスや炎症を經由して発生するかもしれない

		(mitomycin)C と cyclophosphamide ●試験用量 ・微生物復帰突然変異試験 MWCNT 最高暴露濃度 1000 μ g/plate: 希釈濃度 333, 111, 37, 12 μ g/plate ・in vitro 染色体異常試験 MWCNT 暴露レベル 3.125, 6.25,12.5,25,50,100,200 g/ml ・in vivo 細胞小核検定 12.5,2.5, 50 mg/kg	ICR マウスに腹腔内投与し細胞小核試験実施 ●投与期間 ・微生物復帰突然変異試験 44～48 時間 ・in vitro 染色体異常試験 短期間 S9mix 使用および使用せず 6 時間 長期間 S9mix 使用せず 24 時間 ・in vivo 細胞小核検定 24 時間	MWCNT の in vivo 遺伝毒性効果に対しては MWCNT 処理後明確な影響のあることは見られなかった。MWCNT の暴露によりマウスの著しい体重差は起らなかった。Control と比較した場合 PCE/(PCE +NCE)(PCE polychromati erythrocyte 多染性赤血球:NCE normochromatic erythrocyte 正常赤血球)比は数理統計的に有意な差はない。これは高低アスペクト比 MWCNT が循環するため十分に吸収されないことによるもので、このためマウスの赤血球に対して毒性効果を持たない。小核多染性赤血球(MNPCE)に対しては高低アスペクト比 MWCNT で Control と比較して暴露依存性の著しい増加は見られなかった。解剖結果によれば高低アスペクト比 MWCNT は腹腔内に存在するが、器官や血液内には侵入していない。	
--	--	---	--	--	--

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調整法/試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
35	H.Ali-Boucetta, K.T. Al-Jamal, K.H. Müller, S Li, A.E.Porter A.Eddaoudi, M.Prato, M.Prato, A.Bianco K.Kostarelos Small, 7, pp 3230 -3238 (2011)	Cellular uptake and cytotoxic impact of chemically functionaliz-e d and poly- mer-coated carbon nano- tubes (化学的に機 能化また高分 子物被覆を行 なったカーボ ンナノチュー ブの細胞内へ の摂取と毒性 への影響)	●対象物質 ・精製 MWNT-1 アンモニウム機能 化 MWNT (MWNT-NH ₃ ⁺)の前駆体 *購入先 Nanostructured & Amorphous Materials Inc. (U.S.A) *純度 94% ・精製 MWNT-2 プルロニック 127 被 覆 MWNT の生成に使用した MWNT *購入先 Nanocyl 社(ベルギー) *純度 >95% ・アンモニウム機能化 MWNT (MWNT-NH ₃ ⁺) カルボキシル基を アミド化反応によってアミノ基に転 換して(MWNT- NH ₃ ⁺)を生成する ・プルロニック被覆 MWNT (MWNT:F127 または高分子被覆 MWNT:F127) MWNT を界面活性剤 の性状を持つブロック共重合体プル ロニック127で MWNT の非共有結合 的被覆を行なう・ プルロニック F127 非イオン性の界面活性剤ポリオー ル ●A549 の培養 肺上皮悪性腫瘍 A549 は F12 Ham 媒体(FBS、ペニシリン、ストレプトマ イシン、L-グルタミンで補足)中、 CO ₂ 下で培養 ●試料調整法 ・プルロニック被覆 MWNT (MWNT:F127) MWNT を 1%プルロニック F127 中で 最終濃度 1µg/ml にして分散させ、 30 分間回分式遠心分離をおこなう	●試験生物 肺上皮悪性腫瘍 A549 細胞 ●投与方法(培養方 法) A549 細胞を媒体で希 釈した MWNT- NH ₃ ⁺ ま たは MWNT:F127 分散 体で処理 ●暴露(培養)時間 24 または 48 時間 ●試験方法 ・表面修正 MWNT の分 散度と個別化の検定 TEM 使用 ・A549 細胞内への MWNT の取り込みの検 定 フローサイトメトリ ーと光学顕微鏡の使 用 ・A549 細胞の毒性検定 通常の MTT,LDH, Annexin V-FITC/PI と 改良型 LDH 検定法利 用 ・A549 細胞内の超構 造変化の観察 TEM 使用	●549 細胞内への MWNT の取り込みの検定 MWNT-NH ₃ ⁺ の濃度を増加させて培養した A549 細胞に対してはレーザー光の側面散乱は 暴露量に依存して向上する。一方 MWNT:F127 では 125 µg/ml の最高濃度の際でも側面散乱 は最低の変化を示すに過ぎない。 ●A549 細胞の毒性検定 従来型の MTT 使用では MWNT-NH ₃ ⁺ の濃度が 1.9~125µg/ml 間で増加するに伴って細胞の 生存能力が向上するという誤った結果を示す。 一方 MWNT:F127 では 125 µg/ml で生存能力 は低下する。Annexin V-FITC/PI 使用時では 24 時間、濃度 1.9~125µg/ml 間でアポトーシス または壊死が誘起されないことを示している。 この結果のみでは MWNT の細胞毒性の評価 に対するスクリーニングツールとしての妥当性 を確立することは難しい。 ●従来型の LDH 検査法 従来型の LDH 検査法は細胞損傷に続いて媒 体中に分泌した LDH 量を測定することによって 損傷したあるいは溶解した細胞数を間接的に 決定するものである。この検査法では 2 種の MWNT との培養後の LDH の見かけの放出によ り MWNT によって引き起こされた毒性の兆候を 示している。 ●改良型の LDH 検定法 改良型の LDH 検定法では起りうるいろい ろな障害を避けるために反応媒体から全ての MWNT を完全に排除する処方を取り入れたこ とである。これでは MWNT によって損傷を受 けず初期に溶解した細胞を次に細胞溶解物を沈 殿さすためと遠心分離によって LDH の基質と 共に培養の前にペレット化した CNT を除去す	●最も広範に利用されている 2種の表面が変成された多層 カーボンナノチューブ、アンモ ニウム機能化 MWNT (MWNT-NH ₃ ⁺)とプルロニック 127 被覆 MWNT (MWNT: F127) が試験された。 ●化学的に機能化された MWNT は非共有結合性プル ロニック F127 被覆 MWNT に 比較して肺上皮 A549 細胞中 に著しく多量に取り込まれ る。ここで用いた改良 LDH 検 定法によれば MWNT:F127 では細胞毒性が増加されてい る。 ●本研究結果では他の低信 頼性のあるいは高精度の毒 性評価ツールと直接比較す ることによって改良 LDH 検 定法の有効性が確認された。こ の結果はカーボンナノチュー ブの細胞毒性を検定するた めの選択器機としてこの改良 型 LDH 検定法の信頼性を示 し、またカーボンナノチュー ブの高度の細胞内在化が必ず しも有害性を示すものでもな いことを実証している。

		<p>・ MWNT-NH₃⁺ 5% dextrose 中で分散させる</p> <p>● 試験用量 MWNT-NH₃⁺、MWNT:F127 およびプルロニック F127 0, 7.8, 31.25, 125 μg/ml</p> <p>A549 細胞内の超構造変化の検討の場合</p> <p>MWNT:F127 50μg/ml プルロニック F127 500μg/ml</p> <p>● Control ・ Positive control DOTAP, 10% DEMSO, Cationic liposome</p>		<p>るために遠心分離を行なう。原形版の LDH 検定法では LDH の試薬類の添加の以前に細胞媒体の遠心分離により全ての MWNT の沈降と除去を行っていない。2社から購入した化学的に機能化された MWNT-NH₃⁺ の濃度レベル (1.9~125 μg/ml) で 24 または 48 時間の培養期間後の改良型の LDH 検定結果では細胞毒性は示されなかった。この結果と比較して高分子物被覆 MWNT:F127 での細胞処理では 125 μg/ml 濃度で 24 または 48 時間の培養期間後暴露依存の細胞生存率は夫々 60% と 40% であった。プルロニック F127 ブロック共重合体のみで処理した場合 24 時間後細胞生存率はほぼ 100% で毒性の兆候は示されなかった。しかし最高処理濃度で 48 時間後では細胞生存率はほぼ 60% であった。</p> <p>● A549 細胞内の超構造変化 MWNT-NH₃⁺ の場合高度の細胞内への取り込みが観察されたが、MWNT:F127 処理の時 (50μg/ml) のみミトコンドリア異常が確認された。この場合細胞内のミトコンドリアは肥大したり内側に陥入したり折りたたまれたりしている。プルロニック F127 (500μg/ml) による処理では、MWNT-NH₃⁺ の場合も含めてミトコンドリアの損傷やその他の特徴的な構造の異常は発生していない。A549 細胞のプルロニック 127 被覆 MWNT 処理による細胞毒性は顕著なミトコンドリアの損傷に起因している。</p>	
--	--	--	--	--	--

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調整法/試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
36	M. J. Osmond- McLeod, C. A. Poland, F. Murphy, L. Waddington, H. Morris, S. C. Hawkins, S. Clark, R. Aitken, M. J McCall, K. Donaldson Particle and Fibre Toxicology, 8,15 (2011)	Durability and inflammogenic impact of carbon nanotubes compared with asbestos fibres (アスベスト繊維と 比較したカーボン ナノチューブの耐 久性と炎症誘発性 効果)	●対象物質 ・種類 *Glass wool fibre(X607) *Long fibre amosite (LFA) *Long fibre chrysotile(LFC) *単層カーボンナノチューブ (CNT SW) *多層カーボンナノチューブ (spinnable CNT SPIN) *多層カーボンナノチューブ (long CNTLONG1) *多層カーボンナノチューブ (tangled CNTTANG2) ・入手先 *CNT SW Sigma-Aldrich (U.S.A) *CNT SPIN CSIRO(オーストラリ ア) *CNTLONG1 Mitsui&Co (日本) *CNTTANG2 NanoLab(U.S.A.) ・特性(入手先より提供) 直径(nm)長さ(μm) X607 NA NA LFA NA NA LFC NA NA CNT SW 1~2 0.5~2 CNT SPIN 8~10 200~300 CNTLONG1 40~50 平均 13 CNTTANG2 15 5~20 ●試料調整法/ in vivo および in vivo サンプルを Gambles 溶液中で培 養する(Gambles 溶液は左カラム に記載あり)	●in vivo 試験処理生物(培 養生物) ・種類 C57B1/6 マウス ・性別 雌 ・週齢 8 週 ●in vitro 試験処理液 ・種類 Gambles 溶液 (L当り 7.12gNaCl, 1.95NaHCO3,0.029gCaCl2 H2O,0.148gNa2HPO4,0.079 Na2SO4, .212gMgCl26H2O, 0.118gGlycine,0.152gTrisod ium citrate 2H2O, 0.18g Disodium tartrate2H2O, 0.172gSodiumpruvate,167 μl lactic acid) ●投与方法 ・in vitro 処理 Gambles 溶液にサンプル添 加 ・in vivo 処理 試験サンプルを Gambles 溶 液中に添加し培養した後 C57B1/6 マウスの腹腔内 に注射 ●試験期間 ・in vitro 処理*Gambles 溶液 中より回収した試験サンプ ルの重量変化検討 0,3,6,10,24 週間 *Gambles 溶液中より回収 した試験サンプルの平均 重量、長さ、長さ分布(TEM	●試験サンプルの in vitro 耐久性 ・Gambles 溶液中で処理し後回収された重 量(処理 0 週時 100%とする) 週 0 24 X607 100 37.82 LFA 100 75.43 LFC 100 28.23 CNT SW 100 88.68 CNT SPIN 100 114.18 CNTLONG1 100 70.76 CNTTANG2 100 74.06 ・ Gambles 溶液中で処理し後回収された平 均幅、平均長さ、長さ分布(長さ分布ここ では示さず) 平均幅(nm) 平均長さ(μm) 週 0 10 0 10 X607 3500 2100 123 76 LFA 550 820 34 56 LFC 42 43 10.8 1.9 CNT SW 5 5 3.6 3.2 CNT SPIN 9 14 NAs NAs CNTLONG1 60 63 12.4 11.1 CNTTANG2 10 10 NAs NAs ・ CNTLONG1 の繊維寸法における重量減 量と変化についての 1 時間のバッチ超音 波処理の影響の in vitro 明確化 CNTLONG1 サンプルが 1 時間 Gambles 溶 液中で最初に超音波処理されるかある いはオリジナルの 0 週サンプルを作成した条 件を繰り返し、単に Gambles 溶液中に添 加して、直ちにろ過、乾燥、秤量し、その後 繊維長さを測定した。その結果 1 時間超音 波処理では重量減量は起らず、また平均	●試験に使用した 4 種のカー ボンナノチューブ(CNT) のうち 3 種はモデル生物液 体中に 24 時間処理後では 100%に近い耐久性を示し た。1 種はサンプル中の長 繊維の比率の減少に伴っ て重量は減少した。検討し た 3 種は耐久性があり、従 って 4 番目のサンプルであ る CNTLONG1 で見られる 繊維長の短縮と重量の減 少は全 4 種の CNT にわつ たって一般化することは出 来ない。 ●繊維固有評価法を用い た炎症誘発可能性に関す る試験は in vivo での有害 反応は耐久性とサンプ ル中で離散した長い CNT 群 あるいは CNT 群の繊維形 態の凝集体の存在の両者 に依存することを明らかに した。耐久性があるが密接 に凝集した束体の短い CNT SW はマウス中で最 小の反応を引き起こし、一 方 CNTLONG1 の純粋な、 離散した、長い、薄い繊維 はアスベスト様の応答を引 き起こしたが、この応答は 15 μm より長い繊維比を 軽減した化学処理の後そ

			<p>●試験用量 in vivo 50 μg を C57B1/6 マウスに注射</p> <p>●Control X607、LFA、LFC</p>	<p>測定)0, 10 週間 in vivo 処理</p> <p>*試験サンプルに対する in vivo 炎症誘発性応答 サンプルは 0 および 10 週間 Gambles 溶液中に培養した後、ろ過し、0.5%BSA 食塩中に再懸濁し、おそらく重量 100%を回収し、多分 50 μg の重量を雌 C57B1/6 の腹腔内に注射する。マウスに注入し 24 時間および 7 日後解剖</p> <p>●試験(測定)方法 ・汚染金属の定量化 ICP-MS と ICP-AES 利用 ・エンドキシンレベルの測定 QLC-1000 Chromatogenic LAL kit の利用 ・サンプルの free radical 発生の可能性の評価 EPR 利用 ・XPS 分析 AXIS UltraDLD 分光計利用 ・組織検討 SEM,TEM,LM</p>	<p>長さや長い繊維の比率には統計的な差は見られなかった。</p> <p>いくつかのバイオマーカーはビークルの試験サンプルに対する in vivo 炎症誘発性応答 みで処理されたマウス中でのレベルと比較すると引き上げられたことは知られているが Gambles 溶液中での処理時間に係わらず X607 は 7 日処理のサンプルでは全細胞数の例外を除いて統計的に顕著な炎症応答を引き起こさなかった。実験データは 0 週サンプルを注入したマウスで見られる病原性の同時の軽減がおこると共に CNTLONG1 と LFC では Gambles 溶液中の長期処理でいくらかの重量減少と繊維の短縮が起ることを示している。10 週間培養した LFA では同一の時間点で CNTLONG1 に比較して重量の減少を示しているが、繊維の短縮はなく、また病原性を失っていない。これらの観察はここで使用した実験条件での病原性の減少は重量の減少より長い繊維の比率低下により関連していることを示唆している。</p>	<p>の応答は減少した。これらの発見事項はバイオ耐久性と炎症誘発性が全ての形態の CNT にわたって一貫性のあるものではないことを示す証拠をさらに付け加えるものである。</p>
--	--	--	--	--	--	--

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調整法/試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
37	J. Palomäki, E. Välimäki, J. Sund, M. Vippola, P.A. Clausen, K.A. Jensen, K. Savolainen, S. Matikainen, H. Alenius ACS Nano, 5, pp 6861-6870 (2011)	Long,needle- like carbon nanotubes and asbestos activate the NLRP3 inflammasome through a similar mechanism (長い針状の カーボンナノチ ューブとアスベ ストは同様の機 構で NLRP3 イン フラマゾームを 活性化する)	●対象物質 ・カーボンブラック(CB) *品種 Printex 90 *提供社 Evonik Industries AG (ドイツ) *特性 平均粒径 14 nm; 比表面積 300 m ² /g; 炭素含量~100wt% ・多層カーボンナノチューブ (長い針状の MWCNT) *品種 MWCNT-7 *提供社 Mitsui&Co.(日本) *形状 長い針状 *特性 外径>50 nm; 長さ~13 µm; 炭素含量>99wt%; 残存触媒金属<検出 限界 0.1 wt% ・多層カーボンナノチューブ (短い MWCNT) *品種 Baytubes C150 HP *提供社 Bayer Material Science (ドイツ) *形状 短い *特性 外径 5~20 nm; 長さ 1~10µm; 炭素含量>99wt%; 触媒 Co 含量 <.2wt% ・多層カーボンナノチューブ (長い絡まった MWCNT) *購入先 Cheaptubes Inc. (U.S.A.) *形状 長く絡まっている *特性 外径 8~15 nm; 長さ 10~50µm; 比表 面積 233 m ² /g; 炭素含量>99wt%; 残存触媒 金属(Co, Fe, Ni)全量<0.5wt% ・アスベスト(クロシドライト) *提供社 Pneumoconiosis Research Centre(南 アフリカ)	●試験生物 末梢血単核球細胞(PBMCs)よ り得られる単球とマクロファージ ●投与方法 ・LPS-主要なまたは LPS-主要 でないマクロファージが CB、短 い、長く絡まった、長い針状の MWCNT とアスベストに 6 時間 暴露 ・IL-1α および IL-1β の分泌の 動力学検討時には LPS-主要 なマクロファージが長い針状の MW CNT とアスベストに 3、6、9 時間暴露 ●期間 CB、長い針状の MWCNT、短 い MWCNT、長い絡まった MWCNT、アスベスト暴露時間 6 時間 ●試験方法(6時間) ・長い針状のカーボンナノチ ューブのヒトの初期マクロファージよ りの IL-1β の熟成と分泌の誘 導 ・初代マクロファージによる長い カーボンナノチューブとアスベ ストの摂取 ・長い針状のカーボンナノチ ューブの NLRP3 インフラマゾーム (炎症再成小体)の活性化 ・長い針状のカーボンナノチ ューブの ROS 生成とカテプシン B の 活性化を通しての NLRP3 の活	●本実験では各種のカー ボンナノ物質がヒトの初代 マクロファージ内で炎症性 反応を引き起こすかどうか を検討した。インターロイキ ン(IL) 1-族サイトカインの 分泌を誘発するため物質 の可能性におよぼすサイ ズと形態の影響を比較する ためにカーボンブラック、短 い CNT、長い CNT、もつれ ならびにクロシドライトアス ベストが使用された。実験 結果は長い針状の CNT と アスベストは LPS(リポ多糖 類)で活性化したマクロファ ージから IL-1 β 分泌し た。しかしながら長い針状 の CNT のみ IL-1 α の分 泌を引き起こした。sIRNA 実験は NLRP3 インフラマゾ ーム(炎症再生小体)は長 い針状の CNT とアスベスト が誘起した IL-1 β の分 泌に対して不可欠であるこ を示した。更に CNT が誘 起した NLRP3 インフラマゾ ーム活性は ROS 生成、カ テプシン B の活性、P2X7 受容体ならびに Src と Sry チロシンキナーゼに依存す ることが知られている。これ	●長い針状のカーボンナノ チューブが多重機構による炎症 カスケード反応の強力な活性 剤であることを示唆している。 同様な物質による炎症効果 はナノ物質の形状に依存して いることは明らかである。長 い針状の CNT はアスベストと 同様な特性を共有している が、これらの形態のグラフェ ン基盤物質のすべてで最も 重要な効果を有していた。 ●得られた実験データは NLRP3 インフラマゾーム活 性化がナノ物体によって引き 起こされる有害な健康被害に 対する一つの重要なステップ であることを示している。ナ ノ物質によって誘起される NLRP3 インフラマゾーム活 性化を解析するこの方法は 将来いろいろなナノ物質に対 する迅速な毒性の検討に着 手するにあたり一つの有用な 方法であり、従ってナノ物質 のリスク査定を支援する一 方法として役立つかもしれな い。 ●長い針状の MWCNT がア スベストと同様な方法で NLRP3 インフラマゾームを 活性化することができる。また 長い針状の MWCNT によって

		<p>*特性 平均粒径 180 nm;長さ 4.6μm</p> <p>●試料調整法</p> <p>・単球 得られた粘着した単球 を血清フリーのマクロファージ内で培養を行なう</p> <p>・細胞 マクロファージの分化のため培養を行なう</p> <p>●試験用量</p> <p>CB、長い針状の MWCNT、短い MWCNT、長くてもつれた MWCNT ならびにアスベスト 100 μg/mL</p> <p>●Control</p> <p>Negative control siRNA</p>	<p>性化</p> <p>・長い針状のカーボンナノチューブとアスベストによってもたらされた NLRP3 インフラマソームにおける P2X₇ 受容体の活性化の重要性</p> <p>・硬直した長い針状のカーボンナノチューブ後の NLRP3 インフラマソームの活性化の Src と Syk のチロシンキナーゼ活性化に対する依存性</p>	<p>らの結果は長い針状の物質が有害な健康障害を引き起こすかも知れない機構に関して新規な情報を提供する。更に本研究で使用した技術的手法はナノ物質の将来のリスク査定に有用であるかもしれない。</p>	<p>引き起こされる。また NLRP3 インフラマソームの活性は P2X₇ 受容体、カテプシン B 活性、ROS 生成、Src と Sry チロシンキナーゼに依存することである。</p>
--	--	---	--	--	--

TiO2

No	著者/出典	論文題目 (和訳)	対象物質/試料調整法 /試験用量	試験生物/投与方法 期間/試験方法	試験結果	結論
38	Jiegou Xu, Y. Sagawa, M.Futakuchi, K. Fukamachi, D. B. Alexander, F. Furukawa, Y. Ikarashi, T. Uchino, T. Nishimura A. Morita M. Suzui H. Tsuda Food and Chemical Toxicology 49 1298-1302 (2011)	Lack of promoting effect of titanium dioxide particles on ultraviolet B- initiated Skin carcinogenesis in rats 中波長紫外線によ るラットへの皮膚 がん発生に対し て、二酸化チタン 粒子の促進効果 は見られない	●対象物質 ・TiO2超微粒子(ルチ ル、石原産業) ・コーティングなし ・平均一次粒径 20nm ・Pentalan 408中に、 100mg/mlで懸濁 ・使用前に30分間超 音波で攪拌 ●Pentalan 408中懸濁 粒子の粒度 ・直径:10nm-300µm ・平均:4.967± 0.500µm ・メジアン径: 4.570µm	●ヒトの c-Ha-ras 癌原遺伝子に感染している 遺伝子組換えラット(Hras128 ラット)とその野 生種(10 週齢、総計 80 匹) 群1:20cm の距離から毛を剃った背中 の皮膚にUVB を照射(週 2 回、1 回 7 分 で 10 週間 継続、照射強度 800mJ/cm2) ・その後、屠殺まで 42 週間、週 2 回 TiO2 懸濁 Pentalan 408 液を塗布 (TiO2 濃度 100mg/ml、塗布量 0.5ml) 群2:群1と同様 10 週間 UVB 照射 屠殺まで Pentalan 408 液のみを塗布 群3:最初の 10 週間は UVB 照射なし。 その後、群1と同様 42 週間 TiO2 懸濁 Pentalan 408 液を塗布 ●TiO2浸透アッセイ(in vitro) ・12 穴 LabCyte EPI-MODEL を用いて皮膚 への TiO2 超微粒子の浸透性を評価 ・暴露条件:計 24 穴 48 時間 ・Pentalan 408 43.2µl(8 穴) ・TiO2 懸濁 Pentalan 408 液(100, 200mg/ml 各 8 穴) ●サイトカイン分析 ・週齢 10 の野生型SDラット 5 匹(雄) ・塗布液:含 TiO2(100mg/ml)Pentalan 408 液(0.5ml) ・塗布期間:連続 14 日(1 回/日) ・コントロール:Pentalan 408 液のみ ・評価項目:IL-1α,IL-1β,IL-6, GM-CSF,G-CSF,TNFα,IFNγ, IL-18,MCP1,MIPIα,GRO/KC,VEGF	<皮膚腫瘍の出現率> ・皮膚の乳頭腫:32週から発生 ・出現率:群1と群3とも1/8 ・皮膚腫瘍:Hras128ラットの雌で観察されず (野生種ラットは雄雌とも観察されず) ・眼蓋扁平上皮乳頭腫:UVB暴露(群1と2) の野生種雌ラットで観察する(出現率 群1 で12.5%、群2で14.3%) <ラット皮膚内のTiO2粒子の有無> ・上部角質層:有り ・その下の表皮、真皮、皮下組織:なし ・粒状細胞層のレベルの毛嚢:いくつかあり (それ以下、その周りには観察されず) ・受入チャンバーのチタン量は、ベヒクルの みのグループと比べて有意差なし <ラット皮膚組織のサイトカイン分析> ・TiO2処理は、皮膚のサイトカイン・レベルの 発現に関して、有意な効果なし(対ベヒクル 群)	●TiO2超微粒 子を局所に施 用しても、安 全であり、皮 膚または他の 器官に対する 発癌性はな い。

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調整法/試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
39	B. Jovanović, T. Ji, D. Palić Ecotoxicology and Environmental Safety 74, pp 1518-1525 (2001)	Gene expression of zebrafish embryos exposed to titanium dioxide nanoparticles and hydroxylated fullerenes (二酸化チタンと水 酸化フラレンに 暴露されたゼブラ フィッシュ胚の遺伝 子表現)	●対象物質 ・Nano-TiO ₂ (アナターゼ ナノ粉体) *サイズ <25 nm *純度 金属基準 99.7% *購入先 Sigma-Aldrich Corp. (U.S.A.) ・水酸化フラレン (C ₆₀ (OH) ₂₄) *購入先 Sigma-Aldrich Corp. (U.S.A.) ●試料調整法 Nano-TiO ₂ と水酸化フラレン Hanks Balanced Salt 溶液の懸濁 溶液使用。特性は Nano-TiO ₂ 平均粒径 86 nm: zeta-ポテンシャル -88.7 mV 水酸化フラレン 平均粒径 409 nm: zeta-ポテンシ ヤル -19.1 mV ●試験用量 0.2 mg ゼブラフィッシュ胚に対して Nano-TiO ₂ 、水酸化フラレン、 Control いずれも 10nL、胚中最終 濃度は Nano- TiO ₂ では 8.5 ng/g 体重、水酸化フラレンでは 2 μg /g 体重 ●Control Hanks Balanced Salt 溶液(HBSS)	●試験生物 ・種類 成熟ゼブラフィ シュ ・部位 胚 ・入手先 The Iowa State University (U.S.A.) ●投与方法 Nano-TiO ₂ と水酸化フ ラレンの Hanks Balanced Salt 溶液の 懸濁溶液 を耳胞内に微量注入 する ●期間 胚に投与後 28°Cで 48 時間 ●試験方法 Gene microarray 解析 法利用	無処理の Controlに比較してナノTiO ₂ 処理で は 2380 有意に発現したプローブ(遺伝子産 物)、また水酸化フラレン処理では 313 有 意に発現したプローブが存在する。マイクロ チップ上の全プローブは 15617 であった。生 物学的意義のあるレベルで TiO ₂ 処理では2 倍またはそれ以上の発現低下のある 33 の 異なる遺伝子に関連する 36 発現低下プロ ーブがある。 12の異なる遺伝子に関連するTiO ₂ 処理で は2倍またはそれ以上の発現向上のある 12 プローブが存在する。水酸化フラレンでは 2倍またはそれ以上の発現低下のある 25 の 異なる遺伝子に関連する 28 の発現低下し たプローブと2倍またはそれ以上の発現向 上のある 11 の遺伝子に属するプローブがあ る。TiO ₂ 処理では 25 発現低下遺伝子のうち 22が発現低下しており、一方TiO ₂ 処理とフラ レン処理では 11 発現向上遺伝子の中わ ずか 4 種が発現向上している。発現低下さ れた遺伝子の機能を検査した結果ナノ粒子 処理は 24 時間周期リズム、キナーゼ関連活 性を通しての細胞シグナル伝達、開口分 泌、細胞内移動と免疫反応の生物機能を妨 害する。大抵の発現向上した遺伝子の未知 の機能により、幾つかの遺伝子を塊に集団 化することは可能ではない。しかし免疫系の 規制で 2 個の発現向上遺伝子の関与が免 疫機能に対するナノ粒子処理の可能な影響 を示している。	●ゼブラフィッシュ胚内へのナ ノ粒子の微量注入は Affiy- metrix® 遺伝子マイクロアレイ チップで検出された遺伝子表 現パターンに著しい変化を引 き起こした。ナノ粉体の暴露 により 24 時間周期リズム、細 胞キナーゼ活性、細胞内移 動と免疫反応に関連する遺 伝子に変化が起った。 ●ゼブラフィッシュ胚のモデル は異なるナノ物質はトラン スクリプトーム変化で同様の 抑制型、しかし異なる上方 調節型を持つかもしれないこ を示唆している。

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調整法/試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
40	Veronica Freyre-Fonseca, Norma Laura Delgado-Buenrostro, Emma Berta Gutierrez-Cirlos, Claudia Marissa Calderon-Torres, Tecilli Cabellos-Avelar, Yesennia Sanchez-Perez, Enrique Pinzon, Ismael Torres, Eduardo Molina Jijon, Cecilia Zazueta, Jose Pedraza-Chaverri, Claudia Maria Garcia-Cuellar, Yolanda I. Chirino Toxicology Letters 202 111-119(2011)	Titanium dioxide nanoparticles impair lung mitochondrial function (酸化チタンナノ粒子は、肺ミトコンドリア機能を損なう)	●対象物質 ・TiO ₂ ナノ粒子(Aldrich から購入) ・粒径: 25nm 以下 ・比表面積: 200-220 m ² /g ・融点: 1825° C、 ・密度: 3.9g/ml(25°C) ・嵩密度: 0.04-0.06 g/ml ●暴露量 ・1mg のミトコンドリア・タンパク質を、1,5,10,25,50µg の TiO ₂ ナノ粒子の存在下で培養。	●試験動物 ・ウイスターラット ・体重 220-250g ・肺の重量: 2.125±0.1746g ●試験方法 ・肺からミトコンドリアペレットを作成し、その 1mg を TiO ₂ に暴露(他の 1mg はコントロール)。 ●暴露時間: 1,3,5h ●ミトコンドリア呼吸の評価項目 ・呼吸調節率 RCI(状態Ⅲ呼吸と状態Ⅳ呼吸の酸素摂取量の比率)(状態Ⅲ/状態Ⅳ) ●ミトコンドリアの評価項目 ・質量 ・膜ポテンシャル ・ADP/O 率(加えられた ADP と状態Ⅲ呼吸の間に消費される酸素の比率) ・NADH ・ROS 生成 ・抗酸化剤酵素活性	●RCI は、TiO ₂ 暴露によって減少した。 -コントロールの RCI: 2.25(1h) -TiO ₂ 暴露群の RCI: 1.65(1, 5, 10, 25 µg の平均、1h)、1.15(50 µg、1h) ●ミトコンドリアの質量は、変化は無かった。 ●ミトコンドリア膜ポテンシャルは減少した。 -コントロール: 109±12.32 蛍光発光単位、 -TiO ₂ 曝露群: 67.27±3.579 蛍光発光単位 ●ADP 添加後のミトコンドリア呼吸状態Ⅲは減少した。 -コントロール: 11.89±11.091 nmol O ₂ /mg protein/min -TiO ₂ 曝露群: 7.223±0.9611 nmol O ₂ /mg protein/min -この結果、RCI は 2.251±0.075 から 1.505±0.086 まで 33.11%減少。 ●ミトコンドリア膜ポテンシャルは減少した。 ●NADH の自己蛍光強度に変化はなかった。 -コントロール 0.704±0.0430 -TiO ₂ 曝露群 0.634±0.02 ●ROS 生成は 46.5%増大した。 -オリゴマイシン添加によるロス生成の減少はなかった。 -CCCP 添加により ROS 生成は 28%増大した。 ●抗酸化酵素 GPx の活性度は 14.3%増大した。ただし、これは有意だが重要でない。	●TiO ₂ ナノ粒子への曝露は、ラットの肺から単離したミトコンドリアに対してミトコンドリア膜ポテンシャルの減少、酸素消費量の低下、ADPリン酸エステル化の低下などの機能障害を起こす。 ●これらの変化は、細胞に、細胞表現型における無酸素呼吸を促進する変化と物質代謝における厳しい副効果をもたらすかも知れない。 ●TiO ₂ 曝露による影響をより深く理解し、肺組織の異なる細胞タイプの細胞の応答を分析するためには、更なる研究が必要である。

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調整法/試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
41	N. A. Monteiro-Riviere, K. Wiench, R.Landsiedel, S. Schulte, A. O. Inman, J. E. Riviere Toxicological Sciences ;123(1), 264-280 (2011)	Safety Evaluation of Sunscreen Formulations Containing Titanium Dioxide and Zinc Oxide Nanoparticles in UVB Sunburned Skin: An In Vitro and In Vivo Study (二酸化チタンと酸化亜鉛ナノ粒子を含む日焼け止め製剤の UVB 日焼けした皮膚における安全性評価: in vitro および in vivo 調査)	<p>●対象物質</p> <ul style="list-style-type: none"> ・TiO₂とZnOを含む4つの疎水性および親水性日焼け止め製剤。 ①Cm 630(o/w 製剤[T-Lite SF];10%TiO₂)、 ②Cm 634(w/o 製剤[T-Lite SF];10%TiO₂)、 ③Cm 643(o/w 製剤[Z-COTE HP1];5%ZnO)、 ④Cm 644(o/w 製剤[Z-COTE];5%ZnO)。 <p>・TiO₂,ZnO: BASF, Ludwigshafen, Germany 製の市販品</p> <p>・TiO₂:</p> <ul style="list-style-type: none"> -結晶構造: ルチル、 -結晶粒径: 14-16nm、 -一次粒径 10×50nm -凝集体粒径 200nm -形状: 紡錘形 -比表面積 100m²/g、 -ジメチコン/メチコンコポリマーと酸化アルミニウム三水和物の被覆あり。 <p>・ZnO:</p> <ul style="list-style-type: none"> -一次粒径 140nm -比表面積 12-24m²/g、 -3-エトキシ-カプリル-シランの被覆あり(Cm 644 は被覆なし)。 -形状: 不均一 	<p>●試験生物 (in vivo)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・乳離れしたばかりのヨークシャー・ブタ ・体重: 20-30kg <p>●曝露方法</p> <ul style="list-style-type: none"> ・豚の背中中の皮膚に UV を照射 (UVB: 5mW/cm², UVA : 40mW/cm²) (以下、UVB 照射) ・照射量 (最小紅斑投与量 MED): 40~50mJ/cm² <p>●曝露方法</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ブタの暴露部位を 250μl の各製剤で処理。 ・コントロール3種: ①通常の豚皮 (UVB なし、日焼け止めなし、Hill Top Chamber[®] (HTC)なし) ②UVB 曝露 (日焼け止めなし、乾燥チャンバー)、 ③日焼け止め (HTC 内、UVB なし) ・曝露時間: 48 時間 	<p>●UVB 曝露による日焼け</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ UVB 曝露によってブタの皮膚には、+ 2(24h),+3(48h)の日焼け紅斑を生じた。 ・日焼け細胞は、濃化核 (アポトーシス) と好酸性の細胞質を有していた。 ・通常の豚皮と非曝露 (日焼け止めあり) コントロールは、紅斑を生じなかった。 <p>●光学顕微鏡観察 (In Vivo)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・コントロール皮膚 (UVB なし、日焼け止めなし) は、緻密な角質層を有する通常の表皮と真皮を示した。 ・UVB コントロール皮膚 (UVB あり、日焼け止めなし) の表皮の下層には、細胞内の表皮浮腫、わずかな皮膚の炎症、典型的な日焼け細胞が存在した。 ・TiO₂ は、通常の皮膚と UVB 曝露皮膚の角質層に ZnO より深く浸透していた。 <p>●SEM 観察 (In Vivo)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・Cm 630 処理、UVB 曝露皮膚で、TiO₂ は、皮膚表面の大きな凝集体として確認された。Ti の分離断片は、この凝集体の周辺に見いだされた。 ・TiO₂ は毛の基礎の近くにも存在した。Cm 634 の TiO₂ の凝集体は毛にも存在した。 ・Cm 643 の不均一な ZnO は、UVB 皮膚の表面に分布した。 ・ZnO 凝集体も毛の基礎部と毛に存在した。 ・毛の基礎の近くの皮膚で、ZnO 凝集体中に粒径 15 μm もの ZnO 結晶が確認された。 <p>●TOF-SIM 観察 (In Vivo)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・Cm 630 処理 UVB 曝露皮膚では、Ti は真皮でも観察された。 ・Cm 643 処理 UVB 曝露皮膚では、Zn は角質層と上部表皮に存在した。 	<p>●UVB 日焼けした皮膚は、日焼け止め製剤に存在する TiO₂、ZnO の角質層への浸透をわずかに高めた。</p> <p>●ほとんどの場合、角質層への浸透は、ZnO より TiO₂ の方が大きかった。</p> <p>●通常皮膚と UVB 日焼けした皮膚への日焼け止め製剤の適用は、上皮層の上部に TiO₂ と ZnO の最小の浸透を示唆する。</p> <p>●ただし、これに関する全身的吸入の証拠はない。</p>

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調整法/ 試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
42	Daowen Xiong, Tao Fang, Linpeng Yu, Xiaofeng Sima, Wentao Zhu Science of the Total Environment 409 1444-1452(2011)	Effects of nano-scale TiO ₂ , ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: Acute toxicity, oxidative stress and oxidative damage (TiO ₂ , ZnO の粗 粒子/ナノ粒子の ゼブラフィッシュに 及ぼす影響: 急性 毒性、酸化ストレ ス、酸化損傷)	●対象物質 ・TiO ₂ , ZnO の粗粒子とナノ粒 子プラス ZnSO ₄ ・7H ₂ O ・ナノ粒子: 南京工業大学の ナノ応用研究センターから 購入(表面は非修飾) ・粗粒子: 天津 Guangcheng 化学試薬社から購入。 ・粒径(nm) -TiO ₂ 粗粒子: 1000、ナノ粒 子: 30 -ZnO 粗粒子: 500、 ナノ粒子: 30 ・純度: 99%(TiO ₂ 粗粒子/ナ ノ粒子、ZnO 粗粒子/ナノ粒子 全て)。 ・粗粒子、ナノ粒子とも純粋 中に懸濁して使用(安定化 剤は用いず)。 ・Zn ²⁺ 溶液は、ZnSO ₄ ・7H ₂ O 水溶液を使用 ・懸濁液中ではナノ粒子は凝 集していた。 ・凝集ナノ粒子の粒径 -ZnO: 400-1400nm -TiO ₂ : 200-500nm (ともに、粗粒子の径と同程 度)	●試験生物 ・ゼブラフィッシュ ・日齢: 120 日(成体) ・体重: 0.22±0.05g ●試験方法 ・評価項目: ①死亡率、②酸化ストレス と酸化損傷。 ・暴露濃度(①の場合) -ZnO ナノ粒子、粗粒子、 Zn ²⁺ : 0,2,5,10,30,50mg/l -TiO ₂ ナノ粒子、粗粒子: 0,10,50,100,150, 200,300mg/l ・暴露濃度(②の場合) -ZnO ナノ粒子、粗粒子: 5mg/l、 -TiO ₂ ナノ粒子、粗粒子: 50mg/l ・暴露時間: 96 時間(①、② の場合とも) ・各処理とも自然光処理 (明暴露)と暗所処理(暗暴 露)あり。 ・コントロール: 清浄水 ・酸化ストレスと酸化損傷 は、SOD, CAT 活性, GSH, マ ロンジアルデヒド, タンパク 質カルボニル量で評価。 ・えら細胞に対する酸化作 用は観察で評価。	●ナノ粒子処理で生成する・OH ・TiO ₂ ナノ粒子と ZnO ナノ粒子は、明暴露では・ OH を生成した(粗粒子は生成せず)。 ・TiO ₂ ナノ粒子/粗粒子と ZnO ナノ粒子/粗粒子 とも暗暴露では・OH は生成しなかった。 ●急性毒性 ・TiO ₂ ナノ粒子、ZnO ナノ粒子/粗粒子、Zn ²⁺ は、 用量依存的急性毒性を示した。 ・TiO ₂ 粗粒子は急性毒性を示さなかった。 ●酸化ストレスと組織損傷 ・50mg/lTiO ₂ ナノ粒子は肝臓の SOD 活性を減 少させ、消化管の SOD 活性を増加させた。 ・5mg/lZnO ナノ粒子は、肝臓の SOD 活性を減少 させ、消化管のそれは増大させた。 ・5mg/lZnO 粗粒子は、肝臓と消化管の SOD 活 性を抑制した。 ・5mg/lZnO 微粒子は、消化管の CAT 活性を活 性化した。 ・5mg/lZnO 粗粒子は、消化管の CAT 活性を抑 制した。 ・50mg/lTiO ₂ ナノ粒子、5mg/lZnO ナノ粒子、ZnO 粗粒子処理は、肝臓の GSH 含有量を減少させ た。 ・全ての TiO ₂ 処理で消化管の GSH 濃度は増大 した。 ●えら細胞の形態 ・50mg/lTiO ₂ 粗粒子処理では、正常だった。 ・50mg/lTiO ₂ ナノ粒子は細胞膜損傷、細胞形態 異常、濃化核、細胞の破壊を起した。 ・5mg/lZnO ナノ粒子/粗粒子では、えら細胞の 原形質は収縮/損失していた。 ・5mg/lZnO 粗粒子処理では、えら細胞の核の形 状は異常だった。	●ゼブラフィッシュに対す る TiO ₂ ナノ粒子の急性 毒性は、TiO ₂ 粗粒子より 有意に高い。 ●ZnO ナノ粒子は、ZnO 粗粒子と同程度に毒性 であり。 ●ZnO から放出される Zn ²⁺ は毒性に寄与する。 しかし、それは主要な致 死機序でない。 ●TiO ₂ ナノ粒子によっ て生成される・OH は、え ら組織の細胞膜に直接 酸化損傷を誘起する。 ●金属酸化物ナノ粒子 の毒性が粒径によるもの かどうかを明らかにする ためには、更なる研究が 必要である。

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調整法/ 試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
43	Lyudmila P. Sycheva, Vjacheslav S. Zhurkov, Valentina V. Iurchenko, Natalia O. Daugel-Dauge, Maria A. Kovalenko, Elena K. Krivtsova, Andrey D. Durnev Mutation Research 726 8-14(2011)	Investigation of genotoxic and cytotoxic effects of micro- and nanosized titanium dioxide in six organs of mice in vivo (マウスの6器官に対する二酸化チタンのマイクロ/ナノ粒子の遺伝毒性および細胞毒性に関する in vivo 調査)	●対象物質 ・二酸化チタン(TDM)と二酸化チタンシメチコン(TDN) (Sensient Cosmetic Technologies LCW社製) ・結晶構造: 双方ともアナーゼ ・平均粒径(電顕測定): -TDM: 160±59.4nm、 -TDN: 33.2±16.7nm。 ・使用方法: 蒸留水に分散して使用。 ●投与量: マウスの体重kgあたり、40, 200, 1000mg	●試験動物 ・雄 F1 (CBAxB6) マウス ・体重: 20-25g ●投与期間: 毎日×7日間 ●投与方法: 体重 kg あたり懸濁液 10ml を経口投与。 ・コントロール: 蒸留水 ●評価方法 ・DNA 損傷: アルカリ性コメット・アッセイ。 ・骨髄、脳、肝細胞の懸濁液 (70 µl): 電気泳動法。 ・骨髄小核試験: 多染性赤血球の小核を分析。 ・毒性: 総赤血球中の未熟赤血球の割合で評価 ・前胃と結腸の分析: 上皮細胞の小核、核突出、非定型核、核分裂、前胃の2核細胞、凝結クロマチン、核濃縮を分析。 ・精巣分析: マイクロ有核の細胞、2核細胞、多核細胞、アポトーシス数を分析。 ●核学的分析の評価項目: ①細胞遺伝学的項目(小核、核突出、非定型原子核)、②増殖性(間接核分裂、2核細胞、多核細胞)、③細胞死の指標(アポトーシス、クロマチンの凝結、核濃縮、核破碎、核溶解)。	●TDM の突然変異誘発性と毒性 ・TDM は骨髄細胞で DNA 鎖破損を有意に増加させた(コメット尾部の% Tail DNA が増大)。 ・TDM は肝細胞の% Tail DNA を増大させた。 ・骨髄のマイクロ有核多染性赤血球の頻度は、1000mg/kg bw TDM 処理の場合だけ、多染性赤血球 1000 あたり 6.0 に増加した(コントロールは 3.0)。 ・TDM は、精子の細胞毒性を誘起した(小核は誘起せず)。 ・TDM は、前胃と結腸上皮の分裂指数を対コントロールで 2 倍以上に高めた。 ・40mg/kg bw の TDM 処理は、多核精子の頻度を有意に高めた。 ・1000 mg/kg bw の TDM 処理は、精巣のアポトーシス指標を対コントロールで 2.6 倍高めた。 ●TDN の突然変異誘発性と毒性 ・TDN は骨髄と肝臓で DNA 鎖破損を有意に増加させた。 ・200mg/kg bw TDN は、肝細胞の% Tail DNA 有意に高めた。 ・TDN の細胞障害効果は、前胃と結腸上皮で有意に増加した分裂指数(40-mg/kg bw 投与の場合)と、多核球状精子の頻度の形で明白になった。 ・投与量 200mg/kg bw で TDN は、結腸の有糸分裂活性を誘起した。 ・投与量 1000 mg/kg bw で TDN は、精巣のアポトーシスの指標を有意に増加させた(3.3 倍)。	●二酸化チタンのマイクロ/ナノ粒子の経口投与は、遺伝毒性と細胞毒性に関するいくつかのパラメータを有意に増大させる。 ●この結果は、用量と反応の関係が不明であるものの、遺伝毒性に関するこれまでの報告を支持する。 ●この知見は、TiO ₂ 粒子への曝露による健康危険の可能性を示す。 ●ナノ粒子とマイクロ粒子の影響の相違については、更なる調査を要する。

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調整法/ 試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
44	Fumio Furukawa, Yuko Doi, Mayuko Suguro, Osamu Morita, Hirofumi Kuwahara, Takuji Masunaga, Yoshiro Hatakeyama, Fukuyoshi Mori	Lack of skin carcinogenicity of topically applied titanium dioxide nanoparticles in the mouse (酸化チタンナノ粒 子をマウスの皮膚 に使用しても発癌 性はない)	●対象物質 ・酸化チタンナノ粒子2種 ①被覆 (CTDN; coated titanium dioxide nanoparticles) ②非被覆 (UCTDN; uncoated titanium dioxide nanoparticles) ・入手先:石原産業(株) ・TiO2含有量 -CTDN 79.2%、-UCTDN 96.0%、 ・共にスピンドル形状 ・大きさ -長軸 50-100nm、 -短軸 10-20nm ●試料調整法 ・Pentalan408 中に懸濁。 ・濃度 5,10,20mg/0.1g ●投与量: 5,10,20mg/マウ ス(CTDN,UCTDN とも)	●試験生物 ・Crj:CD1 (ICR) マウス (SPF) ・週齢:7(実験開始時点) ●試験計画 ・開始剤:アセトンに溶解した 7,12-ジメチルベンゾ[a]アント ラセン(DMBA)(0.1mg/0.1ml) ・促進剤:アセトンに溶解した 12-o-テトラデカノイルホルポ ール 13-酢酸塩(TPA) (4μg/0.2ml)。 ・開始処理: DMBA(0.1ml)ま たはベヒクルのみを一時に背 中皮膚に適用。 ●投与方法 ・開始処理の1週間後から、 CTDN または UCTDN のアリ コット(5,10,20mg)を適用 (Pentalan 液量:0.1-0.09ml) (毎日) ・あるいは、0.2mlのTPAを適 用(週2回で19週間) ●試験方法 ・屠殺後、背中の剃髪部と小 結節の出現部を摘出して組 織病理学検査に供試。	●小結節数と全体病理 ・CTDN 処理 -TPA 群で、多数の小結節が背中 の皮膚に発現(全マウス)(対 Pen talan 群で有意)。 -5,10mgCTDN 群と TPA 群で下 顎、腹部領域リンパ節、脾臓、 胸腺が拡大。 -TPA 群で、肺の白点が発現(1匹)。 -全群で卵巣の変色領域と嚢胞、 子宮の怒張、胸腺塊が発現(群 間に有意差は無し)。 ・UCTDN -TPA 群で背中皮膚に小結節が 発現(週17で出現率100%)(対 Pentalan 群で有意)。 -5mg,10mgUCTDN 群と TPA 群 で下顎、脾臓、腰部と鼠径大腿 のリンパ節、脾臓、胸腺が拡大。 -各群で腎臓の嚢胞、卵巣の嚢 胞と小結節、子宮の小結節が発 現(群間に有意差なし)。 ●皮膚の組織病理学 ・CTDN -皮膚の扁平上皮過形成と乳頭 腫が発現。(発現した匹数:Pen talan 2,1、10mgCTDN 0,1、 20mgCTDN 1,2) -TPA 群では、①扁平上皮細胞 増殖が4匹、②扁平上皮乳頭腫 が20匹、③角化棘細胞腫が10 匹のマウスで発現(②③は対 Pen talan 群有意)。 ・UCTDN -10mgUCTDN 群で、炎症と毛 囊壊死が発現。 -20mgUCTDN 群で、皮膚の角 化棘細胞腫と脂腺増殖が発現。 -5,10mgUCTDN 群で、扁平上 皮過形成が発現。 -TPA 群で、①扁平上皮過形成 が13匹、②扁平上皮乳頭腫が 20匹、③角化棘細胞腫が6匹 のマウスで発現(対 Pentalan 群 で有意)。	●被覆ならびに非被覆酸化チタンナノ粒子は、双方とも皮膚癌誘発の危険性は無い。すなわち、酸化チタンナノ粒子を皮膚に用いても、皮膚癌発生の心配はない。

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調整法/試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
45	Maija Leppänen, Anne Korpi, Mirella Miettinen, Jani Leskinen, Tiina Torvela, Elina M. Rossi, Esa Vanhala, Henrik Wolff, Harri Alenius, Veli-Matti Kosma, Jorma Joutsensaari, Jorma Jokiniemi, Pertti Pasanen, Arch Toxicol 85:827-839(2011)	Nanosized TiO2 caused minor airflow limitation in the murine airways (TiO2ナノ粒子は、 ネズミ気道に軽度 の気流障害を引き 起こした)	●対象物質 ・TiO2 微粒子 ・液体チタン四イソプロポキシド (TTIP、Ti(C3H7O)4、97%、 SigmaAldrich社製)を用いて製 造。 ・一次粒子径:約20nm ・凝集粒子径:91~130nm(濃度 により増大) ・ゼータ電位:+(酸性下)、-(塩基 性下)	●試験生物 ・非近交系のCr1:OF1 雄マウス ・週齢:5~6週 ・体重:25.3~37.1g ●暴露条件 ・急性曝露: -濃度:8,20,30mg/m3 -継続時間:計1時 間。 ①コントロール期間 (濾過空気だけに曝 露)15分間 ②TiO2への曝露 30分 ③回復期15分 (濾過空気のみ) ・繰り返し曝露 -1時間/日×4日/週 × 4週間。計16時間 -第1群は30mg/m3 に曝露。 -第2群は濾過空気 のみ ●気道影響の評価 ・肺刺激症状は、2種 の肺反射から検出。 ①呼吸の休止期間の 伸び。 ②「急速表在呼吸」を 引き起こしたもう一 つの反射。	●気流障害 ・急性曝露、繰り返し曝露とも、用量依存的でない誘導気管支の気流障害を誘起し、呼吸間隔は増加した。 ・両曝露とも、一回の呼吸量は減少した。 ●知覚の刺激 ・TiO2微粒子の吸入による知覚の刺激は軽症だった(三叉神経、喉頭神経終末の刺激から生じる反射的な反応は軽微であった)。 ・繰り返し曝露では、知覚の刺激は、曝露群と対照群で観察された(対照群で観察された理由は不明)。 ・回復期間の知覚の刺激は、急性および繰り返し曝露の双方で観察された。 ●肺刺激症状 ・肺刺激症状を示す呼吸の休止時間(TP値)の増大が、両曝露で観察された。 ・最高のTP値は、毎日曝露の最初の10分間に観察された。 ・最高のTP値は、曝露日とともに増大した、 ●NPsの位置とネズミ気道の炎症 ・TiO2微粒子は、主に肺マクロファージに蓄積した。 ・少量のTiO2微粒子はI型肺胞上皮細胞でも観察された。 ・繰り返し曝露の方が、1回の曝露よりマクロファージ中のTiO2微粒子が多かった。 ・BAL、組織学、鼻腔試料の観察では、TiO2微粒子は、鼻と肺の炎症を誘起しなかった。 ・全体として、バル試料は通常だった。 ・肺組織学も、正常だった。	●TiO2微粒子への急性 曝露と繰り返し曝露の 主な効果は、気流障 害である。 ●それは調べた全ての 濃度で生じて、呼吸空 気流量の減少として観 察された。 ●知覚と肺刺激は、急性 曝露と繰り返し曝露の 双方で観察された。 ●TiO2の刺激と炎症の 能力は低い。 ●TiO2微粒子を扱う労 働者は、曝露を最小化 する必要がある。

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調整法/試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
46	Yilin Zhang Weiqiang Yu Xinquan Jiang Kaige Lv Shengjun Sun Fuqiang Zhang J Mater Sci: Mater Med 22:1933-1945(2011)	Analysis of the cytotoxicity of differentially sized titanium dioxide nanoparticles in murine MC3T3-E1 preosteoblasts (ネズミMC3T3-E1前骨芽細胞におよぼす2つの粒径の二酸化チタン・ナノ粒子の細胞毒性)	<ul style="list-style-type: none"> ●対象物質 ・酸化チタン・ナノ粒子 ・粒径: 5,32nm(np5,np32) ・純度: 99% ・結晶構造: アナターゼ ・Alfa Aesar社から購入(Ward Hill, MA, USA). ●細胞培養培地での存在形態 ・10%FBの細胞培養培地で; -np5は、不規則形状の血小板状に凝集 -np32粒子の大部分はなめらかな表面を有する球状に凝集。 	<ul style="list-style-type: none"> ●試験生物 ・MC3T3-E1ネズミ前骨芽細胞(サブ・クローン14) ●培養時間 ・24,48,72時間 ●粒子濃度(μg/ml) ・0,5,50,100,500 ☆: 投与量の記載なし。 ●分析項目 ・アネキシンVアポトーシス分析 ・ミトコンドリア膜透過性分析 ・RNAのリアルタイム定量RT-PCR分析 	<ul style="list-style-type: none"> ●細胞毒性 ・24時間の曝露では、np5の生存率は濃度100μg/mlで減少し始めた。np32では50μg/mlで明らかに減少した。 ・48,72時間の曝露では、np5,np32とも低濃度でも生存率は減少した。 ・np5,np32とも、濃度依存的にLDH放出を増大させた。 ●アポトーシス ・np5,np32とも、濃度の増加に伴ってアポトーシス細胞の数は増加した。 ・np5は、500μg/mlのnp32より大きくアポトーシスを誘起した。 ●微粒子の内在化 ・全ての群で、np5,np32とも細胞の表面と内部小胞に凝集していた。 ●ミトコンドリア膜透過性 ・np5,np32は、10μg/mlでミトコンドリア膜透過性を変化させなかった。 ・np5,np32は、100μg/mlでミトコンドリア膜透過性を増加させた(特にnp5)。 ●炎症誘発性応答 ・np5,np32とも、24時間100μg/mlで細胞のGmCSF mRNAを大きく増加させた。 ・np5,np32への24時間曝露は、細胞のG-CSF発現を増加させた。 ・np5,np32への曝露によっては、TNFαと mRNA発現は変化しなかった。 	<ul style="list-style-type: none"> ●TiO2微粒子は、時間依存的、用量依的に細胞毒性を誘起する。 ●この毒性は、TiO2微粒子の粒径とも関連している。 ●将来インプラント材料を創製する時には、30nm未満のTiO2微粒子の毒性に注意しなければならない。

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調整法/ 試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
47	Park YH, Jeong SH, Yi SM, Choi BH, Kim YR, Kim IK, Kim MK, Son SW. Toxicol In Vitro. 2011 Dec;25(8):1863-9. Epub 2011 May 31	Analysis for the potential of polystyrene and TiO ₂ nanoparticles to induce skin irritation, phototoxicity, and sensitization (ポリスチレンとTiO ₂ の皮膚刺激、光毒性、増感作用の可能性の分析)	①ポリスチレンのラテックス ・アミン修飾 ・50nm ②TiO ₂ ・25nm 未満 ①、②とも PBS 中に拡散	1. 人の皮膚角化細胞 HaCaT (HSEM) ①細胞毒性 ・ポリスチレン: 1~100 μg/ml ・TiO ₂ : 25~1000 μg/ml を添加し、24h および 48h 培養後、MTT (0.5mg/ml)を添加し、4h37°Cで培養 ・MTT アッセイで吸光度 540nm で測定 2. 3D EpiDerm (人の皮膚の等価モデル) 3D EpiDerm モデルを 37°C、5%CO ₂ で一晩培養し、 ②EpiDerm 皮膚刺激テスト ・ポリスチレン: 1000 μg/ml ・TiO ₂ : 100 μg/ml を添加し、1h 培養後、PBS で洗浄し、更に 24h 培養し、MTT を含む液中で 3h 培養 ・MTT アッセイで吸光度 570nm で測定 ③EpiDerm 皮膚光毒性テスト ・ポリスチレン: 1000 μg/ml ・TiO ₂ : 100 μg/ml を添加し 24h 培養後、 ・6J/cm ² の UVA を照射後、フォルマザン抽出物密度を 570nm で測定 3. マウスの線維芽細胞 Balb/c3T3 ④NRU 光毒性テスト ・ポリスチレン: 1~100 μg/ml ・TiO ₂ : 1~100 μg/ml 添加し DMEM 中で 1h 培養後 ・5J/cm ² の UVA を照射 ・540nm で測定 4. Hartley アルビノモルモット ・雌 5 週齢 250~300g ⑤動物を用いた皮膚光毒性 ・毛を剃った背肌 1.5x1.5cm に 0.05ml の試験液を塗布 ・ポリスチレン: 1000 μg/ml	①細胞毒性 ・ポリスチレンでは、細胞生存率は濃度に応じて減少した。 ・TiO ₂ では濃度に関係なく毒性はなかった。 ②EpiDerm 皮膚刺激テスト ・ポリスチレン、TiO ₂ の細胞生存率に顕著な差は無く、皮膚刺激性を示さない。 ③EpiDerm 皮膚光毒性テスト ・ポリスチレン、TiO ₂ とも UV 照射有無による細胞生存率に顕著な差は無い。 ④NRU 光毒性テスト ・ポリスチレン 75 μg/ml 以上では、UV 照射により細胞毒性を示す。 ・TiO ₂ では UV 照射と無しの差はなかった。 ⑤動物を用いた皮膚光毒性 ・UV 照射有、無とも紅斑または浮腫は観察されなかった。 ⑥局所リンパ節試験 ・ポリスチレン、TiO ₂ とも刺激指数 (SI) はポジティブコントロールに比べ小さく、顕著な差は無い。	●ポリスチレンとTiO ₂ のナノ粒子は光毒性、急性皮膚刺激症、皮膚感作性をもたらさない。 ●局所リンパ節試験結果から、ポリスチレンとTiO ₂ のナノ粒子はそれ自体皮膚感作物質ではない。 ●HSEM が皮膚のナノ毒性の評価のための有用な代替モデルである

			<ul style="list-style-type: none"> ・TiO₂: 100 μg/ml ・片側のみ 10J/cm² の UVA 照射 ・紅斑または浮腫を 24h、48h、72h 後に観察 <p>5. CBA/N マウス</p> <ul style="list-style-type: none"> ・雌 8~9 週齢 <p>⑥局所リンパ節試験</p> <ul style="list-style-type: none"> ・25 μl の試験液を両耳の裏に 3 日間毎日塗布 ・ポリスチレン: 10~1000 μg/ml ・TiO₂: 10~1000 μg/ml ・5 日目に 5ml の BrdU 液を腹腔内注射し、6 日目に耳のリンパ節の BrdU レベルを ELISA アッセイで評価 	
--	--	--	--	--

酸化亜鉛

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調整法/試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
48	Meng Ho, Kuen-Yuh Wu, Hung-Min Chein, Lung-Chi Chen, Tsun-Jen Cheng Inhalation Toxicology, 23(14): 947-956(2011)	Pulmonary toxicity of inhaled nanoscale and fine zinc oxide particles: Mass and surface area as an exposure metric (吸入された酸化 亜鉛のナノ粒子と 微粒子の肺毒性: 曝露測定基準とし ての質量と表面 積)	●対象物質 ・酸化亜鉛ナノ粒子と微粒子 ・ナノ粒子の粒度: ~35nm ・微粒子の粒度: ~250nm ・両者とも“furnace flow reactor”で 作成 ●曝露濃度(以下、数値は低用量、 中用量、高容量の場合の値) ・吸入粒子数濃度 -35nm ZnO: 1.5x10 ⁶ 、2.1x10 ⁶ と 7.9x10 ⁶ 粒子/cm ³ 。 -250nm ZnO: 6.2x10 ⁴ 、1.5x10 ⁵ と 4.5x10 ⁵ 粒子/cm ³ 。 ・質量濃度 -35nm ZnO: 2.4、3.7、12.1mg/m ³ 。 -250nm ZnO: 7.2、11.5、 45.2mg/m ³ 。 ・表面積濃度 -35nm ZnO: 1.7x10 ⁴ 、2.5x10 ⁴ と 1.0x10 ⁵ mm ² /cm ³ 。 -250nm ZnO: 2.0x10 ⁴ 、4.2x10 ⁴ と 1.2x10 ⁵ mm ² /cm ³ 。 ●凝集 ・35nmZnO: 粒子は10-100nmのクラ スタに凝集。 ・250nm群は凝集後の径 (100-250nm)。 ●純度 ・35nm ZnO: 99.6±0.31% ・250nm ZnO: 99.7±0.25%	●試験生物 ・雄SD系のラット ・週齢: 7週間目 ・体重: 285-302g ●曝露方法: 吸入曝露 ・低濃度、中濃度、高 濃度の3濃度で曝露 ・曝露期間: 午前8時か ら14時まで(6時間) ・曝露の24時間後に屠 殺 ●試験項目 ・末梢血の血液細胞 ・気管支肺胞洗浄分析 ・8-ヒドロキシ-2'-デオ キシグアノシン (8-OHdG)分析	●肺炎症、損傷と酸化ストレスに関する効果 ・35、250nm ZnOに暴露されたラットでは、全体細 胞数、好中球の割合と数は、高用量群で最高だ った。 ・35nm群における用量と反応の関係は、好中球 の割合が最も顕著で、次に総菌数と好中球の数 が続いた。 ・250nm群では、好中球と総菌数の割合が最も顕 著でそれに好中球の数が続いた。 ・35と250nm ZnOの双方の暴露で、バル液の総タ ンパクとLDHは、高用量群で高かった。 ・酸化ストレス・マーカー8-OHdGの量は、35と 250nm ZnOの双方の暴露とも高用量群が高かつ た。 ・35と250nm双方のZnO粒子処理の24時間後に 得られる末梢血において、白血球の数は有意に 高かった(低、中、高容量とも)。 ・しかし、測定された他の血液パラメータは、曝露 群と対照群の間に差はなかった。 ●回帰モデルによる関連付け(数字は寄与率) ・質量濃度と好中球の割合の関係: 0.95 ・表面積濃度と好中球の割合の関係: 0.94 ・表面積濃度と好中球の関係: 0.81 ・質量濃度と好中球の関係: 0.84 ・表面積濃度と全体細胞数の関係: 0.76 ・質量濃度と全体細胞数の関係: 0.73 ・以上は、数濃度とは関連付けられなかった。 ・総タンパク、LDH、8-OHdGも、質量濃度、表面 積濃度、数濃度と関連付けられなかった。	●質量濃度は、好中球 の割合、好中球の数と 全体細胞と有意に関 連づけられる。 ●表面積濃度も、好中球 の割合、好中球の数と 全体細胞と有意に関 連づけられる。 ●質量濃度と表面積濃 度の双方とも、ZnO ナ ノ粒子の毒性のため の測定基準として使え る。 ●この結果は、ZnOナノ 粒子と放出された亜鉛 イオンがナノ粒子の毒 性を媒介するとする最 近の検査結果とも整 合している。

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調整法/試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
49	Wan-Seob Cho, Rodger Duffin, Sarah EM Howie, Chris J Scotton, William AH Wallace, William MacNee, Mark Bradley, Ian L Megson, Ken Donaldson Particle and Fibre Toxicology, 8:27(2011)	Progressive severe lung injury by zinc oxide nanoparticles; the role of Zn ²⁺ dissolution inside lysosomes (酸化亜鉛ナノ粒 子による進行性重 度肺損傷; リソソーム中の Zn ²⁺ 溶解の役割)	●対象物質 ・酸化亜鉛ナノ粒子 (ZnONP) ・粒径: 10.7±0.7nm ・NanoScale社 (Manhattan, KS, 米 国)より購入。 ・ZnONPは人工リソソーム液と人工 肺間質液 (Gamble液)で培養。 ・ZnONPは、PBSや蒸留水中では容 易に分散しない「ハードな凝集体」 を、血清タンパク質中では容易に分 散する「柔らかい凝集体」を形成。 ・ゼータポテンシャル: -27.13± 1.36mV (PBS中)。 ●対象物質2: ・代替ZnONP (ZnONPalt) ・(Nanostructural and Amorphous Materials, Inc (ヒュースト ン、TX、米国)から購入。 ・粒径: 137±9.2nm ●コントロール粒子1: ・ルチル型TiO ₂ ナノ粒子 (TiO ₂ NP) ・粒径: 30.5±1.8nm ・Nanostructure&Amorphous Materials Inc (ヒューストン、TX、米 国)より購入。 ●コントロール粒子2: ・NiOナノ粒子 (NiONP) ・粒径: 5.3±0.48nm	●試験生物 ・雌ウィスターラット (200-250g) ●投与方法: 気管内注 入 (50,150 cm ² /ラット) ・ZnONPの凝集体 (4,380nm)も150 cm ² / ラットで注入 ・注入後、1日、1週、4 週で屠殺。 ・ベヒクル・コントロー ル: 含5%ラット血清生 理食塩水 ●代替ZnONPalt ・投与方法: 注入 ・投与量: 310µg/匹 (150 cm ² /ラット) ・屠殺: 1日後 ・コントロール: BAL液 の注入 ●Zn ²⁺ の注入 ・ZnONP をHCl酸性生 理食塩水に溶解 (1mg/ml)し、気管内に 注入 (92.5、277.5µg Zn ²⁺)。 ●ZnONPの吸引 ・ZnONPをC57BL/6と BALB/cマウスの肺に 吸引。 ・屠殺: 1日後	●ZnONPの注入後、1週と4週でBAL液の総細胞 数は有意に増加した。 ●BAL液の総タンパクとLDHのレベルは、1日で 有意に増加した。 ●BAL液のIL-1βは、150 cm ² ZnONPの注入の 1日と1週で有意に増加した。 ●BAL液のエオタキシン発現は、両投与量とも1 日でだけ有意に増加した。 ●血清とBAL液のIgEとIgA ・血清のIgEはZnONP注入後、1日、1週で一時的 に増加した。 ・血清のIgAは2、3、4週後に有意に減少した。 ●ZnONPは、肺拡張不全を伴う好酸性の炎症、 気道上皮細胞損傷、再生性増殖、杯細胞増殖、 肺線維症などの肺病変と、肺組織における重篤 な好酸性の炎症を誘起した。 ●ZnONPは杯細胞と気道上皮細胞の増殖を誘 起した。 ●凝集ZnONPの注入 ・凝集ZnONP (4,380nm)はBALに91,000の好酸 球 (1.3%)を、分散ZnONP (242.9nm)は595,000の 好酸球 (36.7%)を作り出した。 ●ZnONPaltは、BAL液中の多形核白血球と好酸 球の数を増加させた。DHと総タンパクは、ZnONP と同様であった。 ●ZnONPに暴露された肺からのBAL液 (ナノ粒 子なし)の注入後の1、4週で、炎症はなかった。 ●Zn ²⁺ 注入後の4週で、肺はZnONP処理と同様 の病変を示した。 ●C57BL/6とBALB/cマウスの肺へのZnONPの 吸引は炎症を誘発した。 ●NiONPは、多形核白血球増殖と好中球炎症を 誘発した。	●ZnONPの注入は、多 様な病理学的変化 (好 酸球増加、気道上皮 細胞損傷、再生性杯 細胞増殖、気管支中 心の肺線維形成と肺 拡張不全)を誘起す る。 ●ZnONPの一回の高容 量曝露は重度線維形 成、気道上皮損傷、好 酸球流入を誘起する。 ●これらは主に、ファゴ ソームの酸性環境にお けるZnONPのイオン溶 解による。 ●リソソームの酸性環 境下でのZnONPのイ オン溶解はリソソーム不 安定化と細胞死を引き 起こす。 ●注入経路に沿って広く 生じた細胞死は、重度 細胞死とその後の病 原性の主要な要因で ある。 ●重篤な有害反応を最 小にするために、 ZnONPに対する曝露 は、職業上あるいは消 費者環境では厳密に 管理されなければならない。

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調整法/試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
50	R Surekha, A. Sairam Kishore, A. Srinivas, G. Selvam, A.Goparaju, P. Neelakanta Reddy, P. Balakrishna Murthy Cutaneous and Ocular Toxicology, 1-7, Early Online (2011)	Repeated dose dermal toxicity Study of nano zinc oxide with Sprague-Dawley rats (SDラットにおける 酸化亜鉛ナノ粒子 の繰り返し服用に よる経皮毒性)	●対象物質 ・ZnO のナノ粒子、マイクロ粒子 ・ZnOナノ粒子は、湿式の化学的方法によって合成された。 ・ナノZnOの平均粒径: 63nm 溶液中では、224.7nm ・多分散指標polydispersity index は、0.305であった。 ・ゼータ電位: -30.9mV : マイクロ粒子の粒径などは記載なし。	●試験動物 ・SDラット(雄と雌) ・体重1 80-220g ・週齢: 6~8週間 ・曝露期間: 28日 ・血液採取: 0、28、42 日 ●投与方法 ・曝露量 -ナノZnO: 75、180、 360mg/kgbw -マイクロZnO: 2000mg/kgbw ・ラットの体表領域の 約10%に塗布。 ・コントロール: 蒸留水 のみを塗布 ・塗布期間: 5日/週 × 4週 ・屠殺: 28日と48日 ・血液: 28 日目に採 取 ●臨床生化学と血液 学 ・生化学パラメータと血 液学パラメータ、2 8、42日に分析され た。 ●病理学検査 ・病理学検査は、実験 期間(28日、42日) 終了後実行。	●臨床生化学と血液学 ・臨床生化学パラメータの有意な変化は、マイク ロとナノZnOの双方の処理とも観察されなかつ た。 ・血液学的パラメータも、有意な変化はなかつ た。 ・血液凝固時間の増加は、マイクロとナノの全て の処理群で観察された。 ●コラーゲン量 ・マイクロとナノの全ての処理群で皮膚と尾部に おけるコラーゲン量の減少が観察された。 ・逆の用量依存関係が全ての処置群で観察さ れた。 ●病理学 ・病理学的病変は、処理群のいずれでも観察さ れなかった。 ・組織病理学的病変は、観察された器官のいず れでも観察されなかった。	●ナノZnO粒子の75、 180、360mg/kgbwの経 皮曝露は、SDラットに 対する毒性を示さなかつ た。 ●繰り返し塗布の結果、 低用量のナノ ZnO は、 高用量とコントロール と比較してコラーゲン 減少を引き起こした。 ●しかしながら、これらの 効果は 14 日間で可逆 的だった。 ●ナノ酸化亜鉛は上記 の服用レベルでは皮 膚を通して浸透し、コ ラーゲン量の減少を誘 起する。

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調整法/試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
51	WAN-SEOB CHO, RODGER DUFFIN, CRAIG A. POLAND, ALBERT DUSCHL, GERTIE JANNEKE OOSTINGH, WILLIAM MACNEE, MARK BRADLEY, IAN L. MEGSON, KEN DONALDSON Nanotoxicology, 6(1): 22-35 (February 2012)	Differential pro-inflammatory effects of metal oxide nanoparticles and their soluble ions in vitro and in vivo; zinc and copper nanoparticles, but not their ions, recruit eosinophils to the lungs (in vitroとin vivo における金属酸 化物ナノ粒子と それらの可溶性 イオンの炎症誘 発性効果の差; イオンでなく、亜 鉛と銅のナノ粒 子が肺の好酸 球を増加させ る)	●対象物質 ・3種の金属ナノ粒子(NP) ①酸化ニッケルナノ粒子NiONP -粒径: 10-20nm -Nanostructural and Amorphous Materials, Houston, TX, USAか ら購入 ②酸化亜鉛ナノ粒子ZnONP -粒径: 10nm以下 -NanoScale Corporation, Manhattan, KS, USAから購入 ③酸化銅ナノ粒子CuONP -粒径: 50nm以下 -Sigma-Aldrich, Gillingham, Dorset, UKから購入 ・各粒子とも媒体中では凝集 ・ゼータ電位: すべてマイナス ・全てのNP懸濁液にエンドキシン は存在せず。 ●試料調整 ・NPs懸濁液: 二重イオン交換水 に懸濁後、血清タンパク質 (in vitro用はウシ胎児血清、in vivo 用はラット血清) を添加。 ・水抽出液: 上記懸濁液からNPを 除去して作成 (Aqueous extract AE)	●細胞培養 (in vitro) ・ヒトの肺胞II型様の上 皮細胞系 (A549) ●投与方法 ・A549細胞は24時間、 NP懸濁液と AEで処 理。 ・投与面積濃度 NiONP: 30、100、 300 cm ² /mL ・ZnONP、CuONP: 3、 10、30 cm ² /mL ●気管内注入 ・試験生物: 雌ウイスタ ーラット (200-250g) ・300cm ² /mLのNPとそ れから調製された AEを肺に注入。 ・ベヒクル・コントロー ル: 5%ラット血清添 加生理食塩水 ・注入後、24時間、4週 間で屠殺。 ●in vivo の測定項目 ・BAL 液中の示差細胞 数 ・炎症誘発性サイトカイン (IL-11β、MIP-2 とIFN-γ)	●A549細胞の細胞毒性: 略 ●肺炎症-1 (急性 (24時間) 炎症反応) ・NiOAEは炎症細胞を増加させなかった。 ・NiONPは細胞と多形核白血球の総数を増加。 ・ZnOAEは多形核白血球だけを増加。 ・ZnONPは多形核白血球と好酸球を増加。 ・CuOAEは細胞数と多形核白血球数を増加。 ・CuONPは全体細胞、多形核白血球と好酸球の 数を増加させた。 ●肺炎症-1 (慢性炎症反応 (4週間)) ・全てのAEとCuONPは、炎症細胞流入を誘発し なかった。 ・NiONPは全体細胞、多形核白血球、リンパ球の 数を増加させた。 ・ZnONPは全細胞数と好酸球数を増加。 ●BALの細胞毒性と総タンパク・レベル ・注入後の24時間で、全NpとCuOAEはLDHと総タ ンパクを増加させた。 ・注入後4週では、NiONPを除いてBALのLDHとタ ンパク質は管理水準に戻った (NiOAEとZnOAE は変化なし)。 ●BALの炎症誘発性サイトカイン・レベル ・注入後24時間で、MIP-2タンパク質はNiONP、 CuONPとCuOAEで増加した。 ・IL-1βタンパク質は全ての処理で増加した。 ・注入の後の4週間で、IL-1βのレベルは、全て の処理群で管理水準に戻った。 ・MIP-2タンパク質はNiONP暴露で増加した。 ・IFN-γタンパク質も、4週間でNiONPとZnONPで 増加した。	●金属酸化物NPから放出さ れる可溶性イオンが、肺の 炎症誘発性において演ず る役割はNPの種類に特定 的で炎症の急性相に限定 される。 ●金属酸化物NPの炎症誘発 能を評価するにあたって、 ZnONPに関するデータは、 in vitroデータのみによ 拠している危険がある。 ●ZnONP可溶性成分はin vitroでの全ての炎症誘発 性分析で活性だったが、in vivoでは非常にわずかの 毒性しかなかった。 ●これは、Znイオンは、in vivoでは裏づけられない偽 陽性効果をin vitroで作り 出すことを示唆する。 ●本研究は、金属酸化物NP の金属イオン成分の役割 の評価において重要な差 を示す。この差は、材料の 傷害性確認と危険特徴づ けにおいて考慮されなけれ ばならない。

ナノ銀

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調整法/試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
52	MEGHAN E. SAMBERG, PAUL E. ORNDORFF, NANCY A. MONTEIRO-RIVERIE Nanotoxicology, June; 5(2): 244-253(2011)	Antibacterial efficacy of silver nanoparticles of different sizes, surface conditions and synthesis methods (異なるサイズ、表面条件、合成方法を有する銀ナノ粒子の抗菌有効性)	<p>●対象物質</p> <ul style="list-style-type: none"> ・銀ナノ粒子(Ag-nps) ・nanoComposix(サンディエゴ、CA、米国)から得られた。 ・種類 ①unwashed Ag-nps: 粒度 20、50、80nm ②washed Ag-nps: 粒度 20、50、80nm ③炭素被覆Ag-nps: 粒度25、35nm(市販の乾燥Ag-nps) ・①、②は、5nm のAuの種粒子上でAgの水酸化アンモニウム触媒還元によって合成 ・①、②とも溶液は60 ppb以下の溶解銀を含んだ。 ・③は、プラズマ反応で合成。 ・①、②は、狭い粒度分布を有し、球形形状。 ・③は、より広い粒度分布で、形状は球形、わずかに凝集、ぼんやりした境界を持つ。 	<p>●試験菌種</p> <ul style="list-style-type: none"> ・大腸菌J53、 ・Ag抵抗性がある大腸菌J53(pMG101) ・S. aureus(ATCC 25213) ・メチシリン耐性S. aureus(MRSA; ATCC 43300) ・サルモネラ菌sp.(ATCC 35664) <p>●Ag-npsに対するバクテリアの感受性: ブロス微量希釈最小阻止濃度(MIC)試験によって評価。</p> <p>●Ag-npsに対する細菌の相互作用は、20nm washed Ag-npsと、代表的なグラム陽性の(S aureus)、グラム陰性の(E. coli J53)系統を用いて調査。</p> <p>●Ag+イオンのソースとしてはAgNO3を使用。</p> <p>(MBC: 最小殺菌濃度)</p>	<p>●Ag-npsに対するバクテリアの感受性(以下で、tマークつきは、この濃度でさえバクテリアは成長したことを示す。)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・20、50、80nmのunwashed Ag-npsは、すべての菌種に対して、3.0-8.0µg/mlの間のMICと6.0-14.7µg/mlの間のMBCを有した。 ・上澄みは3.7-11.0µg/mlの間のMICと、2.0-4.0µg/mlの間のMICを有した。 ・20、50と80nmのwashed Ag-npsは、64.0-1024µg/mlの間のMICと85.3-1024.0µg/mlの間のMBCを有した。 ・25、35nmのカーボン被覆Ag-npsは、256.0-1024µg/mlの間のMICと384.0-1024.0µg/mlの間のMBCを有した。 ・AgNO3は、1.7-1024.0µg/mlの間のMICと4.0と1024µg/mlの間のMBCを有した。 ・ホルムアルデヒドは32.0-64.0µg/mlの間のMICと、128.0µg/ml のMBCを有した。 <p>●超微細観察</p> <ul style="list-style-type: none"> ・無処置の大腸菌J53は、特徴的な細菌形状を示した一方、10µg/mlの20nm washed Ag-npsで処理された大腸菌J53は、細胞質の凝縮と細胞断裂を示した。 ・Ag-nps処理後も、大腸菌J53(pMG101)は正常でコントロールと同様に見えた。 ・コントロールS. aureusは、特徴的な球菌形状を示したが、Ag-nps暴露S. aureusは、膜健全性の損失と細胞破裂を示した。 ・Ag-nps処理大腸菌J53とS. aureusは、縮退した細胞の近くでAg-nps凝集体によって破裂していた。 ・10µg/mlの 20nm washed Ag-npsで処理されたバクテリア中には、Ag-npsの存在が確認された。 	<p>●Unwashed Ag-npsは、3.0-8.0µg/mlの間の濃度で全ての菌種に対して毒性である。</p> <p>●Washed Ag-npsとカーボン被覆Ag-npsは、64.0-1024.0µg/mlの間の濃度でAg抵抗性がある大腸菌以外の全ての菌種に毒性である。</p> <p>●Unwashed Ag-npsまたはその上澄みで処理された場合にだけ、Ag抵抗性がある大腸菌は死亡する(ただし、この両者ともホルムアルデヒドを含む)。</p> <p>●このAg抵抗性がある大腸菌の系統は、Agと汚染物質の間の毒性の差の確認のためのツールとして使える。</p>

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調整法/試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
53	Margriet V.D.Z. Park, Arianne M. Neigh, Jolanda P. Vermeulen, Liset J J. de la Fonteyne, Henny W. Verharen, Jacob J. Briede, Henk van Loveren, Wim H. de Jong Biomaterials 32 9810-9817 (2011)	The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles (細胞毒性、炎症、発達毒性、遺伝毒性に及ぼす銀ナノ粒子の粒径の影響)	●対象物質 ・銀のナノ粒子(3種) ・粒径: 20.3±1.9、79.8±5.8、112.6±7.8 ・nanoComposix社(サンディエゴ、CA、米国)より提供。 ・ナノ粒子は銀塩から水性還元合成によって合成 ・形状: ほぼ球形	●試験細胞 ①ネズミ腹腔マクロファージ細胞系RAW 264.7 ②L929マウス線維芽細胞 ③D3ネズミES細胞 ●細胞代謝活性 ・WST-1細胞増殖試薬を用いて評価。 ・暴露時間: -24h(①と②) -10日(③) ●細胞膜健全性: 放出されるLDHで評価(①と②)。 ●無細胞活性酸素種 ・銀ナノ粒子のヒドロキシルラジカル形成で評価。 ●細胞の活性酸素種 ・ROS生成で評価(①)。 ・銀ナノ粒子濃度: 0.1-100µg/ml ・暴露時間: 4時間 ●ES細胞分化 ・銀ナノ粒子濃度: 5-100µg/ml ・対象細胞: ③細胞 ●遺伝毒性: 胚線維芽細胞で評価。 ・暴露時間: 16時間 ・濃度: 0.1-100µg/ml	●①マクロファージ、②細胞の代謝活性は、イオン銀、銀ナノ粒子とも濃度依存的に減少した。 ●銀ナノ粒子の場合、代謝活性は、①マクロファージと比較して②細胞の方がより強く影響を受けた。 ●①マクロファージ。②細胞とも、20nmの銀ナノ粒子が最も代謝活性を減少させた。 ●②細胞の細胞膜健全性は全ての銀ナノ粒子によって損なわれた。 ●①マクロファージの細胞膜健全性は、20nm銀ナノ粒子にわずかに影響を受けた(80、113nmは影響なし)。 ●イオン銀は①②の双方の細胞膜健全性を同じ程度に損なった。 ●②細胞の場合、20nm銀ナノ粒子はイオン銀より強力に細胞膜健全性を損なった。 ●①マクロファージの場合、イオン銀の方が銀ナノ粒子より細胞膜健全性を損なった。 ●20nm銀ナノ粒子への曝露は①マクロファージのROS生成を増加させた。 ●ナノ粒子への①マクロファージの曝露は、一連の炎症マーカーの放出を誘起した。 ●IL10以外の全ての標識は、20nm銀ナノ粒子の場合に最も誘起された。 ●銀ナノ粒子は、③細胞の分化に基づく心筋細胞の収縮を用量依存的に抑制した。 ●この効果は、20nm銀のナノ粒子がナノ粒子で最も強力だったが、イオン銀ほどでなかった。 ●20nm銀ナノ粒子は、3µg/mlまで遺伝子突然変異の頻度を増加させなかった。	●銀ナノ粒子は一連の異なる細胞タイプに対して損傷を負わせる。 ●その結果、ROS生成、DNA損傷、幹細胞分化の抑制などの二次効果を誘起する。 ●マクロファージが最高に暴露される細胞であるにもかかわらず、それは銀ナノ粒子の効果に最も敏感でない可能性がある。 ●よって、ナノ材料の生体適合性の評価には他の細胞を含む必要性がある。 ●毒性はナノ粒子の大きさで大きく異なる。 ●このため、質量濃度に基づいて銀ナノ粒子の曝露限界を導き出すことが適切ではない。 ●銀ナノ粒子に関する安全な曝露限界を導き出すことは、ケースバイケースのアプローチで扱わなければならない。

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調整法/試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
54	Eun-Jung Park, Kyunghee Choi, Kwangsik Park, Arch Pharm Res Vol 34, No 2, 299-307(2011)	Induction of Inflammatory Responses and Gene Expression by Intratracheal Instillation of Silver Nanoparticles in Mice (銀ナノ粒子のマウスの 気管内注入による炎症反応と 遺伝子発現の誘発)	●対象物質 ・銀ナノ粒子(AgNP) ・シグマアルドリッチ製 ・純度:99% ・凝集粒子径:243.8 ± 176.7 nm (PBS中わずかに凝集;測定法 submicron particle size analyzer (NICOMPTM)) 一次径記載なし	●試験動物 ・ICRマウス(雄) ・体重:25±1g ●気管内注入 ・用量依存性調査 -投与量:125、250、 500µg/kg -屠殺:注入後1日目 ・時間依存性調査 -投与量:500µg/kg -屠殺:注入後 1,7,14,28日目 ●細胞サイクル分析 ・投与量:125、250、 500µg/kg ・バル(BAL)細胞:処 理後1日目に採取 ●組織の遺伝子発現: ・投与量:500µg/kg ・屠殺:注入後 1日目 ・対象組織:肺(全RNA を分析) ●その他実施項目 ・サイトカイン測定 ・免疫表現型検査 ・IgE測定 ・組織病理学分析	●バル細胞の細胞サイクル変化 ・注入の後1日目で、G1ステージの分布は減少した。 ・細胞のアポトーシスに関連するサブG1の分布は、 それぞれ、19.8%、22.7%、24.6%まで増加した。 ●バルと血液のサイトカイン ・バル液中の炎症誘発性サイトカイン(IL-1)の濃度 は、28日目で最大に達した。TNF-αとIL-6は増加した が、7日目から28日目まで同レベルにとどまった。 ・IL-1とIL-2は、時間依存的に増加した。 ・Th1-タイプ・サイトカイン、IL-12は7日目に、IFN-γ は、28日目でピークに達した。 ・Th2-タイプ・サイトカイン(IL-4、IL-5、IL-10)とTGF- βは時間依存的に増加した。 ・血液に分泌されるサイトカインIL-6、IL-12は、1日目 で最大に達した。 ・IFN-γとIL-10は7日目に最大に達した。 ●血液中のIgEは注入の後、時間依存的に増加し た。 ●リンパ球表現型 ・500µg/kg投与では、注入の後1日目でB細胞の割合 が増加した。 ・NK、NKT、B、T細胞の1日群の脾細胞の割合は、そ れぞれ、1.44%、0.54%、74.74%、23.27%であった。 ●肺の組織病理学 ・肺に急性炎症反応が見られたが、14、28日目には 回復した。 ●遺伝子発現 ・500µg/kgの注入によって2倍以上に増大した遺伝 子の数は261、・2倍以下に減少した遺伝子の数は 103であった。	●銀ナノ粒子は、マ ウスの肺にTh2タ イプ優性炎症反応 と組織損傷を誘起 する可能性があ る。

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調整法/ 試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
55	Larissa V Stebounova, Andrea Adamcakova-Dodd, Jong Sung Kim, Heawon Park, Patrick T O'Shaughnessy, Vicki H Grassian, Peter S Thorne Particle and Fibre Toxicology, 8:5(2011)	Nanosilver induces minimal lung toxicity or inflammation in a subacute murine inhalation model (銀ナノ粒子は、亜急性ネズミ吸入モデルにおいて軽微な肺毒性または炎症を誘起する)	●対象物質 ・銀ナノ粒子 ・粒径分布(二峰性) -第1ピーク:5nm(全体粒子数の85~90%) -第2ピーク:22nm(全体粒子数の15%未満) ・比表面積:3±2 m ² /g ・酸化銀:不検出 ・銀ナノ粒子エアロゾルの幾何平均易動度粒径:79nm ・外来性カーボン、C-O官能基、Ag ₂ CO ₃ の被膜あり(皮膜厚さ0.7nm)。	●試験生物 ・C57B1/6マウス(雄) ・週齢:6週 ・解剖時の体重: -22.4g(曝露終了時) -26.8g(終了後3週) ●亜急性吸入曝露 ・4h/d×5d/w×2w ・暴露濃度:3.3±0.5mg/m ³ ・解剖:曝露終了後1h(0週群)、3週(3週群) ●BAL液関連の測定項目 ・バル液中マクロファージ数 ・LDH活性 ・サイトカイン分析(IL6、IL-12(p40)、TNF α 、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、ケラチノサイト由来のサイトカイン、単球走化性タンパク質MCP1、マクロファージ炎症蛋白 ●組織病理の分析項目 ・実質性構造 ・炎症性の浸潤物 ・急性肺損傷の有無 ・線維形成の有無	●亜急性曝露 ・肺中の銀量(μ g/g肺d.w.) -0週群:31(範囲4.3~37.5)(μ g/g肺d.w.) -3週群:10(範囲4.3~37.5)(μ g/g肺d.w.) ・名目Ag服用量の4%が肺で見いだされた。 ●気管支肺胞洗浄液 ・BAL液中のマウスあたり細胞の総数は、コントロール(50.1±8.4×10 ³)と比較して、0週群(92.3±3.7×10 ³)と3週群(119.2±18.7×10 ³)で有意に増加した、 ・BAL液中のマウスあたり好中球数は、0週群と3週群で有意に増加した(ただし、生物学的有意性はなし)。 ・0週群と3週群で総菌数に有意差はなかった。 ・BAL液中のLDHの総タンパク・レベルと活性度には群間の有意差はなかった。 ・BAL液中のサイトカイン(IL-6, TNF- α , MCP-1, MIP-1 α , GM-CSF)濃度は、検出限界以下であった。 ・0週群ではIL-12(p40)とkc濃度がわずかだが有意に上昇した。3週群では増加したが有意ではなかった。 ・BAL上澄みのAgイオンの平均濃度は、0週群と3週群でそれぞれ、13.9±0.9、1.7±0.2 μ g/lであった(コントロール:不検出)。 ・炎症細胞浸潤物、肺炎、血管周囲炎、リンパ様凝集体、上皮損傷、肉芽腫、巨細胞、線維形成の徴候は観察されなかった。 ・粒子を飲み込んだマクロファージは、最後の曝露の直後に肺実質(lung parenchyma)とBAL液で見いだされた。 ・3週間群では、マクロファージ・ファゴソーム中に銀粒子が見出された。	●40時間、3.3mg/m ³ での銀ナノ粒子の吸入は、軽微な肺毒性または炎症を誘起する。 ●この炎症反応は、銅のナノ粒子よりはるかに小さい。 ●これらの結果は他の研究と一致している。 ●銀ナノ粒子の場合、他の金属が有意な炎症を誘起するために必要な量より、はるかに大きな量が必要である。 ●より高濃度、長期間の銀ナノ粒子への曝露が、慢性効果や他の器官への転座の可能性を有するかどうかは、さらなる研究によって評価する必要がある。

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調整法/ 試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
56	Christiane Beer, Rasmus Foldbjerg, Yuya Hayashi, Duncan S. Sutherland, Herman Autrup Toxicology Letters 208 286-292(2012)	Toxicity of silver nanoparticles—Na nanoparticle or silver ion? (銀のナノ粒子の 毒性-ナノ粒子 か? 銀イオン か?)	●対象物質 ・銀ナノ粒子(AgNPs) ・NanoAmor(ヒューストン、米国) から得られた。 ・粒径: 30-50nm ・不純物合計: 0.1%以下 ・形状: 球形 ・表面: 0.2% PVP(ポリビニルピロ リドン)の被膜あり ・コロイド状AgNPsは、クエン酸ナ トリウム溶液中で銀塩をNaBH4 還元することによって合成	●試験細胞 ・A549ヒトの肺癌上皮性 細胞系統 ・細胞は、ペニシリン (100μg/ml)、ス トレプトマイシン (100U/ml)、10% 熱失活FB補足された DMEM中で培養。 ・曝露の1日前に、 DMEM/10% FBの中 で、細胞培養皿に播 種。 ・AgNP懸濁液または AgNP上澄みは、 DMEM/1% FBで希釈さ れて、細胞に加えられ た。 ●MTT分析 ・細胞はDMEM/1% FB中 で、37°C、24時間培養 (試験物質ありとなし) ・曝露の後試験液は廃棄 され、細胞は100μl のMTT溶液で培養。 ●その他分析項目 ・WST-8分析 ・細胞サイクル分析 ・ROS分析 ・アネキシンV/PI分析	●細胞生存度 ・A549細胞を、銀イオン濃度39%と69%のAgNP懸濁 液で24時間処理した結果、細胞生存度は、前者 で94%、後者で54%であった(全銀濃度1.5μg/mlの 場合)。 ・高銀イオン濃度(69%)では、AgNP懸濁液と上澄 みで処理の間にA549細胞の細胞生存度の差は なかった。 ・この結果は、市販のAgNPsを用いた時も同様だっ た。 ・1%と2.6%の間の銀イオン濃度では、AgNP懸濁液 は上澄みより有意に毒性だった ・5.9%の銀イオン濃度では、AgNP懸濁液とその上 澄みの毒性に、有意差はなかった。 ●アポトーシスとネクローシスの誘発 ・生存細胞のわずかな減少と初期アポトーシス細 胞のわずかな増加が認められた(ただし、有意で はない) ・アポトーシスとネクローシスの誘発に関してAgNP 懸濁液と上澄み処理の間に有意差はなかった。 ●ROS産生 ・AgNP上澄みは、2.6から6倍、AgNP懸濁液より多く のROSを産生する。これは、ROS産生が主に銀 イオンの存在によることを示唆する。 ●細胞サイクルに及ぼす影響 ・細胞サイクルのG2/M期の細胞の数は、AgNP懸 濁液とAgNP上澄みで有意差はなかった。 ・G1/G0も同様だった(2μg/mlで)。 ・これは、3μg/mlでは約10%減少した。 ・AgNP懸濁液またはAgNP上澄み処理は、細胞サ イクルのS期細胞の割合を増加させた。	●AgNP懸濁液の毒性 において遊離銀イオ ンが大きな役割を演 ずる。 ●AgイオンとAgNPの 共存の効果は、Agイ オンのより小さい濃 度に対して現れる。 ●今後、AgNP試料の 毒性評価において、 銀イオンの量が測 定・報告されなけれ ばならない。 ●我々は、更に AgNPsの毒性の信 頼できる評価のた め、そして、銀イオン による毒性とAgNP による毒性を区別す るために、AgNP懸 濁液の上澄みを、標 準的な付加的なコン トロールとして用い ることを提案する。 ●以上のことは、 CuONPsのような比 較的高い溶解度を 持つ他の金属の NPsに対しても同様 かもしれない。

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調整法/試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
57	EUN-AH JUN, KYUNG-MIN LIM, KEUNYOUNG KIM, OK-NAM BAE, JI-YOON NOH, KYU-HYUCK CHUNG, JIN-HO CHUNG Nanotoxicology, June; 5(2): 157-167(2011)	Silver nanoparticles enhance thrombus formation through increased platelet aggregation and procoagulant activity (銀のナノ粒子は、 血小板凝集と凝血 原活性の増大を 通して血栓形成を 高める)	●対象物質 ・ナノAg粉、マイクロAg粉 ・粒度: -ナノAg粉: 10-100nm(カタログno. Aldrich 576832) -マイクロAg粉: 5,000-8,000 nm(カ タログno. Aldrich 327093)) ・両者とも、Sigma-Aldrich Chemical Co. (St Louis, MO, USA)から得られ た。 ・ナノAg粉の形状: 球状	●試験生物-1 ・健全な男性成人 (18-25歳)の血小板 ・実験当日に採血 ●測定項目 ・血小板凝集の測定 -光顕下で単一の細 胞(single cell)数を カウント。 -曝露時間: 5分間 -処理濃度: 0,10,50,100,250µg/m l ・血小板凝集のTEM観 察 ・ホスファチジルセリン (PS)曝露のフロー血 球数分析 ・血小板凝血原活性の 測定 ・セロトニン分泌の測 定 ・P-セレクチン発現の 測定 ・細胞内のカルシウ ム・レベルの決定 ・ラットの血小板凝集 の測定 ●試験生物-2 ・雄SDラット ・体重: 250-350g ●測定項目 ・ナノAgの気管内注入	●血小板凝集に及ぼすナノAgの効果 ・ナノAgは100µg/ml以上の濃度で、濃度依存的 に血小板凝集を誘起した。 ・トロンビンとの共同処理では、ナノAgの凝集促 進効果は大きく強化された。 ・銀の微粒子(5-8 µm)の凝集促進効果は、弱か った。 ●血小板凝血原活性に及ぼすナノAgの効果 ・ナノAgは、濃度依存的に、かつ上記と同様のパ ターンで大幅にPS暴露血小板を増加させた。 (ホスファチジルセリン;血小板の活性化に伴っ て、その表面に出現するリン脂質-凝血原活 性化の代表的な標識) ・トロンビンはこれらの効果を増幅した。 ・ナノAgに暴露された血小板は、トロンビン生成 を促進した。 ●細胞内のカルシウム、P-セレクチン発現とセロ トニン放出に及ぼすナノAgの効果 ・ナノAgは細胞内のカルシウムを増加させ、P-セ レクチン発現とセロトニン放出も増加した。 ・トロンビンは、ナノAgに媒介された細胞内のカ ルシウムを増加させ、 ●in vivoにおけるナノAgの血栓症促進効果 ・ナノAgは、ヒトの血小板に対して観察されたの と同様のパターンで、ラットの血小板凝集とPS曝 露を高めた。これはトロンビンとの相乗効果に よってさらに促進された。 ・血栓形成はナノAg(0.1mg/kg(25-30)µg/ラット、 静脈(i.v.)大量瞬時投与)によって有意に増加 した。 ・ナノAgの気管内注入(5-10mg/kg、1-4mg/ラッ ト)の後、血小板凝集応答とPS曝露は、生体 外(ex vivo)で増加した。	●ナノAgは細胞内のカ ルシウムの増加を通し て血小板凝集と凝血 原活性を高める。 ●これらの効果はトロン ビンの存在で増幅され る ●これは、ナノAgは心 管疾患をもつ患者の 血栓症促進 (prothrombotic)のリス クを増加させることを 示唆する。 ●本研究は、ナノ材料に 起因する血栓症促進 リスクに関する重要な 証拠を提供した。

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調整法/試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
58	Katrin Loeschner, Niels Hadrup, Klaus Qvortrup, Agnete Larsen, Xueyun Gao, Ulla Voge, Alicja Mortensen, Henrik Rye Lam, Erik H Larsen Particle and Fibre Toxicology, 8:18 (2011)	Distribution of silver in rats following 28 days of repeated oral exposure to silver nanoparticles or silver acetate (28日間にわたる銀ナノ粒子または酢酸銀の経口投与に伴うラット中の銀の分布)	<ul style="list-style-type: none"> ●対象物質 ・銀ナノ粒子(AgNP) ・ポリビニルピロリドン(PVP)(BASF社製)の存在下でヒドラジンで硝酸銀を還元することによって製造。 ・流体力学的粒径:2つのピークあり-第1ピーク:14±2nm(粒子容積の90%、粒子数の99.9%以上)-第2ピーク:50±9nm(粒子容積の11%、粒子数の0.1%以下) ・形状:ほぼ球面形状(凝集体は検出されず) ・ゼータ電位:-2mV(懸濁液pH5.9) ・懸濁液中の銀濃度:628±55µg/ml ・このうち、70±1µg/ml(全体銀濃度の11%)はろ液中にイオンとして存在。 	<ul style="list-style-type: none"> ●試験生物 ・雌Wistar Hannover Galasラット ・週齢:4週 ・体重:107±9g ●投与方法: ・1群:PVP(ベヒクル・コントロール) ・2群:AgNP ・3群:酢酸銀(AgAc) ・1日2回×28日間、11.5mg/mlの水溶液として経口投与 ●投与量 -AgNP懸濁液:10ml/kgb.w.×2回/日(12.6mg/kgb.w./日の銀量) -AgAc:9mg/kgb.w./日の銀量 ●実験日数:28日間 ●採取組織 胃(胃体の部分)、肝臓(左中葉の先進部)、腎臓(右腎の部分)、肺(右中葉)と筋肉(右大腿二頭筋)。 ●銀濃度の定量:組織、血漿、尿と糞便 	<ul style="list-style-type: none"> ●銀の臓器分布 ・臓器ごとの銀の分布は、AgNPとAgAcで同様だった。 ・最高の銀の濃度は、小腸、胃、腎臓、肝臓で見いだされた。 ・AgNP暴露の各組織の銀の濃度は、AgAc暴露の40-50%(腎臓、胃、脳と原形質)、10-20%(筋肉、肺)であった。 ●銀の排出 ・銀の多くは糞便で排出された。尿による排出は少なかった。 ●回腸における銀の存在 ・AgNP暴露では、回腸の絨毛の先端の固有層(lamina propria)と粘膜下組織の細胞で検出された(上皮細胞の細胞質では検出されず)。これは、AgAc暴露でも同様だった。 ・AgNP暴露では、球面状の、凝集した高電子密度の粒状体が固有層中のマクロファージのリソソームで見いだされるとともに、単一の粒状体が上皮の基底層に見出された。これは、AgAcでも同様だった。 ・粒状体の粒径は12nm以下であった。 ・単一の粒状体は、粘膜下組織の結合組織の中にランダムに分布していた。 ・銀に加えて、SeとSも検出された。 ・AgNP暴露とAgAc暴露の粒状体の元素組成の間に定性的差はなかった。 ●肝臓の銀の所在 ・肝臓の銀濃度には動物間の差が確認された。 ・銀の分布パターンは、AgNPとAgAc暴露で同様だった。 ●腎臓における銀の存在 ・腎臓では糸球体と近位尿細管に存在。 ・AgNP、AgAcとも銀の分布に差はなかった。 	<ul style="list-style-type: none"> ●AgNPまたはAgAcがラットに経口投与されたとき、銀は臓器に同様に分布する。 ●腸壁には、セレンウムと硫黄を含む銀粒が存在する。これは、その形成に関する共通の機序を示唆する。 ●AgNPが胃腸系で溶解して吸収されるのか、あるいは、器官と組織に無傷のナノ粒子として転座するのかがどうかを明らかにするための、さらなる研究が必要である、 ●今後の研究では、ナノ粒子が溶解して銀イオンを放出することが考慮されなければならない。また、毒性の比較のために粗粒子も実験範囲に含めることが望ましい。

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調整法/試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
59	M Korani SM Rezayat, K Gilani, S Arbabi Bidgoli, S Adeli International Journal of Nanomedicine:6 855-862 (2011)	Acute and subchronic dermal toxicity of nanosilver in guinea pig (モルモットに対す る銀ナノ粒子の急 性ならびに亜慢性 皮膚毒性)	●対象物質 ・銀ナノ粒子 ・QuantumSphere社(Santa Ana、 CA)から購入。 ・粒径:100nm以下	●試験生物 ・雄ハートレイ・アルビ ノ・モルモット ・週齢:5~6週 ・体重:350~450g ●急性経皮毒性検査 ・投与方法:(曝露群) 100,1000µg/mLを背 中の皮膚に塗布 ・陽性対照群:AgNO3 溶液100µg/mL ・陰性対照群:無処理 の皮膚 ・検査間隔:1,2,4,8,72 時間(全観察期間: 14日間) ・検査項目:水腫、紅 斑、皮膚の変化 ●亜慢性経皮毒性検 査 ・背中の皮膚に100, 1,000,10,000 µg/mLの液を週に5 日、1回/日で13週 間塗布 ・陽性対照は、 -100µg/mL AgNO3 溶液を塗布 ・対照群:塗布無しの 皮膚 ●病理学研究 ・膚、肝臓と脾臓の組 織を観察	●急性経皮毒性 ・AgNO3群では、表皮厚みの減少と真皮乳頭層 の膠原繊維の規則的な増大が観察された。単 核炎症も見られた。 ・低用量ナノ粒子群(100µg/mL)では、表皮と真 皮乳頭層の厚みは減少した。 ●亜慢性毒性・皮膚 -全ての処理群で皮膚の炎症が観察された。 -AgNO3群では表皮と真皮乳頭層の厚みが減 少し、ランゲルハンス細胞の数は増加した。 -1000µg/mL処理では、表皮と真皮の厚みは減 少した。一方、ランゲルハンス細胞と炎症は増 加し、真皮乳頭層は減少した。 -10000µg/mL処理でも、表皮と真皮の厚みは 減少し、ランゲルハンス細胞と円形細胞は増 加し、通常の膠原繊維と炎症をもつ真皮乳頭 層は減少した。 -筋内膜には炎症を起こした筋線維の好酸原形 質が観察された。 -若干の筋線維は、マクロファージによって取り 囲まれていた。 ●亜慢性毒性・肝臓 -AgNO3群とナノ粒子群で、肝細胞索 (hepatocyte cords)の破壊が見られた。 -試験群でクッパー細胞の過剰生産と肝細胞の 縮退が見られた。これは、ナノ粒子濃度の増 加とともに増加した。 -壊死は、10,000µg/mLのナノ粒子の場合だけ で観察された。 ・脾臓 -対照群の脾臓には赤い被膜が見られた。 -AgNO3群ではこれは薄くなっていた。 -低用量ではより薄くなっていた。	●0.1mg/kg(100µg)以上 の銀ナノ粒子への曝露 は、肝臓、脾臓、皮膚の 軽微な損傷を誘起する 可能性がある。 ●同じ経路で投与される ときでも、銀ナノ粒子と 銀の毒性は異なる。 ●低用量域における暴 露期間と組織病理変化 の間の関係、さらには、 銀ナノ粒子の毒性に及 ぼす粒子形状と大きさ の影響に関するさらなる 研究が必要である。

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調整法/ 試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
60	Maneewattanapinyo P, Banlunara W, Thammacharoen C, Ekgasit S, Kaewamatawong T. J Vet Med Sci. 2011 Nov;73(11):1417-23. Epub 2011 Jun 29	An evaluation of acute toxicity of colloidal silver nanoparticles コロイド状銀ナノ 粒子の急性毒性 の評価	●コロイド状銀ナノ粒子 (AgNPs) ・粒径:10~20nm ・純度:99.96% 銀イオン<0.04% ●AgNO ₃ 0.094M の水溶液 を NaBH ₄ 0.07M の水溶液 に滴下して還元し、遠心分 離により AgNPs を沈殿	1. ICR マウス ・雄および雌 10-12 週齢 ・体重:28~35g ①急性経口毒性 ・50mg/kg または 5000mg/kg を経口投 与 ・投与後、1日、7日、14日目に体重測 定 ・1、7、14日ごとに、採血し血液検査、 また解剖し、臓器の病理組織検査 2. モルモット ・雄 ・体重:500~650g ②急性眼刺激性及び腐食性試験 ・50ppm または 5000ppm の AgNPs 水 溶液 0.1ml を片側の眼球の結膜嚢 に投与 ・投与後、1、12、24、48、72h 毎に虹 彩、結膜、角膜、結膜浮腫を観察 ③急性経皮毒性 ・50ppm または 100,000ppm の AgNPs 水溶液 2ml を毛剃りした皮膚 7x10cm にガーゼで塗布 ・塗布 1、3、7、14h後に観察 ・塗布 24h 後に洗浄除去し、1、3、7、 14日後に生検を実施	①急性経口毒性 ・いずれの AgNPs の経口投与で死亡は 記録されなかった。 ・マウスの体重増加の割合は、コントロ ールと投与群間に有意差は認められな かった。 ・血液学的分析では、AgNPs とコントロ ールで処理したマウス間に有意差は認 められなかった。 ・血液および生化学検査では検査パラメ ータのいずれに有意差はなかった。 ・臓器の病変も全試験条件で観察されな かった。 ②急性眼刺激性及び腐食性試験 ・急性眼刺激性は全試験条件で観察さ れなかった。 ③急性経皮毒性 ・AgNPs の浸透は全試験条件で観察さ れなかった。	●短時間の動物モ デルで、経口、眼、 皮膚にコロイド AgNPs を投与した 場合では、比較的 安全であることが 示唆された。

シリカ

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調整法/ 試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
61	Hirai T, Yoshikawa T, Nabeshi H, Yoshida T, Tochigi S, Uji M, Ichihashi K, Akase T, Yamashita T, Yamashita K, Nagano K, Abe Y, Kamada H, Tsunoda S, Yoshioka Y, Itoh N, Tsutsumi Y. Pharmazie. 2011 Sep;66(9):727-8	Size-dependent immune-modulating effect of amorphous nanosilica particles アモルファスナノシリカ 粒子のサイズ依存的 免疫調節作用	●アモルファスシリカ 粒径:1000、300、100、70nm ●PBS(pH7.4)で懸濁	●C57BL/6J マウス 雌 10 週齢 ●皮下注射 ●試験用量(試験動物当り) ・PBS50 μ l 中にシリカ 625 μ g と卵 白アルブミン(OVA)100 μ g を懸 濁 ●注射 6 日後に脾細胞を in vitro で OVA ₂₅₇₋₂₆₄ ペプチド(SL8)5 μ g/ml 中で 24 時間培養し、SL8 特異的 CD8 ⁺ T 細胞の誘発を IFN- γ ELISPOT アッセイで調査	・サブミクロンサイズのナノシリカの 皮下注射は SL8 特異的 CD8 ⁺ T 細胞の誘発には顕著でない。 ・100nm 未満のナノシリカは大幅に SL8 特異的 CD8 ⁺ T 細胞応答を 高める。 ・更に小径の方が顕著になる。	●ナノシリカの皮下注 射は外来抗原に対す る CD8 ⁺ T 細胞の反応 に影響を与える。

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調整法/ 試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
62	Isoda K, Hasezaki T, Kondoh M, Tsutsumi Y, Yagi K. Pharmazie. 2011 Apr;66(4):278-81	Effect of surface charge on nano-sized silica particles-induced liver injury ナノサイズシリカ粒 子の表面電位の肝 障害に対する効果	●シリカ粒子 (SP70) :平均粒径 70nm ●上記を修飾したもの ①アミノ基 (SP70- N) :平均粒径 61.5nm、電荷-19.7mV ②カルボキシル基 (SP70- C) :平均粒径 70.5nm、電荷-52.4mV ●25mg/mL を純水に希釈	●BALB/c マウス 雄 8 週齢 ①急性肝毒性 ・25mg/mL を純水に希釈した SP70、-C、-N を 最大 100mg/kg を静脈注射 a) 致死量 ・24h 後、血液採取し、ALT アッセイで評価 b) 組織分析 ・24h 後、肝臓を採取し、肝細胞のヘマトキシリ ンエオジン染色による観察 ・24h 後、血液採取し、BUN アッセイで評価 ②慢性肝毒性 ・SP70-C、SP70-N: 60mg/kg SP70: 30mg/kg を 2 回/週静脈注射を 4 週反復 ・最終注射の 3 日後解剖 c) 肝線維症の発現 ・肝臓のヒドロキシプロリン含有量で評価 d) 肝線維コラーゲンの観察 ・アザン染色による観察	①急性肝毒性 a) 致死量 ・SP70: 50mg/kg ・SP70-C: 60~100mg/kg で SP70-N よ り毒性が弱まる ・SP70-C、-N の致死量は投与量に応 じ増加する。 b) 組織分析 ・SP70 (40mg/kg) は 修 飾 SP70 (60mg/kg) より肝障害が広範囲であ る。 ・全シリカ粒子で BUN の顕著な増加は なかった。 ②慢性肝毒性 c) 肝線維症 ・SP70 の含有量は顕著に増加し、コン トロールの 3.5 倍であった。 ・修飾 SP70 では増加は見られない。 d) 肝線維コラーゲンの観察 ・SP70 では観察されるが、修飾 SP70 で は観察されない。	●ナノシリカ の表面修飾 により、肝障 害に対する 毒性を弱め ることができる。

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調整法/ 試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
63	Park MV, Verharen HW, Zwart E, Hernandez LG, van Benthem J, Elsaesser A, Barnes C, McKerr G, Howard CV, Salvati A, Lynch I, Dawson KA, de Jong WH. Nanotoxicology. 2011 Jun;5(2):168-81. Epub 2010 Aug 24	Genotoxicity evaluation of amorphous silica nanoparticle s of different sizes using the plasmid lacZ gene mutation assay プラスミド lacZ 遺伝子 の変異アッ セイを用いた 種々のサイ ズの非晶質 シリカナノ粒 子の遺伝毒 性評価	●4 種のアモルファスシ リカ サイズ: 公称(TEM 実 測) 10(11)、30(34)、80 (34)、400(248)nm ●純水で希釈し、細胞 培養液中に拡散	1. 3T3-L1 マウス胚線維芽細胞株 ①ナノ粒子の細胞内取込 ・DMEM 中で 37°C、5%CO2 で 24h 培養し、50 μg/ml のシ リカ粒子を含む培養液に 16h 浸漬 ・TEM による観察 ②in vitro 小核テスト ・細胞培養後 DPBS で洗浄し、サイトカラシン B(6 μ g/ml)、シリカ粒子各 4、40、400 μg/ml と 10%FCS を含 む細胞培養液中で 24h 培養 ・染色し、2 核性細胞と細胞分裂停止を計数 2. マウス胚線維芽細胞(MEF-LacZ) 実験前に DMEM 中で 37°C、10%CO2、3%O2 で 1 週間 培養 ③細胞毒性テスト ・0.3~100 μg/ml のシリカ粒子を 10%FCS を含む細胞培 養液中で 24h 培養 ・分光光度計(440nm)による WST-1 アッセイで評価 ④遺伝子変異テスト ・4~400 μg/ml のシリカ粒子を含む 10%FCS を添加し 16 h 培養 ・遺伝子のプラスミドを大腸菌に転写 ⑤活性酸素の発生(ROS) ・0.3~100 μg/ml のシリカ粒子を添加した 10%FCS を含 む培養液で 4h 培養 ・その後 PBS で洗浄し、PBS 中の 10 μM H ₂ DCF-DA プロ ーブで 45 分培養 ・波長 520nm による蛍光分析	①ナノ粒子の細胞内取込 ・シリカ粒子は小胞に取り込まれるが、細 胞核には観察されない。 ②in vitro 小核テスト ・全てのシリカ粒子径において、細胞分裂 は 400 μg/ml で顕著に阻害される。 ・2 核性の小核は 80(34)nm シリカのみに 認められる。 ・陽性対照のプレオマイシン(2 μg/ml)で は 2 核性小核は全テストの 4 倍 ③細胞毒性テスト ・MEF-LacZ の代謝活性は 30(34)シリカ 粒子で 85 μg/ml において対照例に対し 80%に低下した。 ④遺伝子変異テスト ・10(11)、400(248)nm のシリカ粒子では 遺伝子変異は観察されない。 ・対象例に対し、30(34)nm シリカでは 3 倍、80(34)nm シリカでは 2 倍の遺伝子 変異が観察された。 ⑤活性酸素の発生 ・30(34)と 80(34)nm のシリカ粒子では 100 μg/ml まで H ₂ DCF 活性は増加しな い。 ・陽性対照の 10 μg/ml の LPS と PMA は 2 倍の ROS 増加だった。	●遺伝毒性効果 は 3T3-L1 の 80 (34)nm シリカ および MEF-LacZ の 30(34)、80 (34)nm シリカ に細胞毒性以 下の投与量で 認められる。 ●シリカ粒子は細 胞に取り込まれ るが、核には観 察されない。

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調整法/ 試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
64	Greish K, Thiagarajan G, Herd H, Price R, Bauer H, Hubbard D, Burckle A, Sadekar S, Yu T, Anwar A, Ray A, Ghandehari H. Nanotoxicology. 2011 Jul 28. [Epub ahead of print	Size and surface charge significantly influence the toxicity of silica and dendritic nanoparticles サイズおよび 表面電荷のシリ カナノ粒子と 樹状ナノ粒子 の毒性への影響	①非多孔質シリカナノ粒 子(SNP) ・粒径: SNP-50 :約 48nm SNP-200:約 170nm ・-NH ₂ 基、-OH 基で表面 修飾 ②ポリ(アミドアミン)デン ドリマー(PAMAM) ・粒径 G3.5: 3.2nm G4 : 2.6~3.4nm G6.5: 8.5nm G7 : 6.4~8.1nm ・-NH ₂ 基、-OH 基、 -COOH 基で表面修飾 詳細は Table-II による。	1. CD-1(帝王切開)マウス ・雌 4~6 週齢 ①急性毒性テスト ・各ナノ粒子を生理食塩水に溶かし、0.2ml を 静脈注射し、10~1000mg/kg を投与 ・最大許容投与量は 10 日間に 10%未満の体 重減少となるよう調整し、測定 ②組織、血液分析 ・10 日後、採血および組織観察 ③経口投与の急性毒性テスト ・PAMAM デンドリマーを①と同様の量経口投 与 ④PAMAM の生体内分布 ・ヨウ素 125 で標識された G7-NH ₂ 、G7-OH、 G6.5-COOH、G4-NH ₂ を①の毒性下限で静 脈注射 ・注射後、2h、8h 毎に採血、組織分析 2. SD ラット ・雌 体重 150~200g ⑤生体内の凝固、線維素溶解反応 ・G4-NH ₂ 、G7-NH ₂ を 30mg/kg 注射 ・30 分後採血して、血小板数、フィブリノーゲ ンレベル、フィブリン分解産物の測定 3. 人の血液 ・ドナーより各 30ml 採血 ⑥人血の凝固、線維素溶解反応 ・G4-NH ₂ 、G7-NH ₂ を 30mg/kg 相当を血液サ ンプルに添加 ・血小板数、フィブリノーゲンレベル、フィブリ ン分解産物の測定	①急性毒性テスト ・PAMAM デンドリマー NH ₂ 基で修飾したものは 10mg/kg 未満であった。 OH 基、COOH 基で修飾したものは NH ₂ 基の 50 倍であった。 ・ナノシリカ粒子では表面修飾は影響がなかった。 50nm では 200mg/kg まで許容可能で、それ以上 では肺合併症で致死性であった。 200nm では 30mg/kg が致死量であった。 ②組織、血液分析 ・血清中の ALT、AST、BUN、クレアチン、ビリルビ ン、全たんぱく質に有意な変化はなかった。 ・体重変化も有意でない。 ③経口投与の急性毒性テスト ・G7-NH ₂ を 50mg/kg 投与すると、2 日後 10%を超え る体重減少があり、胆道出血があった。 ・G4-NH ₂ 100mg/kg では、10 日後でも顕著な毒性 はない。 ④PAMAM の生体内分布 ・G7-NH ₂ は注射後 2h 以内に肝臓に集まる。 ・G7-OH、G6.5-COOH は血中に留まり、徐々に尿 に排出される。 ・G4-NH ₂ も肝臓に集まる。 ⑤生体内の凝固、線維素溶解反応 ・フィブリノーゲンレベル、血小板は顕著に減少し、 フィブリン分解産物は増加した。 ⑥人血の凝固、線維素溶解反応 ・フィブリノーゲンレベル、血小板は顕著に減少し、 フィブリン分解産物は増加した。	●デンドリマーで は毒性はサイ ズによらず、 表面修飾基 (電位)の影響 を受ける。 ●-OH 基、 -COOH 基の 許容量は -NH ₂ 基の 50 倍になり、 -NH ₂ 基は血 管内凝固など の血液学的合 併症を起こ す。 ●SNP では対照 的に、表面修 飾に無関係 に、サイズの 大きい SNP が 小さい SNP より も毒性が高い。

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調整法/ 試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
65	Rabolli V, Thomassen LC, Uwambayinema F, Martens JA, Lison D. Toxicol Lett. 2011 Oct 10;206(2):197-203. Epub 2011 Jul 22	The cytotoxic activity of amorphous silica nanoparticles is mainly influenced by surface area and not aggregation 非晶質シリカナノ粒子の細胞毒性活性は、主に表面積により影響され、凝集によらない。	アモルファスシリカ粒子(SNP) ①SNP 凝集体 10% Ludox SM-30 ゾル(20ml)に20mlの1M KCl水溶液を加えた液中で静電凝集により調整後、攪拌 凝集径 外表面積 (nm) (m ² /g) ・L10 : 25 206 ・L10-A3:183 249 ・L10-A4:182 257 ・L10-A5:188 233 ・L10-As: 46 230 ②SNP 単分散 Stöber:139 28	●実験細胞株 ・マウスマクロファージ(J774) ・マウス線維芽細胞 BALB/c3T3 を10%FBSのDMEM中で培養 ①細胞毒性評価 ・PBSで洗浄後、血清のないDMEMでSNPの①、②に暴露 ・24h後WST1アッセイを実施 ・WST1が50%低下する投与量をED50とし、各細胞株、SNPについて、ED50を調査 ②SNPの細胞への摂取 ・L10、L10-A5、Stöberを非毒性以下(5乃至10μg/ml)投与 ・6h後、ICP-MSで細胞中のシリカ%を測定	①細胞毒性評価 ・J774では、SNP単分散の細胞毒性は、SNP凝集体より小さく、また凝集体間の差は顕著でない。 ・3T3でも同じ傾向である。 ・凝集体のED50は J774:6-9μg/ml 3T3:15-22μg/ml ・投与量を粒子外表面積に換算して実験結果を評価すると、J774では、ED50は全てのサンプルでほぼ同じ外表面積になる。 ・3T3では、SNP単分散とL10、L10-Asはほぼ同じだが、L10-A3、-A4、-A5では毒性が小さい。 ②SNPの細胞への摂取 ・in vitro沈殿拡散線量計測(ISDD)モデルと実験結果を比較した。 ・J774ではL10、L10-A5、Stöberの差はなかった。 ・3T3ではL10、L10-A5の差はなかったが、Stöberの吸収量は小さかった。	●細胞毒性に凝集は影響しない。 ●SNPの外表面積が細胞毒性に影響する。

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調整法/ 試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
66	Lee S, Yun HS, Kim SH. Biomaterials. 2011 Dec;32(35):9434 -43. Epub 2011 Sep 1	The comparative effects of mesoporous silica nanoparticles and colloidal silica on inflammation and apoptosis メソポーラスシリカナノ粒子とコロイダルシリカの炎症とアポトーシスにおよぼす効果比較	①メソポーラスシリカ(MPS) 空孔径 2.4nm を有す 6 角形のメソ構造となっている。 ・粒径:約 100nm ・表面積:1150m ² /g ・空孔体積:1.46cm ³ /g ②コロイダルシリカ(Col) 空孔は観察されない。 ・粒径:約 100nm ・表面積:40m ² /g ・空孔体積:0.29cm ³ /g ・MPS の合成 超分子ポリマーテンプレート法 テトラエチルシリケート(TEOS)と MPS のテンプレートとしてイオン界面活性剤(CTAB)を NH ₃ 存在下の水に混合、攪拌後、CTAB を除去 ・Col の合成 TEOS を NH ₃ 存在下のエタノール水に混合、攪拌 ・ポジティブコントロール DNFB(ジニトロフルオロベンゼン)	1. マウスマクロファージ(J774) ①細胞毒性 ・MPS、Col 濃度 0、0.1、10、100、1000 μg/ml ・培養期間:1 日および 3 日 ・MTT アッセイで細胞生存率を測定 ②アポトーシス細胞死 ・MPS、Col 濃度:100 μg/ml で 24h 培養 ・フローサイトメーターで細胞死を観察 ・カスパーゼ 3 の活性化の評価 ③炎症性サイトカインの発現 ・MPS、Col 濃度:100 μg/ml で 6h 培養 ・炎症性サイトカイン(TNF-α、IL-1β、IL-6)の発現を RT-PCR で評価 ④MAP キナーゼ、NF-κB の活性化 ・MPS、Col 濃度:100 μg/ml で 2h 培養 ・燐酸化反応で MAP キナーゼ(ERK、p38、JNK)を観察 ・IκB-α の劣化と p65 NF-κB の核移行をウェスタンブロットで観察 2. BALB/c マウス ・8 週齢 ⑤過敏反応 ・片側 1mg の MPS、Col を両耳に 3 日間塗布後、4 日および 6 日目に計測 ・体重測定 ・耳の厚さの変化 ⑥リンパ球増殖 ・⑤よりリンパ節を採取し、細胞培養し、リンパ球増殖増殖を計測	①細胞毒性 ・Col では 100 μg/ml で高い毒性を示した。 ・MPS では 100 μg/ml までは毒性を示さない。 ②アポトーシス細胞死 ・MPS は Col に比べ大幅に少ないアポトーシス細胞死を示した。 ・MPS は Col に比べカスパーゼ 3 の活性化は低い。 ③炎症性サイトカインの発現 ・MPS は Col に比べ、TNF-α、IL-1β、IL-6 などの炎症性サイトカインの発現は低い。 ④MAP キナーゼ、NF-κB の活性化 ・Col S は MP に比べ、MAP キナーゼの高度な活性化をもたらす。 ・Col S は、IκB-α の劣化と p65 NF-κB の核移行をもたらすが、MPS ではその程度が小さい。 ⑤過敏反応 ・1~6 日間で体重変化は認められない。 ・DNFB(ポジティブコントロール)と Col は、2 日目から耳の厚みの増加をもたらした。 ・MPS では厚み変化は小さい。 ⑥リンパ球増殖 ・DNFB はリンパ球増殖をもたらす。 ・Col と DNFB の併用はその度合を大きくする。 ・MPS と DNFB の併用では、その度合は小さい。	●MPS は Col に比べ in vitro の細胞毒性、炎症性因子の発現が低い。 ●MPS は Col に比べ in vivo での接触過敏症の発症が少ない。 ●MPS は Col に比べ良好な生体適合性を持つことが in vitro、in vivo の双方で確認された。

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調整法/ 試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
67	Li Y, Sun L, Jin M, Du Z, Liu X, Guo C, Li Y, Huang P, Sun Z. Toxicol In Vitro. 2011 Oct;25(7):1343- 52. Epub 2011 May 7	Size-dependent cytotoxicity of amorphous silica nanoparticles in human hepatoma HepG2 cells ヒト肝癌 HepG2 細胞における非晶質シリカナノ粒子のサイズ依存的細胞毒性	●4種類のシリカナノ粒子 ・粒径 Si498 :498nm Nano-Si68: 68nm Nano-Si43: 43nm Nano-Si19: 19nm ●Nano-Si19 以外は水中およびDMEM中で分散している。	●ヒト肝癌細胞(HepG2) ・24hDMEM中で培養後、シリカナノ粒子をDMEMで希釈し添加 添加濃度:12.5、25、50、100、200 μ g/ml ・添加後24hで各種評価 ①細胞毒性 ・上記処理後、10 μ lのWST-8 cell counting kitを加え、更に1h培養後、細胞生存率を測定 ②形態変化 ・シリカ100 μ g/mlで処理し、HEステインにより、観察 ③細胞膜の損傷 ・シリカ100 μ g/mlで処理し、LDHアッセイで測定 ④細胞内の活性酸素(ROS)発生 ・シリカ100 μ g/mlで処理し、DCFH-DAで処理し、活性酸素をDCFの蛍光分析で評価 ⑤DNA損傷 ・シリカ100 μ g/mlで処理し、コメットアッセイで評価 ⑥細胞周期停止 ・シリカ100 μ g/mlで処理し、フローサイトメトリーで計測 ⑦アポトーシス ・シリカ100 μ g/mlで処理し、フローサイトメトリーで計測	①細胞毒性 ・生存率は濃度に応じ低下する。 ・4種のシリカ粒子とも200 μ g/mlでは生存率を抑制する。 ・生存率は径に応じ減少するが、Si498では殆んど変わらない。 ②形態変化 ・粒子径が小さいほど形態変化は顕著となる。 ・多核細胞の比率は粒子径が小さいほど3.5%から25.5%に増加。 ・Si498は対照例と同じで0.2% ③細胞膜の損傷 ・LDH活性は粒子径が小さいほど増加する。 ・LDH活性と細胞生存率は有意な負の相関がある。 ④細胞内の活性酸素(ROS)発生 ・ROSレベルは粒子径が小さいほど増加する。 ⑤DNA損傷 ・DNA損傷率は粒子径が小さいほど増加する。 ⑥細胞周期停止 ・G0/G1期の比は粒子径が小さいほど徐々に減少する。 ・S期の比は粒子径が小さいほど増加する。 ・Nano-Si19では、S期とG2/Mの比の両方が増加した。 ⑦アポトーシス ・アポトーシスは粒子径が小さいほど4.2、11.8、21.6、40.9%と増加。	●シリカ粒子のHepG2細胞における細胞毒性は投与量、サイズへの依存性がある。 ●サイズが小さいほど毒性が強い。 ●微小シリカナノ粒子はHepG2細胞にDNA損傷、細胞周期停止、アポトーシスをもたらした。 ●ROSの生成は、この毒性に寄与しているとは言い切れない。

その他（酸化鉄）

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調整法/ 試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
68	Szalay B, Tátrai E, Nyíró G, Vezér T, Dura G. J Appl Toxicol. 2011 Dec 7. doi: 10.1002/jat.1779 . [Epub ahead of print	Potential toxic effects of iron oxide nanoparticles in in vivo and vitro experiments 酸化鉄ナノ粒子の in vivo および in vitro における潜在 毒性作用	①酸化鉄(2 価、3 価)ナノ粒子 (IONP) ・粒径:<50nm ・純度:≥98% ・BET 表面積:>60m ² /g 生理食塩水中に拡散	1. ラットによる in vivo テスト ・Wister ラット 雄 8 週齢 ・体重:250~270g ①一般毒性、病理組織テスト ・4 グループに分け気管に投与 無処理(UnC) 対照例(Con):生理食塩 1mg/kg 低投与(LD):IONP 1mg/kg 高投与(HD):IONP 5mg/kg ・投与後、1、3、7、14、30 日後に解剖し、臓器、 体重を検査 2. 細胞による in vitro テスト ②MTT アッセイ ・ベロ細胞 ・IONP 添加量:78~10000 μg/ml ・4h および 24h 培養後、細胞生存率を MTT アッ セイで調査 ③Ames アッセイ ・サルモネラ・ティフィムリウム TA98、TA100、 TA1535、TA1537 ・大腸菌 WP2uvrA ・IONP 添加量:6.9~5000 μg/培養皿 ・突然変異株の発生数で評価	①一般毒性、病理組織テスト ・体重は UnC、Con に比較し、LD、HD は顕著に減少した。 ・肺の重量は LD、HD で減少し肺線維 症が認められ、HDの方が重度であつ た。 ②MTT アッセイ ・4h の培養では差がない。 ・24h 培養では 2500 μg/ml 以上で生存 率が低下した。 ・IONP の毒性は穏やかである。 ③Ames アッセイ ・全 IONP 添加量で、突然変異発生は、 ネガティブコントロールと同様であつ た。 ・ポジティブコントロールは顕著な変異 原性を示した。	●in vitro で はIONPは 変異原性 を示さない が、弱い 細胞毒性 はある。 ●in vivo で はIONPは 弱い肺線 維症の 後、肺間 質性炎症 をもたら す。

(4) 有害性研究論文のまとめ

本節では、検索し、各文献のサマリーを作成した結果を概観し、*in vivo*を中心に、有害性研究の現状についてまとめる。

1) フラーレン

フルーレンについては、環境生物についての研究が多く、フルーレンを水に溶解させる際に使用した化学物質のが、環境生物への有害性の結果に与える影響についての全体的な理解がまだ不十分であることが、それを取り上げた Henry らの研究(03)で明らかである。

Shinohara らは(04)は、NEDO プロジェクトで行った研究をもとに、それまでの研究を総括して、吸入暴露と気管支内注入試験での C_{60} の肺滞留データを用いてラットの肺毒性に関する C_{60} の無毒性効果レベル(NOEL)を 3.1 mg/m^3 と推定した。この値は亜慢性毒性に対する推定値であり、これを基に 15 年暴露に対するヒトの時限許容暴露レベル(AEL-PL)が提案された。

2) カーボンナノチューブ

カーボンナノチューブについては、この 1 年間で約 40 件近くの研究が報告されており、ナノマテリアルの有害性研究で、群を抜いて関心を呼んでいるテーマである。しかも *in vivo* 研究が 6 割を占めている。しかし、ヒト健康への影響について最も有用な情報を与える吸入実験は、SWCNT、MWCNT について、1 件ずつしかなく、二つとも我が国の研究である。

① SWCNT

Morimoto ら(10)は、産総研が開発したいわゆるスーパーグロース CNT(SWCNT)の 4 週間吸入、90 日間観察の実験を、質量濃度(mg/m^3) 低 0.03、高 0.13 で雄 Wister ラットの全身暴露で行った。高低両濃度の SWCNT の暴露で BALF 中の全細胞数と好中球数ならびに肺中と BALF 中でのサイトカイン誘導好中球化学誘発物質(CINC 類)の濃度の増加は起らず、肺浸潤も確認できなかった。

Kobayashi ら(11)は、同じ試料で気管内注入実験を行った。注入量に依存して肺で炎症反応が引き起こされた。しかしながら肝臓、腎臓、脾臓や脳ではこの炎症反応は起らなかった。進行性の肺組織肥厚は SWCNT 暴露グループの最高暴露レベル(2 mg/kg)で確認された。しかしながら全暴露グループで注入 6 カ月後まで線維症、非定型病変あるいは腫瘍関連の発現は確認されなかった。肺沈着 0.04 mg/kg (2.2×10^{12} 繊維/kg)で肺炎は発生しなかった。これにより、無毒性量(NOEL)の判定に使用することが出来るとした。

Teeguorden ら(06)、Ravichendran ら(09)は、咽頭吸引で、Park ら(07)、Hsieh ら(12)は、気管注入で試験を行っている。試料は、すべて異なっている。Hsieh ら(12)は、プラスチックグラフを使用し、CNT は気道の過反応と、気流の閉塞を引き起こすことを見出している。

in vitro 研究では、Giorgio ら(13)が、マクロファージ細胞株を使用し、SWCNT、MWCNT とも、細胞膜を通過して、ROS 放出、細胞壊死、染色体変化を起こすが、アポトーシス、炎症反応を誘起しないとしている。

Hitoshi ら(17)は、2 種類の SWCNT、2 種類の細胞で試験し、SWCNT の物理化学特性によって、細胞の機能によって有害性に差があり、SWCNT の分散状態によっても異なる事を見出した。

Bianco ら(18)らは、CNT 表面の機能化により、生体適合性、生分解性を変えることができる事を示し、親水性部分の導入は CNT の生化学的反応性を低下させ生理学的環境(循環系や軟組織)に沿った移動を容易にするものであり、生分解性もまた化学的機能化と酸化酵素により可能になるとした。

Kisin ら(19)は、CNT、CNF、Asbesto の比較を行い、物質構造による単純な傾向はなく、エンドポイントにより強弱が変わる事を報告した。

② MWCNT

Morimoto ら(26)は、Nikkiso MWCNT を高度に分散し、雄 Wister ラットに、気管注入、全身暴露吸入実験(重量濃度 0.37 mg/m³)結果をまとめて報告した。これは NEDO プロジェクトによるものである。気管内注入では高濃度暴露時には持続的な肺炎症と CINC-1 の発現が確認され、低濃度暴露では一時的な肺炎症が起るに過ぎないことが示された。吸入では一時的且つ最小限の肺炎症と CINC-1~3 の発現が起ることが認められた。これらの実験に基づいて、15 年暴露に対するヒトの時限許容暴露レベル(AEL-PL)が提案された。

Pacurari ら(25)らは、Mitsui MWCNT の咽頭吸引の結果、肺の炎症と損傷、線維性反応と肺がんバイオマーカー遺伝子発現を報告している。

Erdeliv ら(27)は、Mitsui MWCNT、Carbon Nanotechnology, Inc. (U.S.A.) SWCNT を試料として、マウスの咽頭吸引実験を行った。これらの CNT に対する暴露は測定可能な全身性炎症性反応をもたらし、初期の影響は血液細胞中に主要なサトカインと炎症遺伝子発現の血清レベルの上昇を含んでいる。これに続いて初期の炎症マーカーの減少と予想された急性期反応が起る。暴露 24 時間以上では一貫性のある好酸球性応答と免疫活性に関連する一連のプロテインが明白となる。肺の CNT 暴露の評価値測定を示すマーカーは主として有害な心臓血管の影響と関連している、とした。また、Mercer ら(28)も、Mitsui MWCNT を試料として、マウスの咽頭吸引実験を行った。MWCNT 肺負荷の大部分は暴露の初期にもまた長期的にも肺泡マクロファージが占め、肺泡隔壁にその約8%が配送される。胸膜下組織に対しては比較的少ないが潜在的には重篤な負荷である。肺泡組織に送られる肺負荷は比較的低率ではあるが肺泡隔膜の結合組織の平均厚さはコントロール暴露の場合と比較して著しく増大している。また、MWCNT は肺の肺泡組織で進行性線維症を引き起こす可能性がある。FESEM と暗視野顕微鏡検査によれば MWCNT 凝集体が間質腔に侵入している。

Ranzani ら(29)は、Arkema MWCNT の単回、繰り返し咽頭吸引を行い、新たに使用した合成界面活性剤は、これまでに使用された分散剤と比較して、生体適合性もあり、MWCNT の分散にかなり効果的であり、この界面活性剤で分散された MWCNT を単回および複数回投与した際、気道全体にわたって分布し、また肺泡マクロファージと肺泡上皮細胞中に、また侵入した好中球中に存在している事を確認している。

Patlolla ら(30)は、Nano Lab Inc. (U.S.A.)の MWCNT の精製したもの、COOH 基で機能化したものをマウスの腹腔内に投与し、いろいろな肝臓毒性と酸化的ストレスバイオマーカーに及ぼす影響を検討した。MWCNT 暴露の肝臓の病理組織学はコントロール暴露と比較して肺組織の変化に顕著な影響を及ぼしていることを示しており、酸化的ストレス機構の活性化によりマウスの肝臓毒性を引き起こす可能性のあることを示唆している。

Jain ら(30)は、MWCNT をカルボキシル基で機能化したもの、元の MWCNT を、マウス尾静脈注射を行なった。MWCNT による毒性の発生は決定的に機能化密度に依存する。表面のカルボキシル基の密度が向上すると毒性は低下する。CNT により誘起された酸化性損傷度は機能化密度に依存しない。p-MWCNT と関連している金属不純物が原因で p-MWCNT により酸化性ストレスが誘起されたと推定される。

Kim ら(34)は、マウス腹腔に Hanwha Nanotech の MWCNT を投与し、*in vivo* 細胞小核試験を、また、*in vitro* Ames 試験を行った。その際、MWCNT のアスペクト比が異なる試料を調製した。直径が 10~20nm に対し、長さを約 10 μm のものと約 0.15 μm のものである。いずれの MWCNT も、*in vitro* 染色体異常試験法と *in vivo* 細胞小核検定法による検定では遺伝毒性がみられなかった。しかし、細胞増殖と細胞生存能力に悪影響をおよぼし、高アスペクト比 MWCNT は低アスペクト比 MWCNT より毒性は高かった。高アスペクト比 MWCNT は直接には遺伝子毒性や代謝活性化媒介遺伝毒性を引き起こさないが、遺伝子毒性は間接的に酸化ストレスや炎症を経由して発生するかもしれないとしている。

Donaldson が共著者である Osmond- McLeod ら(36)は、長さやバンドルの状態が異なるいろいろな MWCNT、及び SWCNT を使用し、生体を模した Gambles 溶液中での耐久性や腹腔投与による炎症誘発応答の違いを調査した。4 種のうち 3 種は耐久性を示したが、長い MWCNT は、繊維長の短縮と重量の減少を示した。炎症誘発可能性に関する試験は、*in vivo* での有害反応は耐久性とサンプル中で離散した長い CNT 群あるいは CNT 群の繊維形態の凝集体の存在の両者に依存することを明らかにした。耐久性があるが密接に凝集した束体の短い CNT SW はマウス中で最小の反応を引き起こし、一方 CNTLONG1 の純粋な、離散した、長い、薄い繊維はアスベスト様の応答を引き起こしたが、この応答は 15 μm より長い繊維比を軽減した化学処理の後その応答は減少した。これらの知見はバイオ耐久性と炎症誘発性とが全ての形態の CNT にわたって一貫性のあるものではないことを示す証拠をさらに付け加えるものであった。

Palomaki ら(37)は、Mitsui MWCNT を、ヒト末梢血単核球細胞から得られる単球とマクロファージに暴露した。長い針状の MWCNT がアスベストと同様な方法で NLRP3 インフラマゾームを活性化することができる事を示した。NLRP3 インフラマゾーム活性は ROS 生成、カテプシン B の活性等に依存することが知られている。これらの結果は長い針状の物質が有害な健康障害を引き起こすかも知れない機構に関して新規な情報を提供する。

3) 酸化チタン

酸化チタン粒子を肺に投入する *in vivo* 実験は、1 件のみで、皮膚投与が 3 件、経口投与が 1 件、ゼブラフィッシュを使用した研究が 2 件、*in vitro* が 3 件であった。

Leppoenen ら(45)は、チタンアルコキシドから製造した一次粒径約 20nm の凝集粒子を、濃度: 8、20、30mg/m³ で 1 時間のマウスへの暴露を、単回及び繰り返し(1 時間/日 × 4 日/週 × 4 週間、計 16 時間)行い、気流障害、知覚刺激、肺炎症状等を調べた。TiO₂ 微粒子への急性曝露と繰り返し曝露の主な効果は、気流障害であり、それは調べた全ての濃度で生じて、呼吸空気流量の減少として観察された。知覚と肺刺激は、急性曝露と繰り返し曝露の双方で観察されたが、その能力は低いと結論された。

Xu、Tsuda ら(38)は、TiO₂ ナノ粒子(ルチル、石原産業製、平均一次粒径 20nm)ラット背中の皮膚に塗布し、UV 照射した。皮膚腫瘍の出現率、ラット皮膚内の TiO₂ 粒子有無、ラット皮膚組織のサイトカイン分析等を行った結果、TiO₂ ナノ粒子を局所に施用しても、安全であり、皮膚または他の器官に対する発癌性はない、とした。

Monteiro-Riviere ら(41)は、ともに BASF 社製の TiO₂ 粒子(14-16nm、ルチル)、ZnO 粒子(140nm)を使用して、親水性、疎水性の 4 種のサンスクリーン製剤を調製し、UVB 暴露による日焼けブタの背中に暴露し UV 照射した。日焼けした皮膚は、日焼け止め製剤に存在する TiO₂、ZnO の角質層への浸透をわずかに高めた。ほとんどの場合、角質層への浸透は、ZnO より TiO₂ の方が大きかった。通常皮膚と UVB 日焼けした皮膚への日焼け止め製剤の適用は、上皮層の上部に TiO₂ と ZnO の最小の浸透を示唆する。ただし、これに関する全身の吸入の証拠はない。

Furukawa ら(44)は、酸化チタンナノ粒子 2 種、被覆したものとしていないもの(石原産業製、スピンドル形状で、大きさ-長軸 50-100nm、-短軸 10-20nm)をマウス背中皮膚に投与した。被覆ならびに非被覆酸化チタンナノ粒子は、双方とも皮膚癌誘発の危険性は無い。すなわち、酸化チタンナノ粒子を皮膚に用いても、皮膚癌発生の心配はない、との結論を得た。

Lyudmila ら(43)は、平均粒径 33nm と 160nm のアナターゼ粒子を、経口投与した。二酸化チタンのマイクロ/ナノ粒子の経口投与は、遺伝毒性と細胞毒性に関するいくつかのパラメータを有意に増大させる。この結果は、用量と反応の関係が不明であるものの、遺伝毒性に関するこれまでの報告を支持している。この知見は、TiO₂ 粒子への曝露による健康危険

の可能性を示す。ただ、ナノ粒子とマイクロ粒子の影響の相違については、更なる調査を要するとした。

酸化チタンナノ粒子をゼブラフィッシュの胚に投与した実験(Javanovic ら(39))では、遺伝子表現パターンに著しい変化を引き起こした。ナノ粒子の暴露により 24 時間周期リズム、細胞キナーゼ活性、細胞内移動と免疫反応に関連する遺伝子に変化が起ったとしている。酸化亜鉛などの粒子とともに、ゼブラフィッシュに急性暴露した場合(Xiong ら(42))は、TiO₂ ナノ粒子の急性毒性は、TiO₂ 粗粒子より有意に高い。ZnO ナノ粒子は、ZnO 粗粒子と同程度に毒性であり、ZnO から放出される Zn²⁺は毒性に寄与する。しかし、それは主要な致死機序でない。金属酸化物ナノ粒子の毒性が粒径によるものかどうかを明らかにするためには、更なる研究が必要であるとしている。

Park ら(47)は、ポリスチレンのラテックスビーズ(アミン修飾、50nm)、TiO₂(25nm 未満)の皮膚刺激、光毒性、増感作用の可能性の分析を行い、これらのナノ粒子は光毒性、急性皮膚刺激症、皮膚感作性をもたらさない、局所リンパ節試験結果から、それ自体皮膚感作物質ではない、との結論を得た。

4) 酸化亜鉛

酸化亜鉛については、溶解による Zn²⁺の影響について、Donaldson らが調査している。

Ho ら(48)は、酸化亜鉛ナノ粒子(~35nm)と微粒子(~250nm)を低濃度、中濃度、高濃度の 3 濃度で、雄SD系のラットに 6 時間単回吸入曝露し、肺炎症、損傷と酸化ストレスに関する効果を調査した。その結果を、質量濃度、表面積濃度、数濃度で比較した。質量濃度と表面積濃度の双方とも、好中球の割合、好中球の数と全体細胞と有意に関連づけられ、ZnO ナノ粒子の毒性のための測定基準として使えることがわかった。

Cho, Donaldson ら(49)は、雌ウイスターラットに 10.7nm と 137nm の酸化亜鉛粒子を気管注入、肺吸引させた。また Zn²⁺の気管注入も行った。ZnO ナノ粒子の注入は、多様な病理学的変化(好酸球増加、気道上皮細胞損傷、気管支中心の肺線維形成と肺拡張不全など)を誘起する。これらは主に、ファゴソームの酸性環境における ZnONP のイオン溶解による。リソソームの酸性環境下での ZnO ナノ粒子のイオン溶解はリソソーム不安定化と細胞死を引き起こす。注入経路に沿って広く生じた細胞死は、重度細胞死とその後の病原性の主要な要因であるとした。

Surekha ら(50)は、63nm のナノ ZnO 粒子と μ サイズの ZnO 粒子の経皮曝露を行った。ナノ ZnO 粒子の 75、180、360mg/kgbw の経皮曝露は、SDラットに対する毒性を示さなかった。繰り返し塗布の結果、低用量のナノ ZnO は、高用量とコントロールと比較してコラーゲン減少を引き起こした。しかしながら、これらの効果は 14 日間で可逆的だった。

Cho, Donaldson ら(51)は、3 種の金属ナノ粒子(NP)、酸化ニッケルナノ粒子 NiONP-粒径:10-20nm、酸化亜鉛ナノ粒子 ZnONP-粒径:10nm 以下、酸化銅ナノ粒子 CuONP-粒径:50nm 以下について、ヒト上皮細胞系(A549)の細胞毒性調査と雌ウイスターラットへの気管内投与を行った。その結果、金属酸化物 NP から放出される可溶性イオンが、肺の炎症誘発性において演ずる役割は NP の種類に特定の炎症の急性相に限定される。ZnONP 可溶性成分は *in vitro* での全ての炎症誘発性分析で活性だったが、*in vivo* では非常にわずかの毒性しかなかった。これは、Zn イオンは、*in vivo* では裏づけられない偽陽性効果を *in vitro* で作り出すことを示唆している。

5) 銀

銀については、多様な実験方法による研究が報告されている。

Larissa ら(55)は、銀ナノ粒子(粒径分布(二峰性)-第 1 ピーク:5nm(全体粒子数の 85~90%)-第 2 ピーク:22nm(全体粒子数の 15%未満)を、亜急性吸入曝露(4h/d × 5d/w ×

2w・暴露濃度:3.3±0.5mg/m³)した。3.3mg/m³での銀ナノ粒子の吸入は、軽微な肺毒性または炎症を誘起するが、この炎症反応は、銅のナノ粒子よりはるかに小さい。より高濃度、長期間の銀ナノ粒子への曝露が、慢性効果や他の器官への転座の可能性を有するかどうかは、さらなる研究によって評価する必要があるとした。

Parkら(54)は、凝集粒子径:243.8nmの銀ナノ粒子を、ICRマウス(雄)の気管内注入を行った。

銀ナノ粒子は、マウスの肺に Th2 タイプ優性炎症反応と組織損傷を誘起する可能性があるとして結論づけた。

Katinら(58)は、液相還元で製造した銀ナノ粒子と酢酸銀とをマウスに経口投与した。ともに同様に臓器に分布する。Agナノ粒子が胃腸系で溶解して吸収されるのか、あるいは、器官と組織に無傷のナノ粒子として転座するのどうかを明らかにするための、さらなる研究が必要である、今後の研究では、ナノ粒子が溶解して銀イオンを放出することが考慮されなければならない。また、毒性の比較のために粗粒子も実験範囲に含めることが望ましいとしている。

Koraniら(59)は、Agナノ粒子をモルモットに投与する急性経皮毒性及び亜慢性経皮毒性試験を行った。0.1mg/kg(100µg)以上の銀ナノ粒子への曝露は、肝臓、脾臓、皮膚の軽微な損傷を誘起する可能性がある、同じ経路で投与されるときでも、銀ナノ粒子と銀の毒性は異なる、などの結論を得たが、低用量域における曝露期間と組織病理変化の間の関係、さらには、銀ナノ粒子の毒性に及ぼす粒子形状と大きさの影響に関するさらなる研究が必要であるとした。

Maneewattanapinyoら(60)は、コロイド状銀ナノ粒子(粒径:10~20nm)のマウスへの急性経口毒性試験、モルモットへの急性眼刺激性及び急性経皮毒性試験を行ったが、結果的に比較的安全であることが示された。

6) シリカ

アモルファスシリカが3件、その他の形態の二酸化珪素が4件である。

Hiraiら(61)は、マウスに皮下注射し、免疫調節作用のアモルファスナノシリカ粒子のサイズ依存性を調べた。サブミクロンサイズのナノシリカの皮下注射はSL8特異的CD8⁺T細胞の誘発には顕著でない。100nm未満のナノシリカは大幅にSL8特異的CD8⁺T細胞応答を高める。更に小径の方が顕著になる

Isodaら(62)は、70nmのシリカ粒子とそれをアミノ基またはカルボキシル基で修飾したものを静脈注射し、急性及び慢性肝毒性を調べた。急性肝毒性は、修飾によって弱まる。また、肝線維症の範囲も修飾によって小さくなり、肝線維コラーゲンもなくなった。

Greishら(64)は、非多孔質シリカナノ粒子とポリ(アミドアミン) dendrimerについて、粒径、修飾基の影響を、静脈注射、経口投与などで調べた。Dendrimerでは毒性はサイズによらず、表面修飾基(電位)の影響を受ける。-OH基、-COOH基の投与許容量は-NH₂基の50倍になり、-NH₂基は血管内凝固などの血液学的合併症を起こす。シリカナノ粒子では対照的に、表面修飾に無関係に、サイズの大きい方が小さい粒子よりも毒性が高い。

Leeら(66)は、空孔径2.4nmを有する約100nmのメソポーラスシリカ(MPS)と空孔が観察されないコロイダルシリカ(Col)を比較した。MPSはColに比べ*in vitro*の細胞毒性、炎症性因子の発現が低く、MPSはColに比べ*in vivo*での接触過敏症の発症が少なかった。