

平成23年度厚生労働省  
請負調査報告書

# 平成23年度ナノマテリアル安全対策調査事業 報告書

平成24年3月  
JFEテクノリサーチ株式会社

## はじめに

ナノテクノロジーは、情報通信、医療、環境・エネルギーなど、国民生活を豊かにし、健康を増進し、持続的な成長をになう分野の先端的な発展に貢献する共通基盤技術として、大きな便益が期待され、世界各国で注力されている技術である。ナノテクノロジーの健全な発展を図ることは、ものづくり先進国であるわが国にとって極めて重要である。そういった中で、一部のナノマテリアルについては、一般消費者向けの製品への利用が拡大しており、今後も新たな製品が開発されることにより、ナノマテリアルがさまざまな用途に用いられることが予想される。

他方で、ナノマテリアルの安全性に関しては、現在までに人の健康に影響を及ぼすという報告はないものの、動物実験データも少なく、人の健康への影響を予想するために十分なデータが得られた状況にはない。しかしながら、粒子のサイズが小さくなること等により、ナノマテリアルが一般の化学物質とは異なる有害性を有することが示唆されている。他方、リスク管理の観点からナノマテリアルの動物実験の毒性データのみならず、人が実際にどれだけナノマテリアルにさらされるかを把握する必要がある。

ナノマテリアルに関するリスク管理の観点、国際動向を把握しつつ、生体への影響やばく露などに関する情報を収集する必要がある。さらに、これまで集積された知見等を踏まえて、ナノマテリアル含有製品に係るリスク手法の検討を行う必要がある。

以上の状況を踏まえて、消費者向け製品への利用が拡大されつつあるナノマテリアルの安全対策を検討する上で必要となる基礎資料を作成することが重要である。

本報告書は、ナノマテリアルの国内での使用状況、ナノマテリアルの安全性に関する文献情報のまとめ、主要国のナノマテリアル規制動向および海外行政機関等が出した報告書の翻訳等を収録したものである。本報告書が、人の健康を確保した上での、ナノテクノロジーの健全な発展の一助になれば幸いである。

2012年3月  
JFE テクノリサーチ株式会社

## 目次

概要	i
1. 消費者製品等に含まれるナノマテリアル情報の収集	1
(1) 調査方法	1
(2) 調査結果	1
1) 対象ナノマテリアルの使用状況まとめ	1
2) フラーレン(誘導体を含む)	3
3) 単層カーボンナノチューブ	9
4) 多層カーボンナノチューブ	14
5) ルチル型酸化チタン	21
6) アナターゼ型酸化チタン	27
7) ナノシリカ	33
8) ナノ銀	41
2. ナノマテリアルの安全性等に関する文献調査	47
(1) 検索方法	47
(2) 文献分類表	48
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に出てきた材料である。	48
(3) 文献サマリー	49
フララーレン	49
SWCNT	57
DWNT	83
MWCNT	85
TiO <sub>2</sub>	109
ナノ銀	124
シリカ	133
その他(酸化鉄)	140
(4) 有害性研究論文のまとめ	141
3. 国際動向調査	146
3-1 主要国におけるナノマテリアルに関する規制状況、	146
(1) 米国	146
(2) EU	150
(3) ドイツ	151
(4) フランス	152
(5) デンマーク	152
(6) カナダ	152
(7) オーストラリア	153
(8) 韓国	154
(9) 中国	159
3-2 OECD および ISO における安全対策等に関する対応状況	162
(1) OECD 工業ナノ材料作業部会	162
1) 第9回工業ナノ材料作業部会会合(WPMN9)	162
2) スポンサー会合	169

3)	SG4対面会議	170
(2)	ISO	171
1)	ISO/TC229 の概要	171
2)	2011 年度の会議開催状況	171
3)	2011 年度の進捗内容	171
3-3	主要な学会の内容	173
(1)	Nanocarbon 2011 in Nagano	173
(2)	Inno.CNT ワークショップ(カーボンナノチューブの計測と暴露評価)	183
4.	海外行政機関、国際機関の報告書の分析と主要なものの翻訳	201
(1)	文献の選択	201
(2)	添付文献リスト	202

## 概要

ナノテクノロジーは、人類に大きな便益をもたらすことが期待され、一般消費者向けの製品への利用が拡大している。一方、ナノマテリアルの安全性に関しては、粒子のサイズが小さくなること等により、ナノマテリアルが一般の化学物質とは異なる有害性を有することを示唆する結果もある。このため、人が実際にどれだけナノマテリアルにさらされるかを把握し、リスク管理をどのように行うかの検討が必要である。このような状況で、をナノマテリアルの安全対策を検討する上で必要となる基礎資料を集めることが重要である。

本調査では、ナノマテリアルの国内での使用状況、ナノマテリアルの有害性に関する文献、主要国のナノマテリアル規制動向および海外行政機関等が出した報告書の中で重要と思われるものの翻訳を行った。

製品に含まれるナノマテリアルとして、フラーレン、カーボンナノチューブ、酸化チタン、ナノシリカ、ナノ銀を対象にその使用状況を、ナノマテリアル製造者にヒアリングし、物質ごとに、国内使用量、最終製品、最終製品中のナノマテリアル含有量等をまとめた。

また、ここ1年のフラーレン、カーボンナノチューブ、酸化チタン、酸化亜鉛、ナノシリカ、ナノ銀の有害性試験の文献を調査し、重要と思われる68論文を選んで要約した。

国際動向調査では、以下の調査を行った。

- ・ 米国、EU 等主要7カ国/地域を対象にナノマテリアルの規制状況
- ・ OECD および ISO の状況
- ・ 主要な学会情報
- ・ 海外行政機関の報告書の翻訳

主要な学会として「Nanocarbon 2011 in Nagano」と「Inno.CNT ワークショップ」の報告をまとめた。

海外行政機関の報告書の翻訳としては、欧州議会 STOA (Science and Technology Options Assessment) の「ナノセーフティ:人工ナノ粒子のリスク管理」、米国 EPA の「HeiQAGS-20 の条件付登録決定文書」およびデンマーク環境庁プロジェクト報告「ナノマテリアルのリスク基本情報」の抜粋を選択し、翻訳文を付属資料とした。

## Summary

Nanotechnology is expected to bring a significant profit to people and the use for consumer products is expanding. On the other hand, about the safety of nanomaterials, some experiments suggest that nanomaterials are more hazardous than the common chemical substance because of the smaller particle size. Accordingly, it is necessary to understand the how much people might be exposed to nanomaterials and to consider the introduction of effective risk management. In this situation, it is very important to gather basic information to develop the safety measures of nanomaterials.

In this study, the use of nanomaterials in Japan, papers on hazardous study of nanomaterials, regulatory activity on nanomaterials of key countries and the translation of important reports published by foreign governments or organizations.

For the study of use of nanomaterials in consumer products, fullerenes, carbon nanotubes, titanium oxide, nano-silica and nano-silver were chosen and these sales volume, the end products, contained amounts of those materials, etc. are summarized.

For the study of on hazard of nanomaterials, the papers on hazardous study of fullerenes, carbon nanotubes, titanium oxide, zinc oxide, nano silica, and nano silver were retrieved and important 68 papers were selected and summarized.

As the study of the overseas activity, the following investigations were conducted.

- Regulatory activity on nanomaterials for seven major countries/areas, such as the U.S. and EU.
- The activity of OECD and ISO
- Information of important conferences on nano-safety
- Translation of the reports on nano-safety of overseas governmental agencies

The reports of "Nanocarbon 2011 in Nagano" and "Inno.CNT workshop" were summarized as important conference information.

Three reports from overseas governmental agencies, "NanoSafety-Risk Governance of Manufactured Nanoparticles" of the European Parliament STOA (Science and Technology Options Assessment), "Decision Document: Conditional Registration of HeiQ AGS-20 as a Materials Preservative in Textiles" of U.S. EPA and the extract of the Danish Ministry of the Environment's project report "Survey on basic knowledge about exposure and potential environmental and health risks for selected nanomaterials" were chosen and the translations were attached as appendices.

## 1. 消費者製品等に含まれるナノマテリアル情報の収集

### (1) 調査方法

#### 調査対象ナノ物質

本調査では、市場での流通量が多いもの、今後伸びが期待される物質から以下の6物質を選んで調査を行った。

- ・ フラーレン
- ・ 単層カーボンナノチューブ
- ・ 多層カーボンナノチューブ
- ・ 二酸化チタン(ルチル型およびアナターゼ型)
- ・ ナノシリカ
- ・ ナノ銀

#### 調査方法

対象ナノ物質を製造しているメーカーからのヒアリングを行った。  
一部の物質については混合部材や最終製品メーカー、研究機関からのヒアリングも行った。

### (2) 調査結果

#### 1) 対象ナノマテリアルの使用状況まとめ

調査結果のまとめを表 1-1 に示す。  
各物質の調査結果を2)以下に記す。

表 1-1 ナノ物質の使用状況まとめ

材料名	市場規模 (2010年実績)	成長性	利用分野											原料・素材区分	製品・使用区分	具体的用途例	用途別シェア			
			電気・電子	自動車	機械	建築・土木	食品	医療	化粧品	スポーツ用品	環境浄化	衣料品	日用雑貨					育児/介護用品		
フラーレン	2t 9億円	→	△	○												①	④	太陽電池、トランジスタ・ダイオード、他	43%	
								△									③	③		エンジンオイル・カーエアコン用潤滑剤
									○								③	③		癌治療薬、診断薬、他
										○							①	①		化粧品、美容液、クリーム、他
単層カーボンナノチューブ	0.08t 24億円 (内製分を含む)	→	△													①	④	電気二重層キャパシタ、燃料電池、他	100%	
			△	△													①	①		タッチパネル
								○									①?	④		水素貯蔵タンク
								△									①	①		細胞培養用基板
多層カーボンナノチューブ	30t 4億7,000万円	↗	○													①	①	DDS、癌治療薬	87%	
			△	○												①	①	電子部品搬送用トレイ/容器類		
				△													①	④		燃料チューブ
																	③	②		二次電池、キャパシタ
大径多層カーボンナノチューブ	75t 21億円	↗	○													③	②	電着塗装	10%	
																	①	①		ゴルフクラブ、テニスラケット、他
(ルチル型)酸化チタン	790t 29億5,000万円	→	○													③	③	サンスクリーン製品、ファンデーション、他	73%	
			○	○		○										③	④	トナー(外添材)		
			△													③	②	白色塗料		
			△													③	②	ディスプレイ(反射防止膜、他)		
(アナターゼ型)酸化チタン	150t 6億1,000万円 (大型排ガス処理用触媒担体用途を含まず)	→	○													③	②	太陽電池	87.00%	
			○													③	②	光触媒コーティング(建築外装、内装、道路製品)		
				○												③	②	光触媒フィルター(空気清浄機、脱臭機、他)		
																③	②	光触媒フィルター(排ガス/排水処理設備)		
ナノシリカ(フェームドシリカ)	19,100t 195億円	→	○													③	②	光触媒親水性(サイドミラー他)	13.00%	
																①、③	①、②	光触媒(消臭・抗菌繊維製品)		
																③	②	光触媒(消臭・抗菌スプレー)		
																③	②	光触媒コーティング(まな板、包丁、他キッチン用品)		
ナノシリカ(高純度コロイダルシリカ)	1,840t 28億4,000万円	→	○													③	②	光触媒コーティング(シーツ等)	57%	
																③	②	触媒担体他		
				○	○											③	①	シリコン製品(パッキン、スイッチ類、他)		
																③	①	シリコン製品(自販機チューブ)		
ナノ銀	3.2t 13億6,000万円	↗	○													③	①	シリコン製品(シール剤、ホース類、他)	43%	
			○													③	①	シリコン製品(チューブ/カテーテル類、他)		
			○													③	①	シリコン製品(キッチン用品、他)		
																③	①	シリコン製品(哺乳瓶・ニップル、おしゃぶり、他)		
ナノシリカ(高純度コロイダルシリカ)	1,840t 28億4,000万円	→	○													③	①	シリコン製品(玩具)	91%	
																③	①	シリコン製品(シーリング、ガスケット、他)		
																③	③	歯磨き粉、ファンデーション、制汗剤、他		
																③	②	高吸水性ポリマー(おむつ、生理用品、他)		
ナノ銀	3.2t 13億6,000万円	↗	○													③	②	インクジェット用紙	9%	
			○													③	③	電子部品研磨剤		
			○													③	②	インクジェット用紙		
																③	④	プリント基板配線材		
ナノ銀	3.2t 13億6,000万円	↗	○													③	②	コーティング(携帯電話筐体、他)	99.70%	
			○													①、③	①、②	樹脂成形品(家電部品)		
			○													①、③	①、②	包装材料(トレイ、袋、他)		
																①	①	歯科治療材料		
ナノ銀	3.2t 13億6,000万円	↗														③	②	カード類	0.30%	
																③	③	消臭・抗菌スプレー		
																①、③	①、②	タオル、下着、靴下等		
																③	②	水処理用フィルタ		
ナノ銀	3.2t 13億6,000万円	↗														①、③	①、③	石鹸、シャンプー、歯磨き、他		

商業化状況 ○: 商業化、 △: 技術開発、用途開発中  
 製品状態区分 ①: 樹脂、ゴム等常温固体状基材中に含有、 ②: フィルム、樹脂上にコーティング、  
 ③: 常温で液体、流体(ゲル、粉体状)の混合物成分、 ④: 部品等成型品中に含有



2) フラーレン(誘導体を含む)

①製品概要

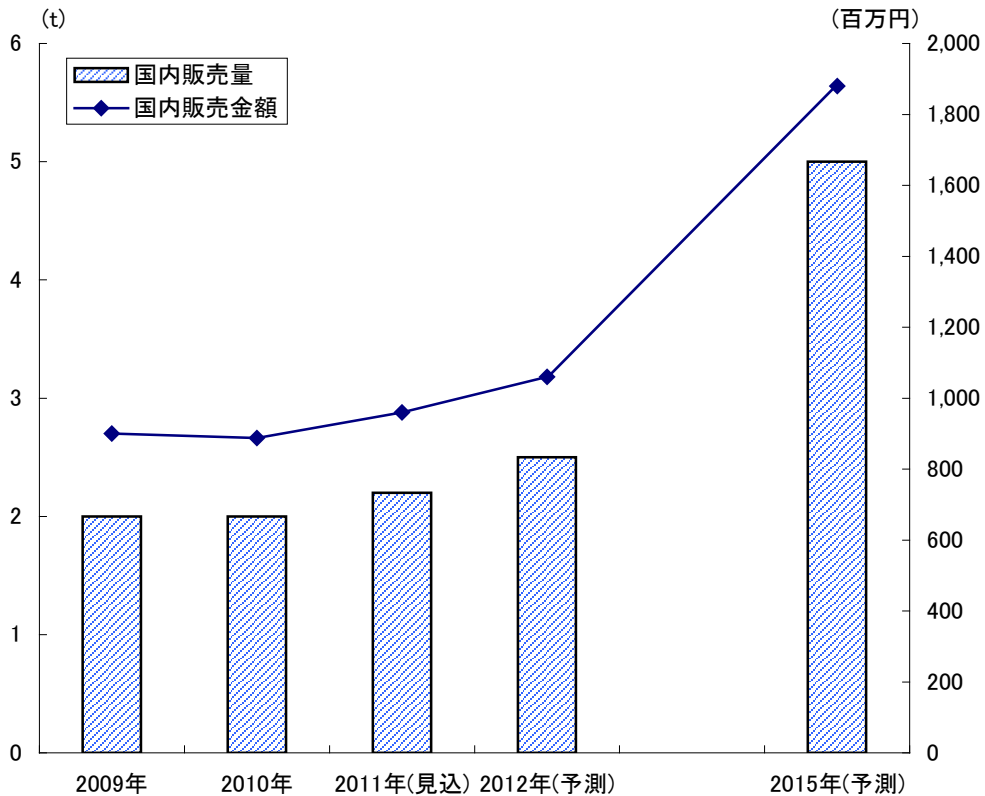
サイズ	[一次粒子] 0.7~1.0 nm [二次粒子] 20~40 μm			
形状	C60-サッカーボール状の結晶構造			
計測技術	誘導回折格子散乱法			
物性	項目	単位	C60	C70
	分子量	—	720	—
	密度	g/cm <sup>3</sup>	1.729(5k、計算値)	1.693(室温)
	融点	°C	1,180	—
	昇華熱	Kcal/mol	38~40	43~45
	蒸気圧	torr	1.9 × 10 <sup>-5</sup> (430°C)	1.4 × 10 <sup>-5</sup> (430°C)
			5 × 10 <sup>-4</sup> (500°C)	2 × 10 <sup>-4</sup>
			1 × 10 <sup>-3</sup> (600°C)	7 × 10 <sup>-3</sup> (600°C)
	熱容量(常圧)	J/kmol	500(室温)	680(室温)
熱伝導率	W/mK	0.4(室温)	—	
機能/特性	①溶媒に可溶(種類により溶けにくいものもある)			
	②化学修飾が容易			
	③重合が可能			
	④電子親和性			
	⑤ラジカル補足能			
	⑥光エネルギーを吸収しやすい			
	⑦内側の空孔に金属原子を内包できる			
製造会社	[国内]			
	■ フロンティアカーボン(株)			
	■ 本荘ケミカル(株)			
	■ (株)イデアルスター			
	■ ビタミン C60 バイオリサーチ(株)			
	(三菱商事系列、フラーレン自体は本荘ケミカルより購入。化粧品原料を製造販売。)			
■ FLOX(株)				
[海外]				
■ TDA Research				
■ Material Technologies Research				

## ②国内市場動向

(単位:t、百万円)

	2009年	2010年	2011年(見込)	2012年(予測)	2015年(予測)
国内販売量	2	2	2	3	5
前年比	—	100.0%	110.0%	113.6%	200.0%
国内販売金額	900	888	960	1,060	1,880
前年比	—	98.7%	108.1%	110.4%	177.4%

[富士キメラ総研推定]

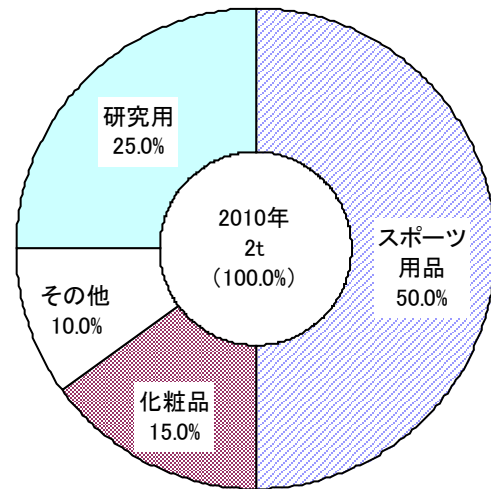


- ・ フラーレンの国内市場規模は、2010年実績で2t、9億円程度と推定される。2003年以降、スポーツ用品、2005年以降は化粧品用途で用途開拓が進んでいる。
- ・ フラーレンは、従来物質にはない様々な機能特性を有しており、現在も研究開発が活発に進められている。
- ・ 特に、有機薄膜太陽電池や燃料電池用電解質膜等のエレクトロニクス分野やがん治療、DDS用キャリア等の医療分野での需要形成が期待されている。
- ・ 2010年には、フラーレン大手のフロンティアカーボン(株)が有機薄膜太陽電池の超高純度フラーレン誘導体PCBMを発売している。
- ・ まだ、研究開発レベルのものが多いが、これら新規用途が立ち上がってくれば、大きく需要が拡大する可能性を秘めている。

### ③主要用途構成

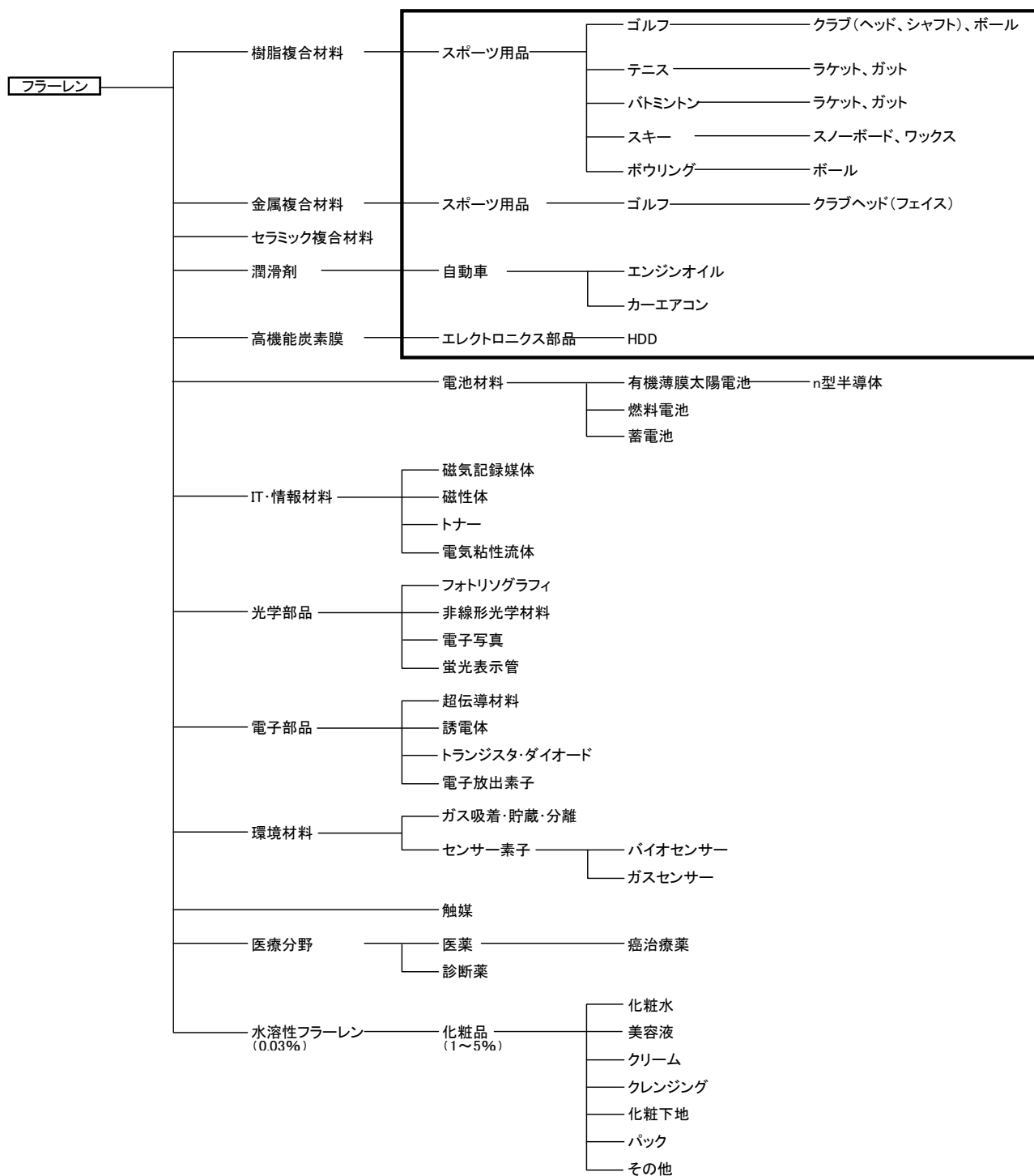
用途	販売量(t)	構成比
スポーツ用品	1.0	50.0%
化粧品	0.3	15.0%
その他	0.2	10.0%
研究用	0.5	25.0%
合計	2.0	100.0%

[富士キメラ総研推定]



- ・ フラーレンは、2003年にボウリング・ボールやゴルフクラブ・ヘッド(現在は製造を中止した)に採用されたのを皮切りにスポーツ用品での利用が拡大した。
- ・ ゴルフクラブ・シャフト(2004年)、バトミントン・ラケット(2004年)、テニス・ラケット(2005年)、バトミントン/テニス・ガット(2005年)、スキー・ワックス(2005年)、スノーボード(2005年)、ゴルフ・ボール(2006年)と相次いで新商品が上市され、当該品需要の50.0%を占めている。
- ・ 2005年には、フラーレンの抗酸化作用に着目した化粧品原料への利用がはじまり、利用が広がっている。
- ・ 現在、『フラーレン配合』化粧品は、化粧品市場において確固とした地位を確立しており、今後も、利用拡大が期待できる。
- ・ その他、商業化されている用途としては、潤滑剤や高機能炭素膜等がある。
- ・ このほか、フラーレンの持つ電気特性、熱特性、機械特性等を活かした応用研究も進められており、研究用の需要があり、有機薄膜太陽電池用(n型半導体)等のエレクトロニクス分野やがん治療等の医療分野での需要開拓が見込まれる。

#### ④主要用途における製品フロー



□は、商業化されている用途

⑤利用事例

製品名	化粧品 (化粧水、美容液、クリーム、クレンジング、化粧下地、パック、他)												
含有形態	<p>水溶性フラーレン</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・フラーレンにポリビニルピロリドン(PVP)、1,3-ブチレングリコール(BG)を配合し、フラーレンが水に分散しやすくしたもの。</li> </ul> <p>【Radical Sponge<sup>®</sup>成分構成】</p> <table border="1" data-bbox="504 528 1362 607"> <tr> <td>フラーレン</td> <td>PVP</td> <td>BG</td> <td>水</td> </tr> <tr> <td>&lt;0.03%</td> <td>10.0%</td> <td>75%</td> <td>&gt;14.97%</td> </tr> </table> <p style="text-align: right;">[ビタミン C60 バイオリサーチ(株)製品データ]</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・油性化粧品用に植物性スクワランにフラーレンを溶解させたものも、2009年に開発されている。</li> </ul> <p>【LipoFullerene<sup>®</sup>成分構成】</p> <table border="1" data-bbox="504 752 1362 831"> <tr> <td>フラーレン</td> <td>スクワラン</td> </tr> <tr> <td>&lt;0.03%</td> <td>&gt;99.97%</td> </tr> </table> <p style="text-align: right;">[ビタミン C60 バイオリサーチ(株)製品データ]</p>	フラーレン	PVP	BG	水	<0.03%	10.0%	75%	>14.97%	フラーレン	スクワラン	<0.03%	>99.97%
フラーレン	PVP	BG	水										
<0.03%	10.0%	75%	>14.97%										
フラーレン	スクワラン												
<0.03%	>99.97%												
1 製品当たりの使用量	<p>◆1.0～5.0% (水溶性フラーレン(Radical Sponge<sup>®</sup>)としての含有量)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・化粧品用途でフラーレン配合の効果を十分に発現させるための配合率の基準は1%以上といわれている。</li> <li>・濃度 1%以上のフラーレンを含んだ化粧品は、化粧品原料フラーレンの供給元であるビタミンC60バイオリサーチ(株)の商標、ロゴマークが表示されているものが多い。</li> <li>・化粧品の効用は、単一成分にのみで決定するものではないため、フラーレン濃度が1.0%未満の商品もあるが、一般的にフラーレン化粧品とはいわない。</li> </ul>												
特色	<p>①抗酸化作用</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・フラーレンは、過酸化物を吸収する特性を有し、肌の老化原因である活性酸素を吸収する抗酸化作用(ビタミンCの172倍)がある。</li> <li>・それにより化粧品に配合した場合、下記の効能がある。             <ul style="list-style-type: none"> <li>a. 皺、たるみ防止</li> <li>b. メラニン形成抑制(シミ/ソバカス防止、美白)</li> <li>c. 毛穴の引き締め(育毛)</li> <li>d. 脂質の酸化抑制</li> <li>e. セルライト抑制</li> </ul> </li> </ul>												

製品名	潤滑剤
含有形態	<p>基油にフラーレン(C60/C70 他の混合体)を添加</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ オレフィン系油類等のベースとなる基油にフラーレンを添加して使用している。</li> <li>・ フラーレンは、C60 の他、C70 等を含んだ混合体が利用されるケースが多い。</li> </ul>
1 製品当たりの使用量	<p>◆ <u>0.05～5%(0.5～1%が主流)</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ フラーレンを添加してその効果が発現するには、最低 0.05%の添加が必要といわれている。また、フラーレンの添加量が多いと基油に十分に溶解しない。</li> <li>・ 現在、商品化されている製品や試作品では、フラーレンを 0.5～1%程度添加したものが主流となっている。</li> </ul>
特色	<p>&lt;エンジンオイル潤滑油&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ エンジンオイルが形成する低摩擦潤滑皮膜に対してフラーレンが低温域での潤滑皮膜形成を促進する働きをする。</li> <li>・ 加えて、フラーレンが形成され潤滑皮膜と動部品の間で介在することで潤滑皮膜との相乗効果により低摩擦効果を向上させる役割も担っている。</li> <li>・ 低温域での低摩擦効果を向上させることによって、パワー、トルクの向上と低摩擦を両立させると共に、エンジン摺動部品の精度維持、ノイズ低減、油温上昇抑制、清浄分散性向上等の効果もある。</li> </ul> <p>&lt;カーエアコン用オイル潤滑油&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 上記と同様の効果で、カーエアコンコンプレッサの潤滑性を向上させ、パワーロスを軽減し、エアコン使用時の燃費改善に繋がっている。</li> <li>・ また、冷房効率の向上やコンプレッサの作動音、振動を軽減することで車内環境を快適にすることができる。</li> </ul>

### 3) 単層カーボンナノチューブ

#### ①製品概要

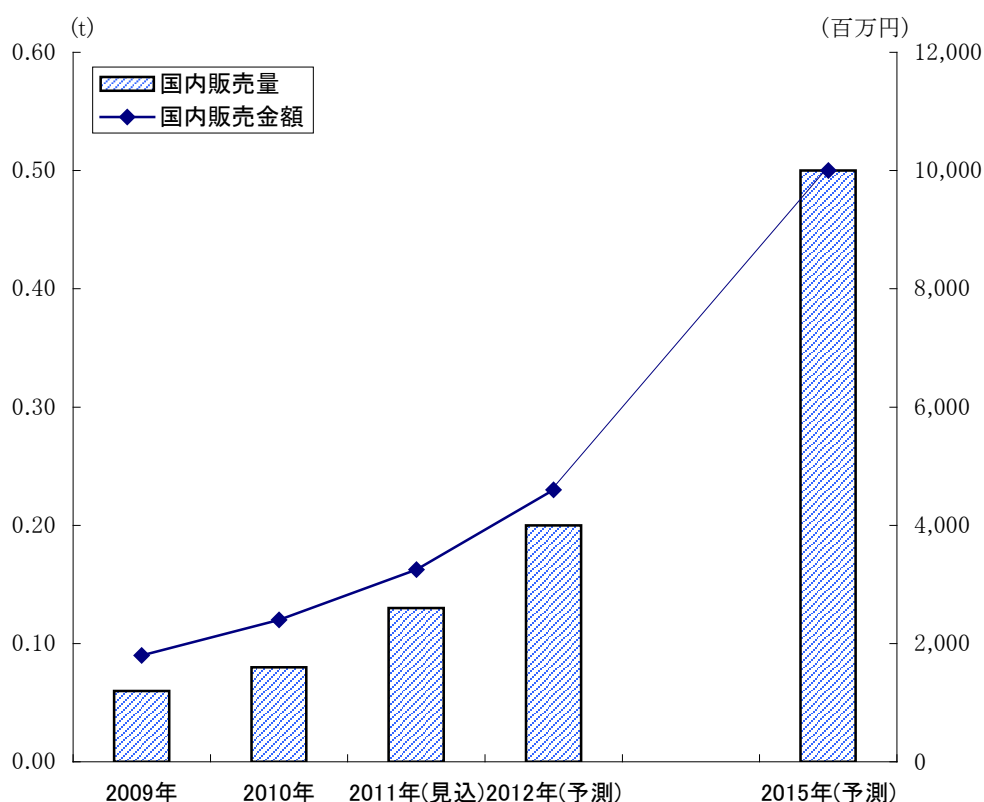
サイズ	直径-0.8~1.4nm 長さ-5~10 $\mu$ m						
形状	筒状 (構造によって①アームチェア型、②ジグザグ型、③カイラル型があり、異なる電気特性を示す)						
計測技術	TEM、SEM						
物性		項目	単位	CG100	SG65	SG76	CG200
		直径	nm	1.0 $\pm$ 0.3	0.8 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.2	0.7~1.4
		長さ	nm	400~ 2,300	450~ 2,000	300~ 2,300	—
		炭素含有量	%	>90			
		SWNT含有量*	%	$\geq$ 65	$\geq$ 77	$\geq$ 77	$\geq$ 77
		Chirality Distribution	%	—	>50(6.5)	>50(7.6)	—
		アスペクト比	—	>1,000			
		※T1% carbon as SWNT [シグマアルドリッチ・ジャパン(株)製品データ]					
機能/特性	①高強度 ②高柔軟性 ③高熱伝導性 ④高電流密度 ⑤比表面積が大きい(約 1,000 m <sup>2</sup> /g) ⑥生体親和性						
製造会社	[国内] <ul style="list-style-type: none"> <li>■ (株)名城ナノカーボン</li> <li>■ (株)マイクロフェーズ</li> <li>■ 本荘ケミカル(株)</li> <li>■ 日本ゼオン(株)(2011年から実証プラント稼働中:600g/日[目標値]、2013年度に量産プラントの設置を判断)</li> </ul> [海外] <ul style="list-style-type: none"> <li>■ NanoIntegris(国内代理店:オプトサイエンス、関東化学)</li> <li>■ KH Chemical(国内代理店:巴工業)</li> </ul>						

## ②国内市場動向

(単位:t、百万円)

	2009年	2010年	2011年(見込)	2012年(予測)	2015年(予測)
国内販売量	0.06	0.08	0.13	0.20	0.50
前年比	—	133.3%	162.5%	153.8%	250.0%
国内販売金額	1,800	2,400	3,250	4,600	10,000
前年比	—	133.3%	135.4%	141.5%	217.4%

[富士キメラ総研推定]



※上記市場規模は、研究用の内製分を含む

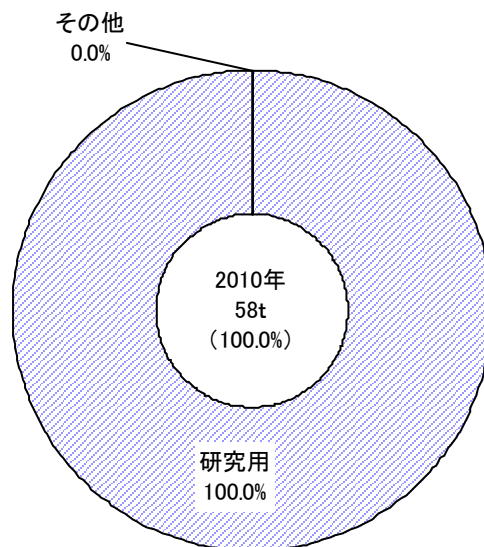
- ・ 単層カーボンナノチューブ(SWCNT)の国内需要規模は、2010年で80kg、24億円と推定される。
- ・ 当該品に関しては、量産化が遅れており、価格が1万～20万円/g(純度等により価格差大)と高いことから研究用としての利用がほとんどであり、実用化が進展していない。
- ・ 2011年4月から日本ゼオンが実証プラントによるサンプル供給を開始しており、同プラントで生産されたSWCNTに関しては共同研究先への供給が決まっており、一定の需要が見込める。
- ・ 量産プラントの建設は、実証の結果を元に2013年度に判断される予定であり、仮に量産化が実現すれば、実用化研究が加速することが期待でき、需要拡大に繋がるとみられる。



③主要用途構成

用途	販売量(t)	構成比
研究用	0.08	100.0%
その他	△	△
合計	0.08	100.0%

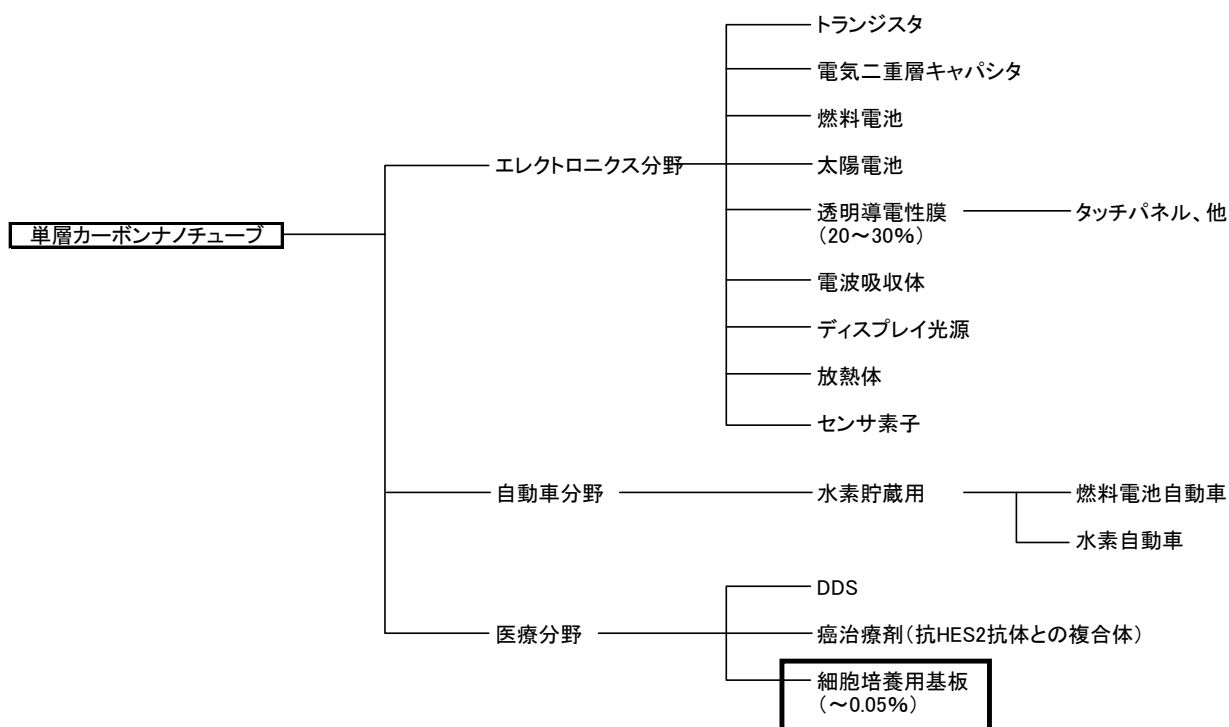
[富士キメラ総研推定]



- ・ SWCNT に関しては、実用化が遅れており研究用の需要が中心となっている。
- ・ 一部、細胞培養用基板で利用されているが、同基板自体も研究用であり、需要量としては年間 1kg にも満たないとみられる。
- ・ 機械的、電氣的、熱的特性に優れた特性を有しており、応用研究の範囲は多岐に渡っている。
- ・ 下記に応用分野の具体例を示す。

分野	具体的用途例
エレクトロニクス	トランジスタ、電気二重層キャパシタ、燃料電池、太陽電池、透明導電性膜(タッチパネル用等)、電波吸収体、ディスプレイ光源、放熱体、センサ素子、
自動車	水素自動車/燃料電池自動車(水素貯蔵用)、
医療	DDS、癌治療剤(+抗 HER2 抗体との複合体)、細胞培養用基板、

#### ④主要用途における製品フロー



□は、商業化されている用途

⑤利用事例

製品名	細胞培養用基板
含有形態	分散液 <ul style="list-style-type: none"> <li>水溶性キシラン水溶液に単層カーボンナノチューブを均一に分散したもの。</li> <li>基板上に上記分散液を滴下して、スピコート法等により薄膜を形成する。</li> </ul>
1製品当たりの使用量	◆ <u>~0.05%</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>細胞培養基板向けに市販されている。</li> <li>現状は、研究用の利用が大半であるが、実証が進み効果が明確になれば、再生医療分野での利用が期待できる。</li> </ul>
特色	<ul style="list-style-type: none"> <li>単層カーボンナノチューブを薄膜塗布することによって網目構造と平滑性を両立させることで良好な培養条件を発現している。</li> <li>特に、低血清濃度条件下での培養に効果があり、骨芽細胞様細胞において通常の3~5倍の増殖速度が確認されている。</li> </ul>

製品名	タッチパネル(透明導電膜)
含有形態	分散液 <ul style="list-style-type: none"> <li>単層カーボンナノチューブを分散させた分散液を基材(ガラス、プラスチックフィルム、等)に塗布することにより透明導電膜層を形成する。</li> <li>単層カーボンナノチューブは、硝酸等による酸処理を行い、導電性を高めて利用される場合が多い。</li> </ul>
1製品当たりの使用量	◆ <u>20~30%</u> (分散液中濃度) <ul style="list-style-type: none"> <li>透明導電膜の応用研究においては、薄膜形成用の分散液として、単層カーボンナノチューブを20~30%を含んだものが使用されるケースが多い。</li> <li>透明導電膜の膜厚は、15~20 <math>\mu\text{m}</math>。</li> </ul>
特色	<ul style="list-style-type: none"> <li>導電性に優れる金属型 SWCNT を利用することにより、少量で高い導電性を発現し、光透過性の高い透明導電膜を形成することが可能。</li> <li>従来、金属型 SWCNT と半導体型 SWCNT を効率的に分離(通常、3:7の割合で混在)、金属型 SWCNT を高純度で取り出すことが困難であったが、研究開発の進展により、80%以上の高濃度の金属型 SWCNT を精製することが可能になっている。</li> <li>それにより、実用化に向けた研究開発が加速しており、ITO 透明導電膜に代わる技術として注目をされている。</li> </ul>

#### 4) 多層カーボンナノチューブ

##### ①製品概要

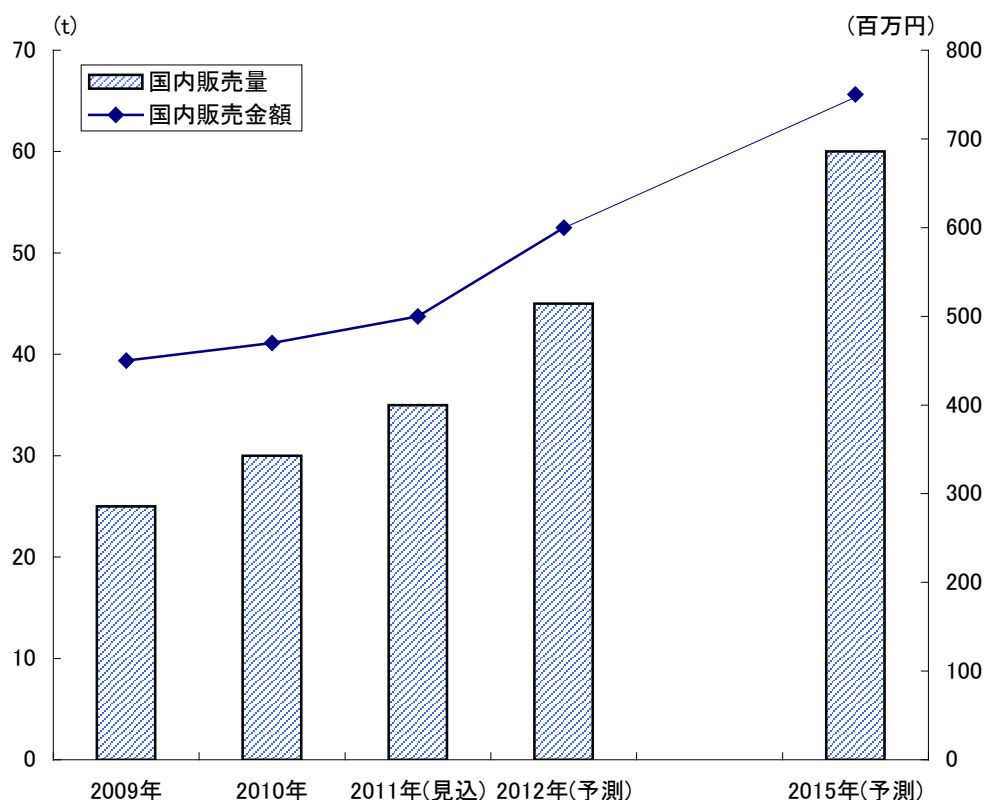
サイズ	<市販品> $\phi 15\sim 80\text{nm} \times h\sim 10\mu\text{m}$		
形状	棒(繊維)状 ・ SWCNT が幾重(2~10層以上)にも重なったような構造		
計測技術	SEM、TEM		
物性	<MWCNT の基本物性>		
	項目	単位	代表値
	DBP 吸油量	ml/100g	330±30
	比表面積	m <sup>2</sup> /g	230±20
	嵩密度	g/ml	0.09±0.02
	水分	%	≤0.5
	灰分	%	≤2.0
	炭素分	%	≥98
	粉末抵抗値	Ω·cm	2-6 × 10 <sup>-2</sup>
	[宇部興産製品データ]		
機能	電気特性—導電性付与、帯電防止 熱伝導性 耐摩耗性 高強度		
製造会社	[国内] ■ 保土谷化学工業(株) ■ 昭和電工(株) ■ GSI クレオス(株) ■ 宇部興産(株)(2011年10月新規参入) ■ 本荘ケミカル(株) ■ 三菱マテリアル(株) [海外] ■ Hyperion Catalysis International ■ Nano ■ CNano Technology(国内代理店:丸紅情報システムズ(株)) ■ Arkema(アルケマ(株)) ■ Nanocyl ■ Bayer(国内代理店:豊田通商(株))		

## ②国内市場動向

(単位:t、百万円)

	2009年	2010年	2011年(見込)	2012年(予測)	2015年(予測)
国内販売量	25	30	35	45	60
前年比	—	120.0%	116.7%	128.6%	133.3%
国内販売金額	450	470	500	600	750
前年比	—	104.4%	106.4%	120.0%	125.0%

[富士キメラ総研推定]



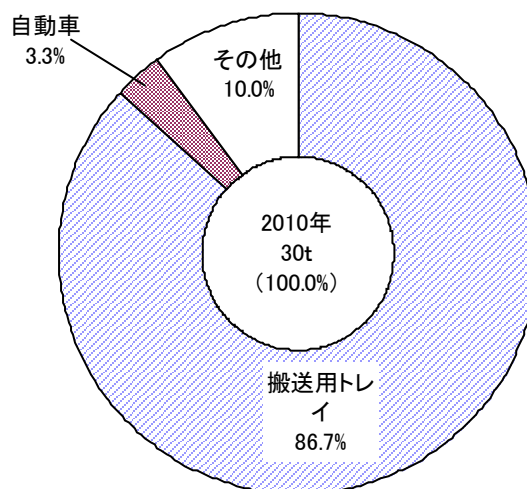
注: 昭和電工 VGCF はカーボンファイバーの扱いとし、MWCNT には含めず

- ・ 多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の国内市場規模は、2010年実績で30t、4億7,000万円となっている。
- ・ 2008年秋のリーマンショック以降の景気後退により、最近2年間は市場が伸び悩んでいる状況にある。
- ・ 今後、リチウムイオン電池の電極材料用等の本格化により需要拡大が期待できるが、主力のエレクトロニクス用の搬送トレイが円高の影響で台湾等アジア地域の生産割合が上昇傾向にある。
- ・ そのため、国内需要の成長は、世界需要の成長を下回るとみられる。

### ③主要用途構成

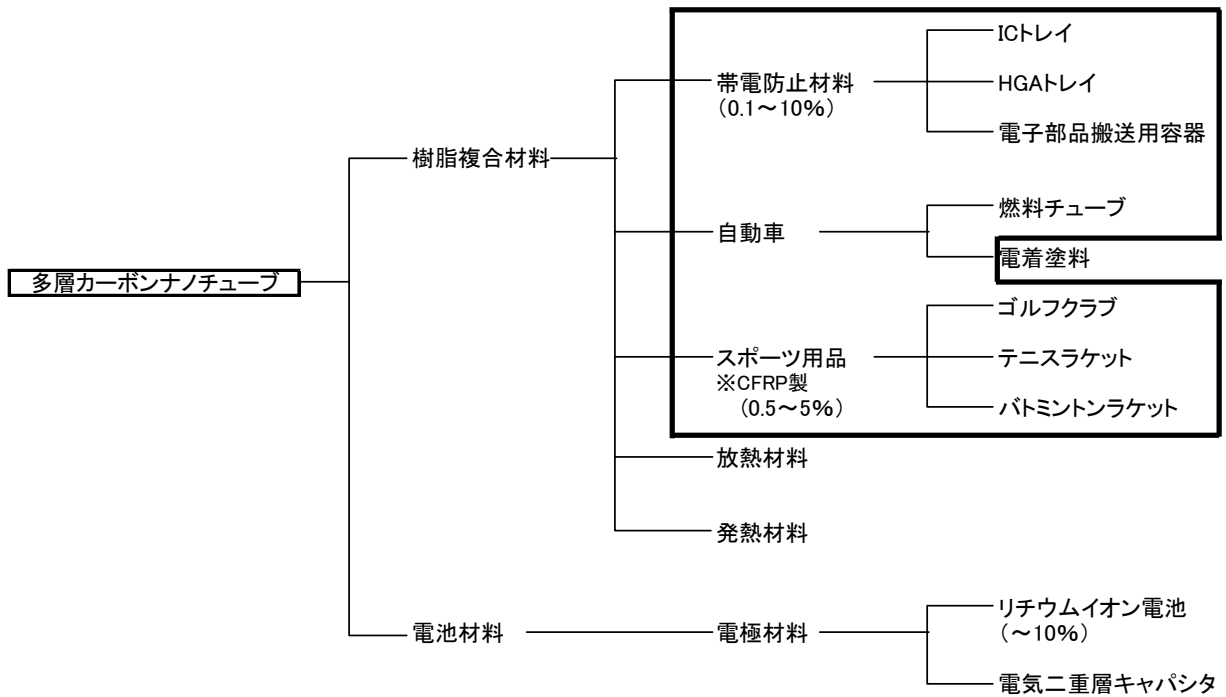
用途	販売量(t)	構成比
搬送用トレイ	26	86.7%
自動車	1	3.3%
その他	3	10.0%
合計	30	100.0%

〔富士キメラ総研推定〕



- ・ MWCNTの主力用途は、半導体等エレクトロニクス部品向けの搬送トレイに使用されており、86.7%のウエイトを占めている。
- ・ 自動車用途向けでは、主に燃料チューブに使用されている。その他、外装の電着塗装に採用されている。
- ・ MWCNT含有燃料チューブは、欧米自動車メーカーでの採用が中心であり、国内自動車メーカーでの採用はほとんどない。
- ・ その他としては、リチウムイオン二次電池の電極(導電助剤)、電気二重層キャパシタや放熱材料、スポーツ用品等の用途がある。
- ・ この中でリチウムイオン二次電池電極用での需要拡大が期待されており、2011年10月には宇部興産が年産20t規模のプラントを稼働させており、当該用途をメインに拡販を進める計画を持っている。

④主要用途における製品フロー



□は、商業化されている用途

⑤利用事例

製品名	リチウムイオン二次電池(電極)
含有形態	<p>粉末、ペースト状、分散液</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 当該分野向けの MWCNT の供給形態は各種ある。</li> <li>・ 粉末を電極材料(黒鉛等)に添加する方法や電極表面にペーストを塗布する方法、電極を分散液に含浸する方法等が用いられている。</li> <li>・ 2010年8月には、米・マサチューセッツ工科大学(MIT)の研究チームが、含浸法を応用してエネルギー容量を大幅に増加させる技術を開発しており、分散液を吹き付けて加工する方法も検討している。</li> </ul>
1製品当たりの使用量	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">~10%</span></li> <li>・ 電極材料の質量に対して約 10%の MWCNT を添加することによって、耐久性向上、エネルギー出力、総電力供給率等の性能アップの効果が発現する。</li> <li>・ 実用化に向け、より少ない添加量で高い効果を得るための研究開発が行われており、MWCNT の含有率は減少する方向にある。</li> </ul>
特色	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ リチウムイオン電池の電極用としては、主として負極材料に用いられている。</li> <li>・ MWCNT を添加することにより電極の耐久性が向上し、電池の長寿命化が見込める。</li> <li>・ また、質量当たりのエネルギー容量等の性能も向上させることができるため、小型で長時間駆動可能な電池の製作が可能になり、モバイル機器等の小型・軽量化に資する。</li> <li>・ また、電気自動車用の大型二次電池が実用化されれば、電気自動車の普及を加速させ、当該品需要も大きく拡大することが期待できる。</li> </ul>



製品名	電子部品搬送用トレイ
含有形態	<p>粉体</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>樹脂に添加され、熔融固定化された状態で存在している。</li> <li>一般的に分散性を高めるための表面処理を行っている。</li> </ul>
1製品当たりの使用量	<p>◆ <u>0.1～10%</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>要求特性(主として電気特性)によって添加率は変わってくるが、樹脂に添加して使用する場合、0.1～10%程度添加しているものが多い。</li> <li>炭素繊維等と比較して高い導電性を有していることから、数%程度の添加で優れた帯電防止機能を発現することができる。</li> </ul>
特色	<ul style="list-style-type: none"> <li>半導体等の電子部品の搬送用トレイでは、帯電による電子部品の破壊やほこり等付着防止を目的に帯電防止機能を有する材料が利用されている。</li> <li>従来、カーボンブラック等の導電性フィラーが利用されていたが、少量の添加で高い帯電防止機能を付与できる。</li> <li>従来の導電性フィラーと比較し添加量が少ないことから、当該品が電子部品を汚染するリスクも低いことから利用が進んでいる。</li> </ul>

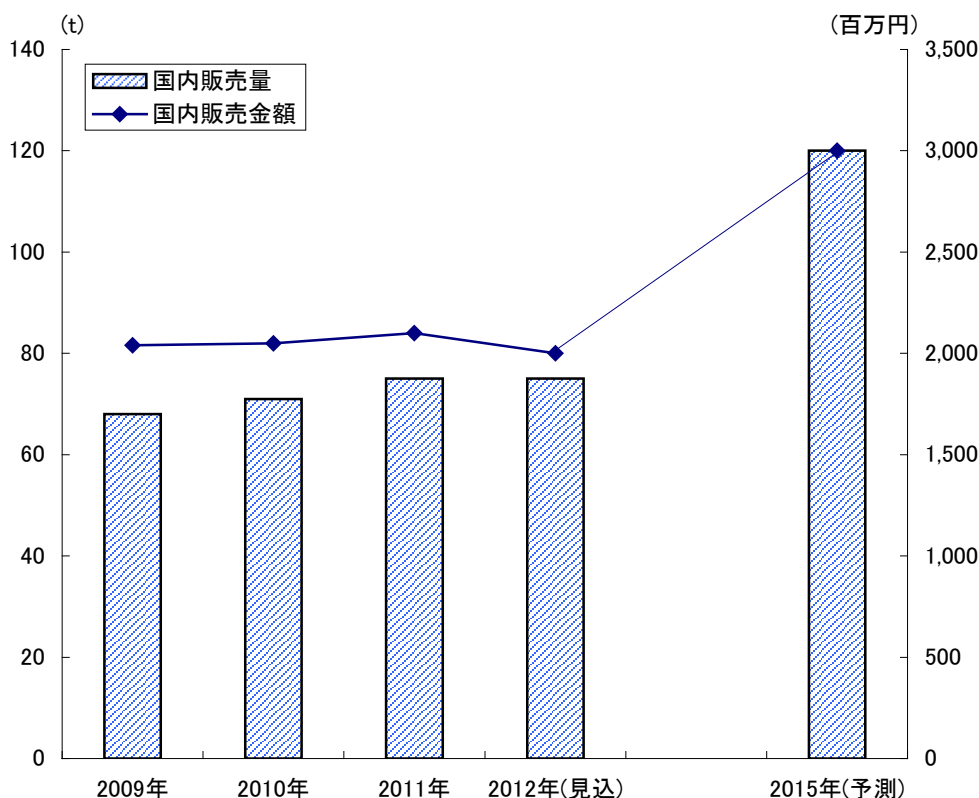
<参考 CNF 国内市場規模について>

CNF の中には、非常に MWCNT と似た構造のものがあり、以下にその国内市場を示す。

(単位:t、百万円)

	2009年	2010年	2011年	2012年(見込)	2015年(予測)
国内販売量	68	71	75	75	120
前年比	—	104.4%	105.6%	100.0%	160.0%
国内販売金額	2,040	2,050	2,100	2,000	3,000
前年比	—	100.5%	102.4%	95.2%	150.0%

[富士キメラ総研推定]



- ・ CNF の国内市場規模は、2010 年実績で 71t、20 億 5,000 万円である。2011 年は 75t、21 億円と 5.6% (量ベース) の成長を示している。
- ・ 需要の約 80% は、LiB の電極用 (導電補助) として利用されており、LiB の生産拡大に伴い需要を伸ばしてきたが、近年は、LiB の生産が中国等のアジア地区にシフトしており、当該品の成長率も鈍化してきている。
- ・ 今後、車載用 LiB の需要が本格化してくることによる回復が見込まれるが、国内需要に関しては今後、1～2 年は成長が低水準にとどまることが予想される。

## 5) ルチル型酸化チタン

### ①製品概要

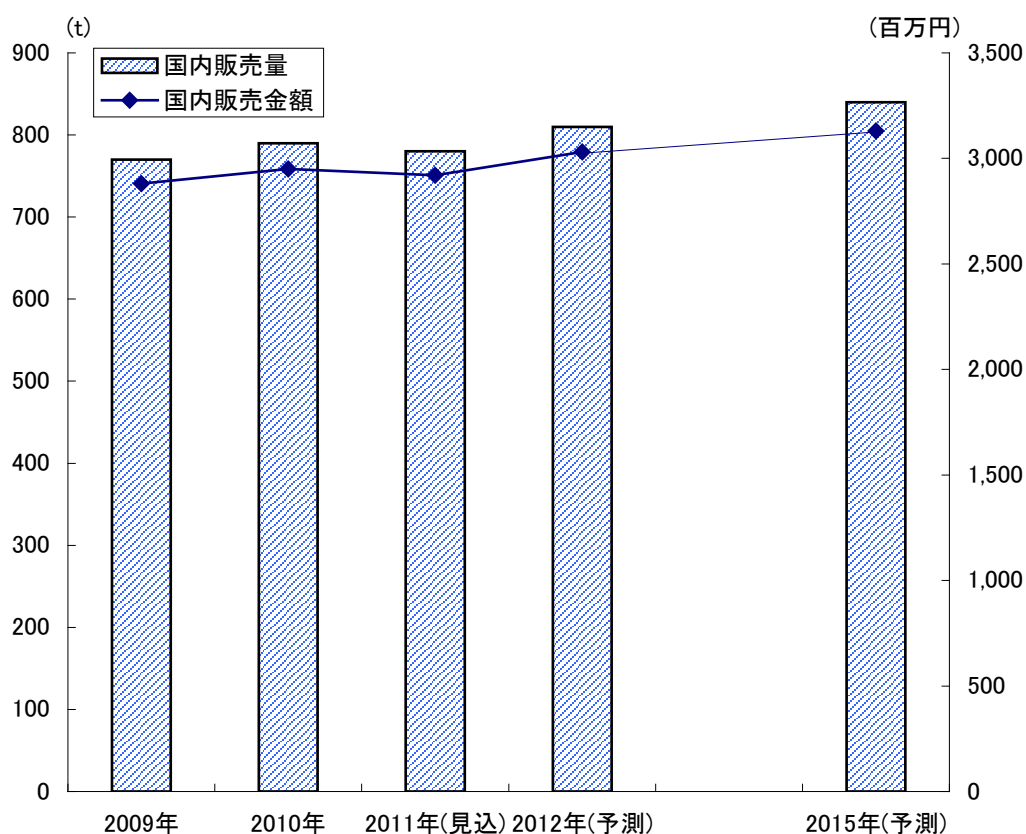
サイズ	[一次粒径]－10～50nm [二次粒径]－200nm～ [比表面積]－20～150 m <sup>2</sup> /g												
形状	粉体、分散体												
計測技術	[一次粒径]－TEM [二次粒径]－動的散乱法、レーザー光散乱法 [比表面積]－BET 法												
物性	<p>&lt;一般物性&gt;</p> <table border="1"> <tr> <td>結晶系</td> <td>正方晶系</td> </tr> <tr> <td>比重</td> <td>4.27</td> </tr> <tr> <td>屈折率</td> <td>2.72</td> </tr> <tr> <td>硬度</td> <td>7.0～7.5</td> </tr> <tr> <td>誘電率</td> <td>114</td> </tr> <tr> <td>融点</td> <td>1,825℃</td> </tr> </table>	結晶系	正方晶系	比重	4.27	屈折率	2.72	硬度	7.0～7.5	誘電率	114	融点	1,825℃
結晶系	正方晶系												
比重	4.27												
屈折率	2.72												
硬度	7.0～7.5												
誘電率	114												
融点	1,825℃												
機能	<p>① 透明性 ② 紫外線遮蔽性 ③ 高屈折率 ④ 可視光散乱 ⑤ 環境安定性</p>												
製造会社	<p>[国内]</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ テイカ(株)</li> <li>■ 石原産業(株)</li> <li>■ 堺化学工業(株)</li> <li>■ チタン工業(株)</li> <li>■ 富士チタン工業(株)</li> </ul> <p>[海外]</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Sachtleben Chemie GmbH(独)※Rockwood Specialties Group</li> <li>■ Degussa(独)</li> <li>■ DuPont(米)</li> </ul>												

## ②国内市場動向

(単位:t、百万円)

	2009年	2010年	2011年(見込)	2012年(予測)	2015年(予測)
国内販売量	770	790	780	810	840
前年比	—	102.6%	98.7%	103.8%	103.7%
国内販売金額	2,880	2,950	2,920	3,030	3,130
前年比	—	102.4%	99.0%	103.8%	103.3%

[富士キメラ総研推定]

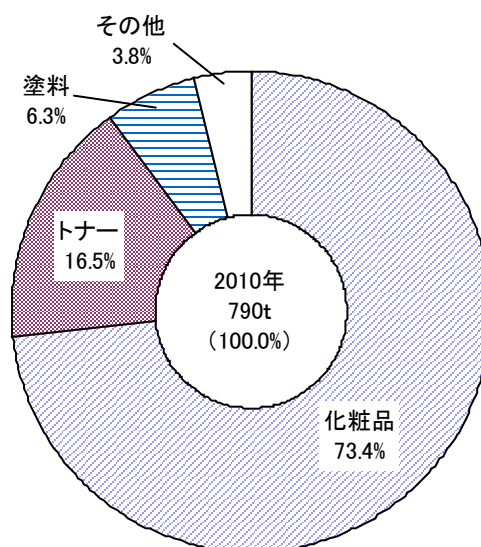


- ・ ルチル型酸化チタンの国内市場規模は、2010年実績で790t、29億5,000万円となっており、安定した需要を確保している。
- ・ 紫外線遮蔽機能及び透明性等の特性から主として化粧品(ファンデーション等)用途で利用されている。当該用途は比較的景気の影響を受けにくく、また、美白、老化防止等の観点から紫外線対策ニーズが高まっていることから、今後も安定した成長が期待できる。
- ・ トナーや塗料等の工業用途でも安定した需要が見込めるが、新規用途開拓はあまり進展しておらず、大幅な需要拡大も期待できないとみられる。
- ・ 食品に添加、食品の劣化防止の用途がある。

### ③主要用途構成

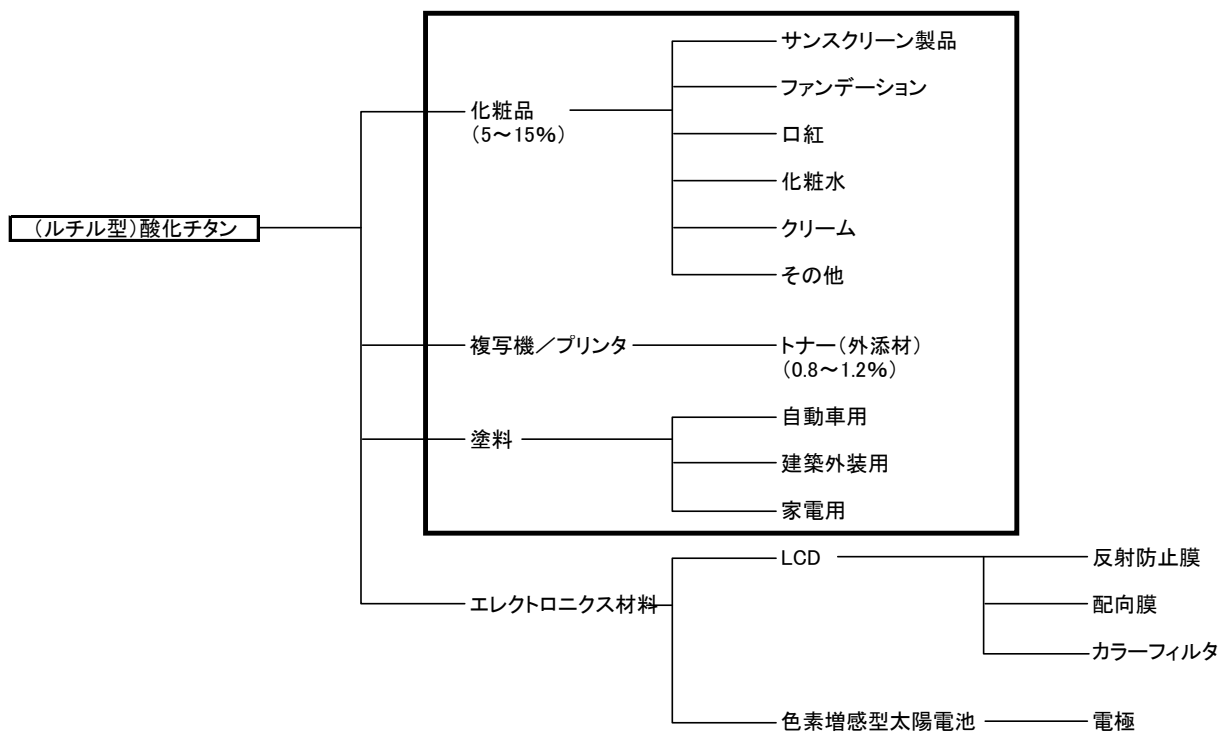
用途	販売量(t)	構成比
化粧品	580	73.4%
トナー	130	16.5%
塗料	50	6.3%
その他	30	3.8%
合計	790	100.0%

[富士キメラ総研推定]



- ・ 一般的なルチル型酸化チタンの場合、塗料やインキ・顔料用途での利用が約80%を占めているが、本調査の対象となるナノサイズ品は、主として紫外線遮蔽目的で化粧品用に利用されている。
- ・ 化粧品の場合、ブランド品等の輸入があるものの、日常使用するものは国産品が主流であり、品質管理面等から今後も、国内生産が中心となるとみられる。
- ・ 紫外線対策の認識が国民に定着していることもあり、安定した成長が見込める用途となっている。
- ・ 工業用途では、トナー（電荷調整剤）、塗料等での利用が比較的多くなっている。その他、樹脂等の添加剤や触媒担体等への利用がある。また、LCD（反射防止膜等）等への応用研究が行われている。

④主要用途における製品フロー



□は、商業化されている用途

⑤利用事例

製品名	化粧品 (サンスクリーン製品、スキンケア製品、他)
含有形態	粉体 ・ アルミ、シリカやポリシロキサン等により表面処理を施しており、疎水性を付与したものが使用されている。
1 製品当たりの使用量	◆ 1.0～20.0% (10%±5%が中心) ・ 一般に酸化チタンの含有量が 1.0%以下の場合、十分な紫外線遮蔽効果が発現せず、20%を超えると製品の流動性が悪くなるといわれている。 ・ 紫外線遮蔽効果を謳っている製品については、10%内外を含有しているケースが多い。 ・ また、化粧品によっては、酸化チタン以外の紫外線遮蔽剤(酸化亜鉛、有機系、天然系、他)を併用している場合があるが、その場合は他剤の混合比率に応じて酸化チタンの含有量が低下する。
特色	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 紫外線遮蔽剤としては、日焼けの原因となるUV-Bに対する遮蔽効果が高いという特色を有している。</li> <li>・ UV-Bによって生成したメラニン色素を酸化させ褐色に変質させる作用は、UV-Aが担っている。</li> <li>・ UV-Aに対する遮蔽効果は、酸化亜鉛が優れていることから、多くのサンスクリーン製品において併用されている。</li> <li>・ また、粒子の微細(ナノ)化が進行したことにより、光反射率も低下することから、化粧の仕上がりが白っぽくなるのを防止し、より自然な肌色を表現できるようになっている。</li> </ul>

製品名	複写機、プリンタ用トナー(外添剤)
含有形態	<p>粉体</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 15~50nm のサイズのもので利用されている。</li> <li>・ シランカップリング剤やシリコンオイルで表面処理を行うことで疎水性を付与したタイプのもので使用されている。</li> <li>・ トナー表面に当該品をコーティングして使用する。</li> </ul>
1 製品当たりの使用量	<p>◆ 0.1~2.0% (1%±0.2%が中心)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 含有量が 0.1%未満の場合、トナーの摩擦帯電特性を十分に維持できなくなる可能性があるほか、研磨効果が得られない。</li> <li>・ 一方、2.0%を超えるとトナー自体の帯電性を阻害する要因になるため、含有率は 0.1~2.0%の範囲のもので一般的。</li> <li>・ 特に、約 1.0%程度、当該品を添加している製品が多いとみられる。</li> </ul>
特色	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 通常、シリカ微粒子、アルミナ微粒子と一緒に利用されている。</li> <li>・ それによって、トナーの耐環境安定性、帯電量安定化、流動性、転写効率の改善、耐久性の向上を図っている。</li> <li>・ 上記の表面処理にフッ素化合物を加えたものも製品化されており、負帯電性、疎水化度、潤滑性を強化したグレードとなっている。</li> </ul>



6) アナターゼ型酸化チタン

①製品概要

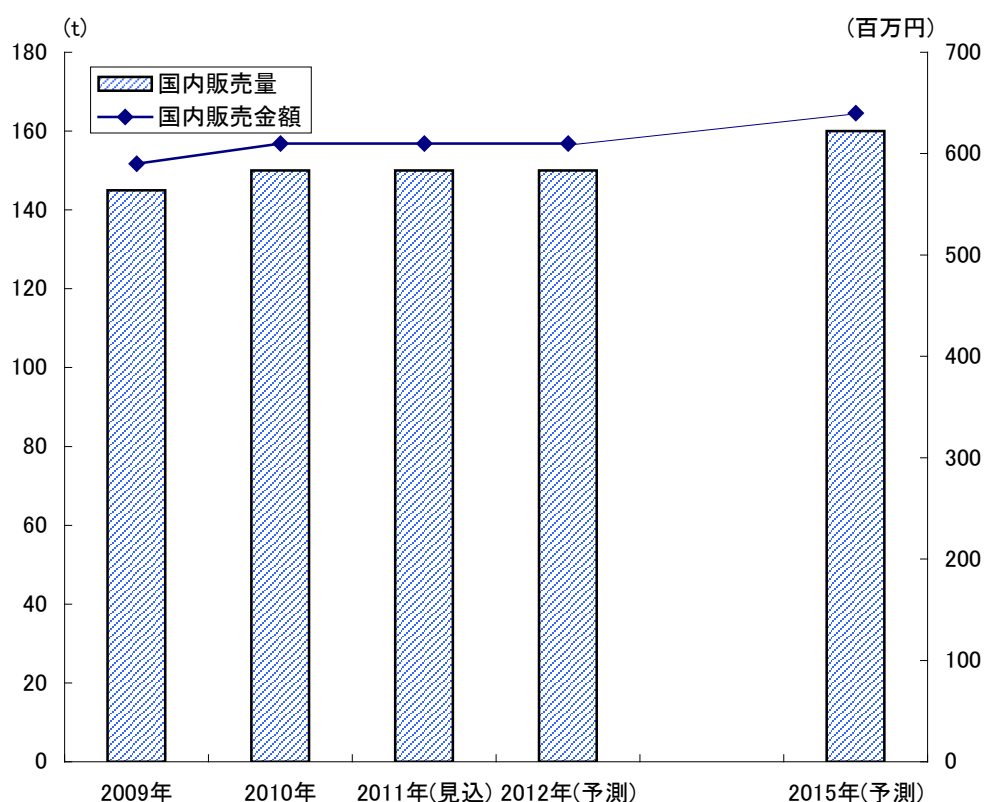
サイズ	[一次粒径]－6～30nm [二次粒径]－200nm [比表面積]－10～300 m <sup>2</sup> /g			
形状	粉体、分散体、ゾル、コーティング剤			
計測技術	[一次粒径]－TEM [二次粒径]－動的散乱法、レーザー光散乱法 [比表面積]－BET 法			
物性	<一般物性>			
	結晶系		正方晶系	
	比重		3.9	
	屈折率		2.52	
	硬度		5.5～6	
	誘電率		31～48	
	融点		915±15℃以上でルチル型に転移	
	<薄膜形成用ゾル>			
	品名	TiO <sub>2</sub> 濃度	結晶子サイズ	pH
	A-6	6%	10nm	10
	M-6	6%	5nm	3
	AM-15	15%	10nm	3
	[多木化学製品データ]			
機能	① 光活性 ② 高比表面積 ③ 透明性			
製造会社	[国内] <ul style="list-style-type: none"> <li>■ テイカ(株)</li> <li>■ 石原産業(株)</li> <li>■ 堺化学工業(株)</li> <li>■ チタン工業(株)</li> <li>■ 日本アエロジル(株)(Degussa と三菱マテリアルの合併会社)</li> </ul> [海外] <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Sachtleben Chemie GmbH(独)※Rockwood Specialties Group</li> <li>■ Degussa(独)</li> </ul>			

## ②国内市場動向

(単位:t、百万円)

	2009年	2010年	2011年(見込)	2012年(予測)	2015年(予測)
国内販売量	145	150	150	150	160
前年比	—	103.4%	100.0%	100.0%	106.7%
国内販売金額	590	610	610	610	640
前年比	—	103.4%	100.0%	100.0%	104.9%

[富士キメラ総研推定]

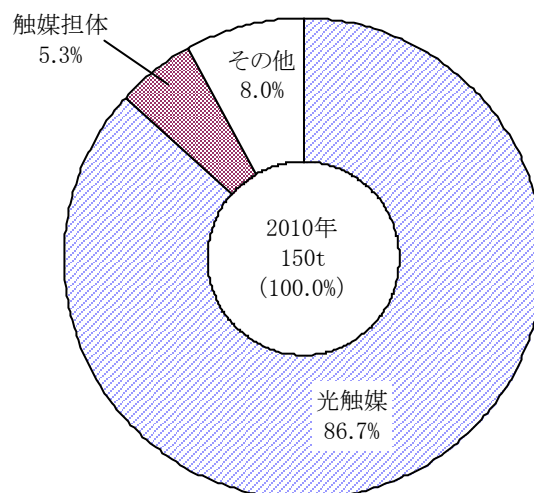


- ・ アナターゼ型酸化チタンの国内市場規模は、2010年実績で150t、6億1,000万円の規模となっている。
- ・ 当該品は、ルチル型と比較して比表面積が大きく光触媒活性が良好であることから、その特色を活かして浄化(空気、水、等)、抗菌、防汚機能を必要とする分野で使用されている。
- ・ 光触媒用途に関しては、一時期のブームは収束しているが、地道な応用研究が進められており、今後も安定した需要が見込める。
- ・ 色素増感太陽電池向け(電極)等の新規需要が立ち上がれば、需要拡大も見込めるが、当面は、横ばいから微増で推移するものとみられる。
- ・ 触媒担体として利用し、排ガスの脱硝に用いられる量も多い。

### ③主要用途構成

用途	販売量(t)	構成比
光触媒	130	86.7%
触媒担体	8	5.3%
その他	12	8.0%
合計	150	100.0%

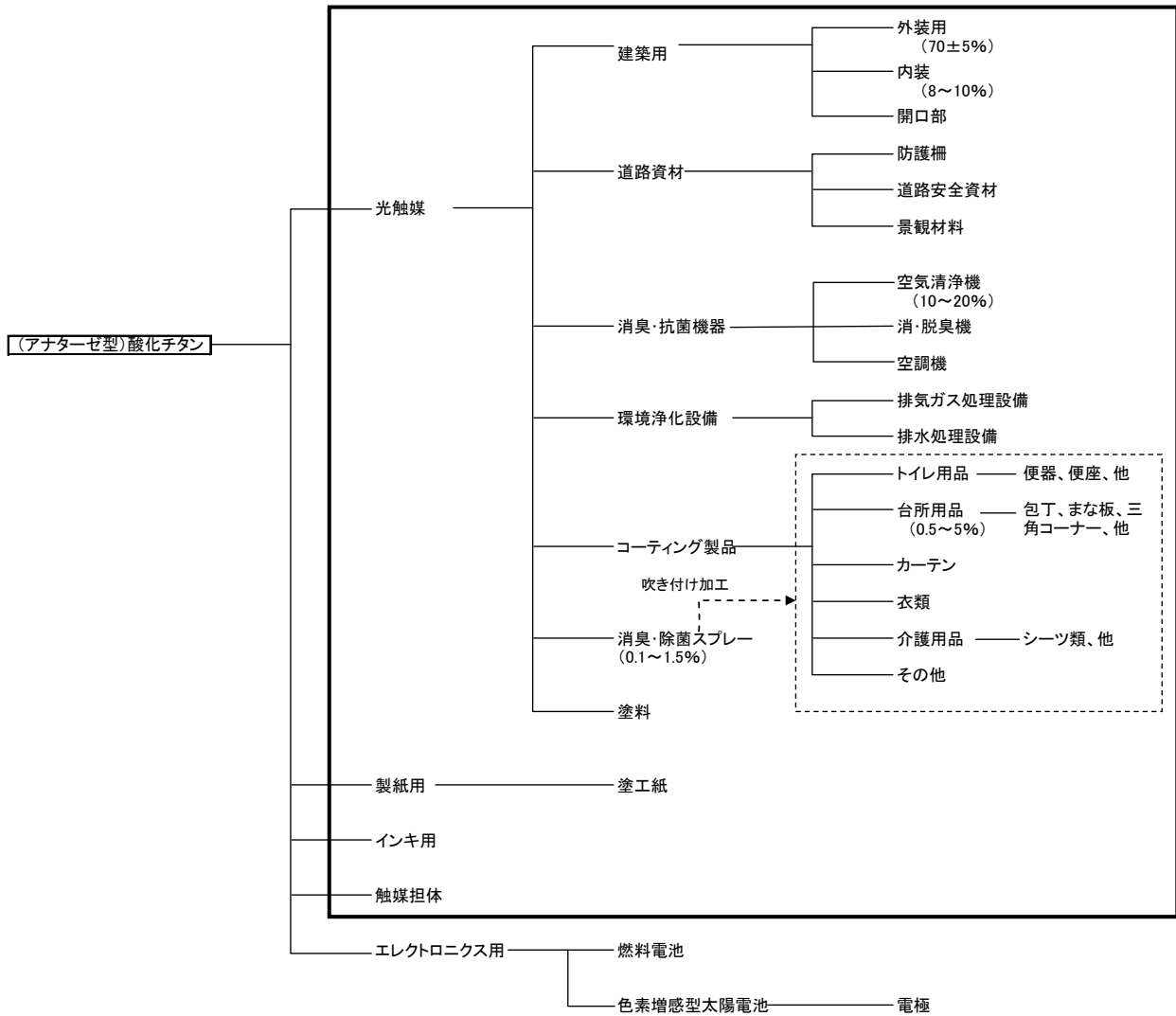
[富士キメラ総研推定]



- ・ アナターゼ型酸化チタンは、光触媒活性に優れていることから同用途での応用展開が主体となっている。
- ・ 当該品を対象物(外装材、浄化フィルタ等)の表面にコーティングして使用するケースが一般的。
- ・ 光触媒の応用用途としては、外装、内装といった建築資材が最も多く約 70%(外装:約 60%、内装:約 10%)を占めており、次いで空気清浄機等の浄化機器(約 20%)が多い。
- ・ 建築外装材用途では、主として防汚(セルフクリーニング)目的で利用されているが、当該品の超親水性を利用し、外装に薄い水の膜を形成し、その気化熱を利用して建物内部を冷やす技術等の研究開発も行われている。
- ・ 抗菌・殺菌効果を利用した農業分野への応用等の取り組みもあり、応用範囲は今後も広がっていくことが期待できる。
- ・ その他用途としては、触媒担体や樹脂添加剤、製紙、塗料、インキ等に使用されている。
- ・ 塗料に使用した場合、塗膜が劣化しやすくなりチョーキングが起こる可能性が高まることから応用例が限られている。

なお、最近になり火力発電所等の大型排ガス処理設備用に約 14,000t/年のアナターゼ型酸化チタンが触媒担体として用いられていることが判明したが、今回のデータには過去の実績が不明なため省略した。

#### ④主要用途における製品フロー



⑤利用事例

製品名	建築外装材														
含有形態	<p>外装材表面にコーティングして使用</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 当該品を分散させた溶液(ゾル)とバインダーを組み合わせたコーティング材を被塗物に吹き付けて光触媒層を形成している。</li> <li>・ その際、通常、光触媒の作用による被塗物の劣化を防止し、さらに光触媒層の密着性を確保するためのバリア層を設けている。</li> </ul> <p>&lt;コーティング材の代表例&gt;</p> <table border="1" data-bbox="488 600 1364 913"> <tr> <td>TiO<sub>2</sub> 粒径 (nm)</td> <td>17</td> </tr> <tr> <td>TiO<sub>2</sub> 比表面積 (m<sup>2</sup> /g)</td> <td>120~150</td> </tr> <tr> <td>バインダー種</td> <td>金属アルコキシド系無機バインダー</td> </tr> <tr> <td>固形分 (%)</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>粘度 (cp)</td> <td>2~3</td> </tr> <tr> <td>pH</td> <td>3.5±0.5</td> </tr> <tr> <td>溶剤</td> <td>アルコール/水</td> </tr> </table> <p style="text-align: right;">〔日本ペイント製品データ〕</p>	TiO <sub>2</sub> 粒径 (nm)	17	TiO <sub>2</sub> 比表面積 (m <sup>2</sup> /g)	120~150	バインダー種	金属アルコキシド系無機バインダー	固形分 (%)	3	粘度 (cp)	2~3	pH	3.5±0.5	溶剤	アルコール/水
TiO <sub>2</sub> 粒径 (nm)	17														
TiO <sub>2</sub> 比表面積 (m <sup>2</sup> /g)	120~150														
バインダー種	金属アルコキシド系無機バインダー														
固形分 (%)	3														
粘度 (cp)	2~3														
pH	3.5±0.5														
溶剤	アルコール/水														
1製品当たりの使用量	<p>◆ <u>70±5%</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 酸化チタン(光触媒)と無機系バインダーの比率は、おおよそ7:3となっている。</li> <li>・ 光触媒層の膜厚は、0.3~1.0 μm 程度である。</li> </ul>														
特色	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 酸化チタンの光触媒作用によるメカニズムは、外装に汚れを付着させる主原因となっている油脂分を光触媒による酸化分解反応で分解して、汚れの付着力を低下させる。</li> <li>・ また、親水性が優れているため、光触媒層と汚れの間に水が入り込みやすくなっており、それにより降雨等の外力が加わることで容易に汚れを洗い流すことが可能となっている。</li> </ul>														

製品名	消臭・除菌スプレー
含有形態	<p>分散液</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 水／アルコール等に当該品を分散させたものが使用されている。</li> <li>・ ハンドポンプやエアゾールにより当該品を吹き付けて、対象物に付着させて利用する。</li> </ul>
1製品当たりの使用量	<p>◆ 0.1～1.5%</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 光触媒を利用した消臭・除菌スプレーは、数多く商品化されており、その含有率も様々である。</li> <li>・ 光触媒としては、0.1～1.5%程度含有している製品が多くなっている。</li> <li>・ また、当該用途では、光触媒と無機抗菌剤（銀等）や有機系抗菌剤等を組み合わせて利用しているものが多くなっている。</li> </ul>
特色	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ カーテン、カーペット等の内装材やトイレ、キッチン等に吹き付けることで当該品を付着させ、光触媒機能を発現することで、脱臭、除菌を行なう。</li> <li>・ 付着した光触媒は、クリーニング等により容易に落ちてしまうため、繰り返し利用することが必要となる。</li> </ul>

7) ナノシリカ

①製品概要

サイズ	<ヒュームドシリカ> 5~50nm(10~15nm のものが中心) <高純度コロイダルシリカ> 15~75nm					
形状	<ヒュームドシリカ>球状 <高純度コロイダルシリカ>球状					
計測技術	SEM					
物性	<ヒュームドシリカ> ①親水性					
	項目		比表面積(BET法)	乾燥減量	pH	
	単位		m <sup>2</sup> /g	wt. %	—	
	AEROSIL®90		90±15	≤1.0	3.7~4.7	
	AEROSIL®150		150±15	≤1.5	3.7~4.7	
	AEROSIL®200		200±25	≤1.5	3.7~4.7	
	AEROSIL®300		300±30	≤1.5	3.7~4.7	
	[日本アエロジル(株)製品データより抜粋]					
	②疎水性					
	製品	比表面積(BET法)	乾燥減量	pH	炭素含有量	
単位	m <sup>2</sup> /g	wt. %	—	wt. %		
AEROSIL®972	110±20	≤0.5	3.6~5.5	0.6~1.2		
AEROSIL®104	150±25	—	≥4.0	1.0~2.0		
AEROSIL®202	100±20	≤0.5	4.0~6.0	3.5~5.0		
AEROSIL®812	260±30	≤0.5	5.5~7.5	2.0~3.0		
[日本アエロジル(株)製品データより抜粋]						
<高純度コロイダルシリカ>						
	項目	単位	PL-1	PL-3	PL-7	PL-20
一般物性	外観	—	透明性 乳白色	透明性 乳白色	乳白色	乳白色
	比重(20/4℃)	—	1.07	1.12	1.14	1.12
	pH	—	7.3	7.3	7.3	7.3
	シリカ濃度	%	12	20	23	20
粒子径	一次粒子径	nm	15	35	75	220
	二次粒子径	nm	40	70	125	370
	会合度	—	2.7	2.0	1.7	1.7
純度	アルカリ金属	ppb	<300	<300	<300	<300
	重金属	ppb	<100	<100	<100	<100
[扶桑化学工業(株)製品データ]						
機能/特性	①研磨性 ②吸着性					

	<p>・ 塗料、接着剤、インク等に混合することで下記の機能を付与</p> <p>③増粘性、チクソ性の付与</p> <p>④つや消し</p> <p>⑤沈降防止</p> <p>⑥固結防止</p> <p>・ 粉体製品に混合することで下記の機能を付与</p> <p>⑦流動性</p> <p>・ ゴム、樹脂製品に混合することで下記の機能を付与</p> <p>⑧強度向上</p> <p>⑦形状保持性</p>
製造会社	<p>〔国内〕</p> <p>&lt;ヒュームドシリカ&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ 日本アエロジル(株)</li> <li>■ (株)トクヤマ</li> <li>■ 旭化成ワッカーシリコーン(株)</li> </ul> <p>&lt;高純度コロイダルシリカ&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ 扶桑化学工業(株)</li> <li>■ 多摩化学工業(株)</li> </ul> <p>〔海外〕</p> <p>&lt;ヒュームドシリカ&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Evonik Degussa</li> <li>■ Cabot</li> <li>■ Wacker Chemie AG</li> </ul> <p>&lt;高純度コロイダルシリカ&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Nalco(米)</li> <li>■ Slico International(米)</li> </ul>



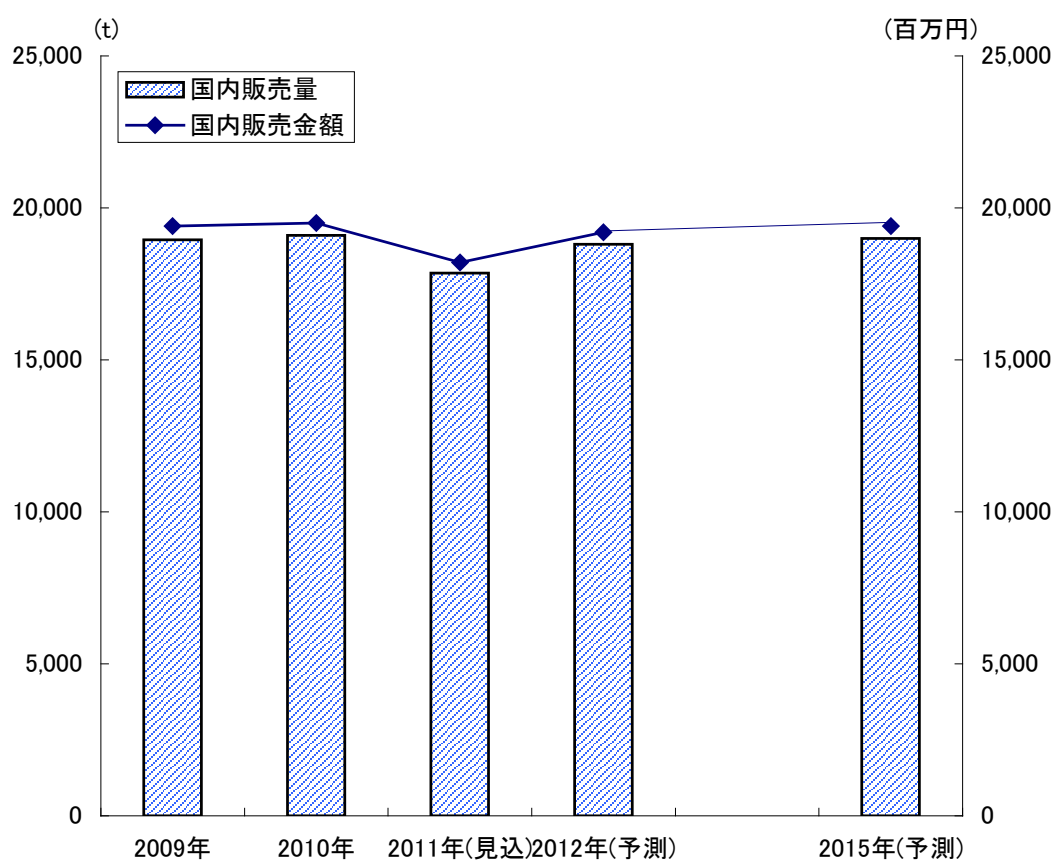
## ②国内市場動向

### (a) ヒュームドシリカ

(単位:t、百万円)

	2009年	2010年	2011年(見込)	2012年(予測)	2015年(予測)
国内販売量	18,950	19,100	17,850	18,800	19,000
前年比	—	100.8%	93.5%	105.3%	101.1%
国内販売金額	19,400	19,500	18,200	19,200	19,400
前年比	—	100.5%	93.3%	105.5%	101.0%

[富士キメラ総研推定]



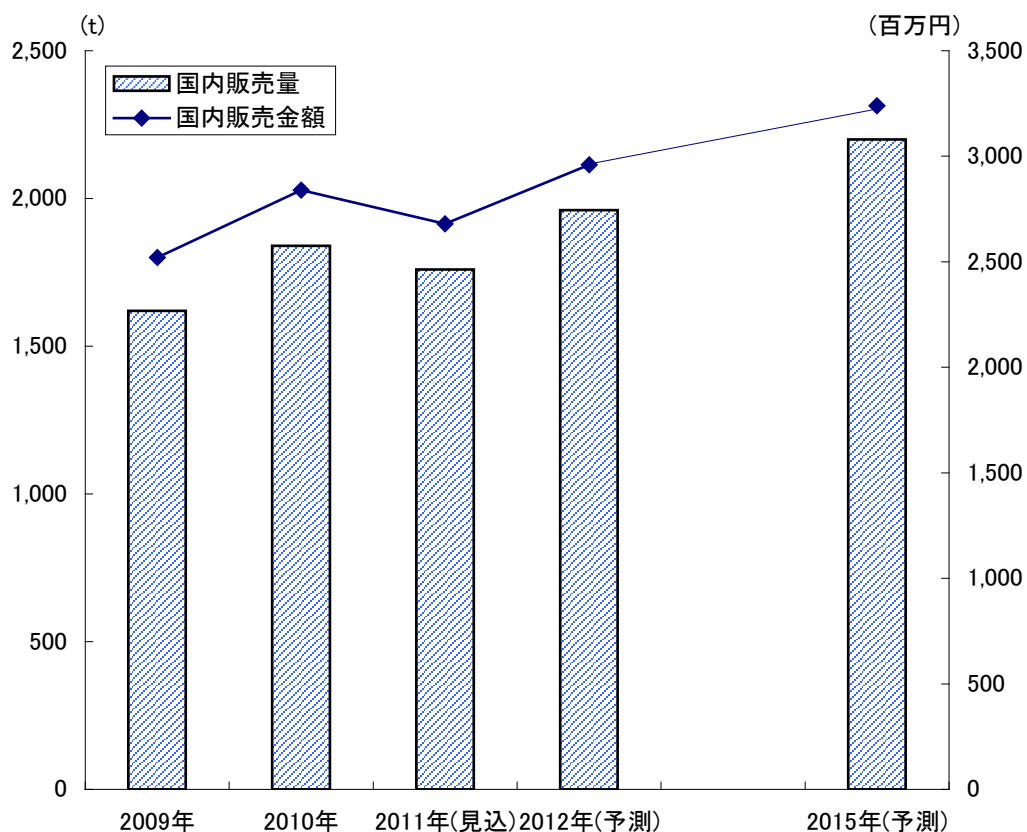
- ・ ヒュームドシリカの国内市場規模は、2010年実績で19,100t、195億円となっており、景気動向等の影響はあるものの比較的安定した需要を確保している。
- ・ 国産品の利用が中心であるが、2010年実績で2,700tが輸入されている。一方、同年実績で5,500tの輸出がある。
- ・ 当該品は、機能付与を目的にシリコン製品等ゴム、樹脂製品に混練して利用されるケースが多いが、国内市場は成熟しており、今後も大幅な需要拡大は厳しいとみられる。

(b) 高純度コロイダルシリカ

(単位:t、百万円)

	2009年	2010年	2011年(見込)	2012年(予測)	2015年(予測)
国内販売量	1,620	1,840	1,760	1,960	2,200
前年比	—	113.6%	95.7%	111.4%	112.2%
国内販売金額	2,520	2,840	2,680	2,960	3,240
前年比	—	112.7%	94.4%	110.4%	109.5%

[富士キメラ総研推定]



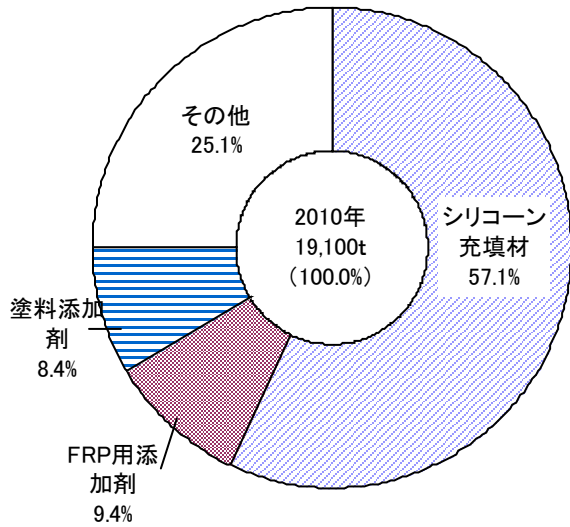
- ・ 高純度コロイダルシリカの国内市場は、2010年実績で1,840t、28億4,000万円の規模となっている。
- ・ 当該品は、ウェハ研磨剤やCMPスラリー向けが大半を占めていることから、半導体市場の動向に影響を受けやすい特徴がある。
- ・ しかし、半導体の微細化の進展に伴いより高純度の研磨剤を必要とするようになっており、ヒュームドシリカや既存のコロイダルシリカを代替する形で採用ウエイトが高まってきている。
- ・ 特に、傷付きやすいCu研磨用CMPスラリーでは、当該品が主流になってきており、今後も堅調に需要を伸ばしていくとみられる。

### ③主要用途構成

#### (a) ヒュームドシリカ

用途	販売量(t)	構成比
シリコン充填材	10,900	57.1%
FRP用添加剤	1,800	9.4%
塗料添加剤	1,600	8.4%
その他	4,800	25.1%
合計	19,100	100.0%

[富士キメラ総研推定]

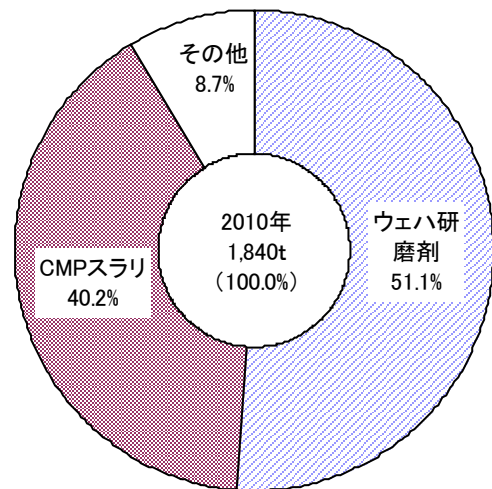


- ・ 当該品は、シリコンゴム等のシリコン製品向け充填剤としての利用が、最も多く57.1%を占めている。
- ・ 次いでFRP用添加剤、塗料添加剤向けが多くなっている。
- ・ 専ら、増粘、補強、チキソ性、沈降防止等の機能付与を目的に他材料に混合して利用されており、上記のほか、接着剤、化粧品、ワックス、農薬、複写機用トナー等に利用されている。
- ・ その他、化学重合や環境用触媒等の担体としても利用されている。

#### (b) 高純度コロイダルシリカ

用途	販売量(t)	構成比
ウェハ研磨剤	940	51.1%
CMPスラリ	740	40.2%
その他	160	8.7%
合計	1,840	100.0%

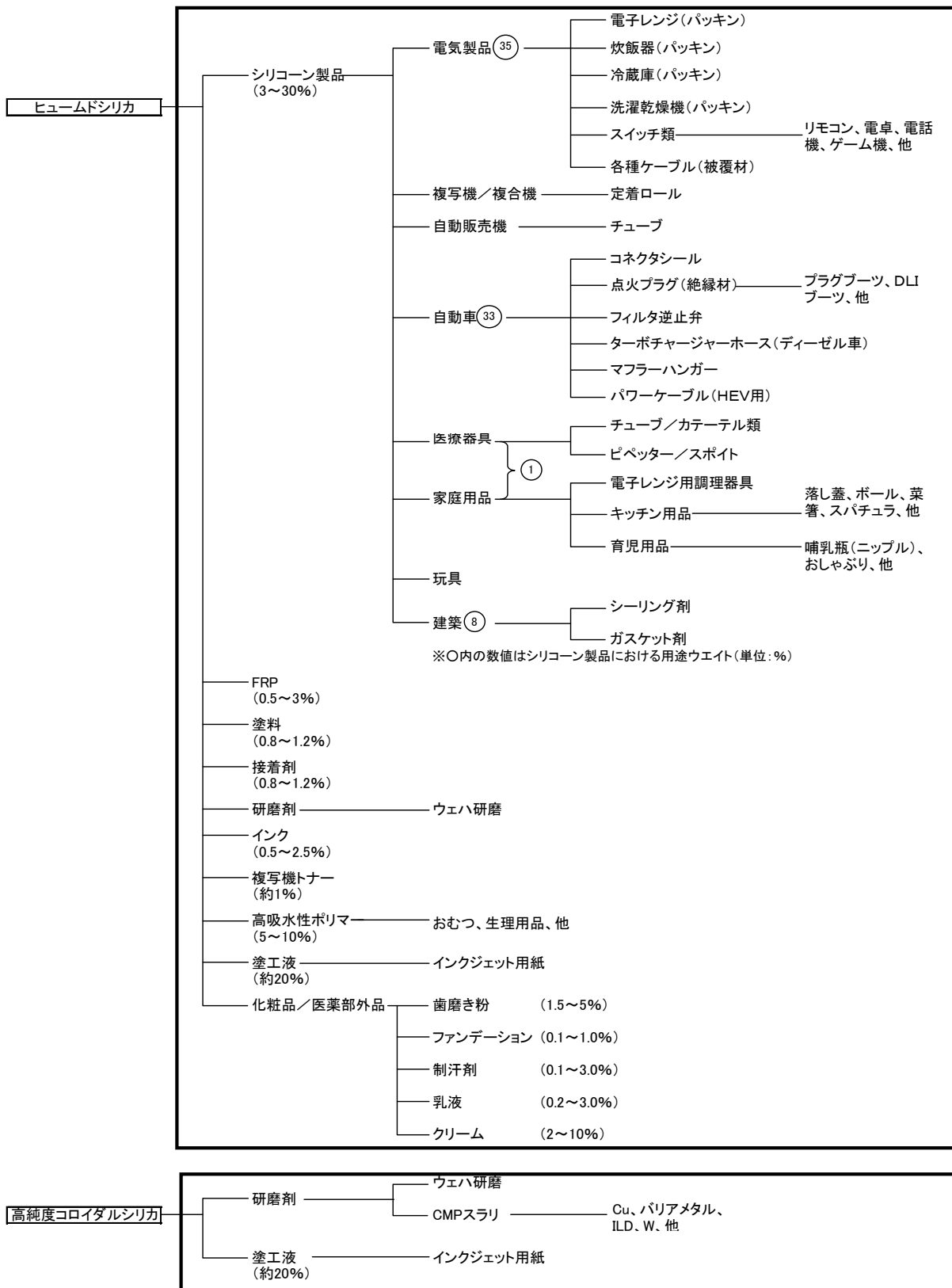
[富士キメラ総研推定]



当該品は、半導体の研磨剤としての利用が大半を占めており、ウェハ研磨剤用途が 51.1%、CMP スラリ用途が 40.2%を占めている。

- ・ 半導体製品の微細化の進展により、ヒュームドシリカ、既存のコロイダルシリカからの代替が進んでいる。
- ・ これらの用途では、半導体の生産工程で利用され、洗浄・除去されるため、電気・電子機器等最終製品には残留していない。
- ・ その他用途としては、インクジェット用紙の塗工剤に光沢付与、インク受容性向上を目的に使用されている。

④主要用途における製品フロー



□は、商業化されている用途

⑤利用事例

製品名	シリコーンゴム製品
含有形態	シリコーンゴムにコンパウンド ・ ロールミル、プラネタリーミキサー等の分散装置を用いシリコーンゴムにナノシリカを均質に分散させている。
1製品当たりの使用量	◆ 3～30% ※要求特性に応じて調整。 ・ ナノシリカは、シリコーンゴムの補強・強化、チクソ性付与(室温硬化型の場合)、誘電特性向上(熱硬化型の場合)等の目的で添加されているが、利用用途等によって要求特性が異なるため、それに応じて添加量が調整されている。
特色	・ 当該品は、主としてシリコーンゴムの強度向上を目的に混練されている。 ・ ナノサイズであり、透明性があるため、特に着色したシリコーンゴムの利用に適している。 ・ 室温硬化型の場合、チクソ性を付与することで成形を容易にする効果もある。
応用製品例	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 家電製品ーパッキン(電子レンジ、炊飯器、冷蔵庫、洗濯乾燥機、等)、スイッチ類(リモコン、電卓、電話、ゲーム機、等)、各種ケーブル被覆材、等</li> <li>■ 複写機/複合機ー定着ロール</li> <li>■ 自動販売機ーチューブ</li> <li>■ 自動車ーコネクタシール、点火プラグ(絶縁材)、フィルタ逆止弁、ターボチャージャーホース、マフラーハンガー、パワーケーブル、等</li> <li>■ 医療器具ーチューブ/カテーテル類、ピペッター/スポイト、等</li> <li>■ 家庭用品ー電子レンジ用調理器具、キッチン用品(落とし蓋、ボール、菜箸、スパチュラ、等)、育児用品(哺乳瓶ーニップル、おしゃぶり、等)等</li> <li>■ 玩具 等</li> </ul>

製品名	インクジェット用紙
含有形態	<p>エマルジョン</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 各種樹脂にナノ銀(純度 99.99%)を均質に分散させている。</li> <li>・ ペレットに加工され、樹脂成形加工事業者向けに出荷される。</li> </ul>
1 製品当たりの使用量	<p>◆ <u>塗工剤の 20%</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 塗工量は、製品によって違うが、片面 2~5g/m<sup>2</sup>が一般的。</li> <li>・ ヒュームドシリカはインク受容層に、高純度コロイダルシリカは光沢層に利用されるケースが多い。</li> </ul>
特色	<p>①インク吸収性が高い→滲みのないクリアな印画・印字が可能</p> <p>②速乾性</p> <p>③光沢性</p> <p>④耐水性</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 上記の特性により高画質の印刷が可能であり、写真印刷用を中心にナノシリカが利用されている。</li> </ul>

## 8) ナノ銀

### ①製品概要

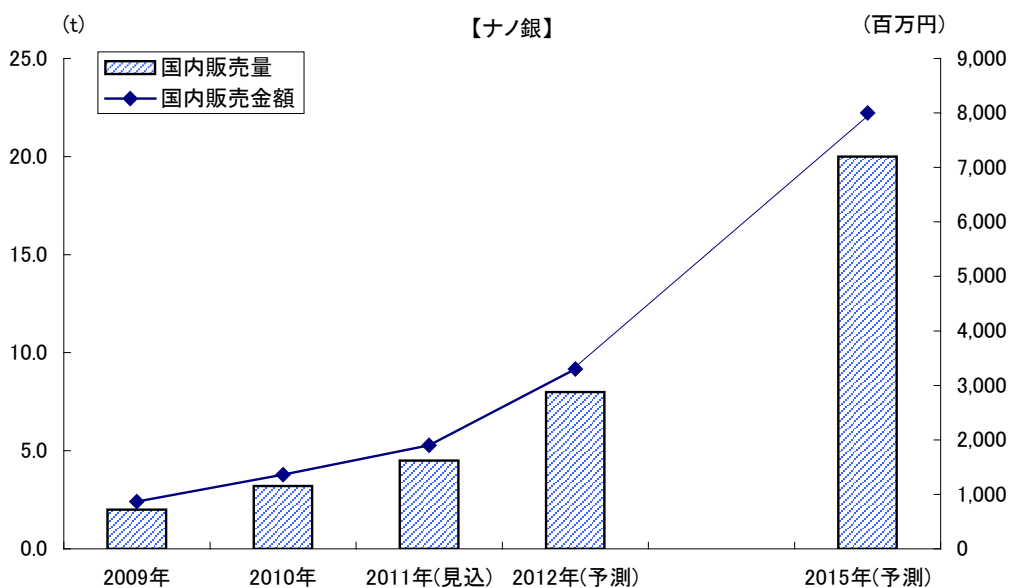
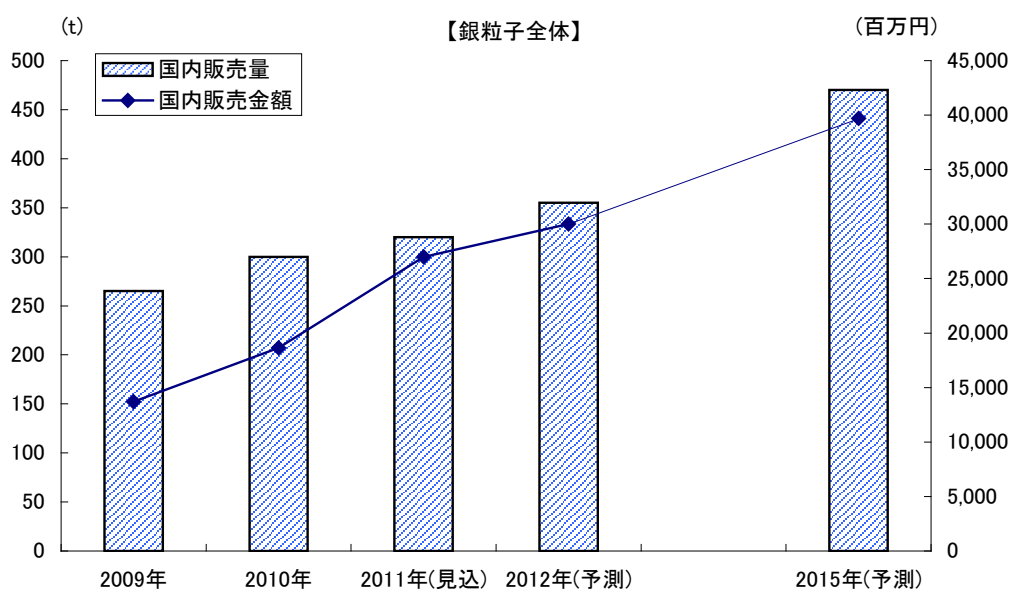
サイズ	1～100nm ・ エレクトロニクス用銀ナノペーストに使用されるナノ銀は、1～10nm のものが主流。 ・ 抗菌用は、メーカー／製品による製品のバラつきが大きく、数 nm のものと数十 nm のものが混在している。																																			
形状	粉体／ペースト／コロイド水溶液																																			
計測技術	TEM(日本イオン)																																			
物性	<table border="1"> <thead> <tr> <th>項目</th> <th>単位</th> <th>乾粉-1</th> <th>乾粉-2</th> <th>乾粉-3</th> <th>乾粉-4</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>粒径</td> <td>nm</td> <td>20</td> <td>60</td> <td>100</td> <td>300</td> </tr> <tr> <td>SSA</td> <td>m<sup>2</sup>/g</td> <td>15～20</td> <td>5～8</td> <td>3～6</td> <td>1～2</td> </tr> <tr> <td>TAP 密度</td> <td>g/ml</td> <td>2～4</td> <td>2～4</td> <td>2～4</td> <td>1～3</td> </tr> <tr> <td>Ag 含有量</td> <td>wt%</td> <td>≥95</td> <td>≥98</td> <td>≥99</td> <td>≥99</td> </tr> </tbody> </table> <p style="text-align: right;">[DOWA エレクトロニクス(株)製品データ]</p>						項目	単位	乾粉-1	乾粉-2	乾粉-3	乾粉-4	粒径	nm	20	60	100	300	SSA	m <sup>2</sup> /g	15～20	5～8	3～6	1～2	TAP 密度	g/ml	2～4	2～4	2～4	1～3	Ag 含有量	wt%	≥95	≥98	≥99	≥99
項目	単位	乾粉-1	乾粉-2	乾粉-3	乾粉-4																															
粒径	nm	20	60	100	300																															
SSA	m <sup>2</sup> /g	15～20	5～8	3～6	1～2																															
TAP 密度	g/ml	2～4	2～4	2～4	1～3																															
Ag 含有量	wt%	≥95	≥98	≥99	≥99																															
機能／特性	①導電性 ②抗菌性 ③光学特性(高効率で光を吸収や散乱)																																			
製造会社	[国内] ■ アルバック(ハリマ化成がペースト化) ■ DOWA エレクトロニクス ■ 日本イオン ■ (株)ユーブイコート(韓国・漢陽大学と提携※輸入販売) [海外] ■ Sigma-Aldrich(米国) ■ Nanopoly(韓国)																																			

## ②国内市場動向

(単位:t、百万円)

		2009年	2010年	2011年(見込)	2012年(予測)	2015年(予測)
銀 粒 子 全 体	国内販売量	265	300	320	355	470
	前年比	—	113.2%	106.7%	110.9%	132.4%
	国内販売金額	13,700	18,650	27,000	30,000	39,700
	前年比	—	136.1%	144.8%	111.1%	132.3%
ナ ノ 銀	国内販売量	2.0	3.2	4.5	8.0	20.0
	前年比	—	160.0%	140.6%	177.8%	250.0%
	国内販売金額	870	1,360	1,900	3,300	8,000
	前年比	—	156.3%	139.7%	173.7%	242.4%

[富士キメラ総研推定]



・銀粒子全体としては、国内で300tの需要があり、生産規模は年間1,050t(2010年)あるが、



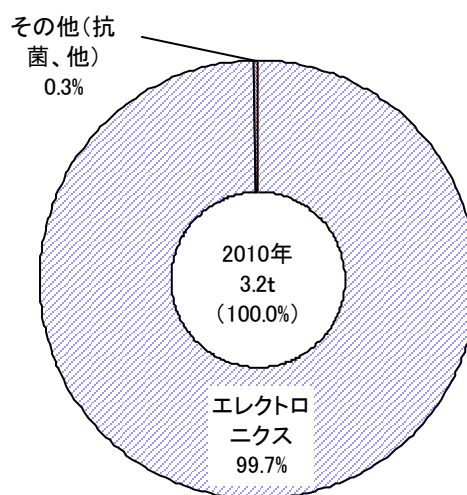
その70%超が韓国、中国を中心に輸出されている。

- ・ 粒子サイズは1~5 $\mu$ mのものが60%超のウエイトを占めており、主用途のエレクトロニクス部品の小型軽量化に伴い微細化の傾向にある。それに伴いナノ銀を使用した銀ナノペーストが利用されるようになってきている。
- ・ ナノ銀の国内市場は、3.2t、13億6,000万円であるが、その大半が銀ナノペースト用となっており、現状、まだ規模は小さいが高成長が見込めることから、新規参入やより微細加工に適した製品開発が活発に行われている。

### ③主要用途構成

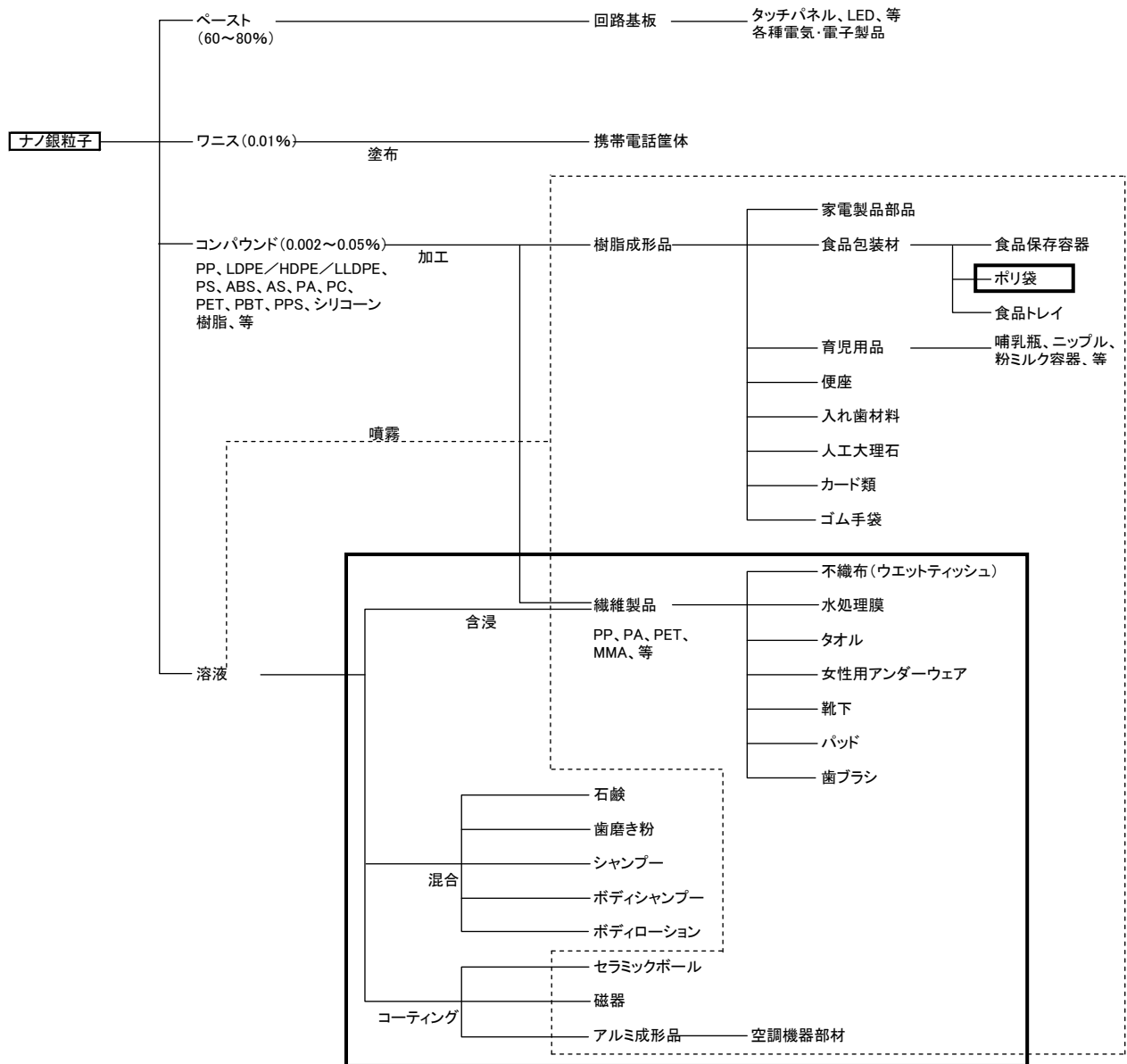
用途(2010年)	販売量(t)	構成比
エレクトロニクス	3.19	99.7%
その他(抗菌、他)	0.01	0.3%
合計	3.2	100.0%

[富士キメラ総研推定]



- ・ ナノ銀は、銀ナノペーストとして、エレクトロニクス部品用配線・接点材料にその大半が利用されている。
- ・ 銀ナノペーストの場合、ナノ銀の含有率が65~90%と高い。
- ・ プリントドエレクトロニクスのキーマテリアルのひとつであり、今後の市場拡大が見込めることから、現在も、新製品開発、新規参入が活発である。
- ・ 一方、ナノ銀の抗菌／消臭機能を活かした応用展開も進んでおり、衣類、生活用品等を中心に製品化が行われている。
- ・ 当該用途では、従来、材料表面にコーティングして利用されるケースが多かったが、ナノ銀を練りこんだ樹脂ペレットの量産化が始まっており、今後、応用展開が広がっていくことが期待できる。
- ・ しかし、ナノ銀の含有率は、0.00n~0.0n%と低濃度のものが大半であり、ナノ銀自体の使用量は極少量に留まっている。

#### ④主要用途における製品フロー



□は、商業化されている用途

⑤利用事例

製品名	抗菌プラスチック
含有形態	各種樹脂にコンパウンド ・各種樹脂にナノ銀(純度 99.99%)を均質に分散させている。 ・ペレットに加工され、樹脂成形加工事業者向けに出荷される。
1 製品当たりの使用量	◆ 0.05%(標準値)※要求特性に応じて調整可。 ・ナノ銀含有率 0.05%で抗菌活性値 4 程度(樹脂種類、成形形態等の条件により性能に格差はある)。
特色	①繊維、フィルムを含め各種成形加工が可能。 ②光や塩分等により変色がしない。 ③抗菌効果の持続性が高い。 ④他微粒子にナノ銀を担持した抗菌材と比較して樹脂の物性に与える影響が小さい。
応用製品例	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 繊維製品－衣類(作業着、スポーツウェア、肌着、靴下、看護・介護服、エプロン等)、タオル、寝具、カーペット、水処理膜、空気清浄フィルタ、等</li> <li>■ 食品包装－食品保存容器/袋、食品トレイ、等</li> <li>■ 医療器具－シリンジ、手術器具用トレイ、等</li> <li>■ 育児用品－哺乳瓶、ニップル、粉ミルク容器、等</li> <li>■ キッチン用品－まな板、しゃもじ、スポンジ、三角コーナー、等</li> <li>■ 家電製品－調理機器(炊飯器、ミキサー、ジューサー、等)、掃除機、洗濯・乾燥機、エアコン、空気清浄機、加湿器、等</li> <li>■ お風呂用品－洗面器、いす、マット、等</li> </ul>

- ・ 抗菌剤として銀を使用した製品は多数製品化が行われている(ナノ銀以外の製品を含む)。
- ・ 家庭用日用品等を中心に廉価な粗悪品(抗菌効果が低い、持続性がない等)も多く市場に出回っており、そうした粗悪品との差別化を明確化し、抗菌用途でのナノ銀利用製品の評価を確立できるか否かが当該用途での普及の鍵を握っている。

製品名	銀ナノペースト
含有形態	ペースト状 <ul style="list-style-type: none"> <li>・ ナノ銀粒子を溶媒、樹脂（熱硬化性樹脂、熱可塑性樹脂、他）と混練してペースト状に加工して使用される。</li> <li>・ ガラス、プラスチック等の基材上にスクリーン印刷等により配線パターンを形成する。</li> </ul>
1製品当たりの使用量	◆ 65～90% ※70～80%のことが多い <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 当該品は、ナノ銀粒子を高濃度に含んでおり、ユーザーの要望に応じてナノ銀粒子の濃度や溶媒、バインダー樹脂の種類等を調整して供給されている。</li> <li>・ そのため、ユーザーによってナノ銀粒子の濃度は異なるが、おおよそ70～80%のものが利用されているケースが多い。</li> </ul>
特色	①微細加工が容易 <ul style="list-style-type: none"> <li>・ ナノ銀粒子の使用により微細な配線パターンが形成でき、電子部品の高性能化、小型・軽量化に繋がる。</li> </ul> ②焼結の低温化 <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 100～300℃で焼結が可能であり（従来の銀ペーストは 500℃以上）、プラスチック基板等の耐熱性の低い材料に利用できる。</li> <li>・ それにより、電子部品の小型・軽量化やフレキシブル化に対応できる。</li> </ul>

## 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, TiO<sub>2</sub>

D; Zinc Oxide or ZnO

E; Silica or Silicon Oxide or Silicon Dioxide or SiO<sub>2</sub> 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 <sub>2</sub>	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 $\mu$ g/L f-C60 545.6 $\mu$ g/L と 823 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ g/L と 823.9	●暴露濃度 823 $\mu$ 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><math>\mu\text{g/L}</math> 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 <math>545.4\mu\text{g/L}</math>、f-C60 <math>545.6\mu\text{g/L}</math> と <math>823.9\mu\text{g/L}</math> 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 <sub>60</sub> (コロイド状フ ラーレン C <sub>60</sub> の 遺伝毒性)	●対象物質 水性フラーレン懸濁液(aqu-フラー レン C <sub>60</sub> ) ●試料調整法 京都大学 Dr. H. Tsue より提供された C <sub>60</sub> を精製、乾燥した C <sub>60</sub> 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 C <sub>60</sub> をろ過 により除去。 ●特性 ・aqu-C <sub>60</sub> 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 ●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 ●検定用試験(aqu-C <sub>60</sub> 濃度) ・細菌の遺伝毒性試験 0~ 0.43 mg/L ●遺伝毒性試験用量(aqu-C <sub>60</sub> 濃度) ・Bacillus subtilis (枯草菌)Rec-Assey 0.048 mg/L	●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 ・ <sup>32</sup> P-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 ●投与方法 細菌および細胞培養 aqu-C <sub>60</sub> 中に上記の試 験用細菌または細胞 を添加し培養 ●期間 ・aqu-C <sub>60</sub> 暴露 24 また は 72 時間 ・MTS 検定 24 または 72 時間 ・Bacillus subtilis Rec- Assey 5 時間 ●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	●細菌の遺伝毒性試験 aqu-C <sub>60</sub> 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-C <sub>60</sub> 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-C <sub>60</sub> 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。 ●哺乳類細胞増殖に及ぼす aqu-C <sub>60</sub> 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-C <sub>60</sub> 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。 ●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、CdG <sub>1</sub> 、CdG <sub>2</sub> を選択した。CdG <sub>1</sub> と CdG <sub>2</sub> のレベルは aqu-C <sub>60</sub> 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-C <sub>60</sub> で引き起こされる巨大 DNA 付加物は検出されな かった。 ●aqu-C <sub>60</sub> 懸濁液の遺伝毒性試験結果 細胞株または組織 結果 枯草菌 H17 と M45 + ネズミチフス菌 +	●aqu-C <sub>60</sub> は DNA 障害を 起こす可能 性があるが DNA 障害は C <sub>60</sub> 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。 ●aqu-C <sub>60</sub> 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。

		・umu テスト(変異原性試験) 0.43 mg/L ・ <sup>32</sup> 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 <sup>32</sup> 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 <sub>60</sub> ) 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 <sub>60</sub> :inhalati- on hazard assessment and derivation of a period-limited acceptable exposure level  (フラーレン C <sub>60</sub> : 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)	<ul style="list-style-type: none"> <li>●対象物質 C<sub>60</sub> 17 文献にのぼる C<sub>60</sub> 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。</li> <li>●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。</li> <li>●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。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>●試験生物 各種ラットとマウス</li> <li>●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。</li> <li>●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。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>●吸引暴露試験結果に基づいてラットの肺毒性の C<sub>60</sub> の無毒性効果レベル NOAEL を決定する。</li> <li>●気管支内注入試験結果に基づいてラットの肺毒 性の C<sub>60</sub> の無毒性効果レベル NOAEL を決定する。</li> <li>●ラットの NOAEL 値を含むヒト(健康な労働者およ 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ーとして 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<sub>60</sub> 粒子に対して成 立する。</li> <li>●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。</li> <li>●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<sub>60</sub> 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。</li> <li>●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<sup>~</sup>3 と した。</li> <li>●幾何学的平均径 96 nm の C<sub>60</sub> 粒子の AEL-(PL) の推定値 健康な労働者に対しては 0.39 mg/m<sup>3</sup> で 一般の社会人には 1.4x10<sup>-2</sup> mg/m<sup>3</sup> である。粒子 のサイズが異なる C<sub>60</sub> に対する AEL-(PL) の推定値 の算定式も誘導された。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>●本研究では使用可 能な限定された C<sub>60</sub> 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<sub>60</sub> 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。</li> <li>●吸入暴露と気管支 内注入試験での C<sub>60</sub> の肺滞留データ を用いてラットの肺毒 性に関する C<sub>60</sub> 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<sup>3</sup> 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。</li> </ul>

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	<p>J. G. Teeguarden, B-J. Webb-Robertson, K. M. Waters, A. R. Murray, E.R. Kisin, S. M. Varnum, J. M. Jacobs, J. G. Pounds, R. C. Zanger, A. A. Shvedova</p> <p>Toxicological Sciences,120, pp 123-135 (2011)</p>	<p>Comparative proteomics and pulmonary toxicity of single-walled carbon nanotubes, crocidolite asbestos, and ultra-fine carbon black in mice</p> <p>(マウスに注入した単層カーボンナノチューブ、クロシドライトアスベストならびに超微細カーボンブラックの比較プロテオミクスと肺毒性)</p>	<p>●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<sup>2</sup>/g ・標準クロシドライト AB *入手先 A Union for International 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<sup>2</sup>/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<sup>2</sup>/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<sup>+2</sup>と Mg<sup>+2</sup> フリーリン酸緩衝生理食塩水</p>	<p>●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、マクロファージ、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</p>	<p>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、SWCNT、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度と過酷度は 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 1 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。</p>	<p>●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。</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
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 <sub>60</sub> ) 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 <sub>60</sub> )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 <sub>60</sub> (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 <sub>60</sub> 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 <sub>60</sub> 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 <sup>+</sup> 、K <sup>+</sup> 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 <sup>+</sup> 、K <sup>+</sup> 、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 <sup>+2</sup> 、Mg <sup>+2</sup> 、 Na <sup>+</sup> 、K <sup>+</sup> )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 <sup>+</sup> K <sup>+</sup> -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 <sup>+</sup> K <sup>+</sup> -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 <sub>60</sub> )) 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 <sub>60</sub> 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 <sub>60</sub> 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 <sub>60</sub> 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"> <li>・SWCNT 500 mg/kg</li> <li>・C<sub>60</sub> 500 mg/kg</li> </ul> <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。C<sub>60</sub>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 <sup>6</sup> )と MWCNT(9.87x10 <sup>5</sup> )の場合 Control 暴露マウ ス(5.46x10 <sup>5</sup> )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ー 3 やカスパーゼー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、酸化物質と抗酸化物 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 <sup>2</sup> /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 <sup>3</sup> ) 低 0.03 高 0.13 数濃度(粒子数/cm <sup>3</sup> ) 低 5.0x10 <sup>4</sup> 高 6.6x10 <sup>4</sup> 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"> <li>・Negative control Tween80 エアロゾル</li> <li>・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。</li> </ul> <p>●Control</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Negative control Tween80 エアロゾル</li> <li>・平均粒径 62 nm</li> <li>・平均質量濃度 0.38 mg/m<sup>3</sup></li> <li>・平均粒子数 5.6 x10<sup>4</sup> 粒子数/cm<sup>3</sup></li> </ul>	<p>光学顕微鏡使用</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・肺胞マクロファージの特性</li> </ul> <p>TEM 使</p>	<p>ム(食胞とリソ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 <sup>2</sup> /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 <sup>2</sup> /g N <sub>2</sub> 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 <sup>2</sup> /kg) 0.04 0.2 1.0 2.0 0.025 数(粒子/kg)x 10 <sup>12</sup> 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 <sup>12</sup> 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, <b>46</b> , 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 <sup>2</sup> /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, <b>722</b> , 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 <sup>3</sup> ) 1.7 2.1 25°C 表面積(m <sup>2</sup> /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 <sup>2</sup> /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、内在化した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 に結合するよう見られ る。

		<ul style="list-style-type: none"> <li>・CNT 暴露による壊死の観察 CNT 0.25,10,25,50,100 <math>\mu\text{g}/\text{ml}</math></li> <li>・CNT の遺伝子毒性 1, 3, 10, 50 <math>\mu\text{g}/\text{ml}</math></li> <li>●Control</li> <li>・Positive control</li> <li>*CB</li> <li>*H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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</li> <li>・Negative control</li> <li>未処理マウスマクロファージ細胞 株 Raw 264.7</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>コメットアッセイなど 他 2 種</li> <li>・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</li> <li>・炎症反応の検出 TNF-<math>\alpha</math> の測定</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>い量の TNF-<math>\alpha</math> が放出した。</li> </ul>	
--	--	--	--	--	--

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"> <li>●対象物質</li> <li>・種類 HiPco 法で合成した SWCNT</li> <li>・購入先 Cheap Tubes Inc. (U.S.A.)</li> <li>・特性</li> <li>*残存金属含量 3-12%</li> <li>*直径 0.8~1.2 nm;長さ 100~1000 nm</li> <li>●試験目的</li> <li>●試料調整法</li> <li>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</li> <li>●試験用量</li> <li>・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 8<math>\mu</math>g/ml</li> <li>・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 80<math>\mu</math>g/ml</li> <li>・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 40<math>\mu</math>g/ml</li> <li>・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 <math>\mu</math>g/ml</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>●試験生物</li> <li>・種類 ヒトの肺胞表皮細胞(A549)</li> <li>・購入先</li> <li>The American Type Culture Collection (U.S.A.)</li> <li>●投与方法</li> <li>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</li> <li>●期間(時間)</li> <li>・血清の影響の検討:0,1,3,6 および 24 時間</li> <li>・暴露時間の影響の検討:0,1,3,6 および 24 時間</li> <li>・暴露と回復時間の影響の検討:6 および 24 時間</li> <li>暴露時静的および動的細胞成長環境の利用:24 時間</li> <li>●試験方法</li> <li>・細胞増殖 BCA 全プロテインキット使用</li> <li>・IL-8 発現 IL-8 レベルを A549 の上澄みから specific sandwich ELISA で測定</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>●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。</li> <li>●SWCNT 濃度 4 および 8<math>\mu</math>g/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。</li> <li>●SWCNT 濃度 4 および 8<math>\mu</math>g/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 4<math>\mu</math>g/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。</li> <li>●細胞を色々な濃度(2,4,8,20,40,80<math>\mu</math>g/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。</li> <li>●SWCNT 誘起 IL-8 発現と細胞増殖に対する回復時間の影響</li> </ul> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>濃度(<math>\mu</math>g/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 4<math>\mu</math>g/ml 暴露時間 6 時間)</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>昇</td> <td>4, 40</td> <td>24</td> <td>著しく上</td> </tr> <tr> <td>昇</td> <td>(コントロール 濃度 4 と 40<math>\mu</math>g/ml 暴露時間 24 時間)</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>昇</td> <td>プロテイン濃度 4</td> <td>48, 96</td> <td>著しく上</td> </tr> <tr> <td>昇</td> <td>(コントロール 濃度 4<math>\mu</math>g/ml 暴露時間 0 時間)</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>少</td> <td>4, 40</td> <td>24</td> <td>著しく減</td> </tr> </tbody> </table>		濃度( $\mu$ g/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 4 $\mu$ g/ml 暴露時間 6 時間)			昇	4, 40	24	著しく上	昇	(コントロール 濃度 4 と 40 $\mu$ g/ml 暴露時間 24 時間)			昇	プロテイン濃度 4	48, 96	著しく上	昇	(コントロール 濃度 4 $\mu$ g/ml 暴露時間 0 時間)			少	4, 40	24	著しく減	<ul style="list-style-type: none"> <li>●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。</li> <li>●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。</li> <li>●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。</li> <li>●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。</li> </ul>
	濃度( $\mu$ g/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 4 $\mu$ g/ml 暴露時間 6 時間)																																									
昇	4, 40	24	著しく上																																							
昇	(コントロール 濃度 4 と 40 $\mu$ g/ml 暴露時間 24 時間)																																									
昇	プロテイン濃度 4	48, 96	著しく上																																							
昇	(コントロール 濃度 4 $\mu$ g/ml 暴露時間 0 時間)																																									
少	4, 40	24	著しく減																																							

				<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 0<math>\mu</math>g/ 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 <math>\mu</math>g/ ml で IL-8 レベルはコントロール値(濃度 0<math>\mu</math>g/ 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(0<math>\mu</math>g/ ml)あるいは存在下(20<math>\mu</math>g/ ml)細胞増殖は引き起こされる。</p> <p>SWCNT 5 および 10<math>\mu</math>g/ 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"> <li>●対象物質 <ul style="list-style-type: none"> <li>・単層カーボンナノチューブ (SWCNT) <ul style="list-style-type: none"> <li>*購入先 Carbolex Inc.Ltd. (U.S.A)</li> <li>*純度 ~99% 不純物(鉄触媒) &lt; 1%</li> </ul> </li> <li>・多層カーボンナノチューブ (MWCNT) <ul style="list-style-type: none"> <li>*製法 組織内で MPCVD 法利用</li> <li>*触媒(Co)含量 &lt; 1%</li> </ul> </li> </ul> </li> <li>●チタニアナノチューブ(TiNT) <ul style="list-style-type: none"> <li>・合成法 TiO<sub>2</sub>(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 51m<sup>2</sup>/g)の熱水処理により合成、洗浄後焼鈍(400°C,2h)</li> </ul> </li> <li>●対象物質の物性測定 <ul style="list-style-type: none"> <li>・SWCNT および MWCNT SEM、TEM、ラマン分光法</li> <li>・チタニア HRTEM、XRD</li> </ul> </li> <li>●試料調整法 <ul style="list-style-type: none"> <li>・細胞毒性測定濃度(試験用量)</li> <li>*CNT(SWCNT または MWCNT) PBS 中の CNT 濃度 0.01、0.05、0.11 mg/mL</li> <li>*チタニアの構造体(TiNT または TiO<sub>2</sub>) 燐酸塩緩衝食塩 PBS 中濃度 0.1、0.5、1.1 mg/ mL</li> </ul> </li> <li>●コントロール <ul style="list-style-type: none"> <li>TCP と PBS</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>●試験生物 <ul style="list-style-type: none"> <li>・種類 A549 ヒト肺腺癌細胞株</li> <li>・購入先 American Type Culture Collection (U.S.A.)</li> </ul> </li> <li>●細胞培養方法と対象物質添加処理 <ul style="list-style-type: none"> <li>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 CO<sub>2</sub>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%CO<sub>2</sub>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。</li> <li>●期間 細胞生存率測定のための培養期間は 1、3、7 日</li> <li>●試験方法 <ul style="list-style-type: none"> <li>・細胞生存率の測定</li> <li>市販の MTT 評価キット利用</li> </ul> </li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>●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 <ul style="list-style-type: none"> <li>・チタニアナノ構造体 <ul style="list-style-type: none"> <li>*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</li> <li>*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</li> <li>*ナノ粒子 結晶サイズ~23 nm の粒子の凝集体</li> </ul> </li> <li>・MWCNT <ul style="list-style-type: none"> <li>*CNT フィルム MWCNT が縦に整列したフィルム 高さ 25~30μm</li> <li>*ナノチューブ 壁数 2~3で径 10~30 nm 壁間隔 0.34 nm</li> <li>・SWCNT <ul style="list-style-type: none"> <li>*形状 束状 長さ 5~10 nm 径 0.5~3 nm</li> </ul> </li> </ul> </li> <li>●細胞生存率解析 <ul style="list-style-type: none"> <li>SWCNT、MWCNT、TiNT、TiO<sub>2</sub> 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、TiO<sub>2</sub> 濃度は 0.1、0.5、1.1 mg/ mL。Control として TCP と PBS 使用した。</li> <li>(1) TiNT と TiO<sub>2</sub> 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。TiO<sub>2</sub> 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 TiO<sub>2</sub>0.5mg/ 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。</li> <li>(2) SWCNT と MWCNT 処理に対しては 1 日後で</li> </ul> </li> </ul> </li></ul>	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, <b>34</b> , 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 <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> 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 <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> 相中での細胞の%個体数 65%:SDS Control グループにおける G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> 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 <sub>1</sub> 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"> <li>・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</li> <li>・全プロテイン抽出物の作成</li> <li>24 時間培養</li> <li>・単細胞電気泳動法 (Comet 検定法)</li> <li>24 時間培養</li> <li>●試験方法</li> <li>・細胞数の測定 MTT 法利用</li> <li>・細胞毒性 CytoTox-Fluor™ 使用</li> <li>・タンパク質濃度測定 BCA プロテイン検定キット使用</li> <li>・プロテインの検定 イムノプロット法解析使用</li> <li>・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</li> </ul>	<p>された場合、8 <math>\mu</math>g/ 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 <math>\mu</math>g/ 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 <math>\mu</math>g/ 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 ープの異なる影 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 <sub>2</sub> 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 とは異なる反応を示 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 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 <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> MWCNT COOH+ HRP/PSF 1,3-dipolar cycloaddition HRP: horseradish peroxidase, MPO: myeloperoxidase, PSF: phagolysosomal simulating fluid, Phs: Phosphatidyl serine	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。

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, <b>252</b> , 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 <sup>2</sup> ・Comet 検定法 V29 細胞使用 0, 3, 12, 48 µg/cm <sup>2</sup> ・小核検定 0, 3, 12, 48 µg/cm <sup>2</sup> ・クロマチン全動原体シグナル検 出 2, 4, 24 µg/cm <sup>2</sup> ・ヒト末梢気管支上皮細胞(SAEC) 2, 4, 24 µg/cm <sup>2</sup> ●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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> +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 <sup>2</sup> /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 <sup>2</sup> )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 <math>\mu\text{g}/\text{cm}^2</math>) 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 <sub>4</sub> 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, <b>207</b> , 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 <sub>2</sub> - CH <sub>4</sub> 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 <sup>2</sup> /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 実験1および2 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 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(CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, MgSO<sub>4</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, 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, <b>352</b> , 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)	<ul style="list-style-type: none"> <li>●対象物質</li> <li>・種類 MWCNT(HTT2800) Mitsui MWCNT-80</li> <li>・寸法 アスペクト比 100~150 nm: 長さ 10~20 <math>\mu</math>m</li> <li>●試料調整法</li> <li>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</li> <li>●試験用量および試験時間</li> <li>HTT2800 濃度と試験時間は各試 験により異なる</li> <li>・BEAS-2B 細胞中での HTT2800 摂 取</li> <li>HTT2800 30<math>\mu</math>g/ml 12 または 24 時 間</li> <li>・HTT280 の急性細胞毒性</li> <li>0.1~100 <math>\mu</math>g/ml 24 または 72 時間</li> <li>・ROS 生成</li> <li>HTT2800 0.1~30<math>\mu</math>g/ml 24 時間</li> <li>●HTT2800 暴露後開裂された caspase-3 の検出</li> <li>0.1~30 <math>\mu</math>g/ml と 30~100<math>\mu</math>g/ml</li> <li>・炎症反応</li> <li>30<math>\mu</math>g/ml 24 時間</li> <li>●Control</li> <li>Positive control H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 <math>\mu</math>M) Negative control(媒体 0.1%ゼラチ ン)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>●試験生物</li> <li>・種類 ヒト気管支表皮細胞 (BEAS-2B)</li> <li>・購入先 American Type Culture Coll- ection</li> <li>・細胞培養法</li> <li>BEAS-2B を 10% FBS、ペニ シリン(100U/ml)とストレプトマ イシン(100 <math>\mu</math>g /ml)を含む DMEM 媒質中に保持、成長さ せる</li> <li>●試験方法</li> <li>・BEAS-2B 細胞中での HTT2800 の細胞摂取検定</li> <li>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</li> <li>・細胞生存率</li> <li>アラマーブルー検定法使 用</li> <li>・LDH 放出検定</li> <li>LDH 活性を LDH 細胞検定 キットで評価</li> <li>・ROS の測定</li> <li>フローサイトメトリー法使用</li> <li>・プロテイン解析</li> <li>ウエスタンブルー法使用</li> <li>・培地上澄み液中のサイトカ インの検定</li> <li>Cytometric bead array flex set 使用</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>●BEAS-2B 細胞中での HTT2800 摂取</li> <li>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。</li> <li>●HTT280 の急性細胞毒性</li> <li>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 10<math>\mu</math>g/ml (IC<sub>50</sub>= 15<math>\mu</math>g/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。</li> <li>●ROS 生成</li> <li>HTT2800 濃度 0.1~30<math>\mu</math>g/ml 間 24 時間暴露で 明確な DCF 応答は見られない。</li> <li>●HTT2800 暴露後開裂された caspase-3 の 検出</li> <li>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。</li> <li>●炎症反応</li> <li>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-<math>\alpha</math>, IL-10, IL-1<math>\beta</math>)は HTT2800 暴露後検出されなかつ た。</li> </ul>	<p>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。</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
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 <sub>2</sub> ) ・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 <sub>2</sub> 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 <math>Ca^{+2}</math> 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, <b>255</b> , 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 $\mu\text{m}$ : 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 $\mu\text{g}$ /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 $\mu\text{g}$ /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 $\mu\text{g}$ 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 <sup>2</sup> /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 <sup>3</sup> ●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/m<sup>3</sup>)</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/m<sup>3</sup> エアロゾル (Triton X 0.47 mg/m<sup>3</sup> 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. <b>53</b> , S80- S86 (2011).	<a href="#">Identification of systemic markers from a pulmonary carbon nanotube exposure</a> (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 ・プロテオミックスとその 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(リボ核酸)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 な全身性炎症性 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 $\mu\text{m}$ ; 数平均 直径 49 $\pm$ 13.4 nm *BET 法平均表面積 26 m <sup>2</sup> /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 <sup>+2</sup> と Mg <sup>+2</sup> 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 $\mu\text{g}$ /マウス	●試験生物 C57BL/6J マウス ・7 週齢 ・雄 ・体重 *MWCNT 暴露量 80 $\mu\text{g}$ 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 $\mu\text{g}$ 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 $\mu\text{m}$ 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 $\mu\text{g}$ 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 $\mu\text{m}$ 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 $\mu\text{g}$ 、MWCNT 80 $\mu\text{g}$ 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 rate 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ตอบสนอง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ตอบสนอง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-<math>\alpha</math>, 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 <math>\mu</math>g 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 <math>\mu</math>g)を行った。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-<math>\beta</math> 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 <math>\mu</math>g の暴露で最高値を示す)。BALF 中の全 TGF-<math>\beta</math> 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 <math>\mu</math>g 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-<math>\beta</math> 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)	<ul style="list-style-type: none"> <li>●対象物質</li> <li>・MWCNT</li> <li>*合成場所 Nano Lab Inc. (U.S.A.)</li> <li>*合成法 接触化学気相蒸着法</li> <li>*特性</li> <li>・外径 15~30 nm:長さ 15~20 μm:純度 &gt;95%</li> <li>CNT の比表面積 未精製物 41m<sup>2</sup>/g :精製物 42 m<sup>2</sup>/g</li> <li>●試料調整法</li> <li>・機能化 MWCNT</li> <li>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</li> <li>・MWCNT 分散液</li> <li>*作成法</li> <li>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</li> <li>*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</li> <li>●Control</li> <li>Negative control 生理食塩水</li> <li>Positive control カーボンブラック(CB)、0.75 mg/kg</li> <li>●/試験用量</li> <li>0.25, 0.5 または 0.75 mg/kg/日</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>●試験生物</li> <li>・種類 スイス-Webster マウス</li> <li>・性別 雄</li> <li>・週齢 5~7</li> <li>・平均体重 30±2g</li> <li>●投与方法</li> <li>・投与物種類</li> <li>精製し機能化した MWCNT, Positive control, Negative control</li> <li>・方法 腹腔内注射</li> <li>●投与期間 24 時間間隔で5日連続</li> <li>●試験方法</li> <li>・肝臓ホモジネート、(均等質)の作成</li> <li>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</li> <li>・ROS 検定 DCFH-DA (ROS 蛍光分析用プローブ)使用</li> <li>・ヒドロ過酸化物</li> <li>LHP 検査法利用</li> <li>・ALT (Alanine aminotransferase アラニンアミノ基転移酵素)</li> <li>Reitman らの方法使用</li> <li>・AST (Aspartate aminotransferase アスパラギン酸アミノ基転移酵素)</li> <li>分析法利用</li> <li>●ALP (Alkaline phosphatase アルカリホスファターゼ)</li> <li>Kay らの方法利用</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>●ROS</li> <li>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。</li> <li>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。</li> <li>●ヒドロ過酸化物</li> <li>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。</li> <li>●ALT</li> <li>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。</li> <li>●AST</li> <li>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。</li> <li>●ALP</li> <li>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。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>●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。</li> <li>●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。</li> <li>●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。</li> <li>●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。</li> </ul>

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)	●対象物質 ・未処理 MWCNT(p-MWCNT) Nanovatec Pvt. Ltd.(U.S.A.)よりの 贈与品。 ・機能化 MWCNT(f-MWCNT) ●試料調整法 *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 f-MWCNT の調整 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-および f-MWCNT の特性 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 置換基 COOH ●試験用量 投与量 p-および f-MWCNT 共に単 回投与 10 mg/ kg	●試験生物 ・スィスマウス ・体重~25g ●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。 ●暴露期間 7,15,28 日 ●試験方法 ・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-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。 ●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。 ●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-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。 ●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。 ●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。	●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-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。 ●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。 ●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。



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, <b>74</b> , 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"> <li>●対象物質</li> <li>・MWCNT</li> <li>*購入先 NanoAmor 社(U.S.A.)</li> <li>*原料特性</li> <li>純度 &gt;.95%</li> <li>外径 20~30 nm</li> <li>長さ 0.5~2 μm</li> <li>・水調整用試薬</li> <li>*購入先 Fisher Scientific 社(U.S.A.)</li> <li>*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</li> <li>*その他 National organic matter(天然有機 物)NOM</li> <li>・水</li> <li>*Reconstituted moderately hard water(RHW)</li> <li>*純水</li> <li>* MilliQ 水</li> <li>・天然有機物(NOM)</li> <li>・MWCN の懸濁液希釈液 NOM に RHW 添加、濃度 15 NOM mg/L</li> <li>●Control NOM 非含有 RHW NOM 溶液</li> <li>●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</li> <li>●試験用量</li> <li>・成長暴露 4.2 または 8.4 mg/L</li> <li>・繁殖暴露</li> <li>*c.dubia: 0.48, 2.38, 4.77 mg/L 7 日</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>●試験生物</li> <li>ミジンコ(c.dubia)</li> <li>オオミジンコ(d.magn- na)</li> <li>●投与方法</li> <li>温度湿度制御室内で ミジンコと試験液とを混 合</li> <li>●期間</li> <li>繁殖試験 c.dubia 7 日 d.magna 21 日</li> <li>●試験方法</li> <li>・MWCNT 濃度測定 UV-vis 分光法利用</li> <li>・MilliQ 水中に懸濁さ れた MWCNT 凝集体 の平均粒径測定 SEM</li> <li>・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</li> <li>・ζポテンシャル測定 Malvern instrumen- ts Zeta Sizer 使用</li> <li>・バイオ(生存、成長繁 殖)検定 EPA 標準法使用</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>●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)</li> <li>pH SEM 径 DLS 径 ζポテンシャル (μm) (nm) (mV)</li> <li>6 9.2 129.1 -21.7</li> <li>7 6.5 149.2 -23.3</li> <li>8 2.3 142.4 -25.8</li> <li>●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。</li> <li>●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</li> <li>●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。</li> <li>●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。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>●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。</li> <li>●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。</li> <li>●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。</li> <li>●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。</li> </ul>



			<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 $\mu\text{m}$ ; 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 113.103m <sup>2</sup> /g * BJH 法細孔容積 0.688 m <sup>2</sup> /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±0.58 g ●投与方法 コントロールとして懸濁液 (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"> <li>●対象物質 <ul style="list-style-type: none"> <li>・原料種類 市販 MWCNT, CM-95</li> <li>・購入先 Hanwha Nanotech (Incheon, Korea)</li> <li>・寸法 直径 10~15 nm; 長さ~20µm</li> <li>・純度 C 95% Fe 約5%</li> </ul> </li> <li>・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"> <li>*高アスペクト比 MWCNT 直径 10~15 nm; 長さ~10µm</li> <li>*低アスペクト比 MWCNT 直径 10~15 nm; 長さ~150 nm</li> </ul> </li> <li>●試料調整法 <ul style="list-style-type: none"> <li>・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</li> <li>・MWCNT 分散液 MWCNT を分散溶媒 (Ca<sup>2+</sup> と Mg<sup>2+</sup> 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。</li> </ul> </li> <li>●Control <ul style="list-style-type: none"> <li>・微生物復帰突然変異試験 (Ames 試験) negative, positive 菌株 specific</li> <li>S9-specific control 物質</li> <li>・in vitro 染色体異常試験 positive control: マイトマイシン</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>●試験生物 <ul style="list-style-type: none"> <li>・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</li> <li>・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)</li> <li>・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</li> </ul> </li> <li>●投与方法 (in vivo) 腹腔内投与</li> <li>●試験方法 <ul style="list-style-type: none"> <li>・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</li> <li>・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</li> <li>・in vivo 細胞小核試験法 MWCNT を病原菌フリー</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>●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。</li> <li>●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% (GI<sub>50</sub>) に基づく高アスペクト比 MWCNT (GI<sub>50</sub>=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。</li> <li>●in vivo 細胞小核試験</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>●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。</li> <li>●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。</li> <li>●高アスペクト比 MWCNT は低アスペクト比 MWCNT より毒性は高い。</li> <li>●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</li> </ul>

		<p>(mitomycin)C と cyclophosphamide</p> <p>●試験用量</p> <p>・微生物復帰突然変異試験</p> <p>    MWCNT 最高暴露濃度 1000 <math>\mu</math>g/plate:</p> <p>    希釈濃度 333, 111, 37, 12 <math>\mu</math>g/plate</p> <p>・in vitro 染色体異常試験</p> <p>    MWCNT 暴露レベル 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 g/ml</p> <p>・in vivo 細胞小核検定</p> <p>    12.5, 2.5, 50 mg/kg</p>	<p>ICR マウスに腹腔内投与し細胞小核試験実施</p> <p>●投与期間</p> <p>・微生物復帰突然変異試験 44～48 時間</p> <p>・in vitro 染色体異常試験</p> <p>    短期間 S9mix 使用および使用せず 6 時間</p> <p>    長期間 S9mix 使用せず 24 時間</p> <p>・in vivo 細胞小核検定 24 時間</p>	<p>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。</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
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 functionalized and polymer- 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 <sub>3</sub> <sup>+</sup> )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 <sub>3</sub> <sup>+</sup> ) 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 <sub>3</sub> <sup>+</sup> )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 <sub>2</sub> 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 <sub>3</sub> <sup>+</sup> 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 <sub>3</sub> <sup>+</sup> 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 <sub>3</sub> <sup>+</sup> 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 <sub>3</sub> <sup>+</sup> )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-NH<sub>3</sub><sup>+</sup> 5% dextrose 中で分散させる</p> <p>● 試験用量 MWNT-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>、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-NH<sub>3</sub><sup>+</sup> 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-NH<sub>3</sub><sup>+</sup> 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-NH<sub>3</sub><sup>+</sup> 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關す 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 <sup>2</sup> /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 <sup>2</sup> /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

		<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 P2X<sub>7</sub> 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 P2X<sub>7</sub> 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,TNF α,IFN γ, IL-18,MCP1,MIPI α,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 <sub>2</sub> (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 <sub>60</sub> (OH) <sub>24</sub> ) *購入先 Sigma-Aldrich Corp. (U.S.A.) ●試料調整法 Nano-TiO <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 、水酸化フラレン、 Control いずれも 10nL、胚中最終 濃度は Nano- TiO <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> ナノ粒子(Aldrich から購入) ・粒径: 25nm 以下 ・比表面積: 200-220 m <sup>2</sup> /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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 暴露によって減少した。 -コントロールの RCI: 2.25(1h) -TiO <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> /mg protein/min -TiO <sub>2</sub> 曝露群: 7.223±0.9611 nmol O <sub>2</sub> /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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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"> <li>・TiO<sub>2</sub>とZnOを含む4つの疎水性および親水性日焼け止め製剤。</li> <li>①Cm 630(o/w 製剤[T-Lite SF];10%TiO<sub>2</sub>)、</li> <li>②Cm 634(w/o 製剤[T-Lite SF];10%TiO<sub>2</sub>)、</li> <li>③Cm 643(o/w 製剤[Z-COTE HP1];5%ZnO)、</li> <li>④Cm 644(o/w 製剤[Z-COTE];5%ZnO)。</li> </ul> <p>・TiO<sub>2</sub>,ZnO: BASF, Ludwigshafen, Germany 製の市販品</p> <p>・TiO<sub>2</sub>:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-結晶構造: ルチル、</li> <li>-結晶粒径: 14-16nm、</li> <li>-一次粒径 10×50nm</li> <li>-凝集体粒径 200nm</li> <li>-形状: 紡錘形</li> <li>-比表面積 100m<sup>2</sup>/g、</li> <li>-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。</li> </ul> <p>・ZnO:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-一次粒径 140nm</li> <li>-比表面積 12-24m<sup>2</sup>/g、</li> <li>-3-エトキシ-カプリル-シランの被覆あり(Cm 644 は被覆なし)。</li> <li>-形状: 不均一</li> </ul>	<p>●試験生物 (in vivo)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・乳離れしたばかりのヨークシャー・ブタ</li> <li>・体重: 20-30kg</li> </ul> <p>●曝露方法</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・豚の背中中の皮膚に UV を照射 (UVB: 5mW/cm<sup>2</sup>, UVA : 40mW/cm<sup>2</sup>) (以下、UVB 照射)</li> <li>・照射量 (最小紅斑投与量 MED): 40~50mJ/cm<sup>2</sup></li> </ul> <p>●曝露方法</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ブタの暴露部位を 250μl の各製剤で処理。</li> <li>・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<sup>®</sup> (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)</li> <li>・曝露時間: 48 時間</li> </ul>	<p>●UVB 曝露による日焼け</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 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。</li> <li>・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。</li> <li>・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。</li> </ul> <p>●光学顕微鏡観察 (In Vivo)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・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。</li> <li>・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。</li> <li>・TiO<sub>2</sub> 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。</li> </ul> <p>●SEM 観察 (In Vivo)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・Cm 630 処理、UVB 曝露皮膚で、TiO<sub>2</sub> 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。</li> <li>・TiO<sub>2</sub> は毛の基礎の近くにも存在した。Cm 634 の TiO<sub>2</sub> の凝集体は毛にも存在した。</li> <li>・Cm 643 の不均一な ZnO は、UVB 皮膚の表面に分布した。</li> <li>・ZnO 凝集体も毛の基礎部と毛に存在した。</li> <li>・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。</li> </ul> <p>●TOF-SIM 観察 (In Vivo)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・Cm 630 処理 UVB 曝露皮膚では、Ti は真皮でも観察された。</li> <li>・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。</li> </ul>	<p>●UVB 日焼けした皮膚は、日焼け止め製剤に存在する TiO<sub>2</sub>、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 TiO<sub>2</sub> 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 TiO<sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> , ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: Acute toxicity, oxidative stress and oxidative damage  (TiO <sub>2</sub> , 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 <sub>2</sub> , ZnO の粗粒子とナノ粒 子プラス ZnSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 粗粒子: 1000、ナノ粒 子: 30 -ZnO 粗粒子: 500、 ナノ粒子: 30 ・純度: 99%(TiO <sub>2</sub> 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 <sup>2+</sup> 溶液は、ZnSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> : 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 <sup>2+</sup> : 0, 2.5, 10, 30, 50mg/l -TiO <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> ナノ粒子、ZnO ナノ粒子/粗粒子、Zn <sup>2+</sup> は、 用量依存的急性毒性を示した。 ・TiO <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 処理で消化管の GSH 濃度は増大 した。 ●えら細胞の形態 ・50mg/lTiO <sub>2</sub> 粗粒子処理では、正常だった。 ・50mg/lTiO <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> ナノ粒子の急性 毒性は、TiO <sub>2</sub> 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 <sup>2+</sup> 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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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 Pentalan 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 Pen talan 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 ・急性暴露: -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"> <li>●対象物質</li> <li>・酸化チタン・ナノ粒子</li> <li>・粒径: 5,32nm(np5,np32)</li> <li>・純度: 99%</li> <li>・結晶構造: アナターゼ</li> <li>・Alfa Aesar社から購入(Ward Hill, MA, USA).</li> <li>●細胞培養培地での存在形態</li> <li>・10%FBの細胞培養培地で;</li> <li>-np5は、不規則形状の血小板状に凝集</li> <li>-np32粒子の大部分はなめらかな表面を有する球状に凝集。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>●試験生物</li> <li>・MC3T3-E1ネズミ前骨芽細胞(サブ・クローン14)</li> <li>●培養時間</li> <li>・24,48,72時間</li> <li>●粒子濃度(μg/ml)</li> <li>・0,5,50,100,500</li> <li>☆: 投与量の記載なし。</li> <li>●分析項目</li> <li>・アネキシンVアポトーシス分析</li> <li>・ミトコンドリア膜透過性分析</li> <li>・RNAのリアルタイム定量RT-PCR分析</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>●細胞毒性</li> <li>・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。</li> <li>・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。</li> <li>・np5,np32とも、濃度依存的にLDH放出を増大させた。</li> <li>●アポトーシス</li> <li>・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。</li> <li>・np5は、500μg/mlのnp32より大きくアポトーシスを誘起した。</li> <li>●微粒子の内在化</li> <li>・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。</li> <li>●ミトコンドリア膜透過性</li> <li>・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。</li> <li>・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)。</li> <li>●炎症誘発性応答</li> <li>・np5,np32とも、24時間100μg/mlで細胞のGmCSF mRNAを大きく増加させた。</li> <li>・np5,np32への24時間曝露は、細胞のG-CSF発現を増加させた。</li> <li>・np5,np32への曝露によっては、TNFαと mRNA発現は変化しなかった。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>●TiO2微粒子は、時間依存的、用量依的に細胞毒性を誘起する。</li> <li>●この毒性は、TiO2微粒子の粒径とも関連している。</li> <li>●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。</li> </ul>

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 <sub>2</sub> nanoparticles to induce skin irritation, phototoxicity, and sensitization  (ポリスチレンとTiO <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> ・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 <sub>2</sub> : 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 <sub>2</sub> で一晩培養し、 ②EpiDerm 皮膚刺激テスト ・ポリスチレン: 1000 μg/ml ・TiO <sub>2</sub> : 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 <sub>2</sub> : 100 μg/ml を添加し 24h 培養後、 ・6J/cm <sup>2</sup> 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 <sub>2</sub> : 1~100 μg/ml 添加し DMEM 中で 1h 培養後 ・5J/cm <sup>2</sup> 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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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"> <li>・TiO<sub>2</sub>: 100 μg/ml</li> <li>・片側のみ 10J/cm<sup>2</sup> の UVA 照射</li> <li>・紅斑または浮腫を 24h、48h、72h 後に観察</li> </ul> <p>5. CBA/N マウス</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・雌 8~9 週齢</li> </ul> <p>⑥局所リンパ節試験</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・25 μl の試験液を両耳の裏に 3 日間毎日塗布</li> <li>・ポリスチレン: 10~1000 μg/ml</li> <li>・TiO<sub>2</sub>: 10~1000 μg/ml</li> <li>・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</li> </ul>	
--	--	--	--	--

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 <sup>6</sup> 、2.1x10 <sup>6</sup> と 7.9x10 <sup>6</sup> 粒子/cm <sup>3</sup> 。 -250nm ZnO: 6.2x10 <sup>4</sup> 、1.5x10 <sup>5</sup> と 4.5x10 <sup>5</sup> 粒子/cm <sup>3</sup> 。 ・質量濃度 -35nm ZnO: 2.4、3.7、12.1mg/m <sup>3</sup> 。 -250nm ZnO: 7.2、11.5、 45.2mg/m <sup>3</sup> 。 ・表面積濃度 -35nm ZnO: 1.7x10 <sup>4</sup> 、2.5x10 <sup>4</sup> と 1.0x10 <sup>5</sup> mm <sup>2</sup> /cm <sup>3</sup> 。 -250nm ZnO: 2.0x10 <sup>4</sup> 、4.2x10 <sup>4</sup> と 1.2x10 <sup>5</sup> mm <sup>2</sup> /cm <sup>3</sup> 。 ●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 <sup>2+</sup> 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 <sup>2+</sup> 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 <sub>2</sub> ナノ粒子 (TiO <sub>2</sub> 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 <sup>2</sup> /ラット) ・ZnONPの凝集体 (4,380nm)も150 cm <sup>2</sup> / 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 <sup>2</sup> /ラット) ・屠殺: 1日後 ・コントロール: BAL液 の注入 ●Zn <sup>2+</sup> 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 <sup>2+</sup> )。 ●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 <sup>2</sup> 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 <sup>2+</sup> 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 <sup>2</sup> /mL ・ZnONP、CuONP: 3、 10、30 cm <sup>2</sup> /mL ●気管内注入 ・試験生物: 雌ウスタ ーラット(200-250g) ・300cm <sup>2</sup> /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)	●対象物質 ・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。	●試験菌種 ・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) ●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。 ●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。 ●Ag+イオンのソースとしてはAgNO3を使用。  (MBC: 最小殺菌濃度)	●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。) ・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。 ●超微細観察 ・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。	●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。 ●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。 ●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)。 ●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。

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 <sup>2</sup> /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 <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 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 <sup>3</sup> ・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 $\alpha$ 、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( $\mu$ g/g肺d.w.) -0週群:31(範囲4.3~37.5)( $\mu$ g/g肺d.w.) -3週群:10(範囲4.3~37.5)( $\mu$ 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 <sup>3</sup> )と比較して、0週群(92.3±3.7×10 <sup>3</sup> )と3週群(119.2±18.7×10 <sup>3</sup> )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- $\alpha$ , MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , 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 $\mu$ 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 <sup>3</sup> 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"> <li>●対象物質</li> <li>・銀ナノ粒子(AgNP)</li> <li>・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。</li> <li>・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)</li> <li>・形状:ほぼ球面形状(凝集体は検出されず)</li> <li>・ゼータ電位:-2mV(懸濁液pH5.9)</li> <li>・懸濁液中の銀濃度:628±55µg/ml</li> <li>・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。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>●試験生物</li> <li>・雌Wistar Hannover Galasラット</li> <li>・週齢:4週</li> <li>・体重:107±9g</li> <li>●投与方法:</li> <li>・1群:PVP(ベヒクル・コントロール)</li> <li>・2群:AgNP</li> <li>・3群:酢酸銀(AgAc)</li> <li>・1日2回×28日間、11.5mg/mlの水溶液として経口投与</li> <li>●投与量</li> <li>-AgNP懸濁液:10ml/kgb.w.×2回/日(12.6mg/kgb.w./日の銀量)</li> <li>-AgAc:9mg/kgb.w./日の銀量</li> <li>●実験日数:28日間</li> <li>●採取組織</li> <li>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)。</li> <li>●銀濃度の定量:組織、血漿、尿と糞便</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>●銀の臓器分布</li> <li>・臓器ごとの銀の分布は、AgNPとAgAcで同様だった。</li> <li>・最高の銀の濃度は、小腸、胃、腎臓、肝臓で見いだされた。</li> <li>・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。</li> <li>●銀の排出</li> <li>・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。</li> <li>●回腸における銀の存在</li> <li>・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。</li> <li>・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。</li> <li>・粒状体の粒径は12nm以下であった。</li> <li>・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。</li> <li>・銀に加えて、SeとSも検出された。</li> <li>・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。</li> <li>●肝臓の銀の所在</li> <li>・肝臓の銀濃度には動物間の差が確認された。</li> <li>・銀の分布パターンは、AgNPとAgAc暴露で同様だった。</li> <li>●腎臓における銀の存在</li> <li>・腎臓では糸球体と近位尿細管に存在。</li> <li>・AgNP、AgAcとも銀の分布に差はなかった。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>●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。</li> <li>●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。</li> <li>●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、</li> <li>●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。</li> </ul>



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 <sub>3</sub> 0.094M の水溶液 を NaBH <sub>4</sub> 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 $\mu$ l 中にシリカ 625 $\mu$ g と卵 白アルブミン(OVA)100 $\mu$ g を懸 濁 ●注射 6 日後に脾細胞を in vitro で OVA <sub>257-264</sub> ペプチド(SL8)5 $\mu$ g/ml 中で 24 時間培養し、SL8 特異的 CD8 <sup>+</sup> T 細胞の誘発を IFN- $\gamma$ 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 <sup>+</sup> 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 <sup>+</sup> 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 <sup>+</sup> 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%CO <sub>2</sub> 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%CO <sub>2</sub> 、3%O <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 、G7-OH、 G6.5-COOH、G4-NH <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 、G7-NH <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 、G7-NH <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 基の 50 倍になり、 -NH <sub>2</sub> 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 <sup>2</sup> /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 <sup>2</sup> /g ・空孔体積:1.46cm <sup>3</sup> /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 <sup>2</sup> /g ・空孔体積:0.29cm <sup>3</sup> /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 <sub>3</sub> 存在下の水に混合、攪拌後、CTAB を除去 ・Col の合成 TEOS を NH <sub>3</sub> 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 $\mu$ g/ml ・添加後24hで各種評価 ①細胞毒性 ・上記処理後、10 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 <sup>2</sup> /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  $3.1 \text{ mg/m}^3$  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( $\text{mg/m}^3$ ) 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( $2\text{mg/kg}$ )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  $0.04 \text{ mg/kg}$ ( $2.2 \times 10^{12}$  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/m<sup>3</sup>)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10μmのものと約0.15μm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  $\mu\text{m}$  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/m<sup>3</sup> 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。TiO<sub>2</sub> 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、TiO<sub>2</sub> 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 TiO<sub>2</sub> 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、TiO<sub>2</sub> 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 TiO<sub>2</sub> 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 TiO<sub>2</sub>、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 TiO<sub>2</sub> 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 TiO<sub>2</sub> 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、TiO<sub>2</sub> 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、TiO<sub>2</sub> ナノ粒子の急性毒性は、TiO<sub>2</sub> 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<sup>2+</sup>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)、TiO<sub>2</sub>(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 Zn<sup>2+</sup>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 Zn<sup>2+</sup>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  $\mu$  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/m<sup>3</sup>)した。3.3mg/m<sup>3</sup>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<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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-NH<sub>2</sub>基の50倍になり、-NH<sub>2</sub>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。

### 3. 国際動向調査

#### 3-1 主要国におけるナノマテリアルに関する規制状況、 安全性試験・研究戦略

以下に主要国のここ1年のナノマテリアル規制に関する動向を記す。

##### (1) 米国

##### 1) EPA の動向

##### ① TSCA(有害物質規正法)改正法案の提出

2011年4月14日、フランク・ローテンバーグ上院議員(民主党、ニュージャージー州選出)らは、Safe Chemicals Act of 2011(TSCA改正法案、S.847)<sup>1)</sup>を提出した。ローテンバーグ上院議員は昨年「Safe Chemicals Act of 2010」を提出しているが、今回提出されたものは昨年度版を改定した内容となっている。

同法案は、従来から議論のある TSCA の抜本的改正を狙ったものであるが、ナノ規制との関連については、以下の通り。

法案の SEC. 4. DEFINITIONS に「分子的に同一であっても、特別な性質を有していれば、新規化学物質とみなされる」という規定があつて、その性質とは、「物理的、化学的、生物学的な特性によりリスクに重大な影響がある場合であつて、大きさ又は大きさの分布、形状と表面構造、反応性などの特性によると EPA が考える場合」、としている。すなわち、EPA が物質の大きさ又は大きさの分布によって、リスクに大きな影響を与えると判断すると新規化学物質とみなされることになり、従来物質でもナノスケールになると新規化学物質となる可能性がでてくる。

法の審議は進んでいないが、ボクサー議員が共同提案者であることから、同法案は主要法案の1つになっていく可能性があると思われる。しかし、昨年度の調査結果からみて、議会の合意を得るのは難しいと考えられる。

##### ② 多層 CNT の重要新規利用規則(SNUR)発表<sup>2)</sup>

米国環境保護庁(EPA)は2011年5月6日、TSCA section 5(a)(2)に基づき多層カーボンナノチューブ(CNT)の重要新規利用規則(SNUR)<sup>3)</sup>を公布した。ナノ物質のSNURは、Thomas Swan社のSWCNT、MWCNTに次いで3度目となる。今回のSNURでは、樹脂系複合材料の強化材や工業用触媒として使われる多層CNTもその対象に含まれている点が、PMN P-08-177(トーマススワン社MWCNT)と異なる。これは、EPAがこの化学物質が健康に害を及ぼす可能性があり、実際の製造や輸入以前に利用目的などを検証する機会を設ける必要があると判断したことによる。このSNURは2011年6月6日より有効となる。

##### ③ IUR改定によるCDR制定の動向<sup>4), 5), 6)</sup>

8月1日に、EPAは16ヶ月間の検討を経て、有害物質規正法(TSCA)に基づいた化学物質報告システム(Chemical Data Reporting: CDR)の正式公布前版(pre-publication)<sup>8)</sup>を同ウェブサイトに掲載した。このシステムは従来のIUR(インベントリー更新規則)を改定したもので、それに伴って名称もIURからCDRに変更された。この改定版CDR規則に基づいて提出が義務付けられる情報には、化学物資の製造量、製造場所と、それらの物質の用途も含まれる。

8月16日には、TSCAのCDRの最終規則が発表され、その30日後に発効する。ただし、対象となる取り扱い下限量変更などの新規則全てが適用になるのは、2016年からである。

##### ④ 最終重要新規利用規則(SNUR)の公布<sup>6)</sup>

米国環境保護庁(EPA)は10月5日、製造前届出(PMN)の対象になっている36種類の化学物質について最終重要新規利用規則(SNUR)<sup>7)</sup>を公布し、それらの化学物質をSNURで定



義した利用目的のため、製造、加工または輸入する事業者は90日前にEPAにその旨を申請しなければならない旨を定めた。

今回 SNUR の対象となった36化学物質のうち、ナノスケール物質を含有すると考えられる物質には、以下の二つが含まれている。(同意指令は、2009年2月17日発効)

- ・ 錫、亜鉛、カルシウム添加されたルチル(P-06-36)
- ・ 錫、亜鉛、ナトリウム添加されたルチル(P-06-37)

この SNUR は、2011年12月5日より有効になるため、11月4日までパブリックコメントを受け付けている。

## 2) FDA の動向

### ① ナノテクが使われているかどうかを判断するためのガイド

米国食品医薬品局(FDA)は管轄対象にナノテクが使われているかどうかを判断するための判断基準案を示した<sup>8)</sup>。これは、規制策定より1段階前のステップである。その基準とは、

イ) 工業材料または製品が少なくとも1つの次元でナノスケール(約1~100 nm)であること

又は、

ロ) それらが、その大きさ故に、物理的/化学的/生物学的な特性/現象が現れるかどうか(例えば1 $\mu$ mのように、ナノスケールの大きさから外れていても)

である。向こう60日間で、パブリックコメントを収集する。

### ② ナノテクレギュラトリーサイエンス法案

10月6日、Mark Pryor 上院議員(民主党、アーカンソー州選出)が、2011年ナノテクレギュラトリーサイエンス法案(Nanotechnology Regulatory Science Act of 2011, S. 1662)<sup>9)</sup>を米上院議院に提出した。この法案は、同議員が2010年1月21日に提出した、2010年ナノテク安全法(Nanotechnology Safety Act of 2010, S. 2942)を改定したもので、米食品医薬品局(FDA)に、ナノテクを応用した薬物、薬物送達システム(DDS)、医療機器、整形外科用インプラント、化粧品、及び食品添加物の安全性と効果を科学的に調査する権限を与える目的がある。

この法案は、保健社会福祉(HHS)長官が農務(USDA)長官と協議の上、同法案の規制対象に既に含まれている、あるいは規制対象製品に含まれる予定のナノ材料について、科学的調査を実施し、これらの物質の潜在的毒性や、生態系への影響や生態系との相互作用といった課題に取り組むプログラムを、FDA 内に設立するよう要請している。大量のナノ材料が市場に出回る現在、FDA が科学的根拠に基づき、ナノ材料を規制するための枠組みを必要としており、関係者はこの法案の行方に注目している<sup>10)</sup>。

## 3) ナノ銀に対する規制関係

### ① EPA、FIFRA をナノ銀含有製品に初適用、条件付で認可

米国環境保護局(EPA)は、12月1日付けで、製造事業者が規定の毒性データを提出するという条件つきで、ナノ銀を有効成分にした抗菌性殺虫剤 HeiQ AGS-20 の利用登録を認可した<sup>11)</sup>。この製品は、スイスを拠点にハイテク・繊維製品を開発、加工、製造販売する HeiQ Materials AG 社が製造しており、銀イオンの働きを利用して、バクテリアやカビなど微生物の繁殖を抑制する働きがある。AGS-20 は、布地の仕上げ加工、医療用の包帯やカテーテル、化粧品、ペンキやコーティング剤に混ぜるなどの用途がある。

今回のケースは、EPA が初めて米国殺虫剤・殺菌剤・殺鼠剤法(Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act: FIFRA)をナノテク関連製品に適用した認可となる。EPA は、認可の理由を述べた文書の中で、「ナノ銀で処理したテキスタイルは、より強い抗菌効果が得られるため、このナノ抗菌剤は有用である」としている。

EPA は、ナノ銀については、亜慢性/慢性毒性についてのデータが無い場合、関連研究文献から推察して、最大の不確定要素を見積もった上で、AGS-20 の使用に伴う「子供と環境への影響は憂慮する程ではない」と結論づけている。

AGS-20 認可に向けては、上記のように、「HeiQ 社が、職場、消費者、及び環境に及ぼす AGS-20 の毒性など様々なテストを実施し、1 年以内に、包括的リスク評価の結果を EPA に提出すること」などの条件が義務づけられている。

#### 4) 対 FDA 訴訟<sup>12)</sup> 訴訟の概要<sup>13), 14)</sup>

国際技術評価センター(International Center for Technology Assessment: CTA)が NGO 連合を代表して 2011 年 12 月 21 日に起こした FDA に対する起訴は、特定のナノテク政策に対してではなく、同グループが 2006 年に提出した陳情書<sup>15), 16), 17)</sup>に対して FDA が、何も対応していないことに対する訴訟である。連邦法である行政訴訟法(Administrative Procedures Act)によって、政府機関は陳情書に、適切な期限内に対応しなければならない」と定めているにもかかわらず、その「適切な期限」をすぎても、何の対応もしていないことに業を煮やして、CTA に代表される NGO 団体が、訴訟に踏み切った経緯がある。

訴訟の原因となった 2006 年 5 月に出された陳情書は、「ナノ材料を含む製品に対する表示を義務付ける」、「ナノ材料を含む日焼け止めの宣伝を FDA が止めさせるべき」など、ナノ材料を含む製品全般と、ナノ材料を含む日焼け止め製品に対して、それぞれ FDA が取るべき対応措置を 4 点ずつ挙げている。陳情書ではこれらの提言の根拠として、FDA の工業ナノ材料を含む製品に対する規制状況と、日焼け止め製品に関する規制状況について、製品名や社名を挙げながら詳細に説明している。この請願に対して、FDA は、2006 年 11 月に、「この陳情は、即答できない複雑な問題を提起する」としたまま、未だ正式な回答を出していない。

FDA は、「ナノテク・タスクフォース」を設け、提起された問題を調査するとして、2007 年に、タスクフォースによる報告書を発表した。しかし、その報告書の内容は、「FDA の政策ではなく、タスクフォースの意見である」としたため、正式な回答とはみなされない。

今回の訴訟によると、2007 年以降の FDA の政策や政策案で、2006 年の陳情に言及しているものは無く、同 NGO グループに対しての回答時期も伝えられていない。訴訟にあたり、原告側は、「ナノ製品は、市場急速に浸透してきているが、健康と環境への潜在的影響への政府による監視や研究は、不十分である。」と訴えた。原告は日焼け止めなどのパーソナルケア製品を挙げ、市場に広く出回っており、人体に直接塗布するなど、暴露度も使用頻度も高いことから、特に憂慮される分野だとした。

#### 訴訟を起こした NGO グループについて

消費者や環境保護団体を代表して訴訟を起こした CTA は、非営利、無党派団体で、社会に対するテクノロジーの影響を分析、評価し、その結果を市民に伝えることを目的としている。特にナノテクの監視に力を入れており、ナノ・アクション(NanoAction)プログラムを展開している。また、食物安全センター(Center for Food Safety)とも関連が深いため、今回の訴訟の代表になっている。

訴訟を起こした環境団体や消費者団体などの主な NGO は以下の通り。

組織名	概要
フレンズオブアース(Friends of Earth: FoE)	FoE は、40 年の歴史を持ち、世界に約 2 百万人の活動家を擁する環境保護団体で、抗議行動なども行う。
侵食、テクノロジー、濃縮に対するアクション・グループ(Action Group of	ETC は、25 年の歴史を持ち、持続可能な社会理念の下、生物多様性、食物の安全性、人権問題などを世界に発信している。国や政府関連団

組織名	概要
Erosion Technology and Concentration: ETC)	体とパートナーシップを組み、リサーチ結果などを提供しており、草の根的活動はしていない。
環境健康、食物、水監視センター(The Center for Environmental Health, Food and Water Watch)	非営利団体で、食物や飲料水の安全を求め、2005年に12名のメンバーで設立され、現在60名以上のスタッフを抱えている。活動成果のいくつかは、スターバックスに、成長ホルモンを与えられた牛のミルクの使用を止めさせたり、ボトル入り飲料水の衛生・安全・環境への影響といった懸念を一般に広めたことなどが挙げられる。
農業・通商政策協会(The Institute for Agriculture and Trade Policy: IATP)	IATPは、公平で持続可能な食糧供給、農業、通商システムを目指し、政策提言などを行っている。IATPは、2011年6月に、「先走り:規制不在の米国農業関連ナノテク(Racing Ahead: U.S. Agri-nanotechnology in the Absence of Regulation)」と題した報告書の中で、規制や研究に裏づけされない状態では、ナノテクの可能性を生かすことは出来ないと警告を発している。

(米国関連情報参考 URL)

- 1) <http://lautenberg.senate.gov/assets/SafeChem-Summary.pdf>
- 2) <http://www.winston.com/index.cfm?contentID=19&itemID=168&itemType=25&postid=488>
- 3) [http://www.nanolawreport.com/uploads/file/2011-11127\\_PI.pdf](http://www.nanolawreport.com/uploads/file/2011-11127_PI.pdf)
- 4) <http://blogs.edf.org/nanotechnology/2011/08/03/epa-moves-chemical-reporting-into-the-21st-century-%E2%80%93though-we%E2%80%99ll-have-to-wait-until-mid-decade-to-actually-get-there/>
- 5) [http://www.epa.gov/iur/pubs/Fact%20Sheet\\_IUR%20ModificationsFinalRule\\_8-11-11.pdf](http://www.epa.gov/iur/pubs/Fact%20Sheet_IUR%20ModificationsFinalRule_8-11-11.pdf)
- 6) <http://chemicalwatch.com/8606/us-epa-issues-snurs-for-36-chemicals>
- 7) <http://www.federalregister.gov/articles/2011/10/05/2011-25497/significant-new-use-rules-on-certain-chemical-substances#p-3>
- 8) <http://www.fda.gov/RegulatoryInformation/Guidances/ucm257698.htm>
- 9) [http://www.nanolawreport.com/uploads/file/S\\_%201662%20Nanotechnology%20Regulatory%20Science%20Act%20of%202011.pdf](http://www.nanolawreport.com/uploads/file/S_%201662%20Nanotechnology%20Regulatory%20Science%20Act%20of%202011.pdf)
- 10) <http://www.nanolawreport.com/2011/10/articles/the-nanotechnology-regulatory-science-act-of-2011/>
- 11) <http://www.regulations.gov/#!docketDetail;dct=FR%252BPR%252BN%252BO%252BSR%252BPS;rpp=250;so=ASC;sb=docId;po=0;D=EPA-HQ-OPP-2009-1012>
- 12) <http://www.nanowerk.com/news/newsid=23811.php>
- 13) [http://www.icta.org/files/2011/12/CTA\\_nano-silver-petition\\_final\\_5\\_1\\_08.pdf](http://www.icta.org/files/2011/12/CTA_nano-silver-petition_final_5_1_08.pdf)
- 14) [http://www.fdalawblog.net/fda\\_law\\_blog\\_hyman\\_phelps/2011/12/fda-sued-for-not-acting-on-nanotech-citizen-petition.html](http://www.fdalawblog.net/fda_law_blog_hyman_phelps/2011/12/fda-sued-for-not-acting-on-nanotech-citizen-petition.html)
- 15) <http://www.centerforfoodsafety.org/wp-content/uploads/2011/12/2006-Nano-FDA-petition.pdf>
- 16) <http://www.mtbeurope.info/news/2011/1112032.htm>
- 17) [http://www.icta.org/files/2011/12/CTA\\_nano-silver-petition\\_final\\_5\\_1\\_08.pdf](http://www.icta.org/files/2011/12/CTA_nano-silver-petition_final_5_1_08.pdf)

## (2) EU

### 1) ナノ材料の定義

REACH にはナノ材料への言及はないが、ナノ材料も「化学物質」であるから、同規則の対象となりうる。しかし、REACH の登録義務対象となるのは、年間の生産・輸入量が 1 トン以上のものなので、まだ使用量が少ない多くのナノ材料は規制対象とならない。一方、ナノ材料に関する有害性実験の結果などから、ナノテク応用の安全性に対する懸念が高まり、ナノ材料を対象とした規則を作ることや、REACH の修正などを提案する声が欧州議会 (European Parliament: EP) などから上がっていた。しかしながら、ナノ材料を対象とした規制を課すためには、その前にナノ材料を正しく定義する必要である<sup>1)</sup>ことから、欧州委員会 (European Committee: EC) は二つの機関、欧州共同研究センター (JRC: Joint Research Centre) 及び SCENIHR (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks) に対し、規制を念頭においたナノ材料の定義を諮問した。その結果、EC は、2011 年 10 月 18 日、包括的な規制上のナノ材料の公式定義を導入するに至った<sup>1)</sup>。

#### 定義:

- ・ ナノ材料とは、その構成粒子が固定されていない状態 (unbound) の粒子或いは、凝結体 (アグリゲート; aggregate)、又は凝集体 (アグロメレート; agglomerate) であって、個数に基づいたサイズ分布 (number size distribution) のうち 50% 以上が、少なくとも一つの次元のサイズにおいて 1 nm から 100 nm の範囲である粒子を含む、自然由来、又は非意図的、あるいは、人工的に製造された物質である
- ・ 「特定のケース、及び、環境、健康、安全、または、欧州の競争力に関わるなどの懸念といった観点から妥当だと判断される場合には、粒子の個数濃度に基づいたサイズ分布 50% という閾値は、1-50% 間の閾値に置き換えてもよい
- ・ 1 つ以上の外径が 1 nm 未満のフラーレン、グラフェンフレーク及び単層カーボンナノチューブはナノ材料と見なす
- ・ 個数濃度だけでなく、比表面積での判定も可能とし、ある物質の単位体積あたりの表面積が  $60 \text{ m}^2/\text{cm}^3$  より大きければ、その物質が上記のナノ材料定義の範疇に入ると見なす。ただし、個数基準のサイズ分布に基づいてナノ材料だと判断された物質は、たとえ単位体積あたりの表面積が  $60 \text{ m}^2/\text{cm}^3$  未満であってもナノ材料と見なされるべきである

### 2) REACH

10 月 20 日には、REACH ガイダンス文書改訂に向けて、JRC に依頼して進めていた 3 つのナノ材料に関連する検討プロジェクト

- ・ ナノ材料として扱う物質の特定 (Substance Identification: RIP-oN1)
- ・ 届出に必要な情報要件 (Information Requirements, RIP-oN2)
- ・ 安全性評価 (Safety Assessment, RIP-oN3)

のうち、既に公表した Rip-oN1 に加え、RIP-oN2 及び RIP-oN3 の最終報告書<sup>2), 3)</sup>を公表した。

### 3) RoHS 規制

有害物質規制指令 (The Directive on the Restriction of Hazardous Substances, RoHS 規制) の改訂版<sup>4)</sup>が、欧州理事会 (European Council) と欧州議会 (European Parliament) の双方を通過した。今回の改訂は、明快性を向上させることを目的としていた。改訂版では、鉛、水銀、カドミウム、六価クロム、PBB、PBDE の 6 物質に対する研究要請が加えられたが、ナノ銀及び長い多層 CNT の規制に関する提案は最終的に EU 議会において承認されず、今回の改訂版には含まれなかった。また、今回の RoHS 改訂により、医療機器が新たに対象として

加えられ<sup>5)</sup>、当初 8 種類であった対象品目は 11 種類となった。

#### 4) 化粧品関係<sup>6), 7)</sup>

欧州委員会 (EC) の健康・消費者保護総局 (Directorate General for Health and Consumers: DG SANCO) は 2012 年 1 月 11 日、化粧品の成分などの届出ポータル・サイト、(Cosmetic Products Notification Portal: CPNP) を開設したと発表した<sup>8), 9)</sup>。このポータル・サイトは、化粧品メーカーが、欧州の市場で発売する化粧品についてオンラインで届出を出すために開設されたものである。化粧品規制が実施される 2013 年 7 月 11 日から、関連メーカーや企業に、ポータルを介した届出が義務づけられる。化粧品の成分にナノ材料が含まれるかどうかという点も、重要な必須届出項目である。

既に市場に出回っているナノ材料を含む製品については、2013 年 7 月 11 日までに、届け出ることが義務づけられ、ナノ材料を含む新製品については、欧州市場で発売する 6 か月前までに届け出ることになっている。

(欧州関連情報参考 URL)

1) <http://europa.eu/rapid/pressReleasesAction.do?reference=IP/11/1202&format=HTML&aged=0&language=EN&guiLanguage=en>

2) [http://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech/pdf/report\\_rapon2.pdf](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech/pdf/report_rapon2.pdf)

3) [http://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech/pdf/report\\_rapon3.pdf](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech/pdf/report_rapon3.pdf)

4) <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:174:0088:0110:EN:PDF>

5) [http://www.digikey.com/us/en/purchasingpro/articles/supply-chain/european-union-expands-scope-of-rohs.html?WT.z\\_pp\\_page\\_sec=WH](http://www.digikey.com/us/en/purchasingpro/articles/supply-chain/european-union-expands-scope-of-rohs.html?WT.z_pp_page_sec=WH)

6) <http://nanotech.lawbc.com/2011/10/articles/international/ec-requests-guidance-on-safety-assessment-of-nanomaterials-in-cosmetics/>

7) <http://www.nanotechia.org/global-news/european-commission-expert-committee-to-write-guidance-on-safety-assessment-of-nanomaterials-in-cosmetics>

8) [http://ec.europa.eu/consumers/sectors/cosmetics/files/pdf/cnpn\\_new\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/consumers/sectors/cosmetics/files/pdf/cnpn_new_en.pdf)

9) <http://www.nanotechia.co.uk/global-news/cosmetic-products-notification-portal--cnpn--launched-for-the-implementation-of-the-european-cosmetics-regulation-of-2009>

### (3) ドイツ

ドイツ連邦政府の環境諮問委員会 (Sachverständigenrat für Umweltfragen: SRU) は、2011 年 9 月 1 日に「ナノ物質を管理するための予防的戦略 (Precautionary Strategies for Managing Nanomaterials)<sup>1)</sup>」を発表した。SRU は、政府からは独立した立場を確立しており、4 年に一度、ドイツ連邦政府に対して環境報告書を提出することが義務づけられている。今回発表された報告書では、今後ナノ物質の政策関係者に対するナノテクノロジーの予備的、そして責任ある開発のための勧告・提言が述べられている。

科学・製品・環境に関する既存の規制はナノ物質に対しても「大抵の場合適用される」としているが、従来の規制ではナノ物質の特質に適応できない可能性も高い、とし、こうした規制におけるギャップを無くすためには「ナノ物質の定義の統一、ナノ物質に特化した化学リスク評価、そして製造者側にナノ物質専用の調査データ提出を義務づけることが必要」としている。

現時点における懸念材料として特に、「ナノ物質使用の一般消費者向けスプレー、銀ナノ粒子を含む消費者製品の売り上げの増加、そして発ガン作用があると見られるカーボンナノチューブ (特に高アスペクト比を持つもの) の製造/加工」を挙げている。

消費者向け製品に含まれるナノ物質に関する透明性を向上するため、SRU はナノ物質を含む商品の登録制度や、既存のラベル表示義務の拡大を勧告している。

ドイツ化学技術バイオテクノロジー協会(DECHEMA)とドイツ化学工業協会(VCI)は 10 月 17 日、「ナノ材料のヒト及び環境への毒性、リスク評価における 10 年間の研究記録('10 Jahre Forschung zu Risikobewertung, Human- und Ökotoxicologie von Nanomaterialien')<sup>2)</sup>」を公表した。同報告書によれば、ナノ材料には重大なリスクはなく、サイズ特有のハザードは見つかっておらず、ハザードは材料の種類、粒子のサイズ、形状や表面の構造(surface texture)による。このため、新たに開発されたナノ材料へのリスクアセスメントを別途行う必要はなく、個別の毒性検査が必要な場合には、OECD が定めた検査方法など、国際的に認められているガイドラインと検査方法にのっとり、検査が行われるべきであるとしている<sup>5)</sup>。

(ドイツ関連情報参考 URL)

- 1) [http://www.umweltrat.de/SharedDocs/Downloads/EN/02\\_Special\\_Reports/2011\\_09\\_Precautionary\\_Strategies\\_for\\_managing\\_Nanomaterials\\_KFE.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](http://www.umweltrat.de/SharedDocs/Downloads/EN/02_Special_Reports/2011_09_Precautionary_Strategies_for_managing_Nanomaterials_KFE.pdf?__blob=publicationFile)
- 2) [http://www.processnet.org/processnet\\_media/FG+Chemische+Reaktionstechnik/TAK+Nano/RisikobewertungNano\\_2011.pdf](http://www.processnet.org/processnet_media/FG+Chemische+Reaktionstechnik/TAK+Nano/RisikobewertungNano_2011.pdf)
- 3) <http://www.nanotechia.co.uk/global-news/german-chemical-associations-publish-interim-report-on-nano-risk-assessment>

#### (4) フランス

主な動きは OECD への報告である Tour de Table(175P)にある。フランスの工業ナノ材料報告制度案は、欧州委員会のナノ定義「個数濃度で 50%以上が 1~100nm」を採用した初めての規制と言えるものである。100 グラム以上製造・輸入・販売する場合が該当する。当初はこの閾値が 10 グラム/年であった。施行は 2013 年 1 月 1 日からである。

2012 年 2 月フランス政府は、2009 年 10 月~2010 年 2 月まで実施された国民ナノ討議への回答を発表した。1) ナノに関連する問題やリスクのより良い理解、2) 国民への情報提供の継続、3) ナノテクの責任あるガバナンスのためのアクター間のリンク が重視されている。フランスにおいては、このような社会受容への取組みがなされているのが特徴である。

#### (5) デンマーク

デンマークの環境保護局(DEPA)が、消費者製品に含まれるナノ材料の種類と、それらをもたらす健康や環境への影響や暴露の程度を特定し、危険度をランクで表示するスクリーニングツールである NanoRiskCat(NRC)<sup>1)</sup>を 11 月 25 日に発表した<sup>1)</sup>。

ナノ材料関連のステークホルダーが、対象とするナノ材料についてのデータ、情報を提出すると、科学文献及び規制関連の情報やデータを基に評価され、影響・暴露度ランクが「赤・黄・緑」といった色分けで表示される。このランク付けのためには、ステークホルダーは、以下のナノ材料評価関連項目についてのデータ・情報を提出する必要がある。また、ランク付けの際の指標となる評価項目は以下の通り。

- ・ ナノ材料を専門に扱うエンドユーザーがナノ材料に暴露する可能性
- ・ 消費者がナノ材料に暴露する可能性
- ・ 環境への暴露の可能性
- ・ 人間への危険性に対する一次(初期的)評価
- ・ 環境への危険性に対する一次(初期的)評価

(デンマーク関連情報参考 URL)

- 1) <http://www.nanowerk.com/news/newsid=23677.php>

#### (6) カナダ

10 月 11 日付けで保健省は、ナノ材料の暫定的定義(Health Canada's Working Definition of

Nanomaterial)<sup>1)</sup>を発表した<sup>2), 3)</sup>。この定義によると、以下の工業製造物質及び製品、構成物質、原料、装置、構造をナノ材料であると定義している。

- ① 物質の外径寸法の少なくとも一つがナノスケールである、あるいは、ナノスケールの内部構造か外部構造を持っている (It is at or within the nanoscale in at least one external dimension, or has internal or surface structure at the nanoscale)。
- ② 全ての次元がナノスケールより小さい。あるいは、全ての次元がナノスケールより大きいが一以上以上のスケールの特性もしくは現象を示す (It is smaller or larger than the nanoscale in all dimensions and exhibits one or more nanoscale properties/phenomena)。

また、これらの定義を説明する形で以下の説明を加えている。

- ① 「ナノスケール」とは、1 – 100 nm を意味する。
- ② 「ナノスケールの特性もしくは現象を示す」とは、原子や分子およびバルクの化学的、あるいは物理的特性とは異なる、サイズやその作用に起因する特性を指す。
- ③ 「工業 (manufactured)」とは、物質の工学的処理と制御・操作を含む (The term “manufactured” includes engineering processes and the control of matter.)。

(カナダ関連情報参考 URL)

1) <http://www.hc-sc.gc.ca/sr-sr/pubs/nano/pol-eng.php>

2) <http://www.hc-sc.gc.ca/sr-sr/pubs/nano/index-eng.php>

3) <http://nanotech.lawbc.com/2011/10/articles/international/health-canada-announces-policy-statement-concerning-working-definition-for-nanomaterial/>

## (7) オーストラリア

オーストラリアにおける化学物質管理は NICNUS(国家工業化学品届出審査機構)が、労働安全衛生は SWA(労働安全審議会)担当している。それらのナノマテリアルに関しては 2011 年から 2012 年にかけて、特記すべき動きがなかった(3-2 1-2) ① Tour de Table 参照)。

なお、NICNUS は、2010 年 10 月、化学物質管理の枠組みである「工業化学品(届出・審査)法」第 3 章を改訂し、2011 年 1 月 1 日以降は工業ナノ材料を本章に規定している一般のナノスケールではない新規化学物質とは別の取り扱いをすると発表した。すなわち、既存化学物質インベントリ(Australian Inventory of Chemical Substances)に登録されていない化学物質で、かつそれが NICNAS の定義する工業ナノ材料である場合には、一般の新規化学物質とは異なる手続きが必要となる。現在はそれが発効している。詳細は、平成 22 年度経済産業省委託調査報告書「ナノ材料の安全性情報に関する調査」84-87P を参照されたい。

直近の動きでは、2012 年 3 月、SWA が「カーボンナノチューブの安全な取扱いと使用」を発表した。これは CSIRO に委託して作成されたガイダンス文書で、第一部に有害性評価と曝露評価に基づく管理、第 2 部にコントロールバンディングにもとづく管理が示されている。

## (8) 韓国

韓国では、ナノ材料の安全性の調査、規制に関し、環境部、知識経済部、等複数の官庁が関与している。環境部ではナノ物質の安全管理に対する総合的な体系構築のため、2009年に「ナノ物質安全管理中長期推進計画」を策定した。また、知識経済部は2010年に「ナノ製品安全性総合計画 中長期推進計画」を作成し、ナノ製品の安全な使用のため、安全性の評価体系確立及び国際標準、認証体系の構築を計画している。以下に、韓国のナノ製品の安全性への取り組みを記す。

### ① 第3期「ナノテクノロジー総合発展計画 2011～2020」

「ナノテクノロジー開発促進法」では、5年ごとに総合発展計画を作成することを規定している。これにより、第1期(2001～2010年)、第2期(2006～2015年)に引き続き、第3期「ナノテクノロジー総合発展計画 2011～2020」を教育科学技術部、環境部、知識経済部、農林水産食品部、保健福祉部、防衛事業庁、食品医薬品安全庁の7省庁が共同で作成し、ナノテクノロジー開発の国内外の環境変化に伴う今後10年間のビジョン、目標及び重点推進課題を示した。

#### (a) ビジョンと目標

ビジョン：世界一流のナノ強国の建設

目標：ナノテクノロジーを基礎とする新産業の創出、優秀なナノ人材の養成及び最大限のインフラ活用、ナノテクノロジー研究開発の社会的・倫理的責任の強化

#### (b) ナノ安全性関連

同計画ではナノの安全性についても言及しており、教育科学技術部、環境部、知識経済部、食品医薬品安全庁及び雇用労働部が参加する「ナノ物質安全性政策協議会」を活性化させ、環境・保健・安全(EHS)に関係する省庁間の連携対応システムを強化するとしている。

また、ナノ安全性分野における研究開発の拡大が必要とし、ナノテクノロジー研究開発予算の中で3%を占めている安全性評価などEHS関連の基礎研究の予算を、2020年には7%に引き上げるとしている。

### ② 2011年ナノテクノロジー発展施行計画

「2011年ナノテクノロジー発展施行計画」は第3期「ナノテクノロジー総合発展計画 2011～2020」に基づき、教育科学技術部、環境部、知識経済部、農林水産食品部、保健福祉部、防衛事業庁、食品医薬品安全庁の7機関が作成した。本計画では、各部が以下の活動を行うとしている。

教育科学技術部：ナノ物質のライフサイクルにおける物理・化学的な性質の測定法の研究開発を推進する。

知識経済部：ナノ融合産業を促進するための「ナノ製品安全性総合計画」を推進する。

環境部：ナノ物質の毒性及び人体、環境への有害性を評価する技術の研究を強化する。

食品医薬品安全庁：消費者に直接関係する食品、医薬品などの有害性評価機関(ナノ安全性センター)を設立し、「ナノ安全性評価基盤研究事業団」を運営する。

また、教育科学技術部、環境部、知識経済部、食品医薬品安全庁、雇用労働部はナノテクノロジーの全段階の安全管理確保のため政府総合管理システムを構築し、ナノ安全の技術開発、ナノ物質、ナノ製品の安全管理について、2012年から2016年までの「ナノ安全管理総合計画」を作成する。



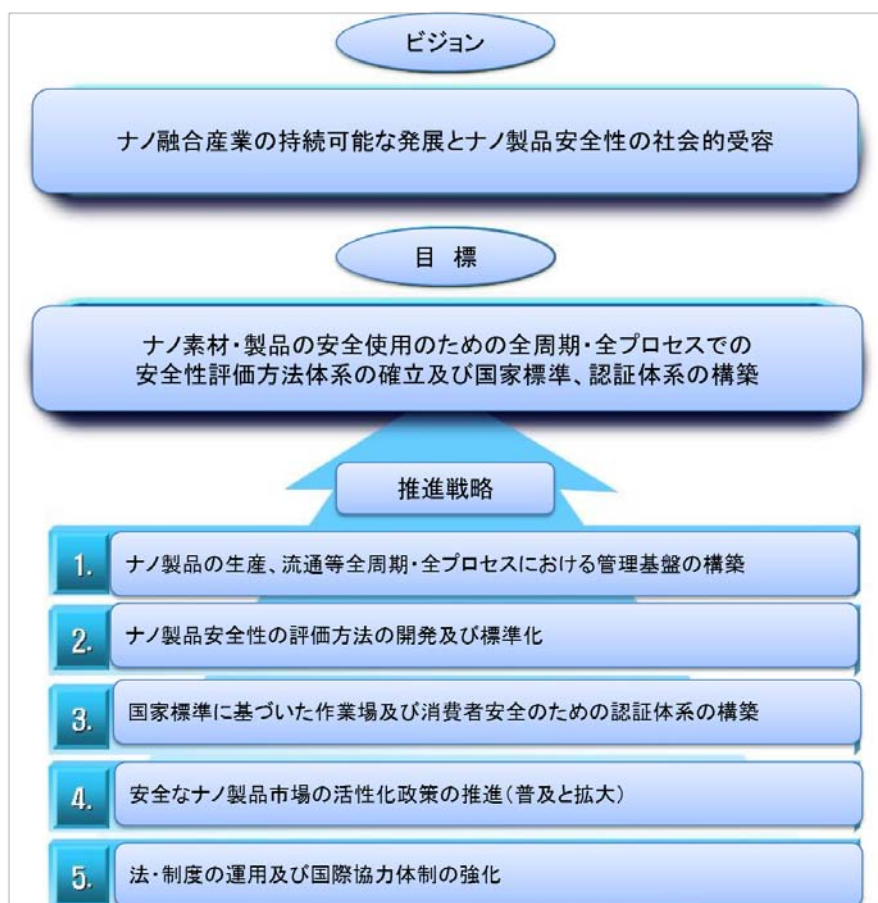
### ③ ナノ安全総合計画

知識経済部は安全なナノ製品の利用を促進し、ナノ融合産業の持続可能な発展とナノ製品の社会的受容を促進するため、「ナノ製品安全性総合計画」を作成した。

この計画は、ナノ製品の環境、保健、安全に対する不安が広がり欧米諸国ではすでにナノ物質使用への規制を検討していることから、韓国企業の輸出への影響の懸念が背景にある。韓国政府は韓国企業の国際規制対応能力とナノ製品の安全性検証システムの構築が、今後の競争力構築において極めて重要な要素であり、2015年までに世界のナノ市場の15%のシェアを獲得する目標を掲げている。しかし、今後ナノ安全性問題が新たな貿易障壁になる可能性があり、そうなると同目標の達成は困難であるとしている。これを回避するために、ナノ製品の安全性問題を体系的に研究し、有害性評価方法の標準化を推進し、ナノ関連規制を活用した海外市場獲得戦略の作成が必要である、と謳っている。

#### (a) 計画の内容

「ナノ製品安全性総合計画」は韓国の知識経済部の主導で推進され、「ナノ融合産業発展戦略」の後続施行計画として作成が開始された。



(知識経済部(2011年)「ナノ製品安全性総合計画」より)

図 3-1-1 「ナノ製品安全性総合計画」のビジョン、目標及び推進戦略

この計画は、ナノテクの持続可能な発展とナノ製品安全性の社会需要のために、ナノ材料・製品のライフサイクル全プロセスでの安全性評価法体系の確立と国家標準、認証体系の

構築を目標としている。

具体的推進項目として、以下の5項目をあげている。

- i) ナノ製品の生産、流通等ライフサイクル・全プロセスにおける管理基盤の構築
  - ・ ナノ材料適用製品の実態調査
  - ・ 有害ナノ製品の輸出入管理のため、部門間で構築された品目別の安全管理体系の構築
  - ・ ナノ製品のライフサイクル・全プロセス及びリスクマネジメントに関する SDoC (Supplier's Declaration of Conformity; 供給者適合宣言)の誘導、有害商品販売遮断システムの適用
- ii) ナノ製品安全性の評価方法の開発及び標準化
  - ・ ナノ製品の安全性評価・測定方法の開発事業推進
  - ・ 国際的に標準化されたナノ測定技術の安全性評価システムの構築
  - ・ ナノ材料・製品関連企業に対する安全性情報支援システムの準備
- iii) 国家標準に基づいた作業場及び消費者安全のための認証体系の構築
  - ・ ナノ材料・製品の製造作業場安全のための安全管理システムの構築
  - ・ ナノ材料・製品の消費者安全のための安全管理システムの構築
- iv) 安全なナノ製品市場の活性化政策の推進(普及と拡大)
  - ・ ナノ製品に関する信頼度を向上させ、関連製品の市場活性化のため、民間認証マークの開発と導入必要性を検討
  - ・ 消費者製品安全監視システムなど専門化された市場監視活動を支援
  - ・ ナノ製品の品質と安全性等を検証し、政府調達時における優先購買制度の試験的な適用を検討
- v) 法・制度の運用及び国際協力体制の強化
  - ・ 安全なナノテクノロジーの開発を促進するための法・制度の運用
  - ・ 保健・安全・環境の標準化分野における国際活動の強化
  - ・ 省庁を超えてナノ安全性総合対策の作成に参加

#### (b) 法制度の構築

本計画には、「品質経営及び工業品安全管理法」に基づき、ナノ材料を使用した製品を安全管理の対象にして安全認証を行う体制構築を推進することが記載されている。しかし、安全認証制度のためには法規制も必要になる。「ナノ製品安全性総合計画」の推進戦略では、ナノ融合産業の健全な発展のためには最小限の規制及び効率を考慮した選択的な法・制度の運用が不可欠であるとしている。規制の最小化を実現するため、安全管理の対象品目を選定する際、有害度が高い品目を中心に段階的に推進すべきとし、ナノ材料・製品に関する市場の信頼を確保すべきとした。

一方、現在韓国政府のナノ安全性関連事業は標準技術力向上事業、プラットフォーム技術開発事業を中心に推進されており、特定のナノ物質(銀ナノ、TiO<sub>2</sub>、MWCNT)に集中している。現在、製品関連法令として 14 の関連法をナノ製品規制に適用できることになっている。食品医薬品安全庁は 4 法令、環境部は 2 法令、農林水産食品部は 2 法令、教育科学技術部は 1 法令、知識経済部は 1 法令、企画財政部は 1 法令、雇用労働部は 1 法令、国土海洋部は 1 法令、消防防災庁は 1 法令である(詳細は表 3-1-1 参照)。

表 3-1-1 ナノ物質・製品の関連法状況

法律	所管部署	目的	対象製品	有害性評価				有害情報伝達	リスクマネジメント	規制関連性
				有害性確認	投薬反応	露出評価	リスク分析			
薬事法	食品医薬品安全庁	医薬品	医薬品	許可審査				表示	容量基準、モニタリング事業、禁止	高
化粧品法		化粧品管理	化粧品							
食品衛生法		食品添加物管理	食品添加物	許可審査						
医療機器法		医療機器管理	医療機器	許可審査		許可審査				
有害化学物質管理法	環境部	健康、環境破壊の予防、有害化学物質の適正管理	有害化学物質	有害性審査		有害性評価			取り扱い制限・禁止、事故対応物質	
環境保健法		国民健康と生態系の保護、維持	環境汚染物質	疫学調査		有害性評価		児童用表示	環境基準、国民環境保健基礎調査、環境問題調査	中
農薬管理法	農林水産食品部	農薬安全管理、農業生産と生活環境の保全	農薬	農薬登録審査				表示	禁止、制限、安全使用基準、取り扱い制限基準	中
農産物品質管理法		農産物の適正な品質管理	農産物			残留量調査			出荷延期、用途転換、廃棄	低
品質経営及び工業品安全管理法	知識経済部	工業品の安全管理による消費者保護	工業品、児童保護(有害化学物質など)	安全性調査					販売使用禁止、販売制限	高
消費者基本法	企画財政部	消費者権利の強化	物品	安全調査					表示基準、破棄、収集	中
危険物安全管理法	消防防災庁	危険物の安全管理	危険物	分類					安全基準	低
産業安全保健法	雇用労働部	労働者の安全保健	有害要素	有害性調査、有害要素管理	有害性調査、有害要素管理	作業環境測定、疫学調査	疫学調査、有害要素管理	MSDS、警告表示	露出基準、健康診断、製造許可、禁止	高
研究室安全環境造成法	教育科学技術部	研究室安全	有害危険物質						健康診断	
船舶安全法	国土海洋部	船舶の危険物に関する安全管理	危険物、毒性物質、有害性物質	分類				表示	安全基準	低

出所：知識経済部(2011年)「ナノ製品安全性総合計画」より

また、環境部、食品医薬品安全庁、雇用労働部などの省庁で積極的に規制基準を検討している一方、ナノ製品の安全性規制に必要なデータの不足と有害性試験・評価方法の標準化などの問題で、新たな規制の作成までには時間がかかるとしている。

#### 9-4 ナノ製品の安全管理指針（韓国国家基準(KS)）

国家基準の作成面において、韓国政府は2011年5月21日に「ナノ製品の安全管理指針」を韓国の国家基準(KS)にすると発表した。同管理指針は製造に従事するナノ技術者とナノ製品を利用する消費者の利益と安全性の確保、ナノ製品の社会的受容性の向上、関連産業の持続可能な発展と製品開発の促進を目標にしている。消費者の視点のみならず、「ナノ融合産業を促進するための安全性総合計画」の一環として韓国の知識経済部と産業界が共同で作成した同標準は、ナノ製品の開発、生産、利用と輸入、販売までの安全及び環境への有害性、労働者の健康と安全に関する企業の社会的責任を強調するなどの内容も含まれている。

##### 「ナノ製品の安全管理指針」の主要内容

- ・ 事業者の責任と行動
- ・ 作業場の安全保健
- ・ 利害関係者とのコミュニケーション
- ・ 安全関連情報の提供
- ・ 流通供給網での協力
- ・ 公共健康と安全及び環境への危害性防止措置
- ・ 広範囲な社会的・環境的・倫理的影響
- ・ 透明性と公開性の原則

知識経済部は同国家標準の作成によりナノ製品の国際貿易における技術規制障壁の回避が可能になり、韓国製ナノ製品に対する国際市場の信頼向上に繋がると期待している。

(9) 中国

中国におけるナノ材料の安全性に関する最初の報告書は、2001年11月の科学院高エネルギー物理研究所による「ナノ物質の生物毒性に関する研究レポート」である。この報告を受けて、国家科学技術部、国家自然科学基金委員会及び国家ナノ科学センターの支援を受け中国科学院は多くのナノ材料の安全性研究分野の整備を行った。また、中国科学院、中国医学科学院、軍事医学科学院、中国医科大学、北京大学、東南大学等の研究機関もナノ材料の生体影響と有害性に関する研究を行っている。

2004年には「ナノ物質による生物学的効果」をテーマとする第243回香山科学会議(科学専門家会議)が北京で開催された。2007年には「ナノテクノロジーと環境安全」をテーマとする香山科学会議の第314回学術シンポジウムが北京で開催され「ナノ材料の環境リスク及び安全性評価」、「ナノテクノロジーと環境管理・修復」、「ナノ測定技術と環境モニタリング」の3つのテーマについて討論が行われ、以下の提言がなされた。

- ① 現行の技術レベルでナノテクノロジーと環境の安全性に関する公共の研究プラットフォームを構築し、国内のナノテクノロジー及び環境分野の専門家に学際的研究のための公共の場を提供する。
- ② 新しい環境モニタリング及び安全性評価体系を構築する。
- ③ 国の関連政策においては、ナノテクノロジーと環境安全問題を重視し、支援を強化すること。

これらの提言をきっかけに、科学技術部はナノテクノロジーの生物学的安全性分野における研究に大々的に支援するようになった。

標準化については、2005年に全国ナノテクノロジー標準化技術委員会(SAC/TC279)を設置し、その後まもなくナノ素材標準化分化技術委員会とその他4つのナノテクノロジーの測定・加工技術と関係する標準化ワーキンググループを設置した。SAC/TC279の成立記念式典の際に、ナノテクノロジー・バイオ製薬標準化準備グループの設置が提案された。

この分野の及ぶ範囲は広く、協調作業に時間がかかるため、全国ナノテクノロジー標準化委員会の傘下にナノテクノロジー健康・安全・環境標準化ワーキンググループが2010年3月に設置された。このワーキンググループは中国医学科学院基礎医学研究所の管轄下にあり、ナノテクノロジーの医学的・生体影響ならびにナノ材料・ナノ製品の生産・包装・輸送・使用プロセスにおけるヒト・環境の安全性に対する影響の標準化作業を行う。

第11次五ヵ年計画では、ナノ研究国家重大科学研究計画、国家自然科学基金、国家重点実験室特別事業、国の基礎的な科学技術プラットフォーム構築、多分野の人材育成などを通じてナノテクノロジーに対する投入を強化し、論文被引用数は世界で2番目、ナノテクノロジー関連の特許出願件数も世界2位と、ナノ研究の大幅なレベル向上がはかられた。

第12次5ヵ年計画においても、引き続きナノテクノロジーの推進を図り、特に産業化を重視している。

このような流れの中で、最近ではナノの安全性に関する政策に目立ったものはないが、標準化に関しては積極的に動いているようである。

2011年8月に国家標準化管理委員会は「作業現場のナノテクノロジーの健康と安全」に関する17項目の標準化を関係部署に指示した。

次表にこの17項目の標準を示す。いずれも2013年までに作成する計画としている。

また、2012年9月4-7日には、2年おきに開催される「International Conference on Nanotoxicology」が北京で開催される。この会議は科学技術部等の政府機関が後援し、国家ナノセンターの主催で行われる。この会議では、①ナノ毒性学、②ナノ医療、③ナノバイオ、④ナノバイオ化学、⑤ばく露とリスク評価、⑥環境とナノ安全性、⑦ナノ特性評価と標準化の7つのセッションが予定されている。

「作業現場のナノテクノロジーの健康と安全」等17項目の標準制定計画

No.	計画番号	名称	種類	採用する国際標準	制定時期	主管部署	技術集約部署	起草
1	20110023-T491	作業現場のナノテクノロジーの健康と安全	推奨	ISO TR 12885	2013	中国科学院	全国ナノテクノロジー標準化技術委員会	国家ナノセンター
2	20110024-T491	ナノカーボン材料の用語と定義	推奨	ISO 11751	2013			国家ナノセンター
3	20110025-T491	ナノ材料の用語と定義: ナノ粒子、ナノファイバー、ナノプレート	推奨	ISO TS 28687	2013			国家ナノセンター
4	20110026-T491	カーボンナノチューブ中の金属不純物測定手順 (ICP-MS)	推奨		2013			国家ナノセンター
5	20110027-T491	ナノテクノロジー重要用語	推奨	ISO 80004-1	2013			国家ナノセンター
6	20110028-T491	ナノテクノロジー生物用語	推奨	ISO 80004-5	2013			国家ナノセンター
7	20110029-T491	強化ガラスの易清浄性検査法	推奨		2013			北京航空航天大学
8	20110030-T491	金ナノロッドの特性 第2部: 光学特性	推奨		2013			国家ナノセンター
9	20110031-T491	金ナノロッドの特性 第3部: 表面電荷測定法	推奨		2013			国家ナノセンター
10	20110032-T491	SWCNTのラマン測定手順基準	推奨		2013			国家ナノセンター
11	20110033-T491	ナノ粒子固液界面のゼータ電位分析-ゼータ電位総則	推奨		2013			華東師範大学、 国家ナノセンター
12	20110034-T491	ナノパウダーのぬれ性測定-Washburn動態浸透法	推奨		2013			華東師範大学、 国家ナノセンター
13	20110035-T491	生産環境におけるナノ二酸化チタン粉塵濃度測定法-分光光度法	推奨		2013			南京理工大学
14	20110036-T491	ナノ材料の作業現場の粉塵粒径分布測定法	推奨		2013			南京信息工程大学、 南京理工
15	20110037-T491	熱重量分析法を用いた揮発速度の標準計測法	推奨		2013			国家ナノセンター
16	20110038-T491	ナノ二酸化チタンの経口毒性試験前の純度分析法	推奨		2013			中国科学院 高能物理研究所
17	20110039-T491	ナノ二酸化チタンのクリーン生産評価法-ナノ二酸化チタン粉塵評価	推奨		2013			中国科学院 高能物理研究所

### 3-2 OECD および ISO における安全対策等に関する対応状況

#### (1) OECD 工業ナノ材料作業部会

第9回工業ナノ材料作業部会会合(WPMN9)が2011年12月7日(水)~9日(金)に亘り、パリにあるOECD本部で開催された。また、この作業部会に先立ち、OECDテストガイドラインのナノ材料への適用(SG4)、スポンサーシッププログラムのPhase1の完了とPhase2に関して(SG3)、の二つの分科会が開催された。以下にその概要を記す。

#### 1) 第9回工業ナノ材料作業部会会合(WPMN9)

WPMNは現在9つのプロジェクトが行われており、作業部会会合でそれぞれの進捗が報告された。また、各国のナノ材料規制の取り組み状況、その他のトピックスが報告された。

#### 1-1) 各プロジェクト報告

##### ① プロジェクト1/2:「ナノEHS研究データベース」進捗報告

前回以降インプットがほとんどなされておらず、DBの拡張を見合わせたいとの提案があった。議論の後、当面DBは継続することになった。

##### ② プロジェクト3: ナノ材料の有害性試験の実施

スポンサーシッププログラムで実施している各材料の試験状況を報告し、環境エンドポイントはほとんどの材料で部分的なデータがあるだけであるとした。

今後のドシエの作成レビューに関して、詳細データを活用するために nanohaub と協力する、ドシエレビューグループを結成する(BIAC、ドイツ、EC、USAが志願)、ドシエのモデルを BIAC とUSが作る( $\text{CeO}_2$ )、Phase1の評価は水平的(Horizontal)とすべきである。そのために Horizontal work shop を行うとした。

Phase2に関しては、Phase2は統合、評価、実験のプログラムであり、2013年12月目標で統合/評価を行い、更なる提案を行うとした。

##### ③ プロジェクト4: テストガイダンス

GNSPD (Guidance Notes on Sample Preparation and Dosimetry)を1月までに完了させ公開プロセスに入ること、Fate と Eco-Tox の Horizontal Work Shop をおこなうことに合意した。

##### ④ プロジェクト5: 自主報告精度と規制プログラムの協力

報告書「Information Gathering Scheme on Nanomaterials」の改訂版および「Regulated Nanomaterials: 2006-2009」の改訂版が公開プロセスに入った。WPMNのHPにワークスペースを作成、現在は限定された国の政府代表者にのみ公開されているが、Phase2ではSG5参加政府への公開を検討する。

次の作業として規制体制調査としてナノ材料の定義、ナノ材料の規制への取り組み等をアンケート調査する。WPMN10で報告を行う予定。

##### ⑥ プロジェクト6: リスク評価

WPMN8で紹介した報告書(Critical Issue; 重要事項)をその後のコメントを反映して改定した。この改訂版をケミカルコミッティーの合同会議に提出し、公表プロセスに入ることが了解された。

次のステップとして重要事項のガイダンス作成とリスクアセスメントプロジェクトの立ち上げ、ワークショップの提案。



⑦ プロジェクト7: 代替試験法

最近の活動として、「Guidance Manual for the Testing of Manufactured Nanomaterials」の第1回の見直しを行ったこと、第1回、第2回の専門家コンサルテーション会議を実施し、報告書を作成したことが報告された。

また、第3回の専門家コンサルテーション会議を2012年3月に行う予定であり、専門家会議が新規アイテムの発掘とタイムライン設定の良い機会である。

⑧ プロジェクト8: 暴露の測定と低減

実施中のプロジェクトの説明と新規提案の説明がなされた。

実施中プロジェクト

- ・ 気中ナノ粒子濃度決定の技術とサンプリング手順プロジェクト
- ・ ナノ材料の廃棄と処理に関する情報の収集プロジェクト
- ・ ナノ材料暴露評価の方法とモデル情報の収集
- ・ ナノ銀のケーススタディ
- ・ ナノ金のケーススタディ

新規プロジェクト提案

- ・ ナノ材料の分解半減期の決定

⑨ プロジェクト9: 工業ナノ材料の環境持続的応用

9月に行われたワークショップの説明および今後の進め方が報告された。

今後の活動として、ワークショップレポートの公表、小グループによるLCAのガイドライン(一つの例を含む)作成等を行うことになった。

1-2) その他のトピックス

① Tour de Table

各国、団体からトピックスの報告が行われた。Tour de Table に提出された報告書のうち、主要国・機関の分は後述する。以下はその場で、口頭で報告された内容である。

ISO: ISO TC229 は 15 のドキュメントを公開し、29 が準備中である。第8回 WPMN 会合以降に WPMN に関係の深いドキュメントとして、TR13121「ナノ材料のリスク評価」が制定された。また現在投票中の「工業ナノ材料に適用する職場リスク管理のガイドライン(Prt1 原則とアプローチ)」と「ナノ材料の SDS」がある。

WPN: OECD WPN(Working Party on Nanotechnology)の活動を紹介した。

その内、主なものは以下である。

最近終了したプロジェクト

- ・ Communication Outreach and Public Engagement with Nanotechnology  
-An overview of the key points of the planning guide for beginners in the field of public engagement- では、政策立案者が立案時および政策実行時に注意すべき8つのキーポイントを挙げた。
- ・ Fostering Nanotechnology to Address Global challenge: waster では、飲料水や下水処理等で、ナノテクノロジー適用の有用性を紹介した。

現在進行中のプロジェクト

- ・ Regulatory Tools for nanotechnology in Food and Medical Products (次回 WPN 会合に報告書ドラフト提出)では、食品と医薬品のナノテクノロジーの規制

に関してメンバー国が提出した報告を解析。

- ・nanotechnology for sustainable development は、持続可能な発展のためのナノテクノロジーに関し、概観のレポートを作成中。プロジェクトとして、少なくとも2つのケーススタディ(タイヤと持続可能なエネルギー)が提案されている。

#### The Business Impact of Nanotechnology

各国のナノテク関連会社を調査し、会社サイズ、ビジネス分野、製品分野等の分類による解析を報告した。

EU: JRC (Joint Research Center)による RIP-oN (Reach Implementation Project on Nanotechnology)とナノ材料定義に関する報告を行った。

- ・ 2011年10月に公開された RIP-oN2 (Information Requirement) では、OECD Test Guidance 等は概ねナノ材料にも適用できるとしたが、一部は改定の必要があるとしている。
- ・ RIP-oN3 (Chemical Safety Assessment) では、暴露評価: 暴露モデル、暴露測定、リスク管理手法等に関するガイダンスの改定を推奨。基準については、質量基準を続けるが、比表面積や個数基準をもちいることも有益であるし、動物時間では将来のため、質量基準、比表面積、個数基準のすべてで表現すべきである、としている
- ・ EUにおけるナノ材料の定義(提案)について、1~100nmの個数比率で50%以上(定義1)、50%以上は1~50%の間で調整することがある。(この定義を用いるときは事前検討が必要)(定義2)、グラフェン、CNT、フラーレンは1次元が1nm以下でもナノ材料とする(定義3)。等の説明が行われた。

米国: ナノ銀入り殺虫剤について EPA が条件付きで登録されたこと、評価するための追加データ提出を要求したことを報告した。

## ② WPMN の中間レビュー

事務局から、WPMN 活動全般に関する3項目および各プロジェクトに対する11項目、合わせて14項目の提案をまとめた中間報告書の説明があった。この報告書は、2012年2月の全体会合に提出する。

## ③ 吸入暴露専門家会議報告

2011年10月19、20日にかけてオランダで行われた吸入暴露専門家会議の報告が行われ、吸入試験に関するTG (Test guidance)の改定やPhase II に対する提言が行われた、との報告があった。

## ④ ナノ材料のリスク評価

産総研中西フェローが、NEDOプロジェクトで実施したナノマテリアルのリスク評価について、特別講演を行った。本プロジェクトの結果がどのように日本で活用されているかとの質問に対し、企業が自主規制に活用していること、経済産業省と厚生労働省がナノ安全性と規制に関する委員会を立ち上げたことを紹介した。

## ⑤ タイヤプロジェクト提案の紹介

BIAC が、CO<sub>2</sub>削減やタイヤ磨耗量低下によるタイヤ出すと発生源のために、タイヤへのナノテクノロジー適用プロジェクトを提案した。このプロジェクトは OECD の (WPN Working Party on Nanotechnology) および WPMN と関係が深く、WPMN の SG6

(リスク評価)も参加予定である。

#### ⑥ 2012年度委員の任命

2012年度の委員として下記委員が選出された。米国が Jeff Morris から Maria Doa に変更、その他は前年度に引き続く任命である。

議長	Bjorn Hansen	(EC)
副議長	Roshini Jayewardene	(オーストラリア)
副議長	Greg Carreau	(カナダ)
副議長	Klaus Steinhaeuser	(ドイツ)
副議長	Chie Hamaguchi	(日本)
副議長	Kay Williams	(英国)
副議長	Maria Doa	(米国)

#### ⑦ 次回会合日程

次回および次々回の WPMN 会合開催予定が下記日程でアナウンスされた。

WPMN 10: 2012年 6月25日～29日

WPMN 11: 2013年 2月18日～22日

#### 1-2) 各国の活動報告トピックス (Tour de Table) の主要国・機関の内容

WPMN9における各国・機関からの報告—Tour de Table—

報告対象期間: 2011年3月～2011年11月

##### ① オーストラリア

- ・ NICNAS が、2011年1月1日付けで発効した管理規制により、人や環境への暴露が十分予防できると思われる場合を除き、ナノ形態の新しい化学物質をオーストラリアに持ち込むことは出来なくなった。さらに、すべてのナノ物質の事前評価は、NICNAS によって行われることになる。
- ・ 労働安全審議会 (Safe Work Australia) は、2011年9月から、ウェブ上で (a)安全性データシート (SDS) の準備方法、(b)職場環境での有害物質への表示について、情報公開している。
- ・ NICNAS は、ナノ材料に該当する物質として、工業化学物質のセクターでは3件の申請を受け、公表されているガイドラインに従って審査した。殺虫剤と食品のセクターでの申請は無かった。
- ・ 労働安全審議会 (SWA) は、ナノテク労働安全衛生プログラムの中で15のプロジェクトを推進し、2011年5月に7つ目の報告書として「カーボンナノチューブの滞留と炎症を起こす可能性について」を発行した。

##### ② カナダ

- ・ 第四回 ICCR 会議における議論の結果、化粧品規制において適用されるナノ材料の定義として、以下の結論に至った。  
定義: 意図的に製造された不溶性成分で、化粧品に含まれる状態で少なくとも一つの次元の長さが 1~100 nm の範囲にあり、生体内で安定に存在するとともに残留することで、生体と相互作用する可能性がある物質。
- ・ 国際生命科学研究機構 (ILSI) により実施中のプロジェクト NanoRelease に参加している。NanoRelease は、正式名称を“NanoRelease Consumer Products”といい、USEPA、ACC

(アメリカ化学工業協会)、NIST 等に加え、カナダの環境省と保健省も支援している。三つのタスクグループ(計測方法、放出に係る特性評価、ライフサイクルでの放出シナリオ)と一つの実験グループに分かれて実施されている。

### ③ フランス

- ・ 環境コードの L、523-4 条に基づき報告が義務付けられている市場で取引されているナノ物質の年間報告に関する環境、厚生労働、農業、防衛、法務の省庁間に跨る法律案が、EC に告知され、EC のほか、ドイツ、英国から見解が出され、それに対して、フランス当局から回答がなされた。見解には、適用範囲、報告を義務付ける下限量、定義、「不適切」とされる範囲、報告すべき内容、研究の場合の報告義務や、この法律の影響調査等についてであった。なお、報告の義務が生じる下限取扱量は、従来の 10 g/年から 100 g/年に上げられている。
- ・ フランス国立産業環境リスク研究所は、REACH の中で行った社会環境分析をナノ材料に合わせて修正し、報告書で公開予定である。

### ④ ドイツ

- ・ 連邦環境庁は、物質の定義を REACH 規制の枠組みの中のナノ材料に適用することに関して、法律上の質問を提起した。すなわち、ナノ物質の定義をそのまま適用できるかどうか、また適用した場合の問題点について。環境庁は、自らこれらについて検討を行うとともに、そのような定義が必要か、ガイダンスドキュメントが十分機能するが、REACH の枠組みの中で、異なった規制が出来ないかを詳しく検討することになった。
- ・ 連邦環境庁(UBA)は、「ナノ金の環境毒性調査」、「ナノサイズの酸化チタンの環境評価書：環境毒性学上及び環境寿命に関する研究報告の分析」、「異なるタイプの廃棄処理を行う施設におけるナノ物質の排出による環境への潜在的影響調査」、「自然環境に近いところにある堆積物の処理中の工業無機ナノ粒子の寿命に関する研究」等の研究を助成している。
- ・ 連邦環境庁(UBA)の助成で、連邦環境研究所、BASF、Nanogate が「ナノ製品の持続的潜在力の分析と戦略的管理」を実施、近々、報告書が公開される予定である。
- ・ 2011 年秋、研究所、化学工業界、損害保険業界、政府からなるグループが、ナノ材料の吸入暴露の計測に関する実利的なアプローチに関する報告書を公開した。

### ⑤ 韓国

- ・ 韓国政府は、ナノ材料、ナノテクノロジー、ナノ製品、労働安全に関する「国家ナノ安全マスタープラン(2012-2016)」を立てた。これは、環境部(MOE)、教育科学技術部(MEST)、雇用労働部(MOEL)、韓国食品医薬品安全庁(KFDA)の協働による。
- ・ 環境部(MOE)は、ナノ材料の労働安全管理のガイダンスを作成した。
- ・ 知識経済部(MKE)は、「ナノテクノロジーに基づく製品の安全管理に関するガイダンス」を作成した。(2011 年 5 月出版)これはナノ製品製造者が遵守すべき標準であり、ナノ製品の社会受容を促進し、ナノテクノロジーの持続可能な発展を確保し、消費者とナノテクノロジーのユーザーの安全を増進するためのものである。
- ・ MOE は、ナノ材料の生産、使用、輸出入の量と使用パターンを自主的に調査するプロジェクトを開始した。
- ・ MOE と NIER は、ナノ材料のインベントリーを作成するために、その生産、使用、輸出入の量と使用パターンとその情報の調査を行うプロジェクトを開始した。

### ⑥ 英国

- ・ “Nanomaterials in REACH”というプロジェクトが進行中で間もなく報告書が出される。これは CASG Nano を補完する目的で、「環境保護のための科学的知識ネットワーク」の下で実施されているもので、現在の REACH は、環境とヒト健康の適切な保護のために機能が発揮できているか、できていなければどう変えるべきか、そのために何が足りないか、について考察している。
  - ・ BSI は、二つの標準文書を作成した；工業ナノスケール物質を含む廃棄物の処理ガイドと複合マトリックス中のナノ材料の検出と同定。
  - ・ 環境における汚染された場所の修復のための鉄ナノ粒子の応用に対するリスク／便益アプローチプロジェクトは 2011 年末研究結果が刊行予定。
  - ・ 環境省と DEFRA は、ナノテクノロジーの便益を金額で推定する方法を開発し、公開した。
- ⑨ 曝露計測、曝露低減
- ・ 環境省と DEFRA は、銀ナノ粒子が抗菌製品に広く使用されている現状にかんがみ、UK におけるナノ銀の環境濃度を計算するモデルを開発し公開した。

#### ⑦ 米国

- ・ EPA の農業プログラム局は、現在市場に出ている農業製品がナノスケール物質を含んでいるかどうかの決め方を連邦公報の通知として公表した。この通知には、ナノスケール物質を含むと同定された製品は、農薬法上新しい活性成分を含むとみなすという EPA の政策も含んでいる。
- ・ EPA はナノスケール物質が適切な規制的レビューを受けるよう TSCA の 5(a)(2)条項のもとで SNUR を展開している。SNUR は、TSCA インベントリーにある既存物質でも新しいナノスケール物質を生産、輸入、加工しようとするものは、その 90 日前に SNUR を EPA に提出することを要求している。TSCA の 8(a)条項も適用し、ナノスケール物質を製造するものは、その使用、生産量、ある物理的性質、化学/構造的特性、製造及び加工方法、曝露や放出情報、利用可能な健康安全データ等の情報を EPA に通知しなければならない。
- ・ EPA は 2005 年以来、TSCA の下で 120 のナノスケール物質を評価してきた。
- ・ FDA は、「FDA が規制する製品がナノテクの応用を含んでいるかどうか考察する」と題した産業界のためのガイダンスを公表した。(2011 年 6 月 14 日)
- ・ NIOSH は、4 月 17 日 CIB63「二酸化チタンの職業曝露」を発した。

#### ⑧ 欧州委員会

- ・ 2011 年夏、ナノ材料に関する REACH 実施プログラム (RIP-oN) を公表した。ナノ材料が REACH に登録される際に企業と ECHA がナノ材料を扱う方法を推奨として示した。
- ・ 2011 年 10 月 20 日、ナノ材料の定義に関する推奨案を採択した。  
ナノ材料の定義：自然界に存在するか、偶然生成したか、あるいは工業的に製造された材料であって、粒を含んでいるか、結合していない凝集塊か凝集体であり、少なくとも一つの次元の寸法が 1 nm から 100 nm の物質の比率が数で 50%以上からなるもの、と定義される。
- ・ 労働者保護については、Directorate General Employment, Social Affairs and Inclusion (DG EMPL) が担当している。検討中の内容については、2012 年末までにはまとめられる予定である。

#### ⑨ BIAC

##### ACC(米国化学工業協会)

- ・ 2011 年 4 月、ACC のナノテクノロジー小委員会は、NIOSH に対して、他の研究機関とテ

ーマが重複している「ナノ材料のリスク評価」を止めて、暴露評価、リスク分析及びリスク管理に注力すべきとの意見書を提出した。

#### Cefic(欧州化学工業連盟)

- ・ 2011年10月18日、ECは、長年の懸案事項であったナノ材料の定義についての勧告を採択した。Ceficは、法的に確固かつ一貫性のある定義を設定しようとする努力を歓迎するが、今回の定義は範囲が広すぎて、実際に法規制で用いるのは難しいと考えている。
- ・ 産業界全体を代表しているというCeficの利点を活かして、昨年(2010年)、サプライチェーン全体から参加者を集めたプラットフォームを設けた。その結果、異なるセクター間でより一貫性のある行動をとることができるようになっただけでなく、セクター独自で法規制活動に走ることへの注意を喚起することが出来た。

#### JCIA(日本化学工業協会)

- ・ 2011/11/8付け日経新聞に掲載された記事「ハツカネズミがシリカと酸化チタンのナノ粒子で妊娠合併症を発症」について、専門家の意見をヒアリングし、協会としてのコメントを出す予定。
- ・ 2011年5月にサンクトペテルブルクで開催されたISO委員会に出席し、WG4(材料規格)において、シリカや酸化チタンなどの材料ごとに規格を制定すべきであるという中国からの提案に反対し、材料共通の包括的な規格を制定すべきとの提案を行った。

#### NIA(ナノテク工業協会)

- ・ 2011/7/1付けで、国際的な官民パートナーシップ Global-NanoMaPPP(基金:4.6百万ユーロ)を立ち上げ、ナノ酸化亜鉛、ナノ酸化セリウム、MWCNT、SWCNT、ナノクレイ、ナノ銀、ナノ金、ナノ硫酸バリウムのOECD/WPMNプロジェクトに貢献している。Global-NanoMaPPPは、IUCLIDを基にしたデータベースであるNANOhubにこれらの材料のデータを集積し、チェックする作業を担当している。
- ・ 2011/11/30には、「ナノが定義されるって!? EUのナノ材料の定義がもたらすコンプライアンス上の義務と市場への影響」と題するワークショップを開催した。そこでは、
  - i) この定義に伴う追加的な義務によって、どの業種が最も影響を受けるか?
  - ii) 現在及び将来のナノテク利用の経済的影響は何か?
  - iii) EUの定義は、EU全体及び各国の法制化において、どのようにして活かされるか?
  - iv) 長期的な負荷によるコスト増をカバーするために、民間企業は目先、何が出来るか?が議論された。

#### VCI(ドイツ化学工業会)

- ・ ドイツ化学工業会は、会員企業のために、様々な文章やパンフレットを発行してきた。その一部は下記の通りである。
  - i) 責任あるナノ在留の製造と使用のためになすべき作業
  - ii) REACH規制上、ナノ材料として製造あるいは輸入された物質に必要な手続き
  - iii) ナノ材料のリスク評価に必要な有害性情報を段階的に収集するためのガイダンス
  - iv) 安全データシートを用いることにより、サプライチェーンに沿ってナノ材料の取り扱いに関する情報伝達を行うためのガイダンス

- v) ナノ材料を含む物質の安全な回収と廃棄のためのガイダンス
- vi) ナノ材料の標準化に関するドイツ化学工業会の戦略

#### ⑩ ISO

- ・ WPMN8 以降では、2011 年 5 月にサンクトペテルブルク(ロシア)で、また同年 11 月にヨハネスブルク(南アフリカ)で委員会が開催された。
- ・ WPMN に最も関連する文章として、DTS12901-1「ナノテクノロジー：職場における工業ナノ材料のリスク管理のガイドライン、パート 1 指針とアプローチ」及び DTS13329「ナノテクノロジー：工業ナノ材料の安全データシート(SDS)作成について」である。いずれも 2012 年 1 月に投票が締め切られる。

#### 2) スポンサー会合

WPMN に先立ち、スポンサーシッププログラムのスポンサーおよび関係者が集まるスポンサー会議が 2011 年 12 月 6 日に行われた。

##### ① 各スポンサーからの進捗報告

###### i) カーボン3物質

- ・ SWCNT(単層カーボンナノチューブ)は新たに 2 種の SWCNT を Principal Material に追加した。多くのエンドポイントをカバーしているが、Thomas Swan の材料についてはデータが間に合わないことから Principal Material から外すこととした。
- ・ MWCNT(多層カーボンナノチューブ)は Principal およびいくつかの Alternate Material で多くのエンドポイントがカバーされている。
- ・ フラーレンは、環境データ以外はほとんどのエンドポイントをカバーしている。

###### ii) ナノ銀

- ・ 前回の WPMN8 から大きな進展はない。

###### iii) 二酸化チタン

- ・ P25 に関しては、ほぼドシエができています。

###### iv) 酸化亜鉛と酸化セリウム

- ・ 物理化学特性はほぼカバーした。環境データに関しては現在進行中であり、哺乳類毒性に関しては慢性毒性を検討中。ほとんどのエンドポイントを WPMN10 までにカバーする。

###### v) 二酸化ケイ素

- ・ 物化特性は完了したが、環境データは始めたところ、哺乳類毒性の試験は進行中。環境データは 6 月に間に合わない。

###### vi) デンドリマー

- ・ 第3、第4世代の PAMAM デンドリマーで試験中。物理化学特性はかなりデータが出てきたが、その他はまだ時間がかかる。

###### vii) ナノ金

- ・ vitro 試験の結果を報告した。

###### viii) ナノクレイ

- ・ 2011 年後半にスタートしたところで、完了まで約2年かかる。

###### ix) まとめ

- ・ 多くの物質のドシエは6月の WPMN10 に間に合う。

##### ② Phase1の完了とPhase2について

Phase 1 の完了に関して

- ・ ドシエの提出、13物質のデータ提供、SG4 への情報インプット
- ・ 完了しないエンドポイントにつき完了しない理由を明確にすべき。
- ・ ドシエの評価は Horizontal に行うべき。
- ・ ①体内動態と発現メカニズム、②環境中運命、③遺伝毒性、④環境毒性、哺乳類毒性、の Horizontal 会議を推奨する
- ・ 評価は2013年 12 月まで(長すぎるとの意見があった)。  
等が、議論された。

Phase 2 に関しては、12 月 1-2 日に行われたタスクグループ2の会合の報告が行われた。Integration とドシエ評価のために、以下が必要とされた。

- ・ 2012 年 6 月までに 6 つ以上のドシエを提出する
- ・ 評価者がデータにアクセスできること
- ・ ドシエ評価ガイダンスの作成
- ・ ドシエのホリゾンタルな評価

### 3) SG4 対面会議

スポンサーシッププログラムと関連の深い SG4 の対面会議がスポンサー会議前日の 12 月 5 日に行われた。

#### ① GNSPD の進捗確認

GNSPD (Guidance Notes on Sample Preparation and Dosimetry) の改訂版の説明が行われた。

GNSPD の改定に当たり、

- ・ Physical Chemical Properties の新規エンドポイント追加があれば1月中とした。
- ・ Environmental Fate では、2月の電話会議で確認して、WPMN10で最終版とすることが確認された。Eco-Toxicity は SG4 のレビューにかける準備ができています。
- ・ Human Health は Sample Preparation が重要で加筆したとの説明、SG4 のレビューにかけられるか至急検討する。

#### ② 2012年作業の優先順の議論

- ・ 今後、見直しをかける OECD テストガイダンスとして TG209、TG302B、TG 310、TG316、TG403、TG412、TG413、TG436 が挙げられた。
- ・ SG3だけでなく、リスクアセスメントの SG6、暴露関連の SG8との協力が必要とされた。
- ・ ドイツが環境中運命と環境毒性のホリゾンタルワークショップを推奨、ドイツがスポンサーとなる。



## (2) ISO

### 1) ISO/TC229の概要

2005年に国際標準化機構(ISO)の中にナノテクノロジーを扱う第229番目の技術委員会(Technical Committee) TC229が設置された。同年12月にロンドンで第1回TC会議が開かれて以来、毎年2回の会議開催を通して活発に活動し、既に22件(内、6件が日本提案)のISO規格が出版されている。

TC229は次の4つの作業グループから構成されている。

JWG1: 用語・命名法合同分科会

JWG2: 計量・計測合同分科会

WG3 : 環境・安全分科会

WG4 : 材料規格分科会

なお、JWG1、JWG2は、IEC[国際電気標準会]/TC113との合同分科会(Joint Working Group)である。

### 2) 2011年度の会議開催状況

- ① 第12回総会及び各作業グループ(WG)会合が、2011年5月16日～20日、ロシアのサンクトペテルブルクで開催された。
- ② 第13回総会及び各作業グループ会合が、2011年11月14日～18日、南アフリカのヨハネスブルグで開催された。ISO/TC229設立当初から今日に至るまで議長を努めてきたPerter Hatto博士が、第13回総会限りで退任することになり、長年の尽力に対する深い謝意とナノテクノロジーの世界的な発展への貢献に対する敬意が示された。

### 3) 2011年度の進捗内容

- ① 2008年に出版されたISO/TS 27687: nano-objects[ナノ物体]が3年目の見直し作業に入った。TS 27687では「nanoparticle」、「nanofibre」、「nanofilm」、「agglomerate」、「aggregate」等の定義を定めているが、今回追加が検討されている用語は、「primary particle」、「secondary particle」、「aspect ratio」、「engineered nano-object」、「manufactured nano-object」、「incidental nano-object」、「nanofilament」、「nanocone」、「nano-onion」、「nano-ribbon」、「nanopowder;」、「nanocrystal」等である。また、「agglomerate」、「aggregate」、「nanoparticle」、「nanoplate」、「nanofibre」は定義の再検討の対象となっている。
- ② WG3やWG4では、ナノ粒子製造現場における環境測定評価や、製造したナノ粒子の評価・規定等、現実に存在する状態[一次粒子、その集合体である弱凝集体(agglomerate)・強凝集体(aggregate)の混合物]の粒子を扱っており、審議が進むにつれ単純にnanoparticleという用語でカバーしきれなくなってきた。このため、JWG1のアドバイスを受け、この粒子集合体を表現する用語を、NOAA(Nano-objects, and their aggregates and agglomerates greater than 100 nm)とすることが決まった。
- ③ 材料規格を開発するWG4においては、中国からナノ炭酸カルシウム、ナノ酸化チタンの基本的特性に関する規格案が審議されているが、このままでは個別の化学物質ごとに規格を作成し続けることに成りかねず、また規格のユーザーも非常に似通った規格を購入させられるする危険が指摘された。このため、個別ナノ材料に囚われず包括的なナノ粒子規格作成を目的とした新たな規格[Generic規格]案を日本から提案し、サンクトペテルブルグ・ヨハネスブルグ会合での審議を経て、ヨハネスブルグ総会でTC229の委員会投票に進むことが承認された。
- ④ 英国からCEN[欧州標準化委員会]/TC352とISO/TC229に提出されたナノラベリン

グ規格(ナノ材料含有製品にはラベルを付けるとの規格)はISO/GENのウィーン協定に基づき、CEN/TC352 主導で作業が進められてきたが、2011年1月の両委員会において否決された。しかし、この規格をCEN/TC352で再審議することが決まったため、非EU国を中心にその運営方法に対して異議が噴出した。このため、サントペテルブルグ総会において今後の進め方に関する臨時の会合が、議長の呼びかけで開催された。協議の結果、ナノラベリング規格の作成をISOとGENのどちらの主導で進めるかについて、CEN/BT(技術評議会)と協議して決定するよう、説明文をつけて、ISO/TC229からISO/TMB(技術管理評議会)に要請した。

これは、ナノラベリングによって一般社会がナノ材料・ナノ材料含有製品に対して不必要な懸念を抱かす恐れのある規格作成を非EU圏の審議なしで進めることへの反対表明である。

この懸案課題は、ヨハネスブルグ総会時点でもISO/TMB、CEN/BTの正式な裁定が下されていないままであった。その一方で、CEN/TC352が規格草案の審議を開始したことをTC229としては遺憾とした。このためヨハネスブルグ総会において下記の決議が合意された。

ISO/TC229からのTS 13830(ラベリング規格)の作成の主導に関する問い合わせについて、ISO/TMBから明確な回答が得られていないこと、回答の遅れが規格作成に遅れを引き起こすことに鑑み、ISO/TC229は、本年5月の決議に基づく問い合わせを再度提出する。

この「ラベリング規格」作成の主導権をEU圏が取るか、非EU圏が取るかは、ECのナノ規制の動きとその動きへの牽制に絡んだ複雑な課題である。

- ⑤ 上記2回の会合での討議を経て、2011年度だけで11件(内、2件が日本提案)の規格が発行された。

### 3-3 主要な学会の内容

主な国際学会として、Nanocarbon 2011 in Nagano と Inno.CNT ワークショップ(ドイツ)に参加して、情報を収集した。以下に、その内容を記す。

#### (1) Nanocarbon 2011 in Nagano

会場: ホテルメトロポリタン長野

日時: 2011年11月16日(水)-17日(木)

#### 【スケジュール】

##### I. グリーンイノベーションにおけるナノカーボンの役割(11/16)

9:00 - 9:10 開会の辞

司会: 清水教授(信州大学工学部)

9:10 - 10:00 環境、健康、安全に対する共同の取り組み“炭素のためのナノ安全コンソーシアム(NCC)”について

Mr. John C. Monica (Porter Wright's Nanotechnology、米国)

10:20 - 11:20 リチウム-黒鉛層間化合物とナノカーボンコーティングしたかんらん石

Dr. Karim Zaghbi (Hydro Quebec、カナダ)

11:20 - 12:00 ナノ材料と電池の現状と将来

江田信夫研究マネージャー(リチウムイオン電池材料評価研究センター)

13:00 - 13:40 粉末冶金法によるMWCNT強化金属基複合材料

近藤勝義教授(大阪大学接合科学研究所)

13:40 - 14:20 ナノカーボンが組み合わさって出来る階層構造を有するナノ複合材料

Prof. Zhong Zhang (国家ナノ科学中心、中国)

14:20 - 15:00 グラファイトにおける微視的超潤滑と磨耗フリー現象

Prof. Quanshui Zheng (清華大学、中国)

15:30 - 16:10 カーボンナノチューブを活用し、商業的に実現可能な製品と用途

Dr. Peter Krueger (Bayer Material Science、ドイツ)

16:10 - 16:50 カーボンナノチューブ強化複合材料: 持続可能性を向上させるために商業的に実現可能な手段として

Dr. Michael Claes (Nanocyl S.A、ベルギー)

16:50 - 17:30 ナノコンポジットの強化機構: 概説とモデル化のための提案」

Prof. Marino Quaresimin (University of Padova、イタリア)

17:30 - 17:40 閉会の辞

##### II. 第5回カーボンナノチューブの毒性と安全に関する国際ワークショップ

(11/17午前)

9:00 - 9:15 開会の辞

司会: 鶴岡秀志教授(信州大学工学部)

9:15 - 10:00 遺伝毒性的発癌物質の閾値に関する実験結果に基づく新提案

福島昭治所長(日本バイオアッセイ研究センター)、鰐淵英機教授(大阪市立大学医学部)ら

10:00 - 10:45 燃焼由来のナノ粒子の毒性: 大気汚染研究からの教訓

Dr. Flemming R. Cassee (National Institute for Public Health and the Environment (RIVM)、オランダ)

- 11:00 – 11:45 げっ歯類への異なる投与経路における異なる工業ナノ粒子(Ir,Ag,Au,TiO<sub>2</sub>,  
原子状炭素,MWCNT)の生体動力学  
Dr. Wolfgang G. Kreyling (Helmholtz Center Munich – Research Center  
for Environmental Health、ドイツ)
- 11:45 – 12:30 ナノ炭素毒性学に関する材料科学者の視点  
Prof. Robert H. Hurt (Brown University、米国)
- 12:30 – 12:45 閉会の辞

### Ⅲ. 特別講演(11/17午後)

- 14:30 – 16:30 曝露ナノ粒子の移動—チェルノブイリ事故の経験を基に  
Dr. Wolfgang G. Kreyling (Helmholtz Center Munich – Research Center  
for Environmental Health、ドイツ)

### Ⅳ. ポスターセッション(11/16)

12:00 – 13:00

司会: Yoong Ahm Kim 准教授 (信州大学工学部)

## 【内容】

### I. グリーンイノベーションにおけるナノカーボンの役割

- ① A Collective Approach to Environmental, Health, and Safety: The NanoSafety Consortium for Carbon (環境、健康、安全に対する共同の取り組み“炭素のためのナノ安全コンソーシアム(NCC)”について)

Mr. John C. Monica、Porter Wright Morris & Arthur LLP, U.S.A

炭素のためのナノ安全コンソーシアム(NCC)は、ナノカーボンの責任ある商業化を目的として、これらの物質に対する法律や規制、環境・健康・安全に関する課題に取り組んでいるコンソーシアムであり、講演者の John C. Monica は、NCC の顧問弁護士である。

NCC が目指すところは、

- 米国 EPA の間に同意が得られるような毒性評価試験方法の確立を目指す。それは、NCC メンバー企業のカーボンナノ材料に適用できる TSCA 同意指令が要求する毒性評価試験項目を満足し、代表ナノカーボン材料のセットを対象としたものである。
- 代表試験方法の考え方として、新しい方法は、NCC と米国 EPA が合意でき、しかも NCC メンバー企業の製品に対して、毒性試験を全く新しく包括的に行う必要がないように、合理的な範囲内での修正が認められるものでなければならない。
- ナノカーボン材料に対して TSCA の第 4 節あるいは第 8 節に準じて規定されるデータ採取法、すなわち試験法に関する NCC の基本的な考え方を EPA に伝えること。

である。

現在、NCC に加入しているメンバーは、以下の通りである。

- Angstrom Materials LLC, Dayton, OH
- Applied Sciences, Inc., Cedarville, OH
- Cheap Tubes, Inc., Brattleboro, VT
- Cintinental Carbon Nanotechnologies, Inc., Huston, TX
- Nano-C, Inc., Westwood, MA

- Nano Integris, Skokie, IL
- Nanolab, Waltham, MA
- Nanoshel, LLC, Wilmington, DE
- Pyrograf Products, Cedarville, OH
- Solid Carbon Products, Provo, UT
- SouthWest NanoTechnologies, Inc., Norman, OK
- Unidym, Sunnyvale, CA
- XG Sciences, Inc., East Lansing, MI

NCC が実施・支援するすべてのプロジェクトは、高度なレベルの科学的正確性、精密性を重んじ、そこで得られたデータは公開される。現在の最大の課題は、米国環境保護庁 (USEPA) が新規化学物質に課しているラットを用いた 90 日間の吸入毒性試験である。この試験には 1 物質当たり 35 万ドル (約 2,700 万円) から 70 万ドル (5,500 万円)、場合によっては 100 万ドル (約 7,800 万円) 掛かるとも言われており、異なる製造者、異なるプロセスで作られるナノカーボン物質が全て対象となれば、特に中小企業やベンチャー企業への負担は過大となることから、NCC は 2011 年 4 月に多層 CNT、二層 CNT、単層 CNT、グラフェンの 4 物質について、共同で試験を行い、結果を公開することを USEPA に申し入れたが、その後の人事異動 (本件に積極的だった Jim Willis の転出) 等により、結論待ちの状態である。

現在の NCC の課題は、作業環境等を含む製造者側の安全性から、ナノカーボン材料の使用者側の安全性に移っており、機械加工、切断、磨耗等によりナノカーボンを含む樹脂からのナノ材料の放出や最終処分までを含めた安全性に移ってきている。

質疑では、NCC と独占禁止法との関係、2011 年 4 月の NCC 提案に対する回答がいつ頃になると予想しているか等が話し合われた。当然ながら、独禁法上、NCC 会員間では、価格や顧客情報、マーケティング等に関する情報交換を行わないことに注意しており、USEPA の回答がいつになるかについては、全く分からないとのことであった。

- ② From Lithium Graphite Intercalation Compounds for Nanocarbon Coating Olivines (リチウム-黒鉛層間化合物ナノカーボン黒鉛とナノカーボンコーティングしたかんらん石)  
Dr. Karim Zaghbi Hydro Quebec, Canada

電気自動車、ハイブリッド自動車等、今後期待される自動車に不可欠な高性能電池の一翼を担うであろうリチウムイオン電池と、それがナノカーボンやグラファイトとの関係についての解説。

今のところ、エネルギー密度が高いことから、リチウムイオン電池の最も好ましい負極材料として  $\text{LiCoO}_2$  が挙げられるが、安定供給に不安のある Co (最大の産出国が、コンゴ) を含有することから、Co フリーの電極材料が望まれている。Padhi らにより開発された  $\text{LiFeO}_4$  は、安全性、コスト競争力、環境への配慮等の点から有力な陰極材料となっているが、本発表では、 $\text{LiFeO}_4$  を含めた  $\text{LiMPO}_4$  ( $M = \text{Fe}, \text{Mn}, \text{Co}$ ) 系負極材料のカーボンの電極としての特性に及ぼすカーボンコーティングの効果についても紹介。

- ③ Nano-materials and Batteries: Present and the Future (ナノ材料と電池の現状と将来)  
江田信夫 (技術研究組合リチウムイオン電池材料評価研究センター、LIBTEC)

リチウムイオン二次電池の試作と評価、電池材料の評価を目的に設立された LIBTEC

から、リチウムイオン電池の今後と、本機関の活動の紹介。プレゼンテーションは、以下の項目について行われた。

主要電池の出荷実績推移(金額ベース)、各種電池の単位容積および単位重量当たりのエネルギー密度比較、リチウムイオン電池の正極および負極材料の変遷と今後、リチウムイオン電池に使用されるナノ材料とナノプロセス技術、パナソニックから発売されたVGCFを使ったリチウムイオン電池、リチウムイオン電池におけるVGCFとCNTの使用状況、電池におけるナノカーボンの長所・短所、スマートフォンに使用されだしたCNT、ナノ金属化合物をコーティングした負極材料。

まとめとして、リチウムイオン電池は、発売以来、生産量を伸ばしており、エネルギー密度は当初の3倍以上に増大してきている。VGCF、CNT、ナノシリコン等のナノ材料は、リチウム電池材料としてのメリットを活かして使用されだしているが、ナノに関わるリスクが懸念される。しかしながら、リチウムイオン電池にとって、ナノ材料に期待するところは、引き続き大きい。

④ Un-bundled MWCNTs Reinforced Metal Matrix Composites by Powder Metallurgy Process (粉末冶金法によるMWCNT強化金属基複合材料)

近藤勝義教授(大阪大学接合科学研究所)

自身に絡み合った状態で供給されるCNTを材料(マトリックス)に複合化するに当たり、解きほぐす過程と、それらを用いて粉末冶金法により製造した複合材料の特性の紹介。

本研究では、双性イオン性界面活性剤を用いてMWCNTを解きほぐし、それを金属粉末と混合し、それを焼結後、熱間加工により仕上げている。金属粉としては、チタン、アルミ、マグネシウム、銅、鉄およびそれらの合金が考えられる。熱力学的には、ある種の元素は、焼結中にCNTと反応してTiC、Al<sub>4</sub>C<sub>3</sub>、Cr<sub>23</sub>C<sub>6</sub>、Fe<sub>3</sub>C等の炭化物を生成し、これらの炭化物は、マトリックスとMWCNTの界面で力を伝達するという重要な役割を果たすだけでなく、分散相は分散強化として、また、チタンの場合は一部のカーボンはマトリックスに固溶して固溶強化として、強度上昇に寄与する。

実例として、チタンに0.1 mass%のMWCNTを添加した場合、室温での0.2%耐力、引張強さ、伸びは、それぞれ1030 MPa、1095 MPa、25%となり、強化相の無い場合の598 MPa、732 MPa、28%に比べて強度が大幅に増大していることが示された。

⑤ Hierarchically Structured Nanocomposites Based on Hierarchically on Nano-carbon Building-blocks(ナノカーボンが組み合わさって出来る階層構造を有するナノ複合材料)  
Prof. Zhong Zhang, National Center for Nanoscience and Technology, China

CNTやグラフェン等のナノカーボンは、優れた特性を有するものの、現在の技術でナノカーボンを“組み上げ”て、この優れた特性をマクロ材料で達成することは難しい。発表では、ナノカーボン自らは、クラスター(房)を形成すると同時に、それが周囲の樹脂と鎖のような連結を築くことで、階層状の構造を持ったナノ複合材料を作製し、優れた機械的性質を達成した例を示している。

⑥ Microscale Superlubricity and Wearless in Graphite(グラファイトにおける微視的超潤滑と磨耗フリー現象)

Prof. Quanshui Zheng Tsinghua University, China

高配向熱分解黒鉛(HOPG; Highly Oriented Pyrolytic Graphite)で観察される「超潤滑」お

よび「無磨耗」現象についての研究発表。

HOPG上に形成された島の突起を微小距離ずらしと、外部からの力無しに元に戻る現象がある。これは、すれた面間の摩擦力が非常に小さいことを示しており、将来、マイクロメカニックスの分野で超潤滑技術として活用できる可能性を示す。

ずらす距離が2 μm以下の時は100%、3、3.5、5 μmと大きくなるにつれて基に戻る確率は87%、33%、13%と急激に低下する。また、一方向にずらすのではなく、島状の破片を回転させると、元に戻らないだけでなく、ある特定の角度、回転させたところで固着(lockup)してしまい、更に力を加えると別な軸を中心に回転するようになり、以降、その繰り返しである。固着する角度は、お互いに約60°の角度を持っており、グラファイトの対称氏に対応している。

- ⑦ Commercial Viable Products and Applications Based on Carbon Nanotubes to Address Societal Challenges(カーボンナノチューブを活用し、商業的に実現可能な製品と用途)  
Dr. Peter Krueger Bayer Material Science, Germany

講演は、CNT(Baytube)で複合化した樹脂を構造部材に用いた太陽電池で自力飛行する飛行機プロジェクト“Solar Impulse”の紹介から始まった。Bayerでは、このような活動を支援することで、CNTの認知度、社会受容性を向上させ、市場拡大に役立てようとしている。他にも、直径160mの風力発電用回転翼などが、CNTのお蔭で実用化されてきていることなどをPR。

ドイツでは、政府の支援を受けてInno.CNTという産学連携・学際共同研究機構を設け、27のプロジェクトを擁し、推進中である。講演者のDr. Kruegerが組織委員長になり、11/29-30にはInno.CNT Workshopが開催され、欧州以外から日米韓イスラエル等から参加者を集めている。

質疑では、遠藤先生(信州大学)から、今後の課題としてナノ材料含有物質の最終処理、リサイクルの重要性をどのように認識しているか、との質問に対し、毒性評価ほどは進んでいないが、特性把握、標準化・基準化等に取り掛かっている、との回答であった。

また、NCCのMonica弁護士から、Inno.CNTへの外国企業・研究機関への参加の可否について質問があった。ドイツ政府から50%の補助を受けて推進しているので、全てに参加可能と言うわけではないが、アライアンスへの参加は可能である、との回答があった。

- ⑧ Carbon Nanotubes Composites : Commercially Available Solutions for Improving Sustainability(カーボンナノチューブ強化複合材料:持続可能性を向上させるために商業的に実現可能な手段)  
Dr. Michael Claes Nanocyl S.A., Belgium

NanocylのCNTについての物理・化学的特性、EHS特性を詳しく調査してきた状況を概説した。

Nanocylでは、自社製品であるCNT“NC7000”について、OECDが定める方法(あるいはその修正方法)に準じて、毒性および環境毒性評価を行っている。試験項目は、急性、準慢性、慢性で16のエンドポイントに亘る。

暴露評価では、2 nmから30 μmまでの最大15種類のサイズまで浮遊粒子を採取できる装置を開発し、物理および化学的性質を分析している。また、潜在的危険を孕む作業を特定するとともに、その結果生じる4つの暴露シナリオを考慮した結果、MWCNTを安全に取り扱うことが出来ることを示し、MWCNTを含む樹脂複合材料の磨耗試験では、磨耗粉の中に“フリー”CNTが認められなかったことを示している。

リスク管理手法においては、発生源からの放出を抑えたり、発生源で補足したりする技術的な方法や、組織的な取り組み(プロセス検討や教育・訓練)や個別対処法(防護マスク等)を検討している。

Nanocyl の CNT の市場に関する情報や用途について質問があった。地域別には、アジアが約 6 割、欧州が約 4 割、残り数%がその他の地域からとなっており、今後期待する用途は、エレクトロニクスのパッケージに加え、なんといっても自動車である、とのことであった。

⑨ Toughening Mechanisms in Nanocomposites :an Overview and Ideas for Modelling(ナノコンポジットの強化機構:概説とモデル化のための提案)

Prof. Marino Quaresimin University of Padova, Italy

樹脂(resin)に  $\mu\text{m}$  サイズのファイバーを添加した従来型の複合材料に比べ、これらにナノ材料を更に添加した三元系複合材料では、剛性、強度、靱性が向上することが知られており、中でも、従来型の複合材料の最大の欠点の一つであった層間剥離破壊に対して非常に高い靱性を有していることが魅力である。

これらの優れた機械的性質を説明しようとしているモデルは、ナノコンポジットの弾性挙動に焦点を当てているが、正確には、ナノサイズの強化相とミクロンサイズの強化相、そして母相(マトリックス)の間の相互作用までも取り入れなければならず、靱性の向上までも説明できるモデルは非常に限られていた。

本発表では、まず、ナノコンポジットの種類および添加ナノ材料の種類(ナノクレイ、ナノ粒子、CNT)が靱性に及ぼす影響について説明し、二相(ミクロンオーダーのファイバーとレジン)系コンポジットと三相(二相系にナノオーダーの強化相を加えたもの)における靱性の向上について、議論された。そして、新しいモデルとして、マイクロメカニクス、ナノ構造、そして分子の挙動を記述したものが提案された。最後に、樹脂系コンポジットにおいて、靱性が向上するメカニズムをモデル化方法として、多重機構的(multi-mechanism)アプローチを考え、それを用いて、靱性向上メカニズムを記述するオリジナルなモデルを提案している。

## II. 第 5 回カーボンナノチューブの毒性と安全に関する国際ワークショップ

① New Proposal Based on Experimental Results on Threshold of Genotoxic Carcinogens  
(遺伝毒性発癌物質の閾値に関する実験結果に基づく新しい提案)

福島昭治所長(日本バイオアッセイ研究センター)、鰐淵英機教授(大阪市立大学医学部)ら

高木ら、坂本らの直線タイプの MWCNT が、腹腔投与により中皮腫を惹起するという実験結果及び福島らの細胞実験によって MWCNT には遺伝毒性はあるが変異原性はないという結果は、ヒトに対する MWCNT の発癌リスクの懸念を抱かせている。これまでのヒトへの外挿に用いられた動物試験の発がんデータは、その化学物質の発がん性を見出すために実施された高用量域での試験結果である。すなわち、発がんのリスク評価にあたっては、発がん物質の高用量域での用量反応曲線、すなわち S 字状曲線を、ヒトが曝露される可能性のある低用量域へ延ばすことによりヒトへの外挿がなされ、しかもその曲線は 0 にたどると理解されている。少なくとも遺伝毒性発がん物質についてはそうであり、閾値がないというのが定説となっている。

福島らは、変異原性と遺伝毒性を有する(IARC で 2A に分類されている)、MeIQx、IQ、



PHIP のような複素環式アミン化合物、ジエチルニトロソアミンのようなN-ニトロソ化合物の低投与量における発癌性を調査した結果を報告した。福島らは、ラットによる in vivo 経口投与試験を、0.0001ppm のような低投与量から実施した。(ちなみに、Peto が N-ニトロソジメチルアミン、ジメチルアミンについて、4080 のラットで行った実験(Cancer Research,1991)においても、最低投与量は 0.033ppm であった。これでもヒトの摂取可能性から言えば高濃度であるという。)全物質で、影響は 0.1~1ppm 位から出てくるのが確かめられ、発癌性には、低投与量において、閾値(少なくとも実地的な(practical)閾値)が存在することが確かめられた。MeIQx のラット肝発がん過程をまとめると、先ず DNA 付加体形成がみられ、その後ある程度の無作用量域があつて 8-OHdG 形成レベルの上昇、LacI 変異、およびイニシエーション活性の増加、さらにある程度の無作用量域の後、GST-P 陽性細胞巢がみられ、そしてさらに幅広い無作用量域を持って肝がん発生の増加に至ることが明らかとなった。このように肝発がんの指標である種々のマーカーにはそれぞれの無作用量域が求められ、マーカーから推察される発がん機序を考えると MeIQx の発がん性には閾値があると結論することができる。また、変異原性がなく遺伝毒性があるジメチルアルシン酸の場合には、完全な閾値が存在した。

あらゆるタイプの発癌性物質に対してこのことが適用できると推定できる。したがって、新しい物質の発癌性の評価は、この観点から実施されることが強く望まれる、とした。

これは非常に重要な提起で、これまでの発癌物質はどんなにわずかでも、存在する限り安全ではないという「ゼロリスク論」を否定するものである。直ちに、出席していた欧州の権威ある毒性学者 Kreyling から、これまでの考え方に問題を投げかけるもので、早急に結論は出せない、という意見が述べられた。福島先生は、データがまだ少ないことは承知している、扉を開けた段階である、との答えであった。吸入試験はどうかとの問いに、現在 2 年間の試験を実施している最中とのことであった。Whole-body 試験と Nose-only 試験についてどう考えるかとの質問に、Oberdorster は、Whole-body を認めている、癌試験は、Whole-body のみであるとの答えであった。

② Combustion-derived Nano Particle Toxicity: Lessons Learnt from Air Pollution Research  
(燃焼由来のナノ粒子の毒性: 大気汚染研究からの教訓)

Flemming R. Cassee, National Institute for Public Health and the Environment (RIVM),  
Nederland

大気汚染の研究において、ナノ粒子は健康被害の点でもっとも有害な成分であるとされておられ、気道や肺のみならず、血管系や脳を含む神経系にも影響を及ぼすことが明らかになりつつある。同じ重量では、粒子数濃度がはるかに大きく、大きな粒子より影響が大きい。その理由は、肺の深部に侵入する、肺の細胞に当たる数が多い、重量あたりの表面積が大きい、化学的な活性や表面電荷などの表面特性が異なる、また、ナノ粒子は、嗅球(olfactory bulb)通過し脳に達して影響を及ぼす、などである。

ディーゼル排気(粒子トラップ(500~5000 分の1に粒子数をカット)の有無)とろ過空気を、ボランティアに1時間吸入実験を行った。血流調査、プレステモグラフ、血液採取によって、影響を調べた。血管系に影響がある(cardiovascular effects; 脈管結紮、血栓形成)ことが認められた。一方で炭素ナノ粒子ではそのような影響がないため、環境ナノ粒子は、ディーゼル排気の有害成分のキャリアとなっていると考えられる。Biswas らは、排気粒子から吸着成分を除去すると有害性がみられなくなることを報告している。また、顔面マスクをしても同様の効果がある。以上のことから、大気中のナノ粒子の有害性は表面化学に起因していることが示されている。

燃焼由来のナノ粒子が急性・慢性の血管疾患を引き起こす機構は、下図のようにまとめ

られている。

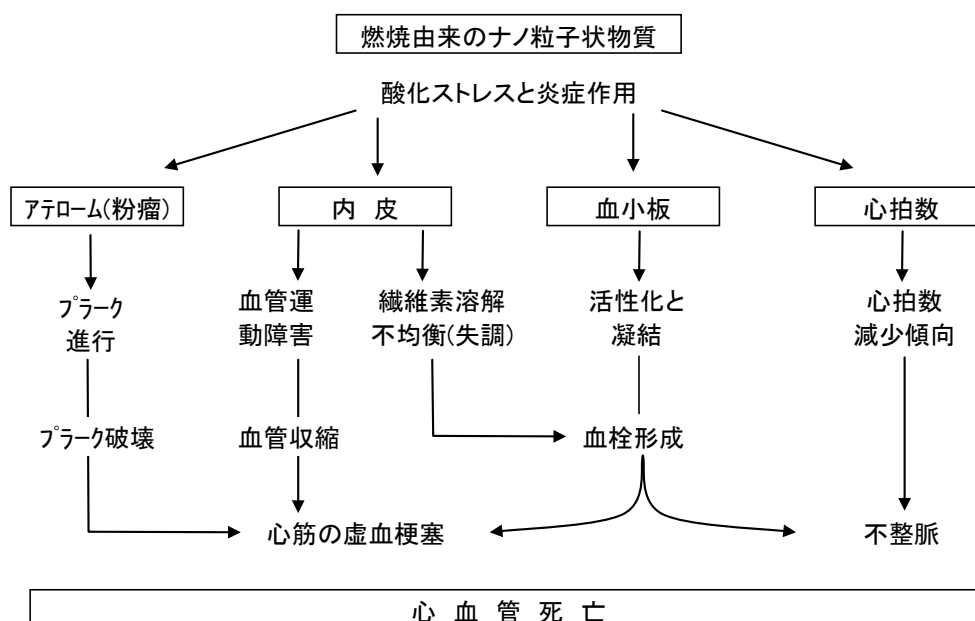


図 燃烧由来のナノ粒子状物質が急性、慢性の血管疾患を引き起こす機構

さらに、「繊維仮説」を主張している英国の Poland, Donaldson らとの CNT, Ni wire の気腔注入の共同研究も紹介し、例えば蛋白コーティングで表面の化学的性質を制御するなど、安全な CNT をデザインするよう提唱した。

議論では、欧州のメーカーから、MWCNT は長くても Tangle にして有害性を低減させているとの発言、Surface modification よりも Surface Area の影響が大きく限界があるという意見などが出された。

- ③ Biokinetics of Different Engineered Nanoparticles (Ir, Ag, Au, TiO<sub>2</sub>, Elemental Carbon, MWCNT) in Rodents after Different Routes of Administration (げっ歯類への異なる投与経路における異なる工業ナノ粒子 (Ir, Ag, Au, TiO<sub>2</sub>, 原子状炭素, MWCNT) の生体動力学) Wolfgang G. Kreyling, Helmholtz Center Munich – Research Center for Environmental Health, Germany

同位体でラベルしたナノ粒子を作製し、咽頭吸入、気管注入、経口投与及び血管内注入実験を行った。放射性元素でラベルしたナノ粒子の作成は、微量の <sup>48</sup>V を含む Ti 電極を、酸素を含む気流中で火花放電させて発生させて行い、そのまま二酸化チタンのエアロゾルとして、吸入させた。実験の誤差と変動を予め検討し、精密、正確な実験を行っている。過去に演者が行った実験も含めて、表題にある各種のナノ粒子について、肺、心臓を含む投与器官と二次器官における分布を経時的に測定した。20nm の異なった材料と構造のナノ材料 (Ir, EC, TiO<sub>2</sub>, Au) の吸入24時間後の器官と組織における分布を下図に示した。肺での滞留が支配的であり、二次器官においては、通常、投与量の 0.1% 以下しか残らず、ナノ粒子の特性に強く依存している事が示されている。肺投与の 1-10% が、空気-血液バリアを通過する。その大きさは Ir > EC > TiO<sub>2</sub> > Au である。現時点では 2 次器官に移動したナノ粒子による急性の有害性は示唆されなかったが、二次器官にナノ粒子が高濃度に蓄

積することによる慢性的な影響の可能性があり、その場合は、取り込み器官である肺等にも有害影響が出てくる可能性があるとしている。Au ナノ粒子では、注入と吸入実験を行ったが、24時間後の分布は、両者は類似していた。

この研究は、演者が属するミュンヘン・ヘルムホルツ中心研究所とECの共同研究センター(JRC)等との共同研究であり、ENPRA(Risk Assessment of Engineered Nanoparticles)プロジェクトを中心とするFP7の資金による研究であり、将来さらに、Ag を追加し、吸入実験 28 日後の分布等の研究を進める予定である。

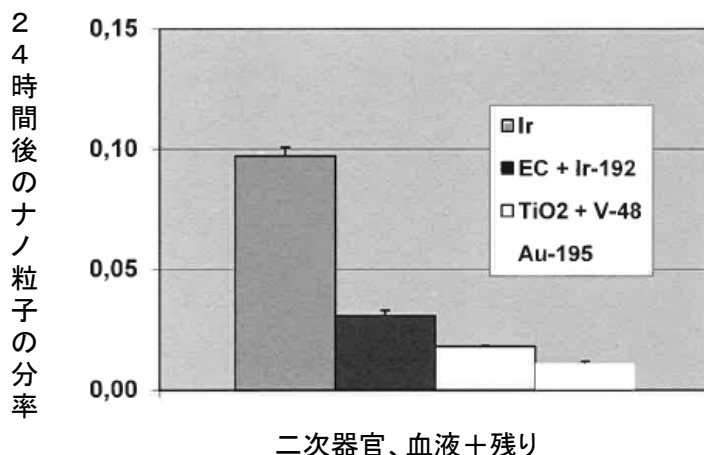


図 20nm の各種ナノ粒子の投与24時間後の分布

④ A Materials Scientist's Perspective on Carbon Nanotoxicology (ナノ炭素毒性学に関する材料科学者の視点)

Prof. Robert H. Hurt, Brown University, U.S.A.

ナノテクノロジーのリスク管理における材料科学者の役割について述べ、具体的にカーボンナノチューブについて演者を含めたグループの研究を紹介した。

- a) 不純物の問題 触媒として用いられた金属不純物は、その量と化学的性質、炭素による被包性によって異なるが、生体雰囲気において水素イオンによって媒介された酸化還元反応により影響を及ぼす。
- b) 細胞のグルタチオン(GSH)との相互作用 表面の構造欠陥によって媒介される。高温アニーリングの効果が説明できる。
- c) 1次元幾何学的性質によって細胞への取込みが決まる。CNTの閉じた丸い先端を粒子と錯覚して細胞が取込む。回転しながら垂直に貪食されその長さを評価できないため、最終的な貪食に失敗する。(シミュレーションモデルが示された。実際に、細胞に対して取り込まれたCNTが、垂直に近い角度で突き出している状況が確認され、これはエンドサイトーシスの特徴である。先端が閉じているCNTでは、細胞の取込みは、受容体との結合力を通じた細胞の認識、脂質と受容体で形成され手いる二層構造の細胞膜の存在、チューブの界面における非対称の弾性ひずみによって引き起こされる回転によって、垂直に近い取込みが起きるというモデルである。入射角は、チューブの回転と受容体の拡散との相対的な時間スケールによって決まる。先端が閉じていないチューブの場合は、細胞膜との相互作用が異なるので、先端をどのように変えると細胞の取込みがどのように変化するかという、興味深い問題になる。) 同様な試みをグラフェンについても行っている。

d) 修飾基による特性制御 酸化性の酸による表面処理が SWCNT を生物劣化させることが報告されている。以上のような研究は、CNT の生体適合性・有害性を設計できる可能性を示している。

会場の興味を呼んだ発表であった。いろいろ感想が述べられたが、今後の研究が期待される。

### Ⅲ. 特別講演

“Migration Behavior of Exposed Nano-particle -On the Bases of Experience in Chernobyl Accident-” (曝露ナノ粒子の移動—チェルノブイリ事故の経験を基に)

Prof. Robert H. Hurt, Brown University, U.S.A.

ヨウ素とセシウムの排出量が、チェルノブイリの方が、福島よりほぼ一桁多い。粒子は気流によって、非常に遠距離を移動する。

このテーマとは別に、ナノ粒子のエアロゾルの曝露、取込みと毒性上の運命について、ミクロン粒子と比較して説明された。連続的に曝露されるときにどのくらいの数の粒子がヒトの細胞に堆積していくかを推定し、in vitro 実験と比較し、後者が非常に多いという認識を持つべきであると指摘した。また、Rodent とヒトを比較すると、排出速度はヒトが遅い。0.5～5ミクロンで Rat は 200 日で 90%排出されるが、ヒトでは 25%しか排出されない。

### Ⅳ. ポスターセッション

ポスター発表では、以下の 2 件が有害性に関するものであった。

- ① Evaluation of CNT Toxicity in Comparison to Tattoo Ink Nanoparticles for use as a Biomaterial (刺青インクナノ粒子と有害性比較した生体材料としての利用のための CNT の評価)

Kazuo Hara, Masayuki Shimizu (信州大学)ら

歴史的に安全性が証明されている刺青インクと販売されている超高純度 MWCNT の生体反応性を比較して、変わらないことが分かった。超高純度 MWCNT は生体材料として安全に使用できる。

- ② The Relationship between Cellular Uptake of Multi-Walled Carbon Nanotubes and Cytotoxicity (多層カーボンナノチューブの細胞取込みと細胞毒性との関係)

Kazuo Hara, Masayuki Shimizu (信州大学)ら

MWCNT の細胞毒性に関するこれまでの研究は数多くあるが、実験条件がマチマチのため結果は複雑であり、確定的な結論が言えない状況である。そこで 3 種類の分散剤と 4 種類の細胞を用いて系統的な実験を行った。分散剤の種類によって、細胞への取込みは異なり、細胞毒性のレベルは、細胞への取込みと関係が見られた。MESO-1、BEAM-2B 及び分化した THP-1 は MWCNT を活発に貪食し、細胞毒性はリソソームの損傷をもたらす。

IMR-32 と分化していない THP-1 は細胞毒性を示さなかった。THP-1 は分化していてもいなくても炎症性の応答を示した。カーボンブラックは同じ細胞に、リソソームの損傷無しに貪食され、サイトカインを分泌したが、細胞毒性は示さなかった。MWCNT の細胞毒性は細胞の取込みのみならず、リソソームの損傷を必要としている。

## (2) Inno.CNT ワークショップ(カーボンナノチューブの計測と暴露評価)

### ① はじめに

Inno.CNT(Innovation Alliance Carbon Nanotubes)は、ドイツ連邦政府教育研究省が支援している CNT に特化したプロジェクトで、2008 年に大学・研究機関や大企業、中小企業等からなる 70 の組織の参加を得て、5 つの分野に分かれた 18 のプロジェクトから始まった。現在では、総予算 9000 万ユーロ(約 91 億円)、参加機関数 90、プロジェクト数 27 と拡大している。

総予算の半分をドイツ政府が負担し、残りを参加機関が負担している。現在、実施中の 6 分野、27 のプロジェクトを表 1 に示す。27 件中、大半は CNT を添加した樹脂に関するものであり、CarboSafe と CarboLifeCycle がナノ安全性に関するものである。CarboSafe では、CNT が有する潜在的リスクを一般大衆に正しく伝えるために、ナノ材料の計測技術の確立、考えられる暴露経路とその影響の把握、環境毒性学上の影響の有無の確認等を目的としており、CarboLifeCycle は、CarboSafe の成果も踏まえつつ、製造、加工、利用および最終処理までの暴露計測ならびに生態毒性学上の試験技術の確立を目的としている。

Inno.CNT のプロジェクトリーダーである Dr. Pöter Krüger は、Baytube®の商品名で MWCNT (多層 CNT)の生産・販売を行っている Bayer Material Science でナノテクノロジーワーキンググループリーダーを務めており、2011 年 11 月に長野で開催されたシンポジウム“Nanocarbon 2011 in Nagano”の招待講演者の一人でもある。

### ② ワークショップ

Inno.CNT Workshop 2011 は、ドイツ国内の他、欧州各国、イスラエル、米国、日本、韓国、オーストラリアから 25 名の研究者(添付の参加者リストを参照)を集めて、11 月 29 日、30 日の二日間に亘ってケルン郊外の Schloss Burg で開催された。発表は、Inno.CNT プロジェクトの研究成果報告だけでなく、米国の NanoRelease の活動状況報告や日韓における研究成果の報告もあった。

報告の対象としては、ほとんどが CNT を含む樹脂材料に関するもので、CNT の製造段階から樹脂への混合、複合樹脂材料の加工や使用中、風化、環境風化、処理(裁断や焼却など)時の CNT の放出やそれに伴う暴露等、ライフサイクルの一部または全てに亘る評価を行ったものが多かった。

表3-3-1 Inno.CNT で実施中のプロジェクトとその概要

分野 (プロジェクト数)	研究プロジェクト名(目的・用途等)
Cross-sectional technologies (3)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CarboScale(超高純度 CNT 製造技術の確立とその標準化)</li> <li>• CarboFunk(複合材料中の CNT と樹脂との結合性向上)</li> <li>• CarboDis(樹脂への CNT の均一混合・分散技術)</li> </ul>
Energy and environment (7)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CarboPlate(固体高分子型燃料電池のセパレータ)</li> <li>• CarboFuel(燃料電池及び電解セルの電極)</li> <li>• CarboPower(導電性向上のためのリチウムイオン電池添加剤)</li> <li>• CarboMembran(海水淡水化や CO<sub>2</sub> ガス分離装置のメンブレン)</li> <li>• CarboInk(プリント可能な導電性インク)</li> <li>• CarboElCh(食塩水電気分解用酸素復極化陰極(ODC))</li> <li>• CarboKat(CNT を含む高効率触媒の開発)</li> </ul>
Mobility (6)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CarboAir(航空宇宙産業および風力発電)</li> <li>• CarboCar(車・航空機向け高強度・高導電性樹脂系複合材料)</li> <li>• CarboSpace(宇宙環境に耐える高性能樹脂系複合材料)</li> <li>• CarboRoad(機械産業や高機能自転車等のレジャー機器)</li> <li>• CarboShield(航空機や風力発電設備に用いられる CFRP の導電性向上による稲妻対策)</li> <li>• CarboSlide(低摩擦・熱安定性を有する滑り軸受け)</li> </ul>
Lightweight construction (5)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CarboTube(静電気対策のための高導電性自動車部品等)</li> <li>• CarboElast(エラストマー用 CNT とエラストマー複合材の開発)</li> <li>• CarboBau(CNT 強化高強度コンクリート)</li> <li>• CarboMetal(CNT 強化金属材料——アルミ、マグネシウム、チタン及び銅合金)</li> <li>• CarboProtekt(安全性向上のための CNT 強化発泡体製緩衝材)</li> </ul>
Electronics (4)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CarboFilm(ITO 等に替わる透明電極)</li> <li>• CarboAktiv(部分的に導電性を付与した筐体等)</li> <li>• CarboFEM(CNT やグラフェンを用いた電子発生電極)</li> <li>• CarboTCF(電子ペーパー等の用途を想定した透明電極)</li> </ul>
Safety (2)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CarboSafe(計測技術の確立と暴露経路)</li> <li>• CarboLifeCycle(製造、加工、利用および最終処理時の暴露計測、ならびに生態毒性学上の試験技術の確立)</li> </ul>

### ③ ワークショップの内容

#### 【技術項目の順位付け評価】

ワークショップは、計測技術(Metrology)、放出と暴露(Release and potential exposure during the production of CNT and processing of CNT-containing products)、CNT含有製品のライフサイクル評価(Life cycle analysis of CNT-containing products)の三つのセッションに分かれ、それぞれ5件、5件、4件の計14件のプレゼンテーションが行われ、最後に総合討論の時間が設けられた。

総合討論では、セッションごとに重要と思われる項目が出席者からリストアップされ、それらについて議論し、その議論を踏まえて時間軸と重要度の二次元で評価・投票が行われ、更にその結果について議論し、本ワークショップの結論としてまとめられた。時間軸は達成されるべき時期によって短期(1-3年)、中期(4-7年)、長期(8年以上)の3段階、重要度は高・中・低の相対的3段階で評価された。

以下にセッション毎の提案された重要項目とその説明を、また、最後に分析結果を図表にしたものを示す。

#### a) 計測技術(Metrology)

計測技術では、以下に説明する12項目がリストアップされた。

##### [M1] 複数の検出方法の組み合わせおよびオンライン計測技術

オンライン計測においてCNTを分類する際には、電気的移動度等価直径として計測し、等価直径は、物理的直径のほか、長さや帯電量で決まる。電気的移動度の計測では、通常、CNTの種類で分類した後に粒子数計測を行う。CNTの長さや直径の値を知るためには、例えば、移動度と表面積といった二つのパラメータの値を計測する必要があり、これは、電気的移動度等価直径が等しいナノ粒子を区別する際には非常に重要である。

##### [M2] 採取装置と自動画像解析装置

大気中に浮遊している微量のCNTを同定する上で、CNTを採取して、それを電子顕微鏡(TEMやSEM)で観察する手法は、非常に重要である。採取では、様々な種類の基板を用いた異なる方式の採取装置が存在するが、特にCNTを対象とした場合は、採取効率が分からないことが多い。画像解析では、偏りの無いコントラストをもち、帯電による画像の揺らぎ(perturbation)もない高画質が必要である。

CNTの長さ、直径およびアスペクト比が分かれば、自動画像解析によって、異なる材質の基板上的CNTや、おそらくはマトリックス(樹脂)に固定されているCNTであっても、同定が可能なのである。

CNTの弱凝集体を、曖昧さを残さないで自動化して同定する方法は、この10年以内に可能になるとは思えないが、画像解析を自動化する方法は、確立し、検証、標準化されなければならない。

##### [M3] バックグラウンドのカーボンと区別するための他元素によるCNTのラベリング法(エアゾールに限定せず)

CNTを電子顕微鏡法によらず、簡便に検出する方法として、他元素によるラベリング、すなわちCNTの製造後、ある一定量の前駆体(precursor)をCNTに付着する方法である。Coは通常、身の回りには無い元素なので検出が容易であるが、鉄やニッケルは職場環境以外にも存在していることから、これらの元素を含む前駆体を用いても、能動的な検出は不可能である。体内移動や生体内循環解析などの科学的研究目的には、放射性物質を用いたラベリングが感度も高く識別性も良いので非常に有効であるが、CNTの製造現場でも実施可能な(非放射性)元素によるラベリング技術が求められている。

[M4] WHO が定義する“fiber”と、HARN(高アスペクト比ナノ物質)の区別

世界保健機関(WHO)による“fiber”の定義は、長さが 5  $\mu\text{m}$  超で直径が 3  $\mu\text{m}$  未満、なおかつアスペクト比(長さ:直径比)が 3:1 超のものである。例えばアスベストの分析などのように、数密度を評価する際には、ある特定の条件下でフィルターを用いてファイバーを採取し、実用上は 200 nm 超の直径を有するファイバーを観察法によって分析する。高アスペクト比ナノ物質(HARS)も、長さが 5  $\mu\text{m}$  超であれば、通常、WHO の定義に入るが、後工程で加工等が加わると、必ずしもそうではなくなってしまう。

空气中を浮遊する HARS の正しい評価のためには、WHO の古い定義と新ナノ物質を形態的に、また化学的に区別する必要がある。

[M5] 検出装置の較正や動作確認に使用する径や長さが分かった標準 CNT の製造技術

今日、空中を浮遊する粒子を分析できるほとんどすべての計測機器は、サイズと密度が分かった較正用球形サンプルが必要である、また、粒子数密度測定のための較正基準も定められていない。そこで、CNT エアゾールの計測に使用される機器の正確な較正のために、少なくとも直径と長さが事前に把握され、大気中を浮揚し運ばれる CNT を含有するエアゾールを製造する必要がある。またこれらのエアゾールは採取装置の較正と動作確認のためにも必要になってくる。

[M6] 有機物のカーボンから元素状のカーボンを区別するための較正方法

CNT の検出と定量に適しているのは、有機物中のカーボンと元素状カーボンを熱光学的に分析する方法(OC/OE 法)である。NIOSH プロトコル 5040 は、職場の衛生状態を観測する標準法として用いられており、使用者により、バックグラウンドのエアゾールのカーボンと CNT のカーボンをより明確に識別するために温度プロトコルに改良が加えられている。

計測機器は、CO<sub>2</sub> ガスあるいは蔗糖(sucrose)等の標準有機物を用いてトータルカーボン量の較正が行われる。残念ながら、有機物カーボン(OC)と元素状カーボン(EC)の明確な区別がなく、OC と EC の濃度を較正する標準が無いのが実情である。それゆえ、温度プロトコルや較正方法を含めた OC/EC 分析法の標準の開発が必要である。

[M7] 長さ、空気動学的中央粒子径、形状

CNT の主たる形態を表すパラメータは直径と長さであり、これらは通常、電子顕微鏡によって測定することができる。しかしながら、CNT は数万程度の非常に大きなアスペクト比(=長さ/直径)を有するので、二次形態も考慮する必要がある。すなわち、ファイバーが毛玉やもつれた糸のように自らに絡まって二次構造体を作ったり、他の CNT と弱凝集体(agglomerates)を形成して束のようになっていたりする。CNT の拡散現象の大部分を支配するのは、このような二次形態であり、ほとんどの粒子径計測機器により空気動学的中央粒子径(MMAD)として決定される。

MMAD は、微細な粒と粗大な粒を質量換算で丁度半分に分けるような値である。CNT “粒子”は、グラファイトに比べて高密度の空隙率を有しているので、一般に密度は遥かに小さくなってしまう。CNT の形態を上手く記述するパラメータのセットが必要である。

[M8] 化学修飾、機能化と、体内残留性と環境運命への影響

CNT は純粋なグラフェンとして成長するが、触媒成分の除去のための精製の過程や親水性等の異なる化学的特性を付与するための過程で他の元素と反応することがある。



CNT に他の元素が共有結合すると、六角構造が四角構造に変化し、CNT の管壁に大きな歪が導入され、CNT の“壁”に欠陥をもたらすことになる。

このような欠陥は、更なる機能化や CNT 内に極を作り出したり、イオン結合 CNT の水への溶解度が大きくなったり、化学的な攻撃を受けやすくなったりし、結果的に生体残留性を下げることができる。このような CNT の構造と化学修飾との関係や環境中での振舞いに及ぼす影響を詳細に理解することが求められている。

#### [M9] 化学修飾・表面改質による毒性

CNT に関係する生体内でのプロセスの毒性学的な潜在力はさまざまに変化し、未だに説明されていない。その支配因子には、アスベストや大食細胞のような最小長さに関連したファイバー状の形態に関わるもの、触媒に起因する不純物や機能性付与のための化学修飾から来る化学毒性、細胞壁のような半透過膜を通過する力をもつことによる生体残留性などがある。これらの関係をより理解していくことが必要である。

#### [M10] CNT のトレーサーとしての前駆体粒子

金属触媒は、CNT を合成する際にカーボン原子同士を結合させるために用いられる。プロセスによっては、後工程でそのようなナノ粒子からなる触媒を出来上がった CNT から引き離したり、そのような触媒を化学的に溶解除去したりすることも可能である。しかしながら、触媒が CNT と強く結合してしまい、残留してしまう場合もある。このような金属識別子は、純粋な CNT 中のカーボンと違って、様々な方法で検出することができ、存在している CNT の定量化に利用することができる。トレーサー粒子を同定するための広く認知される方法を確立すべきである。

#### [M11] 低コスト連続計測技術 (HARN に限定せず)

クリーンルームや環境中でのエアゾールの連続的計測は、質量を基準にした濃度測定器や光学的散乱を使った粒子カウント法により実施される。粒子の質量計測は、粗粒のバックグラウンド粒子により大きく影響を受ける。なぜなら、非常に細かい粒子は、(質量が小さ過ぎて)結果にほとんど影響を及ぼさないからである。他の問題点は、検出に使用する光の波長より小さな粒子を検出することは、Kramers-Kronig の関係式として知られる電気力学の基準原理に従わないことである。しかしながら、グラフィイトや有機物に含まれる“有機的”なカーボンと CNT やグラフェンに含まれる原子状のカーボンを区別できる装置では、カーボン検出の感度を上げることは可能である。

バックグラウンド粒子と CNT のカーボンが区別できないことから、光学的粒子カウンタの結果は、バックグラウンドにより大きく影響を受ける。さらに、より重要なことは、様々な環境下において光学カウント方式で正確に計測しようと思ったら、“同時”による数え落しを観察する必要がある。現在のところ、凝縮粒子カウンタはあまり使用されていないが、将来的には意味のある重要な計測値を得る方法になると思われる。また、低コスト連続計測方法は、CNT に特有の特性に適合させなければ意味がない。

#### [M12] 数、表面積および質量の測定標準

生体系の内外にかかわらず、いくつかの化学反応には CNT の表面で起こり、これらの反応では、粒子の数や質量ではなく、表面積が反応を支配する。エアゾールの総表面積は、粒子を飽和帯電させてその電荷量を測定することにより計測することができる。

実用上意味のあるデータセットが揃っているケースを用いて、認知されるような表面積の測定標準を明示すべきである。

これらの12のトピックスについて行われた投票結果を表3.XXに示す。最も緊急度が高く、かつ重要だとの票を集めたのは、M2 採取装置と自動画像解析装置)であったが、時間軸では、

M3 バックグラウンドのカーボンと区別するための他元素によるCNTのラベリング法

M4 WHOが定義する“fiber”と、HARN(高アスペクト比ナノ物質)の区別

M5 検出装置の較正や動作確認に使用する径や長さが分かった標準CNTの製造技術

M6 有機物のカーボンから元素状のカーボンを区別するための較正方法が3年前後以内での達成を求められているようであった。

また、重要度では、M2に加え、

M8 化学修飾、機能化と、体内残留性と環境運命への影響

M9 化学修飾・表面改質による毒性

が高い評価を得ていた。

表3-3-2 計測技術分野における重要サブテーマ

サブテーマ名		時間軸 *1	重要 度*2
番号	技術項目名		
CNT およびバックグラウンド計測のための最適検出方法の選択 (Selectivity of detectors for CNTs vs. background)			
M1	複数の検出方法の組み合わせおよびオンライン計測技術 (Couple classification + online spectroscopy)	1.89	2.26
M2	採取装置と自動画像解析装置 (Collector + automated image analysis)	1.55	2.50
M3	バックグラウンドのカーボンと区別するための他元素による CNT のラベリング法(エアゾールに限定せず) (Labeling vs. natural/non-CNT background (not only aerosol))	1.55	2.25
M4	WHO が定義する“fiber”と、HARN(高アスペクト比ナノ物質) の区別 (To distinguish HARN vs WHO fibers)	1.53	2.16
計測のための標準(Standards)			
M5	検出装置の較正や動作確認に使用する径や長さが分かった 標準 CNT の製造技術 (To generate predefined CNT aerosols)	1.58	1.95
M6	有機物のカーボンから元素状のカーボンを区別するための 較正方法 (Calibration for elemental carbon)	1.56	1.78
異なる種類の CNT の区別・選別 (Selectivity for different types of CNTs)			
M7	長さ、空気動力学的中央粒子径、形状 (By length/MMAD/shape)	1.85	2.10
M8	化学修飾、機能化と、体内残留性と環境運命への影響 (By Chemistry/surface functionalization → persistence and fate)	1.90	2.50
M9	化学修飾・表面改質による毒性 (Toxicity by chemistry/surface function)	2.27	2.40
M10	CNT のトレーサーとしての前駆体粒子 (Precursor particles as tracer for CNTs)	2.11	1.68
M11	低コスト連続計測技術 (HARN に限定せず) (Continuous (low-cost) monitoring (not always HARN) )	1.80	2.65
M12	数、表面積および質量の測定標準 (Number vs surface vs mass metrics)	1.79	2.21
平均		1.78	2.20

注)時間軸: 1 短期(1-3年)、2 中期(4-7年)、3 長期(8年以上)

(よって、小さいほど、緊急度が高い)

重要度: 1 小、2 中、3 大(よって、大きいほど、重要)

- b) 放出と暴露(Release and potential exposure during the production of CNT and processing of CNT-containing products)

放出と暴露では、12項目がリストアップされた。

- [R1] サンプルングとオンライン計測装置(分析 vs バックグラウンド、自動化+統計、複数同時のサンプルング&オンライン計測、総量計測+分布計測、効率的・代表サンプルング、非球状エアゾール)

CNTを含有する製品の製造と加工は、本質的に複合構造からなっており、CNTの検出に関する項目は、単体の場合に比べて、より難しくなる。CNTを含まない樹脂が存在する場合などのバックグラウンドとの区別や、CNTの含有の仕方(CNTが埋め込まれているタイプ、CNTが表面に突き出しているタイプ、CNTで表面が覆われている粒子、CNT単体の区別など)の違いの区別など。

CNTの製造やCNT含有製品の加工時に発生するエアゾールは、常に非球形状で、しかも多分散系であることから、一つの決まった方法で採取したり、検出したりすることは難しく、これらに対応可能な装置の開発が必要である。

- [R2] 合意を得た方法による放出試験(様々な応力条件、推奨される装置、試験プロトコル)

一貫性がある、予想に反するような結果が出ないように、放出量を計測する方法が合意される必要がある。また、これは、計測における正しいゼロ値を定めたり、放出されたCNT関連材料のリスク評価が十分に分析されるような基礎を提供したりすることになる。

他にも、関連する応力条件や放出シナリオ、例えば、樹脂複合材料の擬似加工プロセスや消費者が使用する際の磨耗、廃棄や環境風化など、また、CNTが放出されるような媒体や条件、推奨される装置類、他の研究と比較するために報告すべきデータや統計解析手法に関して、基準となるプロトコルが必要かもしれない。

- [R3] 危険原理の観点からの放出の特性(工業ナノ粒子の種類による差異、複合化、再凝結マトリクス)

CNT含有樹脂から放出される物質には、単独CNTや、触媒や副産物などと反応したCNT、樹脂に完全に埋め込まれたCNT、樹脂表面に引っ付いているCNT、樹脂単体などがある。CNTのリスク分析では、放出後の環境内移動、環境寿命、暴露、リスク評価を行うために、これらの放出される材料それぞれの特性が考慮されるべきである。そのために、放出される物質を計測し、分析したりするための合意された方法が必要であり、その結果、危険原理(hazard principle)を考慮して、樹脂に添加されたCNTがどのようにナノサイズ粒子の放出に繋がるかを評価することができるようになる。

- [R4] 放出試験に使用する基準物質(陽性対象/陰性対象)

装置や測定方法の較正のためや、CNT添加樹脂複合材料から放出される物質の定性的および定量的測定結果に及ぼす添加CNT(種類や量)の影響を一貫性を持たせて明らかにするために、基準物質が必要である。基準物質は、最も起こりうる放出シナリオに対して、陽性対象と陰性対象のどちらとしても使用できるものでなければならない。陰性対象はCNTを含有しない樹脂材料であり、陽性対象は、そのCNT含有複合材料になされるであろう加工や使用、廃棄を模擬した工程でCNTに関連した物質を放出することが分かっている材料でなければならない(項目R7に関連)。

本項目は、当初、中期(4~7年)で達成されるべき項目に分類されたが、総合討論の結果、基準物質は、その他の多くの項目達成のための前提であって、もっと早期に達成される必要があると結論付けられたため、図では、早期(1~3年)に修正してある。

- [R5] 風化によって放出される量(風化と外力の組合せによって発生する量、検出限界)

コーティングやプラスチックの風化度合いを評価する装置や方法は実用化され、またISO化もされている。しかしながら、これらの方法は、風化後にも材料が残存するバルク材料の光学および機械的性質を対象にしており、放出されて無くなってしまふような断片状の材料の評価

に有効かどうかは確認されていない。

風化試験中に放出される物質や風化後の通常の使用時にかかる力によって生じる放出を評価する試験法は新しい方法と言える。まずは、放出される断片状の物質の同定を目的とし、次に、定量化を目指す。

#### [R6] 放出確率を考慮したプロセスの分類

CNT が関係する物質の放出を予想するためには、CNT の製造、樹脂との混合（マスターバッチ、プリプレグ、最終混合工程）、複合材料の加工、消費者の手に渡ったコーティングされた複合材料の扱い、廃棄までを考慮する必要がある。例えば、機械加工や磨耗する環境で使用される場合に比べたら、密閉された環境下での使用されるコーティングされた CNT 複合材料は CNT を放出しにくいと考えられる。種々の材料やその使用法（例えば樹脂や CNT の種類、複合材料の使用法）を対象として系統だった評価や分類を基本として経験則的な開発を行うことで、測定の中身を明らかにし、リスク管理の優先順位をつけることができるようになる。そのような原理は、CNT 含有複合材料の製造・使用・廃棄の各ステージにおける放出を最小化することを考慮して、複合材料の使用組み合わせを開発するのに役に立つであろう。

#### [R7] 放出確率を考慮した物質の分類（ナノ複合材料の定量と放出確率）

暴露確率をより効率的に評価するためには、それがたとえ研究目的の新しいナノ複合材料であっても、放出確率指標と呼ばれるもので分類する必要がある。指標には、マトリックス材料の既知のライフサイクル挙動から明らかに外挿できるものもある（たとえば、光安定性や softness/hardness）。

他には、マトリックス中に分散されるナノフィラーの分散の性質や、ナノフィラー表面とマトリックスとの相性の良さの程度、既知のナノフィラーの触媒作用の強さなどである。構造と活性の関係は、まだ実用化されていない材料も含めて、この多次元のナノフィラー・相性・マトリックスの関係から導き出される。

#### [R8] 大気中での CNT の長期安定性

CNT が酵素によって分解されると記載されている文献もいくつかあることから、通常的环境下でそのような分解にどの程度の時間が要するか、興味のあるところである。他には、環境下において、化学修飾や表面改質された CNT の時間経過に伴う安定性の変化である。これらの点は、“新品”の CNT が何ヶ月も何年も経った CNT と、環境中におかれた場合に同じ振舞いをするか、とすることになる。

#### [R9] 実験室の放出データを工業規模でのフィールドテストで検証すること

ナノ複合材料は、化学物質が直ぐに放出されるような状況ではないものの、すでにいくつかのものが実用化されている。従来型の排気システム下での配合作業のシミュレーションに用いられているような方法によれば、実験室的シミュレーション結果を実際の工業規模へ直接適用することも可能であろう。すべての関連する機械的、化学的あるいは環境のパラメータを再現するために、剪断応力 (shear stress) を用いる実験室的方法を採用するのが良いと思われる。

#### [R10] 使用期間終了後の放出（シュレッダー、リサイクル、埋め立て、焼却、風化）

予備的な調査の結果では、使用中のナノ含有材料から CNT が単独で (naked) 放出される可能性は考え難いが、使用期間終了後は、マトリックス（特に有機物系の場合）が化学的に変化した場合には、CNT が単独で放出されることが確認されている。これらのシナリオは、時間的に均一ではなく、埋め立てや風化のように何年もかかる場合や焼却のように数秒で終わるものもある。これらのプロセスは、機械的な力によって CNT が放出される場合に比べて、シミュレーションするのが容易ではなく、使用期間終了時のシナリオについての検討は、直ぐにでも開始しなければならない。

#### [R11] 製造されたままの純粋な CNT データを用いた放出 CNT の有害性評価

通常の毒性試験では、製造されたまま、あるいは使用後のナノ材料の潜在的毒性が評価される。製品から放出されるナノ材料の潜在的毒性は、ナノ物質表面の化学的あるいは形態的特性によって異なるであろう。しかしながら、通常、放出試験で実際に放出されるナノ物質の量は毒性試験を行うには十分でないことから、製造されたままの純粋な(pristine)CNT を用いて得られたデータを基に実際に放出された CNT の毒性を推定する方法を確立することは有益である。

#### [R12] 既得データを用いたデータベース構築

CNT の異なる放出シナリオのデータが数多くのプロジェクトにおいて採られているが、今までのところ、これらの全てのデータを蓄積し、材料や放出シナリオごとに上手く構造化されたデータベースは整えられていない。もし、そのようなデータベースがあれば、放出評価を行う際や追加実験が必要な領域を見極める上で、非常に有力なツールになり、また、CNT を含有する材料の構造からナノ物質の放出可能性が推測できるかもしれない。

これらの 12 のトピックスについて行われた投票結果を表 3.XX に示す。群を抜いて最も緊急度が高く、かつ重要だと票を集めたのは、

R1 サンプリングとオンライン計測装置

であり、

R2 合意を得た方法による放出試験

R10 使用期間終了後の放出

が後に続いた。

既述の通り、R4 は、当初、中期(4~7 年)で達成されるべき項目に分類されたが、総合討論の結果、基準物質は、その他の多くの項目達成のための前提であって、もっと早期に達成される必要があると結論付けられたため、早期(1~3 年)に修正された。

表3-3-3 放出と暴露分野における重要サブテーマ

番号	技術項目名	時間軸	重要度
R1	サンプリングとオンライン計測装置(分析 vs バックグラウンド、自動化+統計、複数同時のサンプリング&オンライン計測、総量計測+分布計測、効率的・代表サンプリング、非球状エアゾール) (Sampling and online instruments (Analysis vs. Background, automated + statistics, sampling + online in parallel, total + distribution, efficient/representative sampling, non-spherical aerosols) )	1.06	2.82
R2	合意を得た方法による放出試験(様々な応力条件、推奨される装置、試験プロトコル) (Release tests with agreed methods (various stress conditions (aim at worst case?), recommended instruments, test protocols) )	1.50	2.56
R3	危険原理の観点からの放出の特性(工業ナノ粒子の種類による差異、複合化、再凝結マトリクス) (Quality of release (differentiate ENP vs hybrids vs recondensed matrix) (with respect to hazard principles) )	1.61	2.11
R4	放出試験に使用する基準物質(陽性対象/陰性対象) (Standard materials for release measurement (positive/negative control) )	1.94	2.06
R5	風化によって放出される量(風化と外力の組合せによって発生する量、検出限界) (Quantity from Weathering (Combined action weathering + low-mid stress) )	2.00	2.28
R6	放出確率を考慮したプロセスの分類(Classification of processing steps with probability of release)	1.65	2.41
R7	放出確率を考慮した物質の分類(ナノ複合材料の定量と放出確率) (Classification of nanomaterials with probability of release (Correlation between quality of nanocomposite and release probability) )	1.65	2.29
R8	大気中での CNT の長期安定性 (Long-term stability of CNT in air)	2.07	1.60
R9	実験室の放出データを工業規模でのフィールドテストで検証すること (Validate release lab results with industrial scale field tests)	1.87	2.07
R10	使用期間終了後の放出(シュレッダー、リサイクル、埋め立て、焼却、風化) (Focus on release from end-of-life (shredder, recycle, landfill, incineration, weathering) )	1.60	2.53
R11	製造されたままの純粋な CNT データを用いた放出 CNT の有害性評価 (Extrapolate hazard assessments from pristine to released)	1.60	2.47
R12	既得データを用いたデータベース構築 (Build database of existing data)	2.20	2.33
平均		1.83	2.29

c) CNT 含有製品のライフサイクル評価 (Life cycle analysis of CNT-containing products)

ライフサイクル評価では、3 項目がリストアップされた。

[L1] LCA の考え方を取り入れること(データや仮定を精査/最も関係するシナリオについて考慮 / 放出データを含める/最終処分までの代表的な使用期間を考慮)

LCA のシステムに入出力するデータに関する知識が不足している現状では、新興の技術そのまま CNT の LCA 全体に亘って適用することはできない。ナノ材料およびナノ製品に LCA の考えを適用するためには、LCA 特有のデータの収集方法や、ナノ材料が人体や環境に及ぼす潜在的毒性評価のためのモデル等を十分に理解する必要がある。

ナノテク分野で、ナノ材料に LCA の考えを完全に適用する際の問題点は、

- 1) 全ての分野に LCA の考えを適用する必要があること
- 2) 入出力すべき信頼できるデータが不足しているとともに、入出力データ間の影響度が明らかでないこと
- 3) 製造方法に関して、特定の機関の独占情報が多いこと
- 4) 毒性学に関する試験結果が不足していること
- 5) プロセスによる特性の差異が大きいこと

などが、挙げられる。これらの問題点の内、いくつかは、全ライフサイクル中のデータを蓄積することで、ゆっくりではあるが解決されつつありものの、使用中および処分時の放出データは不足している。

[L2] ナノ材料特有のリスク評価を LCA に織り込むこと

ライフサイクル影響度評価(LCIA)は、他の影響度評価、例えばリスク評価(RA)を区別して考えることが重要である。後者では、特定の材料、臓器を対象とし、ある定義された暴露における評価を行う。しましながら、RA で得られたデータも LCA の織り込まれるべきであり、毒性データと RA のデータを LCA と組み合わせることによって、全体的な影響度とトレードオフ(利点・欠点のバランス点)が評価できる。

[L3] 大量の CNT が使用された場合の LCA 実施(現在および 5 年後)

大規模拡散の場合には、既述のもの以外にも重要な影響が起こりうる。時間と場所を特定してナノ材料を追跡調査できるかどうかを評価するためと、異なる追跡調査を継続して実施できるかどうかを評価するためにスケールアップしたシナリオ分析を使うことが推奨される。

この分析結果は不確実性が大きいものの、現在実施中の研究を補完する情報として、また特に政策決定者にとって重要なものである。

ライフサイクル評価では、大きく分けて 3 のトピックスが挙げられた。表3-3-4に示すように、「L1 LCA の考え方を取り入れること」が最も重要度が高く、かつ早期に達成されるべきとの評価であった。

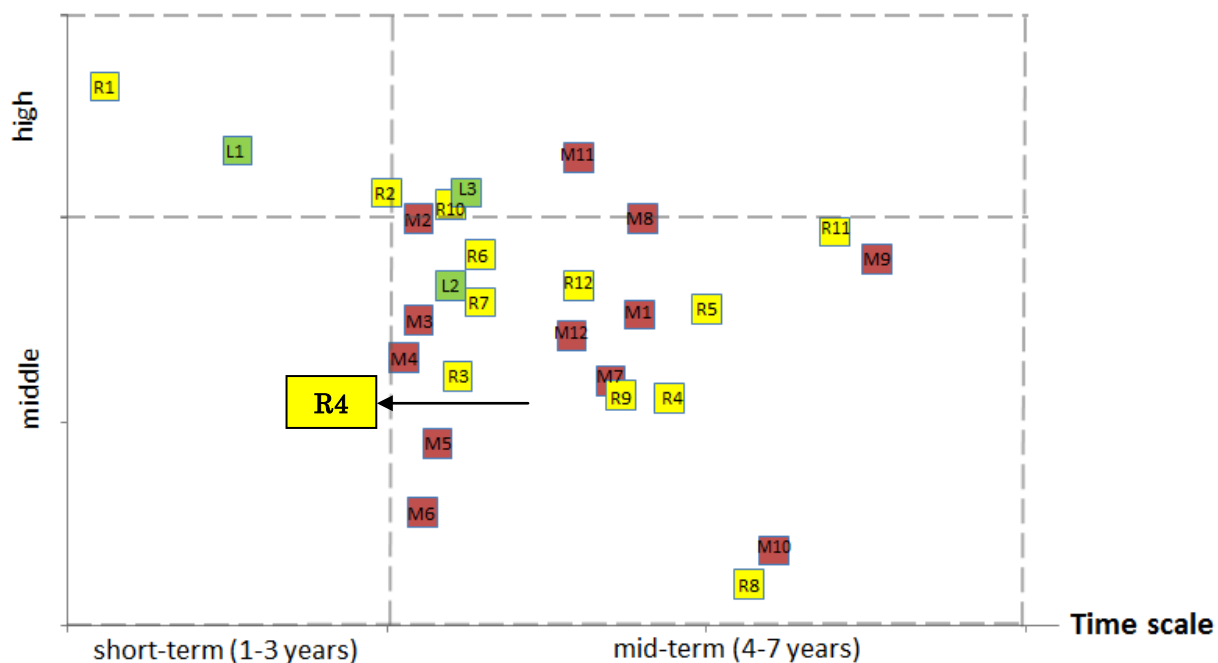
表3-3-4 ライフサイクル評価分野における重要サブテーマ

番号	技術項目名	時間軸	重要度
L1	LCA の考え方を取り入れること (Adapt LCA: scrutinize inputs / assumptions, consider most relevant scenarios, include release data, and consider typical duration of use-phase until disposal)	1.27	2.67
L2	ナノ材料特有のリスク評価を LCA に織り込むこと (Integrate NM-specific risk assessment into LCA)	1.60	2.33
L3	大量の CNT が使用された場合の LCA 実施(Perform LCA for high volume CNT-applications now / in 5y (with turnover) )	1.63	2.56
平均		<u>1.50</u>	<u>2.52</u>



全体では、[放出と暴露]の項目にある「採集とオンライン分析」が、重要度得点 2.82(3 点満点)と最も高く、しかも、ほとんど全ての参加者が 1~3 年以内の達成を望んでおり、全項目の中で最も短期での達成が必要との認識されていた。これらの結果を図3-3-1に示す。

### Importance



- M Metrology
- R Release and potential exposure during the production of CNT and processing of CNT-containing products
- L Life Cycle Analysis of CNT-containing products

図3-3-1 放出とばく露の重要サブテーマ分布

【個別発表要旨】

14 件の個別プレゼンテーションの要旨を記す。

セッション 1【計測】  
座長: Heinz Fissan (Institute of Energy and Environmental Technology e.V. (IUTA))

発表題目	実施者(下線は、発表者)、所属機関
Comparison of different methods for generation and sampling of airborne CNTs (CNT を大気中へ飛散させる方法および差プリングする方法の比較)	B. Stahlmecke <sup>1</sup> , M. Hildebrandt <sup>1</sup> , C. Asbach <sup>1</sup> , N. Dziurowitz <sup>1</sup> , S. Plitzko <sup>2</sup> , H.J. Kiesling <sup>3</sup> , M. Voetz <sup>3</sup> , T.A.J. Kuhlbusch <sup>1</sup>  <sup>1</sup> Institut für Energie- und Umwelttechnik e.V. <sup>2</sup> Federal Institute for Occupational Safety and Health (BAuA) <sup>3</sup> Bayer Technology Services GmbH
<p>[要旨]Inno.CNT のプロジェクトの内の CarboSafe の成果報告。            空気中のナノ繊維 (CNT、CNF) のサンプリング・計測方法を評価するために、湿式 (atomizer)、乾式 (shaker) の二通りの方法で CNT、CNF を空気中に放出し、採取した。サイズ、形状により、Particle、High aspect-ratio nano object、Cluster に分けて解析し、これらの構成比を比較した。その結果、CNT か CNF、発生方法の違いにより、構成比に差異が認められたが、Charger か Preseparator による差、あるいは極性による差異は認められなかった。これらの結果は、今後、各種計測技術の確立に役立てることが出来ると結論付けている。</p>	
Detection of Carbon Nanotubes in Air (大気中の CNT の検出)	Jurg Schutz  CSIRO Materials Science and Engineering
<p>[要旨]エアロゾルの状態での CNT の検出は、その大きなアスペクト比 (<math>10^3 \sim 10^7</math>) のために非常に困難である。また、CNT の拡散は、基本的な形状 (単純な筒状) だけによって支配されるのではなく、毛玉状や絡み合った形状、塊状等の二次形状にも支配され、またこれらの二次形状は非常に安定であることから、拡散現象は複雑である。しかも、CNT が化学的には炭素のみから構成されており、これらの二次的な形状を組成から検知することは出来ない。本研究では、数種間に亘って採集した CNT を高分解能の SEM や TEM によって観察し、これらの物質の濃度を推定している。</p>	
Novel technique to detect nanocarbon distribution using CNT peapod	鶴岡秀志 <sup>1</sup> 、遠藤守信 <sup>1</sup> 、古月文志 <sup>2</sup> 、 齊藤直人 <sup>3</sup> 、薄井雄企 <sup>3</sup> 、藤森俊彦 <sup>1</sup> 、金子克美 <sup>1</sup>  <sup>1</sup> 信州大学, Research Center for Exotic Nanocarbons, <sup>2</sup> 北海道大学地球環境科学研究所 <sup>3</sup> 信州大学医学部

[要旨]環境中に存在する CNT を検出、あるいはその濃度を計測することは、化学的にも物理的にも難しいため、鶴岡らは、CNT の“鞘(pea pod)”の内部にある特定の種類の原子あるいはその組み合わせでラベリングすることによって、X 線を用いた物理解析手法(XDR、XAFS など)によって検出することを提案している。

Characterisation of CNT using a thermo-optical elemental carbon/organic carbon analyser	Mareile Renker, Astrid John, T.A.J. Kuhlbusch Institut für Energie- und Umwelttechnik e.V.
---	---

[要旨]Inno.CNT プロジェクトの一つである CarboLifeCycle において実施されているテーマ。大気中および職場の空気中の CNT の検出と定量方法として、NIOSH 法 5040 に準拠した thermo-optical 法を用い、13 種類の CNT の分析を行うとともに、他の分析法(EUSAAR2、IMPROVE、quartz.bar)との比較も行っている。

CNT の種類によって、NIOSH 5040 法で有機物に由来するカーボンと CNT を区別出来たり出来なかったりしたが、MRICD の CNT では、有機物に由来するカーボンが検出されず、MITSUI の CNT は、比較的安定で CNT によると思われるピークを上手く検出できていた。ただし、材料としてドライの bulky sample を用いる場合と、湿式(懸濁液中の)CNT では、ピークに差異が認められている。

Dispersion, Measurement, Filtration, and Exposure Assessment of CNTs	David Y.H. Pui <sup>1</sup> , Jing Wang <sup>2</sup>  <sup>1</sup> University of Minnesota <sup>2</sup> ETH Zurich and EMPA
--	--

[要旨]購入した CNT は、通常、ミクロン単位の大きな弱凝集体(agglomerates)を作っているため、分散化が非常に重要であり、本研究では、エレクトロスプレイを用いて、コロイド状の CNT 懸濁液を所望のサイズの弱凝集体にエアロゾル化する方法を開発し、従来のアトマイザーによる場合と比較した。その結果、空中を移動する CNT の物理的な長さや電気的な易動度の間には、非常に良い正の相関が認められた。その他、磨耗試験によって飛散する CNT のテストや、ろ過作用等についても発表があった。

**セッション 2【暴露】**  
座長: Richard Canady (ILSI Research Foundation, USA)

Strategies for Nanoparticle Release Assessment from Powders, Liquid and Solid Materials into the Environment	Heinz Fissan  Institute of Energy and Environmental Technology e.V. (IUTA)
--	--

[要旨]ナノ物質を含有する材料からナノ粒子が放出される過程とその確率を評価する方法についての発表。放出されるためには、“機械的”な作用が“熱的”な作用が必要で、ほとんどのケースで、前者(ドリル加工、鋸切断など)から始まる。後者では、気化や酸化が関与し、一般にナノ物質よりマトリックスの方が低い温度で気化や酸化するため、ナノ物質が単独で放出されうることになる。本研究では、熱過程を TGA(熱重量測定)によりナノ粒子の放出確率

(Release Factor＝単位質量当りの放出粒子数)を評価するとともに、方法を基準化している。

Exposure to carbon nanotubes in research and industry	Carsten Möhlmann  Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung (IFA)
<p>[要旨]CNT を製造している製造所とそのユーザ (Downstream) をモニタリングした結果を報告。ナノ物質を扱っている時とそうでない時の空気中のナノ物資の濃度比から、1.05 以上を“possibly (not excluded)”、2 以上を“likely”とした。計測は、集塵したフィルターを SMPS および CPC 分析により行い、判定した。TEM (電顕) による観察も併用したが、TEM では CNT そのものは認められなかった。</p> <p>課題は、CNT の寸法、形状等によって、検出限界が異なることである。形状 (体積) が異なると易動度が異なるためであり、BS1 PD 6699-2:2007 で定める 10,000 fiber/m<sup>3</sup> を意識した場合には、TEM による定量化が重要である。</p>	

24-hr monitoring of nanoaerosols in a CNT manufacturing workplace	Gwi-Nam Bae  Korea Institute of Science and Technology (韓国)
<p>[要旨]CVD 方法で CNT を製造している職場環境におけるナノエアロゾル濃度のモニタリングを行った。SMPS、ダストモニタ、NAM (ナノ粒子エアロゾルモニタ)、アーセロメータ、TEM グリッドサンプラー、OC/EC サンプラーを用いて、粒子数、サイズ分布、表面積等を計測した (実際の作業環境での計測は、2011 年 8 月)。バックグラウンドは、週末の非作業時の値を用いている。</p> <p>結論として、MWCNT はナノサイズの物質としてだけでなく、マイクロ単位の物質としても振舞うので、観察法による検出が可能であり、カーボンブラック用のモニタリング装置でも検出が可能である。一方、短い測定時間ではナノ粒子の放出を検出することは難しく、またバックグラウンド値は、注意深く決定する必要がある、可能であれば、24 時間の計測が望まれる。</p>	

Ageing/weathering of MWCNT and MWCNT nanocomposites	Elisabet Fernández-Rosas <sup>1</sup> , Gemma Janer <sup>1</sup> , Martí Busquets <sup>2</sup> , Víctor Puentes <sup>2</sup> , Socorro Vázquez-Campos <sup>1</sup>  <sup>1</sup> LEITAT Technological Center, Terrassa (Barcelona), Spain <sup>2</sup> Institut Català de Nanotecnologia, Campus UAB, Bellaterra (Barcelona), Spain
<p>[要旨]本プロジェクトは、スペイン政府の支援も受けている CNBSS (Carbon for NanoBioSafety and Sustainability) において実施されたものである (類似のプロジェクトである NanoPolyTox とは、異なる)。</p> <p>ナノ物質を含有する樹脂材料の製造と風化、風化する際のナノ材料の移動と放出について、調査。材料は、マトリックス (樹脂) として PP、PA6、EVA の 3 種類、ナノ材料として</p>	

MWCNT、ZnO、SiO<sub>2</sub>、TiO<sub>2</sub>、2種類のナノクレイの計18種類であり、経時変化は1000時間のオープン内と戸外での自然暴露の二種類で評価した。

マトリックスとナノ材料との相性 (compatibility) を評価するために、PA6樹脂にCNT単体を添加したものと、PA6+CNTのマスターバッチを添加したものを比較した (CNT添加量は、いずれも3%)。

Exposure Assessment of a weaving process of CNT-coated yarn by applying carbon analysis	<p>小野真理子<sup>1</sup>、鷹屋光俊<sup>1</sup>、久保田久代<sup>1</sup>、篠原也寸志<sup>1</sup>、秋葉英治<sup>2</sup>、鶴岡秀志<sup>3</sup>、甲田茂樹<sup>1</sup></p> <p><sup>1</sup>労働安全衛生総合研究所  <sup>2</sup>クレハリビング株式会社  <sup>3</sup>信州大学</p>
---	--

[要旨]WMCNTをコーティングした繊維により作られるシート状発熱体用として用いられるCNTEC®(クラレリビングと三井物産の開発商品)の製造工程におけるCNTの放出を実際の製造現場において計測・解析した結果を報告。

繊維を織る工程においては、MWCNTを含むマイクロ単位の破片は検出されたが、ファイバーそのものは単体では検出されなかった。樹脂繊維(ポリエステル)の破片が、CNTを含有しているかどうかの判別は、熱分析と走査型電子顕微鏡による観察によって行った。

[報告者注]CETEC®(シーエヌテック)は、ポリエステルマルチフィラメント加工系の表面にMWCNTの均一ネットワークを形成し、それをバインダーで固着した導電繊維である。全面発熱、ヒートスポットが無い、薄くて軽く柔らかい、フレキシブル、屈曲疲労性に優れる、折りたためる等の長を有し、融雪マットやロードヒーティング(道路の融雪及び凍結防止のため路面の温度を上げる設備)、暖房(床暖房、膝掛け、シートヒーター)、電池対応ポータブルヒーター(ウエストウォーマー、ネックウォーマー)等に用いることが期待されている。

セッション3【LCA】  
 座長:小野真理子(労働安全衛生総合研究所)

Nano Sustainability Check	<p>Martin Möller</p> <p>Öko-Institut</p>
---------------------------	--

[要旨]ドイツのÖko-Institut(Institute for Applied Ecology)で開発された製品の持続性評価プログラム“PROSA”を元に、ナノ材料の機会とリスクを管理する“Nano Sustainability Check”フレームワークの紹介と利用例の紹介。Nano Sustainability Checkは、ナノ材料により環境面の恩恵を推測したり、新規市場を予想(identify)したりする。また、社会への損害を予防したり無駄な投資をしないようにすることを目的としたものである。

報告では、BASF SEのコンクリート固化加速剤であるX-SEED®と、Nanogate Industrial Solutionのガラスの紫外線遮蔽材料であるpro.Glass® Barrier 401について、ケーススタディを行っている。いずれの商品もまだ開発段階であり、その段階から、必要な知見(知識)の欠如(knowledge gap)や潜在的なリスクを予測することができるというのは、有益であるといえる。また、競合材料とのCO<sub>2</sub>ガスの発生量比較(CO<sub>2</sub> footprint)などにも応用できる。

NanoRelease Project (米国ナノリリースプロジェクト)	Richard Canady ILSI Research Foundation
<p>[要旨]正式名称を“NanoRelease Consumer Products”という NanoRelease プロジェクトの紹介講演。本プロジェクトは、国際生命科学研究機構 (ILSI) の研究財団が中心となり、USEPA、カナダの環境省と保健省、ACC (アメリカ化学工業協会)、NIST 等が支援している。</p> <p>ナノ材料の有害性データは蓄積されつつあるのに対し、放出量の計測に関する研究や調査がほとんどなされていないことから、本プロジェクトでは、ナノ材料およびナノ材料を含む製品のライフサイクルにおいて最も影響の大きいステップを特定し、その際のナノ材料の放出量を計測するために最も良い方法を定め、併せて、ナノ材料を移動させたり放出させたりする際の基準となる方法を確立することを目的としている。</p> <p>三つのタスクグループ (計測方法、放出に関係する特性評価、ライフサイクルでの放出シナリオ) と一つの実験グループに分かれて実施されている。プロジェクトは、四つの Phase に別れ、Phase 1 では、20 以上のナノ物質の中から、繊維に含まれるナノ銀と樹脂に含まれる MWCNT を有力候補とし、最終的に後者を計測方法の評価に用いる基準物質に決定した。現在は Phase 2 であり、専門家グループを構成し、基準物質の提供を開始したところである。今後、成果を白書にまとめるとともに、ステークホルダーが合意できるような計測方法を提案する計画である。</p> <p>費用は、ACC が 1/3 から 1/2 の費用を補助し、残りを各機関が負担しているとのこと (Richard Canady)。</p>	
Characterization of fragments released from CNT-composites under use-phase-scenarios, benchmarked on CNT-formulations	Wendel Wohlleben, Robert Landsiedel, Karin Wiench BASF SE
<p>[要旨]消費者の手に届くナノ粒子やナノファイバー関連製品は、ほとんどが他のマトリックス中に含まれた形であることから、評価は、1) 風化、2) “日曜大工”的な作業 (sanding)、3) 通常の使用時、にそのような粒子やファイバーが放出されるかどうかが重要である。本報告では、樹脂やセメント質のマトリックスから放出されたナノ物質の計測・観察や、それらを用いた <i>in-vivo</i> 試験を行った。その結果、1)では、従来からの報告にあるように検出されたが、2)では、検出限界以上のナノ粒子・ファイバーは検出されなかった。しかしながら、これらの計測方法は、ISO に規定されているものの、まだ改善の余地があると思われる。</p>	
Exposure in the Lifecycle of CNT – Measurements from Production to Weathering	Matthias Voetz Bayer Technology Services GmbH
<p>[要旨]Inno.CNT 中の安全性に関するプロジェクト、CarboSafe と CarboLifeCycle の成果報告。ナノ物質の製造からそれを含む樹脂材料の最終処分 (裁断や焼却など) までの MWCNT の放出と暴露について調査したもの。</p>	

#### 4. 海外行政機関、国際機関の報告書の分析と主要なものの翻訳

##### (1) 文献の選択

以下に検討した文献、報告書をあげ、その評価と結果を記す。

- ・ドイツのSRUの予防原則の提案 9ページの短いもので、別途報告あり。
- ・フランスのDecree 9ページの文書で、別途報告あり。
- ・STOAのNanosafety-Risk Governance 110ページの大部の報告書。  
STOA(シンクタンク)の重要な機能の一つは、EU議会のために、社会と産業界の間の信頼を維持するため、最善を尽くした法律やルールを作るのに必要な最高の知識について理解し提供することである。そしてナノマテリアルはその潜在性からも非常に重要なトピックである。

STOAが委託した、人工ナノマテリアル(manufactured nanomaterial)のリスクガバナンスに関するプロジェクトは、2010年1月から2011年10月にかけて、カールスルーエ(ドイツ)にあるカールスルーエ工科大学(Karlsruhe Institute of Technology: KIT)と、ウィーン(オーストリア)にある、技術評価研究所(Institute of Technology Assessment)が実施した。プロジェクトでは、潜在的な環境、健康、安全性への問題と、産業界との関係、リスク評価の面での懸念や一般社会からの期待、などについて研究した。このプロジェクトの報告書のドラフトは10月に出され、11月21日に半日かけて、ブリュッセルでワークショップが行われ、報告と議論がなされた。今後のEUのナノテク政策に影響が大きいと思われる。この報告書は、翻訳対象とされた。

##### ・RIP-oN2、RIP-oN3

RIP-oNとは、REACH Implementation Project on Nanomaterialsの略称であるが、その結果であるReportは、ECHAへの勧告の意味を持っており、それを受けてECHA(欧州化学品庁)は動かなければならない。また、REACHの所管官庁間にCASGNano(Competent Authorities Sub Group on Nanomaterials)が、2008年3月に設置され、以降RIP-oNの進行を管理し、時期に応じて議論することを行ってきた。この作業部会は、2012年のREACH見直しの期限まで機能する。

RIP-oNでは、2はREACHガイダンス文書の見直し(付け加えるべきエンドポイント)が必要だが、3のリスク評価では従来のものが適用可能だという結論である。従って、RecommendationのあるRIP-oN2の方が必要性が高いと思われる。しかし、重要ではあるが、長大な文書であり部分的に訳しても余り意味が無いので、翻訳対象としない。

- ・EPAのOIGのレポートは、内部監査で、資料性が乏しいように思われ、内容については、別途報告。
- ・EPAのHeiQの条件付認可の決定文書は、NRDCが訴訟を起こしており、関心を呼んでおり、リスク評価の内容をきちんと把握しておく必要性が高いと思われる。欧米のリスク評価の手法やレベルを知るよい文書と考えられ、翻訳対象とした。
- ・米国NRCのEHS研究戦略は、今後の米国の研究の方向を示すもので、重要であり、もし取り上げるならば、サマリーと結論的な部分、研究の優先順位と研究ニーズ、研究戦略の実行と評価の進歩を取り上げるのが適当と思われる。しかし、内容を瞥見すると、総花的な内容で特に注目すべき内容が無いと思われた。
- ・デンマーク環境庁(DEPA)が2011年に出した、ナノ製品の暴露と環境・健康リスクについての調査プロジェクトの報告書であり、暴露の状況について具体的に記述されている点に特徴がある。この報告書のサマリー、材料ごとのまとめ(サマリーシート)とまとめを訳するのが適当である。

以上のような評価と経過で、STOAレポート全体、HeiQ評価書全体、デンマーク環境庁プロジェクト評価の一部を翻訳対象とした。

(2) 添付文献リスト

以下に翻訳文献を示す。

文献1: STOA レポート「ナノセーフティ: 人工ナノ粒子のリスク管理」

文献2: EPA 評価書

「布製品の抗菌剤としての HeiQ AGS-20 の条件付登録に関する決定文書」

文献3: デンマーク環境庁プロジェクト報告

「特定ナノマテリアルのばく露と環境・健康への潜在的リスクに関する基本情報の調査」(抜粋)