

## 2.ナノマテリアルの安全性等に関する学術論文等の文献調査

### (1)検索方法

①使用 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。

Y ; nanomaterial OR nanoparticle OR nanosized OR ultrafine OR ultrafine particle  
OR nanostructure OR subnanosize

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

A ; fullerene or C60 or C70

B ; carbon nanotube or single wall or carbon nanotube or SWNT or SWCNT or  
multiwall carbon nanotube or MWNT or MWCNT or carbon nanohorn

C ; titanium dioxide or titanium oxide or TIO2

D ; zinc oxide or ZNO

E ; silica or silicon oxide or silicon dioxide or SIO2 or amorphous silica

F ; silver or nanosilver or AG

G ; graphene or graphite

H ; platinum or PT or colloidal platinum

I ; gold or aurum or AU or colloidal gold

③検索式

CNT 及びフラーレン: (A or B)andZ、  
及び

その他のナノ物質: (C or D or E or F or G or H or I)andY andZ

④検索期間

2012年1月1日～2012年12月31日

### (2)文献選択の手順

①上記検索方法により文献 DB(PubMed)から「要旨」を抽出

②「要旨」の内容から、明らかに本調査とは関係ない文献を除外

③「要旨」の内容を精査し、「食品」「食品容器」「医療」「医薬品」「土壌環境」等といった分野を除外

④論文の全文を取寄せ、試料、試験方法、試験結果の内容から判断し、内容を一覧表にまとめた。

### (3)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	他	小計
	吸入	経口	気管 注入	腹腔	静脈 注射	皮膚 注射	点眼	点鼻			
フラーレン		1							1	2	4
SWCNT	1		1						7		9
MWCNT		1	2	1					8		12
グラフェン									3	1	4
酸化チタン	2								9		11
ナノシリカ						1			9		10
プラチナ		1							2	1	4
金		1	1						5	2	9
銀		1			1	1	1	1	9	1	15
タンニン酸										1	1
酸化グラフェン									1		1
バナジウム									2		2
酸化亜鉛									2		2
金コバルト		1									1
合計	3	6	4	1	1	2	1	1	58	8	85

注)数値は、文献内の物資の数であり一部重複している。また、タンニン酸以下は、論文中に出てきた材料。

(4) 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
1	Takahashi M, Kato H, Doi Y, Hagiwara A, Hirata-Koizumi M, Ono A, Kubota R, Nishimura T, Hirose A.  The Journal of Toxicological Sciences Vol.37, No2, 353-361, 2012	Sub-acute oral toxicity study with fullerene C60 in rats. (ラットにおけるフ ラーレン C60 を用 いた亜急性経口 毒性研究)	■対象物質 フラーレン C60 直径:0.71nm 入手元:Frontier Carbon Corp. (Japan) 粒度:99.9% 保存方法:17-22°Cの 暗室で保管	■試験生物 CrI:CD(SD)ラット 週齢:4 週間 入手元: Charles River Laboratories Japan, Inc. ・保管方法: 室温 20.0-22.5 °C、湿度 48-62°C,換気は一日少 なくとも10回。 ・投与方法: 使い捨ての 注射器と胃管による経 口投与 ・投与頻度: 1 回/日 ・期間: 29 日間の投与実 施と、その後14日間の 回復期間 ・投与量: 0 (コーンオイ ル), 1, 10, 100, 1,000mg/kg/day ■試験内容 ・血液検査 EDTA-2Kによる採血 ・臓器の重量測定	・毒性による死亡や臨床兆候は、いずれの群にも見られなかつた。概観としては、1,000 mg/kg/day の濃度で、投与4日目から投与期間終了までと、回復期の0~1日目に、雄および雌において黒味がかかった糞が見られた。詳細な臨床的所見では、1 mg/kg/day の濃度で、2週間目の初日に雌における排尿の回数が有意に増加した。1,000 mg/kg/day の濃度で、3週間目の初日に雄における排便の回数が有意に減少した。しかし、これらは一貫した変化ではなかった。マニピュレーションテスト、握力、運動活動、体重および摂餌量においては、対照群に変化は見られなかった。投与期間の終了時の尿検査においては、10 および 1,000 mg/kg/day の濃度で、雄において、ケトン体の陽性発生率の上昇のみが見られた。血液検査においては、雄において、投与期間終了時に、微分リンパ球比率の減少と微分好酸球比率の増加が見られた。これらの変化は回復期の終了時には見られなかった。剖検時において、1,000 mg/kg/day の濃度を投与されたすべての動物において、投与期間の終了時に、胃および大腸に黒い内容物が見られた。これは回復期の終了時には見られなかった。その投与期間の終了時と回復期の終了時に、どの動物においても、肉眼で見られるその他の変化は見られなかった。100 mg/kg/day の濃度での、雌における相対胸腺重量における増加、および 1,000 mg/kg/day の濃度での、雄における相対腎臓重量は、投与期間終了時には見られたが、回復期の終了時には見られなかった。絶対・相対肝臓重量の増加および相対脾臓重量の増加が、回復期の終了時にのみ、雄において見られた。組織病理学的知見では、投与期間終了時に検査されたすべての臓器において、対照群には変化が見られず、回復期において検査された雄において、肝臓および脾臓における変化は見られなかった。LC-MS/MS を用いた検査では、肝臓、腎臓および脾臓のサンプルにおいて、投与期間の終了時および回復期終了時には、フラーレン C60 の内容物は、検出限界未満であった。	・結論として、29 日間のフラーレン C60 の反復強制投与試験の結果により、経口投与による毒性が比較的低いことが示されたが、しかし、組織病理学的変化は見られず、これらの臓器に吸収されたフラーレン C60 は、検出限界未満であったが、回復期後に見られた肝臓・脾臓重量の増加は、フラーレン C60 の投与に関連する可能性もある。 ・そのため、低い毒性の物質であるため、今後使用頻度が増えたことによる考えうるばく露に際して、フラーレン C60 への経口ばく露の影響を明らかにするために、より長期の試験が必要である。

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
2	Ji Dai, Chao Wang, Chii Shang, Nigel Graham, Guang-Hao Chen Chemosphere 87 (2012) 362-368	Comparison of the cytotoxic responses of Escherichia coli (E. coli) AMC 198 to different fullerene suspensions (nC <sub>60</sub> ) (異なるフラーレン懸濁液(nC <sub>60</sub> )に対する Escherichia coli (大腸菌) AMC 198 の細胞毒性反応の比較)	<p>■対象物質</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・4種類の水性 nC<sub>60</sub> 会合体</li> </ul> <p>■試料</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・C<sub>60</sub> (99.9%, MER Corp.)</li> <li>・THF (99.7%, VWR)</li> <li>・トルエン (99.7%, Mallincrodt)</li> <li>・生細胞/死細胞二重染色法キット (溶液 A、溶液 B および染色バツファ)</li> </ul> <p>入手元: Calbiochem and Nutrient Broth (NB) from Becton, Dickinson and Company)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・溶液および懸濁液の調合用の Milli-Q 浄水システムにより精製された超純水 (抵抗 &gt; 18 MΩ)</li> </ul> <p>入手元: Barnstead International</p> <p>■各種懸濁液の準備方法</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・Aqu-N<sub>2</sub>/nC<sub>60</sub> 密封した琥珀容器で 1000 mL の超純水に溶かした乾燥した 400 mg の C<sub>60</sub> (99.9%, MER Corp. 社製) 粉末を分散し、Aqu-N<sub>2</sub>/nC<sub>60</sub> 懸濁液を調合。その後酸素のない暗所で、磁石を用い 30 日にわたり攪拌。</li> <li>・Aqu-O<sub>2</sub>/nC<sub>60</sub> 窒素ガスで琥珀容器をパージせず、容器が非密封であったことを除き、上記のプロトコルに基づき、Aqu-O<sub>2</sub>/nC<sub>60</sub> 懸濁液を調合。酸素飽和環境で長時間攪拌。</li> <li>・Tol/ nC<sub>60</sub> (1) 80 mL のトルエンに 100 mg の粉末を溶かし、C<sub>60</sub> が完全に分解するまで一晩攪拌および混合。(2) 同混合物を 1001 mL までトルエンと混ぜ、a 1 g<sup>L-1</sup> を生成。(3) 同溶液を超純水に 1:10 の割合で混合し、77 mL 生成。(4) トルエンが完全に蒸発するまで同混合物を連続して超音波器で分解。</li> <li>・THF/ nC<sub>60</sub> 乾燥した 10 mg の C<sub>60</sub> 粉末を 500 mL の THF 中で溶かし、THF/nC<sub>60</sub> 懸濁液を調合。使用前に同溶液を暗闇で窒素ガスによりパージさせ、再度密封後、C<sub>60</sub> 粉末が完全に溶けるまで、室温で同溶液を暗所で攪拌 (THF での C<sub>60</sub> 溶解度は 9 mL<sup>-1</sup>)。同溶液を 0.45 μm の Whatman ナイロン膜でろ過し、未分解粒子を除去。その後同溶液に同分</li> </ul>	<p>■試験細胞</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・大腸菌 AMC 198 (ATCC#11229)</li> </ul> <p>入手元: American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA)</p> <p>■検査の手順</p> <p>大腸菌 AMC 198 の単一コロニー分離に NB 培地に植菌し、nC<sub>60</sub> 不在の環境下、37°C で一晩好氣的培養。一晩置いた培地の中の約 1 × 10<sup>7</sup> 個の細胞を、ビン/ビーカー/シャーレの中の 0.5% のグルコースを添加した 50 mL の NB に移した。各ビンには、濃度が 0、0.01、0.1 ないし 1 mgL<sup>-1</sup> の 4 種類のうちの 1 種類の nC<sub>60</sub> 懸濁液が入っている。移された大腸菌細胞を 37°C で好氣的培養し、毎分 135 ストロークで 6 時間振動を与える。その後 OD600、生細胞/死細胞二重染色法と処置済みの大腸菌のアセテート生成面における、大腸菌の増殖および代謝状況を評価。結果の再現性を確認するため、各検査を少なくとも 3 回ずつ実施した。</p>	<p>■細胞生存率・細胞毒性反応評価</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・Tol/ nC<sub>60</sub> 懸濁液の作用 Tol/ nC<sub>60</sub> 懸濁液への 1 mgL<sup>-1</sup> 以下のばく露時では、全ての濃度において対照群との差はなかった。アセテート産出においては濃度 1 mgL<sup>-1</sup> へのばく露では対照群と比べ約 50% 上昇したが、0.01 mgL<sup>-1</sup> と 0.1 mgL<sup>-1</sup> の Tol/ nC<sub>60</sub> へのばく露では、対照群と同じ傾向であった。</li> <li>・THF/ nC<sub>60</sub> 懸濁液の作用 THF/ nC<sub>60</sub> 懸濁液への 1 mgL<sup>-1</sup> のばく露の際に大幅な大腸菌増殖の抑制が見られた。濃度が 0.01 mgL<sup>-1</sup> 以下の場合には対照群と比べ類似した結果となった。これにより、THF/ nC<sub>60</sub> の細胞毒性は濃度依存であることが判明した。大腸菌のアセテート産出はばく露後 4 時間では緩やかであったが、その後 2 時間で急激に増した。</li> <li>・Aqu-N<sub>2</sub>/nC<sub>60</sub> および Aqu-O<sub>2</sub>/nC<sub>60</sub> 懸濁液の作用 Aqu-N<sub>2</sub>/ nC<sub>60</sub> と Aqu-O<sub>2</sub>/nC<sub>60</sub> の懸濁液へのばく露時では、大腸菌増殖は濃度 1 mgL<sup>-1</sup> を除いて対照群のものと同様の傾向であったが、1 mgL<sup>-1</sup> では大幅な抑制を確認した。アセテート産出においては、濃度 0.01 mgL<sup>-1</sup> の段階から対照群のものを上回り、これによりかなり低い濃度でも大腸菌の代謝に影響を与えることが確認できた。また、Aqu-O<sub>2</sub>/nC<sub>60</sub> よりも Aqu-N<sub>2</sub>/nC<sub>60</sub> の方がアセテータ産出を高めることが判明した。</li> <li>・異なる分散方法の作用 全ての懸濁液を濃度 1 mgL<sup>-1</sup> 時で試</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・大腸菌に対する 3 種類の分散媒を用いた 4 種類の典型的な分散方法のフラーレン毒性への影響を調査したが、大腸菌に対する nC<sub>60</sub> の影響は分散方法間で異なった。</li> </ul>

		<p>量の超純水を <math>250 \text{ mL}^{-1}</math> の速度で添加しながら、強く攪拌。40～70℃に段階的に温度を上昇させ、回転式蒸発器を用いて THF を蒸発させ、各調合懸濁液における <math>\text{nC}_{60}</math> 会合体の生理化学的特性を分析し、<math>0.45 \mu\text{m}</math> の薄膜濾紙での濾過後、4℃で暗所に保管。毒性試験前に、ストックの <math>\text{nC}_{60}</math> 会合体懸濁液を 30 日間以上保管。30 日後、<math>\text{nC}_{60}</math> 会合体の粒子の分布がより均一になり、平均直径が <math>150 \text{ nm}</math> に到達。毒性試験のために十分な溶媒交換試料を生成するためには少なくとも 3 回、広範な混合試料を生成するためには少なくとも 2 回、上記の手順を反復。</p>		<p>験した結果、大腸菌の増殖において THF/<math>\text{nC}_{60}</math> のみわずかな増殖が確認でき、残りの懸濁液は対照群のものと同様の結果となった。また、アセテート産出の検査においては、THF/<math>\text{nC}_{60}</math> 以外の懸濁液による検査で対照群のものを上回ったのに対し、THF/<math>\text{nC}_{60}</math> のものに関しては対照群を著しく下回った。</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
3	Mashayekhi H, Ghosh S, Du P, Xing B  Journal of Colloid and Interface Science 374 (2012), pp 111-117	Effect of natural organic matter on aggregation behavior of C60 fullerene in water (水中でC <sub>60</sub> フラ ーレンの凝集挙動 に及ぼす天然有 機物の影響)	■対象物質 C <sub>60</sub> フラーレンパウ ダー 入手元:MER Corp (USA)	■試験物質 ・タンニン酸(TA) 入手元: Fisher Scientific(USA) ・Fulvic acid(FA) 入手元: International Humic Substances Society(IHSS) ・有機土からアルカリ溶液を使 用して抽出した HA1, HA7。 ■FWS のゼータポテンシャル 測定 ■凝集体の収着研究 ZetaSizer Nano ZS 使用 (Malvern Instruments 社, USA) ■動的光散乱解析(DLS) ■試験方法 フラーレン粉末を HPLC 等級の トルエン(2 mg/mL)に溶かし、そ の 2 mL の紫色のトルエン液を 150 mL の Milli Q 水に添加し、 超音波処理発生器のプローブ を 100W(Fischer Scientific 社) で、フラーレンが水に移行し、 すべてのトルエンが蒸発するま で、数時間超音波分解した。	■NOM の FWS ゼータ電位への影響 Ca <sup>2+</sup> なしでも、いかなるタイプの NOM の添加でも、フ ラーレン粒子が増加した。pH7 では、NOM の極性官 能基のほとんどが脱プロトン化した。フラーレン凝集 体表面上の NOM 吸収は、ゼータ電位を上昇させた。 静電気効果と粒子周囲の電気二重層の厚みの減少 により、Ca <sup>2+</sup> 濃度の上昇が FWS のゼータ電位を低 下させた。 Ca <sup>2+</sup> 添加による、HA7 を持つ FWS のゼータ電位を低 下させる効果は弱めであった。いかなる濃度の Ca <sup>2+</sup> であっても、HA7 は他の検査された NOMs より若干高 く FWS を上昇させた。 TA を持つ FWS ゼータ電位の低下は、Ca <sup>2+</sup> 電荷遮蔽 により、他の NOMs より若干高めであった。 ■NOM 不存在下の FWS 凝集 カルシウムイオンは、フラーレン凝集体周囲の二重 層の範囲を効果的に狭めることができ、エネルギー 障壁を低下させ、Ca <sup>2+</sup> 1 mM という低い濃度で始まる 急速な凝集を生じさせた。フラーレン凝集速度がさら に Ca <sup>2+</sup> 濃度の上昇に反応することはなかった。 Ca <sup>2+</sup> (2 mM)の添加では、いかなるタイプの NOM とで も凝集性増強が見られたが、他のタイプの NOMs に 比べ、HA7 存在下では、フラーレンは最低の凝集度 が見られた。AFM 高さの画像でも同様に観測され た。Ca <sup>2+</sup> および TA を持つマイカの表面に、高さ 150 nm を優に超える大きい凝集体が見られた一方で、 HA7 および Ca <sup>2+</sup> を持つ高さ 20 nm 未満の最小凝集 体も見られた。	・異なる NOM 特性には、 水中のフラーレンの安 定性およびサイズに対 しては有意に、輸送お よび生物学的利用能 に対しては潜在的に影 響を与える能力があ る。 ・フラーレン凝集体の表 面への NOMs の吸着 は、表面電荷に影響を 与える能力があるが、 立体安定性が、フラ ーレン凝集体の安定性 を上昇させるための支 配的メカニズムである ように思われる。

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
4	Kong L, Zepp RG  Environmental Toxicology and Chemistry, Vol 31, No.1, pp. 136-143, 2012	Production and consumption of reactive oxygen species by fullerenes (フラーレンに よる活性酸素 種の生産と消 費)	<p>■対象物質</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・フラーレン C<sub>60</sub> 純度:99.9%</li> <li>・フラレノール 入手元:Materials and Electrochemical Research</li> </ul> <p>■フラーレンとフラレノールの水性懸濁液の調製。</p> <p>■試料・方法</p> <p>磁気攪拌器上で少なくとも4週間 C60 粉末(最大 400 mg まで)をナノ純水(最大 1L まで)に混ぜ合わせ、C60 懸濁液を調合。攪拌を停止し、その後の濾過前の 24 時間、懸濁液をそのままにした。1.5L のナノ純水を通し、C60 懸濁液の濾過前にフィルターを前洗浄。Kong らが説明する方法に従い、フラレノール懸濁液のストックを用意した。フラレノール粉末をナノ純水に添加し 24 時間混ぜ合わせた。このストックの懸濁液からのアリコート希釈剤により、フラレノール懸濁液が得られた。C60 および使用前に、0.05M の pH7.0 リン酸塩緩衝液を用いて、フラレノールの懸濁液を中性 pH へと調整した。</p>	<p>■試験内容/方法</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・水性フラーレン・フラレノールによる一重項酸素光生成測定。 水性フラーレン懸濁液と水性培地内フラレノールに単色ライト(366nm)を照射、もしくは一重項酸素スカベンジャー FFA(100 μ M)を有する状態で、太陽放射のシミュレーションによる観測。 TEM 使用</li> <li>・水性フラーレン・フラレノールと O<sub>2</sub> の反応 ローズベンガル使用</li> <li>・酸化/空気飽和懸濁液を使用した日照環境下での FFA 酸化実験。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・フルフリルアルコールは、非照射 aqu/nC60 より照射前の aqu/nC60 においてより急速に光酸化し、照射前は、aqu/nC60 による一重項酸素の光合成を増強させることを示した。</li> <li>・抽出後の照射された aqu/nC60 の水層は、照射されたフラーレン懸濁液の水層と非常に似た EEM スペクトルを示した。</li> <li>・転換増加とともに aqu/nC60 による一重項酸素生成の効率が上昇した。これは、aqu/nC60 よりも一重項酸素を発生させることができるフラレノールなどの親水性中間体の形成により生じる可能性がある。</li> <li>・aqu/nC60 とフラレノールの間の一重項酸素生成における相違点は、水中に異なる構造の凝集体を形成するという事実によりある程度説明できる。</li> <li>・aqu/nC60 凝集体は、フラレノールにより形成されるものより堅固な集合である。</li> <li>・フルフリルアルコールの光酸化は、酸素依存性であり、酸素濃度上昇とともに増加した。</li> <li>・照射時間とともに、これら全系統における FFA 損失速度が若干上昇する一方、FFA 光酸化には、フラレノール存在下では一時速度則が見られた。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・露光への感受性、酸素濃度および他の環境条件は、フラーレンの ROS の光増感および ROS 除去特性にかなり影響を与え、最終的に物理化学的・生物学的プロセスにおけるそれらの役割に影響を与える。</li> </ul>

【単層カーボンナノチューブ(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
5	Tahara Y, Nakamura M, Yang M, Zhang M, Iijima S, Yudasaka M.  Biomaterials 33 (2012), pp 2762-2769	Lysosomal membrane destabilization induced by high accumulation of single-walled carbon nanohorns in murine macrophage RAW 264.7 (マウスマクロファ ージRAW264.7に おける単層カー ボンナノホーン の高蓄積により誘 発されたリソソ ーム膜の不安定性)	<p>■対象生物 単層カーボンナノホーン (SWNH) 直径:2-5nm 長さ:40-50nm</p> <p>約 2,000 個のカーボンナ ノホーンでできた球状凝集体 直径:80-100nm</p> <p>■製法: 金属触媒無しの黒 鉛の CO<sub>2</sub>レーザーアプレ ーションにより処理。時間を かけて燃焼させ、酸化させ る。酸化させたナノホーン (oxSWNHs, 10mg)を 1mL の水か PBS で混ぜること により、1,2-distearoyl -sn-glycero -3-phosphoethanolamine (DPEG:2.5mg; Avanti) で表面被膜する。</p>	<p>■試験細胞 RAW264.7 マクロファージ 入手元: ECACC</p> <p>■細胞培養方法 37°Cで5%のCO<sub>2</sub>環境で、 ストレプトマイシン/ペニ シリンと 10%の FCS を含 んだ RPMI 培地で培養。</p> <p>■試験内容 ・細胞毒性評価 Bradford 解析と G6PD 解析により測定。 ・リソソーム膜の不安定 性・ROS 検出 共焦点顕微鏡により検 査 ・炎症性サイトカインの検 出 IL-1β、TNF-α、IL-6 を ELISA で測定。</p>	<p>■ブラッドフォード法回析 ・単層カーボンナノホーン(SWNHs)で処置した RAW 264.7 細胞は、ナノホーン濃度が上昇すると、生細胞由来のタンパク質量が有意に減少し、SWNHs が細胞成長の阻害や細胞死を引き起こしていた可能性を示唆した。細胞死に起因したかどうかを確認するため、死細胞から細胞質性細胞 G6PD の培地への放出量を定量化したところ、SWNH の濃度上昇は有意に増加した G6PD の放出量と並行した。</p> <p>・FITC-デキストランがあらかじめ組み込まれている RAW 264.7 細胞を SWNHs で培養すると、蛍光シグナルの細胞の内部全体への拡散とともに輝点の数が減少したことから、リソソーム膜が損傷したため、FITC-デキストランを細胞質へと放出させたことが示された。</p> <p>・リソソーム膜の不安定性が ROS により促進されることはよくあるため、SWNH で処理された細胞を染色することにより、ROS の指示薬であるジヒドロエチジウム(DHE)を用いて、ROS 生成を検査した。</p> <p>・共焦点顕微鏡法により、SWNH 取り込みの上昇とともに上昇した ROS 上方調節が見られたため、ROS は、リソソーム膜の不安定化を引き起こす要因のひとつである可能性がある。</p> <p>■炎症性サイトカイン放出 RAW 264.7 細胞が死亡する間に起きる炎症性サイトカインの放出を ELISA で評価した。リポ多糖により、培地における TNF-α、IL-1β および IL-6 の量が増加する一方で、SWNHs に対してはほとんど影響を与えなかった。さらに、各サイトカインのうち少量しか SWNHs 上に吸収されなかったため、SWNH で処理された RAW 264.7 細胞は、全サイトカイン量を分泌することなく、SWNHs の高取り込みにより分泌物も有意に上昇しなかった。</p>	<p>・マクロファージ細胞ライン RAW 264.7 における SWNHs への細胞性反応を調査した。</p> <p>・SWNHs の細胞毒性では、TNF-α や IL-6 などの炎症性サイトカインの顕著な放出は見られなかった代わりに、マクロファージの連続的なシーケンスが示された。</p> <p>・リポソームにおける SWNHs の蓄積が ROS 生成を誘発するため、リポソーム膜の不安定性がアポトーシスおよび壊死に起因する。</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
6	Yuan J, Gao H, Sui J, Duan H, Chen WN, Ching CB  Toxicological Sciences 126(1) 2012, pp 149-161	Cytotoxicity evaluation of oxidized single-walled carbon nanotubes and graphene oxide on human hepatoma HepG2 cells: an iTRAQ-coupled 2D LC-MS/MS proteome analysis (酸化単層カーボ ンナノチューブお よび酸化グラフェ ンがヒト肝癌 HepG2 細胞に及 ぼす細胞毒性の 評価:iTRAQ 結 合 2D LC-MS/MS プロ テオーム解析)	<p>■対象物質</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・SWCNT 入手元:Unidym (USA) 直径:0.8-1.2nm 酸化 SWCNT⇒ SWCNT を硫酸と 窒素酸の混合物を 還流して製造。</li> <li>・酸化グラフェン(GO) グラファイトパウダ ーを合成。</li> </ul> <p>酸化 SWCNT と GO を 培養培地を加える前 に一時間の超音波 分解。 水溶性の酸化 SWCNT と GO を 10%FBS で補填した DMEM 内で 1 μg/ml に薄め、よくかき混ぜ る。</p>	<p>■試験細胞</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ヒト肝癌細胞(HepG2) 入手先:ATCC DMEM 内で培養し、CO<sub>2</sub> 5%、室温 37°Cの環境で 保管。</li> <li>■細胞溶解、タンパク消 化、標識化 iTRAQ 試薬で解析</li> <li>■タンパク質発現プロファ イルの変化研究 iTRAQ 結 合 2D LC-MS/MS プロテオーム 解析</li> <li>■細胞増殖分析、細胞内 ROS 測定 MTT 解析、蛍光プローブ DFDA 使用。</li> <li>■アポトーシス検出 Annexin V-fluorescein isothiocyanate(FITC)アポ トーシス検出解析使用。</li> <li>■細胞周期測定 フローサイトメトリー分析</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・全体としては、300 を超えるタンパク質類を、3つの 独立した試験からの各タンパク質と同定した。自動 検証の検索条件により得られたこれらのタンパク 質類の中で、有意に変化(&gt;0.1.2-ないし&lt;0.8 倍)し たタンパク質類を、それらの細胞機能に従い、明 確な部類に分類した。これらには、細胞の酸化還 元調節に関与した 5 つのタンパク質、細胞骨格形 成およびカルシウムに関連するシグナル経路に関 与した 7 つのタンパク質、10 の代謝酵素類および 8 つの増殖関連のタンパク質が含まれた。</li> <li>・他の酸化 SWCNTs ないし GO への 48 時間のばく 露後、対照群と比べると、ナノ物質で処理した両方 の細胞の活性に減少が見られた。</li> <li>・酸化 SWCNTs および GO への 12 時間のばく露後、 DFDA を細胞培養に添加し、暗所で 1 時間の DFDA での培養後、細胞により生成されたフルオレ セインを測定した。その結果、対照群に比べ、生成 されたフルオレセインの細胞に対する蛍光強度 が、約 1.14 倍高かった。しかし、GO で処理された 細胞に対する蛍光強度は、対照群の細胞を 8%し か上回っていなかった。これらのデータから、酸化 SWCNTs は、GO と比較すると、ヒト HepG2 細胞に おける ROS 濃度をより高め、タンパク質のプロフ イルから示されるように、これらの細胞中では、 GO より重度の酸化ストレスであることを示す。 酸化 SWCNTs で処理したバッチに対して、アポトー シスを受けている細胞の割合における有意な増加 が見られた。比較すると、GO で処理された対照群 では、アポトーシス細胞における有意な増加は見 られなかった。</li> <li>細胞周期分析により、酸化 SWCNTs で処理したヒ ト HepG2 細胞は、G2/M フェーズにおける細胞の 割合を有意に増加させることを示した。</li> </ul>	<p>ナノ物質に反応した HepG2 細胞の機能の研究への、iTRAQ 結合 2D LC-MS/MS プロテオ ーム分析の応用の効果が示さ れた。プロテオーム・レベルで 細胞機能の詳しい調査により、 GO で処理された細胞と SWCNTs で処理された細胞間 の酸化細胞反応の特徴的パ ターンが識別された。これは、 これらのナノ物質に関する生 物系に対する異なる作用機序 を示した。さらなる機能分析に より、酸化 SWCNTs が ROS 濃 度上昇、細胞代謝活性低下お よび細胞周期摂動を誘発し、 アポトーシス細胞の割合を有 意に増加につながることが確 認された。</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
7	Ge C, Meng L, Xu L, Bai R, Du J, Zhang L, Li Y, Chang Y, Zhao Y, Chen C  Nanotoxicology, 2012; 6(5): pp 526-542	Acute pulmonary and moderate cardiovascular responses of spontaneously hypertensive (SH) rats after exposure to single-wall carbon nanotubes (単層カーボンナ ノチューブをばく 露した本態性高 血圧ラットの急性 肺、心臓血管系 反応)	<p>■対象物質 単層カーボンナ ノチューブ 直径:0.7-1.5nm 長さ:&gt;1<math>\mu</math>m 入手元:Shenzhen Nanotechnologies Co., Ltd (China)</p> <p>0.5%の F108 を含ん だ食塩水に分散単 層カーボンナノチ ューブ粉体を 30 分間 超音波分解し、 1.5mg/mL の単層カ ーボンナノチューブ 懸濁液を調合。</p>	<p>■雄 SH ラット 入手元:Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd 週齢:11-12 週 体重:220-250g ■投与方法 2 種類の食塩水によ って懸濁した単層カ ーボンナノチューブ (0.6mg/ラット)を気管 内注入。 ■投与期間 2 日間(1 回/日) ■試験方法 炎症・毒性・サイトカ イン・酸化ストレス検 査。 BALF 解析、組織病 理学検査(HE 染色 使用)、TEM 検査</p>	<p>■BALF 分析 [炎症] ・非外科的気管内注入による SWCNTs への肺のばく露により、BALF におけるいくつかの炎症マーカーが増加。 [毒性] ・BALF における LDH、アルブミンおよび総タンパク質測定の結果、CNT へのばく露により、細胞毒性増大および損傷細胞の完全性が生じた。 [サイトカインおよび酸化ストレス] ・点滴による SWCNTs へのばく露は、BALF における炎症誘発サイトカインの濃度を上昇させた。CNT へのばく露は、肺循環において内皮機能不全を誘発した(p&lt;0.05)。 ■組織病理学的試験 [肺] 24 時間のばく露後、肺胞においてかなりの数の SWCNTs が悪化し、炎症細胞数とともに肉芽腫が形成された。PMNs、マクロファージ、炎症細胞、リンパ球を含む炎症細胞が肺胞に浸透しているのが見られ、72 時間後に、これらの現象は徐々に強まった。 [心臓] ばく露 72 時間後には、24 時間後より心臓障害がより顕著であり、鉄が乏しい SWCNTs より鉄が豊富な SWCNTs に著しく見られた。 ■透過電子顕微鏡法 [肺] SWCNTs へのばく露後の、肺組織における急性病変は、BALF における炎症細胞の総数増加と一致する。 [心臓] SWCNTs へのばく露群においては、毛細血管鬱血と組織が希薄で上皮細胞の空胞変性が見られるスポンジ状の外観が認められたが、これは、血管原生浮腫と増加した血栓および漏出性出血の見られる疎性間質の存在を示した。</p>	<p>・SH ラットにおける 2 種類の気管内注入による SWCNTs へのばく露は、肺組織における局所性炎症反応および酸化ストレス、動脈血管再生、血管周囲筋細胞変性および末梢血管病変を誘発する可能性がある。 ・これらの結果は、SH ラットの SWCNTs へのばく露は、心臓血管系の病変を誘発する可能性があることを示し、個々の既存の心臓血管系疾患が、SWCNT の刺激を受けやすいことを示唆する。</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
8	Morimoto Y, Hirohashi M, Kobayashi N, Ogami A, Horie M, Oyabu T, Myojo T, Hashiba M, Mizuguchi Y, Kambara T, Lee BW, Kuroda E, Shimada M, Wang WN, Mizuno K, Yamamoto K, Fujita K, Nakanishi J, Tanaka I  Nanotoxicology, 2012; 6 (7): pp 766-775	Pulmonary toxicity of well-dispersed single-wall carbon nanotubes after Inhalation (分散処理をした 単層カーボンナ ノチューブの吸 入後の肺毒性)	■単層カーボン ナノチューブ (SWCNT) サイズ: 3.0± 1.1nm  SWCNTs 1% Tween 80 溶液 を洗浄器(40 kHz, 240W)を使用し 9 時間分散。分散 培地内の Tween 80 濃度を下げる ために、分散した SWCNT の線維細 胞を薄膜フィルタ ー上に取り出し、 蒸留水の中で再 度分散。	■試験生物 雄 Wistar ラット 週齢: 8 週 入手元: Kyudo Co., Ltd. (Japan) ■ばく露方法: SWCNT 懸濁液を加圧噴射器と微粉末噴霧 乾燥器を使用し、室内ばく露。 試験ラットを 3 つのグループ(低 SWCNT 濃度、高 SWCNT 濃 度、Tween 80)に分け(各 10 匹)、6h/日、5 日/週、計 4 週 間、エアロゾルを吸入。 ■試験方法(吸入ばく露試験後の動物) 肺組織を T-PER 組織タンパク質抽出試料で均質化し、遠心 分離機にかけた(1500×g で 10 分間)。基準としてウシの血 清アルブミンを用いて、BCA タンパク質アッセイキット(米国 イリノイ州ロックフォード、PIERCE 社製)で上清のタンパク質 濃度を測定した。総タンパク濃度をサイトカイン誘発性好中 球化学誘引物質-1(CINC-1)および CINC-2 に対しては 500 μg/mL、CINC-3 に対しては 4000 μg/mL、ヘムオキシゲナ ーゼに対しては 2000 μg/mL の最終濃度に調節した。 Quantikine ラット CINC-1、CINC-2、CINC-3(米国ミネソタ州 ミネアポリス、R&D Systems 社)(Cat. #RCN100、#RCN200、 #RCN300)と HO-1 ELISA キット(米国ミシガン州アナーバ ー、Stressgen Bioreagents 社製)を用いて、肺組織における ケモカインと HO-1 濃度を測定した。気管支肺胞洗浄細胞 (BALF)の上清におけるケモカインならびに HO-1 濃度を測 定した。	■肺における CINC <sub>s</sub> 濃度 ・観察期間では、SWCNT ばく露群と Tween ばく露群の 間の肺細胞の、CINC <sub>s</sub> 濃度 における差異は見られなかつた。CINC-1 の濃度では、 SWCNT ばく露群の肺組織 の CINC-2 の濃度は、有意 に上昇しなかつた。観察期 間を通して、3 つの群の間 で肺組織の CINC-3 濃度 における有意差は見られなかつた。 ■肺の HO-1 濃度および BALF ・観察期間では、SWCNT の どちらの濃度においても、 HO-1 濃度には有意な上昇 は見られなかつた。SWCNT ばく露群における BALF の HO-1 濃度に一時的な低下 が見られたこともあったが、 観察期間では、HO-2 の濃 度において一貫した変化は 見られなかつた。	・SWCNT <sub>s</sub> 濃度の高低 にかかわらず、主に 好中球の炎症を誘発 したり、肺における CINC <sub>s</sub> や HO-1 の濃 度に影響を与えるこ とはなかつた。 ・十分に分散した SWCNT <sub>s</sub> でも、本研 究の状況下では、肺に おける好中球の炎症 を誘発することはな かつた。

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
9	Manshian BB, Jenkins GJ, Williams PM, Wright C, Barron AR, Brown AP, Hondow N, Dunstan PR, Rickman R, Brady K, Doak SH  Nanotoxicology 2013; 7(2):144-156	Single-walled carbon nanotubes: differential genotoxic potential associated with physico-chemical properties (単層カーボンナ ノチューブ: 物理 化学特性と関連 する異なる遺伝 毒性)	■単層カーボンナ ノチューブ 直径: 1-2nm 長さ(浄化済): 400-800nm 純度: 99% 長さ(未浄化): 1-3 μ m 純度: 97% 入手元: Prof. A. Barron (Rice university, USA) ・大きめの長さ(浄化 済)の SWCNT サンプ ル(5-30 μ m)を <a href="http://www.cheaptu&lt;br/&gt;besinc.com">http://www.cheaptu besinc.com</a> から購 入。 純度: 99%  上記のサンプルを血 清を含んだ細胞培養 培地で懸濁。	■試験細胞 ・BEAS-2B 細胞 10%FCS で補填した DMEM 内で培養 ・MCL-5 細胞 10%ウマ血清、1% L-グルタ チオン、200 μ g/ml ハイグ ロマイシン B で補填した RPMI1640 内で培養。  ■試験方法 ・細胞毒性・細胞生存率分 析 サイトカラシブロック小核 アッセイ法(CBMN 法) ・染色体損傷における SWCNT の長さを与える影 響評価 小核アッセイ法 ・HPRT 突然変異頻度観 察、細胞内 ROS レベル測 定 HPRT 突然変異試験、酸化 ストレス分析	■細胞毒性試験 ・3つの SWCNT サンプルを用いて評価した全濃度におい て、24 時間ないし 48 時間のばく露後、BEAS-2B 細胞に おいて細胞毒性の有意な増加は見られなかった。 ■小核アッセイ: SWCNT の長さの染色体損傷影響 ・これらの試験からの遺伝毒性試験では、最小濃度(1、5 および 10 μ g/mL)において、1~3 および 5~30 μ m の SWCNT サンプルでは、小核レベルにおける有意な上昇 は見られなかった。一方、400~800 nm のサンプルで は、検査した用量(≥1 μ g/mL)において、小核発現頻 度における有意な増加が見られた。すべてのケースに おいて、小核発現頻度は、≥20 μ g/mL で安定レベル に到達したため、これらのサンプルにより誘発された著 しい染色体損傷の力価は、長さ 400-800 nm>5-30 μ m ≥1-3 μ m のナノチューブであった。 ■hprt 突然変異発現頻度 ・評価された用量範囲では、長さ 400~800 nm および 5 ~30 μ m の SWCNT サンプルは、MCL-5 細胞内で点突 然変異の頻度における有意な上昇を誘発することはな かった。それとは著しく対照的に、1~3 μ m のサンプル において、対照群と比べ、25、50 および 100 μ g/mL(p<0.01)の 3 つの最大用量において、用量依存的 な突然変異の有意な増加が見られ、アルキル化剤 N- エチル-ニトロソウレア(4 μ g/mLにて ENU、英国 Sigma-Aldrich Ltd.社製)およびクロシドライト石綿の陽 性対照群の突然変異率を上回った。 ■酸化ストレス評価 ・BEAS-2B 細胞の 1~3 μ m の SWCNT サンプルへのばく 露により、ROS 生成における時間・用量依存的な増加 が見られたが、有意性は ≥2 μ g/mL においてのみ見ら れた(p<0.05)。400~800 nm の SWCNT サンプルは、最 大 20 μ g/mL まで ROS 増加を誘発したが、その後のよ り高濃度においては、検出された ROS には、未処理の 対照群との差はなかった。それと対照的に、5~30 μ m の SWCNT は、無細胞系と細胞内系双方において、ほ ぼ ROS を誘発することがなかった。MCL-5 細胞におけ る試験で、同様の ROS プロフィールが見られたが、ROS 誘発程度は、全体的により低いレベルであった。	・SWCNT は、垂細胞毒 性濃度において染色 体損傷を有意なレ ベルで誘発し、その 力価は、長さ 400-800 ng>539-30 μ m ≥ 1-3 μ m の SWCNT サンプ ルであった。

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
10	Sargent LM, Hubbs AF, Young SH, Kashon ML, Dinu CZ, Salisbury JL, Benkovic SA, Lowry DT, Murray AR, Kisin ER, Siegrist KJ, Battelli L, Mastovich J, Sturgeon JL, Bunker KL, Shvedova AA, Reynolds SH  Mutation Research 745 (2012), pp 28-37	Single-walled carbon nanotube-induced mitotic disruption (単層カーボンナノチューブにより誘発する有糸分裂異常)	<p>■単層カーボンナノチューブ 入手元: CNI Inc. (USA) 直径: 1-4nm 長さ: 0.5-1 μm 純度元素炭素 99%、鉄 0.23%</p> <p>SWCNT を培地内で懸濁し、氷上で 5 分間超音波分解。 五酸化バナジウムを同様に懸濁し 30 分間氷上で超音波分解。</p> <p>実験投与量(μg/cm<sup>2</sup>): SWCNT: 0, 0.024, 0.24, 2.4, 24 バナジウム(μg/cm<sup>2</sup>): 0.31</p>	<p>■試験細胞 不死化した(BEAS-2B)/初期のヒト(SAEC)呼吸器官上皮細胞群 BEAS-2B 入手元: ATCC 培養方法: 10%FBS で補填した DMEM 内で培養 SAEC 入手元: Lonza</p> <p>■試験方法 ・有糸分裂紡錘体、染色体形態分析 LSM、TEM 使用 ・染色体数測定 FISH 法 ヒト染色体 1 番、4 番使用 ・細胞生存率・アポトーシス測定 アラマーブルーバイオ解析 TUNEL 解析</p>	<p>■SWCNT 有糸分裂破壊 ・SWCNT での処理により、有糸分裂破壊の頻度に用量依存的上昇が見られた。BEAS-2B 細胞株の異常な有糸分裂のうちの 95%が多極性で、単極性はわずか 5%であった。有糸分裂紡錘体の破壊のパターンは、五酸化バナジウムで処理した細胞で見られるパターンと同様であった。</p> <p>■染色体数 ・フィッシュ法では、染色体 1 番ないし 4 番が減少もしくは過剰で、一次性呼吸性細胞において、1.0±1.0%の異数性が見られた。 対照的に、SWCNT で処理された SAEC には、五酸化バナジウムで処理した陽性対照群の細胞において見られる作用と同程度の高レベルの異数性があった。 ・SWCNT の最小用量では、認められた異数性の半数あまりが、染色体 1 番ないし 4 番の過剰によるものであったが、合計 35%の異数性細胞のうちわずか 8%にしか、双方の染色体の過剰が見られず、異数性細胞の 16%は染色体 1 番ないし 4 番の欠損によるものであったため、異数性を倍数性で説明することができなかった。</p> <p>■生存能力およびクローン性増殖 ・処理 24 時間後に、五酸化バナジウムの陽性対照群の生存能力が低下した。SWCNT にばく露された細胞の有糸分裂破壊率は、五酸化バナジウムにばく露された細胞と同程度の高さであったが、SWCNT での処理 24 時間後に、一次 SAEC もしくは BEAS-2B 細胞における生存能力が有意に低下した。0.24、2.4 ないし 24 μg/cm<sup>3</sup> の SWCNT での処理 72 時間後に、一次 SAEC が有意に低下した。0.31 μg/cm<sup>3</sup> 五酸化バナジウムへのばく露の 72 時間後に、BEAS-2B 細胞および SAEC において生存能力の低下が見られた。SWCNT も五酸化バナジウムも検出可能なアポトーシスとはならなかったため、低下した生存能力は、アポトーシス経路の誘発によるものではなかった。ばく露の 7 日後、高用量の SWCNT にはコロニー数の低下が見られたが、低用量ばく露は、コロニー形成が増加していた。</p>	<p>・職業的に関連する用量で、SWCNT による有糸分裂紡錘体の有意な破壊が見られた。 ・カーボンナノチューブにばく露された細胞において見られた細胞増殖は、娘細胞への遺伝子損傷を通過する潜在能力がより大きい。 ・中心体の破壊は、肺がんを含む多くの固形腫瘍において共通する。</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																																																																		
11	Pasquini LM, Hashmi SM, Sommer TJ, Elimelech M, Zimmerman JB  Environmental Science & Technology 46 (11): 6297-6305	Impact of surface functionalization on bacterial cytotoxicity of single-walled carbon nanotubes (単層カーボン ナノチューブの 細胞毒性細菌 における表面機 能化の影響)	<p>■対象物質 単層カーボンナノチューブ(SWCNT) 入手元: Nanostructured &amp; Amorphous Materials Inc., (USA) サイズ: 0.4-1.1nm</p> <p>実験用に9種の機能化したfSWCNTを用意。</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>サンプル</th> <th>%C</th> <th>%N</th> <th>%O</th> <th>%S</th> <th>% function- alization</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>純粋 SWCNT</td> <td>95.9</td> <td></td> <td>4.1</td> <td>&lt;4.1</td> <td></td> </tr> <tr> <td>n-propylamine</td> <td>95.2</td> <td>0.6</td> <td>3.3</td> <td></td> <td>0.6</td> </tr> <tr> <td>phenylhydrazine</td> <td>95.7</td> <td>0.8</td> <td>3.4</td> <td></td> <td>0.4</td> </tr> <tr> <td>hydroxy</td> <td>84.8</td> <td></td> <td>11.6</td> <td></td> <td>13.7</td> </tr> <tr> <td>phenyldicarboxy</td> <td>77.8</td> <td>1.92</td> <td>19.9</td> <td>0.3</td> <td>8.6</td> </tr> <tr> <td>phenyl</td> <td>96.6</td> <td></td> <td>3.45</td> <td></td> <td>N/A</td> </tr> <tr> <td>sulfonic acid</td> <td>78.1</td> <td></td> <td>18.4</td> <td>3.45</td> <td>6</td> </tr> <tr> <td>n-butyl</td> <td>97</td> <td></td> <td>2.99</td> <td></td> <td>N/A</td> </tr> <tr> <td>diphenylcy- clopropane</td> <td>95.9</td> <td>0.53</td> <td>3.4</td> <td></td> <td>N/A</td> </tr> <tr> <td>hydrazine</td> <td>95.9</td> <td>0.4</td> <td>3.7</td> <td></td> <td>0.2</td> </tr> </tbody> </table>	サンプル	%C	%N	%O	%S	% function- alization	純粋 SWCNT	95.9		4.1	<4.1		n-propylamine	95.2	0.6	3.3		0.6	phenylhydrazine	95.7	0.8	3.4		0.4	hydroxy	84.8		11.6		13.7	phenyldicarboxy	77.8	1.92	19.9	0.3	8.6	phenyl	96.6		3.45		N/A	sulfonic acid	78.1		18.4	3.45	6	n-butyl	97		2.99		N/A	diphenylcy- clopropane	95.9	0.53	3.4		N/A	hydrazine	95.9	0.4	3.7		0.2	<p>■試験物質 大腸菌 K12 (MG1655)</p> <p>■試験内容/方法 ・機能化した SWCNTsの細菌 細胞毒性検査。 2標本t検定 ・機能化した SWCNTの細胞毒 性と物理化学特 性との関連性検 査</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>本研究で検査した9種類のfSWCNTsのうち3種類(n-ブチル、ジフェニルシクロプロパン、ヒドラジン)に、出発物質に比べ、統計的有意な細胞生存率低下の減少が見られた。残る6種類のうち1種類(スルホン酸)に、ほぼ同等の細胞生存率低下が見られ、出発物質に比べ、5種類に統計的有意な細胞生存率低下の増加が見られた。</li> <li>細菌の細胞毒性は、直接的ないし間接的にSWCNTの表面機能性による影響を受ける。</li> <li>回帰分析結果の取りまとめでは、細菌の細胞毒性と、機能性SWCNTsの生理化学的特性、構造的特性あるいは熱的特性間に、相関性がないことを示している。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>フラクタル次元 Df と凝集体サイズ分布の双方により定量化される分散度により、間接的影響が生じる。</li> <li>表面機能性と細胞毒性は、凝集体の形態および分散度を通じて、間接的に関係している。</li> </ul>
サンプル	%C	%N	%O	%S	% function- alization																																																																			
純粋 SWCNT	95.9		4.1	<4.1																																																																				
n-propylamine	95.2	0.6	3.3		0.6																																																																			
phenylhydrazine	95.7	0.8	3.4		0.4																																																																			
hydroxy	84.8		11.6		13.7																																																																			
phenyldicarboxy	77.8	1.92	19.9	0.3	8.6																																																																			
phenyl	96.6		3.45		N/A																																																																			
sulfonic acid	78.1		18.4	3.45	6																																																																			
n-butyl	97		2.99		N/A																																																																			
diphenylcy- clopropane	95.9	0.53	3.4		N/A																																																																			
hydrazine	95.9	0.4	3.7		0.2																																																																			

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	Wang J, Sun P, Bao Y, Dou B, Song D, Li Y  Toxicology in Vitro 26 (2012), pp 32-41	Vitamin E renders protection to PC12 cells against oxidative damage and apoptosis induced by single-walled carbon nanotubes ビタミン E は、 PC12 細胞を単 層カーボンナ ノチューブ誘発性 の酸化損傷とア ポトーシスから 保護する	<p>■対象物質</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・SWCNTs</li> <li>入手元: Beijing Nachen Technology &amp; Development Co. Ltd. (China)</li> <li>サイズ: 1-2nm</li> <li>長さ: &lt;20 μm</li> <li>・ビタミン E</li> <li>入手元: Sigma (USA)</li> </ul> <p>SWCNTs を DMEM 細胞培養培地で分散。凝集を減らすために懸濁液をボルテックスを使用し 20 秒間かき混ぜ、その後 20 秒間超音波分解。</p>	<p>■試験細胞</p> <p>ラット PC12 細胞 (副腎:褐色細胞腫)</p> <p>入手元: Institute of Biochemistry and Cell Biology (China)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・5%CO<sub>2</sub>、室温 37°Cの環境で、10%FBS、100 μg/ml ペニシリン、100 μg/ml ストレプトマイシンで補填した DMEM 内で培養。</li> </ul> <p>■ばく露濃度</p> <p>50 μg/ml SWCNTs</p> <p>■試験内容/方法</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・細胞生存率分析</li> <li>MTT 解析、LDH 解析</li> <li>・細胞自然死と壊死の分析</li> <li>フローサイトメトリー法</li> <li>・ROS と MDA 測定</li> <li>DCFH-DA 使用</li> <li>・SOD, CAT, GSH-Px 活性と GSH の測定</li> <li>・ミトコンドリア膜電位測定</li> <li>Rh123 使用</li> <li>・カスパーゼ 3 の活性測定</li> <li>・Bcl-2 と Bax タンパク質分析</li> </ul>	<p>■3.5 ミトコンドリアの膜電位への VE の影響</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・PC12 細胞の SWCNTs 誘発性のアポトーシスにおいて、ミトコンドリアの膜電位の崩壊が見られ、SWCNTs への 24 時間のばく露で 32.49±0.19%に、48 時間のばく露で 29.78±0.27%に、MMP が低下した。</li> </ul> <p>■SWCNTs 誘発の PC12 細胞におけるカプターゼ-3 活性に対する VE の影響</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・カプターゼ-3 の活性により、SWCNT により処理された PC12 細胞における減少が見られた。VE での前処理により、PC12 細胞には、非処理群と比べ、カプターゼ-3 の活性における有意な減少が見られた。</li> </ul> <p>■Bcl および Bax タンパク質発現への VE の影響</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・PC12 細胞の 50 μg/mL の SWCNTs での 48 時間の処理後、対照群の細胞に比べ、Bcl タンパク質発現量が、89.8~68.8%に減少し、Bax タンパク質発現量は、4.2~12.3%に増加した。細胞を VE で前処理した際、SWCNT 誘発性の PC12 細胞における Bcl-2 と Bax の発現量が逆転した。Bcl-2 タンパク質発現量が 78.9%に増加し、タンパク質発現量が 7.3%に減少。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・VE は、0.05~2mM の範囲で、用量依存的に、SWCNTs 誘発性の PC12 細胞障害を防げる可能性がある。</li> <li>・VE は、抗酸化作用を介した SWCNTs 誘発性アポトーシスから PC12 細胞を防御する可能性があり、内因性抗酸化物質を促進し、ROS 生成とミトコンドリア介在アポトーシスの発生を減少させ、カプターゼ-3 の活性化、Bcl-2 の下方調節、Bax の上方調節を阻害する。</li> <li>・これらに基づくと、VE は SWCNTs 誘発性の神経毒性から PC12 細胞を保護し、SWCNTs 損傷への神経保護的効果を示唆している。</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																																				
13	Fröhlich E, Meindl C, Höfler A, Leitinger G, Roblegg E  Nanotoxicology, 2012; Early Online, pp 1-14	Combination of small size and carboxyl functionalization causes cytotoxicity of short carbon nanotubes (小さなサイズとカルボキシル機能化の組み合わせは短いカーボンナノチューブの細胞毒性を引き起こす)	<p>■対象物質 カーボンナノチューブ(SCNT(COOH-の有/無), MCNT) 入手元: CheapTubes Inc (USA) SCNT を CCVD で合成し、希硝酸で精製。空気酸化により機能化。 MCNT は還元を繰り返し、KMnO<sub>4</sub> 内で抽出することにより機能化。 ・SCNT 純度: &gt;90% ・MCNT 純度: &gt;95%</p> <p>10%FBS を含んだ DMEM 内で懸濁した CNTs の特性 (DLS/LDV, TEM により解析)</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>CNT</th> <th>直径 (nm)</th> <th>長さ (nm)</th> <th>ζ (mV)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>SCNT</td> <td>~2</td> <td>n.d.</td> <td>-9.72</td> </tr> <tr> <td>SCNTc</td> <td>~2</td> <td>n.d.</td> <td>-8.1</td> </tr> <tr> <td>MCNT8</td> <td>4.7±0.48</td> <td>222±126.2</td> <td>-6.96</td> </tr> <tr> <td>MCNT8c</td> <td>4.2±0.8</td> <td>217±117.9</td> <td>-9.64</td> </tr> <tr> <td>MCNT20</td> <td>18.9±0.9</td> <td>446±77.9</td> <td>-9.78</td> </tr> <tr> <td>MCNT20c</td> <td>15.3±2.5</td> <td>251±94.4</td> <td>-10.3</td> </tr> <tr> <td>MCNT50</td> <td>62.8±5.7</td> <td>355±96.4</td> <td>-7.28</td> </tr> <tr> <td>MCNT50c</td> <td>63.6±11.3</td> <td>392±195.3</td> <td>-11</td> </tr> </tbody> </table>	CNT	直径 (nm)	長さ (nm)	ζ (mV)	SCNT	~2	n.d.	-9.72	SCNTc	~2	n.d.	-8.1	MCNT8	4.7±0.48	222±126.2	-6.96	MCNT8c	4.2±0.8	217±117.9	-9.64	MCNT20	18.9±0.9	446±77.9	-9.78	MCNT20c	15.3±2.5	251±94.4	-10.3	MCNT50	62.8±5.7	355±96.4	-7.28	MCNT50c	63.6±11.3	392±195.3	-11	<p>■試験細胞 ・EAhy926 入手元: Dr. C. J. Edgell ・A549 ・HepG2 ・DMBM-2 ・V79 入手元: Deutsche Sammlung fur Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Germany) ・TK-6 cells 入手元: Cell lines service (Germany) ・TK-6 cells を除き、上記は全て粘着性のある細胞である。 ■ばく露濃度・期間 細胞を CNT に濃度 0-500 μg/ml で、4 or 24h ばく露。 ・Positive control 用に 10%FBS を含んだ DMEM 内で懸濁し、濃度 400 μg/ml(4h)、200 μg/ml(24h)をばく露したポリスチレン粒子(20nm)を使用。 ・Negative control 用に 200nm のポリスチレン粒子(ばく露濃度 500 μg/ml)を使用。 ■試験内容/方法 細胞毒性スクリーニング ・EAhy926 細胞における 100 μg/ml CNTs ばく露後の毒性比較。 ATPase, DNA, Protein</p>	<p>■細胞毒性スクリーニング ・DNA 含有量の化学発光検出および蛍光検出による ATP 定量化では、4 時間のばく露および 24 時間のばく露後に、全 CNTs に対して同様のデータを示し、異なる CNTs 間の区別がつかなかった。 ・LDH 放出の蛍光検出ならびにスルホローダミン B 染色法による総タンパク質の検出により、SCNTs が最も細胞毒性の強い CNTs であることを確認した。しかし、どちらのアッセイも、CNTs 間のほんの些細な違いしか示さず、数種類の CNTs に関しては、蛍光データは MTS アッセイのデータと矛盾していた。 ■異なる細胞株における細胞毒性スクリーニング ・50 μg/mL の濃度の CNT は、ばく露 4 時間時点でも 24 時間時点でも、生存率における有意な低下は見られなかった。より高濃度における生存率の低下は、EAhy926 細胞において最も顕著であった。 ・カルボキシル化 CNTs は、24 回中 14 回の培養で生存率が有意に低下し、未加工 CNTs は 24 回中 11 回で見られた。500 μg/mL では、TK-6 細胞中の MCNT20s および MCNT50 を除く全 CNTs に関して、有意な生存率低下が見られた。 ■酸化ストレスの役割 ・毒性のない濃度 (25 μg/mL) の CNTs は、GSH が高含有量の細胞 (A549 および HepG2 細胞) における GSH 含有量に対しては、ごくわずかな影響しか与えなかった。 ・HepG2 細胞における SCNTc、MCNT20c、MCNT50c に関して、ま</p>	<p>・この大規模な比較試験においては、薄壁 CNTs は厚壁 CNTs より強い細胞毒性を発揮した。 ・CNTs のカルボキシル化は、自らの細胞毒性を強めたが、これは他の官能基による遮蔽が優位であることを示す。 ・細胞内 GSH 濃度が高濃度であっても、外因性抗酸化物質を添加しても、口径が小さいカルボニル官能基化 CNT による細胞毒性を防止することはなかったが、これは、これらの粒子が ROS 依存性細胞膜損傷ないし膜受容体シグナル伝達経路により作用することを示す。</p>
CNT	直径 (nm)	長さ (nm)	ζ (mV)																																							
SCNT	~2	n.d.	-9.72																																							
SCNTc	~2	n.d.	-8.1																																							
MCNT8	4.7±0.48	222±126.2	-6.96																																							
MCNT8c	4.2±0.8	217±117.9	-9.64																																							
MCNT20	18.9±0.9	446±77.9	-9.78																																							
MCNT20c	15.3±2.5	251±94.4	-10.3																																							
MCNT50	62.8±5.7	355±96.4	-7.28																																							
MCNT50c	63.6±11.3	392±195.3	-11																																							

			<p>の質量測定。  スルホローダミン B 解析、MTS・MTS<sub>co</sub> 解析、LDH 解析  ・MTS 解析による異なる細胞株の細胞毒性評価。CNT 濃度 50, 100, 500 <math>\mu</math>g/ml。ばく露後 4 or 24 時間。  ・酸化ストレスの役割。GSH レベルの変化観察。</p>	<p>た、A549 細胞における SCNT<sub>c</sub> に関して、未加工の対照群と比べ、有意な大幅の GSH 減少が見られた。  ・全 CNTs に関して、高濃度 GSH 細胞株に比べ、低濃度 GSH 細胞株において細胞毒性が強かった。</p>	
--	--	--	--	--	--

【多層カーボンナノチューブ(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
14	Cinzia Lucia Ursini, Delia Cavallo, Anna Maria Fresegna, Aureliano Ciervo, Raffaele Maiello, Giuliana Buresti, Stefano Casciardi, Francesca Tombolini, Stefano Bellucci, Sergio Iavicoli  Toxicology in vitro 26 (2012), pp 831-840	Comparative cyto-genotoxicity assessment of functionalized and pristine multiwalled carbon nanotubes on human lung epithelial cells (ヒト肺上皮細胞に対する機能化、製造されたままの純粋な多層カーボンナノチューブの比較細胞遺伝毒性評価)	<p>■対象物質</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>•Pristine MWCNTs 入手元: Heji (China) 直径: 32±2nm 凝集体サイズ: 8.1±2 純度: 97.37% 不純物: CI 0.20%, FE 0.55%, Ni 1.86%, S 0.02%</li> <li>•MWCNT-OH 入手元: Heji (China) 直径: 18±1nm 凝集体サイズ: 6.6±1.3</li> </ul> <p>機能化したナノ粒子-OH&gt;5wt.%.</p>	<p>■実験細胞</p> <p>ヒト肺細胞基底上皮腺癌細胞(A549) 入手元 American Type Culture Collection (ATCC) A549は5%CO<sub>2</sub>を含み37°Cの環境で10%のFCSを補填したRPMI1640 (EuroClone, United Kingdom)で培養。</p> <p>■ばく露濃度: Pristine MWCNTs 5,10,20,40 μg/ml MWCNT-OH 1,5,10,20,40 μg/ml</p> <p>Pristine MWCNTsとMWCNT-OH用に蒸留水を懸濁するために溶液(2mg/ml)を準備し、ばく露時、溶液を1分間ボルテックスし、その後5分間構造を分散させるために超音波で分解。</p> <p>■細胞生存率測定 24時間のばく露後、PBSで処理しMTT分析キットで測定</p> <p>■細胞毒性評価 24時間のばく露後、LDH解析により測定。ばく露しない細胞を陰性対照群として使用。</p> <p>■DNA損傷 2,4,24時間のばく露後、細胞を100μlのPBSで処理し、コメット解析で評価。</p>	<p>■細胞生存率</p> <p>ばく露24時間後、Pristine MWCNTsは対照群と比べ5μg/ml濃度時に細胞生存率は64%にまで減少させた。それよりも高い濃度での測定では大きな変化はなかった。MWCNT-OHでの測定値は濃度依存の傾向があり、20μg/ml時には急激に減少し、40μg/ml時には細胞生存率は58%にまで減少した。</p> <p>■細胞毒性評価</p> <p>24時間のばく露後、Pristine MWCNTsによる細胞毒性値は濃度5μg/mlから急激に上昇し、その後は濃度依存の値であった。MWCNT-OHに関しては、濃度20μg/mlまではほとんど毒性が確認されなかったが、濃度40μg/ml時には急激に上昇した。</p> <p>■DNA損傷</p> <p>Pristine MWCNTsでばく露した細胞のDNA損傷の測定は、濃度と期間依存の値となり、ばく露24時間で40μg/mlでの値が最も高かった。MWCNT-OHに関しても同様に、濃度依存の傾向が強く、中でも5μg/ml時での上昇が目立った。</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Pristine MWCNTsとMWCNT-OHでは細胞膜上の影響が異なる。</li> <li>•MWCNT-OHに対して、Pristine MWCNTsの方が低濃度時の細胞膜ダメージが大きい。</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
15	Ting Zhang, Meng Tang, Lu Kong, Han Li, Tao Zhang, Shanshan Zhang, Yuying Xue, Yuepu Pu  Journal of Hazardous Materials 219-220 (2012), pp 203-212	Comparison of cytotoxic and inflammatory responses of pristine and functionalized multi-walled carbon nanotubes in RAW 264.7 mouse macrophages (RAW264.7 マウ スマクロファージ における初期及 び機能化多層カ ーボンナノチュー ブの細胞毒性反 応及び炎症反応 の比較)	<p>■対象物質 多層カーボンナノチュ ーブ(MWCNT) 入手元 Shenzhen Nanotech Port Co. Ltd (China)</p> <p>■特性(実験に使用し た対象物質の) 直径(nm) 10-20nm 長さ(μm) 5-15 μm</p>	<p>■実験細胞 ・マウスマクロファージ細胞株 RAW 264.7 入手元 Cell Culture of the Chinese Academy of Medical Sciences (China)</p> <p>■試験方法 ・細胞生存率の測定 WST-8 細胞数測定キットを使用。 96-well プレート内で培養し、3 つの MWCNT(Pristine, -COOH, -PEG) の 6 種類 (25, 50, 100, 200, 400, 800 μg/mL) の細胞濃度にてばく露。 ■LDH を使用した膜結合測定 細胞を 24-well プレートに培養し、 Pristine, -COOH, -PEG に 25、50、 100、200 μg/mL の 4 つの濃度でばく 露。LDH の活性を LDH 分析キットを 用いて測定。 ■期間 細胞生存率測定、LDH での 測定ためのばく露期間は共に 24 時 間</p>	<p>■MWCNT の細胞毒性評価 Pristine MWCNT、MWCNT-COOH、 MWCNT-PEG は、WST-8 のデータでは 24 時間培養した調製細胞内において細胞 毒性の減少を示した。中でも、機能化した MWCNT に比べ、Pristine MWCNT が細胞 生存率において明らかに減少を示した。 さらに、24 時間 RAW264.7 細胞への MWCNT(25-200 μg/mL) のばく露では、 細胞生存率の著しい変化が生じ、細胞死 をもたらしした。また、100 μg/mL の濃度 において、Pristine MWCNT が他の機能化さ れたものとは比べ、かなりの LDH を放出し た。 ■MWCNT の炎症反応 Pristine MWCNT のサイトカイン遺伝子発 現は、機能化した MWCNT と比べそれほ ど大きな上昇ではなかった。この結果は、 MWCNT の細胞生存率や膜結合の結果と 矛盾している。このデータから判断する と、MWCNT で処理したマクロファージの 先天性免疫反応は表面機能性によるも のであると考えられる。</p>	<p>Pristine MWCNT と機能化 した MWCNT は異なる細胞 傷害を引き起こす可能性 がある。 機能化した MWCNT は Pristine と比べ、軽度から 中度の細胞毒性を発し た。しかし、機能化したも のは炎症の増加を引き起 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															
16	Reddy AR, Reddy YN, Krishna DR, Himabindu V  Environmental Toxicology, 27, 4, pp211-219	Pulmonary toxicity assessment of multiwalled carbon nanotubes in rats following intratracheal instillation (気管内注入 後のラットにお ける多層カー ボンナノチュー ブの肺毒性評 価)	<p>■カーボンニル鉄 入手元: Sigma (USA) サイズ: 4.5 μm 純度: &gt;98%</p> <p>■石英微細粉末 入手元: SD fine chemicals (India) サイズ: 58-68 μm 純度 99.94%</p> <p>多層カーボンナノチューブを ARC と CVD の方法で産出。</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>CNTs</th> <th>ARC</th> <th>CVD</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>産出方 法</td> <td>電気ア ーク</td> <td>化学蒸 着</td> </tr> <tr> <td>サイズ</td> <td>90-150n m</td> <td>60-80n m</td> </tr> <tr> <td>結晶化 度</td> <td>六方晶 系</td> <td>立方晶 系</td> </tr> <tr> <td>表面積 (m<sup>2</sup>/g)</td> <td>197</td> <td>252</td> </tr> </tbody> </table> <p>PBSと1% Tween 80 内で10mg/mLの濃度によってナノ粒子懸濁液を調合。</p>	CNTs	ARC	CVD	産出方 法	電気ア ーク	化学蒸 着	サイズ	90-150n m	60-80n m	結晶化 度	六方晶 系	立方晶 系	表面積 (m <sup>2</sup> /g)	197	252	<p>■対象生物 雄 Wistar albino ラット 入手元: Mahaveer Enterprises (India) 週齢: 8 週 体重: 200-225g</p> <p>■試験方法 ・肺の損傷・炎症検査 LDH 解析 ・Type II 肺胞上皮細胞の 分泌作用測定 アルカリホスファターゼ活 性 ・病理組織分析によるラッ トの肺組織の光学マイ クロ写真の観察</p>	<p>■肺障害および肺炎症 ・石英と同様に、ラットにおける両方の MWCNT のばく露は、ばく露後 24 時間時点で、BAL 液体 LDH 値の一時的な用量依存的上昇となり、その後他の時点(1 週間、1 ヶ月、3 ヶ月)とともに徐々に低下した。 ・ばく露後 24 時間、1 週間、1 ヶ月および 3 ヶ月時点での BAL 液体 LDH 値の上昇は、有意であり、点滴用量が 0.2 mg/kg(P&lt;0.05)、1 mg/kg(P&lt;0.1)、5 mg/kg(P&lt;0.001)であった。異なる濃度でのラットへのカルボンニル鉄ばく露は、すべてのばく露後時点において、BAL 液体 LDH 値における非有意な変化(P&gt;0.05)となった。 ・ラットにおける異なる濃度両方の MWCNT ばく露は、ばく露 24 時間後において、BAL 液体 ALP 値の一時的な用量依存的上昇となり、その後他の時点で徐々に低下した。 ・石英と同様に、0.2 mg/kg(P&lt;0.05)、1 mg/kg(P&lt;0.01)、5 mg/kg(P&lt;0.001)の濃度で、対照群に比べ、MWCNT ばく露後 24 時間、1 週間、1 ヶ月および 3 ヶ月時点での BAL 液体 ALP 値が有意に高いのが見られた。</p> <p>■病理組織解析 ・ラットの肺の MWCNT ばく露では、24 時間後および 1 週間後に、用量依存的な多発性肉芽腫、限局的細気管支周囲リンパ球凝集および細気管支周囲のリンパ形質細胞浸潤が見られた。その後、1 ヶ月後、肉芽腫を持つ多巣性マクロファージが肺胞損傷とともに見られた。</p>	<p>・カーボンナノチューブは、石英粒子と比べ、有意により高い毒性を示した。</p>
CNTs	ARC	CVD																			
産出方 法	電気ア ーク	化学蒸 着																			
サイズ	90-150n m	60-80n m																			
結晶化 度	六方晶 系	立方晶 系																			
表面積 (m <sup>2</sup> /g)	197	252																			

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	Ponti J, Broggi F, Mariani V, De Marzi L, Colognato R, Marmorato P, Gioria S, Gilliland D, Pascual Garcia C, Meschini S, Stringaro A, Molinari A, Rauscher H, Rossi F  Nanotoxicology, March 2013; 7 (2): pp 221-233	Morphological transformation induced by multiwall carbon nanotubes on Balb/3T3 cell model as an in vitro end point of carcinogenic potential (発がん性の in vitro エンドポイント としての Balb/3T3 細胞モデルにおけ る多層カーボンナ ノチューブによって誘 発する形態変換)	■対象物質 多層カーボンナノチューブ 商品名/化学的機能 ・Nanocyl-7000/なし ・Nanocyl-3101/ -COOH ・Nanocyl-3152/ -NH <sub>2</sub> ・Nanocyl-3153/ -OH 入手元: Nanocyl (Belgium) 直径: 平均 9.5nm 長さ: 平均<1.5 μ m  10mg/mL の MWCNT を含 んだストック懸濁液をジメ チル・スルホキシド (DMSO)内で調合。  アモサイト、クリソタイル、 クロシドライトのアスベスト 繊維を positive control 用 に使用。	■試験細胞 不死化マウス線維芽 細胞株(Balb/3T3) 入手元: Hatano Research Institute (Japan) ■培養方法: 10%FBS, 1%ペニシリン, 1%ストレ プトマイシンを加え M10F 内で室温 37°C、 5%CO <sub>2</sub> 環境で 24 時間 培養。 ■試験内容・方法 ・細胞生存率評価 Colony forming efficiency (CFE)解析 ・細胞毒性と発がん性 の同時評価 細胞変換解析(CTA) ・遺伝毒性評価 小核(MN)解析	■細胞毒性、形態転換および遺伝毒性 ・ばく露 24 時間および 72 時間後、すべての MWCNTs 濃度および機能化試験において、細胞毒 性は見られなかった。とりわけ、コロニー数減少か らわかる細胞生存率における低下は、陰性対照群 と比べ、茶石綿および青石綿繊維(100 μ g/mL; p<0.001***)へのばく露に関しては統計的に異なっ ていた。CFE アッセイに用いた陽性対照群は、ばく 露 24 時間と 72 時間時点で、完全細胞死を誘発し た。 ・最大濃度(100 μ g/mL)ですべての試験で陽性結 果が見られた MWCNTs を除き、用量依存的影響 は見られなかった。 ・青石綿は最大の形質転換を示した。最大濃度 (100 μ g/mL)で試験した物質に関して、統計的に 有意な結果が得られ、用量依存的影響であった。 ・異なるサンプルに関しては統計的に有意な小核 形成は見られず、形質転換が他の異なる分子の 経路の活性化によるものである可能性を示した。	・MWCNTs は細胞毒性 や遺伝毒異性を誘発し なかったが、形質転換 が見られた。

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
18	Matsumoto M, Serizawa H, Sunaga M, Kato H, Takahashi M, Hirata-Koizumi M, Ono A, Kamata E, Hirose A  The journal of Toxicological Sciences Vol.37, No.3, pp463-474, 2012	No toxicological effects on acute and repeated oral gavage doses of single-wall or multi-wall carbon nanotube in rats (ラットへの単 層・多層カーボ ンナノチューブ の急性・反復経 口投与の無毒 性影響)	■対象物質 SWCNTs サイズ:2nm MWCNTs サイズ:30nm 入手元:Nikkiso Co., Ltd (Japan)  5%アカシアゴムの水 溶液で分散し、混合 物を超音波ホモジ ナイザーで均質化 する。均質の試験 懸濁液を顕微鏡で 観察。	■試験生物 CrI:CD(SD)ラット 入手元: Charles River Laboratories Japan, Inc. (Japan) 雌ラット(SWCNT:週齢 8 週; MWCNT: 週齢 9 週)を急性毒性試験に使用し、 雄/雌ラット(SWCNT:週齢 6 週; MWCNT:週齢 5 週)反復投与毒性研究 用に使用。 ・試料濃度: SWCNT0.625mg/ml、 MWCNT2.5mg/ml ・急性毒性検査用のばく露量: 50mg/kg bw or 200mg/kg bw ・反復毒性検査(1 回/日)用のばく露 量 SWCNT: 0, 0.125, 1.25, 12.5mg/kg bw MWCNT: 0, 0.5, 5.0, 50mg/kg bw ・ばく露期間:28 日間 ■試験方法 解剖による臓器の重量測定、採血/ 検尿検査。	■単層 CNT ・28 日間の SWCNT 投与では、雄雌ともに死亡は 見られなかった。 ・機能検査においては、投与期間終了時に、すべ ての投与群の雄において着陸開脚の値が有意 に低いのが見られた。 ・尿検査においては、投与期間中に、12.5 mg/kg bw/day およびそれ以上の濃度において、雌の 尿量が有意に少量であるのが認められた。 ・血液検査においては、投与期間終了時に、12.5 mg/kg bw/day の濃度において、雌における赤血 球数の有意に多さと、雄におけるリンパ球数なら びに好塩基球数の有意な多さが認められた。 ・臓器重量測定値においては、投与期間終了時 に、0.125 mg/kg bw/day の投与群の雄におい て、絶対脾臓重量が有意に低いのが見られた。 ・剖検時に、投与期間終了時および回復期に、対 照群および 12.5 mg/kg bw/day の投与群におい て散発的に、肺に赤黒い病巣が見られた。組織 病理学的試験では、肺に赤黒い病巣が見られた 動物において、同部位に出血が見られた。 ■多層 CNT ・28 日間の MWCNT 投与では、雄雌ともに死亡は 見られなかった。 ・詳細な臨床観察、機能検査、体重・摂餌量、臓器 重量、尿検査および組織病理学的所見では、何 も影響は見られなかった。	・ SWCNT および MWCNT の急性経口 投与では、臨床所見 上および体重におい て、死亡や毒性学的 影響は見られなかつ 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
19	Gavello D, Vandael DH, Cesa R, Premoselli F, Marcantoni A, Cesano F, Scarano D, Fubini B, Carbone E, Fenoglio I, Carabelli V  Nanotoxicology, February 2012; 6(1): pp 47-60	Altered excitability of cultured chromaffin cells following exposure to multi-walled carbon nanotubes (多層カーボ ンナノチュー ブにばく露し た後の培養 クロム親和 性細胞の変 異興奮性)	<p>■MWCNT 入手元:Mitsui Chemicals (Japan) 培養培地の分散性 を増すために、 CNTsを振動性ポー ルミル内で6時間 粉碎。</p> <p>・CNTs サイズ: 50-100nm 長さ:&gt;10 μm ・Ground CNT サイ ズ: 67±2nm 長さ: 1.12±0.05 ・MWCNTを異なる 濃度(263 μg/ml、 100 μg/ml、30 μ g/ml)で培養培地に 懸濁。</p> <p>・Negative control 用に濃度 263 μ g/mlで培養培地に 溶解したトリスフ ラーレンを使用。</p> <p>・細胞内培地のプロ テインの濃度にお ける MWCNTs の影 響を評価するた めに、MWCNTs を 48 時間 15%FBS 水溶 液に懸濁し、その後 遠心分離によって 取り出した。</p>	<p>■試験細胞</p> <p>・マウスクロム親和性細胞(電気生理学用) 雄 C57BL/6J マウスから採取</p> <p>・ラットクロム親和性細胞(電子顕微鏡法用)</p> <p>■クロム親和性細胞の分離と培養</p> <p>・マウスクロム親和性細胞 副腎をCa<sup>2+</sup>とMg<sup>2+</sup>の入っていないLocke's 緩衝液に 浸けた。緩衝液の構成(単位:ミリモル)は次の通り: 室 温、pH 7.3、154 NaCl、3.6 KCl、5.6 NaHCO<sub>3</sub>、5.6 グル コース、10 HEPES。副腎のカプセルを開放し、皮質組 織から髄質を正確に分離。37°Cで、50 分後に、20 U/mL のパパイン(米国ニュージャージー州、レークウ ッド、Worthington Biochemical 社製)と10.1 mg/mL の DNase(Sigma 社製)を含有する酵素溶液内で髄質消 化が得られた。この細胞懸濁液を洗浄液(DMEM, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mg/mL BSA)で2度洗浄し、15%のウシ 胎仔血清(FBS)で再懸濁した。濃縮した細胞懸濁液を well の中央に一滴垂らし、細胞をポリ-L-オルニチン (0.5 mg/mL)およびラミニン(L-15 炭酸塩 10 μg/mL)で 処理したプラスチック皿の4つのくぼみでプレATING グした。1時間後、15%のFBS(米国ニューヨーク州グラ ンドアイランド、Invitrogen 社製)、50 IU/mL のペニシリン、 50 μg/mL のストレプトマイシン(Lonza 社製)、10 μM の塩酸シトシン b-D-アラビノ-フラノシド(Sigma 社 製)、10 μM の5-フルオロ-2'-デオキシウリジン (Sigma 社製)で補完した1.8 mLのDMEMをくぼみに 添加した。</p> <p>・ラット親和性細胞 パパインの代わりに濃度 0.35 mg/mL のリベラーゼ-ブ レンザイム-3(Roche 社製)の溶液を使用したことを除 き、マウスの場合と同様の方法でクロム親和性細胞培 養を行った。こうして、DMEM の mg 単位ごとに 100 μL のリベラーゼ溶液を添加。</p> <p>■試験方法/内容</p> <p>・ラットクロム親和性細胞を用い、親和性細胞内に取り 込まれる MWCNTs の電子顕微鏡観察。 濃度: 263 μg/ml ばく露期間: 24h, 48h</p> <p>・MWCNTs が親和性細胞の膜入力抵抗に与える影響。</p>	<p>■MWCNTs はクロム親和性細胞 内に取り込まれる</p> <p>・集率(%)は時間とともに上昇し た。</p> <p>・MWCNTs は血漿膜を横断し、細 胞質および核膜に到達する。特 に長時間(48時間)のばく露の 後、細胞の取り込みを混乱させ る可能性がある。その場合、器 官はもはや目に見えなくなり、細 胞質は MWCNTs 凝集物(白い点 線の四角)に満ちて見える。</p> <p>■MWCNTs はクロム親和性活性 細胞数を減少させる</p> <p>・MWCNTs への24時間のばく露 は、自発的に発火する MCCs の 数を用量依存的に減少させた。 より低容量(30 μg/mL)の MWCNTs は、発火細胞の数をそ れぞれ 48%(n=25)、52%(n=29)に 減少させた。これは、MWCNTs が MCCs の機能に影響を与える ことを明示している。</p> <p>■MWCNTs はクロム親和性細胞 の膜入力抵抗を低下させる</p> <p>・フラレンでの24時間の処理 (2.9±0.4 GΩ; n=4)も 30 μg/mL の MWCNTs での処理(2.9±0.2 GΩ; n=7)も、対照群と比べ、膜 抵抗を有意に低下させなかった (p&gt;0.05)。細胞入力抵抗は、用 量依存的に低下した。</p>	<p>・カーボンナノチューブ は、用量依存的に初代 クロム親和性細胞培養 の濃度で損傷を誘発 し、高濃度(100 および 263 μg/mL)ほど顕著と なる。</p> <p>・MWCNTs は、24 時間 の培養後に血漿膜を横 断し、細胞質の濃度 において影響を無効にす ることがある。特に 48 時間後は顕著となる。</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	Fenoglio I, Aldieri E, Gazzano E, Cesano F, Colonna M, Scarano D, Mazzucco G, Attanasio A, Yakoub Y, Lison D, Fubini B  Chemical Research Toxicology 2012, 25, pp 74-82	Thickness of multiwalled carbon nanotubes affects their lung toxicity (肺毒性に影 響を及ぼす多 層カーボンナ ノチューブの 厚さ)	<p>■対象物質</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・MWCNT<sub>9,4</sub> サイズ: 9.4±0.3nm 長さ: 0.1-1 μm SSA: 240m<sup>2</sup>/g</li> <li>・MWCNT<sub>70</sub> サイズ: 70±2nm 長さ: 1-3 μm SSA: 60 m<sup>2</sup>/g</li> </ul> <p>入手元: Mitsui Chemicals (Japan)</p> <p>HClの0.1M 溶液内で 懸濁し、10 日間 RT でかき混ぜる。</p>	<p>■試験細胞(in vitro)</p> <p>マウス肺胞マクロファージ(MH-S) 入手元: Istituto Zooprofilattico Sperimentale (Italy)</p> <p>■培養方法</p> <p>10%FBS を含んだ RPMI1640 を 35nm もしくは 100nm の Petri dish 内で 24 時間 MWCNT の 有/無で培養。</p> <p>■ばく露について</p> <p>260mg/L の濃度で血清を含んだ培養培地へ MWCNT をばく露。</p> <p>■試験内容/方法</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・クロシドライト石綿を Positive control 用に使用</li> <li>・細胞外の LDH 活性の測定</li> <li>・細胞内 ROS 産出測定 電子スピン共鳴分光法</li> <li>・細胞内グルタチオンの測定</li> <li>・MWCNT の細胞内への内在化の測定 TEM 使用</li> </ul> <p>■試験生物</p> <p>雌 Wistar ラット 入手元: Faculty of Medicine of UCL (UK) 体重: 250g 麻酔後、2mg の CNT 懸濁液を気管内注入。</p> <p>■試験内容</p> <p>LDH 活性と総タンパク量の測定</p>	<p>・ネズミの肺胞マクロファージに対する検査 を実施した際、MWCNTs<sub>9.4</sub> は、LDH 漏出 からわかるように、用量依存的細胞毒性影 響を誘発した。逆に、MWCNT<sub>70</sub> は、試験を した全用量において細胞毒性がないように 思われた。同時に、MWCNT<sub>9.4</sub> では、細胞 内 ROS 生成および細胞内 GSH の減少が 見られ、細胞毒性が CNT 誘発性の酸化ス トレスにより仲介されたことを示す。 MWCNT<sub>70</sub> は、同等の質量用量では、細胞 変化は誘発しなかった。</p> <p>・双方のサンプルにおいて、異なるナノ粒 子径の塊が細胞の内側に見られたが、炭 層 CNTs は見られなかった。塊は主に細胞 質に局部的に集中していた。核や他の細 胞小器官には CNTs は見られなかった。</p> <p>・CNT の単回投与の 24 時間に、MWCNT<sub>9.4</sub> を投与したラットのみが、LDH 活性ならび に気管支肺胞洗浄液におけるタンパク質 含有量ならびに好中球、好酸球およびリン パ球の補充により評価された、炎症反応を 発症した。</p> <p>・MWCNT<sub>70</sub> には、MWCNT<sub>9.4</sub> に比べ、破砕 により発生した欠陥が若干多いのが見ら れたが、毒性はより低めであった。</p>	<p>・短径、高純度、薄膜な いし厚膜 MWCNTs が肺 胞マクロファージにより in vitro に取り込まれ た。ラットに注入した 際、薄膜の MWCNTs は、肺胞マクロファージ に対して毒性があり、 肺炎症性反応を誘発し た。</p> <p>・逆に、in vitro および in vivo 双方の試験におい て厚膜 MWCNTs の毒 性は低いように思われ 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
21	Clichici S, Biris AR, Tabaran F, Filip A  Toxicology and Applied Pharmacology 259 (2012), pp 281-292	Transient oxidative stress and inflammation after intraperitoneal administration of multiwalled carbon nanotubes functionalized with single strand DNA in rats (一本鎖DNAで機能化した多層カーボンナノチューブのラットの腹腔内投与後の一過性の酸化ストレスと炎症)	<p>■対象物質 MWCNT 外径: 15-25nm 内径: 10-15nm 入手元: Sigma-Aldrich Chemicals GmbH (Germany)</p> <p>MWCNTs を含浸によって得られた Fe: Co: CaCO<sub>3</sub>(2.5: 2.5: 95wt)触媒を使用し誘導加温 720°C で cCVD 法にて合成。</p> <p>ss-DNA (Sigma, Germany)を再蒸留水内で混ぜ、0.1%ss-DNA の溶液を抽出。15ml の溶液に 0.9%の NaCl を加えたものを ss-DNA 対照群への注入用に使用。</p>	<p>■試験生物 雄 Wistar ラット 体重: 190±10g</p> <p>■ばく露方法 ・1.5ml の ss-DNA-MWCNT 溶液 (270mgL<sup>-1</sup>)使用。 ・ばく露から実験までの間隔をグループ分け。1, 3, 6, 24, 48, 144 時間。 ・2 つのコントロールグループ。 1.5ml 食塩水、1.5ml ss-DNA0.1%溶液注入。 ・ばく露から実験までの間隔(1h)</p> <p>■試験内容/方法 ・細胞毒性評価 LDH 活性分析 ・肝臓酵素分析 比色分析キットを用いた半自動解析 ・酸化ストレス測定 PC, MDA, GSH を Bradford 法で評価。 ・炎症性のサイトカイン (TNF-<math>\alpha</math>、IL-1<math>\beta</math>)を ELISA キットを用いて評価。</p>	<p>■細胞毒性反応 ・肝臓ホモジネートにおいて、ss-DNA-MWCNTs の ip 投与の 1 時間後、細胞膜損傷のマーカである LDH 放出が増加。対照群と比べ、1 時間後および 6 時間後に、LDH が有意に増加した。 ・ss-DNA-MWCNTs を注入したラットの ip の血清における ALT および AST の分析から得られたデータは、対照群と比べ、6 時間後に統計的に有意な作用を示している。</p> <p>■酸化ストレス ・ss-DNA-MWCNTs の ip 投与の 3 時間後、血漿中濃度が上昇したが、対照群と比べて統計的有意ではなかった。 ・生理食塩水群と比べ、ss-DNA-MWCNTs 投与後の、3、6、24、48 時間後、肝臓の MDA 濃度が有意に上昇し、144 時間後に正常値が見られた。対照群と比べ、最も重要な上昇は、3 時間後に見られた。 ・対照群に比べ、ss-DNA-MWCNTs が、ip 投与の 6 時間 (10.70±2.4 nmol ml<sup>-1</sup>、2 倍増加)および 48 時間 (9.533±1.9 nmol ml<sup>-1</sup>、2.25 倍増加)後の GSH の有意な減少を決定づける。 ・対照群に比べ、3 時間および 24 時間後に肝臓の GSH は有意に減少した。 ・生理食塩水群に比べ、このパラメータは、1 時間 (25.78±2.294 Umg P-1、1.83 倍減少)、24 時間 (26.88±1.047 Umg P-1、1.76 倍減少)および 48 時間 (27.47±3.011 Umg P-1)後に低下したが、144 時間は持続しなかった。</p> <p>■サイトカイン濃度 TNF-<math>\alpha</math> には、試験開始から 1、3、6、24 および 48 時間後に、肝臓における有意な濃度の上昇が見られた。144 時間後には、TNF-<math>\alpha</math> は対照群のそれと匹敵した。48 時間後に、生理食塩水群と比べ、IL-1<math>\beta</math> は肝臓ホモジネートにおいて有意に増加した。</p>	<p>・270mg1-1 の溶液 1.5mL の ip 単回投与後、ss-DNA-MWCNTs は、一時的な酸化ストレス、炎症および細胞間経路の活性化を生じさせる。 ・酸化ストレスパラメータおよび炎症サイトカインは、一時的な変化しか示さず、ip 投与後 6 日間以内に正常値に回復する。</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
22	Guo F, Ma N, Horibe Y, Kawanishi S, Murata M, Hiraku Y  Toxicology and Applied Pharmacology 260 (2012), pp 183-192	Nitrative DNA damage induced by multi-walled carbon nanotube via endocytosis in human lung epithelial cells (ヒト肺上皮細胞におけるエンドサイトーシスを介した多層カーボンナノチューブによって誘発するニトロ化DNA損傷)	■対象物質 MWCNT ・CNT20 サイズ: 20-30nm ・CNT40 サイズ: 40-70nm 入手元: Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Japan) 純度: 95% 長さ: 0.5-2 μm  MWCNT を 100mg/l カ ナマイシン、5%FBS で 補填した DMEM 内で懸 濁。	■試験細胞 A549 細胞 ■ばく露濃度: 2.5, 5, 10 μg/ml ■試験内容/方法 ・細胞生存率測定 A549 細胞を一晩 96-well プレ ート内で培養し、その後 100mg/l カナマイシン、5%FBS で補填した DMEM 内にて 37°C、24 時間、10 μg/ml MWCNT で処理。MTT 解析使 用。 ・免疫細胞分析 MWCNT で処理した A549 内の 8-ニトログアニジン形成と iNOS 発現観察。 蛍光免疫測定法、ANOVA 試 験、チューキー法 ・酸化窒素レベルの測定 Griess 法 ・ROS 生成の測定 過酸化値をフローサイトメリー 法で測定。 ・MWCNT によって誘発する DNA 損傷のメカニズム調査。 蛍光免疫測定法	・10 μg/mL の対照群と比べ、24 時間の培養後、 CNT20 および CNT40 の双方とも細胞生存性に有意 な変化を誘発することはなかった。この結果は、試 験条件下では、MWCNT が細胞毒性および成長阻害 作用を持たないことを示した。 ・MWCNT 濃度とともに、8-ニトログアニンの免疫反応 は上昇したが、非処理群には、染色が見られない か、もしくは低い染色度合いが見られた。非処理群 には、iNOS 発現は弱いかもしれない。非処理群 には、CNT20 および CNT40 は、4 時間で細胞質の iNOS 発現を誘発し、24 時間持続した。 ・MWCNT での 4 時間の処理の後、対照群に比べ、 CNT20 および CNT40 は NO 生成を増加させた。8 時 間では、CNT20 および CNT40 は、それぞれ非有意 (p=0.142)・有意(p<0.05)な増加を誘発した。CNT40 は、24 時間(p=0.085)で非有意に NO 生成を増加させ た。CNT20 による処理と CNT40 による処理におい ては、NO 生成の有意差は見られなかった。 ・MWCNT による細胞の処理では、4 時間および 8 時間 で、蛍光強度の増加は見られなかった。 ・CNT40 は、細胞内の 8-ニトログアニン生成ならびに iNOS 発現を強く誘発し、iNOS および NF-κB 阻害剤 での処置により、免疫活性度がほぼ完全に低下し た。	MWCNT は、肺上皮細胞 株の 8-ニトログアニン生 成を誘発した。MWCNT 粒子は、カベオラおよび クラスリン仲介のエンド サイトーシスを介して、 上皮の非食細胞に取り 込まれた。

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
23	Hsieh SF, Bello D, Schmidt DF, Pal AK, Rogers EJ  Nanotoxicology 2012; 6 (1): pp 61-76	Biological oxidative damage by carbon nanotubes: fingerprint or footprint? (カーボンナノチューブによる生体の酸化損傷: 指紋や足跡?)	■対象物質					■試験細胞 ヒト静脈血清  ■試験内容/方法 ・生物学的酸化損傷(BOD)測定。FRAS 分析。ヒト血清を10mgmL <sup>-1</sup> の濃度でばく露し、37°Cで90分間かき混ぜ、蓄熱ヒーター内で培養。 ・ナノマテリアルの比表面積(SSA)測定。窒素収着分析。測定前に48h、200°Cで脱気。 ・粒子形態分析 TEM 解析	<ul style="list-style-type: none"> <li>すべてのMWCNTsが、非ばく露血清対照群と比べ、統計的に有意なBODを示した(P&lt;0.01、t検定)。</li> <li>いくつかのMWCNTsは、2つのSWCNTサンプルより高いBOD値を示した。比較すると、すべて同様のSSAs(それぞれ112、119、110m<sup>2</sup>g<sup>-1</sup>)を持つMW_A3・B3およびカーボンブラックN110により生じたBODの値に、有意な差異はなかった。</li> <li>■BODとSSAの関係</li> <li>・SSAとBODの度合いの間には指数関係があり、200m<sup>2</sup>g<sup>-1</sup>周辺で急速な上方移行が見られた。SSAとSSAsの下端(&lt;200m<sup>2</sup>g<sup>-1</sup>)にあるBODは、ほぼ線形関係にあった。</li> <li>■表面活性係数としての特定のBOD</li> <li>・同様のSSAsを持つ2つの長めのMWCNTs(例えばMW_C1やMW_E)に比べ、短いMW_D1(0.5~2μm)は高めのsBOD値となり、低めのsBODs値(それぞれ0.09、0.11)が見られた。sBODとSSAの間に強い相関性(ピアソンγ=0.88)が見られ、当該経験的観測を裏付け、他の潜在的要因であるSSAの潜在的共変量がsBODに影響を与えることを示している。</li> <li>・処理の関数としてのsBOD</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>いくつかの物理化学的特性、生物学的関連性およびBODの毒性への有意な関与と、FRAS BODの堅固な関係が、酸化損傷の可能性に関するFRAS BODのCNTsスクリーニングにおける有益な役割を示している。</li> <li>・アッセイにより、酸化損傷を生じさせ、生体分子を攻撃するナノマテリアルの固有用量指数がもたらされる。</li> <li>・一群の重要で可変性が高く、測定が困難なCNTsの物理化学的パラメータと関連して、BODは、当該パラメータの相互作用ならびにCNTsの潜在的毒性に関する比類な見識を提供している。</li> </ul>
			サンプル	入手元	外径 (nm)	内径 (nm)	長さ (μm)			
			MW A1	A	<8	2-5	10-30			
			MW B1	B	<8	2-5	10-30			
			MW A2	A	10-20	3-5	10-30			
			MW B2	B	10-20	5-10	10-30			
			MW A3	A	20-30	5-10	10-30			
			MW B3	B	20-30	5-10	10-30			
			MW A4	A	30-50	5-10	10-20			
			MW B4	B	30-50	5-15	10-20			
			MW A5	A	50-80	5-10	10-20			
			MW B5	B	50-80	5-15	10-20			
			MW B6	B	60-100	5-10	5-15			
			MW C1	C	10-20	5-9	1-5			
			MW C2	C	25-35	10-15	5-20			
			MW D1	D	10-20	5-10	0.5-2			
			MW D2	D	10-30	5-10	10-30			
			MW D3	D	10-20	5-10	10-30			
			MW E	E	6-10	3-7	NA			
			MW-OH	A	<8	2-5	10-30			
			MW-COOH	A	<8	2-5	10-30			
			Nanoforest	F	6-10	3-7	50-100			
			Nanrope	G	5.6-10	1.2-3	>50			
Nanorope, purified in HNO3	G	5.6-10	1.2-3	>50						
Nanocloth	G	8-25	2.5-9	NA						
Nanocloth, purified in HNO3	G	8-25	2.5-9	NA						
Nanocloth, acetone-washed	G	8-25	2.5-9	NA						
SW S	A	1-2	0.8-1.6	0.5-2						

SW L	A	1-2	0.8-1.6	5-30
N110 Carbon black	Cabot Corp	20-25		
Nano TiO2 (anatase)	Sigma- Aldrich	<25		
Nano ZnO	NAM	20		

・入手元: A: Cheap Tubes, Inc. (USA); B: Nanostructured and Amorphous Materials (USA); C: NanoLab Inc. (USA); D: Cheap Tubes, Inc. (USA); E: Applied Nanotech Nanotubes; F: Prof. Wardle's Lab, MIT; G: Local manufacturer who wished to remain anonymous

における変化の傾向も顕著である。基準のナノクロスに比べ、硝酸処理は sBOD を 50%増加させた(金属含有量は低下したが)が、アセトン処理は全く逆の結果となり、同様のサイズの sBOD が減少した。官能基 MWCNTs(-OH および -COOH)の sBOD も最大測定値であり、sBOD 値がそれぞれ 0.25、0.34  $\mu$  mol TEUs  $m^{-2}$  であった。2 つの SWCNT サンプルも最大測定値(0.27、0.36  $\mu$  mol TEUs  $m^{-2}$ )であった。

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
24	Kim JS, Song KS, Lee JK, Choi YC, Bang IS, Kang CS, Yu IJ  Archives of Toxicology 2012, Vol 86, issue 4, pp553-562	Toxicogenomic comparison of multi-wall carbon nanotubes (MWCNTs) and asbestos  (多層カーボンナ ノチューブとアス ベストの毒性遺 伝比較)	<p>■対象物質</p> <p>・MWCNTs 入手元: Hanwha Nanotech (Incheon, Korea) 直径: 10-15nm 長さ: 545±230nm, 10,451± 8,422nm 純度: 94.86%</p> <p>■MWCNT 分散液 MWCNT を分散溶媒(Ca<sup>2+</sup>と Mg<sup>2+</sup>フリー、リン酸緩衝生理 食塩水(PBS)、pH7.4、補助 物質 D-グルコース 5.5mM、 マウス血清アルブミン 0.6mg/ml、 DPPC(1,2-dipalmitoyl- sn-glycero-3 -phosphocholine)0.01mg/ml を含む)に分散する。</p> <p>■Control アスベスト(crocidolite) Positive control 用 入手元: South African National Institute of Occupational Health</p>	<p>■試験細胞 正常ヒト気管支上皮細胞 (NHBE)株 入手元: Cambrex (USA)</p> <p>■培養方法 NHBE 株を 24-well プレー トと T-75 フラスコ内で、気 管支上皮の増殖培地で 5%CO<sub>2</sub>、気温 37°Cの状態 で培養。</p> <p>■試験方法 ・細胞生存率 増殖試薬 WST-1(Takara, Japan)を用いて測定。 WI-38 細胞を MWCNTs も しくは crocidolite と処理 し、24-well マイクロプレ ートで 5%CO<sub>2</sub> を含み 37°C の環境のもと 24 時間もし くは 48 時間培養。</p> <p>RNA 抽出 DNA マイクロアレイ法</p>	<p>■RNA 抽出および DNA マイクロアレイ 1 μg の総 RNA を T7 プロモータープライマーと混ぜ、 65°Cで 15 分間培養した。CDNA マスターミックス(5× first-strand バッファ、0.1 M DDT、10 mM dNTP mix、 RNase-Out、MMLV-RT)を調合し、反応ミキサーに 添加した。その後サンプルを 40°Cで 2 時間培養し、 その後 65°Cで 15 分間培養し RT と dsDNA 合成が終 了した。製造元のプロトコルに従い、転写マスターミ ックス(4×転写バッファ、0.1 M DDT、NTP 身オック ス、50%PEG、RNase-Out、無機リン酸塩、T7-RNA ポ リメラーゼ、シアニン 3/5-CTP)を調合した。</p> <p>■マイクロアレイ・データ分析 DNA マイクロアレイ・スキャナー(Agilent Technology 社製)を用いて、混成化した画像をスキャンし、その 後 Future Extraction Software(Agilent Technology 社 製)を用いて定量化した。Gene-SpringGX 7.3(Agilent Technology 社製)を用いて、データ正規化および fold-change 後の遺伝子の選択を行った。正規化シ グナル・チャンネル強度を正規化コントロール・チャネ ル強度で除して、正規化比率の平均を算出した。 Gene-SpringGX 7.3 を用いて、Gene OntologyTM Consortium に従い、遺伝子の機能注解を行った。 BioCarta、GenMAPP、DAVID、Medline のデータベー スの検索結果を基に、遺伝子分類を行った。</p>	本研究により、比較 的高レベルの不確 実性ならびにリスク への認識があること がわかったが、これ らを認知していても、 リスク回避に対する アクションを実施せ ず、行政による監督 を優先していたわけ でもなかった。

【グラフェン】

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
25	Kang SM, Kim TH, Choi JW  Journal of Nanoscience and Nanotechnology Vol. 12, pp 5185-5190, 2012	Cell chip to detect effects of graphene oxide(GO) nanopellet on human neural stem cell  (ヒト神経幹細胞へのグラフェン酸化ナノペレットの影響を検出するセルチップ)	<p>■対象物質 グラフェン酸化物 入手元 : Graphene Supermarket (USA)</p>	<p>■試験細胞 HB1.F3 細胞 入手元: Gibco(USA)</p> <p>■培養方法 加熱不活性化した 10%FBS と 1%濃度の抗生物質で補填し DMEM 内で培養。(室温 37°C、5%CO<sub>2</sub>)</p> <p>&lt;試験方法&gt; ■ラマン分光分析法 NTEGRA Spectra (NTMDT, Russia)使用 ■セルチップをベースにした電気化学測定 定電位電界装置(ポテンシオスタット) CHI 社、USA を使用。 Au 電極に 5×10<sup>5</sup>個の HB1.F3 細胞/mL を播種し、24 時間培養し、PBS(pH 7.4)を電解質として用い、差分パルスボルタンメトリーにより HB1.F3 細胞からの電流応答を測定 ■細胞生存率試験 MTT 解析を使用。生細胞の光吸収度を測定。濃度 25-200 μg/ml の GO ナノペレット使用。</p>	<p>■ラマン分光法による GO の特性確認 ・785nm-波長励起 (785nm-wavelength excitation)を使用した結果、1,310cm<sup>-1</sup>(D バンド)、1,507cm<sup>-1</sup>(G バンド)時に最大値を示した。G バンドは黒鉛六方格子の多層膜という特徴があり、D バンドはシャープレスカーボンもしくは六方構造の変形振動のいずれかの特性を持つ。 ■金電極上の HB1.F3 細胞の差分パルスボルタンメトリー ・0.05V の振幅と 0.05 s のパルス幅で、0.2~0.4 V の電位範囲を用いて、HB1.F3 細胞の電気化学的反応を検知した。HB1.F3 細胞を 25 μg/mL の濃度の GO ナノペレットで処理した際に、最大電流の電位は正の方向(0.09 V)に若干移動した。その結果、細胞からの電気化学的シグナルが減少し、GO ナノペレットの濃度が 0 μg/mL から 200 μg/mL に上昇した。これは、GO ナノペレットの濃度が、細胞の生存能力に反比例したことを示す。最低濃度 25 μg/mL の GO ナノペレットで処理した HB1.F3 細胞でさえ、シグナルにおいて有意な減少を示した。これは、最低濃度でさえ、HB1.F3 細胞において GO ナノペレットの毒性が見られることを示す。このため、細胞チップおよび他の炭素系の物質を用いて、低濃度下で、細胞チップを使い GO ナノペレットの毒性を確認することができた。 ■細胞生存率試験 ・細胞生存率は濃度 200 μg/ml 時に 1.17(濃度 0 μg/ml 時は約 1.65)に減少し、濃度依存の傾向がある中で、0-25 μg/ml 時の数値に最も大きな減少が見られた。MTT 解析でも、前述した電気化学シグナルや形態変化と同じような細胞毒性結果が得られた。</p>	細胞生存率の減少には 25 μg/ml の GO で十分であり、ヒト神経幹細胞にとって毒性が高いということが証明された。MTT 生存率解析や光学顕微鏡観察方法においても DPV と同様の結果となった。これにより、低濃度の GO でも、セルチップを使用した未分化ヒト神経幹細胞にとって毒性であり、in vivo への活用の際には十分な注意が必要である。

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
26	Mullick Chowdhury S, Lalwani G, Zhang K, Yang JY, Neville K, Sitharaman B  Biomaterials 34 (2013), pp 283-293	Cell specific cytotoxicity and uptake of graphene nanoribbons (細胞の特異 毒性とグラフ エナノリボンの 摂取)	<p>■対象物質 酸化グラフェンナノ リボン サイズ:125-220nm</p> <p>MWCNTs(catalog no 636487, Sigma Aldrich, USA) と合 成。 MWCNT(150mg)を 2-4 時間 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(30ml)内で懸 濁。過マンガン酸カリ ウムを加え、混合物 をかき混ぜる。その 後、エタノールとエー テルを凝集のため追 加。</p>	<p>■試験物質</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>•Henrietta Lacks cells (HeLa)</li> <li>•National Institute of Health mouse fibroblast cells (NIH-3T3)</li> <li>•Sloan Kettering breast cancer cells (SKBR3)</li> <li>•Michigan cancer foundation -7 breast cancer cells (MCF7)</li> </ul> <p>■入手元: ATCC (USA)</p> <p>■培養方法 HeLa と NIH-3T3 は DMEM 内で培養。SKBR3 は McCoy's 培地で培養し、MCF7 は RPMI1600 培地で培 養。 全ての培地を 10%FBS、1%ペニシリンストレプトマイシン で補填し、室温 37°C、5%CO<sub>2</sub> 環境で培養。</p> <p>■試験方法</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>•ミトコンドリアの健全性の細胞生存率測定及び Alamar blue 解析で測定</li> <li>•リソソームの健全性の細胞生存率測定及び Neutral red 解析</li> <li>• SKBR3、MCF7、HeLa の細胞死亡率測定及び Trypan blue 解析</li> <li>•O-GNR-PEG-DSPE にばく露した細胞の膜組織健全 性及び LDH 解析キットで評価</li> <li>• O-GNR-PEG-DSPE にばく露した細胞の細胞分裂や 細胞群体の評価及び Clonogenic 解析により評価。</li> </ul>	<p>■PEG-DSPE でコーティングされた O-GNR は、溶解度が高くなり、生 体媒質における安定性が増す。</p> <p>■4種類の細胞株(HeLa, MCF7, SKBR3, NIH3T3)を用いて5種類の 分析方法(アラマーブルー、ニュー トラルレッド、トリパンプルー、LDH 放出、クローン形成法、生細胞アッ セイ)で毒性スクリーニングを実施 した。</p> <p>■O-GNR-PEG-DSPE が、4種類 の細胞株に対して、用量・時間依 存の異なる細胞毒性率があるこ とがわかった。HeLa に、5種類の 分析において他の細胞株より強い 毒性が見られた。細胞組織学的 TEM 画像の試料は、他の細胞に比 べ、HeLa 細胞への O-GNR-PEG-DSPE 生成物の高取 り込みを示した。これは、取り込み が高いほど、HeLa 細胞機構に強い 影響を与え、これが HeLa 細胞と他 の細胞株の細胞毒性結果が違う 主な理由である。</p>	<p>この研究の結果は、修飾 Hummer's method(グラフ ァイト酸化により製造される グラフェンナノ粒子および その機械的剥離)およびそ のバリエーションにより製 造されるグラフェンナノ粒子 に比べ、CNTs から合成さ れた O-GNRs には、細胞特 有の細胞毒性作用があり、 有意に異なる細胞毒性プ ロフィールを持つことを示 す。</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	Sanchez VC, Jachak A, Hurt RH, Kane AB  Chemical Research in Toxicology 13; 25 (1), 2012 pp-15-34	Biological interactions of graphene-fa mily nanomaterial s: an interdisciplin ary review (グラフェン・ ファミリーナ ノマテリアル の生物学的 相互作用: 学際的レビ ュー)	■対象物質/試料 調整法/試験用量 総説のため記載で きず。	■試験生物/投与 方法・期間/試験方 法 総説のため記載で きず。	この総説で述べられ ている議題は、 ・グラフェン・ファミ リーナノマテリアル ノ特性 ・人体への影響(細 胞毒性、体内摂取)	<ul style="list-style-type: none"> <li>・GFNs の中には、加熱剥離法を用いて、乾燥粉末として製造されるものもある。この場合、吸入はヒトばく露の経路となりうる。</li> <li>GFNs の中には空気力学径のものもあり、吸入およびその後ヒトの気道に相当量が沈着し、肺防御・クリアランスに損傷を与え、肉芽腫ならびに肺線維症の形成につながる可能性もある。</li> <li>・in vitro 毒性に関しては、限られた文献が細胞に対する GFNs の無害性ないし毒性を示唆しているのみであり、層の数、水平方向のサイズ、硬さ、疎水性、表面機能化、用量などにより、グラフェン族内で生物学的反応が異なると仮定されている。GFNs の中には非常に疎水性のある表面積を持ち、膜脂質との有意な相互作用をもたらす直の物理的毒性につながる、もしくは生体分子の吸着をもたらす間接的毒性へとつながる可能性もあるものがあるが、標的細胞における ROS 発生自体が毒性のメカニズムである可能性がある。</li> <li>・わずかな in vivo 研究が、静脈内投与後の GFNs の全身性の生体内分布および生体内持続性を示している。他の滑らかで持続性のある、生体内耐久性のあるインプラントや異物と同様に、GFNs は異物性腫瘍を誘発する可能性を有する。GFNs のデザインにおいては、その薬物送達、再生医療、蛍光ベースの生体分子検出などについて、長期の有害影響を考慮しなければならない。</li> <li>・毒性に関連する物理学・化学的特性の組織的評価などを含む、GFNs への基本的な生物学的反応を検証するために、さらなる研究が必要である。生物学的応用を最適化することを目的に、GFNs の安全性デザインならびに製造のために、環境衛生および安全性へのリスクを最小化しつつ完全な物質の特性化ならびに毒性機構研究が必須である。</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
28	Das S, Singh S, Singh V, Joung D, Dowding MJ, Reid D, Anderson J, Zhai L, Khondaker IS, Self TW, Seal S  Particle & Particle System Characterizati on. 2013, 30, pp 148-157	Oxygenated Functional Group Density on Graphene Oxide: Its Effect on Cell Toxicity (酸化グラフェン の含酸素機能 密度:細胞毒性 に及ぼす影響)	<p>■対象物質</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・グラフェン酸化物(GO) 入手元: Cheap Tubes Inc., (USA)</li> <li>・還元グラフェン酸化物(RGO) GOを異なる時間間隔(10, 20, 30, 45, 60分)でヒドラジンによって還元。</li> </ul> <p>GOS1(サイズ: 0.4-0.8 μm)を還元したものをRGOS1、GOS2(サイズ: 0.2-0.8 μm)を還元したものをRGOS2と呼ぶ。</p>	<p>■試験細胞</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・正常ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC) 入手元: Lonza Walkersville Inc. (USA)</li> <li>・ヒト骨肉腫細胞株(MG-63) 入手元: ATCC</li> <li>・ヒト皮膚細胞(HaCaT) 入手元: ATCC</li> </ul> <p>■培養方法</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・HUVEC細胞は、2%のウシ胎仔血清(米国カリフォルニア州サンディエゴ、ScienceCell社製)と100 IU mL<sup>-1</sup>のペニシリン(米国バージニア州マナサス、Mediatech社)で補完した、内皮細胞において培養した。</li> <li>・MG-60細胞を、10%の加熱不活性化FBS(米国モンタナ州セントルイス、Sigma-Aldrich Inc.社)と100 IU mL<sup>-1</sup>のペニシリンで補完した、ATCC社製造のEagle 最小必須培地(米国バージニア州マナサス、ATCC社)において培養した。</li> <li>・HaCaT細胞を培養した。10%の加熱不活性化FBS(米国テキサス州カービル、Equitech Bio社)と100 IU mL<sup>-1</sup>のペニシリンで補完したDulbecco 変法イーグル培地において培養した。培地を5%のCO<sub>2</sub>大気環境下で培養器内に37°Cで保った。</li> </ul> <p>■試験内容/方法</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・GOとRGOの細胞毒性評価 HUVECを使用し、10 μg/mLのGOS1, GOS2, RGOS1, RGOS2をばく露。ばく露期間48時間。</li> <li>・細胞生存率測定 MTT染色解析。ばく露期間24, 48h。ばく露濃度: 1, 5, 10 μg/mL</li> <li>・サイズ依存細胞毒性の観察 対象物質を16時間、40kHzで超音波分</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・GOS1およびGOS2は、10 μg/mLの用量で強い毒性を示した。</li> <li>・RGOS1およびRGOS2は、GOS1およびGOS2より弱い毒性を示した。</li> <li>・これらの物質は、このばく露範囲内において毒性を示した。予想どおり、これらの物質を用いた48時間の培養では、24時間の培養より強い毒性が見られた。</li> <li>・HaCaTとMG63細胞双方におけるMTTアッセイを実施し、同様の所見が得られた。これらに基づく、いくつかの細胞培養モデルにおいて、RGOはGOより毒性が弱いことを示す。</li> </ul> <p>■サイズ依存的細胞毒性</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・細胞内相互作用および小口径かつ広範に核酸したナノシートの取り込み増加により、超音波分解したGO/RGOの細胞毒性増加はある。</li> <li>・GOおよびRGOにより仲介されるROS生成細胞がGOサンプルにばく露した際、ROS濃度が上昇した。FACSおよび共焦点顕微鏡の双方により、対照群のGOサンプルよりROS生成が少ないRGOサンプル(RGOS1およびRGOS2)で処理した細胞が見られた。</li> <li>・細胞に対してRGOサンプルは、同じサイズのGOサンプルより弱い毒性を示した。</li> </ul> <p>GOばく露は、酸化ストレスにつながり、培養で評価されたとおり、GOからRGOへの還元は、酸化ストレスを減少させる。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・より小口径のGO(GOS2)は、より大きいサイズのGO(GOS1)に比べ、より多くのROS生成を誘発した。同様の口径依存性が、RGOサンプルの場合にも見られた。</li> <li>・RGOS1における酸素処理炭素の割合が減少するにつれ、細胞毒性も減少した。LDH放出アッセイにおいても同様の傾向が見られた。</li> <li>・GO/RGO表面上の有機官能基の存在が、「ナノバイオ」界面にある哺乳類の細胞との相互作用に影響を与えた。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・GO/RGO ナノシートのサイズは、GO/RGO 仲介の毒性において重要な役割を担い、シートのサイズが小さいほど毒性が高くなる。</li> <li>・GOの表面上の官能基の程度は、細胞の生存能力に直接影響を与えた。</li> <li>・毒性は細胞中のROS生成の誘発によりもたらされた。</li> <li>・GO表面上の官能基を減らすことにより、酸化ストレスを低下させDNA損傷を撲滅することは可能であった。</li> </ul>

			<p>解し観察。AFM で測定。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>細胞内 ROS レベルの測定</li> <li>濃度 10 <math>\mu</math>g/mL の HUVEC を 24 時間対象物質にばく露し、H2-DCFDA で染色。</li> <li>FACS, 共焦点顕微鏡検査</li> <li>特異的に還元した RGO の細胞毒性評価</li> <li>MTT 解析、LDH 解析</li> <li>HUVEC 内の DNA 損傷分析(濃度 10 <math>\mu</math>g/mL、ばく露期間:24h)</li> <li>コメット解析</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>酸素官能基の還元により、RGO が生物学的により生物学的不活性になったため、細胞毒性が低下した。</li> <li>■酸化ストレスマーカー遺伝子および DNA 損傷の発現</li> <li>GO で処理した細胞において、有意なレベルの DNA 損傷が見られたが、RGO で処理した細胞においては DNA 損傷の程度は非有意であった。</li> <li>GO により誘発される酸化ストレスが、細胞における DNA 損傷につながった。</li> <li>二次元構造の GO も、10 <math>\mu</math>g/mL の濃度で、DNA 損傷を誘発する可能性がある。</li> <li>RGO の還元時間を 30 分から 60 分に増やすと、(酸化炭素含有量が低下するため)DNA 損傷が有意に減少した。</li> </ul>	
--	--	--	--	---	--

【酸化チタン】

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
29	A. Noel, K. Maghni, Y. Cloutier, C. Dion, K.J. Wilkinson, S.Halle, R. Tardif, G. Truchon  Toxicology Letters 214 (2012), pp 109-119	Effects of inhaled nano-TiO <sub>2</sub> aerosols showing two distinct agglomeration states on rat lungs (ラットの肺におけ る2つの異なる凝 集体を示すナノ 酸化チタンエアロ ゾルの吸入効果)	■対象物質 ナノ酸化チタン 入手元 Nano structured and Amorphous Materials Inc. (USA) ・粒径 5nm ・比表面積 200-220m <sup>2</sup> /g	■試験生物 ・雄フィッシャーラット(F344 ラット) 入手元 : Charles River Breeding Laboratories (Canada) 体重 169±13g ■試験方法・ばく露期間 500-L の立方体ステンレ スチール吸入チャンバ ー内で吸入ばく露が行 われ、エアロゾルをラ ットの鼻のみにばく露 するために吸排気口を 吸入チャンバーの一つ の壁のみに設置した。 5nm のナノエアロゾル を 6 時間ばく露した 4 グループ(n=6)のラッ トと、清浄圧縮空気を ばく露した 2 つの対 照群に分けた。ナノ エアロゾルは質量濃 度 2 or 7mg/m <sup>3</sup> で大 (>100nm) 小(<100 nm)凝集体によって 構成されたサイズ分 布により発生した。最 終ばく露 16 時間後、 肺の毒性細胞やマー カーを測定するために 気管支肺胞洗浄(BAL) を行った。	■ラットの肺毒性 ・質量濃度 2mg/m <sup>3</sup> で 大小両方の凝集体を ばく露したラットの 管支肺胞洗浄液(BALF) 細胞分析では、対 照群と比べ、マク ロファージ数、好中 球数、細胞数の全 てにおいて数値上 大きな違いは見 られなかった。一 方、高濃度(7mg/m <sup>3</sup> ) 時で大凝集体をば く露すると、対 照群に比べ好中球 数は大幅に上昇 したが、同濃度 で、小凝集体をば く露した場合の上 昇はわずかなも のであった。さ らに、細胞計数は 異なる濃度であ っても、全てのグ ループで大きな 差は生まれな かった。 ・全てのグループ で分析された炎症 伝達物質はキット の閾値以下であ った。(IL-1α<6.23 pg/mL, IL-6<9.80 pg/mL, TNF-α<4.44 pg/mL)。濃度 7mg/ m <sup>3</sup> でばく露した 2 つのグループ では、それほど 大幅な MCP-1 の 上昇は見られ なかった。濃度 2 mg/m <sup>3</sup> と 7mg/m <sup>3</sup> でばく露したラ ットの細胞毒性・ 酸化ストレス指 標の測定では、 ALP, LDH, 総タン パク量, HO-1, 8-Isoprostane, 総 GST 量の数字上 に大きな違いは 検出されな かったが、対 照群と比べると、 LDH と 8-Isopro stane では小凝 集体で構成され た 7mg/m <sup>3</sup> の ナノエアロゾル においてほぼ倍 (p=0.065)の値 を示した。 ・全てのグループ において、巨大な 細胞(マク ロファージ)は ほとんど検出 されず、大部 分の細胞は標 準的であり、 対照群でも標 準的なマク ロファージ、 リンパ球、 好中球が検 出された。ナ ノ酸化チタン を含む細胞は これらのグ ループから は観測され なかった。	・100nm を基準に 大小異なる二 つの凝集体 における 5nm の酸化チタ ンの急性吸 入は、過程 は異なり共 に軽度では あるが濃度 7mg/m <sup>3</sup> 時 に肺への影 響をもたら した。 ・急性炎症 反応が大き め(>100nm) の凝集体へ のばく露か ら生じ、BALF によって測 定された明 らかに免疫 細胞活性化 の無い細胞 傷害・酸化 ストレスを 示す傾向は、 小さめ(<100 nm)の凝集 体で確認さ れた。 ・ナノ粒子 に対する生 物学的反応 は、単にナ ノ粒子の大 きさによっ て決まるの ではなく、 ナノ粒子凝 集体の大 きさが関係 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
30	Jin C, Liu Y, Sun L, Chen T, Zhang Y, Zhao A, Wang X, Cristau M, Wang K, Jia W  Journal of Applied Toxicology	Metabolic profiling reveals disorder of carbohydrate metabolism in mouse fibroblast cells induced by titanium dioxide nanoparticles (代謝のプロファイ リングによりマ ウスの線維芽細 胞における二酸 化チタンナノ粒子 により誘発される 炭水化物代謝障 害の発生が示さ れる)	<p>■対象物質 二酸化チタン(<math>\text{TiO}_2</math>) 直径:5nm 試験用の凝集体 20-50nm 固形分:2% pH値:6.0-8.0 入手元:Sunrise Chemical Co. (China)</p> <p>■細胞特性測定と分散 <math>\text{TiO}_2</math> ナノ粒子コロイド をPBS、培養液、純粋 のいずれかに分散。5 分間超音波処理した のち、<math>\text{TiO}_2</math> ナノ粒子懸 濁液をTEMとPCSで 分析。乾燥後、微量金 属不純物をICP-AES を用いて測定。<math>\text{TiO}_2</math> ナ ノ粒子の結晶化を XRDで分析し、結晶化 度をTOPAS Pを用い て算出。</p>	<p>■実験細胞 マウス線維芽細胞 (L929) 入手元:Cell Bank of Shanghai Institutes for Biological Sciences (China)</p> <p>■細胞培養 細胞を、10%FBS、 100U ml<sup>-1</sup>ペニシリン および100 <math>\mu\text{g ml}^{-1}</math>ス トレプトマイシンを含 み、5%CO<sub>2</sub>の加湿 環境(37°C)でDMEM 内にて培養。</p> <p>■ばく露期間 48時間</p> <p>■試験内容 ・細胞毒性評価 多変量統計解析を 併用した GC/TOFMSによる分 析。</p>	<p>■チタンナノ粒子の用量依存性細胞毒性試験 GC/TOFMS分析において、L929細胞中の総イオン量クロマトグ ラム(TIC)において、対照群と比べ、異なるチタンナノ粒子濃度(0 ~300 <math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)へのばく露後に採取された内因性代謝物濃度 に、明らかな変化が見られた。低濃度(50 <math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)のチタンナ ノ粒子では、可視型指紋認識の結果は、対照群と同様であっ た。チタンナノ粒子の濃度が高まる(100~300 <math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)につ れ、TICスペクトルにおいて、L929細胞中の<math>\alpha</math>-ケトグルタラ ート、3-ホスホグリセリン酸、フルクトース、リボース、リボース-5- リン酸塩、アデノシン、ニコチンアミド、リン酸塩、グリセルアルデ ヒドおよびL-<math>\alpha</math>-アラニンなどのいくつかの重要な代謝物に対す るピーク強度が徐々に変化した。これらの代謝物のピーク区域 における変化は、L929細胞において、チタンナノ粒子用量依存 性の細胞毒性であった。しかしながら、チタンナノ粒子へのばく 露後(300 <math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)では、培地の栄養素における変化が見られ なかった。この結果により、チタンナノ粒子は培地に対して干渉 しないということがわかった。</p> <p>■チタンナノ粒子起因の炭水化物代謝障害 100 <math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>のチタンナノ粒子にばく露したL929細胞/対応する 培地と対照群の間の最も有意な差異は、炭水化物代謝の変化 であった。糖分のポリオールを除き、細胞内リン脂質に関連す る、リン酸塩、エタノールアミンおよびグリセロール-3-リン酸塩 などの、チタンナノ粒子にばく露したL929細胞における3種類 の代謝物の濃度が、有意に低下した。逆に、対応する培地のコ レステロール濃度は上昇した。</p>	チタンナノ粒子の細胞毒 性の研究に、多変量統 計解析と併用した GC/TOFMSを用いた。 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ を超える濃 度のチタンナノ粒子を L929細胞に添加すると、 主に、異常なエネルギー 過程後の細胞の炭水化 物代謝障害、ペントース リン酸経路およびヌクレ オチド代謝阻害、ミトコン ドリア損傷および細胞参 加ストレス増加を起かさ せることがある。

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
31	Du H, Zhu X, Fan C, Xu S, Wang Y, Zhou Y  Environmen- tal Toxicology, Vol 27, issue 10, pp 590-597	Oxidative damage and OGG1 expression induced by a combined effect of titanium dioxide nanoparticles and lead acetate in human hepatocytes (ヒト肝細胞におけ る酸化チタンナノ粒 子と酢酸塩の複合 効果により誘発す る酸化ストレスと OGG1 発現)	■対象物質 TiO <sub>2</sub> (P25) 入手元: Degussa (Germany) 直径: 21nm (TEM, X-ray diffraction 分析) 含有量: ア ナターゼ 80%、ルチル 20% 表面積: 49.6m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup>	■試験細胞 正常ヒト肝細胞(L02) 入手元: China Center for Type Culture Collection (China) ■培養方法 ・10%FBS、100Uml <sup>-1</sup> ペニシリ ン/ストレプトマイシンで補填 した DMEM 内で培養。 (5%CO <sub>2</sub> 気温 37°C環境) ■酸化ストレス測定 ばく露後、 20mmolL <sup>-1</sup> 2,7-dichlorofluores cin DCF) diacetate と培養し、 30 分後にフローサイトメリー 分析により測定。 ■細胞生存率評価 多機能マイクロプレートリーダ ー(Tecan, Austria)で 490nm の光学濃度の下、測定。 ■8-OHdG 検出 電気化学検出器 (Waters, USA)と高性能液体クロマトグ ラフィーを使用。 ■OGG1 検出 化学発光気質検出試薬 (Thermo, USA)使用。	■細胞生存度 酸化チタンナノ粒子および酢酸塩単体のばく露および混合ばく露 の後、細胞生存度の用量依存パターンが見られた。酸化チタン (10 μgmL <sup>-1</sup> )は、他の群より有意に高い細胞毒性を誘発し、0.1~ 10 μgmL <sup>-1</sup> の酸化チタンを含有する混合物は、陰性対照群より 有意に高い細胞毒性を誘発した。10 μgmL <sup>-1</sup> を含有する酸化チ タンおよび 1 μgmL <sup>-1</sup> の酢酸塩に対しては、他の群と比べ、細胞 生存度が有意に低下した。 ■細胞の酸化ストレスおよび抗酸化濃度 酸化チタン単体および混合物は、用量依存パターンで活性酸素 種生成を誘発した。酸化チタンもしくは酢酸塩単体へのばく露で は、対照群と比べ、高濃度の活性酸素種を生成せず、陰性対照 群プラス酢酸塩との比較では、すべての混合物へのばく露におい て、L02 細胞における活性酸素濃度が有意に上昇した。グルタチ オン濃度およびスーパーオキシドジスムターゼ活性値に関して は、細胞が酸化チタン単体にばく露した際、用量依存パターンが 見られた。酸化チタンないし酢酸塩単体へのばく露後、スーパー オキシドジスムターゼ(SOD)活性値およびグルタチオン(GSH)濃度 に有意な変化は見られなかったが、0.01、0.1 および 1 μmL <sup>-1</sup> 混 合物へのばく露では、1 μmL <sup>-1</sup> の酢酸塩単体へのばく露と比べ、 GSH 濃度が有意に上昇した。さらに、陰性対照群と比べ、0.1 およ び0.01 μmL <sup>-1</sup> 混合物による、SOD 活性値における有意な上昇が 見られた。 ■8-OHdG(8-ヒドロキシデオキシグアノジン)生成 また、混合物へのばく露により、8-OHdG の用量依存的生成が認 められた。酸化チタンもしくは酢酸塩単体へのばく露では、 8-OHdG 生成の著しい上昇は見られなかったが、陰性対照群と比 べ、10 および 1 μmL <sup>-1</sup> の混合物により誘発される 8-OHdG 生成 は著しく上昇した。さらに、1 μmL <sup>-1</sup> 酢酸塩単体に比べ、10 μ mL <sup>-1</sup> の混合物は 8-OHdG の生成上昇を誘発させた。 ■グリコシラーゼホモログ 1(OGG1)遺伝子発現 混合物へのばく露は、OGG1 遺伝子の用量依存パターンを誘発し たが、酸化チタンもしくは酢酸塩単体へのばく露の後では、OGG1 遺伝子の有意な変化は検知されなかった。陰性対照群および 1 μmL <sup>-1</sup> の酢酸塩と比較すると、0.01 μmL <sup>-1</sup> 混合物を除き、混合 物では OGG1 濃度上昇となった。酸化チタン濃度が上昇すると、 酸化チタンと酢酸塩が、相乗的に OGG1 発現率を上昇させた。	紫外線照射下で 24 時 間、低濃度 (<10 μ gmL <sup>-1</sup> )の酸化チタンおよ び酢酸塩にばく露する と、L02 細胞内で、酸化 ストレス、酸化的 DNA 損傷、OGG1 遺伝子発 現および細胞毒性が増 加した。 酸化ストレスは、細胞毒 性および DNA 損傷に関 与する主なメカニズムで ある。これらの混合物へ のばく露で活性酸素種 の生成を誘発し、これに より、SOD 活性値およ び GSH 濃度などの細胞 防御発現上昇が誘発さ れたが、高濃度では発 現低下が誘発された。

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
32	Montiel-Dávalos A, Ventura-Gallego s JL, Alfaro-Moreno E, Soria-Castro E, García-Latorre E, Cabañas-Moreno JG, Del Pilar Ramos-Godinez M, López-Marure R  Chemiscal Research Toxicology 2012, 25, pp 920-930	TiO <sub>2</sub> nanoparticles induce dysfunction and activation of human endothelial cells (TiO <sub>2</sub> ナノ粒子 はヒト内皮細胞 の機能不全お よび活性化を誘 発する)	■対象物質 酸化チタン 入手元: Paris Drugstore (Mexico) サイズ: <50nm 凝集体サイズ: 421 ±4.3nm ゼータポテンシャル: -6.98mV 純度: アナターゼ 96%、ルチル<4%	■試験細胞 正常ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC) ■培養方法 10%FBS、2mM グルタチオン、1mg/mL ヘパリン、 20 μg/mL 内皮マイトジェンで補填した M199 内のゼラチンによって被覆した培養皿上で培養。 ヒト組み換え TNF-α (10ng/mL) にばく露した培養物を 内皮活性の対照群として使用。10%FBS、L-glutamine (2mM) で補填した RPMI-1640 培地でヒト白血病前単球 U937 を培養。 ■ばく露濃度 5, 10, 20, 40 μg/cm <sup>2</sup> ■試験方法 ・細胞増殖測定 クリスタルバイオレット染色使用 ・細胞死検出 アポトーシス、壊死細胞の検出用にホスファチジル セイン(PS)転位を観察。 ・U937 細胞の内皮細胞への粘着性測定 倒立顕微鏡(Nikon 社 TMS)使用 ・粘着性・炎症分子発現の評価、酸化ストレス測定/ フローサイトメトリー法 ・TiO <sub>2</sub> の NF-κB 経路活性誘発検査 EMSA 分析	■TiO <sub>2</sub> 細胞増殖を阻害 ・TiO <sub>2</sub> は、用量依存的かつばく露時間依存的に、細胞増殖を阻害した。 ・40 μg/cm <sup>2</sup> で 72 時間のばく露で、90% の阻害率という最大の作用が見られた。 ■TiO <sub>2</sub> 誘発性細胞死 ・対照細胞と比べ、TiO <sub>2</sub> は、すべての濃度で、細胞のおよそ 20%においてアポトーシス細胞死を、60%において壊死を誘発した。 ■TiO <sub>2</sub> U937 細胞の HUVEC への接着性を誘発 ・すべての濃度範囲において、TiO <sub>2</sub> は、U937 細胞の HUVEC への強い接着性を誘発したが、最大の増加は、5 と 10 μg/cm <sup>2</sup> で見られた(対照細胞に比べ 8 倍の増加)。 ■TiO <sub>2</sub> 誘発性炎症性分子発現 ・TiO <sub>2</sub> は ROS 生成において、5 μg/cm <sup>2</sup> で 7 倍、20 μg/cm <sup>2</sup> で 9 倍の上昇を誘発した。TiO <sub>2</sub> は硝酸塩生成を上昇させ、上昇は 20 μg/cm <sup>2</sup> で 24 時間の処置~72 時間まで続いた。 ・EMSA 法では、テストをした双方の濃度で、TiO <sub>2</sub> が NF-κB 核転座を誘発したことがわかった。	TiO <sub>2</sub> は以下により HUVEC の細胞毒性を誘発する: (1) 細胞増殖の阻害 (2) 接着分子の発現率増加の誘発、その後単球接着の増加の誘発 (3) NF-κB 経路の活性化に関連する ROS ならびに NO 生成増加により仲介される、酸化ストレスの誘発 (4) アポトーシスおよび壊死による細胞死の誘発。

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	Jugan ML, Barillet S, Simon-Deckers A, Herlin-Boime N, Sauvaigo S, Douki T, Carriere M  Nanotoxicology, 2012; 6(5): 501-513	Titanium dioxide nanoparticles exhibit genotoxicity and impair DNA repair activity in A549 cells (酸化チタンナノ 粒子は A549 細 胞の DNA 回復 を損ない遺伝毒 性を発現する)	■酸化チタン 名称(サイズ)/入手 元 A12(12nm)/Laborat ory Francis Perrin A25(24nm)/Deguss A140(142nm)/Sigm a R68(9nm)/Sigma R20(21nm)/ Laboratory Francis Perrin  ナノ粒子を 10mg.ml <sup>-1</sup> 濃度、振 動状態(1 s on /1 s off)、4°C、30 分間 の超音波分解の条 件で超高純度の滅 菌水内で分散。	■試験細胞 A549 ヒト肺胞基底上 皮腺がん細胞 入手元: ATCC ■培養方法 10%FBS、50IU.ml <sup>-1</sup> ペ ニシリン、50 μg.ml <sup>-1</sup> 、 2mM L-グルタチオン で補填した 4.5g.l <sup>-1</sup> を含 んだ DMEM 内で培養。 ■試験方法 ・細胞毒性・細胞死率 評価 MTT 解析、クローン 形成活性解析 ・細胞内酸化状態評 価 H <sub>2</sub> DCFDA 解析 ・DNA へのダメージ評 価 コメット解析 ・酸化チタンにばく露し た A549 細胞の BER と NER の評価 Multiplexed excision/Synthesis 解析	■ナノ粒子の特性か、細胞毒性および細胞の内在化 ・直径 100 nm 未満の、金紅石と鋭錐石双方の丸い形状の TiO <sub>2</sub> -NPs が、直径 100 nm を超える TiO <sub>2</sub> -NPs より顕著な毒性影 響を示した。TiO <sub>2</sub> -A140 および-R68 は、48 時間のばく露後、それ ぞれ 10%、1%未満の致死性しかもたらさなかった。TiO <sub>2</sub> -A12、 -A25 および-R20 などのより顕著な細胞毒性イベントを誘発した TiO <sub>2</sub> -NPs は、48 時間のばく露後、25%の細胞死しか生じさせなかつ た。 ■細胞の酸化状態 ・A549 細胞の TiO <sub>2</sub> -NPs への短期ばく露(4 時間)後、直径、形 状、結晶相にかかわらず、細胞内の ROS 生成が有意に増加し た。H <sub>2</sub> DCFDA アッセイ(AI <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 、SiC、SiO <sub>2</sub> 、Au、カーボンナノチュ ーブ)において研究所で検査された全 NPs は、細胞内の ROS 含 有量の増加を生じさせた(データなし)。 ・A25 にばく露した細胞においては、細胞内の ROS 生成は、ばく 露 15 分後に早々に開始し、ばく露 4 時間の安定レベルに達する まで増加を続けた。24 時間のばく露後、細胞内の ROS 含有量 は、TiO <sub>2</sub> -A12、-A25 および-R20 にばく露した細胞において、未 ばく露の細胞より高めのものであった。 ■DNA 損傷 ・4 時間のばく露後、どんな TiO <sub>2</sub> -NPs であれ、DNA 切断のレベ ルの有意な上昇が見られた。24 時間のばく露後、切断のレベルは さらに上昇した、依然として TiO <sub>2</sub> -A12、-A25、-R20 へのばく露で のみ統計的に有意であったが、TiO <sub>2</sub> -R68 および-A140 へのばく 露では統計的に有意ではなかった。48 時間のばく露後、ばく露し た細胞における切断の頻度が劇的に低下した。 ■細胞の DNA 損傷修復能力 ・24 時間のばく露後、TiO <sub>2</sub> -A12 および-A140 は、未ばく露の細胞 に比べ、検査された病変の細胞切除/修復能力を劇的に減少さ せた。BER および NER の経路は同程度まで阻害された。 TiO <sub>2</sub> -R68 と TiO <sub>2</sub> -R20 の細胞においては、阻害も有意であつた が、未ばく露の細胞ほど顕著ではなかった。逆に言えば、 TiO <sub>2</sub> -A25 は検査されたすべての病変の修復能力を高めた。 48 時間のばく露後、阻害は全体的となり、TiO <sub>2</sub> -A25 さえも検査さ れたすべての病変の修復力を阻害させた。	・TiO <sub>2</sub> -NPs は、酸化 ストレスを生じさせ、 A549 細胞に対して遺 伝毒性を見せる。 ・より小さく球状の NPs には、その結晶相と は無関係に、より顕著 な毒性作用が見られ る。 ・一本鎖切断及び 8-oxodGuo を含むが 二本鎖切断や染色体 切断・損失は含まな い、酸化による DNA 損傷が生じた。

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												
34	Prasad RY, Chastain PD, Nikolaishvili-Fein berg N, Smeester L, Kaufmann WK, Fry RC  Nanotoxicology, 2012; Early Online, 1-9	Titanium dioxide nanoparticles activate the ATM-Chk2 DNA damage response in human dermal fibroblasts (酸化チタンナ ノ粒子はヒト皮膚 線維芽細胞に おいて ATM-Chk2 DNA 損傷反応 を活性化させ る)	■対象物質 酸化チタン サイズ:15nm 100%アナターゼク リスタル 入手元: NanoAmor (USA)	■試験細胞 ヒト皮膚線維芽細胞 ■培養方法 10%FBS, 1%PSN で補填した DMEM 内において 37°C、 5%CO <sub>2</sub> の環境で培養。 <table border="1"> <thead> <tr> <th>濃度 (<math>\mu</math>g/ml)</th> <th>サイズ(nm)</th> <th>ζポテンシャル (mV)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>325.93<math>\pm</math>10.34</td> <td>-0.64<math>\pm</math>0.51</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>314.37<math>\pm</math>20.41</td> <td>-0.48<math>\pm</math>0.11</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>397.33<math>\pm</math>17.48</td> <td>-0.78<math>\pm</math>0.05</td> </tr> </tbody> </table> (DLS 測定) ■細胞生存率評価 Trypan blue 色素排除解析 ■pH2AX, pATM, pChk2 の免疫細胞化学分析 免役体の発現を Aperio Nuclear V9 で測定。 ■DNA 修復経路測定 Western blotting 法	濃度 ( $\mu$ g/ml)	サイズ(nm)	ζポテンシャル (mV)	1	325.93 $\pm$ 10.34	-0.64 $\pm$ 0.51	3	314.37 $\pm$ 20.41	-0.48 $\pm$ 0.11	10	397.33 $\pm$ 17.48	-0.78 $\pm$ 0.05	・濃度依存的ナノ TiO <sub>2</sub> へのばく露により ヒト皮膚線維芽細胞の生存能力が低 下。ナノ TiO <sub>2</sub> で処理したヒト皮膚線維芽 細胞の生存能力に、濃度依存的低下が 見られた。24 時間のばく露後、30 および 100 $\mu$ g/mL で、ナノ TiO <sub>2</sub> で処理したヒト 皮膚線維芽細胞における有意な細胞毒 性が見られた。 ・免疫細胞化学試験結果が示すとおり、 ナノ TiO <sub>2</sub> へのばく露は H2AX、ATM およ び Chk2 のリン酸化反応に関連 ・24 時間のばく露後、ナノ TiO <sub>2</sub> は、正電 荷の原子核(%)により判明したとおり、1 および 3 $\mu$ g/mL で pH2AX を統計的有意 に上昇。 ・24 時間のばく露後、pATM では、3 $\mu$ g/mL で正電荷の原子核(%)における統 計的有意な上昇が見られた。 ・24 時間のばく露後、PChk2 では、1 およ び 3 $\mu$ g/mL で正電荷の原子核(%)にお ける統計的有意な上昇が見られた。 ・ヒト皮膚線維芽細胞がナノ TiO <sub>2</sub> ばく露 に反応し ATM/Chk2DNA 損傷反応経路 を活性化、ナノ TiO <sub>2</sub> の濃度上昇ととも に ATM リン酸化が増加し、3 および 10 $\mu$ g/mL で有意な増加を示した。	ナノ TiO <sub>2</sub> にばく露 したヒト皮膚線維 芽細胞は、主に ATM/Chk2 経路を 介して反応する。
濃度 ( $\mu$ g/ml)	サイズ(nm)	ζポテンシャル (mV)																
1	325.93 $\pm$ 10.34	-0.64 $\pm$ 0.51																
3	314.37 $\pm$ 20.41	-0.48 $\pm$ 0.11																
10	397.33 $\pm$ 17.48	-0.78 $\pm$ 0.05																

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	De Angelis I, Barone F, Zijno A, Bizzarri L, Russo MT, Pozzi R, Franchini F, Giudetti G, Uboldi C, Ponti J, Rossi F, De Berardis B  Nanotoxicology, 2012; Early Online, 1-12	Comparative study of ZnO and TiO <sub>2</sub> nanoparticles: physicochemical characterization and toxicological effects on human colon carcinoma cells (酸化チタンと酸化 亜鉛のヒト結腸癌 細胞における毒物 学的影響、物理化 学的特性)	■酸化亜鉛 入手元: Sigma サイズ: 50-70nm ・酸化チタン 入手元: Sigma サイズ: <25nm 純度: 99.7%  両ナノ粒子をエタノール培養培地、無血清培養培地に最終濃度 0.1mg/mL で懸濁。	■ヒト結腸癌由来の細胞株(Caco-2) 入手元: ATCC ■培養方法 加熱不活性化した 10%FCS、10mM HEPES、1% 非必須アミノ酸、4mM/L グルタミン、100 μg/ml ストレプトマイシン、100IU/mL ペニシリンで補填した高グルコースを含む DMEM 内(室温 37°C、5%CO <sub>2</sub> 、湿度 90%)で培養。 ■細胞生存率・毒性測定 NRU 解析、CFE 解析 ■ROS 産出の検出 DCFDA 解析 ■炎症誘発メディエーター放出測定 TNF-α、IL-6、IL-8 のサイトカイン放出を測定。ELISA kit 使用。	■Caco-2 細胞上で ZnO および TiO <sub>2</sub> 処理により誘発される細胞毒性 ・NRU アッセイにより、ZnO NPs の存在下で、6 時間および 24 時間の処置の後、細胞生存能力の用量依存的低下が見られ、統計的有意な値の上昇が見られた。FCS の存在は、おそらく NP 表面とのタンパク質相互作用を介して、ZnO NP の毒性作用をかなり低下させた。メートル計量での用量(質量、表面積ないし粒子数)にもかかわらず、用量生存能力曲線は同一であり、ZnO NPs のみが有意な細胞死を誘発した。 ・CFE により、血清の存在下(p<0.05)および血清の非存在下(p<0.01)で、15 μg/mL の ZnCl <sub>2</sub> への 6 時間のばく露後、統計的に有意な毒性が見られたが、25、50、100 μg/mL では、完全な細胞死を誘発した。6 および 24 時間のばく露後、血清の存在如何にかかわらず、TiO <sub>2</sub> に関する Caco-2 細胞への細胞毒性は見られなかった。 ■NP ばく露誘発性の ROS 生成の分析 ・DCFDA により、ZnO および TiO <sub>2</sub> NPs の細胞間 ROS 生成能力を測定した。ZnO NPs 1 および 2.5 μg/cm <sup>2</sup> において、ROS 生成を評価した。それ以上の濃度で誘発された細胞毒性作用は、信頼性のある ROS 生成評価を。TiO <sub>2</sub> NPs に対しては、1~20 μg/cm <sup>2</sup> の範囲の全用量を試験した。 ■炎症性メディエーター放出への NPs の影響 TiO <sub>2</sub> NPs へのばく露では、6 時間の処理後、IL-8 放出は誘発されなかった。24 時間の培養後、1 μg/cm <sup>2</sup> で 121 ± 6pg/mL、2.5 μg/cm <sup>2</sup> で 162 ± 9pg/mL(p<0.05)のわずかな放出が見られた。	・2 つの異なるアッセイによる評価では、ZnO NPs のみが有意な細胞毒性を生じさせた。 ・培養液中の仔ウシの血清が、ZnO NPs の毒性、イオン漏出および NP 細胞間の相互作用を有意に減少させた。 ・2 つの NPs は、6 時間の処理後、細胞間の ROS を増加させた。 ・ZnO NPs のみが ROS を増加させ、6 時間および 8 時間の処理後、IL-8 の放出を誘発した。 ・化学組成と溶解性が、イオン漏出と無血清培養地での NPs との細胞相互作用に関連することがわかった。

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
36	Ahmad J, Dwivedi S, Alarifi S, Al-Khedhairi AA, Musarrat J  Mutation Research 747 (2012), pp 246-252	Use of $\beta$ -galactosidase (lacZ) gene $\alpha$ -complementat ion as a novel approach for assessment of titanium oxide nanoparticles induced mutagenesis  ( $\beta$ ガラクトシダー ゼの $\alpha$ -補完性を 利用し、突然変 異生成によって 誘発した酸化チタ ンナノ粒子評価 のための新アプ ローチ)	■対象物質 粉末状多面体ルチ ル酸化チタンナノ粒 子 平均サイズ: 30.6nm 入手元: Algarh Muslim University (India)  均質の懸濁液を得る ために、15 分間超純 水(ミリ Q 水)内で超 音波分解。  薬剤耐性遺伝子 pUC19 を QIAGEN プ ラスミドミニキットを 使用し抽出。  アンピシリン、 MgCl <sub>2</sub> 、CaCl <sub>2</sub> 、 X-gal、IPTG を Sigma Chemistry 社(USA) から入手	■試験細胞・遺伝子 ・大腸菌 DH5 $\alpha$ ・PUC19  ■試験方法 ・pUC19 プラスミドで 処理した酸化チタン ナノ粒子による E. coli(DH5 $\alpha$ ) 宿主細 胞生存率と形質転 換。 コロニー解析法 ・Lac <sup>+</sup> バクテリアの突 然変異体(White コロ ニー)と普通体(Blue コロニー)の数量測 定。 Blue:White コロニー 解析 ・損傷した pUC19 プ ラスミド DNA 内の酸 化チタンナノ粒子の 突然変異分析/多 配列分析	■試験結果 ・5、10、25 および 50 $\mu$ g/mL の濃度で 6 時間 TiO <sub>2</sub> -NPs で処理した E. coli DH5 $\alpha$ 細胞には、コロニー形成能力向 上が見られた。TiO <sub>2</sub> -NP で処理した細胞の生存能力(%) が、濃度 5 および 50 $\mu$ g/mL で、それぞれ 83.1 $\pm$ 3.9 から 38.1 $\pm$ 3.1 に濃度依存的に低下した。 ・事実上、未処理の対照群に比べ、アガロースゲル上 に、サイズ縮小ないしスペシエーションにつながる DNA 切除は見られなかった。 ・同じく 5、10、25 および 50 $\mu$ g/mL の濃度範囲において、 TiO <sub>2</sub> -NPs での処理した pUC19 の DNA を適切(lacZ-)な E. coli DH5 $\alpha$ 宿主細胞の中に移した。 ・TiO <sub>2</sub> -NPs の濃度が上昇すると、はるかに多多数の形 質転換細胞の白コロニー(突然変異体)と、有意に少な い形質転換発生頻度が見られた。形質転換能力の低下 が、TiO <sub>2</sub> -NPs の濃度と線形的に相関性があるのがわか った。 ■損傷 pUC19 プラスミド DNA における TiO <sub>2</sub> -NPs の突然 変異性プロフィールの評価 ・無作為に採取した突然変異体コロニーからの DNA 配列 には、2 から 5 までの範囲の点突然変異が見られた。コ ロニー(TiO <sub>2</sub> -W3)は例外で、150 nt の位置において、1 つ の転位型突然変異をしか見られなかった。	・指標細菌の E. coli 大腸菌株 の修復・複製機構による DNA 損傷の通常のプロセス を通じて、金属化合物 NPs により誘発された突然変異 は、容易に検出できる。 ・よって、E. coli DH5 $\alpha$ 細胞に おけるプラスミド pUC19-lacZ 遺伝的相補性は、NPs の突 然変異スペクトルの評価た めに、重要な遺伝学研究法 であることを証明した。

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
37	Lindberg HK, Falck GC, Catalán J, Koivisto AJ, Suhonen S, Järventaus H, Rossi EM, Nykäsenoja H, Peltonen Y, Moreno C, Alenius H, Tuomi T, Savolainen KM, Norppa H Mutation Research 745 (2012), pp 58-64	Genotoxicity of inhaled nanosized TiO <sub>2</sub> in mice (酸化チタンを 吸入したマウ スの遺伝毒 性)	■酸化チタン サイズ: 21nm アナターゼ 74%、板チタン 石 26% 入手元: Sigma-Aldrich (USA)	■対象生物 雄 C57BL/6J マウス 週齢: 9-11 週 入手元: Scanbur AB (Sweden)  実験用マウスにそれぞれ 0.8, 7.2, 28.5mg/m <sup>3</sup> のナノ 酸化チタンを 5 日間にわた り 4 時間/日のペースでば く露。Positive control 群に は 600mg/m <sup>3</sup> のエチレンオ キシドをばく露し観察。 ■試験内容・方法 ・DNA 損傷測定 comet 解析。最終ばく露 後すぐに測定。 ・末梢血赤血球内の小核 測定 細胞標本を蛍光色素ア クリジンオレンジで染色 し、小核の数量を計測。 ・骨髄毒性評価 PCEs 割合計測	・ comet アッセイでは、ナノ TiO <sub>2</sub> にばく露したマウスと陰性対照群を 比較した際、3 つのどの用量においても、有意な DNA 損傷誘発は 見られなかったが、エチレンオキシドで処理した陽性対照群マウス には、テイルにおいて、統計的に有意な 1.7 倍の DNA の平均比率に おける増加が見られた。 ・ BAL 細胞中の好中球の比率(%)により測定されたように、対照群に 比べ、最大濃度のナノ TiO <sub>2</sub> (平均 15%) において炎症反応の有意な 増加が見られた。 ・ 試験に使用したどのナノ TiO <sub>2</sub> の濃度においても、陰性対照群に比 べ、小核 PCEs や NCEs を有意に誘発することはなかった。エチレ ンオキシドにばく露したマウスにおいては、対照群のマウスの小核 PCEs (4.0/1000 個) に比べ、統計的に有意に高い頻度で小核 PCEs (8.3/1000 個) が見られた。どの用量においても PCEs の比率 の減少は見られなく、骨髄への毒性影響がないことを示した。 ・ 0.8mg/m <sup>3</sup> のナノ TiO <sub>2</sub> にばく露したマウスには、対照群の PCEs (1.9%; p=0.004) に比べ、有意に高い頻度で PCEs (2.7%) が見ら れたが、その値は、本研究で見られた対照群におけるばらつきの 範囲内であったため、偶然によるものであったのかもしれない。 ・ テイルの血液サンプル採取の 24 時間後 (直近のばく露 72 時間後) に採取した BAL 液において、対照群 (0.5%; p<0.05) と比べ、最大用 量 (28.5mg/m <sup>3</sup> ) のナノ TiO <sub>2</sub> (9.6%) で好中球の平均比率における有 意な増加が見られた。したがって、直近のばく露直後に見られた好 中球の増加は、3 日後も増加したままであった。初期のサンプルよ り好機のサンプルの方が、BAL 液の好中球の割合が低かったが、 その差異は統計的に有意ではなかった。	認められた肺好中球 増加症にもかかわら ず、肺に局所的にも全 身の血液中でも、遺 伝毒性は見られなか った。

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
38	Saquib Q, Al-Khedhairi AA, Siddiqui MA, Abou-Tarboush FM, Azam A, Musarrat J  Toxicologist in Vitro 26 (2012), pp 351-361	Titanium dioxide nanoparticles induced cytotoxicity, oxidative stress and DNA damage in human amnion epithelial (WISH) cells (酸化チタンナノ 粒子はヒト羊膜上 皮(WISH)細胞に おいて DNA 損 傷、酸化ストレ ス、細胞毒性を誘 発する)	■対象物質 酸化チタン サイズ: 30.6nm  粉末状の酸化チタ ン(1mg/ml)をミリ Q 水内で懸濁。	■試験細胞 ヒト羊膜上皮(WISH)細胞株 入手元: ATCC (USA) ■培養方法 室温 37°C、5%CO <sub>2</sub> 環境で、 10%FBS、1%抗生・抗菌性溶 液を補填し、RPMI1640 内で 培養。 ■ばく露濃度・期間 ばく露期間: 24h ばく露濃度: 0, 0.625, 1.25, 2.5, 5.0, 10.0 μg/ml ■試験内容/方法 ・細胞生存率評価 MTT 解析、NRU 解析。 ・蛍光プローブ DCFH-DA を 使用した、酸化チタンによっ て誘発する細胞内 ROS 生 成測定 フローサイトメトリー法。 ・DNA 損傷評価 コメット解析 ばく露期間: 6h	・MTT アッセイにおいて、TiO <sub>2</sub> -NPs に 24 時間ばく露し た細胞は、非処理群に比べ、細胞生存において濃度 依存的な低下を示した。さらに、結果は、無細胞条件 下での、TiO <sub>2</sub> -NPs のアスコルビン酸誘導の MTT 減 少への影響に関連し、40 μg/mL までの、紫色の MTT ホルマゼン生成物生成の開始への干渉は見られな かった。しかし、80 μg/mL およびそれ以上のより高濃 度 TiO <sub>2</sub> -NPs 添加により、対照群と比べ、有意 (p<0.010)な色素強度の上昇となった。 ・データは、TiO <sub>2</sub> -NPs に 24 時間ばく露した細胞の生存 率における、濃度依存的低下を示した。 ・1.25 μg/mL を超える濃度で、有意な TiO <sub>2</sub> -NPs 細胞 毒性が見られた。 ・無細胞条件下では、0.625~10 μg/mL の濃度範囲 で、TiO <sub>2</sub> -NPs の NR 染料との干渉は見られなかった。 しかし、対照群に比べ、20 μg/mL というより高濃度で の干渉は多少見られ、540nm での吸収度が有意に (p<0.05)上昇した。 ・5.0 および 10 μg/mL の TiO <sub>2</sub> -NPs 濃度で、DFC 蛍光 強度のピークにおける有意な変化が見られ、処理し た細胞における ROS 生成の増加が見られた。より低 濃度(0.625~2.5 μg/mL)の TiO <sub>2</sub> -NPs では、細胞内 ROS 濃度における有意な変化は見られなかった。 ・様々な濃度の TiO <sub>2</sub> -NPs に 6 時間ばく露した細胞で は、20 μg/mL の濃度で、DNA 損傷における有意な誘 発が見られた。	・マーカーの抗酸化濃 度および細胞内 ROS 生成における有意な 低下は、処理した細 胞中に DNA 損傷をも たらず、酸化ストレス 誘発の役割を示した。 ・培地において主に凝 集した形状で見られ る TiO <sub>2</sub> -NPs は、エン ドサイトーシスを通り、 細胞に進入する。

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
39	Yoo KC, Yoon CH, Kwon D, Hyun KH, Woo SJ, Kim RK, Lim EJ, Suh Y, Kim MJ, Yoon TH, Lee SJ  International Journal of Nanomedicine 2012;7, pp 1203-1214	Titanium dioxide induces apoptotic cell death through reactive oxygen species-mediated Fas upregulation and Bax activation (酸化チタンは活性酸素種が媒介する Fas アップレギュレーションおよび Bax 活性化を介してアポトーシス細胞死を誘発する)	<p>■対象物質 酸化チタン ・TiO<sub>2</sub><sup>P25-70</sup> サイズ: 74nm ・TiO<sub>2</sub><sup>P25-130</sup> サイズ: 133nm ・TiO<sub>2</sub><sup>P25-300</sup> サイズ: 327nm</p> <p>P25 酸化チタン粉末(21nm, アナターゼ 87%、ルチル 13%、入手元: Evonik Degussa GmbH, Germany)を脱イオン水内で 10g/L に分散した後、10 分間超音波分解。</p>	<p>■試験細胞 ・Chang(ヒト肝臓)細胞株 ・MCF10A(ヒト乳房上皮)細胞株 ・WI38(ヒト肺線維芽)細胞株 入手元: ATCC (USA) ■培養方法 1%ペニシリン/ストレプトマイシン、10%FBS を含んだ RPMI1640 培地内で培養。 ■試験内容./方法 ・細胞死減量測定、ROS 生成測定、Bax と Bak 活性測定。 フローサイトメトリー法、Western blot 解析</p>	<p>■酸化チタンは星状細胞内で水力学のサイズ依存アポトーシスを誘発する。 濃度 200ppm 以下での酸化チタンナノ粒子をばく露した Chang 細胞は有意な細胞死を引き起こさなかったが、高濃度(200, 400ppm)時では粒子のサイズを問わず劇的な細胞死を引き起こした。紫外線 A 照射し、濃度 150ppm の酸化チタン処理はサイズ依存で Chang 細胞内で細胞死を誘発した。しかし、濃度 150ppm の酸化チタンナノ処理と紫外線 A 放射単独では有意な細胞死は引き起こされなかった。紫外線 A 照射し、濃度 150ppm の酸化チタン処理は正常 MCF10A と WI38 細胞内では細胞死を誘発した。 ・TiO<sub>2</sub><sup>P25-70</sup> はカスパーゼの活性と Fas の増加によりアポトーシスを誘発する。 ・TiO<sub>2</sub><sup>P25-70</sup> はミトコンドリア膜電位を消失させ、プロアポトーシス分子の放出を誘発する。 ・細胞内 ROS の増加は TiO<sub>2</sub><sup>P25-70</sup> が誘発する Fas 増加と Bax 活性を介したアポトーシス細胞死を必須とする。 ・ミトコンドリアは TiO<sub>2</sub><sup>P25-70</sup> で処理した Chang 細胞内の ROS 産出の上昇に影響を与える可能性がある。</p>	紫外線 A 放射下の 100 nm 口径の TiO <sub>2</sub> P25-70 による代替処理により、ROS 仲介の死受容体である Fas の上方調節ならびにアポトーシス促進性タンパク質である Bax を介して、アポトーシス細胞死が誘発される。

【ナノシリカ】

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
40	J. Michael Berg, Amelia A. Romoser, David E. Figueroa, Christie M. Sayes, C.Spencer West  Toxicology in Vitro 27 (2013), pp 24-33	Comparative cytological responses of lung epithelial and pleural mesothelial cells following in vitro exposure to nanoscale SiO <sub>2</sub> (ナノスケールの シリカへの in vitro ばく露時の、 肺上皮細胞と胸 膜中皮細胞の比 較細胞反応)	■対象物質 シリカナノ粒子 入手元: NanoAmor (USA) サイズ: 33.5 ± 7.73nm Zeta potential: -47.6±5.39mV	■実験細胞 ・ヒト肺細胞基底上皮腺癌細胞(A549) 入手元: American Type Culture Collection (ATCC) 1%のペニシリン混合物と 10%の牛胎仔血清(FBS) を補填した F-12K cell culture medium を使用して 培養。 ・ヒト中皮細胞(MeT-5A) American Type Culture Collection (ATCC)から入 手。 Medium 199 を基本培地として培養。 MeT-5A 細胞株は 10%の FBS、3.3nM の上皮細胞 増殖因子(EGF)、400nM のヒドロコルチゾン、 870nM のインスリン、20mM の HEPES、微量元素 B、1%のペニシリン、ストレプトマイシン、アンフォテ リシン B 混合物を含む。 両細胞を 37°Cで 5%の CO <sub>2</sub> 条件のもと、加湿培養 器内で培養。 ■試験方法 ・細胞内酸化剤産出 シリカ 0.01-100 μg/mL で処理し、DCFH-DA 解析 で測定 ・細胞生存率 シリカ 0.01-100 μg/mL を 24 時間ばく露し、MTT 解析で測定 ・総・減少グルタチオン シリカ 0.01-100 μg/mL で処理し、GSH-GLO™ 解 析で計測	■細胞内酸化剤産出 シリカ 1 μg/mL 以上の濃度ではか なりの酸化剤産出上昇を確認し た。1-75 μg/mL にかけて、両細胞 は用量依存の上昇を示した。 最大値はそれぞれ control 群と比 べ A549 が 166%、MeT-5A が 187% であったが、100 μg/mL 時では 75 μg/mL のばく露と比べ減少した。 ■細胞生存率 A549 の MTT 解析では、高濃度シ リカ検査でわずかな減殖が起こ り、MeT-5A では 50 μg/mL のばく 露の際に著しい減殖が見られた。 MeT-5A の細胞生存率はシリカ 75 μg/mL でのばく露時が最少となっ た。 ■グルタチオン測定 A549 の GSH レベルはシリカ 75 μ g/mL で著しく減少し、MeT-5A の GSH レベルは全てのばく露濃度 (0.01-100 μg/mL)でかなりの減少 が見られた。	A549 と MeT-5A の両細胞 共に今回行われた実験で 脆弱性が明らかになった が、A549 の方が、若干抵 抗力が強いことが認めら れた。(回復力がある)

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																		
41	Hirai T, Yoshikawa T, Nabeshi H, Yoshida T, Tochigi S, Ichihashi K, Uji M, Akase T, Nagano K, Abe Y, Kamada H, Itoh N, Tsunoda S, Yoshioka Y, Tsutsumi Y  Particle and Fiber Toxicology 2012, ( <a href="http://www.particleandfibretoxicology.com/content/9/1/3">http://www.particleandfibretoxicology.com/content/9/1/3</a> )	Amorphous silica nanoparticle size-dependently aggravate atopic dermatitis-like skin lesions following an intradermal injection (皮内注射による非結晶質シリカは、サイズ依存の傾向でアトピー性皮膚炎のような肌への損傷を悪化させる)	<p>■対象物質 非結晶質シリカ 粒子サイズ: 30(nSP30), 70(nSP70), 100(nSP100), 300(nSP300), 1000nm(mSP 1000)</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>粒子サイズ(nm)</th> <th>PBS 直径(nm)</th> <th>平均ゼータポテンシャル(mV)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1000</td> <td>1136±32.1</td> <td>-33.2±1.4</td> </tr> <tr> <td>300</td> <td>264±7.2</td> <td>-25.8±0.7</td> </tr> <tr> <td>100</td> <td>106±0.6</td> <td>-24.3±0.5</td> </tr> <tr> <td>70</td> <td>76±1.7</td> <td>-19.5±1.0</td> </tr> <tr> <td>30</td> <td>39±4.2</td> <td>-14.0±1.3</td> </tr> </tbody> </table> <p>シリカ粒子の懸濁液(25, 50mg ml<sup>-1</sup>) 入手元: Micromod Partikeltechnologie GmbH (Germany) ■研究手順 試験マウスを各グループ(PBS, DP, Dp+ mSP 1000, Dp+ nSP300, Dp+ nSP100, Dp+ nSP70, Dp+ nSP30)に分類。PBSグループは20μlのPBS、Dpグループは20μgのPBSに2.5μgのDp ダニアレルゲンを摂取し、Dp+グループはPBS20μlに2.5μgDpと250μgシリカナノ粒子を混ぜたものを注入。</p>	粒子サイズ(nm)	PBS 直径(nm)	平均ゼータポテンシャル(mV)	1000	1136±32.1	-33.2±1.4	300	264±7.2	-25.8±0.7	100	106±0.6	-24.3±0.5	70	76±1.7	-19.5±1.0	30	39±4.2	-14.0±1.3	<p>■試験生物 NC/Nga slc マウス (自然発症皮膚炎モデル) 性別: 雄 週齢: 8 週 入手元: Nippon SLC (Japan) 実験期間: 19 日間</p> <p>■AD-like 皮膚障害のシリカナノ粒子のサイズによる影響 方法: マウスの耳の厚さ(炎症反応)の観察 ■Dp+SPs 注入マウスのDp 特定免疫反応 方法: ELISA ■インターフェロンγとIL-4 産生細胞の検出 方法: ELISPOT 法</p>	<p>Dp 単体と比較して、DpとサブミクロンサイズのSPs、mSP1000ないしSP300の混合注入では、耳介肥厚化が増進されなかった。それとは対照的に、DpとnSPs(nSP100、nSP70、nSP30)混合注入では、2~5倍、耳介肥厚化が増進された。nSPによる処理では、耳介肥厚化させる強い傾向が見られた。したがって、直径≤100 nmのnSPsは、このモデルにおいて特に耳介肥厚化を増進させた。 Dp 注入は、PBS 注入に比べ、有意な炎症性細胞濾過を発生させた。それとは対照的に、Dpと異なるサイズのSPsの注入では、Dp単体のみに比べ、より重度の炎症性細胞浸潤を発生させた。 ■異なるサイズのSPsのIgEへの影響 Dpのみの群における総IgE値は、PBS群のそれより高かった。さらに、DpとSPの群における総IgE値は、Dp単体の群のそれに比べ、SPサイズ依存的に増強されていた。 ■nSPを注入された皮膚のサイトカイン発現解析 SPにより増強されたAD様皮膚病変のメカニズムを明らかにするため、Dpに関連する皮膚におけるサイトカイン発現プロファイルを分析した。Dp単体の皮内注射では、IL-4およびIL-13の局所発現が増加し、PBS注入に比べ、IL-5およびIFN-γの生成を減少させた。Dpと直径≤30 nmのSP群におけるIL-4の濃度は、Dp単体の群のそれと比較すると、有意に上昇した。Dpと直径≤300 nmのSP群におけるIL-5およびIL-13の濃度は、Dp単体の群のそれと比較すると、有意に減少した。さらに、≤300 nmの直径のSPs注入は、Dp単体のそれと比較すると、IFN-γにおいて有意な減少となった。従って、Dpを用いたSPsの注入は、皮膚内のサイトカイン濃度において、Dp単体の注入の効果を増加させる傾向があった。しかし、SPsでの処理の後、IFN-γおよびIL-5の濃度は、Dp単体と比較して、有意に減少した。 ■DpとSPsを注入されたマウスにおけるDp特有の免疫反応 DpとSP群で、Dp単体の群より高いDp特有のIgE濃度が見られた。 DPとnSP群におけるDp特有のIFN-γ分泌脾細胞数は、他のどの群よりも多かった。しかし、DpとnSP群を除き、すべての群のDp特有のIFN-γ分泌脾細胞において、差異は見られなかった。回帰分析では、粒子サイズ減少がこの影響に対して有意な因子であることを示した。</p>	<p>粒子のサイズはSPsにより誘発されるIL-18に影響を与え、TSLP誘導は、Dpに関連するTh2免疫反応を増強させ、AD様皮膚病変の悪化を誘発すると考えられた。</p>
粒子サイズ(nm)	PBS 直径(nm)	平均ゼータポテンシャル(mV)																						
1000	1136±32.1	-33.2±1.4																						
300	264±7.2	-25.8±0.7																						
100	106±0.6	-24.3±0.5																						
70	76±1.7	-19.5±1.0																						
30	39±4.2	-14.0±1.3																						

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	Gehrke H, Frühmesser A, Pelka J, Esselen M, Hecht LL, Blank H, Schuchmann HP, Gerthsen D, Marquardt C, Diabaté S, Weiss C, Marko D  Nanotoxicology, 2012; Early Online, 1-20	In vitro toxicity of amorphous silica nanoparticles in human colon carcinoma cells (ヒト結腸がん細 胞細胞における 非結晶シリカナノ 粒子の in vitro 毒性)	<p>■対象物質 非結晶シリカナノ 粒子 サイズ：12, 40, 200nm 入手元：Evonik Industries (Germany)</p> <p>全ての粒子をストック 濃度 10mg/ml の 純粋に懸濁・超音 波分解し、dH<sub>2</sub>O 内 で 50 μg/ml に薄め る。</p>	<p>■試験細胞 ヒト結腸がん細胞株(HT29) 入手元：German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Germany)</p> <p>■培養方法 DMEM(4500mg/l glucose 含む。ピルビン酸 ナトリウムを除く)内で 37°C、5%CO<sub>2</sub> 環境にて 培養。 その後、細胞を 1%FCS で懸濁したシリカナノ 粒子と 24h 時間培養。</p> <p>■細胞毒性試験 ・HT29 細胞の成長抑制測定 SRB 解析(10%FCS による解析) ・細胞培地における LDH 活性測定 LDH 測定(1%もしくは 10%FCS 使用) ・ミトコンドリア活性(MA)の細胞生存率測定 WST-1 解析</p>	<p>■細胞増殖への影響 HT29 細胞のシリカ NPs へのばく露 後、153.6 μg/cm<sup>2</sup>(500 mL)まで増殖 阻害作用は検出されなかった。その 反対に、12 nm の粒子に対しては、24 時間後、31.3(100 μg/mL)および 93.8 μg/cm<sup>2</sup>(300 μg/mL)の濃度におい て、有意な増殖刺激が見られた。40 お よび 200 nm の SiO<sub>2</sub> は、24、48 および 72 時間後に、有意に細胞増殖に影響 を与えることがないことがわかった。</p> <p>■LDH アッセイ 細胞密度を変えても、HT29 に対する 結果に影響がなかった。しかし、FCS 濃度を変えると、HT29 細胞に対する アッセイの結果を完全に変化させた。 血中濃度を 1%まで低下させると、SiO<sub>2</sub> は濃度およびサイズ依存的な細胞毒 性がみられた。</p> <p>■WST-1 アッセイ 10%の FCS 存在下で 24 時間培養する と、SiO<sub>2</sub> の HT29 細胞の MA に対する 影響が見られた。対照的に、低血清 濃度(FCS 1%)での培養は、増殖およ びコンフルエント条件ともに、HT29 細 胞の減少となり、LDH アッセイにより 評価された細胞毒性が確認された。</p>	<p>・SiO<sub>2</sub> は、培養時間およ び粒子サイズにより、 HT29 細胞増殖を促進 する。</p> <p>・SiO<sub>2</sub> の細胞毒性は、培 地の濃度、サイズおよ び FCS 含有量によるこ とがわかった。</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
43	Uboldi C, Giudetti G, Broggi F, Gilliland D, Ponti J, Rossi F  Mutation Research 745 (2012), pp 11-20	Amorphous silica nanoparticles do not induce cytotoxicity, cell transformation or genotoxicity in Balb/3T3 mouse fibroblasts (非晶質シリカナノ粒子は Balb/3T3 マウス線維芽細胞で細胞毒性、細胞形質転換、遺伝毒性を誘発しない)	■非晶質シリカナノ粒子 NM-200 粉体形状 NM-203 粉体形状 NRT-808 調製濃度: 1.69mg/mL NRT-817 調製濃度: 1.53mg/mL NRT-820 調製濃度: 1.54mg/mL NRT-944 調製濃度: 5mg/mL  直径: 15nm-300nm	■マウス線維芽細胞( Balb/3T3) 入手元: Hatano Research institution (Japan) ■培養方法 細胞培養で処理されたフラスコ(イタリア、ミラノ、BD Falcon 社製)内で、70~80%の合流点まで細胞を培養し、週に1度フラスコを揺らした。60 mm の各ペトリ皿(1 濃度当たり3 反復、試験 3 回実施)に入れた 10 %(v/v)の抗生物質(米国カリフォルニア、カールスバッド、Invitrogen 社製、ペニシリン 10,000 U/mL、ストレプトマイシン 10,000 μg/mL)で補充された、200 個の Balb/3T3 細胞を、3 mL の新鮮な完全培地(米国カリフォルニア、カールスバッド、Invitrogen 社製、Minimum Essential Medium (MEM))1×)に播種した。通常の細胞培養条件下(37℃、CO25%、湿度 90%)で 24 時間の培養後、細胞に対して一定分量で、aSiO2NPs(1 μg/mL-10 μg/mL-100 μg/mL)の処理懸濁液を添加した。 ■細胞毒性評価 MTT 試験、CFE 解析	aSiO2NPs は、in vitro で、Balb/3T3 細胞の CFE に対して有意な損傷を誘発しなかったため、合成手順も粒子のサイズ・粒子塊化/凝集も、細胞毒性に關与していなかったことを示した。72 時間のばく露後に、100 μg/mL の NM-200 は Balb/3T3 細胞において非有意(CFE93.5%±6.61)な細胞毒性影響を誘発させた。Balb/3T3 細胞の他の観察された aSiO2NPs へのばく露や異なる濃度でのばく露は、CFE に対する影響を誘発せず、得られたすべての値は CFE97.24%±3.15(10 μg/mL の NRT-808)から 1106.28%±5.18(100 μg/mL の NRT-820)の範囲であり、他の陰性対照(未処理の細胞)と比べ、統計的に有意ではなかった。それとは対照的に、MTT アッセイでは、NRT-820 (標準直径サイズ 80 nm)への in vitro ばく露の 72 時間後に、わずかながら Balb/3T3 細胞の生存能力において有意な低下が見られた。本試験の MTT アッセイでは、他のシリカ粒子の存在下では Balb/3T3 細胞の生存能力低下は見られなかった。 ■Cell Transformation Assay(CTA)による細胞形質転換試験 OECD リストより選択された aSiO2NPs(NM-808、NM-203)と水溶液中で合成した aSiO2NPs (NRT-808、NRT-817、NRT-820)は、72 時間のばく露の後、Balb/3T3 において形態変換を生じさせなかった。 ■小核試験による遺伝毒性試験 100 μg/mL の濃度では、aSiO2NPs は、in vivo の Balb/3T3 細胞における有意な小核形成を誘発することはなかった。	aSiO2NPs は、Balb/3T3 マウスの線維芽細胞により in vitro で吸収されるが、細胞毒性や遺伝子毒性作用をもたらさず、形態変換を誘発しないため、aSiO2NPs は、工業製品における便利な化学成分である可能性がある。

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
44	Maciej Stepnik, Joanna Arkusz, Anna Smok-Pieniazek, Anna Bratek-Skicki, Anna Salvati, Iseult Lynch, Kenneth A. Dawson, Jolanta Gromadzinska, Wim H. De Jong, Konrad Rydzynski  Toxicology and Applied Pharmacology 263 (2012), pp 89-101	Cytotoxic effects in 3T3-L1 mouse and WI-38 human fibroblasts following 72 hour and 7 day exposures to commercial silica nanoparticles (市販シリカナノ 粒子への72時間 および7日間の ばく露後での 3T3-L1 マウスお よび WI-38 ヒト線 維芽細胞におけ る細胞障害性効 果)	<b>■対象物質</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>CL コロイド状シリカ (LUDOX) 入手元: Sigma-Aldrich Co. サイズ:21nm 30wt% in H<sub>2</sub>O</li> <li>CL-X コロイド状シリカ (LUDOX) 入手元: Sigma-Aldrich Co. サイズ:30nm 45wt% 懸濁液 in H<sub>2</sub>O</li> </ul>	<b>■試験細胞</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>マウス線維芽細胞(3T3-L1) 入手元:American Type Culture Collection (ATCC)</li> <li>ヒト線維芽細胞(WI-38) 入手元:European Collection of Cell Cultures (ECACC)</li> </ul> <b>■保管方法</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>両細胞株を10%の過熱不活性化した FBS、25mM の HEPES、4mM の L-gultamine、100U/ml のペニシリン、100 μg/ml の streptomycin で補填した DMEM 内で保管。</li> </ul> <b>■試験方法</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>WST-1 分析 事前に 96-well マイクロプレートに播種した細胞 (1.5 × 10<sup>3</sup> cells/well, 3T3-L1) (4 × 10<sup>3</sup> cells/well, WI-38) in 100 μl を、試験サンプルの有無にかかわらず 72 時間の培養。Ludox シリカへの7日間のばく露後、全ての well に 10 μl WST-1 試薬を追加。</li> <li>LDH 活性検査 10 μl の上清を HBSS 内で10倍に薄め、100 μl の反応混合物を加え、30 分間培養。</li> </ul>	<b>■細胞生存率・細胞毒性反応評価</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>3T3-L1 は、低濃度時には生存率の上昇を示したが、高濃度時では、細胞生存率が大きく低下した。反対に、同濃度の WI-38 は濃度に依存して細胞生存率はわずかに減少した。CL-X シリカナノ粒子は、細胞毒性反応を一貫して誘発し、両細胞株の比較的高ばく露量(250 μg/ml)から反応が始まった。ナノ粒子の透析の有無に関する違いは確認できなかった。</li> </ul> <b>■LDH 活性検査結果</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>3T3-L1 の検査において、CLシリカナノ粒子は WST-1 のような結果が得られなかったが、CL-X シリカナノ粒子では同様の結果が得られた。細胞毒性は 200-250 μg/ml CL-X シリカナノ粒子から確認された。WI-38 の検査では WST-1 と同様の結果が得られた。CL シリカナノ粒子はほとんど毒性を誘発しなかったのに対し、CL-X シリカナノ粒子は高濃度 (&gt;100 μg/ml) 時にはっきりと毒性を発した。この解析では透析したもの・しないものの違いは確認されなかった。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>3T3-L1 の方が WI-38 よりも CL-X シリカナノ粒子の細胞毒性に関して影響を受けやすい。</li> <li>CL シリカナノ粒子は WI-38 細胞においては、高濃度時を除いてほとんど毒性を誘発しない。</li> <li>CL-X シリカナノ粒子は両細胞で毒性であることを確認した。</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
45	Zheng X, Su Y, Chen Y  Environmental Science & Techology 2012, 46, pp 7182-7188	Acute and chronic responses of activated sludge viability and performance to silica nanoparticles (活性汚泥生存率 の急性・慢性反 応およびシリカナ ノ粒子への作用)	<p>■対象物質 非晶質シリカナノ 粒子 入手元: Sigma</p> <p>1L のミリ Q 水に 100mg のシリカナノ 粒子を加え、1 時間 の超音波処理 (25°C、250W、 40kHz)し、100mg/L のナノ粒子ストック 懸濁液を用意。</p> <p>ストック懸濁液内の 平均粒子サイズ: 80-100nm</p>	<p>■試験対象 活性汚泥</p> <p>■試料および方法 嫌気性低溶存酸素(DO: 0.15-0.20 mg/L)の条件下で 親のバッチ式反応器(SBR) を連続して作動させ、生物 学的栄養塩除去(BNR)を目的 とし、活性汚泥を培養した。 最初の COD、NH46-4 およ び SBR 中の可溶性オルトリ ン酸の濃度を、それぞれお よそ 300、25、10 mg/L に制 御した。</p> <p>■ばく露濃度 0, 1, 50mg/L SiO<sub>2</sub> NPs</p> <p>■試験方法 ・活性汚泥の生存率測定 LDH 放出解析 ・汚泥内のバクテリアの DNA 解析 PCR-DGGE 法 ・機能的マーカーとして、亜 硝酸塩レダクターゼ遺伝子 による脱窒菌の数量分析 Real-time PCR 解析</p>	<p>■SiO<sub>2</sub> NPs の活性汚泥の生存能力に対する急性 および慢性影響</p> <p>・SiO<sub>2</sub> NPs の有無にかかわらず、1 および 50 mg/L の濃度の SiO<sub>2</sub> NPs への急性および慢性ばく露で は、同様の LDH 放出による活性汚泥の細胞質漏 出は生じなかった。短期および長期ばく露後 (p&gt;0.05)の、活性汚泥の相対生存率においても有 意差が見られなかった。</p> <p>・SiO<sub>2</sub> NPs は、50 mg/L の濃度であっても、活性汚 泥の生存率に対する急性・慢性影響を与えること はなかった。</p> <p>・環境に関連した濃度(1 mg/L)の SiO<sub>2</sub> NPs は、汚 泥の生存率および廃水中の窒素およびリン除去に 対し、急性および慢性の有害影響は与えなかつた が、70 日のばく露後、50 mg/L の SiO<sub>2</sub> NPs は、廃 水中の硝酸塩濃度の上昇を誘発し、79.6%から 51.6%へ TN 除去効率を低下させた。</p> <p>・これは、脱窒酵素、硝酸還元酵素および亜硝酸還 元酵素の活性低下によるものであった。急性ばく露 後でも慢性ばく露後でも、廃液中のリン除去は、1 および 50 mg/L の SiO<sub>2</sub> NPs に対しては感受性が なかった。その理由は、エキソポリホスファターゼお よびポリリン酸キナーゼの活性やポリヒドロキシア ルカノエートおよびグリコーゲンの細胞内形質転換 などの、生物学的脱リンに密接に関連する決定的 因子が有意に変化しなかったためである。</p>	<p>環境に関連した濃度(1 mg/L) の SiO<sub>2</sub> NPs は、廃水処理シス テムにおける汚泥の生存率お よび BNR に対して、急性・慢性 影響を与えることはなかつた が、NPs の使用および環境中 への放出が増加すると、本研 究における 50 mg/L などのより 高濃度の SiO<sub>2</sub> NPs が、脱窒酵 素(NAR および NIR)の活性を 低下させることにより、廃水中 の窒素除去に対しておよび脱 窒細菌の存在量に対して悪影 響を及ぼす可能性がある。</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
46	Panas A, Marquardt C, Nalcaci O, Bockhorn H, Baumann W, Paur HR, Mülhopt S, Diabaté S, Weiss C  Nanotoxicology, 2012; Early Online, 1-15	Screening of different metal oxide nanoparticles reveals selective toxicity and inflammatory potential of silica nanoparticles in lung epithelial cells and macrophages (異なる金属酸 化物ナノ粒子の スクリーニング は肺上皮細胞 とマクロファージ におけるシリ カナノ粒子の炎 症の可能性と 選択毒性を明ら かにする)	<p>■対象物質</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>•SiO<sub>2</sub> 12nm(Aerosil 200) (Evonik 社, Germany)</li> <li>•SiO<sub>2</sub> 25nm (own synthesis)</li> <li>•Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 20-40nm (NanoArc) (own synthesis)</li> <li>•TiO<sub>2</sub> 5nm</li> <li>•TiO<sub>2</sub> 32nm (AQLfa Aesar 社, Germany)</li> <li>•TiO<sub>2</sub> 20nm(own synthesis)</li> <li>•TiO<sub>2</sub> 40nm(own synthesis)</li> <li>•CB14nm (Printex 90) (Evonik 社, Germany)</li> </ul> <p>粒子を 10mg/ml の濃度、10%FCS(有/無)で培養培地に直接懸濁。</p> <p>CdO 粒子 (Merck 社, Germany) とリポ多糖体 (Sigma 社, Germany) を抗酸化・炎症反応の対照群として使用。</p>	<p>■試験細胞</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>•A549</li> <li>•RAW264.7</li> </ul> <p>入手元: ATCC (USA)</p> <p>培養方法: 10%FCS, 100U/ml ペニシリン、100mg/ml ストレプトマイシンで補填した DMEM 内において 37°C、5%CO<sub>2</sub> の環境で培養。 A549 細胞の培地には 2mM の L-グルタミンを追加。</p> <p>■細胞特性評価 / A549 と RAW264.7 内への SiO<sub>2</sub>-, TiO<sub>2</sub>-, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> の吸収測定</p> <p>TEM、DLS 使用</p> <p>■細胞毒性測定</p> <p>AlamarBlue 解析 LDH 解析 ROS 測定</p> <p>■炎症誘発と抗酸化反応測定</p> <p>mRNA 発現度合いの観察</p>	<p>■粒子の特性化</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>•DLS 測定値は、血清の非存在下では、SiO<sub>2</sub>-NP 集塊/凝集物のサイズが増大せず、やや縮小したことを示した。</li> </ul> <p>■NP<sub>s</sub> の取り込み</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>•凝集物はほとんど細胞内小胞における細胞質全体に分布した。核にもミトコンドリアにおいても、NP<sub>s</sub> は検出されなかった。</li> </ul> <p>■NP<sub>s</sub> の細胞毒性</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>•購入した細胞株と自作の細胞株の双方において、非晶質シリカ NP<sub>s</sub> は、血清の非存在下で、細胞生存率を低下させ、薄膜漏出量を増加させた。血清の存在下では、自作のシリカ NP<sub>s</sub> に関しては、双方の細胞膜においてシリカ NP<sub>s</sub> の毒性が完全に抑制された。注目すべきは、購入したシリカ NP<sub>s</sub> は、効率は低下していたものの、依然として特にマクロファージに対して毒性があった。</li> <li>•Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-NP ないし TiO<sub>2</sub>-NP で培養した細胞には、血清の有無にかかわらず、毒性兆候が見られなかった。相対表面積用量を考慮すると、異なる NP<sub>s</sub> の異なる毒性も明らかであった。</li> </ul> <p>■NP<sub>s</sub> で誘発される抗酸化反応および炎症促進性反応</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>•購入した SiO<sub>2</sub>-NP<sub>s</sub> および程度は劣るが自作の SiO<sub>2</sub>-NP<sub>s</sub> は、血清、特にマクロファージにおける、HO-1 および <math>\gamma</math> GCLC の発現量を増加させたが、自作の TiO<sub>2</sub>-NP<sub>s</sub> および Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-NP<sub>s</sub> は、どちらの細胞株においても、抗酸化遺伝子発現を誘発できなかった。</li> <li>•購入した SiO<sub>2</sub>-NP<sub>s</sub> および自作の SiO<sub>2</sub>-NP<sub>s</sub> は、血清のない培地において炎症促進性反応を誘発した。また、TiO<sub>2</sub>-NP<sub>s</sub> および Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-NP<sub>s</sub> は、血清の非存在下で、特に肺上皮細胞において、TNF-<math>\alpha</math> 発現を誘発した。それにもかかわらず、SiO<sub>2</sub>-NP<sub>s</sub> は肺上皮細胞において、COX-2、IL-6 および IL-8 の発現を誘発させたが、TiO<sub>2</sub>-NP<sub>s</sub> および Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-NP<sub>s</sub> は誘発させなかった。</li> <li>•従って、TiO<sub>2</sub>-NP<sub>s</sub> および Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-NP<sub>s</sub> は、双方の細胞株に対して細胞毒性がなく、抗酸化遺伝子発現を促進しなかったが、肺上皮細胞ないしマクロファージ中の iNOS において、TNF-<math>\alpha</math> を非常に選択的に誘発した。それとは対照的に、シリカ NP<sub>s</sub> には細胞毒性がなく、双方の細胞株において特に血清の非存在下で、RAW264.7 マクロファージにおける抗酸化反応と炎症遺伝子発現を活性化させた。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•シリカ NP<sub>s</sub> には、特に血清非存在下では、細胞毒性があった。さらに、COX-2、TNF-<math>\alpha</math>、IL-1<math>\beta</math>、IL-6、IL-8 などの発現増加からもわかるように、シリカ NP<sub>s</sub> は炎症反応を生じさせた。しかし、酸化鉄 NP<sub>s</sub> ないしチタニア NP<sub>s</sub> には細胞毒性がなく、広範囲の炎症性メディエーターを誘発することはなかったが、意外にも A549 細胞の TNF-<math>\alpha</math> mRNA とマクロファージの iNOS のみを誘発した。</li> <li>•特筆すべきは、たとえばシリカ NP<sub>s</sub> が ROS 濃度を上昇させず最も毒性の高い NP<sub>s</sub> 濃度を上昇させたように、細胞の ROS 濃度は見られた細胞毒性と炎症反応の強さとは相関性がなかった。その一方で、付随する細胞毒性なしに、チタニア NP<sub>s</sub> は明らかに ROS 量を増加させた。</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
47	Farcas LR, Uboldi C, Mehn D, Giudetti G, Nativo P, Ponti J, Gilliland D, Rossi F, Bal-Price A  Nanotoxicology , 2012; Early Online, 1-16	Mechanisms of toxicity induced by SiO <sub>2</sub> nanoparticles of in vitro human alveolar barrier: effects on cytokine production, oxidative stress induction, surfactant proteins A mRNA expression and nanoparticles uptake in vitro のヒト肺胞 バリアの SiO <sub>2</sub> ナノ 粒子誘発の毒性メ カニズム: サイトカ イン生成、酸化スト レス誘発、界面活 性剤タンパク質類 mRNA 発現および ナノ粒子取り込み への影響	■対象物質 非晶質シリカ ・NRT-817 サイズ: 15nm ・NRT-808 サイズ: 35nm ・NRT-820 サイズ: 80nm ・蛍光性 NRT-944 サイズ: 80nm	■試験細胞 ・ヒト上皮細胞株 NCI-H441 入手元: ATCC ・ヒト内皮細胞株 ISO-HAS1 入手元: Mikiko Masuzawa (Kitasato university, Japan) ・単球 THP-1 細胞株 入手元: ATCC ■試料および方法 ヒト 上 皮 細 胞 株 NCI-H441(ATCC-HTB-17 4)、内皮細胞株 ISO-HAS18 (北里大学医学部)および単 球 THP-1 細胞株 (ATCC-TIB-202, USA)を、75cm <sup>2</sup> の細胞培 養地のフラスコ上に単一培 養として保ち、10%のウシ胎 児血清、0.25g/mL の D-グ ルコース、1mM のピルビン 酸ナトリウム、100 μg のペ ニシリン・ストレプトマイシン (100 個)で補完した、 RPMI-160 W/HEPES + 2mM L-グルタミン培地を与 えた。 ■試験内容/方法 ・72 時間のばく露後の細胞 生存率測定 Alamar blue 解析。試験濃 度: 19, 50, 100, 200 μg/ml ・炎症性のサイトカイン (IL-8, IL-1β, TNF-α)レベ ル測定 ELISA 解析。試験濃度: 50, 100 μg/ml。ばく露期間: 24, 48, 72h。THP-1 の有無 で測定。	■非活性化 THP-1 細胞および PMA により活性化(マク ロファージ様表現型)された THP-1 細胞の炎症反応に おける役割 ・非活性化 THP-1 細胞株は、バリアの機能性に有意な 影響を与えない。 ・PMA により活性化した THP-1 細胞の存在下では、 TEER 値が劇的に低下(530±9.5 から 32±Ω cm <sup>2</sup> )し、 肺胞バリアが重度かつ急速に破壊されたことを示し た。 ■単一培養中の LPS もしくは PMA により活性化される THP-1 細胞によるサイトカイン放出 ・100 μg/mL の SiNPs への 72 時間のばく露により、対 照群の THP-1 細胞(244±11.8pg/mL)と比べ、細胞培 地における IL-8 濃度(362±29.3pg/mL)が有意に上昇 した。 ・LPS ないし PMA は、THP-1 細胞に比べ、IL-8 の放出 を有意に増加させた。 ■in vitro 肺胞バリアへの SiNPs の影響 (細胞生存率) ・対照群の細胞と比べると、AB アッセイにより確立して いるように、ばく露後最大 72 時間で、どの SiNPs 濃度 やサイズも細胞毒性作用を誘発しなかった。 ■炎症性サイトカインの放出 ・3つの全 SiNPs サイズ(15nm に対し 147%±19.5、37nm に対し 165%±27.9、80nm に対し 149%±13.1)の THP-1 細胞の非存在下でも、100 μg/mL(ばく露時間 72 時 間)の濃度において、対照群(100%)に比べ、SiNPs は共 培養系の尖角部における IL-8 濃度を有意に上昇させ た。 IL-8 は、上皮および内皮細胞および THP-1 細胞の存 在が、これらの細胞の能力を低下させ、IL-8 を生成さ せる。 72 時間のより小さいサイズ(15 および 35nm)の SiNPs へのばく露後、THP-1 細胞は、in vitro の肺胞バリアの 反応に影響を与えた。対照群の共培養系においては、 THP-1 細胞の存在の有無にかかわらず、TNF-α は非 常に低濃度(〜3-5pg/mL)。 ■ROS ・同一の共培養系 100 μg/mL の SiNPs(15、35、80nm)	・TNF-α および IL-8 の高 濃度放出が見られたた め、in vitro 肺胞バリアの SiNPs へのばく露は、炎 症を誘発した。 特に、TNF-α の高濃度 放出は、認められた SP-As mRNA 発現の下 方調節に貢献し、その 後のサイトカイン生成 を調節することが可能 であった。 ・ROS 生成が見られた ため、酸化ストレスも、 SiNPs により誘発され た毒性のメカニズムに 貢献したと見られる。

			<ul style="list-style-type: none"> <li>・シリカナノ粒子の細胞内摂取評価 分光光度法、蛍光顕微鏡法</li> <li>・ROS 産出測定 DCFH2-DA を基質として使用。250 <math>\mu</math>M TBHP を対照群として使用。</li> </ul>	<p>への最大 72 時間までのばく露の後、THP-1 細胞株の有無にかかわらず、ROS 生成も誘発された。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・THP-1 細胞の非存在下で、測定値は、対照群と比べ、サイズ 15nm の SiNPs へのばく露後の共培養系下での ROS 放出の増加を示したが、15nm および 35nm の SiNPs に関しては、対照群と比べ、ばく露 4 時間後で既により高濃度であったため、THP-1 細胞の存在下では、ROS はずっと速い速度で放出された。80nm という最大 SiNPs は、ばく露のいかなる時点においても、どちらの共培養系(+/-THP-1 細胞)でも ROS 生成が誘発されることはなかった。</li> <li>・THP-1 細胞(165%<math>\pm</math>4.3)の存在下で、15nm という最小サイズにおいて、最も有意な ROS 生成はばく露 24 時間後で見られた。</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
48	Gong C, Tao G, Yang L, Liu J, Liu Q, Li W, Zhuang Z  Toxicology Letters 209 (2012), pp 264-269	Methylation of PARP-1 promoter involved in the regulation of nano-SiO <sub>2</sub> -induc ed decrease of PARP-1 mRNA expression ナノ SiO <sub>2</sub> 誘発性 の PARP-1 mRNA 発現減少 の調節に関与す る PARP1 プロモ ーターのメチル化	■対象物質 ・シリカナノ粒子 入手元:Wan Jing New Material Co. Ltd (China) サイズ:15nm ・マイクロサイズシリ カナノ粒子 入手元: Sigma (USA) サイズ:1-5 μm	■試験細胞 ・ヒト皮膚細胞 HaCaT 入手元: China center for type Culture Collection (China) ■培養方法  ■試験方法・内容 ・PARP-1 mRNA 発現の観察 リアルタイム PCR, Western blotting 使用 ・DNA のメチル化分析 MSP 解析、Bisulfite(亜硫酸 水素塩) sequencing 法	・対照群に比べ、ナノ SiO <sub>2</sub> 粒子の濃度上昇に伴う、 ナノ SiO <sub>2</sub> により処理された HaCaT 細胞における PARP-1 mRNA およびタンパク質発現の漸次低下が 見られた。 ・細胞の各群はそれ固有の非メチル化レベルを持 ち、PARP-1 が 290~159 bp の位置において非メチ ル化していることを示す。増幅断片の階調レベルを 簡単に分析すると、ナノ SiO <sub>2</sub> 粒子濃度の上昇ととも に、非メチル化レベルが徐々に低下し、ノックダウン した DAC および DNMT1 は、状況を部分的に逆転す ることが可能である。PARP-1 プロモーターにおいて 見られた断片では、メチル化レベルと対応する mRNA 濃度の間の明確な関連性は見られなかった。 ・平均メチル化率は、対照群において 1.8%、10 μ g/mL 群において 4.09%、DAC 群において 3.18%、 sh-DNMT1 群において 1.8%であったが、位置特有の メチル化濃度は、229 bp 位置において明らかに変化 していた。 ・これらの所見は、ナノ SiO <sub>2</sub> により処理された細胞の PARP-1 mRNA 発現の下方調節は、CpG アイランド における過剰メチル化の総レベルとの関連性はない が、位置固有の過剰メチル化レベルとは関連性がある ことを示している。	・ナノ SiO <sub>2</sub> で処理した HaCaT 細胞における PARP-1 mRNA 発現減少は、DNMT1 ノックダウンのみにより元の 状態に戻された。 ・ナノ SiO <sub>2</sub> 誘発の HaCaT 細 胞における PARP-1 発現の 転写減少は、後成的修飾の 特定の組み合わせにより仲 介された。 ・PARP-1 の mRNA 発現は、 ナノ SiO <sub>2</sub> により阻害された。

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
49	Mu Q, Howdow NS, Krzeminski L, Brown AP, Jeuken L JC, Routledge MN  Particle and Fibre Toxicology, 2012, pp 9-29	Mechanism of cellular uptake of genotoxic silica nanoparticles (遺伝毒性のあ るシリカナノ粒 子の細胞内摂 取のメカニズム)	<p>■対象物質 非晶質シリカナノ 粒子 入手元: Ludox Colloid Silica サイズ: 14nm</p> <p>MilliQ 水で3日間 透析した後、 DMEM 内で懸濁。</p> <p>凝集体サイズ: 500nm</p>	<p>■試験細胞 ・A549(ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞) ・HT29(結腸腺腫由来細胞) ・HaCaT(ヒト皮膚細胞) 入手元: Sigma (UK)</p> <p>■培養方法 A549とHT29を0.5%ペニシリン/スト レプトマイシン、10%FBSを含んだ DMEM 内で培養。 HaCaTを0.5%ペニシリン/ストレプト マイシン、10%FBSを含んだ RPMI 培地内で培養。</p> <p>■試験内容/方法 ・細胞生存率測定 MTT 解析 ばく露濃度: 0.01, 0.1, 1, 10, 100, 1000 <math>\mu</math>g/ml ばく露期間: 24h ・DNA 損傷の誘発観察 コメット解析 ばく露濃度: 0, 0.01, 0.1, 1, 10 <math>\mu</math> g/ml ばく露期間: 24h ・粒子の細胞内摂取観測 TEM 解析</p>	<p>・用量 100 <math>\mu</math>g/mL 以上で、MTT アッセイにより 判明した細胞生存率が有意に低下した。ほ とんどの場合で、HaCat 細胞において、他の 2つの細胞株に比べ、シリカ NPs に対する抵 抗増加が見られた。</p> <p>・対照群に比べ、1 および 10 <math>\mu</math>g/mL の濃度で DNA 損傷の有意な減少が見られた。細胞毒 性アッセイの結果と一致して、10 <math>\mu</math>g/mL の シリカで培養した HaCat 細胞株には、DNA 損 傷に対して最も高い抵抗が見られた。10 <math>\mu</math> g/mL のシリカで培養した細胞の TEM では、 大多数の細胞が無傷であることと、シリカ NPs が細胞質に存在していたことが示され た。</p> <p>・シリカがより高用量(100 <math>\mu</math>g/mL)になると、有 意な細胞死の原因となった。</p> <p>・TEM 切片において少数の無傷細胞と、細胞 周囲に多量の細胞残屑が見られ、おそらく NPs と混ざっているものと思われた。</p> <p>・37°Cで30分間 100 <math>\mu</math>g/mL のシリカ NPs で 培養した細胞には、37°Cで24時間 10 <math>\mu</math> g/mL のシリカ NPs で培養した細胞と同様の NPs 取り込みが見られた。</p> <p>・4°Cで培養した細胞にも、NP 取り込みが見ら れ、NPs 自体が細胞質中に散らばり、明ら かな細胞膜カプセル化は見られず。</p>	<p>A549 細胞に関しては、血清 タンパク質の不在時は、細胞 質へのシリカ NP の直接取り 込みとなる。</p> <p>非結晶質シリカ NPs は、細胞 の中へと受動的に輸送され る。</p> <p>環境ばく露濃度では、シリカ NPs は、ヒトへの有意な健康 影響を持つとは考えにくい。</p> <p>シリカ NPs は、薬物送達およ び遺伝子治療に対する適切 な媒体であるのかもしれない。</p>

【プラチナ】

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	Bendale V, Paul S, Bhattacharyya SS  Journal of Chinese Integrative Medicine 2012, Vol10, No.6, pp 681-9	Green synthesis, characterization and anticancer potential of platinum nanoparticles Bioplatin (プラチナナノ粒 子Bioplatinのグリ ーン合成、特性、 抗がんの可能性)	■対象物質 プラチナナノ粒子 Bioplatin サイズ: 137.5nm 表面電荷: -35.8mV	■試験細胞 ヒト悪性黒色腫(A375) 入手元: National Center for Cell Science (India) 培養方法: 10%FBS, 1%PSNで補填したDMEM内 において 37°C、5%CO <sub>2</sub> の環境で培養。 PBMCs を培養し、細胞毒性試験のために Bioplatin へばく露。 ■PBMCs と A375 細胞による細胞生存率測定。 ■試験期間 24, 48, 72 時間 ■蛍光顕微鏡検査 4' 6-ジアミジノ-2-フェニルインドール(DAPI)と Hoechst 33258 による染色し、Bioplatin がアポトー シスを誘発するか否かを確認した。 ■DNA 断片化アッセイ 24, 48 および 72 時間の処理の後、細胞を採取し、 抽出緩衝液 (10 mmol/L の NaCl, 20 mmol/L の EDTA および 1%の Triton X-100 を含有する pH7.4 の 10 mmol/L の Tris-HCl) に入れた。56°Cで 8 時 間から 12 時間、10 μg/mL のプロテイナーゼ K で 細胞抽出物を消化させ、ゲノム DNA を分離させ た。エタノールで沈殿させ、Tris-EDTA に溶かした フェノール/クロロホルムで DNA を精製した。1%の アガロースゲルを用いた電気泳動により、DNA の 完全性を解析し、エチジウムブロマイド染色を行っ た。	■PBMCs および A375 細胞の生存 割合 Bioplatin は PBMCs に対して細胞 毒性影響を与えないもしくはごく僅 かな細胞毒性しか与えなかった。 最大濃度(100 μg/mL)の Bioplatin で、24, 48 および 72 時間で、夫々 92%、89.5%、86.8%の細胞生存能力 が見られた。より低い濃度では、異 なる処置時間で、2~8%の細胞毒 性が見られた。 ■蛍光顕微鏡検査 未処理の A375 細胞は DAPI のポジ ティブ染色法を受け入れなかった ため、明らかにクロマチン凝縮した 細胞は見られなかったが、一方、 Bioplatin 処理では、時間数が多い ほどクロマチン凝縮した細胞数が 増加しているようであった。 ■DNA 断片化アッセイ 対照群と比べ、Bioplatin で処理し た群の断片は、より強く染色されて いるように思われ、DNA の細分化 とともにアポトーシスの度合いが高 まることを示した。	Bioplatin は、癌細胞に おけるアポトーシスを 誘発し、ヒトの癌に対 していくぶんかの有益な 効果をもたらすこともあ る。DNA と相互作用し、 DNA に対して安定性を 与え、DNA 複製を阻止 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	Rehman MU, Yoshihisa Y, Miyamoto Y, Shimizu T  Inflammation Research 2012, pp 1177-1185	The anti-inflammatory effects of platinum nanoparticles on the Lipopolysaccharid e(LPS)-induced inflammatory response in RAW 264.7 macrophages (RAW264.7 マクロ ファージにおける リポ多糖起因性 炎症反応に対す るプラチナナノ粒 子の抗炎症効果)	<p>■対象物質 プラチナナノ粒子 直径:平均 2.4±0.7nm</p> <p>■Pt ナノ粒子の準備 43.8 mL の H<sub>2</sub>O を容量 100 mL のナスの形状 をしたフラスコに注ぎ、 4 mL の 16.6 mM の H<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub> を添加した。 還流が始まるまで、フ ラスコの中反応混合物 を 100°C で攪拌した。 77.2 mM のクエン酸三 ナトリウム二水和物の 8.6 mL の分割量を反 応混合物に注入し、さ らに 30 分間還流を続 行した。</p>	<p>■試験細胞 RAW264.7 細胞 入手元: ATCC (USA) 保存方法: 10%FBS, 1%抗 生剤で補填した DMEM 内において 37°C、5%CO<sub>2</sub> の環境で保存。</p> <p>■細胞生存率測定 ・MTT 解析 細胞を 96-well プレートに 播種し、DMEM に 24 時間 培養。異なるプラチナナ ノ粒子 (10, 50, 100, 500, 1,000 μM) を 24 時間細胞 に加える。</p> <p>■細胞内の ROS 産出の 検査 フローサイトメトリー法に より検出</p> <p>■タンパク質・IL-1β、 IL-6、TNF-α の mRNA 発現レベル Western blot 分析・逆転 写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) 分析</p>	<p>■RAW 264.7 細胞への Pt ナノ粒子の細胞毒性 RAW 267.7 細胞における Pt ナノ粒子 (10、50、100、 500、1,000 μM) の細胞毒性影響を評価し、Pt ナノ粒 子は、濃度 1,000 μM でさえも、RAW 264.7 に対して細 胞毒性影響を与えないことがわかった。 10 μg/mL の濃度において、10 分間の LPS 刺激 O<sub>2</sub>-お よび H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 生成における顕著な増加が見られた。さら に、100 μM の Pt ナノ粒子を用いた 24 時間の前培養 は、LPS により誘発される細胞内 ROS 生成を有意に阻 害した。 RAW 264.7 細胞の LPS 刺激により、iNOS タンパク質濃 度および iNOS mRNA 発現がかなり下方調節された。Pt ナノ粒子での処理は、用量依存的に、iNOS タンパク質 濃度および iNOS mRNA 発現性を低下させた。Pt ナノ 粒子は、LPS 刺激ネズミ科マクロファージにおける iNOS 発現性を低下させ、NO 生成を低下させる。Pt ナノ 粒子は、IκB-α の分解を阻止したが、これは、RAW 264.7 細胞における IκB-α 分解阻止により、Pt ナノ粒 子が LPS 刺激 NFκB 転座を有意に減少させることを示 す。 Pt ナノ粒子 (10~100 μM) での 1 時間の細胞処理で は、Akt および ERK1/2 の LPS により誘発されるリン酸 化反応を有意に阻害した。その一方で、Pt ナノ粒子は、 マウスのマクロファージにおける p38 および SAPK/JNK のリン酸化反応に対して阻害作用を与えないことがわ かった。</p>	Pt ナノ粒子の抗炎症特 性は、マクロファージ中 の NFκB シグナリング 経路の下方調節による ものである場合もあるた め、Pt ナノ粒子の抗炎症 薬としての使用の有効 性を裏付ける。

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
52	Kim WK, Kim JC, Park HJ, Sul OJ, Lee MH, Kim JS, Choi HS  EXPERIMENTA L and MOLECULAR MEDICINE, Vol. 44, No.7, pp 432-439, (2012)	Platinum nanoparticles reduce ovariectomy-induced bone loss by decreasing osteoclastogenesis (プラチナナノ粒子は破骨細胞生成の減少による卵巣摘出誘発する骨量減少を軽減する)	<p>■対象物質 プラチナナノ粒子 平均サイズ:&gt;100nm</p> <p>試料調整法:蒸留水内でプラチナワイヤー(0.1mmのワイヤーに充電電圧 3kV)を電気爆発させ、-12.62mVのゼータポテンシャルのプラチナナノ粒子の分散懸濁液を調合。</p>	<p>■試験生物 C57BL/6J マウス 週齢:6 週 入手元 : Jackson Laboratory 投与方法:食道カニューレを通して胃内投与(0.5g/g of bw/day) 投与期間:8 週間</p> <p>■細胞内 ROS 検出 FACS Calibur とフローサイトメトリーにより測定 ■Ca<sup>2+</sup>の細胞内濃度測定 共焦点顕微鏡法により検査</p>	<p>■PtNP による OC 形成減少 RANKL は、BMM におけるかなりの濃度の ROS 生成を促進し、外因性 PtNP がこの効果に拮抗した(図 3C)。この知見は、PtNP による破骨細胞形成の低下は、RANKL に反応した ROS 生成減少に起因する可能性を示唆している。</p> <p>RANKL での 48 時間の長期 BMM 活性により、総 Ca<sup>2+</sup>の上昇を誘発し、その一方で、PtNP は Ca<sup>2+</sup>を有意に低下させた。さらに、PtNP は、各細胞の Ca<sup>2+</sup>振動反応の振幅ならびにその頻度も低下させた。PtNP は、NFAT2 発現性低下ならびに NF-κB 活性低下により、RANKL シグナリング障害を発生させた。</p>	<p>Pt ナノ粒子(PtNP)の胃内投与により、卵巣摘出により誘発された骨量低下が減少し、in vivo の破骨細胞の活性および数の減少が見られた。PtNP は、核内因子κBリガンド(RANKL)のシグナリングの活性化受容体を損ない、破骨細胞形成を阻害した。この障害は、核因子κBの活性低下および活性化 T 細胞である細胞質 1 における核内因子レベルの低下によるものであった。PtNP は、RANKL 誘発性の持続性的活性酸素および Ca<sup>2+</sup>振動の細胞内濃度を低下させた。</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
53	Okamoto H, Horii K, Fujisawa A, Yamamoto Y  Experimental Dermatology, 21 (Suppl. 1), 5-7	Oxidative deterioration of platinum nanoparticle and its prevention by palladium (プラチナナノ粒子の酸化劣化とパラジウムによるその予防)	<p>■対象物質</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・プラチナナノ粒子</li> <li>・パラジウムナノ粒子</li> </ul> <p>入手元: Toyo Kasei Pharmaceutical Co. (Japan)            サイズ(Pt): 1.93±0.34nm            サイズ(Pd): 3.59±0.56nm</p> <p>比較試験用に下記の内容で対象物質を用意</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・閉管に4週間-20℃、4℃、室温の環境で保管したPtナノ粒子懸濁液</li> <li>・室温で保管したが毎日5分間空気にさらしたPtナノ粒子懸濁液</li> <li>・等モルのPtとPdの懸濁液を、室温で保管し毎日5分間空気にさらしたもの</li> </ul>	<p>■VCの安定性に基づきPtナノ粒子の影響を評価するため、5μMのプラチナのサンプルを、100μMのジエチレントリアミンペンタ酢酸を含有する40mMのリン酸塩緩衝液が入った100μMのVCに添加した。</p> <p>■VCの濃度を光度計により測定した。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の安定性を、240nmでのその吸光度により測定し、最終的な濃度を20nmとした。</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・調合したてのPtナノ粒子は、VCをあまり分解しなかったが、VCの分解活性は、室温での保存の日数(週単位)とともに上昇した。1日5分間、空気にばく露したPtナノ粒子の懸濁液は、VCをはるかに急速に分解した。</li> <li>・調合したてのPtナノ粒子は、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>をあまり分解しなかったが、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の分解活性は、室温での保存の日数(週単位)とともに上昇した。1日5分間、空気にばく露したPtナノ粒子の懸濁液は、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>をはるかに急速に分解した。</li> <li>・Ptナノ粒子の酸化変質率は温度依存的であり、保存室の温度の低下とともに低下した。</li> <li>・等モル量のPdPtナノ粒子をPtナノ粒子に添加し、室温で保存した。</li> <li>・混合物を1日5分間、空気にばく露させたが、PtOの形成が阻止されたのか、混合液はVCもH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>もあまり分解しなかった。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・調合したてのPtナノ粒子は、VCやH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の分解に対してはほぼ不活性であった。</li> <li>・これは、Ptナノ粒子が、化粧品や医薬品に有用性のある優秀な還元剤であることを示す。</li> <li>・Pdナノ粒子は、保管の間、Ptナノ粒子の酸化変質を効率的に阻止した。</li> <li>・Ptナノ粒子は、酸化変質しH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>と反応してもHOを生成しないため、安全に使用できる。</li> </ul>

【金】

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	Schulz M, Ma-Hock L, Brill S, Strauss V, Treumann S, Gröters S, Van Ravenzwaay B, Landsiedel R  Mutation Research 745 (2012), pp 51-57	Investigation on the genotoxicity of different sizes of gold nanoparticles administered to the lungs of rats. (ラットの肺に投 与した金ナノ粒子 の異なるサイズ の遺伝毒性調査)	<p>■対象物質 金ナノ粒子 入手元：British Biocell international (UK) 直径：2, 20, 200nm</p> <p>注入用に生理食塩 水と共にボルテック スし、濃度 36 μ g/ml に調節。</p>	<p>■試験生物 雄 wistar ラット(陰性・陽性対照群) 入手元： Charles River Laboratories (Germany)</p> <p>■ばく露方法 イソフラレン麻酔状況で、500 μL(各 肺に 18 μg の検査物質)の金コロイド 懸濁液を気管内注入。対照群には 500 μL の生理食塩水を注入。 陽性対照群のラットには 300mg/kg bw で生理食塩水に溶かした EMS を 経口ばく露。</p> <p>■DNA 損傷評価 ラットに異なる試験材料(金コロイド懸 濁液(オリジナル粒子サイズ 2, 20, 200nm)、500 μL 生理食塩水、EMS 300mg/kg bw)を注入し、 コメット解析法で測定。 サンプリング期間：72 時間</p> <p>■ラットの骨髄細胞の小核試験 One-sided Wilcoxon test による小核 を含む多染赤血球の割合を記録。</p>	<p>■DNA 損傷評価</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>%tail intensity (Mean %)</th> <th>Viability (Mean %)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Saline</td> <td>14.2</td> <td>71.2</td> </tr> <tr> <td>Gold colloid 2nm</td> <td>12.2</td> <td>59.6</td> </tr> <tr> <td>Gold colloid 20nm</td> <td>13.4</td> <td>60.5</td> </tr> <tr> <td>Gold colloid 200nm</td> <td>18.2</td> <td>61.1</td> </tr> <tr> <td>EMS 300mg/kg bw</td> <td>78.9</td> <td>75.8</td> </tr> </tbody> </table> <p>・EMS300mg/kg bw の注入では上記のようにな りの DNA 損傷が確認できたが、ばく露後 72 時間 での金コロイドのサイズによる DNA 損傷の明ら かな違いは発見されなかった。</p> <p>■骨髄細胞の小核試験 多染赤血球 (% 小核)</p> <table border="1"> <tbody> <tr> <td>Saline</td> <td>3.0</td> </tr> <tr> <td>Gold colloid 2nm</td> <td>1.9</td> </tr> <tr> <td>Gold colloid 20nm</td> <td>1.8</td> </tr> <tr> <td>Gold colloid 200nm</td> <td>1.9</td> </tr> <tr> <td>EMS 300mg/kg bw</td> <td>21.9</td> </tr> </tbody> </table> <p>・DNA 損傷評価の結果同様、結果的に金コロイド のサイズによる変化は生じなかった。</p>		%tail intensity (Mean %)	Viability (Mean %)	Saline	14.2	71.2	Gold colloid 2nm	12.2	59.6	Gold colloid 20nm	13.4	60.5	Gold colloid 200nm	18.2	61.1	EMS 300mg/kg bw	78.9	75.8	Saline	3.0	Gold colloid 2nm	1.9	Gold colloid 20nm	1.8	Gold colloid 200nm	1.9	EMS 300mg/kg bw	21.9	ラットの肺に投与した 金コロイド懸濁液のサ イズによる毒性・DNA 損傷の相違はなかつ た。
	%tail intensity (Mean %)	Viability (Mean %)																																
Saline	14.2	71.2																																
Gold colloid 2nm	12.2	59.6																																
Gold colloid 20nm	13.4	60.5																																
Gold colloid 200nm	18.2	61.1																																
EMS 300mg/kg bw	78.9	75.8																																
Saline	3.0																																	
Gold colloid 2nm	1.9																																	
Gold colloid 20nm	1.8																																	
Gold colloid 200nm	1.9																																	
EMS 300mg/kg bw	21.9																																	

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	Coulter JA, Jain S, Butterworth KT, Taggart LE, Dickson GR, McMahon SJ, Hyland WB, Muir MF, Trainor C, Hounsell AR, O'Sullivan JM, Schettino G, Currell FJ, Hirst DG, Prise KM  International Journal of Nanomedicine 2012, pp 2673-2685	Cell type-depen dent uptake, localization, and cytotoxicity of 1.9 nm gold nanoparticle s (1.9nm の金 ナノ粒子の 細胞種類依 存摂取、機 能化、細胞 毒性)	■金ナノ粒子 入手元: Nanoprobes Inc (USA) サイズ: 1.9nm  試料調整法: 金ナノ粒 子を分子レベルの滅 菌水 (Sigma) に懸濁。 0.2 μm フィルターでろ 過し、2.4mM の濃度で -20°Cの環境で保管。	■試験細胞 Human Du 145 (ヒト前立腺がん細胞) MDA-MB-231(乳がん細胞) L132(肺上皮細胞) 入手元: ATCC (USA) ■培養方法 10%FBS、1%ペニシリン/ストレプトマイ シンで補填した培地で培養。 Human DU 145⇒RPMI1640 MDA-MB-231⇒DMEM L132⇒MEM ■細胞生存率測定 MTT 解析 ■長期毒性、放射線増感の可能性を 測定 クローン形成法 ■プロアポトーシスタンパク質レベル 検出 Western Blot 分析 ■細胞生存率の低下を示唆する sub G <sub>1</sub> 細胞の測定 フローサイトメトリー法 ■ROS 測定 FACS Calibur フローサイトメトリー、 Cell-quest ソフトウェアによる測定	■MTT 細胞増殖アッセイ DU145 および MDA-MB-231 細胞株において、細胞生存能力の用量依存的低下が見られ、LD50 値は、それぞれ 838±11 μg/mL(20 μM)と 1028±11 μg/mL(24.6 μM)であった。L132 細胞は、1.9 nm の金ナノ粒子に対してより強い耐性があり、外挿 LD50 値は 13,300±130 μg/mL(320 μM)であった。 ■クローン原生アッセイ 12 μM の金ナノ粒子への 24 時間のばく露の後、NDA-MB-231 細胞において、有意な(P=0.01)細胞毒性が見られ、生存率の 21%の低下となった。DU145 や L132 細胞の潜在的クローン形成能力においては、金ナノ粒子へのばく露後、有意な低下は見られなかった。12 μM の GMP で処置した MDA-MB231 細胞は、対照群に比べ、3 Gy の X 線に対して有意に高い感受性を示し、治療効果を 87%上昇させた。DU145 や L132 細胞においては、有意な放射線感受性の上昇は見られなかった。 ■フローサイトメトリー 12 μM の金ナノ粒子での 24 時間の処理後、MDA-MB-132 および DUI143 細胞の G1 細胞亜母集団において、それぞれ 2.9 倍と 2.0 倍の有意な (P=0.003 および P=0.02) 増加が見られた。金ナノ粒子の調合液は、これらの腫瘍細胞株モデルにおける細胞死を誘発する。L132 細胞株においては、G1 細胞亜母集団の増加は見られず、1.9 nm の金ナノ粒子は、不死化の正常細胞の生存能力低下を誘発しないという証拠となった。 ■活性酸素種の評価 12 μM の金ナノ粒子での処理後 1 時間で、MDA-MB-132 と DUI143 細胞においてはともに、活性酸素種生成における有意な(それぞれ P=0.0132、P=0.0196) 上昇が見られた。さらに、24 時間の間、活性酸素種濃度は上昇し続けた。細胞毒性およびアポトーシスのデータを反映し、12 μM の金ナノ粒子での処理では、L132 不死化肺上皮細胞の活性酸素種の生成を有意に増加させることはなかった。	不死化の正常細胞株は、腫瘍細胞株ほど効率的に金ナノ粒子を取り込むことはなかった。 ・金ナノ粒子は、12 μM の金ナノ粒子の存在下では、二本鎖切断形成および放射線類似物質であるブレオマイシンを有意に増加させることはなかった。

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
56	Freese C, Uboldi C, Gibson MI, Unger RE, Weksler BB, Romero IA, Couraud PO, Kirkpatrick CJ  Particle and Fiber Toxicology 2012, <a href="http://www.particleandfibertoxicology.com/content/9/1/23">http://www.particleandfibertoxicology.com/content/9/1/23</a>	Uptake and cytotoxicity of citrate-coated gold nanospheres: Comparative studies on human endothelial and epithelial cells (クエン酸被覆金ナノ粒子の摂取と細胞毒性: ヒト上皮と内皮の比較研究)	■クエン酸被覆金ナノ粒子 AuS0302-RIT サイズ: 10nm Aus0302-RIS02 サイズ: 11nm AuS0302-RIS04 サイズ: 25nm	■試験細胞 ・HDMEC ・hcMEC/D3 入手元: the group of Pierre-Oliver Couraud (France)  ■細胞生存率分析 MTS 解析、Ki-67 解析、LDH 放出解析 ばく露濃度: 50, 100, 500, 1000 $\mu$ M  ■摂取と TEM 分析 EM410 (Philips 社)使用 ■内面化した金ナノ粒子の定量分析 ICP-AES 使用	■ AuNPs 濃度が 500 $\mu$ M を超えている場合のみ、hcMEC の細胞生存能力の低下が見られた。1000 $\mu$ M の AuS0302-RIS02 および AuS0302-RIS04 へのばく露後に、生存能力の若干の低下が見られた。  ■48 時間の 1000 $\mu$ M の AuS0302-RIS02 および AuS0302-RIS04 へのばく露後に、HDMEC の細胞生存能力が有意に低下した。  ■500 $\mu$ M の AuS0302-RIS04 へのばく露後、Ki67 発現率が有意に大幅に低下した。1000 $\mu$ M の AuS0302-RIS04 への高用量ばく露後、発現率がさらに低下した。より小さい金ナノ粒子(11 nm)は、AuS0302-RIS04(25 nm)と比べより軽度ではあるが、双方の細胞型における Ki67 発現率を有意に低下させた。  ■吸収された金ナノ粒子の量の比較では、どのような差異が、表面結合クエン酸ナトリウム量における差異やナノ粒子サイズに関連している可能性があるのかは判明しなかった。さらに、2つの異なる内皮細胞へと摂取される金ナノ粒子の量における差異は、TEM では判明しなかった。	上皮細胞は、内皮細胞より AuNPs をより多く吸収し、摂取量はナノ粒子表面上のクエン酸ナトリウム量と関連しない。

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	Downs TR, Crosby ME, Hu T, Kumar S, Sullivan A, Sarlo K, Reeder B, Lynch M, Wagner M, Mills T, Pfuhler S  Mutation Research 745 (2012), pp38-50	Silica nanoparticles administered at the maximum tolerated dose induce genotoxic effects through an inflammatory reaction while gold nanoparticles do not (最大耐量を投 与したシリカナ ノ粒子は炎症反 応を介して遺伝 毒性を誘発する が、金ナノ粒子 は誘発しない)	<p>■対象物質</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・金コロイド懸濁液 入手元: British Biocell International (UK) サイズ: 2, 20, 200nm</li> <li>・シリカナノ粒子(Levasil) サイズ: 15, 55nm 入手元: HC Stark (Germany)</li> <li>・DC12 石英粉塵粒子 サイズ: 1 μm 入手元: Dorentrup Quartz GmbH &amp; Co. KG (Germany)</li> </ul> <p>ブタノール内で分散し、ビー ズミルにより 100nm 以下にサ イズを減少。 金ナノ粒子を FBS 内で低濃 度化し、シリカナノ粒子を DPBS 内で懸濁。</p> <p>■in vivo 用の懸濁液</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・in vivo 処理プロトコルおよび in vivo コメット・小核コンビネ ーションアッセイ</li> </ul> <p>金粒子を FBS で 30 μg/mL まで希釈し、1 匹あたり 6 μg の定質量で注入。DQ12 の石 英を計量し、125 mg/mL の濃 度で DPBS により再懸濁し、 60 分間超音波分解し、さらに 20%のウシ血清アルブミン (BSA)溶液ならびに DPBS で 最終的に 100 mg/mL になる まで希釈。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・Levasil®200(15 nm)および Levasil®50(55 nm)の粒子を 最初に DPBS 中で 1:4 に希釈 し、分散の高アルカリ度 (pH10)により注射用に pH7.5 に中和させ 0.1N HCl を添加</li> </ul>	<p>■試験細胞</p> <p>ヒト末梢血リンパ球(HPBLs)</p> <p>■培養方法(in vitro 用)</p> <p>4.5ml RPMI-1640 培地、15%加熱不活 性化した FBS、2%PHA、100U/ml ペニ シリン、100 μg/ml ストレプトマイシン を含んだヘパリン化したチューブに全 血(0.5ml)を加え、室温 37°C、5%CO<sub>2</sub> の環境で 44-48 時間培養。</p> <p>■試験生物</p> <p>雄 Wistar ラット 体重: 150-200g 入手元: Charles River Laboratories (USA)</p> <p>■注入方法/量</p> <p>25g の Winged Infusion Set を用いて、 DQ12 およびシリカ粒子総量 0.2~ 0.25 mL(1 mL/kg)を注入、その後カニ ューレを 0.4 mL の無菌食塩水で洗い 流した。</p> <p>■試験方法/内容</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・In vitro 小核解析 蛍光顕微鏡検査法</li> <li>・in vivo コメット/小核解析</li> <li>・検尿検査(8-oxodG 検出) ELISA 法</li> <li>・肝臓内のアポトーシス測定 TUNEL 解析</li> <li>・肝臓内のグルタチオン・脂質過酸化 反応 マイクロプレートグルタチオン解析キ ット使用</li> <li>・プラズマ内の炎症性指標</li> <li>・肝臓内と肺細胞組織の金レベル</li> </ul>	<p>■in vitro 小核アッセイ</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・金ナノ粒子に関しては、14 μg/mL の 用量で、200 nm の金ナノ粒子での場 合のみ、MN に統計的に有意な上昇 (%)が見られた。15 nm および 55 nm の シリカナノ粒子と石英粒子の双方に関 しては、HPBLsにおけるこの in vitro 系 におけるいかなる粒子のタイプ・用量 でも、MN における上昇(%)は見られな かった。</li> </ul> <p>■in vitro コメット・小核コンビネーション アッセイ</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・動物に対するサイズが 2~200 nm の 金ナノ粒子の静脈注射では、肝臓や 肺組織における DNA 損傷増加や白血 球数の増加を誘発することはなかつた が、EMS で処理された陽性対照群に おいては明らかな増加が評価された。</li> <li>・金ナノ粒子とは対照的に、15 nm のシ リカナノ粒子の注入では、用量依存 的な、肝臓および肺組織における DNA 損傷の増加ならびに白血球の増加が 見られた。</li> <li>・MTD の 15 nm のシリカナノ粒子で処理 したラットのうちの 1 匹が、試験終了時 前に死亡し、MTD の 55 nm のシリカナ ノ粒子ないし石英粒子で処理したすべ てのラットは、試験終了時まで生存。</li> </ul> <p>■肝臓の組織病理検査</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・シリカナノ粒子で処理したラット群のう ち、15 nm で処理したラットより、肝臓 における最多かつ最重度の顕微鏡に よる所見が得られた。</li> <li>・55 nm のシリカナノ粒子で処理したラッ トは、6 個の肝臓のうち 3 個に有糸分 裂像を持つ肝細胞数におけるほんの わずかな増加が見られ、単核細胞お よび好中球浸潤の発生率は、非処理</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・in vivo コメットアッセイ および小核アッセイに おいて測定されたよう に、MTD にて静脈注 射を投与した際、15 nm および 55 nm のサ イズの金ナノ粒子は 遺伝毒性を生じさせ なかったが、公称 15 nm および 55 nm のシ リカナノ粒子は、DNA 損傷をやや増加させ た。</li> <li>・相対酸化・炎症エンド ポイントを評価した結 果、粒子誘発性の組 織損傷により仲介さ れた炎症反応を裏付 けていることがわかっ た。</li> </ul>

			し、さらに DPBS で希釈、最終的に必要な 25~125 mg/mL の濃度にした。		<p>群および賦活剤による対照群における発生率と同様であった。40 nm の石英粒子を投与されたラットには、肝臓組織における変化が見られた。</p> <p>■TUNEL 法での肝臓における in situ 染色</p> <p>・顕微鏡による解析では、賦活剤で処理した群のラットに比べ、15 nm のシリカ粒子(50 mg/kg)および DQ12 石英粒子(100 mg/kg)で処理したラットの肝臓において、TUNEL 陽性核(茶色)における最大 5 倍の増加が見られた。</p> <p>■血漿における炎症マーカー</p> <p>15 nm および 55 nm のシリカナノ粒子(125 mg/kg)ならびに石英粒子で処理された群のラットにおいて、TNF-<math>\alpha</math> および IL-6 における血漿中濃度における最大の上昇が見られた。</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
58	Truong L, Zaikova T, Richman EK, Hutchison JE, Tanguay RL  Nanotoxicology, November 2012; 6 (7): 691-699	Media ionic strength impacts embryonic responses to engineered nanoparticle Exposure  培地のイオン強度の胚のナノ粒子へのばく露反応に対する影響	<p>■対象物質</p> <p>1.2nm 3-MPA-金ナノ粒子 入手元: Sigma-Aldrich Chemical Co (USA)</p> <p>■ばく露用溶液</p> <p>1.2 nm の 3-MPA-AuNPs を異なるイオン濃度の胚の培地(EM)で懸濁し、これらの溶液を使用して、50 <math>\mu</math>g/mL の濃度の希釈標準溶液を用意。100%の EM を RO 水で希釈[0% (11 <math>\mu</math> S, 0.007 ppt), 0.16% (14 <math>\mu</math> S, 0.01 ppt), 0.8% (34 <math>\mu</math> S, 0.024 ppt), .4% (113 <math>\mu</math> S, 0.08 ppt), .20% (480 <math>\mu</math> S, 0.34 ppt), .100% (2420 <math>\mu</math> S, 1.7 ppt)EM]し、6 種類のイオン強度の培地を用意した。</p>	<p>■試験生物</p> <p>ゼブラフィッシュ胚 (Danio rerio)</p> <p>・100 <math>\mu</math> L のばく露溶液を含んだ 96-well プレートにコリオン除去した胚を移動し検査。</p> <p>■試験内容/方法</p> <p>・1.2nm 3-MPA-金ナノ粒子の毒性検査 5 つの異なる濃度 (0-50 <math>\mu</math>g/mL)・6 つの溶液を用いた測定。</p> <p>・死亡率・奇形への影響検査</p>	<p>■胚の培地は 1.2 nm の 3-MPA-AuNPs の沈殿を発生</p> <p>・乾燥した 1.2 nm の 3-MPA-AuNPs の懸濁後、直後には沈殿物は見られなかったが、24 hpr で胚を評価した際、くぼみの底と動物を取り囲んでいる NP 沈殿物を検出した。ほとんどの AuNPs は 18 時間後には既に溶液中に存在していなかった。これらの状況下で、1.2 nm の 3-MPA-AuNPs へのばく露では、死亡や奇形発生は増加しなかったが、50 <math>\mu</math>g/mL の濃度では、ばく露した胚の 100%に、(データなし)。NPs は塊となっていたが、依然としてかすかな有害な生物学的反応を誘発した。</p> <p>・EM が低濃度(0~0.8%)の場合でも、死亡・奇形発生率は統計的に有意ではなかった。</p> <p>・これらの研究により、コリオン除去の胚は低イオン強度の溶液に耐えることができ、少なくとも 120 hpf までは正常に発達しうることを示している。</p> <p>■1.2 nm の 3-MPA-AuNPs の発達毒性</p> <p>・高めのイオン濃度 (EM 20~100%)において、バックグラウンド(&lt;13%)を上回る死亡や奇形は見られなかった。これは、&lt;20%の AuNPs が 120 hpf による溶液中に存在していたことを示す安定性データと相関性を持つ。</p> <p>・その他のイオン濃度 (EM 0~4%)に関しては、イオン濃度が低下すると、死亡率および奇形発生率が上昇した。各イオン濃度に関しては、死亡および奇形発生に用量依存的な増加が見られた。</p>	RO 水で飼育した場合、コリオン除去の胚は形態学的に正常に発達し、少なくとも 120 hpf までは正常な CNS 機能を示す

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	Truong L, Tilton SC, Zaikova T, Richman E, Waters KM, Hutchison JE, Tanguay RL  Nanotoxicology 2013 pp 192-201	Surface functionalities of gold nanoparticles impact embryonic gene expression responses (金ナノ粒子の表面機能化は胚性遺伝の発現反応に影響を与える)	<p>■対象物質 金ナノ粒子 サイズ：&lt; 1.5nm 異なる三種のリガンドを用いて機能化・</p> <p>・THAT ・MES ・MEEE</p>	<p>■ゼブラフィッシュ胚 (Danio rerio) 胚を異なる7種の濃度(0.016, 0.08, 0.4, 2, 10, 50, 250 <math>\mu</math>g/mL)と胚培地(EM)controlにばく露。</p> <p>■試験内容/方法</p> <p>・機能化した金ナノ粒子の生物学的反応誘発測定 3種の機能化した金ナノ粒子をEM内で分散し、肺を7種の異なる濃度にばく露。 ・ばく露後の胚における金の量の測定 ICP-MS使用 ・異なる生物学的反応を引き起こす表面機能化した金ナノ粒子のメカニズム(MES, TMAT。24, 48hpf)</p>	<p>■AuNPsは他と異なる生物学的反応を誘発する</p> <p>・120 hpfでは、10 <math>\mu</math>g/mLの濃度で、TMAT-AuNPsは100%の割合で形態異常を誘発したが、MES-AuNPsは40%しか誘発せず、MEEE-AuNPsは誘発しなかった。50 <math>\mu</math>g/mLの濃度では、TMAT-AuNPsは80%の死亡率、MES-AuNPsおよびMEEE-AuNPsは誘発しなかった。2 <math>\mu</math>g/mLの濃度で、MES-AuNPsには、MEEE-AuNPsと比べ、統計的に有意な高めの催奇性が見られた。</p> <p>■AuNPsはゼブラフィッシュの胚の体内に吸収され利用される</p> <p>(1)研究を行った表面機能性は、他と異なる胚への取り込みを左右することはなかった。 (2)取り込みは急速であった。 (3)どのタイプのAuNPも蓄積しなかった。</p> <p>■24および48 hpfにおいて遺伝子発現における変化がMESとTMATにより誘発</p> <p>・24 hpfにおいて、MES-AuNPsへのばく露は、TMAT-AuNPsより多い転写産物の誤発現となった(それぞれ24, 18)。 ・48 hpfまでに、MES-AuNPsおよびTMAT-AuNPsにより誤発現となった転写産物数が、双方のAuNPsの間で共通となり、それぞれ316, 58へと増加した。</p>	<p>・AuNPsの表面機能性は、表現型レベルおよび分子レベルで、生物学的反応に影響を与える。</p> <p>・炎症・免疫反応は、NPばく露に対して比較的全身的応答である。</p> <p>・異なる表面機能群のAuNPs群にばく露すると、輸送機構が誤調整された</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
60	Choi SY, Jeong S, Jang SH, Park J, Park JH, Ock KS, Lee SY, Joo SW  Toxicology in Vito 26 (2012) pp 229-237	In vitro toxicity of serum protein-adsorbed citrate-reduced gold nanoparticles in human lung adenocarcinoma cells (ヒト肺腺癌細胞に おける血清タンパ ク質吸着クエン酸 還元金ナノ粒子の in vitro 毒性)	<p>■対象物質 金ナノ粒子</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・サイズ: 17.0 ± 1.7nm</li> <li>・流体力学直径: 36.0 ± 1.7nm</li> <li>・10%FBS を含んだ RPMI を吸着した後のサイズ: 44.9 ± 0.8nm</li> <li>・ζポテンシャル: -37.5 ± 6.3mV</li> </ul>	<p>■試験細胞</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・A549 細胞</li> <li>・NCI-H1975 細胞</li> <li>・A431 細胞</li> </ul> <p>入手元: ATCC</p> <p>■培養方法</p> <p>10%FBS、抗生剤で補填した RPMI1640 内に室温 37°C、5%CO<sub>2</sub> 環境で培養。</p> <p>■試験内容/方法</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・細胞生存率・細胞毒性測定</li> <li>MTT 解析、LDH 解析</li> <li>・細胞周期分析</li> <li>細胞の DNA を PI で染色し、フローサイトメリー法で蛍光性を解析。</li> <li>・RNA の検出測定</li> <li>リアルタイム PCR 解析</li> <li>・A549 細胞内の金ナノ粒子の細胞死のメカニズム</li> <li>ATP 測定</li> </ul>	<p>■AuNPs の細胞毒性</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・24 時間ばく露した AuNPs は、A529、NCI-H1975 および A431 細胞に対して有意な毒性を持った。細胞が AuNPs に 24 時間ばく露すると、それぞれ 48.94(n=5) μg/mL、53.3(n=6)、65.2(n=6) μg/mL で、生存能力がおおよそ 50%低下した。</li> <li>・72 時間ばく露した細胞の生存能力は、24 時間ばく露した細胞のそれとは有意に異なっていた。</li> <li>・AuNPs で処理した A529、NCI-H1975 および A431 細胞において、LDH 漏出が増加した。</li> <li>・1 × IC<sub>50</sub> の AuNPs で処理した場合、A549 細胞 ATP 濃度は低下した。3 × IC<sub>50</sub> の Au で処理した場合、ほとんどの細胞母集団が G1 フェーズにあるのが見られた。</li> <li>・AuNPs で処理した細胞においては、亜群 G1 母集団の方が大型になった。</li> <li>・双方の AuNPs が、細胞増殖への損害を示唆する亜群 G1 フェーズ母集団が増加したため、アポトーシスを誘発した。</li> <li>・AuNPs は、内因性アポトーシス経路に加え、外因性経路を誘発した。そのため、内因性および外因性双方の経路が、Au 誘発性のアポトーシスに介在する。</li> <li>・AuNPs は、細胞中にアポトーシスを誘発し、細胞の生存能力を低下させた。</li> <li>・フローサイトメリー、ATP 測定およびリアルタイム RT-PCR 分析の 3 つの個別の技法のうちのすべてが、AuNPs がアポトーシスを誘発することを示した。AuNPs は、細胞内 ATP 枯渇によりアポトーシスならびにその後の Bax、Bak およびカスパーゼ-3 を含む、主なアポトーシス遺伝子の上方調節を誘発するように思えた。カプターゼ-8 の mRNA 濃度の有意な上昇を考慮すると、細胞に導入された場合、AuNPs は外因性アポトーシス経路を介してアポトーシスを誘発するはずである。</li> </ul>	<p>内因性および外因性の双方の経路は、血清タンパク質被膜のクエン酸により減少する AuNPs にとって効率的であるはずである。</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
61	Gagner JE, Qian X, Lopez MM, Dordick JS, Siegel RW  Biomaterials 33 (2012), pp 8503-8516	Effect of gold nanoparticle structure on the conformation and function of adsorbed proteins (吸着したタンパ ク質の立体構 造及び機能上 における金ナノ 粒子構造の影 響)	<p>■対象物質</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・金ナノ立方体 サイズ: 85±15nm</li> <li>・金ナノ八面体 サイズ: 60±20nm</li> </ul> <p>・両ナノ粒子を高 温ポリオール法で 精製。</p> <p>・PVP で合成。メル カプト酸(MUA)使 用。</p>	<p>■試験内容/方法</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ナノ粒子の特性評価 SEM、TEM、ICP-MS 使 用</li> <li>・溶液内でのタンパク質 量測定 BCA 解析</li> <li>・タンパク質とナノ粒子 の相互作用の測定 等温滴定量熱計(ITC) 実験</li> <li>・タンパク質とナノ粒子 の共役反応特性 表面プラズモン共鳴 (SPR)の吸光分光法測 定</li> </ul>	<p>■ナノ粒子特性化</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・リガンド交換前後に撮影された SEM 画像は、PVP 除去および MUA との置換後、ナノ粒子の形態が未変化であったことを示す。</li> </ul> <p>■吸着等温線</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・Lyz には、等電点がそれぞれ P=11、P=8.75[30、31]のためか、 ChT より AuNP 表面に対して親和性が若干高めである。</li> <li>・酵素は同様にナノ粒子と相互作用する。ナノチューブへの吸着は、 Langmuir モデルにより適切に表されており、ナノチューブへの全吸 着部が本質的に同一であることを示し、ナノ八面体への吸着は、 bi-Langmuir モデルによりさらに適切に表されており、2つの AuNO 上の吸着部を示している。</li> </ul> <p>■タンパク質・ナノ粒子複合体の特性化</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・AuNO および AuNC 双方への Lyz 吸着は、ゆっくりと集まり沈殿す る不安定な複合体を招き、吸収度低下が以前の数ある研究と一 致した。しかし、ChT-AuNO 複合体は、可視検査下では安定してい るように見え、吸収値は、ナノ粒子単体一面で共役 SPR における 26%の低下を示し、SPRピーク値の赤方偏移は見られなかった。</li> <li>・予測低表面被覆率において、AuNC 上で 80%、AuNO 上で 40%の相 対比活性が消失し、far-UV-CD において見られた二次構造の消 失と一致した。低表面被覆率(~25%)における ChT 複合体の far-UV CD の研究により、ChT が本質的に AuNO への吸着という 天然構造を維持することができることがわかった。</li> </ul> <p>■等温線滴定量熱測定</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ITC 試験における理論上の表面被覆率は、双方の位置(N1+N2)に おける ChT 生体分子数を考慮すると、等温線モデルにより見られ るものと同様であった。</li> </ul>	タンパク質吸着は、 AuNP のみの影響を 受けるだけでなく、ナ ノ粒子表面の根本的 な原子構造による影 響も受ける。

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	Girgis E, Khalil WK, Emam AN, Mohamed MB, Rao KV  Chemical Research in Toxicology 21; 25 (5) 2012, pp 1086-1098	Nanotoxicity of gold and gold-cobalt nanoalloy (金・金コバル トナノ合金の 毒性)	<p>■対象物質</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・金ナノ粒子</li> <li>・金コバルトナノ粒子</li> </ul> <p>サイズ: 15±1.5nm</p> <p>■試験手順</p> <p>NP 懸濁液を、10,000 rpm で遠心分離機にかけ精製し、分離した粒子を再度水中に分散させ、透析膜に通してさらに精製。溶液中の過剰イオンを外部水溶液へと移動させ、その後、注射用 Au-Co および AuNPs 懸濁液を用意するために、粒子のコロイド溶液を、再蒸留水中(DDW)で界面活性剤として機能する 2%の Tween 80 に混ぜ、10 分間超音波振動により分散させた。</p>	<p>■試験生物</p> <p>雄アルビノマウス(160 匹)</p> <p>入手元: the Animal House Colony (Egypt)</p> <p>体重: 20-25g</p> <p>■試験用グループ</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・4 グループ: Negative control, Positive control, 実験グループ(金、金コロイダル)</li> <li>・実験グループ内をさらに濃度別(80, 160, 320mg/kg bw)に 3 グループに分ける。</li> </ul> <p>■投与方法: 経口投与</p> <p>■実験内容/方法</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・First-Strand cDNA の合成と RNA 抽出。</li> <li>遺伝子発現分析</li> <li>・雄マウスの骨髄細胞内の小核を有する多染性赤血球 (MnPCE)における金ナノ粒子と金コロイダル粒子の影響。</li> <li>小核試験</li> <li>・グルタチオンペルオキシダーゼ活性の検出</li> <li>・8-OHdG の産出検査</li> </ul>	<p>■遺伝子発現</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・癌源遺伝子に関しては、最近の結果で、Au-Co NPs にばく露したマウスの肝臓 mRNA 濃度における有意な上昇がわかった。160 および 320 mg/kg bw の濃度で、7 日ないし 14 日の Au-Co NPs へのばく露で、CYP3A および p27 遺伝子の発現率が有意に上昇した。さらに、最大用量の Au-Co NPs の 7 日ないし 14 日間のばく露で、CYP3A および p53 遺伝子の発現率が有意に上昇した。しかし、低用量の Au-Co NPs では、7 日ないし 14 日間のばく露で、CYP3A、p53 および p27 遺伝子の発現率は有意に上昇することはなかった。</li> <li>・抗酸化遺伝子(GST)発現評価では、中用量および最大用量の Au-Co NPs へのばく露は、処置 14 日目に、有意に発現率を低下させることがわかった。しかし、用量 80 および 160 mg/kg bw の Au-Co NPs では、ばく露 7 日目に、GST 遺伝子発現率を有意に低下させることはなかった。</li> </ul> <p>■小核アッセイ</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・低用量の Au-Co NPs では、7 日目および 14 日目において、対照群に比べ、MnPCEs の発現率を有意に増加させることはなかった。しかし、中用量および高用量での雄のマウスへの Au-Co NPs へのばく露では、同期間において、対照群と比べ(それぞれ 5.3±0.1、5.9±0.1)、MnPCEs の発現率が有意に上昇したしかし、雄のマウスの低用量もしくは中用量の Au NPs での処置では、同期間において、骨髄細胞における MnPCE 形成が増加し、有意な差異は見られなかった。</li> </ul> <p>■グルタチオンペルオキシダーゼ活性の測定</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・160 および 320 mg/kg の用量で Au-Co NPs にばく露した雄のマウスに、対照群と比べ、7 日目および 14 日目において、有意なグルタチオンペルオキシダーゼ低活性が見られた。同様に、高用量の Au NPs にばく露した雄のマウスに、対照群と比べ、同期間において、有意なグルタチオンペルオキシダーゼ低活性が見られた。</li> </ul> <p>■8-ヒドロキシ-2-デオキシグアノシン(8-OHdG)生成</p>	<p>Au-Co alloy NPs は、遺伝子発現、DNA 損傷および DNA 付加物において、Au NPs に比べ、より多くの変性を生じさせた。これらの影響には抗酸化防御力の低下が伴い、遺伝子発現変化および遺伝毒性を誘発する ROS 生成の増加となる場合もある。最大用量を除き、対照群と同様の抗酸化グルタチオンペルオキシダーゼ酵素の濃度を伴う DNA においては、Au NPs がこの毒性を発生させることはなかった。</p>

					<ul style="list-style-type: none"> <li>・対照群の肝組織における8-OHdG値は、105 dGに対し3.6 8-OHdGから105 dGに対し3.5 8-OHdGであった。</li> <li>・Au NP処置後の7日目および14日目における8-OHdG/2-dG比は、対照群のそれと同様であった。しかし、対照群に比べ、中用量でのAu-Co NPsでの処理後14日目で、8-OHdG/2-dG生成の比率が1.5倍に増加した。さらに、この比率は7日目の1.4倍から14日目の2.6倍へと増加した。同様に、低用量のAu-Co NPsによる処置の7日目および14日目に、対照群と比べ、8-OHdG/2-dG生成の比率が若干増加した。</li> </ul>	
--	--	--	--	--	--	--

【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
63	<p>Mukherjee SG, O'Clonadh N, Casey A, Chambers G</p> <p>Toxicology in Vitro 26 (2012), pp 238-251</p>	<p>Comparative in vitro cytotoxicity study of silver nanoparticle on two mammalian cell lines. (2種の哺乳動物細胞株への銀ナノ粒子の in vitro 細胞毒性研究における比較)</p>	<p>■対象物質 銀ナノ粒子 直径:100nm 以下 入手元: Sigma Aldrich Ltd. (Ireland)</p>	<p>■試験細胞 ・ヒト皮膚細胞(HACAT cells) 入手元: Prof. Dr. Boukanp (Germany) ・ヒーラ細胞(Hela cells) 入手元: ATCC (USA)</p> <p>■培養方法 Hacat 細胞: CO<sub>2</sub> 5%、室温 37°Cの環境で、FBS 10%、45IU/ml のペニシリンおよび 45IU/ml のストレプトマイシンで補填した 2mM L-グルタミンと共に DMEM F-12 HAM 内で培養。 Hela 細胞: CO<sub>2</sub> 5%、室温 37°Cの環境で、FBS 10%、45IU/ml のペニシリンおよび 45IU/ml のストレプトマイシンで補填した RPMI-1640 内で培養。</p> <p>■2種の細胞株の毒性評価方法 ・Alamar Blue 解析 ・Neutral Red 解析 ・Coomassie blue 解析 ・MTT 解析 ・Clonogenic 解析 ■アポトーシス研究 ApoGlow kit 使用(Lonza 社、UK)</p>	<p>■標準細胞毒性アッセイ Alamar Blue(AB)、Neutral Red(NR)、Coomassie Blue(CB)、MTT などのすべてのアッセイに関して、用量依存反応が見られた。 AB、NR、CB、MTT などのアッセイにおけるばく露時間の増加とともに、生存能力の低下が見られた。 CB および NR アッセイにおけるすべてのばく露時間の point において、HeLa 細胞の LD50 値は、HeCaT 細胞よりかなり低い。AB および MTT アッセイにおいて、ばく露 24 時間後で、HaCaT 細胞に比べ、HeLa 細胞の LD50 値は若干高かったが、48 時間と 72 時間後に再び低下した。また、クローン形成法では、コロニー数が減少すると、Ag ナノ粒子の濃度が上昇した。 ■アポトーシス研究 Ag ナノ粒子の濃度が上昇する HeCaT および HeLa 細胞株においては、アポトーシス細胞母集団における有意な増加が見られた。双方の細胞株を比較すると、濃度とばく露時間が同じ場合、HeLa 細胞は HeCaT 細胞よりアポトーシス細胞死を起しやすかった。</p>	<p>・Ag ナノ粒子の細胞毒性は、検査した用量・ばく露時間・細胞株依存性であった。 ・Ag ナノ粒子は、酸化ストレス度の上昇、グルタチオン枯渇、およびアデニル酸キナーゼアッセイから判明し、アポトーシスの原因となる細胞膜への損傷を誘発することがわかった。</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
64	Haase A, Mantion A, Graf P, Plendl J, Thuenemann AF, Meier W, Taubert A, Luch A  Archives of Toxicology 2012, Vol 86, issue 7, pp 1089-1098	A novel type of silver nanoparticles and their advantages in toxicity testing in cell culture systems  (新型銀ナノ粒子 の細胞培養シス テムにおける毒 性試験の利点)	■対象物質 銀ナノ粒子(ペプチドコ ーティング)、SNPs 入手元: Fluka, Bachem(Switzerland) サイズ: 20nm(Ag20Pep), 40nm(Ag40Pep)  ペプチドコーティング金 ナノ粒子 (GNPs)(Au20Pep)を比 較のため使用。	■試験細胞 ヒト単球性白血病細胞株(THP-1) 入手元: German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH (Germany) ■細胞培養 10%FCS, 2mM L-glutamine, 10mM HEPES, 1mM ピルビン酸 塩, 100U/ml ペニシリン, 0.1mg/ml ストレプトマイシンを補 填した RPMI 培地中に室温 37°C、5%CO <sub>2</sub> 環境で培養。 培養期間: 24時間と48時間  ■細胞毒性・細胞生存率試験 細胞生存率をWST-1解析とLDH 解析にて測定。	■試験結果 ・検査した両方のタイプの SNP は、強い 用量・ばく露時間依存的な細胞毒性反 応を示した。質量用量に基づくと、小さ めの SNP(Ag20Pep)は大きめの SNP(Ag40Pep)より、若干毒性が高かつ た。 ・放出された銀イオンは非常に少量で あった。それと対照的に、溶液中の AgNO <sub>3</sub> は、適用された細胞系における 25 μM の濃度でも細胞毒性があると証 明された。 ・両方のタイプの SNP に対して、用量・ ばく露時間依存的な毒性を検出した。 小さめの SNP(Ag20Pep)には、大きめ の SNP(Ag40Pep)より高い毒性があつ た。 ・LDH アッセイにより測定された IC(50) 値は、細胞への Ag20Pep へのばく露に 対し、24時間で 100 μg/mL、48時間で 15 μg/mL であった。それと対照的に、 Ag40Pep の IC(50)値は、24時間のばく 露では算出できなかったが、48時間の ばく露で、最大 100 μg/mL であった。	・SNPs は、培養下の細胞にお いて、強い用量・ばく露時間依 存的な毒性を示す。

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	Kim JS, Song KS, Sung JH, Ryu HR, Choi BG, Cho HS, Lee JK, Yu IJ  Nanotoxicol ogy, 2012; Early Online, 1-8	Genotoxicity, acute oral and dermal toxicity, eye and dermal irritation and corrosion and skin sensitisation evaluation of silver nanoparticles (銀ナノ粒子の 遺伝毒性、急性 経口・真皮毒 性、眼・皮膚刺 激、皮膚感作評 価)	■銀ナノ粒子 入手元:ABC Nanotech Co., Ltd. (Korea) 1%クエン酸内で分 散。 ストック溶液内濃 度:20.48% 粘着性:<15 平均サイズ:10nm pH:5.80	■試験生物、方法 ・ネズミチフス菌 TA98, TA100, TA1535, TA1537、大腸菌 WP2uvrA を使用した微生物 復帰突然変異試験法(Ames 試験) 細胞入手元: Molecular Toxicology Inc. (USA) ・S9. チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO-k1)を使用した in vitro 染色体異常検 査。 ばく露期間:6, 24 時間 マイトマイシン B、シクロホスファミドを対照 群として使用。 ・ラットを使用した経口、真皮毒性検査。 週齢:7 週 入手元:Koatec Co. Ltd. (Korea) ばく露ステップ(経口毒性検査用): 1 回目:300mg/kg 2 回目:300 mg/kg 3 回目:2000 mg/kg 4 回目:2000 mg/kg ・ニュージーランドホワイトラビットを使用し た眼刺激・腐食試験。 入手元:Samtako (Korea) 眼刺激試験:100mg の試験物質を左目の 結膜に点眼。 皮膚刺激試験:0.5ml の対象物質を含んだ ガーゼ片を使用。0.5ml のクエン酸塩を含 んだガーゼ片と比較。 ・モルモット(Guinea pig)を使用した皮膚感 作試験。 入手元:Samtako (Korea) 0.1ml のコロイド状銀ナノ粒子を肩周辺に 三ヶ所皮内注射。	■微生物復帰突然変異試験(Ames テスト) ・代謝活性化系の非存在(S9 混合液)下で、細 胞毒性は、最大 62.5 $\mu$ g/plate(TA98、TA1535、 TA1537 および WP2uvrA)および最大 31.25 $\mu$ g/plate(TA100)で見られた。さらに、代謝活性化 系の存在下では、最大 125 $\mu$ g/plate(TA98、 TA100 および TA1537)および最大 250 $\mu$ g/plate (TA1535 および WP2uvrA)で見られた。 ■in vivo 染色体異常試験 ・CHO-k1 細胞に関しては、陰性対照群と比べ、 代謝活性の有無にかかわらず、試験をしたどの 用量においても、Ag-NPs には、染色体異常を持 つ細胞数の統計的有意な増加は見られなかつ た。さらに、陰性対照群と比べ、S9 混合液の存 在の有無にかかわらず、Ag-NPs には、倍数な いし核内倍加する細胞数における統計的有意な 増加は見られなかった。 ■ラットを用いた急性経口・皮膚毒性試験 ・試験動物の死亡も異常な兆候も見られなかつ た。さらに、投与 14 日間で体重における有意 差は見られず、剖検時には肉眼的異常所見も見 られなかった。 ■ウサギを用いた急性眼刺激性・腐食試験 ・試験物質除去後の 1、24、48 および 72 時間時 点で、角膜、虹彩、結膜への刺激の形跡は見ら れなかった。 ■ウサギを用いた急性皮膚刺激・腐食試験 ・試験動物において、1、24、48 および 72 時間時 点で、角膜、虹彩、結膜への刺激の形跡は見ら れなかった。 ■モルモットを用いた皮膚感作性試験 ・投与群の SPF モルモットにも対照群にも、試験 期間中に、有意な体重変化、異常な臨床症状、 死亡などは見られなかった。20 匹中 1 匹に、抗 原投与パッチ除去後 24 時間および 48 時間時 に、それぞれ離散性紅斑と斑状紅斑が見られ た。	Ag-NPs には、微生物、 哺乳類細胞株、標的動 物の臓器に対して、強 い毒性作用はなかつた が、ある特定の濃度の Ag-NPs は、微生物およ び哺乳類細胞株に対し 細胞毒性を誘発するこ とがわかった。

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
66	Haase A, Rott S, Mantion A, Graf P, Plendl J, Thünemann AF, Meier WP, Taubert A, Luch A, Reiser G  Toxicological Sciences 126 (2), 457-468 (2012)	Effects of silver nanoparticles on primary mixed neural cell cultures: uptake, oxidative stress and acute calcium responses (混合神経系細胞 培養における銀 ナノ粒子の影響: 摂取、酸化スト レス、急性カルシ ウム反応)	<p>■対象物質 銀ナノ粒子(ペプチドコーティング)、SNPs 入手元:Fluka, Bachem(Switzerland) サイズ:20nm(Ag20Pep), 40nm(Ag40Pep)</p> <p>ペプチドコーティング金 ナノ粒子 (GNPs)(Au20Pep)を比 較のため使用。</p> <p>ナノ粒子アリコートを一 80°Cで冷凍保存。銀ナ ノ粒子のアリコートを超 音波分解し、酸性の水 内で懸濁。</p>	<p>■生後 1-3 日の Wistar rat の脳から 得た神経細胞</p> <p>■培養方法 10%FBS で補填した DMEM 内で播種。</p> <p>■試験方法 ・銀ナノ粒子の細胞 毒性評価 WST-1, LDH、 MANOVA 解析 ・銀ナノ粒子の酸化 ストレス検査 ROS 生成測定。 DHE 染色法 ・銀ナノ粒子の急性 カルシウム反応測 定</p>	<p>■銀ナノ粒子の細胞毒性 ・Ag20Pep 粒子に関しては、強い細胞毒性が見られた。質量ベースで用量を比較した際、試験をしたすべての濃度において、より大きい Ag40Pep の方がかなり低い毒性であった。Student-t 検定を用いて、7 日、14 日、21 日のそれぞれの培地に対して、Ag20Pep と Ag40Pep の細胞毒性における差が統計的有意であるかどうかを調べ、2 つの高濃度 (50 および 100 <math>\mu</math>g/mL) に関して有意差が認められた。</p> <p>■銀ナノ粒子は酸化ストレスの原因 ・SNP へのばく露後、初回の処置の 3 時間後時点で既に検知可能であった、培地における強いタンパク質カルボニルの形成の傾向が見られた。それとは対照的に、GNPs は効力がなかった。</p> <p>■銀ナノ粒子は急性カルシウム応答を喚起 ・SNP での混合神経細胞処理後、迅速かつ強い細胞内カルシウム応答が見られた。この応答は、通常 SNP 添加の 3~6 分後に見られた。逆に言えば、SNP での処理後に、5~50 <math>\mu</math>g/mL の濃度範囲でカルシウム上昇が見られた。</p> <p>・両方のタイプの SNP には、同じ用量で適用した Ag20Pep と比べ、有意かつより強い急性のカルシウム応答を誘発することが可能であった。用量依存性はやや稀であった。</p> <p>・既に Ag20Pep の 5 <math>\mu</math>g/mL 時点で、強いカルシウム応答が検知され、濃度が高まるにつれ、応答が低下した。細胞毒性のある SNP 用量の 50 <math>\mu</math>g/mL で測定したカルシウム濃度は、再び低下しつつあった。しかし、Ag40Pep の粒子に比べ、最小濃度の 5 <math>\mu</math>g/mL でより強い応答が喚起された。</p>	<p>・in vivo のバイオアベイラビリティに応じて、低用量の SNP での長期ばく露は、CNS において有害影響を誘発する。</p> <p>・Ag20Pep 粒子ははるかに強い応答を喚起する。</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
67	Ghosh M, J M, Sinha S, Chakraborty A, Mallick SK, Bandyopadhyay M, Mukherjee A	In vitro and in vivo genotoxicity of silver nanoparticles (銀ナノ粒子の in vitro と in vivo 遺伝毒 性)	<p>■対象物質 銀ナノ粒子 入手元: Sigma (USA) ・サイズ: 75-130nm ・純度: 99.5% ・微量金属基準</p> <p>PBS もしくは水内 で懸濁し、超音波 振動(100W, 30kHz)により 30 分 間分散。</p>	<p>■試験細胞 ヒトリンパ球 20-30 歳の男性ボランティア 3 名から 血液を採取し、リンパ球を調達。 細胞生存率をトリパブルー色素排 除試験法で解析⇒約 95%</p> <p>■培養方法 異なる銀ナノ粒子の濃度 (0,25,50,100,150,200 <math>\mu</math>g/ml)で 3 時間、 37°C で RPMI-1640 培地内にて培養。</p> <p>■試験内容・方法(in vitro) ・ヒトリンパ球内の銀ナノ粒子の細胞 毒性 MTT, WST, トリパブルー解析 ・リンパ球内の銀ナノ粒子による DNA 損傷検査 コメット解析 ・ヒトリンパ球細胞内の ROS 生成 DCFDA 解析 ・血球内の銀ナノ粒子の摂取 フローサイトメトリー法</p> <p>■試験生物・内容・方法(in vivo) 雄 Swiss albino マウス使用。 週齢: 8-12 週 体重: 25-30g ・骨髄細胞の DNA 損傷検査 コメット解析、ANOVA 試験 ・骨髄細胞の ROS 生成 DCFDA 解析 ・A. cepa と N. tabacum の DNA 損傷検 査 コメット解析</p>	<p>■ヒトのリンパ球における Ag-np 細胞毒性 ・細胞毒性試験の結果に、すべての濃度において用 量依存的細胞毒性が見られた。トリパブルー色素 排除試験で、細胞生存率における用量依存的低下 が見られ、150 <math>\mu</math>g/mL およびそれ以上の濃度では低 下が有意であった。</p> <p>■ヒトのリンパ球の DNA 損傷 ・Ag-np は、ヒトのリンパ球の DNA 切断を誘発する。テ イルの強度(テイル DNA(%))は、すべての濃度で対 照群より高かった。25 <math>\mu</math>g/mL の最小濃度において 急上昇があり、その後は Ag-np の濃度の上昇とともに 徐々に低下した。</p> <p>■ヒトのリンパ球における ROS 生成 ・すべての濃度において、ROS 生成の有意な増加が 見られた。蛍光強度(DCFA)において、3~5 倍の増 加が見られた。</p> <p>■Ag-np の in vivo 遺伝毒性 ・ANOVA テストにより、異常な細胞の発生頻度と、対 照群に比べ、1 細胞あたりの裁断数が有意に多い(<math>P</math> <math>\leq 0.05</math>)ことがわかった。 ・コメットアッセイにおいては、Ag-np での処理群のマ ウスの骨髄における DNA 損傷の増加が見られた。 同アッセイのパラメータ(テイル DNA(%))は、20 mg/kg bw の濃度を超えるとそれ以上の DNA 損傷は 示していなかった。</p> <p>■マウスの骨髄細胞における ROS 生成 ・結果は、10 および 20 mg/kg bw の濃度で有意な ROS 生成を示した。蛍光強度における最大 1.5 および 1.4 倍の上昇が、それぞれ 10 および 20 mg/kg bw の濃 度で見られた。</p> <p>■A. cepa および N. tabacum における DNA 損傷 ・A. cepa の芽から分離させた核においては、DNA 鎖 切断が増加し、50 <math>\mu</math>g/mL でおよびそれ以上の濃度 で平坦域に達した。根茎においては、50 <math>\mu</math>g/mL の濃 度まで徐々に増加が始まり、その後徐々に減少し た。新芽における処理の影響は、25 および 50 <math>\mu</math> g/mL において統計的に有意(<math>P \leq 0.05</math>)であった。</p>	<p>・要約すると、in vitro および in vivo 試験で は、Ag-np は植物系 および動物系に対し て遺伝毒性があり、 ROS を生成し、アポト ーシスおよび壊死を 誘発する可能性があ ることを示した。 ・核 DNA と細胞機能に おいて有意な損傷が 見られたが、これは Ag-np と DNA の相互 作用を示す。</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
68	Lee Y, Kim P, Yoon J, Lee B, Choi K, Kil KH, Park K  Nanotoxic ology, 2012; Early Online, 1-11	Serum kinetics, distribution and excretion of silver in rabbits following 28 days after a single intravenous injection of silver nanoparticles (銀ナノ粒子の単回 静脈内注射後 28 日 のラビット内の銀の 血清動態、分布およ び排泄)	<p>■銀ナノ粒子 入手元:ABC NANOTECH (Korea) クエン酸塩で被覆し、 20%水溶液の状態にて提 供。 サイズ:7.9±0.95nm</p> <p>ストック銀ナノ粒子を 薄めて静脈内注射用 の銀ナノ粒子懸濁液を 調合。</p> <p>終末濃度:高投量グル ープ 2.5mg/ml(5mg/kg) 低投量グループ 0.25mg/ml(0.5mg/kg)</p> <p>2ml/kgbw の注入</p>	<p>■試験生物 ニュージーランドホウ イトラビット 入手元 Samtako Bio Korea Company (Korea) 体重:平均 2.4kg(4匹)</p> <p>■試験方法 ・肝臓、腎臓、脾臓、 肺、脳、精巣、胸腺の 細胞組織を取り出し、 グインナノ粒子の分 配分析。 ・血清動態、分布およ び排泄分析 ICP-MS 解析 ・尿検査による一般毒 性検査 Multistix 10SG(Simens, USA), 尿検査器 (Clinitek 100, USA)使用。</p>	<p>■血中動態 ・銀の血中濃度の算術平均値は、5 mg/kg での処置後 5 分後 では、<math>0.462 \pm 0.143 \mu\text{g/mL}</math> であり、最大値であった。処置 24 時間後に、緩やかな低下(<math>0.233 \pm 0.049 \mu\text{g/mL}</math>)が見られた。 統計的な有意性ではなかったものの、処置後 2 日目に見 られた <math>0.304 \pm 0.074</math> までの若干の上昇は、予期せぬイベント であった。試験最終日の処理後 28 日目の AgNPs の血中濃 度は <math>0.050 \pm 0.009 \mu\text{g/mL}</math> であり、これは、血中における当初 の AgNPs のうちの 90%が排出されていたことを示した。 ・0.5 mg/kg で処理した群においては、注射の 5 分後で、 AgNPs の最大血中濃度も見られ、濃度は <math>0.312 \pm 0.080 \mu\text{g/mL}</math> であった。その血中濃度の低下は、最も急速であり、当 初の血中濃度のうちの 15%が、注射の 24 時間後に見られ た。28 日後に、低用量投与群において、血中濃度は当初の およそ 5%まで緩やかに低下していた。</p> <p>■組織分布 ・肝臓、脾臓および腎臓が、脳および胸腺の組織に比べ、 AgNPs 蓄積の主な標的臓器であるように思われた。 ・精巣と胸腺を除き、組織の大半は 1 日目より 7 日目の濃 度が高かった。</p> <p>■排出 ・試験全期間を通して、糞による排出に比べ、尿による銀の排 出は非常に少なかった。尿による排出は、1 日目にピークの <math>0.044 \pm 0.0080 \mu\text{g/mL}</math> に達し、3 日目で <math>0.016 \pm 0.003 \mu\text{g/mL}</math> まで減少した。</p> <p>■遺伝毒性 ・単回の AgNPs 静脈内点滴注射では、5 mg/kg 0.5 mg/kg 群 においても死亡は見られなかった。</p>	<p>・AgNPs は、ウサギへの 単回静脈内点滴注射 の後、血中濃度の低下 が見られたものの、容 易に体内に蓄積し長時 間留まった。 ・血中動態の半減期が、 5 mg/kg で処理した群 において、<math>11.7 \pm 1.3</math> 日 で、0.5 mg/kg で処理し た群において、<math>16.3 \pm</math> <math>2.9</math> 日であった。 ・AgNPs の 50%超が最終 日の 28 日まで試験した 臓器内に残存していた ため、臓器から血中へ の銀の放出の半減期 は算出できなかった。</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
69	Liu Y, Guan W, Ren G, Yang Z  Toxicology Letters 209 (2012), pp 227-231	The possible mechanism of silver nanoparticle impact on hippocampal synaptic plasticity and spatial cognition in rats (ラットの海馬 のシナプス可 塑性と空間認 知における銀 ナノ粒子が及 ぼす影響のメ カニズム)	■銀ナノ粒子 入手元: Research Institute of Science & Technology, University of Hertfordshire (UK) サイズ: 50-100nm  銀ナノ粒子の懸濁液を 純粋で用意し、超音波 振動で 20 分間分散。  ・TEM 解析による懸濁 液内の銀ナノ粒子の 凝集サイズ: 32.68-380.21nm ・DLS 試験による平均 直径: 244.5nm ・ζ 電位: -42.81	■試験生物 雄 SPF Wistar ラット 入手元: Experimental Animal Center of the Chinese Academy Medical Sciences (China) 体重: 275±20g ラットを 8 匹ずつ 3 つのグループ に分割。 1. Control グループ 2. 低投与量(Ag-np 3mg/kg)グ ループ 3. 高投与量(Ag-np 30mg/kg) グループ ■ばく露方法: 点鼻 ■試験内容・方法 ・空間認知検査 Morris water maze(モリス水迷 路)測定 ・シナプス可塑性 LTP(長期増強)の測定 ・海馬の ROS 解析 ・ヘマトキシリンとエオシンによっ て染色した臓器の観察。 光学顕微鏡検査	■空間プローブテストへの Ag-np の影響 ・対照群と比べ、投与群において、標的四半部 における時間率とプラットフォームの位置の交 差点が減少し、高濃度群では減少がより顕著で あった。 ・Ag-np ばく露群において、対照群と比べ、空間 学習力および空間記憶力が低下した。ばく露が 高濃度になるほど、ラットにおける損傷度も高か った。 ■長期電位 ・高周波刺激の直後、fEPSPs の勾配が大きく、 基準期間のレベルを超えて安定化した。しかし、 対照群と比べ、Ag-np ばく露群では fEPSPs の 勾配が明らかに少なかったが、低濃度群より高 濃度群の方が fEPSPs の勾配が少なかった。 ・海馬のホモジネートにおける ROS アッセイ Ag-np ばく露群の方が、対照群に比べ、超酸化 物アニオンとヒドロキシルラジカルが高濃度であ った。 ■HE 染色 ・HE 染色を応用し、Ag-np により誘発されたニュー ロン損傷を観察した。対照群ラットの海馬にお ける PP および DG 領域に、通常のピラミッド状 のニューロンの形態が見られた。Ag-np ばく露 群では、海馬の PP および DG 領域のピラミッド 状のニューロンの輪郭がかなり変化していた。	・ラットへの Ag-np の経鼻投与 により、MWM の成績により表 されたように、学習および記憶 の欠損が誘発された。Ag-np の神経毒性の機序は、少なく とも部分的に、シナプス可塑 性の損傷に存在していた。 ・Ag-np は、海馬の PP および DG 領域の LTP を低下させ、 学習および記憶損傷が現れ る。 ・海馬のホモジネートにおける ROS アッセイでは、HE 染色片 で見られたように、ROS 過生 成は、ストレス、炎症、DNA 損 傷およびアポトーシスなどの 酸化的損傷につながるものが 示された。

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
70	Bowman CR, Bailey FC, Elrod-Erickso n M, Neigh AM, Otter RR  Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 31, No.8, pp 1793-1800, 2012	Effects of silver nanoparticles on zebrafish (Danio rerio) and Escherichia coli (ATCC 25922): a comparison of toxicity based on total surface area versus mass concentration of particles in a model eukaryotic and prokaryotic system (真核生物と原核生物 のシステムにおける全 表面積対粒子の質量 濃度に基づいた毒性 の比較:ゼブラフィッ シュおよび大腸菌の銀ナ ノ粒子が与える影響)	<p>■対象物質</p> <p>・銀ナノ粒子 入手元: nanoComposix (USA) サイズ: 20, 50, 110nm ナノ粒子の質量: 4.39E-17, 6.87E-16, 7.31E-15 全表面積: 2.82E+16, 1.08E+16, 5.08E+15</p> <p>銀塩から水溶液法 を使い、リン酸緩 衝液内で 2mM の 終末濃度に合成。 ・硝酸銀 入手元: Sigma-Aldrich</p>	<p>■試験細胞</p> <p>・ゼブラフィッシュ胚 倒立顕微鏡(Nikon Eclipse TS100)を用い て、24、72 および 120 hpf で、ばく露した胎児を観 察</p> <p>・大腸菌(ATCC25922) E. coli 大腸菌培養および アッセイ開発 トリプシン大豆スープに E. coli 大腸菌を植菌</p> <p>■試験濃度</p> <p>・銀ナノ粒子: 0.1, 0.5, 1, 5mg/L ・硝酸銀: 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5mg/L</p> <p>■試験方法</p> <p>・銀ナノ粒子の特性評価 TEM、DLS、紫外線可視 分光光度計使用 ・ゼブラフィッシュ内の銀 ナノ粒子と硝酸銀の毒性 評価 ・大腸菌内の銀ナノ粒子 と硝酸銀の毒性評価</p>	<p>■ゼブラフィッシュにおける銀ナノ粒子と AgNPs の毒性</p> <p>・銀ナノ粒子(20、50、110 nm)は、72 hpf で の残存率(ある一定の時点での生存率 (%))において濃度依存的な反応を誘発し た。</p> <p>・1 および 5 mg/L で 20 nm、0.5、1 および 5 mg/L で 50 nmならびに 5 mg/L で 110 nm の粒子において、対照群との有意な差異 (<math>p &lt; 0.05</math>)が見られた。対照群の胎児は、72 hpf で 95%の残存率が見られた。AgNO<sub>3</sub> で 処理したゼブラフィッシュには、0.1 mg/L で残存率に激減が見られ、すべてのゼブ ラフィッシュが死亡したが、0.001~0.05 mg/L の質量濃度に対しては、ほぼ 100% の残存率が見られた。</p> <p>■E. coli 大腸菌における Ag NP および AgNO<sub>3</sub> 毒性</p> <p>・アッセイにより、質量濃度ベースで、E. coli 大腸菌の AgNPs および AgNO<sub>3</sub> に対する 明確な用量およびサイズ依存的な反応が 見られ、粒子が小さいほど強い毒性を示 した。毒性を粒子の表面積ベース(nm<sup>2</sup>/L) で調べた際、サイズ依存的ではないが、 用量依存的な反応が保たれていた。</p>	<p>・AgNPs には、ゼブラフィッシュおよび 細菌に対して、濃度依存的な毒性が ある。</p> <p>・ゼブラフィッシュは、AgNPs 処理に対 してサイズ依存的に反応はしなかつ たものの、20 nm の AgNP は、運動異 常の発生率を最大化し、発達遅滞を 誘発した。細菌は AgNPs に対してサ イズ依存的に反応はせず、20 nm で は最小濃度で致死毒性が見られた。</p> <p>・ゼブラフィッシュおよび細菌に対 しては、AgNO<sub>3</sub> (銀イオン)は、20、50、 110 nm の AgNPs より毒性が強かつ た。</p> <p>・Ag NP の総表面積を細菌の死亡率の 評価に使用すると、本研究にもちられ た3つのすべての AgNPs(20、50、110 nm)に関して、サイズ依存的ではなく 用量依存的な反応が見られ、ひとた び総表面積がおよそ 1E × 18 nm<sup>2</sup>/L に達すると、ほぼ 100%の死亡率が見 られた。</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																																	
71	Kermanizadeh A, Pojana G, Gaiser BK, Birkedal R, Bilaničová D, Wallin H, Jensen KA, Sellergren B, Hutchison GR, Marcomini A, Stone V	In vitro assessment of engineered nanomaterials using a hepatocyte cell line: cytotoxicity, pro-inflammatory cytokines and functional markers (肝細胞株を使用した工業用ナノマテリアルの in vitro 評価: 細胞毒性、炎症性サイトカイン、機能的マーカー)	<p>■試験細胞</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>NM</th> <th>NMコード</th> <th>平均サイズ (nm)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>TiO<sub>2</sub></td> <td>NM101</td> <td>7</td> </tr> <tr> <td>ZnO</td> <td>NM110</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>ZnO</td> <td>NM111</td> <td>130</td> </tr> <tr> <td>Ag</td> <td>NM300</td> <td>&lt;20</td> </tr> <tr> <td>MWCNT</td> <td>NM400</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>MWCNT</td> <td>NM402</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>TiO<sub>2</sub></td> <td>NRCWE001</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>TiO<sub>2</sub></td> <td>NRCWE002</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>TiO<sub>2</sub></td> <td>NRCWE003</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>TiO<sub>2</sub></td> <td>NRCWE004</td> <td>94</td> </tr> </tbody> </table> <p>・NRCWE001 入手元: NanoAmor (USA) NRCWE002と NRCWE003の産出用に使用。 ・NRCWE004 入手元: Nabond Technologies Co., China ・それ以外の細胞 入手元: European Commission Joint Research Centre (Italy) ・NM110(未被覆)、NM111(被覆済)</p>	NM	NMコード	平均サイズ (nm)	TiO <sub>2</sub>	NM101	7	ZnO	NM110	100	ZnO	NM111	130	Ag	NM300	<20	MWCNT	NM400	30	MWCNT	NM402	30	TiO <sub>2</sub>	NRCWE001	10	TiO <sub>2</sub>	NRCWE002	10	TiO <sub>2</sub>	NRCWE003	10	TiO <sub>2</sub>	NRCWE004	94	<p>■試験細胞 ヒト肝芽腫(C3A)細胞株 入手元: ATCC 10%FCS、2mM L-グルタミン、100U/ml ペニシリン/ストレプトマイシン、1mM ピルビン酸ナトリウム、1%非必須アミノ酸を含んだ MEM 内で 37°C、5%CO<sub>2</sub> の環境で培養。</p> <p>■試験方法 ・細胞生存率測定 WST-1 解析、Alamar Blue 解析 ・IL-8、TNF-<math>\alpha</math>、IL-6、CRP、アルブミンの産出 ELISA ・C3A 細胞による尿素産出におけるナノマテリアルばく露の影響 QuantiChrom 尿素解析キット使用</p>	<p>■NM<sub>s</sub> の選択パネルの C3A 細胞生存率への影響 ・WST-1 データから、24 時間のばく露時点で、全 NM<sub>s</sub> を通じて細胞生存率における用量依存的の低下があったのは明らかであったが、Ag (NM 300) 2 <math>\mu</math>g/cm<sup>2</sup>、未被覆 ZnO (NM 110) 7.5 <math>\mu</math>g/cm<sup>2</sup>、および被覆 ZnO (NM 111) 15 <math>\mu</math>g/cm<sup>2</sup> に関しては、LC50 のみ測定可能であった。 ・WST-1 アッセイは、AlamarBlue と比べ、曲線の最大勾配の部分で相対的により感度が高かった。銀粒子(NM 300)は、C3A 細胞とともに最大の毒性を誘発した。その次が未被覆 ZnO (NM 110)、被覆 ZnO (NM 111)粒子という順番であった。</p> <p>■ナノ粒子の C3A 肝細胞 IL-8 生成への影響 ・低毒性の TiO<sub>2</sub> および MWCNT のサンプル(NM 101、NM 400、NM 402、NRCWE 001、NRCWE 002、NRCWE 003、NRCWE 004)に関しては、対照群と比べ用量依存的に IL-8 生成が増加し、高ばく露濃度において統計的有意差レベルに達した。しかし、毒性の強い Ag および ZnO (NM 100、NM 111、NM 300) の存在下では、IL-8 タンパク質生成レベルにおける夕菜上昇があり、LC50 値の周辺でピークに達し、その後毒性が増すにつれ生成されたサイトカインの量が減少した。</p> <p>■NM<sub>s</sub>C3A 肝細胞 IL-6.TNF-<math>\alpha</math> および CRP 生成への影響 ・C3A 細胞の選択 NM<sub>s</sub> へのばく露後、IL-6.TNF-<math>\alpha</math> および CRP 生成における有意な増加も減少も見られなかった。</p> <p>■ナノ粒子の C3A 肝細胞による尿素およびアルブミン生成への影響 ・24 時間のばく露後のどの NM<sub>s</sub> も尿素生成を修飾することができなかった。ZnO NPs-NM 100 および NM 111 に関しては、対照群と比べ、アルブミン値において有意な低下が見られた。しかし、他の 8 つの NM<sub>s</sub> は肝細胞によるアルブミンの生成に影響を与えることが可能であった。</p>	<p>・in vitro 肝細胞モデルは、細胞毒性およびサイトカイン生成に関しては、ZnO NPs は一貫して強力であることを示した。 ・対照的に、MWCNT および TiO<sub>2</sub> NMs は相対的に毒性がより低いことを示した。 ・ZnO の細胞毒性は、その溶解性と関連している可能性があるが、Ag NPs に関してはその可能性が低い。</p>
NM	NMコード	平均サイズ (nm)																																					
TiO <sub>2</sub>	NM101	7																																					
ZnO	NM110	100																																					
ZnO	NM111	130																																					
Ag	NM300	<20																																					
MWCNT	NM400	30																																					
MWCNT	NM402	30																																					
TiO <sub>2</sub>	NRCWE001	10																																					
TiO <sub>2</sub>	NRCWE002	10																																					
TiO <sub>2</sub>	NRCWE003	10																																					
TiO <sub>2</sub>	NRCWE004	94																																					

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
72	Li Y, Chen DH, Yan J, Chen Y, Mittelstaedt RA, Zhang Y, Biris AS, Heflich RH, Chen T  Mutation Research 745 (2012), pp 4-10	Genotoxicity of silver nanoparticles evaluated using the Ames test and in vitro micronucleus assay (in vitro 小核解析と Ames 試験を用いて評価した銀ナノ粒子の遺伝毒性)	■対象物質 銀ナノ粒子 入手元: Novacentrix, USA サイズ: 100 以上のナノ粒子がある中で、TEM 分析によると 4-8nm(66%), 8-12nm(24%), 0-4nm(4%), 12nm 以上(6%)の割合。 ゼータサイズ分析: 超高純度の水中で 61.2±1.6nm。	■試験対象 ・サルモネラ菌株 TA102, TA100, TA1537, TA98, TA1535 入手元: BioReliance Corporation (USA) 10 種の異なる銀ナノ粒子の濃度を 100 μL の滅菌水に 5 分間ボルテックス分散。その後 5 分間、超音波分解し、試験株と培養。 ・ヒトリンパ芽球細胞(TK6 細胞) 入手元: ATCC(USA) 室温 37°C、5%CO <sub>2</sub> 環境で、10%の FBS、1%のペニシリン/ストレプトマイシンを補填した RPMI-1640 培地で保存。 ■変異原性評価 ・エームズ試験(Ames test)、小核分析による評価。 S. typhimurium 検定系統の T98、TA100、TA1535、TA1537、TA102 を BioReliance Corporation(米国メリーランド州ロックビル)より入手し、試験に用いた。5 分間ボルテックスしその後 5 分間超音波分解し、10 種類の異なる濃度の AgNPs(0.15、0.3、0.6、1.2、2.4、4.8、9.6、19.2、38.4、76.8 μg/プレート)を 100 μL の滅菌水に散布し、37°Cで 4 時間、80rpm で揺らしながら、総量 200 μL を試験株で培養。 ■小核試験 TK6 ヒトリンパ芽球細胞および細胞培養の試料を American Type Culture Collection(米国バージニア州マナサス)より購入した。TK6 細胞を、10%のウシ胎児の血清と 1%のペニシリン/ストレプトマイシンで補充した RPMI-1640 培地で、大気中に 5%の CO <sub>2</sub> が存在する湿気のある環境で 37°Cで保った。	■Ames 試験における AgNPs の変異原性 ・被験物質が明らかな抗菌能力を示したにもかかわらず、AgNPにより処置した異なる試験株は、変異頻度を高めることはなかった。 ・試験した AgNPs の濃度は、すべての試験株に対して毒性を示したが、個々の試験株は、被験物質に対して異なる感作性レベルを見せた。TA98 および TA100 に対しては、プレート毎に 4.8 μg 以上で明らかな毒性(バックグラウンドの復帰突然変異株発現頻度の減少および(もしくは)バックグラウンドの芝生の菲薄化)が、TA1535 および TA1537 に対しては、プレート毎に 9.6 μg 以上で明らかな毒性が見られた。76.8 μg の最大濃度では、5 つの株のバクテリアすべてが死滅した。 ■TK6 細胞中の AgNPs による小核誘発 ・AgNPs を用いた 3 つの個別の試験から得られた細胞毒性プールデータは、20 μg/mL を超える濃度で AgNPs の毒性が大幅に上昇したことを示した。30 μg/mL での AgNPs の処置は、RPD が 45.4 %になり、RPD45±5%の試験における最大毒性に対する限界であった(細胞毒性 55±5%)。 ・AgNP による処置により用量依存的に小核発現頻度が上昇し、25 および 30 μg/mL で、小核における有意な増加が見られた。25 μg/mL による処置では対照群の 2.59 倍の増加が見られ、1.02%の純増加であり、30 μg/mL では 3.17 倍の反応度で、1.6%の純増加であった。 ・陽性対照の X 線による処置では、RPD 76.3%と、小核発現頻度が対照群	・5 nm/mL の AgNPs は、OECD TG471 推奨の 5 つの異なる S. typhimurium 試験株において、突然変異体を誘発することはなかったが、ヒトリンパ芽球細胞 T6 細胞小核試験において、AgNPs は濃度依存の細胞毒性および遺伝毒性を示した。弱い反応ではあったが、AgNPs は試験における小核発現頻度を統計的に有意に上昇させた。このデータにより、AgNPs の遺伝毒性評価には、in vivo 小核試験は Ames 試験より適切である可能性があることが示唆される。 ・ナノ粒子遺伝毒性評価のための、より適切なアッセイのバッテリー開発に取り組む今後の研究は、変数としての粒子サイズと被覆も検討するべきである。適切な遺伝毒性試験が確立されるよう、異なる粒子に関する機構データならびに発がん性バイオアッセイデータが必要である。

					<p>の 20 倍の誘発度が得られた。 ・AgNPs のみの対照群のサンプルを分析した際、小核は検出されなかった。これは、ナノ粒子およびそれらの凝集物が小核の測定に干渉しなかったことを示す。</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
73	Grosse S, Evje L, Syversen T  Toxicology in Vitro 27 (2013), pp 305-313	Silver nanoparticle-i nduced cytotoxicity in rat brain endothelial cell culture (ラット脳内皮 細胞培養にお ける銀ナノ粒 子によって誘 発した細胞毒 性)	<p>■対象物質 銀ナノ粒子 サイズ: 10, 50, 100nm 入手元: Nanocomposix, Inc. (USA)</p> <p>溶液内での試験物質 の分散</p> <p>■試料・方法 AgNP の原液(1 mg/mL)を、2mM のク エン酸緩衝液に混ぜ、 超純水で希釈し (Purelab Ultra Analytic、Elga 社)、100 <math>\mu\text{g/mL}</math> の保存溶液に した。この AgNP をさら に調合する前に、強く (2200 rpm で 2 分間) ボルテックスした。</p>	<p>■試験細胞 RBE4 細胞株 入手元: Michael Aschner (Vanderbilt University, USA)</p> <p>■培養方法 リボヌクレオシド、デオキ シリボヌクレオシド、 10%FBS、1%ペニシリン ストレプトマイシン、0.2% ジエネティシン硫酸塩、 0.2%塩基性線維芽細胞 成長因子で補填した MEM <math>\alpha</math> 培地で培養。</p> <p>■試験内容/方法 ・細胞毒性の指標となる 膜透過性の測定 ニュートラルレッド摂取 解析 ・細胞膜統合性測定 LDH 解析</p>	<p>・RBE4 細胞の NT 取り込みは、用量、ばく露 時間、粒径依存的である。全濃度におい て、ばく露時間の増加とともに RBE4 細胞の 染料取り込みが減少した。 ・<math>&gt;10 \mu\text{g/mL}</math> の濃度において、4 時間の短 時間ばく露後、最小径の AgNPs(Ag10)に、 細胞膜に対する最も強い毒性が見られ、 NR 取り込みを対照群のおよそ半分に減少 させた。 ・RBE 細胞からの細胞質 LDH 放出は、粒 径、濃度、ばく露時間依存的である。 ・<math>25 \mu\text{g/mL}</math> での Ag10 は例外であった。この 濃度は、4 時間および 24 時間後、同様では あるが非有意な LDH 漏出をもたらした。 LDH 漏出の有意な増加が、ばく露 24 時間 後に見られた。 ・<math>1 \mu\text{g/mL}</math> 未満(例えば 0.01 および <math>0.1 \mu\text{g/mL}</math>) の Ag10 へのばく露では、RBE4 細胞 のコロニー形成となった。特に、<math>&lt;1 \mu\text{g/mL}</math> の濃度で既に、非処理対照群に比べ、コロ ニー数は、粒子濃度の上昇とともにコロニ ー数が減少した。<math>&gt;5 \mu\text{g/mL}</math> の濃度では、 Ag10 へのばく露でコロニー形成には至らな かった。</p>	<p>・RBE 細胞の球状のクエン酸塩でコーティン グされた AgNPs へのばく露により、これら の細胞膜機能が損傷した。この作用は粒 径、表面積、ばく露時間および用量依存的 であった。 ・NR 取り込みアッセイでは、AgNP ばく露後 の重度の細胞膜損傷が見られ、LDH 漏出 は細胞膜へのごく軽度の損傷を示した。 ・RBE4 細胞の増殖能力を評価するために コロニー形成アッセイにより、驚くような低 濃度(<math>&gt;1 \mu\text{g/mL}</math>)の AgNPs で、コロニー形 成の完全な阻害が見られた。それとは対 照的に、NPs から放出された Ag+イオン は、RBE4 細胞の細胞膜機能ならびに増殖 能力のごく軽度の損傷をもたらしただけ であった。これらの結果は、AgNPs から放 出された Ag+イオンのみが、AgNPs により誘 発された影響の原因ではないことを示して いる。毒性メカニズムにおいては、NPs の イオン放出より、他の AgNPs の特性がさら に重要である可能性がある。</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
74	Kim S, Ryu DY  Journal of Applied Toxicology. 2013;33:78-79	Silver nanoparticle-induced oxidative stress, genotoxicity and apoptosis in cultured cells and animal tissues (銀ナノ粒子による酸化ストレス、遺伝毒性、アポトーシス内の培養細胞、動物細胞組織)	<p>■対象物質 銀ナノ粒子</p> <p>・総説のため試料調整法/試験用量の詳細は記載できない。</p>	<p>■試験生物/投与方法・期間/試験方法</p> <p>・総説のため記載できない</p>	<p>この総説で述べられている議題</p> <p>(1) 銀ナノ粒子が誘発する酸化ストレス</p> <p>(2) 銀ナノ粒子が誘発する遺伝毒性とアポトーシス</p> <p>(3) 銀ナノ粒子の物理化学特性とその影響</p>	<p>■今後の銀ナノ粒子が誘発する毒性の評価に向けての注意事項。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・まず、AgNPs が物理化学的特異特性を Ag 原子ないし Ag<sup>+</sup>イオンと比較した結果、AgNPs は Ag 原子やイオンとは異なる様式で細胞/組織と相互作用し、固有の経路を介して毒性を生じさせる可能性があることがわかった。しかし、細胞酸化ストレス、遺伝毒性およびアポトーシスの AgNP 特有のメカニズムの解明は、Ag<sup>+</sup>イオン放出・凝集などの AgNP 特有の特性により妨げられるため、これらの固有かつ不可避の特性に対応できる評価方法を考案するところが不可欠となる。</li> <li>・次に、AgNP 誘発性の毒性に関する数多くの研究が発表されてきており、AgNP 仲介の有害性への幅広い興味を反映している。しかし、これらの研究の多くが、各研究グループが独自の方法を採用した。これは特に AgNPs の調合について当てはまり、とりわけ AgNPs のコーティングと分散手順について言えることである。</li> <li>・そのため、完全に研究同士を比較することはできず、これは、特に細胞生存率の試験で得られた半数阻害濃度などの定量的データの場合に当てはまる。試みがなされた同分野の進歩に向けて、AgNP 誘発性の毒性に関する試験手順を標準化ならびに調和させることが非常に重要である。</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
75	Hayashi Y, Engelmann P, Foldbjerg R, Szabó M, Somogyi I, Pollák E, Molnár L, Autrup H, Sutherland DS, Scott-Fordsmand J, Heckmann LH  Environmental Science & Technology	Earthworms and humans in vitro: characterizing evolutionarily conserved stress and immune responses to silver nanoparticles  ミミズおよびヒト における in vitro 研究:進化的に 保存されたストレ スならびにナノ銀 粒子への免疫反 応の特性化	■対象物質 銀ナノ粒子 サイズ:83± 22nm 入手元: NanoAmor (USA) 銀ナノ粒子粉 末(純度: 99.9%のコロイ ド状態濁液を 準備し、1:1 の 割合で BSA と 混ぜる。	■試験細胞 ・ミミズ体腔細胞 Eisenia fetida を ECT Oekotoxikologie GmbH(Germany)から入手 ・THP-1 細胞 入手元: German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Germany) ・分化した THP-1 細胞 ・ヒト末梢血単核細胞 ■培養方法 1-10%FBS と 1%ペニシリン/ストレプトマイシン、 2mM アラニル L-グルタミンで補填した RPMI1640 内で培養。 ■試験内容/方法 ・細胞毒性評価 細胞計算キット-8 を使用し WST-8 解析による測 定。ばく露濃度: Ag <sup>+</sup> (0-1.35 μgAg/mL)、Ag ばく露 期間: 24h ・銀ナノ粒子の細胞蓄積 グラファイト炉原子吸光分析法(GFAAS)。ばく露 濃度: 0, 2.0, 4.0 μg/mL ・銀ナノ粒子の細胞内 ROS 分析。ばく露濃度: 5.91 μg/mL。ばく露期間: 1-6h フローサイトメトリー法 ・遺伝子発現様式観察	・体腔細胞には、どの細胞型よりも Ag +濃度上昇に伴うその生存率の低下 が見られた。 ・Ag+への感受性差にもかかわらず、 試験をした濃度範囲で ECx 値を推定 することができなかった THP-1 細胞に 比べ、より低濃度の AgNP で、体腔細胞 および分化型 THP-1 細胞が同様の 影響を受けた。低濃度(2 μg/mL)の AgNPs では、体腔細胞は、未分化型 THP-1 細胞より有意に多量の銀を蓄 積させた。 ・中程度の濃度(4 μg/mL)では、細胞 膜損傷により(生存率 83%、変形細胞 7-AAD 染色。未公表データ)、体腔細胞 の銀の蓄積が少なめであった。そ の一方で、THP-1 および分化型 THP-1 細胞は、ほぼ無傷のままであ った(トリパンブルー色素排除法により 確立)。 ・THP-1 細胞の ROS 誘導因子 TBHP(0.05mM)へのばく露では、最初 に ROS 濃度の上昇、その後に急激が 低下が見られた。それとは対照的に、 AgNPs および TBHP は同様に ROS 生 成を誘発した。	本研究にて時間分解的 に調査した酸化ストレ スならびに選択された バイオマーカー遺伝子 の分子署名は、AgNP へのばく露開始後の体 腔細胞ならびに THP-1 細胞における酸化ストレ ス遺伝子ならびにそ の後の免疫シグナリン グプロセスの早期調整 を勧めている。