

ナノマテリアル安全対策調査事業
報告書

平成 25 年 3 月

株式会社工業市場研究所

目次

概要	1
1.消費者製品等に含まれるナノマテリアル等の情報の収集	4
(1)調査方法	4
(2)調査結果	4
1)フラーレン	5
2)単層カーボンナノチューブ	10
3)多層カーボンナノチューブ	16
4)グラフェン	22
5)酸化チタン(ルチル型)	28
6)酸化チタン(アナターゼ型)	33
7)ナノシリカ	38
8)プラチナ(白金)	46
9)金	51
10)ナノ銀	56
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	61
(1)検索方法	61
(2)文献選択の手順	61
(3)文献分類表	62
(4)文献サマリー	63
・フラーレン	63
・単層カーボンナノチューブ	68
・多層カーボンナノチューブ	78
・グラフェン	90
・酸化チタン	95
・ナノシリカ	106
・プラチナ	117
・金	121
・銀	132

3.ナノマテリアルの安全対策に関わる国際動向調査	146
3-1.主要国におけるナノマテリアル等利用製品の規制の状況	146
(1)アメリカ	147
(2)欧州委員会	149
(3)EU加盟国	151
(4)カナダ	152
(5)オーストラリア	152
(6)韓国	153
(7)中国	154
3-2.主要な学会、シンポジウム等におけるナノマテリアルの安全性、ばく露、試験法 等に関する議論の状況	156
(1)NANOSAFE2012	156
(2)ハーラングローバルセミナー&シンポジウム	173
(3)nano tech 2013	182

概要

ナノマテリアルは、一辺の長さが概ね 1~100 ナノメートルの物質とされているが、粒子、棒状（針状）、薄片と様々な形状のものが存在している。ナノマテリアルは、同じ分子式であっても、既存物質と比較するとそのサイズの小ささから特異な機能を発揮することも多く、現在多くの工業製品や一般消費者向け製品に利用されており、また今後もその利用用途は拡大していくことが予想されている。

一方、ナノマテリアルの安全性に関しては、現在までヒトの健康への影響を予測するために必要十分なデータが得られた状況にはない。また、リスク管理の観点からは、ナノマテリアルの動物実験等の毒性データ（ハザード情報）のみならず、ヒトがどれだけナノマテリアルにさらされているか（ばく露情報）も把握する必要がある。

以上の状況を鑑み、本調査では、生体への影響やばく露などに関する情報を収集すると共に、ナノマテリアルに関する規制やリスク管理にかかる国際的動向を把握するなど、利用が拡大されつつあるナノマテリアルの安全対策を検討する上で必要となる基礎情報収集を行った。

具体的には、以下の内容に係る情報収集を行った。

1.消費者製品等に含まれるナノマテリアル等の情報収集

フラーレン（誘導体含む）、単層カーボンナノチューブ、多層カーボンナノチューブ、グラフェン、酸化チタン、シリカ、プラチナ、金、銀を対象に、日本国内におけるナノマテリアル及びサブナノマテリアル含有製品に関する情報（含有形態、使用量、サイズ等）を収集した。

2.ナノマテリアルの安全性、試験法等に関する学術論文の収集

日本国内で既に実用化されている、又は実用化の可能性のあるナノマテリアルに関し、安全性や試験法等の情報を含む学術論文を収集し、主なものの概要を一覧としてまとめた。

3.ナノマテリアルの安全対策を検討する上で重要と考えられる国際動向に関する情報の収集

ア) 主要国におけるナノマテリアル及びナノマテリアル利用製品（食品、食品容器、医薬品、医療機器等は除く）の上市規制、表示規制に関する情報をまとめた。

イ) 「nanosafe2012」、「ハーラングローバルセミナー&シンポジウム」、「nano tech 2013」に参加し、その内容をまとめた。

1.消費者製品等に含まれるナノマテリアル等の情報の収集

(1)調査方法

1)調査対象ナノ物質

本調査では、以下の 10 物質を選んで調査を行った。

- ・ フラーレン
- ・ 単層カーボンナノチューブ
- ・ 多層カーボンナノチューブ
- ・ グラフェン
- ・ 酸化チタン(ルチル型)
- ・ 酸化チタン(アナターゼ型)
- ・ ナノシリカ
- ・ プラチナ
- ・ 金
- ・ 銀

2)ナノ物質の大きさ

1nm～100nm のナノマテリアル及び 1nm を下回るサブナノマテリアルを対象とした。

3)調査方法

対象ナノ物質を製造しているメーカーからのヒアリングを行うとともに、カタログや一部の物質については混合部材や最終製品メーカー、研究機関からのヒアリングも行った。

(2)調査結果

各物質の調査結果を 1)以降に記す

1)フラーレン

①製品概要

<p>サイズ</p>	<p>1次粒子:0.7~1.0nm 2次粒子:10~40μm</p>																																	
<p>サブナノサイズ</p>	<p>フラーレンは、物理的な粒子径は1nmを下回るが、何も修飾せず単粒子で使用するというニーズはなく、また、物理的に溶剤等に単粒子を分散させることは技術的に難しい。</p>																																	
<p>形状</p>	<p>C₆₀:サッカーボール状の結晶構造</p>																																	
<p>計測技術</p>	<p>回析式粒度分布測定、SEM</p>																																	
<p>物性</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>特性</th> <th>単位</th> <th>C₆₀</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>分子量</td> <td>—</td> <td>720</td> </tr> <tr> <td>かさ密度(粉体)</td> <td>g/cm³</td> <td>0.65</td> </tr> <tr> <td>質量密度</td> <td>g/cm³</td> <td>1,729(5K 計算値)</td> </tr> <tr> <td>比表面積</td> <td>M²/g</td> <td>0.24~0.92</td> </tr> <tr> <td>蒸気圧</td> <td>Pa</td> <td>0.67(500°C)</td> </tr> <tr> <td>引火点</td> <td>°C</td> <td>200°C以上</td> </tr> <tr> <td>融点</td> <td>°C</td> <td>1,180</td> </tr> <tr> <td>熱伝導率</td> <td>W/mK</td> <td>0.4(室温)</td> </tr> <tr> <td>熱容量(常圧)</td> <td>J/kmol</td> <td>500(室温)</td> </tr> <tr> <td>電気抵抗</td> <td>Ω cm</td> <td>10⁸~10¹⁴</td> </tr> </tbody> </table>	特性	単位	C ₆₀	分子量	—	720	かさ密度(粉体)	g/cm ³	0.65	質量密度	g/cm ³	1,729(5K 計算値)	比表面積	M ² /g	0.24~0.92	蒸気圧	Pa	0.67(500°C)	引火点	°C	200°C以上	融点	°C	1,180	熱伝導率	W/mK	0.4(室温)	熱容量(常圧)	J/kmol	500(室温)	電気抵抗	Ω cm	10 ⁸ ~10 ¹⁴
特性	単位	C ₆₀																																
分子量	—	720																																
かさ密度(粉体)	g/cm ³	0.65																																
質量密度	g/cm ³	1,729(5K 計算値)																																
比表面積	M ² /g	0.24~0.92																																
蒸気圧	Pa	0.67(500°C)																																
引火点	°C	200°C以上																																
融点	°C	1,180																																
熱伝導率	W/mK	0.4(室温)																																
熱容量(常圧)	J/kmol	500(室温)																																
電気抵抗	Ω cm	10 ⁸ ~10 ¹⁴																																
<p>機能/特性</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○溶媒に可溶(種類により溶けにくいものがある) ○化学修飾が容易 ○重合が可能 ○電子親和性 ○ラジカル捕捉能 ○光エネルギーを吸収しやすい ○内側の空孔に金属原子を内包できる ○高い電気抵抗 ○不活性環境下で良好な熱安定性 																																	
<p>製造会社</p>	<p>[国内]</p> <ul style="list-style-type: none"> ・フロンティアカーボン(株)(2013年1月、株主が昭和電工となる) ・本荘ケミカル(株) ・(株)イデアルスター ・ビタミン C60 バイオリサーチ(株) ・FLOX(株) <p>[海外]</p> <ul style="list-style-type: none"> ・Material Technologies Research(米国) ・TDA Reserch(米国) 																																	

②市場規模

発見・歴史	<p>フラーレンは 1985 年に発見された C_{60} であり、最小単位が 60 個の炭素原子で構成されている。形状は、サッカーボール状の 3 次元中空分子となっており、建築家のバックミンスター・フラーが建設したドームの構造に似ていたのでフラーレンと名付けられた。</p> <p>炭素原子の数が 60 個以上のフラーレンも発見されている (C_{70}、C_{76}、C_{78}、C_{82}、C_{84}、C_{90}、C_{96})</p> <p>フラーレンは、高い電気特性や機械特性、熱特性、抗酸化特性を持っていることから、様々な用途で研究開発が進められている。</p>	
国内市場動向	2011 年 (実績)	<p>国内の市場規模は概ね 2.0トンと推定される。</p> <p>フラーレンは、2003 年からスポーツ用品(ゴルフシャフトやバドミントンラケット、テニスラケット等)に採用、2005 年からはフラーレンの抗酸化作用を目的に化粧品に採用され市場が形成されている。ゴルフクラブは、震災からの需要減少に一定の歯止めがかかったものの市場は減少、一方、フラーレンを配合した化粧品は、年々種類も増え、販売量が増加している。</p>
	2012 年 (見込)	<p>2012 年の国内市場は、2.2トンと前年を 10%程度上回る見込である。主要用途のスポーツ用品市場がゴルフやテニスを中心に回復傾向にあることや化粧品市場における需要増が背景となっている。</p> <p>また、有機薄膜太陽電池向けやがん治療、MRI 造影剤用など実用化に向けた研究開発が活発化しており、研究開発用の需要も拡大している。</p>
製造方法	<p>初期の製造(合成)方法は、レーザーを用いて黒鉛を蒸発させる方法であったが、製造(合成)できる量は限られていた。1990 年代になると、アーク放電を用いて黒鉛を蒸発させる方法がドイツで考案され、大量生産(合成)が可能となった。</p> <p>2000 年に入るとフロンティアカーボン(株)がベンゼンやトルエンなどの炭化水素を原料とする「燃焼法」を開発、量産化が一層進んだ。</p>	
用途	<p>現在、フラーレンにおいて実用化されている用途は、配合することで強度や機能性向上を目的として、ゴルフクラブやテニスラケット等の「スポーツ用品」に多く利用されており、国内需要全体の約 45%を占めている。また、フラーレンの持つ抗酸化作用により「化粧品」用途に 20%程度、自動車の「潤滑油」が 7~8%、「研究用その他」が 27~28%を占めている。</p>	

③主な用途

用途	製品
スポーツ	ゴルフ(クラブ、シャフト、ボール) テニス(ラケット、ガット) バドミントン(ラケット、ガット) スキー(スノーボード、ワックス)
潤滑油	エンジンオイル添加剤 エアコン添加剤
化粧品 (水溶性フラーレン)	化粧水、美容液、クリーム、クレンジング、化粧下地、パック、石鹸、その他
エネルギー	有機薄膜太陽電池(n型半導体)、燃料電池、リチウムイオン電池
IT・情報材料	磁気記録媒体、磁性体、トナー、電気粘性流体
光学部材	フォトリソグラフィ、非線形光学材料、電子写真、蛍光表示管
電子部品	超電導材料、誘電体、トランジスタ、ダイオード、電子放出素子
環境材料	ガス吸着・貯蔵・分散 センサ素子(バイオセンサ、ガスセンサ)
医療分野	治療(がん治療:光線力学療法)、診断薬、DDS用キャリア
その他	HDD、触媒、産業用各種添加剤

※網掛けは実用化されている用途

④研究・開発事例

製品名	開発者	概要
有機薄膜太陽電池モジュール	(株)東芝	5cm 角という実用に近いサイズの有機薄膜太陽電池モジュールを試作、変換効率で 7.7%を達成した。 光電変換層の n 型半導体に純度の高いフラーレン化合物を使ったのが特徴。
有機薄膜太陽電池 発電効率向上技術開発	大阪大学 日本原子力研究開発機構	有機薄膜太陽電池の性能を高める技術を開発、フラーレンを極細のひも状に凝集して混ぜ込む技術で、変換効率を1%向上できる。ひもの直径は 16~20nm で、薄膜内で電子が移動し易くなる。
有機太陽電池の新構造を開発	金沢大学	電極材料である亜鉛フタロシニアンとフラーレンを順番に積み重ね、凹凸を作ることで変換効率がアップする仕組みで、発電効率を 10%達成が可能とみている。
有機薄膜太陽電池の実証試験	(株)イデアルスター (株)倉元製作所	半導体としてフラーレンを使っており、液晶ガラス加工会社の倉元製作所と共同で開発。駅のバス停の屋根に設置、20センチ四方のガラス基板に塗布(発電効率は3%程度)

⑤利用事例

製品名	化粧品 (化粧水、美容液、クリーム、クレンジング、化粧下地等)												
含有形態	<p>水溶性フラレーン</p> <ul style="list-style-type: none"> ・フラレーンにポリビニルピロリドン(PVP)、1,3-ブチレングリコール(BG)を配合し、フラレーンが水に分散しやすくしたもの。 <p>【RadicalSponge®成分構成】</p> <table border="1" data-bbox="496 555 1310 638"> <tr> <td>フラレーン</td> <td>PVP</td> <td>BG</td> <td>水</td> </tr> <tr> <td><0.03%</td> <td>10.0%</td> <td>75%</td> <td>>14.97%</td> </tr> </table> <p style="text-align: right;">[ビタミン C60 バイオリサーチ製品データ]</p> <ul style="list-style-type: none"> ・油性化粧品用に植物性スクワランにフラレーンを溶解させたもの <p>【LipoFullerene®成分構成】</p> <table border="1" data-bbox="496 757 1018 840"> <tr> <td>フラレーン</td> <td>スクワラン</td> </tr> <tr> <td><0.03%</td> <td>>99.97%</td> </tr> </table> <p style="text-align: right;">[ビタミン C60 バイオリサーチ製品データ]</p>	フラレーン	PVP	BG	水	<0.03%	10.0%	75%	>14.97%	フラレーン	スクワラン	<0.03%	>99.97%
フラレーン	PVP	BG	水										
<0.03%	10.0%	75%	>14.97%										
フラレーン	スクワラン												
<0.03%	>99.97%												
1 製品当たりの使用量	<p>1.0～5.0%(水溶性フラレーン(RadicalSponge®)の含有量)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・1%水溶液に含まれるフラレーン粒子は約 2ppm。 ・化粧品用途でフラレーン配合の効果を十分に発現させるための配合率の基準は水溶性フラレーン(RadicalSponge®として 1%以上と言われている。 ・水溶性フラレーン(RadicalSponge®)の含有量濃度が1%以上のフラレーンを含んだ化粧品は、化粧品原料フラレーンの供給元であるビタミン C60 バイオリサーチ(株)の商標、ロゴマークが表示されているものが多い。 												
粒子の大きさ	<p>数μm</p> <ul style="list-style-type: none"> ・フラレーン粒子を PVP で包み込んでしまうため、大きさは数μm と大きい。 												
特色	<ul style="list-style-type: none"> ・化粧品用フラレーンの大手である「ビタミン C60 バイオリサーチ(株)」によれば、フラレーンは抗酸化力が高く(ビタミン C の 172 倍)化粧品に配合すると以下の効果があるとしている。 <ul style="list-style-type: none"> ○シミの原因となる活性酸素を消去・抑制 ○メラニンインデックスの低下 ○シワ面積率の減少 ・フラレーン配合化粧品は、現在 1,000 種類程度市場に出ているとされる。 												

製品名	ゴルフクラブ(シャフト)
含有形態	カーボン繊維で強化された樹脂にフラーレンを混入 <ul style="list-style-type: none"> 樹脂をカーボンで強化した「カーボンシャフト」において、フラーレンを配合することにより、強度を高めることができる。 フラーレンとしては、C60 だけでなく、C70、C80 など混合して使用するケースがある。
1 製品当たりの使用量	0.1～10% (0.5～3%が主流) <ul style="list-style-type: none"> プリプレグとして、カーボン繊維をエポキシ樹脂に含浸させるが、その樹脂に重量比で 0.1～10%の範囲でフラーレンを混入する。 どの種類のフラーレンを樹脂にどの割合で配合するかは、企業のノウハウとなっている。 シャフト自体の種類や硬さ、しなり感等によって配合を変えている。
粒子の大きさ	0.6～3.5nm <ul style="list-style-type: none"> 0.6nm 未満のフラーレンは採取・製造が難しく、シャフトの強度増加率が低くなる、逆に、3.5nm 以上でも強度が低下してしまう。
特色	<ul style="list-style-type: none"> ゴルフシャフトは、飛距離や安定性向上だけでなく、少子高齢化によるシニアゴルファーの増加に伴い、より軽量化が求められている。 従来の「カーボンシャフト」にフラーレンを配合することにより、強度が高まるため、シャフトの肉厚や外径を小さくすることで軽量化が図られるとともに、飛距離も伸ばすことが可能となる。

⑥リスク評価に対する考え方

- 製造の現場においては、作業員へのばく露対策として、厚生労働省の示しているガイドラインに沿って作業現場の排気装置や作業衣、マスクの着用等について企業サイドにて対応している。
- 製造工程におけるばく露に関し、特定のフラーレンについては、急性ばく露については限りなく問題ないということが証明されているが、10年とか30年といった長期期間でのばく露評価については今後の課題となっている。
- フラーレンの安全性については、産総研を始め様々な研究機関において実験や評価を行っており、市販している製品については、ほとんど問題ないという結果を得ていることから、メーカー各社においては、フラーレンは安全であるとの意識が広まっている。
- 販売に当たっては、最終製品メーカーから安全性に関する評価データを要求されるため、製品安全シートに有害性に関する情報や環境影響に関する情報を掲載している。(ただし、人への健康影響としては「知見なし」として大きな問題がないと説明している)。なお、医薬部外品添加物申請を視野に、毒性試験を行った例もある。(ガイドラインとしては厚労省の通知や OECD に準拠している)
- 安全性については、その都度、毒性評価や安全評価を行うと多大な費用が掛かってしまうため材料メーカーとしては負担が大きいとの声がある。また、一言でフラーレンと言っても、C60 の中でもさらにいくつかのグレードが存在していることから、毒性評価や安全評価も多様である。

2)単層カーボンナノチューブ(SWCNT)

①製品概要

サイズ	直径:0.5~3nm 長さ:1~数百 μm																																																					
サブナノサイズ	1nm 未満のサブナノサイズでの研究や開発は行われている。ただし、あまり小さくなると期待する特性が得られないケースもあるため、一般的には 1nm 以上が中心である。																																																					
形状	筒状 炭素原子が六角形に配置されたグラファイトシート(グラフェン)を筒状に巻くが、巻き方によって電気特性が異なる。																																																					
計測技術	TEM、SEM																																																					
物性	<table border="1" data-bbox="469 752 1158 1021"> <thead> <tr> <th>項目</th> <th>単位</th> <th>物性</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>直径</td> <td>nm</td> <td>0.5~3</td> </tr> <tr> <td>長さ</td> <td>μm</td> <td>~10 μm</td> </tr> <tr> <td>嵩密度</td> <td>g/cm^3</td> <td>0.02~0.15</td> </tr> <tr> <td>真密度</td> <td>g/cm^3</td> <td>1.3~1.4</td> </tr> <tr> <td>引張強度</td> <td>GPa</td> <td>50~70</td> </tr> <tr> <td>熱伝導</td> <td>W/mK</td> <td>2000~3000</td> </tr> <tr> <td>屈折率</td> <td>—</td> <td>1.5~1.6</td> </tr> </tbody> </table> <p data-bbox="852 1032 1145 1055">【名城ナノカーボン HP より抜粋】</p> <table border="1" data-bbox="469 1066 1190 1429"> <thead> <tr> <th>項目</th> <th>単位</th> <th>スーパーグローブ CNT</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>直径</td> <td>nm</td> <td>2~3</td> </tr> <tr> <td>長さ</td> <td>μm</td> <td>数 100 μm以上</td> </tr> <tr> <td>比表面積</td> <td>m^2/g</td> <td>1000(未開口) 1600~2000(開口)</td> </tr> <tr> <td>炭素純度</td> <td>%</td> <td>99.9</td> </tr> <tr> <td>配向</td> <td>—</td> <td>あり</td> </tr> <tr> <td rowspan="3">構造体</td> <td>重量密度</td> <td>g/m^3</td> <td>0.037</td> </tr> <tr> <td>面積密度</td> <td>$\text{本}/\text{cm}^2$</td> <td>5.2×10^{11}</td> </tr> <tr> <td>チューブ間距離</td> <td>nm</td> <td>15</td> </tr> </tbody> </table> <p data-bbox="619 1440 1182 1462">【産業技術総合研究所ナノチューブ応用研究センターのデータ】</p>		項目	単位	物性	直径	nm	0.5~3	長さ	μm	~10 μm	嵩密度	g/cm^3	0.02~0.15	真密度	g/cm^3	1.3~1.4	引張強度	GPa	50~70	熱伝導	W/mK	2000~3000	屈折率	—	1.5~1.6	項目	単位	スーパーグローブ CNT	直径	nm	2~3	長さ	μm	数 100 μm 以上	比表面積	m^2/g	1000(未開口) 1600~2000(開口)	炭素純度	%	99.9	配向	—	あり	構造体	重量密度	g/m^3	0.037	面積密度	$\text{本}/\text{cm}^2$	5.2×10^{11}	チューブ間距離	nm	15
項目	単位	物性																																																				
直径	nm	0.5~3																																																				
長さ	μm	~10 μm																																																				
嵩密度	g/cm^3	0.02~0.15																																																				
真密度	g/cm^3	1.3~1.4																																																				
引張強度	GPa	50~70																																																				
熱伝導	W/mK	2000~3000																																																				
屈折率	—	1.5~1.6																																																				
項目	単位	スーパーグローブ CNT																																																				
直径	nm	2~3																																																				
長さ	μm	数 100 μm 以上																																																				
比表面積	m^2/g	1000(未開口) 1600~2000(開口)																																																				
炭素純度	%	99.9																																																				
配向	—	あり																																																				
構造体	重量密度	g/m^3	0.037																																																			
	面積密度	$\text{本}/\text{cm}^2$	5.2×10^{11}																																																			
	チューブ間距離	nm	15																																																			
機能／特性	<ul style="list-style-type: none"> ○高強度 ○高柔軟性 ○耐食性 ○耐熱性 ○高熱伝導性 ○高電流密度 ○比表面積が大きい ○高電界放出特性 ○生体親和性 																																																					
製造会社	[国内] ・日本ゼオン(株) ・(株)名城ナノカーボン																																																					

	<ul style="list-style-type: none"> ・(株)マイクロフェーズ ・本荘ケミカル(株) <p>[海外]</p> <ul style="list-style-type: none"> ・NanoIntegris ・KH Chemicals ・CNano Technology
--	--

②市場規模

発見・歴史	<p>1991年、日本の飯島澄男(当時 NEC 筑波研究所)によって、フラーレンを作っている途中にアーク放電した炭素電極の陰極側の堆積物中から最初に発見されたのが多層カーボンナノチューブであり、その後、多層 CNT に比べて伝導性、柔軟性等に優れた単層 CNT がその合成方法を含めて世界各国で研究されている。</p> <p>我が国においては、日本ゼオンが産総研との共同研究によって生産コストを削減できる量産技術(スーパーグロース法)を確立、量産によるサンプル出荷を始めている。</p>	
国内市場動向	2011年 (実績)	<p>2011年の市場規模は、前年比50%増の120kgとなった。</p> <p>単層CNTは、量産化技術が確立していないこともあり、単価がグラム当たり数万円と高価である。そのため、研究用途での利用が大半を占めていることから、本格的な実用化には至っていない。</p>
	2012年 (見込)	<p>2012年の市場規模は、活発な研究開発を背景にして、前年比50%増の180kgになると見込まれる。</p> <p>量産については、日本ゼオン(株)が2013年から量産プラントで月産十数kgのサンプル生産を開始することから、市場規模は倍以上に拡大するものと予想される。</p>
製造方法	<p>単層CNTについては、世界中で低コストの量産技術を開発しているが、一般的には、以下のような製造方法が存在している。</p> <ul style="list-style-type: none"> ○アーク放電法 ○レーザー蒸発法 ○CVD法 ○スーパーグロース法 <p>※スーパーグロース法は、通常のカーボンナノチューブ合成環境下に極微量(ppmオーダー)の水分を添加することで、通常は数秒の触媒寿命が数十分にもなり、極微量の触媒から、大量の単層カーボンナノチューブが合成可能となる。</p>	
用途	<p>単層CNTは、高強度、高柔軟性、耐食性、耐熱性、高熱伝導性、高電流密度、比表面積が大きい、高電界放出特性、生体親和性といった様々な優れた機能を有していることから、様々な産業分野における用途が期待されている。</p> <p>具体的には、フレキシブル電気回路、トランジスタといった「エレクトロニクス分野」、プリプレグ用自動車ボディ補強材や高耐熱建築物免震ゴムといった「構造材料分野」、スーパーキャパシタ電極や二次電池電極材料といった「エネルギー分野」、透明導電膜やアクチュエーターといった「高機能材料分野」、DDSなどの「医療分野」などでの利用が期待されている。</p>	

③主な用途

用途	製品
エレクトロニクス	トランジスタ フレキシブル電気回路 パワー半導体用放熱体 電波吸収体 透明導電膜(タッチパネル等) ディスプレイ光源 センサ素子
構造材	自動車ボディ補強材 航空機ボディ補強材 風力発電用ブレード 高耐熱建築物免震ゴム
エネルギー	電気二重層キャパシタ 燃料電池 太陽熱発電用熱吸収体
高機能材料	アクチュエーター 高導電性ゴムローラー
医療	DDS、癌治療剤

※いずれも研究用途

④研究・開発事例

製品名	開発者	概要
CNT キャパシタ	日本ケミコン(株)	次世代のキャパシタとして高いパワー密度と耐電圧を実現する CNT キャパシタの開発を進める。 スーパーグロース法によって合成された単層 CNT を電極に採用することで従来よりも高いパワー密度と高耐電圧を実現する。
CNT の導電性を液晶材料で制御する技術を開発	東京大学	ベンゼン環を含むトリフェニレンという物質を主成分とする液晶材料に単層 CNT を 5~10% 分散して溶かした。ガラス基板上で液晶材料の分子に合わせて CNT の向きが変わる。今後、導電性を変える駆動装置等への応用を見込んでいる。
単層 CNT を分散したアルミ複合材を開発	TASC(単層 CNT 融合新材料研究開発機構)	特殊な製法で作った単層 CNT をアルミに分散させることで、放熱性能がアルミ単体の 4 倍以上、アルミに炭素繊維を混ぜた従来素材に比べて 4 割向上する。今後、パワー半導体の放熱部材等の用途を見込んでいる。
少量の CNT 添加で複合材に導電性を持たせる技術を開発	TASC(単層 CNT 融合新材料研究開発機構)	樹脂やゴム母材の物性を保持した導電材料を開発、長尺単層 CNT を少量添加することで導電性を持たせる。通常、導電性フィラーを添加する

		と材料が脆くなったり、硬化したりするが、こうしたことが起こらないのが特徴。
鉄を上回る熱伝導率を持つゴム複合材料	TASC(単層 CNT 融合新材料研究開発機構)	熱伝導率の高い炭素繊維と嵩が高く熱伝導性の高い CNT をゴム中に均一に分散させ、炭素繊維間の熱移動を効率化することで鉄以上の熱伝導率のゴム材料となる。

⑤利用事例

製品名	薄膜トランジスタ(CNT 薄膜)
含有形態	分散液 ・カーボンナノチューブの分散液を用いて、基板上に塗布することで薄膜を形成する。
1 製品当たりの使用量	70~90% ・薄膜トランジスタに用いられるカーボンナノチューブ薄膜は、分散体を基板上に塗布する方法やフロー乾燥法等によって形成する。
粒子の大きさ	直径:0.5~2.0nm 長さ:100nm~10 μm ・原料として利用する単層 CNT の直径は、0.5~2nm が一般的である。 ・また、膜厚は、1~2 μmであり、厚すぎると素子を流れる電流の制御が難しくなるとされる。
特色	・薄膜トランジスタは、液晶表示装置用のスイッチング素子として広く用いられているが、従来は、製造コストが高いアモルファスや多結晶シリコンを使っていた。 ・カーボンナノチューブを使った薄膜トランジスタは、成膜方法が安価であり、かつ素子の大型化が可能、また、成膜プロセスの温度を比較的低温にすることができるため、基板材料も有機材料など幅広い基材が選択できるのが特徴である。

製品名	電気二重層キャパシタ(電極材料)
含有形態	<p>粉体</p> <ul style="list-style-type: none"> ・一般的に電解液とカーボンナノチューブの粉体を混練させてスラリー状にし、電極材とする。 ・また、カルボキシル基やヒドロキシル基などの親水性の官能基で修飾することもある。
1 製品当たりの使用量	<p>50～75%</p> <ul style="list-style-type: none"> ・電気二重層キャパシタの分極性電極として利用する場合は、高容量を確保する点から 50～75%の範囲が一般的とされる。
粒子の大きさ	<p>3～20nm</p> <ul style="list-style-type: none"> ・キャパシタの分極性電極として利用する場合は、小さい程高い容量が得られる。 ・単層 CNT は構造的には、径が最小 0.5nm 程度であるが、あまり小さすぎると期待した特性が得られない場合があるため、3nm 以上が良いとされる。
特色	<ul style="list-style-type: none"> ・現在、小型大容量の電気二重層キャパシタを得るために、分極性電極材料として比表面積が大きな活性炭が使われている。 ・しかし、活性炭の表面には、直径 1～2nm の微細な孔があるため、電解液が入り込めず、電気二重層を形成できる活性炭の表面積は 1/3 程度となり、内部抵抗が増大し、大電流を得ることができない。 ・カーボンナノチューブは、電解液と接触可能な表面積が非常に大きいことから、内部抵抗を極めて低く抑えることができ大電流を得ることが可能となる。

⑥リスク評価に対する考え方

- ・2013 年から量産を開始している日本ゼオン(株)における対策は、製造はクリーンルーム内での作業で、排気は HEPA フィルターを使って、スクラバー経由で大気に排出している。また、単層 CNT の製造装置は、クリーンルーム内での作業であり、作業者とは隔離されている。作業者に対しては、保護具として、専用のウエア、手袋、マスク、ゴーグルの着用を徹底している。同社では、今後、本格的な量産にあたっては、国内外の情報を調査し、ハザード評価等を実施する予定である。
- ・本荘ケミカル(株)では、作業場は専用の部屋で、他の作業場と隔離されている。製造は完全密閉されたリアクター(反応炉)の中で、アーク放電により行われるが、粉塵の発生は、放電(反応)終了後、リアクター内から製品を取り出す時に発生する。作業者は、国からの通達をベースに、粉塵対策を施した装備(保護具)に加え、局所排気装置を作動させて作業を行う。また、作業後は、簡易集塵装置で作業場の集塵を行い、集塵された粉塵は外部に漏れることのない設備で焼却

される。

- ・製品メーカー等販売先に対しては、一般的に、安全データシート(SDS)を提供し、その中に、単層 CNT の有害性に関する情報や取扱い事項などを記載している。
- ・記載する内容や情報のレベルは、原料メーカーによって異なる。具体的には、海外の文献(実験結果等)を引用するケースや自社で行った試験データを記載するケース等様々である。

3)多層カーボンナノチューブ(MWCNT)

①製品概要

サイズ		直径:15~150nm 長さ:3~10 μm																																																																						
	サブナノサイズ	多層 CNT は、単層 CNT を複数層にしたものであるため、1nm 未満のサブナノサイズでの利用はない。																																																																						
形状	棒状 ・単層 CNT が幾重(2~10 層以上)にも重なった構造																																																																							
計測技術	TEM、SEM																																																																							
物性	<table border="1"> <thead> <tr> <th>項目</th> <th>単位</th> <th>NT-5(開発品)</th> <th>NT-7</th> <th>CT-12</th> <th>CT-15</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>繊維径</td> <td>nm</td> <td>50</td> <td>65</td> <td>110</td> <td>150</td> </tr> <tr> <td>アスペクト比</td> <td>—</td> <td>>100</td> <td>>100</td> <td>>100</td> <td>>100</td> </tr> <tr> <td>嵩密度</td> <td>g/cm³</td> <td>0.005</td> <td>0.007</td> <td>0.012</td> <td>0.014</td> </tr> <tr> <td>真密度</td> <td>g/cm³</td> <td>2.1</td> <td>2.1</td> <td>2.1</td> <td>2.1</td> </tr> <tr> <td>比表面積</td> <td>m²/g</td> <td>34</td> <td>28</td> <td>17</td> <td>14</td> </tr> <tr> <td>酸化温度</td> <td>°C</td> <td>600</td> <td>600</td> <td>600</td> <td>600</td> </tr> <tr> <td>純度</td> <td>%</td> <td>>99</td> <td>>99.5</td> <td>>99.9</td> <td>>99.99</td> </tr> </tbody> </table> <p style="text-align: right;">【保土ヶ谷化学㈱製品データ】</p> <p>※CNT と非常に良く似た形状の CNF(カーボンナノファイバー)が存在しており、リチウムイオン電池の電極用助剤として使われている。</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>項目</th> <th>単位</th> <th>VGCF-H</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>繊維径</td> <td>nm</td> <td>150</td> </tr> <tr> <td>真密度</td> <td>g/cm³</td> <td>2.1</td> </tr> <tr> <td>比表面積</td> <td>m²/g</td> <td>13</td> </tr> <tr> <td>熱伝導率</td> <td>W/(m・K)</td> <td>1200</td> </tr> <tr> <td>導電率</td> <td>Ω cm</td> <td>1 × 10⁻⁴</td> </tr> </tbody> </table> <p style="text-align: center;">【昭和電工㈱製品データ】</p>						項目	単位	NT-5(開発品)	NT-7	CT-12	CT-15	繊維径	nm	50	65	110	150	アスペクト比	—	>100	>100	>100	>100	嵩密度	g/cm ³	0.005	0.007	0.012	0.014	真密度	g/cm ³	2.1	2.1	2.1	2.1	比表面積	m ² /g	34	28	17	14	酸化温度	°C	600	600	600	600	純度	%	>99	>99.5	>99.9	>99.99	項目	単位	VGCF-H	繊維径	nm	150	真密度	g/cm ³	2.1	比表面積	m ² /g	13	熱伝導率	W/(m・K)	1200	導電率	Ω cm	1 × 10 ⁻⁴
	項目	単位	NT-5(開発品)	NT-7	CT-12	CT-15																																																																		
繊維径	nm	50	65	110	150																																																																			
アスペクト比	—	>100	>100	>100	>100																																																																			
嵩密度	g/cm ³	0.005	0.007	0.012	0.014																																																																			
真密度	g/cm ³	2.1	2.1	2.1	2.1																																																																			
比表面積	m ² /g	34	28	17	14																																																																			
酸化温度	°C	600	600	600	600																																																																			
純度	%	>99	>99.5	>99.9	>99.99																																																																			
項目	単位	VGCF-H																																																																						
繊維径	nm	150																																																																						
真密度	g/cm ³	2.1																																																																						
比表面積	m ² /g	13																																																																						
熱伝導率	W/(m・K)	1200																																																																						
導電率	Ω cm	1 × 10 ⁻⁴																																																																						
機能/特性	<ul style="list-style-type: none"> ○電気特性(導電性、帯電防止) ○熱伝導性 ○高強度 ○柔軟性 ○耐摩耗性 ○電波吸収性 ○発熱性 ○生体親和性 																																																																							
製造会社	<p>[国内]</p> <ul style="list-style-type: none"> ・保土ヶ谷化学㈱ ・昭和電工㈱ ・宇部興産㈱ ・本荘ケミカル㈱ ・GSI クレオス㈱ ・三菱マテリアル㈱ <p>[海外]</p> <ul style="list-style-type: none"> ・Hyperion Catalysis International ・Nano 																																																																							

	<ul style="list-style-type: none"> ・ CNano Technology(国内代理店:丸紅情報システムズ(株)) ・ Arkema(アルケマ(株)) ・ Nanocyl ・ Bayer(国内代理店:豊田通商(株))
--	--

②市場規模

発見・歴史	<p>1991年、日本の飯島澄男(当時 NEC 筑波研究所)によって、フラーレンを作っている途中にアーク放電した炭素電極の陰極側の堆積物中から最初に発見されたのが多層カーボンナノチューブである。</p> <p>単層 CNT に比べると大量生産が比較的容易に出来ることから、エレクトロニクス用搬送トレイ向けに実用化されている。また、最近では、リチウムイオン電池向け電極の添加剤として需要が立ち上がりつつある。</p>	
国内市場動向	2011年 (実績)	<p>2011年の市場規模は、前年比約17%増の35トンとなった。</p> <p>これまで用途の8割以上を占めていた搬送容器向けが国内の半導体・電子部品産業の低迷によって縮小した一方で、電気自動車に使われるリチウムイオン電池の電極向け需要が本格的に立ち上がったことが増加の背景となっている。</p> <p><u><CNF></u></p> <p>CNTと非常に似た構造を持つ、CNFの市場規模は、2011年から電気自動車市場が本格的に立ち上がったことから、年間75トンの市場規模となった。</p>
	2012年 (見込)	<p>2012年の市場規模は、半導体や電子部品産業の低迷により搬送容器市場は縮小傾向だが、Lib用電極材向けが順調に需要を拡大していることから、前年比20%増の42トンが見込まれる。</p> <p>2013年以降は、Lib用電極材向けに年率30%程度の伸びが予想される。</p> <p><u><CNF></u></p> <p>CNFについては、2012年は、EV市場の拡大を受けて90トン、2013年以降も年率20~30%の伸びを示すものと予想される。</p>
製造方法	<p>多層CNTは、一般的には、以下のような製造方法が存在している。</p> <p>○CVD法 炭素源となる炭素化合物を500~1000°Cで触媒金属微粒子と接触させることによりCNTを得る方法であるが、金属不純物が大量に残るため、高純度の製品を製造することが難しいとされてきたが、最近では、純度95%程度まで純度を高めることが可能となっている。</p> <p>○アーク放電法 大気圧よりやや低い圧力のアルゴンや水素雰囲気下、炭素棒の間に20V・50A程度のアーク放電を行うと、陰極堆積物の中にMWCNTが生成される。一般的に、純度の高い製品が作れるが大量生産には向いていないとされる。</p>	
用途	<p>多層CNTは、樹脂材料に添加され、導電性を付与することにより静電気の発生を抑えることを目的として、電子部品向上等のクリーンルーム内で使用される搬送器具や、樹脂複合材(carbon-fiber-reinforced plastic, CFRP)としてスポーツ用品等で実用化されている。</p> <p>注目されているのは、リチウムイオン電池や電気二重層キャパシタの電極材用途であり、世界的な電気自動車、ハイブリッド車といった次世代蓄電池向</p>	

	<p>け用途として、多層 CNT メーカー各社は生産能力の増強を行っている。 この他、導電性樹脂として接着剤やフィルム、電磁波吸収として ETC 乱反射防止やレーダー波吸収、高強度特性から CFRP 等各種複合材料向け、生体親和性から人工骨やカテーテルといった用途も期待されている。</p> <p><u><CNF></u> CNT と形状が類似している CNF (例. 昭和電工の VGCF) の用途は、その 8 割が Lib の電極用 (導電助剤) として利用されている。</p>
--	---

③主な用途

用途	製品
エレクトロニクス	IC チップ搬送用トレイ ハードディスク部品搬送用トレイ 電子部品搬送用容器
スポーツ用品	ゴルフクラブ、テニスラケット等
自動車	燃料チューブ ボディ補強材 電着塗装
電池材料	リチウムイオン電池 電気二重層キャパシタ
電波吸収	ETC 乱反射防止 レーダー波吸収 電磁波測定装置
高機能材料	放熱材料 発熱材料 (布ヒーター、塗布型ヒーター)
医療	人工骨 カテーテル

※網掛けは実用化されている用途

④研究・開発事例

製品名	開発者	概要
CNT を利用した人工骨	信州大学、ナカシマメディカル(株)	開発した製品は、多層 CNT と PE、アルミナセラミックスを複合化したもので、生体親和性が高いのが特徴。CNT を用いることで、従来の架橋 PE に比べ摺動性は同等で、破壊靱性値は従来のアルミナの 2 倍となる。2014 年に治験開始、2017 年の上市を計画している。
電磁波吸収フィルム	(有)ポーラステクノ	開発製品は、熱伝導率の高い金属層表面に CNT 膜を形成、99% の高い電磁波吸収能力とグラファイトシートに近い放熱性能を付与したものの。絶縁膜を含む厚みは 25 μm と薄いため、スマートフォンや携帯電話といった密閉筐体に適している。2013 年サンプル出荷を予定している。
熱伝導性の高い複合樹脂	(株)豊田中央研究所	開発製品は、多層 CNT を使って、樹脂の絶縁性を損なうことなく、熱伝導性を高めた樹脂。CNT を分散した樹脂を異なる樹脂でくるみ、それを熱伝導率を高めたい樹脂の中に混ぜることで絶縁性を維持しつつ熱伝導性を高めたもので、自動車用部材への応用を目指す。
導電シート	JNC(株)／静岡大学	開発製品は、チューブの長さが数 μm ～数百 μm の多層 CNT を使い、独自の方法で導電シートに加工するもの。電気が流れても大丈夫なので、発熱するカーペットやロケットの機体、導線に替わる送電線材料などへの応用が可能となる。

⑤利用事例

製品名	リチウムイオン二次電池(電極材)
含有形態	<p>粉末、分散液、ペースト状</p> <ul style="list-style-type: none"> ・リチウムイオン二次電池用電極材における多層 CNT、CNF の供給形態は様々で、電極の製造方法によって異なる。 ・多層 CNT、CNF は、電極材(黒鉛)へ粉体を添加する方法や電極表面への塗布、メッキといった方法がある。
1 製品当たりの使用量	<p>1~8%</p> <ul style="list-style-type: none"> ・電極材料の質量に対して、1~8%の範囲で添加するのが一般的となっている。 ・多層 CNT、CNF は、年々品質(純度)が高まっていることから、添加量は少なくなる傾向になる。 ・添加量については、添加しすぎると電極表面の抵抗値や放電容量が低下する傾向があるため、1~8%程度が適切とされる。
粒子の大きさ	<p>50nm~150nm</p> <ul style="list-style-type: none"> ・添加する多層 CNT の直径は、リチウムイオン電池の電極材の場合、一般的に 50nm~150nm の範囲とされている。
特色	<ul style="list-style-type: none"> ・多層 CNT、CNF を電極材に添加することによってエネルギー容量の増大や耐久性の向上といった性能向上が得られるため、小型で長時間駆動可能な電池として、スマートフォンやタブレット端末といった機器向けに需要が拡大していく。 ・また、電気自動車用の Lib 電極材としても、様々な研究開発が世界中で行われており、電気自動車の普及に伴って、大きな需要が期待されている。

製品名	透明導電性フィルム
含有形態	分散液 ・透明基板上に、CNT を溶媒に分散した分散液を塗布した後、溶媒を除去することによって製造される。
1製品当たりの使用量	0.02～0.15% (分散液中) ・一般的に、使用量が少なすぎると基材への塗布性が低下し、均一に膜を形成することが難しくなり、多すぎると、CNT が凝集しやすくなってしまふ。
粒子の大きさ	直径: ~15nm ・透明導電性フィルムに仕様される多層 CNT は、比較的径の小さい(5層以下)ものが使われるケースが多い。(単層 CNT が使われることも多い) ・径が大きくなると透明導電性が低下する。また、純度が高い程導電性能が良いとされる。
特色	・透明導電性フィルムは、液晶ディスプレイに使われる電磁波遮蔽フィルムや反射防止フィルム、タッチパネル用のフィルム等に使うことができる。 ・CNT の高い導電性から、透明導電性フィルムへの応用は様々研究されているが、CNT の性質上、凝集しやすく、いかに分散液中に高分散させるかが課題となっている。

⑥リスク評価に対する考え方

- ・国内大手の保土ヶ谷化学㈱では、安全性については、SDS で表示しているような毒性試験を生体や環境に対して行っており、こうした試験データを販売先へ提供している。
- ・試験内容は、主にナノ粒子に対して、各グレードや物質ごとに行っており、試験方法は、OECD で決められた一般的なものが多いとしている。
- ・製造現場における安全対策としては、ナノ粒子特有の安全対策を取っており、製造設備は密閉構造で、製造設備が設置されている建屋については、全体を集塵機つきの排気設備で換気している。
- ・ばく露対策としては、マスクは最もメッシュの細かなもの、作業の近くには排気装置を用意するといったもので、厚生労働省の局長通知に基づいた製造管理を徹底している。
- ・その他のメーカーについても、販売先の企業へは SDS で毒性試験データや取扱いにおける安全性やリスク管理について情報を提供している。

4) グラフェン

① 製品概要

サイズ	単層: 約 0.3nm (厚さ) 複数層: 数 nm ~ 数十 nm (厚さ)																																										
サブナノサイズ	グラフェンは、単層の場合は、厚みが 1nm 未満であるため、サブナノと言えるが、一般的には複数層での使用が多い。																																										
形状	平面状でハチの巣状の結晶格子で構成																																										
計測技術	AFM、SEM、TEM																																										
物性	<p>[一般的な物性]</p> <table border="1" data-bbox="483 689 1342 1077"> <thead> <tr> <th>項目</th> <th>単位</th> <th>数値</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>表面積</td> <td>m²/g</td> <td>3000</td> </tr> <tr> <td>電子移動度</td> <td>cm² V⁻¹ s⁻¹</td> <td>15,000</td> </tr> <tr> <td>導電率</td> <td>S/m</td> <td>7.5 × 10⁷</td> </tr> <tr> <td>電流密度</td> <td>A/cm²</td> <td>10⁸</td> </tr> <tr> <td>白色光吸収率</td> <td>%</td> <td>約 2.3</td> </tr> <tr> <td>熱特性</td> <td>Wm⁻¹K⁻¹</td> <td>(4.84 ± 0.44) × 10³ ~ (5.30 ± 0.48) × 10³</td> </tr> <tr> <td>力学特性(引張係数)</td> <td>TPa</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>破戒強度</td> <td>GPa</td> <td>130 ~</td> </tr> </tbody> </table> <p>[グラフェンフラワー分散液]</p> <table border="1" data-bbox="496 1151 1342 1346"> <thead> <tr> <th>特性</th> <th>単位</th> <th>数値</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>純度</td> <td>%</td> <td>99.9</td> </tr> <tr> <td>分散量</td> <td>mg/ml</td> <td>0.02 ~ 1</td> </tr> <tr> <td>数層グラフェン大きさ</td> <td>μm</td> <td>1 ~ 10</td> </tr> <tr> <td>数層グラフェン 厚さ</td> <td>nm</td> <td>1 ~ 3</td> </tr> </tbody> </table> <p>(株)インキュベーションアライアンスカタログより抜粋</p>	項目	単位	数値	表面積	m ² /g	3000	電子移動度	cm ² V ⁻¹ s ⁻¹	15,000	導電率	S/m	7.5 × 10 ⁷	電流密度	A/cm ²	10 ⁸	白色光吸収率	%	約 2.3	熱特性	Wm ⁻¹ K ⁻¹	(4.84 ± 0.44) × 10 ³ ~ (5.30 ± 0.48) × 10 ³	力学特性(引張係数)	TPa	1	破戒強度	GPa	130 ~	特性	単位	数値	純度	%	99.9	分散量	mg/ml	0.02 ~ 1	数層グラフェン大きさ	μm	1 ~ 10	数層グラフェン 厚さ	nm	1 ~ 3
項目	単位	数値																																									
表面積	m ² /g	3000																																									
電子移動度	cm ² V ⁻¹ s ⁻¹	15,000																																									
導電率	S/m	7.5 × 10 ⁷																																									
電流密度	A/cm ²	10 ⁸																																									
白色光吸収率	%	約 2.3																																									
熱特性	Wm ⁻¹ K ⁻¹	(4.84 ± 0.44) × 10 ³ ~ (5.30 ± 0.48) × 10 ³																																									
力学特性(引張係数)	TPa	1																																									
破戒強度	GPa	130 ~																																									
特性	単位	数値																																									
純度	%	99.9																																									
分散量	mg/ml	0.02 ~ 1																																									
数層グラフェン大きさ	μm	1 ~ 10																																									
数層グラフェン 厚さ	nm	1 ~ 3																																									
機能/特性	<ul style="list-style-type: none"> ○可視から赤外まで広い波長の光に対して透明(光透過率 97%) ○電子移動度が速い(シリコンの 100 倍以上) ○熱伝導性が高い(銅より高い) ○機械的強度が強い(鋼に比べ 100 倍の機械的強度) 																																										
製造会社	<p>[国内]</p> <ul style="list-style-type: none"> ・アイトリックス(株) ・(株)インキュベーション・アライアンス ・(株)名城ナノカーボン <p>[海外]</p> <ul style="list-style-type: none"> ・Graphenea(スペイン) ・Cabot(アメリカ) ・上海南江集団(中国) ・XG Sciences(アメリカ) ・SPI Supplies(アメリカ) ・NanoIntegris(アメリカ) 																																										

②市場規模

発見・歴史	<p>グラフェンは、CNT、フラーレンに次いで2004年に発見された炭素系ナノマテリアルであり、形状は平面状、その厚さは原子1個分と非常に薄いのが特徴である。</p> <p>2010年には、グラフェンを分離することに成功した Andre Geim 氏と Konstantin Novoselov 氏がノーベル賞を受賞している。</p> <p>グラフェンは、電気特性や力学特性、熱伝導性、光透過性等に優れた物理特性を有していることから、量産技術を始め、各種製品への応用技術が世界各国で研究・開発されている。</p>	
国内市場動向	<p>2011年 (実績)</p>	<p>2011年の市場規模は、研究開発用のサンプル出荷が中心であり、実用化として本格的な市場は立ち上がっていないため、数千万円規模とみられる。</p> <p>グラフェンのサンプル製品は、酸化シリコン(SiO₂)、石英、樹脂フィルム、銅箔、ニッケル箔といった基板上にグラフェンを成膜するものから分散液に混合するもの、粉体状とさまざまである。</p>
	<p>2012年 (見込)</p>	<p>2012年度(見込)の国内市場は、数千万～1億円とみられるが、量産化(合成)技術が確立しつつあるため、今後、市場規模は飛躍的に拡大する可能性がある。</p> <p>世界的にグラフェンを事業化しているスペインの Grafenea 社によると、2015年には世界市場で4,900万€(1€=115円換算で56億円)と予測している。仮に、日本の市場が20%と仮定すると約10億円の規模になるものと推計される。</p>
製造方法	<p>○酸化的剥離法 グラフェン発見の原理である、グラファイトを酸化処理して剥離する方法であるが、官能基や欠陥が残ることにより、品質が良くなく、しかも作成に時間がかかるため、量産という面で課題がある。</p> <p>○超臨界流体を使った剥離法 東北大学、昭和電工(株)では、これまでの酸化的剥離法に比べて、超臨界流体を使ってグラフェンを剥離する方法で、従来の密閉式反応器と比較して100倍以上の生産能力を実現している。</p> <p>○CVD法 TASC(単層CNT融合新材料研究開発機構)では、炭素を含むメタンガスなどを熱分解して、ニッケルや銅の表面に大面積のグラフェンを形成する化学気相蒸着法(CVD)を開発、ロール to ロールでの大量生産技術の開発を行っている。</p>	
用途	<p>グラフェンは、シリコン(ケイ素)の100倍の電気伝導性、熱的・化学的安定性、非常に大きな表面積を有することから、電気自動車用大型リチウムイオン電池やキャパシタ向け電極材、グラフェントランジスタ、透明電極材料等次世代電子材料等エレクトロニクス材料として注目されている。また、環境や食品、生体といった分野においても研究が進められている。</p>	

③主な用途

用途	製品
エレクトロニクス	トランジスタ(電界効果トランジスタ) 集積回路 センサ(ガス、赤外線) タッチパネル用透明電極 リチウムイオン電池電極材 キャパシタ電極材 燃料電池電極材 太陽電池用透明電極材 電子ペーパー フレキシブル照明 放電性基板(ヒートシンク) 電磁シールド 圧電材料
環境	ろ過膜(海水淡水化) 封止膜(ガスバリア)
食品	包装材(抗菌性) 食品容器(ガスバリア)
生体	生体膜(血管、各種臓器) 人工骨 細菌検出デバイス DNAセンサ

※いずれも研究・開発中

④研究・開発事例

製品名	開発者	概要
グラフェントランジスタ駆動型ガスセンサ(試作)	東京大学 IRT 研究機構	イオン液体中のグラフェンに電圧をかけると、グラフェン近傍のイオン液体に約1nm の薄い絶縁層が形成される。イオン液体は周囲のガスを吸収するが、イオン液体の種類によって吸収するガスの量や種類が変わるといった特徴があるため、この特徴を利用することで、様々なガスに対応可能なガスセンサが実現できる。
グラフェンを使った成形自在なゴム状材料の開発	東京理科大学	カチオン性(正電荷)高分子を修飾したグラフェンナノシートとアニオン性(負電荷)高分子との静電相互作用を利用して、この2つを乳鉢でほんのわずかな水を加えてこねるだけで柔軟なゴム状へと変換できることを発見。また、柔軟性を生かしてあらゆる形状に室温下で成形加工でき、水の蒸発に伴い樹脂化(プラスチック化)して、非常に固く丈夫な材料へと変化させることが可能となる。
新動作原理のグラフェントランジスタの開発	産業技術総合研究所 物質・材料研究機構	グラフェンの上に二つの電極と二つのトップゲートを置き、トップゲート間のグラフェンにヘリウムイオンを照射して欠陥を導入。電気的な制御によってトランジスタ極性の反転が可能であり、今後、既存の集積回路の製造プロセスに応用可能であり、超低消費電力デバイスへの利用が見込める。
タッチパネル用透明電極用材料の開発	単層CNT融合新材料研究開発機構(TASC)	産総研が開発した表面波励起マイクロ波プラズマ化学気相成長法(CVD)を使って、グラフェンの大量合成技術の開発を進める。300℃という低温で、大面積かつ高速に作成できるのが特徴で、タッチパネル用透明電極用材料への応用が期待される(グラフェンの膜厚は0.6nm)
グラフェンの高分散ゲル化	東京理科大学	水だけでゲル化し、環境にやさしいアミノ酸誘導体の低分子ゲル化剤を使って、グラフェンを高分散させてゲル化することに成功した。電気伝導性が高い状態で長期的に安定することから、インクジェット分野に応用して微細配線パターンニングや透明電極ペースト材としての利用が期待される。

⑤利用事例

製品名	電界効果型トランジスタ／集積回路
含有形態	<p>CVD 法(ガス状)、剥離法(結晶)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・基本的に、シリコン等の基板状に CVD 法や剥離法を用いて、グラフェン層を成膜し、そこに、リソグラフィー法やエッチング法等により、電極を形成することでトランジスタとなる。また、グラフェン層を成膜した基板に回路をパターンニングすることで集積回路を作成できる。
1 製品当たりの使用量	<p>0.2～2%</p> <ul style="list-style-type: none"> ・CVD 法によって成膜する場合、原料ガスとなる炭素含有化合物とキャリアガスを混合するが、平均的な濃度は、0.2～2%とされる。
粒子の大きさ	<p>1nm～10nm(厚み)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・成膜に当たっては、1層(0.6nm)では、十分な性能が得られないことから、一般的には複数層(2～10層)にする。 ・20層以上になると、電子移動度がグラファイトと同じになってしまうことから、一般的には20層以下、2～10層程度が一般的である。
特色	<ul style="list-style-type: none"> ・グラフェンは垂直方向の外部電界に対して高い応答性を示すため、電界効果トランジスタ(FET: field-effect transistor)の作製が可能となる。 ・現状のグラフェントランジスタは、オン・オフ比が非常に低いため、これを向上する方法が研究されている。 ・最近の開発動向としては、2010年にIBMの研究グループが遮断周波数100GHzのグラフェンFETを開発、2012年には、サムスンエレクトロニクスがグラフェントランジスタで初めて電流のオン・オフ動作に成功している。 ・国内では、産総研と材料・物質研究機構が新動作原理のグラフェントランジスタの開発を行っている。

製品名	薄膜ガスセンサ
含有形態	分散液 ・薄膜ガスセンサのガスを検知する薄膜部分をグラフェン薄膜にしたものであり、シリコン基板に、酸化グラフェンの分散液を塗布し、形成する。形成後は、ガス感知機能を付与するために酸化グラフェンをグラフェンに還元する。
1 製品当たりの使用量	0.03～0.05g/ml(分散液中) ・酸化グラフェンの分散液中の濃度は、分散液中 0.03～0.05g/ml とされる。 ・なお、形成されたグラフェン膜には、単層膜や複数層膜が混在している。
粒子の大きさ	～30nm(厚み) ・グラフェン薄膜は、厚くなるとグラファイトと呼ばれることもあるが、当該製品においては、5 層～10 層くらいの薄膜が好ましいとされる。 ・グラフェン膜が厚すぎると、ガス分子が内側のグラフェンまで浸み込まないため、感度が低下するとされる。
特色	・一般的な薄膜ガスセンサは、検知部を構成する薄膜が熱応力によってクラックが発生してガス感知性能が変動することがあるが、熱特性に優れたグラフェン薄膜を利用することでクラック発生を防止することができる。 ・グラフェンは、一般的に、その 2 次元構造を利用し高性能のセンサを作ることができるため、単分子ガスセンサや赤外線センサなどへの応用が期待されている。 ・国内では、2012 年に東京大学 IRT 研究機構においてグラフェントランジスタ駆動型ガスセンサの試作に成功している。

⑥リスク評価に対する考え方

- ・グラフェンは、現在、主要企業においてはサンプル出荷のレベルとなっているが、製造過程でばく露の可能性のある作業員に対しては、厚生労働省の通知に基づく安全対策を行っている(具体的には、作業環境を密閉化し、作業員には、マスク等による保護や作業場所における局所排気装置の設置等を実施)
- ・販売先に対しては、製品毎、グレード毎に SDS(安全データシート)を提供しており、この中で、応急措置や取扱いに関する記述はあるが、有害性に関する情報は、「データなし」と記載されており、具体的な毒性試験の内容は記載がないケースが多い。

5)酸化チタン(ルチル型)

①製品概要

サイズ	1次粒子:10~50nm 2次粒子:200nm~ [比表面積]:20~150m ² /g													
	サブナノ ルチル型酸化チタンにおいては、現状、商業ベースでは、サブナノサイズとなる1nm未満の製品は見当たらない。一般的に酸化チタンは凝集力が高いため、サブナノサイズを分散するのが難しいとされる。													
形状	粉体、分散体													
計測技術	1次粒子:TEM 2次粒子:動的散乱法、レーザー光散乱法													
物性	<一般物性>													
	<table border="1"> <tr> <td>結晶系</td> <td>正方晶系</td> </tr> <tr> <td>ユニットセル体積</td> <td>61.9 Å³</td> </tr> <tr> <td>比重</td> <td>4.27[g/cm³]</td> </tr> <tr> <td>屈折率</td> <td>2.72</td> </tr> <tr> <td>モース硬度</td> <td>7.0~7.5</td> </tr> <tr> <td>誘電率</td> <td>114</td> </tr> <tr> <td>融点</td> <td>1825°C</td> </tr> </table>	結晶系	正方晶系	ユニットセル体積	61.9 Å ³	比重	4.27[g/cm ³]	屈折率	2.72	モース硬度	7.0~7.5	誘電率	114	融点
結晶系	正方晶系													
ユニットセル体積	61.9 Å ³													
比重	4.27[g/cm ³]													
屈折率	2.72													
モース硬度	7.0~7.5													
誘電率	114													
融点	1825°C													
機能/特性	<ul style="list-style-type: none"> ○可視光透過性 ○紫外線遮蔽性 ○高屈折率 ○可視光散乱 ○環境安定性 <p>※1次粒子径が小さくなる程可視光透過性が高まる。</p>													
製造会社	<p>[国内]</p> <ul style="list-style-type: none"> ・テイカ(株) ・石原産業(株) ・堺化学工場(株) ・チタン工業(株) ・昭和電工(株) ・富士チタン工業(株) <p>[海外]</p> <ul style="list-style-type: none"> ・Dupont(米) ・Sachtleben Chemie GmbH(独) ・Degussa(独) 													

②市場規模

<p>発見・歴史</p>	<p>一般的なルチル型酸化チタンは、優れた白色度、隠蔽力、着色力に加えて、安定性や安全性を有していることから、白色顔料として塗料、顔料を中心に年間 10 万トンを超える需要を形成している。一方、100nm 以下のナノサイズの酸化チタンは、機能性酸化チタンとして化粧品を中心に利用されており、その需要を拡大している。</p>	
<p>国内市場動向</p>	<p>2011 年 (実績)</p>	<p>本調査で対象とするナノサイズの酸化チタンの国内の市場規模は、2011 年で前年比ほぼ横ばいの 790 トンと推計される。ナノサイズのルチル型酸化チタンは、その約 7 割が化粧品用途となっているが、市場が成熟していることもあって国内需要は安定している。また、プリンターやコピー機に使われるトナー外添剤や塗料等の用途についても需要は安定している。</p>
	<p>2012 年 (見込)</p>	<p>2012 年の国内市場は、前年比 5% 増の 830 トンと推計される。中心的な用途である化粧品やトナー、塗料といった用途の需要に大きな変化はないものの、積層セラミックコンデンサ (MLCC) 用の超微粒子酸化チタン (10nm 未満) の量産が 2013 年から立上ることが背景となっている。MLCC 向けは、スマートフォンやタブレット端末の普及によって、より小型・軽量、高容量化が求められることに伴うものであり、将来的な需要増加が見込まれている。</p>
<p>製造方法</p>	<p>ルチル型酸化チタンの製造方法は、様々な方法が存在しているが、一般的には以下のような製造法があげられる。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・チタニウム塩の中和加水分解 (焼成) ・四塩化チタンの気相酸化 (気相) ・チタン酸ソーダ中和法 (焼成) ・チタンナルコキシドの加水分解 (低温焼成) ・チタンアルコキシドの気相分解 (気相) 	
<p>用途</p>	<p>ルチル型のナノサイズ酸化チタンの用途は、可視光透過性を持ちながら紫外線を遮蔽する機能を持っていることから、UV カット化粧品を中心として幅広く製品化されており、市場において約 7 割を占めている。その他の用途としては、プリンター等に使われるトナーの流動調整や電荷調整を目的としたトナー外添剤や塗料等がある。</p> <p>また、最近では、酸化チタンの高屈折率とナノサイズ酸化チタンの特徴となる高透明性を利用した反射防止膜用途の開発も期待されている。</p> <p>電子部品用途では、昭和電工が積層セラミックコンデンサ (MLCC) 向けの原料として、粒径 10nm 未満と従来の MLCC 向け酸化チタンにより小さな「超微粒子酸化チタン」の量産を始めることから、同用途における需要が今後拡大するものと考えられる。</p>	

③主な用途

用途	製品
化粧品	サンスクリーン製品 ファンデーション 口紅 化粧水 クリーム その他
複写機／プリンター	トナー外添剤
塗料	自動車用 家電用 建築外装用
樹脂・ゴム	樹脂添加剤、ゴム充填剤
電子部品	積層セラミックコンデンサ
エレクトロニクス材料	LCD(反射防止膜、配向膜、カラーフィルター) 色素増感型対象電池(電極)

※網掛けは実用化されている用途

④研究・開発事例

製品名	開発者	概要
PA4+に対応した酸化チタン、酸化亜鉛を開発	堺化学工業(株)	UV-Aにおいて最高水準の遮蔽効果を持つ化粧品に表示が認められる新たな「PA4+」に対応する酸化チタンと酸化亜鉛を開発。従来の遮蔽材料では配合率を多くすると肌に塗布した膜面の透明性が低下することから、独自の微細化や表面処理技術によって分散性の向上と透明性の確保を両立した。(配合率は、酸化亜鉛が33%、酸化チタンが6%)
固体高分子型燃料電池向け白金触媒	東京都市大学	CNTを使った電極に酸化チタンを被覆すると、被覆しない場合に比べて白金触媒の耐久性が1.2倍になる。直径60nmのCNTに厚さ10nmの酸化チタンをコーティングし、白金粒子を担持した。今後、実用化に向け性能向上を図る。
太陽電池透明電極向け溶液	サスティナブルテクノロジー(株)	太陽電池の発電効率を高める透明電極向けの溶液を開発。主原料に2~10nmの酸化チタンの微粒子を含む酸化チタンの複合物で、ウエット法によって成膜する。銅溶液を成膜した太陽電池モジュールの発電効率は両面で10%前後向上する。
色素増感と有機薄膜を融合した新型太陽電池	桐蔭横浜大学	新型太陽電池の構成は、色紙増感型で使う酸化チタンの層、チタンとアントラキノンという有機化合物で構成される金属錯体の層、ペリレンという有機半導体の層を積み重ねたものを電極で挟んだもの。現状、変換効率は低いですが、シリコン型や有機薄膜型に比べて高い電圧が取れることからコストが下げられるメリットがある。

⑤利用事例

製品名	化粧品 (サンスクリーン製品、スキンケア製品、他)
含有形態	粉体 ・形状は、球状や紡錘状であり、多くがシリカや水酸化アルミ、シリコーン等で表面処理されている。
1 製品当たりの使用量	1.0～20.0% ・1 製品当たりの使用量は、1.0%～20%と幅広く、これは、紫外線の遮蔽性や他の成分との関係から化粧品メーカーが決定する。 ・一般的に、UV カットを謳っている製品では、10%程度含有しているケースが多い。 ・含有率が 1.0%以下の場合には十分な紫外線遮蔽効果が十分得られない場合があり、逆に、20%以上になると、流動性が悪くなると言われている。
粒子の大きさ	10～50nm ・原料として利用する酸化チタンの1次粒子径は、概ね10～50nmが中心となっている。
特色	・酸化チタンは、紫外線遮蔽性が大きな特徴であるが、紫外線遮蔽の指標となる「SPF」(Sun Protection Factorの略)は、紫外線のうち、日焼けの原因となるUV-B波を遮断する効果の程度を表している。 ・最近では、日焼け後すぐに黒くなるUV-A領域紫外線(波長320～400nm)での遮熱機能を強化した製品が注目されている。 ・業界団体である日本化粧品工業連合会は、UV-Aの指標となる「PA」表示について、現行の最高レベル「+++」(スリープラス)を超える「++++」(フォープラス)を新設、製品の高機能化に合わせた規制を設けている。

製品名	複写機、プリンター用トナー(外添剤)
含有形態	粉体 ・一般的に、シランカップリング剤やシリコンオイルで表面処理を行うことで疎水性を付与したタイプが使用されている。
1製品当たりの使用量	0.1～2.0%(1%前後が中心) ・含有量が0.1%を下回ると、トナーの摩擦帯電特性を十分に維持できなくなる可能性がある。一方で、2.0%を超えるとトナー自体の帯電性を阻害する可能性があると考えられる。 ・一般的には、1%前後添加しているケースが多いものとみられる。
粒子の大きさ	15～50nm ・トナー用途において使用される酸化チタンの粒径は15～50nmサイズのものが一般的である。 ・粒径については、小さくなる程トナーの劣化や帯電性の低下といった問題があるとされ、逆に、50nmを超えると流動性が不十分となる場合がある。
特色	・トナー外添剤は、画像特性の向上を目的として帯電性、転写性の向上を図っているが、近年のカラー化や高精細化、高画質化といった画像ニーズが高まっている。 ・こうしたニーズに対応するために、シリカ微粒子やアルミナ微粒子と一緒に利用することで、トナーの帯電安定性、流動性、転写性向上、安定性、耐久性の向上を図っている。 ・新たなトナー技術として、定着温度を下げながら高画質なモノクロ画像出力を可能にしたトナー(EA-Eco トナー:富士ゼロックス)が開発されている。

⑥リスク評価に対する考え方

- ・酸化チタン大手のテイカ(株)では、ナノスケール二酸化チタンの製造設備を密閉構造に、設備からの粉体の取り出しや出荷のための袋詰めなど粉じんが発生する作業にあたっては、室内換気設備を併用して粉じんを除去している(除去した粉じんは産業廃棄物「汚泥」として廃棄処分)ことから、大気や排水等水を介した環境へのナノスケール二酸化チタンの排出はほとんどないと考えている。また、リスク管理については、既存法令を遵守したばく露防止、環境対策、環境測定を行っており、特にナノマテリアルに特化した作業環境測定のデータを収集、そのデータを解析し、作業環境の改善、環境対策を実施している。
- ・石原産業(株)では、ナノマテリアルを扱う作業に対しては、防塵マスク、ゴーグル等の保護具の着用を義務付け、発塵発生箇所には局所排気装置(バグフィルターを備えた除じん装置)を設けている。
- ・製品供給先に対しては、主要企業は全てSDSにおいて安全性等について記載し、注意を喚起している。具体的には、作業者の保護具、換気・排気等の設備対策等を明記している。また、有害情報についても急性毒性(経口、経皮、吸入)や皮膚刺激性、発がん性等についてのデータを明記している。

6)酸化チタン(アナターゼ型)

①製品概要

サイズ	1次粒子:6~30nm 2次粒子:200nm~ [比表面積]:10~300m ² /g													
	サブナノ アナターゼ型の酸化チタンにおいては、1次粒子径で1nm未満の製品は商業化された用途では存在していない。													
形状	粉体、分散体、ゾル、コーティング剤													
計測技術	1次粒子:TEM 2次粒子:動的散乱法、レーザー光散乱法													
物性	<一般物性>													
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>結晶系</th> <th>正方晶系</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>ユニットセル体積</td> <td>135.6 Å³</td> </tr> <tr> <td>比重</td> <td>3.90[g/cm³]</td> </tr> <tr> <td>屈折率</td> <td>2.52</td> </tr> <tr> <td>モース硬度</td> <td>5.5~6.0</td> </tr> <tr> <td>誘電率</td> <td>31~48</td> </tr> <tr> <td>融点</td> <td>915±15°Cでルチル型に転移</td> </tr> </tbody> </table>	結晶系	正方晶系	ユニットセル体積	135.6 Å ³	比重	3.90[g/cm ³]	屈折率	2.52	モース硬度	5.5~6.0	誘電率	31~48	融点
結晶系	正方晶系													
ユニットセル体積	135.6 Å ³													
比重	3.90[g/cm ³]													
屈折率	2.52													
モース硬度	5.5~6.0													
誘電率	31~48													
融点	915±15°Cでルチル型に転移													
機能/特性	○光活性 ○高比表面積 ○透明性													
製造会社	[国内] ・テイカ(株) ・石原産業(株) ・堺化学工場(株) ・チタン工業(株) [海外] ・Degussa(独) ・Sachtleben Chemie GmbH(独)													

②市場規模

<p>発見・歴史</p>	<p>アナターゼ型酸化チタンは、一般的に光触媒としての活性が高いことから、浄化(空気、水等)や抗菌、防汚機能を必要とする分野で使用されている。中でも、光触媒酸化チタンは、日本が開発した技術であり、1990年代から市場が拡大している。</p> <p>国内需要としては、外装材や内装材を中心とした光触媒用途が全体の8割以上を占めている。</p>	
<p>国内市場動向</p>	<p>2011年 (実績)</p>	<p>本調査で対象とするナノサイズのアナターゼ型酸化チタンの2011年の国内の市場規模は、前年比ほぼ横ばいの150トンとなった。需要の8割以上を占める建築用途である外装材(家の外壁材や高速道路の防音壁等)、内装材(壁紙や天井材等)は、住宅や建築着工数に影響されるが、部分的に震災復興需要はあったものの、全体としては、横ばいから微増程度となったことで市場規模に大きな変化は見られなかった。</p>
	<p>2012年 (見込)</p>	<p>2012年は、住宅需要が回復傾向に向かいつつあり、建築向けの需要が伸びたことから、前年比5.3%増の158トンと見込まれる。</p> <p>2013年については、消費税の駆け込み需要や円安による輸出型企業の業績回復、公共事業の拡大などから、建築需要の拡大が見込まれることから、同市場は大きく伸長するものと予想される。</p>
<p>製造方法</p>	<p>アナターゼ型酸化チタンの製造方法は、気相法や液相法が一般的に使われている。</p> <p>気相法では、チタンテトライソプロポキシドを600℃～800℃で処理する方法がある、一方、液相法では、ゾルーゲル法で得られた非晶質酸化チタンを300～600℃の高温で焼成する方法がある。</p>	
<p>用途</p>	<p>アナターゼ型の酸化チタンの用途は、光触媒活性の高さから、防汚機能を目的として建物の外装材として多く利用されており、市場全体に占める外装材用途の割合は約7割を占めている。一方、内装材については、アナターゼ型酸化チタンの抗菌効果やシックハウス対策を目的として使用されているケースが多い。また、空気清浄器のフィルターにも使用されているが、これは、フィルター表面にコーティングすることで清浄効果を得ることを目的としている。</p> <p>その他、抗菌や防汚効果を目的として各種家庭用品として利用されている(トイレ用品、台所用品、衣類・カーテン、その他)</p> <p>衣類等の繊維製品については、光触媒の加工剤を繊維に染み込ませるケースが多く、使用量は繊維質量に対して0.01～30%(用途に応じて)と範囲が広い。光触媒加工した繊維製品については、「社団法人繊維評価技術協議会」が独自のガイドラインに基づき「SEKマーク(光触媒抗菌加工)」として認証している。同協議会のガイドラインでは、安全性についても審査しており、光触媒の加工剤等の安全データの提出を義務付けた上で、所定の試験に合格しなければならない。</p> <p>協議会のガイドラインにおける安全性試験としては、「急性経口毒性試験」、「変異原性試験」、「皮膚刺激性試験」、「皮膚感作性試験」がある。</p>	

③主な用途

用途	製品
建築用	外装材 内装材 コーティング製品(ガラス)
道路資材	防音壁、防護柵、道路安全材料、景観材料
消臭・抗菌機能	空気清浄器 消臭・脱臭機 空調機
環境浄化設備	排気設備、排水処理設備
コーティング製品	トイレ用品 台所用品 衣類 カーテン 介護用品
日用品	消臭・除菌スプレー
顔料	塗料・インキ
製紙用	塗工紙
医療器具	カテーテル

※網掛けは実用化されている用途

④研究・開発事例

製品名	開発者	概要
抗ウイルス光触媒	NEDO	東京大学と共同で抗菌・抗ウイルス性に優れた可視光応答型光触媒を開発。ナノクラスター化した銅や鉄などの金属を酸化チタン表面に分散担持させたもので、既存の窒素ドープ型酸化チタンに比べて可視光に対する感度が10倍高い。ウイルスや大腸菌に対して効果が得られたため、今後、量産及び製品化を進めていく。
光触媒塗料	笹野電線(株)	これまでの光触媒塗料の課題である、可視光による抗菌機能を高め、臭気成分を吸着する機能を高めた光触媒塗料を開発。二酸化チタンにアパタイトと銀ナノ粒子を組合わせたのが特徴で、蛍光灯程度の光でも強い抗菌力を発揮する。
不織布	宇部興産(株)	同社では、汚染物質を分解する光触媒の働きを2倍に高めた不織布を開発。ケイ素系材料とチタン系材料を糸にして高温にさらし、繊維そのものが酸化チタンに覆われている。これまでの製品に比べOHラジカルの寿命が長いのが特徴で、空気清浄機のフィルターなどに活用できる。

⑤利用事例

製品名	建築用外装材
含有形態	<p>外装材表面にコーティングして使用</p> <ul style="list-style-type: none"> ・光触媒として用いるアナターゼ型酸化チタンは、粉末、スラリー、ゾル(超微分子分散溶液)であるが、ナノサイズの粒子径では、ゾルとバインダーを含有するコーティング材を塗布することで光触媒機能を付与する。 ・バインダーは、酸化に強い無機系のバインダーが多く使われる。 ・外装材については、使用する基材や環境によって求められる機能は異なるものの、光触媒活性や膜強度、透明性の向上が製品メーカー各社によって研究されている。
1 製品当たりの使用量	<p>20.0～70.0%</p> <ul style="list-style-type: none"> ・製品への使用量は、用途によって異なる。 ・一般的に、透明性などが求められない屋外の構造物など光触媒活性の効果を十分得ることを目的とする場合は、70～80%含有させるが、家の外壁材など透明性が求められる場合は、使用量は少なくなる。
粒子の大きさ	<p>10～30nm</p> <ul style="list-style-type: none"> ・粒子の大きさとともに、比表面積も重要であり、表面積が小さいと十分な触媒活性が得られないし、逆に、大きすぎると分散性が低下するとされている。
特色	<ul style="list-style-type: none"> ・酸化チタンによる光触媒効果は、光が当たると、酸化力が強い物質が生じ、この強い酸化力によって汚れの原因となる有機物質(油脂分等)を酸化分解反応で分解することで汚れを付きにくくする効果がある。 ・また、酸化チタンは、親水性が高いため、雨水が汚れの下に入り込んで浮き上がることで汚れが落ちる効果がある。 ・最近では、紫外線よりも波長の長い光でも触媒効果が発揮できる「可視光応答型光触媒」が開発され、さらに、波長範囲を広げる研究や性能向上の改良が進められている。

製品名	脱臭機用フィルター								
含有形態	<p>水溶液</p> <ul style="list-style-type: none"> 酸化チタンの粉末を一定濃度になるまで純水を加え分散液とし、これに臭いを吸着する吸着剤を混合し、フィルターとなる基材に塗布する。 脱臭装置として利用する場合は、光触媒を塗布したフィルターに紫外線光源や送風機構等を備える。 <p><フィルター用酸化チタンの一例></p> <table border="1"> <tr> <td>形状</td> <td>粉末</td> </tr> <tr> <td>TiO₂</td> <td>93%</td> </tr> <tr> <td>粒子径</td> <td>9nm</td> </tr> <tr> <td>比表面積</td> <td>270m²/g</td> </tr> </table> <p>[堺化学工業製品データ]</p>	形状	粉末	TiO ₂	93%	粒子径	9nm	比表面積	270m ² /g
形状	粉末								
TiO ₂	93%								
粒子径	9nm								
比表面積	270m ² /g								
1製品当たりの使用量	<p>60～80%</p> <ul style="list-style-type: none"> フィルターに塗布する光触媒材料に占める酸化チタンの含有量は、光照射の際の脱臭性能から、60～80%が適切とされている。 また、吸着剤の使用量は、重量比で20～30%が適切とされる。 								
粒子の大きさ	<p>5～10nm</p> <ul style="list-style-type: none"> 使用される酸化チタン粒子の大きさは、5～10nm、光触媒材料の厚みは、200～800 μm。 比表面積は200～350m²/gが好ましいとされている。 								
特色	<ul style="list-style-type: none"> 光触媒を使って空気中の臭気成分を分解するものであり、光触媒を臭いの吸着剤と組み合わせることで、脱臭速度を速めたり、特定のにおいに対する分解速度を向上させたりすることが出来る。 こうした、光触媒をフィルターに使った脱臭機や空気清浄機は、アナターゼ型酸化チタン市場の10～20%を占めるものとみられる。 								

⑥リスク評価に対する考え方

- ・アナターゼ型酸化チタンの大手である堺化学工業(株)では、製造ラインは、可能な限り閉鎖系としており、粉塵が発生するか所では、局所排気設備で集塵し、バグフィルターにより粉末のみを回収、可能な限り再利用している。再利用できない分は、事業場で生産する他の全ての材料の残渣と合わせて回収し、自社の管理型廃棄物処分場へ産業廃棄物として処理している。労働者のばく露については、ばく露の可能性のある作業場には局所排気設備を設置し、作業者には防塵マスク、保護衣、保護手袋等を着用させ、ばく露防止の対策をしている。同社では、労働安全衛生法に基づいた、ばく露・排出抑制対策を実施しており、今後については、現在実施している関係法規に基づいた対策を継続しながら、ナノ材料に特化した作業環境等の見直しを行い、改善を加えていくとしている。
- ・販売先への対応は、基本的に SDS による記載や注意喚起となっており、大半のメーカーが対応している。SDS においては、取扱いや保管についての注意点を記述している他、有害情報として、急性毒性として経口、経皮、吸入のデータ、発がん性に関するデータ等も記載している。

7) ナノシリカ

① 製品概要

サイズ	[ヒュームドシリカ] 1次粒子: 5~50nm [高純度コロイダルシリカ] 1次粒子: 15~75nm																																																																
	サブナノ [ヒュームドシリカ] ・ヒュームドシリカは、粒子径が小さい程「強度」や「粘度」が向上すると言われるが、現状では、1nm 未満のヒュームドシリカは、工業用製品としては存在していないようである。 [高純度コロイダルシリカ] ・粒子径については、数ナノレベルは存在するようだが、1nm 未満のサブナノサイズは工業用製品としては存在していないようである。																																																																
形状	[ヒュームドシリカ]: 球状 [高純度コロイダルシリカ]: 球状																																																																
計測技術	SEM																																																																
物性	[ヒュームドシリカ] ■親水性																																																																
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>製品</th> <th>比表面積(BET法) m²/g</th> <th>乾燥減量 Wt. %</th> <th>pH</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>AEROJIL®90</td> <td>90±15</td> <td>≤1.0</td> <td>3.7-4.7</td> </tr> <tr> <td>AEROJIL®150</td> <td>150±15</td> <td>≤1.5</td> <td>3.7-4.7</td> </tr> <tr> <td>AEROJIL®200</td> <td>200±25</td> <td>≤1.5</td> <td>3.7-4.7</td> </tr> <tr> <td>AEROJIL®300</td> <td>300±30</td> <td>≤1.5</td> <td>3.7-4.7</td> </tr> <tr> <td>AEROJIL®380</td> <td>380±30</td> <td>≤2.0</td> <td>3.7-4.7</td> </tr> </tbody> </table> <p style="text-align: right;">[日本アエロジル製品データより抜粋]</p>	製品	比表面積(BET法) m ² /g	乾燥減量 Wt. %	pH	AEROJIL®90	90±15	≤1.0	3.7-4.7	AEROJIL®150	150±15	≤1.5	3.7-4.7	AEROJIL®200	200±25	≤1.5	3.7-4.7	AEROJIL®300	300±30	≤1.5	3.7-4.7	AEROJIL®380	380±30	≤2.0	3.7-4.7																																								
	製品	比表面積(BET法) m ² /g	乾燥減量 Wt. %	pH																																																													
	AEROJIL®90	90±15	≤1.0	3.7-4.7																																																													
AEROJIL®150	150±15	≤1.5	3.7-4.7																																																														
AEROJIL®200	200±25	≤1.5	3.7-4.7																																																														
AEROJIL®300	300±30	≤1.5	3.7-4.7																																																														
AEROJIL®380	380±30	≤2.0	3.7-4.7																																																														
■疎水性																																																																	
<table border="1"> <thead> <tr> <th>製品</th> <th>比表面積(BET法) m²/g</th> <th>乾燥減量 Wt. %</th> <th>pH</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>AEROJIL®R972</td> <td>90±15</td> <td>≤1.0</td> <td>3.7-4.7</td> </tr> <tr> <td>AEROJIL®R104</td> <td>130±25</td> <td>≤1.5</td> <td>3.7-4.7</td> </tr> <tr> <td>AEROJIL®R202</td> <td>150±15</td> <td>≤1.5</td> <td>3.7-4.7</td> </tr> <tr> <td>AEROJIL®R805</td> <td>200±25</td> <td>≤1.5</td> <td>3.7-4.7</td> </tr> <tr> <td>AEROJIL®R7200</td> <td>255±25</td> <td>≤1.5</td> <td>3.7-4.7</td> </tr> </tbody> </table> <p style="text-align: right;">[日本アエロジル製品データより抜粋]</p>	製品	比表面積(BET法) m ² /g	乾燥減量 Wt. %	pH	AEROJIL®R972	90±15	≤1.0	3.7-4.7	AEROJIL®R104	130±25	≤1.5	3.7-4.7	AEROJIL®R202	150±15	≤1.5	3.7-4.7	AEROJIL®R805	200±25	≤1.5	3.7-4.7	AEROJIL®R7200	255±25	≤1.5	3.7-4.7																																									
製品	比表面積(BET法) m ² /g	乾燥減量 Wt. %	pH																																																														
AEROJIL®R972	90±15	≤1.0	3.7-4.7																																																														
AEROJIL®R104	130±25	≤1.5	3.7-4.7																																																														
AEROJIL®R202	150±15	≤1.5	3.7-4.7																																																														
AEROJIL®R805	200±25	≤1.5	3.7-4.7																																																														
AEROJIL®R7200	255±25	≤1.5	3.7-4.7																																																														
	[高純度コロイダルシリカ]																																																																
	<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">項目</th> <th>単位</th> <th>PL-1</th> <th>PL-3</th> <th>PL-7</th> <th>PL-20</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="4">一般物性</td> <td>外観</td> <td>—</td> <td>透明性 乳白色</td> <td>透明性 乳白色</td> <td>乳白色</td> <td>乳白色</td> </tr> <tr> <td>比重(20/4℃)</td> <td>—</td> <td>1.07</td> <td>1.12</td> <td>1.14</td> <td>1.12</td> </tr> <tr> <td>pH</td> <td>—</td> <td>7.3</td> <td>7.3</td> <td>7.3</td> <td>7.3</td> </tr> <tr> <td>シリカ濃度</td> <td>%</td> <td>12</td> <td>20</td> <td>23</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td rowspan="3">粒子径</td> <td>一次粒子径</td> <td>nm</td> <td>15</td> <td>35</td> <td>75</td> <td>220</td> </tr> <tr> <td>二次粒子径</td> <td>Nm</td> <td>40</td> <td>70</td> <td>125</td> <td>370</td> </tr> <tr> <td>会合度</td> <td>—</td> <td>2.7</td> <td>2.0</td> <td>1.7</td> <td>1.7</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">純度</td> <td>アルカリ金属</td> <td>Ppb</td> <td>300 以下</td> <td>300 以下</td> <td>300 以下</td> <td>300 以下</td> </tr> <tr> <td>重金属</td> <td>ppb</td> <td>100 以下</td> <td>100 以下</td> <td>100 以下</td> <td>100 以下</td> </tr> </tbody> </table> <p style="text-align: right;">[扶桑化学工業(株)製品データ]</p>	項目		単位	PL-1	PL-3	PL-7	PL-20	一般物性	外観	—	透明性 乳白色	透明性 乳白色	乳白色	乳白色	比重(20/4℃)	—	1.07	1.12	1.14	1.12	pH	—	7.3	7.3	7.3	7.3	シリカ濃度	%	12	20	23	20	粒子径	一次粒子径	nm	15	35	75	220	二次粒子径	Nm	40	70	125	370	会合度	—	2.7	2.0	1.7	1.7	純度	アルカリ金属	Ppb	300 以下	300 以下	300 以下	300 以下	重金属	ppb	100 以下	100 以下	100 以下	100 以下
項目		単位	PL-1	PL-3	PL-7	PL-20																																																											
一般物性	外観	—	透明性 乳白色	透明性 乳白色	乳白色	乳白色																																																											
	比重(20/4℃)	—	1.07	1.12	1.14	1.12																																																											
	pH	—	7.3	7.3	7.3	7.3																																																											
	シリカ濃度	%	12	20	23	20																																																											
粒子径	一次粒子径	nm	15	35	75	220																																																											
	二次粒子径	Nm	40	70	125	370																																																											
	会合度	—	2.7	2.0	1.7	1.7																																																											
純度	アルカリ金属	Ppb	300 以下	300 以下	300 以下	300 以下																																																											
	重金属	ppb	100 以下	100 以下	100 以下	100 以下																																																											

機能／特性	<p>[ヒュームドシリカ]</p> <ul style="list-style-type: none"> ○液体流動特性 ○強度向上 ○高温下での断熱性 ○増粘性 ○撥水性 ○腐食防止性 ○粉体流動性 ○耐スクラッチ性 <p>[高純度コロイダルシリカ]</p> <ul style="list-style-type: none"> ○研磨性 ○安定分散性
製造会社	<p>[国内]</p> <p><ヒュームドシリカ></p> <ul style="list-style-type: none"> ・日本アエロジル(株) ・(株)トクヤマ ・旭化成ワッカーシリコーン(株) <p><高純度コロイダルシリカ></p> <ul style="list-style-type: none"> ・扶桑化学工業(株) ・多摩化学工業(株) <p>[海外]</p> <p><ヒュームドシリカ></p> <ul style="list-style-type: none"> ・Evonik Degussa ・Cabot ・Wacker Chemie AG <p><高純度コロイダルシリカ></p> <ul style="list-style-type: none"> ・Nalco ・Slico International

②市場規模

<p>発見・歴史</p>	<p><ヒュームドシリカ> 1941年エボニックデグサ社が、当時、石油からしか製造できなかった工業用カーボンブラックに代わる白い充填剤の開発を始め、1942年火炎加水分解法を開発、その後、世界初となる超微粒子高熱法シリカの開発に成功、アエロジルのブランド名が世界的に有名である。</p> <p><高純度コロイダルシリカ> 1925年にJ.G.Vailによって合成され、現在は、ゾルゲル法で製造されたゲル状のシリカ微粒子で、純度は、99.9999%と高いのが特徴である。 製品の純度と研磨性から、半導体用の研磨剤(ウエハ研磨剤、CMPスラリー)を中心とした用途が中心となっている。</p>	
<p>国内市場動向</p>	<p>2011年 (実績)</p>	<p><ヒュームドシリカ> 2011年の国内市場規模は、前年比約9%減少の17,400トンとなった。2011年は、主力用途のシリコン(ケイ素化合物)製品用途において、自動車関連や家電製品向けを中心に東日本大震災の影響で大きくマイナス、塗料やインキ、化粧品といったその他の用途についても需要が停滞したことが背景となっている。</p> <p><高純度コロイダルシリカ> 2011年の国内市場規模は、東日本大震災による主力半導体メーカーの被災等の影響から、これまでの拡大基調から一時的に減少、前年比約6%減の1,730トンとなった。</p>
	<p>2012年 (見込)</p>	<p><ヒュームドシリカ> 2012年は、自動車生産が大きく回復したことを受けて市場規模は回復に向かうが、家電製品は引き続き海外生産や国内需要の低迷から需要減、建築資材向けなども震災特需を除けば大きな動きがなかったことから、前年比約7%増の18,600トンと見込まれる。 2013年は、円安により自動車生産が回復基調、公共投資の拡大による建築向け需要が拡大するものと思われるため、前年比3~5%程度の増加が予想される。</p> <p><高純度コロイダルシリカ> 同製品は、半導体向け研磨剤としての利用が大半を占めているが、半導体の微細化によりCMP(化学的機械研磨)用スラリー原料向け高性能砥粒として需要が拡大している。 そのため、市場規模は順調に拡大、2012年は、前年比約10%増の1,900トンと見込まれる。また、2013年以降も、年率二桁の増加で推移するものと予想される。</p>
<p>製造方法</p>	<p><ヒュームドシリカ> 一般的には、四塩化ケイ素(SiCl₄)を酸水素炎中で燃焼して製造するため「火炎加水分解法」と呼ばれている。</p> <p><高純度コロイダルシリカ> 金属ケイ素からアルコキンドを合成、その後、ゾルゲル反応を経て濃縮、溶媒に置換した後、ろ過、充填される。</p>	
<p>用途</p>	<p><ヒュームドシリカ> 同製品の用途は、シリコンエストラマーの補強を目的として、シリコン(ケイ素化合物)製品向けの充填剤用途が市場全体の50%を超えているのが特</p>	

	<p>微である。次いで、FRP用の添加剤や塗料用添加剤など工業用の用途が15～20%存在している。その他の用途としては、強度向上等様々な機能向上を目的として、接着剤やインク、トナー、インクジェット紙用塗工液、また、化粧品などにも利用されている。</p> <p><高純度コロイダルシリカ></p> <p>同製品の用途は、半導体の研磨剤としての用途が大半を占めているのが特徴である。具体的には、ウエハ研磨剤とCMPスラリーとなっており、両方で市場の約9割を占めている。その他の用途としては、インクジェット紙向けのコーティング用として利用されている。</p>
--	--

③主な用途

<ヒュームドシリカ>

用途	製品	
シリコン充填剤	電気製品	各種パッキン類、各種ケーブル類、各種スイッチ類 放熱向け部材
	OA製品	複写機等の定着ロール
	情報機器	携帯電話機用キーパッド
	自動車	プラグブーツ、オイルフィルター、各種パッキン類、 ターボチャージャーホース、マフラーハンガー、パワーケ- ーブル(HEV用)コネクタ
	家庭用品	キッチン用品、電子レンジ用調理器具、育児用品等
	医療器具	チューブ・カテーテル類
	建築関連	シーリング剤、ガスケット剤
	その他	玩具、自動販売機(チューブ)
化粧品・医薬部外品	クリーム、ファンデーション、乳液、制汗剤等	
ウエハ研磨剤	ウエハ研磨剤	
その他	塗料、接着剤、インク、粘着テープ、FRP、インクジェット用紙向け塗工液、複写機トナー	

※実用化されている用途

<高純度コロイダルシリカ>

用途	製品
研磨剤	ウエハ研磨、CMPスラリー
塗工液	インクジェット用紙
OA製品	トナー添加剤

※実用化されている用途

④研究・開発事例

製品名	開発者	概要
100nm のシリカ粒子でがん治療	東洋大学 バイオ・ナノエレクトロニクス研究センター／学際・融合科学研究科	同研究は、シリカ粒子表面に 10-20nm の穴を無数に形成、バイオイメージングによりがん細胞を捉える技術やがん細胞を捉える材料を多孔内に収めたハイブリッド粒子により、血流を通じてがん治療を行うもの。今後、海外の大学でモルモットを使った動物実験を通じて、正常細胞に対する安全性などを検証する。
ナノシリカを混ぜた Lib 正極材	東北大学	同開発は、正極材にレアメタルを使わないリチウムイオン電池で、6nm のシリカ粒子を混ぜた材料を固体の電解質として活用することで有機分子が溶け出ないように工夫している。試作は、ボタンサイズで、エネルギー密度が現在の電池の 2 倍、100 回以上の連続充放電にも耐えられる。EV 向けの二次電池として早期実用化を目指す。
DDS に使う微粒子を開発	横浜国立大学	薬物送達システム(DDS)に使う微粒子は、主成分の酸化鉄化合物に表面を非晶質シリカで覆う構造で、微粒子の大きさは 2~30nm。表面に多くの薬品成分を載せ、外から磁場をかけると微粒子が発熱し薬品成分と発熱の両面で効果を発揮するのが特徴。半年後に大学医学部や製薬会社と動物実験の予定。
超高純度コロイダルシリカのナノパウダー	扶桑化学工業(株)	従来のトナー添加剤に比べ、転写性が大幅に向上させる超高純度コロイダルシリカのナノパウダーを 2008 年頃から開発、最近、国内メーカーに採用された。

⑤利用事例

製品名	シリコーンゴム製品
含有形態	シリコーンゴムコンパウンド ・シリコーンゴムに混合機や分散装置を使ってヒュームドシリカを添加・混合・分散させる。
1 製品当たりの使用量	3～30% ・1製品当たりの使用量は、用途に応じて求められる特性や性能により異なる。使用量が適切でないと成型時に十分な機械的特性等が得られない場合がある。
粒子の大きさ	10～100nm ・ヒュームドシリカを加えることによってシリコーンゴム製品の特性が変化するが、合わせて、比表面積による影響も大きい。製品や求められる特性によって最適な比表面積を選択するが、一般的には 100～400 m ² /g が多いとされる。
特色	・ナノシリカは、シリコーンゴムの強度を向上させるだけではなく、耐熱性や対候性・耐薬品性向上、電気絶縁性付与、熱伝導性、難燃性、導電性等様々な特性を向上させることが可能である。
応用製品例	<ul style="list-style-type: none"> ◆電気製品 各種パッキン類、各種ケーブル類、各種スイッチ類、放熱向け部材 ◆OA製品 複写機等の定着ロール ◆情報機器 携帯電話機用キーパッド ◆自動車 プラグブーツ、オイルフィルター、各種パッキン類、ターボチャージャーホース、マフラーハンガー、パワーケーブル(HEV用)コネクタ ◆家庭用品 キッチン用品、電子レンジ用調理器具、育児用品等 ◆医療器具 チューブ・カテーテル類 ◆建築関連 シーリング剤、ガスケット剤 ◆その他 玩具、自動販売機(チューブ)

製品名	シリコン研磨用CMPスラリー
含有形態	水溶液 ・ベースとなる水に「高純度コロイダルシリカ」を分散させている。
1 製品当たりの使用量	0.1～10.0% ・CMP スラリーの濃度は、研磨速度と経済性を重視して選定されている。0.1%以下では、研磨速度が低下する傾向があり、10%を超えると経済性が損なわれる可能性がある。
粒子の大きさ	5～100nm ・砥粒の平均粒度は、小さすぎると研磨速度が低下し、逆に、大きすぎると被研磨面の研磨傷の数が増え、半導体の歩留まりや信頼性が低下するため、適切な粒径を選定するのが重要である。 ・一般的には、15～50nm が適切とされている。
特色	・半導体素子の微細化により、被研磨面の平坦性に対する要求が年々厳しくなっていることから、CMP スラリーに対しては、より優れた段差解消性やオーバー研磨耐性、残膜厚制御性の向上が求められている。 ・研磨剤メーカーのこうした要求により、高純度コロイダルシリカメーカーもより微細化に対応した製品の開発を進めている。

製品名	半導体ウエハ研磨剤(エッジ研磨)
含有形態	水溶液 ・水系溶媒に「ヒュームドシリカ」を分散
1 製品当たりの使用量	5～50% ・使用量については、研磨対象物が金属か酸化ケイ素かによって異なる。 ・使用量を最適に設定することで研磨速度や研磨品質を調整する。
粒子の大きさ	10～50nm ・砥粒の平均粒度は、小さすぎると研磨速度が低下し、逆に、大きすぎると被研磨面の研磨傷の数が増え、半導体の歩留まりや信頼性が低下するため、適切な粒径を選定するのが重要である。
特色	・ウエハのエッジ部は、半導体が切り離されるまで搬送時の支えになるが、エッジの形状が不規則になると搬送装置との接触によって微細破壊が起こり、微粒子の発生等により後工程で大きなトラブルの要因になるため、研磨が必要となる。

⑥リスク評価に対する考え方

- ・ヒュームドシリカの大手である日本アエロジル(株)では、ばく露等のリスク管理対策として、粉塵マスク(DS2:厚生労働省国家検定規格)、一般保護手袋、一般保護眼鏡を着用している。また、発じん場所では集塵機(局所排気装置)やドラフトを使用、製造設備は密閉系であり、粉じん則に該当しないがそれに準じた抑制対策を図っている。
- ・トクヤマ(株)では、ばく露対策として、シリカの製造設備については、基本的に密閉構造としており、

粉塵の発生が考えられる包装作業においては、通常の粉塵対策(局所排気装置設置・作業員の防塵マスク着用・防塵マスク着用義務付けエリア設定)を徹底している。また、回収された粉塵は、産業廃棄物として社内にて再利用しており、外部には出さない形としている。

- ・製品供給先に対しては、主要メーカーにおいては、SDS において取扱い上の注意を明記しており、作業者のマスクや作業衣、ゴーグルといった対策をはじめ、局所排気などについて記載している。有害情報については、ラットを使った急性毒性や発がん性等についての情報を記載している。

8)プラチナ(白金)

①製品概要

サイズ	1～50nm 触媒用は、白金塩溶液を使って酸化物粒子に担持させる排ガス浄化用触媒として使用する。 白金ナノコロイドは、保護剤としてポリビニルピロリドンやポリアクリル酸を使ったり、クエン酸で表面が修飾したりする。																																	
	サブナノ 触媒用や磁性材料用では、数 nm サイズが中心に使われるが、化粧品等に使われる白金ナノコロイド液では、より粒径が小さく分散状態が安定している製品として 1nm 以下のサイズが使われているケースがある。																																	
形状	球形、多面体(分散液、コロイド状) 本調査で対象とするプラチナナノ粒子は、分散液、白金ナノコロイド溶液として製造されている。																																	
計測技術	TEM、SEM																																	
物性	<p>[プラチナナノ粒子製品]</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>項目</th> <th>単位</th> <th>品番 (685453)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>直径</td> <td>nm</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>低効率</td> <td>$\mu\Omega$</td> <td>10.6</td> </tr> <tr> <td>比表面積</td> <td>m^2/g</td> <td>98.0</td> </tr> <tr> <td>bp</td> <td>$^{\circ}C$</td> <td>3827</td> </tr> <tr> <td>mp</td> <td>$^{\circ}C$</td> <td>1772</td> </tr> <tr> <td>濃度</td> <td>g/m^3</td> <td>21.45</td> </tr> </tbody> </table> <p>[Sigma-Ardrich 製品データ]</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>項目</th> <th>単位</th> <th>WRPt-40NM</th> <th>WRPt-20NM</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>粒子径</td> <td>Nm</td> <td>40</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>形状</td> <td>—</td> <td>—</td> <td>sphere chain</td> </tr> </tbody> </table> <p>[(株)ワインレッドケミカル製品データより]</p>	項目	単位	品番 (685453)	直径	nm	50	低効率	$\mu\Omega$	10.6	比表面積	m^2/g	98.0	bp	$^{\circ}C$	3827	mp	$^{\circ}C$	1772	濃度	g/m^3	21.45	項目	単位	WRPt-40NM	WRPt-20NM	粒子径	Nm	40	20	形状	—	—	sphere chain
項目	単位	品番 (685453)																																
直径	nm	50																																
低効率	$\mu\Omega$	10.6																																
比表面積	m^2/g	98.0																																
bp	$^{\circ}C$	3827																																
mp	$^{\circ}C$	1772																																
濃度	g/m^3	21.45																																
項目	単位	WRPt-40NM	WRPt-20NM																															
粒子径	Nm	40	20																															
形状	—	—	sphere chain																															
機能／特性	<ul style="list-style-type: none"> ○触媒機能 ○導電性 ○抗原抗体反応 ○抗菌性 ○抗酸化作用 																																	
製造会社	<p>[国内]</p> <ul style="list-style-type: none"> ・田中貴金属工業(株) ・相田化学工業(株) ・アイノベックス(株) ・(株)バイオフェイス ・(株)ワインレッドケミカル <p>[海外]</p> <ul style="list-style-type: none"> ・Particular GmbH ・US Research Nanomaterials 																																	

②市場規模

発見・歴史	<p>プラチナ(白金)は、化学的には非常に安定しており、白い光沢をもつ金属として長年装飾品として利用されてきた。産業用としての利用は、プラチナの持つ触媒機能により自動車排ガス処理用の触媒としての利用が代表的である。本調査で対象となるナノサイズの分散液あるいはコロイド状のナノサイズのプラチナは、排ガス触媒用をはじめとして、HDD の磁性膜や導電ペースト材料といったエレクトロニクス分野の需要が中心となっている。また、白金ナノコロイドは、1998 年頃から市場に登場、高い抗酸化作用があるとされることから、化粧品に使われる他、抗菌性を付与した繊維製品や日用品等が製品化されている。</p>	
国内市場動向	2011 年 (実績)	<p>ナノサイズプラチナの 2011 年の国内市場は、概ね 70~80Kg と推定される。これまで需要の大きかったエレクトロニクス用途は、業界の低迷によって伸び悩んでいるものの、排ガス触媒用では、一定の需要を確保している。また、白金ナノコロイドを使った化粧品や繊維製品を中心に多様な製品に応用されている。</p>
	2012 年 (見込)	<p>2012 年度の国内市場規模は、自動車の需要が回復したことによる排ガス触媒作用や白金ナノコロイドを使った抗菌・消臭製品や化粧品などの需要が増加したことから、前年を 5%程度上回るものと見込まれる。</p> <p>ナノサイズのプラチナは、燃料電池や光触媒、光学材料、バイオ関連等様々な分野で研究開発が進められていることから、2013 年以降についても安定した需要を確保していくものと推察される。</p>
製造方法	<p>○プラチナナノ分散液 プラチナナノ粒子の製造方法は、白金と界面活性剤、溶媒からなる水溶液に還元剤を添加することで合成する方法や塩化白金酸水溶液に安定化ポリマーを添加することにより、ポリマーと結合させることで白金ナノ粒子を成長させる方法等がある。</p> <p>○白金ナノコロイド 白金ナノコロイドは、白金を溶解させた白金塩を溶液中で還元し、白金粒子を得る方法が一般的であるが、還元条件や還元剤、保護剤などの種類や精製の工程等によって、性質や用途が異なる。</p>	
用途	<p>ナノサイズのプラチナの用途は、排ガス用触媒や HDD の構成材料、導電ペースト材料において実用化されており、近年では、燃料電池の電極材やバイオセンサといった用途も研究されている。一方、白金ナノコロイドは、抗酸化能力や抗菌機能から化粧品や繊維製品、日用品等に利用されている。</p>	

③主な用途

用途	製品
自動車	排ガス浄化用触媒
エレクトロニクス	HDD 磁性層 導電ペースト(積層セラミックコンデンサ、圧電部品等) 燃料電池用電極
医療・医薬品	イムノクロマトグラフィー 抗腫瘍剤(プラチナ複合体)
化粧品・日用品	基礎化粧品(乳液、化粧水、クリーム、美容液、パック等) 洗顔石鹸、洗顔フォーム シャンプー、ヘアトリートメント 歯ブラシ、消臭スプレー
繊維製品	マスク、寝具、衣類(下着類、靴下、作業着、Tシャツ等)
その他	CD・DVD用スプレー 炊飯器(内釜コーティング)

※実用化されている用途

④研究・開発事例

製品名	開発者	概要
夜でも作用する光触媒	東京大学	エネルギーを貯蔵する作用のある「水酸化ニッケル」を使ったもので、酸化タングステンにプラチナの微粒子を混ぜた触媒に、水酸化ニッケルを付着させたもの。
固体高分子燃料電池用カソード触媒の開発	大阪府立大学	固体高分子燃料電池の触媒に使われるプラチナをナノ粒子化し、本来持つ触媒活性を落とさずにプラチナの使用量を減らすため、単分散プラチナナノ粒子触媒を開発。

⑤利用事例

製品名	排ガス用触媒
含有形態	溶液 ・アルミナ等の無機酸化物やアルカリ土類金属酸化物の粉末を水等の溶液でスラリー化し、白金塩溶液を添加した後、乾燥、焼成工程を経て白金を担持させ、排ガス浄化用触媒とする。
1製品当たりの使用量	0.1~5% ・排ガス浄化用触媒における白金の含有量は、0.1%~5%の範囲が好ましいとされる。 ・含有量が少ないと十分な触媒活性が得られず、多すぎると触媒の寿命が低下するとされる。
粒子の大きさ	5nm~50nm ・排ガス用触媒においては、粒子の大きさによって触媒活性が異なるとされる。
特色	・排ガス用の触媒は、従来からアルミナ等の無機酸化物に白金等の貴金属を担持させることで、還元反応や一酸化炭素及び炭化水素の酸化反応を促進する役割を担っている。 ・自動車業界における排ガス規制の強化やアイドリングストップ機構といった新たな燃費向上メカニズムの採用に伴って、排ガス用触媒の性能向上が図られている。

製品名	化粧水
含有形態	分散液 ・白金ナノコロイド液を他の化粧品成分と混ぜる。
1製品当たりの使用量	10%(白金濃度 1mmol/L の水溶液) ・白金濃度と調整する量については、白金ナノコロイドの持つ抗酸化機能を発揮できる最適用量が必要であり、少なすぎると酸素除去効果が薄く、多すぎても効果が上がらずコスト高になる。
粒子の大きさ	1~5nm ・平均粒径は、1~5nm が好ましいとされる。 ・この範囲を大きく外れると、体内に取り込まれたときに、十分な活性酸素除去機能が発揮されない。
特色	・白金ナノコロイドを使った化粧品メーカーでは、白金ナノコロイドの抗酸化機能により、老化につながる体内の主要な活性酸素を除去する作用があるとの宣伝文句や保湿効果等を訴求した宣伝文句がみられる。 [化粧品メーカーのHP等より抜粋した宣伝文句] ◇「保湿成分として配合」(ロート製薬:Obaji プラチナイズドシリーズ) ◇「肌表面の水分子を電氣的にひきつけるマイナス電位を持つ」(DHC) ◇「紫外線によって発生した活性酸素を除去し続けます」(株ナノイー)

⑥リスク評価に対する考え方

- ・ナノサイズのプラチナ粒子の製造は、企業により様々な方法で行っているが、概ね、作業員等製造現場においては、国の指針に沿ったばく露等の対策をとっている。
- ・最終製品に加工する企業に対しては、最終消費者への安全性を踏まえて、各企業が自社あるいは、研究機関等による安全性試験の結果を提供している。（当該物質の代表的企業である田中貴金属工業(株)では、販売先から求められれば、SDS を提供し、取扱い情報や有害情報等を提供している）
- ・白金ナノコロイドについては、原料メーカーが、独自で実施した試験や研究機関に委託した試験結果、各種論文等を用いて安全性等に対する情報を提供するケースがみられる。

9)金

①製品概要

サイズ	5~100nm																																													
サブナノ	金ナノ粒子の場合は、1nm 未満のサイズについては、市場には出ておらず、研究室レベルにとどまっている。																																													
形状	粉体、コロイド状 金ナノ粒子は、そのままでは、簡単に凝集してしまうことから、分散剤等によりコロイド状にしたり、表面を様々な物質で保護や修飾したりすることで粒子径や機能等を制御している。																																													
計測技術	TEM、SEM																																													
物性	<p>[金ナノ粒子]</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">項目</th> <th rowspan="2">単位</th> <th colspan="5">品番 No</th> </tr> <tr> <th>(741949)</th> <th>(741965)</th> <th>(741965)</th> <th>(742007)</th> <th>(742031)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>直径</td> <td>nm</td> <td>5</td> <td>10</td> <td>20</td> <td>50</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>粒子数</td> <td>/ml</td> <td>5.47×10^{13}</td> <td>5.98×10^{12}</td> <td>6.54×10^{11}</td> <td>3.51×10^{10}</td> <td>3.84×10^9</td> </tr> <tr> <td>Peak SPR Wavelength</td> <td>nm</td> <td>515-520</td> <td>515-520</td> <td>524</td> <td>535</td> <td>572</td> </tr> <tr> <td>モル吸光係数</td> <td>$M^{-1} cm^{-1}$</td> <td>1.10×10^7</td> <td>1.01×10^8</td> <td>9.21×10^8</td> <td>1.72×10^{10}</td> <td>1.57×10^{11}</td> </tr> </tbody> </table> <p>[Sigma-Ardich 製品データより抜粋]</p>						項目	単位	品番 No					(741949)	(741965)	(741965)	(742007)	(742031)	直径	nm	5	10	20	50	100	粒子数	/ml	5.47×10^{13}	5.98×10^{12}	6.54×10^{11}	3.51×10^{10}	3.84×10^9	Peak SPR Wavelength	nm	515-520	515-520	524	535	572	モル吸光係数	$M^{-1} cm^{-1}$	1.10×10^7	1.01×10^8	9.21×10^8	1.72×10^{10}	1.57×10^{11}
項目	単位	品番 No																																												
		(741949)	(741965)	(741965)	(742007)	(742031)																																								
直径	nm	5	10	20	50	100																																								
粒子数	/ml	5.47×10^{13}	5.98×10^{12}	6.54×10^{11}	3.51×10^{10}	3.84×10^9																																								
Peak SPR Wavelength	nm	515-520	515-520	524	535	572																																								
モル吸光係数	$M^{-1} cm^{-1}$	1.10×10^7	1.01×10^8	9.21×10^8	1.72×10^{10}	1.57×10^{11}																																								
機能／特性	<ul style="list-style-type: none"> ○光学特性(プラズモン共鳴) ○導電性 ○体積当たりの表面積が大きい ○光錯乱性 ○生体親和性 ○触媒特性 																																													
製造会社	<p>[国内]</p> <ul style="list-style-type: none"> ・田中貴金属工業(株) ・バンドー化学(株) ・浜松ナノテクノロジー(株) ・ワインレッドケミカル(株) ・(株)スティックスバイオテック <p>[海外]</p> <ul style="list-style-type: none"> ・Cytodiagnosics 社 ・Nanocs 社 ・Nanopartz 社 																																													

②市場規模

発見・歴史	<p>金は有史以来、宝飾品等を中心に利用されている。金ナノ粒子については、ステンドグラスの赤色を出すために 16 世紀頃から使われてきたが、原理が発見されたのは 1850 年である。</p> <p>その後、金は、エレクトロニクス産業の発展に伴い、金の優れた導電性によって半導体や電子部品等様々なエレクトロニクス製品に利用されるようになるが、2000 年代に入り、ナノサイエンスの研究が活発になると、金や銀をはじめとする金属ナノ粒子の研究が国内外で活発化した。</p> <p>最近では、エレクトロニクス関連用途だけでなく、DDS や診断等医療関連用途での実用化が進められている。</p>	
国内市場動向	2011 年 (実績)	<p>2011 年の国内市場規模は、約 400Kg と推定される。</p> <p>用途の多くを占めるイムノクロマト用において、インフルエンザ診断薬の需要が高まったことから金ナノ粒子の需要が高まっている。一方、電子回路描画用のインクや電子部品回路用ペーストは、エレクトロニクス産業向けが思うように伸びなかったことから横ばいで推移した模様である。</p>
	2012 年 (見込)	<p>2012 年度の国内市場規模は、前年比 5% 増の 420 kg と見込まれる。2013 年以降は、診断薬用微粒子において様々なウイルスへの対応が広がると予想されることから、需要は堅調に拡大するものと推定される。</p> <p>エレクトロニクス用途においても、金ナノ粒子を使った直接描画が本格的に実用化していくことで需要拡大が望まれる。</p>
製造方法	<p>金ナノ粒子の製造には、一般的に、粉碎等の物理的な製造方法と化学反応(還元)によって粒子を合成する方法がある。</p> <p>○粉碎法 粉碎法には、機械的粉碎(遊星ボールミルなど)、蒸発(真空、気相)、レーザーアブレーション、噴霧(アトマイズ法)などがある。</p> <p>○化学法 化学法は、液中で金属塩を還元して合成する還元法や金属塩または金属錯体を熱分解する熱分解法が一般的である。還元法は、一般的に保護剤の設計や添加量によって粒子径を制御しやすいと言われている。</p>	
用途	<p>金ナノ粒子は、イムノクロマトグラフィー用の微粒子として、医療検査用途や印刷用インク等導電材料としてエレクトロニクス分野において利用されており、概ね金ナノ粒子市場の 8 割程度を占めるとみられる。また、金ナノ粒子の持つ、低温でも活性が高いといった化学反応を利用して触媒としても利用されている。</p> <p>最近では、金ナノ粒子の持つ光学特性を利用してバイオイメージングや各種センサなどへの研究が進められている。</p>	

③主な用途

用途	製品
医療検査用	妊娠検査薬 イムノクロマトグラフィー用(インフルエンザ、ノロウイルス等) エックス線解析用標識
エレクトロニクス	印刷用インク(回路や電極の描画用) 電子部品回路用ペースト(ハイブリッド IC、センサ、積層セラミック、 パネルディスプレイ等) トランジスタ 偏光素子 光電交換素子 燃料電池
触媒	金触媒
塗料	トップコート材
治療関連	治療用薬物送達(DDS) 温熱療法 癌診断
センサ	比色センサ
	バイオセンサ 近赤外線センサ

※網掛けは実用化されている用途

④研究・開発事例

製品名	開発者	概要
HIV の検出	スティックスバ イオテック(株)	唾液からエイズウイルス(HIV)を検出する手法を開発。唾液 10 ミリリットルにウイルス1粒子という低濃度で検出できるのが特徴。HIV と結合性の強い糖鎖を 20nm の金ナノ粒子に固定化した「糖鎖固定化金ナノ粒子」を唾液と混合した後、遠心分離機を使って分離する。
化学触媒	物質・材料研 究機構	生体で触媒として作用する化学触媒を開発。金ナノ粒子の表面を鎖状の分子で覆い、酵素が物質を取り込む方法と同様の機構を再現することで活性を上げている。(金ナノ粒子の大きさは 10nm)

⑤利用事例

製品名	塗装材料
含有形態	ペースト状 ・表面に光沢と平滑を与えるトップコート塗装において、トップコート材に金ナノ粒子のペーストを混ぜて使用する。
1 製品当たりの使用量	1～数% ・トップコート材に、数%程度混ぜることで、見る角度によって色相、彩度、明度に変化するカラープロップ性が顕著にみられ、ベースの光沢感を損なうことなく透明性や高彩度が実現できる。
粒子の大きさ	10～40nm ・粒子が大きすぎると、光散乱強度が変化し、拡散反射で思うような特性が出なくなることがある。 ・10～40nm 程度の場合、拡散反射が低下し、より透明度が高く、クリアな塗装が実現できるとされる。また、粒径によって赤から紫までの発色を変化させることができる。
特色	・従来からの有機顔料や無機顔料に比べて、金ナノ粒子を色材に使うことで、表面プラズモン共鳴効果によって鮮やかな色調を得ることができる。 ・金ナノ粒子は、粒子径が通常の顔料より小さいため、染料並みの彩度や透明性、無機顔料以上の耐久性を併せ持った色材として機能することが期待されている。

製品名	バイオセンサチップ(血糖値のチェック用)
含有形態	分散液 ・分散液中に、金ナノ粒子を分散させている。
1 製品当たりの使用量	0.2～0.3 μg/μl(分散液中) ・使用量によって電流値が上昇するが、ある一定量以降は、電流値が一定になってしまう。また、0.3 μg/μl を超えると、凝集が起こりやすくなるため、安定した電流値を得るための最小限の金ナノ粒子の使用量として0.2～0.3 μg/μl が適切である。
粒子の大きさ	2～30nm ・2～30nm が最も触媒活性が高いとされ、酵素反応により発生する電流信号の増幅がより効果的とされる。
特色	・糖尿病患者において、自身の血糖値を日常的に監視するために、血液サンプルとバイオセンサチップを使った計測を行っているが、金ナノの高表面積や高導電性、酵素活性の触媒機能等を利用することで、従来の製品よりも、より少量の試料(血液)で済む。

⑥リスク評価に対する考え方

- ・金ナノ粒子の製造については、主要企業では、厚生労働省の通知に基づいて、作業者のばく露対策や排気装置の設置といった対応を行っている。
- ・ただし、金については、素材自体は安全であるという認識が高く、しかも、ナノサイズにおける毒性の試験データがないことから、販売先となる製品企業に対しては、SDS において「データなし」と記載、金ナノ粒子の取扱や保管上の注意等を喚起するにとどまっているケースが多い。
- ・特に、体外診断薬として使う場合は、ナノマテリアルを体内に入れる(触れる)訳ではないので、体内毒性等についてはあまり意識していない。

10)ナノ銀

①製品概要

サイズ	1~100nm ◆銀ナノペーストに使用されるナノ銀は1~10nmが中心 ◆抗菌用の銀粒子は、数nm~200μmまで幅広い																																																															
	サブナノ 消臭・抗菌用として利用されるナノ銀コロイドには1nm以下の粒子を使ったものもある。																																																															
形状	粉体、ペースト、コロイド水溶液																																																															
計測技術	TEM、SEM																																																															
物性	<p>[銀粉]</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>項目</th> <th>単位</th> <th>乾粉-1</th> <th>乾粉-2</th> <th>銀粉-1</th> <th>銀粉-2</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>粒径</td> <td>nm</td> <td>20</td> <td>60</td> <td>100</td> <td>300</td> </tr> <tr> <td>比表面積</td> <td>m²/g</td> <td>15-20</td> <td>5-8</td> <td>3-6</td> <td>1-2</td> </tr> <tr> <td>TPA密度</td> <td>g/ml</td> <td>2-4</td> <td>2-4</td> <td>2-4</td> <td>1-3</td> </tr> <tr> <td>Ag含有量</td> <td>Wt%</td> <td>≥95</td> <td>98</td> <td>99</td> <td>99</td> </tr> </tbody> </table> <p>[DOWA エレクトロニクス(株)製品データ]</p> <p>[銀ナノ分散水溶液]</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">項目</th> <th rowspan="2">単位</th> <th colspan="5">品番</th> </tr> <tr> <th>730785</th> <th>730793</th> <th>730807</th> <th>730815</th> <th>730777</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>直径</td> <td>nm</td> <td>10</td> <td>20</td> <td>40</td> <td>60</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>濃度</td> <td>Mg/ml</td> <td>0.02</td> <td>0.02</td> <td>0.02</td> <td>0.02</td> <td>0.02</td> </tr> <tr> <td>粒子数</td> <td>/ml</td> <td>4.5 × 10¹¹</td> <td>3.6 × 10¹²</td> <td>5.7 × 10¹⁰</td> <td>1.7 × 10¹⁰</td> <td>3.6 × 10⁹</td> </tr> </tbody> </table> <p>[Sigma-Aldrich 製品データ]</p>	項目	単位	乾粉-1	乾粉-2	銀粉-1	銀粉-2	粒径	nm	20	60	100	300	比表面積	m ² /g	15-20	5-8	3-6	1-2	TPA密度	g/ml	2-4	2-4	2-4	1-3	Ag含有量	Wt%	≥95	98	99	99	項目	単位	品番					730785	730793	730807	730815	730777	直径	nm	10	20	40	60	100	濃度	Mg/ml	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	粒子数	/ml	4.5 × 10 ¹¹	3.6 × 10 ¹²	5.7 × 10 ¹⁰	1.7 × 10 ¹⁰	3.6 × 10 ⁹
	項目	単位	乾粉-1	乾粉-2	銀粉-1	銀粉-2																																																										
粒径	nm	20	60	100	300																																																											
比表面積	m ² /g	15-20	5-8	3-6	1-2																																																											
TPA密度	g/ml	2-4	2-4	2-4	1-3																																																											
Ag含有量	Wt%	≥95	98	99	99																																																											
項目	単位	品番																																																														
		730785	730793	730807	730815	730777																																																										
直径	nm	10	20	40	60	100																																																										
濃度	Mg/ml	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02																																																										
粒子数	/ml	4.5 × 10 ¹¹	3.6 × 10 ¹²	5.7 × 10 ¹⁰	1.7 × 10 ¹⁰	3.6 × 10 ⁹																																																										
機能／特性	<p>○導電性</p> <p>○抗菌性</p> <p>○光学特性</p>																																																															
製造会社	<p>[国内]</p> <ul style="list-style-type: none"> ・DOWA エレクトロニクス(株) ・日本イオン(株) ・シルバーソルテック(株) ・三菱マテリアル電子化成(株) ・(株)アルバック(ナノ銀インク) ・DIC(株)(ナノ銀インク) <p>[海外]</p> <ul style="list-style-type: none"> ・Sigma-Aldrich ・Nanopoly ・PChem Associates ・インテック(韓) 																																																															

②市場規模

<p>発見・歴史</p>	<p>銀粉は、古くは顔料として用いられてきたが、近年では、エレクトロニクス産業の発展に伴って、銀の持つ導電性を利用するため、実装関連やプリント基板やリードフレームといった電極向けに利用されている。さらに、本調査の対象となるナノサイズの銀については、銀ナノペーストとして、主にエレクトロニクス部品用に利用されている。</p> <p>最近では、有機トランジスタ電極や透明電極、各種電子デバイスの導電回路形成用途としての銀ナノインクが本格的に事業化され始めている。</p>	
<p>国内市場動向</p>	<p>2011年 (実績)</p>	<p>ナノ銀の2011年の国内市場規模は、前年比50%増の4.8トンとなった。ナノ銀は、銀ナノペーストとして市場を拡大してきたが、加えて、銀ナノインクとして導電性フィルムや回路印刷等の利用が本格的に立ち上がり始めたことから、市場規模が急速に拡大している。</p>
	<p>2012年 (見込)</p>	<p>2012年の市場規模は、前年比ほぼ2倍の9.5トンと見込まれ、従来のエレクトロニクス関連での用途拡大に加え、建築用フィルムや高機能インクジェット印刷など一般印刷用途等へも広がっている。2013年以降も用途拡大に伴って市場が大きく拡大していくものと予想される。</p>
<p>製造方法</p>	<p>ナノ銀を製造する方法は、気相法と液相法が知られており、気相法ではガス中での蒸着法、液相法は、水相で銀イオンを還元する方法や溶媒やアルコール中でハロゲン化銀に還元剤を用いて還元する方法が一般的となっている。</p>	
<p>用途</p>	<p>ナノ銀の用途は、エレクトロニクス用銀ナノペーストとして部品用の配線や接点材料として8割程度が利用されている。しかし、最近では、ナノ銀粒子の表面効果によって、低い焼成温度で高い導電性が得られることから樹脂基板向けの電極や配線、透明電極、デバイス用導電回路形成用途等で本格的な市場が立ち上がりつつある。また、紙やPETなど耐熱性の低い基材にも直接印刷が可能となることから、インクジェットやスクリーン印刷といった一般的な印刷用途においても新たな需要が期待されている。この他、ナノ銀の抗菌や消臭機能を利用した用途開発も進んでおり、生活用品や衣類等を中心に製品化が行われている。ただし、抗菌・消臭用途では、製品に含まれる濃度が非常に低いことから、ナノ銀全体に占める構成比は微量である。</p>	

③主な用途

用途	製品
ナノ銀ペースト	回路基板として、タッチパネル、LED、液晶カラーフィルター等各種電気・電子部品
ナノ銀インク	プリンタブルエレクトロニクス材料として RFID アンテナなど導電回路形成用途
ナノ銀ワイヤー	透明導電フィルム、導電回路形成用途
抗菌／消臭	衣料品(タオル、靴下、下着、帽子、手袋、寝具、各種衣料品等) キッチン用品(フキン、まな板、ゴム手袋、たわし) トイレタリー用品(歯ブラシ、シャンプー、リンス、便座シート)
コンパウンド(樹脂成型品)	携帯電話機、ノートパソコン、浄水器、冷蔵庫、エアクリーナ、エアコン、掃除機、洗濯機、保存容器等
建築用品	水タンク、内装・外装用塗量・ペイント、タイル、壁紙、人造大理石、床締め切り剤、浴槽、シリコンコーキング、セメント

※実用化されている用途

④研究・開発事例

製品名	開発者	概要
銀ナノインクを使った RFID	DOWA エレクトロニクス(株)	同社では、プリンタブルエレクトロニクス材料として期待されている「銀ナノインク」を使って、紙や PET フィルムに直接回路を印刷する。既に、紙基材に回路を描画した UHF 帯の RFID アンテナについては、既に本格生産を行っている。
遮熱用近赤外線反射フィルム	富士フィルム(株)	同社では、リンテック(株)との共同開発により、高い透明性を維持しながら暑さを感じる波長だけをカットできる近赤外線反射フィルムを開発した。120nm の銀ナノ平板粒子を均一にコーティングしたもので既に量産を開始している。
透明導電フィルム	信越ポリマー(株)	同社で開発した透明導電フィルムは、米国ケンブリオステクノロジーズの銀ナノワイヤーインキ技術を使ったタッチパネル用の導電フィルムであり、従来の ITO を電極材としたパネルに比べて、低抵抗性、フレキシブル性、透明性に優れている。既に、韓国で量産を開始している。
太陽光で発電する「紙」	大阪大学	大阪大学産業科学研究所では、木材から取り出したセルロースナノファイバーを利用して、表面に銀ナノワイヤーで導電膜と有機太陽電池素子を印刷した発電する「紙」を開発した。銀ナノワイヤーは 100nm で、光電変換効率は 3%。

⑤利用事例

製品名	インクジェットプリンター用ナノ銀インク
含有形態	液体 ・ナノ銀に加え、高分子化合物の分散体、溶剤としてアルコール、水等を含有する液体。
1 製品当たりの使用量	60～70% ・ナノ銀の含有量については、一般的に60～70%とされるが、少なすぎると導電性などの特性が出ない場合がある、また、多すぎると金属分散体が沈降し、印刷特性に支障をきたす場合がある。
粒子の大きさ	1～50nm ・粒径については、より高い分散性を得るために、1～50nm が一般的な範囲である。
特色	①低温での印刷が可能 ・120℃以下の低温でかつ短時間で焼成できるため、紙や PET などの基材に直接印刷することが可能 ②コストダウンと環境特性 ・インクジェット印刷を活用することで、従来のフォトリソグラフィ工程に比べて、必要な場所に必要な量だけ吐出して印刷できるため、コストダウンが図れ、かつ、廃棄物や廃液が少なく環境性も良い。また、ロールトゥロールの連続印刷も対応可能である。

製品名	抗菌・消臭スプレー
含有形態	コロイド状 ・数ナノサイズのナノ銀を水やエタノール等の溶剤に分散したコロイド溶液を目的に応じて希釈し混入する。
1製品当たりの使用量	0.05～100ppm(銀成分濃度) ・濃度については、抗菌・消臭の効果によってことなるが、一般的には、0.05～100ppmとされる。 ・0.05ppm未満では、十分な抗菌・消臭効果が得られない。逆に、100ppmを超えると、銀による着色が大きくなるとされる。 ・消臭剤スプレーとして利用する場合は、10ppm以下の低濃度でも悪臭成分を分解除去できることから、0.1～数ppmでの利用が多いとされる。 ・抗菌の場合は、消臭よりも高い濃度で使用するケースがみられ、濃度としては20ppm未満で利用するケースが多いようである。
粒子の大きさ	0.5～100nm ・粒子の大きさは、0.5～100nmの範囲とされるが、粒子が小さい程抗菌・消臭効果が大きいとされることから、数ナノサイズの粒子を利用するケースが多い。また、100nmを超えると消臭・抗菌効果は低下するとされる。
特色	・銀ナノ粒子を使った抗菌・消臭スプレーは、天然物質系を使用した製品に比べ、抗菌・消臭の持続性が高いとされている。 ・また、非常に低濃度で効果が持続するという点も、手軽に利用される背景となっている。

⑥リスク評価に対する考え方

- ・主要企業におけるナノ銀の製造現場においては、作業者の保護対策(マスクや作業着)や排気装置の設置といった厚生労働省の通知に基づく対策をとっている。
- ・販売先に対しては、SDSの中で、安全対策や保管、廃棄に関する注意書きをはじめ、取扱いにおける注意や応急措置など細かく説明している場合が多い。
- ・有害性情報についても各種毒性に関する情報についてSDSにおいて記載しているケースが多い。

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 ₆₀) (異なるフラーレン懸濁液(nC ₆₀)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"> ・4種類の水性 nC₆₀ 会合体 <p>■試料</p> <ul style="list-style-type: none"> ・C₆₀ (99.9%, MER Corp.) ・THF (99.7%, VWR) ・トルエン (99.7%, Mallincrodt) ・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) <p>入手元: Calbiochem and Nutrient Broth (NB) from Becton, Dickinson and Company)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・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 > 18 MΩ) <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"> ・Aqu-N₂/nC₆₀ 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 C₆₀ (99.9%, MER Corp.社製) 粉末を分散し、Aqu-N₂/nC₆₀ 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。 ・Aqu-O₂/nC₆₀ 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-O₂/nC₆₀ 懸濁液を調合。酸素飽和環境で長時間攪拌。 ・Tol/ nC₆₀ (1) 80 mL のトルエンに 100 mg の粉末を溶かし、C₆₀ 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^{L-1} 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。 ・THF/ nC₆₀ 乾燥した 10 mg の C₆₀ 粉末を 500 mL の THF 中で溶かし、THF/nC₆₀ 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、C₆₀ 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 C₆₀ 溶解度は 9 mL⁻¹)。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 	<p>■試験細胞</p> <ul style="list-style-type: none"> ・大腸菌 AMC 198 (ATCC#11229) <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、nC₆₀ 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 × 10⁷ 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⁻¹ の 4 種類のうちの 1 種類の nC₆₀ 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"> ・Tol/ nC₆₀ 懸濁液の作用 Tol/ nC₆₀ 懸濁液への 1 mgL⁻¹ 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⁻¹ へのばく露では対照群と比べ約 50% 上昇したが、0.01 mgL⁻¹ と 0.1 mgL⁻¹ の Tol/ nC₆₀ へのばく露では、対照群と同じ傾向であった。 ・THF/ nC₆₀ 懸濁液の作用 THF/ nC₆₀ 懸濁液への 1 mgL⁻¹ 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⁻¹ 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/ nC₆₀ 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。 ・Aqu-N₂/nC₆₀ および Aqu-O₂/nC₆₀ 懸濁液の作用 Aqu-N₂/ nC₆₀ と Aqu-O₂/nC₆₀ の懸濁液へのばく露時では、大腸菌増殖は濃度 1 mgL⁻¹ を除いて対照群のものと同様の傾向であったが、1 mgL⁻¹ 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⁻¹ 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-O₂/nC₆₀ よりも Aqu-N₂/nC₆₀ の方がアセテータ産出を高めることが判明した。 ・異なる分散方法の作用 全ての懸濁液を濃度 1 mgL⁻¹ 時で試 	<ul style="list-style-type: none"> ・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 nC₆₀ の影響は分散方法間で異なった。

		<p>量の超純水を 250 mL^{-1} 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 nC_{60} 会合体の生理化学的特性を分析し、$0.45 \mu\text{m}$ 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 nC_{60} 会合体懸濁液を 30 日間以上保管。30 日後、nC_{60} 会合体の粒子の分布がより均一になり、平均直径が 150 nm 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/nC_{60} 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/nC_{60} 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/nC_{60} 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 ₆₀ 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 ₆₀ 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 ²⁺ 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 ²⁺ 濃度の上昇が FWS のゼータ電位を低 下させた。 Ca ²⁺ 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 ²⁺ 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 ²⁺ 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 ²⁺ 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 ²⁺ 濃度の上昇に反応することはなかった。 Ca ²⁺ (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 ²⁺ 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 ²⁺ 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"> ・フラーレン C₆₀ 純度:99.9% ・フラレノール 入手元:Materials and Electrochemical Research <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"> ・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 ・水性フラーレン・フラレノールと O₂ の反応 ローズベンガル使用 ・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。 	<ul style="list-style-type: none"> ・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。 ・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。 ・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。 ・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。 ・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。 ・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。 ・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。 	<ul style="list-style-type: none"> ・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。

【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 CO₂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CO₂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"> ・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。 ・酸化グラフェン(GO) グラファイトパウダ ーを合成。 <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"> ・ヒト肝癌細胞(HepG2) 入手先:ATCC DMEM 内で培養し、CO₂ 5%、室温 37°Cの環境で 保管。 ■細胞溶解、タンパク消 化、標識化 iTRAQ 試薬で解析 ■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 ■細胞増殖分析、細胞内 ROS 測定 MTT 解析、蛍光プローブ DFDA 使用。 ■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。 ■細胞周期測定 フローサイトメトリー分析 	<ul style="list-style-type: none"> ・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(>0.1.2-ないし<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。 ・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。 ・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。 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。 	<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)	■対象物質 単層カーボンナ ノチューブ 直径:0.7-1.5nm 長さ:>1 μ m 入手元:Shenzhen Nanotechnologies Co., Ltd (China) 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。	■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	■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<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。	・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。

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。気管支肺泡洗浄細胞 (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 _s 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 _s 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 _s 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 _s 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 _s 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
besinc.com">http://www.cheaptu besinc.com 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、亜細胞毒 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/cm²): SWCNT: 0, 0.024, 0.24, 2.4, 24 バナジウム(μg/cm²): 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/cm³ 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/cm³ 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 & 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><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>	<p>・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。</p> <p>・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。</p> <p>・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・熱的特性間に、相 関性がないことを示し ている。</p>	<p>・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。</p> <p>・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。</p>
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"> ・SWCNTs 入手元: Beijing Nachen Technology & Development Co. Ltd. (China) サイズ: 1-2nm 長さ: <20 μm ・ビタミン E 入手元: Sigma (USA) <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"> ・5%CO₂、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。 <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"> ・細胞生存率分析 MTT 解析、LDH 解析 ・細胞自然死と壊死の分析 フローサイトメトリー法 ・ROS と MDA 測定 DCFH-DA 使用 ・SOD, CAT, GSH-Px 活性と GSH の測定 ・ミトコンドリア膜電位測定 Rh123 使用 ・カスパーゼ 3 の活性測定 ・Bcl-2 と Bax タンパク質分析 	<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"> ・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。 <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"> ・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。 <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"> ・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。 	<ul style="list-style-type: none"> ・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。 ・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。 ・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。

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、KMnO₄ 内で抽出することにより機能化。 ・SCNT 純度: >90% ・MCNT 純度: >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 für 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_{co} 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 μg/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_c 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"> •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% •MWCNT-OH 入手元: Heji (China) 直径: 18±1nm 凝集体サイズ: 6.6±1.3 <p>機能化したナノ粒子-OH>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%CO₂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"> •Pristine MWCNTsとMWCNT-OHでは細胞膜上の影響が異なる。 •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。

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: >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>90-150nm</td> <td>60-80nm</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 (m²/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	90-150nm	60-80nm	結晶化度	六方晶系	立方晶系	表面積 (m ² /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<0.05)、1 mg/kg(P<0.1)、5 mg/kg(P<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>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<0.05)、1 mg/kg(P<0.01)、5 mg/kg(P<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	90-150nm	60-80nm																			
結晶化度	六方晶系	立方晶系																			
表面積 (m ² /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 ₂ ・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 ₂ 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:>10 μm ・Ground CNT サイ ズ: 67\pm2nm 長さ: 1.12\pm0.05 ・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Ca²⁺とMg²⁺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 NaHCO₃、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 CaCl₂, 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\pm0.4 GΩ; n=4)も 30 μg/mL の MWCNTs での処理(2.9\pm0.2 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>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)	■対象物質 ・MWCNT _{9,4} サイズ: 9.4±0.3nm 長さ: 0.1-1 μm SSA: 240m ² /g ・MWCNT ₇₀ サイズ: 70±2nm 長さ: 1-3 μm SSA: 60 m ² /g 入手元: Mitsui Chemicals (Japan) HClの0.1M 溶液内で 懸濁し、10 日間 RT でかき混ぜる。	■試験細胞(in vitro) マウス肺胞マクロファージ(MH-S) 入手元: Istituto Zooprofilattico Sperimentale (Italy) ■培養方法 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。 ■ばく露について 260mg/L の濃度で血清を含んだ培養培地へ MWCNT をばく露。 ■試験内容/方法 ・クロシドライト石綿を Positive control 用に使用 ・細胞外の LDH 活性の測定 ・細胞内 ROS 産出測定 電子スピン共鳴分光法 ・細胞内グルタチオンの測定 ・MWCNT の細胞内への内在化の測定 TEM 使用 ■試験生物 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。 ■試験内容 LDH 活性と総タンパク量の測定	・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 _{9.4} 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 ₇₀ 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 _{9.4} 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 ₇₀ は、同等の質量用量では、細胞 変化は誘発しなかった。 ・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。 ・CNT の単回投与の 24 時間に、MWCNT _{9.4} 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。 ・MWCNT ₇₀ には、MWCNT _{9.4} 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。	・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。 ・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。

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: CaCO₃(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⁻¹)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-α、IL-1β)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ーである 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⁻¹、2 倍増加)および 48 時間 (9.533±1.9 nmol ml⁻¹、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-α 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-α 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-1β 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 ⁻¹ 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"> 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<0.01、t検定)。 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、110m²g⁻¹)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。 ■BODとSSAの関係 ・SSAとBODの度合いの間には指数関係があり、200m²g⁻¹周辺で急速な上方移行が見られた。SSAとSSAsの下端(<200m²g⁻¹)にあるBODは、ほぼ線形関係にあった。 ■表面活性係数としての特定のBOD ・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。 ・処理の関数としてのsBOD 	<ul style="list-style-type: none"> 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。 ・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。 ・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。
			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							
			<p>・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</p>									
										<p>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 μ 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 μ mol TEUs m⁻²)であった。</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
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(Ca²⁺と Mg²⁺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%CO₂、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%CO₂ 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%CO₂)</p> <p><試験方法> ■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 5×10⁵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⁻¹(D バンド)、1,507cm⁻¹(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 エンナノリボン 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 H₂SO₄(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"> Henrietta Lacks cells (HeLa) National Institute of Health mouse fibroblast cells (NIH-3T3) Sloan Kettering breast cancer cells (SKBR3) Michigan cancer foundation -7 breast cancer cells (MCF7) <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%CO₂ 環境で培養。</p> <p>■試験方法</p> <ul style="list-style-type: none"> 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 リソソームの健全性の細胞生存率測定及び Neutral red 解析 SKBR3、MCF7、HeLa の細胞死亡率測定及び Trypan blue 解析 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 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。 	<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"> ・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。 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。 ・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。 ・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。 ・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。

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"> ・グラフェン酸化物(GO) 入手元: Cheap Tubes Inc., (USA) ・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。 <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"> ・正常ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC) 入手元: Lonza Walkersville Inc. (USA) ・ヒト骨肉腫細胞株(MG-63) 入手元: ATCC ・ヒト皮膚細胞(HaCaT) 入手元: ATCC <p>■培養方法</p> <ul style="list-style-type: none"> ・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⁻¹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。 ・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⁻¹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。 ・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⁻¹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CO₂大気環境下で培養器内に37°Cで保った。 <p>■試験内容/方法</p> <ul style="list-style-type: none"> ・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。 ・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 ・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 	<ul style="list-style-type: none"> ・GOS1およびGOS2は、10 μg/mLの用量で強い毒性を示した。 ・RGOS1およびRGOS2は、GOS1およびGOS2より弱い毒性を示した。 ・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。 ・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。 <p>■サイズ依存的細胞毒性</p> <ul style="list-style-type: none"> ・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うる。 ・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。 ・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。 <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"> ・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。 ・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。 ・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。 	<ul style="list-style-type: none"> ・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。 ・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。 ・毒性は細胞中のROS生成の誘発によりもたらされた。 ・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。

			<p>解し観察。AFM で測定。</p> <ul style="list-style-type: none"> 細胞内 ROS レベルの測定 濃度 10 μg/mL の HUVEC を 24 時間対象物質にばく露し、H2-DCFDA で染色。 FACS, 共焦点顕微鏡検査 特異的に還元した RGO の細胞毒性評価 MTT 解析、LDH 解析 HUVEC 内の DNA 損傷分析(濃度 10 μg/mL、ばく露期間:24h) コメット解析 	<ul style="list-style-type: none"> 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。 ■酸化ストレスマーカー遺伝子および DNA 損傷の発現 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。 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。 二次元構造の GO も、10 μg/mL の濃度で、DNA 損傷を誘発する可能性がある。 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。 	
--	--	--	--	---	--

【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 ₂ 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 ² /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 ³ 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 ³ 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 ³) 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 わずかなものであつた。 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 な差は生まれなかつた。 ・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 あつた。(IL-1α<6.23 pg/mL, IL-6<9.80pg/ mL, TNF-α<4.44pg/ mL)。濃度 7mg/m ³ 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 昇は見られなかつた。 濃度 2 mg/m ³ と 7 mg/m ³ 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-Isoprostane では 小凝集体で構成され た 7mg/m ³ 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 されなかつた。	・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 ³ 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 によつて 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(<100nm) 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(TiO₂) 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 TiO₂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、TiO₂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。TiO₂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⁻¹ペニシリン および100 μgmL⁻¹ス トレプトマイシンを含 み、5%CO₂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 μgmL⁻¹)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 μgmL⁻¹)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 μgmL⁻¹)につ れ、TICスペクトルにおいて、L929細胞中のα-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-α-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 μgmL⁻¹)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 μgm⁻¹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 μgmL ⁻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 Environmental 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 ₂ (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 ² g ⁻¹	■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 ⁻¹ 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 ₂ , 気温 37°C環境) ■酸化ストレス測定 ばく露後、 20mmolL ⁻¹ 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 ⁻¹)は、他の群より有意に高い細胞毒性を誘発し、0.1~ 10 μgmL ⁻¹ 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 ⁻¹ を含有する酸化チ タンおよび 1 μgmL ⁻¹ 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 ⁻¹ 混 合物へのばく露では、1 μmL ⁻¹ 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 ⁻¹ 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 ⁻¹ 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 ⁻¹ 酢酸塩単体に比べ、10 μ mL ⁻¹ 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 ⁻¹ の酢酸塩と比較すると、0.01 μmL ⁻¹ 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 ⁻¹)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 ₂ nanoparticles induce dysfunction and activation of human endothelial cells (TiO ₂ 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 ² ■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 ₂ の NF-κB 経路活性誘発検査 EMSA 分析	■TiO ₂ 細胞増殖を阻害 ・TiO ₂ 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 ² 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 ₂ 誘発性細胞死 ・対照細胞と比べ、TiO ₂ 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 ₂ 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 ₂ 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 ² で見られた(対照細胞に比べ 8 倍の増加)。 ■TiO ₂ 誘発性炎症性分子発現 ・TiO ₂ は ROS 生成において、5 μg/cm ² で 7 倍、20 μg/cm ² で 9 倍の上昇を誘発した。TiO ₂ は硝酸塩生成を上昇させ、上昇は 20 μg/cm ² 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 ₂ が NF-κB 核転座を誘発したことがわかった。	TiO ₂ 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 ⁻¹ 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 ⁻¹ ペ ニシリン、50 μg.ml ⁻¹ 、 2mM L-グルタチオン で補填した 4.5g.l ⁻¹ 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 ₂ 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 ₂ -NPs が、直径 100 nm を超える TiO ₂ -NPs より顕著な毒性影 響を示した。TiO ₂ -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 ₂ -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 ₂ -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 ₂ -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 ₂ DCFDA アッセイ(AI ₂ O ₃ 、SiC、SiO ₂ 、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 ₂ -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ままであった。 ■DNA 損傷 ・4 時間のばく露後、どんな TiO ₂ -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 ₂ -A12、-A25、-R20 へのばく露で のみ統計的に有意であったが、TiO ₂ -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 ₂ -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 ₂ -R68 と TiO ₂ -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 ₂ -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 ₂ -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 ₂ -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 ₂ の環境で培養。 <table border="1"> <thead> <tr> <th>濃度 (μg/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±10.34</td> <td>-0.64±0.51</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>314.37±20.41</td> <td>-0.48±0.11</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>397.33±17.48</td> <td>-0.78±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 (μ g/ml)	サイズ(nm)	ζポテンシャル (mV)	1	325.93±10.34	-0.64±0.51	3	314.37±20.41	-0.48±0.11	10	397.33±17.48	-0.78±0.05	・濃度依存的ナノ TiO ₂ 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 ₂ 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 μ g/mL で、ナノ TiO ₂ 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 ₂ 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 ₂ は、正電荷の原子核(%)により判明したとおり、1 および 3 μ 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 μ 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 μ 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 ₂ ばく露に反応し ATM/Chk2DNA 損傷反応経路を活性化、ナノ TiO ₂ の濃度上昇とともに ATM リン酸化が増加し、3 および 10 μ g/mL で有意な増加を示した。	ナノ TiO ₂ 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 (μ g/ml)	サイズ(nm)	ζポテンシャル (mV)																
1	325.93±10.34	-0.64±0.51																
3	314.37±20.41	-0.48±0.11																
10	397.33±17.48	-0.78±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 ₂ 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 ₂ 、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 ₂ 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 ₂ 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 ₂ 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 ₂ 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 ² 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 ₂ NPs に対しては、1~20 μg/cm ² 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 ₂ 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 ² で 121 ± 6pg/mL、2.5 μg/cm ² 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 β -galactosidase (lacZ) gene α -complementat ion as a novel approach for assessment of titanium oxide nanoparticles induced mutagenesis (β ガラクトシダー ゼの α -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 ₂ 、CaCl ₂ 、 X-gal、IPTG を Sigma Chemistry 社(USA) から入手	■試験細胞・遺伝子 ・大腸菌 DH5 α ・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 α) 宿主細 胞生存率と形質転 換。 コロニー解析法 ・Lac ⁺ 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 μ g/mL の濃度で 6 時間 TiO ₂ -NPs で処理した E. coli DH5 α 細胞には、コロニー形成能力向 上が見られた。TiO ₂ -NP で処理した細胞の生存能力(%) が、濃度 5 および 50 μ 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 μ g/mL の濃度範囲において、 TiO ₂ -NPs での処理した pUC19 の DNA を適切(lacZ-)な E. coli DH5 α 宿主細胞の中に移した。 ・TiO ₂ -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 ₂ -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 ₂ -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 ₂ -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 α 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 ₂ 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 ³ 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 ³ 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 assay では、ナノ TiO ₂ 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 ₂ (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 ₂ 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 ³ のナノ TiO ₂ 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 ³) のナノ TiO ₂ (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 ₂ 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 ₂ -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 ₂ -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 ₂ -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 ₂ -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 ₂ -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 ₂ -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 ₂ -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 ₂ -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 ₂ -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 ₂ -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 ・TiO₂^{P25-70} サイズ: 74nm ・TiO₂^{P25-130} サイズ: 133nm ・TiO₂^{P25-300} 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。 ・TiO₂^{P25-70} 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。 ・TiO₂^{P25-70} 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 TiO₂^{P25-70} 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 TiO₂^{P25-70} 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 ₂ 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 ₂ (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 ₂ 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, (http://www.particleandfibretoxicology.com/content/9/1/3)	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⁻¹) 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≤100nm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≤30nm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≤300nm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、≤300nm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、dH₂O 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%CO₂ 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/cm²(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/cm²(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 SiO₂ 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、SiO₂ 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、SiO₂ 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>・SiO₂ 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>・SiO₂ 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)	<p>■非晶質シリカナノ粒子</p> <p>NM-200 粉体形状 NM-203 粉体形状 NRT-808 調製濃度: 1.69mg/mL</p> <p>NRT-817 調製濃度: 1.53mg/mL</p> <p>NRT-820 調製濃度: 1.54mg/mL</p> <p>NRT-944 調製濃度: 5mg/mL</p> <p>直径: 15nm-300nm</p>	<p>■マウス線維芽細胞(Balb/3T3)</p> <p>入手元: Hatano Research institution (Japan)</p> <p>■培養方法</p> <p>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。</p> <p>■細胞毒性評価</p> <p>MTT 試験、CFE 解析</p>	<p>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。</p> <p>■Cell Transformation Assa(CTA)による細胞形質転換試験</p> <p>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。</p> <p>■小核試験による遺伝毒性試験</p> <p>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。</p>	<p>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。</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
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)	■対象物質 ・CL コロイド状シリ カ (LUDOX) 入手元: Sigma-Aldrich Co. サイズ:21nm 30wt% in H ₂ O ・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 ₂ O	■試験細胞 ・マウス線維芽細胞(3T3-L1) 入手元:American Type Culture Collection (ATCC) ・ヒト線維芽細胞(WI-38) 入手元:European Collection of Cell Cultures (ECACC) ■保管方法 ・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。 ■試験方法 ・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 ³ cells/well ,3T3-L1)(4 × 10 ³ 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。 ・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。	■細胞生存率・細胞毒性反応評価 ・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。 ■LDH 活性検査結果 ・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(>100 μ g/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。	・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。 ・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。 ・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。

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、NH₄-4 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 SiO₂ 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>■SiO₂ 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>・SiO₂ NPs の有無にかかわらず、1 および 50 mg/L の濃度の SiO₂ 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>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>・SiO₂ 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 SiO₂ 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 SiO₂ 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 SiO₂ 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 SiO₂ 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 SiO₂ 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"> •SiO₂ 12nm(Aerosil 200) (Evonik 社, Germany) •SiO₂ 25nm (own synthesis) •Fe₂O₃ 20-40nm (NanoArc) (own synthesis) •TiO₂ 5nm •TiO₂ 32nm (AQLfa Aesar 社, Germany) •TiO₂ 20nm(own synthesis) •TiO₂ 40nm(own synthesis) •CB14nm (Printex 90) (Evonik 社, Germany) <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"> •A549 •RAW264.7 <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%CO₂ の環境で培養。</p> <p>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 SiO₂-, TiO₂-, Fe₂O₃ 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"> •DLS 測定値は、血清の非存在下では、SiO₂-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。 <p>■NP の取り込み</p> <ul style="list-style-type: none"> •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 は検出されなかった。 <p>■NP の細胞毒性</p> <ul style="list-style-type: none"> •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 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 に関しては、双方の細胞膜においてシリカ NP 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 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。 •Fe₂O₃-NP ないし TiO₂-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 の異なる毒性も明らかであった。 <p>■NP 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"> •購入した SiO₂-NP および程度は劣るが自作の SiO₂-NP は、血清、特にマクロファージにおける、HO-1 および γ GCLC の発現量を増加させたが、自作の TiO₂-NP および Fe₂O₃-NP 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。 •購入した SiO₂-NP および自作の SiO₂-NP 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、TiO₂-NP および Fe₂O₃-NP は、血清の非存在下で、特に肺上皮細胞において、TNF-α 発現を誘発した。それにもかかわらず、SiO₂-NP 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、TiO₂-NP および Fe₂O₃-NP は誘発させなかった。 •従って、TiO₂-NP および Fe₂O₃-NP 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-α を非常に選択的に誘発した。それとは対照的に、シリカ NP 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。 	<ul style="list-style-type: none"> •シリカ NP 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-α、IL-1β、IL-6、IL-8 などの発現増加からもわかるように、シリカ NP は炎症反応を生じさせた。しかし、酸化鉄 NP ないしチタニア NP 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-α mRNA とマクロファージの iNOS のみを誘発した。 •特筆すべきは、たとえばシリカ NP が ROS 濃度を上昇させず最も毒性の高い NP 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 は明らかに ROS 量を増加させた。

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
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 ₂ 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 ₂ 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 ² 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 ²)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"> ・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 ・ROS 産出測定 DCFH2-DA を基質として使用。250 μM TBHP を対照群として使用。 	<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"> ・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。 ・THP-1 細胞(165%±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。 	
--	--	--	---	--	--

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 ₂ -induc ed decrease of PARP-1 mRNA expression ナノ SiO ₂ 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 ₂ 粒子の濃度上昇に伴う、 ナノ SiO ₂ 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 ₂ 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 ₂ 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 ₂ 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 ₂ 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 ₂ 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 μg/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 μg/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 μg/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 μg/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 μg/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 μg/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 μg/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 μg/mL のシリカ NPs で培養した細胞には、37°Cで24時間 10 μg/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 ₂ 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 H₂O 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 H₂PtCl₆ 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%CO₂ 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 O₂-お よび H₂O₂ 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>	<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。</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
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:>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 ■Ca²⁺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 Ca²⁺の上昇を誘発し、その一方で、PtNP は Ca²⁺を有意に低下させた。さらに、PtNP は、各細胞の Ca²⁺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 Ca²⁺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"> ・プラチナナノ粒子 ・パラジウムナノ粒子 <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"> ・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 ・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 ・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 	<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。H₂O₂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"> ・調合した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。 ・調合したPtナノ粒子は、H₂O₂をあまり分解しなかったが、H₂O₂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、H₂O₂をはるかに急速に分解した。 ・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。 ・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。 ・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H₂O₂もあまり分解しなかった。 	<ul style="list-style-type: none"> ・調合したPtナノ粒子は、VCやH₂O₂の分解に対してはほぼ不活性であった。 ・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。 ・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。 ・Ptナノ粒子は、酸化変質しH₂O₂と反応してもHOを生成しないため、安全に使用できる。

【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 ₁ 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, http://www.particleandfibertoxicology.com/content/9/1/23	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 μM ■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 μM 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 μM 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 μM 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 μM 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 μM 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"> ・金コロイド懸濁液 入手元: British Biocell International (UK) サイズ: 2, 20, 200nm ・シリカナノ粒子(Levasil) サイズ: 15, 55nm 入手元: HC Stark (Germany) ・DC12 石英粉塵粒子 サイズ: 1 μm 入手元: Dorentrup Quartz GmbH & Co. KG (Germany) <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"> ・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 <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"> ・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 	<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%CO₂ 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"> ・In vitro 小核解析 蛍光顕微鏡検査法 ・in vivo コメット/小核解析 ・検尿検査(8-oxodG 検出) ELISA 法 ・肝臓内のアポトーシス測定 TUNEL 解析 ・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 ・プラズマ内の炎症性指標 ・肝臓内と肺細胞組織の金レベル 	<p>■in vitro 小核アッセイ</p> <ul style="list-style-type: none"> ・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。 <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"> ・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った 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。 ・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。 ・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。 <p>■肝臓の組織病理検査</p> <ul style="list-style-type: none"> ・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。 ・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 	<ul style="list-style-type: none"> ・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。 ・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。

			<p>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>		<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-α 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 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 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 μg/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 μ S, 0.007 ppt), 0.16% (14 μ S, 0.01 ppt), 0.8% (34 μ S, 0.024 ppt), .4% (113 μ S, 0.08 ppt), .20% (480 μ S, 0.34 ppt), .100% (2420 μ 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 ゼブラフィッシュ胚 (Danio rerio)</p> <p>・100 μ 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 ・1.2nm 3-MPA-金ナノ粒子の毒性検査 5 つの異なる濃度 (0-50 μg/mL)・6 つの溶液を用いた測定。 ・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 μg/mL の濃度では、ばく露した胚の 100%に、(データなし)。NP は塊となっていたが、依然としてかすかな有害性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(<13%)を上回る死亡や奇形は見られなかった。これは、<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：< 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 μg/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。</p> <p>・ばく露後の胚における金の量の測定 ICP-MS使用</p> <p>・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 μg/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 μg/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 μg/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。</p> <p>(2)取り込みは急速であった。</p> <p>(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)。</p> <p>・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"> ・サイズ: 17.0 ± 1.7nm ・流体力学直径: 36.0 ± 1.7nm ・10%FBS を含んだ RPMI を吸着した後のサイズ: 44.9 ± 0.8nm ・ζポテンシャル: -37.5 ± 6.3mV 	<p>■試験細胞</p> <ul style="list-style-type: none"> ・A549 細胞 ・NCI-H1975 細胞 ・A431 細胞 <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%CO₂ 環境で培養。</p> <p>■試験内容/方法</p> <ul style="list-style-type: none"> ・細胞生存率・細胞毒性測定 MTT 解析、LDH 解析 ・細胞周期分析 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。 ・RNA の検出測定 リアルタイム PCR 解析 ・A549 細胞内の金ナノ粒子の細胞死のメカニズム ATP 測定 	<p>■AuNPs の細胞毒性</p> <ul style="list-style-type: none"> ・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。 ・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。 ・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。 ・1 × IC₅₀ の AuNPs で処理した場合、A549 細胞 ATP 濃度は低下した。3 × IC₅₀ 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。 ・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。 ・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。 ・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。 ・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。 ・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。 	<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"> ・金ナノ立方体 サイズ: 85±15nm ・金ナノ八面体 サイズ: 60±20nm <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"> ・ナノ粒子の特性評価 SEM、TEM、ICP-MS 使 用 ・溶液内でのタンパク質 量測定 BCA 解析 ・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 ・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 	<p>■ナノ粒子特性化</p> <ul style="list-style-type: none"> ・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。 <p>■吸着等温線</p> <ul style="list-style-type: none"> ・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。 ・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。 <p>■タンパク質・ナノ粒子複合体の特性化</p> <ul style="list-style-type: none"> ・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。 ・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。 <p>■等温線滴定量熱測定</p> <ul style="list-style-type: none"> ・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。 	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"> ・金ナノ粒子 ・金コバルトナノ粒子 <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"> ・4 グループ: Negative control, Positive control, 実験グループ(金、金コロイダル) ・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。 <p>■投与方法: 経口投与</p> <p>■実験内容/方法</p> <ul style="list-style-type: none"> ・First-Strand cDNA の合成と RNA 抽出。 遺伝子発現分析 ・雄マウスの骨髓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。 小核試験 ・グルタチオンペルオキシダーゼ活性の検出 ・8-OHdG の産出検査 	<p>■遺伝子発現</p> <ul style="list-style-type: none"> ・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。 ・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。 <p>■小核アッセイ</p> <ul style="list-style-type: none"> ・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、骨髓細胞における MnPCE 形成が増加し、有意な差異は見られなかった。 <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"> ・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。 <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"> ・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。 ・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。 	
--	--	--	--	--	--	--

【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	Mukherjee SG, O'Clonadh N, Casey A, Chambers G Toxicology in Vitro 26 (2012), pp 238-251	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)	■対象物質 銀ナノ粒子 直径:100nm 以下 入手元:Sigma Aldrich Ltd. (Ireland)	■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) ■培養方法 Hacat 細胞:CO ₂ 5%、室温 37℃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 ₂ 5%、室温 37℃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。 ■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)	■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 こしやすいことがわかった。	・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。

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)	<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>■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%CO₂環境で培養。 培養期間: 24時間と48時間</p> <p>■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。</p>	<p>■試験結果</p> <ul style="list-style-type: none"> ・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 AgNO₃ 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。 	<p>・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。</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
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 μ g/plate(TA98、TA1535、 TA1537 および WP2uvrA)および最大 31.25 μ 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 μ g/plate(TA98、 TA100 および TA1537)および最大 250 μ 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 μg/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 μg/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 μg/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 μg/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 μg/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 μg/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 μg/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 μg/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(P ≤ 0.05)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 μg/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 μg/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 μ g/mL において統計的に有意($P \leq 0.05$)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 Nanotoxicology, 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、$0.462 \pm 0.143 \mu\text{g/mL}$ であり、最大値であった。処置 24 時間後に、緩やかな低下($0.233 \pm 0.049 \mu\text{g/mL}$)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 0.304 ± 0.074 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 $0.050 \pm 0.009 \mu\text{g/mL}$ 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 $0.312 \pm 0.080 \mu\text{g/mL}$ 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 $0.044 \pm 0.0080 \mu\text{g/mL}$ に達し、3 日目で $0.016 \pm 0.003 \mu\text{g/mL}$ 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、11.7 ± 1.3 日 で、0.5 mg/kg で処理し た群において、$16.3 \pm$ 2.9 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 (<i>Danio rerio</i>) and <i>Escherichia coli</i> (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) <i>E. coli</i> 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 <i>E.</i> <i>coli</i> 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 ($p < 0.05$)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。AgNO₃ 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>■<i>E. coli</i> 大腸菌における Ag NP および AgNO₃ 毒性</p> <p>・アッセイにより、質量濃度ベースで、<i>E. coli</i> 大腸菌の AgNPs および AgNO₃ 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(nm²/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、AgNO₃ (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 nm²/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>TiO₂</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><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>TiO₂</td> <td>NRCWE001</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>TiO₂</td> <td>NRCWE002</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>TiO₂</td> <td>NRCWE003</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>TiO₂</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 ₂	NM101	7	ZnO	NM110	100	ZnO	NM111	130	Ag	NM300	<20	MWCNT	NM400	30	MWCNT	NM402	30	TiO ₂	NRCWE001	10	TiO ₂	NRCWE002	10	TiO ₂	NRCWE003	10	TiO ₂	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%CO₂ 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-α、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_s 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_s 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 μg/cm²、未被覆 ZnO (NM 110) 7.5 μg/cm²、および被覆 ZnO (NM 111) 15 μg/cm² 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 TiO₂ 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_sC3A 肝細胞 IL-6、TNF-α および CRP 生成への影響 ・C3A 細胞の選択 NM_s へのばく露後、IL-6、TNF-α 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_s 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_s 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 TiO₂ 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 ₂	NM101	7																																					
ZnO	NM110	100																																					
ZnO	NM111	130																																					
Ag	NM300	<20																																					
MWCNT	NM400	30																																					
MWCNT	NM402	30																																					
TiO ₂	NRCWE001	10																																					
TiO ₂	NRCWE002	10																																					
TiO ₂	NRCWE003	10																																					
TiO ₂	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 ₂ 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 ₂ 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 $\mu\text{g/mL}$ 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 α 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。 ・$>10 \mu\text{g/mL}$ 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。 ・$25 \mu\text{g/mL}$ 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。 ・$1 \mu\text{g/mL}$ 未満(例えば 0.01 および $0.1 \mu\text{g/mL}$) 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、$<1 \mu\text{g/mL}$ 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。$>5 \mu\text{g/mL}$ 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($>1 \mu\text{g/mL}$)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"> ・まず、AgNPs が物理化学的特異特性を Ag 原子ないし Ag⁺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⁺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。 ・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。 ・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。

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 ⁺ (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 EC _x 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。

3.ナノマテリアルの安全対策に関わる国際動向調査

3-1.主要国におけるナノマテリアル等利用製品の規制の状況

本項では、主要国におけるナノマテリアルに関する規制、及びナノマテリアル等利用製品（食品、食品容器、医薬品、医療機器等は除く）の上市規制/表示規制に関し、その動向をまとめた。

なお、ここで取り上げたナノマテリアル等利用製品の表示規制（ナノラベリング）については、工業ナノマテリアルに対する不安の解消や“利用者の知る権利”に対応することを目的としたものとした。ナノラベリングと言った場合、製品の性能面をアピールすることを目的としたナノラベリング（台湾、タイ、イランで導入中）もあるが、先進国では導入していないこと、また規制に関わるラベリングではないということから、対象としないこととした。

＜ナノマテリアルの規制動向＞

国名	ナノマテリアルの規制
アメリカ	・EPA が CNT を新規化学物質として TSCA で規制
欧州委員会	・REACH 改正によりナノマテリアルを明確に規制していく見通し
EU 加盟国	＜フランス＞ ・ナノマテリアルの届出義務化（2013 年 1 月 1 日発効）
カナダ	・環境省が多層 CNT を有害性が疑われる新規化学物質として届出の義務
オーストラリア	・NICNAS において新規ナノマテリアルの届出義務化
韓国	・上市規制なし
中国	・上市規制なし

＜ナノマテリアル等利用製品の規制動向＞

国名	NM 等利用製品の上市規制	NM 等利用製品の表示規制
アメリカ	・上市規制なし	・表示規制なし
欧州委員会	・2013 年 7 月 11 日施行の改正化粧品規則により、ナノマテリアルを含む含有成分の事前登録、化粧品安全報告書の提出が義務化。	・改正化粧品規則では、成分にナノマテリアルが含まれる場合、製品の成分名称において(nano)と表記しなければならない。
EU 加盟国	・各国固有の上市規制なし	・各国固有の表示規制なし
カナダ	・上市規制なし	・表示規制なし
オーストラリア	・上市規制なし	・表示規制なし
韓国	・上市規制なし	・表示規制なし
中国	・上市規制なし	・表示規制なし

その他		<ul style="list-style-type: none"> ・ニュージーランドの環境保護庁 (EPA) は化粧品グループ基準を見直し、2015年7月1日から、ニュージーランドで売られる化粧品のナノ成分のラベリングを義務付け。 ・ISO/TC229のWG3で、TS13830(ナノラベリング規格)を審議中。
-----	--	---

(1) アメリカ

化学物質の規制は、環境保護庁(EPA)が所管する有害物質規制法(TSCA)によって対応しており、TSCA インベントリーに掲載されていない化学物質は、新規化学物質として上市前届出(PMN)が義務化されている(つまり、TSCA インベントリーに掲載されている物質が既存化学物質)。TSCAにおける新規化学物質の定義は、「既存化学物質の中に、同じ分子的同一性を持つものがない」ということであり、物質サイズは既存か新規かに関与していない。そのためカーボンナノチューブ(CNT)やフラーレンは、既存のカーボン物質と分子構造が異なるため新規化学物質となるが、例えば酸化チタンや銀などは既存のバルク物質と分子構造が同一なため、新規化学物質に定義されず、PMNは不要である。

また、TSCA 第5条 a 項に基づき公布された規則として重要新規利用規則(SNUR)があり、これはEPAが特定の化学物質についてリスク評価を行った結果、その物質に関するリスクを正當に評価する十分な情報がなく、かつ、人や環境に不当なリスクをもたらす恐れがある又は相当な量の環境への放出もしくはばく露の恐れがある、と判断した化学物質の製造、輸入等を制限・禁止する規則である。ナノマテリアルとしては、CNTがSNURの適用物質となっており、PMNによる上市規制がとられている。

なお、EPAは、2013年1月8日付官報に掲載した規制アジェンダの中で、提案段階ルールとして「ナノスケール材料-ナノスケール材料として製造・輸入・加工された化学物質-報告と記録管理の要求-重要新規用途ルール」を掲載した。EPAの提案ルールの内容は、「TSCA 第5条 a 項に基づくSNURで、ナノスケール材料を製造・輸入・加工する者は少なくとも90日前にEPAに用途の届出を行う規制」と「TSCA 第8条 a 項に基づき、ナノスケール材料の生産量、製造/加工方法、ばく露、排出情報、入手可能な健康/安全データの報告と記録管理を要求する」ということであり、これらの情報に基づいて、EPAは評価を行い、制限や禁止を含む対応を行うとするものである。米行政予算管理庁(OMB)ではEPAの上記規制提案の審査を2013年7月までに完了する予定であり、この規制が適用された場合は、CNTに限らず全てのナノマテリアルが規制対象となることから、その動向が注目される。

その後、2013年2月28日に、EPAからナノマテリアルを含む37物質に対するSNURの提案が出された。ナノマテリアルとしては、多層カーボンナノチューブ(MWCNT)が2物質、多層カ

ーボンナノファイバー(MWCNFs)が 12 物質の計 14 物質であり、4 月 26 日までパブリックコメントを受け付けることとなっている。

しかし、EPA がこの規制を導入するに当たり、“ナノスケール材料”の定義をどうするのかといった課題が残る可能性がある。

ナノマテリアル等利用製品の上市規制、表示規制については、現在のところの製品分野においても制定されていない。現在のナノマテリアルの主力用途であり、ヒトへの影響が強いと目されることを要因に EU で規制が始まろうとしている化粧品においても、米国の化粧品規制に関する法律である「連邦食品医薬品化粧品法(FD&C 法)では、化粧品やその成分については着色添加物を除くと、食品医薬品局(FDA)への上市前承認が義務付けられていないのが現状であり、FDA 自身はナノマテリアルに対する特別な規制は不要という立場をとっていることから、化粧品に対する上市規制や表示規制は現時点ではない。

なお、化粧品については、FDA ではその安全性を確保する責任は製造業者や流通業者にあるとする考えであり、製造業者や流通業者に向け、ナノテクノロジーを利用した化粧品の安全性を評価するための手引き案が 2012 年 4 月に FDA より出されている。

この化粧品手引書案では、化粧品中のナノマテリアルの安全性を評価するために考慮すべきポイントが挙げられており、有害性評価においては、ナノマテリアルを溶解性と不溶性に分けて論じられている。リスク評価は、溶解性の成分については重量ベースで問題ないが、不溶性の成分については、数や表面積やそれらの分布といった他の指標も必要になるかもしれないことが指摘されている。また、ICCVAM(米国の動物実験代替法に関する多省庁の共同検討組織)や ECVAM(欧州動物実験代替法バリデーションセンター)による妥当性の検証が行われた in vitro 試験法、すなわち代替試験法についても紹介され、下記の 5 種類が挙げられている。

- 1.皮膚刺激性や腐食試験のための EpiskinTM や EpidermTM といった再構築されたヒトの皮膚
- 2.紫外線(UV)吸収物質に適用可能な 3T3 NRPT を介した光毒性試験(3T3 線維芽細胞ニュートラルレッド取り込み光毒性試験)
- 3.皮膚吸収のための拡散細胞におけるヒト/ブタ皮膚
- 4.眼球刺激のための、牛摘出角膜を用いた眼刺激性試験代替法(BCOP 法)とニワトリ摘出眼球を用いた眼刺激性試験法(ICE 法)
- 5.3 つの推奨される試験法のバッテリーを用いた遺伝毒性試験:細菌を用いた復帰突然変異試験、in vitro 哺乳動物細胞遺伝子変異試験あるいは in vitro 哺乳動物染色体異常試験、in vitro 小核試験

安全性評価において、考慮すべき重要なファクターとして勧告されている項目は以下のとおりである。

- ・物理化学的特性
- ・最終製品のものに対応した毒性試験条件下でのナノマテリアルの凝集状態と粒径分布

- ・不純物
- ・潜在的な製品ばく露レベルと、最終製品中でのナノ粒子の凝集可能性
- ・in vitro と in vivo 試験のための用量設定
- ・化粧品成分とそれらの不純物に関する in vitro と in vivo の毒性データ、皮膚浸透、刺激性（皮膚と目）、感作性研究、突然変異性／遺伝毒性研究
- ・化粧品成分や最終製品を、ヒトボランティアに対して制御された条件下で試験する臨床試験

ちなみに、これはあくまでも手引きであり、製造業者や流通業者に対して法的拘束力を持つものではない。

(2) 欧州委員会

EU では化学物質規制である REACH(化学物質の登録、評価、許可、制限に関する規則)において、包括的な化学物質規制を行っている。

REACH 規制は 2007 年 6 月に施行され、このことにより新規、既存を問わず、欧州域内において年間の製造量または輸入量が 1 トンを超えている化学物質は欧州化学物質庁(ECHA)への登録が必要となった。製造・輸入事業者は、登録のためにその化学物質に関する情報を提出する必要があり、安全性が評価されていない物質を含む製品は販売ができなくなっている。

REACH では、基本的な化学物質管理として、日本や多数の国が採用しているような既存化学品に含まれていない新規化学物質を規制するという考え方ではなく、先のように新規/既存問わず事前登録を必須とするものであるが、物質の分類を「段階的導入物質」と「非段階的導入物質」の 2 つに区分している。

[段階的導入物質]

欧州届出化学物質リスト(EINECS)か NLP(No-Longer Polymers)のリストに収載されているか、もしくは EU 内で製造されたことのある既存物質であるが、過去 15 年間に全く市場に回っていない物質。

[非段階的導入物質]

REACH の発効以前に使用されたり登録されたりしたことのない全く新しい物質。

段階的導入物質の REACH 登録期限は以下の通りである。

< 予備登録した段階的導入物質の登録期限 >

・2010 年 11 月 30 日まで

年間 1t 以上の CMR 物質(発がん性、変異原性、生殖毒性を有する物質)

100t 以上の水生生物毒性物質

1,000t 以上

・2013 年 5 月 31 日まで

年間 100t 以上

・2018 年 5 月 31 日まで

年間 1t 以上

なお、非段階的導入物質については、年間 1 トン以上製造または輸入されるものは、ECHA に登録した後しか市場に出せないこととなっている。

このように REACH による化学品規制が行われているが、REACH にはナノマテリアルを明示的に参照する規定はなく、ナノマテリアルは REACH における物質の定義[自然の状態、あるいは何らかの製造過程を通じて出来た化学元素とその化合物]によってカバーされる形となっている。

欧州委員会では、ナノマテリアルも REACH 規制によって適正に規制できるとの立場をとっているが、ナノマテリアルには流通量が少ないものもある。流通量が少ないものは 2018 年まで規制対象にならないか、あるいは年間 1 トン未満であれば 2018 年以降も全く規制を受けないこととなり、課題も多いことが指摘されている。

こうした中、2012 年 6 月 8 日に ECHA がナノマテリアルの EU 定義を採用し、REACH への登録者に対し、EU 定義に沿ってナノマテリアルを登録することを奨励することが発表された。ECHA では 2013 年にガイダンスを開発し、REACH 付属書の改定を予定しており、REACH 規制の改正によってナノマテリアルをより明確に規制していく見通しである。

EU におけるナノマテリアル等利用製品の上市規制/表示規制については、2013 年 7 月から施行される改正化粧品規則がある。

EU では 1976 年にスタートした化粧品指令によって、化粧品の成分規制を行っており、何度かの改正を経て現在に至るが、2013 年 7 月 11 付けで新たな化粧品規則が施行される。今回改正された化粧品規則では、新たに「化粧品安全報告書」の提出が義務付けられるもので、化粧品メーカーと輸入業者は、上市前に化粧品の製造法、含有物質、ヒト健康や環境に対する安全性などを報告書に記載しなければならず、使用が想定される人体の部位や頻度、含有物質のばく露量などの詳細を記載することも必要である。なお、「化粧品安全報告書」の提出義務化に合わせ、欧州委員会の健康・消費者保護総局(DG SANCO)によって 2012 年 1 月より開設された「化粧品届出ポータル」への製品情報登録も義務化される。このポータルは、化粧品が新規則に沿って製造、販売されることを欧州委員会にオンラインで報告するためのツールであり、化粧品メーカー等は欧州委員会が提供する認証サービス(ECAS)など 2 か所の Web サイトを通じて、化粧品の名称、販売地域、ナノマテリアルの含有有無などを電子登録する。既に市場に出回っている化粧品については、2013 年 7 月 11 日までに届け出ることが必要である(ナノマテリアルが含まれる製品も含めて)。なお、通常製品の登録期限は上市 30 日前までとなっているが、ナノマテリアルが含まれる製品は、欧州市場で上市する 6 か月前までに登録することが必要で

ある。ナノ物質形状の全ての成分は、成分リスト中に明示することが必要であり、成分名称にかっこ付きで(nano)と表記しなければならないこととなっている。ただし、着色剤、UVフィルター、保存剤として使用されるナノ物質は適用外となっている。

2011年7月に改正 RoHS 指令(有害物質の電気・電子機器への使用を制限するための指令)が官報に掲載されたが、改正に当たっての改正案段階において、①ナノマテリアル(銀ナノ粒子、多層カーボンナノチューブ)を使用禁止物質に加えること、②ナノマテリアルを含む電気電子部品、機器にその含有を示すラベルを貼付すること、が改正案として含まれていた。結果的にこの件は否決され、今回の改正 RoHS 指令には含まれなかったが、次回の改正時には改めて検討課題として掲げられることが確実視されている。

なお、欧州委員会では、2011年10月にナノマテリアルの定義に関する勧告を公表したが、ナノマテリアルの定義を明確に定めた目的の一つとして、ナノラベリングの実現という点が含まれているのも事実であり、EUでは今後化粧品に限らず他の製品分野においてもナノラベリングが進展していくものと見られる。

(3)EU 加盟国

①フランスにおけるナノマテリアル報告制度

フランスのエコロジー・持続可能開発・運輸・住宅省(MEDDTL)は、2012年2月にナノマテリアルの届け出の義務化を定める法案を制定した。本法令は2013年1月1日に発効し、法令中の罰則部分は2013年7月1日に発効するもので、年間100g以上のナノマテリアルの製造、加工、輸入、流通に関わる事業者は、毎年一度の頻度で、量と使用方法に関する情報を含む届出をすることが義務付けられている(データは食品環境労働衛生安全庁(ANSES)が管理する)。届出日は毎年5月1日で、2013年5月1日が第一回目のデータ提出日となっている。ちなみに本法令のナノマテリアルは、欧州委員会が2011年10月公開したナノマテリアルの定義に倣ったものであり、フラーレン、グラフェン、単層CNTが含まれていることが明記されている。(本法令は、欧州委員会のナノマテリアルの定義を適用する初めての規制策)

②ドイツ監督官庁の立場に関する報告文書

ドイツでは、REACH実施に当たっての監督官庁である連邦環境局(BUA)、連邦リスクアセスメント研究所(BfR)、連邦労働保護労働医学局(BAuA)の連名で、「ナノマテリアルとREACH」と題する報告文書が2013年2月にリリースされた。

ここでは、REACHの監督官庁の立場から、ナノマテリアルを規制するためのREACH改正提案がなされており、REACHでは対象外となる1トン未満から規制対象に加えることや、ナノマテリアル特有の必要とされるテスト要件など、具体的な提案内容が提示されている。

(4)カナダ

カナダでは、環境省及び保健省が所管する「1999年カナダ環境保護法」及び同法に基づき制定された「新規物質届出規則(化学品及びポリマー)」により、新規化学物質の届出制度が定められている。国内物質リスト(DSL)に記載されていない物質は、製造または輸入前に届出が必要となっている。

こうした中、ナノマテリアルに関しては、2007年に環境省から、ナノマテリアルが環境保護法の下で届出の対象となるかどうかの基準が示され、「物質のサイズではなく、DSLに記載されているかどうか、独特の構造または分子配列を持つかどうかで決まる」とされている。

その一方で、環境省では、2010年9月に多層CNTに対し「重要新規活動」を適用する告示を出し、年間100kg以上製造または輸入する事業者は、毒性試験データを含めた届出が必要とした。これは、多層CNTを有毒性が疑われる新規化学物質と位置付けていることを意味しており、上市規制の対象となっている。

ナノマテリアル等利用製品の上市規制、表示規制については、現在のところの製品分野においても制定されていない状況にある。

(5)オーストラリア

オーストラリアで化学物質管理を行っているのは、NICNAS(国家工業化学品届出審査機構)であり、AICS(オーストラリア化学物質インベントリー:既存化学物質)をもとに化学物質管理を行っている。AICSに登録されていない物質は新規化学物質となり、輸入/製造する場合は、NICNASに諸データ(SDSを含む)を添えて安全性の審査を要請し、審査証明書を手入れしなければならないが、2011年1月1日からは、AICSに登録されていない物質で、それがNICNASの定義する工業ナノマテリアルである場合には、ナノスケールではない新規化学物質とは異なる手続きが必要となっている。現在はAICSに登録されていない物質が対象であるが、既存化学物質のナノ形態の物質にまで規制を広げることも検討中である。

<NICNASのナノマテリアルの定義>

- ・特異的性質または特定の組成を持たせるため、意図的にナノスケールで生産、製造、または加工された工業用物質。(非意図的に作られた物質は含まれない)
- ・特異的性質とは、ナノスケールではない同一物質には見られないナノスケール形状物質独自の化学的/物理的特性(強度、化学反応性、伝導性など)を言う。
- ・サイズは、1、2または3次元の長さが1~100nmの物質か、ナノ構造体(内部構造または表面構造がナノスケール)の物質。
- ・アグリゲート(一次粒子が強く結合した凝集塊)、アグロメレート(アグリゲートの集合体)はナノ構造体とみなす。

・粒子個数基準のサイズ分布で、10%以上がナノスケールのもの。

ナノマテリアル等利用製品の上市規制、表示規制については、現在のところどの製品分野においても制定されていない。

なお、従来より化粧品のナノラベリング化を求める声が環境 NGO や消費者保護団体より上がっており、それに対して有識者等は「ラベルはすべてのナノマテリアルが一律に健康に悪いと消費者に間違った解釈をさせる恐れがあり、適切ではない」(メルボルン大学の Paul Wright 教授)、「ラベルは消費者の懸念をいたずらに煽るだけ」(公共広告機構(TGA CRP))と反対する意見が大勢を占めていたが、2012年2月に国立計測研究所(NMI)の研究グループによって、'non-nano'表示のサンスクリーンの多くが実際はナノ粒子を使用していたという研究結果が公表されたことにより、2012年6月には消費者協会がナノ表示の義務化を求めるなど、強制的なナノ製品表示制度が必要ではないかという議論が活発に行われているのが現状である。

(6) 韓国

韓国では国内でのナノマテリアルの使用が急増している状況を踏まえ、安全管理のためにも国内の流通量を把握することが必要との判断のもと、2011年にナノマテリアル流通量調査が実施された。しかし、現在までのところ、韓国ではナノマテリアルに関する規制は制定されていない状況にある。また、ナノマテリアル等利用製品の上市規制、表示規制についても、どの製品分野においても制定されていない。

韓国の新規化学物質の規制(届出制度)としては、有害化学物質管理法で対応しているが、約43,000種存在する化学物質のうち、同法で確認しているのは全体の15%にすぎないのが実情である。こうした中、欧州 REACH、日本の化学物質審査規制法(化審法)など、化学物質の登録・評価システムの制定・改正が世界的な潮流となっていることを受け、韓国においても新たに「化学物質登録及び評価等に関する法律」(K-REACH)の制定が進められているところである。

K-REACHは、現時点では国会審議に回っており、2013年5月にも国会で承認される見通しで、2014年1月からの施行が予定されている。K-REACHは、既存化学物質、新規化学物質とも年間1トン以上製造または輸入する事業者課される登録制度であるが、ナノマテリアルに関しては特に規定されておらず、運用していく中で定められていくものと思われる。

ナノマテリアル等利用製品の表示規制は、先の通り既存では存在していないものの、規制に向けての動きは見られている。

2012年2月、韓国の食品医薬品安全庁の食品医薬品安全評価院は、韓国政府による「第1次ナノ安全管理総合計画(2012～2016)」に従って、食品、化粧品等に用いられているナノマテリアルの人体に及ぼす有害性を評価することを目的としたリスク評価指針を策定した。

今回の指針の主要な内容は、①リスク評価の必要性及び目的、②評価の基本原則、③リスク評価の段階別決定の流れ等となっている。

- ・有害評価対象は食品、医薬品、化粧品、医療機器等、食品医薬品安全庁の管理製品に限定。
- ・ナノマテリアルの生産から廃棄まで、すべてのサイクルに対する総合有害性評価を原則として、ナノマテリアルのばく露量に基づき、毒性値(NOEL、BMDL等)を算出。
- ・最終的な人体への有害性判断は事前予防原則に従う安全管理を適用。

具体的取組として、ナノマテリアルのリスク評価を効率的に実施するため、研究ロードマップを作成し、段階別で進める計画である。

<第一段階>

2014年までをナノマテリアルのリスク評価のための「基盤づくり」の時期として以下を実施。

- ①ナノ製品の実態調査
- ②ナノマテリアルの確認・定量分析試験手法調査
- ③消費者へのばく露量情報調査等

<第二段階>

2017年までをナノマテリアルのリスク評価の「活性化」時期として以下を実施。

- ①製品の中のナノマテリアルのモニタリング及びばく露評価
- ②ナノ製品の基準及び規格設定関連研究
- ③リスク評価関連収集情報の統計分析及び検証等

この計画に基づき、2012年は①ナノテクノロジーの応用食品に対する定義及び体系的な分類の作成、②ナノマテリアルのばく露評価のための情報収集、③OECD等国際機関及び外国の現状を反映し、表示制度の導入の必要性を検討、を実施している。

(7) 中国

現在のところ、ナノマテリアルの規制に関しては、有害性の懸念は指摘されつつも、具体的な規制の動きはない状況である。また、ナノマテリアル等利用製品の上市規制、表示規制についても、どの製品分野においても制定されていない。

なお、中国における新規化学物質の登録制度としては、「新規化学物質環境管理弁法」がある。同法は新規化学物質の生産・輸入の管理のために、生産前・輸入前申告登記制度を実施するもので2003年より施行されているが、2010年10月15日より現法に改正された(2010年1月19日公布)。旧法は新規化学物質に対する環境管理を目的としていたが、実際の管理

手法は申告・登録のみで済むことから、登録後の管理がほぼ何も行われていなかった。改正された現法は、環境リスクを管理することを目的とし、欧州 REACH に近い管理手法を採用していることから中国版 REACH とされている。

新規化学物質は、中国環境部化学品登録センター(CRC-MEP)に申告しなければならず、登録完了までは、研究、生産、輸入、加工使用してはならないこととなっている。

<新規化学物質環境管理弁法(中国版 REACH)の概要>

対象物質	「中国現有化学品物質名録」に未収載の物質 (医薬品、農薬、動物用医薬品、化粧品、食品、食品添加剤、飼料添加剤、放射性物質、軍事製品、天然物質等は対象外で、それぞれを管轄する法規制が適用されるが、これらの原料や中間体は本法の適用範囲となる)
申告種類	・申告の種類には、通常申告(年間生産量または輸入量 1t以上)、簡易申告、科学研究備案(科学研究目的で年間生産量または輸入量が 0.1t 未満及び生体毒性試験のためのサンプル使用の場合)がある。
申告内容	<p><通常申告の内容></p> <ul style="list-style-type: none"> ・新規化学物質通常申告表のほか、化学品分類、警告標識および警告説明安全規定など国家基準に基づいた分類、ラベルおよび化学品安全技术説明書(CSDS)を添付する。 ・リスク評価報告には、申告物質の有害性評価、ばく露予測、リスク制御措置などの内容を含む。 ・物理化学特性、毒性学と生態毒性学的特性の測定報告及び測定機構の資格証明を添付する。
登録後管理	<ul style="list-style-type: none"> ・申告・登録に係る資料は 10 年以上保管 ・一般申告して登録された場合、初回生産活動から 30 日以内に、登録センターに初回活動に関する報告書を提出 ・毎年 2 月 1 日以前に、前年度の新規化学物質の生産および輸入状況、次年度の計画を登録センターに報告

3-2.主要な学会、シンポジウム等におけるナノマテリアルの安全性、ばく露、試験法等に関する議論の状況

主な学会、シンポジウムとして、「NANOSAFE2012」(フランスにて開催)と「第6回ハーラングローバルセミナー&シンポジウム」(日本にて開催)、「nano Week 2013」(日本にて開催)に参加し、情報収集を行った。

(1)NANOSAFE2012

1)学会、シンポジウムの概要

ア)名称

NANOSAFE2012

(Third International Conference On Safe Production and Use Of Nanomaterials)

イ)開催期間、開催場所

開催期間:2012年11月13日(火)~15日(木)

開催場所:MINATEC(フランス グルノーブル)

ウ)参加者数

参加人数:約370名

エ)プログラム

セッション名	講演件数
オープニング講演	5件
セッション1:ばく露評価	
1a.職場と放出の研究	4件
1b.方法論(ばく露評価の方法)	5件
1c.ばく露評価ツールと職場以外でのばく露	4件
セッション2:工業ナノ粒子の検出、識別	
2a.合成、エアロゾル化したナノ粒子の追跡	6件
2b.ナノ粒子の生物学への応用	5件
2c.水溶液中のナノ粒子の検出、測定	5件
2d.大気中のナノ粒子の検出、測定	4件
セッション3:毒性	
3a.ナノ粒子の生体内での変化、分解	9件
3b.ナノ粒子と生物の相互作用モデル	13件
3c.ナノ粒子の転移、障壁	13件

3d.生体組織、環境	8 件
セッション 4:環境相互作用	
4a.ナノマテリアルの移動、変質	6 件
4b.生分解/生物との相互作用	7 件
4c.ナノマテリアルの生物学的影響	2 件
セッション 5:ナノマテリアルの放出	
5a.環境ストレスによる放出	6 件
5b.機械ストレスによる放出	8 件
5c.その他一般的な放出メカニズム	6 件
セッション 6/7:安全な工業生産と保護技術	
6a.安全な工業生産	4 件
6b.保護技術	3 件
セッション 8:ライフサイクル分析、リサイクル、廃棄物管理	10 件
セッション 9:倫理問題、社会問題	5 件
セッション 10:商業機器	6 件
セッション 11:労働安全衛生のためのリスクマネジメント	9 件
セッション 12:ナノ製品の規制及び標準化	
12a.規制	5 件
12b.標準化	4 件
セッション 13:サテライトミーティング	
13b.TRIMATEC	6 件
*TRIMATEC(フランスの地域共同ネットワーク)参加企業による講演	
	168 件

注)上記の通常講演以外に、パネルディスカッション 3 件(管理、毒性、市民社会の意見)、ポスターセッション 109 件が実施された。

オ)NANOSAFE2012 概要

NANOSAFE は、フランス グルノーブルにおいて隔年で開催されており、今回は 3 回目の開催となった。前回の 2010 年開催時は、3 日間での講演数が 86 件(オープニングセッション、ポスターセッション、サテライトミーティング除く)であったのに対し、今回は 157 件(同)と大幅に拡大しており、各所においてナノマテリアルの安全利用についての検討、研究が年々拡大している様子が窺える内容であった。

今回の講演内容の傾向を見ると、上記のように発表件数としては毒性に関するテーマが 43 件と最も多く、ナノ粒子の測定関係とナノマテリアルの放出関係がそれぞれ 20 件で続く状況であった。毒性関係とナノマテリアル測定関係は、前回は講演件数の多いセッションであり、ナノマテリアルの持つ毒性の有無の確認や、ナノマテリアルの規制あるいは労働安全を図る上での統一的な

指標を作るためのベースとなる測定手法の確立が、継続的な重要テーマとなっていることがわかる。

なお、前回と今回ではセッション区分が微妙に異なるが、セッション区分(講演カテゴリー)ごとの講演件数の傾向を簡単に整理すると以下の通りである。

セッション(カテゴリー)	NANOSAFE2010	NANOSAFE2012
ばく露評価関係	10	13
ナノ粒子の測定関係	14	20
毒性関係	27	43
環境への影響関係	4	15
ナノリリース関係	5	20
安全な工業生産、保護技術関係	9	7
ライフサイクル関係	2	10
商業製品・機器関係	8	6
規制、標準化関係	0	9
その他	7	14
合計	86 件	157 件

注) オープニングセッション、ポスターセッションを除く

ナノマテリアルの安全確認や安全保障に対する研究の高まりから、各カテゴリーとも相対的にテーマ数が増加する形となっているが、特に毒性、環境への影響、ナノリリース、ライフサイクル関係のテーマ数が増えている。これは主催者側の意向もあろうが、ナノマテリアルの安全性に関しては不確実であるという現状、早急に取り組まねばならないテーマの傾向を示していると言える。

なお、規制・標準化関係については、前回では2テーマほどの講演が予定されていたものの、実際の発表は行われなかった。今回は規制・標準化関係で9件の講演があったが、欧州 REACH の運用が本格的に開始され、ナノマテリアルをどう規制していくか、などの課題が明確化してきたことの表れと言えるであろう。

2) ナノマテリアルの安全性、ばく露、試験法等に関する議論の概要

本学会での講演のうち、安全性、ばく露、試験法等、ナノマテリアルの安全対策を検討する上で重要な講演についての概要を以下に示す。

a) STUDY OF NANOPARTICLES LOCALIZATION IN ORGANS AND TISSUES OF RATS AFTER INTRAPERITONEAL AND INTRAGASTRICAL ADMINISTRATION

Boris B. Dzantiev, Sergey G. Klochkov, Olga D. Hendrickson, Anatoly V. Zherdev, sergey o. Bachurin(A.N, Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences)

腹腔内および胃内投与後のラットの臓器及び組織中のナノ粒子の局在に関する研究

生物の器官や組織中に局在するナノ粒子(NP)の研究は、ナノ粒子のばく露とその生物学的作用の影響に関する情報を提供し、ナノマテリアルの特性評価で基本的な役割を果たすものである。生物におけるナノ粒子の局在に関するデータは、ナノ粒子の生物安全性を評価するためのバックグラウンドとなる。

本研究の狙いは、各種分析手法でナノ粒子にばく露されたラットの臓器や組織に局在するナノ粒子を研究することであり、臓器や組織内でのナノ粒子濃度の測定とともに、ナノスケールの形で存在することを確認するというのも目的とした。ナノ粒子の局在を検出するため、2 セットの試験方法を用いた。一つ目の試験セットは、ナノ粒子(例えば酸化チタン)、あるいは分子構造のナノ粒子(C₆₀)の存在を検出するためのものである。この試験セットには、分光光度検出、原子吸光分析法(AAS)、動的光散乱法(DLS)、酵素結合免疫吸着法(ELISA)を用いた高速液体クロマトグラフ(HPLC)が含まれている。二つ目の試験セットは、顕微鏡技術によるものである。これにより、ナノ粒子のナノスケールでの形を証明し、臓器や組織の機能的、形態学的状態を評価した。

生物学的材料として、臓器や組織のスライスとホモジネートの 2 つのタイプを使用した。ラットの急性毒性(腹腔内)及び慢性毒性(胃内)評価のために投与する材料としては、OECD が推奨している炭素系ナノ粒子(フラーレン C₆₀)、金属ナノ粒子(直径の平均が12nmの銀)、金属酸化物ナノ粒子(直径の平均が40nmの酸化チタン)を使用した。ナノ粒子の測定に当たり、臓器や組織の前処理として最も効果的な手法を選択した。実験動物を使ったナノ粒子の毒性用量の決定に関する実験(その特異性とサイズに関して)では、胃への投与による致死量の値は、しきい値 5,000 mg / kg を超えることが示された。

今回提案した手法は、ばく露されたラットの臓器や組織のナノ粒子分布を定量的に特長づけるためのツールとして有効である。急性および慢性の実験条件において用量とばく露期間に応じて、ナノ粒子の局在確認を行った。それにより、HPLC または HPLC-MS によるアプローチは、その高い感度と精度で生体内での C₆₀ の存在を特定するための最適な手法であることを示した。銀ナノ粒子とナノ酸化チタンの測定には、AAS を選択した。HPLC、原子吸光法、ELISA 法、顕微鏡法と

いう試験セット全体により、臓器、組織及び体液中のナノ粒子の分布に関するデータを取得することができた。

観察の全期間を通し、死亡した動物はおらず、毒性の臨床徴候も観察されなかった。解剖結果では、内部の臓器を観察しても変化はなかった。今回の急性および慢性の実験では、ナノ粒子が、様々な臓器や組織(肺、肝臓、腎臓、血液、脳、脾臓、リンパ節、腸、など)に浸透、蓄積されていた。ルチル型及びアナターズ型酸化チタンナノ粒子は、小腸の腸内だけではなく、ナノ粒子を導入した場所(リンパ節、腎臓、肝臓、脾臓)から離れた臓器でも発見された。酸化チタンは、明らかに単一のナノ粒子として、小規模または大規模な集合体の形で細胞質に存在していた。臓器内での銀ナノ粒子の分散やその形状や大きさの違いによる規則性は、異なる投与量によって比較した。脳と卵巣を除き、試験した全ての臓器で、大規模で単一の銀粒子(50-200nm 程度)とその集合体が検出された。小さな結晶の銀ナノ粒子(10-20 nm)は、脾臓および腎臓で検出された。銀粒子および凝集体の大規模なクラスタは、肝臓に存在していた。フラーレン C₆₀ は臓器内で結晶を形成し、大規模なクラスタとして蓄積されていた。大規模な C₆₀ クラスタは、腸間膜、腹腔内、脾臓および肝臓(解毒と免疫の器官)で見つかった。フラーレンは、エンドソーム内の細胞、核の脂肪滴で検出された。

今回開発した試験手法は、生体内での様々なナノ粒子の局在を特定するための有用なツールと考えることができる。この研究は、連邦目標プログラム“ロシア連邦におけるナノ産業インフラ開発(2008~2011年)、及び EC の第7次フレームワークプログラムである MARINA プロジェクト(契約番号 236215)のサポートによって実施されたものである。

b) ASSESSMENT OF DIFFERENT METHODS STUDYING THE IMPACT OF CARBON NANOMATERIALS ON PLATELET FUNCTION.

Julie Laloy, F. Mullier, S. Robert, L. Alpan, J. Mejia, J-P.Piret, N. Bailly, S. Lucas,
B. Chatelain, O.Toussaint, B. Masereel, S. Rolin & J-M. Dogné (University of Namur, Belgium)

血小板機能に及ぼすカーボンナノマテリアルの影響研究に対する異なる手法の評価

本件の目的は、ナノ粒子の一次止血における潜在的な影響を測るべく、普遍的かつ高速、正確、信頼性が高く、また毒物学に関連のある臨床前のスクリーニングテストを検証することである。

評価対象としては、医療用として利用が見込まれるカーボンブラック(CB)、フラーレン(C₆₀)、単層カーボンナノチューブ(SWCNT)、多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の4種を検証した。また、血小板機能に及ぼす粘着、活性、凝集などの影響を研究するうえで、光透過測定(LTA)、全血インピーダンス凝集測定(マルチプレート)、血小板機能分析器(PFA-100)、Impact-Rの4つの現存する定量分析を行った。さらに、定性分析方法として、障害や機能的影響を分析するために、走査電

子顕微鏡もしくは透過電子顕微鏡も使用した。

分析の結果としては、LTAのような光学的手法により検出できるC₆₀、CB、SWCNT、MWCNT、の最大濃度はそれぞれ、500、10、500、100µg/mlであった。全血インピーダンス凝集測定はインピーダンス測定とナノ粒子が負(マイナス)に帯電する相互作用の理由から、適した方法ではないとみなされた。Impact-RではC₆₀、CB、SWCNT、MWCNTにおいて250、500、500、250µg/ml濃度まではそれぞれの干渉がなく、計測できることがわかった。その上、人間の血液の粘性によく似た牛血清アルブミン7.4g/l(最終濃度)を付加することで、C₆₀とMWCNTの干渉が解消することがわかった。

結論としては、Impact-Rと電子顕微鏡を用いた方法が、ナノ粒子が血小板機能与える影響を評価するうえで、最も適しているという結果となった。

c) IN VITRO, EX VIVO AND IN VIVO TRANSLOCATION OF TITANIUM DEOXIDE NANOPARTICLES THROUGH THE GASTROINTESTINAL BARRIER, TOXICOLOGICAL CONSEQUENCES

Emilie Brun, Nathalie Herlin-Boime, G. Veronesi, B. Fayard, A-M. Flank, M. Carrière (CEA-CNRS, France)

In vitro、ex vivo、in vivo 実験における二酸化チタンナノ粒子の胃壁移動と毒性の結果

ナノ粒子は、現在、特に食品添加物、食品包装、または栄養補助食品として、食品業界において多くの一般製品に使用されている。中でも、二酸化チタンは白色顔料や光沢付与を目的に食品に使用されている。また、歯磨き粉や日焼け止め、または経口投与薬として日常的に使用する衛生製品にも使用されている。しかし、消化管におけるナノ酸化チタンの影響や、胃腸壁を通じたの転移に関する研究は、あまり進められていないのが現状である。

そこで、胃腸上皮の様々なモデルによるナノ酸化チタンの転移に焦点を当て、シンプルな細胞モデルと共培養モデルによる、試験管培養(in vitro culture)によって胃腸壁の特性を確認した。これらのモデルに対し、アナターゼ型ならびにルチル型ナノ酸化チタンを6~48時間ばく露させた。

ナノ酸化チタンの細胞への取り込みや転移の確認については、透過型電子顕微鏡及びµ-XRF(蛍光X線分析)による元素マッピング、チタン原子の局所構造分析のためのXAS(X線吸収分光法)分析によって行った。実験はex vivoモデルを行ってから、ナノ酸化チタンを経口ばく露させたマウスのin vivoによる検証によって結論を得た。最終的に、消化管の異なる領域において様々な体液に連続的に潜伏するアナターゼやルチル型ナノ粒子をin vitro消化モデル内で評価した。

評価結果は以下の通りであった。

<Ex vivo, in vitro モデル実験結果>

- ・腸組織の末梢部分(それに近い場所)で少量のナノ粒子が検出された。
- ・小腸細胞(M細胞)と腸細胞を経由して、胃腸への少量の転位がみられた。

<In vitro モデル実験結果>

1. シンプルモデル(分離した腸細胞: Caco-2 細胞株(上皮組織との密着結合))

- ・少量の蓄積、細胞の頂端部、転移なし、低影響

2. 共培養モデル

- ・粘液分泌細胞内で 10 倍以上の蓄積、低影響
- ・小袋細胞(M 細胞)内で高い蓄積、転移あり、低影響

d) COMPARISON OF TOXICITY OF UNCOATED AND COATED SILVER NANOPARTICLES

Kathy C Nguyen, P. Rippstein, J. Tan, A. F. Tayabali (Health Canada, Canada)

銀ナノ粒子の被覆有無による毒性比較

銀ナノ粒子(Ag-NPs)は、抗菌作用を持つことから、消費者製品に幅広く使用されている。しかし、多くの消費者製品に銀ナノ粒子が含まれているにもかかわらず、これらのナノ粒子の人体への危険や環境への影響はほとんど知られていない。そこで、被覆されていないコロイド状の銀ナノ粒子(20 nm, 40 nm, 60 nm and 80 nm)、クエン酸塩(OECD 基準)で被覆した銀ナノ粒子(10 nm, 50 nm and 75 nm)、ポリビニルピロリドンで被覆した銀ナノ粒子(10 nm, 50 nm and 75 nm)といった3種のナノ粒子を用い、J774A.1 マクロファージ及び HT29 上皮細胞(ヒト結腸腺癌の上皮細胞)における毒性を調べた。

実験では、個々の試験細胞に異なる濃度の銀ナノ粒子を 24 時間つけおきした。この研究では細胞生存率(細胞毒性など)を評価するために MTT 試験を実施し、細胞内構造や活性酸素種製品を調べるために共焦点透過電子顕微鏡を使用した。サイトカインの数値測定には、ビーズ構成の多重試験を行い、また、グルタチオンと SOD(スーパーオキシドジスムターゼ)の活量を検出するために、酵素による試験を行った。

結果として、1 μ g/ml の濃度では、被覆されていない銀ナノ粒子の細胞生存率は 20-40% 下がり、さらなる分析で 20nm と 40nm の粒子は 60nm と 80nm の粒子と比べ、10% 細胞毒性が高いことが示され、サイズにより影響が変わることが証明された。被覆されている銀ナノ粒子は 25 μ g/ml 濃度から細胞生存率の減少が始まるという結果となった。

被覆されている銀ナノ粒子の細胞生存率への影響もまた、サイズによって変化することが明らかとなった。ポリビニルピロリドンで被覆された粒子の方がクエン酸塩で被覆された銀ナノ粒子よりも細胞毒性が高かった。細胞内構造の変化は、1 μ g/ml 濃度において、20nm と 40nm の被覆されていない粒子と、50 μ g/ml 濃度における 10nm と 50 nm のクエン酸塩とポリビニルピロリドンにより被覆された粒子のもので J774A.1 細胞で確認した。1 μ g/ml 濃度では、被覆されていない銀ナノ粒子は J774A.1 の TNF- α (腫瘍壊死因子)と HT29 細胞の IL-8(走化性因子)といったサイトカインの減少が確認された。反対に、クエン酸塩とポリビニルピロリドンにより被覆された銀ナノ粒子

はより高い濃度(25µg/ml と 50 µg/ml)時に、これらサイトカインが増加し、ポリビニルピロリドンで被覆された粒子はクエン酸塩で被覆された粒子と比べ、サイトカインが大きく増加する結果となった。

1µg/ml 時の被覆されていない銀ナノ粒子は、試験細胞においてグルタチオンを失い、SOD が増大するといった結果となった一方で、被覆された銀ナノ粒子は最も高い試験濃度時でさえ、グルタチオンとSODにさほどの変化は見られなかった。1 µg/ml の被覆されていない銀ナノ粒子(20nm と 40nm)と 50µg/ml の被覆されている銀ナノ粒子(10nm-ポリビニルピロリドン)は、ROS(活性酸素)がわずかに増加した。

このように、試験データでは、被覆されていない銀ナノ粒子の方が被覆されているものよりも毒性が強いという結果が得られた。被覆されていない銀ナノ粒子が炎症反応を抑制することが明らかになり、試験細胞において酸化ストレスを引き起こすことがわかった。

今回の調査結果では、銀ナノ粒子の毒性はそのサイズと被覆の有無次第であることが明らかになった。

e) COMPARATIVE STUDY OF NEUROLOGIC EFFECTS OF NANO-TiO2 VERSUS SiO2 AFTER DIRECT INTRACEREBRAL EXPOSURE IN MICE

Aurélie Balvay, N. Thieriet, L. Lakhdar, A. Bencsik (ANSES, France)

ナノ酸化チタンとナノシリカをマウスの脳内に直接ばく露させた場合の神経に対する影響比較

工業ナノマテリアル(ENMs)のさらなる開発や生産は、消費者製品、食物、薬の分野において多様でかつ広範囲にわたり潜在的に利益をもたらすものと考えられている。しかし工業ナノマテリアルの独特な特性は、潜在的に人体や環境に対し意図しない結果を招くことが考えられ、関心が寄せられている。もし、ばく露が体内吸収や神経系への伝達に影響すれば、神経毒性の潜在的リスクが生じる。しかしながら、神経毒性に関してはほとんど立証されていないままである。そこで、第一ステップとして脳へのばく露が神経毒性の影響を引き起こすのかを検証するべく、定位固定装置を使い、C57Bl6 マウスの脳内に直接ナノ粒子を注入するという試験を実施した。試験では回転装置を使い、ナノ酸化チタンとナノ二酸化ケイ素の単回投与による運動能力への神経学的影響を比べた。投与の前後に、毎週1回、計8週間、それぞれのマウスの運動能力を測定した。加えて、マウスは神経膠症や炎症過程等の脳への病理組織の時間依存効果を調べるために、1,2,3,4,そして8週間でそれぞれ観察した。

ナノ酸化チタンとナノ二酸化ケイ素は、生体媒質における陽性(酸化チタン)と陰性(二酸化ケイ素)の表面電荷の粒子を調べるために選択された。今回のナノ酸化チタンとナノ二酸化ケイ素は両方とも、ナノマテリアル研究の中核であり、OECD スポンサーシッププログラムの組織でもあるEC 共同研究センター(European Commission Joint Research Centre)から提供されている。マウ

スへの注射は脳全体にナノ粒子を拡散させるため、脳室への全身麻酔の状態で行われ、注入部位は組織学的に検査した。損傷の組織学的回復と注射針跡は、時間的依存性を観察した。神経毒の効果は運動能力パラメータを使い調査し、20 rpm の回転もしくは 4-40rpm に加速されたロッドにより測定した。結果として注射前のマウスは少なくとも一定の回転装置では 129 s +/- 105 で走ったが、ナノサイズの二酸化ケイ素を注射ばく露後は、29 s +/- 52 *p<0.05 となり、一週間で運動能力の障害を引き起こした。加速させた回転装置を用いると、運動能力は注射前のマウスに比べ注射したものは 1,2,3 週間で劇的に落ちた。ナノ酸化チタンはそれぞれの運動能力において、さらなる低下を引き起こした。20 rpm 時の 104 s +/-86 における最初の運動では、1 週間時点で少しずつ減少し 84 +/- 100 となり、4 週間後にはゼロになった。1 週間時点では、炎症をともなう神経膠症の部分が、星状細胞とミクログリア細胞の活性化により最初の注射部位から見られた。もちろん、これはナノ粒子と関連しているとは言い切れない。その後、神経膠症が次第になくなっていく一方で、ミクログリアの活発化が脳中で増し、これはおそらくナノ粒子と関連があり、長期にわたって神経炎症を引き起こすだろうことを示唆している。これは運動能力の減少とも合致した。

結論として、脳へ直接ばく露させたマウスの運動能力の低下を見ての通り、ナノサイズの酸化チタンと二酸化ケイ素は神経的な影響を引き起こすことが確認された。

f) EVALUATION OF MULTI WALLED CARBON NANOTUBES ECO(GENO)TOXICITY USING THE AMPHIBIAN LARVAE OF XENOPUS LAEVIS

Laury Gauthier, F. Mouchet, C. Gancet, A. Perrault, F. Bourdiol, E. Flahaut, P. Puech, E. Pinelli, J-C. Boutonnet (CNRS, NAUTILE, France)

アフリカツメガエルの幼生を使用した、多層カーボンナノチューブの遺伝毒性評価

カーボンナノチューブの生体毒性の影響に関する現代知識は未だ乏しく、より広範囲にわたって検証されるべきである。ナノマテリアルの中でも異質の特性をもち、特別なカテゴリーに分類されるカーボンナノチューブは非常に多くの場での活用が目指されており、世界の年間生産能力は増え続けている。その際、いくつかのカーボンナノチューブのライフサイクル(生産、使用、処分)で環境を汚染することが考えられる。今回は、産業用多層カーボンナノチューブの潜在的毒性をアフリカツメガエルの幼生を用いて検証した。

多層カーボンナノチューブはアルケマ(フランス)製を使用した。多層カーボンナノチューブの潜在的な有害性は、“ISO 21427-1”の研究条件に即して行い、それぞれ 0.1、1、10、50mg/L 濃度でばく露させて 12 日間経過したアフリカツメガエルと、0.1 と 1mg/L 濃度で 24 時間ばく露させたものにより比較した。調査のポイントは、循環血液内の赤血球の中の主な DNA 損傷(小核とコメットアッセイ)、小核誘発、発達障害、死亡率などとした。生物サンプルの中で多層カーボンナノチューブの存在を確認するに当たっては、ラマン分光法分析を実施した。

50mg/L の多層カーボンナノチューブにばく露させ、12 日後に観察した幼虫には成長障害が見られたが、死亡や遺伝的影響(小核誘発や主な DNA 障害)は確認されなかった。一方、ばく露後 24 時間の方では、かなりの DNA 障害が見られた。

結果的に多層カーボンナノチューブの毒性は間接的に作用し、短いばく露時間において酸化ストレスにつながるが、ばく露から 12 日後では DNA の回復が起こったため、回復できないほどの変異には結びつかないと判断できる。なお、顕微鏡を使い特定の臓器や細胞を調べても多層カーボンナノチューブは検出されなかったが、消化管ではかなりの量の多層カーボンナノチューブが確認されたことを考えると、食糧摂取が多層カーボンナノチューブ汚染の主な理由と言える。

今回の結果からすると、環境に放出された多層カーボンナノチューブが幼生に摂取され、そこから食物連鎖上でカーボンナノチューブが発見される可能性があると考えられる。

g) COBALT, TITANIUM DIOXIDE AND NANOSILVER NANOPARTICLES CAUSE SKELETAL DAMAGES IN SEA URCHINS AT PLUTEUS STAGE

Antonietta Morena Gatti, C. Gambardella, S. Ferrando, L. Gallus, P. Ramoino, C. Falugi (University of Genoa, Italy)

コバルト、二酸化チタン、銀のナノ粒子はプルテウス段階でウニの骨格障害を引き起こす

工業用ナノ粒子は多くの商業製品に使用されているが、その毒性影響の可能性の多くは知られていない。本件は、工業用ナノ粒子が生体の骨格形成を含む生物学的過程において悪影響を及ぼす働きをする可能性についての報告である。

今回は異なるばく露濃度のコバルト、二酸化チタン、銀ナノ粒子が、ウニのプルテウス段階において骨格障害を引き起こすかどうかを考察した。

プルテウス段階のウニについては、異なるナノ粒子の濃度(0.0001~1 $\mu\text{g L}^{-1}$)をばく露させた精子を使った受精卵から得た。また、対照実験用に、ばく露させていないウニの精子も使用して比較した。

プルテウスはグリセリン水溶液にて透明化し、その後 WGA(レクチン小麦胚芽凝集素)で処理した。WGA は蛍光色素結合抗体であり、組織の中に取り入れられると共焦点顕微鏡と落射傾向顕微鏡により観察することができる。蛍光 WGA レクチン結合部位は、ナノ粒子により処理されたプルテウス段階の間充細胞と骨格桿体視細胞において確認された。反対に対照群(ナノ粒子をばく露させていない精子を使ったもの)のプルテウス段階では蛍光発光が検出されなかった。走査型電子顕微鏡(Quanta 社の FEG-ESEM)と X 線マイクロプローブによるプルテウスの形態観察によって、体内での異なるナノ粒子の形態変化や存在を確認した。なお、用量依存によるナノ粒子の影響は確認されなかった。骨格の非対称桿体視細胞やプルテウス段階における不規則な形状等の形態異常は、ばく露させたプルテウスのみで確認された。

結論として、現在の研究では、ナノ粒子は発達過程の間充組織と骨格の中で WGA レクチン結合部位と相互に作用するということがわかった。これは子孫にも先天性異常を引き起こすということの意味している。

＜本件の結果＞

- ・出生力には影響しない
- ・原腸胚とプルテウスの発達異常を引き起こす
- ・酵素活性は全てのばく露されたサンプルに影響を及ぼした

今回の研究では、コバルト、二酸化チタン、銀ナノ粒子は、神経毒障害を引き起こす可能性があるという結果が得られた。

h) NANORELEASE – DEVELOPING METHODS TO MEASURE RELEASE OF NANOMATERIALS FROM SOLID CONSUMER PRODUCTS

Lie Chen, M.Hill, R.Canady (Health Canada, Canada)

ナノリリース – 消費者製品(固体)からのナノマテリアル放出を測定するための方法

本件は、ナノリリース消費者製品プロジェクトにおいて開発中である「消費者製品からのナノマテリアル放出を測定するための方法」の進捗状況を説明したものである。

ナノテクノロジーは薬品、エネルギー、電子機器、化粧品、こん包材料やその他の分野での使用の際、ナノスケールの新たな材料や機器を生み出すことができるという点において、将来を有望視されている技術である。世界中の政府関係団体、各産業がこれらの新しい技術の可能性を把握するために研究に数十億ドルもの投資を行っており、これまでにナノマテリアルはあらゆる消費者製品への有用性を見出している。それに伴い、人体や環境に及ぼすナノマテリアルの潜在的な影響についての科学的また大衆的関心は高まり続けている。根幹となる問題はナノマテリアルが消費者製品から放出されるのか、である。

ナノリリースプロジェクトは、消費者製品からのナノマテリアルの放出の把握と、ナノマテリアルを使った製品の安全開発の促進をサポートすることを目的としている。このプロジェクトは ILSI 財団法人から運営支援を受け、多国籍の公的、民間機関と連携しており、3つのステップから構成されている。

- (1) ステップ 1—ナノマテリアルの選択(すでに完了):いくつかのナノマテリアルを順位付けするために所定の基準が設けられた。最初の研究発表会が 2011 年の 5 月にワシントン DC で行われ、運営委員会にどのナノマテリアルを採用するかを申し出た。結果として、ポリマー内の多層カーボンナノチューブが選択された。
- (2) ステップ 2—評価方法(開発中):データや情報データベースの収集、分類や、白書の作成のために3つのグループが作られ、第2回の研究発表会が2012年の6月にベテスダで行われ、

その3つのグループが白書を発表した。

1)グループ1 - 測定方法

どのようにしてポリマーから放出される多層カーボンナノチューブを測定するのか?

2)グループ2 - 材料

ポリマー内から放出された多層カーボンナノチューブは、どのような作用(空中への広がり)をするのか?

3)グループ3 - ばく露/放出シナリオ

ポリマー内多層カーボンナノチューブの主な放出シナリオは何か?

(3つのグループの白書に基づいて、最終公文書が作成される予定である)

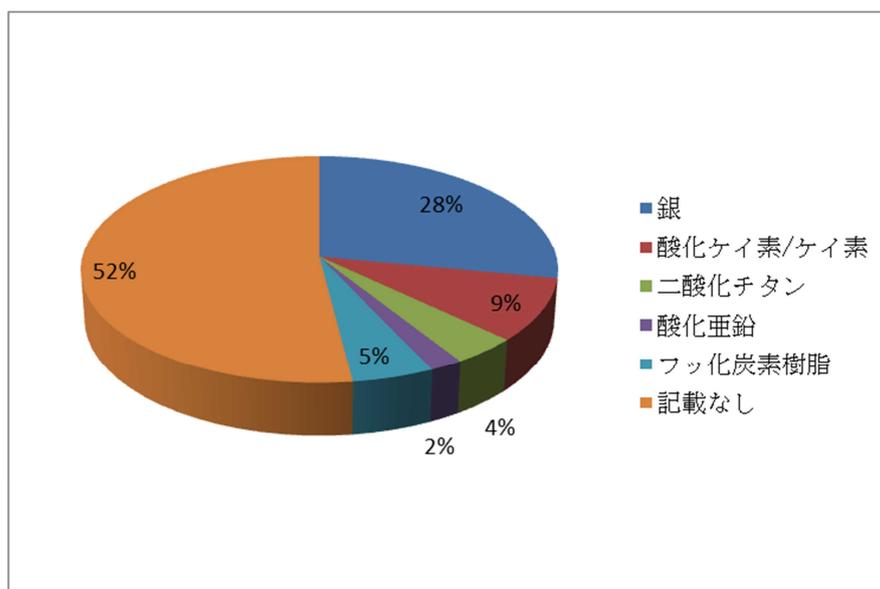
- (3) ステップ3- インターラボラトリーテスト(2013年実施): インターラボラトリーテストグループでは、現在協力してくれる研究室を募集しており、ラボラトリーテストの最終作業計画を考案しているところである。

このプロジェクトの長期目標は、ISO や OECD における標準化である。

i) CHARACTERIZATION AND QUANTIFICATION OF NANOPARTICLE RELEASE FROM COMMERCIAL AVAILABLE SPRAY PRODUCTS CONTAINING ENGINEERED NANOPARTICLES.

Sabrina Losert, M.Lattuada, K.Hungerbuhler, A.Ulrich (EMPA, Switzerland)

工業用ナノ粒子を含有する市販のスプレー製品から放出されるナノ粒子の特性評価と定量化



※スプレー製品に含まれるナノ粒子

ナノマテリアルは、その異質な特徴から様々な分野で数多く利用されている。そのため、多くの工業用ナノ粒子が消費者製品に使用される傾向がここ数年間で起きている。その優れた特性とは別に、工業用ナノ粒子による人体や生態系への悪影響についての関心も高まってきている。特に工業用ナノ粒子を含んだスプレー製品は、肺に至る重大なばく露につながるため、細心の注意を払う必要がある。これまで、工業用ナノ粒子を含むスプレー製品の環境に及ぼす影響に関する研究はごくわずかであり、未だ多くの疑問も残ったままである。この溝を埋めるべく、噴射の過程でのナノ粒子の性質・作用・人体への影響を理解するため、様々な噴射シナリオを調査した。

ナノ粒子の特性評価は難しいものであるが、エアロゾルとスプレー製品に含まれる工業用ナノ粒子の成分分布、サイズ、形態、量を明らかにする独自の分析方法を構築した。ICPMS(誘導結合プラズマ質量分析装置)とA4F(スプレー分散非対称流フィールドフロー分画装置)を利用することで、分散の粒度、粒度分布、濃度、化学成分の詳細にわたる特性を把握した。

空気中に浮遊するナノ粒子の測定は、信頼性のある噴射実験を行うために組み立てられたグローブボックス内で行った。第一段階で、エアロゾルフォーメーションを詳細に調査し、第二段階では周囲環境に存在する他のエアロゾルとの相互作用を調査した。大きめのサイズ(>300nm)の粒度分布はOPC(光学式カウンター)で測定し、一方小さめサイズ(<500nm)のものはSMPS(走査型移動度粒径測定器)を使用して測定した。SMPSの代わりになるものとして、FMPS(高速移動型粒径測定器)も使用可能である。また、その後の電子顕微鏡分析でナノ粒子や噴射エアロゾル内で生成された凝固物質のサイズ、形態、化学的性質の情報を得るために、TEM(透過型電子顕微鏡)での単一粒子のサンプリングを行うための静電サンプラーを使用した。

今回は、市販のナノ製品を用いて異なる噴射シナリオを調査した。特に注視したのは、噴射の距離と方向性の設定である。今回得られたデータは、腸管、皮膚、肺を経由する摂取の可能性を評価し、ばく露モデルを更新するために使用されるべきものとなっている。

j) REGULATORY ASPECTS OF NANOMATERIALS IN REACH

Maria Puokamaa(DG Enterprise and Industry, European Commission, Brussel)

REACHにおけるナノマテリアルの規制

EU 科学諮問委員会やリスク評価者の現時点における知識や見解によると、ナノマテリアルは毒性のあるものもあればそうでないものもある、といった点で一般的な化学物質と似ていると言える。実際、健康リスクに関する科学委員会(SCENIHR)によると、長年使用されているカーボンブラックや二酸化チタンの毒性は低いと発表している。重要な課題として、毒性の検出、特性、分析のための計測機器や正当性のある方法の確立や、ナノマテリアルの危険性についての完全な情報収集、また、それらの評価方法を発達させることなどが挙げられる。

起こりえる危険性は、特定のナノマテリアルと特別な使用に関連する。それゆえ、ナノマテリアル群の検査には適正な情報を使い、リスク評価を個別に行う必要がある。現在既に確立されているリスク評価方法を応用できるが、ある部分のリスク評価においては未だ研究が必要である。

欧州委員会では、ナノマテリアルが物質や化合物として発生した場合、登録(Registration)、評価(Evaluation)、認可(Authorization)、および制限(Restriction)を化学物質に適用する REACH 法が、ナノマテリアルのリスク管理に最も適した方法であると位置づけたが、この方法においても、より細かな要件が必要であるとも認識している。欧州委員会は REACH にいくつかの修正を加え、2013 年以降の登録へのガイダンスをさらに進展させるために欧州化学物質庁(ECHA)に働きかけている。

ナノマテリアルに関する情報の正当性を高めるために、欧州委員会は全ての関連情報の参考文献や出典元を記載した内容を閲覧できるウェブサイトを立ち上げる予定である。それと並行して、欧州委員会では、透明性を高める最良の方法を特定ならびに策定するための影響評価に着手し、その結果生じるデータ収集のニーズの詳細な分析を含めた規制管理を確実に行う考えである。この分析は既存の通知、登録、認可の計画から外されているナノマテリアルも含むものとなっている。

k) DEFINING OCCUPATIONAL AND CONSUMER EXPOSURE LIMITS FOR NANOMATERIALS – FIRST EXPERIENCES FROM REACH REGISTRATIONS

Karin Aschberger, Frans M. Christensen, (Nanobiosciences Unit, Institute for Health and Consumer Protection, European Commission–JRC, Italy)

労働者及び消費者に対する REACH に登録したナノマテリアルのばく露制限 最初の REACH 登録

2010 年 12 月 1 日より、REACH 規制の下、1,000 トン以上生産または輸入する物質はすべて登録が必要となった。(2013 年 5 月からは 100 トン/年以上、2018 年 5 月からは 1 トン/年以上の物質に登録義務が発生する) JRC (欧州委員会の下部組織である Joint Research Center) では、登録されたナノマテリアルに関する情報の各種評価を行った(Nanosupport プロジェクト)。これに基づき、JRC ではナノマテリアルに対する REACH 要件の妥当性を検討するとともに、現在の REACH のフレームワーク上に構築可能な特定のナノマテリアルの規定のためのオプションを開発した。

4,700 物質をカバーする 26,000 件の登録書類から、最終的に 21 件の書類が、ナノマテリアルやナノ形状物質をカバーすると考えられた。化学物質安全性報告書(Chemical Safety Report)だけでなく、物質の識別、物理化学的性質、人間の健康、運命、生態毒性、PBT 評価、分類および表示を含むすべてのエンドポイント(評価項目)のために提供された書類の詳細な分析と評価を

行った。

労働者と消費者の安全性が確保されているかを評価するためには、ナノマテリアルをカバーする物質の確立されている“導出無(最小)毒性量”(DN(M)ELs)をチェックするのが適切である。導出無毒性量(DNELs)は、主に労働者の長期吸入ばく露のために設定されたものである。1通の書類において、すべてのばく露経路、労働者、消費者ならびに一般市民に対する、短期・長期ばく露の導出無毒性量が記載されていた。評価した書類の半数には、一般集団に対する長期経口ばく露の導出無毒性量が含まれていた。導出無毒性量は大抵、ナノサイズの形では特定されず、またナノサイズのマテリアルとして計算されるケースはほとんどない。そのため、ナノ形状の物質から危険なデータとして抽出されることはほとんどなかった。

いくつかの導出無毒性量は、未だナノサイズのマテリアルには確立されておらず、吸入性・呼吸性粉塵レベルの利用可能な職業的ばく露濃度に基づいたものであった。REACH のガイダンスにあるデフォルトの評価要因を適用することによって、導出無毒性量が導き出された書類はほとんどなかった。全ての導出無毒性量は質量/体積指標で表されていた。

このプロジェクトで取り組まれた書類の提出、識別、選択は、ナノマテリアルの定義に関する EC 勧告(2011/696/EU)の導入前であることと、ナノマテリアルのための推奨事項が含まれた改訂された欧州化学物質庁(ECHA)のガイダンス文書の公表前に行われた点に注意することが必要である。なお、このプロジェクトでは、分析した書類の整合性評価は行わなかったが、ナノマテリアルに関する適切な情報収集・報告ならびに適切なリスク・安全性評価を確実に行うためには、どのように REACH 規則を状況に応じて変化・対応させていくかに焦点を当てている。

I) DEVELOPMENT OF AN INTEGRATIVE PROGRAM OF NANOSAFETY: PROMOTE THE COORDINATION BETWEEN INDUSTRIES AND RISK ASSESSOR.

Claude Emond, Serge Kouassi , Frederic Schuster, (BioSimulation Consulting Inc, USA, University of Montreal, Canada)

ナノセーフティに関する総合プログラムの開発: 産業とリスク評価者間の調整

ナノテクノロジーは、ナノスケールのレベルで物質を操作する新しい科学技術である。

最近ナノテクノロジーが拡大しているのは、多様な領域で革命を起こす可能性を秘めていることに由来している。

ナノマテリアルは多くの産業分野で広く利用されており(化学、バイオ医学、環境など)、そのアプリケーションは、今後数年間で大幅に拡大することが予想される。ナノマテリアルのこの成長は、人間の健康や環境、より具体的には労働作業員の健康への潜在的リスクに関する多くの問題を提起するものでもある。いろいろな文献で、多くのナノマテリアルの全身ばく露において、肺の機能、消化管、皮膚に対して障害をもたらすことが指摘されている。

しかし、生体へのナノ粒子の毒性に関連する潜在的なリスクの問題の前に、規制当局においてリスク管理手法を開発する必要がある。

本研究の最終的な目標は、マーケティングフェーズでのナノテクノロジーの安全性を向上させるために、工業用ナノ材料による健康リスクに関する検査ツールを開発することである。

この研究で提案したアプローチは、(1)ナノ材料ベースの物理化学的特性、毒性、用途の一次調査と識別、(2)製造過程での職業ばく露リスク、(3)消費者製品における工業用ナノ材料など、様々な側面を統合するナノ材料の生産と消費者の製品に関する安全評価手法に基づいている。

このアプローチは、商業化される前のナノ材料の生産に関連する不確実性や、産業労働者のためらいを減らし、規制機関に衛生管理の認証ツールを提供するための重要なパラメータを提供している。また、この研究はナノ材料や消費者の安全性の重要な問題に対し、より良い理解を提供し、ナノ粒子のある種類の使用制限を規定している。さらに、ナノ材料のリスク評価の将来的なプランの改善を可能にし、一般消費者の信頼を高めることを可能にしている。

m) REGULATION, RISK, AND THE GLOBAL NANOTECHNOLOGY WORKPLACE

Cassandra Engeman, (University of California, Santa Barbara, USA)

規制、リスク、ナノテクノロジーの職場

工業用ナノ材料のもつ新たな特性は、エネルギー、医療、その他の産業に重要な革新の機会をもたらすものである。現在のナノテクノロジー産業の研究では、毒性学研究と環境衛生・安全のための最も効果的な実践方法を開発しているところである。現在の規制アプローチは主に業界の自主規制と自己申告に頼っている。ソフト規制では、工業用ナノ材料企業が人の健康と環境を守る上で重要な役割を果たす。今回のプレゼンテーションは、企業から報告された環境・健康・安全に関する評価とナノ材料のリスクや規制に関しての産業界からの視点での報告である。今回の分析は、2009-2010年の間に工業用ナノ材料を使用・生産した民間企業の国際調査(78社参加)から得られた回答に基づくものである。

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。企業の大半は、ナノに特化した安全対策の重要な障害として「情報の不足」、「規制の不足」、「予算の制約」を報告したが、「産業界が一番理解している」という見解に代わる、幅広く利用可能で具体的なガイダンスは見つからなかった。実際、調査した企業の87%は環境・労働安全衛生に関するプログラムを作成しているのに対し、ナノ材料に特化したプログラムを作成している企業は46%と大幅に少なかった。

企業は、概ね政府が推奨したばく露管理に対する階層的アプローチの全要素に及ぶ実践事項

の報告は行ったが、ナノに特化した対策に関しては、一般的な衛生上の対策よりも報告は少なかった。プロダクト・ステewardシップや廃棄物管理、その他の環境衛生や安全性のものよりも少なかった。さらに、安全処理規制が存在しない場合、企業から報告されるナノに特化した健康や安全に関するプログラムの範囲は狭かった。この調査の結果では、国家間によってリスクに対する認識の違いが見えた。

今回の調査では、政府の指導が産業界に行き届いていないことが明らかになった。産業界は規制に対して前向きではないとかがえる一方、彼らが提出した起こり得るリスクへの認識や、危険な現場環境は、規制機関からのトップダウンアプローチが従業員や環境を守る上で必要であることを示唆している。また、特に製品廃棄時の環境衛生や安全性により多くの配慮が必要である。

n) ARE SPECIFIC REGULATIONS FOR NANOMATERIALS EFFICIENT?

Daniel Bernard(Arkema, France)

ナノマテリアルに対して特別な規制は必要なのか

ナノマテリアルの使用量や生産量の増加にともない、リスクアセスメントや安全性評価に関する不確実性から市民環境や顧客を保護するため、より具体的な規制が地域、国家、グローバルレベルで行われている。規制当局やメーカーにおいては、何をナノマテリアルとしてみなすか、ということを確認して説明する必要がある。

ナノマテリアルは、内部または外部の構造体によるサイズによって物質分類しなければならない。それは特定のリスクを意味するものでもなく、また必ずしもその成分と比べて新しい危険特性を持っているとも限らない。

例えば、表面積対体積比が増加することによって、あるナノサイズの材料の特性の中に変化が見られたという研究結果がある。いくつかのナノマテリアルは、生体に影響を与え、人間や環境に対して害を引き起こす可能性がある。これらの特別なナノマテリアルは、ナノスケールでの1次元、2次元、3次元の外部サイズにより、ナノ物質(ナノプレート、ナノファイバー、ナノ粒子)という名前がつけられている。(ISO TC229 / TS 80004-1, TS 80004-2, TS 80004-4 参照)

ナノマテリアルの定義を考えると、サイズが重要な特徴であり、最適な測定量である。規制目的のために提言された作業定義の大部分では、サイズは指定された範囲内で1つ以上の外形寸法のことを指す。定義されたサイズの範囲は、同一解釈を容易にする。しかし、100nmの上限を超えたものが一般的に使用されている場合、この値の妥当性が適正であることを証明する科学的証拠はない。

したがって、いかなるナノマテリアルも、測定に使用された手順を含めた粒度分布によって説明されるべきである。結果を正しく比較確認するためには、ナノスケール(例えば1ミクロン以下であるか。サンプリングや試料調製、分散等が施されているか)の測定を実行するために利用できる十分有効な方法論が必要である。

しかし、なぜ規制の定義においては、偶発的ナノマテリアルを除く、意図的に作られたナノマテリアル(例えば工業用、人工的ナノマテリアル)に限定されるべきなのであろうか。

注)本講演は、ナノマテリアルに対して特別な規制は必要なのかが投げかけられただけで、結論は提示されなかった。

(2)第6回ハーラングローバルセミナー&シンポジウム

1)学会、シンポジウムの概要

ア)名称

第6回ハーラングローバルセミナー&シンポジウム
～既存・新規化学物質からナノマテリアルまで～

イ)開催日、開催場所

開催日:2012年10月31日(水)

開催場所:学士会館(東京都千代田区)

ウ)主催/協賛

主催 ナノマテリアル安全性評価フォーラム

協賛 EO/EG タスクフォースコンソーシアム

BPA 安全性研究会

Nanosafety Consortium For Carbon(米国)

ハーランラボラトリーズジャパン株式会社

エ)参加者数

参加人数:約100名

オ)プログラム

【第1部】新規・既存化学物質の法規制動向と事業者の対応

- ・K-REACHの施行にともなう韓国当局と工業会の共同化学物質安全性評価・調査活動と今後の展望(キムジェソン KCMA 科学技術情報部部長)
- ・中国及び台湾における化学物質法規制の最新動向と事業者における留意点(陳梅官ハニカム・テクノロジー(株) 代表取締役)
- ・欧州 REACHにおけるコンプライアンスの重要性と事業者に求められる対応(ジョン ハンドレー 英国ハーランラボラトリーズ 法規制部門総責任者)

【第2部】世界のナノマテリアルに関する規制動向と事業者の対応

- ・ナノ材料の安全性確保に向けた国内外の法規制と研究開発の動向(岸本充生 産業技術総合研究所 安全科学研究部門グループ長)
- ・アメリカの事業者団体におけるナノマテリアル(特にカーボン)のヒト・環境安全に対するアプローチ～ 米国コンソーシアム NCC の戦略と今後の展望 ～ (ジョン C.モニカ Jr.Mr.John C.Monica, Porter Writer's Nanotechnology, U.S.A)
- ・ナノマテリアルにおける多面的安全性評価スキーム(NanoDiversity®) の有用性(ハーラン ラボラトリーズジャパン 代表取締役 安齋享征)
- ・ナノカーボンの物性と応用可能性および工業化における安全性指針(信州大学工学部 特任教授 鶴岡秀志)

2) ナノマテリアルの安全性、ばく露、試験法等に関する議論の概要

本学会での講演概要を以下に示す。

a) K-REACH の施行にともなう韓国当局と工業会の共同化学物質安全性評価・調査活動と今後の展望

キムジェソン KCMA 科学技術情報部部長

韓国では、現在新たな化学物質規制として K-REACH の策定が進められており、その概況が説明された。

1. バックグラウンド

欧州や日本、中国など国際的な化学物質規制の潮流に合わせる必要性や、2011 年に発生した加湿器の殺菌剤事故などがバックグラウンドにあることが説明された。

2. 現況

2011 年 2 月～4 月に立法予告がなされ、2012 年 9 月に法制上の検討が完了し、国会に提出されたことが説明された。

3. K-REACH のフレームワーク

これまでの新規化学物質管理法であった「有害化学物質管理法(TCCA)」と K-REACH の比較説明や、K-REACH での登録プロセス、規制対象となる物質の内容と規制時期などが説明された。

4. 今後の計画

2013 年上半期に国会通過を目標とし、2015 年上半期施行を目指していることが説明された。

なお、K-REACH は、韓国が新たに導入を予定している既存化学物質、新規化学物質の規制法であるが、特に同法ではナノマテリアル規制の視点が含まれていないことから、ナノマテリアルに関連する報告はなかった。

b) 中国及び台湾における化学物質法規制の最新動向と事業者における留意点

陳梅官 ハニカム・テクノロジー(株) 代表取締役

中国と台湾の化学物質法規制の動向として、以下の内容が発表された。

1. 中国における化学物質法規制の最新動向

2010年10月より新規化学物質規制として改正版中国 REACH が施行されていること、危険化学品、有毒化学品の規制として、2012年8月に危険化学品登記管理弁法が施行されたことが説明された。この中で、ナノ物質に関しては、「現状、有害性の懸念は指摘されつつも、具体的な規制の動きはない」ことが説明されている。

また、事業者への影響については、中国 REACH の対応について中国現地での試験実施と当局審査の遅延が目立つこと、最新版「危険化学品目録」が未公表のため、規制対象物質の範囲が不明のまま、現場の混乱が続いていることが報告された。

2. 主な法令の施行状況と事業者の留意点(中国)

危険化学品安全管理条例の概要、中国 REACH の内容、中国 GHS(MSDS とラベル)の対応内容、輸出入通関検査の内容、事業者における留意点、という視点での発表がなされた。

3. 台湾における化学物質法規制の最新動向

4. 主な法令の施行状況と事業者の留意点(台湾)

本件は、中国と台湾における化学物質規制を全般的に説明する内容であったが、その中でナノマテリアル規制に関しては、中国では「現状、有害性の懸念は指摘されているものの具体的な規制の動きはない」こと、台湾では「ナノ工業安全指針が出されており、現在行っているナノ作業調査を経て規制の検討に入る予定」ということが発表された。

c) 欧州 REACH におけるコンプライアンスの重要性と事業者に求められる対応

ジョン ハンドレー 英国ハーランラボラトリーズ 法規制部門総責任者

本講演では、2010年より開始された欧州 REACH のこれまでの経過や現状等について発表された。

この中でナノマテリアルについては、2012年6月8日に欧州化学物質庁(ECHA)がナノマテリアルの EU 定義を採用し、REACH への登録者は EU 定義に沿ってナノマテリアルの登録が奨励されるようになったこと、登録書類を評価する際、物理化学特性を考慮されるようになったこと、などが説明された。

また、欧州議会や NGO から欧州委員会に対し、ナノマテリアルの規制強化を求める要望が出されており、それに対する第2回目の回答が2012年10月3日に公表され、ナノマテリアルに対しても、既存の REACH によるリスク評価手法が適用可能であり、リスク評価はケースバイケースで

行うこと、ナノ定義の実行に当たっては、検出方法、測定方法、モニタリング方法の開発に ECHA のワーキンググループで取り組むこと、ECHA では 2013 年に向けてガイダンスを開発し、REACH 付属書の改定を予定していること、などが回答されたことが説明された。

d) ナノ材料の安全性確保に向けた国内外の法規制と研究開発の動向

岸本 充生 産業技術総合研究所 安全科学研究部門グループ長

本講演は、1.背景やナノリスクの特徴、2.国内の規制官庁の動向、3.カーボンナノチューブのリスク評価事例、4.自主安全管理の必要性、5.自主安全管理のために必要な技術とは、という内容であった。

1. 背景やナノリスクの特徴

ナノ材料のリスクに関する仮説として、「粒子病原性パラダイム:小さいものが危ない」、「繊維病原性パラダイム:まっすぐで長くて硬いものが危ない(>15or20 μm)」の2つが挙げられ、この仮説を背景に、これまでナノマテリアルに対するリスクが考えられてきた。ナノ材料の安全性については、2008年～2010年頃は「よくわからない」という状況で、予防的/回避的な管理で対応してきたが、2011年以降では一通りのデータが揃ってきたことで、自主安全管理で対応する動きとなっている。今後、ナノ材料の安全性がほぼわかってくると、既存化学物質と同様な管理で問題ないかもしれないことが説明された。

2. 国内の規制官庁の動向

2008年2月に、国立医薬品食品衛生研究所によるカーボンナノチューブを投与したマウスに中皮腫ができたとする研究結果が新聞記事となり、その後、厚生労働省からは、自主的なばく露防止等に努めるよう促す通知、経済産業省からは、自主的な対策や6材料について情報収集・情報公開を促す通知(結果的に2010年3月までに31社からデータが提供された)、環境省からは、「工業用ナノ材料に関する環境影響防止ガイドライン」が出されたことが説明された。

3. カーボンナノチューブのリスク評価事例

NEDO プロジェクト「ナノ粒子特性評価手法の研究開発」(2006～2010年度)のリスク評価書が2011年夏に公開され、その概要が報告された。当プロジェクトでは、代表的なナノマテリアルであるカーボンナノチューブ、フラーレン、ナノ酸化チタンを対象に、作業環境基準値を導出しており、通常の化学物質と同様のやり方で管理可能であることが示されている。

<作業環境中の許容濃度の提案(OELs)>

材料	OEL(PL)	コメント
カーボンナノチューブ (CNTs)	0.03mg/m ³	最も比表面積が大きい単層 CNT から導出 (1000m ² /g)
フラーレン(C ₆₀)	0.39mg/m ³	個数加重幾何平均の直径が 96nm(GDS=2.0)の C ₆₀ から導出
ナノスケール酸化チタン	0.6mg/m ³	ナノスケール TiO ₂ の中で相対的に有害性が

(TiO ₂)	強いと考えられている、Evonic Degussa P25 のデータから導出
---------------------	---

*OELs は時限付の値として設定。15 年程度の垂慢性のばく露を想定し、科学的知見の進展を見越して 10 年以内に再評価されなければならない。

なお、ナノマテリアルの職業ばく露限度について、海外の機関等から提案されている値との比較表が提示された。

【提案されている CNT の職業ばく露限度 (OEL) の比較】

	NEDO pj (2009)	NEDO pj (2011)	欧州 ENRHES pj(2010)	Bayer 社 (2010)	Nanocyl 社 (2009)	米国 NIOSH(2010)draft
エンドポイント	肺の炎症	肺の炎症	肺への影響	肺への影響	肺の炎症(肉芽種)	肺への影響
根拠	ラット 28 日間 吸入ばく露試験	ラット 28 日間 吸入ばく露試験	マウス 14 日間吸 入ばく露試験	ラット 90 日間 吸入ばく露試験	ラット 90 日間 吸入ばく露試験	NIOSH 法 5040 の 計測定量下限値
材料	日機装(多層 CNT)	SG 単層 CNT(単層 CNT)→CNT	Shenzhen Nanotech Port 社 製(多層 CNT)	Bayer 社 Baytube(多層 CNT)	Nanocyl 社 NC7000(多層 CNT)	Baytube と NC7000→CNT と CNF 一般
職業ばく 露限度	0.21mg/m ³	0.03 mg/m ³ (時限)	0.2or0.034 mg/m ³	0.05 mg/m ³	0.0025 mg/m ³	0.007 mg/m ³

【ナノスケール TiO₂ の職業ばく露限度 (作業者の比較)】

	NEDO pj (2011)	欧州 ENRHES pj(2010)	Du Pont 社 (2008)	Du Pont 社 (2008)	米国 NIOSH(2010)draft
エンドポイント	肺の炎症	肺への影響	肺の炎症	肺の炎症	一部腫瘍を除いた 肺腫瘍
根拠	ラットの 13 週間吸 入ばく露試験 NOAEL:2mg/m ³	ラットの 13 週間吸 入ばく露試験 NOAEC:0.5mg/m ³	ラットへの気管内 投与試験 NOEL:5mg/kg	ラットの 13 週間吸 入ばく露試験 NOAEC:2mg/m ³	ラットの 2 年間吸 入ばく露試験 ベンチマーク用量 法
材料	P25	P25	Uf-1,uf-2	P25	P25
職業ばく 露限度	AEL(PL) 0.6 mg/m ³	DNEL 0.017 mg/m ³	AEL 2.0 mg/m ³	AEL 1.0 mg/m ³	REL 0.3 mg/m ³

4. 自主安全管理の必要性

ナノ材料管理に、法規制に加えて自主安全管理が必要とされる背景として、ナノ材料の多様性(分子式が同じでも異なる特性をもつ)、新規性(技術革新が早く、規制が追いつかない)、社会の変化(「わからないものはとりあえず危険とみなす」という予防の時代にある)、差別化(安全性を示すことで製品の差別化を行う事業者がでてきた)、風評対策(「ナノだから危険」という風評のおそれがある)、といった点が提示された。

5. 自主安全管理のために必要な技術とは

今後必要とされる自主安全評価/管理技術として、有害性評価、ばく露評価、リスク評価の観点からの提案がなされた。

有害性評価の面では、ナノ材料の多様性に対応できる有害性試験フレームワークとして、例えば特定の CNT 評価には吸入ばく露試験、CNT でも複数社の評価比較を実施するには気管内投与試験、CNT の多様なバリエーションを評価するには培養細胞試験を実施するなど、多様性を特徴とする工業ナノ材料には、各種有害性試験を効率的に利用する必要性が指摘された。

ばく露評価の面では、これまでの高価で詳細な計測から、安価で簡易な計測手法の開発の必要性が指摘された。

リスク評価の面では、ナノ材料やナノ製品のメーカーが個々独自に実施するのではなく、各メーカーから委託を受けた事務局(民間)が集約して生体毒性試験や動物試験等を実施(実施自体は事務局から外部委託)するような体制案が提示された。

e) アメリカの事業者団体におけるナノマテリアル(特にカーボン)のヒト・環境安全に対するアプローチ～ 米国コンソーシアム NCC の戦略と今後の展望 ～

ジョン C.モニカ Jr.Mr.John C.Monica, Porter Writer's Nanotechnology, U.S.A

カーボンナノチューブを主体としたコンソーシアムである NCC の現状の活動内容についての報告であった。

NCC(The NanoSafety Consortium for Carbon)は、2010 年にナノスケールカーボン(カーボンナノチューブ)に関係する企業メンバーによって設立したコンソーシアムであり、カーボンナノチューブ(CNT)メーカーを中心に現在 13 社が参加している。

このコンソーシアムの第一の目的は、ナノ製品関連のメンバー企業に関係する規制やヒト・環境安全(EHS)についての提案活動を行うことである。これは、逆に言うと、CNT メーカー等が、安全性や環境面で各所から訴えられることを避けることでもあるとしている。

コンソーシアムの諮問委員会メンバーが6名おり、ナノテク産業協会(NIA)、オレゴン大学、マサチューセッツ大学アマースト校、ロチェスター大学、カリフォルニア大学の専門家(吸入毒性学、工学、化学工学)によって構成されている。それと、国立労働安全衛生研究所(NIOSH)、標準技術研究所(NIST)、US Army の工業研究開発センターと外部連携している。

現在、NCC では2つのプロジェクトを進めており、一つは「EPAによる吸入毒性テスト」、もう一つは、国際生命科学研究機構(ILSI)と共同で実施している「ポリマー放出テスト」である。

「EPAによる吸入毒性テスト」については、周知のように米国では、有害物質規制法(TSCA)における製造前届出(PMN)において、米国環境保護庁(EPA)は「ラットへの90日間の吸入ばく露試験」を同意指令として命じているわけであるが、その試験にかかる費用は、1回のテストで35万ドル～100万ドルかかってしまう。カーボンナノチューブのメーカーがPMNのために個々試験を実施するとなると、費用的にも負担が重くなり、CNTの普及を阻害しかねない。そこで、コンソーシアムでは、テストすべきCNTの種類や、一度PMNが出された種類のものについては、コンソ

ーシウムメンバーであれば PMN を必要としないようにする提案(ロビー活動)を EPA に対して行っている。

現在提案しているテストマテリアルは以下のものである。

- (1) 単層 CNT(直径 0.7~2nm で、長さが 10 μm 未満)
- (2) 2 層 CNT(直径 1.5~2nm で、長さが 2~3 μm)
- (3) 多層 CNT(直径 4~20nm で、長さが 20 μm 未満)
- (4) グラフェン・ナノプレートレット(厚さ 6~8nm で、直径が 5~25 μm)

今後は、EPA との交渉により、試験対象とすべき物質リストの確定や、同意命令に係る試験条件の交渉などを進めていくことが予定されている。

2 つ目のプロジェクトである「ポリマー放出テスト」については、ポリマーコンポジットからの CNT 放出テストを ILSI と共同で研究中である。ターゲットとするポリマーはエポキシが有力であり、試験方法の検討を重ねているところである。実際のテストは 2014 年に実施する計画であることが報告された。

f) ナノマテリアルにおける多面的安全性評価スキーム(NanoDiversity®)の有用性

ハーランラボラトリーズジャパン 代表取締役 安齋享征

既存の法規制を有効利用しつつ、工業用原材料としてのナノマテリアルと製品中のナノマテリアルを合理的に分別し、さらにできるだけ無駄を省いた安全性評価を行うための画期的スキームが2012年3月の米国毒性学会で発表された。この「NanoDiv」(NanoDiversity Evaluation Scheme) はヒトへの安全はもとより環境ばく露による影響評価までカバーしており、今後の法規制の在り方を示唆するスキームとして注目されている。ハーランラボラトリーズジャパンが提案している、この NanoDiv の有用性に関して解説された。

「NanoDiv」では、まずナノマテリアルを「(薬や食品のように)ヒトが口に入れる製品」と「それ以外の製品(直接ヒトによって消費されることがない製品)」という2つのグループに分け、後者をナノマテリアルの定義や生産量、物理化学的性質等をもとに“工業用原材料としてのナノマテリアル”と“ナノマテリアルを使用した消費者製品”に区分する。それぞれが化粧品用途を有するか否かによって分けられ、これによって分けられた4つのカテゴリーごとに必要とする基本的な安全性評価スキームを提案した内容となっている。(次ページのスキーム図参照)

<カテゴリー区分>

工業用原材料としてのナノマテリアル	化粧品用途を含む	①
	化粧品用途を含まない	②
ナノマテリアルを使用した消費者製品	化粧品用途を含む	③
	化粧品用途を含まない	④



個々のカテゴリー毎に合理的な評価試験スキームを提案

今回提案されたスキーム例の妥当性はまだ認証されていないが、ナノマテリアルの安全性評価のための手法を定めるに当たっての一助となるものであるとしている。

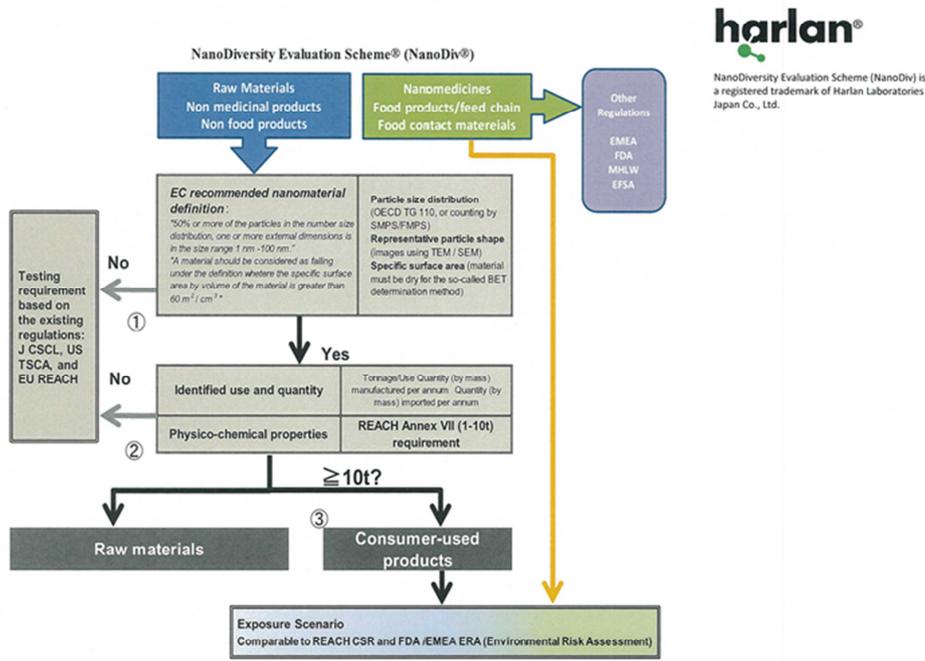


Fig. 1 NanoDiv® used the EC definitions of MNs, and employed a low-volume exemption (10t). In cases where the low-volume exception value exceeded 10t, the process moved on to the next step (3) in Fig. 1 and Fig. 2

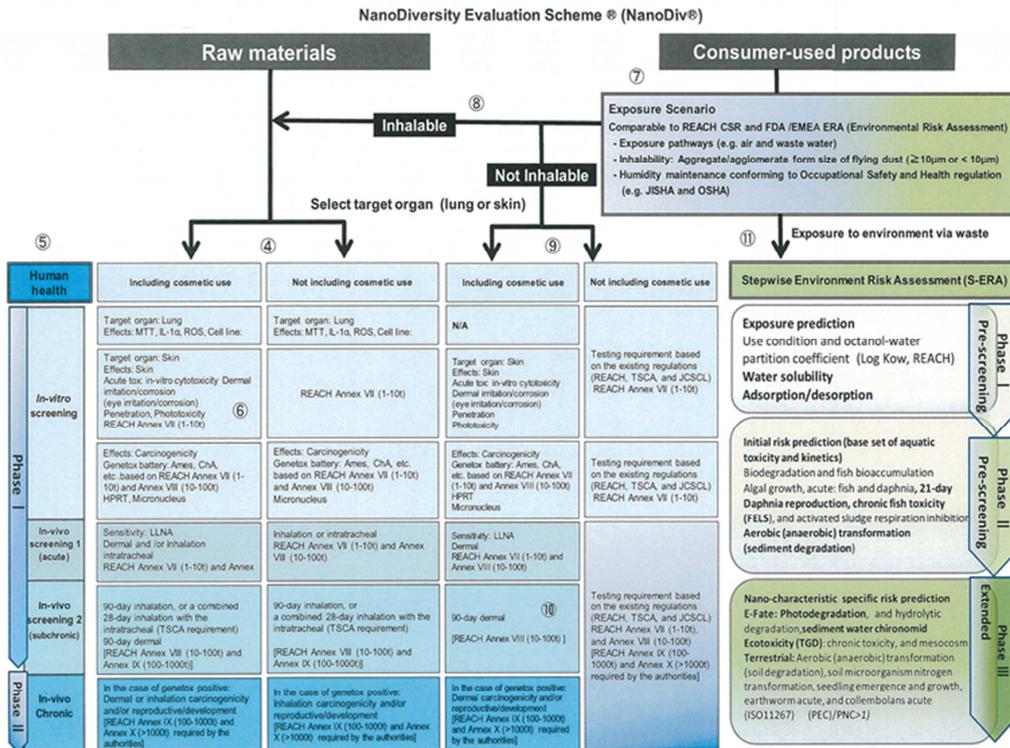


Fig. 2 NanoDiv® consists of two categories: Raw materials and Consumer-used products. Both need to clarify cosmetic usage and inhalability. Raw materials have to be classified as inhalable. Consumer-used product automatically requires Exposure scenario.

harlan®
NanoDiversity Evaluation Scheme (NanoDiv) is a registered trademark of Harlan Laboratories Japan Co., Ltd.

g) ナノカーボンの物性と応用可能性および工業化における安全性指針

信州大学工学部 特任教授 鶴岡秀志

前半は、カーボン素材の開発や今後の用途展開の可能性として、グラフェンとカーボンナノチューブのハイブリッドや、液体カーボンなど、ナノカーボンを使った新素材が数多く生み出されていること、また用途としてナノカーボン半導体の可能性やリチウムイオン電池及び電気二重層キャパシタへの応用(極材への添加による容量や寿命性能のアップ)、シェールガスの掘削ホースに使われるラバーシールへの応用(ゴムにCNTを添加することで高耐熱(260°C)、高耐圧(239MPa)を実現)など、今後の需要拡大が期待される用途にカーボンナノ素材が使われることが例示された。

後半は、CNTの安全性指針の面から、CNTから発生する活性酸素による評価手法が説明された。活性酸素の中のOHラジカルは生物学的に有毒であることがわかっており、各種CNTから発生する活性酸素の測定結果、多種類のCNT(単層/多層、長さの違いなど)におけるOHラジカル捕集率の結果が提示された。結果として、活性酸素の測定は、簡易評価手法として有用であると考えられるという内容であった。

(3) nano week 2013

1) 学会、シンポジウムの概要

ア) 名称

nano week 2013「ナノテクノロジー国際標準化ワークショップ ナノバイオテクノロジーと標準化」

*nano week 2013 は、nano tech 2013(第 12 回国際ナノテクノロジー総合展・技術会議)の開催期間中(2013 年 1 月 29 日～2 月 1 日)に同時開催されたものであり、16 種類のシンポジウム、セミナー等が開催された。その中でナノマテリアルの安全対策の検討に関わる「ナノテクノロジー国際標準化ワークショップ ナノバイオテクノロジーと標準化」のシンポジウムに参加した。

イ) 開催期間、開催場所

開催期間:2013 年 2 月 1 日(金) 13:30-16:30

開催場所:東京ビッグサイト(東京都江東区)

ウ) 主催

独立行政法人 産業技術総合研究所、ナノテクノロジー標準化国内審議委員会

エ) 参加者数

参加人数:約 100 名

オ) プログラム

- ・「ナノテクノロジー国際標準化の動きについて(2012 年活動報告)」(竹歳尚之 ISO/TC229 国内審議委員会 幹事)
- ・「ナノマテリアルの開発動向と安全性評価」(堤康央 大阪大学薬学部 教授)
- ・「Challenges facing standardization in the field of Nano Biotechnology ナノバイオテクノロジーにおける標準化の挑戦」(Dr.Simon Holland (Chair of ISO/TC229(Nanotechnology),GSK)
- ・パネル討論「ナノバイオテクノロジーの開発と標準化」

2) ナノマテリアルの安全性、ばく露、試験法等に関する議論の概要

本学会での講演のうち、安全性、ばく露、試験法等、ナノマテリアルの安全対策を検討する上で重要な講演についての概要を以下に示す。

a) 報告「ナノテクノロジー国際標準化の動きについて(2012 年活動報告)」

竹歳尚之 (ISO/TC229 国内審議委員会 幹事)

2012年6月14日～18日にイタリアのストレーザでの会合の報告を行った。

ISO/TC229におけるワーキングは全部で4つとなっており、JWG1が「用語」、JWG2が「計測」、JWG3「安全」、JWG4「材料」となっており、イタリアの会合では30か国180人が参加したとの報告があった。

今回の会合のポイントの一つは、ナノマテリアルのラベリング規格(ナノマテリアルが入っているということを表示する規格)についての議論が始まったことであるとしている。

以下、4つのワーキングの会合の内容についての報告がなされた。

○JWG1(用語)

- ・4つの新しい用語が提案
- ・CNTに関する用語の Systematic review が始まる
- ・IUPAC との協業

国際純正・応用化学連合: International Union of Pure and Applied Chemistry

○JWG2(計測)

- ・韓国や中国においてポテンシャルアイテムが増えている
- ・ナノの粒子を TEM で計測する勉強会に日本も参加する

○JWG3(安全)

- ・提案する規格の品質を上げていく活動として独自のチェック項目に基づいて設定する
- ・ラベリングについての議論
- ・NEDO で行っているナノの安全性について発表した

○JWG4(材料)

- ・2つのアイテム、SAC(CaCO₃,TiO₂)について出版プロセスが承認された
- ・日本からの提案しているアイテム(WG4/PG6(Generic))についても承認された

※PG6は、TS 17200 粉末状態のナノ粒子:特性と測定

その他、2012年で発行されたアイテムは全部で12件に上ったこと、今後のスケジュールとしては、3月にメキシコで開催されることが報告され、会合のタイミングはこれまでの6か月に1回から9か月に1回になりつつあるとしている。ただし、審議案件も増えているので、Webミーティング等により適宜行うようになっているとのことである。

b) 招待講演「ナノマテリアルの開発動向と安全性評価」

大阪大学薬学研究科 堤 康央

同氏の基本的な考え方は、ナノマテリアルは、近年、危ないものというイメージが出ているが、危ないものを排除していくのではなく、「安全なものを見つけて活用していく」がモットーと考える。

最近は、1-10nm のサブナノ材料が登場しており、ナノバイオの世界においても新たな動きが始まっている。特に、ナノメディシンは、有用であるのは当たり前、安全性がより重要になるとともに安全性を確認し、確保していくことが先進国としての役割と考える。

今後、ナノ材料を産業界において活用していくためには、ナノ材料のリスクを回避し、訴えるのではなく、安全なナノ材料を作っていくこと、安全性評価に基づいて選別し、安全なものから使っていくこと、そして、不安なものは、安全なものに仕立てていくことが重要であると考ええる。

そのためには、ナノ材料の情報、安全性確保、社会的受容の醸成が必要であり、これらは、産官学の連携なくしては成立しないと考える。

次に、具体的な安全性評価の事例をいくつか発表しており、その中の 1 例を紹介する。

[非晶質シリカ、サブナノ白金、サブナノ銀を用いた安全性評価の実験結果について]

ナノ材料に対する安全評価の質問として多いのが、「NM や SNM は接触部位から体内に吸収されるのか?」、「リスクが出るのかどうか?」というものであるが、現在、吸収、代謝、排せつメカニズムは解明されていない。

実験結果の事例として、マウスを使った実験では、100nm 以上のナノ材料は、経皮吸収は見られなかったが、100nm 以下になると真皮層を經由してリンパ節まで到達するという結果が得られた。また、長期ばく露試験では、100nm 以下は、脳のグリア細胞まで到達するという結果が得られた。

鼻から吸ったナノ材料の実験では、100nm 以上は臓器への取り込みはないものの、100nm 以下のウイルスよりも小さいサイズになってくると微量ではあるが、遠隔組織となる肝臓や脳など全身に到達することが確認された。

そのため、我々としては、動態の定量解析が今後重要と考えると結論づけている。

続いて、静脈投与と経口投与の違いについての説明を行った。詳細は割愛するが、結果として、物質とそのサイズによって吸収されたり排せつされたりと違いが出ている。特に、SNM については、細胞内に入り込むという結果が得られている。

また、毒性試験や免疫試験の状況、生殖毒性についての試験結果についても発表されたが、生殖毒性については、サイズが小さい SNM になると胎児にまで影響が出ることが確認されているとしている。

上記のような、安全性評価に対するひとつの結論として、安全なナノ材料に向けた開発について、その多くが表面修飾されていることから、表面修飾をより適切に施すことによってリスクが回避され、安全性が高まると考える。なお、表面修飾については、今後、生体タンパク質との相互作用の解析が重要となってくるとしている。

最後に、ナノメディシンとしてのフラレンについての取り組み事例が発表された。

フラレンは高度に安全性が担保されていると認識していることから、ナノメディシンとして炎症性腸疾患に対して効果的と考えている。

C₆₀ は凝集性が高く扱いが大変であるが、水酸化することでほとんど毒性を示さず、かつ分散性が高く、抗酸化活性が高いことから in vivo の治療結果を見ても有効であることを確認している。

講演後、会場から出された質問とその回答は以下の通り。

[質問1]: ナノマテリアルの脳内移行について

我々の実験で、シリカは脳内移行が見られたが、Pt、Ag は、十分なデータないため今後課題となっている。粒径の問題かということだが、これについては、十分なデータはない。例えば、100nm 以下で言えば、ディーゼルの排ガスでは、子供の脳にまで移行するというデータもあることから、粒径は大きなファクターと考えられる。

[質問2]: ナノマテリアルの核内への移行について

核内移行や脳内移行のメカニズムは現状、全く分かっていないため、今後の課題である。

[質問3]: 表面修飾について

表面修飾では、実は体内動態はほとんど変わらない。何をどのように修飾するかで異なるが、シリカは肝臓への変化はないが、表面修飾によって核内移行したり、細胞の表面には付くが中には入らないといった違いがあり、こうした違いが毒性の違いになると考えている。

[質問4]: 体内動態とナノマテリアルの量との関係について

微量か大量かで違うのかという問いでは、シリカは、量に寄らず約8割が肝臓に移行する。最も大事なのは蓄積性だと思っていて、移行しても排出されれば安全と考えるので、我々はいかに排泄させるかというテクノロジーを作っていくことが課題である。

[質問5]: DDS を考えた時の体内残存性と安全性確保のための修飾との関係について

ナノマテリアルにおいて食品と医薬の安全性の考え方は違う。ナノメディシンの場合は、少々リスクがあっても、それを上回るメリットがあればそれで良いと思っている。

例えば、シリカで言えば、肝臓に残るということは、考え方によっては肝炎を治療する目的であれば、それは DDS のベネフィットにもなるので、ケースバイケースと考えている。

同氏の用意した講演に先立っての挨拶文は以下のとおり

[講演要旨]

「ナノバイオテクノロジーの開発と標準化」～ナノマテリアルの開発動向と安全性評価～
大阪大学薬学研究科

(独)医薬基盤研究所

堤康央

【要旨】

近年、ウイルスと同等サイズのコロイドナノ材料(NM:粒子径 100nm 以下)に加え、遺伝子・蛋白質と同等サイズのサブナノ材料(sNM:1~10nm 範囲)までもが開発・実用化され、我々は、これらに対する意図的・非意図的なばく露を避け得ない状況となってきた。しかし未だ、NM・sNM の安全性については、ハザード情報でさえ不十分であり、リスク解析に必須のばく露実態(動態 [ADME]:吸収性、その後の分布、代謝、蓄積・排泄といった細胞内・体内挙動)情報に至っては皆無に等しい。

さらに、粒子径・形状・表面性状・分散/凝集状態などの物性・品質によっても、NM・sNM に特有の性能(有用性/有効性や安全性/毒性)が変動し得ることが理解されつつあるにも関わらず、化審法などにおいても、NM・sNM には殆ど言及しておらず、主として NM・sNM を構成する化学物質の構造式(物質名)で規制せざるを得ない。

一方で、我が国の圧倒的な強みである「有用な NM・sNM の開発と実用化」を活かし、社会や産業界がその恩恵を最大限に享受していくことは、今後の最重要課題となっている。

従って、NM・sNM の安全性評価(ADMET の理解)と安全な NM・sNM の利用促進、安全性に懸念が残るものは安全なもの仕立てあげていくことが、まさにキーポイントとなっており、ヒトの健康確保と社会受容の促進(ナノテクの社会還元)の両方が急がれている。本観点から我々は、種々 NM・sNM の物性・品質を解析すると共に、リスク解析基盤となる細胞内・体内動態と一般毒性・特殊毒性を定性・定量解析し、物性-動態-安全性の連関評価に資するナノ安全科学(Nano-Safety Science)研究を推進してきた。

これら情報は、別の視点から眺めると、安全な NM・sNM を粒子設計するための Nano-Safety Design(ナノ最適デザイン)研究にもインパクトを与えるものであり、Sustainable Nanotechnology(安全・安心に持続的に社会受容されるナノテク)研究の 1 つと位置付けられる。

本発表では、以上についての我々の取組についてオムニバス形式で、時間の許す限り、ご紹介させて頂き、ご批判、ご意見を賜りたい。

c) 基調講演「Challenges facing standardization in the field of Nano Biotechnology」ナノバイオテクノロジーにおける標準化の挑戦

Dr.Simon Holland (Chair of ISO/TC229(Nanotechnology),GSK

ISO/TC229 の議長でもある Simon 氏より、以下の 4 つのテーマについて基調講演が行われた。

1. ナノバイオについて何故標準化するのか
2. ISO についての解説
3. ナノバイオメディシンの定義

4. ナノバイオ標準化における課題

1. ナノバイオの標準化については、標準化することで開発がより進み、新たな技術や製品の登場、また、参入障壁が低くなり、市場における需要が促進されるといったメリットがある。

2. ISO については、組織の成り立ちやナノマテリアルに関する ISO/TC229 の組織や WG 毎の活動状況等についての発表があった。

3. ナノバイオやナノメディシンについては、現在、様々なナノマテリアルが DDS 向けの材料として開発が進んでいること、しかし、実際市場に出回っている製品は 100nm 以上であることから、ナノメディシンを単に小さくなった物質として定義して良いのかという問題を提起した。

ISO の標準化委員会では、ナノマテリアルの物理学的定義として、「ナノサイズの外形寸法や内部構造、表面構造を持っていること」、「サイズとしては、約 1~100nm」としている。

一方、欧州委員会においては、1~100nm の粒子が 50%以上含まれているものをナノマテリアルと定義している。

同氏によれば、既に使用されている特殊なナノ構造の医薬品や医薬デバイスの優位性を考えると、「ナノ」という用語を使うことは、欧州委員会で勧告している定義を何ら妨げるものではないとしている。また、米国 FDA が「ナノテクノロジー」、「ナノマテリアル/ナノスケールマテリアル」、「ナノメディシン」について定義しているが、範囲が広く、決して満足できるものではないという点、さらに、「ナノテクノロジー」と「バイオテクノロジー」は融合するはずであり、無用に新しい用語を作る必要はないとしている。

4. ナノバイオの課題については、以下の5つであるとしている。

- ①適切な計測方法が確立されていない
- ②ナノバイオのばく露に対する健康や環境への影響における知識の欠如
- ③ナノテクノロジーをベースとした新たなマーケット
- ④規格化や標準化における企業の積極的な参加
- ⑤ナノテクノロジーの開発企業の多くが中小企業(ナノの上市に関する要件を理解していないため上市に苦勞する)

その他にも、ナノバイオについての開発や使用における課題が話された。

ISO とナノバイオとの関係では、昨年の会合においても「ナノメディシンの定義」や「ナノ製品のラベリング」、「ライフサイクルマネジメント」について議論しているが、特に、「ラベリング」については、世界的に大きな注目を集めており、次回のメキシコでの会合における進捗状況の発表に注目している。

講演後、会場からの以下のような質問が出された。

○欧州委員会の定義について、具体的な事例に対する考え方を聞かれ、欧州委員会の定義は不適格であるという考えを述べた。

○欧州委員会の定義の中にある50%以上の根拠についての質問に対して、まだ、審議中であり、今後アップデートしていただろうと述べた。

d) パネル討論「ナノバイオテクノロジーの開発と標準化」

以下のメンバーによるパネル討論が行われた。

湯元 昇(モデレーター) 産総研理事「ライフサイエンス」

Simon Holland GSK, ISO/TC229 国際議長

堤 康央 大阪大学薬学部 教授

阿部 修治 ISO/TC229 国内審議委員会 用語命名法合同分科会主査

蒲生 昌志 産総研安全科学研究部門グループリーダー

加藤 くみ子 国立医薬品食品衛生研究所 薬品部 室長

パネル討論から参加の湯本氏、阿部氏、蒲生氏、加藤氏より、自己紹介を兼ねた自身の研究内容等についての概要が発表された後、モデレーターである湯本氏の質問に対して討論を行った。

質問(1): ナノテクとバイテクの違いについて

「2つのアプリケーションは近づいてきているので違いはない」(Holland氏)や「工業用ナノマテリアルは機能的に比較的単純だがナノバイオは非常に複雑」(湯元氏)、「問題はコミュニケーションギャップを無くしていくこと」(阿部氏)等の意見が出された。

質問(2): ナノバイオの標準化の問題点

「共通の言語と理解が大事」(Holland氏)、「用語の定義が大事」(阿部氏)といった意見が出された。

質問(3): 工業用ナノとナノバイオの安全性評価の違い

「現状は、工業用ナノのリスク評価や計測について議論があるが、ナノバイオは毒性と薬効の両方を生体に対して評価する必要がある」(蒲生氏)、「ナノは現在全てダメ、というような論調があるが、使われ方によって基準を決めていくことが重要である」(堤氏)

質問(4): 100nm を境に特性が変わるが別々に議論すべきか

「体内動態を考えると、100nm 以上のウイルスサイズはそもそも生体の持つ免疫特性があるので良いが、10nm 以下になると細胞に入っていくという特徴もあるのでサイズ別に評価して体内動態についてクリアにしていくことが必要」(堤氏)

質問(5): 食品と医薬品用途の違いについて

「食品や医薬品については、FDA からガイドラインが出されているが、双方とも Characterisation と体内動態がポイントであるため評価が共通している部分もある」(加藤氏)、
「コスメティックス(化粧品)」と「ファーマシューティカルズ(製薬・医薬品)」という言葉を合わせた造語で「コスメスーティカル」という言葉がある、化粧品でもサイズが 10nm 以下になると皮膚を通過してしまう、そうすると医薬品になってしまう。また、EU においては、化粧品のラベリングにおける規制が存在している」。医薬品の場合は、ナノマテリアルそのものよりも、ナノマテリアルを使う影響の方が重要と考えている。イギリスにおいても、当局が製薬メーカーに対して、厳しい規制を課していることを考えると、よりナノマテリアルの使用に対しては、厳しい規制が必要である。また、化粧品や医薬等用途が増えると定義自体が増えてしまう可能性があるため、ナノマテリアルの定義については、なるべくその範囲を狭める方向で議論すべきと考える。(Holland 氏)