

2. ナノマテリアルの安全性、試験法等に関する文献調査

2. 1 調査方法

(1) 検索方法

① 使用データベース

MedLine を使用した。

② 検索期間

2013/1/1～2013/12/31 (出版年月日を基準とした)

③ 検索式：

表 2-1-1 に示した。

④ 手順

- ・上記の検索式で得られたもの文献リストの書誌事項及び抄録を出力した。
- ・その中から、医薬関係あるいは食品関係のものを除き、次いで、速報など実験項等が詳しく記されていないと思われるようなものを除き全文を出力した。さらに内容確認後、最終的に 79 報を選択した。その内容の分類を表 2-1-1 に示した。
- ・なお、これらの報文については、特にナノマテリアルの性質及びその調製法についての記載の有無と概要が分かるように要約を (2) 各論の項でまとめた。

表 2-1-1

内容	検索番号	検索式
ナノマテリアル	S1	S nanomaterial OR nanoparticle OR nanosized OR ultrafine OR nanostructure OR subnanosize OR nano?(W) (particle OR material OR size? OR structure)
安全性	S2	S carcinogenicity or toxicity or cytotoxicity or toxicology or biochemical (W) activity or biological (W) activity or biological (W) interaction or biocompatibility
フラーレン	S3	S fullerene? ? or C60 or C70
カーボンナノチューブ	S4	S carbon (W) nanotube? ? or single (W) wall? ? or carbon (W) nanotube? ? or SWNT or SWCNT or multiwall (W) carbon (W) nanotube? ? or MWNT or MWCNT or carbon (W) nanohorn? ?
チタン	S5	S titanium (W) dioxide? ? or titanium (W) oxide? ? or TiO2
酸化亜鉛	S6	S zinc (W) oxide? ? or ZnO
シリカ	S7	S silica or silicon (W) oxide? ? or silicon (W) dioxide? ? or SiO2 or amorphous (W) silica
銀	S8	S silver or nanosilver or AG
グラフェン	S9	S graphene? ? or graphite? ?
プラチナ	S10	S platinum or PT or colloidal (W) platinum
金	S11	S gold or aurum or AU or colloidal (W) gold
亜鉛	S12	S zinc or Zn
クレイ	S13	S clay OR nanoclay
セルロース	S14	S cellulose OR nanocellulose
	S15	S (S3+S4) AND S2
	S16	S ((S5+S6+S7+S8+S9+S10+S11+S12+S13+S14) AND S1 OR (nanosilver OR nanoclay OR nanocellulose OR nano?(W)silver OR nano?(W)clay OR nano?(W)cellulose)) AND S2
	S17	S (S15+S16) AND PY=2013
	S18	S S17 AND DT=JOURNAL ARTICLE
	S19	S S18 NOT DT=REVIEW?

2. 2 検索結果概要

(1) 調査論文の分類

上記、検索式によって得られた論文数は 633 件であった、そのうち、ドラッグデリバリーシステム、医療における診断に関連したテクノロジーに関するものが多数を占めた。それら医療に関連する文献を除き、残りの論文のタイトル及び要旨のキーワード検索でその全体像の内訳を調べたところを以下に示す。

全体的にはナノカーボン関連の文献が非常に多く全体の 4 割を占めた。とりわけカーボンナノチューブに関する論文が多く、その関心の高さを表している。次に、二酸化チタン、銀、シリカ、酸化亜鉛の順であった。現実の使用量を考慮すると、酸化チタン、シリカ、酸化亜鉛が多いのは当然だが、ナノ銀については使用量に比べ文献数が多く、安全性に対する関心が高いと思われる。一方、今回新たに取り上げたナノクレイやセルロースの安全性に関する文献は非常に少なかった。そのため、今回セルロースについては多少古い文献も加えた。セルロースは天然由来のナノマテリアルであり、安全とのイメージがあるが、注目される新しいナノマテリアルでありその研究開発が進むと同時に、今後は実際の研究を通してその安全性を証明する必要がある。

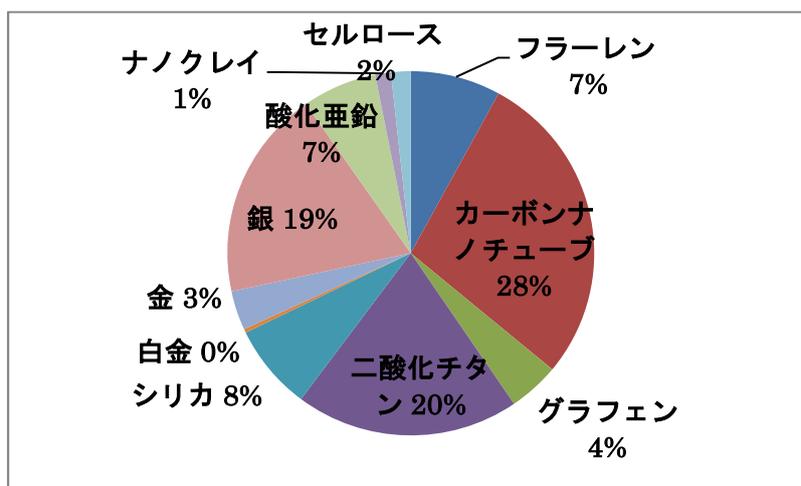


表 2-2-1 に選択した文献の内容分類を示す。ナノセルロースに関する文献は少なかったが、今回、初めて取り上げたため、2013 年以前の文献も含め調査対象とした。

表 2-2-1

ナノマテリアル	in vivo							In vitro	環境生物	合計
	吸入	気管吸引	静注	鼻腔	腹腔	経口	その他			
フラーレン	1		1						3	5
MWCNT	6	4	1		1			6	1	19
SWCNT								7	3	10
グラフェン								1		1
酸化チタン	1	3	1	1				9	6	21
ナノシリカ	1			1	1			3		6
ナノ銀	3	1						1	4	10
ナノ金	1							1	1	3
酸化亜鉛		1						3	3	7
ナノセルロース							1	3		4
ナノクレイ								1		
合計	13	9	3		2	1		35	21	84

全 79 文献の分類。重複があるため合計数が 79 を超えている。

(2) 各論

1) フラーレン

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法 /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	UKKA PAKARINEN, ELIJAH J. PETERSEN, LEILA ALVILA, GRETA C. WAISSI-LEINONEN, JARKKO AKKANEN, MATTI T. LEPPÄNEN, and JUSSI V. K. KUKKONEN nvironmental Toxicology and Chemistry, Vol. 32, No. 6, pp. 1224- 1232, 2013	A SCREENING STUDY ON THE FATE OF FULLERENES (nC60) AND THEIR TOXIC IMPLICATIONS IN NATURAL FRESHWATERS (フルラーレン (nC60) の運命に関するスク リーニング試験及び 天然水におけるその 毒性の影響)	<p>■対象物質 クリスタリン C60 フラ ーレン (98%) 入手元 シグマアル ドリッチ</p> <p>■試料調製法 フルラーレン 100mg/L を 4 種類の湖から採取し た天然水中で 4 週間、 遮光しながらスター ラーにて懸濁した。</p> <p>■試験用量 0.05、0.1、0.2、2、5、 10 mg/L</p>	<p>■試験生物 オオミジンコ</p> <p>■試験方法 ・運動抑制試験 (投与用量 0.05、0.1、 0.2、2、5、10 mg/L) ・蓄積試験 (投与用量 0.05、0.2 mg/L)</p> <p>■投与期間 0、24、48 時間</p>	<ul style="list-style-type: none"> ・フルラーレンはいずれの天然水においても、最初の数日間に堆積が見られたが、水中における安定的なフルラーレン濃度はサンプル間で差異が見られた。 ・nC60 と水中に溶解している物質 (DNOM) のアグロメレートサイズは水によって異なり、3 種の水では 235nm であったが、1 種の水においては 1000nm 以上であった。 ・オオミジンコの運動抑制に対する EC50 はいずれの水においても得られず、EC20 も信頼できる値が得られなかった。 ・フルラーレン処理をした水中において、運動抑制を受けるオオミジンコの数はわずかに増加していた。 ・毒性試験の期間中にフルラーレンの水中濃度は低下し、スタート時の濃度の 5 倍低くなったが、この変化はいずれも有意ではなかった。 ・フルラーレンの蓄積量は、各水の種類によって異なり、フルラーレン投与用量が多いほどその差異は大きかった。 ・各水においてフルラーレン投与用量に相関して蓄積量も増加していたが、Lake Kuorinka においてのみ有意差が得られた。 ・フルラーレン投与用量 0.05 mg/L において、いずれの水の堆積量も有意差は得られなかったが、0.2 mg/L においては Lake Kuorinka と他 2 湖の間に明確な差が見られた。 	<ul style="list-style-type: none"> ・天然水に溶解したフルラーレンは 1 年後も安定であった。 ・水中における安定性は、水質と、元来溶解している物質 (DNOM) の分子サイズに影響を受けた。 ・フルラーレンによって運動抑制を受けたオオミジンコは 20%以下で、投与用量によって大きく変化した。 ・急性毒性試験期間中(例として 48 時間)に、相当量の堆積が見られた。 ・0.5 mg/L のフルラーレンの堆積はいずれの天然水でも違いは見られなかったが、2 mg/L のフルラーレンでは違いが見られた。

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法 /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	JASON W. KELSEY, and JASON C. WHITEz	EFFECT OF C60 FULLERENES ON THE ACCUMULATION OF WEATHERED p, p'-DDE BY PLANT AND EARTHWORM SPECIES UNDER SINGLE AND MULTISPECIES CONDITIONS (単種及び複数種の 存在下で、植物及びミ ミズにより風化した p, p-DDE の蓄積におけ る C60 フラーレンの影響)	<p>■対象物質 p, p'-DDE o, p'-DDE 入手元 ChemService C60 フラーレン 入手元 VWR International</p> <p>■試験用量 0、50 mg (1670 ppm)</p> <p>■試料調製法 30gの空気乾燥した土 壌に乾燥粉末状のフ ラーレンを加え混和。</p>	<p>■試験生物 ペポカボチャ</p> <p>■投与方法 土壌混入</p> <p>■試験期間 21日若しくは21日+17 日(ポストプラント+フ ラーレン、若しくはフ ラーレン無しの処置群は、 21日後にミミズを添加 し、更に17日育生)</p> <p>■試験方法 DDE濃度の測定</p>	<p>・DDE及びC60は、植物及びミミズの生存率、又はバイオマスに 影響を及ぼさなかったが、フラレンでは相対的根量の有意な 減少が見られた(29.6-39.0%)。</p> <p>単種若しくは複数種の存在下において、各々の種族におけるDDE の生物濃縮にわずかに影響を及ぼした。</p> <p>・非フラレン暴露群の新芽、根、及びミミズのDDE濃度は、 それぞれ181、7400及び8230 ng/gであった。フラレン暴露 群ではDDE濃度は有意に低下し、それぞれ・163、7280、及び7540 ng/gであった。</p> <p>・ミミズの存在下では、新芽のDDE含量は有意に低下(28.6%) したが、根の含量に変化は見られなかった。</p> <p>根のDDE含量はフラレンの存在による影響は見られなかった が、ミミズと共生している期間は21.6%から37.5%に減少した。 ミミズのDDE含量は植物存在下で減少した。</p> <p>・植物の生育後の土壌に添加したミミズではより多くのDDEが 蓄積していたが、C60の暴露による影響はなかった。</p>	<p>フラレンは土壌におけ る風化した汚染物質の生 物濃縮に対して大きな影 響を与えない。</p>

2) 単層カーボンナノチューブ

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/ 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	Hemang J. Patel and Soonjo Kwon Journal of exposure science & environmental epidemiology, 23(1), 101-8 (2013)	Length-dependent effect of single-walled carbon nanotube exposure in a dynamic cell growth environment of human alveolar epithelial cells (ヒト肺胞上皮細胞の動的細胞増殖環境における単層カーボンナノチューブ暴露の長さ依存的影響)	<p>■対象物質 単層カーボンナノチューブ (SWCNT)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・短 SWCNT ・長 SWCNT <p>入手先: Cheap Tubes, VT)</p> <p>サイズ</p> <ul style="list-style-type: none"> ・短 SWCNT—長さ: 0.5 ~ 2 μm, 外側直径: 1 ~ 2nm, 内側直径: 0.8 ~ 1.6nm ・長 SWCNT—長さ: 5 ~ 30 μm, 外側直径: 1 ~ 2nm, 内側直径: 0.8 ~ 1.6nm <p>■試験用量 5, 10, 20 μg/ml</p> <p>■溶媒・調製</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ストック溶液: 脱イオン水懸濁 10.08mg のポリビニルピロリドンを追加して 30 分間超音波処理 ・試験時: ストック溶液を培養液に添加 	<p>■試験生物 A439 細胞 (ヒト II 型肺胞基底上皮細胞)</p> <p>■投与方法 培養液に添加</p> <p>■試験方法</p> <ul style="list-style-type: none"> ・静的培養条件、及び動的培養条件 (細胞に周期的等二軸変性を与える培養細胞伸展装置 (Flexcell International) を用いた培養) 下で対象物質を添加し、細胞増殖への影響を比較: BCA 総タンパク質アッセイ ・IL-分泌量測定: ELISA 法 ・活性酸素種 (ROS) レベルの測定: 脱アセチル化プローブ 2', 7'-ジクロロフルオレセインに基づく蛍光アッセイ 	<p>■細胞増殖への影響</p> <ul style="list-style-type: none"> ・A549 細胞の増殖は、動的培養条件の方が静的培養条件より有意に高かった。 ・短 SWCNT 添加では、いずれの条件においても、24 時間後では増殖が上昇したが、48 時間及び 72 時間では減少した。48 時間及び 72 時間では、動的培養条件の方が静的培養条件より有意に高かった。 ・長 SWCNT 添加では、すべての添加濃度及びいずれの培養条件においても、24 時間後に増殖が減少したが、48 時間、72 時間後では増加し、48 時間では、コントロール及び短 SWCNT 添加に対し有意差が認められた。 <p>■ROS 産生誘導への影響</p> <ul style="list-style-type: none"> ・増殖条件の違いによる ROS レベルの相違は認められなかった。 ・静的培養条件では、短 SWCNT の添加濃度及び添加時間に依存して ROS 産生の誘導が増加し、20 μg/ml、72 時間の添加では、有意差が認められた。 ・長 SWCNT 添加では、いずれの培養条件においても、24 時間で有意な ROS 産生の誘導が認められ、その後 72 時間まで減少した。静的培養条件での ROS レベルは、48 時間及び 72 時間において、動的培養条件より有意に高かった。 ・動的培養条件での 24 時間添加では、長 SWCNT の ROS 誘導レベルは、短 SWCNT より有意に高かった。 <p>■IL-8 産生に及ぼす影響</p> <ul style="list-style-type: none"> ・いずれの培養条件においても、72 時間で、IL-8 産生が認められた。 ・短 SWCNT 添加による IL-8 発現への有意な影響は、いずれの濃度においても認められなかった。 ・いずれの培養条件でも、長 SWCNT のすべての添加濃度で、IL-8 発現の有意な亢進が認められた。 ・動的培養条件における長 SWCNT 添加の 48 時間及び 72 時間での IL-8 発現は、すべての添加濃度において、静的培養条件及びコントロールより有意に亢進した。 	<ul style="list-style-type: none"> ・動的環境は、SWCNT と A549 単層細胞との相互作用の変化を促進した。 ・動的条件における細胞の反応は、静的条件とは有意に異なっていた。 ・SWCNT に対する細胞の応答は、細胞増殖の静的及び動的条件のいずれにおいても、SWCNT の長さに依存していた。

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/ 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	Cyrill Bussy, Erwan Paineau, Julien Cambedouzou, Nathalie Brun, Claudie Mory, Barbara Fayard, Murielle Salomé, Mathieu Pinault, Mickaël Huard, Esther Belade, Lucie Armand, Jorge Boczkowski, Pascale Launois and Sophie Lanone/ Particle and Fibre Toxicology 2013, 10:24	Intracellular fate of carbon nanotubes inside murine macrophages: pH-dependent detachment of iron catalyst nanoparticles (マウスマクロファージ内部のカーボンナノチューブの細胞内運命: 鉄触媒ナノ粒子の pH 依存的脱離)	<p>■対照物質 単層カーボンナノチューブ (SWCNT) 3 種 ・1 種は HiPCO 法により作成 ・2 種は Carbon Nanotechnologies Incorporated より購入 直径 0.8-1.2 nm 長さ 100-1000 nm</p> <p>■試料調製法 250 $\mu\text{g/mL}$ で培地に懸濁した後、30 秒回転させ、20 分間超音波破碎 (毎 5 分毎に 15 秒間欠)。暴露直前に血清フリーの培地に適宜希釈した。</p> <p>■試験用量 50 $\mu\text{g/mL}$</p>	<p>■試験生物 マウスマクロファージ細胞株 RAW 264.7</p> <p>■試験方法 X 線回析 (XRD) 高解像度透過電子顕微鏡法 (HR-TEM) 高角度散乱暗視野 (HAADF-STEM) 電子エネルギー損失分光法 (EELS) 熱重量分析 シンクロトロンに基づくマイクロ蛍光試験 (μXRF) アポトーシス測定 (アクリジンオレンジ染色) カテプシン活性測定 ウエスタンブロット解析</p>	<ul style="list-style-type: none"> ・ HAADF-STEM 及び HRTEM で得られた像から、鉄からなる小胞 (1-10 nm) が CNT の側壁にあるナノ粒子中に存在する様子が確認された。 ・ SWCNT を暴露した細胞において、鉄は内在性鉄に起因する P シグナルの他、境界外、若しくは細胞外において、CNT の存在に起因する部位に特異的に豊富に存在することが検出された。 ・ HAADF-STEM の結果、SWCNT が小胞内に束状に存在し、CNT に沿ってナノ粒子が接着している明確に確認された。 ・ SWCNT を暴露した細胞の細胞質及び核の画像を EELS 回析によって解析すると、どちらにおいても脱離した鉄ナノ粒子が見られた。 ・ CNT サンプルの調製中は粒子の鉄触媒の脱離は見られず、細胞との相互作用によって引き起こされることが推測された。 ・ 脱離した鉄粒子は主に細胞質に局在しているが、24 時間後には核内に観察され、時間経過に伴い脱離した粒子も増加が見られた。 ・ SWCNT を暴露後、細胞内のマクロファージカテプシン B 及びグリコプロテイン 1 の 2 緩いのリソソームタンパク質の発現増加によってファゴリソソームが形成され、マクロファージの酸性化を引き起こした。 ・ 細胞内の酸性化を阻害してもマクロファージによる CNT の取り込みは阻害されないが、核及び細胞質の鉄ナノ粒子の脱離の総数は減少したことから、ナノ粒子の脱離と小胞外への放出は pH の酸性化が関連している。 ・ 酸性化の阻害は、CNT によって引き起こされる p53 及び H2AX タンパク質のリン酸化からの保護を伴い、これらは DNA 損傷プロセスの開始マーカーであることから、pH の酸性化はマクロファージを CNT 暴露による核の損傷から保護していることが示唆された。 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 鉄ナノ粒子の急速な部分的脱離は、まず細胞質のフリーな鉄の SWCNT やマウスのマクロファージに暴露された CNT の核に接着する。 ・ 細胞内リソソームの酸性化の妨害は、CNT 束からの鉄ナノ粒子の脱離を阻害し、CNT のダウンストリーム毒性から細胞を保護した。 ・ 本試験の結果は他の触媒を含むナノ材料にも適用することができると思われ、CNT の毒性についての解釈、理解に至る新たな方法である。

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/ 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	Ping-Xuan Dong, Bin Wan, Zi-Xia Wang, Liang-Hong Guo, Yu Yang & Lixia Zhao/ Nanotoxicology. August 2013; 7(5):1028-1042	Exposure of single-walled carbon nanotubes impairs the functions of primarily cultured murine peritoneal macrophages (単層カーボンナノチューブの暴露によって損なわれるマウス腹腔マクロファージ初代培養細胞の機能)	<p>■対象物質 単層カーボンナノチューブ (SWCNT) 入手元 Chengdu Organic Chemicals Co., Ltd. 酸性単層カーボンナノチューブ (AF-SWCNT)</p> <p>■試料調製 c-RPMI medium に 1 mg/mL の濃度に SWCNT 及び AF-SWCNT を懸濁し、10 秒間欠で 30 秒 × 10 回超音波破碎を行った。</p> <p>■試験用量 0-50 μg/mL</p>	<p>■試験生物 Kunming マウス (雌、6-8 週齢) 由来マクロファージ</p> <p>■投与期間 24 時間</p> <p>■試験方法 live/dead 解析 アネキシン-V-FITC/PI 解析 リアルタイム逆転写 PCR 解析 ファゴサイトーシスアッセイ T リンパ球増殖アッセイ サイトキネシス測定</p>	<ul style="list-style-type: none"> AF-SWCNT の暴露用量 1-50 μg/mL までは、細胞の生存率に影響を与えず、アポトーシス及びネクロトーシスの割合にも変化はなかったことから、試験用量の AF-SWCNT はマクロファージに細胞毒性を示さない。 AF-SWCNT はマクロファージに入り込み、より短い形態となって主に細胞質、エンドソーム、及びリソソームに局在していた。 AF-SWCNT は SWCNT よりもより深刻なミトコンドリアの損傷を濃度依存的に引き起こしていた。 マクロファージにおける四つのプロテオソームサブユニット遺伝子の発現は AF-SWCNT によって濃度依存的に抑制されていたが、リソソームプロテアーゼサブユニットに関連する二つの遺伝子の発現には変化が見られないことから、リソソームにおける変化は転写後に起こることが示唆された。 AF-SWCNT はファゴサイトーシス細胞の割合と、各細胞によって貪食されるビーズ数を減少させることでマクロファージのファゴサイトーシス機能を損なうのに対し、SWCNT は主にファゴサイトーシス細胞の割合に影響を与えた。 AF-SWCNT は SWCNT よりもマクロファージの補助細胞の機能の阻害に効果的であった。 本試験用量において、AF-SWCNT 及び SWCNT は重大な細胞生存率の低下を引き起こさなかった。 AF-SWCNT で処理したマクロファージは T 細胞の Th1 タイプへの優先的な分化を促進させる可能性が示された。一方 SWCNT の暴露は IL-2 レベルを濃度依存的に減少させたが、他のサイトカインに影響を見られなかった。このことから、SWCNT は T 細胞分化に影響を与えないが、酸性機能を付与したことで Th1 誘導体となる可能性が示された。 	<ul style="list-style-type: none"> SWCNT は大半がファゴサイトーシスにより吸収され、マクロファージのリソソームに局在していることが TEM 解析により判明した。 10 及び 50 μg/mL の AF-SWCNT はミトコンドリアの機能とプロテオソームの形成に濃度依存的に損傷を与えた。 CNT 20 μg/mL はファゴサイトーシス細胞の割合に有意な影響を与え、AF-CNT 5 μg/mL はマクロファージにおいてラテックスビーズのファゴサイトーシス作用を阻害した。 AF-SWCNT 10 μg/mL 及び SWCNT 50 μg/mL はどちらも補助細胞の機能に影響を与えた。 AF-SWCNT は IFN-γ と TNF の産生をもたらすことでナイーブ T 細胞の分化を Th1 タイプに偏らせることから、AF-SWCNT の暴露が Th-1 の関連する病の潜在的リスクが示唆された。

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/ 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	Joanna Pelka, Helge Gehrke, Anja Rechel, Manfred Kappes, Frank Hennrich, Christian G. Hartinger, & Doris Marko/ Nanorotoxicology, February 2013;7(1):2-20	DNA damaging properties of single walled carbon nanotubes in human colon carcinoma cells (ヒト大腸がん細胞における単層カーボンナノチューブのDNA損傷特性)	<p>■対象物質 単層カーボンナノチューブ (SWCNT) 粒子径 1-1.4 nm</p> <p>カーボンブラック (CB) 粒子径 14 nm</p> <p>■試料調製法 10 mg の SWCNT を 12 mL の D20 (1 wt. % SC 入り) に溶解し超音波破碎した。溶解液をゲル濾過カラムで濾過し、密度勾配遠心分離法で大きなアグロメレート除去した。</p> <p>■試験用量 0.00001-0.2 $\mu\text{g/mL}$</p>	<p>■試験生物 HT29 細胞 チャイニーズハムスター-V79 (雄) 由来肺繊維芽細胞</p> <p>■試験期間 3、24、48、72 時間</p> <p>■試験方法 毒性試験 ・SRB アッセイ (成長阻害) ・WST-1 アッセイ (ミトコンドリア活性) ・LDH アッセイ (膜統合性) ・DCF アッセイ (酸化ストレス測定) ・GSH アッセイ ・BCA アッセイ ・コメットアッセイ ・微小核アッセイ ・ウエスタンブロット解析</p>	<p>・SWCNT の暴露 24 時間では細胞の成長阻害は見られなかったが、濃度 0.2 $\mu\text{g/mL}$、72 時間で暴露した HT29 細胞は 50% 以上の成長阻害が見られた。CB 0.5 mg/mL の暴露は阻害が見られなかった。</p> <p>・SWCNT 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 以上の暴露はミトコンドリア活性を損ない、その作用は濃度依存的で最高投与用量 0.2 $\mu\text{g/mL}$ において最大となった。CB 0.5 mg/mL の暴露はミトコンドリア活性に影響を及ぼさなかった。</p> <p>・膜統合性は、全ての投与用量において 24 時間の暴露では影響は見られなかった。</p> <p>・SWCNT を 3 時間以上暴露した HT29 細胞は活性酸素の生成が有意に上昇し、最高投与用量 0.2 $\mu\text{g/mL}$ における活性酸素レベルは対照群の 290% となった。</p> <p>・SWCNT を暴露した HT29 細胞の細胞内 tGSH は増加したが、暴露濃度の増加に伴い減少していた。</p> <p>・SWCNT (0.2 $\mu\text{g/mL}$) を 1 時間暴露した細胞の核 Nrf2 レベルは、対照に比べて $138 \pm 22\%$ 増加していたが、暴露 3 時間は核内のいかなる転写因子の蓄積も見られなかった。</p> <p>・アルカリコメットアッセイにおいて、暴露濃度 0.0001 $\mu\text{g/mL}$ 以上の SWCNT を 3 時間暴露した HT29 細胞で DNA 鎖の崩壊が見られ、24 時間の暴露ではより増加した。しかし中性条件下の電気泳動では DNA 鎖の崩壊は見られなかったことから、SWCNT の 24 時間暴露後の DNA 二重鎖の崩壊は起こらないことが示された。</p> <p>・V79 細胞において SWCNT を暴露すると DNA 断片を含む微小核はわずかに増加しているが、染色体全体を含む微小核 (MN) の数は対照群のレベルに近く、キネトコアポジティブな MN の誘導は起こらないことが示唆された。</p> <p>・SWCNT の暴露 3 時間及び 24 時間後、p53 量の増加が検出された。</p>	<p>・スルホローダミン B アッセイにおいて、単層カーボンナノチューブで 24 時間インキュベーションした細胞は成長への影響は見られなかったが、48 時間及び 72 時間では成長阻害が見られた。</p> <p>・24 時間のインキュベーション後、ミトコンドリア活性 (WST-1) の低下が見られたが、膜統合性 (乳酸デヒドロゲナーゼ) に影響は見られなかった。</p> <p>・細胞毒性濃度において、活性酸素の生成と、総グルタチオン及び核 Nrf2 のわずかな上昇が観察された。</p> <p>・subcytotoxic な濃度における DNA 損傷はアルカリコメットアッセイで観察されたが、ホルムアミドピリミジン DNA グリコシラーゼサイトの形成との関連は見られなかった。</p> <p>・更に、動原体陰性小核 (V79) 及び癌抑制タンパク質 p53 (HT29) のリン酸化の増加がこれらのナノ構造の遺伝毒性の可能性を強調した。</p>

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/ 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	Belab. Manshian, Gareth JS. Jenkins, Paul M. Williams, Chris Wright, Andrew R. Barron, Andrew P. Brown, Nicole Hondow, Peter R. Dunstan, Rob Rickman, Ken Brady, & Shareen H. Doak/ Nanotoxicology, March 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: 物理化学的特性に関連した差次的遺伝毒性の可能性)	<p>■対象物質 単層カーボンナノチューブ (SWCNT) 直径 1-2 nm ・長さ 400-800 nm ・長さ 1-3 μm ・長さ 5-30 μm</p> <p>■試料調製法 SWCNT は培地に懸濁し、4°Cで1時間、30秒の間欠を挟みながら超音波破碎して、直ちに試験に使用した。</p> <p>■試験用量 1、5、10、25、50、100 μg/mL</p>	<p>■試験生物 BEAS-2B 正常ヒト気管支上皮細胞 MCL-5 ヒトリンパ芽B細胞</p> <p>■投与期間 24時間、48時間</p> <p>■試験方法 生存性試験 CBMN アッセイ hprt 正突然変異アッセイ 活性酸素測定 酸化遺伝子発現プロファイリング</p>	<p>■細胞毒性解析 SWCNT の暴露は、暴露時間に関わらず BEAS-2B 細胞に細胞毒性を示さなかった。MCL-5 細胞においては、400-800 nm の SWCNT は変化が見られなかったが、1-3 μm 及び 5-30 μm の SWCNT の投与は生存率が 80%まで低下した。</p> <p>■小核アッセイ: SWCNT の長さの染色体損傷への影響 1-3 及び 5-30 μm の SWCNT を 1,5 及び 10 μg/mL で 24 時間等よしたところ、小核の増加は見られなかった。一方、400-800 nm の SWCNT はいかなる投与用量 (>1 μg/ml) においても小核の出現頻度が増加した。</p> <p>■hprt 変異頻度 400-800 nm 及び 5-30 μm の SWCNT は MCL-5 細胞において点変異の出現頻度を増加させなかった。しかし 1-3 μm の SWCNT では 25-100 μg/mL を投与した際、用量依存的に変異の増加が見られた。</p> <p>■酸化ストレス評価 BEAS-2B 及び MCL-5 細胞において、活性酸素レベルが最も目立って変化するのは暴露時間が 30 分及び 4 時間のサンプルであった。1-3 μm SWCNT サンプルは時間及び投与用量依存的な活性酸素生成量の増加が見られた。400-800 nm の SWCNT サンプルでは活性酸素は 20 μg/mL まで増加したが、それ以上の投与用量では対照群の値と同程度になった。一方 5-30 μm の SWCNT は無細胞及び細胞内経路共に活性酸素検出量は大きく低下した。最も多くの活性酸素生成が見られたのは、1-3 μm SWCNT、1 μg/mL であった。</p> <p>■酸化ストレス反応性遺伝子発現プロファイリング 高用量の 1-3 μm SWCNT で最も顕著な転写調節の変化。酸化ストレス反応性遺伝子のうち 89%が 30 分及び 4 時間の時点で影響を受け、最も高い活性酸素と、実質的変異原性を引き起こした。これらの変化は、低用量の 1-3 μm SWCNT では、4 時間においてのみ見られた。最も動的に変化したのは EPHX2、SFTPD 及び NCF1 遺伝子であった 400-800nm、5-30 μm SWCNT では発現変化は少なかった。</p>	<p>・SWCNT を暴露した細胞は細胞毒性は示さないが、小核の頻度は時間及び投与用量依存的に有意に増加した。同じ投与用量の範囲内では、1-3 μm の SWCNT のみが 25 μg/mL 以下で hprt 点変異の有意な上昇を示した。</p> <p>・細胞内の 2,7-ジクロロハイドロフルオレセインジアセテート (DCFH-DA) 蛍光アッセイ及び酸化経路遺伝子プロファイリングのための RT-PCR では、1-3 μm SWCNT において見られた遺伝毒性の潜在的酸化メカニズムを明らかにした。</p> <p>・本試験では、SWCNT の遺伝毒性は、試験条件下のその二次構造によるもので、酸化ストレスのみが損傷の理由となるわけではないことを示した。</p>

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/ 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	Neelam Azad, Anand Krishnan V. Iyer, Liying Wang, Yuxin Liu, Yongju Lu, & Yon Rojanasakul/ Nanotoxicology, March 2013; 7(2):157-168	Reactive oxygen species-mediated p38 MAPK regulates carbon nanotube- induced fibrogenic and angiogenic responses. (p38 MAPK で仲介される活性酸素がカーボンナノチューブによって誘導される繊維形成及び血管新生反応を調節する)	<p>■対象物質 単層カーボンナノチューブ (SWCNT) 幅 0.8-1.2 nm 長さ 0.1-1 nm</p> <p>■試料調製法 Survanta/ sonication によって培地に懸濁した</p> <p>■試験用量 5、10、25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$</p>	<p>■試験生物 ヒト肺繊維芽細胞 CRL-1490</p> <p>■試験方法 細胞分裂アッセイ コラーゲンアッセイ (Sircol アッセイ) ウエスタンブロットアッセイ 活性酸素検出 ELISA 血管新生アッセイ</p>	<p>■SWCNT は繊維の増殖及びコラーゲン生成を誘導 SWCNT は投与用及び時間依存的に繊維増殖を誘導。同様の時間及び用量依存的な反応は、溶解性コラーゲン量の変化にも表れた。SWCNT はコラーゲン I 及び III を強力に誘導した。</p> <p>■SWCNT 誘導線維形成において含まれる活性酸素 SWCNT は細胞内の DCF 蛍光強度を投与用量依存的に増加させ、ペルオキシダーゼの形成を示したが、活性酸素形成の指標となる DHE の蛍光への影響は小さかった。活性酸素、とりわけペルオキシダーゼは SWCNT に誘導される繊維形成に重要なレギュレーターとなっていることが示された。</p> <p>■SWCNT に誘導される線維形成の影響は p38 MAPK 経路を通じて仲介される p38 MAPK インヒビターは SWCNT の線維形成及びコラーゲン発現の誘導を有意に阻害した。また SWCNT は p38 のリン酸化を投与用量及び時間依的に誘導したが、p38 タンパク質レベルの総量に影響はなかった。また、活性酸素インヒビターは SWCNT に誘導される p38 リン酸化を有意に阻害したことから、SWCNT に仲介される活性酸素生成は p38 MAPK の活性化が必要であることが示された。</p> <p>■SWCNT は p38 MAPK 経路を通じて TGF-β1 活性化を仲介 SWCNT は投与用量依的に TGF-β1 活性化の増加を引き起こした。活性酸素インヒビター及び p38 MAPK インヒビターは SWCNT により誘導される TGF-β1 の活性化を有意に阻害した。TGF-β1 のインヒビターは、SWCNT に誘導される線維形成の減少を引き起こした。</p> <p>■SWCNT に誘導される VEGF の線維形成における役割 VEGF のタンパク質レベルは SWCNT 処理によって投与用量依的に誘導された。SWCNT による VEGF の誘導は、NAC、カタラーゼ及び p38 MAPK インヒビターによって有意に阻害されたことから、SWCNT が誘導する VEGF 生成は、活性酸素の生成を介して、p38 MAPK 経路による可能性が示された。VEGF はコラーゲンの発現と線維芽細胞増殖を誘導しており TGF-β1 との間にポジティブなフィードバックが見られた。</p> <p>■SWCNT は血管新生反応を誘導 SWCNT は投与用量依的に血管新生を誘導した。活性酸素、p38 MAPK、TGF-β1 及び VEGF のインヒビターは SWCNT による血管新生を有意に阻害したが、TGF-β1 及び VEGF による処理は SWCNT による血管新生を増加させた。</p>	<p>・ SWCNT は活性酸素によって調節される p38 マイトゲン活性化タンパク質キナーゼ (MAPK) のリン酸化を通じて線維形成を引き起こした。</p> <p>・ SWCNT による p38 MAPK の活性化は TGF-β1 と血管内皮成長因子 (VEGF) の誘導を導いた。TGF-β1 及び VEGF は、SWCNT の線維増殖性及びコラーゲン誘発に有意な寄与を示した。</p> <p>・ TGF-β1 及び VEGF の間にはポジティブなフィードバックループが見られた。この線維形成と血管新生メディエータの相互作用は SWCNT に反応した血管新生の増加を引き起こした。</p> <p>・ 本試験では、SWCNT が誘導した線維形成及び血管新生に關与する重要なシグナル分子を明らかにした。</p>

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/ 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	ASHLEY N. PARKS, LISA M. PORTIS, P. ARIETTE SCHIERZ, KATE M. WASHBURN, MONIQUE M. PERRON, ROBERT M. BURGESS, KAY T. HO, G. THOMAS CHANDLER, and P. LEE FERGUSON/ Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 32, No. 6, pp. 1270- 1277, 2013	BIOACCUMULATION AND TOXICITY OF SINGLE-WALLED CARBON NANOTUBES TO BENTHIC ORGANISMS AT THE BASE OF THE MARINE FOOD CHAIN (海の食物連鎖の下層 に位置する底生生物に 対する単層カーボンナ ノチューブの生物濃縮 と毒性)	<p>■対象物質</p> <ul style="list-style-type: none"> ・単層カーボンナノチューブ (SWNT) ・CoMoCAT ナノチューブ (SG65, SG76, CG100, OECD) <p>入手元 SouthWest NanoTechnologies</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ [14C]SWNT arc-discharge 法によって作成 <p>■試料調製法</p> <p>2% w/v のデオキシコール酸ナトリウム (SDC) 中にストック溶液を作成。10 分間超音波破碎した後、遠心した。試験前に 1mG SWCNT/mL 2% w/v SDC を調製し、遠心せず、使用直前に再度超音波破碎</p> <p>■試験用量</p> <p>0. 1、1、10 μg SWNT/g 乾燥沈殿物</p>	<p>■試験生物</p> <p>端脚類 <i>Ampelisca abdita</i> アミ類 <i>Americamysis bahia</i> 河口端脚類 <i>Leptocheirus plumulosus</i>.</p> <p>■試験期間</p> <p>7 日間</p> <p>■試験方法</p> <p>堆積物による毒性試験 生物濃縮試験</p>	<ul style="list-style-type: none"> ・ <i>A. abdita</i> 及び <i>A. bahia</i> において、10 μg/g 乾燥堆積物までの濃度の SWNTs4 種類による生存率は 85-100%を示し、堆積物及び食物源からの暴露では生存率は 95-100%を示した。 ・ 28 日間暴露した後に洗浄した成体 <i>L. plumulosus</i> の生存率は、対照群の 87%-98%であり、いずれの投与群においても繁殖活動が観察できた。 ・ 生存率において、投与群と対照群の有意差は見られなかった。 ・ SWNTs は洗浄及び未洗浄のアミ類、洗浄の端脚類からは検出されなかったが、堆積物や食物源 (藻類)、及び未洗浄の端脚類からは検出された。 ・ SWNTs は藻類から摂取された後、腸管内腔を経ずに直ぐさま排出されるので、下部組織の濃度は検出限界値以下となることが示唆された。 ・ [14C]SWNT 生物濃縮試験において、藻類における [14C]SWNTs の暴露は約 5 倍、堆積物における暴露では約 50 倍の身体負荷量の増加が見られた。 ・ 堆積物を通じての SWNTs 摂取は、藻類の食餌を通じた経路よりも <i>L. plumulosus</i> の SWNT 濃縮において深刻な影響を与えることが示唆された。 ・ Bioaccumulation factors (BAF) の計算によると、各投与群の BAF は低く、洗浄後は更に析値が低下した。よって、[14C]SWNTs は生物濃縮は起こらず、SWNT を摂取した底生生物は即座に排出する。 ・ [14C]SWNT 100ppm を堆積物に投与した際のマスバランスは、水中に 8-15%、堆積物に残っているものが 34-54%、生物の組織及びふん塊の含まれるものは 1%以下であった。 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 堆積物若しくは食餌を通じた暴露では、100 ppm まではいずれの生物も目立った死亡率の変化は見られなかった。 ・ 洗浄した生物からは SWNT は検出できなかったが、藻類を通じて SWNT を摂取した <i>A. abdita</i> を洗浄せずに測定したところ、SWNT を定量できた。 ・ [14C]SWNT の堆積物 (100 μg/g) 及び藻類 (100 μg/g) を 28 日間暴露した <i>L. plumulosus</i> は、洗浄後に 0.50 μg/g、洗浄前に 5.38 μg/g の [14C]SWNT が検出された。 ・ SWNT は海洋の底生生物に対して生物受容性があるが、濃縮は見られず、毒性も引き起こさなかった。

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/ 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	Dacian Roman, PhD, Amber Yasmeen, PhD, Matei Mireuta, PhD, Ion Stiharu, PhD, Ala-Eddin Al Moustafa, PhD/ Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine 9 (2013) 945-950	Significant toxic role for single-walled carbon nanotubes during normal embryogenesis (正常な胚形成期間に 単層カーボンナノチュ ーブが及ぼす有意な毒 性)	<p>■対象物質 単層カーボンナノチュ ーブ (SWCNT) 入手元 Sigma-Aldrich</p> <p>■試料調製法 PBS で一度洗浄した後、 乾燥させて、再び PBS で 1 mg/mL となるように懸 濁した。ポルテックスで 1 分間攪拌した後、間接 的な超音波破碎を 10 分 間、4°C で実行した。再 びポルテックスを行っ てから胚に投与した。</p> <p>■試験用量 25 μg</p>	<p>■試験生物 ホワイトレグホン鶏 3 日胚</p> <p>■投与方法・期間 マイクロキャピラリー チューブを通じた投与 単回</p> <p>■試験方法 H&E 染色 RT-PCR 解析</p>	<ul style="list-style-type: none"> ・暴露群 75 個体のうち、10 個体は投与翌日に操作上の原因で死亡した。 ・投与後 11 日目に暴露群の半数を剖検したところ、SWCNT はニフトリの脳及び肝臓において絨毛尿膜 (CAM) の血管新生を阻害していた。また、暴露群の胚は対照群に比べ小さく、SWCNT の投与が正常な発生を妨げていた。 ・投与後 12 日目までに、暴露群 65 個体のうち 52 個体が死亡した。これらの胚に肉眼的な観察で異常は見られなかったが、肝臓を組織学的に解析したところ、ネクローシスと血管発達の阻害が見られた。 ・細胞分裂、アポトーシス、生存、細胞周期及び血管新生に重要な、INHBA、Atf-3、FOXA-2、CASPAS-8、MAPRE2、BCL-2、RIPK-1、Cadherin-6 type-2、SPI-4、KIF=14 及び VEGF-C の 11 の遺伝子について、暴露群の脳及び肝臓組織における発現を RT-PCR で解析したところ、INHBA、ATF-3、FOXA-2、CASPAS-8、MAPRE2、BCL-2、RIPK-1 の遺伝子は上方制御されており、Cadherin-6 type-2、SPI-4、KIF-14 及び VEGF-C は下方制御されていた。 	<ul style="list-style-type: none"> ・ SWCNT を暴露した胚は全て対照群の胚に比べ小さかったことから、SWCNT の暴露は正常な肺の発生に害と成りうることを確認した。 ・ また、暴露群の胚の大半は 12 日以前に死亡した。肉眼による観察ではこれらの胚に異常は見られなかった。 ・ しかし、細胞分裂、アポトーシス、生存及び血管新生の調節に重要な役割を果たす 11 の遺伝子について RT-PCR 解析を行ったところ、暴露群の胚においてはこれらの遺伝子が脳及び肝臓で脱制御されていることが判明した。 ・ 本試験の結果から、SWCNT は胚の正常な発生に大変有害であると思われる。

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/ 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	Po-Hsuan Chen, Kuang-Ming Hsiao, Cheng-Chung Chou/ Biomaterials 34 (2013) 5661	Molecular characterization of toxicity mechanism of single-walled carbon nanotubes (単層カーボンナノ チューブの毒性メカニズ ムの分子的特性)	<p>■対象物質</p> <ul style="list-style-type: none"> ・単層カーボンナノチューブ (SWCNT) 長さ 0.5-2.0 μm ・ α-SWCNT 長さ 0.7-1.0 μm 入手元 Sigma-Aldrich <p>■試料調製法</p> <p>1%の界面活性剤を含む培地に溶解し、一晚超音波破碎した。解析前に ultrasonic cell disruptor で完全に溶解させた。</p>	<p>■試験生物</p> <p>線虫 N2</p> <p>■投与方法・期間</p> <p>摂餌・48時間</p> <p>■試験方法</p> <p>生存率及び成長率の測定 繁殖率 α-SWCNT 摂餌アッセイ 定量的 RT-PCR エンドサイトーシスアッセイ 酸素消費率測定 DAF-16 核転移アッセイ</p>	<ul style="list-style-type: none"> ・高濃度の α-SWCNT は <i>C. elegans</i> の成長の遅延を引起し、寿命を縮め、一腹子数を減少させた。低用量の α-SWCNT の継続的な投与においても、線虫の毒性の蓄積を引き起こした。 ・全ゲノムのマイクロアレイによって、α-SWCNT の暴露によって差次的に制御されている遺伝子を明らかにした。遺伝子はセルペンチン受容体を通じた化学物質伝達シグナルで決定される機能を持ち、暴露を受けた線虫は成長、細胞周期、寿命及び繁殖といった点で毒性が見られた。更なる経路解析によって、エンドサイトーシス、MAPK シグナルカスケード、及びクエン酸回路に関与することが知られている生物学的経路の下方制御が明らかに増えている事が明らかになった。 ・更なる分子生物学的解析で、α-SWCNT はエンドサイトーシスとクエン酸回路を阻害し、寿命の短縮は DAF-16 の核転移の減少によることがわかった。 ・これらの見解は、ナノマテリアルの生物に対する潜在的毒性を評価するのに、<i>C. elegans</i> アッセイは細胞培養系に比べて信頼性がありコストも安いプラットフォームであることが示された。 	<ul style="list-style-type: none"> ・SWCNT は水中では疎水性の巨大なアグロメレートを形成するので、高溶解性アミド修飾 SWCNT (α-SWCNT) を本試験で使用した。 ・α-SWCNT は線虫に効果的に取り込まれ、成長の遅延、寿命の短縮、胚形成の欠陥といった急性毒性を引き起こした。 ・線虫は投与を終了すると毒性症状から回復したことから、可逆性だった。 ・発生段階を通じて低用量の α-SWCNT を慢性的に暴露することによっても毒性の蓄積は見られた。 ・線虫で見られた毒性には、エンドサイトーシスの欠陥、クエン酸回路活性の減少、及び DAF-16 転写因子の核移行の減少といった重要な要因が見られた。

3) 多層カーボンナノチューブ

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/ 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	Furong Tian a, Nunja C. Habel a, Renfu Yin a, Stephanie Hirn a, Atrayee Banerjee b, Nuran Ercal b, Shinji Takenaka a, Giovanni Estrada c, Kostas Kostarellos d, Wolfgang Kreyling a, Tobias Stoeger/ European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutic s 84 (2013) 412- 420	Pulmonary DWCNT exposure causes sustained local and low-level systemic inflammatory changes in mice (マウスにおける 二重層カーボンナ ノチューブの肺へ の暴露は局所的に 残存し低レベルの 全身性炎症変化を 引き起こす)	<p>■対象物質 二重層カーボンナノ チューブ (DWCNT) 直径 3.5 nm 長さ 1-10 μm</p> <p>■試料調製法 DWCNTは1% ブルロニッ ク F-127 を添加した滅 菌水に懸濁し、30 分間 超音波破碎し、1%F-127 を添加した水で 1:10 に 希釈した。投与直前 にはボルテックスによ って混和した。</p> <p>■試験用量 50 μg</p>	<p>■試験生物 BALB/cAnNCrI マウス (10-12 週齢、雌)</p> <p>■投与方法 気管内単回投与</p> <p>■試験方法 サイトカイン及びケモ カインの測定 グルタチオン及びカタ ラーゼ活性測定 (高速 液体クロマトグラフイ ー) 免疫染色</p>	<p>■DWCNT による持続的肺炎炎症</p> <ul style="list-style-type: none"> ・肺の炎症反応は暴露 1 日後に好中性顆粒球の動的な肺胞蓄積が見られた。肺胞洗浄液 (BAL) によって回復した細胞内の白血球の構成は急性期の反応期間に変化し、DWCNT 処理後 1 日目の好中球は 64% であったが、3 日目には 22%、7 日目は 23% であった。 ・肺胞白血球の構成及び数の動的变化は、炎症誘発性サイトカインの遊離を伴った。投与群のマウスの BAL における IL-13、CSF3、CXCL、及び CCL3 の濃度は 100 倍以上増加した。サイトカインの反応は 2 相性で、好中球の細胞数の変動と相関しており、1 日目は高く、3 日目には減少するが 7 日目に再び増加が見られた。しかし先に述べた Th1 細胞とは対照的に、Th2 のサイトカインの IL13 及び CCL11 は 7 日目まで高く、肺の損傷による影響が試験期間異常にわたることが示唆された。 <p>■DWCNT は軽微な全身性の炎症の変化を引き起こす</p> <ul style="list-style-type: none"> ・末梢白血球細胞の数は DWCNT 投与後 3 日目に降上に昇するが、1 日目では観察されなかったことから、軽微な全身性炎症反応は後期特有の反応であることが示された。反対に、血中の好中球の割合は 1 日目及び 7 日目に上昇しているが 3 日目は元の値に戻っていた。血中のサイトカイン反応は肺に比べ少なかった。 <p>■DWCNT アグロメレートは肺胞マクロファージに取込まれたが、顆粒球には取り込まれない</p> <ul style="list-style-type: none"> ・CNT アグロメレートはマクロファージで観察されたが、好中球では見られなかった。アグロメレートを取り込んだマクロファージの数は一定であることから、ファゴサイトーシスはマクロファージの数によるものではないことが示された。 	<ul style="list-style-type: none"> ・50 μg の DWCNT は明らかに肺の炎症を引き起こし、7 日間の観察期間中分解されなかった。暴露した DWCNT のアグロメレートを光学顕微鏡により調査したところ、粒子は顆粒球には取り込まれず、マクロファージにのみ、取り込まれていた。 ・肺を損傷する局所的な炎症は、抗酸化作用の消耗と、全身の炎症を示す血液学的兆候を伴った。 ・急性期に見られた炎症反応は主に好中球と、好中球から補填されるサイトカインが占めていたが、暴露 3 日後にはマクロファージ及びリンパ球と関連するサイトカインにも兆候が表れた。 ・本試験結果は、肺における急性毒性は DWCNT アグロメレートの高用量投与によって引き起こされ得るため、長期にわたる毒性の可能性を避けるためにナノチューブの設計パラメータを改良することを提案した。

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/ 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	Karin S. Hougaard, Petra Jackson, Zdenka O. Kyjovska, Renie K. Birkedal, Pieter-Jan De Timmerman, Andrea Brunelli, Eveline Verleysen, Anne Mette Madsen, Anne T. Saber, Giulio Pojana, Jan Mast, Antonio Marcomini, keld A. Jensen, Hakan Wallin, Jozef Szarek, Alicja Mortensen, Ulla Vogel / Reproductive toxicology 41: 86-97 (2013)	Effect of lung exposure to carbon nanotubes on female fertility and pregnancy. A study in mice. (雌の生殖能力及び妊娠に及ぼす肺のカーボンナノチューブへの暴露の影響 マウスでの試験)	<p>■対象物質 多層カーボンナノチューブ ・NM-400 入手先: OECD WPMN sponsorship program ・サイズ (TEM 測定): 長さ-295±234nm ・直径-10±3nm ・表面積 (製造者データ) (BET 測定): ・250~300m²/g</p> <p>■試験用量 ・受胎前暴露試験 67 μg/個体 x 1 回 ・妊娠期間暴露試験 67 μg/個体 x 4 回 (合計 268 μg/個体)</p> <p>■溶媒・調製 溶媒: 2%マウス血清を添加した 0.2 μm フィルタろ過 γ 線照射 Nanopore Diamond UV 水 調製: 16 分間超音波処理</p>	<p>■試験生物 C57BL/6J BomTac マウス ・雌 7 週齢、 ・雄 9 週齢</p> <p>■投与方法 ・受胎前単回暴露試験 雌マウスに所定量の対象物質を気管内投与し、その後雄マウスと共に飼育した。 ・妊娠期間暴露試験: 妊娠日の 8, 11, 15 及び 18 日に所定量の対象物質を気管内投与した。</p> <p>■試験方法 ・受胎前単回暴露試験: 出産までの時間、一腹の仔数、親動物の炎症 (気管支肺胞洗浄細胞の構成、好中球・顆粒球の出現) 及び組織病理学的試験 ・妊娠期間暴露試験: 雄仔動物の運動活性化 (オープンフィールド試験)、驚愕反応 (ASR 試験及び PPI 試験)、毎日の精子生産 (DSP) の測定</p>	<p>■粒子特性 ・ICP-OES 分析の結果、触媒であるアルミニウム (5.3wt%)、鉄 (0.4wt%)、及びコバルト (0.2wt%) が主要不純物として検出された。</p> <p>■受胎前単回暴露試験 ・NM-400 MWCNT を単回暴露した雌親動物の 6~7 週間後に採取された気管支肺胞洗浄細胞の構成には、有意な差は認められなかったが、相対的に死細胞が多かった。 ・NM-400 MWCNT を単回暴露した雌親動物の病理組織学的試験では、6 週間後、2/3 例の肺に変化 (気管支上皮下の浮腫、血管周囲の浮腫、気管支上皮細胞の過形成) が認められた。4 ヶ月後、気管支壁及び動脈壁近傍への単核球の浸潤 (6/6 例) 及びマクロファージの浸潤 (3/6 例) が認められた。また、細気管支及び/又は血管周囲の支持組織の浮腫 (2/6 例) が観察された。 ・NM-400 MWCNT を単回暴露した雌親動物の病理組織学的試験では、6 週間後、肝臓に壊死の微小病巣 (3/3 例)、単核細胞肥大 (2/3 例)、クッパー細胞数及び二核細胞数の増加 (3/3 例) が認められた。4 ヶ月後、限局性過形成 (3/6 例) 及びクッパー細胞肥大 (4/6 例) などが認められた。 ・NM-400 MWCNT を単回暴露した雌親動物から生まれた一腹の仔数は、コントロールと同等であった。最初の出産は、コントロールと比較して平均 5 日間遅延した。</p> <p>■妊娠期間暴露試験 ・雄仔動物の 4 週齢及び 13~14 週齢での運動活性化試験 (オープンフィールド試験) 及び驚愕反応試験では、有意な差は認められなかった。 ・125 日齢の雄仔動物の DSP 及び精巣重量には暴露の影響は認められなかった。</p>	<p>・多層カーボンナノチューブ NM-400 の気管支内単回暴露により、肺及び肝臓に長期的な病理組織学的変化が引き起こされた。 ・多層カーボンナノチューブ NM-400 の気管支内単回暴露により、雌マウスの最初の出産に遅延が認められた。 ・粒子の暴露による肺の炎症が雌の生殖パラメータに干渉する可能性がある。</p>

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/ 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	Dale W. Porter, Ann F. Hubbs, Bean T. Chen, Walter McKinney, Robert R. Mercer, Michael G. Wolfarth, Lori Batelli, Nianqiang Wu, Krishnan Sriram, Stephen Leonard, Michael Andrew, Patsy Wilard, Shuji Tsuruoka, Morinobu Endo, Takayuki Tsukada, Fuminori Munekane, David G. Frazer & Vincent Castranova/ Nanotoxicology (2013), vol. 7, No. 7, 1179-1194	Acute pulmonary dose-responses to inhaled multi-walled carbon nanotubes (多層カーボンナノチューブの吸入による投与量依存的な肺の急性症状)	<p>■対象物質 多層カーボンナノチューブ(MWCNT) 入手元 Hodogaya Chemical Company 直径 1.3 μm (mass mode aerodynamic diameter)、 0.42 μm (count mode aerodynamic diameter) 空気動学的直径の質量中央値 1.5 μm 幾何標準偏差 1.67</p> <p>■試験用量 10mg/m³、5時間/日</p>	<p>■試験生物 C57BL/6J マウス 雄 6週齢</p> <p>■投与方法 (日数) 吸入暴露 (2, 4, 8, 12 日)</p> <p>■試験方法 ・粒子特性 電子顕微鏡観察 (TEM) X線光電子分光法 (XPS) 電子共鳴スピン解析 ・肺の負荷測定 重量測定 組織中 MWCNT 含量測定 ・肺の流動性 LDH、アルブミン及びサイトカイン測定 ・組織病理学解析 ・顕微鏡観察 ・免疫染色</p>	<p>・エアロゾル化した MWCNT は 1.32% で、1.06% の鉄を含んでいた。 ・MWCNT はフェントン反応により発生したヒドロキシラジカルを捕集していた。 ・エアロゾルの MWCNT 粒子の形状は、単独の繊維状のナノチューブからもつれたアグロメレートまで、様々であった。 ・MWCNT の暴露は暴露時間の多少に関わらず肺に負荷をもたらした。 ・MWCNT は全体の 24% が気道、うち 11.7% が気腔、4.5% が組織、8.1% がマクロファージに分布していた。同じく全体の 76% は肺胞近傍、うち 14.6% が気腔、11.9% が組織、49.2% がマクロファージに分布していた。 ・MWCNT は胸壁にも分布していた。 ・全ての投与群の洗浄肺 (WLL) には多形核白血球が増えていた。 ・肺の炎症は投与用量依存的に増大していた。 ・全ての投与群で WLL 流体の好中球走化性因子のケモカイン KC が増加しており、肺の炎症の増大と相関していた ・投与群の WLL 流動性 LDH 活性は有意に高くなっていた。 ・投与群の MLL 流動性アルブミン濃度は上昇していた。 ・投与 8 日目、12 日目のマウスの肺には肥大化細胞が見られた。 ・投与群の肺のマクロファージは細胞質及び核膜への浸潤がみられた。 ・MWCNT が含まれたマクロファージは核融解が起こり、異常な核分裂が見られた。 ・気道上皮細胞の核分裂は、投与 4 日目は投与群全てのマウスに見られたが、投与 12 日目には 1 匹のマウスでしか見られなかった。 ・上皮に取り込まれた MWCNT は投与 4 日目には 7/8 匹で、8 日目には 2/6 匹で見られたが、投与 12 日目には観察されなかった。 ・投与 4 日目の MWCNT 投与群の 7/8 匹に気道上皮細胞の粘液異形成が見られ、8, 12 日目には全ての投与群で見られた。 ・肺の腺維症と MWCNT の炎症に伴って観察された。</p> <p>・投与 12 日のマウス 2 匹において胸膜の浸潤が見られ、うち 1 匹は胸膜から胸膜表面のマクロファージへ広がっていた。 ・投与 4 日目のマウスの一部と、投与 8, 12 日目の全てのマウスで MWCNT がリンパ節の傍皮質深層に広がっていた。 ・鼻において、投与 12 日目に好中球炎症が見られた。</p>	<p>・投与期間の長さで肺の負荷は直線的に相関した ・MWCNT 投与群は肺の炎症を示すパラメータ値が上昇していた。 ・組織病理学的解析によると、肺において (1) 細気管支中心性の炎症、(2) 細気管支上皮の肥厚、(3) 腺維症、(4) 血管病変、(5) 稀に胸膜侵入、が認められた ・投与 8, 12 日では MWCNT がリンパ節の副皮質深層まで移入していた。 ・MWCNT の急性吸入は肺の炎症を引起し、肺腺維症を急速に進行させ、また胸膜にまで達することが示された。</p>

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/ 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	Yuhji Taquahashi, Yukio Ogawa, Atsuya Takagi, Masaki Tsuji, Koichi Morita and Jun Kanno/ J. Toxicol. Sci. vol. 38, No. 4, 619-628, 2013	An improved dispersion method of multi-wall carbon nanotube for inhalation toxicity studies of experimental animals (実験動物による 多層カーボンナノ チューブ吸入毒性 試験の分散法の改 良)	■対象物質 多層カーボンナノチュ ープ (MWCNT) 入手元 Mitsui & Co., Ltd., ■試料調製法 Tert-butanol (TB) 200 mLとMWCNTを混合 し、凍結融解し、フィ ルタ濾過後に急速に凍 結させ、バキュームで TBを昇華させて残存し たMWCNTを回収した。 ■試験用量 1 mg/m ³	■試験生物 C57BL/6NCrSlc マウス (雄、10-11週齢) ■投与方法・期間 吸入暴露 2時間/日、5日間 ■試験方法 組織染色切片	・Taquannの方法により調製したMWCNT (T-CNT) を2時間/日、5日間暴露したマウスの肺胞において、1.8 mg/m ³ のT-CNTが検出された。二匹のマウスの肺で検出された長さの平均は8.4±5.0 μm及び8.3±4.9 μmでspiked lungにおいては9.5±5.2 μmであった。回収された繊維の総量は、それぞれ5.1×10 ⁶ 及び3.2×10 ⁶ で、spiked lungにおいては1.6×10 ⁶ であった。回収されたT-CNTを電子顕微鏡で観察すると、単繊維が分布している様子が見られ、長さは20 μm以上であった。 ・組織学的観察によると、CNTは気管支腔から肺胞空間周辺部に分布していた。気管支腔においては繊維は気管支粘液に捕捉されていた。肺胞空間周辺部においては肺胞マクロファージにおいて単繊維がファゴサイトーシスされている様子が見られた。	・効果的にアグリゲート/アグロメレートを除き、溶剤のない乾燥状態でも単繊維の分布が十分で、かつ長さや幅の分布に変化がない方法を開発した。 ・新たに設計した注入システムは、吸入チャンパー内のエアロゾル中によく分散しており、暴露したマウスの肺には、原粒子とほぼ同サイズの単繊維が含まれていた。 ・この方法は低費用で実行することが可能であり、他の吸入毒性試験に応用することができるだろう。
16	Silke Treumann, Lan Ma-Hock, Sibylle Gröters, Robert Landsiedel, and Bennard van Ravenzwaay/ toxicological sciences 134(1), 103-110 2013	Additional Histopathologic Examination of the Lungs from a 3-Month Inhalation Toxicity Study with Multiwall Carbon Nanotubes in Rats (ラットにおける 3ヶ月間の多層カ ーボンナノチュ ープ吸入毒性への肺 の組織学的追加試 験)	■対象物質 多層カーボンナノチュ ープ 入手元 Nanocyl S.A. 直径 5-15nm 長さ 0.1-10 μm ■試験用量 0.1、0.5、2.5 mg/m ³	■試験生物 ラット ■投与方法・期間 吸入暴露・90日 ■試験方法 透過型電子顕微鏡観察 組織切片の染色	■コラーゲン線維の観察 電子顕微鏡で観察すると、肺胞壁はコラーゲン線維は増加しておらず、一方小肉芽腫ではわずかに増加が見られた。肋膜ではコラーゲン線維の増加は見られなかった。 ■レチクリン線維の観察 0.5、2.5 mg/m ³ の投与群では肺胞壁のレチクリン線維がわずかに増加していた。雄に比べ、雌においてより影響が見られた。 ■電子顕微鏡によるMWCNTの観察 錯綜したMWCNTが肺胞マクロファージ内に認められた。時折高電子密度の分子や破片が膜結合小胞内で見られ、これはつまりMWCNTが分解しようとうことを示していた。もしそうであれば、MWCNTは肺胞内マクロファージにより分解され、肺には残存しない。	・MWCNTの吸入は肉芽腫性の炎症を肺の実質組織内で引き起こすが、肋膜やその他結合組織では引き起こさなかった。 ・これはアスベストの吸入による影響と類似していたが、特異的であり、肋膜の炎症や線維症からくる中皮腫などは見られなかった。

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/ 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	Robert R Mercer, James F Scabilloni, Ann F Hubbs, Lori A Battell, Walter McKinney, Sherri Friend, Michael G Wolfarth, Michael Andrew, Vincent Castranova and Dale W Porter/ Particle and Fibre Toxicology 2013, 10:33	Distribution and fibrotic response following inhalation exposure to multi-walled carbon nanotubes (多層カーボンナ ノチューブを吸入 暴露した後の分布 及び線維性反応)	■対象物質 MWCNT 入手元 Hodogaya Chemical Company ■試験用量 5 mg/m ³ 、5 時間/日、12 日間 (週 4 回、3 週間)	■試験生物 C57BL/6J マウス (7 週 齢) ■投与方法・期間 吸入暴露 5 時間/日、12 日間 (週 4 回、3 週間) ■試験方法 組織切片染色 肺負荷の測定 ギムザ染色 LDH アッセイ 電子顕微鏡解析 暗視野顕微鏡解析 morphometric point counting methods 形態計測解析	・暴露後 1 日において、肺胞における肺負荷は 84±3%、気道におけ る肺負荷は 16±2%であった。肺胞における初期の分布は、肺胞のマ クロファージ、肺胞空間及び肺胞組織で見られ、それぞれ肺負荷の 56±5%、7±4%、及び 20±3%であった。暴露後 1 日から 168 日の排 出で、肺胞マクロファージの MWCNT 負荷は 35%減少した。一方は違 法組織に含まれる MWCNT は 63%増加した。 ・4 繊維以上を含む大きな MWCNT 構造は、初期肺負荷の 53.6%を占 め、大半が排出されたが、シングレットの MWCNT による肺負荷は変 化が見られなかった。 ・肺の膨張を測定した平均 linear intercept は、各群に目立った 差異は見られなかった。肺の炎症及び損傷は、BAL における多形核 白血球 (PMN) の数、若しくはラクターゼデヒドロゲナーゼ活性 (LDH) 及びアルブミンを測定し、暴露後 1 日から急速に増加し、時間経過 に伴い緩やかに減少した。 ・MWCNT 暴露を受けたマウスの肺胞部位の線維状コラーゲンは、時 間経過に伴い厚みが次第に増加し、対照群と大きく異なることが示 された。	・肺胞組織の配布かは比較 的少なかったが、肺胞部位 の結合組織の平均的厚さ は暴露後 336 日には 70%増 加していた。 ・この結果から、MWCNT の 暴露は肺胞組織内で堆積 及び残存し、そこで暴露後 336 日まで進行性かつ持 続性の線維性反応を起こ すことが示された。

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/ 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	Yumi Umeda, Tatsuya Kasai, Misae Saito, Hitomi Kondo, Tadao Toya, Shigetoshi Aiso, Hirokazu Okuda, Tomoshi Nishizawa, and Shoji Fukushima / J Toxicol Pathol 26:131-140 (2013)	Two-week toxicity of multi-walled carbon nanotubes by whole-body inhalation exposure in rats (ラットにおける 全身吸入暴露によ る多層カーボンナ ノチューブの2週 毒性)	<ul style="list-style-type: none"> ■対象物質 多層カーボンナノチュ ーブ (MWCNT) 入手先：保土ヶ谷化 学工業 (株) 表面積：24-28m²/g 幅：88±5nm 長さ：5.0±4.5nm (38.9% - >5μm) ■試験用量 0.2, 1, 5mg/m³ ■溶媒：空気 	<ul style="list-style-type: none"> ■試験生物 F344/DuCr1Cr1j ラッ ト、5週齢、雌雄 ■投与方法 ラットを各濃度の対象 物質のエアロゾルに6 時間/日、5日/週、2週 間暴露した。 ■試験方法 ・投与期間及び投与後4 週間の臨床症状の観察 及び体重測定 ・投与期間の終了時及 び投与の4週間後にそ れぞれ半分のラットを 解剖し、血液及び各種 臓器の重量を測定 ・各種臓器の組織切片 を作成し、病理学的試 験を実施 ・気管支肺胞の洗浄液 (BALF)を回収し、生化 学的及び細胞学的分析 を実施 	<ul style="list-style-type: none"> ■2週毒性 ・2週間の暴露期間及び暴露後4週間の死亡又は臨床症状はいずれの投与濃度においても観察されなかった。暴露期間の4週間後の体重には、有意な差が認められなかった。 ・雌雄の5mg/m³の暴露群において、暴露期間の4週間後では、いずれの臓器においても有意な重量の差は認められなかった。 ・すべての暴露量の群において、MWCNTの繊維が肺(気管支、肺胞腔及び肺胞壁)に堆積しており、この堆積は主に肺胞マクロファージ内に認められた。暴露期間の4週間後、肺における持続的な堆積が観察された。 ・5mg/m³暴露群では、暴露期間後に気管支関連リンパ組織及び期間周囲のリンパ節においてMWCNTの堆積が認められた。暴露期間の4週間後には、1mg/m³の暴露群においても認められ、暴露期間後より堆積が増加した。 ・1及び5mg/m³暴露群では、暴露期間後に、鼻腔及び鼻咽頭の杯細胞の過形成が観察されたが、暴露期間の4週間後にはこの過形成は退行していた。 ・5mg/m³暴露群では、暴露期間後に肺の肉芽腫性変化が観察され、暴露期間の4週間後に増加していた。この変化は、MWCNTを貪食した肺胞マクロファージによるものであり、少量のコラーゲン線維が堆積していた。肉芽腫性変化内又はその周辺に多核の巨細胞が観察された。 ・暴露濃度依存的にBALF中のマクロファージが減少し、1及び5mg/m³の暴露群において、好中球が増加していた。雌では、さらに5mg/m³の暴露群において、リンパ球が増加していた。 ・1及び5mg/m³の暴露群のBALFにおいて、暴露期間後に多核マクロファージの割合が上昇した。 ・すべての暴露濃度群のBALFにおいて、暴露期間後、及びその4週間後に肺胞マクロファージによって貪食されたMWCNT繊維が観察された。これらのマクロファージの多くは、細胞質に多数の液胞様空胞が満ちており、死滅し細胞質を失ったマクロファージも観察された。 ・暴露期間後、暴露濃度依存的にBALF中の総タンパク質、アルブミン量及びアルカリホスファターゼ活性が上昇し、暴露期間の4週間後においてもこの上昇が観察された。 	<ul style="list-style-type: none"> ・MWCNTを吸入暴露したラットでは、肺にMWCNTが堆積し、暴露期間の4週間後においてもその大部分が残留した。 ・5mg/m³の暴露群では、肺に肉芽腫性変化が認められ、これらの変化は、暴露期間の4週間後に若干悪化していた。 ・1及び5mg/m³暴露群のBALF中では、好中球及び多核マクロファージの割合が増加し、ALP活性及び総タンパク質量とアルブミン量が増加した。暴露期間の4週間後においても、BALFパラメータ値の上昇が継続した。 ・組織学的変化及び炎症性変化に基づき、MWCNTの2週間吸入暴露に関する無毒性量(NOEL)は、0.2mg/m³であった。

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/ 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	Yuanqin Jiang, Honggang Zhang, Yange Wang, Min Chen, Shefang Ye, Zhenqing Hou, Lei Ren/ PLOS ONE June(2013) vol.8 Issue6	Modulation of Apoptotic Pathways of Macrophages by Surface-Functiona lized Multi-Walled Carbon Nanotubes (機能性多層カー ボンナノチューブ によるマクロファ ージのアポトーシ ス経路の調製)	<p>■対象物質 多層カーボンナノチュ ープ(入手元 Nanotech Port C. Ltd.)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・MWCNT-COOH MWCNT を H₂SO₄/HNO₃ で 精製 長さ 0.9±0.5 μm 直径 24.6±9.7 nm 純度(wt% Fe) 0.0074 表面電位 -20.2 mV 表面積 98 m²/g ・MWCNT-PEG MWCNT と PEG をポリ(エ チレングリコール)によ って結合 長さ 0.8±0.6 μm 直径 247.3±12.5 nm 純度(wt% Fe) 0.0042 表面電位 -35.6 mV 表面積 78 m²/g <p>■試料調製法 使用前直前に培地に懸濁</p>	<p>■試験生物 BALB/c マウス(雌 6-8 週齢) RAW264.7 細胞</p> <p>■投与方法 腹腔内注射</p> <p>■試験方法 ・細胞生存性試験 (WST-1 アッセイ) ・MWCNT の細胞取り込み 量試験(フローサイト メトリー)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・アポトーシスアッセ イ(TUNEL アッセイ) ・カスパーゼ活性アッ セイ ・免疫蛍光染色 ・細胞内活性酸素種 (ROS)生成量測定 ・NADPH オキシダーゼ活 性アッセイ ・ミトコンドリア膜ポ テンシャルアッセイ (投与用量 75 μg/mL) ・電気泳動移動度シフ ト・解析(EMSA) ・ウエスタンブロット 解析 	<ul style="list-style-type: none"> ・RAW264.7 細胞に対して、MWCNT-COOH、あるいは MWCNT-PEG を 75 μg/mL で 24 時間暴露させたところ、細胞生存性が明らかに減少したが、同一の濃度においては、MWCNT-PEG は MWCNT-COOH に比べ毒性が低かった。 ・ラットのプライマリーなマクロファージでも MWCNT-PEG の毒性は MWCNT-COOH よりも低かった。 ・MWCNT-COOH は開始から 2 時間で取り込み量の経時的増加が見られたが、MWCNT-PEG の取り込み量は-COOH のそれよりも少なかった。 ・細胞内に取り込まれた機能性 MWCNT はインキュベーション 12 時間以内は主に細胞質に局在しており、核への移行はなかった。 ・RAW264.7 細胞において、MWCNT-PEG 及び MWCNT-COOH の両方で細胞のアポトーシスの誘導が見られた。 ・機能性 MWCNT により誘発される細胞毒性はアポトーシスによる細胞死として現れることが示された。 ・RAW264.7 細胞を MWCNT-COOH で処理すると、カスパーゼ 3 及び 9 の活性が投与用量依存的に増加したが、カスパーゼ 8 は活性化されなかった。MWCNT-PEG の活性化増強作用は-COOH よりも少なかった。 ・MWCNT-COOH はミトコンドリアから細胞質へとシトクロム c を放出させ、アポトーシス促進性 Bcl-2 の発現を上昇させた。一方 MWCNT-PEG はアポトーシス成分への影響は少なかった。 ・MWCNT-PEG 処理した細胞の過酸化ラジカルの蓄積は、MWCNT-COOH よりも格段に少なかった。 ・MWCNT-COOH で処理した RAW264.7 細胞は、MWCNT-PEG 処理の細胞よりも高い NADPH オキシダーゼ活性を示した。 ・MWCNT-COOH は MWCNT-PEG よりも多くの p47phox 及び p67phox のメンブレン移行を誘導した。 ・MWCNT-COOH は MWCNT-PEG よりも高い p38MAPK 活性を誘導したが、JNK 及び ERK 活性への影響はどちらの MWCNT も少なかった。 ・暴露後 3 時間の NF-κB DNA 結合活性は、MWCNT-COOH に比べ MWCNT-PEG でより少なかった。 ・MWCNT-PEG は、IκBa の分解及び p65 の核移行の誘導は MWCNT-COOH に比べより少なかった。 ・機能性 MWCNT は ROS、p38 MAPK 及び NF-κB 経路によって駆動される NADPH オキシダーゼの一部に依存したアポトーシスを引き起こすことが示唆された。 	<ul style="list-style-type: none"> ・MWCNT-PEG は細胞への取り込み量が少ないため、細胞毒性及びアポトーシス作用が MWCNT-COOH に比べ低かった。 ・MWCNT-PEG による NADPH の活性化を含めた ROS 生成の誘導も、MWCNT-COOH に比べて少なかった。 ・MWCNT-PEG は細胞内への取り込み量が少ないため、p38 マイトゲン活性タンパク質キナーゼや核因子(NF)-κB といった酸化ストレス応答経路の活性化が低かった。 ・CNT の表面にある機能性分子が ROS に仲介される細胞毒性や、アポトーシスシグナル経路の調製によるアポトーシス応答に変化を与えるようだ。

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/ 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	Ruibin Li, Xiang Wang, Zhaoxia Ji, Bingbing Sun, Haiyuan Zhang, Chong Hyun Chang, Sijie Lin, Huan Meng, Yu-Pei Liao, Meiyang Wang, Zongxi Li, Angela A. Hwang, Tze-Bin Song, Run Xu, Yang Yang, Jeffrey I. Zink, Andre E. Nel, and Tian Xia/ ACSNANO VOL. 7 ' NO. 3 ' 2352-2368 ' 2013	Surface Charge and Cellular Processing of Covalently Functionalized Multiwall Carbon Nanotubes Determine Pulmonary Toxicity (表面電荷及び細胞内の機能性カーボンナノチューブの共有結合が肺の毒性を決定する)	<p>■対象物質 多層カーボンナノチューブ (AP-MWCNT) 入手元 Cheap Tibes Inc. 機能性多層カーボンナノチューブ (f-MWCNT) AP-MWCNT から合成 ・ COOH-MWCNT ・ sw-NH₂-MWCNT COOH-MWCNT から合成 ・ PEG-MWCNT ・ NH₂-MWCNT ・ PEI-MWCNT</p> <p>■試料調製 脱イオン水に 2 mg/mL で懸濁し、100W、15 分間超音波破碎した溶液を、培地若しくは PBS に懸濁し、使用直前に 15W、15 秒間破碎した。分散度を上げるため、培地若しくは PBS には 0.6 mg/mL BSA 及び 0.01 mg/mL DPPC を添加した。</p>	<p>■試験生物 BEAS-2B 細胞(不死化ヒト気管支上皮細胞株) THP-1 細胞(マクロファージ様細胞株) C57Bl/6 マウス (雄 8 週齢)</p> <p>■投与方法 (マウス) 口咽頭吸入法 (oropharyngeal aspiration method) 投与用量 2mg/kg 投与 40 時間若しくは 21 日目に屠殺。</p> <p>■試験方法 ・細胞への取り込み量の検出 (透過型電子顕微鏡) ・細胞内 MWCNT の定量 (吸光度測定) ・気管支肺洗浄液 (BALF) の細胞数測定及び IL-1b、TGF-β1、PDGF-AA 値の測定 ・肺のコラーゲン生成量の測定 ・カテプシン B の局在観察 (共焦点顕微鏡) ・コラーゲン定量 (Sircol assay) ・共焦点ラマン顕微</p>	<p>・培養条件下において最も安定なのは非イオン性の COOH 及び PEG-MWCNT で、以後 AP、NH₂、sw-NH₂ だった。陽イオン性の PEI-MWCNT は最も安定性が低かった。 ・MTS アッセイの結果、120 μg/mL の MWCNT は細胞毒性を示さなかった。 ・60 μg/mL の f-MWCNT を 24 時間反応させた細胞では、多くの場合で成長因子 IL-1b、TGF-β1、PDGF-AA の発現が上昇していたが、非イオン性の COOH 及び PEG-MWCNT を反応させた細胞における発現量は対照群よりも低かった。NH₂-MWCNT を反応させた細胞は、わずかに IL-1b 及び PDGF-AA が低下した。 ・CNT の長さは自身の線維形成促進能に影響を与えておいた。 ・チューブ表面の陽イオン化はサイトカインや成長因子の生成を促進させた。 ・透過型電子顕微鏡の観察によると、MWCNT は両方の細胞において細胞膜に結合した小胞内に取り込まれていたが、細胞や細胞内小器官の形態変化は見られなかった。 ・AP-MWCNT に比べ、PEI-MWCNT は取り込み量が多く、PEG-MWCNT 及び COOH-MWCNT は少なかった。 ・細胞内への取り込み量は IL-1b の生成と相関が見られた。 ・IL-1b の生成は内部移行した MWCNT の量によって決められ、リソソームの損傷と NLRP3 インフラマソーム活性を誘導することが示された。 ・COOH-MWCNT を除く MWCNT からはカテプシン B が遊離していた。 ・MWCNT 投与 40 時間後の動物において、BALF 中の IL-1b 値は MWCNT の種類とは無関係に増加していた。一方 PDGF-AA の生成は PEI-MWCNT で最も多く、COOH-MWCNT が最も低かった。TGF-β1 は変化は見られなかった。 ・慢性的な肺の炎症は PEI-MWCNT によって明らかに悪化が見られ、NH₂-MWCNT sw-NH₂-MWCNT の投与によっても悪化が見られた。 ・PEI-MWCNT の投与は AP-MWCNT 投与群に比べ肺におけるコラーゲン堆積が顕著に見られたが、COOH-MWCNT 及び PEG-MWCNT 投与群は顕著なコラーゲン堆積の増加は見られなかった。</p>	<p>・AP-MWCNT に比べ、陰イオンを付与 (COOH 及び PEG) した MWCNT は線維形成促進性サイトカイン及び成長因子 (IL-1b、TGF-β1、PDGF-AA 等) の生産が減少した。中性及び弱陽イオン性の MWCNT (NH₂ 及び sw-NH₂) は中間的作用を示し、強陽イオン性である PEI-MWCNT は強い生物学的作用を示した。 ・非修飾の MWCNT に比べ、強陽イオン性の PEI-MWCNT は肺線維症を引き起こし、カルボキシル化は肺線維症の範囲を減少させた。 ・本試験により表面電荷は肺における f-CNT の線維形成促進能を決定づける構造と活性の相互作用において重要であることが示された。</p>

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/ 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	Jessica Ponti, Francesca Brogi, Valentina Mariani, Laura De Marzi, Renato Colognato, Patrick Marmorato, Sabrina Gioria, Douglas Gililand, Cesar Pascual Garcia, Stefania Meschini, Annarita Stringaro, Agnese Molinari, Hubert Rauscher, & Francois Rosi / Nanotoxicology (2013); 7(2); 221-233	Morphological transformation induced by multiwall carbon nanotubes on Balb/3T3 cell model as an in vitro end point of carcinogenic potential (発癌能の in vitro エンドポイントのモデル細胞 Balb/3T3 に多層カーボンナノチューブで引き起こされる形態変化)	<ul style="list-style-type: none"> ■対象物質 多層カーボンナノチューブ 入手元 Nanocyl S. A. (Belgium) ・非修飾 (粒径 9.5nm/長さ 1.5μm/炭素純度 90%) ・-COOH 付加 (9.5/1.5/>95%) ・-NH₂ 付加 (9.5/<1/>95) ・-OH 付加 (9.5/<1/>95) ■試料調製 10g/mL を DMSO で調製し、培地で目的濃度に適宜希釈 (DMSO の最終濃度は 1% となるように調製) ■試験用量 1, 10, 100 μg/mL ■ポジティブコントロール アスベスト繊維 入手元 the Institute of Occupational Medicine Milliq で 10mg/mL に懸濁し、適宜培地で希釈 	<ul style="list-style-type: none"> ■試験生物 マウス線維芽細胞株 Balb/3T3 ■試験方法 (暴露期間) ・電子顕微鏡 (SEM: 走査型電子顕微鏡, TEM: 透過型電子顕微鏡) による粒子と細胞の相互作用観察 (72 時間、100 μg/mL) ・細胞形態転換アッセイ ・コロニー形成効率 (mwCNT: 24 時間、アスベスト繊維: 72 時間) ・形態変化 (72 時間) ・小核試験 (24 時間) 	<ul style="list-style-type: none"> ■粒子特性 ・いずれの mwCNT も培地中で堆積するが、中でも -COOH 付加型と非修飾型は堆積スピードが速かった。 ■粒子と細胞相互作用 ・100 μg/mL の mwCNT を暴露した細胞は、細胞膜において mwCNT の凝集が見られた。 ・-COOH 付加型と非修飾型は細胞膜と強力に相互作用するものの、細胞内には取り込まれていなかった ・-NH₂ 型と -OH 型は細胞内に取り込まれていた ・mwCNT の暴露は、SEM で観察すると細胞の形態変化を引き起こさないが、TEM で観察すると核の変形や、オルガネラや空胞が多い細胞質などが見られた。 ■細胞毒性、形態転換及び遺伝毒性 ・mwCNT 及びアスベスト繊維の暴露 24 時間から 72 時間は細胞毒性は認められなかった。 ・アスベスト繊維は投与用量依存的にコロニー形成数が減少した。 ・形態転換アッセイでは、-NH₂: 1 μg/mL ($p < 0.01$) 及び 10 μg/mL ($p < 0.01$)、-COOR: 1 μg/mL ($p < 0.05$)、-OH: 10 μg/mL ($p < 0.01$)、被修飾型: 10 μg/mL ($p < 0.01$) で有意な影響が見られた。 ・形質転換アッセイにおいて投与用量依存的な影響が見られたのは非修飾型のみであった。 ・形質転換アッセイにおいて、100 μg/mL の投与は全ての mwCNT でポジティブな結果を示した。 ・形質転換したコロニーは多層に重なり、周囲の単層に分岐していた。 ・全ての試験サンプルで有意な小核形成は見られなかった。 	<ul style="list-style-type: none"> ・細胞形態転換アッセイ、小核試験、形態学的解析といった試験から得た結果、mwCNT に細胞特性及び遺伝毒性は見られなかった。 ・mwCNT は発癌性及び細胞相互作用があることが認められた。 ・ナノマテリアルの試験では、発癌性など長期的な影響と、細胞毒性や遺伝毒性といった即効性の影響と、双方を考慮できるエンドポイントが必要である。

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/ 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	Brandi N Snyder-Talkingt on, Diane Schwegler-Berry , Vincent Castranova, Yong Qian and Nancy L Guo/ Particle and Fibre Toxicology 2013, 10:35	Multi-walled carbon nanotubes induce human microvascular endothelial cellular effects in an alveolar-capillar y co-culture with small airway epithelial cells (微小気道上皮細胞 と共培養した肺 胞毛細管において 多層カーボンナノ チューブが引き起 こすヒト毛細血管 内皮細胞の影響)	■対象物質 多層カーボンナノチュ ーブ (MWCNT) 入手元: Mistui-&-Company 20-50 層 金属汚染: ナトリウム (0.41%)、鉄 (0.32%)、 その他 (0.02%) 長さ: 3.86 μ m 幅 49 \pm 13.4 nm ゼータ電位 -11mV ■試料調製 MWCNT は分散性を高め る DM 溶液に懸濁した後 4 $^{\circ}$ C、5 分間の間接的超 音波破碎した。その後 直接的に 5 分間超音波 破碎した。0.5 mg/mL のストック溶液は 4 $^{\circ}$ C で保存し、2-3 週間以内 に使用した。細胞培養 に使用する直前に直接 的に 1 分間超音波破碎 した。 ■試験用量 1.2 μ g/mL	■試験生物 ヒト微小気道上皮細胞 (SAEC) ヒト毛細血管内皮細胞 (HMVEC) ■投与期間 6、24 時間 ■試験方法 ELISA 共焦点顕微鏡 血管新生アッセイ PathScan inflammation マルチターゲットサン ドイッチ ELISA	・SAEC と HMVEC の共培養に MWCNT を添加したところ、上皮細胞とは相互作用が見られたが、共培養システムの Transwell membrane を通過できないため内皮細胞への相互作用は明確でなかった。 ・共培養システムにおいて頂部で SAEC を単独で培養して MWCNT を 24 時間暴露したところ、頂部のチャンパーにおける VEGFA レベル及び底部のチャンパーにおけるタンパク質レベルが上昇していた。このことから、SAEC から分泌された細胞内メディエーターは Tranwell membrane を通過して、底部の内皮細胞に影響を及ぼし得ることが判明した。 ・共培養システムにおいて HMVEC を底部チャンパーで単独培養し、頂部チャンパーに MWCNT を暴露したところ、底部の VEGFA レベルは ELISA の検出限度以下であった。 ・SAEC と HMVEC を共培養して MWCNT を暴露した後、頂部及び底部の VEGFA タンパク質レベルは上昇していた。炎症反応に関連する sICAM-1 タンパク質及び sVCAM-1 タンパク質も、頂部及び底部で共に上昇していた。 ・頂部の SAEC に MWCNT を暴露させると、暴露時間の長さに比例して底部の HMVEC によるスーパーオキシドラジカルの産出が増加した。 ・SAEC への暴露時間の長期化は、HMVEC の細胞骨格のアクチン変質を招き、膜のラフリング、ストレスファイバーの欠損、HMVEC 細胞間のギャップ構造の喪失を引き起こした。 ・共培養の状態での暴露を行い、その後単独で培養した HMVEC は、暴露を行わなかった対照群に比べ毛管状微細構造の形成が多く見られた。共培養から離脱後にも血管新生能力の増強が見られたことから、MWCNT が SAEC を通じて細胞内シグナルへの影響を与えたことが示唆された。 ・SAEC への MWCNT 暴露後、共培養した HMVEC の NF- κ B レベルは有意に減少していたが、リン酸化 NF- κ B p65、リン酸化 Stat3、及びリン酸化 p38 MAPK は増加していた。SAEC への MWCNT 暴露後、共培養した HMVEC のリン酸化 SAPK/JNK 及びリン酸化 I κ B- α に顕著な変化は見られなかった。	・肺胞毛細管の MWCNT への暴露は、MWCNT の暴露により上皮細胞から放出された細胞シグナルメディエーターを通じて、下にある血管内皮に多彩な変化を引き起こすことが共培養システムにより確認された。 ・共培養システムは、MWCNT の肺毒性を試験する in vitro の手法として適切である。

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/ 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	Raymond F. Hamilton Jr, Chengcheng Xiang, Ming Li, Ibrahima Ka, Feng Yang, Dongling Ma, Dale W. Porter, Nianqiang Wu, and Andrij Holian	Purification and sidewall functionalization of multiwalled carbon nanotubes and resulting bioactivity in two macrophage models (多層カーボンナノチューブの精製及び側鎖の機能付与と、二つのマクロファージモデルにおいて生じるパイオアクティビティ)	<p>■対象物質 多層カーボンナノチューブ (MWCNT) 入手元 Nanostructured & Amorphous Materials, Inc.</p> <p>・精製法 塩酸塩に懸濁し、30分間超音波破碎した。80-90°Cで4時間還流した後、室温で自然に冷却し、遠心した。上清を除去し、沈殿を洗浄してpHを6.0-7.0に調整し、真空オーブンで一晩乾燥させた。</p> <p>・4種のMWCNT 未精製MWCNT 精製MWCNT カルボキシル基付与未精製MWCNT カルボキシル基付与精製MWCNT</p> <p>■試料調製法 BSA入りPBSに5mg/mLで懸濁し、1分間超音波破碎してストック溶液を作成した。</p> <p>■試験用量 0、10、25、50及び100µg/mL</p>	<p>■試験生物 C57Bl/6マウス(2ヶ月齢、雄)由来マクロファージ ヒトモノサイト細胞株THP-1</p> <p>■試験方法 毒性アッセイ(MTSアッセイ) サイトカインアッセイ カスパーゼ1イメージング及び定量</p>	<p>・未精製のMWCNT及びHClで精製したMWCNTの溶解度は低かったが、硝酸酸化作用後はどちらのカルボキシル基型MWCNTも溶解度が高く、懸濁液は2ヶ月まで安定であった。</p> <p>・透過型電子顕微鏡による観察の結果、HClで精製したMWCNTはより管状構造が明確になっており、HCl処理は表面にある無定形の炭素を効果的に除去していた。HCl還流は、表面の無定形炭素を除去することで、側壁の機能付与を促進していた。</p> <p>・機能付与したMWCNTは、未精製及び精製MWCNTに比べ高濃度においても比較的毒性が低かった。精製自体は毒性に影響を与えなかった。</p> <p>・マクロファージに粒子を暴露することでIL-1b及びIL-18が放出され、濃度依存的なインフラマソーム活性が見られた。このアッセイでは未精製MWCNTの反応が最大であり、続いて精製MWCNTの反応が大きく見られたが、機能付与したMWCNTはどちらも反応は小さかった。</p> <p>・カテプシンB及び阻害剤及びカスパーゼ-1阻害剤を添加したところ、未精製及び精製MWCNTにおいて阻害剤は毒性を反転させるには効果的ではなかったが、IL-1bの放出を減少させた。このことから、細胞毒性及びインフラマソーム活性化の過程はMWCNTの暴露によって相関するものではないことが示された。</p> <p>・全てのタイプのMWCNTにおいて、マクロファージへの取り込みが見られた。精製MWCNTは大きな液胞若しくはファゴリソームに取り込まれ細胞質には存在しなかった。一方二つの機能性MWCNTは大きな液胞には見られず、細胞質において小さなファゴリソーム若しくは無生物構造となって存在していた。</p> <p>・精製MWCNTを暴露したマクロファージはファゴリソームの損傷が見られたが、機能性MWCNTを暴露した細胞においては損傷は見られなかった。</p> <p>・未精製MWCNTを暴露した細胞においてはカスパーゼ1の染色が対照よりも増加していたが、機能性MWCNTにはその減少は見られなかった。精製MWCNTを暴露した細胞においては、カスパーゼ1の染色はわずかに減少していた。機能性MWCNTは精製度合いに関わらずより多く細胞に取り込まれていたことから、機能性MWCNTはその表面構造の違いによって異なるメカニズムで取り込まれることが示唆された。</p> <p>・THP-1細胞によるモデルはナノマテリアルの生物学的活性の評価に重要となる可能性がある。</p>	<p>・HClで精製したMWCNTは、硝酸酸化作用によってカルボキシル基部位に更なる側壁の機能付与強化が誘導された。その結果、未精製、精製、カルボキシル基付与未精製、カルボキシル基付与精製MWCNTの4種が生じた。MWCNTのカルボキシル基の機能付与は、最奥毒性及びインフラマソーム活性を著しく減少させた。</p> <p>・本試験から、MWCNTの生物活性はNIの汚染、及び/又はカルボキシル基の付与によって減少させることが示された。</p>

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/ 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	Brandi N. Snyder-Talkington, Maricica Pacurari, Chunlin Dong, Stephen S. Leonard, Diane Schwegler-Berry, Vincent Castranova, Yong Qian, and Nancy L. Guo / toxicological sciences 133(1), 79-89 2013	Systematic Analysis of Multiwalled Carbon Nanotube-Induced Cellular Signaling and Gene Expression in Human Small Airway Epithelial Cells (ヒトの小気道上皮細胞において多層カーボンナノチューブによって引き起こされる細胞内シグナル及び遺伝子発現の体系的解析)	<p>■対象物質 多層カーボンナノチューブ (MWCNT) 長さ 3.86 μm 幅 49\pm13.4 nm</p> <p>■試料調製法 MWCNT は溶液中に懸濁し、間接的超音波破碎で5分間処理した。その後、直接的超音波破碎を5分間行い、0.5 mg/mL のストック溶液を作製した。使用までの2-3週間、4°Cで保存した。細胞に添加する直前、再び直接的超音波破碎を1分間行った。</p> <p>■試験用量 1.2 $\mu\text{g/mL}$</p>	<p>■試験生物 小気道上皮細胞 (SAEC)</p> <p>■投与方法 1、6、18、24時間</p> <p>■試験方法 ウェスタンブロット解析 共焦点顕微鏡による活性酸素の測定 細胞移動アッセイ 定量的リアルタイムPCR 透過型電子顕微鏡解析 Ingenuity Pathway 解析 ELISA</p>	<p>・in vitro の暴露後 MWCNT と SAEC は結合する 暴露後の MWCNT は SAEC に入り込み、洗浄後も細胞終焉を通じて結合していた。</p> <p>・MWCNT 暴露による活性酸素生成刺激 MWCNT の暴露時間の長期化に従い、SAEC は活性酸素の生成が増加した。</p> <p>・MWCNT 暴露が引き起こす細胞内タンパク質のリン酸化 MWCNT の暴露は、暴露1時間及び24時間において、全体的なチロシンリン酸化の二相性の増加を引き起こし、スレオニンリン酸化の全体的な増加を経時的に引き起こした。</p> <p>・MWCNT 暴露が細胞移動能を増加させた MWCNT を暴露した細胞群は、対照群に比べ移動能が有意に上昇していた。</p> <p>・MWCNT 暴露による遺伝子発現変化 暴露後いくつかの遺伝子は上方及び下方制御を受けており、それら遺伝子の生物学的機能は主に細胞発達、細胞成長及び増殖、細胞シグナル、小分子性化学、及び細胞内移動であった。</p> <p>・MWCNT 暴露が炎症マーカーのタンパク質発現を変化させた CCL2 タンパク質レベルは、暴露24時間後において、対照群の253 pg/mL に対し435 pg/mL と有意に増加した。 VEGF タンパク質レベルは、暴露24時間後において、対照群の82 pg/mL に対して239 pg/mL と有意に増加した。 これらのタンパク質は、23時間後の mRNA 発現が増加しているという結果と一致した。</p>	<p>・SAEC と MWCNT の直接的な相互作用が MWCNT 内部及び細胞外周において確認された。SAEC は暴露を受けると、活性酸素の生成量、総タンパク質のホスホチロシンとホスホスレオニンレベル、そして細胞の移動行動が経時的に増加した。遺</p> <p>・伝子及びタンパク質の発現解析は、肺の損傷、発ガン、及び腫瘍進行を示す多様なバイオマーカーと、関連するシグナル経路に含まれる遺伝子の調節が変化していることが明らかになった。</p> <p>・MWCNT 暴露から得られた遺伝子発現データは、小気道における MWCNT の作用機序を明らかにし、リスク評価で指標となる可能性のある遺伝子を示した。</p>

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/ 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	Kosuke Shimizu, Arina Uchiyama, Mina Yamashita, Akihiko Hirose, Tetsuji Nishimura and Naoto Oku/ J. Toxicol. Sci. Vol.38, No.1, 7-12, 2013	Biomembrane damage caused by exposure to multi-walled carbon nanotubes (多層カーボンナ ノチューブの暴露 により引き起こさ れる生体膜の損傷)	<p>■対象物質 多層カーボンナノチ ューブ (MWCNT) 入手元 昭和電工 (株) 150nm 長さ 8μm</p> <p>■試料調製法 MWCNT は PBS に 1mg/mL 濃度で懸濁し、10 分間 の超音波破碎を 2 種の 機械で実施した。</p> <p>■試験用量 0、1、10、100 μg/mL</p>	<p>■試験生物 RAW264 細胞</p> <p>■投与方法・期間 24 時間</p> <p>■試験方法 WST-8 アッセイ 位相差顕微鏡観察 LDH 放出アッセイ カルセイン放出アッセ イ</p>	<p>■RAW264 に対する細胞毒性 MWCNT の暴露は濃度依存的に RAW264 細胞の生存率を低下させた。用 量 100 μg/mL においてはほぼ全ての細胞が死亡した。</p> <p>■RAW264 細胞内における分布 位相差顕微鏡による観察の結果、MWCNT は懸濁液中で針状の形状で、 凝集していた。また暴露 3 時間後には RAW264 細胞表面に結合し、 一部はプラズマメンブレンに突き刺さっている様子が見られた。よ って、MWCNT はマクロファージのプラズマメンブレンと相互作用す ることが示唆された。</p> <p>■MWCNT による膜損傷 生体膜損傷の指標となる LDH の放出量を測定した結果、暴露 1 時間 後から LDH の放出が検出され、3 時間後にはその量は増加していた。 MWCNT と脂質二重層の相互作用を検討するカルセリンアッセイの結果、 リボソームメンブレンの損傷を示すカルセリンの放出は、100 μg/mL の MWCNT 暴露後に検出された。これらの結果から、MWCNT は 細胞表面に結合してプラズマメンブレンに物理的損傷を引起し、 その結果急性の細胞死を引き起こすことが確認された。</p>	<p>・ RAW264 細胞内の MWCNT はプラズマメンブレンの 表面に局在していて、一部 は内部に貫通しているよ うであった。100 μg/mL の CNT の暴露は LDH の放出 を招いた。生体膜に及ぼす CNT の物理的損傷を検討 したところ、脂質に重曹の 透過性が増加しているこ とが判明した。</p> <p>・ 本試験の結果、高濃度の MWCNT はマクロファージ に対して細胞毒性を持ち、 MWCNT によって引き起こ される直接的な物理的生 体膜の摂動がその活性に 関与していることがわか った。</p>
26	Robert R Mercer, James F Scabilloni, Ann F Hubbs, Liying Wang, Lori A Battelli, Walter McKinney, Vincent Castranova and Dale W Porter/ Particle and Fibre Toxicology 2013, 10:38	Extrapulmonary transport of MWCNT following inhalation exposure (吸入暴露した MWCNT の肺外への 輸送)	<p>■対象物質 MWCNT 入手元 Hodogaya Chemical Company</p> <p>■試験用量 5 mg/m³、5 時間/日、 12 日間</p>	<p>■試験生物 C57BL/6 J マウス (7 週 齢)</p> <p>■投与方法・期間 吸入暴露 5 時間/日、12 日間</p> <p>■試験方法 組織切片染色 電子顕微鏡解析 暗視野顕微鏡解析</p>	<p>・ 気管内のリンパ節含量は、暴露 1 日後に肺負荷の 1.08%、336 日 後に 7.34%であった。肺負荷の約 54%はアグロメレートであったが、 横隔膜、胸壁、肝臓、腎臓、心臓及び脳においてはシングレットの MWCNT が見られた。</p> <p>・ 暴露 1 日後において、肝臓及び腎臓におけるシングレット MWCNT の平均的長さは肺に匹敵し、それぞれ 8.2\pm0.3、及び 7.5\pm0.4 μm であった。</p> <p>・ 肝臓、腎臓、心臓及び脳における暴露 1 日後の平均値は、15371 繊維/g、336 日後は 109885 繊維/g であった。</p> <p>・ リンパ節、横隔膜、胸壁及び肺外の組織におけるシングレット MWCNT の負荷は、暴露 1 日後に比べ暴露 336 日後は有意に高かった。</p>	<p>・ MWCNT の暴露は肺に堆積 し、胸膜の一部、呼吸器の 筋系、肝臓、腎臓、心臓及 び脳へシングレットの形 態で輸送され、時間経過と 共に蓄積した。</p> <p>・ 暴露後、気管内リンパ節 には高レベルの MWCNT が 含まれ、約 1 年間にわたっ て蓄積し、暴露 1 日後の肺 負荷のかなりの割合に達 した。</p>

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/ 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	Yumi Umeda, Tatsuya Kasai, Misae Saito, Hitomi Kondo, Tadao Toya, Shigetoshi Aiso, Hirokazu Okuda, Tomoshi Nishizawa, and Shoji Fukushima J Toxicol Pathol 2013; 26: 131- 140	Two-week Toxicity of Multi-walled Carbon Nanotubes by Whole- body Inhalation Exposure in Rats (多層カーボンナ ノチューブを2週 間全身に吸入暴露 したラットに見ら れる毒性)	<p>■対象物質 多層カーボンナノチュ ーブ (MWCNT)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・表面積 24-28 m²/g ・純度 99.8% (wt/wt) ・入手元 Hodogaya hemical Co., Ltd ・粒子径 幅 88±5nm、 長さ 5.0±4.5 μm (38.9%は長さ 5 μm 以 上) <p>■試験用量 0.2, 1, 5 mg/m³</p>	<p>■試験生物 F344/DuCrIjラット 雌雄</p> <ul style="list-style-type: none"> ・5週齢 <p>■投与方法 吸入暴露</p> <p>■投与期間 6時間/日、5日/週で 2週間</p> <p>■試験方法 医学的所見と病理検査 ・解剖所見 (投与終了 時及び投与終了4週間 後)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・血液学的解析 ・血液生化学 ・組織 (胸腺、副腎、 精巣、卵巣、心臓、左 肺、腎臓、脾臓、肝臓、 及び脳) の観察 組織 (肺、気管、鼻腔、 気管支関連リンパ組織 (BALT)、気管周囲リン パ節、肝臓、及び腎臓) のH&E染色及び免疫染色 ・気管支肺洗浄液 (BALF) の生化学的及び 細胞生物学的解析 総タンパク量 アルブミン及びアルカ リフォスファターゼ (ALP) 活性測定 	<p>■医学的所見</p> <ul style="list-style-type: none"> ・2週間の投与期間中、体重は低下したが、10%を超える成長の遅延は見られなかった。 ・投与完了4週間後に対照群との体重の違いは見られなかった。 <p>■病理学的所見</p> <ul style="list-style-type: none"> ・投与完了時、5mg/m³の投与群の肺の重量は、対照群に比べ1.15倍とわずかに増加した。 ・投与完了4週間後に投与群と対照群の臓器の重量に違いは見られなかった。 ・投与完了時、肺 (気管支、肺胞空間、及び肺胞壁) におけるMWCNTの堆積が見られた。4週間後MWCNT繊維はわずかに伸びて肺胞空間に残存。0.2mg/m³の投与群は、投与完了4週間後の肺胞壁におけるMWCNTの堆積がわずかに上昇。投与完了4週間後、全ての投与群においてMWCNTの強固な堆積が見られた。 ・投与完了時、5mg/m³投与群はBALT及び気管周囲リンパ節にMWCNTの堆積が見られた。1、5mg/m³投与群は、投与完了4週間後においてもMWCNTの堆積と、短いMWCNTが見られた。 ・投与完了時、1.5mg/m³投与群は鼻腔及び鼻咽頭における杯状細胞 ・5mg/m³投与群のラットは投与完了時及び4週間後において肉芽腫の変化が見られ、肺胞のマクロファージに貪食されたMWCNTの凝集と、コラーゲン線維のわずかな堆積が観察された。肉芽腫内及びその周囲に多核化した巨大細胞も見られた。 ・肺胞壁とリンパ節においてMWCNTが堆積している部位において細胞の浸潤は見られなかった。 ・リンパ節において肉芽腫形成は見られなかった。 <p>■BALFの細胞学及び生化学的解析</p> <ul style="list-style-type: none"> ・投与完了時、マクロファージが減少、4週間後も対照群より少なかった。 ・投与完了時、1、5mg/m³投与群は好中球が増加、また5mg/m³投与群はリンパ球が増加していた。1、5mg/m³投与群は多核マクロファージが増加していた。 ・投与完了4週間後、5mg/m³投与群の好中球とリンパ球は対照群に比べ増加していた。 ・投与完了時及び4週間後、投与群には肺胞のマクロファージに貪食されたMWCNT繊維が見られた。 ・投与完了時、BALF中の総タンパク量、アルブミン及びALP活性が増加。4週間後も依然わずかな増加が見られた。 	<ul style="list-style-type: none"> ・MWCNTは多くが肺に堆積し、排出されない。 ・MWCNTは肺から出てリンパ節に輸送される。 ・肺からMWCNTが排出されにくいのは、MWCNTを貪食したマクロファージによる肉芽腫の形成が排出を妨げている可能性がある ・投与完了4週間後の肺における堆積の残存がBALFにおける炎症に影響している ・病理学的知見と炎症変化より、MWCNTを2週間投与したNOAELは0.2mg/m³である。 ・MWCNTは長期にわたって肺に残存し、リンパ系によって移送されるため、より長期にわたる毒性試験が必要である。

4) グラフェン

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/ 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	Xiaofang Tan, Liangzhu Feng, Jing Zhang, Kai Yang, Shuai Zhang, Zhuang Liu, and Rui Peng / Appl. Mater. Interfaces 5:1370-1377 (2013)	Functionalization of graphene oxide generates a unique interface for selective serum protein interactions (グラフェン酸化物の機能付与により、選択的な血清タンパク質との相互作用に関する特有の接触面を作り出す)	<p>■対象物質</p> <ul style="list-style-type: none"> ・グラフェン酸化物 (GO) (合成) ・PEG 化 GO (nGO-PEG) <p>GO を PEG 化</p> <p>サイズ (AFM 測定)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・GO : 数 μm までの大きさのナノシート ・nGO-PEG : 10~50nm のナノシート <p>ゼータ電位</p> <ul style="list-style-type: none"> ・GO - -47.6mV ・nGO-PEG - -13.5mV <p>■試験用量</p> <ul style="list-style-type: none"> ・結合血清中タンパク質の解析 : GO - 0.4mg/ml nGO-PEG - 0.05, 0.25mg/ml ・補体 C3 活性化アッセイ : GO - 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ nGO-PEG - 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ・U937 細胞を用いたカルシウム・フラックスアッセイ : nGO-PEG 結合ビーズ 33 $\mu\text{g}/\text{m}$ 添加血清及びその上清 	<p>■試験生物</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ヒト血清 ・U937 細胞 (C3aR 発現細胞) <p>■投与方法</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ヒト血清に所定濃度の対象物質を添加した。 ・Fura-2/AM を負荷した U937 細胞 (1×10^6) にサンプル血清又は上清を添加した。 <p>■試験方法</p> <ul style="list-style-type: none"> ・GO 又は nGO-PEG と血清を反応 (37°C, 1h) させ、結合タンパク質を回収 (遠心沈降又はプルダウン・アッセイ) し、LC MS/MS 解析 ・補体 C3 活性化アッセイ : ウェスタンブロット法 ・U937 細胞を用いたカルシウム・フラックスアッセイ 	<p>■血清タンパク質との相互作用</p> <ul style="list-style-type: none"> ・GO は血清タンパク質との非特異的な疎水性吸着を示したが、PEG 化した nGO-PEG は、選択性の高い血清タンパク質との吸着を示した。 ・nGO-PEG と選択的に吸着した血清蛋白質の LC MS/MS 解析の結果、血小板第 4 因子 (PF4)、ビトロネクチン、C3a/C3a (des-Arg)、クラスタリン (α 鎖及び β 鎖)、トロンビン、ヒスチジンリッチ糖たんぱく質 (HRG) が同定された。これらのタンパク質は、すべて免疫応答に関与するタンパク質であった。 ・同定された nGO-PEG 吸着タンパク質の pI は、5.46~9.69 であり、これらのタンパク質との結合が非特異的な静電気引力を介するものではなく、何らかの特異的相互作用によることが示唆された。 ・C3a/C3a (des-Arg) のペプチド配列は C3 にも含まれるが、nGO-PEG は C3 より C3a/C3a (des-Arg) と選択的に結合することから、両者間の全体的な配座及び二次構造の違いが nGO-PEG との相互作用に寄与している可能性がある。 ・補体 C3 活性アッセイにおいて、GO は著しい C3 の開裂を引き起こした。nGO-PEG による C3 の開裂は、GO と比較して非常に減少しており、その程度は補体活性化能を有するザイモサンと同程度であり、PEG 化によって補体の親和性が適度に改善されることが示された。 ・nGO-PEG への C3a の結合には C3 の活性化が必要ではないこと、nGO-PEG 処理した血清の上清中の C3a 濃度が非常に減少していることが示された。 ・U937 細胞を用いたカルシウム・フラックス試験において、C3a が結合した nGO-PEG は細胞内カルシウム量を上昇させなかったことから、nGO-PEG は C3a との結合によって C3a と C3aR 間の相互作用を抑制し得ることが示唆された。 	<ul style="list-style-type: none"> ・GO の PEG 化は、その表面の化学的性質を変化させ、GO と様々な血清因子との相互作用に影響を及ぼす。 ・PEG 化した GO (nGO-PEG) は、C3a/C3a (des-Arg) と特異的に結合し、C3a と C3aR 間の相互作用を抑制することが可能である。 ・nGO-PEG は、その他のナノ物質によって誘導される C3a/C3a (des-Arg) の除去に活用できる可能性がある。

5) ナノカーボン (2 種以上)

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/ 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	Eleonore Frohlich, Claudia Meindl, Anita Hofler, Gerd Leitinger, & Eva Roblegg/ Nanotoxicology, November 2013; 7(7): 1211-1224	Combination of small size and carboxyl functionalisation causes cytotoxicity of short carbon nanotubes (粒子の小ささとカルボキシル機能付与の組み合わせによって引き起こされるショートカーボンナノチューブの細胞毒性)	<p>■対象物質 ショートカーボンナノチューブ (Short CNT) 入手元 CheapTubes Inc. 多層カーボンナノチューブ・MCNT8 ・MCNT8c (COOH) ・MCNT20 ・MCNT50c</p> <p>単層カーボンナノチューブ ・SCNT ・SCNTc すべてのカーボンナノチューブに以下の記載有。 (流体力学的サイズ (nm)、表面電位 (mV)、単体 CNT 直径 (nm)、単体 CNT の長さ (nm)、CNT 束直径 (nm)、CNT 束長さ (nm))</p> <p>■試料調製法 培地に懸濁後、超音波破碎。 単体粒子とアグリゲーションの効果を個別に検討する際は、室温で遠心し、大きな塊を除去し細胞に添加。</p> <p>■試験用量 0-500 μg/ml</p>	<p>■試験生物 EAhy926 A549 HepG2 DMBM-2 V79 TK-6</p> <p>■投与期間 4 時間 24 時間</p> <p>■試験方法 ・アデノシン三リン酸含量測定 ・ホルマザン生体内還元性アッセイ ・DNA 定量 ・アポトーシスアッセイ ・膜統合性 ・還元型グルタチオンの定量</p>	<p>・CNT を暴露した細胞で全ての CNT 及び暴露時間 (4 時間、24 時間) において、明確な差は見られなかったが、この結果は顕微鏡による観察と一致しなかった。</p> <p>・LDH 放出量及び総タンパク質の検出の結果、カルボキシル化した Short CNT が最も毒性が高かったが、各 CNT 間の差はわずかであった。</p> <p>・各細胞株における細胞毒性比較の結果、50 μg/mL CNT では全ての細胞、暴露時間、CNT において生存性の低下は見られなかった。全ての CNT で 100 μg/mL の投与 4 時間後には生存率が低下した。</p> <p>・生存率の試験において、最も感受性が高かった細胞は EAhy926 細胞だった。上皮系細胞株の大半は感受性が低く、生存率の有意な低下が見られたのは SCNT 及びカルボキシル化 SCNT 及び MCNT8c、100 μg/mL を暴露 24 時間後であった。</p> <p>・投与用量 500 μg/mL では、TK-6 細胞において MCNT20 及び MCNT50 を投与した場合以外を除き、全ての CNT で明らかな生存率の低下が見られた。</p> <p>・EAhy926 細胞において、上清を遠心後に添加したところ、500 μg/mL においても生存率の低下はわずかであった。CNT が凝集することで溶液中の濃度が低下したことに起因すると考えられる。</p> <p>・EAhy926、DMBM-2 及び V79 は低 GSH (<2 nmol/10⁶ cells)、A549、HepG2 及び TK-6 は高 GSH (>2 nmol/10⁶ cells) として分類された。</p> <p>・高 GSH 細胞において、カルボキシル化した CNT は非修飾 CNT に比べるとより GSH の低下を引き起こした。</p> <p>・低 GSH 細胞は高 GSH 細胞に比べて細胞毒性が高かった。</p> <p>・N-アセチルシステインを添加することによって、細胞内 GSH の保護に効果が得られたが、8nm のカルボキシル化された CNT では効果が小さかった。</p> <p>・<8 nm でカルボキシル化された CNT の細胞毒性は強く、概ね GSH レベルの低下と相関していた。</p> <p>・YoPro-1 及び P1 の蛍光色素で標識した結果、直径の大きな CNT を暴露した細胞は主に YoPro-1 で染色され、小さな CNT で暴露した細胞は P1 で染色された。</p> <p>・P1/YoPro-1 の割合が高い値の場合はネクロシス、低い場合はアポトーシスを示唆し、カルボキシル化 CNT の P1/YoPro-1 の値は>1 であることから、アポトーシスが優位な作用機序ではないことが示された。</p>	<p>・8nm よりも小さい CNT は 20nm 以上の CNT より強い毒性を示した。</p> <p>・カルボキシル化された CNT は、非修飾の CNT よりも強い毒性を示した。</p> <p>・N-アセチルシステインによる酸化ストレスからの防御反応は、直径が大きかつ非修飾の CNT で最大であり、直径が小さくカルボキシル化された CNT では最小であった。</p> <p>・直径 8nm 以下の薄い CNT は主に膜構造を崩壊させる働きを持ち、直径の大きな CNT はアポトーシスの変化を引き起こした。</p> <p>・カルボキシル化された小さい CNT による細胞毒性は、ネクロシスによって引き起こされ、抗酸化剤では防ぐ事ができない。</p>

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/ 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	Devrah A. Arndt, Maika Moua, Jian Chen, and Rebecca D. Klaper / Environ. Sci. Technol. 47:9444-9452 (2013)	Core structure and surface functionalization of carbon nanomaterials alter impacts to Daphnid mortality, reproduction, and growth: acute assays do not predict chronic exposure impacts (カーボンナノマテリアルのコア構造及び表面の官能基化は、ミジンコの死亡率、繁殖及び成長への影響を変化させる：急性試験は、慢性的暴露の影響を予測しない)	■対象物質 ①フラーレン (C60) ②水酸化フラーレン ③単層カーボンナノチューブ ④カルボン酸付加 SWCNT ⑤PEG 付加 SWCNT ⑥多層カーボンナノチューブ ⑦C60 と β サイクロデキストリンの複合体 ⑧アミノ基付加フラーレン ⑨C60-amino と γ サイクロデキストリンの複合体 ⑩マロン酸付加フラーレン ⑪マロン酸二ナトリウム付加フラーレン ⑫C60-malonate と γ サイクロデキストリンの複合体 ⑦～⑫は、研究室での合成品 フラーレンのサイズ：105～175 nm ナノチューブ：TEM 画像では、1 μ m 以上のアグリゲートが観察された。	■試験生物 オオミジンコ (Daphnia magna) (入手先：Klaper laboratory) オオミジンコは、中程度の硬度の調製水 (MHRW) で飼育し、藻及びアルファルファを給餌した。 ■投与方法 培養液に添加、培養液は、3 回/週交換 ■試験方法 ①培養液の交換時に、ミジンコの死亡率と繁殖度 (新生個体数) を測定 ②21 日目に大きさを測定	■粒子特性 ・SWCNT, MWCNT, C60-amino は、ミリQ 水中で不安定であった。 ・ナノマテリアルは、MHRW に添加した場合、安定性が低下したが、藻とアルファルファが存在する飼育液中では安定性が向上した。 ■急性及び慢性の死亡率に及ぼす影響 ・48 時間以内の急性の死亡は、認められなかった。 ・C60-amino- γ CD 及び C60-malonate- γ CD の 5ppm 添加では、7 日目及び 10 日目に、それぞれ 60% 及び 50% の死亡率を示したが、 γ -CD、C60-amino 及び C60-malonate では死亡は認められなかった。これらの結果は、毒性が γ CD に結合したフラーレンに関連することを示している。 ・カーボンナノチューブでは、MWCNT の 50ppm 添加のみ、19 日目に有意な死亡率 (20%) が示された。 ■繁殖に及ぼす影響 ・9 日間のコントロールの新生仔数は、7.06/匹であるのに対し、50ppm の SWCNT-COOH、SWCNT-PEG の添加では、それぞれ 2.23、0.018/匹であった。 ・官能基付加のないすべての CNM (C60、SWCNT、MWCNT)、21 日目に有意な減少が示された。C60 はカーボンナノチューブと比較し毒性が弱く、コア構造が重要なパラメータであった。 ・フラーレンの 50ppm の C60 は、21 日目に 11% 減少したが、C60-OH では変化が認められず、水酸基の付加によりフラーレンの毒性が低下する。 ・フラーレンの 21 日目の C60 は 50ppm 以下では変化を示さなかったが、5ppm の C60-malonate は 25.5% の増加を示した。 ・官能基を付加した SWCNT においても毒性が認められた。SWCNT への CONH ₂ 及び PEG の付加は、COOH 基の付加より、SWCNT の毒性を低下させた。 ■ミジンコの成体の大きさに及ぼす影響 ・C60、SWCNT、MWCNT の 50ppm 添加では、成体の大きさがそれぞれ、6.6%、12.4%、8.2% 減少した。 ・C60-OH 添加ではコントロールとの有意差がなく、水酸基の付加により C60 の毒性が軽減され得ることが示された。 ・C60-amino 及び C60-malonate の 5ppm 添加では、それぞれ、3.4% 及び 5.5%、SWCNT/MWCNT-CONH ₂ 、SWCNT-COOH、及び SWCNT-PEG の 50ppm 添加では、それぞれ、12.4%、7.4%、17.7%、10.2% 減少した。SWCNT-COOH は、SWCNT-CONH ₂ より毒性が高かった。	・フラーレンの γ CD との複合体を除き、フラーレンよりカーボンナノチューブをコアとするナノマテリアルの方が毒性が高かった。 ・急性試験は、ナノマテリアルの慢性毒性を予測するための十分な試験とはならなかった。 ・慢性暴露は、異なった化学的性質を有するナノマテリアルが異なった作用機序を示し、コア構造と表面の科学的性質がいずれも粒子の毒性に影響を及ぼすことを示す有益な情報を提供する。

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/ 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	HAIFANG WANG, SHENG-TAO YANG, AONENG CAO, AND YUANFANG LIU ACCOUNTS OF CHEMICAL RESEARCH' 750- 760 (2013) Vol. 46, No. 3	Quantification of Carbon Nanomaterials in Vivo (in vivoにおけるカ ーボンナノマテリア ルの定量化)	カーボンナノ材料 (フラーレン、カーボ ンナノチューブ、グラ フェン、ナノダイヤモンド、カーボンナノ粒 子) ■調製方法 ・非炭素アイソトープ 共有結合、キレート化、 カプセル封入などを通 じて標識 ・炭素アイソトープ 14C-タウリンを官能基 に取り込ませて、多層 式カーボンナノチュー ブを標識	■試験生物 マウス ■試験方法 細網内皮システムキャ プチャー HPLC-MS 組織内の蓄積量解析	・動物実験によると、静脈内注射によるナノ材料の投与は、100%循環システムに吸収されるが、その他の投与方法では暴露の経路やカーボンナノ材料の物理化学上の性質によるが、わずかである。 ・繊維状のカーボンナノ材料は一般的に肺に残りやすい。 ・経口摂取の吸収率は、界面化学などの特性で変化する。 ・カーボンナノ材料は血管循環からある程度除去される。 ・カーボンナノ材料の代謝は、炭素骨格と官能基に大別できる。 ・カーボンナノ材料の排出は遅く長期にわたるため、完全に排出される過程を観察することは困難。 ・単層カーボンナノチューブのペグ化は組織分布に影響を与えた。 ・単層ナノカーボンチューブのペグ化は血液循環中の半減期を15.3時間に延長した。 化学的性質の付与がカーボンナノ材料の排出に影響を与えていた。 ・凝集は蓄積、分布、代謝、排出などに影響を与える。 ・静脈内投与の場合生物学的利用能は100%であるが、腹腔内投与や経口投与ではナノ材料の特性で変化する。 ・肝臓及び肺においてカーボンナノ材料の毒性が見られ、またその排出経路にあたる腎臓にも毒性が懸念される。	カーボンナノ材料の in vivo における代謝や、低用量の長期にわたる排出を解析するために、in vivo における新しい定量的解析手法を開発することが求められる。

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/ 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	JunyiLi, Rebecca Strong, JúlioTrevisan, SimonW. Fogarty, NigelJ. Fullwood, KevinC. Jones, and Francis L. Martin/ Environ. Sci. Technol. 2013, 47, 10005-100	Dose-Related Alterations of Carbon Nanoparticles in Mammalian Cells Detected Using Biospectroscopy: Potential for Real-World Effects (生体分光鏡検査を用いた哺乳類細胞におけるカーボンナノ粒子の濃度依存的変化：実世界の影響)	<p>■対象物質</p> <ul style="list-style-type: none"> ・カーボンナノ粒子 (CNP) 短い多層カーボンナノチューブ (直径 10-15 nm、長さ 0.1-10 μm) 長い多層カーボンナノチューブ (直径 110-170 nm、長さ 5-9 μm) フラーレン C60 (直径 1nm) <p>入手元 Sigma</p> <p>■試験用量</p> <p>0.0025、0.005、0.01、0.025、0.05、0.1 mg/mL</p>	<p>■試験生物</p> <p>MCF-7 細胞</p> <p>■投与方法</p> <p>24 時間</p> <p>■試験方法</p> <p>ATR-FTIR 分光光度計 PCA-LDA</p>	<ul style="list-style-type: none"> ・ raw IR スペクトラにおいて、単純な観察ではバイオケミカル細胞フィンガープリントリージョンにおける変化は見られなかった。しかし、多変量なコンピュータ解析を大量のスペクトラで行ったところ、より多くの変化がはっきりと確認できた。 ・ CNP 処理した細胞は G0/G1 期の細胞が S 期に比べ多く存在した。 ・ 低用量による刺激及び高用量による阻害反応が見られた。短い MWCNT においては明確な低用量の影響が観察され、ハザード評価の懸念事項となった。 ・ S 期の細胞における暴露では、いずれの CNP のタイプも作用機序は類似しており、主にタンパク質に影響をもたらした。G1/G1 期の細胞においては、C60 の暴露は DNA/RNA スペクトラリージョンにおいて高いレベルの変化が検出されたが、MWCNT においては比較的低かった。 ・ S 期の細胞において、C60 の暴露によってタンパク質の特異的な変質が検出され、二つの MWCNT においても類似の変化が見られた。G0/G1 期の細胞においては、C60 による主なスペクトラルマーカールの変化が検出され、長い MWCNT でも同様の変化が見られたが、短い MWCNT では変化は少なかった。 ・ 短い MWCNT は他の 2 種に比べて示す影響が少ないが、活性酸素の発生は最も多かった短い MWCNT によって示される毒性影響は主に活性酸素発生によるもので、一方長い MWCNT は直接的接触や損傷など、異なるメカニズムが作用していると示唆された。 	<p>それぞれの CNP タイプに応じて、明確な細胞のバイオマーカースペクトラルの変化が引き起こされた。ラマン分光法により、活性酸素が CNPs により生成されることが判明した。</p>

6) 二酸化チタン

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/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	Guodong Gao, Yuguan Ze, Xiaoyang Zhao, Xuezi Sang, Lei Zheng, Xiao Ze, Suxin Gui, Lei Sheng, Qingqing Sun, Jie Hong, Xiaohong Yu, Ling Wang, Fashui Hong, Xueguang Zhang / J Hazardous Materials 258-259: 133-143 (2013)	Titanium dioxide nanoparticle-induced testicular damage, spermatogenesis suppression, and gene expression alterations in male mice (二酸化チタンナノ粒子によって引き起こされる雄ラットにおける精巣障害、精子形成抑制、及び遺伝子発現変化)	<p>■対象物質</p> <ul style="list-style-type: none"> ・二酸化チタンナノ粒子 サイズ：294nm(208～330nm)/0.5%(w/v)ヒドロキシプロピルセルロース(HPMC)溶液中 ゼータ電位：12時間後-7.57mV、24時間後-9.28mV <p>■試験用量</p> <ul style="list-style-type: none"> 2.5, 5, 10 mg/kg <p>■溶媒</p> <ul style="list-style-type: none"> 0.5%(W/V)-HPMC 溶液 	<p>■試験生物</p> <ul style="list-style-type: none"> CD-1 雄マウス、5週齢 <p>■投与方法</p> <ul style="list-style-type: none"> 0.5%(W/V)-HPMC 溶液に懸濁した TiO₂ ナノ粒子を30分間超音波処理した後、5分間機械振とうさせ、各濃度の溶液を90日間、胃内投与した。 <p>■試験方法</p> <ul style="list-style-type: none"> ・体重、精巣重量、精巣中のチタン含量の測定：ICP-MS 分析 ・精巣の病理組織学的試験：光学顕微鏡による観察 ・血清中の性ホルモン濃度の測定：市販キットによる生化学的アッセイ ・mRNA 発現量及びタンパク質量の測定：qRT-PCR 法及び ELISA 法 ・精液中の精子濃度及び動きの測定：光学顕微鏡及び血球計による測定 	<p>■精巣に対する毒性</p> <ul style="list-style-type: none"> ・体重及び精巣重量の純増加量は、TiO₂ ナノ粒子の投与量に依存して有意に減少し、精巣中のチタン濃度が増加した。 ・TiO₂ ナノ粒子投与群の精巣では、精子の希薄化、精子の損傷、セルトリ細胞及び精原細胞の希薄化、セルトリ細胞のアポトーシス、精細管の精原細胞壊死、胚芽層の厚さの減少、空胞形成、及び精細管のセルトリ細胞の不規則な配列を含む重度の病理学的変化が認められた。 ・TiO₂ ナノ粒子の10mg/kg 投与群では、精細管に黒い凝集体が観察され、共焦点ラマン顕微鏡によりこの凝集体に TiO₂ のピークが認められた。 ・TiO₂ ナノ粒子投与群では、投与量に依存して精子の濃度及び運動性が有意に減少し、異常な精子が増加した。 ・TiO₂ ナノ粒子投与群では、投与量に依存して血清中のエストロゲン及びプロゲステロン濃度が有意に上昇し、黄体形成ホルモン、卵胞刺激ホルモン及びTホルモンの減少した。 ・TiO₂ ナノ粒子10mg/kg 投与群の精巣中の遺伝子発現プロファイルは、コントロール群と比較し、254 遺伝子の発現に相異が認められ、その内の153 遺伝子の発現が上昇し、101 遺伝子の発現が低下していた。これらの内の142 遺伝子は、分子及びイオンの結合、代謝、情報伝達、酸化的ストレス、免疫、増殖及び成長、精子形成、輸送、ステロイド及びホルモンの代謝過程、細胞骨格、アポトーシス、損傷及び刺激に対する応答、タンパク質合成及びプロセシング、及び転写を含む14 種の遺伝子クラスターに分類された。その他の112 遺伝子の機能については不明であった。 ・精巣中の遺伝子発現プロファイルの比較において有意な変化が認められた精子形成、ステロイド及びホルモンの代謝過程、アポトーシス、酸化的ストレス、及び情報伝達に關与する遺伝子の内、Gpx5, Ly6e 及び Th は発現が上昇し、Adam Axud1, Cfd, Cyp1b1, Cyp2e1, Gylk11, Lep, Prm1, Spata19, Tdrd6 及び Tnp2 は発現が低下していた。 ・精巣中のタンパク質量の測定においても、TiO₂ ナノ粒子10mg/kg 投与群では Gpx5, Ly6e 及び Th が上昇し、Adam, Axud1, Cfd, Cyp1b1, Cyp2e1, Gylk11, Lep, Prm1, Spata19, Tdrd6 及び Tnp2 が低下していた。 	<ul style="list-style-type: none"> ・TiO₂ ナノ粒子は、血液精巣隔壁を通過して精巣に到達し、蓄積される可能性がある。 ・その結果、精巣損傷、精子奇形、及び血清中の性ホルモン濃度の変化が引き起こされる可能性がある。 ・TiO₂ ナノ粒子の投与による精巣機能障害は、主に精子形成、ステロイド及びホルモン代謝過程などに関与する遺伝子発現の変化と関連があるものと思われる。

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/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	Mainul Husain, Anne T. Saber, Charles Guo, Nicklas R. Jacobsen, Keld A. Jensen, Carole L. Yauk, Andrew Williams, Ulla Vogel, Hakan Wallin, Sabina Halappanavar / Toxicology and Applied Pharmacology 269 (2013) 250-262	Pulmonary instillation of low doses of titanium dioxide nanoparticles in mice leads to particle retention and gene expression changes in the absence of inflammation (低用量二酸化チタンナノ粒子のマウス肺注入が及ぼす粒子の残存と、炎症を伴わない遺伝子発現変化)	<p>■対象物質 ルチル二酸化チタンナノ粒子 平均粒子サイズ 20.6 nm 表面積 107.7 m²/g</p> <p>■試料調製法 4.05mg の二酸化チタンナノ粒子を1mL MQに懸濁し、16分間氷上で超音波破碎した。</p> <p>■試験用量 162 μg 54 μg 18 μg</p>	<p>■試験生物 C57BL/6 マウス (雌、5-7 週齢)</p> <p>■投与方法 単回気管内投与 投与後に 24 時間、3 日、28 日の回復期</p> <p>■試験方法 ヘマトキシリン-エオジン染色 マイクロアレイハイブリダイゼーション 発現遺伝子の解析 リアルタイム PCR リアルタイム PCR アレイ ELISA</p>	<p>・投与用量 54 及び 162 μg において、投与 1 日目は炎症反応が見られたが、投与後 28 日までに部分的に回復していた。投与用量 18 μg においては対照群との違いは見られなかった。</p> <p>・投与群の肺組織のランダムな部位において二酸化チタンナノ粒子のアグリゲート及びアグロメレートが用量依存的に増加している様子が観察された。また投与用量に関わらず、投与後 28 日後の二酸化チタンの量は 1 日目と同程度であった。</p> <p>・全ての投与群で発現変化が見られた遺伝子は 60 のみであった。投与 3 日後、全ての投与群で変化が見られた転写因子は 209 であった。投与 1 日後はほとんどの遺伝子がアップレギュレートされており、3 日には大半の遺伝子がダウンレギュレートされていた。</p> <p>・GO 解析によると、発現変化が見られた遺伝子の多くは筋肉調節や横紋筋発生に関わるものであった。</p> <p>・投与群においては 14 の経路が共通して有意に強化されていた。56 の遺伝子は肝臓/肝星状細胞の活性化経路に関わるもので、全ての投与群にで影響をうけていた。</p> <p>・62 の遺伝子はマイクロアレイ及び qPCR で共通して発現変化が見られた。</p> <p>・低用量投与群において 1 日目にアップレギュレーションされているタンパク質のうち、炎症性モジュレーターに関する遺伝子が mRNA レベルで上昇しているものはなかった。中用量及び高用量投与において、CCL2、CCL3、CCL4、CXCL1 は mRNA レベルで増加が見られた。</p>	<p>・ハイパースペクトラルマッピングの結果、投与後 28 日までに、用量依存的に二酸化チタンナノ粒子は残存。</p> <p>・DNA マクロアレイ解析の結果、全ての投与群において約 3000 の遺伝子の発現が変化していた。</p> <p>・mRNA 及びタンパク質レベルで、いくつかの炎症メディエーターが投与用量、また時間依存的に変化していた。</p> <p>低投与用量において好中球の流入は見られなかったが、炎症に関与するいくつかの遺伝子及びタンパク質の発現変化が観察された。</p> <p>中用量における炎症の回復と、低用量における肺液中の好中球流入の欠如はイオンホメオスタシスと筋肉調節に関与する遺伝子のダウンレギュレーションと関連していた。</p> <p>炎症を伴わない二酸化チタンナノ粒子の残存は、カルシウム及びイオンホメオスタシスを乱し、滑らかな筋肉調節に影響する可能性がある。</p>

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/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	Petra Jackson, Sabina Halappanavar, Karin Sorig Hougaard, Andrew Williams, Anne Mette Madsen, Jacob Stuart Lamson, Ole Andersen, Carole Yauk, Hakan Walin & Ula Vogel/ Nanotoxicology, February 2013;7(1):85-96	Maternal inhalation of surface-coated nanosized titanium dioxide (UV-Titan) in C57BL/6 mice: effects in prenatally exposed offspring on hepatic DNA damage and gene expresion (表面をナノサイズ二酸化チタンでコーティングしたマテリアルのC57BL/6 マウスにおける吸入暴露: 出生前暴露が子孫にもたらす肝臓 DNA の損傷及び遺伝子発現への影響)	<p>■対象物質 UV-チタン L181 粒子サイズ 17nm</p> <p>■試験用量 840 μg/匹</p>	<p>■試験生物 C57BL/6 マウス</p> <p>■投与方法・期間 吸入暴露、11 日間 1h/日</p> <p>■試験方法 エンドトキシン測定 コメットアッセイ 全般的遺伝子解析 mRNA 定量</p>	<p>・粒子懸濁液のエンドトキシン測定 マウスへの総暴露量は 0.84 mg UV-Titan/個体で、1 日のエンドトキシン用量は 0.16 EU/kg 体重若しくは 10.5 pg/kg 体重で、11 日間で 1.74 EU/kg 体重若しくは 116 pg/kg 体重であった。</p> <p>・DNA 鎖崩壊の検出 新生子及び離乳子の肝臓における出生前の UV-チタン暴露は DNA 鎖崩壊の程度に影響を与えなかった。</p> <p>・全般的遺伝子発現 UV-チタンの出生前暴露は、産子の雄及び雌の双方において、わずかではあるが有意な肝臓遺伝子発現の変化を引き起こしたが、雌の発現変化は最大 1.8 倍だったのに対し、雄は 1.3 倍であった。雌で多く変化が見られたのはレチノイン酸レセプターシグナルに関連するもので、雄は雌に比べ反応が少なかった。</p> <p>・産子の肝臓 mRNA レベルの定量 マイクロアレイによる遺伝子発現の解析の結果は有意なものであったが、RT-PCR による解析は差はわずかであった。</p>	<p>・UV-チタンの暴露は、マウス及びその産子の DNA 鎖の崩壊を引き起こさなかった。</p> <p>・新生子の肝臓における転写プロファイリングの結果、雌はレチノイン酸シグナル経路に関与する遺伝子発現の変化が見られたが、雄の遺伝子発現に影響は見られなかった。</p> <p>・遺伝子発現解析では直接的な証明はできなかったが、変化は母体への暴露による副作用の考えられる。</p>

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/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	<p>Namasivayam, Andrei Ambalavanan, Stanishevsky, Arlene Bulger, Brian Halloran, Chad Steele, Yogesh Vohra, and Sadis Matalon/ Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 304: L152-L161, 2013.</p>	<p>Titanium oxide nanoparticle instillation induces inflammation and inhibits lung development in mice (酸化チタンナノ粒子の点滴投与はマウスにおいて炎症と肺の発達阻害を引き起こす)</p>	<p>■対象物質 酸化チタンナノ粒子 ~6 nm</p> <p>■試料調製法 二酸化チタンナノ粒子はチタンイソブタノール、オルトチタン酸テトラブチル、イソプロパノールと3:1で混合し、純水に添加した。混合液は~75°Cで24時間還流させた。遠心した上清を超純水で置換し、1時間超音波破碎した。目的濃度に懸濁し、再び超音波破碎した。投与直前に30秒破碎してから使用した。</p> <p>■試験用量 1 μg/g 体重 (新生仔) 1 mg/kg</p>	<p>■試験生物 C57BL/6 マウス (4日齢、雄)</p> <p>■投与方法・期間 点滴投与 生後4日の単回投与、若しくは4、7、10日の複数回投与</p> <p>■試験方法 組織切片染色 肺胞及び血管の形態測定 リアルタイム PCR マイクロアレイ解析 サイトカイン/ケモカイン解析</p>	<p>二酸化チタンの単回若しくは複数回投与によって、死亡例はなく、体重、呼吸、チアノーゼ若しくは病的所見の変化は見られなかった。</p> <ul style="list-style-type: none"> 組織における二酸化チタンナノ粒子の分布 <p>暴露2時間後における観察では大半が肺のマクロファージに局在し、わずかに上皮表面にも存在した。</p> <ul style="list-style-type: none"> ナノ粒子投与は細胞流入炎症及び肺の発達阻害を引き起こす <p>単回投与を受けたマウスは、14日目には気道とそれに繋がる動脈に炎症細胞が斑状に集まっていた。これらの炎症細胞は二酸化チタンナノ粒子が蓄積したマクロファージで形成されており、他の炎症細胞が周りを囲んでいた。投与を受けたマウスでは肺の発達阻害も見られ、ML1が上昇しRACが低下していた。CD68による染色で、炎症細胞の大半はマクロファージで、残りの流入細胞の大半は多形核白血球であることが確認された。</p> <ul style="list-style-type: none"> ナノ粒子の投与は肺の機能若しくは肺血管修復に影響を与えない <p>14日目の投与群マウスの肺機能は、対照群に比べ有意な変化は見られなかった。また肺の血管壁の厚さにも変化は見られなかった。</p> <ul style="list-style-type: none"> ナノ粒子投与は肺のホモジネートにおける遺伝子発現及び特異的サイトカインのタンパク量を増加させる <p>投与群マウスの肺において、Cc18、Spp1、Cxc19、IL1r2、Ccr5、Ccl24、Itgamといった遺伝子発現が上昇し、IL11、Ltb、Ccr7は減少していた。タンパク質では、CSF、IL-1b、IL-2、IL-4、IL-9、IP-10、KC、MIG、MIP-1α、MIP-1b、MIP-2及びTNF-αが投与群で上昇しており、VEGFは減少していた。またMMP-9も有意に上昇していた。</p>	<ul style="list-style-type: none"> 酸化チタンナノ粒子の単回投与は細胞流入の炎症を引き起こし、複数回投与は肺機能に目立った影響は与えなかったが、肺の発達に炎症と阻害を与えた。 マクロファージは酸化チタンナノ粒子を取り込み、多形核浸潤が起こった。肺のホモジネートにおいて複数のサイトカイン及びマトリックスメタルプロテイナーゼ9が増加し、VEGFは減少した。 これらの結果から、発達中の肺に対するナノ粒子の暴露はマクロファージによって排出されず、炎症が残存し、肺の発達に影響を与え、その後の呼吸器疾患のリスクに影響を与えることが示された。

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/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	Bing Li, Yuguan Ze, Qingqing Sun, Ting Zhang, Xuezi Sang, Yaling Cui, Xiaochun Wang, Suxin Gui, Danlin Tan, Min Zhu, Xiaoyang Zhao, Lei Sheng, Ling Wang, Fashui Hong, Meng Tang/ PLOS ONE February (2013) Vol. 8 Issue 2	Molecular Mechanisms of Nanosized Titanium Dioxide- Induced Pulmonary Injury in Mice (マウスにおいて肺損傷を引き起こしたナノサイズ二酸化チタンの分子メカニズム)	<p>■対象物質 二酸化チタンアナターゼナノ粒子 ・チタニウムテトラブタオキシドの加水分解から作成 ・平均粒径~6nm ・HPMC 溶液に懸濁 24 時間後の平均粒径 5-6nm ・表面積 174.8 m²/g ・HPMC 溶液中の流体力学的径平均 294nm ・インキュベーション 12 及び 24 時間語のゼータ電位 7.57 及び 9.28 mV</p> <p>■試料調製法 0.5% (w/v) ヒドロキシプロピルメチルセルロース (HPMC) K4M 溶液に懸濁し、15-20 分間超音波破碎を行い、その後 2 若しくは 3 分間機械的に振動させた。 ・マウスへの投与 0.5% (w/v) HPMC に懸濁師、30 分間超音波破碎を行い、その後 5 分間機械的に振動させた。</p> <p>■試験用量 2.5, 5, 10 mg/kg 体重</p>	<p>■試験生物 CD-1 マウス (雌、5 週齢、平均体重 23±2g)</p> <p>■投与方法・期間 点鼻注入 連続 90 日</p> <p>■試験方法 ・気管支肺胞洗浄 (BAL) 解析 LDH、ALP、総タンパク質量 (TP) ・肺におけるチタニウム量解析 ・病理組織学的解析 ・肺の超微細構造観察 ・肺切片の共焦点ラマン顕微鏡 ・酸化ストレスアッセイ ・マイクロアレイ ・定量的リアルタイム PCR</p>	<p>・二酸化チタンナノ粒子の投与は、漸次的に体重を減少させ、一方チタニウム含量と肺重量は相対的に増加させたことから、成長阻害と肺の損傷が引き起こされることが示唆された。</p> <p>・病理組織学的解析によると、二酸化チタンナノ粒子濃度が増加するに従い、炎症細胞の浸潤、肺間質の肥大化、浮腫といった深刻な変化が見られ、10 mg/kg の投与群においては肺のサンプルに黒いアグロメレートが観察された。</p> <p>・共焦点ラマン顕微鏡によると、黒いアグロメレーション部位における二酸化チタンナノ粒子の特定ピーク領域は 148cm⁻¹ であった。</p> <p>・肺の超微細構造観察では、二酸化チタンナノ粒子投与群はミトコンドリア膨張、核の縮小、クロマチン凝集、ラメラ体の除去といった、典型的なアポトーシスの形態変化が見られた。</p> <p>・BALF におけるマクロファージ、リンパ球、好中球、好酸球の数と、LDH、ALP、TP の値は二酸化チタンナノ粒子の投与量増加に伴い上昇していることから、マウスにおいて深刻な炎症と生化学的な機能障害が起きていることが示唆された。</p> <p>・活性酸素種の生成量は、二酸化チタンナノ粒子の投与用量に依存的に上昇していた。過酸化脂質、過酸化タンパク質及び DNA 損傷の値も明らかに上昇していることから、二酸化チタンナノ粒子が肺における過酸化酸素種の生成を促進させ、脂質、タンパク質及び DNA の過酸化を引き起こすことが示唆された。</p> <p>・最高投与用量 10 mg/kg のマウスの組織において、総遺伝子の~1.16% (521/45,000 既知遺伝子) が二酸化チタンナノ粒子の投与によって変化していた。うち 361 は上方制御、160 は下方制御されていた。これら 521 の遺伝子は、免疫応答、炎症応答、アポトーシス、酸化ストレス、代謝制御、ストレス応答、シグナル伝達、細胞分裂、細胞骨格、細胞分化、細胞周期などに関わるものが多く含まれていた。</p>	<p>・長期間にわたる二酸化チタンナノ粒子の暴露は、マウスの肺組織において明らかに細胞の炎症、乳酸デヒドロゲナーゼ、アルカリフォスファターゼ、総タンパク質量の増加をさせ、活性酸素の生成を促進し、脂質、タンパク質及び DNA の過酸化を引き起こした。</p> <p>・二酸化チタンナノ粒子のマウス肺組織における堆積は、深刻な肺の炎症と肺上皮組織のアポトーシスに繋がった。</p> <p>・二酸化チタンナノ粒子を暴露した肺の組織では 847 位電子の発現が変化し、うち 521 は免疫/炎症反応、アポトーシス、酸化ストレス、細胞周期、ストレス応答、細胞分裂、細胞骨格、シグナル伝達、代謝制御に関わる遺伝子であった。</p> <p>・二酸化チタンナノ粒子の使用は人間に対しては注意されるべきである。</p>

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/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	Raju Y. Prasad, Kathleen Wallace, Kaitlin M. Daniel, Alan H. Tennant, Robert M. Zucker, Jenna Strickland, Kevin Dreher, ^ Andrew D. Kligerman, Carl F. Blackman, and David M. DeMarini ACS NANO vol. 7 No. 3 1929-1942 (2013)	Effect of Treatment Media on the Agglomeration of Titanium Dioxide Nanoparticles: Impact on Genotoxicity, Cellular Interaction, and Cell Cycle (遺伝毒性、細胞間相互作用及び細胞周期に影響を与える二酸化チタンナノ粒子の凝集物上で処理した培地)	二酸化チタン粒子 (86%アナターゼ及び14%ルチル) 入手元 Degussa(現 Evonic, NJ) ■調製方法1 0.1%BSA を含んだ KGM 培地 (KB) 若しくは 10% FBS を含んだ KGM 培地 (KGF)に 1mg/mL の濃度で懸濁し、氷上で 2 分間、7W で破碎し、KB 若しくは KF で 500, 200, 100 μg/mL に調製 ■調製方法2 0.6%BSA 及び 0.001%DSPC を含んだ培地に 1mg/mL で懸濁し、778-82W、on/off=10 分/10 分で 1 時間破碎後、12000g、10 分遠心してナノ粒子を回収し KGM 培地に懸濁 ■試験用量	■試験生物 BEAS-2B ヒト気管上皮細胞 (ATCC) ■試験方法 粒子特性評価 一・電子顕微鏡観察 一・一次元ゲル電気泳動 細胞への暴露の影響観察 一・Live/Dead アッセイ 一・トリパンブルーアッセイ 一・フローサイトメトリー 一・顕微鏡観察 一・コメットアッセイ 一・アクリジンオレンジ染色による細胞分裂阻害 MN アッセイ 一・細胞周期アッセイ ■試験用量 0, 10, 20 (コメットアッセイを除く), 50 及び 100 μg/mL ■暴露時間 24 時間	・ナノ粒子の凝集性は、KB 培地>DM 培地>KF 培地の順で高かった ・各培地において二酸化チタン粒子は濃度が高くなる程凝集性も高くなった ・PdI とゼータ電位から、ナノ粒子の分散性は不安定で、遺伝毒性試験の間液相がなくなると凝集と分散が起こることが示された ・粒子の大きさ、PdI、ゼータ電位は培地の組成、pH、ナノ粒子の種類などに影響を受ける ・培地中のタンパク質はナノ粒子の表面に吸収され、その表層や凝集性において重要な働きをした ・凝集の大きさは二酸化チタン粒子の細胞内相互作用に重大な役割を果たし、培地の組成は凝集の大きさとナノ粒子の摂取に影響を与えた ・最高濃度 (100 μg/mL) の二酸化チタンを 24 時間暴露した細胞は、<10%の生存率の低下を示した ・環境汚染の毒性を評価したところ、二酸化チタン粒子は 100 μg/mL まで細胞毒性を示さなかった ・コメットアッセイによると、二酸化チタン粒子はその凝集作用、細胞間相互作用、細胞周期の変化の程度に関わらず、いずれの培地でも同程度の DNA 損傷を引き起こした ・凝集作用が最も低く、細胞相互作用が最大で、S 期で停滞する細胞数が最大である KF 培地においてのみ、ナノ粒子は MN (細胞分裂阻害微小核形成) を引き起こした	・培地の組成物、粒子の摂取量、ナノ粒子と細胞の相互作用とが影響しあって、MN アッセイに見られるような染色体損傷を引き起こす。

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/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	Sung Gu Hana, Bradley Newsomea, Bernhard Hennig/ Toxicology 306(2013)1-8	Titanium dioxide nanoparticles increase inflammatory responses in vascular endothelial cells (二酸化チタンナノ粒子が血管内皮細胞の炎症反応を増加させる)	<p>■対象物質 二酸化チタンナノ粒子 (アナターゼ、5nm) 入手元 Alfa Aesar</p> <p>■試料調製法 5 mg/mL のストック溶液を超音波破碎で 15 分圏濁した。</p> <p>■試験用量 10、50 μg/mL</p>	<p>■試験生物 血管内皮細胞</p> <p>■投与期間 2、4、8、16 時間</p> <p>■試験方法 電気泳動移動度シフト解析 定量的リアルタイム PCR ウエスタンブロット解析</p>	<p>・二酸化チタンナノ粒子 10-50 μg/mL の投与 1 時間後における過酸化物の生成は有意に増加していた。</p> <p>・10 及び 50 μg/mL の二酸化チタンナノ粒子による投与は、三つ全ての MAPK 経路を顕著に増加させた。MAPK の活性化と類似して、Akt の Ser473 が二酸化チタンナノ粒子によってリン酸化された。</p> <p>・二酸化チタンナノ粒子は、血管内皮細胞における NF-kB の DNA 結合能を有意に増加させた。NF-kB の活性化は IkB α のリン酸化によって確認された。</p> <p>・二酸化チタンナノ粒子は投与量 50 μg/mL において、全ての投与時間で MCP-1 mRNA 発現を有意に誘導させていた。一方、投与量 10 μg/mL においては、暴露 2 時間後においてのみ MCP-1 mRNA の増加が見られた。</p> <p>・VCAM-1 mRNA の発現は 50 μg/mL の投与後は有意に上方制御され、10 μg/mL の投与後は 2 時間においてのみ増加した。VCAM-1 タンパク質は、いずれの投与用量群においても暴露 4 時間後において顕著に増加が見られた。50 μg/mL 投与群では 16 時間後までタンパク質の増加が維持されていた。</p> <p>・50 μg/mL の二酸化チタンナノ粒子を投与した細胞の自食作用は増加が見られ、暴露 8 時間後に LC3-II の最大発現が見られた。</p> <p>・ERK、p38、JNK 及び Akt のリン酸化阻害や、NF-kB の阻害をすると、二酸化チタン (10 μg/mL) により誘導される MCP-1 及び VCAM-1 位電子発現が弱くなるため、これらのシグナル因子が血管内皮細胞において二酸化チタンが誘導する炎症経路のメディエーターとなっていることが示唆された。二酸化チタンナノ粒子で誘導される炎症の遺伝子発現は酸化ストレスによって仲介され、NF-kB の DNA 結合を増加させた。</p>	<p>・二酸化チタンナノ粒子の暴露は細胞内の酸化ストレス及び NF-kB の DNA 結合を増加させた。更に、Akt、ERK、JNK、及び p38 のリン酸化が増加していた。</p> <p>・二酸化チタンナノ粒子はまた VCAM-1 の mRNA 及びタンパク質レベル、MCP-1 の mRNA レベルを上昇させた。NF-kB、酸化ストレス、Akt、ERK、JNK 及び p38 の阻害剤による前処理は、二酸化チタンナノ粒子により誘導される MCP-1 及び VCAM-1 遺伝子発現を有意に減少させた。</p> <p>・これらのデータから、二酸化チタンナノ粒子は redox-感受性の細胞内シグナル経路を介して内皮細胞の炎症反応を誘導することが示唆された。</p>

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/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	Ying Tang, Fude Wang, Chan Jin, Hao Liang, Xinhua Zhong, Yongji Yang/ ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY AND PHARMACOLOGY 36 (2013) 66-72	Mitochondrial injury by nanosized titanium dioxide in A549 cells and rats (A549 細胞及びラットにおけるナノサイズの二酸化チタンによるミトコンドリア損傷)	<p>■対象物質 二酸化チタンナノ粒子 入手元 Shanghai Institute of Ceramics, Chinese Academy of Sciences</p> <p>■試料調製 二酸化チタンナノ粒子は、ストック液に懸濁して 120℃、2 時間滅菌し、使用まで 4℃で保存した。使用前は二酸化チタンナノ粒子ストック溶液を 30 分間超音波破碎(10 分ごとにボルテックス)し、直ちに使用した。</p> <p>■試験用量 ・ A549 細胞 50、100、200、300 $\mu\text{g/mL}$ ・ ラット 0.1、1.0、10.0 mg/mL</p>	<p>■試験生物 A549 細胞 ラット (雄)</p> <p>■投与方法・期間 ・ A549 細胞 4 時間 ・ ラット 気管内注入 単回</p> <p>■試験方法 細胞生存率アッセイ ATP アッセイ マロンジアルデヒド測定 病理組織学的観察 (H&E 染色) 微細構造観察</p>	<p>■二酸化チタンナノ粒子懸濁液の特性 ノーマル血清若しくは培地の懸濁による有意な違いは見られなかった。超音波破碎した二酸化チタンナノ粒子のサイズは 20-50 nm であった。 ・ A549 細胞の微細構造 投与群の細胞は、二酸化チタンナノ粒子が原形質膜が出現し包まれている様子が見られた。ミトコンドリアクリステは投与用量増加に伴い分解されており、二酸化チタンナノ粒子により近いものの分解は重度であった。 ・ A549 細胞生存率に二酸化チタンナノ粒子が及ぼす影響 投与用量依存的に A549 細胞生存率は低下し、300 $\mu\text{g/mL}$ の二酸化チタンナノ粒子を 4 時間暴露すると 68.5%まで低下した。 ・ ミトコンドリアの様子 二酸化チタンナノ粒子は投与用量依存的に A549 細胞の細胞内 ATP レベルを減少させた。</p> <p>■病理組織学的見解 対照群マウスの肺は、肺胞の壁が薄く、構造に変化はなかった。二酸化チタンナノ粒子の単回投与を受けたマウスは、肺胞壁が厚くなった。特に 10.0 mg/mL の二酸化チタンナノ粒子投与群においては、いくつかの肺胞が破裂し、大きな気泡が形成されていた。投与用量の増加に伴い、肺組織における赤血球の数も増加していた。10.0 mg/mL 投与群は、肺における二酸化チタンナノ粒子を明確に観察できた。</p> <p>・ ラット肺胞上皮細胞の微細構造 0.1 mg/mL 及び 1.0 mg/mL 投与群の肺胞上皮細胞は、二酸化チタンナノ粒子が原形質膜に包まれており、わずかなリソソームが出現していた。10 mg/mL 投与群において、多くの二酸化チタンナノ粒子が細胞内に見られ、リソソームの数も増加していた。</p> <p>・ 過酸化脂質の値 過酸化脂質の生成量を表すマロンジアルデヒドを測定した結果、投与用量依存的に MDA も増加しており、10 mg/mL 投与群においては対照群に対して 35%も多かった。</p>	<p>・ ナノサイズの二酸化チタンは用量依存的な細胞毒性を見せ、それに伴い A549 の微細構造、A549 細胞生存率、及び細胞内 ATP レベルは変化した。</p> <p>・ ナノに酸化チタンを気管内に単回投与したラットの肺は損傷を受けており、肺胞上皮細胞の微細構造、肺組織病理学、及び肺組織の MDA レベルの変化が表れた。</p> <p>・ 本試験の結果、ナノ二酸化チタンは、ミトコンドリアを損傷し ATP 合成を阻害する細胞内活性酸素の生成に関与していることが示された。細胞は最終的にアポトーシスした。</p>

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/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	Swayamprava Dalai, Sunandan Pakrashi, Natarajan Chandrasekaran, Amitava Mukherjee PLOS ONE April (2013) Volume 8, Issue 4	Acute Toxicity of TiO ₂ Nanoparticles to Ceriodaphnia dubia under Visible Light and Dark Conditions in a Freshwater System (淡水系の明暗期における二酸化チタンナノ粒子のニセネコゼミジノコの急性毒性)	乾燥酸化チタン(IV)ナノパウダー(二酸化チタン 99.7%アナターゼ、粒径 <25nm) 入手元 Sigma Aldrich (USA)	■試験生物 ニセネコゼミジノコ ■暴露時間 48時間 ■試験方法 ・毒性評価 0, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 mg L ⁻¹ を48時間投与。試験中は明/暗=18/8時間若しくは終日暗期で実施。 ・酸化ストレス測定 投与後の活性酸素(ROS)と抗酸化活性(SOD)を測定。 ・ナノ粒子取り込み量測定 ・生物濃縮キネティクス 暴露後、洗浄して48時間後に測定。 ・顕微鏡観察 ・二酸化チタンナノ粒子の安定性と沈殿の解析	■毒性試験 ・明暗期下 16mg L ⁻¹ までは投与量に依存した生存率を示したが、それ以上の濃度では生存率が上昇した ・生存率が50%となるのは 8mg L ⁻¹ 付近、暗環境下では 32mg L ⁻¹ であった ・暗環境下では 64mg L ⁻¹ で投与量と生存率が比例しなくなり、生存率は約 80%であった ■酸化ストレス測定 ・ROS アッセイでは、32mg L ⁻¹ までは投与量依存的に増加するが 64mg L ⁻¹ は 32mg L ⁻¹ より明らかに少ない ・SOD は同じ投与量でも暗期の方が高い ■ナノ粒子取り込み量 ・8mg L ⁻¹ までは投与量依存的に上昇していたが、32mg L ⁻¹ から減少 ・暗期では 1mg L ⁻¹ において最も取り込み量が多く暴露量が上昇するにつれ低下 ■消化管への影響 ・明期に投与したミジンコは消化管が破壊された ・暗期に投与したミジンコは微絨毛密度が減少した ・投与したナノ粒子は消化管の細胞に蓄積し、上皮細胞や微絨毛の変形が見られた ■実験マトリックス上のナノ粒子の安定性と沈降 ・湖の水においてナノ粒子が48時間安定的に分散する濃度は 1mg L ⁻¹ で、高濃度になると凝集した ・凝集は明期より暗期の方が早い速度で進んだ ・有効なナノ粒子は時間経過に従い減少し、明期に比べ暗期では早く減少した ・沈降が最大なのは6時間以内に起こる	・明期暗期に関わらず、一定の濃度までは、投与量と毒性の強さは比例するが、一定量以上になると凝集が起こり、沈降して有効な粒子が減少することから、取り込み量や毒性は低下する ・明期の二酸化チタンナノ粒子は暗期と比較してより蓄積しやすく、生物濃縮値も高い。生体へのナノ粒子の蓄積は消化管に損傷を与える。

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/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	HONGBO MAY and STEPHEN A. DIAMOND / Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 32, No. 9, pp. 2139-2143, 2013	PHOTOTOXICITY OF TiO ₂ NANOPARTICLES TO ZEBRAFISH (DANIO RERIO) IS DEPENDENT ON LIFE STAGE (ゼブラフィッシュに対する酸化チタン粒子の光毒性はライフステージに依存する)	<p>■対象物質 AEROXIDE P25 酸化チタン</p> <p>■試験用量</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 亜致死作用試験 0 mg/L, 0.5 mg/L, 1 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L, 20 mg/L ・ 致死毒性試験 0 mg/L, 1 mg/L, 10 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L, 500 mg/L ・ 後期毒性試験 (yolksac larvae) 0 mg/L, 10 mg/L, 20 mg/L, 30 mg/L, 40 mg/L, 50 mg/L (free-swimming larvae) 0 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L, 150 mg/L, 200 mg/L, 250 mg/L (juvenile fish) 0 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L, 200 mg/L, 300 mg/L, 400 mg/L, 500 mg/L 	<p>■試験生物 ゼブラフィッシュ</p> <p>■試験方法</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 96 時間胚試験 疑似太陽光 (SSR) を照射して96時間光毒性処置を行い、胚及び幼生成長を観察した。 ・ 後期ライフステージにおける毒性試験 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 二酸化チタン粒子が 50-500 mg/L 濃度の時、アグロメレートは 1μm から 2μm に増加した。 ・ 二酸化チタン濃度に関わらず、暴露期間中にアグロメレートのサイズは増加し、10mg/L 以上の濃度では粒子の沈殿が見られた。 ・ 実験室の光の環境下 (非 UV) において、500mg/L までの二酸化チタンはゼブラフィッシュの初期発生に悪影響を及ぼさなかった。 ・ SSR 下において 1-20mg/L の二酸化チタンを暴露した胚及び幼生は、奇形率が増加した。 ・ SSR 下において 20-500 mg/L の二酸化チタンを暴露した胚及び幼生は、96 時間における死亡率が増加した。 ・ ゼブラフィッシュ胚若しくは幼生の 96 時間の LC50 は 34 mg/L であった。 ・ 96 時間のうち、最初の 2 日間のみ UV を照射した場合は、4 日間全て UV を照射した場合に比べ光毒性が低かった。 ・ 幼生に最初の 2 日のみ SSR を照射した場合、死亡率に影響は見られなかったが、奇形率が上昇した。 ・ 奇形は可逆的で、試験 6 日目 (SSR 照射 4 日後) には奇形幼生は正常な幼生となっていた。 ・ yolksac larvae 及び free-swimming larvae の 96 時間の LC50 は、それぞれ 20.3mg/L 及び 134.6 mg/L で、死亡率が高かったのは最初の暴露 24 時間の間であった。 ・ juvenile fish は本試験濃度では毒性は見られなかった。 	<ul style="list-style-type: none"> ・ ゼブラフィッシュの二酸化チタン粒子に対する感受性は、ライフステージによって異なったことから、複数のライフステージで影響を検討する必要がある。 ・ 胚は絨毛によってナノ粒子との接触から保護されているため、96 時間胚試験は、小魚に対する二酸化チタン粒子のハザード及びリスクを予測するには不十分な可能性がある。

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/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	Frank Seitz, Mirco Bundschuh, Ricki R. Rosenfeldt, Ralf Schulz/ Aquatic Toxicology 126 (2013) 163-168	Nanoparticle toxicity in Daphnia magna reproduction studies: The importance of test design (オオミジンコの繁殖試験におけるナノ粒子の毒性：試験設計の重要性)	<p>■対象物質 二酸化チタンナノ粒子 ・ A-100 (6 nm) ・ P25 (21 nm)</p> <p>■試料調製法 ナノ粒子懸濁液は 10 分間超音波破碎した。</p> <p>■試験用量 0.00、0.02、0.06、0.20、0.60、2.00 mg/L</p>	<p>■試験生物 オオミジンコ</p> <p>■投与期間 21 日間</p> <p>■試験方法 繁殖試験 準静的繁殖試験 フロースルー試験</p>	<p>■準静的繁殖試験 A-100 を 0.06 mg/L、21 日間投与した結果、平均子孫数が対照群に比べ 12%減少した。更に、0.20 及び 2.00 mg/L 投与群の成体の体長は 11%減少し、0.60 mg/L においては変化は見られなかった。0.20 mg/L 及び 0.60 mg/L 投与群では子孫数の減少は暴露 14 日目には表れていた。2.00 mg/L の投与群においても同様の所見が見られた。P25 は子孫数及び成体の平均体長においてわずかに逸脱が見られた。</p> <p>■フロースルー試験 フロースルー試験の結果、A-100 及び P25 の投与群において、平均体長及び子孫数に有意な変化は見られなかった。しかし暴露 19-21 日に A-100 /2.00 mg/L 投与群から産まれた子の平均体長は対照群に比べて 7.6%減少していた。</p>	<p>・準静的試験の結果、0.06 mg/L の A-100 の投与は有意に子孫数が減少したことから、環境的リスクを示した。・反対に、A-100 のフロースルー試験では産子数との関連性は見られなかった。P25 は試験設計に関係なく、毒性の影響は見られなかった。</p> <p>・本試験では、粒子の大きさ、組成、試験容器の底部における二酸化チタンナノ粒子の蓄積などが表れる毒性の違いを引き起こす要因となりうる。そのためこれらの要因はナノ粒子の環境リスクを改善するために考慮されるべきである。</p>

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/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	Mehmet Ates, James Daniels, Zikri Arslan, Ibrahim O. Farah/ Environ Mounit Assess (2013) 185: 3339-3348	Effects of aqueous suspensions of titanium dioxide nanoparticles on Artemia salina: assessment of nanoparticle aggregation, accumulation, and toxicity (アルテミア サリーナにおいて二酸化チタン水曜物が及ぼす影響: ナノ粒子のアグリゲーション、蓄積及び毒性の評価)	<p>■対象物質 二酸化チタンナノ粒子 入手元 Skyspring Nanomaterials Inc. 粒子サイズ 10-30 nm 表面積 50 m²/g</p> <p>■試料調製法 脱イオン水に二酸化チタンナノ粒子パウダーを溶解させ、20 秒間超音波破砕した。適当な量を即時試験生物のいる海水中に添加した。</p> <p>■試験用量 0、50、100 mg/L</p>	<p>■試験生物 アルテミアサリーナ</p> <p>■投与期間 24、96 時間</p> <p>■試験方法 ICP-MS マロンジアルデヒド濃度測定</p>	<ul style="list-style-type: none"> ・二酸化チタンナノ粒子は急速に凝集し、マイクロメータサイズの粒子が形成された。更に幼生及び成体において凝集物の蓄積が有意に観察された。幼生における二酸化チタン量の平均値は 24 時間で 0.47-3.19 mg/g、96 時間で 1.29-4.43 mg/g であった。成体においてはより高く、24 時間で 2.30-4.19 mg/g、96 時間で 4.38-6.20 mg/g であった。 ・位相差顕微鏡像では、アルテミアは粒子を排出できないことが明らかになった。よって、二酸化チタンのアグリゲートは腸内に充満していた。 ・いかなる投与用量も、24 時間以内の死亡率若しくは毒性の有意な変化は見られなかった。マロンジアルデヒドを特徴とする脂質の過酸化レベルは対照群に比べ有意な違いはなかった。これらの結果から、二酸化チタンナノ粒子の水溶物はアルテミアに毒性を示さず、水中において二酸化チタンのアグリゲート形成が良性のものであることに起因すると考えられる。一方、暴露時間が 96 時間に延長されると、死亡率及び過酸化脂質は増加した。死亡率が最大なのは 100 mg/L の二酸化チタンナノ粒子水溶液で観察され、幼生で 18%、成体で 14% であった。 ・LC50 は 100 mg/L 以上であった。これは、腸内に充満した粒子が酸化ストレスを引き起こし、長期間にわたって食料摂取に傷害をもたらしたことによる影響であった。 	<ul style="list-style-type: none"> ・二酸化チタンナノ粒子は海水中で急速にマイクロスケールに凝集した。しかし粒子の巨大化は蓄積に影響を与えず、24 時間以内に幼生及び成体の腸内は粒子が充満した。 ・幼生及び成体において 24 時間以内の有意な死亡率及び酸化ストレスは見られず、アルテミアに毒性は示されなかった。 ・暴露時間が 96 時間となると、わずかに死亡率の増加を伴う酸化ストレスが引き起こされた。しかしこれは腸内に二酸化チタンナノ粒子のアグリゲート物が充満したことで摂食障害が起きたためと考えられる。

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/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	Katarina Rajapakse, Damjana Drobne, Damijana Kastelec and Romana Marinsek-Logar	Experimental evidence of false-positie Comet test results due to TiO ₂ particle - assay interactions (TiO ₂ 粒子とアッセイとの相互作用に起因する偽陽性コメット試験結果に関する実験的証拠)	<p>■対象物質 バルク-TiO₂、TiO₂ ナノ粒子 入手先：Sigma Aldrich Co, MO, Merck, Germany, Biolife, Italy のいずれか)</p> <p>サイズ ・TiO₂ ナノ粒子：15nm (BET 解析) ・TiO₂ ナノ粒子 (流体力学半径)：820nm/培養液中 (動的光散乱)</p> <p>表面積 (BET 解析) ・TiO₂ ナノ粒子：190 ~290m²/g ゼータ電位 (ZetaPals での測定) ・TiO₂ ナノ粒子：-15mV (pH7.4, 培養液中) (バルク-TiO₂ の測定は行っていない)</p> <p>■試験用量 0.1, 100 μg/ml</p> <p>■溶媒・調製 培養液に懸濁し、添加する前に 30 分間の超音波処理</p>	<p>■試験生物 テトラヒメナ好熱菌 (Tetrahymena thermophila)</p> <p>■投与方法 培養液に添加</p> <p>■試験方法 ・細胞の脂質組成を測定：ガスクロマトグラフィー法、チオバルビツール酸反応法 ・細胞の活性酸素種 (ROS) の測定：OxiSelect Intracellular ROS assay Kit ・コメット試験 (変異原性試験)</p>	<p>■細胞膜の脂質組成、及び脂質の酸化 ・細胞膜の脂質組成では、バルク-TiO₂ 又は TiO₂ ナノ粒子の添加後もコントロールとの有意な相異が認められなかった。 ・脂質の酸化では、バルク-TiO₂ 又は TiO₂ ナノ粒子の添加後もコントロールとの有意な相異が認められなかった。 ■ROS の産生 ・コントロールと比較し、0.1 μg/ml の添加では、いずれの TiO₂ の添加でも ROS の産生は認められなかったが、100 μg/ml の濃度では、いずれの TiO₂ の添加においても有意な上昇が認められた。 ■コメット・アッセイ ・アルカリ性での溶解後のアッセイでは、遊離細胞又はアガロースに包埋した細胞のいずれの条件においても、バルク-TiO₂ 及び TiO₂ ナノ粒子の添加 (0.1、及び 100 μg/ml) によって有意な DNA 損傷が認められた。 ・アガロースに包埋した核では、TiO₂ ナノ粒子の 100 μg/ml 濃度の添加を除き、その他のバルク-TiO₂ 又は TiO₂ ナノ粒子の添加において有意な DNA 損傷が認められた。核によるアッセイでは、添加濃度間 (0.1 μg/ml と 100 μg/ml) に DNA 損傷の有意差があり、高濃度溶液中での粒子のアグリゲーションにより、ゲルへの浸透が妨げられたものと考えられた。 ・中性での細胞溶解によるアッセイでは、TiO₂ 処理とコントロールとの間に DNA テールの長さには有意差がないことから、TiO₂ の添加により、DNA の 2 本鎖切断は発生しないことが示された。 ・アルカリ性での溶解及び中性での溶解による試験結果から、TiO₂ による DNA 損傷は、一本鎖 DNA 切断が主であることが示された。 ・核への TiO₂ 暴露の結果は、包埋された核と TiO₂ 粒子が相互作用した際、広範囲におよぶ DNA の一本鎖切断を生ずる可能性があることを示しており、アッセイの間に培養液中に TiO₂ 粒子が存在する場合、DNA に干渉して偽陽性結果を生じさせ、実際の遺伝毒性が過大評価される可能性があることを示唆している。</p>	<p>・遊離細胞、ゲルに包埋した細胞、及びゲルに包埋した核をバルク-TiO₂ 又は TiO₂ ナノ粒子に暴露した結果、コメット・アッセイではすべて陽性であったが、脂質酸化、ROS 又は細胞膜組成などの細胞毒性による裏付けは得られなかった。 ・細胞毒性が認められない場合、TiO₂ ナノ粒子及びバルク-TiO₂ の遺伝毒性は発生しないことが報告されていることから、本コメット・アッセイの結果は、暴露後の粒子と DNA との相互作用による偽陽性の可能性がある。</p>

8) シリカ

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/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	Susanne Rittinghausen, Bernd Bellmann, Otto Creutzenberg, Heinrich Ernst, Angelika Kolling, Inge Mangelsdorf, Rupert Kellner, Sascha Beneke, Christina Ziemann/ Toxicology 303 (2013) 177-186	Evaluation of immunohistochemical markers to detect the genotoxic mode of action of fine and ultrafine dusts in rat lungs (ラット肺における微小及び超微小塵が遺伝毒性の機構にもたらす作用を検出する免疫組織化学的マーカーの評価)	<p>■対象物質 クリスタリンシリカ (quartz DQ12) カーボンブラック (Printex 90) 無定形シリカ (Aerosil 150)</p> <p>■試料調製法 懸濁液を5分間超音波破碎した後、試験期間中は攪拌し続け均質を保持した。</p>	<p>■試験生物 Wistar WU ラット (雌)</p> <p>■投与方法・期間 気管内点滴 3ヶ月</p> <p>■試験方法 免疫染色 画像解析 免疫組織学的評価</p>	<p>・ Poly(ADP-ribose) (PAR) は試験期間中において異なる粒子の区別には不十分であった。</p> <p>・ PARに比べ、Phosphorylated H2AX (γ-H2AX) ポジティブな核の定量は、異なる粒子の潜在的遺伝毒性をより区別できるようであった。</p> <p>・ 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OH-dG) の解析の結果、全ての粒子のタイプで暴露後に酸化ストレスが引き起こされ、DNA酸化損傷が起こることが示された。8-OH-dG ポジティブな核は、Printex-90及びAerosil 150に比べ、DQ12暴露群で有意に多かった。</p> <p>・ 8-Oxoguanine DNA glycosylase (OGG1) の解析の結果、DQ12を暴露したラットのみOGG-1 ポジティブな核が増加し、酸化ストレスとそれに伴うDNA酸化傷害が引き起こされることが示された。</p> <p>・ 8-OH-dGが生成される酸化損傷と、PARが生成されるDNA修復活性は、粒子が引き起こす炎症と相関していた。</p> <p>・ γ-H2AXの生成は細胞死を示すマーカー (γGlutamyl transferase、乳酸デヒドロゲナーゼ、肺重量) や、総タンパク質量のデータと相関がみられた。</p>	<p>・ 遺伝毒性は quartz DQ12 を暴露したラットで最も顕著であり、DNA二重差の崩壊、酸化損傷とそれに伴う修復活性を示す遺伝毒性マーカーがポジティブな結果を示した。</p> <p>・ Printex 90の示す遺伝毒性はわずかであったが、γ-H2AX及び8-OH-dG ポジティブな核、及びOGG-1 ポジティブな細胞質が検出された。</p> <p>・ Aerosil 150は8-OH-dG ポジティブな核と、細胞質における酸化損傷関連修復活性 (OGG1) のみが有意に増加した。</p> <p>・ 本試験では、3種の粒子において γ-H2AX が最も高感度な遺伝毒性マーカーであった。しかし炎症スコアの平均値とよく相関が見られたのは8-OH-dG ポジティブな核の平均値であった。</p>

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/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	Tokuyuki Yoshida1, Yasuo Yoshioka, Saeko Tochigi, Toshiro Hirai, Miyuki Uji1, Ko-ichi Ichihashi, Kazuya Nagano, Yasuhiro Abe, Haruhiko Kamada, Shin-ichi Tsunoda, Hiromi Nabeshi, Kazuma Higashisaka, Tomoaki Yoshikawa and Yasuo Tsutsumi Particle and Fibre Toxicology (2013) 10:41	Intranasal exposure to amorphous nanosilica particles could activate intrinsic coagulation cascade and platelets in mice (マウスに対する不 定形ナノシリカ粒子 の鼻腔内暴露は内在 性の凝固カスケード と血小板を活性化さ せる)	■対象物質 ・ナノシリカ粒子 粒子径; 粒子数 (個/mg) 30nm; 3.5×13 70nm; 2.8×1012 100nm; 9.5×1011 ・マイクロシリカ粒子 300; 3.5 ×1010 1000nm; 9.5 × 108 ・入手元 Micromod Partikeltechnologie, Rostock/Warnemünde, (Germany) ■試料調製法 使用前に5分間超音波で 破砕し、1分間ポルテッ クスにて攪拌 ■試験用量 500 μg/マウス	■試験動物 BALB/c マウス (雌、 6-8 週齢) ■投与方法 鼻腔内: 20 μ l ■投与期間 7日間 ■試験方法 最終投与から24時間 後 ・in vivo 透過電子 顕微鏡(TMS)解析(鼻 腔、肺、肝臓) ・組織病理学検査 鼻腔、肺、肝臓、 脳 ・血液学的検査 ALT、ALB、BUN ・凝固試験 ヒト血漿	■in vivo 透過電子顕微鏡 ・1000nm 径の粒子は鼻粘膜上皮に、300nm と1000nm 径粒子 は2型肺胞上皮に観察されたが、肝臓には存在しなかつ た。 ・直径100nm 以下のナノシリカ粒子は鼻腔のみならず、肝 細胞にも見られた。鼻腔から吸収され肝臓と脳にも拡散し たと思われる。 ■生物学的効果 鼻腔、肺、肝臓、脳組織病理学検査では強い炎症反応は見 られなかった。血中バイオマーカーではALTがわずかに増えた だけで大きな変化はなかった。ナノシリカの鼻腔内投与で は大きな生物学的作用は見られていない。 ■血液学的検査及び凝固試験 ナノ粒子の粒子径が小さくなるほど暴露されたマウスの血 小板は減少し、活性部分トロンボプラスチン時間は長期化 した。 この効果には用量依存性がみられたが、70nm 粒子では250 μg/マウス以下で、また30nm 粒子では62.5 μg/マウスで はコントロールと差がなかった。 ただし、白血球、リンパ球、単球の数は変化がなかった。 ■ヒトの血漿に対する in vitro 活性試験 ナノシリカ粒子はマイクロシリカ粒子よりも高い凝固因子 Ⅻ活性を示した。 ■ナノシリカ粒子を暴露したマウスは溶解性CD40 リガンド の値と、刺激した血小板に含まれる von Willebrand 因子の わずかな上昇が、粒子径の減少に伴い観察された。	・30、70、及び100nm 径 のナノシリカ及び300、 1000nm 径のマイクロシ リカをマウス鼻腔内に投 与した結果、30~100nm 径 のナノシリカは吸収され 血流に入り、肝臓などの 組織に分布することが示 された。 ・430~70nm 径のナノシリ カ粒子、活性化凝固因子 ⅪIと血小板を活性化し、 内因性の凝固系につな がる可能性が示された。
48	Soyoung Lee, Mi-Sun Kim, Dakeun Lee Taeg Kyu Kwon Dongwoo Khang Hui-Suk Yun Sang-Hyun Kim/International Journal of Nanomedicine 2013:8 147-158	The comparative immunotoxicity of mesoporous silica nanoparticles and colloidal silica nanoparticles in mice (マウスにおけるメ ソポーラスなシリカ ナノ粒子及びコロイ ド状のシリカナノ粒 子の及ぼす免疫毒性 の比較)	■対象物質 メソポーラスシリカナノ 粒子(MPS) コロイド状シリカナノ粒 子(Col) ■試料調製法 前駆体溶液は24時間透 析し、フィルタ濾過し、 水で洗浄し、エタノール で再懸濁した。 ■試験用量 2、20、50 mg/g/日	■試験生物 BALB/c マウス (6 週 齢、雌) ■投与方法・期間 腹腔内投与 4週間 (5日/週) ■試験方法 MTT アッセイ フローサイトメータ ELISA 組織学的観察(切片 観察)	・MPS 及び Col-シリカナノ粒子を投与したマウスに医学的 毒性所見は見られなかった。しかし、MPS ナノ粒子投与した マウスは肝臓及び脾臓の重量、及び脾臓細胞の増殖が増加 していた。 ・また、MPS ナノ粒子投与マウスは脾臓におけるリンパ球の 構成が変化し、血清 IgG 及び IgM の値が増加し、組織学的 な変化が見られた。Col ナノ粒子においては、脾臓における リンパ球構成のわずかな変化以外は免疫学的要素の変化は 見られなかった。	・MPS ナノ粒子の in vivo における暴露は脾臓の調 節不全を引き起こし、Col ナノ粒子よりも免疫シス テムにより深刻な損傷を 与えた。 ・In vivo で得られたデー タは in vitro の結果と一 致し、MPS の細胞毒性はよ り低かった。 ・これらの結果から、新 たなナノマテリアルを設 計する際の、in vivo と in vitro の両方の生物学的 適合性の検証の重要性を 示した。

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/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	Jennifer Kasper · Maria I. Hermanns · Christoph Bantz · Olga Koshkina · Thomas Lang · Michael Maskos · Christine Pohl · Ronald E. Unger · C. James Kirkpatrick/ Arch Toxiol (2013) 87:1053-1065	Interactions of silica nanoparticles with lung epithelial cells and the association to flotillins (シリカナノ粒子と肺上皮細胞の相互作用及びフロチリンとの関連)	<p>■対象物質 シリカナノ粒子 30nm、70nm、300m</p> <p>■試料調製 凝集を防ぐため、純水で懸濁した。</p> <p>■試験用量 6、60、150、300、600 μg/mL</p>	<p>■試験生物 ISO-HAS-1 (ヒト毛細血管内皮株細胞) NCI H441 (ヒト肺腺がん株細胞)</p> <p>■投与期間 ・細胞毒性及び炎症反応試験 4時間 ・共局在試験 20分、4時間</p> <p>■試験方法 MTS アッセイ (細胞毒性) LDH アッセイ (膜統合性) ELISA (炎症反応) トランスフェクション</p>	<p>■細胞毒性及び炎症反応 二つの細胞株において、30nm の粒子は 70 及び 300 nm の粒子よりも生存率の低下を引き起こした。更に 300 及び 600 μg/mL 濃度において、小さいナノシリカ粒子は大きな粒子よりも明確な毒性の増加を示した。 H441 細胞において、30nm 粒子は 60 μg/mL で LDH の流出が見られ、濃度 150 μg/mL で流出はピークに達した。70 nm 粒子は 150 μg/mL において統合していたが依然流出が確認され、濃度上昇に伴い流出も増加した。300 nm の粒子は 600 μg/mL において流出する LDH はわずかであり、より低い濃度においては膜統合性に影響は見られなかった。 ISO-HAS-1 も H441 と類似した挙動を示した。 ナノシリカ粒子を 4 時間暴露した細胞を 20 時間培養すると IL-8 が放出され、30nm の粒子は 60 μg/mL で濃度のピークを迎え、以降濃度上昇に従い放出量は減少した。一方より大きな粒子はより高濃度まで反応が見られなかった。</p> <p>■異なる大きさのナノシリカ粒子の細胞内への取り込み 全ての大きさのナノシリカ粒子でフロチリン 1/2 小胞との結合が観察された。</p> <p>■フロチリン 1 及びフロチリン 2 欠損細胞へのナノシリカ粒子の暴露 トランスフェクションの結果、フロチリン 1/2 RNA は対照に比べて 31-32%に減少したが、細胞の生存率は有意な変化を示さなかった。続いて 4 時間ナノシリカ粒子を暴露した H441 細胞は投与濃度依存的に生存率の低下を示したが、20 時間のナノシリカ粒子を含まない培地でインキュベーションした後は毒性は見られなかった。non-targeted siRNA 細胞は、トランスフェクションをしていない細胞と同様の毒性を示し、また 4 時間の暴露後、非トランスフェクション細胞とフロチリン 1/2 欠損細胞に有意な違いは見られなかった。 siRNA とランスフェクション細胞及び非トランスフェクション細胞は 100 μg/mL において IL-8 の放出量が最大であったが、non-targeted siRNA 細胞のピークは低かった。 フロチリン欠損細胞はナノシリカ粒子の取り込み量が減少したが、ナノシリカ粒子による毒性の上昇は観察された。</p>	<p>・粒子の大きさが細胞毒性及び炎症反応に影響を与え、より小さい粒子ほど毒性が強かった。 ・フロチリンを除去した H441 細胞はナノシリカ粒子の取り込み量が明らかに減少したが、暴露した細胞の生存率は低下した。このことから、フロチリンの働きはよくわかっていないが、エンドサイトーシスメカニズム、及び (若しくは) エンドソームストレージに関与すると示唆された。</p>

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/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	Britta Diesel, Jessica Hoppstadter, Nina Hachenthal, Robert Zarbock, Christian Cavellius, Birgit Wahl, NicolasThewes, KarinJacobs, Annette Kraegeloh, Alexandra K. Kiemer/ Eur. J. Pharmaceutics and Biopharmaceutics	Activation of Rac1 GTPase by nanoparticulate structures in human macrophages (ヒトマクロファージにおけるナノ粒子構造による Rac1 GTPase の活性化)	<p>■対象物質</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ BCG DNA (M. bovis BCG 由来 DNA) ・ ISS1018 (免疫刺激配列のオリゴヌクレオチド、Toll-like receptor (TLR) 9 のリガンド) ・ SiNP (合成シリカ・ナノ粒子); S4, S5, S6 ・ Me15 (15nm 合成シリカ・ナノ粒子) <p>サイズ (平均) の記載有</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ BCG DNA - 268nm/PBS ・ ISS1018 - ナノ粒子は形成しない ・ S4 - 91nm/水、198nm/培地 ・ S5 - 82nm/水、100nm/培地 ・ S6 - 96nm/水、198nm/培地 ・ Me15 - 13nm/水、14nm/培地 <p>■調製: 添加前に 10 分間超音波処理</p>	<p>■試験生物</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ ヒト肺胞マクロファージ ・ ヒト THP-1 マクロファージ <p>■投与方法</p> <ol style="list-style-type: none"> ①THP-1 細胞、添加 3 時間後に TNF-α の mRNA 量を測定。 ②THP-1 細胞、添加 6 時間後の上清中の TNF-α 量を測定。 ③肺胞マクロファージ又は THP-1 細胞、添加後一定時間後に Rac1 活性を測定。 ④THP-1 細胞、L929 又は肺胞マクロファージ、細胞毒性を測定。 ⑤THP-1 細胞、F-アクチンをファロイジン-TRITC で染色し、蛍光量をモニター。 <p>■試験方法</p> <ol style="list-style-type: none"> ①TNF-α mRNA 測定: RT-qPCR ②TNF-α 測定: L929 を用いたバイオアッセイ ③Rac1 活性測定: Rac1-GTP のブルダウンアッセイ ④細胞毒性試験: MTT アッセイ ⑤F-アクチンの定量: ファロイジン-TRITC による染色 	<p>■粒子特性</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ すべてのシリカ・ナノ粒子は、超純水中でマイナスのゼータ電位 (-42~-49mV) を示した。 <p>■ヒトマクロファージに及ぼす影響</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ BCG DNA ナノ粒子は、THP-1 及び肺胞マクロファージの TNF-α mRNA 及び TNF-α タンパク質の生産を誘導した。 ・ BCG DNA ナノ粒子による肺胞マクロファージの TNF-α 発現誘導は、サイトカラシン D によるアクチンの重合化阻害によって弱められ、細胞骨格が BCG DNA ナノ粒子によるマクロファージの活性化機序に関与していることが示唆された。 ・ BCG DNA ナノ粒子を添加したマクロファージにおいて、Rac1 の活性化が観察された。 ・ ナノ粒子は、細胞に迅速に取り込まれ、明確に核の近傍に局在した。 ・ ナノ粒子は、マクロファージの微小管形成中心の周囲に集まり、小胞を介して取り込まれることが示唆された。 ・ SiNP は、THP-1、L929、及び肺胞マクロファージに対して有意な細胞毒性を示さなかった。 ・ SiNP は、BCG DNA と同様、アクチンの重合化を促進し、THP-1 及び肺胞マクロファージの Rac1 活性を上昇させた。 ・ SiNP 及び ISS1018 の添加では、TNF-α mRNA 及び TNF-α タンパク質の発現促進は示されなかった。 ・ ISS1018 と SiNP (S6 又は Me15) を THP-1 細胞に同時に添加した場合、TNF-α mRNA 及び TNF-α タンパク質の発現が促進された。 	<ul style="list-style-type: none"> ・ ISS1018 とは対照的に、BCG DNA は自然にナノ粒子構造を形成し、シリカ・ナノ粒子と同様にアクチンの重合化を誘導した。 ・ マクロファージは、シリカ・ナノ粒子とのインキュベーションにより、ISS1018 に対する応答性が増幅した。 ・ BCG DNA 及びシリカ・ナノ粒子によってマクロファージの Rac1 の活性化が誘導された。 ・ ナノ粒子は、マクロファージにおける炎症応答を増幅するシグナル伝達経路を誘導する可能性がある。

ナノ金

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/ 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	Show-Mei Chuang , Yi-Hui Lee ,, Ruei-Yue Liang ,, Gwo-Dong Roam , Zih-Ming Zeng , Hsin-Fang Tu , Shi-Kwun Wang, Pin Ju Chueh Biochimica et Biophysica Acta 1830 (2013) 4960 - 4973	Extensive evaluations of the cytotoxic effects of gold nanoparticles (金ナノ粒子の細胞 毒性の影響の広範囲 評価)	金ナノ粒子 (10nm × 39nm, 10nm × 41nm, 10nm × 45nm) 入手元 the Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA)	■試験動物 AGS(ヒト胃腺種細胞) A549(ヒト肺線癌上皮) PK-15(ブタインシュリン) Vero(アフリカミドリ ザル腎臓) ■培養時間 暴露後 72 時間 ■試験方法 ・MTS に基づく比色定量 アッセイによる細胞生 存率の測定 ・トリパンプルーによ るアッセイ ・コロニー形成数の測 定 ・アポトーシスの測定 ・細胞周期の解析 ・細胞分裂アッセイ ・活性酸素測定 ・ウエスタンブロット による解析 ・cDNA マイクロアレイ ・定量的リアルタイム PCR	・6つの細胞株において用量依存的な細胞成長阻害性が見られたが、 その重症度と阻害度は金粒子のサイズと取り込み量と間接的な関連 が見られた ・金粒子はアポトーシス誘導若しくは細胞周期の遅延を細胞種及び 細胞構成に依存的に媒介した ・酸化還元シグナルはナノ粒子の毒性としばしばリンクしたが、金 ナノ粒子が媒介した活性酸素産生は、抗酸化防御システムに係るタ ンパク質の顕著な変性を引き起こさなかった	・細胞インピーダンス測定システムは、 種々の哺乳類細胞株 において金ナノ染色 不要のリアルタイム スクリーニングブラ ットホームで、粒子 をモニタリングする 信頼性の高い解析方 法である ・金ナノ粒子は細胞 シグナルと、細胞内 の物理的な変性を起 こす遺伝子の発現を 誘導する

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/ 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	Bryant C. Nelson, Elijah J. Petersen, Bryce J. Marquis, Donald H. Atha, John T. Elliott, Danielle Cleveland, Stephanie S. Watson, I-Hsiang Tseng, Andrew Dilon, Melisa Theodore & Joany Jackman Nanotoxicology, February 2013;7(1):21-29	NISTgold nanoparticle reference materials do not induce oxidative DNA damage (NIST の標準物質で ある金粒子は DNA に 酸化ダメージをもた らさない)	<p>■対象物質 クエン酸安定化 AuNP</p> <ul style="list-style-type: none"> ・粒子径 10、30、60 nm ・入手元 NIST Standard Reference Materials Program <p>■試験用量</p> <ul style="list-style-type: none"> ・HepG2 cells ・0.0002、0.002、0.02 若しくは 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$; ・ct-DNA ・0.0002、0.02 若しくは 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 	<p>■試験生物 HepG2 cells</p> <p>■試験方法</p> <ul style="list-style-type: none"> ・動的光散乱法 (DLS) ・透過型電子顕微鏡 (TEM)による形態観察 ・MTT アッセイ (細胞毒性) ・Live/dead アッセイ ・フローサイトメトリー ・LC/MS/MS ・EPR 分光法 	<p>■金ナノ粒子の取り込み量評価</p> <ul style="list-style-type: none"> ・DLS 測定によると、24 時間の間に培地中で粒子が凝集している様子は観察されなかった。 ・TEM によると、暴露期間中の HepG2 細胞に金粒子は取り込まれ、エンドソーム/リソソーム小胞に局在していた。 <p>■金ナノ粒子の細胞生存性及び細胞周期への影響</p> <ul style="list-style-type: none"> ・MTT アッセイによると、は HepG2 細胞の増殖に対する着ん粒子の目立った影響は見られなかった。 ・Live/dead アッセイによると、金粒子は HepG2 細胞の生細胞率をわずかに低下させており、粒子径及び投与用量との関係は見られなかった。 ・フローサイトによる解析の結果、本投与条件は HepG2 の細胞周期に影響をもたらさなかった。 ・本試験の投与条件において、金粒子は HepG2 細胞に毒性をもたらさなかった。 <p>■金ナノ粒子が HepG2 細胞の DNA にもたらす酸化ダメージ</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ポジティブコントロールは、過酸化水素の発生で 8-OH-dG、8-OH-dA レベルが有意に上昇したが mR-cdA 及び S-cdA の値に変化はなかった。 ・金ナノ粒子による有意な変化は、S-cdA 以外に見られなかった。 ・0.0002 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 投与において、30nm のナノ粒子が S-cdA の測定値を上昇させたが、この現象は投与用量に依存的ではなかった。 <p>■金ナノ粒子が ct-DNA にもたらす酸化ダメージ</p> <ul style="list-style-type: none"> ・対照群と試験群の間に統計的に有意な差異は見られなかった。 <p>■無細胞の金ナノ粒子インキュベーション溶液の EPR 分光</p> <ul style="list-style-type: none"> ・フリーラジカルの生成は検出されなかった。 	<ul style="list-style-type: none"> ・投与用量 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において、投与用量依存的な明らかな DNA の損傷の上昇は見られず、フリーラジカルも検出されなかった。 ・NIST の AuNPs は in vitro 及び in vivo のナノ粒子遺伝毒性試験においてネガティブコントロールとして適当かもしれない。

9) ナノ銀

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/ 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	KyungSeukSong, Jae HyuckSung, JunHoJi, JiHyunLe, JongSeongLe, HyeonRyoI Ryu, JinKyuLee, Yong Hyun Chung, Hyun Min Parl, Beom Soo Shin, Hee Kyung Chang, Bruce Kelman, & IJeYu / Nanotoxicology, March 2013;7(2):169-180	Recovery from silver-nanoparticle-exposure-induced lung inflammation and lung function changes in Sprague Dawley rats (Sprague Dawley ラットにおいて、銀ナノ粒子の暴露によって引き起こされた肺の炎症からの回復と、肺の機能の変化)	<p>■対象物質 銀ナノ粒子</p> <p>■試験用量 0.6×10⁶ 粒子/cm³ 1.4×10⁶ 粒子/cm³ 3.0×10⁶ 粒子/cm³</p>	<p>■試験生物 Sprague-Dawley rat (5週齢、雄雌)</p> <p>■投与方法・期間 吸入暴露 6時間/日、5日/週、12週間</p> <p>■試験方法 全身プレステチモグラフィ 黒鉛炉原子吸光分析 組織病理学的解析 (パラフィン切片観察)</p>	<p>■動物の摂餌量及び体重への影響 暴露群の動物に、目立った毒性の兆候や死亡率の変化、体重の変化は見られなかった。</p> <p>■肺機能試験 雄のラットは、暴露5-12週後にTV値の顕著な低下が見られた。また回復期間においても低下が見られた。この傾向はMV値、及びPEF値においても同様に見られた。一方、雌においては肺の機能を示すパラメータの目立った変化は見られなかった。</p> <p>■肺及び他の組織における銀の濃度 投与群のラットにおいて、肺の銀濃度が投与用量依存的に増加している様子が観察された。これらの銀濃度は回復期間に徐々に低下するが、高用量投与群においては12週間の回復期間後も完全に排出されなかった。銀濃度の上昇は、雌の脳を除き、全ての雌雄の組織で投与用量依存的な増加が見られた。これらの組織の銀はほとんどが回復期間に正常値まで回復したが、脾臓と肝臓のみ12週間後も対照値に比べて高いままであった。</p> <p>・12週間の回復期に肺から排出される銀ナノ粒子平均滞留時間は雌雄で同程度であった。</p> <p>■組織学的評価 投与群のラットは、血管周囲の浸潤、慢性的肺胞炎症といった症状の増加が見られた。12週間の回復期間後、全ての投与群の雌のラットは銀ナノ粒子が排出され炎症が減少したが、高用量投与群の雄は全てが排出されず、回復期間後も炎症が残存した。</p>	<p>・12週間の暴露後、及び12週間の暴露休止後において雄ラットの肺機能の低下が観察された。反対に、雌のラットは暴露期間中及び暴露休止期間中においても肺機能の一貫した低下は見られなかった。</p> <p>・組織病理学的解析では、雌のラットでは肺の炎症が緩やかに回復している様子が見られたが、高用量投与群の雄は12週間の回復期間を通じて炎症が残存していた。</p> <p>・よって、銀ナノ粒子の暴露が引き起こす持続的な肺機能の変化や炎症は、有害作用とされるレベルではないことが示唆された。</p>

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/ 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	Ji Hyun Lee, Yong Soon Kim, Kyung Seuk Song, Hyun Ryol Ryu, Jae Hyuck Sung, Jung Duck Park, Hyun Min Park, Nam Woong Song, Beom Soo Shin, Daniel Marshak, Kangho Ahn, Ji Eun Lee and Il Je Yu/ Particle and Fibre Toxicology 2013, 10:36	Biopersistence of silver nanoparticles in tissues from Sprague-Dawley rats (Sprague-Dawley系ラットに由来する組織における銀ナノ粒子の生体内持続性)	<p>■対象物質 銀ナノ粒子 入手元 ABC Nanotech 純度 99.98% 平均直径 10 及び 25nm</p> <p>■試料調製法 0.9%クエン酸に懸濁し、食餌に混合</p> <p>■投与用量 100mg/kg 体重/日 500mg/kg 体重/日</p>	<p>■試験生物 Sprague-Dawley ラット (雌雄、4 週齢) (投与開始時は 5 週齢)</p> <p>■投与方法 食餌による経口摂取</p> <p>■試験期間 投与期間 28 日(1 回/日) 回復期間 1、2、4 ヶ月</p> <p>■試験方法 生化学的、血液学的、病理組織学的評価 組織銀量の測定 回復期の銀の排出の定量</p>	<ul style="list-style-type: none"> ・投与による摂食量、摂水量への影響、毒性症状は見られなかった。 ・28 日間の投与後、その後の回復期 1 ヶ月及び 2 ヶ月において、肝臓における脂肪滴及び炎症性細胞浸潤と、腎臓における管の再生が観察されたが、投与用量に依存的ではなかった。 ・血液学的解析の結果、回復期 1 及び 2 ヶ月の高用量投与群の雌において MCHC (平均赤血球ヘモグロビン濃度) の減少が見られ、回復期 2 ヶ月の高用量投与群の雌において血小板の減少が見られた。 ・高投与用量群の雌においてプロトロンビン時間が有意に増加。 ・10nm の投与群及び 25nm の低用量投与群の雄は血中のコレステロール値が上昇していたが、回復期には通常値に戻っていた。 ・高用量投与群 (25nm) の雄が無機リンが回復期 2 ヶ月後も上昇。 ・10nm の投与群の雌はアルカリフォスファターゼの値が上昇しており、回復期 1 ヶ月後も依然高かった。 ・25nm の投与群はアスパラギン酸アミノ転移酵素が上昇していた。 ・回復期 2 ヶ月後には、雌のアルカリフォスファターゼ及びアスパラギン酸アミノ転移酵素の値は通常に戻っていた。 ・血液学的マーカーから判断すると、銀ナノ粒子暴露では亜急性、亜慢性の経口毒性があるが、回復期 2 ヶ月後には通常値に戻る。 ・血中の銀ナノ粒子濃度は最初の 1 ヶ月間で急速に減少。 ・血中銀ナノ粒子の半減期は、10nm 高用量群で、雄は 99 日、雌は 78 日だった。25nm 高用量群で、雄は 133 日、雌は 140 日だった。 ・肝臓の銀ナノ粒子は 4 ヶ月間に持続的に減少していた。 ・腎臓において、10nm の高用量投与群は 4 ヶ月間銀粒子が残存していたが、低用量投与群は 1 ヶ月で大きく減少。25nm 投与群は投与用量に関わらず 1 ヶ月後に減少していた。 ・脾臓の銀ナノ粒子は、高用量投与群は 1 ヶ月後に減少が見られた。 ・卵巣において、10nm の高用量投与群の雌は回復期 4 ヶ月後排出が見られた。 ・精巣において銀ナノ粒子の減少が見られたのは、10nm の低用量投与群においてのみ。 ・脳においても銀ナノ粒子の排出は困難な様子が伺われた。 ・脳と精巣/卵巣における平均滞留時間は他の組織より長く蓄積しやすいこと、また平均滞留時間に粒子サイズは影響しないことが判明した。 	<ul style="list-style-type: none"> ・4 ヶ月間の回復期の間に、大半の組織における銀の含量が低下したことから、組織が蓄積した銀を排出していることが示された。 ・脳及び精巣においては、4 ヶ月を経ても完全に排出されず、組織外への銀の輸送が妨げられていることが示された。 ・本試験において銀ナノ粒子の大きさは組織における分布に影響を及ぼさなかった。 ・血液-脳障壁及び血液-精巣障壁などの、生物学的バリアが銀の排出に重要だ。

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/ 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	<p>ABDALLAH OUKARROUM, LOTFI BARHOUMI, LAURA PIRASTRU, and DAVID DEWEZ</p> <p>Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 32, No. 4, pp. 902-907, 2013</p>	<p>SILVER NANOPARTICLE TOXICITY EFFECT ON GROWTH AND CELLULAR VIABILITY OF THE AQUATIC PLANT LEMNA GIBBA</p> <p>(銀ナノ粒子の毒性が水生植物のイボウキクサの成長及び細胞生存性に影響を与える)</p>	<p>銀ナノ粒子 粒子径 50nm 純度 99.9% 比表面積 5~10 m²/g ・入手元 MTI corporation ■調製方法 イボウキクサ培地に100mg/Lで懸濁し、均一な溶質を得るため使用前に2分間超音波破碎。動的光散乱法+ゼータ電位測定で分布を測定。 透過型電子顕微鏡で粒子の大きさを測定し、イボウキクサ培地に1mg/Lに懸濁。 ■粒子から放出された銀の計測 銀ナノ粒子を0~10mg/Lでイボウキクサ培地に懸濁し24時間静置する。 12000g、30分間遠心した後、動的光散乱法(DLS)+ゼータ電位測定で粒子が存在しないことを確認し、原子吸光分析法で銀を計測。</p>	<p>■試験生物 水生植物イボウキクサ生育と試験はチャンバー CONVIRON で実施 明期:暗期は16:8(時間) 温度24℃ ■培養期間 7日以上 ■粒子濃度、方法、期間 ・0, 0.01, 0.1, 1, 10 mg/L ・培養皿中の培地に添加 ・添加後24時間毎に培地を交換し、ナノ粒子濃度を維持。 ■試験方法 ・細胞生存性の測定 フルオレセイン酢酸法 ・活性酸素量測定(暴露後7日) 細胞浸透性蛍光標識 2',7'-ジクロロ ジヒドロフルオレセインジアセタート ・細胞内銀の測定 暴露7日後、10mM EDTAを含む培地で洗浄し、105℃、24時間乾燥させた植物の重量を測定。その後2mLHNO₃、500uL H₂O₂を含む試験管に移し129℃、48時間消化して、ICP 発光分光分析法で細胞内の銀を測定。</p>	<p>■粒子特性 ・粒子径50nmの銀ナノ粒子をイボウキクサ培地に懸濁すると、急速にアグロメレートになった。 ・ナノ粒子のアグロメレーションは、培地のpHやイオン強度に影響を受ける。 ・形成されたアグロメレートは24時間安定。 ・DLSで測定した粒子の中心径は240nm、ゼータ電位は-34.75±2.15で、培地のpH及び組成に影響を受ける。 ・24時間の試験で、~1%と非常に微量の銀が遊離。 ■毒性試験 ・銀ナノ粒子の濃度依存的に成長阻害が見られ、高濃度の銀ナノ粒子を暴露した植物は葉が減少した。 ・本試験濃度において葉の数から算出した植物成長に対するEC50は9.36(±2.36)mg/Lであった。 ・細胞内に蓄積する銀の量は、培地中の銀ナノ粒子量に比例する。 ・細胞内に蓄積した銀の乾燥重量:暴露した銀ナノ粒子濃度(mg/L:mg/L) 0.01:7.72 10⁻³、0.1:9.5 10⁻³、1:11.3 10⁻³、10:17.5 10⁻³ ■細胞生存性 0.1、1、10 mg/Lの銀ナノ粒子を7日間暴露した植物の細胞生存性は有意に低下し、最高濃度(10mg/mL)においては対照の80%であった。 ■活性酸素量測定 10mg/Lの銀ナノ粒子を暴露した植物では、対照の340%の活性酸素を検出した。 ・活性酸素の発生量と、細胞生存性の低下には高い相関性(r²=0.91)が見られた。</p>	<p>・銀ナノ粒子は溶液中で安定したアグロメレートを形成する。 ・銀ナノ粒子の暴露はあらゆる濃度で、濃度依存的に成長阻害を招き、植物成長のEC50は9.36(±2.36)mg/Lであった。 ・細胞内への銀の取り込み量は、培地中に溶解する銀ナノ粒子の濃度に比例する。 ・細胞生存性の低下と活性酸素発生量の増加は高い相関性が見られる。</p>

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/ 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	KIM M. NEWTON, HEMA L. PUPPALA, CHRISTOPHER L. KITCHENS, VICKI L. COLVIN, and STEPHEN J. KLAINÉ /Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 32, No. 10, pp. 2356-2364, 2013	SILVER NANOPARTICLE TOXICITY TO DAPHNIA MAGNA IS A FUNCTION OF DISSOLVED SILVER CONCENTRATION (銀ナノ粒子がもたらすオオミジンコの毒性は溶解した銀の濃縮による)	■対象物質 銀ナノ粒子 ・AgGA (ガムアラビックコート) 入手元 CEINT 粒子径 6nm 銀含量 168.4mg Ag/L ・AgPEG (ポリエチレングリコルコート) 入手元 The Colvin Lab (Rice University) 粒子径 4.7nm 銀含量 28.4mg Ag/L ・AgPVP (ポリビニルピロリドンコート) 入手元 CEINT 粒子径 25nm 銀含量 187.0mg Ag/L ストック濃度 10mg/ ■溶媒 ・moderately hard reconstituted water ・Suwannee River DOC 添加 moderately hard reconstituted water ■試験用量 AgNO ₃ (0.5-32 mg/L) AgPVPs (5-75 mg Ag/L), AgGAs (1-10 mg Ag/L), AgPEGs (0.5-20 mg Ag/L)	■試験生物 オオミジンコ ■試験方法 ・毒性バイオアッセイ 48時間のLC50測定 ・銀総量及び溶解銀の解析 IPC-MS ICP-optical emission spectrometry	■粒子特性 ・溶媒によって各粒子の粒子径は変化した。 ・AgPVPのゼータ電位が最も小さく、ほぼ中性を示した (-0.103±5.5mV) ・AgPEGのゼータ電位は最も大きく (-26.1mV±4.4mV) 脱イオン水中で最も安定であることを示した ・AgGAのゼータ電位 (-11mV±4.1mV) はアグリゲーションを防ぐ十分なチャージがないことを示した。 ■毒性バイオアッセイ ・毒性の強さは AgNO ₃ >>AgGAs>AgPEGs>>AgPVPs であった。 ・Suwannee River DOCの添加は reconstituted water 単独に比べ毒性を弱める傾向が見られたが、濃度依存的とは限らなかった。 ・AgNO ₃ の48時間LC50は1.50mg C/Lで上昇したが、更に9.61 mg C/Lにしても変化はなかった。 ・AgPVPはSuwannee RiverDOC培地による毒性の強さの変化は見られなかった。 ・AgGAは1.46 mg C/Lの添加で reconstituted water の場合より毒性が強まったが、11.30 mg C/Lの添加では弱まった。 ・AgNO ₃ に比べ、ナノ粒子の示す毒性は弱い。 ■48時間のLC50濃度における銀総量と溶解銀の測定 ・reconstituted water において、銀の総量はLC50の52%~70%、そのうち溶解銀は10%~84%。 ・Suwannee RiverDOC存在下において、銀の総量は49%~100%、そのうち溶解銀は0%~83%。 ・reconstituted waer で処理した銀総量は0.68 µg/L (溶解銀は0.58 µg Ag/L)~7.17 µg/L (1.58 µg Ag/L)。 ・いずれのナノ粒子も、Suwannee RiverDOC存在下では銀の総量に対する溶解銀の割合が低下した。	・毒性が最も強いのはAgNO ₃ 、最も弱いのはAgPVPであった。 ・ナノ粒子はAgNO ₃ よりも毒性が弱い。 ・Suwannee River DOCはある程度毒性を軽減させた。 ・Suwannee River DOC存在下は溶解する銀の割合が低下した。 ・銀ナノ粒子の毒性は、溶解銀による作用であると推測できた。

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/ 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	Ki-Tae Kim, Lisa Truong, Leah Wehmas and Robert L Tanguay / Nanotechnology 24 (2013) 15101 (8p)	Silver nanoparticle toxicity in the embryonic zebrafish is governed by particle dispersion and ionic environment (ゼブラフィッシュ胚における銀ナノ粒子毒性は粒子の分散とイオン環境によって決められる)	<p>■対象物質 銀ナノ粒子</p> <p>20nmPVP-stabilized Ag NPs (20AgNPs-P), 20 nm citrate-stabilized AgNPs (20AgNPs-C), 110 nm PVP-stabilized AgNPs (110AgNPs-P) 110nm citratecoated AgNPs (110AgNPs-C).</p> <p>入手元 The National Institute of Environmental Health Sciences</p> <p>保存温度 4°C</p> <p>■試験用量 0, 0.08, 0.4, 2, 10, 50mg /l</p> <p>■溶媒 EM CaCl₂</p> <p>UP (純水)</p>	<p>■試験生物 ゼブラフィッシュ胚</p> <p>■投与方法 産卵後 (hpf) 4 時間で肺を回収し、96well plate に 6 hpf の胚を播種した。目的濃度に調製した銀ナノ粒子を添加し 24-120 hpf の間 22 時点において観察、評価した。</p> <p>■試験方法 奇形率のカウント ICP-MS による銀の定量</p>	<p>■粒子特性</p> <ul style="list-style-type: none"> ・銀ナノ粒子がアグロメレートせず、正常な発達をするのに必要な最低 CaCl₂ 濃度は 62.5 μM であった。 ・EM 中の銀ナノ粒子は全て可視紫外スペクトラが低下し、アグロメレートが示唆された。 ・陽イオン濃度が高い EM は負電荷を帯びた銀ナノ粒子との静電反発が減り、アグロメレートを引き起こした。 ・EM 培地は CaCl₂ and UP 培地に比べ銀の溶解が少なく、アグロメレートが観察された。 ・EM 中において、20AgNPs-P は 20AgNPs-C に比べてよりアグロメレートが少なく、CaCl₂ 中において、110AgNPs-C は 110AgNPs-P に比べ、よりアグロメレートが少なかった。 ・CaCl₂ and UP 中の銀ナノ粒子は 5 日間安定であったが、EM 中では流体力学的径が増加し、アグロメレートが示唆された。 ・銀ナノ粒子の安定は界面力よりも静電反発力が重要である。 ・テスト培地は銀ナノ粒子の安定性に影響を与えた。 <p>■発達毒性のプロファイル</p> <ul style="list-style-type: none"> ・CaCl₂ 及び UP に懸濁した銀ナノ粒子は高い毒性を示し、20AgNPs-P、20AgNPs-C 及び 110AgNPs-P を 50mg/l 投与すると 120 hpf の致死率は 100%。それ以下でも奇形率、致死率は増加。 ・CaCl₂ 及び UP 中における EC50 は EM 中よりも明らかに低い ・EM 中においては高いアグロメレートのため毒性が弱い。 ・EM 培地中における毒性の強さは 20AgNPs-C > 20AgNPs-P > 110AgNPs-C ~ 110AgNPs-P ・CaCl₂ 培地中 (UP も同様) における毒性の強さは 20AgNPs-p > 20AgNPs-C > 110AgNPs-P > 110AgNPs-C <p>■大きさや表面コートによる毒性</p> <ul style="list-style-type: none"> ・粒子径が小さいものはより毒性が強い。 ・PVP コーティングはクエン酸炎コーティングより毒性が強い ・AgNPs-P は AgNPs-C よりも毒性が強い。 ・AgNPs-C の毒性の弱さはアグロメレーションによるものである。 <p>■銀の定量</p> <ul style="list-style-type: none"> ・CaCl₂ 及び UP 中に溶解する硝酸銀は、EM 中に比べより毒性が強く胚に負荷をかける。 ・EM 中の陽イオンが遊離銀イオンを抑制していた。 ・銀イオンの LC50 は 1.5mg/l。 	<ul style="list-style-type: none"> ・銀ナノ粒子は CaCl₂ 62.5 μM 及び UP 中でアグロメレートを保っていたが、EM 中ではアグロメレートが見られた ・CaCl₂ 及び UP の低イオン強度の環境では胚は正常に発達した ・UP 及び CaCl₂ に懸濁した銀ナノ粒子は、EM 中よりも強い毒性を示した ・銀ナノ粒子の分散は、異なる電解質において粒子径に影響をうける ・銀ナノ粒子は濃度が高い程毒性が強く、また同じ粒子径の粒子は PVP コートがより毒性が強い

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/ 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	F. Gagne, J. Auclair, P. Turcotte, C. Gagnon	Sublethal effects of silver nanoparticles and dissolved silver in freshwater mussels (淡水イガイにお ける銀ナノ粒子及 び溶解銀の亜致死 的影響)	<p>■対象物質 銀粒子 (入手先: Ted Pella, Inc. CA) 溶解銀 (硝酸銀)</p> <p>銀粒子のサイズ (プラズモン共鳴) ・ 20nm 粒子 ・ 80nm 粒子</p> <p>ゼータ電位 ・ 20nm 粒子: -5.5mV ・ 80nm 粒子: -36.1mV</p> <p>■試験用量 0.8, 4, 20 $\mu\text{g/L}$</p> <p>■溶媒・調製 水道水 (pH6.7~6.8)</p>	<p>■試験生物 淡水産イガイ (Elliptio companata mussels) (貝殻の大きさ: 6~8cm)</p> <p>■投与方法 飼育水 (水道水) に各濃度で添加する。</p> <p>■試験方法 ・ 対象物質を 15°C、48 時間暴露後、閉殻筋 (貝柱)、えら、消化腺、生殖腺を採取し、バイオマーカーを測定。 ・ 閉殻筋のアクチノミオシン-ATPase を測定: Vassallo ら (1999) の方法 ・ 閉殻筋のメタロチオネイン (MT) を測定: Viarengo (1997) らの方法 ・ 消化腺の脂質過酸化量 (LPO) を測定: チオバルビツール酸反応法 ・ DNA 鎖切断測定: アルカリ性 DNA 沈殿法 ・ えら、消化腺、生殖腺の HSP74 の測定: 免疫化学的分析 ・ えら、消化腺、生殖腺のポリユビキチン化タンパク質レベルの測定: ELISA 法</p>	<p>■粒子特性 ・ 0.1mg/ml 濃度で 1 時間放置後、0.45、0.1、0.05、及び 0.025 μm ボアサイズのフォルターを通した結果、20nm 銀粒子は、0.05 μm フィルタに保持され、3 粒子以上のアグリゲートが形成されていることが示唆された。80nm 銀粒子は 60%が 0.45 μm フィルタに保持され、6 粒子以上のアグリゲートが形成されていることが示唆された。</p> <p>■イガイに及ぼす影響 ・ えらでは、20nm 銀粒子及び 80nm 粒子暴露により HSP72 レベルが低下したが、溶解銀では影響が少なかった。 ・ 20nm 銀粒子暴露では 0.8 $\mu\text{g/L}$、80nm 銀粒子暴露では 4 $\mu\text{g/L}$、溶解銀暴露では 20 $\mu\text{g/L}$ の濃度でタンパク質のユビキチン化が有意に誘導された。 ・ 20nm 銀粒子暴露では 4 $\mu\text{g/L}$ でアクチノミオシン-ATPase 活性が上昇したが、溶解銀暴露ではこの濃度でアクチノミオシン-ATPase 活性が減少した。 ・ 20nm 銀粒子暴露では 20 $\mu\text{g/L}$、80nm 銀粒子暴露では 4 $\mu\text{g/L}$、溶解銀暴露では 0.8 $\mu\text{g/L}$ の濃度で MT が有意に誘導されたが、溶解銀暴露では 20 $\mu\text{g/L}$ の濃度でコントロールのレベルまで戻った。 ・ 20nm 銀粒子暴露では 4、20 $\mu\text{g/L}$、80nm 銀粒子暴露及び溶解銀暴露では 0.8 $\mu\text{g/L}$ で LPO が有意に誘導された。 ・ えらでは、すべての銀の形態において、0.8 $\mu\text{g/L}$ の暴露濃度で、DNA 鎖切断が有意に上昇した。 ・ 消化腺では、0.8 $\mu\text{g/L}$ の 80nm 銀粒子暴露及び溶解銀暴露において、DNA 鎖切断が上昇した。 ・ 生殖腺では、DNA 鎖切断の有意な影響は、いずれの銀の形態においても認められなかったが、最低濃度の溶解銀暴露において、数値上の減少が認められた。 ・ 判別要因解析の結果では、80nm 銀粒子の作用は、20nm 銀粒子より相対的に溶解銀の作用に近似しており、20nm 銀粒子は、消化腺でのタンパク質のユビキチン化、MT レベル及び DNA 鎖切断において、80nm 銀粒子からほぼ区別された。 ・ 消化腺が銀粒子の標的器官であることが示唆された。</p>	<p>・ すべての形態の銀暴露において MT 及び LPO レベルが上昇し、酸化ストレスを引き起こす銀イオンが存在することが示唆された。</p> <p>・ 銀粒子は、さらに溶解銀とは異なる形で消化腺のタンパク質のユビキチン化、アクチノミオシン-ATPase、MT、及び DNA 鎖切断の変化を引き起こした。</p> <p>・ 銀粒子は、放出された銀イオンにより毒性を上昇させるばかりでなく、ナノ粒子のサイズ及び表面特性に関連して誘導されるその他の毒性作用を引き起こすものと結論付けられる。</p>

10) 酸化亜鉛

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/ 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	Verena Wilhelmi, Ute Fischer, Heike Weighardt, Klaus Schulze-Osthoff, Carmen Nickel, Burkhard Stahlmecke, Thomas A. J. Kuhlbusch, Agnes M. Scherbert, Charlotte Esser, Roel P. F. Schins, Catrin Albrecht/ PLOS ONE June (2013) Volume 8 Issue 6 e65704	Zinc Oxide Nanoparticles Induce Necrosis and Apoptosis in Macrophages in a p47phox- and Nrf2-Independent Manner (酸化亜鉛ナノ粒子は、p47phox-及びNrf2-とは独立した経路でマクロファージのネクローシス及びアポトーシスを引き起こす)	<p>■対象物質 酸化亜鉛ナノ粒子 ・ ZnO I (入手元 Nanostructured and Amorphous Materials Inc., 粒子径 20nm, 比表面積 50m²/g) ・ ZnO II (Nanoscale Materials Inc., <10nm, 70m²/g) ・ ZnO III (シグマアルドリッチ, 10m²/g) ・ Zn IV (the European Commission Joint Research Centre より類似物質 Nm-110 を入手, 14m²/g)</p> <p>■試料調製 酸化亜鉛ナノ粒子は試験前に 220°C 16 時間焼成し、エンドトキシンを除去した。試験直前に培地に 0.7g/L で懸濁し、水中で超音波破碎 (60W, 35Hz, 10 分) を行った。</p> <p>■試験用量 1、5、10、40 若しくは 80 μg/cm²</p>	<p>■試験生物 ネズミのマクロファージ様細胞株 RAW264.7 JMR/C9 細胞 骨髓細胞</p> <p>■投与期間 4 時間若しくは 24 時間</p> <p>■試験方法 細胞毒性 DNA 断片解析 酸化 DNA 損傷測定 (フォルムアミドピリミジングリコシラーゼ修飾 コメットアッセイ) 透過型電子顕微鏡 免疫蛍光抗体検査 取り込み量の測定 過酸化物の検出</p>	<p>・アポトーシスの特異的マーカーである低二倍体の解析を行った結果、全ての ZnO サンプルにおいて同等の結果が得られたことから、本試験では ZnO I を ZnO サンプルとして以降使用した。</p> <p>・ZnO の培地中における分散は、24 時間のプレインキュベーションによっても変化は見られなかった。</p> <p>・ZnO 処理した RAW264.7 細胞のマクロファージは、エンドサイトーシス小胞付近に結合するシュードボディアの増加といった貪食過程が見られた。</p> <p>・5 μg/cm² の ZnO で処理した RAW264.7 のマクロファージは、典型的なアポトーシスの指標であるカスパーゼ 3 が検出され、そのシグナルの強さはポジティブコントロールであるスタロスポリンに匹敵した。</p> <p>・DNA 染色の結果、クロマチンの凝集は未処理の細胞や、低濃度 ZnO 処理細胞では検出されなかった。</p> <p>・投与用量 40 及び 80 μg/cm² の処理群は、非特異的なシグナルが増加した。</p> <p>・カスパーゼ 3 の検出は 5 μg/cm² でピークを迎えたのに対し、DNA の断片化及び核凝縮は投与用量に依存的に増加した。</p> <p>・アポトーシス耐性細胞 JMR を 5 及び 10 μg/cm² の ZnO で処理すると、未処理の細胞に比べて細胞生存性はほぼ変化しないが、カスパーゼ 9 を再生した JMR/C9 細胞を同様に処理すると、4 時間後の細胞生存性は 50%以下になった。</p> <p>・10、40 及び 80 μg/cm² の ZnO で処理した細胞は、濃度依存的ではないものの酸化 DNA 損傷が見られた。</p> <p>・野生型マウスのマクロファージを ZnO で処理すると活性酸素の生成増強が見られたが、p47phox-/-マウスのマクロファージでは生成が損なわれていた。</p> <p>・野生型マウスと p47phox-/-マウスにおいて、ZnO の取り込み量、WST-1 アッセイ及び低二倍体 DNA 解析の結果に違いは見られなかった。</p> <p>・酸化還元感受性転写因子 Nrf2 が欠損しているマウスにおいて、ZnO の投与用量依存的な影響が明確に見られたが、マクロファージの遺伝的バックグラウンドとの相関は WST-1 アッセイ及び低二倍体 DNA 解析では見られなかった。</p>	<p>・RAW264.7 細胞では、ZnO 粒子は急速な核凝縮、DNA の断片化、核 DNA の低二倍体及びアポトーシス小体の形成を引き起こした。免疫蛍光染色により、ZnO が仲介するアポトーシスにカスパーゼ 3 が含まれていた。</p> <p>・主要因子のカスパーゼ 9 が欠落している Jurkat T リンパ球は ZnO が仲介する毒性に抵抗が見られ、ZnO が引き起こすアポトーシスの経路は内在性である。</p> <p>・ZnO は RAW264.7 細胞で、骨髓由来マクロファージで p47phox NADPH オキシダーゼ依存性が酸化物が引き起こすのと同様の、DNA 鎖破損及び DNA の酸化的ダメージをもたらした。</p> <p>・p47phox 又は酸化体応答性転写因子 Nrf2 欠損マウスの骨髓由来マクロファージにおいては、ZnO による細胞死は起こらなかった。</p> <p>・ZnO 粒子はマクロファージにおいて p47phox NADPH 酸化体が仲介する活性酸素生成を引き起こすが、これはカスパーゼ-9/-3 の仲介するアポトーシスに必須ではない。</p> <p>・ZnO による細胞死は NADPH 酸化体及び Nrf2 に依存的であるが、様々な経路によって起こった。</p>

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/ 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	Tina Buerki-Thurnherr, Lisong Xiao, Liliane Diener Osman Arslan, Cordula Hirsch, Xenia Maeder-Kathrin Grieder, Bruno Wampfler, Sanjay Mathur, Peter Wick, & Harald F. Krug/ Nanotoxicology, June 2013; 7(4):402-416	In vitro mechanistic study towards a better understanding of ZnO nanoparticle toxicity (酸化亜鉛ナノ粒子毒性をより理解するための in vitro な反応機構研究)	<p>■対象物質 酸化亜鉛 ・ Zn0-1 入手元 IBU-tec advanced materials AG 直径 15.5nm advan・ Zn0-2 (Zn0-1 マンデル酸修飾) 18.3 nm 修飾) advan・ Zn0-3 (Zn0-1 シリカシェル及びメルカプトプロピルトリメトキシシラン修飾) 28.7 nm 及びメルカプト・ Zn0-4 (メトキシコート) 8 nm シリカコート) カプト試料調製法 純水に 1 mg/ml のナノ粒子を懸濁して 2 分間超音波破碎をした。酸化亜鉛粒子は試験直前に調製し、細胞培地で最終濃度に懸濁した後、即座に細胞に添加した。</p>	<p>■試験生物 ヒト白血病 T 細胞株 Jurkat A3</p> <p>■試験方法 細胞死アッセイ ミトコンドリア膜電位測定 DCF アッセイによる活性酸素測定 DHE アッセイによるスーパーオキシドの測定 細胞内の自由亜鉛イオンの測定 ICP-OES による亜鉛イオンの測定</p>	<p>・酸化亜鉛粒子は溶液中で強いアグロメレーションを示し、電荷も互いに反発するには不十分であった。</p> <p>・ Zn0-1 は時間及び濃度依存的にアポトーシスを誘導した。</p> <p>・ FADD アダプターを欠いた細胞や Casp8 を欠損した細胞に Zn0-1 を 15 時間暴露したところ、アポトーシスの減少や、アポトーシス/ネクロトーシス細胞の遅延などの目立った変化は見られなかった。またアンチアポトーシスタンパク質を過剰発現させた Jurkat Bcl-2 細胞においても Zn0-1 によるアポトーシスの誘導を減少させなかった。また Casp3 を阻害しても Zn0-1 により誘導される細胞死を減少させなかった。</p> <p>・ NAC スカベンジャーはラジカルではなく、活性酸素を生成しない他のアポトーシス経路を阻害しないが、Zn0-1 による細胞死は、NAC スカベンジャーによって効果的に阻害された。</p> <p>・ Zn0-1 を暴露した細胞では、Zn0-1 濃度に比例して蛍光染色が増強し、その染色は細胞質では比較的強く、zincosome とされる小胞構造で特に強く見られた。</p> <p>・ Zn0-1 に由来する亜鉛イオンは大量に細胞外へ放出されており、分解反応が主に細胞外で起こることが示された。</p> <p>・ ZnCl₂ は Zn0-1 と類似したアポトーシス細胞死の用量反応曲線を引き起こしたが、Zn0-1 はより低い濃度でも細胞死が認められ、細胞内における亜鉛イオンの主要な放出は亜鉛ナノ粒子の取り込みに起因しないことが示唆された。</p> <p>・ Zn0-2、Zn0-3、Zn0-4 においても Zn0-1 のようなアポトーシスによる細胞死を誘導したが、Zn0-2 の毒性は Zn0-1 よりやや弱く、Zn0-3 及び Zn0-4 の引き起こした細胞死数ははるかに少なかった。各亜鉛イオンの溶解度は異なり、試験のエンドポイントにおける亜鉛の遊離数は Zn0-1 で 15 mg/L、Zn0-2、Zn0-3、Zn0-4 はそれぞれ 11、8、4 mg/L であった。亜鉛イオンキレート剤の DTPA の添加はアポトーシスの誘導を減少させ、同じく亜鉛イオンキレート剤の TPEN により細胞内の必須亜鉛イオンを可燃に除去するとアポトーシスは起こらなかった。</p>	酸化亜鉛による Jurkat 細胞の細胞死は、大量の亜鉛イオンが細胞外に放出されることを含めたイオン性の効果であり、亜鉛イオンは、急速に細胞に取り込まれ、活性酸素の生成とは独立したカスパーゼ依存の代替的アポトーシス経路を誘導することが証明された。本研究では酸化亜鉛ナノ粒子の分解と毒性影響を軽減する新しいコーティングの方法も明らかにした。

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/ 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	Anke-Gabriele Lenz, Erwin Karg, Ellen Brendel, Helga Hinze-Heyn, Konrad L. Maier, Oliver Eickelberg, Tobias Stoeger, and Otmar Schmid/ BioMed Research International Volume 2013, Article ID 652632	Inflammatory and Oxidative Stress Responses of an Alveolar Epithelial Cell Line to Airborne Zinc Oxide Nanoparticles at the Air-Liquid Interface: A Comparison with Submerged Cell-Culture Conditions (気相液相界面において空気伝達された酸化亜鉛ナノ粒子が肺胞上皮細胞株にもたらす炎症反応及び酸化ストレス反応: 従来の浸水型細胞培養との比較)	<p>■対象物質 酸化亜鉛ナノ粒子 入手元 Alfa Aesar 直径 24-71 nm</p> <p>■試料調製法 師範のベンチュリ型ドライパウダー分散機によってエアロゾル化した。投与は気相液相界面 (ALI) チャンバー内で実施した。</p> <p>■試験用量 0.7、2.5 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^2$</p>	<p>■試験生物 人肺胞上皮様細胞 A549</p> <p>■投与方法・期間 空気媒介 3時間</p> <p>■試験方法 定量的 RT-PCR</p>	<p>■粒子の大きさと分散 細胞培地に懸濁した酸化亜鉛ナノ粒子はよりアグロメレート形成しやすくなるため、ALI 条件下の暴露よりも大きな粒子となる傾向にあった。</p> <p>■生物学的エンドポイント 酸化亜鉛ナノ粒子の炎症促進性マーカー (IL-8, IL-6, 及び GM-CSF の mRNA 遺伝子発現) における LOELs は、浸水条件下よりも ALI 条件下においてより低い値が得られたが、酸化ストレスマーカー (HMOX1, SOD-2, 及び GCS) に顕著な反応は見られなかった。 従来の浸水で行ったデータは、ALI 条件下のデータに比べて誤ったネガティブデータをもたらしていた可能性がある。</p>	酸化亜鉛ナノ粒子の投与は細胞生存率に影響を与えず、酸化ストレスマーカーの転写レベルにも有意な影響を示さなかった。しかし炎症促進性マーカーの転写レベルは ALI 条件下で有意に上昇が見られた。本試験の結果から、ALI 細胞培養システムを用いた in vitro のナノ粒子毒性スクリーニングは、浸水細胞培養によるスクリーニングに比べて、誤ったネガティブな結果を低減する可能性がある。しかしそのデータベースは現在のところまだ少ない。

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/ 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	TAYLER A. JARVIS, ROBERT J. MILLER, HUNTER S. LENIHAN, and GRETCHEN K. BIELMYER/ Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 32, No. 6, pp. 1264- 1269, 2013	TOXICITY OF ZnO NANOPARTICLES TO THE COPEPOD ACARTIA TONSA, EXPOSED THROUGH A PHYTOPLANKTON DIET (植物プランクト ンの食餌を通じて 酸化亜鉛ナノ粒子 を暴露したカイシ ア類 ACARTIA TONSA の毒性)	<p>■対象物質 酸化亜鉛ナノ粒子</p> <p>■試料調製法 10mgのZnOナノ粒子を 1mLの合成塩水に懸濁し た溶液を60秒超音波破 砕し、ボルテックスで短 く攪拌した後、10mg/L となるように30ppt合成 海水で希釈した。</p> <p>■試験用量 10、100、500及び100 μg/L(亜鉛濃度 10、99、 168及び263 μg/L)</p>	<p>■試験生物 カイシア類 <i>A. tonsa</i></p> <p>■投与方法・期間 珪藻 <i>Thalassiosira</i> <i>weissflogii</i> を通じた 食餌暴露・7日間</p> <p>■試験方法 生存率測定 金属分析</p>	<ul style="list-style-type: none"> ・Zn濃度 160 μg/L 及び 263 μg/L の藻類は、暴露3日目に明らかに生存率が低下した。 ・暴露期間終了時、99 μg/L、168 μg/L 及び 263 μg/L の Zn を暴露した藻類の生存率は明らかに低下した。 ・藻類における NOEL は亜鉛 10 μg/L、LOEC は 99 μg/L、EC20 は 70 μg/L であった。 ・藻類における亜鉛の蓄積は投与用量に依存的に増加し、最高投与用量においては対照の2倍の亜鉛が蓄積していた。 ・亜鉛の大半は細胞壁画分に局在し、対照群において乾燥重量で 0.38 fg Zn/cell、最高投与用量群において 16 fg Zn/cell であった。 ・EDTA 洗浄後に細胞から遊離した亜鉛は、対照群において 1 fg Zn/cell、最高投与用量群において 3.5 fg Zn/cell であった。 ・最高投与用量群 (263 μg/L) の亜鉛濃度は増加しており、オルガネラ、細胞質及び小胞体画分において、それぞれ対照の 3.7、3.2、1.8 倍となっていた。 ・カイシア類の生存率は、食餌により摂取した ZnO の暴露量増加に従い減少した。 ・最高投与用量 (263 μg/L 亜鉛) において、3日目及び7日目の生存率は、それぞれ 21%及び 52%であった。 ・カイシア類の生存率における EC20 は、3日目及び7日目でそれぞれ 70 μg/L 及び 99 μg/L であった。3日目及び7日目の NOEL はそれぞれ 10 μg/L 及び 99 μg/L、LOEC はそれぞれ 99 μg/L 及び 168 μg/L であった。 ・最高投与用量においてのみカイシア類の繁殖力の低下が見られた。7日間の暴露後には 50%まで低下し、対照群における平均的な繁殖力は 24 幼生/雌であったが、暴露後は 12 幼生/雌となった。 ・カイシア類の繁殖率における亜鉛の EC20 は 143 μg/L、NOEC は 168 μg/L、LOEC は 263 μg/L であった。 	<ul style="list-style-type: none"> ・ <i>T. weissiosira</i> の成長率は ZnO の投与用量依存的に減少し、20%有効濃度 (EC20) は 70 μg/L、最低有効濃度 (LOEC) は 99 μg/L であった。 ・珪藻には投与用量依存的に亜鉛が蓄積し、亜鉛の大半は細胞壁画分に分割されていた。 ・ZnO を暴露した珪藻を摂取したカイシアの生存率と繁殖率は減少した。 ・カイシアにおける生存率と繁殖率の EC20 は、珪藻を暴露した培地中の亜鉛濃度でそれぞれ 112 μg/L (乾燥重量 13 μg/g)、143 μg/L (16 μg/g) であった。LOEC はそれぞれ 168 μg/L (17 μg/g)、263 μg/L (21 μg/g) であった。 ・金属汚染の栄養移行は、海のプランクトン集団内の酸化金属ナノマテリアルと関連があり、個体数の減少を招き生態系に影響を与える。

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/ 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	Maria Luisa Fernández-Cruz, Tobias Lammel, Mona Connolly, Estefania Conde, Ana Isabel Barrado, Sylvain Derick, Yolanda Perez, Marta Fernandez, Christophe Furger & Jose Maria Navas/ Nanotoxicology, August 2013; 7(5):935-952	Comparative cytotoxicity induced by bulk and nanoparticulated ZnO in the fish and human hepatoma cell lines PLHC-1 and Hep G2 (魚及びヒトの肝細胞癌細胞株 PLH-1 及び Hep G2 においてバルク及びナノ粒子化した酸化亜鉛によって引き起こされる細胞毒性の比較)	■対象物質 酸化亜鉛ナノ粒子 入手元 Sigma Aidrich、Tecnan ■試験用量 0.78-100 $\mu\text{g/mL}$	■試験生物 魚肝細胞がん PLHC-1 ヒト肝細胞がん Hep G2 H 投与期間 24 時間 ■試験方法 透過型電子顕微鏡観察 動的光散乱法 プラズママスペクトロメトリー MTT アッセイ NRU アッセイ LDH アッセイ ROS アッセイ	<ul style="list-style-type: none"> 酸化亜鉛ナノ粒子の毒性効果は、ナノ粒子のサイズや形状に明確な相関は見られず、むしろ不均質性に依存した。 二酸化亜鉛ナノ粒子は培地中で巨大な凝集を形成し、魚の細胞において毒性への寄与が見られた。一方ヒトの細胞において見られた毒性効果は、主に溶解している二酸化亜鉛溶液に起因しているようであった。 MTT アッセイでは双方の株細胞において高い感受性を示したが、DNA の変性を元とした毒性の測定テストである LUCS テストでは Hep G2 細胞がより高い感受性を持つことが判明した。このことから、ヒトは魚よりも高い感受性を持つことが明らかになった。 酸化亜鉛による細胞毒性では活性酸素の生成ではなく、ミトコンドリアや DNA レベルにおいての細胞内損傷が主な要素である。 	酸化亜鉛ナノ粒子は巨大な凝集を形成した。魚の細胞において、酸化亜鉛の凝集は事実上の細胞毒性の影響の一因となったが、一方ヒト細胞における毒性は酸化亜鉛の溶解液から主に検出された。活性酸素の生成は細胞毒性に影響しなかった。ナノ粒子の濃度の測定はその毒性メカニズムの理解のために重要である。

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/ 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	Sonia Manzo, Maria Lucia Miglietta, Gabriella Rametta, Silvia Buono, Girolamo Di Francia / J Hazardous Materials 254-255:1-9 (2013)	Embryotoxicity and spermiotoxicity of nanosized ZnO for mediteranean sea urchin Paracentrotus lividus (地中海ウニ Paracentrotus lividus に関するナノサイズのZnOの胚毒性及び精子毒性)	<p>■対象物質</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ZnO ナノ粒子 (入手先: Sigma-Aldrich S.r.l.) ・ZnCl₂ (入手先: Sigma-Aldrich S.r.l.) ・ZnO バルク粉末 (入手先: Galcno S.r.l., Italy) <p>サイズ/表面積</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ZnO ナノ粒子 ・ZnO バルク粉末 <p>人工海水に懸濁した場合のサイズの記載有</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ZnO ナノ粒子 ・ZnO バルク <p>分析方法</p> <ul style="list-style-type: none"> ・粒子径: 動的光散乱法 ・表面積: Brunauer, Emmett and Teller (BET) 法 <p>r 試験用量</p> <p>Zn 濃度として、1, 3, 5, 7, 10, 15, 30, 50r (B 溶媒・調製</p> <p>溶媒: 人工海水 (pH8)</p> <p>調製: 100mg/L 溶液を 30 分間超音波処理し保存、試験使用時に希釈液をボルテックスする。</p>	<p>■試験生物</p> <p>地中海ウニ Paracentrotus lividus</p> <p>■投与方法</p> <ul style="list-style-type: none"> ・胚毒性試験: 培養液に各濃度の対象物質を添加した。 ・精子毒性試験: 取得した精子に各濃度の対象物質を添加した。 <p>■試験方法</p> <ul style="list-style-type: none"> ・胚毒性試験: 受精卵に対象物質を添加し、培養 (18°C、48~50 時間) 後に発生した幼生の発達異常を観察 ・精子毒性試験: 精子に対象物質を添加し、室温に 30 分置いた後卵子に加え、培養 (18°C、48~50 時間) 後の受精率の測定及び発生した幼生の発達異常を評価 <p>* 幼生の発達異常の分類</p> <p>N: 正常 R: 遅延 (大きさが小さい) P1: 奇形 P2: 発達の幼生前停止</p>	<p>■試験溶液の特徴</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ZnO ナノ粒子及び ZnO バルクの高濃度溶液 (100mg/ml) は、時間とともにアグリゲーションして沈降し、2 時間後には濃度が 30%減少。低濃度 (10mg/ml) での粒子の沈降速度は比較的遅かった。 <p>■胚毒性</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ZnCl₂ 及び ZnO バルクでは、5 ルク以上で 100%の影響が認められたが、ZnO ナノ粒子では、1 ノ粒において 100%の影響が認められた。 ・発生に対する影響は、ZnCl₂ の添加において、低濃度 (1~3 添加ではすべての種類の発達異常 (R/P1/P2) が認められ、5~15 では P1/P2 のみ (P1 が 80%) が観察され、高濃度 (30 及び 500) では、P2 の異常が 80%を超えた。 ・発生に対する影響は、ZnO ナノ粒子の添加において、すべての濃度で P1 及び P2 のみの異常が認められた。低濃度 (1~5 みの異では P1 が 85%を占めたが、7~15 めたでは P2 が優性であり、30 及び 50 性ではすべての個体が P2 であった。 ・発生に対する影響は、ZnO バルクの添加において、1~10 クの範囲では濃度の増加に伴い P1 の発生率が上昇し 10 生率で 100%となった。一方、P2 の発生は、3 発生付近の濃度において正規分布様の発生率を示したが、15 の濃以上の濃度で急速に増加し 100%となった。 ・発生に対する影響に関し、各対象物質の添加濃度と P1 発生率との関係を比較した結果、ZnCl₂ と ZnO バルクは類似した傾向を示したが、ZnO ナノ粒子は異なっていた。 ・発生に対する影響に関し、各対象物質の添加濃度と P2 発生率との関係を比較した結果、全体的な傾向は類似しており、添加濃度の上昇と共に P2 発生率が増加した。 <p>■精子毒性</p> <ul style="list-style-type: none"> ・精子への各対象物質の添加による受精率への影響はいずれの添加濃度においても 25%以下であった。毒性の強さは、ZnCl₂>ZnO バルク>ZnO ナノ粒子の順。 ・発生に及ぼす影響は、ZnO ナノ粒子及び ZnO バルクの添加において劇的であり、すべての添加濃度で、P2 の発生率は 100%だった。 ・発生に及ぼす影響は、ZnCl₂ の添加では、1 添加の濃度で P1 が 100%、5~150%の濃度で P2 が 80%以上、30 及び 50、での濃度では突然の変化が起こり、75%以上が正常個体であった。 	<ul style="list-style-type: none"> ・ Paracentrotus lividus の胚に対する毒性は、ZnO ナノ粒子が 1 ノ粒子の濃度で最も強い有害作用を示した。 ・ ZnO ナノ粒子は、低濃度 (≦5 ノ粒) では主に骨格の変化 (P1) を引き起こし、高濃度 (≧7 引き) では、発達を停止させた。 ・ 3 種の対象物質の発達異常の頻度は類似していなかった。 ・ ZnO の毒性は、亜鉛イオンのみならず、粒子/アグリゲートと標的生物、及び/又は海水との何らかの表面相互作用に関連があるものと思われる。

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/ 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	Huanliang Liua, Danfeng Yanga, Honglian Yanga, Huashan Zhanga, Wei Zhanga, YanJun Fanga, Zhiqing Lina, Lei Tiana, Bencheng Lina, Jun Yana, Zhuge Xi/ Journal of Hazardous Materials 248-249 (2013) 478-486	Comparative study of respiratory tract immune toxicity induced by three sterilisation nanoparticles: Silver, zinc oxide and titanium dioxide (3種のナノ粒子—銀、酸化亜鉛、及び二酸化チタン—によりもたらされる気道の免疫毒性の比較試験)	<p>■対象物質 (入手元) 二酸化亜鉛ナノ粒子 (Shenzhen Nanguo) 粒子径 19.61nm Na 銀ナノ粒子 (Sigma-Aldrich) 粒子径 52.25nm 二酸化チタンナノ粒子 (Sigma-Aldrich) 粒子径 22.82nm Aldric 試験用量 ラット 3.5 mg/kg 体重 17.5 mg/kg 体重</p> <p>細胞 5、10、25、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$</p>	<p>■試験生物 Wistar ラット 肺胞マクロファージ (AMs)</p> <p>■投与方法・期間 ラット 気管内点滴 2日に1回、5週間</p> <p>細胞 24時間</p> <p>■試験方法 in vivo BALF中の酸化損傷の検出 BALF中のサイトカイン測定</p> <p>in vitro WST-8 アッセイ LDH 測定 ニュートラルレッドアッセイ</p>	<p>■ユートラ中の酸化ストレスレベル GSH及びSODレベルは、全ての投与群で対照群よりも低かった。酸化亜鉛及び二酸化チタン粒子のSOD活性は投与用量依存的に上昇していた。MDA及びNOはいずれの粒子においても全ての投与群において対照群より上昇していた。二酸化チタンナノ粒子に比べ、銀ナノ粒子及び二酸化亜鉛ナノ粒子はより酸化ストレスを引き起こしていた。いずれの粒中のサイトカインレベル 二酸化チタンナノ粒子及び銀ナノ粒子の低用量投与群を除き、他の投与群においてはTMF-αの濃度が有意に上昇していた。この反応は投与用量依存的に見られた。二酸化チタンナノ粒子を除く全ての投与群でMIP-2濃度は有意に上昇していた。銀ナノ粒子投与群ではIL-6が有意に上昇していた。 酸化ストレスのファクターの結果と同様、二酸化チタンナノ粒子に比べ、他のナノ粒子はより強い毒性が見られた。 化学時間暴露後のAMsにおける形態変化 AMsにおけるファゴサイトーシスは二酸化チタンナノ粒子において多く見られた。 おけるフにおけるナノ粒子の細胞毒性 ナノ粒子で処理した細胞は、投与用量依存的に生存率が減少していた。同じ投与用量で比較をしたところ、最も細胞生存率を低下させたのは酸化亜鉛ナノ粒子であった。 細胞培地中のLDHレベルは投与用量依存的に増加していた。 ベルは投のファゴサイトーシスに対するナノ粒子の影響 投与用量が10 $\mu\text{g}/\text{mL}$の時、いずれのナノ粒子も対照群に比べて有意にファゴサイトーシスを減少させた。25-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$の投与では、酸化亜鉛ナノ粒子が特に大きくファゴサイトーシスを減少させた。</p>	<p>・それぞれのナノ粒子により現れる影響は異なり、化学成分が毒性の違いに関与していた。また投与用量と暴露時間も同様に関与が見られた。</p> <p>・ナノマテリアルの表面反応性は、その表面積の広さから反応が何倍も上昇した。しかし、異なる化学成分のナノマテリアルは多様な物理的及び化学的特性を備えていた。</p> <p>・これらはまたin vivoにおいて異なる代謝経路を持ち、生体の反応程度の機序となる経路もまた異なっていた。</p> <p>・よって、異なるナノマテリアルによる毒性メカニズムもまた異なることが示唆された。</p>

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/ 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	Soile Tuomela, Reija Autio, Tina Buerki-Thurnherr, Osman Arslan, Andrea Kunzmann, Britta Andersson-Willman, Peter Wick, Sanjay Mathur, Annika Scheynius, Harald F. Krug, Bengt Fadeel, Riitta Laheesmaa/ PLOS ONE July 2013 Volume 8 Issue 7	Gene Expression Profiling of Immune-Competent Human Cells Exposed to Engineered Zinc Oxide or Titanium Dioxide Nanoparticles (酸化亜鉛若しくは二酸化チタンナノ粒子を暴露したヒト免疫能細胞の遺伝子発現解析)	■対象物質 ・酸化亜鉛 入手元 BU-tec advanced materials AG 各粒子名称 Zn0-1 (Zn0-2: マンデル酸修飾 Zn0-3: メルカプトプロ ピル 3 トリメトキシシ ラン Zn0-4: メトキシル修飾 Zn0-5: ジエチレングリ コール修飾 Zn0-6: マンデル酸修飾 Zn0-7: グルコン酸修飾 Zn0-8: クエン酸修飾 Zn0-9: 葉酸修飾 ・二酸化チタン 入手元 Evonik Degussa v 調製方法 超純水でストック溶液 を作成し、超音波で破 砕。酸化亜鉛は分解しや すいので、使用直前に調 製した。 純対照 リポ多糖 (LPS)	■試験生物 Jurkat A3 (ヒト白血病 T 細胞株) HMDM (ヒト単球由来マ クロファージ) MDDC (単球由来樹状細 胞) ■投与方法 6 時間若しくは 24 時間 ■試験方法 ・細胞生存性測定 ・溶解度測定(フレーム 原子吸光分析) ・マイクロアレイ解析 RT-PCR	■毒性及び溶解性 ・最も毒性が強かったのは Zn0-5、最も低かったのは Zn0-9。 ・溶解度が最少なのは Zn0-1 (0.81)、最大なのは Zn0-7 (0.99) ・死細胞数と遊離亜鉛イオンに相関は見られず、合成と表面リ ガンドのタイプに相関していた。 ■二酸化チタン及び酸化亜鉛ナノ粒子の HMDM、MDDC 及び Jurkat 細胞の転写に与える影響 ・いずれの細胞においても、二酸化チタンナノ粒子は毒性を示 さず、一方 Zn0-1 は投与量依存的細胞毒性を示した。 ・複製時の平均的な遺伝子発現変化の大きさに基づく解析で は、二酸化チタンナノ粒子がよく組み込まれていることを示 した。 ・、いずれの細胞のいずれの時間においても、二酸化チタン ナノ粒子及び 1 μg/mL Zn0-1 投与後の遺伝子発現に変化はな かった。 ■投与後の遺伝、MDDC 及び Jurkat の Zn0-1 に対する転写応答 の比較 ・3 種の細胞において、Zn0-1 10 μg/mL 投与によって制御さ れた遺伝子の大半はメタロチオネインに関連していた。 ・Zn0-1 によって制御されたプローブは、MDDC で 13、HMDM で 3161、Jurkat で 1101 発見 ・キネティクスは細胞の種類に依存。 ・Zn0-1 で誘導される変化は三種の細胞で共通しているが、遺 伝子発現変化はそれぞれの細胞タイプに特異的であった。 ・各細胞の Zn0-1 への感度の違いは、亜鉛排出タンパク質を コードする遺伝子の発現の違いによる。 ■感度の違い暴露の影響を受けた細胞内経路のバイオインフ ォマティクス解析 ・遺伝子オントロジー解析では、HMDM と Jurkat 細胞の 6 時 間及び 24 時間のタイムポイントで 26 の生物学的プロセスが 含まれていた。 ・トップ生物学的プロセスは、HMDM は「免疫応答」、Jurkat は「細胞周期調節」と機能的に異なっていた。 「細胞周期調由来遺伝子発現の上方制御 ・HMDM と Jurkat 細胞において、グルコシルコリド受容体 である NR3C1 のターゲット遺伝子のうち 19 が制御されてい た。 ・Zn0-1 暴露 6 時間後の Jurkat で最も下方制御されているの は、細胞の増殖と成長、及びアポトーシスを制御する MYC で あった。・HMDM と Jurkat において p53 ターゲット遺伝子が制 御されていた。	・10 μg/mL を投与した HMDM では 2703 の遺伝子発現に 変化が見られたが、MDDC は 12 遺伝子のみであった。 Jurkat では 980 遺伝子の発 現に変化が見られた。 ・全ての細胞でメタロチオ ネインの遺伝子が発現上昇 していた。 ・酸化亜鉛ナノ粒子の溶解 性が細胞内の応答に大きな 影響を与え、酸化亜鉛ナノ 粒子を修飾したリガンドが 亜鉛イオンの到達を制御し ていた。 ・本試験によって、酸化亜 鉛ナノ粒子により引き起こ される毒性の転写マーカー が数多く判明した ・トランスクリプトミクス とバイオインフォマティク スを組み合わせたアプロー チがナノ粒子の応答を評価 するのに有効である。

11) ナノクレイ

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/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	Sinéad Lordan, James E. Kennedy and Clement L. Higginbotham/ J. Appl. Toxicol. 2011; 31: 27-35	Cytotoxic effects induced by unmodified and organically modified nanoclays in the human hepatic HepG2 cell line (無定形かつ有機的に改造されたナノクレイを暴露したヒト肝臓 HepG2 細胞株にもたらされる細胞毒性の影響)	<p>■対象物質</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ナノクレイ Cloisite Na+ ・有機的改造ナノクレイ Cloisite 93A <p>入手元 Southern Clay Products Inc.</p> <p>■試料調製法</p> <p>ナノクレイ溶液は 24 時間空気乾燥で滅菌した。</p> <p>■試験用量</p> <p>1-1000 $\mu\text{g/mL}$</p>	<p>■試験生物</p> <p>ヒト肝臓 HepG2 細胞</p> <p>■投与方法</p> <p>24 時間</p> <p>■試験方法</p> <p>MTT アッセイ (細胞毒性)</p> <p>LDH leakage</p> <p>DCFH-DA 試験 (細胞内活性酸素測定)</p> <p>Caspase-Glo 3/7 アッセイ</p> <p>光学顕微鏡解析</p>	<p>■Cloisite Na+と Cloisite 93A の特性</p> <p>走査型電子顕微鏡による懸濁液の観察の結果、Cloisite Na+と Cloisite 93A のペレットサイズは異なっていた。Cloisite Na+は主に~ 30 から $100 \mu\text{m}$ の大きな構造が見られ、一方 Cloisite 93A は~ 3 から $35 \mu\text{m}$ の小さな構造物が分布していた。</p> <p>■ナノクレイの毒性</p> <p>2 種のナノクレイは細胞生存率に対してどちらも濃度依存的な減少をもたらした。最高投与用量 ($100 \mu\text{g/mL}$) において、Cloisite Na+及び Cloisite 93A のもたらす生存性の減少率はそれぞれ 23%及び 37%であった。</p> <p>■DH 放出</p> <p>Cloisite Na+はわずかではあるが有意な LDH 放出量の増加をもたらした。しかし $1000 \mu\text{g/mL}$ で処理した細胞の LDH 放出量は対照細胞を下回っていた。一方 Cloisite 93A のもたらす LDH 放出量増加はより明確な変化を示した。</p> <p>■細胞内活性酸素生成</p> <p>$10 \mu\text{g/mL}$ 以下の低用量の Cloisite Na+は活性酸素生成を増加させなかったが、$50 \mu\text{g/mL}$ 以上では有意な増加が見られ、$500 \mu\text{g/mL}$ の暴露では対照群の 2 倍以上を示した。Cloisite 93A による細胞内活性酸素生成への影響は小さかった。</p> <p>■カスパーゼ 3/7 活性</p> <p>どちらのナノクレイもカスパーゼ 3/7 活性の増加を検出することはできず、カスパーゼ活性による細胞死は誘導しないことが示された。</p> <p>■培地内のナノクレイの分布</p> <p>$50 \mu\text{g/mL}$ 以下のナノクレイは培地中で分散しているが、$100 \mu\text{g/mL}$ は互いに合併し、大きな束状となって細胞を覆い、そのため光学顕微鏡では細胞を検出することができなかった。</p>	<ul style="list-style-type: none"> ・ナノクレイを 24 時間暴露した細胞の生存性は有意に低下した。Cloisite Na+は細胞膜の損傷と共に細胞内の活性酸素発生をもたらしたが、Cloisite 93A から誘導された細胞死は活性酸素の生成と無関係であった。 ・どちらのナノクレイもカスパーゼ 3/7 の活性を引き起こさなかった。更に、細胞培地中でナノクレイの凝集は異なっており、そのことが毒性のメカニズムの表れ方に影響を与えていた。 ・本試験の結果より、ナノクレイは高い毒性があることが示されたので、ヒトの健康にリスクをもたらす可能性がある。

12) ナノセルロース

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/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	Tian Xia, Raymond F. Hamilton Jr., James C. Bonner, Edward D. Crandall, Alison Elder, Farnoosh Fazlollahi, Teri A. Girtsman, Kwang Kim, Somenath Mitra, Susana A. Ntim, Galya Orr, Mani Tagmount, Alexaa J. Taylor, Donatello Telesca, Ana Tolic, Christopher D. Vulpe, Andrea J. Walker, Xiang Wang, Frank A. Witzmann, Nianguang Wu, Yumei Xie, Jeffery I. Zink, Andre Nel, and Andrij Holian / Environmental Health Perspectives 121:683-690 (2013)	Interlaboratory evaluation of in vitro cytotoxicity and inflammatory responses to engineered nanomaterials: The NIEHS nano GO consortium (加工ナノ材料に対するインビトロ細胞毒性及び炎症反応の研究所間評価: 米国環境科学研究所ナノ・ゴー・コンソーシアム)	<p>■対象物質</p> <p>ナノ粒子 (入手先記載あり)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ZnO ・TiO₂ dioxide (TiO₂-P25) ・TiO₂ anatase (TiO₂-A) ・TiO₂ nanobelts (TiO₂-NBs) ・original MWCNT (O-MWCNT) ・purified MWCNT (P-MWCNT) ・carboxylated MWCNT (F-MWCNT) <p>・サイズ (TEM 測定、DLS 測定/水、DLS 測定/培地*の記載有)</p> <p>・ゼータ電位 (Zetasizer 測定/水中、Zetasizer 測定/培地中の記載)</p> <p>・表面積 (BET 測定の記載有)</p> <p>■試験用量</p> <p>10, 25, 50, 100 μg/ml</p> <p>■溶媒・調製</p> <p>溶媒:</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ストック溶液: 5mg/ml <p>エンドトキシン除去滅菌水</p> <ul style="list-style-type: none"> ・試験: 培養液 <p>調製: 使用時、ストック溶液をボルテックス及び超音波処理し、希釈して使用</p>	<p>■試験生物</p> <ul style="list-style-type: none"> ・RLE-6TN ラット肺胞 II 型上皮細胞株 ・THP-1 ヒト急性単球性白血病細胞株 ・BEAS-2B 気管支上皮細胞株 <p>■投与方法</p> <p>培養液への添加</p> <p>■試験方法</p> <ul style="list-style-type: none"> ・細胞毒性試験: MTS アッセイ、LDH アッセイ ・THP-1 細胞を用いた IL-1β 産生測定: ELISA 法 <p>*8 研究所において、二相の試験が行われた。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・第一相試験: 各研究所の既存のプロトコールによる試験 ・第二相試験: 第一相試験での技術上の問題を特定し解決した後に設定したプロトコールによる試験 	<p>■細胞毒性試験結果—MTS アッセイ</p> <ul style="list-style-type: none"> ・MTS アッセイでの第二相試験の結果は、第一相試験の結果と比較して一貫性が向上し、また第一相試験より平均誤差が 30%、測定誤差が 40% 縮小した。 ・THP-1 細胞株を用いた試験では、ZnO が最も高い細胞毒性を示し、続いて TiO₂-NB が毒性を示したが、その他の対象物質には毒性が認められなかった。 ・BEAS-2B 細胞株及び RLE-6TN 細胞に対するすべての研究所のデータを合わせた結果においても、ZnO の明確な細胞毒性が示された。 <p>■細胞毒性試験結果—LDH アッセイ</p> <ul style="list-style-type: none"> ・第二相試験では、第一相試験と比較し、研究所間の結果がより一致した。 ・各研究所のデータを合わせた THP-1 細胞株の結果は、MTS アッセイの結果と同様のパターンを示し、ZnO 及び TiO₂-NB のみが細胞毒性を示した。 <p>■IL-1β 産生</p> <ul style="list-style-type: none"> ・IL-1β 産生試験においても、プロトコールの改良により、第二相試験では研究所間のデータの一致が認められ、平均誤差が 74%、測定誤差が 83% 縮小した。 ・各研究所のデータを合わせた第二相試験の結果では、TiO₂-NB が有意に IL-1β の産生を引き起こした。全体のデータでは有意差はないが、6 研究所のデータにおいて、O-MWCNT が有意に IL-1β の産生を引き起こした。 ・最も高い細胞毒性を示した ZnO では IL-1β の産生は認められなかった。 	<ul style="list-style-type: none"> ・ZnO は、試験を行ったすべての細胞株に対し細胞毒性を示したが、IL-1β の産生は誘導しなかった。 ・TiO₂ では、ナノベルト型が細胞毒性を示し、有意に THP-1 細胞からの IL-1β 産生を引き起こした。 ・MWCNT は、細胞毒性を示さなかったが、O-MWCNT が低いレベルでの IL-1β 産生を引き起こした。 ・加工ナノ材料を正確に評価するためには、偽陰性を避けるために、関連する複数の細胞種を用いた試験を実施す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/試料調製法/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	Karolina Kowalska-Ludwicka, Jaroslaw Cala, Bartlomiej Grobelski, Dominik Sygut, Dorota Jesionek-Kupnicka, Marek Kolodziejczyk, Stanislaw Bielecki, Zbigniew Pasieka/ Arch Med Sci 2013; 9, 3: 527-534	Modified bacterial cellulose tubes for regeneration of damaged peripheral nerves (損傷した末梢神経の再生のためのバクテリアセルロースチューブの改造)	<p>■対象物質 バクテリアセルロース薄膜 厚さ 10-15 nm</p> <p>■試料調製法 20% NaOH 溶液、若しくは水で 24 時間リンスしてセルロース繊維を除去した。マーセル化の後、水道水で洗浄し、必要な場合は切り出した。pH7.0 に調製した滅菌水に入れオートクレーブ滅菌した。</p>	<p>■試験生物 Wistar rat</p> <p>■投与期間 30、60、90、180 日</p> <p>■試験方法 モーター回復度評価 試験 組織学的評価 S-100 染色</p>	<p>・モーターの回復は、対照群及びセルロース投与群双方において、経時的な回復が見られた。術後 180 日において、投与群は 50%のマウスがスコア 4 と判定され、対照群は 16.7%がスコア 4 と判定されたが、平均値に有意な差は見られなかった。</p> <p>・セルロースを移植すると、結合組織の薄層において正常な増殖と、新たな血管の形成が見られた。</p> <p>セルロースチューブの場合、神経組織の表面において、投与群は顆粒化部位の厚さに変化が見られた。移植後 180 日には移植片は線維状に変化した。</p> <p>・HE 染色の結果、対照群の 86.67%が結合組織の異常増殖と神経構造の破壊を起こしていることが明らかとなり、一方セルロース群では 35%に過ぎなかった。</p>	<p>・結合組織の異常増殖と、神経構造の破壊が対照群の 86.67%で見られたのに対し、セルロース投与群は 35%に過ぎなかった。造管術は結合組織の過剰な増殖を防ぎ、傷ついた組織の浸透から隔離した。</p> <p>・セルロース投与群は神経栄養因子の畜性の証とされるオートカニバリズムが観察されたが、対照群においては見られなかった。</p> <p>モーターの回復に有意な違いは見られなかった。組織反応及び血管新生の感受性のレベルが非常に低いことから、移植の生物学的適合性が確認された。</p>
70	Lina FU, Ping Zhou, Shengmin Zhang, Guang Yang/ Materials Science and Engineering C33 (2013) 2995-3000	Evaluation of bacterial nanocellulose-based uniform wound dressing for large area skin transolantation (広範囲の皮膚移植のためのバクテリアセルロースに基づく均一な創傷ドレッシング材の評価)	<p>■対象物質 バクテリアナノセルロース (BNC)</p> <p>■試料調製法 BNC は 7 日間培養して作成し、0.1M NaOH 中で 30 分間煮沸消毒した。その後滅菌水でリンスし超純水で数回洗浄した後、超純水で 4°Cにおいて保管した。</p>	<p>■試験生物 NIH/3T3 細胞 C57BL/6 マウス (雄、6-8 週齢)</p> <p>■投与期間 7 日間</p> <p>■試験方法 in vitro 細胞毒性試験 細胞生存率試験 (MTT アッセイ) 組織学的観察</p>	<p>・BNC 表面のバクテリアが生息する微小環境が BNC の構造に影響を与えていた。細胞による評価試験の結果では、BNC フィルムは表面で培養される NIH/3T3 線維芽細胞の生存率において毒性や副作用を示さなかった。</p> <p>・BNC 上の NIH/3T3 細胞の形態から、BNC が接着及び増殖に適している事が示された。動物を用いた広範囲の皮膚移植実験では、BNC 投与群はより良い組織再生とより早い治癒をもたらした。</p>	<p>・in vitroにおける BNC の細胞毒性を NIH/3T3 細胞で評価したところ、毒性は低く、顕微鏡で観察したところ、NIH/3T3 細胞の増殖及び接着に問題は見られなかった。</p> <p>・組織学的観察の結果、対照群に比べて、BNC 投与群はより早く、より良い創傷効果を示し、炎症反応はより低かった。</p> <p>・本試験の結果から、BNC は上皮組織の創傷を効果的に促進させるということが示された。</p>

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/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	Laura Alexandrescu ・ Kristin Syverud ・ Antonietta Gatti ・ Gary Chinga-Carrasco /cellulose (2013) 20:1765-1775	Cytotoxicity tests of cellulose nanofibril-based structures (セルロースのナノ繊維から成る構造の細胞毒性試験)	<p>■対象物質 マイクロ繊維セルロース Eucalyptus pulp (TEMPO 処理あり及びなし) Pinus radiata fibers (TEMPO 処理あり及びなし)</p> <p>■試料調製法 密集した構造物はエバポレーションによって室温で乾燥させた。開口かつ多孔性の構造物は凍結乾燥した。</p> <p>■試験用量 直接的接触 5mm×5mm 間接的接触 6 cm² /mL</p>	<p>■試験生物 3T3-L1 線維芽細胞</p> <p>■投与方法・期間 接触・24 時間</p> <p>■試験方法 ・直接的接触試験 光学顕微鏡による形態観察 neural Red 試験 ・間接的接触試験 XTT アッセイ BrdU アッセイ</p>	<p>・電解放出解析 ホモジナイズ前に TEMPO 処理したサンプルはナノ繊維がより細かく見られた。凍結乾燥したサンプルは比較的多くの孔が観察され、空気乾燥サンプルに比べ強度はなく、コンパクト性に欠けていた。</p> <p>・直接的接触試験 構造物による接触の影響は細胞形態観察においては見られなかった。構造物上においても細胞の増力は観察された。PEI で架橋処理をした細胞においても、形態変化は見られず細胞活性が示されたことから、細胞毒性がないことが確認された。一方界面活性剤 CTAB で処理したサンプルは細胞に毒性を示し、死細胞数が増加したが、構造物上における細胞生育には目視では影響は見られなかった。</p> <p>・neural Red による定量的結果 neural Red を用いた細胞生存率の試験の結果、CTAB 処理したサンプルの細胞は損傷を負っていた。</p> <p>・間接的接触試験 XTT 試験の結果、CTAB を含むサンプルでは生存細胞数が減少していた。BrdU アッセイの結果、CTAB 処理したサンプル及び PEI 処理したサンプルの細胞増力の減少が観察されたが、CTAB 処理サンプルでより顕著に見られた。</p>	<p>・ナノ繊維は 3T3 細胞に急性毒性を示さなかった。試験中直接的及び間接的にナノ構造物と接触した 3T3 細胞は、細胞膜、細胞ミトコンドリア活性及び DNA 複製能に変化は見られなかった。界面活性剤の臭化セチルトリメチルアンモニウム (CTAB) でサンプル処理すると明らかな毒性が見られ、細胞の残存性、生存率、増殖に負の影響を与えた。</p> <p>・CTAB は抗菌剤なので、当然予測された結果であった。ポリエチレンミン (PEI) で架橋したサンプルは有意な細胞生存率の低下と、そこから示される DNA 複製の減少を示した。</p> <p>・本試験で使用した適切なセルロースナノ構造物は線維芽細胞に毒性を示さないと我々は結論した。木のパルプ繊維から成るナノ繊維から成るナノ構造物に重要なことは、再生医学や創傷の基盤として有望である。</p>

1 3) 金属ナノ粒子等比較

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/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	Tian Xia, Raymond F. Hamilton Jr., James C. Bonner, Edward D. Crandall, Alison Elder, Farnoosh Fazlollahi, Teri A. Girtsman, Kwang Kim, Somenath Mitra, Susana A. Ntim, Galya Orr, Mani Tagmount, Alexaa J. Taylor, Donatello Telesca, Ana Tolic, Christopher D. Vulpe, Andrea J. Walker, Xiang Wang, Frank A. Witzmann, Niangiang Wu, Yumei Xie, Jeffery I. Zink, Andre Nel, and Andrij Holian / Environmental Health Perspectives 121:683-690 (2013)	Interlaboratory evaluation of in vitro cytotoxicity and inflammatory responses to engineered nanomaterials: The NIEHS nano GO consortium (加工ナノマテリアルに対するインビトロ細胞毒性及び炎症反応の研究) 所間評価: 米国環境科学研究所ナノ・ゴ-コンソーシアム)	<p>■対象物質</p> <p>ナノ粒子(入手先記載あり)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・Zn0 ・TiO₂ dioxide (TiO₂-P25) ・TiO₂ anatase (TiO₂-A) ・TiO₂ nanobelts (TiO₂-NBs) ・original MWCNT (O-MWCNT) ・purified MWCNT (P-MWCNT) ・carboxylated MWCNT (F-MWCNT) <p>・サイズ (TEM 測定、DLS 測定/水、DLS 測定/培地*の記載有)</p> <p>・ゼータ電位 (Zetasizer 測定/水中、Zetasizer 測定/培地中の記載有)</p> <p>■試験用量</p> <p>10, 25, 50, 100 μg/ml</p> <p>■溶媒・調製</p> <p>溶媒:</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ストック溶液: 5mg/ml エンドトキシン除去滅菌水 <p>・試験: 培養液調製: 使用時、ストック溶液をボルテックス及び超音波処理し、希釈して使用</p>	<p>■試験生物</p> <ul style="list-style-type: none"> ・RLE-6TN ラット肺細胞 I1 型上皮細胞株 ・THP-1 ヒト急性単球性白血病細胞株 ・BEAS-2B 気管支上皮細胞株 <p>■投与方法</p> <p>培養液への添加</p> <p>■試験方法</p> <ul style="list-style-type: none"> ・細胞毒性試験: MTS アッセイ、LDH アッセイ ・THP-1 細胞を用いた IL-1β 産生測定: ELISA 法 <p>* 8 研究所において、二相の試験が行われた。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・第一相試験: 各研究所の既存のプロトコールによる試験 ・第二相試験: 第一相試験での技術上の問題を特定し解決した後に設定したプロトコールによる試験 	<p>■細胞毒性試験結果-MTS アッセイ</p> <ul style="list-style-type: none"> ・MTS アッセイでの第二相試験の結果は、第一相試験の結果と比較して一貫性が向上し、また第一相試験より平均誤差が 30%、測定誤差が 40% 縮小した。 ・THP-1 細胞株を用いた試験では、Zn0 が最も高い細胞毒性を示し、続いて TiO₂-NB が毒性を示したが、その他の対象物質には毒性が認められなかった。 ・BEAS-2B 細胞株及び RLE-6TN 細胞に対するすべての研究所のデータを合わせた結果においても、Zn0 の明確な細胞毒性が示された。 <p>■細胞毒性試験結果-LDH アッセイ</p> <ul style="list-style-type: none"> ・第二相試験では、第一相試験と比較し、研究所間の結果がより一致した。 ・各研究所のデータを合わせた THP-1 細胞株の結果は、MTS アッセイの結果と同様のパターンを示し、Zn0 及び TiO₂-NB のみが細胞毒性を示した。 <p>■IL-1β 産生</p> <ul style="list-style-type: none"> ・IL-1β 産生試験においても、プロトコールの改良により、第二相試験では研究所間のデータの一致が認められ、平均誤差が 74%、測定誤差が 83% 縮小した。 ・各研究所のデータを合わせた第二相試験の結果では、Ti2-NB が有意に IL-1β の産生を引き起こした。全体のデータでは有意差はないが、6 研究所のデータにおいて、O-MWCNT が有意に IL-1β の産生を引き起こした。 ・最も高い細胞毒性を示した Zn0 では IL-1β の産生は認められなかった。 	<ul style="list-style-type: none"> ・Zn0 は、試験を行ったすべての細胞株に対し細胞毒性を示したが、IL-1β の産生は誘導しなかった。 ・TiO₂ では、ナノベルト型が細胞毒性を示し、有意に THP-1 細胞からの IL-1β 産生を引き起こした。 ・MWCNT は、細胞毒性を示さなかったが、O-MWCNT が低いレベルでの IL-1β 産生を引き起こした。 ・加工ナノマテリアルを正確に評価するためには、偽陰性を避けるために、関連する複数の細胞種を用いた試験を実施す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/試料調製法/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	James C. Bonner, 1 Rona M. Silva, 2 Alexia J. Taylor, 1 Jared M. Brown, 3 Susana C. Hilderbrand, 3 Vincent Castranova, 4 Dale Porter, 4 Alison Elder, 5 Günter Oberdörster, 5 Jack R. Harkema, 6 Lori A. Bramble, 6 Terrance J. Kavanagh, 7 Dianne Botta, 7 Andre Nel, 8 and Kent E. Pinkerton	Interlaboratory Evaluation of Rodent Pulmonary Responses to Engineered Nanomaterials: The NIEHS Nano GO Consortium (工学的ナノマテリ アルに対するげっ 歯類の肺毒性の研 究室相互評価)	<p>■対象粒子 (入手元) 酸化チタンナノ粒子</p> <ul style="list-style-type: none"> 酸化チタン-P25: 金紅石 (P. Biswas ワシントン大学) 酸化チタン-A: 鋭錐石 (Evonik) 酸化チタン-NB: 鋭錐石ナノベルト (N. Wu ウェストバージニア大学) <p>多層カーボンナノチューブ</p> <ul style="list-style-type: none"> 0-MWCNT (CheapTubes, Inc) P-MWCNT オキサジアゾール基多層カーボンナノチューブ (OMWCNT) を酸洗浄して余剰な金属触媒を除去したもの F-MWCNT OMWCNT カルボキシル基を付与 <p>■調製方法</p> <ul style="list-style-type: none"> DM 培地に懸濁したナノマテリアルは超音波破碎、氷上で破碎した。 酸化チタン NB は超音波破碎によって軸が崩壊するため、DM 培地中 60 分間室温で機械的に攪拌した。 	<p>■試験生物 (投与方法)</p> <ul style="list-style-type: none"> C57BL/6 マウス (口咽頭吸引) 6-8 週齢雄 体重 20-25g SD 若しくは F344 ラット (気管内点滴) 8-10 週齢雄 体重 350-420g <p>■投与期間</p> <p>■試験方法</p> <p>肺組織と気管支肺胞洗浄液を回収し、マクロファージ、好中球、好酸球、リンパ球の細胞数をカウント、総タンパク質濃度と乳酸脱水素酵素活性を測定する。</p> <ul style="list-style-type: none"> 組織病理解析 H&E 染色 免疫組織化学 <p>ラットアンチマウス好中球モノクローナル抗体による染色</p>	<p><マウス></p> <p>■酸化チタン</p> <ul style="list-style-type: none"> 40 μg/50uL の ENM を投与したマウスにおいて、全ての酸化チタン ENM で、好中球の割合の増殖が見られた。 酸化チタン P25 が 2/4 の研究室、酸化チタン A が 1/4 の研究室で、投与一日後で好中球の割合に変化が見られた。 投与 7 日後には、好中球の炎症がベースラインの値近くまで回復していた。対照マウスから回収した BALF 細胞のうち 95%以上がマクロファージであった。 ナノ酸化チタンはリンパ球や好酸球の割合を増加させなかった。 酸化チタン NB を口咽頭吸引 1 日後のマウスは、末梢肺の終末細気管支と肺胞管分岐部に炎症が見られた。 酸化チタン NB は肺胞のマクロファージに局在していた。 <p>■多層カーボンナノチューブ</p> <ul style="list-style-type: none"> いずれの多層カーボンナノチューブも、40 μg/uL を投与したマウスは投与 1 日後の BALF 中の好中球の割合が増加した。 3/4 の研究室で、0-MWCNT は他の MWCNT より顕著な好中球の増加を見せた。 末梢細気管支とマクロファージ近傍に多層カーボンナノチューブは局在していた。 <p><ラット></p> <p>■酸化チタン</p> <ul style="list-style-type: none"> 2/3 の研究室において、酸化チタン NB のみが BALF 細胞中の好中球の投与量依存的な増加を見せた。 気管内投与した酸化チタンナノ粒子は末梢肺まで拡散していた。 投与 7 日後には投与による影響は無くなった。 <p>■多層カーボンナノチューブ</p> <p>多層カーボンナノチューブを投与したラットは好中球が投与量依存的に増加した。</p> <ul style="list-style-type: none"> 肺の組織学的評価では、マウスの結果と類似していた。 投与量 200 μg/uL、投与 1 日後の好中球流入への影響の強さは 0-MWCNT と F-MWCNT は P-MWCNT よりも強い。 投与量 200 μg/uL、投与 21 日後の好中球への影響は、F-MWCNT は対照群と同程度まで低下したが、0-MWCNT と P-MWCNT は持続していた。 肺の組織病理学的解析では、投与 1 日後には急速に炎症した病変が見られたが、21 日後には変化は見られなかった。 	<ul style="list-style-type: none"> ENM が引き起こす影響はマウスとラットで類似していた。 酸化チタンによる影響は、急性好中球増殖であった。 酸化チタン NB は他の酸化チタンよりも毒性が強かった。 酸化チタンにより引き起こされる炎症は投与 7 日後まで持続しない。 多層カーボンナノチューブによる影響は、肺における好中球の流入であった。 炎症を引き起こす強さは、0-MWCNT が最も強く、F-MWCNT が最も弱かった。

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/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	Ali Lermanizadeh, Giulio Pojana, Brigit K Gaiser, Renie Birkedal, Dagmer Bilanicova, Hakan Wallin, Keld Alstrup Jensen, Borje Selligren, Gary R Hutchison, Antonio Marcomini & Vicki Stone/ Nanotoxicology (201 3);7 (3):301-313	In vitro assessment of engineered nanomaterials using a hepatocyte cell line: cytotoxicity, pro- inflammatory cytokines and functional markers (工学的に製造し たナノマテリアル の肝細胞株を用い た invitro の評価、 細胞毒性、炎症性サ イトカイン、及び機 能的マーカー)	<p>■対照物質(性質:粒子径)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・NM101(酸化チタン、マイ ナーアナターゼを持つチ ル:7nm) ・NM110(酸化亜鉛、コーテ ィング無し:100nm) ・NM111(酸化亜鉛トリトエ トキシカプリリルシランコ ーティング:130nm) ・NM300(銀、ポリオキシラ ウレート Tween-20 でキャ ップ:<20nm) ・NM400(多層カーボンナ ノチューブ(MWCNT 直径 30nm) ・NM402(MWCNT、直径 30nm) <p>ナノ粒子は使用前まで暗環 境のアルゴンにて保存</p> <p>■試料調製 以下について記載</p> <ul style="list-style-type: none"> ・銀ナノ粒子・コーティン グされた紅亜鉛鋳 ・その他 <p>■試験用量 0.16-80 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (0.5-256 $\mu\text{g}/\text{mL}$)</p>	<p>■試験生物 ヒト肝細胞 C3A 細胞 株</p> <p>■投与期間 24 時間</p> <p>■試験方法</p> <ul style="list-style-type: none"> ・WST-1 細胞生存性ア ッセイ ・AlamarBlue 細胞生 存性アッセイ ・原子吸光分析 ・IL-8、TNF-a、IL-6 及びアルブミンの生 成(ELISA) ・C3A 細胞によるウレ ア生成測定 	<p>■細胞生存性</p> <ul style="list-style-type: none"> ・WST-1 アッセイによると、24 時間における細胞生存性は、全 てのナノ粒子において投与用量依存的に減少した ・WST-1 アッセイで LC50 が得られたのは、NM300 ($2\mu\text{g}/\text{cm}^2$)、NM110 ($7.5\mu\text{g}/\text{cm}^2$)、NM111 ($15\mu\text{g}/\text{cm}^2$) のみであった ・AlamarBlue で得られたデータは WST-1 と類似していたが、LC50 がわずかに高く検出された ・毒性の強さは、NM300>NM110>NM11 で、他の粒子は 24 時間で は LC50 に達しない程度の毒性であった ・NM300 の溶解度は低かったが、投与用量依存的に増加して おり、水に比べ C3A 培地ではわずかに溶解度が低下した ・24 時間における酸化亜鉛粒子の培地中の溶解度は 50-60%、一 方銀は 1%以下であった。 <p>■IL-8 の生成</p> <ul style="list-style-type: none"> ・毒性の低い酸化チタン及び MWCNT の IL-8 生成は、投与用量に 依存して増加し、暴露最高濃度において最も高かった ・毒性の強い銀及び酸化亜鉛の IL-8 生成は LC50 付近でピーク となり、それ以降は毒性は強まるがサイトカインの生成は減少 していた <p>■IL-6、TNF-a 及び CRP の生成</p> <ul style="list-style-type: none"> ・いずれのナノ粒子においても、IL-6、TNF-a、CRP の生成に変 化は見られなかった <p>■ウレア、アルブミンの生成</p> <ul style="list-style-type: none"> ・いずれのナノ粒子もウレアの生成に影響を及ぼさなかった ・酸化亜鉛粒子の NM110 及び NM111 は、LC50 付近の濃度におい てアルブミン分泌を減少させたが、その他の粒子は影響を及ぼ さなかった 	<ul style="list-style-type: none"> ・細胞毒性が最大だったの は銀粒子で、24 時間の LC50 は $2\mu\text{g}/\text{cm}^2$ であつた ・銀粒子以下、細胞毒性が 大きかったのは酸化亜鉛 (24 時間の LC50 7.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)、コーティングさ れた酸化亜鉛(24 時間の LC50 $15\mu\text{g}/\text{cm}^2$) であつた ・酸化亜鉛粒子の毒性は、 溶解度が約 50-60%である ことに起因するが、一方銀 の溶解度は<1%であつた ・全てのナノ粒子におい て、IL-8 の生成が有意に 上昇していたが、TNF-a、 IL-6、CRP の変化は検出さ れなかった ・肝機能のマーカーである ウレア及びアルブミンは 酸化亜鉛(非コーティング 及びコーティング)のみで 変化が見られ、アルブミン 生成は有意に減少した

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/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	Lone Mikkelsen, Keld A. Jensen, Ismo K. Koponen, Anne T. Saber, Hakan Wallin, Stefen Loft, Ulla Vogel, & Peter Moller / Nanotoxicology, March 2013; 7(2): 17-134	Cytotoxicity, oxidative stress and expression of adhesion molecules in human umbilical vein endothelial cells exposed to dust from paints with or without nanoparticles (ナノ粒子を含む若しくは含まない塗料に由来する塵を暴露したヒト臍帯静脈内皮細胞の細胞毒性、酸化ストレス及び接着分子の発現)	<p>■対象物質(略称、粒子径)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ルチルファイン TiO₂ (fTiO₂, 288nm) ・光触媒効果アナターゼ TiO₂ (pTiO₂, 12nm) ・ルチルナノ TiO₂ (nTiO₂, 21nm) ・無定形ナノシリコンジオキサイド (nSilicaxol, 7nm) ・シリコンジオキサイドアクリラート (nAxilate, サイズ不明) ・カオリナイトアルミニウムシリケート (Alu, Sil., 30-75nm) ・カーボンブラック (CB, 95nm) <p>Primary CB Reference metal/wood paint Metal/wood paint with CB</p> <p>■試料調製</p> <p>基材と結合材が木製の板に塗料を塗り、やすりで研磨して塵を発生させた。培地に懸濁し、使用直前に氷上で超音波破碎した。</p>	<p>■試験生物</p> <p>ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVECs) 入手元 Cell Applications</p> <p>■試験方法</p> <ul style="list-style-type: none"> ・DLS 解析 ・TEM 解析 ・暴露 24 時間における細胞毒性の LDH による測定 ・暴露 24 時間における ICAM-1 及び VCAM-1 の測定 ・ROS 測定 	<p>■粒子特性</p> <ul style="list-style-type: none"> ・培地中における粒子の分散は、粒子のサブミクロンサイズに強く影響を受けていた。 ・全てのマテリアルの粒子径は 100nm 以下。 ・TEM 解析によって、細胞質にナノ粒子が存在すると HUVEC 細胞に取り込まれ、いくつかはエンドソームの内部にまで入った。 <p>■ICAM-1 及び VCAM-1 の発現</p> <ul style="list-style-type: none"> ・TiO₂ を暴露した HUVECs は VCAM-1 のタンパク質レベルが上昇した。 ・HUVECs に塗装の塵を暴露した場合、ナノ粒子ありとナノ粒子無しで表面の ICAM-1 及び VCAM-1 のタンパク質レベルに差異は見られなかった。 ・wall paint fTiO₂ とその派生物、wall paint with pTiO₂、metal/wood paint with nTiO₂、及び metal/wood paint with nTiO₂ とその派生物は、本来の粒子状よりも HUVEC の接着分子の発現が高まっていた。 <p>■ROS 生成能</p> <ul style="list-style-type: none"> ・粒子状の CB は HUVECs において濃度依存的な ROS 生成の上昇を示した。(10-100 µg/mL) ・塗装塵の metal/wood CB は濃度依存的な ROS 生成上昇を示した(50-100 µg/mL)が、Reference metal/wood pin は ROS を生成しなかった。 ・粒子状の fTiO₂ 及び nSilicaxol 100 µg/mL の暴露も ROS 生成を上昇させた。 ・細胞フリーの培地において、塗装塵は ROS を生成しなかったが、粒子状のサンプルのいくつかでは濃度に依存しない ROS 生成が見られた。 <p>■細胞毒性</p> <ul style="list-style-type: none"> ・塗装塵の大半は、濃度 100 µg/mL において最大で 20% の LDH を発生させた。 ・粒子状では、Alu. Sil のみで LDH の発生が見られ、50 µg/mL において 23.6% であった。 ・粒子状では、0.01 及び 0.001 µg/mL において nTiO₂ で 3% 以下の LDH が発生した。 <p>■相互関係</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ROS 発生、細胞毒性及び表面の接着分子の発現に、明確な相関は見られなかった。 ・粒子径などの粒子特性も、評価項目との相関は見られなかった。 	<ul style="list-style-type: none"> ・試験サンプルのうち大半で細胞接着分子 VCAM-1 及び細胞内接着分子 ICAM-1 の細胞表面発現が上昇していた。 ・塗料を削った塵に由来する酸化チタンやカーボンブラックは、大半が本来の粒子状よりも細胞の反応が少なかった。 ・接着分子の発現と、細胞毒性及び活性酸素の生成物に関係性はなかった。 ・ナノ粒子を含む塗装の塵が、ナノ粒子を含まない塗装の塵よりもより酸化ストレスの発生や接着分子の発現を引き起こす、といった事象は観察されなかった。 ・本来の粒子状が最も細胞に影響を与えた。

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/試験 用量	試験生物/投与方法 期間/試験方法	試験結果	結論
76	Ali Jebali , Bahram Kazemi/ Toxicology in Vitro 27 (2013) 1847-1854	Triglyceride-coated nanoparticles: Skin toxicity and effect of UV/IR irradiation on them(トリグリセシドコートナノ粒子: 皮膚毒性及びUV/IR照射の影響)	<p>■対象物質 二酸化チタンナノ粒子 酸化亜鉛ナノ粒子 酸化マグネシウムナノ粒子 銀ナノ粒子 金ナノ粒子 入手元 Lolotech Company</p> <p>■試料調製法 ・TG コーティングナノ粒子の調製 200 μg/mL、1mL のナノ粒子に対し、100 mg/dL、1mL のTG を添加し、37°C で 1 時間攪拌した。遠心後に上清を除き、培地に懸濁した。</p> <p>■試験用量 0.001、0.01、0.1、1、10 μg</p>	<p>■試験生物 Balb/c マウス (雄) 背部皮膚細胞</p> <p>■投与期間 24 時間</p> <p>■試験方法 MTT アッセイ LDH アッセイ 細胞代謝アッセイ ATP アッセイ 活性酸素生成アッセイ</p>	<p>■TG コーティングナノ粒子及び非コーティングナノ粒子の特性 各ナノ粒子は異なるピークを示すが、TG コーティングナノ粒子は全て 1751 cm⁻¹ でピークを示したことから、粒子表面の TG で吸収されていることが示唆された。また TG 溶液とナノ粒子をインキュベーションすると紫外可視スペクトラムは減少が見られ、最も減少率が高いのは酸化マグネシウムナノ粒子、最も低いのは銀ナノ粒子であった。非コーティングのナノ粒子のサイズはいずれも 100-500 nm であったが、TG コーティング粒子は培地中においてそれぞれ 10-30 nm であった。TG コーティングを行った粒子はアグロメレーションを形成しにくいことが確認された。</p> <p>■MTT、LDH、細胞代謝及び ATP アッセイ 最も高い細胞生存性、細胞代謝、及び ATP レベルを示したのは、TG コーティングした粒子に IR を照射しなかった場合であった。銀ナノ粒子は最も細胞生存性、細胞代謝及び ATP レベルが低かった。金ナノ粒子、二酸化チタンナノ粒子、酸化亜鉛ナノ粒子及び酸化マグネシウムナノ粒子は毒性が少なかった。LDH アッセイの結果は反対に、非コーティングナノ粒子において最大であり、TG コーティングしたナノ粒子 (UV 照射)、TG コーティングナノ粒子 (IR 照射)、TG コーティングナノ粒子 (照射無し) の LDH 放出量は少なかった。銀ナノ粒子の LDH 保 j 出漁が最も高く、金ナノ粒子、二酸化チタンナノ粒子、酸化亜鉛ナノ粒子及び酸化マグネシウムナノ粒子は損傷が少なかった。</p> <p>■活性酸素生成アッセイ 活性酸素生成が最大だったのは非コーティングナノ粒子であった。TG コーティングナノ粒子の活性酸素生成量は少なかった。銀ナノ粒子の活性酸素生成量が最大で、二酸化マグネシウムナノ粒子は最小であった。</p>	<p>・TG コーティングナノ粒子は、非コーティングナノ粒子と比べると LDH の放出及び活性酸素の生成は少なく、細胞生存性、細胞代謝活性及び ATP レベルは高かった。全体的に照射をしない非コーティング金属ナノ粒子は、酸化金属ナノ粒子よりも高い細胞毒性を示した。</p>

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/試験 用量	試験生物/投与方法 期間/試験方法	試験結果	結論
77	Ali Kermanizadeh, Sandra Vranic, So 吋 a Boland, Kevin Moreau, Armelle Baeza-Squiban, Birgit K Gaiser, Livia A Andrzejczuk and Vicki Stone/ BMC Nephrology 2013, v14, N1, p96	An in vitro assessment of panel of engineered nanomaterials using a human renal cell line: cytotoxicity, pro-inflammatory response, oxidative stress and genotoxicity (ヒト腎臓細胞を用いて工業的に生産したナノマテリアルパネルの in vitro 評価: 細胞毒性、炎症促進応答、酸化ストレス及び遺伝毒性)	<p>■対象物質 (入手元)</p> <p>NM101 (Hombikat UV100, ルチル、7nm)</p> <p>NM110 (BASF Z-Cote 亜鉛鉱石, 100 nm)</p> <p>NM111 (BASF Z-COTE, 亜鉛コートトリエトキシカブリルシラン、130 nm)</p> <p>NM300 (RAS GmbH, Ag キャップ polyoxylaurat Twenn 20、<20 nm)</p> <p>NM400 (Nanocy、, 絡み形状を持つ MWCNT、直径 30 nm、長さ 5 μm)</p> <p>NM402 (Arkema Graphistrength C100、絡み形状を持つ MWCNT、直径 30nm、長さ 20 μm)</p> <p>・ 二酸化チタン</p> <p>NRCWE 001 (NanoAmor より入手、10nm)</p> <p>NRCWE 002 (陽性、10nm)</p> <p>NRCWE 003 (陰性、10nm)</p> <p>NRCWE (NaBond より入手、94nm)</p> <p>■試験用量</p> <p>0.16-80 μg/cm²</p>	<p>■試験生物</p> <p>ヒト腎臓近位尿管上皮細胞 (HK-2)</p> <p>■試験期間</p> <p>4時間 (DNA 損傷試験)</p> <p>24 時間 (毒性試験、サイトカイン分泌試験、酸化試験)</p> <p>■試験方法</p> <p>WST-1 細胞生存性アッセイ</p> <p>FACS アレイ (サイトカイン分泌測定)</p> <p>HE 酸化試験</p> <p>DNA 鎖崩壊の検出</p>	<p>■ナノマテリアルの特性</p> <p>本試験条件において、ナノマテリアルは凝集する蛍光が見られた。</p> <p>■細胞生存性</p> <p>全てのナノマテリアルにおいて、投与用量依存的に 24 時間の細胞生存性は減少した。NM111、NM110 及び NM300 は特に高い毒性を示した。二酸化チタン及び MWCNT の毒性は低く、試験用量範囲内において 24 時間では LC50 に達しなかった。</p> <p>■サイトカイン分泌</p> <p>NM101 を除くナノマテリアルは、投与用量依存的に IL8 及び IL6 の分泌量の増加をもたらした。一方 MCP-1 及び TNF-a は 24 時間の暴露では分泌量に変化は見られなかった。</p> <p>■HE 酸化試験</p> <p>Ag 及び二酸化亜鉛ナノマテリアルの暴露は HE ポジティブな細胞を有意に増加させた。NRCWE 003 を除く二酸化チタンナノマテリアルにおいても、わずかながら増加が見られた。MWCNT は細胞内の活性酸素に変化を及ぼさなかった。</p> <p>■DNA の損傷</p> <p>各マテリアルの LC20 の値を暴露したところ、NM 300 及び NRCWE 002 の暴露が最も DNA 損傷を引き起こした。また NM 111、NRCWE 001 及び 003 以外のマテリアルにおいて、わずかながら有意な DNA 損傷を検出した。</p>	<p>・二つの二酸化亜鉛ナノマテリアル及び銀ナノマテリアルが細胞に高い毒性を示した。それ以外のマテリアルについては LC50 を得ることができなかった。</p> <p>・全てのナノマテリアルは IL8 及び IL6 の生成を有意に増加させた。最も活性酸素の増加が顕著だったのは、銀ナノマテリアル、及び富津の酸化亜鉛ナノマテリアルであった。</p> <p>・10 種のうち 7 種のナノマテリアルについて、有意な DNA 損傷を引き起こし、最も損傷が激しかったのは銀及び陽性のチャージした二酸化チタンであった。</p>

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/試験 用量	試験生物/投与方法 期間/試験方法	試験結果	結論
78	Yujian Huang, Scott Clenaghan, Lijin Xia, Jason N Burris, C Neal Stewart Jr, andMingjun Zhang /J Nanobiotechnology 11:3 (2013)	Characterization of physicochemical properties of ivy nanoparticles for cosmetic application (化粧品適用を目的とする ivy ナノ 粒子に関する物理 化学的特性の特徴 付け)	<p>■対象物質</p> <ul style="list-style-type: none"> ・セイヨウキツダの根から抽出したナノ粒子 (ivy ナノ粒子) ・TiO₂ 及び Zn0 ナノ粒子 (入手先: Nanostructured & Amorphous Materials Inc. (US)) <p>サイズ</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ ivy ナノ粒子 (動的光散乱による測定): 室温で 115.5±1.9nm ・ TiO₂ 及び Zn0 ナノ粒子: 50nm <p>■試験用量</p> <p>細胞毒性試験: 0.08, 0.04, 0.2, 1, 5, 25, 50, 100 μg/ml</p> <p>■溶媒・調製</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ ivy ナノ粒子は、4°C水中で保存 	<p>■試験生物</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ A549 癌細胞株 ・ B16BL6 癌細胞株 <p>■投与方法</p> <p>細胞に各濃度の対象物質を添加し、48 時間後に MTT アッセイを実施</p> <p>■試験方法</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ MTT アッセイ 	<p>■粒子特性</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ ivy ナノ粒子のタンパク質濃度は約 58%であった。 ・ ivy ナノ粒子のサイズは-20°C~40°Cでは安定であったが、100°C2 時間の処理によって平均粒子径が低下し、1.1%が凝集、5.2%が小さなナノ粒子 (約 12~32nm) となった。また、100°Cではゼータ電位が僅かに上昇した。 ・ ivy ナノ粒子は、260~400nm (UVA/UVB) のスペクトルを強力に消滅させるが、100°Cの処理によってこの消滅がさらに増強された。これは、小さなナノ粒子の出現によるナノ粒子の体積対表面積の割合の増加によるものと思われた。 ・ ivy ナノ粒子のサイズは、pH の低下 (pH10~pH4) に伴い約 121nm~132nm まで増加し、また酸性環境下では、分解と凝集の程度が高かった。 ・ ivy ナノ粒子の UV 消滅度は、260~320nm (UVB) では pH の影響を受けなかったが、320~400nm (UVA) では pH の低下に伴い減少した。 ・ ivy ナノ粒子をフェノールクロロホルム-イソアミルアルコールで除タンパク処理をした結果、球状の粒子形状が一樣でない形状に変化し小破片となったことから、タンパク質が ivy ナノ粒子の形状維持に必要な構成要素であることが示された。 ・ ivy ナノ粒子によるスペクトルの消滅は、ivy ナノ粒子の UV 照射後も比較的安定していた。 ・ ivy ナノ粒子は、TiO₂ 及び Zn0 ナノ粒子と比較し、溶液中の透明性に優れていた。 <p>■細胞毒性の比較</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ A549 及び B16BL6 細胞を用いた細胞毒性試験では、5 μg/ml 以上の濃度において、TiO₂ 及び Zn0 ナノ粒子に有意な細胞毒性が観察されたが、ivy ナノ粒子の影響はほとんど認められなかった。 	<ul style="list-style-type: none"> ・ ivy ナノ粒子は、広範な温度及び pH において、UV 防御能を維持しており、TiO₂ 及び Zn0 ナノ粒子と比較して細胞毒性が低いことから、サンスクリーンへの適用において、これらの金属ナノ粒子の代替となり得る。

No	著者/出典	論文題名 (和訳)	対象物質/試料調製法/試験 用量	試験生物/投与方法 期間/試験方法	試験結果	結論
79	Nanna B. Hamann, Christian Engelbrekt, Jingdong Zhang, Jens Ulstrup, Kresten Ole Kusk, & Anders Baun' / Nanotoxicology, September 2013;7(6):1082・ 1094	The challenges of testing metal and metal oxide nanoparticles in algal bioassays: titanium dioxide and gold nanoparticles as case studies (藻類のバイオア ッセイにおいて金 属及び酸化金属ナ ノ粒子試験の挑 戦:二酸化チタン及 び金ナノ粒子のケ ーススタディ)	<p>■対照物質</p> <ul style="list-style-type: none"> ・金ナノ粒子 <p>初期粒子径 (nm) (Nominal : TEM) N/A : 25±4</p> <p>有効粒子径 (nm) (DLS : NTA) 51±8 : 46±22</p> <p>ゼータ電位 (nm) -20±20</p> <ul style="list-style-type: none"> ・二酸化チタン粒子 AEROXIDE TiO₂ P25 <p>初期粒子径 21 : 23±7 有効粒子径 1120±50 : n. q.</p> <p>ゼータ電位 -14±3</p> <p>■試料調製法</p> <ul style="list-style-type: none"> ・金ナノ粒子金ナノ粒子を algal medium で懸濁して ストック溶液を作成。スト ック溶液を同 medium で懸 濁して試験に使用した。 ・二酸化チタンナノ粒子 algal medium 若しくは MilliQ で 1 g/L のストック 溶液を作成し、超音波破碎 した。ストック溶液は 5°C で遮光して保存し、テスト 溶液を作成する際は超音波 破碎をしてから使用した。 <p>■試験用量</p> <p>金ナノ粒子 : 1.9-30 mg/L 二酸化チタン粒子 : 35-560mg/L</p>	<p>■試験生物</p> <p>緑藻 Pseudokirchneriell a subcapitata (Korshikov) Hindak</p> <p>■試験方法</p> <p>成長率阻害試験 藻類のバイオマス測 定</p> <p>(1) Coulter Counter によるセルカウント (2) hemacytometer によるセルカウント (3) 蛍光アセトンを用 いた測定</p> <p>■投与期間</p> <p>72 時間</p>	<ul style="list-style-type: none"> ・二酸化チタンナノ粒子はアグロメレート/アグリゲートを形成した。 ・ algal medium に懸濁した金ナノ粒子は非常に安定であった。 ・二酸化チタンナノ粒子は algal medium 中において濃度依存的に堆積 量も増加した。 ・ algal medium 中に溶解した粒子は、時間の経過とともにコー ディング層の分解が起こり、粒子径が減少した。 ・金ナノ粒子と藻類の細胞は相互作用が見られ、72 時間後には 細胞表面上の金ナノ粒子のアグロメレートの形態が、より小さ く特徴的な構造へと変化した。 ・二酸化チタンナノ粒子を暴露した藻類は、細胞表面に多くの 粒子が付着しており、サンプル調製の影響の可能性はある。 <p>■Coulter counting</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ Coulter counting によるバイオマス測定では、ナノ粒子の測 定サイズは 2-6.5 μm であり、顕微鏡による測定よりもアグロメ レート/アグリゲートが多く存在。ナノ粒子による干渉のバック グラウンドの差し引きが、バイオマス測定のエラーを引き起 こした。 ・金ナノ粒子においては藻類と巨大なアグリゲートを形成。 ・藻類とナノ粒子の相互作用が大きく影響することから、 Coulter Counter によるセルカウントの有効性には疑問が残る。 <p>■Haemocytometer</p> <ul style="list-style-type: none"> ・金ナノ粒子を暴露したサンプルには比較的正確に測定できた が、二酸化チタン粒子では粒子のアグロメレーション/アグリ ケーションが妨げとなる。この手法は二酸化チタン粒子のよう にアグリゲーションの大きい粒子の測定には適当ではない。 <p>■蛍光アセトンを用いた測定</p> <ul style="list-style-type: none"> ・バックグラウンドの影響の少ない 48 時間後からサンプルを回 収して測定したが、アセトンに比較的安定な金ナノ粒子の干渉 を軽減するには不十分であった。以降 Haemocytometer 及び蛍光 アセトンによる測定を採用する。 ・二酸化チタンナノ粒子を暴露した藻類の成長曲線は濃度依存 的に減少していた。Haemocytometer で測定した EC50 は 160 mg/L であったが、この手法は二酸化チタンナノ粒子の測定に適 当ではなく、蛍光を用いた測定から求めた EC50 は 200 mg/L で あった。最高投与用量 560 mg/L における生存曲線は 70%減少し ていた。 ・金ナノ粒子は最高投与用量 (30 mg/L) において抑制効果が見 られたが、成長阻害は 50%に届かなかった。最低投与用量 (1.9 mg/L) 以外の投与群では、対照群に比べてわずかに成長率が高 かった。 	<ul style="list-style-type: none"> ・本試験において、バイオ マスの代替測定法として、 蛍光を用いた測定が最も 適していた。バイオマスの 測定にはバックグラウン ドの選定が重要な要因と なるが、藻類とナノ粒子の 相互作用やナノ粒子の変 性によって複雑化する。こ の手法の最適化には、より 粒子による測定の阻害を 減少させる必要がある。