

2. ナノマテリアル等の安全性等に関する情報、試験法等に関する文献調査

2.1. 検索方法

- ① 使用する DB: PubMed
- ② 検索キーワード

以下のキーワード及びその組み合わせを使用する。

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?

③検索期間

2014/1/01～2014/12/31(文献発行年月日)

④検索式

- S1 Search (((nanomaterial OR nanoparticle OR nanosized OR ultrafine OR nanostructure OR subnanosize OR nano* (particle OR material OR size* OR structure))) AND ("2014/01/01"[Date - Completion] : "2014/09/30"[Date - Completion])
- S2 Search ((carcinogenicity or toxicity or cytotoxicity or toxicology or biochemical activity or biological activity or biological interaction or biocompatibility)) AND ("2014/01/01"[Date - Completion] : "2014/09/30"[Date - Completion])
- S3 Search ((fullerene* or C60 or C70)) AND ("2014/01/01"[Date - Completion] : "2014/09/30"[Date - Completion])
- S4 Search (((((carbon nanotube* OR single wall carbon nanotube* OR swnt OR swnts OR swcnt OR swcnts OR multi wall carbon nanotube* OR mwnt OR mwnts OR mwcnt OR mwcnts OR carbon nanohorn* OR carbon nanofiber OR carbon nanofiber)))) AND ("2014/01/01"[CDAT] : "2014/09/30"[CDAT]))
- S5 Search ((titanium dioxide* or titanium oxide* or TIO2)) AND ("2014/01/01"[Date - Completion] : "2014/09/30"[Date - Completion])
- S6 Search ((zinc oxide* or ZNO)) AND ("2014/01/01"[Date - Completion] : "2014/09/30"[Date - Completion])
- S7 Search ((silica or silicon oxide* or silicon dioxide* or SIO2 or amorphous silica)) AND ("2014/01/01"[Date - Completion] : "2014/09/30"[Date - Completion])
- S8 Search ((silver or nanosilver or AG)) AND ("2014/01/01"[Date - Completion] : "2014/09/30"[Date - Completion])
- S11 Search (Search (Search (graphene* or graphite*)) AND ("2014/01/01"[Date - Completion] : "2014/09/30"[Date - Completion]))
- S12 Search ((platinum or PT or colloidal platinum)) AND ("2014/01/01"[Date - Completion] : "2014/09/30"[Date - Completion])
- S13 Search ((gold or aurum or AU or colloidal gold)) AND ("2014/01/01"[Date - Completion] : "2014/09/30"[Date - Completion])
- S14 Search ((zinc or Zn)) AND ("2014/01/01"[Date - Completion] : "2014/09/30"[Date - Completion])
- S15 Search ((clay OR nanoclay)) AND ("2014/01/01"[Date - Completion] : "2014/09/30"[Date - Completion])
- S16 Search ((cellulose OR nanocellulose)) AND ("2014/01/01"[Date - Modification] : "2014/09/30"[Date - Modification])
- S17 Search ((S3 or S4) AND S2)
- S18 Search (((S5 or S6 or S7 or S8 or S11 or S12 or S13 or S14 or S15 or S16) AND S1 OR (nanosilver OR nanoclay OR nanocellulose OR nano* silver OR nano* clay OR nano* cellulose)) AND S2)
- S19 Search (S17 or S18)
- S20 Search (S19) AND "journal article"[Publication Type]
- S21 Search (S20) AND "review"[Publication Type]

2.2. 論文選択手順・方法

先ず、上記の方法で検索し、タイトル、書誌事項、要旨を出力した。(1500件)タイトルと要旨から内容を判断して、論文を複写する。(200件)

1500件から200件への絞り込みは、ドラッグデリバリーシステムや医療診断のためにナノマテリアルを利用する文献、センサーへの応用などに関する文献を除外することにより行った。有害性に関する文献は、カーボンナノチューブに関するものが圧倒的に多く、次いで銀が多い。200件からの絞り込みは、これらの物質については類似性がある調査からの選択と、*in vivo* 実験を優先させた。*In vitro* 実験でもメカニズムに触れた文献を取り上げた。二酸化チタン、シリカ、酸化亜鉛についても同様であり、金、白金、ナノクレイ、フラー

レン、グラフェン、ナノセルロースなどは有害性に関して発表されている文献数が少ないので、検索により抽出された文献は優先的に取り上げた。結局、69 件の文献を読み込んでサマリーを作成した。

2.3. 文献分類表

サマリーを作成した文献の分野をまとめて、表 2.3-1 に示す。3種類までのナノ粒子を使用している論文はそれぞれのナノ粒子に数えた。

表 2.3-1 サマリーを作成した文献分類表

ナノマテリアル	in vivo					生態	in vitro	実験方法	小計
	吸入	気管吸引	静注	腹腔	経口				
C60				1			2		3
SWCNT	1	2					3		6
MWCNT	5	8	1			1	9		24
その他 CNT*	1	1					1		3
グラフェン							2		2
カーボンナノファイバー	1	1							2
ナノセルロース							1		1
ナノクレイ							1		1
TiO ₂	1		1		2		4		8
ZnO						1	3		4
SiO ₂		2		1	1		7		11
CeO ₂		1					1		2
Ag			1		2	1	5		9
Au		1	1			1	1		4
Pt							1		1
Nanoparticles**								8	8
合計	9	16	4	2	5	4	41	8	89

*カーボンナノホーン、カップ型積層カーボンナノチューブ

**新しい実験方法を試験するために4種類以上のナノ粒子を用いた文献

(1) 文献サマリー

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間試験方法	試験結果	結論
MW CNT -1	Silva RM, Doudrick K, Franzi LM, TeeSy C, Anderson DS, Wu Z, Mitra S, Vu V, Dutrow G, Evans JE, Westerhoff P, Van Winkle LS, Raabe OG, Pinkerton KE ACS Nano. 2014 Sep 23; 8(9):8911-31	Instillation versus Inhalation of Multiwalled Carbon Nanotubes: Exposure-Relat ed Health Effects, Clearance, and the Role of Particle Characteristics (多層カーボン ナノチューブの 気管内点滴注入 対吸入:暴露関連 の健康影響、クリ アランスと粒子 特性の役割)	対象物質: MWCNTs (以下、O-、P-、F- はそれぞれ、 Original(受け入れ た試料), Purified (精製試料)、 Functionalized(官 能基付加)の意) 1)O-MWCNT ・形状:粉 ・Cheap Tubes, Inc., Brattleboro, VT, USAより受け入れ れ ・外径:20-30nm、 ・内径:5-10nm、 ・長さ:10-30µm 2)P-MWCNT ・O-から残留金属と 無定形炭素を除去 3)F-MWNTs ・P-を硝酸と硫酸で 処理して官能基付 加 物理化学的特性 ・残留触媒量、ζ電位 (水中)、比表面積: ・O-: Ni4.49%、Fe 0.76%、ζ電位- 14.5 mV、 182m ² /g ・P-: Ni 1.8%、	試験動物 ・試験生物:雄SD系ラット ・週齢:9-10週 気管内点滴注入と吸入暴露のため の粒子懸濁液の調製。 ・懸濁液1mlの構成:0.399mL無 菌食塩水、0.600mLラット血 清アルブミン、0.001 mL 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-p hosphocholine (DSPC) 液 ・懸濁液濃度: 10,50,200µg/250µL ・懸濁液は調製後超音波で処理 ・コントロール:粒子無し溶媒 ・暴露方法:吸入暴露 ・暴露時間:6h暴露濃度: 30mg/m ³ 気管内点滴注入 ・投与方法:気管内点滴注入 ・投与量:0、10、50、200µg MWCNTs in 250µL懸濁液 ・この用量は、人の1週、5週、5 カ月の職業被曝に近いもの として設定。 吸入暴露とエアロゾル特性 ・暴露方法:鼻部吸入暴露 ・暴露時間:6hの単回暴露 ・コントロール:濾過空気 ・設定エアロゾル濃度380µg/分 ・各ラットの60分間吸入量:~ 340µg (約1.1mg/kgbw) プログラム化熱分析: 血液、気 管支肺胞洗浄液 (BALF)、肺組	・MWCNT点滴注入は、1日目に BALF好中球増加とMWCNT陽 性マクロファージを産生した。 ・点滴されたO-とP-MWCNTsは肺 組織に有意な炎症を産生した。 しかし、MWCNTが肺中に保持 されていたにもかかわらず、21 日目で回復した。 ・MWCNT吸入は、1日でBALF好 中球の増加も有意な組織病理も 産生しなかった。 ・しかし、霧状にされたMWCNTs の吸入後1日と21日で、BALF におけるMWCNT陽性マクロフ ァージ数は有意に増加した。 ・MWCNTsは肺中に持続的に留ま っているにもかかわらず、せい ぜい一過性の炎症を産生するに とどまることが示された。; ・気管内点滴注入された O-MWCNTsは、P-または F-MWCNTsより多くの炎症を 引き起こした。 ・MWCNT懸濁液は、物理化学的 な粒子特性と肺応答に依存する 著しく異なる影響を産生した。 ・肺中にはO-,P-,F-MWCNTsとも 投与方法に依らず暴露後、1,21日 でほぼ同じ量のMWCNTsが残 留していた。ただし、気管内注 入ではF-MWCNTsのほうが O-,P-MWCNTsよりも多く残留 していた。またF-MWCNTsで	■MWCNTsは、以下 を誘発する: (1)暴露後1日の急 性の用量依存的炎 症 (2)粒子の取込みと 排出メカニズムに 影響を及ぼす物理化 学的特性と相関す る各種の炎症反 応。 (3)吸入暴露と気管 内点滴注入の場合 における、炎症と 粒子の取込みの逆 転したパターン。 (吸入の方が取込 みが多いにもか かわらず炎症は少 ない) ■人がMWCNTsに 暴露されると、健 康影響が懸念され る。 ■MWCNTsは長期 間肺に残留して、 短い、職業的関連 の被曝の後でさえ 毒性応答を生じる 可能性がある。 ■MWCNTによる毒 性の機序を解明す るためにはさらな

			<p>Fe0.08%、ζ電位 -8.3 mV、168 m²/g</p> <ul style="list-style-type: none">• F⁻ ; Ni, Feとも非検出、ζ電位 -50.5 mV、224 m²/g	<p>織を暴露後1日と21日に採取し、含まれる MWCNTsをプログラム化熱分析によって定量化。</p>	<p>は、吸入(吸入量$\sim 340$$\mu$g/時間$\times 6$時間)による残留量は気管内注入 $200$$\mu$g よりも $50$$\mu$g に近かった。</p>	<p>る研究が、必要である。</p>
--	--	--	---	--	--	--------------------

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間試験方法	試験結果	結論
MWCNT-2	Kasai T, Umeda Y, Ohnishi M, Kondo H, Takeuchi T, Aiso S, Nishizawa T, Matsumoto M, Fukushima S Nanotoxicology. 2014 Jul 17;1-10	Thirteen-week study of toxicity of fiber-like multi-walled carbon nanotubes with whole-body inhalation exposure in rats (ラットへの繊維様多層カーボンナノチューブの13週間の全身吸入暴露による毒性研究)	<ul style="list-style-type: none"> ■対象物質：繊維様直線MWCNTs ・保土谷化学から購入 ・精製、篩い分けなしで使用 ・炭素純度：>99.6% ・直径:40-90nm ・アスペクト比：>100 ・表面積：24-28m²/g ・製法：CVD ■実測特性値 ・幅：90.7nm ・長さ：5.7μm ■生成エアロゾル特性 ・著者らの開発したサイクロン-篩方式で生成 (以下はエアロゾルの13週間の平均値、0.2、1、5 mg/m³の目標濃度に対して) ・平均暴露濃度 mg/m³：0.20、1.01、5.02 ・平均個数濃度 cpm：115200、576500、2933900(OPCによる) ・空力質量直径： 	<ul style="list-style-type: none"> ■試験生物： ・F344/DuCr1Cr1jラット ・週齢：4週 ■投与方法 ・暴露方法：全身吸入暴露 ・暴露濃度：0.2、1、5mg/m³ ・暴露時間：6h/d×5d/w×13w ・対照群：大気への暴露 ■臨床観察、尿検査と血液学的および血液生化学的分析： ・臨床徴候と死亡率：毎日観察 ・体重と摂食量：毎週計量 ・尿パラメータ：曝露期間の最終週 ■気管支肺胞洗浄液の細胞学的および生化学的分析： ・血液：全細胞、生化学分析 ・BALF：右肺だけから採取 ・測定項目：好中球、リンパ球、肺胞マクロファージ数、マクロファージの形態学的特徴 ・生化学的分析：総蛋白(TP)、アルブミン、LDH、アルカリホスファターゼ(ALP) ■臓器重量と病理検査： ・胸腺、副腎、精巣、卵巣、心臓、左肺、腎臓、脾臓、肝臓、脳：重量測定と肉 	<ul style="list-style-type: none"> ■死亡率と臨床徴候、血液学、血液生化学 ・13週間の暴露期間中、暴露群、対照群とも、死亡や異常な臨床徴候は観察されなかった ・成長速度は雄、雌、対照群の間に差はなかった。 ・体重増(対対照群、それぞれ、0.2、1、5mg/m³暴露に対して) 雄：96%、101%、94%、雌：102%、100%、102% ・白血球中の好中球比率。(0, 0.2, 1, 5 mg/m³) 雄：変化なし、雌：21%、24%、25%、28% ■BALFの細胞学的および生化学分析 ・好中球とリンパ球の数の暴露濃度関連の増加は、すべての暴露群で観察された。 ・肺胞マクロファージは広範囲にわたる大きさを有して、膨脹した泡状細胞質を有していた。 ・すべての暴露群でMWCNT線維を貪食していた。 ・1mg/m³以上の暴露群では、そのような形態学的な特徴を有する肺胞マクロファージの率は、用量依存的に増加した。 ・LDHとALP活性の増加、TPとアルブミン濃度の暴露濃度関連の増加が、すべての暴露群で観察された(0.2mg/m³の雌のALP活性を除く)。 ■病理組織学的観察 ・死体解剖の肉眼観察によって、多数の白い領域が、5mg/m³処理のラットで見いだされた。 ・肺重量は、雄雌ともコントロールの1.2と1.3倍増加した(1、5mg/m³暴露群)。 ・上下の気道と縦隔リンパ節は、雄雌とも組織病理学的影響を受けた。 ・肉芽腫性変化と限局性線維形成が肺で観察された。これらの発生率と強さは暴露濃度依存的に増加した。 ・肉芽腫性変化は、すべての肺葉で見いだされた。 ・MWCNTsは、すべての暴露群の肺にも堆積した。 ・それらは、主に肺胞マクロファージの中で検出された。 	<ul style="list-style-type: none"> ・ラットを繊維様MWCNTに暴露すると、BALFの肉芽腫性変化や限局性線維形成などの変性亜慢性毒性影響を濃度依存的に誘起する。 ・少数のMWCNTsは、胸膜下領域と横隔膜で観察された。 ・MWCNTsの肺負荷は、毒性の発生率と強さが暴露濃度、期間と保持(retention)に依存することを示した。 ・本研究によって、ヒトに対するMWCNTsのリスク評価として役に立つ繊維様MWCNTsの亜慢性毒性に関する多種多様なデータを得た。 ・より多くの調査

			<p>1.4-1.6μm</p> <ul style="list-style-type: none">形状：ほとんど全て繊維様)	<p>眼的病変観察</p> <ul style="list-style-type: none">鼻腔、鼻部、喉頭、気管、肺、他：組織病理学検査肺：コラーゲン線維の有無 <p>■MWCNT肺負荷</p> <ul style="list-style-type: none">左肺組織：肺MWCNT量	<p>■MWCNT肺負荷</p> <ul style="list-style-type: none">左肺のMWCNTS量：雄 3.23、21.2、120.3μg/左肺、雌 2.30、13.7、80.3μg/左肺	<p>が、MWCNTsの慢性毒性と発癌性を評価するために必要である。</p>
--	--	--	---	--	--	--

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
WC NT- 3	Czarny B, Georgin D, Berthon F, Plastow G, Pinault M, Patriarche G, Thuleau A, L'Hermite MM, Taran F, Dive V ACS Nano. 2014 Jun 24 ;8(6):5715-24	Carbon nanotube translocatio n to distant organs after pulmonary exposure: insights from in situ ¹⁴ C -radiolabelin g and tissue radioimagin g (肺暴露後 における遠 隔器官への カーボンナ ノチューブ の転位: in situ での ¹⁴ C -放射化ラベ リングと組 織の放射能 イメージン グからの洞 察)	■ ¹⁴ C のラベル付き MWCNT合成 ・ ¹⁴ C-LabeledMWCNT (以下、CNT) ・化学蒸着法で合成 ・炭素源: ¹⁴ C ベンゼ ン ■CNTの化学的特性 CNT表面のXPS分析 ・C: 98.36at.% ・O: 1.64at.% 不純物 ・Fe: 7.4wt% ■CNTの物理的特性 ・比表面積: 42±2m ² /g ・バルクCNTの平均外 径: 40nm (TEM) ・溶媒中CNT -長さ: 3.9µm(500nm ~12 µm) -直径: 40nm (10~ 150nm) ■試料懸濁液液分散 媒: 5.5mM D-ブドウ糖、 0.6mg/m マウス血清アルブミ ン 0.01mg/mL1,2-dip amitoylsn-glycero- 3-phosphocholine 補充、Ca、Mgフリ ーPBS (pH7.4) ・懸濁液調整後、高エ	■試験生物: ・雌のBalb/cマウス ・週齢: 6週 ■暴露方法-1: ・単回咽頭吸引 ・暴露濃度: 20µgCNT/50µL分散媒 (285×10 ³ Bq) ・試験期間: 暴露後1、7 日、1、3、6、9、12カ 月 ・採取組織: 肺、肝臓、 脾臓、腎臓、脳、心臓、 胸腺、骨髄 ・血液は、全採血で採取; ■暴露方法-2: ・胃管による強制投与(単 回食道内注入) ・暴露濃度: 50µgCNT/100µL分散 媒) (714×10 ³ Bq) ・糞便と尿: 毎日採取。 ・試験期間: 曝露後1、7、 30日 ■暴露方法-3 ・投与方法: 静注(単回) ・試験期間: 曝露後4日間 ・暴露濃度: 1µgCNT/50µL分散媒 (14.8×10 ³ Bq) ■解析方法;放射能イメ ージングで定性的観察、組 織を溶液化してシンチレ ーションカウンターで定 量(0.2pgのCNTを検出可	■咽頭吸引後の観察 ・体重は正常に増大した。 ・マウスはすべて健康だった。 ・全ての試験項目で炎症は認められなかつ た。 ■転位測定の結果 ・放射信号は、肺曝露後1日の尿と血液で不 検出。 ・放射信号は、1日から90日にかけて肺組織 では減少、7日から360日にかけて脾臓と肝 臓では増大。 ・放射信号は、腎臓と骨髄でも増大したが、 肝臓、脾臓と比較すると少なかった。 ・CNTは、脾臓の白色髄と骨髄に濃縮してい た。 ・暴露後1日の肺負担は、10µg CNTであった。 3月と12ヵ月まで、投与量の10%は肺に残 った。 ・脾臓は肝臓より多くのCNTを蓄積した。 ・12ヵ月後に脾臓と肝臓で検出されたCNT はそれぞれ200ngと75ngであった。 ・これは投与された量の0.2%と0.75%に対応 する。 ・12ヵ月の心臓で少量の放射能が検出され た。しかし、脳と胸腺では検出されなかつ た。 ・12ヵ月の肺から分離されたCNTは、さまざ まな直径と長さ(0.2-10µm)を示した。 ・肝エキスでは、4µm長のCNTが確認された。 ■食道内注入: 注入後1日では、摂取された CNTの95%は、消化管と糞便で見いだされ た。4日には放射能は消化管と糞便で観察 されなかった。放射信号は、1、7、30日後 で脾臓と肝臓で観察されず。 ■以上の結果より、肺曝露後の転位は、空気	・本研究は、組織 切片の放射能 撮像がCNTの 体内分布を決 定するために 使えることを 示した ・マウスへの CNTの咽頭吸 引の後、少量の MWCNTが、 遠隔器官に転 座する。 ・これは、CNT が空気-血液 関門を通過す ることを示す。 ・CNTは、曝露 後1日から12 ヵ月まで、脾臓 と骨髄のよう な末梢臓器に 蓄積する。 ・これより、CNT などのナノ粒 子の第2の器 官におけるバ イオ持続性が 結論される。

			エネルギー超音波で分散	能)	- 血液関門を通したCNTの転位だけによる（腸バリアを横断して起こるものではない）と考えられる。肺からのCNTは、いくつかの遠隔器官まで転位する。	
--	--	--	-------------	----	---	--

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
MWCNT-5	van Berlo D, Wilhelmi V, Boots AW, Hullmann M, Kuhlbusch TA, Bast A, Schins RP, Albrecht C Arch Toxicol. 2014 Sep; 88(9):1725-37	Apoptotic, inflammatory, and fibrogenic effects of two different types of multi-walled carbon nanotubes in mouse lung (マウスの肺におけるアポトーシスや炎症、線維形成におよぼす2つのタイプの多層カーボンナノチューブの影響)	<p>■対象物質：2種</p> <p>① MWCNT1</p> <ul style="list-style-type: none"> 三井物産の MWNT-7 径：40~100nm 長さ：13μm これまでいくつかの毒性学的調査で用いられたもの。 <p>② MWCNT2</p> <ul style="list-style-type: none"> 欧州委員会共同研究センター (JRC; イタリア) から入手。 径：30nm 長さ：5μm EUのナノ毒性学プロジェクトで用いられているもの。 <p>■SEM分析</p> <ul style="list-style-type: none"> MWCNT1は、長~中間長のチューブの束と単体から成る。 長さ：5.3\pm4.0μm (PBS/0.6 mg/ml BSA/0.01 mg/ml DPPC懸濁液中で超音波処理後) MWCNT2は、短い、より剛性の小さい、絡みあった 	<p>■試験対象：A,Bの2種</p> <p><in vivo試験></p> <p>A)特定病原体除去 C57B16/Jマウス (雌)、週齢：9-10週</p> <p>■試験方法</p> <ul style="list-style-type: none"> 暴露方法：咽頭吸引 溶媒： PBS/BSA/DPPC 溶液 懸濁液濃度：1mg/ml 投与量：体重20g当たり 40μlの懸濁液 コントロール：粒子無しのPBS/BSA/DPPC溶液 試験期間：暴露後8週間 <p>■試験項目</p> <ul style="list-style-type: none"> 血液及び肺の組織病理/免疫組 織化学的評価 Bio-Plexサイトカイン分析に よる全身性炎症評価 RNA, cDNA のqRT-PCR 解析 開裂カスパーゼ3とマクロファージF4/80の免疫組織化学 肺の組織病理評価 <p><in vitro試験></p> <p>B)マクロファージ類似 RAW 264.7ネズミ細胞 (ATCC Number TIB-71)</p>	<p>■in vitro 毒性</p> <p>MWCNT1：</p> <ul style="list-style-type: none"> 膜健全性損失が最高20%増加した (LDH 分析) ミトコンドリア活性は対照群の60%にまで減少した (WST-1分析)。 MWCNT2の毒性：不検出 (両分析とも) <p>■炎症誘発性および線維症マーカー</p> <ul style="list-style-type: none"> MWCNT1暴露は、MCP-1レベルを増大させたが、MWCNT2は増大させなかった (全身性炎症評価)。 MWCNT1暴露はMMP-8 (1.8倍) と TIMP-1 (2.2倍) を誘発した (mRNA発現分析)。 <p>■組織病理学</p> <ul style="list-style-type: none"> 肉芽腫病変 (高細胞密度の結節状の構造変化) が、粒子に暴露された全ての動物で観察された。 双方のMWCNTで、混合性細胞肺胞炎症と末梢および細気管支周辺リンパ球浸潤が見られた。 リンパ組織球浸潤を有する肺胞組織細胞増多症と気管支肺胞増殖はMWCNT1だけでみられた。 <p>■酸化ストレス</p> <ul style="list-style-type: none"> in vivoでは、MWCNT1だけがHO-1とγ-GCSを誘発した。 Nrf2のmRNA発現は、双方のMWCNTに影響されなかった。(Nrf2：これらと他の抗酸化剤遺伝子の発現増加に関する転写制御因子。) in vitroでは、二つのMWCNTは、RAW 	<ul style="list-style-type: none"> 吸入された MWCNTの長さや剛性、凝集特性は、マウス肺における炎症と線維性応答の誘発に対して大きな影響を有する。 ただし、肺マクロファージ・アポトーシスにおいては、おそらくその開始トリガーではない。 MWCNTに暴露されたマウスの肺におけるアポトーシスは、単に限局的な炎症性の効果あるいは、炎症と肉芽腫形成を制限するフィードバック・プロセスに対する二次応答を反映するだけかもしれない。 MWCNTによるマクロファ

	BSA; bovine serum albumine DPPC ; dipalmitoyl-phosphatidylcholine	ナノチューブを含む。 ・長さ：6.4±4.1µm (2%マウス血清を用いた溶媒中で超音波処理後)	<ul style="list-style-type: none"> 培養液：(1.5g/l重炭酸ナトリウム+4.5g/lブドウ糖 4mML-グルタミン、ペニシリン (100U/ml) /ストレプトマイシン (0.1mg/ml) +10% FCS 補充) DMEM 粒子濃度：0.625、2.5、10 µg/cm² 	<ul style="list-style-type: none"> 試験項目 毒性試験 アポトーシス caspase 3/7 活性分析 (これに対する陽性対照：スタウロスポリン (STS) (濃度0.1µM×24時間) ROS生成 	<p>264.7細胞のH₂O₂産生を増大させた。</p> <ul style="list-style-type: none"> アポトーシス in vivoでは、-MWCNT-1、-2とも、肉芽腫性病巣に限局された染色強化を誘発した。MWCNT-1はより強い。 肉芽腫の範囲内に限局されるものの、MWCNT処理はアポトーシスの強化を誘発した。 in vitro では、両方ともスタウロスポリン活性を示したが、RAE 264.7 細胞において3/7 カスパーゼ活性は生起しなかった。 	<p>ージ・アポトーシスに関する in vitro試験は、肺障害の十分な予測手段ではない。</p>
--	---	---	--	--	--	---

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間試験方法	試験結果	結論
MWCNT-6	Han SG Inhal Toxicol. 2014 May; 26(6):327-32	Pulmonary response of mice to a sequential exposure of side-stream cigarette smoke and multi-walled carbon nanotubes (たばこ副流煙と多層カーボンナノチューブの逐次的な暴露に対するマウスの肺応答)	<ul style="list-style-type: none"> ■多層カーボンナノチューブ (MWCNT) <ul style="list-style-type: none"> ・フェロセン-キシレン混合物の連続化学蒸着法を用いた触媒分解で合成 ・径：20-30nm ・長さ：最高50μm ・凝集粒子径：30-300 (平均98\pm10) nm ・ほぼ100%が凝集していた。 ■タバコ副流煙 (SSCS) <ul style="list-style-type: none"> ・ケンタッキー大学リファレンスシガレット3R4Fを用いて発生 ・煙微粒子濃度：約40mg/m³ ・含有物：タール9.4、ニコチン0.73mg/タバコ 	<ul style="list-style-type: none"> ■試験生物：A/Jマウス (雌) <ul style="list-style-type: none"> ・週齢：10週 ■タバコ副流煙暴露方法 <ul style="list-style-type: none"> ・暴露室における全身暴露 ・暴露時間：6h/d\times5d/w\times4w ・コントロール：大気暴露 ■MWCNT暴露 <ul style="list-style-type: none"> ・暴露方法：内部咽頭吸引法 (SSCSまたは空気への予備暴露後) (単回) ・投与量：40μg / 40μl PBS ・コントロール：PBSのみ ・試験期間：1日 (半数)、3日 (残り半数) ■試験ケース (4ケース) <ul style="list-style-type: none"> (A)大気への全身暴露 + PBSのみの吸引暴露 (B) たばこの煙の全身暴露 + PBSのみの吸引暴露 (C) 大気への全身暴露 + MWCNTの吸引暴露 (D) SSCSへの全身暴露 + MWCNTの吸引暴露 ■気管支肺胞洗浄液 (BALF) <ul style="list-style-type: none"> ・LDH活性 ・全細胞数、多形核白血球% ・BALFの総蛋白濃度 ・ムチン 	<ul style="list-style-type: none"> ■BALFの全細胞数と多形核白血球流入 <ul style="list-style-type: none"> ・SSCS(B)とMWCNT(C)への曝露は、双方とも1日と3日で全BAL細胞の数を増加させた (対対照群)。 ・しかし、SSCS+MWCNT暴露(D)は、MWCNT単独暴露 (C) と比べて全BAL細胞の数を増加させなかった。 ・MWCNT(C)が1日と3日で多形核白血球の比率を上昇させた一方、SSCS(B)はマウス肺への多形核白血球の流入は増加させなかった。 ・MWCNTのみへの暴露(C)との対比で、SSCS+MWCNT(D)暴露は多形核白血球の比率が1日目で減少した。 ・大気のみコントロール(A)との対比で、SSCS+MWCNT(D)暴露では1日、3日とも、多形核白血球の割合は上昇した ■BALFの総蛋白濃度とLDH活性 <ul style="list-style-type: none"> ・MWCNT暴露(C)はコントロール(A)との対比でBALFへの細胞タンパク質の漏出を増加させた。この増加はSSCSのみの暴露 (B) では見られなかった。 ・MWCNT (C) では、1日でLDH活性が増加したが、3日ではコントロール・レベルに戻った。 ・コントロール (A)との対比で、SSCS+MWCNT群(D)のLDH活性は、3日目で高かった。 ■BALFのムチン・レベル <ul style="list-style-type: none"> ・BALFへのムチンの分泌は、MWCNT(C)とSSCS+MWCNT(D)で増大したが、この両者に有意な差はなかった。 	<ul style="list-style-type: none"> ・A/Jマウスへのたばこ副流煙とMWCNTの逐次的暴露は、マウスの肺で予想される付加的な効果または相乗効果を生じなかった。 ・MWCNTは、マウスにおける肺毒性は著しいが、本研究で選択された濃度と時点におけるたばこ副流煙の予備暴露は、MWCNTに誘起された肺毒性の変化に対して大きな役割は果たさない。

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間試験方法	試験結果	結論
MWCNT-7	Qi W, Bi J, Zhang X, Wang J, Wang J, Liu P, Li Z, Wu W Sci Rep. 2014 Mar 12; 4:4352	Damaging effects of multi-walled carbon nanotubes on pregnant mice with different pregnancy times (異なる妊娠回数を有する妊娠マウスに対する多層カーボンナノチューブの有害影響)	<ul style="list-style-type: none"> ■対象物質： <ul style="list-style-type: none"> 酸化MWCNT(以下oMWCNT) MWCNTをHNO₃で酸化して作成。 MWCNT: Shenzhen Nanotech Port Co. Ltd., Guangdong (中国)でCVD法によって合成されたものを購入 <以下は同社資料による特性値> <ul style="list-style-type: none"> 長さ: 1-2μm、 径: 10-30nm 純度: >96wt% 無定形炭素<3% 灰分<0.2% oMWCNTの99mTc標識 <ul style="list-style-type: none"> 実験には、99mTcで放射化して使用(99mTc-oMWCNT)。 99mTc04-は、China Institute of Atomic Energy, Beijing, Chinaより購入 放射能強度: 5 mCi 	組織内分布 <ul style="list-style-type: none"> ■試験生物： <ul style="list-style-type: none"> 昆明マウス (雌:雄= 1:1) 体重: 15g~18g ■投与方法: 静注 <ul style="list-style-type: none"> 投与物: 99mTc-oMWCNT水溶液 (0.2mL~0.3mL, pH = 7.26, NaCl = 0.9%) 投与量: 20mg/kgbw 試験期間: 静注後1、2、6、16、24時間 (妊娠期間: 17d) ■採取組織： <ul style="list-style-type: none"> 心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、胃 母体の血液と胎児の心臓、肺、肝臓 これらの組織の99mTcを計数 流産率の統計と出産の前後の重量変化 <この項の試験方法> <ul style="list-style-type: none"> ■試験生物: 初妊娠、2回目、4回目の妊娠マウス 投与方法: oMWCNT (20mg/kg.bw)を妊娠7日から流産/出産まで注射 流産/出産後血液を採取 (1mL) 血清中プロゲステロンとエストロゲン含有量を測定 プロゲステロンとエストロゲンに及ぼすoMWCNTの影響。 <この項の試験方法-1>	母体の組織と胎児における99mTc-oMWCNTの体内分布。 <99mTc-oMWCNTの分布> <ul style="list-style-type: none"> 母体では、主に肺 (最高90% ID/g) に分配され、次に肝臓、脾臓、腎臓が続いた。 これは、投与後24時間で、肺で70% ID/gに減少し、脾臓と腎臓で最低に減少し、肝臓でわずかに増加した。 胎児では、注射後6時間で胎盤と胎児でピークに達し、その後6~16時間で大きく減少した。 羊水では、この過程で段階的に増加した。 これらの結果は、oMWCNTが生体内で母体を通過して胎児に達することを示す。 oMWCNT入りの注射の後の異なる妊娠回数のマウスの流産と受精率。 <ul style="list-style-type: none"> 暴露群では暴露後数日の間、母体の体重増加が阻害された。 母体の体重は、妊娠回数初回、2回、4回のマウスでそれぞれ妊娠日数13日、10日、11日で急に増加して、流産または出産へと続いた。 しかし、常に対照群の体重より低かった。 母体の血清中のプロゲステロンとエストロゲンレベルにおよぼす暴露投与量の影響。 <ul style="list-style-type: none"> 初妊娠マウスの血清プロゲステロン値は、対照群より低く、エストロゲン値は高かった。 	<ul style="list-style-type: none"> 静脈内注射によって妊娠マウスに注入されたoMWCNTは、胎盤関門を通過して胎児に入り、主に胎生期肝臓、肺、心臓に蓄積する。 oMWCNTは血清中プロゲステロンを低下させて、エストロゲンを上昇させる。 oMWCNTの妊娠に及ぼす影響は、投与量に依存するが、妊娠期間の経過とともにその影響は弱まる。 oMWCNTの有害性は、経産マウスより初妊娠マウスの方が大きい。 oMWCNTは胎盤機能に損傷

			<ul style="list-style-type: none"> ・投与物質：oMWCNT ・投与量：20mg/kg.bw ・投与方法：4、11、15dの妊娠 <p>日数で、妊娠マウスの静脈に毎朝注射。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・注射液量：0.2mL～0.3mL ・採取組織：母体の血液（1mL） ・測定項目：血清中のプロゲステロンとエストラジオール <p><この項の試験方法-2></p> <ul style="list-style-type: none"> ・投与物質：oMWCNT ・投与量：4、20、30mg/kg.bw ・注射液量：0.2～0.3mL ・投与日：妊娠日数11日目 <p><この項の試験方法-3></p> <ul style="list-style-type: none"> ・投与物質：oMWCNT ・投与量：20mg/kg.bw ・注射液量：0.2～0.3mL ・投与日：妊娠日数13日目 <p><この項の試験方法-4></p> <ul style="list-style-type: none"> ・投与物：oMWCNT ・投与量：4 mg/kg.bw×5日=20 mg/kg.bw ・投与日：妊娠日数13日より5日連続 ・採取試料：血液1mLを妊娠18日目で採取 <p>5異なる妊娠回数をもつ妊娠したマウスの傷害因子の検出。</p> <p><この項の試験方法></p> <ul style="list-style-type: none"> ・投与物：oMWCNT ・投与量：20 mg/kg.bw ・投与方法：毎朝静注 ・投与日：妊娠9,10,11日の3日間 <p>■測定・観察項目</p>	<p>異なる妊娠期間での、母体血清中のプロゲステロンとエストラジオール・レベルに及ぼすoMWCNTの影響。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・妊娠したマウスは、妊娠7、14、18日で、20mg/kg.bw oMWCNTに暴露された。 ・暴露群の血清プロゲステロン値は、7、14と18dの妊娠期間で対コントロールより低かった。 ・この結果は、oMWCNTが胎盤系に入った後にプロゲステロンの分泌を阻害することを示した。 ・暴露群の血清エストラジオール・レベルは、妊娠7dまたは14dでコントロールより高かった。 <p>母体の血清中のプロゲステロンとエストラジオール・レベルに及ぼす暴露時間の影響。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・血清プロゲステロン値は、対対照群で低かった。 ・低用量での多重暴露（4mg/kg.bw/d×5日）は、単回の大量暴露（20mg/kg.bw/d×1回）より血清プロゲステロン値は上昇させ、エストロゲンは減少させた。 <p>oMWCNTによる注射の後の胎盤における活性酸素種（ROS）と血管内皮増殖因子の（VEGF）レベル</p> <ul style="list-style-type: none"> ・胎盤のROS含有量は、初妊娠マウス20mg/kg.bw暴露群では、対対照群で有意に減少した。 ・第2回と第4回妊娠のマウスでは、胎盤組織の明・白な相違は観察されなかった。 ・暴露群の胎盤のVEGF含有量は、4回妊娠マウスを除いて対対照より低かった。 <p>oMWCNTによる注射の後の胎盤の組織</p>	<p>を与え、これによって胎児の発育は遅延し、心臓と脳を害し、流産につながる。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・以上の結果は、CNTsが妊婦に毒性を誘発することを示唆する。 ・CNTs汚染に起因する妊娠中の傷害を予防するために、適当な安全予防措置がとられなければならない。
--	--	--	---	---	--

				<ul style="list-style-type: none">• 血漿中のROSとVEGF• 胎盤、肝臓、肺、脾臓、胎児	<p>についての組織学的観察。</p> <ul style="list-style-type: none">• 初妊娠マウスの暴露群では、対対照群で細胞の大きさは増加し、胎盤組織の血管数は減少した。• 20mg/kg.bw oMWCNTに暴露された妊娠マウスでの胎児の肺と肝臓は影響を受けなかった。一方、胎児の心臓と脳は損傷を受けた。	
--	--	--	--	--	--	--

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料 調整法/試験用 量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
MWCNT-8	Zhao Y, Wu Q, Li Y, Nouara A, Jia R, Wang D Nanoscale. 2014 Apr 21; 6(8):4275-84	In vivo translocation and toxicity of multi-walled carbon nanotubes are regulated by microRNAs (多層カーボンナノチューブのin vivo転座と毒性は、マイクロRNAによって制御される)	<p>■対象物質： MWCNT</p> <ul style="list-style-type: none"> 分散媒：K媒体(50 mM NaCl, 30 mM KCl, 10 mM NaOAc, pH 6.0) Shenzhen Nanotech. Port Co. Ltd (Shenzhen, China)から入手。 <p>■特性値</p> <ul style="list-style-type: none"> 純度：98.94% 不純物 (wt%)： -0.017Fe -0.077Ni 長さ：5-15µm 径：10-20nm ζ電位： -32.4mV (K-媒体中) 	<p>■試験生物：線虫株 (nematode strains)</p> <ul style="list-style-type: none"> 培養液：大腸菌OP50によって接種された線虫増殖培養液 (NGM) 暴露濃度：0.1-1.0mgmL-1 暴露期間：Li-幼虫 (Li-larvae) が若年成虫になるまでの期間 <p>■測定/評価項目：</p> <ul style="list-style-type: none"> 生殖、移動挙動、腸自己蛍光、腸ROS産生に関わる毒性評価 測定項目：miRNA発現プロファイリング MWCNT暴露による異常制御されたmiRNA発現 <p>■毒性評価のためのエンドポイント</p> <ul style="list-style-type: none"> 生殖 (仔のサイズで評価) 線虫の移動挙動 (頭打ちと体屈曲の回数) 自発腸蛍光測定 平均排出サイクル長 線虫におけるMWCNTの転座と分布 	<p><u>miRNAは線虫におけるMWCNT毒性の制御に関与する</u></p> <ul style="list-style-type: none"> 検出されたSOLiD配列は20と22のヌクレオチドの間に分布した。 検出されたSOLiD順序の大部分は、染色体IIとXに局限された。 <p><u>MWCNT暴露による異常制御されたmiRNA発現</u></p> <ul style="list-style-type: none"> 本研究で55の差別的に表示されたmiRNAが確認された。うち21は増加し34は減少していた。 SOLiD塩基配列決定法とqRT-PCRで検出されるmiRNAの発現の間に有意な相関が認められた。 <p><u>MWCNT暴露された線虫における異常制御されたmiRNAのための目標とされた遺伝子の予測と遺伝子存在論の評価</u></p> <p><u>MWCNT暴露された線虫で異常制御されたmiRNAのために予測された目標とされた遺伝子によって媒介される信号経路の分析</u></p> <ul style="list-style-type: none"> MWCNTに暴露された線虫で、少なくとも増加したmiRNAに対し19の、減少したmiRNAに対し13の信号経路が同定された。 <p><u>MWCNT暴露された線虫における若干の異常制御されたmiRNAの突然変異は、第2の目標とされた器官の機能を変えた</u></p> <ul style="list-style-type: none"> 1mg L-1MWCNTに対する長期被曝の後、野生型線虫のひなサイズは減少し頭打ちと体屈曲の回数は減少した。 <p><u>MWCNT暴露された線虫における若干の異常制御されたmiRNAの突然変異は、一次性の目標とされた器官の機能を変えた</u></p> <ul style="list-style-type: none"> MWCNTに暴露されたmir259、mir61/250、mir42-44、mir35とmir355変異体は、MWCNT暴露された野生型N2より顕著な腸自己蛍光と腸ROS産生を誘発した。一方、MWCNT暴露されたmir45、mir51、mir35-41変異体は、野生型N2と比較してそれを減少させた。 <p><u>mir259とmir51変異体におけるMWCNTの分布と転座</u></p>	<ul style="list-style-type: none"> 長期のin vivo MWCNT暴露は、分析システムとしての線虫のmiRNAターゲットの発現パターンを変える。 MWCNTのin vivo転座と毒性の制御において、MWCNTに対して特定されたmiRNAターゲットは重要な役割を演じるとともに、MWCNTの転座と毒性を正にも負にも制御できる。 腸の発達と排出の挙動は、目標miRNA変異体のMWCNT毒性に対して、感受性や抵抗性の制御において重要な役割を演じる。 今後、MWCNTに暴露された

			<ul style="list-style-type: none"> ・小RNA抽出とSOLiD塩基配列決定法 ・生命情報科学分析 ・逆転写と定量的リアルタイムPCR 	<ul style="list-style-type: none"> ・MWCNTへの長期被曝の後、MWCNTは、mir 259変異体 (n4106) 中の腸と性腺、受精囊などの生殖器に大量に蓄積していた。 ・mir259 (n4106) 変異体の尾部領域には、特に大量のMWCNTが堆積されていた。 <p><u>MWCNT暴露されたmir259とmir51変異体の排出挙動</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ・MWCNT暴露の後、mir259 (n4106) 変異体は野生型N2のそれと比較して、長い排出サイクルを示したが、ミール-51 (n4473) 変異体は短い排出サイクルを示した。 <p><u>MWCNT暴露された線虫においてmir259とmir51のための目標とされた遺伝子の予測と遺伝子存在論の評価</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ・排出挙動の制御に必要とされる遺伝子としてmir259に対して目標とされた遺伝子は、mig-2 encoding Rho/Rac family GTPaseであった。 ・mir51に対して目標とされた遺伝子は、unc-36 encoding voltage-gated Ca²⁺ channel α2サブユニットであった。 ・これらは、mir259とmir51は、MWCNTに暴露された線虫において、反対方向かあるいは、異なる生物学的プロセスに対する影響を有することを意味する。 	<p>線虫で特定された異常制御されたmiRNAに対応するmRNAターゲットの特定に注力しなければならない。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・これによって、哺乳類の動物とヒト細胞系列からのデータと線虫からのデータを比較できるようになる。
--	--	--	--	--	--

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整 法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間試験方法	試験結果	結論
MW CNT -9	Kim JS, Sung JH, Choi BG, Ryu HY, Song KS, Shin JH, Lee JS, Hwang JH, Lee JH, Lee GH, Jeon K, Ahn KH, Yu IJ Inhal Toxicol. 2014 Mar; 26(4):222-3 4	In vivo genotoxicity evaluation of lung cells from Fischer 344 rats following 28 days of inhalation exposure to MWCNT, plus 28 days and 90 days post-exposure (MWCNT の28日吸入 暴露後と暴 露後28日、90 日における にフィッ シャー344ラ ットの肺細胞 におけるin vivo遺伝毒性 評価)	■対象物質： MWCNT ・ Hanwha Nanotech, Inc (Incheon、韓 国) から入手 ・商品名:CM-100、 ・径:10~15nm、 ・長さ:~20µm ・炭素純度:95% 以上 ・Fe:2wt%以下 ・Co:2wt%以下 ・Al ₂ O ₃ :4wt%以 下 ・比表面積: 224.9m ² /g ・エアロゾル化 CNT の長さの分布 (300個をTEM 測定); 68~1517nmの 範囲で個数基準 中間値は330nm、 幾何標準偏差は 1.72nm (超音波プロセ スによるエアロ ゾル化によって 短くなった)	■試験生物:SPFフィッシャー344 ラット(F344/N Slc)各群25匹 ・週齢:8週(実験開始日) ・体重:155g(雄)と130g(雌) (実験開始日) ■試験方法 ・暴露方法:鼻のみからの吸入曝 露 ・暴露期間:6h/d×5d/w×28d ・回復期間:0, 28, 90日 ・暴露濃度(目標濃度): 低用量群:0.2mg/m ³ 中間群:0.5mg/m ³ 高用量群:1.0mg/m ³ 対照群:空気のみ暴露 ■毎日の検査項目: ・呼吸、皮膚、行動、鼻、尿生殖 器などの変化 ・体重測定:購入時、グループ化 時、暴露前1日、吸入暴露と回復 の間週1回、死体解剖の前に計量 ■測定・調査項目 ・BALFの調査(アルブミン、タン パク質、LDH、H ₂ O ₂ と炎症性サイ トカイン) ・細胞、マクロファージ、多形核 細胞とリンパ球の全数 ・H ₂ O ₂ 、GHS、アルデヒド ・炎症性サイトカイン(TNF-α、 TGF-13、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、 IL-10、IL-12、IFN-γ) ・肺へのMWCNTの沈着 ・細胞懸濁液中の生菌数 ・単一の細胞ゲル電気泳動分析(コ	■実績暴露濃度(mg/m ³) ・低濃度室:0.17+0.00 ・中間濃度室:0.49±0.00 ・高濃度室:0.96±0.01 ・吸入室中のMWCNTs長さ分布: 68-1517nm ■DNA損傷の測定;OTM値(Olive Tail Moments) ・実験期間中、死亡、臨床異常、有意な体 重変化は見られなかった。(各群;雄15 匹、雌10匹) ・OTM値:(以下は順に対照群、低、中間、 高用量群の値、日数は暴露後の日数) 雄ラットの0日:13.62、28.43*、34.17*、 44.22* 雄ラットの90日:14.89、17.52、17.16、 18.36* 雌ラットの0日:19.32、27.93*、26.13*、 33.72* 雌ラットの90日:14.07、16.54、20.57*、 21.44* *は統計的に有意に高い(p<0.05)事 を示す ■BAL液体の測定 ■ROS ・雄ラットの中間濃度では、暴露後0日目に、 高用量群では0、28日目H ₂ O ₂ は増加し た。 ・雌ラットでは、すべての時点とMWCNT 濃度でH ₂ O ₂ の変化はなかった。 ・MDA、4HHE、ヘキサナールとGSHは、 対照群と暴露群では相違はなかった。 ■炎症性のサイトカイン・レベルの測定 ・細胞、マクロファージ、多形核白血球、	・MWCNTへの 暴露によっ て、ラットの BALF中の OTMは増大し た。 ・高用量群の雄 と、中間群と 高用量群の雌 のラットで は、暴露後90 日でもDNA損 傷は保持され た。 ・雄ラットの H ₂ O ₂ は、中間 群の暴露後0 日と高用量群 の暴露後の0 日、28日で高 かった。 ・雌ラットは、 H ₂ O ₂ の変化を 示さなかつ た。 ・BAL液の炎症 性のサイトカ インは、有意 な相違を示さ なかった。 ・肺細胞に堆積 する短長 MWCNTは、 暴露後の90日

				メットアッセイ;遺伝子損傷)	リンパ球の全数の増加は、0日目と28日目で観察されなかった。 ■ ・MWCNTは、28日の吸入暴露の後、胸膜に堆積していた。 ・雄では、暴露後28日、90日でも、MWCNTの沈着は持続した。	まで持続的だった。 ・肺細胞を短いMWCNTに暴露することは、遺伝毒性を誘起するかもしれない。
--	--	--	--	----------------	--	--

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整 法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
MW CNT -10	Wang X, Shannahan JH, Brown JM Inhal Toxicol. 2014 Mar; 26(4):240-9	IL-33 modulates chronic airway resistance changes induced by multi-walled carbon nanotubes (IL-33は、 多層カーボ ンナノチュ ーブによっ て誘起され る慢性気道 抵抗変化を 調節する)	<ul style="list-style-type: none"> ■対象物質： <ul style="list-style-type: none"> ・MWCNTs ・NanoTech Labs, Inc. (Yadkinville, NC)より入手 ・ドライMWCNTs ・径：22.5±1.3 nm ・長さ：10-100µm ・比表面積：113.10m²/g ・C:99.6at% ・Fe:0.04at% ・懸濁液中ζ電位：-44.6mV ・流体力学径：180nm (DLSによる) ■試料調整 <ul style="list-style-type: none"> ・10%表面活性物質を含む食塩水中で安定に分散 	<ul style="list-style-type: none"> ■試験生物：2種 <ol style="list-style-type: none"> ① 雄C57BL/6マウス。週齢：8週 ② IL-33-/- (欠損)マウス ■投与方法： <ul style="list-style-type: none"> ・口咽頭吸引 (麻酔後単回) ・媒体：表面活性剤含有食塩水 ・投与量：4mg/kgbw ・試験期間：暴露後30日 ■調査項目： <ul style="list-style-type: none"> ・肺機能、メタコリン誘発試験、アルブテロール処理 ・肺疾患に関するコルチコステロイド処理の効果 ・BALF調査と肺組織観察 ■肺機能試験 測定項目： <ul style="list-style-type: none"> ・EKG測定 (心電図) でチェック ・Rn (中心気道抵抗) とR (気道、肺組織、胸壁抵抗の合計) 測定 ■メタコリン誘発試験 <ul style="list-style-type: none"> ・メタコリン (1.5、3、6、12、24mg/ml) をエアロゾル暴露 ・暴露時期と時間：MWCNT 曝露後30日に10秒間暴露 ■アルブテロールとメチルプレドニゾロン処理 <ul style="list-style-type: none"> ・MWCNT曝露後30日に20秒霧状硫酸アルブテロールに暴露 ・MWCNT点滴注入前30分と後7、14、21、28日にメチルプレドニゾロンによる処理は、 	<ul style="list-style-type: none"> ■MWCNT注入後の病理学的観察と肺機能の変化 <ul style="list-style-type: none"> ・C57BL/6マウスでは、注入後30日で、BALFの全細胞は増加、好酸球は僅かに増加。間質炎症細胞数の増加と初期の肉芽腫形成を示した。 ・IL-33-/- マウスでは、BALFの全細胞数、肺胞マクロファージ、好中球数は増加せず、好酸球増加症は減少。間質炎症細胞の流入は、軽度。 ・コラーゲン堆積の増加はIL-33-/- miceと比較してC57BL/6マウスの気道周辺で観察された。 ・両マウスとも、暴露後粘液産生は増加せず。 ・C57BL/6マウスでは、R、Rnとも増加したが、IL-33-/- マウスでは増加しなかった。 ■メタコリン誘発試験結果 <ul style="list-style-type: none"> ・C57BL/6マウスでは、メタコリン24mg/mlの投与で、R、Rnとも顕著に増加した。これはMWCNTがAHR(気道反応過敏)を悪化させたことを示す。 ・IL-33-/- マウスでは、R、Rnとも溶媒と同じ効果であり、AHRは増加しなかった。 ■アルブテロールとメチルプレドニゾロン処理 <ul style="list-style-type: none"> ・アルブテロール処理は、MWCNTによって誘発されたRとRnの増加を逆転させなかった。 ・メチルプレドニゾロンの腹注によっては、RまたはRnは増加しなかった。 ・メチルプレドニゾロンによる処理は、 	<ul style="list-style-type: none"> ・C57BL/6マウスへのMWCNT点滴注入後30日で、ベースライン肺機能、病理学、AHRは変化した。 ・一方、IL-33-/- マウスは、この期間でベースライン肺機能、病理学、AHRの変化を示さなかった。 ・アルブテロール処理は、マウスの肺循環抵抗増加を軽減しなかった。 ・コルチコステロイド・メチルプレドニゾロン処理は、MWCNTによって誘起された肺病理学的変化を減らすとともに、MWCNTに誘発される肺抵抗の変化を予

				<p>レドニゾロン1mg/kgbwを腹注。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 30日後にRとRnを測定 ■ BAL採取と細胞計数 ・ 測定項目：BALF中全細胞数 ■ 肺組織病理学的観察 	<p>MWCNTによって誘発されたBALFへの炎症細胞の流入を緩和しなかった。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ メチルプレドニゾロン処理C57BL/6マウスの気道の近くで、炎症細胞流入と初期の肉芽腫形成の減少が認められた。 ・ MWCNTによって誘発されたコラーゲン堆積は、メチルプレドニゾロン処理によって減少した。 ・ 粘液産生は、MWCNT曝露によっても、メチルプレドニゾロン処理によっても変わらなかった。 	<p>防する。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ MWCNT点滴注入後の慢性肺循環抵抗、病理学、AHRの変化は、主として炎症とIL-33経路に起因すると考えられる。
--	--	--	--	---	---	---

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物/投与方法 期間/試験方法	試験結果	結論
MW CNT -11	Siegrist KJ, Reynolds SH, Kashon ML, Lowry DT, Dong C, Hubbs AF, Young SH, Salisbury JL, Porter DW, Benkovic SA, McCawley M, Keane MJ, Mastovich JT, Bunker KL, Cena LG, Sparrow MC, Sturgeon JL, Dinu CZ, Sargent LM Part Fibre Toxicol. 2014 Jan 30; 11:6	Genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes at occupationally relevant doses (労働環境暴 露に相当する 投与量におけ る多層カーボ ンナノチュー ブの遺伝毒性)	<p>■対象物質：</p> <ul style="list-style-type: none"> 多層カーボンナノチューブ(MWCNT) Nanolab社製 化学蒸着法で製造 希硫酸(3:1v/v)中1時間超音波洗浄により、Feを除去後、$0.2\mu\text{m}$のフィルターで濾過、洗浄して使用 入手のままのMWCNTとの比較で、酸洗MWCNTのラマン分光におけるD帯域は、広くて高い相対強度を示し、機能化の程度(Gピークに対するDピークの強度の比率)は、入手MWCNTで0.59、酸洗MWCNTで0.81 これらは、酸処理がMWCNTのカルボン酸基の数を増加させたことによる。 酸洗MWCNTの化学組成は、Fe; 0.03、Co ;0、Ni; 0%であった。 酸洗・ろ過によって長さは、入手 	<p>■試験細胞：2種</p> <ol style="list-style-type: none"> 不死化ヒト気管支上皮細胞 (BEAS-2B) <ul style="list-style-type: none"> 紡錘体の健全性調査に使用 培養液：10%血清補充 DMEM 初代小気道呼吸肺胞細胞 (SAEC) <ul style="list-style-type: none"> 正常な細胞集団の応答測定に使用 培養液：Cabrex媒体 <p>■処理プロトコル</p> <ul style="list-style-type: none"> 暴露時間：24h (1)2)とも) 暴露後24hで分析 (1)2)とも) 陽性対照：V_2O_5 暴露濃度： <ul style="list-style-type: none"> -MWCNT : 0 (対照群) 0.024、0.24、2.4、$24\mu\text{g}/\text{cm}^2$、 -$\text{V}_2\text{O}_5$: $0.31\mu\text{g}/\text{cm}^2$ <p>■測定/分析項目：</p> <ul style="list-style-type: none"> アポトーシス、壊死 (紡錘体の健全性)、中心体数、染色体数 生存度とアポトーシス <ul style="list-style-type: none"> このための付加的陽性コントロール：1.68Molar DNase デオキシリボヌクレアーゼ 紡錘体分析 蛍光in situ雑種形成 (FISH) による染色体数 コロニー形成 	<p>■紡錘体破壊</p> <ul style="list-style-type: none"> 酸洗MWCNT処理は、用量依存的な紡錘体破壊を誘起した。破壊された紡錘体は、主に単極だったが、5-10%が多重極だった。 <p>■染色体数</p> <ul style="list-style-type: none"> FISH分析によれば、対照SAEC細胞の染色体1または4の異数性は$2.25\pm 1.0\%$であった。 MWCNT処理SAEC細胞では、V_2O_5で処理された細胞に匹敵する異数性を示した。 異常な染色体の発生率は、MWCNT処理によって対照群の$2.25\pm 1.0\%$から有意に上昇した： <ul style="list-style-type: none"> $62\pm 7.0\%$ ($24\mu\text{g}/\text{cm}^2$) $59.0\pm 6.0\%$ ($2.4\mu\text{g}/\text{cm}^2$) $49\pm 6.0\%$ ($0.24\mu\text{g}/\text{cm}^2$) $42\pm 10\%$ ($0.024\mu\text{g}/\text{cm}^2$) $0.31\mu\text{g}/\text{cm}^2$ V_2O_5処理では、異数体細胞は$67\pm 6.0\%$であった。 MWCNT処理細胞の染色体変化は、主に染色体1または4のいずれかの増加であった。 <p>■MWCNTの紡錘体装置との相互作用</p> <ul style="list-style-type: none"> MWCNTは、細胞質と核の中で観察された。 MWCNTは、中心体との強い関連も有した。 MWCNTは、中心体 (の外側) だけでなく中心体の構造の内側に結びついていた。 <p>■生存度とクローン増殖</p> <ul style="list-style-type: none"> V_2O_5処理は、SAECとBEAS-2B細胞の生存度を減少させ、0.024、0.24、2.4、24 	<ul style="list-style-type: none"> 0.024、0.24、2.4、$24\mu\text{g}/\text{cm}^2$のMWCNT暴露は、24時間後に、中心体の破壊、紡錘体異常、異数体、染色体数などを用量依存的に増加させた。 単極紡錘体が、破壊された細胞分裂の95%を占めた。 カーボンナノチューブは、微小管、DNAと集積するか、中心体構造内に集積されていた。 細胞周期分析によれば、MWCNT処理は対照群と比較して、S期細胞を増大させ、G2期細胞を減少させた。これは、細胞周期におけるG1/Sブロックを示す。 職業上ありうる暴露レベルで、MWCNTは紡

			<p>MWCNTの5499 nmから酸洗 MWCNTの825nmに減少した（径は双方15nmであった）。</p>	<p>・ DNA含有量のための細胞周期（サイクル）分析</p>	<p>$\mu\text{g}/\text{cm}^2$のMWCNT暴露は、暴露後72時間で、SAEC細胞の生存度を低下させた。</p> <p>■細胞周期</p> <p>・ 24時間、$24\mu\text{g}/\text{cm}^2$のMWCNT処理は、対照群の32.11%から40.1%までS期中の細胞割合を増加させた。</p>	<p>錘体を破壊する。</p>
--	--	--	--	---------------------------------	---	-----------------

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
M W CN T- 12	Sargent LM, Porter DW, Staska LM, Hubbs AF, Lowry DT, Battelli L, Siegrist KJ, Kashon MML, Mercer RR, Bauer AK, Chen BT, Salisbury JL, Frazer D, McKinney W, Andrew MM, Tsuruoka S, Endo MM, Fluharty KL, Castranova V, Reynolds SH Part Fibre Toxicol. 2014 Jan 9 ;11:3	Promotion of lung adenocarcino ma following inhalation exposure to multi-walled carbon nanotubes (多層カーボ ンナノチュー ブの吸入暴露 に伴う肺腺 癌の促進)	<p>■対象物質： MWCNT</p> <ul style="list-style-type: none"> 保土谷化学工業より入手 流動触媒化学蒸着法により合成。 金属不純物：1.32% (内、Fe：1.06%) <p>■MWCNT吸入暴露とエアロゾル特性</p> <ul style="list-style-type: none"> McKinney(2009)が報告した音響作用による全身吸入暴露装置を使用 質量基準空気力学的径質量中央値の幾何平均と標準偏差)：1.59μm、1.69 数基準空気力学的径幾何平均数中央値)：0.42μm 	<p>■試験生物：</p> <ul style="list-style-type: none"> 雄B6C3F1マウス：週齢：6週 <p>■投与方法：2段階</p> <p>①MCA (methylcholanthrene)； 10μg/gBW、腹腔内注射。またはコーンオイルの単回投与</p> <ul style="list-style-type: none"> MCA：DNA損傷(がんのイニシエーション)作用がある薬剤 <p>② MWCNT暴露</p> <ul style="list-style-type: none"> 暴露時期：①の投与の1週後 暴露方法：全身吸入暴露 エアロゾル濃度：5mg/m³ 暴露時間：5h/d×15d <p>■試験期間：暴露後17ヵ月</p> <p>■暴露の4ケース；</p> <ul style="list-style-type: none"> 大気のみ MCAのみ MWCNTのみ <p>MCA+MWCNT</p> <p>■観察項目：</p> <ul style="list-style-type: none"> 体重、皮膚病変、毛皮の乱れ、嗜眠、ふるえ、陰茎脱出または脱肛、不規則な運動または麻痺 肺組織中の異物(MWCNT)；組織を消化し紫外/可視分光分析 肺組織、検死(腫瘍と病変)、限局性腺腫様肺胞増殖計数 中皮腫のためのマーカーの免疫蛍 	<p>■組織病理学評価、高分解能暗視野撮像から</p> <ul style="list-style-type: none"> MWCNT暴露マウスの初期のMWCNT肺負荷は、31.2\pm0.9μgMWCNT/lungであった。 MWCNTと推定される外来物は、MWCNT暴露とMCA + MWCNT暴露群のすべてのマウスの肺に存在し、長さは、約0.5~5μmであった。 それは、マクロファージ(推定)または気道の内側を覆う上皮細胞の中に、あるいは、気道上皮に隣接した結合組織中のマクロファージの中に存在した。また横隔膜にもMWCNTを示した。 <p>■肺における増殖とマクロファージ浸潤</p> <ul style="list-style-type: none"> 限局性腺腫様肺胞上皮増殖のマウスの発生率、終末細気管支/肺胞管領域におけるマクロファージ浸潤、外来物、多病巣性腺腫様細気管支肺胞性増殖は、MWCNT暴露群で増加した。 限局性腺腫状過形成の発生率は、MCA + MWCNT群で最も大きかった。 <p>■肺腺腫と腺癌</p> <ul style="list-style-type: none"> 細気管支肺胞性腺腫、細気管支肺胞性腺癌、それらの合計発生率または腫瘍のマウスの数は、MCA + MWCNT群で最大だった 最後に殺された、MCAとMCA + MWCNT群の細気管支肺胞性腺腫(adenomas)の発生率はそれぞれ、33%、76%であった。一方、大気処理群は11%、MMWCNT処理群は18%であった。 MCA処理とMCA + MWCNT処理群の細 	<ul style="list-style-type: none"> MWCNT暴露は、B6C3F1マウスで開始された肺細胞の成長と新生物形成の進行を促進する。 この研究で用いた31.2μg/マウスのMWCNT肺負荷は、ヒトの職業被曝のレベルに近い。 MWCNTに対するヒトの暴露を制限するための注意が払わなければならない。

			<p>光検出：MWCNTとMCA暴露マウスの、腹膜および精巣上体の表面の肉腫性腫瘍</p> <ul style="list-style-type: none"> ・暗視野高分解能光顕撮像；肺組織中のMWCNTの検出（光散乱によって光って見える） 	<p>気管支肺胞性腺癌(adenocarcinomas)の発生率はそれぞれ、22%、62%であった。一方、大気処理群は13%、MWCNT処理群は14%であった。</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ 漿膜腫瘍 ・悪性肉腫性中皮腫と形態学的に一致する悪性漿膜腫瘍は、MCA + MWCNT群の5匹のマウスとMCA群の1匹のマウスで見られた。 	
--	--	--	---	---	--

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
MWCNT-14	Kido T, Tsunoda M, Kasai T, Sasaki T, Umeda Y, Senoh H, Yanagisawa H, Asakura M, Aizawa Y, Fukushima S Inhal Toxicol. 2014 Oct; 26(12):750-8	The increases in relative mRNA expressions of inflammatory cytokines and chemokines in splenic macrophages from rats exposed to multi-walled carbon nanotubes by whole-body inhalation for 13 weeks (多層カーボン ナノチューブ に13週間全身 吸入暴露され たラットにお ける脾臓マク ロファージの 炎症性サイト カインとケモ カインの相対 的mRNA発現 の増加)	■対象物質：繊維性 直線状MWCNT ・保土谷化学工業か ら購 入 ・浮動化学蒸着法 (CVD) により合 成 ・更なる精製/篩い分 けなしで使用 ■メーカー仕様： ・C純度：>99.6% と>99.8% (2種) ・平均径：40-90nm ・アスペクト比：100 以上 ・比表面面積： 24-28m ² /g ■分析結果： ・バルク平均幅： 90.7nm 長さ：5.7μm	■試験生物： F344/DuCr1Crljラット (雄と雌) ・週令：6週 (暴露開始時) ・暴露方法：全身吸入暴露 ・暴露濃度：0、0.2、1、 5mg/m ³ ・暴露時間： 6h/d×5d/w×13w ・暴露終了の翌日に脾臓を 摘出 ・対照群：大気暴露 ・組織病理学的分析 ■脾臓マクロファージとリ ンパ球 のサンプリングとRNA の抽出 ・試験方法： ・試験生物：脾細胞 ・培養液： 100Upenicillin/ml、 100μg streptomycin/ml、5%熱 失活ウシ胎児血清を含 むRPMI 1640培地 ・培養時間：1時間 ・RT-PCR/測定項目： ・マクロファージに対し て：TNF-α、IL-1β、IL-6、 IL-10、MCP-1、MIP-1α のmRNA発現 ・Tリンパ球に対して： IL-2、TGFβの発現	■目標暴露濃度：実績濃度 ① 0.2mg/m ³ ：0.20±0.02mg/m ³ ② 1.0mg/m ³ ：1.01±0.11mg/m ³ ③ 5.0mg/m ³ ：5.02±0.25mg/m ³ ■試験結果 ・MWCNTに暴露された雄、雌のラット に、最終的な体重と相対的な脾臓重量 (mg/g) の相違はなかった。 ・MWCNTに暴露されたラットの脾臓組織 でMWCNTの沈着が観察された。 ・IL-10の発現は、暴露の影響を受けなかつ た。 ・5mgMWCNT/m ³ 処理群のIL-1βの発現 レベルは、対照群より有意に高かった。 ・0.2～5mgのMWCNT/m ³ に暴露された ラットの細胞のIL-6値は、対照群より 高かった。 ・0.2～5mgMWCNT/m ³ に暴露された雄 ラットの細胞のIL-10発現とは異なり、 雌宿主 (臓器主) のそれは対照群より 有意に大きかった。 ・対照群のIL-6とIL-10発現は、雌ラット より雄のラットの方が大きかったこと は興味深い； ・5mgMWCNT/m ³ に暴露されたラットの 細胞のMIP-1αmRNAレベルは、対照群 より有意に高かった。 ・雄と同様、mRNA MCP-1レベルに対す る有意な影響はなかった。 ・すべてのMWCNT暴露されたラットの 細胞のIL-2のレベルは、対照群より有 意に低かった。この発現の減少は、0.2、 1.0mg/m ³ MWCNTで1/14、	・MWCNT暴露が 肺の免疫システ ムにおよぼす影 響は、脾臓に由 来するかもしれ ない。 ・13週間MWCNT に暴露されたラ ットの脾臓マク ロファージとリ ンパ球のいくつ かの重要なサイ トカイン/ケモ カインのmRNA 発現の評価は、 これらの宿主 における全身性 炎症反応応答の 誘発の可能性を 示した。 ・脾臓マクロファ ージで起こった 変化は、炎症性 サイトカインの 誘発などの同様 の影響が、肺胞 マクロファージ にも起こり得る ことを示唆す る。 ・これらの宿主 からのTリンパ 球のIL-2

				<ul style="list-style-type: none">• Calibrator 正規化された相対的な比率で表示	<ul style="list-style-type: none">• 5mgMWCNT/m³で1/10であった;• MWCNT暴露のレベルによるTGF-β1発現の有意な相違はなかった。• 全てのMWCNT濃度で、IL-2発現は対照群より有意に低かった。	mRNA発現の分析は、粒子によって誘起される毒性は、in situで抗腫瘍活動と全体の免疫監視に影響を与え得ることも示唆する。
--	--	--	--	--	--	---

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
MW CNT -15	Ursini CL, Cavallo D, Fresegna AM, Ciervo A, Maiello R, Buresti G, Casciardi S, Bellucci S, Iavicoli S Biomed Res Int. 2014;2014:359 506	Differences in cytotoxic, genotoxic, and inflammatory response of bronchial and alveolar human lung epithelial cells to pristine and COOH-functionalized multiwalled carbon nanotubes (無修飾なら びにCOOH官 能基付加多層 カーボンナノ チューブの気 管支および肺 細胞ヒト肺上皮 細胞に及ぼす 細胞毒性、遺伝 毒性および炎 症性応答の相 違)	対象物質：2種 ①無修飾MWCNT ・純度：～97.37% ・不純物：Cl 0.20%、 Fe 0.55%、Ni 1.86%、S 0.02% ②COOH官能基付 加MWCNT 純度：～97.46% (COOH：5 wt% 以上) 不純物：Al 0.19%、Cl 1.02%、 Co 1.09%、S 0.04% ・ともに、HeJi (中 国) より購入 粒子の基本特性 ・平均直径： ① 32±15 nm ② 24.5±10 nm ・長さ： ① 0.070-7.8µm、 ② 0.029-1.56µm ・比表面積： ① 106.7 m ² /g ② 139.1 m ² /g ・ζポテンシャル (10% FBS-RPMI媒体 中)： ① 9.2±0.5 mV、 ② 110.1±0.4mV、	細胞培養と暴露 試験生物：2種 A) ヒト肺上皮細胞 (A549) (以下、A細胞) B)気管支上皮細胞 (BEAS-2B) (以下、B 細胞) ・培養液： A細胞に対して： 10%FBS補充Rosewell Park Memorial Institute 1640 medium (RPMI 1640) B細胞に対して： Bronchial Epithelial cell Growth Medium (BEGM) ・暴露濃度：1、5、10、20、 40µg/mL 細胞に暴露したMWCNTs ・暴露濃度：40µg/mL ・暴露時間：2、4、8、16、 24時間 ・細胞生存度の測定 (WST-1) 細胞膜健全性 ・LDH放出を測定 ・対照：非暴露細胞 ・陽性対照：1%トリトン X-100に暴露された細胞 コメットAssay ・暴露時間：24h ・暴露の後Fpg修正コメッ	暴露後のナノチューブ分散 ・①は互いに付着して、細胞の上で集塊(弱/強凝集 体)を形成した (A細胞、B細胞とも)。 細胞に暴露したナノ粒子の測定 ・A細胞では、①②とも取込みは最初の2時間は緩 慢だったが、4時間では11%に、24時間では①② に対してそれぞれ25%、32%に達した。 ・B細胞では、MWCNTsの取込みは、①②とも最 初の4時間は緩慢だったが、24時間後に①②に対 して、それぞれ15%と18%に達した。 細胞生存度 ・A細胞に対しては、①②とも生存度をわずかに減 少させた。 ・B細胞に対しては、①は最大濃度でだけ、わずか に減少させ、②は用量依存的に減少させた。 細胞膜健全性 (LDH分析) ・A細胞では、①②への暴露とも、LDH放出は投 与量依存的に増加した。 ・B細胞では、①②への暴露とも、A細胞より大き なLDH放出が認められた。 コメットAssay ・A細胞では、①に暴露されると直接的DNA損傷 は濃度依存的に増加したが、②への暴露では直 接的DNA損傷は誘起しなかった。 ・B細胞では、①②とも用量依存的に直接的DNA 損傷が増加した。 サイトカイン放出 ・A細胞では、②の10、20、40µg/mLの暴露によ ってIL-6とIL-8放出は増加したが①への暴露で は増加しなかった。 ・B細胞では、①の20と40µg/mLの曝露によって IL-8放出が増加したが、IL-6放出は①②とも増 加しなかった。	・①②ともA細胞 の生存度を減 少させた。 ・②は高濃度 (40µg/mL) でB細胞の生 存度を減少さ せた。 ・①②とも膜の損 傷を誘起した。 ・A細胞は①によ って、B細胞は ①②双方によ ってDNA損傷 が引き起こさ れた。 ・10µg/mLの② に暴露された A細胞で、IL-6 とIL-8放出の 増加が確認さ れた。 ・①に20、 40µg/mLで暴 露されたB細 胞では、IL-8 放出が増加し た。 ・B細胞には② が、A細胞には ①が細胞遺伝 毒性を示した、 ・得られた知見

				<p>トアッセイでDNA損傷を評価</p> <p>サイトカインの検出</p> <ul style="list-style-type: none">・ 暴露時間：24h・ 測定項目：IL-6、IL-8、TNFα	<ul style="list-style-type: none">・ A細胞では、②の最も大きな濃度の暴露で、TNFα放出がわずかに増加した。・ B細胞では、①の5μg/mLの場合だけTNFα放出がわずかに増加した。	<p>は、CNT毒性研究のために、異なるエンドポイントと細胞で生体外モデルの使用可能性を示唆する。</p>
--	--	--	--	---	---	---

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間試験方法	試験結果	結論
MW CNT -16, Al ₂ O ₃ ,C B)	Taylor AJ, McClure CD, Shipkowski KA, Thompson EA, Hussain S, Garantziotis S, Parsons GN, Bonner JC PLoS One. 2014 Sep 12; 9(9):e106870	Atomic layer deposition coating of carbon nanotubes with aluminum oxide alters pro-fibrogenic cytokine expression by human mononuclear phagocytes in vitro and reduces lung fibrosis in mice in vivo (カーボンナ ノチューブへ の酸化アルミ ニウム原子層 コーティング は、in vitroで はヒト単核食 細胞における 線維化促進 性サイトカイン 発現を変え、 in vivoではマ ウスの肺線維 症を減らす)	対象物質：4種 ①Al ₂ O ₃ を原子層で コーティング (ALD)した MWCNT ・Al ₂ O ₃ 原子層は Al(CH ₃) ₃ と水との 逐次飽和反応によ ってMWCNTの上 に製膜 ②コーティングなし のMWCNT ・MWCNT：化学蒸 着法で合成 ・長さ：0.5-40μm 径：10-30nm ・Helix Materials Solutionsより購入 ③Al ₂ O ₃ ナノ粒子 ・径：～60nm) ・Sun Innovationsよ り購入。 ④Carbon blackナノ 粒子 ・径：8nm ・Columbian Chemicalsより購 入 供試材のコーティン グ厚さ：～20nm Al ₂ O ₃ コーティング によって流体力学 直径は増加し、ゼ ータ電位は減少し た(水性培地)	<in vitro試験-1> ・試験生物：ヒトTHP-1細胞 ・ATCC社から購入 ・培養液：10%ウシ胎児血 清を含むRPMI-1640 培 地 ・対象物質：①、②、③、 ④(③：陰性対照、④陽 性対照) ・暴露濃度：5、10、50、 100μg/ml ・暴露時間：24h <in vitro試験-2> ・試験生物：CD 14+細胞 ・健康人の血液から分離し て、①、②、③、④に暴 露 <in vivo試験> ・試験生物：C57BL6マウ ス ・対象物質：①、② ・①の層厚：約20nm ・投与方法：口腔咽頭吸引 による単回投与 ・投与量：4mg/kg ・溶媒：0.1%Pluronic表面 活性剤溶液と 0.1%Pluronic液 ・試験期間：暴露後1、28 日 ・採取試料：BAL液、右肺 の中央と尾部葉(mRNA 分析用)、左肺(肺コラ ーゲン堆積観察用)	・①と②のナノ粒子は、THP-1マクロフ ァージによって貪食された。 ・超音波で処理したMWCNTsは、超音波 処理のない場合に比べて大きな細胞毒 性を示した。 ・Al ₂ O ₃ 原子層でコーティングはTHP-1 細胞におけるMWCNTの細胞毒性を変 化させた。 ・①は、THP-1細胞においてIL-18、IL-6、 OPN、TNF-αの分泌は増加させた ・②は、THP-1細胞によるIL-18産生を増 加させたが、IL-6、OPN、TNF-αの分 泌は減少させた ③はわずかに用量依存的にIL-18を増 加させた(③との対比で)。 ④は、IL-6、OPNとTNF-αを増加させ た。 ・①は、IL-18を増加させたが、ヒトの末 梢血単球によるOPN分泌を減少させ た。 ・Al ₂ O ₃ コーティングはMWCNTsの線維 化促進性を減少させたが、急性炎症誘 発性は変化させなかった。 ・Al ₂ O ₃ コーティングは、マウスの肺中の 炎症誘発性および線維形成促進性サイ トカインのレベルを減少させた。	・MWCNTへのアル ミナコーティ ングは、ヒトの 単核細胞とマウ スの肺のサイト カイン産生を変 えるとともに、 肺線維症も減少 させる。 ・マウスの肺の、 線維形成の減少 はIL-18、IL-6、 OPN、TNF-αの mRNAの減少、 またはタンパク 質レベルと相関 していた。 ・in vitroでアルミ ナコーティング したMWCNTで 処理された単核 細胞のIL-6、 OPN、TNF-αの 減少したレベル は、同試料曝露 後のマウスの肺 におけるサイト カインの減少レ ベルを予測し た。 ・以上より、アル ミナコーティン グは、吸入曝露 の後人間の肺線 維症に対して低

			(RPMI) 中)	<測定/分析項目> BALF分析 肺線維症の評価 細胞生存度の測定 ELISA分析		いリスクを示す。
--	--	--	-----------	---	--	----------

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質試料 調整法	試験生物投与方法・ 期間試験方法	試験結果	結論
M W CN T -17	Kasai T, Gotoh K, Nishizawa T, Sasaki T, Katagiri T, Umeda Y, Toya T, Fukushima S Nanotoxicolog y. 2014 Mar; 8(2):169-78	Developmen t of a new multi-walled carbon nanotube (MWCNT) aerosol generation and exposure system and confirmation of suitability for conducting a single-exposur e inhalation study of MWCNT in rats (多層カー ボンナノチ ューブ (MWCNT) エアロゾル の生成・暴露 システムに 関する新規 開発とラッ トを用いた MWCNTの 単回暴露吸 入研究によ るその適合 性の確認)	■対象物質： MWCNT ・保土谷化学 工業から 購入 ・CVD法で製 造された ままで使 用 ■特性値-1 (メーカ ー仕様) ・C純度： 99.8% ・アスペクト 比：100超 ・名目平均 径： 40-90nm ■特性値-2 (本研究 でのバル ク MWCNT のSEM観 察結果) ・平均長： 5.7 μm； 中央値 4.8μm、範 囲 0.9-33.4μ m ・平均幅： 90.7nm	■試験生物： 雄 F344/DuCrI CrIj ラット ・週齢：4週 ■試験方法： ・MWCNTエアロ ゾル吸入暴露 ・暴露方法：6時間/ 日(単回) ・暴露濃度：5mg/m ³ ・試験期間：暴露終 了0、1、7、28日 後に検死 ■観察/検査項目： ・肺の光顕微鏡検査 ・臨床徴候と死亡率 (毎日) ・体重と摂食量(毎 週) ・BALFの全細胞、 好中球数 ・LDHとアルブミン ・気管支関連リンパ 系組織(BALT) ■エアロゾル発生装 置 (「サイクロン篩 法」) ・上下を絞った円筒 容器にCNTを供給 し、側下部から空気 を吹き込み、上昇ス パイラル気流により CNTを分散し、重力	■質量濃度と調節・制御の安定性 ・MWCNTエアロゾルは、6時間着実に発生した。 ・目標濃度：実績濃度 0.2mg/ m ³ ：0.20±0.01mg/m ³ 、 1mg/ m ³ ：1.00±0.03mg/m ³ 5mg/ m ³ ：5.07±0.10mg/m ³ ・目標濃度ごとの質量空力中央径と平均個数濃度 (#/cm ³) 0.20 mg/m ³ ：1.33μm、25.9個 1 mg/m ³ ：1.04μm、123.0個 5 mg/m ³ ：1.21μm、657.7個 ・エアロゾル化MWCNTsの長さ：5.7μm、平均幅：130.5nm アスペクト比：44 ■臨床観察、BALF分析と病理所見 ・MWCNTに6時間暴露されたラットは、不規則な呼吸、呼吸 困難、異常行動などの臨床徴候を示さなかった。 ・暴露された動物は、暴露期間の間も暴露後も時折身繕いや顔 面洗浄行動を示した。動物は試験期間の間、発育異常を示さ なかった。 ・対照群と暴露群の間で腫瘍の相違は見いだされなかった。 ・6時間暴露終了時では、肺のほとんど全てのMWCNTはナノ スケールの繊維で、肺のMWCNT繊維の形態は、吸入室のそ れと同様だった。 平均長：8.1μm(中央値6.8μm、範囲：0.7-36.5 μm) 平均幅：100.3nm(中央値88.1 nm、範囲：42.4-505.1 nm) ・好中球の数は、0日、1日で有意に増加し、その後7日、28日 後で減少した。LDHとアルブミンは、暴露後1、7、28日で、 対照群との比較で有意に上昇した。 ・MWCNTsは、暴露群の肺(気管支と肺胞腔と肺胞壁)で、 黒色の孤立した繊維状に堆積していた。 ・いくつかの遊離繊維が気管支と肺胞腔で見いだされたが、 MWCNTは主として肺胞マクロファージ内で検出された。 ・長いMWCNT繊維は、暴露後28日まで肺胞腔で観察された。 ・BALTにおけるMWCNT沈着は、暴露後1、28日で見いださ れた。そのレベルは時間とともに増加した。 ・初期段階の肉芽腫性変化は、暴露28日後に肺で観察された。	・MWCNTを用 いたラットの 吸入暴露研究 を容易にする ために、独自の サイクロン大 気篩エアロゾ ル生成・暴露シ ステムを開発 した。 ・その結果、優れた サイズ分布 を有する 0.2-5mg/ m ³ MWCNTエア ロゾルを、迅速 なフィードバ ック制御で6 時間安定して 発生できるこ とを確認した。 ・性能試験と最終 的な試験の結 果は、OECD ガイドライン によって要求さ れる基準を大 部分満たして、 エアロゾル生 成と暴露シス テムが2~13 週の吸入研究 に使用できる ことを示した。 ・開発した暴露シ

			<p>• アスペクト比：64</p>	<p>と遠心力で分級し、出口上部に設置したフィルターを通過したエアロゾル粒子のみを吸入チャンバーに供給する。</p>	<p>それは、MWCNTを食菌した肺胞マクロファージの集合様の外観を有した。</p>	<p>システムは、この研究に相当である。</p>
--	--	--	--------------------	--	--	--------------------------

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調 整法 /試験用量	試験生物/投与方法 期間/試験方法	試験結果	結論
M W CN T -18	Girtsman TA, Beamer CA, Wu N, Buford M, Holian A Nanotoxicology. 2014 Feb;8(1):17-27	IL-1R signalling is critical for regulation of multi-walled carbon nanotubes-induced acute lung inflammation in C57Bl/6 mice (IL-1R信号は、多層カーボンナノチューブによってC57Bl/6マウスに誘起された急性肺炎の制御に重要である)	<p>■対象物質：2種</p> <p>①低 Ni-MWCNT (LN-MWCNT)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ni : 2.5% • MK Impex Corp, Mississauga, ONより購入 <p>②高 Ni-MWCNT (HN-MWCNT)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ni : 5.54% • Sun Innovations Inc., Fremont, CA, USAより購入 <p>■粒子特性</p> <ul style="list-style-type: none"> •凝集粒径と電位(分散媒中) : LN-MWCNT : 682nm、-11.3mV HN-MWCNT : 429nm、-12mV • HN-MWCNTは、45nmと690nmにピークをもつ二頂 	<p>■試験生物：2種</p> <p>A) Wildtype C57Bl/6 (WTマウス)</p> <p>B) IL-1R^{-/-}マウス</p> <ul style="list-style-type: none"> • 月齢：双方とも2か月 <p>■試験方法：</p> <ul style="list-style-type: none"> • 暴露方法：口頭咽頭吸引 • 分散媒：0.6mg/mlマウス血清アルブミン、0.01mg/ml 1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリンを含むPBS) • 投与量：50µg • 懸濁液量：30µl • 懸濁液濃度：1.67 mg/ml • 試験期間：暴露後28日 <p>■測定・分析項目</p> <ul style="list-style-type: none"> • 全肺洗浄液 (WLL; (Whole lung lavage) • 肺機能検査 • 組織学 • サイトカイン分析 • ヒドロキシプロリン分析 • 明視野鏡検 	<p>MWCNTは、急性の肺炎を誘起する</p> <ul style="list-style-type: none"> • LN-またはHN-MWCNT処理WTマウスのWLLの全細胞数は、対照群との対比で増大し、急性炎症反応を示す。 • HN-MWCNT処理IL-1R^{-/-}マウスでは、対照群との対比で全細胞数は増加した。しかし、増加はWTマウスより少なかった。 • LN-/HN-MWCNT処理WTマウスの気道への多形核白血球と好酸球の流入は、IL-1R^{-/-}マウスでは減少した。 • IL-1R^{-/-}マウスのAMは、WTマウスのAMと同様の粒子取り込みを示した。 • これは、これらの炎症反応は、IL-R^{-/-}AMが粒子と反応しない、あるいは、粒子を取り込めないことに起因するのではなく、むしろIL-18の信号発信の損失に起因することを示唆する。 • LN-と比較してHN-MWCNT暴露によって、好中球はWTマウスでは大きく増加し、IL-1R^{-/-}マウスでは劇的に減少した。 <p>MWCNTは、WLL液に炎症誘発性メディエーターを誘起する</p> <ul style="list-style-type: none"> • WTマウスでは、LN-とHN-MWCNT暴露によって、炎症誘発性サイトカインIL-18、TNFα、IL-6、ケモカインMCP-1の分泌が増大した。 • IL-1R^{-/-}マウスでも、LN-とHN-MWCNT暴露によって、WLLのIL-18、IL-6、TNFαは増大した。 <p>MWCNTによって誘発されたコラーゲン堆積と肉芽腫形成</p> <ul style="list-style-type: none"> • HN-MWCNT処理後7日のIL-1R^{-/-}マウスの肺は、DMまたはLN-MWCNT暴露マウスと比較して、コラーゲン堆積の増加と気管支周囲および血管周囲の炎症を示した。 • 暴露後7日のマウスと比較して、暴露後28日では、進行性のコラーゲン堆積が、IL-1R^{-/-}マウスの肺で観察 	<ul style="list-style-type: none"> • MWCNTは、WTマウスに重篤な急性肺炎を誘起する。 • それはIL-1R^{-/-}マウスでは急速に減少する。 • WTマウスでは、急性炎症反応の回復が観察された。 • 一方、IL-1R^{-/-}マウスでは、MWCNT暴露後28日で、好酸球流入は顕著に増加し、同時に肺循環抵抗も増大した。 • これらは、IL-1R信号は、マウスの肺におけるNi-MWCNTへの急性相炎症反応の除去に重要で、場合によっては走化因子MCP-1とKC発現の減少に起因することを示唆する。 • これらの材料の

			<p>径分布を示した。</p> <ul style="list-style-type: none"> • 双方とも、屈曲とよじれ(kinks)を含むからみ合った構造であった。 	<ul style="list-style-type: none"> • 好酸球ペルオキシダーゼ分析 	<p>された。</p> <p><u>MWCNTは、肺機能の変化を誘起する</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • HN-MWCNTの点滴注入後24時間で、WTマウスは高められた気道反応亢進によって、メタコリン誘発試験に応答した。これは、肺抵抗の増大によって示された。 • 対照的に、IL-1R-/-マウスはWTマウスとの対比で、HN-MWCNTに対する急性の応答が減少した。これは、メタコリン誘発試験によっては、肺抵抗値が増大しなかったことによって示された、 <p><u>Ni-MWCNTは、IL-1R-/-マウスでは減少した急性の気道好酸球増加症をWTマウスに誘起する</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • DM処理マウスと比較して、HN-MWCNT処理WTマウスのWLLへの好酸球の流入は顕著であった。 • 28日で、HN-MWCNTは、IL-1R-/-マウスの好酸球流入を増加させた。 • 一方、好酸球は、28日にHN-MWCNTまたはDM処理WTマウスで検出されなかった。 	<p>毒性学的評価を続ける必要がある。</p> <ul style="list-style-type: none"> • MWCNTへの暴露からの急性応答とその回復において、インフラマソーム活性化は重要である。
--	--	--	--	---	--	--

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
MW CNT -19	Dong C, EIdawud R, Sargent LM, Kashon ML, Lowry D, Rojanasakul Y, Dinu CZ Environ Sci Nano. 2014 Dec 1; 1(6):595-603	Towards Elucidating the Effects of Purified MWCNTs on Human Lung Epithelial cells (ヒト肺上皮細胞に及ぼす精製MWCNTの影響の解明に向けて)	<p>■対象物質：MWCNT</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ Nanolab incより入手 ・ 硫酸+硝酸（容積比3:1）処理によって精製（精製MWCNT）。 ・ 精製条件：23°C×1h <p>■蛍光タンパク質によるMWCNTsの機能化</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 精製MWCNTは、EDCとNHSを用いてAlexa-BSAまたはBSAを共有結合された（EDC-NHS 活性化MWCNT） ・ EDC-NHS 活性化MWCNTsは、その後タンパク質水溶液中で培養された（タンパク質系複合物） <p>EDC:1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide hydrochloride NHS: N-hydroxysuccinimide</p> <p>■粒子特性</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 精製によってMWCNTの形態は変わらなかった。（SEM分析） ・ 精製MWCNTの平均長さは未精製のそれより81%短かった（それぞれ、792、4261nm）（AFM分析） ・ 精製MWCNTでは、Oを含む官能基が確認された。（ATR-FTIR分析） ・ DMEM媒体中では、精製MWCNTは高度に分散していた。これはおそらくカル 	<p>■試験生物：不死化ヒト気管支上皮細胞（BEAS-2B）</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 培養液：10% FBS、0.1% L-グルタミンと1%ペニシリン/ストレプトマイシンを含むDMEM媒体 <p>■暴露方法：</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 暴露物質：以下の4種。ただし、②-④はコントロール <p>① Alexa-BSA-MWCNT複合物 ② PBSに暴露 ③ ①相当量の遊離Alexa-BSA ④ 機能化なしのMWCNT</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 暴露濃度：24 $\mu\text{g cm}^{-2}$ ・ 暴露時間；24時間 <p>■測定/分析項目</p> <p>タンパク質積載</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 精製MWCNTsに結合されたタンパク質量分析 <p>分散度分析</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ MWCNTとタンパク質機能化MWCNTの分散度 <p>蛍光活性化された細胞ソーティング（FACS）</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ フローサイトメトリー <p>細胞活性</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 細胞活性度（暴露時間：24、48、72時間） <p>細胞サイクル分析</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ DNA含有量変化測定 <p>細胞機械的性質変化測定</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 細胞の弾性率、バネ定数（FITC強度） 	<ul style="list-style-type: none"> ・ すべての対照群との対比で、① Alexa-BSA-MWCNT 複合物に暴露された細胞は高い FITC 強度を示した。 ・ 遊離Alexa- BSAに暴露された細胞で観察された高い信号は、ラベルをつけられたMWCNTsの内在化と一致した。これは、安定なMWCNTに固定されたAlexa-BSAと比べて、その取り込みによって生じたプロテアソームの低下のため増加したAlexa-BSA感受性による。 ・ 精製MWCNTに24、48、72時間暴露された細胞の活動度は減少した。この減少は、おそらく、ミトコンドリア・ストレスを始動させる内在化されたMWCNTに起因する。（ミトコンドリア・ストレスは、細胞質Ca²⁺濃度の増加とミトコンドリア浸透性移行膜孔（MPTP）ポテンシャルの変化に導く） ・ 精製MWCNTsに暴露された細胞では、G1期（増殖開始）は増加（13 ± 5.35%）、S期(DNA合成)は減少（25 ± 6.42%）した。 ・ G1期の増加は、DNA含有量、細胞容積、mRNAとタンパク質合成の変化と関連した。 ・ S期の変化は、核酸とCNTの親和性に基づく利用可能な細胞のDNAの減少と関連した。 ・ 対照細胞および暴露細胞の全細胞体の平均ヤング率は、それぞれ 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 精製MWCNTへの暴露は、ヒト肺上皮細胞におけるミトコンドリア活性、細胞の生体機械的な特性、細胞サイクル進行に影響を及ぼす。 ・ MWCNTへの細胞の暴露と関連する細胞毒性と遺伝毒性の相乗作用が示唆される。 ・ それは細胞の形質転換と、それに基づく癌進行を誘起する可能性がある。

			<p>ボン酸塩アニオンの形成、あるいは、流体力学サイズによるものと考えられる。</p>		<p>2.72 ± 0.96、$3.84 \pm 1.12 \text{kPa}$であった。</p> <ul style="list-style-type: none">• 一方、核領域の平均ヤング率はそれぞれ1.58 ± 0.67、$2.20 \pm 0.59 \text{kPa}$であった。	
--	--	--	---	--	--	--

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
CNTs-1,(S WCNT-4,M WCNT-14) polystyrene	Fröhlich E, Meindl C, Wagner K, Leitinger G, Roblegg E Toxicol Appl Pharmacol . 2014 Aug 4; 280(2):272 -284	Use of whole genome expression analysis in the toxicity screening of nanoparticles (ナノ粒子 の毒性スク リーニング における全 ゲノム発現 分析法の活 用)	<p>■対象物質：4種</p> <p>①20、200nmカルボ キシル・ポリスチ レン粒子 (CPS20,CPS200)</p> <p>・Invitrogenより入 手</p> <p>②20、200nmのポリ スチレン粒子 (PPS20,PPS200)</p> <p>・Thermo Scientific より入手</p> <p>③短長 (0.5-2μm) 単層カーボンナノ チューブ (SCNT,1-2nm)</p> <p>・Cheap Tubesより 入手</p> <p>④多層CNT (MCNT8,20,50)</p> <p>・長さ~8nm、20~ 30 nm、50nm以上 の3種 CNTにcが付くも のは、 carboxylationし たもの</p> <p>■特性値</p> <p>・0%FBSのDMEM 中では、10%FBS のDMEM中との 対比で、PPS20と CPS20の径は小 さく、ζ電位はよ り負であった。</p>	<p>■試験生物：ヒト内皮細 胞系EAhy926</p> <p>・培養液： 10% FBS、 2mML-グルタミン、 1%ペニシリン/スト レプトマイシンで補 充されたDMEM、</p> <p>■細胞の取り込み</p> <p>・CPS20, CPS200, PPS20, PPS200の取 り込みは、赤の蛍光で ラベリングして、 CNTの取り込みは、 蛍光BSAでラベリン グして測定。</p> <p>■細胞中の局在</p> <p>・緑の蛍光でラベリン グされたCPS20, CPS200, PPS20, PPS200, CNTを使 用。</p> <p>■細胞毒性スクリーニン グ (ホルマザン・バイオ 還元)</p> <p>・CellTiter 96水性非放 射性細胞増殖分析を 用いて実施</p> <p>■マイクロアレイ試験</p> <p>試験生物：EAhy926細 胞</p> <p>試験方法-1： ・暴露粒子と濃度：150、 200μg/mlのCPS20、 CPS200、 培養液：DMEM</p>	<p>■NPsの細胞の取り込みと細胞毒性</p> <p>・DMEM+10% FBS中の200μg/mlのPPS20へ の暴露とDMEM中の200μg/mlのCPS20へ の暴露は、24時間後に有意な細胞毒性を生 じた。</p> <p>・4時間後では、200μg/ml PPS20と200μg/ml CPS20粒子は生存度を低下させなかった。</p> <p>・0%FBSのDMEM中に懸濁されたPPS20粒子 は大きな細胞毒性を示した。</p> <p>・10μg/ml PPS20は、DMEM+10% FBS中の 200μg/mlのPPS20粒子と同程度に生存度を 減少させた。</p> <p>■全ゲノム発現分析</p> <p>・発現した遺伝子の数は、CNTよりポリスチ レン粒子の方が多かった。</p> <p>・内皮細胞に特有の遺伝子 (P-、E-セレクチン、 VWF、VCAM-1、GAADD45B、MAPK、 STAT、サイクリンA、B) は、ナノ粒子に よって発現しなかった。</p> <p>・エンドセリン1 (EDN1) はPPS20 (10% FBS)、CPS20 (200μg/ml) とSCNTc (50μg/ml) に暴露によって、減少した。</p> <p>■NP暴露によって発現される遺伝子</p> <p>・炎症応答とDNA損傷に関係する遺伝子は、 PPS20,CPS20,SCNTcによって増加した。</p> <p>・酸化ストレス関連の遺伝子を増加させたの は、PPS20だけだった。</p> <p>・CPS20とSCNTcは、アポトーシスと細胞サ イクルに関係する遺伝子を増加させた。</p> <p>・発現した遺伝子の最大の数は、細胞死と生存、 細胞腫瘍と増殖、細胞間相互作用、血液学的 なシステム発現のカテゴリーに属していた。</p> <p>■細胞の分析による確証： インターロイキン分泌</p> <p>・IL-6分泌は、PPS20粒子→CPS20粒子</p>	<p>・(試験したナ ノ粒子によ って) 発現し た(遺伝子の) 機能は、 細胞実験の 結果とよく 関連づけら れた。</p> <p>・(培養媒体中 のFBSなど の) タンパク 質の存在は、 タンパク質 コロナの形 成と粒子凝 集を招き、細 胞毒性を緩 和した。その 際、遺伝子発 現過程の各 種のパター ンに変化は 無かったが 発現の数は 減少した。</p>

			<ul style="list-style-type: none"> • PPS20との対比で、CPS20の径は大きく、ζ電位はより負であった。 • 凝集していないCNTの平均長さは、217~446nmであった。 • SCNT、SCNTc、MCNT8cの凝集した束の長さは、543~816nmであった。 	<p>培養時間：6h</p> <p>試験方法-2：</p> <ul style="list-style-type: none"> • 暴露粒子と濃度： -10μg/ml のPPS粒子、 -20, 50μg/mlのCNT <p>培養液：DMEM+10% FBS</p> <p>培養時間：24h</p>	<p>→50μg/mlのSCNTc順に増加した。</p> <ul style="list-style-type: none"> • IL-8分泌は、PPS20粒子→50μg/mlのSCNTc→CPS20粒子→50μg/mlMCNT20の順に増加した。 <p>酸化ストレス</p> <ul style="list-style-type: none"> • マイクロアレイ・データは細胞のストレスの存在を示した（保護遺伝子は活性化した）。 <p>アポトーシス</p> <ul style="list-style-type: none"> • CPS20（150、200μg/ml）とPPS20（FBS有りとなしのDMEM中で）は、アポトーシスのカテゴリーで遺伝子を減少させた。 • 抗アポトーシスの遺伝子BIRC3は、PPS20とCPS20への暴露によって増加した、 • 抗アポトーシス遺伝子BCL2A1は、SCNTcに対する暴露によって増加した、 	
--	--	--	---	--	---	--

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
CNT s-2(MW CNT -4, CSC NT- 1)	Haniu H, Saito N, Matsuda Y, Tsukahara T, Usui Y, Maruyama K, Takanashi S, Aoki K, Kobayashi S, Nomura H, Tanaka M, Okamoto M, Kato H Int J Nanomedici ne. 2014 Apr 17; 9:1979-90	Biological responses according to the shape and size of carbon nanotubes in BEAS-2B and MESO-1 cells (カーボン ナノチュー ブの形状と 寸法に応じ たBEAS-2B とMESO-1細 胞の生体応 答)	■対象物質：2×3種 1)多層カーボンナ ノチューブ (MWCNT) (3種； VGCF-X, VGCF-S, VGCF)；昭和電工 製 ・気相成長法で合成 ・長さ：3, 10, 8μm ・径：15, 80, 150 nm ・凝集径：4,417±401, 1,638±98, 1,660± 38nm ・Fe：12,000, 1,700,34ppm 2) カップ積層型カー ボンナノチューブ (CSCNT) (3種； CS-L, CS-S, CS-M)；GSIクレ オス製 ・製法：記載なし ・長さ：20-80, 0.5-20, CS-M (CS-L, CS-S の中間) ・径：全て100 nm ・凝集径：2,029±79, 1,547±15, 1,833 ±201nm ・分散媒：0.1%ゼラチ ン含有PBS (水浴中超音波で30 分分散処理)	■試験生物：2種 ① ヒト気管支上皮細胞系 (BEAS-2B) ・培養液：10%FBS補充 Ham's Nutrient Mixture F-12 ② ヒト悪性胸膜中皮腫細 胞系(ACC-MESO-1) ・培養液：10% FBS補充 RPMI1640 ■alamarBlue (AB) アッ セイ 評価項目 i)細胞生存度 (AB分析に よる) ・粒子濃度：1、10、50μ g/mL CNTs ・コントロール：0.001%と なるようにゼラチンを加 えた培養液で細胞培養 ii)血漿膜透過性(LDH放出 分析による) ・粒子濃度：10μg/mL CNT ・コントロール：CNTなし ・陽性対照：0.01%トリト ンX-100含有媒体で細胞 培養 iii) CNT取り込み (レーザ ー読み取り共焦点顕微鏡観 察による) iv) CNT取り込み (TEM観 察による) v)全活性酸素種 (ロス) /ス ーパーオキシド産生 vi)細胞内酸性度の評価	CSCNTは、MWCNTより低い毒性を有する ・BEAS-2B細胞に対するMWCNTの毒性は、 濃度依存的であったが、長さとはよら なかった。 ・BEAS-2B細胞に対するCSCNTの毒性は、 濃度と長さ依存した。 ・MESO-1細胞に対するMWCNTの毒性は濃 度によって変化して、BEAS-2B細胞より低 かった。 ・MESO-1細胞に対しては、CS-LとCS-Mは 最高濃度 (50μg/mL) 以外では毒性でなか った。 ・MWCNTは両細胞系でCSCNTより毒性だ った。 <u>BEAS-2B細胞はMWCNTにCSCNTより浸 透し易い</u> ・BEAS-2B細胞は、10μg/mLではCSCNTに 対するよりMWCNTに対する方が浸透性 だった。 ・MWCNTの間では、VGCF-Xに対する浸透 性が77%で最高だった (その後VGCF-S→ VGCFの順)。 ・CSCNTに対する浸透性はCS-M > CS-L > CS-S ・MESO-1細胞の浸透性は、2つのCNTに対 して30%以下であった。 ・2つの細胞型の浸透性は細胞毒性と同様の 傾向を示した。 ・MESO-1細胞がBEAS-2B細胞より10倍高 い濃度で粒子に暴露された場合でも、CNT 線維と凝集塊はリソソームと結合せず、細 胞質全体に分配された。 ・MWCNTはBEAS-2B細胞でROS産生を促 進する ・酸化ストレス・レベルの増加は、VGCF-X	・CNTに対する 細胞の応答を 評価した。 ・CSCNTは大き な表面積を有 するので機能 化に役立つ。 かつ、長さは ボールミルで 調整できる。 ・CSCNTはわず かに毒性であ るものの MWCNTより 生体適合的だ である。 ・このため、ナ ノ生体適合物 質として大き な潜在性を有 する。 ・CNTの細胞毒 性は、長さ、 径、凝集を含 む多くの因子 に依存する が、細胞によ っても変化した。 ・生体適合物質 としてCNTの 応用を考える とき、細胞型 ごとに生体適 合性を確認す

					<p>に暴露されたMESO-1細胞で観察された。</p> <ul style="list-style-type: none">• CNTsは、取り込まれると、即座に、リソソーム酸性化を誘起する• 1μg/mL VGCF、VGCF-SとVGCF-Xに暴露されたBEAS-2B細胞の酸親和性(acidotropic)プローブの蛍光強度の増大は、それぞれ、10.8%、7.5%と17.5%であった。同じ濃度のCSCNTでは、強度の増大は5%以下であった。	<p>る必要がある。</p>
--	--	--	--	--	--	----------------

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料 調整法/試験用量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
CN Ts- 3(M W CN T-1 3,S W CN T-3)	Clift MJ, Endes C, Vanhecke D, Wick P, Gehr P, Schins RP, Petri-Fink A, Rothens- Rutishauser B Toxicol Sci. 2014 Jan; 137(1):55-64	A comparative study of different in vitro lung cell culture systems to assess the most beneficial tool for screening the potential adverse effects of carbon nanotubes (カーボン ナノチューブの有害影 響可能性をスクリー ニングするた めの最も有 効なツール を評価する 各種のin vitro肺細胞 培養システ ムに関する 比較研究)	■対象物質；3種 1)単層CNT (SWCNT) ・メーカー： Yangtze Nanotechnolog y (China) ・Tween 80で分散 2)多層CNT (MWCNT) ・メーカー：Cheap Tubes Inc. ・Pluronic F127で 分散 3)SWCNT懸濁液中 のすべての非線 維状物質 (=微量 元素) (SWCNT P) (以上の試料の物性 は 全て Supplementary のTable に) ■陽性対照： 4)クロシドライト 石綿線維 (CAFs)； National Res. Inst. For Occup. Diseases, South Africaから 5)標準ディーゼル 排気粒子	■試験生物：単一培養細胞3種 ①ヒト単球由来マクロファージ (MDM) ②単球由来樹枝状細胞 (MDDC) ③ヒト気管支上皮細胞系 (16HBE14o-) ■暴露方法： ・粒子濃度：0.005、0.01、0.02、 0.03、0.04mg/ml ・暴露時間：24時間、37°C、5%CO ₂ ■培養液： A)MDMとMDDC単一培養用： 10%FCS、1% L-グルタミン (L-G)、1%ペニシリン/ストレ プトマイシン (P/S) 補充 RPMI1640培養液 ・この培養液にはMDMとMDDC 単一培養の成熟促進のため、以 下を加えた。 -MDMには成長因子M-CSF -MDDCに成長因子GM-CSF + IL-4 B)16HBE14o-用：10% FCS、1% L-G、1% P/S補充MEM ・培養期間：7日 ■気道バリア上皮の3D三重の細 胞共培養モデル ・16HBE14o層を間に、上部に MDM層、下部にMDDC層が共 同培養された。(TCC-C; triple cell co-culture) ■測定項目： ・TEM電子断層撮影。 ・LDH放出。 ・腫瘍壊死因子；TNF-α放出	■断層撮影によるNanofiber-細胞相互作用 ・SWCNTsが、0.03mg/mlの濃度で24時 間処理されたTCC-CのMDMで見いだ された。 ■細胞毒性 ・MDM、MDDC、16HBE 14o-の単一培 養で0.005~0.04mg/mlの濃度の SWCNT、MWCNT、CAF、DEPに24 時間暴露されたとき、いずれも、細胞 毒性を示さなかった ・TCC-Cでは、SWCNTsとMWCNTs は、濃度0.02mg/mlまで無毒だった。 ■炎症誘発性応答/TNF-α放出 ・MDMとMDDCがMWCNTsに24時間曝 露されたとき、すべての濃度でTNF-α 放出は用量依存的に増加した。また、 濃度0.01~0.04mg/mlのSWCNT、 CAF、DEPに暴露されたときも、同様 の傾向が認められた。 ・IL-8放出 ・16HBE14o-が単一培養で濃度 0.02mg/mlまでのCAF、DEP、CNT、 MWCNTに24時間暴露されたとき、 炎症誘発性ケモカインIL-8の放出が 用量依存的に増加した。 ・濃度0.03と0.04mg/mlで、TNF-αタ ンパク質に関して、IL-8タンパク質 の同様の吸着パターンが観察され た。 ■還元GSH含有量 ・MDMとMDDCが単一培養で、0.01、 0.02mg/mlの濃度のMWCNTに暴露さ れたとき、細胞内の還元GSH含有量は 低下した。	・ヒト肺のシミュレーション に用いられる in vitro単一培 養と共培養の 間には、得ら れる生化学的 応答に相違が ある。 ・ナノ材料によ る有害影響の 研究に、単一 培養と共培養 のどちらが優 れているかは 言えない。 ・単一培養は、 ナノ材料暴露 による生死を 評価するには 十分である。 ・共培養は生体 内で起こる細 胞間相互作用 を考慮に入れ るので、ナノ 材料のin vitro 病理学に情報 を付け加えら れる。 ・多細胞系を用 いれば、ナノ 材料のリスク を全体的に評 価できる可能

			(DEP) ; SRM No.2975	<ul style="list-style-type: none">・炎症誘発性ケモカイン ; IL-8放出・蛋白質吸着	<ul style="list-style-type: none">・16HBE14o-が単一培養で、DEP、SWCNTs、MWCNTに暴露されたとき、検査されたすべての濃度 (0.005、0.01、0.02mg/ml) で、還元GSH含有量は低下した。	性があり、動物実験を置き換えるのに十分かもしれない。
--	--	--	------------------------	---	---	----------------------------

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整 法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
SW CNT -1	Fujita K, Fukuda M, Fukui H, Horie M, Endoh S, Uchida K, Shichiri M, Morimoto Y, Ogami A, Iwahashi H Nanotoxicology. 2014 Jun 9:1-12	Intratracheal instillation of single-wall carbon nanotubes in the rat lung induces time-depende nt changes in gene expression (ラットの肺 への単層カー ボンナノチュ ーブの気管内 点滴注入は、遺 伝子発現の時 間依存的変化 を誘起する)	■対象物質： SWCNT ・触媒化学蒸着方 法によって合成 ・Nikkiso Co., Ltd から入手 ・幾何平均直径： 1.8nm ・比表面積： 877.7m ² /g ■試験SWCNTの 調製 ・入手SWCNTを エタノール水溶 液中で遊星ボー ルミルでミリン グ処理し親水化 してバンドルを 解砕する。次に フラクトース加 えてさらにミリン グした後、メン ブレンフィル ターでろ過し洗 浄し、0.1%トリ トンX-100水溶 液とする。 ・分散SWCNT中 のSWCNTの幾 何平均直径と長 さ： 直径：44nm (範 囲15-152nm) 長さ：0.69μm	■試験生物：雄ウィスターラ ット ・週齢：9週 ・体重：270g (点滴注入前) ■投与方法：気管内点滴注入 (単回) ・投与量：(2水準) ラットあたり0.2、0.4mg SWCNT /0.4mL溶媒 ■実験計画 ・溶媒：0.1%トリトンX-100 水 ・コントロール：0.1%トリ トンX-100水溶液のみの投 与 ・試験期間：点滴注入後、3,7, 30, 90, 180, 365,754日で 解剖 ■観察/調査項目： ・ラットの生存度と一般状 態：毎日一回 ・体重：点滴注入前、暴露後 3,7,30,90,180,365,754日 ・肺、肝臓と脳の重量：3、7、 30、90、180、365と754日 ・解剖学的観察、組織病理学 的観察 ・遺伝子発現マイクロアレイ 分析	体重/肺重量と一般状態 ・0.4mg群の3日、180日、365日で体重の 有意な変化が観察された (対対照群)。 ・異常行動や規則な呼吸などの臨床徴候、 ならびに肺重量の違いは全処理群で認め られなかった ・死亡数は、対照群で1、0.2mg群で2、0.4mg 群で3匹であった。 解剖学的観察 ・SWCNT凝集体は各処理群の肺の気管支 と細気管支周辺で観察された。 ・これは、各群とも時間依存的に減少した。 ・肺胞マクロファージによって貪食された 細密な粒状物質は、各処理群の肺胞、肺 胞壁、細気管支で観察された。 ・炎症性細胞浸潤は各処理群で、わずかに 観察された。 ・各処理群の90日で、肺胞マクロファージ を含む肉芽腫がSWCNT凝集体の周辺で 観察された。 遺伝子オントロジー (GO) 解析 ・炎症反応に関係する多数の遺伝子は90日 または180日まで大きく発現が増加した (遺伝子発現プロファイリングによる)。 その後、遺伝子発現パターンは365日で 劇的に変化し、炎症反応に関係する発現 が増加した遺伝子の数は減少した。 このことは注入後90から180日まで急性 の肺応答が持続し、組織病理学的に遷移 領域が存在していることを反映してい る。 ・遺伝子Ctsk、Gcgr、Gpmb、Lilrb4、 Marco、Mreg、Mt3、S1c2604、Sppl、 Tnfsf4とTrem2の発現レベルは、注入後	・SWCNTの気管 内点滴注入で あり得る機序 を提案するた めに、組織病 理および免疫 組織化学的知 見と共に、遺 伝子発現の時 間依存的変化 を用いたCNT 毒性を調査す る方法を示し た。 ・遺伝子発現プ ロファイリン グは毒物学的 エンドポイン トの統合に向 けての有益な 洞察を提供す る。 ・遺伝子発現プ ロファイリン グ・データは 同じ種の多数 の異なる器官 に適用でき て、in vivoと in vitroの試験 をつなぐ橋を 提供するかも しれない。 ・GO解析を用い

			(範囲 0.18-3.3 μ m)		<p>365日まで用量依存的かつ持続的に増加した。</p> <ul style="list-style-type: none">• Atp6v0d2、Lpo、Mmp7、Mmp12とRnase9の発現レベルは、注入後754日まで有意に増加した。	<p>た遺伝子発現プロファイリングは、様々な種間の比較分析のために有益であり得る。</p>
--	--	--	--------------------------	--	--	---

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整 法 /試験用量	試験生物投与方法 ・ 期間/試験方法	試験結果	結論
SW CN T-2	Wang LR, Xue X, Hu XM, Wei MY, Zhang CQ, Ge GL, Liang XJ Small. 2014 Jul; 10(14): 2859-69	Structure- dependent mitochondri al dysfunction and hypoxia induced with single-walle d carbon nanotubes (単層カー ボンナノチ ューブによ って誘起さ れる構造依 存的ミトコ ンドリア機 能不全と低 酸素症) 前報 ; L.R.Wang et al.; Nanoscale 2012,4(13),3 99	■対象物質 : SWNT ・DGU法によって 4つの画分に使 用。 (DGU:密度勾配超 遠心分離 ; density gradient ultra- centrifugation) ■DGUソーティ ング ・超遠心分離器を 用いて、SWNT を密度別に分別 するもの。 ・原料 : 高度に分 散した SWNT-DOC- Rh123 システム (DOC:デオキシ コール酸ナトリ ウム、Rh123 : ローダミン123 (共同表面活性 物質) ; 著者前 報 ・分別後 : 4種 -画分A : 単独分 散、径 : 1nm -画分B : 単独分 散、径 : 2nm -画分C : 凝集体、 幅15nm (凝集ナ ノ粒子数5-10 ;	■試験生物 : 2種 ①ラット気管上皮 (RTE) 細胞 ②ヒト上皮癌 (KB) 細胞 ■暴露方法 : ・培養液 : 記載な し ・培養時間 : 48h ・粒子濃度 : 0.5-10 μ g/mL ■レーザー走査共 焦点顕微鏡 (LSCM) 像によ るミトコンドリア 機能変化の測定 : ・陽性対照 : アポ トーシス誘起試 薬 ; carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone (CCCP) ・SWCNT暴露後、 5,5',6,6'-tetrach loro-1,1',3,3'-tet raethylbenzimi -dazolylcarbocy anine iodide(JC-1)染 色し、蛍光測定 ■測定・分析項目 ・酸素フラックス	RTE及びKB細胞における4つのSWNT画分の細胞毒性 ・RTE細胞に対して画分AとBは、5 μ g/ml SWNT培養で、 明白な細胞毒性を誘起しなかった。一方、画分CとDは細 胞毒性を約50%減少させた。 ・KB細胞では、同様の傾向が1 μ g/mlのより低い濃度で観 察された。 ・細胞生存度の結果に反して、画分CとDではなく画分Aと Bで培養後強いラマン信号がRTEとKBの両細胞で観察 された。 不規則なミトコンドリア呼吸に関する4つのSWNT画分に よるミトコンドリア機能障害 ・RCC-I活性は画分Cでの処理に反応して呼吸の最大の減少 を示した。すなわち、コントロールとの対比でRCC-I活 性はおおよそ25%低下した。 ・一方、画分Aは明白な変化を示さず、画分BとDは、RCC-I 活性をわずかに高めた。 ミトコンドリア酸素消費と低酸素症関連のタンパク質に及 ぼす4つのSWNT画分の影響 ・画分A,B,C,Dの培養によってミトコンドリアは、稜(crista) は部分的に消失して、ふくらんで、からっぽのように観 察された。これは、構造依存的低酸素症変動を示す。 ・RTE細胞では、画分CとDでの培養によって、画分A、B とコントロールと比較して、O ₂ の消費はそれぞれ25%、 20%低下した。 ・KB細胞では、画分CとDでの培養により、画分A、Bとコ ントロールのそれらと比較して、O ₂ の消費はそれぞれ 35%、30%増加した。 ・RTEとKB細胞の画分CとDの処理によってHIF-1 α の高い 発現が見いだされた。これは、より多くの低酸素症状 況を示す一方、HIF-1に応答して低下したミトコンドリア 活性と一致した。 4つのSWNT画分の構造依存的メカニズムはミトコンドリア 機能障害と低酸素症に関する ・画分AとBは、より少ないミトコンドリア機能障害と低酸	・SWNTを径、凝集 性、構造健全性に 基づいて4つの画 分に分列する DGU法を開発し た。これによって、 SWNTの構造依 存的生体効果を調 査することが可能 になった。 ・ミトコンドリア機 能不全と低酸素症 には、SWNTの凝 集と構造健全性が 重要な役割を果た す。 ・完全なSWNTで は、凝集は、不規 則なミトコンドリア とアポトーシス 誘発性タンパク質 の開始(initiation) によって、ミトコ ンドリア機能不全 と低酸素症を誘起 して、より毒性で あった。 ・一方、不完全な SWNTでは、同様の 影響は主に ROSの増加に依 存した。 ・本研究は、高い生 物学的安全性、少

			<p>SWCNTバンドル形成) -画分D：凝集体、幅20nm (凝集ナノ粒子数5-10) (多数の欠陥のため構造健全性は不十分)</p>	<p>測定 ・RCC-1活性エリサ分析 ・4.8 H1F-10、PDK1とBNiP3のためのウエスタンブロット法 (Wb)</p>	<p>素症を示した。 ・それは、ETCとROSに対する影響を僅かに示したが、OXPHOSと解糖のバランスは変えず、最終的により少ない細胞死を誘起した。</p>	<p>ない生物学的反応性、高い腫瘍死滅率を有するSWCNTの開発に向けての指針を提供する。</p>
--	--	--	--	---	---	---

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質試料調整法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間試験方法	試験結果	結論
C60-1	Chen L, Miao Y, Chen L, Xu J, Wang X, Zhao H, Shen Y, Hu Y, Bian Y, Shen Y, Chen J, Zha Y, Wen LP, Wang M Biomaterials 2014 Nov; 35(34):926-979	The role of low levels of fullerene C60 nanocrystals on enhanced learning and memory of rats through persistent CaMKII activation (CaMKIIの持続的活性化によるラットの学習と記憶の強化に関する低レベルフルーレンC60ナノ結晶の役割)	・ナノ粒子調製と特性 対象物質：2種 1) フラーレンC60ナノ粒子 ・純度：99.9% ・Bucky USAより 2) ダイヤモンド粒子 ・Sigma-Aldrichより ・双方とも水性懸濁液として供試。 ・濃度： 1)：40µg/ml、 2)：1mg/ml ナノ粒子の物理的性質と特性 ・ナノC60はおよそ100nmの粒径で円形あるいは、矩形・ナノC60の流体力学的サイズは、少なくとも10日間、DMEMまたは10% BS補充DMEM中で安定 ・C60ナノ粒子の一部は凝集していた。 ・ナノC60の電位は、10% FBS補充DMEM中で、1日目の-19.13mVから10日目の-11.15mVに上昇。	■試験生物： ・成SDラット；体重180-250g ■試験方法 ・投与方法：IP注射 ・投与期間：1回/日×10日（長期投与） ・投与量：320µgナノC60/kgbw ・コントロール：食塩水のみ ・カニューレによる海馬内注入も実施（DG域またはCA1領域） ・注入物質：ナノC60、ナノ・ダイヤモンド、人工脳脊髄液（ACSF） ・注入量：各20ng ■試験項目/採取組織 生体内電場電位記録法 ・電場電位の記録は、麻酔下のラット海馬のDGとCA1域を対象 スライス標本：日齢14-16日のラット（雄、雌）の脳を採取 モリス水迷路 ・空間記憶に関するナノC60の影響は、モリス水迷路試験で評価 プライマリ・ニューロン培養 ・出産当日に子ラットから海馬を取出 CaMKIIキナーゼ分析 ・海馬は、CycLex CaMKII assayキットでCaMKII活性を測定。 ウエスタンブロット法分析 ・ニューロン細胞のリン酸化されたタンパク質レベルを分析 HPLCとMALDI-TOF分析 ・IP投与の後のラットのナノC60の体内分布を測定。	・細胞毒性評価 ・試験生物：HT22細胞（ニューロン細胞系） ・対象物質：ナノC60とH ₂ O ₂ （陽性対照） ・暴露濃度：ナノC60 0.08、0.04、0.2µg/ml ・測定項目：細胞生存度 ・ナノC60の有意な毒性は、最高0.2 mg/mlの濃度で観察されなかった。 ・対照細胞と比較して、生存細胞の数は、1mMの濃度のH ₂ O ₂ 処理で有意に減少した。 ・明白な壊死はナノC60処理HT22細胞で観察されなかったが、H ₂ O ₂ （1mM）処理ではPI陽性細胞数が増加した。 ・空間学習と記憶に関するナノC60の影響 ・ナノC60のIP注射を受けたラットは、注入2日目以降モリス水迷路からの脱出時間が短くなった（対対照動物）。 ・ナノC60処理ラットは、より多くのプラットフォーム横断回数と目標四分円部（target quadrant）への高い到達度を示した（対対照動物）。 ナノC60によるLTP強化 ・LTP long term potentiation：長期強化 ・20µg/kg体重/日×10日のナノC60注射を受けたラットでは、高頻度刺激（HFS）は、CA1で興奮性シナプス後電位（EPSP）の強化を誘発した。 ・ナノC60処理の後、海馬のCM領域でシナプス密度の変化は見られなかった。 ・ナノC60は、DG領域のLTPも有意に強化した。 ・C60は腎臓、肝臓、脾臓、脳などの組織で確認。 ナノC60による持続的なCaMKII活性化 ・FRET分析は、ナノC60が培養ニューロン	・ナノC60は、非常に低い用量で海馬依存的なLTPと空間記憶を強化する予想外の能力を備えている。 ・これは、おそらく、海馬のCaMKIIの持続的な活性化を通して発現する。

			<ul style="list-style-type: none">水懸濁液中のナノ・ダイヤはおよそ10nmの粒径であった。	電子顕微鏡法 <ul style="list-style-type: none">内部移行したナノC60の検	<p>に入ることができて、CaMKIIの構造変化と持続的な活性化を誘発したことを証明した。</p> <ul style="list-style-type: none">ナノC60の一回のIH注入によって、CaMKIIのCa²⁺/CaM-自律キナーゼ活性は有意に強化された。	
--	--	--	--	---	---	--

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間試験方法	試験結果	結論
C60-2	Wang F, Jin C, Liang H, Tang Y, Zhang H, Yang Y Environ Toxicol Pharmacol. 2014 Mar;37(2):65 6-61	Effects of fullerene C ₆₀ nanoparticles on A549 cells (A549 細胞に およぼすフラ ーレン C ₆₀ ナノ 粒子の影響)	<ul style="list-style-type: none"> ■対象物質：フラーレン C₆₀ ナノ粒子 (C₆₀ NPs) ・純度：99.9% ・シグマアルドリッチ社から購入 ■C₆₀ NPsの特性・径：150±50nm ・DMEM中で凝集(超音波破壊後) 	<ul style="list-style-type: none"> ■試験生物：A549細胞 ・細胞培養液：含、10% FBS、100U/mlペニシリン、100 µg/mlストレプトマイシンDMEM ・暴露濃度：12.5、25、50、100、200µg/ml ・暴露時間：6時間 ・コントロール：C₆₀ NPsなしの培養液 ■観察・測定項目 ・超微細構造観察 ・細胞生存度測定 ・ROSとGSHの測定 ・細胞内ATG16L1の測定 	<ul style="list-style-type: none"> ■A549細胞の超微細構造 ・C₆₀ NPsは、A549細胞に直ちに内在化された。 ・ただし、細胞質に限局されていた。 ・ミトコンドリアは肥大していた。 ・クリステは可視だった。 ・他の細胞小器官は正常だった。 ・C₆₀ NPsは、ミトコンドリアや核では見られなかった。 ・C₆₀ NPsは細胞中で膜で包まれていなかった。 ・細胞内には、オートファゴソームも見られた。 ■細胞生存度 ・C₆₀ NPsは、細胞生存度を減少させなかった。(CCK-8分析) ■細胞内ROSとGSHの決定 ・C₆₀ NPsに暴露されたA549細胞のDCF蛍光強度は、濃度依存的に増加した(対照群の蛍光強度は有意でなかった)。 ・これは、C₆₀ NPsに反応してROS生成が生じていることを意味する。 ・細胞内GSHレベルも濃度依存的に増加した。 ■細胞内ATG16L1レベル ・C₆₀ NPsに暴露されたA549細胞では、ATG16L1が用量依存的に増加した(ATG16L1：細胞自食の指標)。 	<ul style="list-style-type: none"> ・C₆₀ NPsは、本研究の範囲内では、生物学的に相当に安全である。 ・C₆₀ NPsはA549細胞に直ちに内在化するものの、直接的な毒性をほとんど示さなかった。 ・C₆₀ NPsに暴露されたA549細胞のROSは増加した。 ・一方、グルタチオン還元酵素活性は、さらにGSHを生成して細胞の酸化還元平衡を維持するためにおそらく活性化した。 ・フラーレン・ナノ粒子の存在下で細胞の生存度を最大にすることを目的とした自己食応答も検出された。

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
C60-3	Lehto M, Karilainen T, Róg T, Cramariuc O, Vanhala E, Tornaesus J, Taberman H, Jänis J, Alenius H, Vattulainen I, Laine O PLoS One. 2014 Dec 4; 9(12):e114490	Co-exposure with fullerene may strengthen health effects of organic industrial chemicals (フラーレンとの同時暴露は、有機工業化学薬品の健康影響を強化するかもしれない)	<p>■対象物質：</p> <p>1)昇華C₆₀フラーレン (99.95%) (以下、C₆₀)</p> <p>・Materials Technologies Research から</p> <p>2)アセトフェノン (99%)</p> <p>3)ベンズアルデヒド (99%超)</p> <p>4)ベンジルアルコール (99%)</p> <p>5)m-クレゾール (99%)</p> <p>6)トルエン(99.9%)</p> <p>・2)以下はシグマアルドリッチから入手。</p> <p>■フラーレンとフラーレン懸濁液の特性</p> <p>・C₆₀中に、酸化C₆₀、C₇₀、他のフラーレン種の不純物は認めず。</p> <p>・DLSによる懸濁液中のC₆₀凝集体の平均径は、有機化合物の有無で差はなかった。</p> <p>・全ての懸濁液でC₆₀凝集体の粒度は、</p>	<p>■試験生物：ヒト単球白血病細胞系列THP-1；THP-1は、100nMホルボール12-ミリスチン酸塩13-酢酸塩補充10% FBS/cRPMIでの培養によって、マクロファージ類似の表現型に分化した。</p> <p>■暴露方法：</p> <p>・cRPMI：2mM GlutaMAX 1、10mM HEPES、50μM β-メルカプトエタノール、50U/mL ペニシリン、50μg/mL ストレプトマイシン補充RPMI 1640</p> <p>・2% BSAを含むcRPMI中にC₆₀を分散させ懸濁液の原液 (1mg/mL) を調製。</p> <p>・懸濁液の一部は、暴露の前に0.45μm フィルターでろ過し使用。</p> <p>・濃度：-C₆₀：200μg/mL</p> <p>-アセトフェノン、ベンズアルデヒド、ベンジルアルコール、トルエン：10mM</p> <p>-m-クレゾール：5mM、</p> <p>■分析方法</p> <p>・フーリエ変換イオン・サイクロトロン発振質量スペクトロメトリー</p> <p>・動的散乱とζ-ポテンシャル測</p>	<p>■フラーレンの細胞への取り込み</p> <p>・有機化合物有りと無しとも、C₆₀懸濁液のC₆₀はヒトTHP-1由来マクロファージに取込まれた。</p> <p>・取込まれたC₆₀は細胞内で径4μmに達する大きな凝集体となっていた。これは、有機化合物ありとなしとも C₆₀凝集体は細胞の中に止まること、凝集体は1桁大きくなることを意味する。</p> <p>■フラーレン懸濁液の急性細胞毒性</p> <p>・C₆₀懸濁液のLDH放出は有機化合物群と比較して30- 50%だった (トルエンを除く)。</p> <p>・純粋なトルエンは、1%未満のLDH放出増だった。</p> <p>これはサンプル調製と細胞への暴露の間のトルエンの蒸発に起因するかもしれない。</p> <p>・本研究におけるC₆₀の濃度は、高レベル職業的吸入暴露に対応する。</p> <p>・C₆₀は未濾過懸濁液のすべての化学物質の急性細胞毒性をわずかに増加させた。しかし、共存影響はベンズアルデヒドのみ有意だった。</p> <p>・ベンズアルデヒドの細胞毒性の増加は14%で、純粋なC₆₀の細胞毒性より大きい。ベンズアルデヒドの細胞毒性の陽性共存影響は、ろ過した懸濁液で消失した。</p> <p>・ろ過したm-クレゾールを有する液で5%の負の共存影響が観察され、m-クレゾールがC₆₀と共存するときは単独の場合より細胞毒性が少ないことを意味する。</p> <p>■フラーレン懸濁液の免疫毒性</p> <p>・C₆₀は、有機化合物の免疫毒性に対して、有意な共存影響を生じなかった。</p> <p>・IL-18とTNFα分泌のC₆₀による増加の最高値</p>	<p>・職場環境における同時暴露を模擬したが、おそらく有機化合物とC₆₀の間の短い相互作用時間のため、観察された共存影響はわずかであった。</p> <p>・MDシミュレーションは、有機分子は水環境フラーレンと共凝集することを示した。これは、実験結果と一致した。</p> <p>・C₆₀クラスターは、親水性有機分子より多くの疎水性有機分子を含むかもしれない。</p> <p>・共凝集体は、ろ過懸濁液における疎水性化合物の細胞毒性の増加を説明する。</p>

			<p>200 nm程度であった。</p> <ul style="list-style-type: none"> 有機化合物なし（純粋）の懸濁液中のC₆₀凝集体のζ-電位は、有機化合物との混合懸濁液の場合より少し陽性だった。一方、混合懸濁液中では、互いに他と異ならなかった。 	<p>定</p> <ul style="list-style-type: none"> 液体クロマトグラフィ質量スペクトロメトリー 透過電子顕微鏡検査 細胞毒性分析／免疫毒性分析 分子動力学(MD)シミュレーション 	<p>は、未ろ過懸濁液のベンジルアルコールで観察されたが、ろ過した懸濁液では消失した。ろ過懸濁液で最も高い陽性共存影響は、アセトフェノンで観察された。</p> <p>■MDシミュレーション：実験と一致した。</p> <ul style="list-style-type: none"> 有機分子は水環境においてフラーレンと共凝集する。このC60クラスターは、親水性有機分子よりも疎水性分子の方をより多く含む。 	<ul style="list-style-type: none"> 他の化学物質とフラーレンの同時暴露は健康影響を引き起こすかもしれない。 以上の結果は、フラーレンの環境への暴露にも適用できる。
--	--	--	--	---	---	--

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
CNF, SWCNT, asbestos	Shvedova AA, Yanamala N, Kisin ER, Tkach AV, Murray AR, Hubbs A, Chirila MM, Keohavong P, Sycheva LP, Kagan VE, Castranova V Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2014 Jan; 306(2): L170-82	Long-term effects of carbon containing engineered nanomaterials and asbestos in the lung: one year postexposure comparisons (肺における含炭素ナノ材料とアスベストの長期的影響: 暴露後1年の比較)	<p>■対象物質: 3種</p> <p>① 炭素ナノ線維CNF</p> <ul style="list-style-type: none"> Pyrograf Productsから入手。 気相成長法によって合成後、3,000°Cの熱処理によってFeを除去 <p>② SWCNT:</p> <ul style="list-style-type: none"> 高圧CO不均化法(HiPco法)によって製造後、酸処理によって触媒金属を除去 Unidymから入手 <p>③ UICC標準クロシドライト・アスベスト</p> <p>粒子特性</p> <ul style="list-style-type: none"> PBS懸濁液中では、SWCNTはナノ・ロープ様、あるいは、μm径の絡み合った形で凝集していた。 CNFとアスベストは、懸濁液中で分散かつ安定して存在した。 <p>■特性値 (左から順に SWCNT、CNF、アスベストの値)</p> <ul style="list-style-type: none"> C: 99.7、98.6、-% Fe: 0.23、1.4、18% 粒径: ~65、80~160、160~800nm 長さ: 1-3、5~30、2-30μm、 	<p>■試験生物: 特定病原体フリー雌C57BL/6マウス</p> <ul style="list-style-type: none"> 週齢: 8-10週 体重: 20.0g (試験開始時) <p>■投与方法: 2種</p> <p>A) 咽頭吸引</p> <ul style="list-style-type: none"> 投与量 (μg/マウス) CNF: 40、120 アスベスト: 120 SWCNT: 40 コントロール: 無菌PBS 測定項目: 細胞数、LDH分析、タンパク質、サイトカイン・レベル <p>B) 全身吸入暴露:</p> <ul style="list-style-type: none"> 対象物質: SWCNTのみ 5mg/m³で5時間/日×4日 肺への負荷: 5μg コントロール: 大気 試験期間: 最後の暴露後1年 <p>■評価項目</p> <ul style="list-style-type: none"> 炎症: BAL液中の全細胞数、細胞差とサイトカインの蓄積 肺毒性: 無細胞BAL液のLDH活性、タンパク質濃度の上昇 線維形成性: コラーゲン堆積 組織病理学 肺核学的分析(lung karyological assay) 	<p>■肺炎症と損傷の特徴づけ</p> <ul style="list-style-type: none"> 肺負荷40μgのSWCNT咽頭吸引の1年後で、急性の炎症は認められなかった 肺負荷40μgのCNF暴露では、全BAL細胞、AM、リンパ球、多形核白血球は、対照群との対比で有意に増加した。 より高い肺負荷(120μg)のCNFまたはアスベストの咽頭吸引は、すべての細胞の炎症マーカーの大きな上昇を誘起した。 咽頭吸引暴露群の全てで、肺コラーゲンは対照群との対比で、有意に増加した。その程度は、SWCNT>CNF=アスベストであった、 SWCNT吸入1年後で、気管気管支のリンパ節の肉芽腫性気管支間質性肺炎 (granulomatous bronchointerstitial pneumonia) と肉芽腫性リンパ腺炎が見られた。 <p>■K-ras 突然変異</p> <ul style="list-style-type: none"> 肺負荷5μg SWCNT吸入では、肺負荷40μg の吸引より大きく突然変異が増加した。 同じ肺負荷(40μg)のCNFの吸引では、クラス突然変異(K-ras mutations)を誘起しなかった。しかし、120μgでは、対照群より50%多いコドン12 (codon 12)の突然変異を発生させた。 アスベスト吸引では、120μgでも突然変異は検出されなかった。 <p>■核学的分析</p> <ul style="list-style-type: none"> 肺負荷5μgのSWCNT吸入では、肺細胞における小核と小核プラス突出の有意な 	<ul style="list-style-type: none"> SWCNT、CNF、アスベストとも暴露1年後に肺腫瘍の増加は見られなかった。 SWCNTとCNFでは、K-ras 腫瘍遺伝子の突然変異の増加があり、アスベストではなかった。 吸引投与よりも吸入の方が炎症、線維症、遺伝毒性が有意に大きかった。 SWCNT、CNFとアスベストの長期的肺毒性は、それらの化学組成だけでなく、比表面積や暴露のタイプによって規定される。

			<ul style="list-style-type: none">• 比表面積：1040, 35 ~45、8.3m²/g	<ul style="list-style-type: none">• K-ras変異解析• ラマン分光分析	<p>増加 (increase in micronuclei and micronuclei plus protrusions) によってもSWCNTの遺伝毒性が示された。</p> <ul style="list-style-type: none">■ ラマン分光分析• 半定量的推定により~4.1±1.9μg が肺に残留	
--	--	--	--	---	--	--

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間試験方法	試験結果	結論
SWC VH, CB, CeO ₂ , Ni 分 析 法	Pal AK, Aalaei I, Gadde S, Gaines P, Schmidt D, Demokritou P, Bello D ACS Nano. 2014 Sep 23; 8(9):9003-1 5	High resolution characterization of engineered nanomaterial dispersions in complex media using tunable resistive pulse sensing technology (可変抵抗パ ルス検知技術 を用いた、複合 媒体中の工業 ナノ材料懸濁 液の高解像度 分析法) Tunable Resistive Pulse Sensing (TRPS ;可変 抵抗パルス検 知法)	■対象物質：4種 ①酸化単層炭素ナノ・ホ ーン (SWCNH-ox) ②Printex 90 (カーボン ブラック) ③CeO ₂ ④Ni Inco(Niナノ粒子) ■ナノ粒子懸濁液の特 性；TRPS対DLS ・TRPSによる粒度分布 は、各粒子とも2つの ピークを示した。 ・主要なピークは、DLS 測定によるピーク (250-270nm) と一 致 ・第2のピークは700 - 900nmの範囲に存在 ・分布は最大2 μ m超ま で広がっていた。 ■粒子の特性値 A)DLSによる流体力学 径(nm)、粒子径多分 散指数PdI、ζ 電位 (mV) ① 261、0.23、-9.3 ② 270、0.37、-13.1 ③ 265、0.31、12.1 ④ 234、0.40、14.4 B)TRPSによる第1、第2 ピークの大きさ(nm) ① 249、660 ② 264、1068 ③ 268、1066 ④ 268、1136	■TRPSとは ・Coulterの原理に基づ く、μm～nmの粒子の 測定技術 ・検出下限：～40nm ・エラストマー膜に正確 に作られたナノサイズ の細孔を、個々の微粒 子が通過するときのイ オン電流の変化をモニ ターすることによっ て、微粒子の電荷、形 状、伝導率などを測定 する。 ■試験-1 ・測定項目：細胞生存度 ・試験生物；ヒト単球/マ クロファージ (THP-1) 白血球細胞系 ・培養液：10% FBS、ペ ニシリンG (50U/mL) 硫酸ストレプトマイシ ン (50/Cg/mL) を含む RPMI 1640媒体 ・暴露濃度：0、1、5、10、 30、50μg/mL ・暴露時間：24時間 ■試験-2 ・測定項目：サイズ分布 測定のDLSとTRPSの感 度確認 ・対象物質：SWCHN-ox ・希釈液：RPMI+10% FBS ・希釈比率：1:10から	■サイズ測定 of 感度 ・DLS測定は、すべての濃度で広い単峰形のサ イズ分布を示した。 ・流体力学平均径dh,z-aveは濃度50μg/mLでは 311nmだったが、0.5μg/mLでは43nmまで減 少した。 ・この後のピークは、血清蛋白質に対応する。 ・多分散指数PdIは (高濃度域の) 0.3 ～0.4か ら、1μg/mL以下の濃度では1まで増加した。 ・TRPS測定は、感度確認の試験でも220と 660nmにピークを有する二頂分布を示した ・このピークは、0.5μg/mLまでの濃度によっ ては特に変化しなかった。 ■サイズ分布相違の毒物学的な結果への影響 ・SWCNH-oxとPrintex 90の細胞生存度勾配 (投与量が細胞生存度に及ぼす影響) は、 DLS-データからの堆積投与量deposited doseに基づく勾配が有意に大きかった。 ・この勾配はSWCHN-oxが最も大きく、以下 Printex-90→Ni-Inco→CeO ₂ の順に小さくな った。 ・TRPSに基づく勾配は、DLSに基づく勾配と 若干異なった。 ■TRPの他の有望な特徴 ・1% FBSのSWCNH-oxのdh,z-aveは、10% FBSより50nmほど大きかった。 ・1%FBSのSWCNH-oxは、血清不十分のため 十分に安定しないように見えた。 ・SWCNH-ox粒子はH ₂ O ₂ 処理によって、負の 大きな表面電荷を示した。 ・血清によるコーティングで、この負の電荷は 減少 ・SWCNH-ox、CeO ₂ 、Ni Incoは規則的な、ほ ぼ球面上の凝集塊を形づくったのに対して、 Printex 90の集塊は不規則な形状であった。	・TRPS法は、 DLS法と比較 して、複雑な 生物学的媒体 に対して高い 感度と解像度 を有する分析 法を提供す る。 ・これはナノ毒 物学とナノ薬 剤への応用の ための有益な 方法であり得 る。 ・容積50 μ Lの希 薄懸濁液の個 数濃度の直接 測定は特に価 値がある。 ・TRPSは、安価 な機器価格、 良好な携帯性 と精度で、凝 集体形態、粒 子間と粒子-生 体分子間の相 互作用に関す る付加的な情 報を抽出する 可能性を提供 する。 ・これらの理由 で、この技術 はナノ毒物学

				<p>1:1000 ・この希釈による期待濃 度：0.5-50μg/mL</p>		<p>とナノ薬剤の 分野で更なる 研究に値す る。</p>
--	--	--	--	--	--	---

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
Graphene-1	Chng EL, Chua CK, Pumera M Nanoscale. 2014 Sep 21; 6(18):10792-7	Graphene oxide nanoribbons exhibit significantly greater toxicity than graphene oxide nanoplatelets (酸化グラフェンナノリボンは、酸化グラフェンナノ小板より大きな毒性を示す)	<p>■対象物質：2種 1)酸化グラフェンナノリボン (GONR) 2) 酸化グラフェンナノ小板 (GONP) ・1),2)とも修正ハマー法によって1)はMWCNTより、2)は積層グラフェンナノ線維 (SGNF)より調製。</p> <p>■原料MWCNT： ・直径：～100nm、 ・長さ：5-9μm、 ・Fe不純物：<3ppm</p> <p>■原料SGNF： ・直径：～100nm、 ・長さ：5-9μm、</p> <p>■材料特性 ・GONR： 直径：～310 nm 長さ：5000 nm ・GONP： 直径：100 nm 長さ：100 nm ・格子サイズ： -GONR 22.2nm -GONP 19.1nm ・C/O比率： -GONR 1.9 -GONP 1.9 ・CO=基の比率： -GONR 28.22. -GONP 11.06</p>	<p>■試験細胞：ヒト肺癌上皮細胞系A549 ■培養液：10%FBS+1%ペニシリン/ストレプトマイシン補充MEM ■試験方法 ・ナノ材料濃度：8水準の濃度 (3.125,6.25,12.5,25,50,100,200,400 μgmL⁻¹) ・暴露時間：24時間 ・溶媒量：570 μL ・コントロール：溶媒のみ</p> <p>■分析方法と測定項目 ・MTT分析—細胞生存度 —粒子干渉実験(細胞なし) ・WST-8分析—細胞生存度 —粒子干渉実験(細胞なし) (粒子干渉 (particle interference) とは、細胞生存度測定に使用した試薬がナノ粒子と干渉して、生存度が低下したように見える現象)</p>	<p>■細胞生存度 ・GONRとGONPとも、A549細胞の生存度に対して強い用量依存的影響を示した。 ・GONRの場合、最低の暴露濃度 (3.125μgmL⁻¹) で、生存度は56%であった。 ・GONR濃度上昇に伴って生存度は低下し、400μgmL⁻¹では10%未満となった。 ・GONPの場合、生存度は3.125 μgmL⁻¹の暴露で81%、400 μgmL⁻¹では25%であった。 ・WST-8分析によっても、生存度が用量依存的に減少するという同様の結果が得られた。 ・ただし、生存度の値は異なり、かつ、WST-8分析による生存度の減少はMTTの場合ほど急激でなかった。 ・GONR、GONPとも用量依存的な細胞毒性を有する。ならびに、GONRの方がGONPより大きな毒性応答を誘起したことが明らかになった。 ・無細胞対照実験によっても、以上の結果の信頼性は確認された。(粒子干渉は、一部を除いて殆ど見られなかった。) ・GONRの方がGONPより大きな毒性を示す理由として、CO=基の比率が考えられる (GONR のC=O基の量は、GONPの2倍以上)。 ・加えて、GONPに対してGONRが有する非常に広い寸法の分布は、GONRの強い毒性発現に、主な役割を果たす。</p>	<p>・GONRはGONPより強い細胞毒性を有する。 ・この理由として、①MWCNTを酸化的に破砕する (unzipping) ことの結果として、より多くのC=O基が存在すること、ならびに ②GONRが有する長さの大きな範囲の分布があることが考えられる。 ・本研究で使用したin vitro研究は、グラフェン酸化物の潜在毒性に焦点をあてる第一歩である。 ・より系統的調査が、グラフェン酸化物ベースのナノ材料の実用的な適用の前に必要である。</p>

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整 法 /試験用量	試験生物役与方法・ 期間試験方法	試験結果	結論
TiO ₂ , a-SiO ₂ 実験方法	Lehmbecker A, Rittinghausen S, Rohn K, Baumgärtner W, Schaudien D Toxicol Pathol. 2014 May 6; 42(6):1041-10 46	Nanoparticles and Pop-off Technique for Electron Microscopy: A Known Technique for a New Purpose (ナノ粒子 と電子顕微 鏡法のため のポップオフ 技術: 新しい目的 のための既 知の技術)	<p>■ 調査標本: 3種</p> <p>① TiO₂ナノ粒子を以前に吸入したラットの肺のH&E染色した薄片(陽性対照)</p> <p>・光顕観察ではこの薄片中にナノ粒子の凝集塊が認められた。</p> <p>② 同じ動物の喉頭組織</p> <p>・光顕観察ではこの薄片中にナノ粒子の集塊は確認できなかった。</p> <p>③ 非晶質SiO₂を以前に吸入したラットの肺の薄片</p> <p>・これは、以前にカーボンナノチューブを用いて処理されたラットの3つの気管支肺胞洗浄液(BAL)の細胞内スポット(cyto-spots)からなる。</p>	<p>■ ポップオフ技術における薄片製造手順。</p> <p>(1) 関心領域のマーキング</p> <p>(2) カバーガラスの除去。</p> <p>(3) 各種試薬によるスライドのコーティング。</p> <p>(4) エポキシ樹脂充填ガラシ・カプセルのマーク位置への配置。</p> <p>(5) 液体窒素を用いて重合後、エポン(Epon)ブロックの除去。</p> <p>(6) 関心領域のトリミングによる超薄切片調製。</p>	<p>■ 光顕観察結果</p> <p>・ ①の標本は光顕下で、肺泡マクロファージの中に微細な顆粒状の、金色から茶色の細胞質内粒子を示した。</p> <p>・ ②の標本では、鱗片状から呼吸皮覆組織への移行ゾーンで、腹側部に位置する上皮の潰瘍と上皮の変化が見られた。</p> <p>・ ③の標本では、微細な顆粒状のわずかに好酸性の泡状細胞質が見られたものの、ナノ粒子は見られなかった。</p> <p>・ BALの標本では、黒い、ねじれたカーボンナノチューブを含む、泡状細胞質を有するマクロファージが認められた。</p> <p>■ 電顕観察結果</p> <p>・ 肺標本では、光顕観察と同様、TiO₂ナノ粒子が肺泡マクロファージの細胞質に確認された。</p> <p>・ 肺泡マクロファージの細胞質内のナノ粒子は、やや濃い電子密度、不規則形状の、球ないしは回転楕円体ように見えた。</p> <p>・ 粒子の径はおよそ20nm、凝集塊の径は～1μmであった。</p> <p>・ SiO₂ナノ粒子の吸入の後、空胞のある肺泡マクロファージでは、電顕検査では細胞質内にやや高電子密度の、不規則な形状の凝集したナノ粒子が認められた。</p> <p>・ 主要な粒子の径はおよそ20nm、凝集塊は1μmであった。</p> <p>・ EDXによっても、上述のTiO₂とSiO₂粒子の存在は確認された。</p>	<p>・ ポップオフ技術は、組織学的薄片中のナノ粒子を検出するための、速くて簡単な方法である。</p> <p>・ これはEDXのような付加的な技術によって、ナノ粒子の更なる分析を可能にする。</p> <p>・ さらに、光顕微鏡的病変とナノ粒子の直接的な関係を、正確に同一部位で調査できる。</p>

No	著者/ 書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料 調整法/試験用 量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
Gra phe ne-2	Ding Z., Zhang Z., Ma H., Chen Y. ACS Appl. Mater. Interfac es 2014.6, 19797- 19807	In Vitro Hemo- compatibilit y and Toxic Mechanism of Graphene Oxide on Human Peripheral Blood T Lymphocyte s and Serum Albumin (ヒト末梢 血のTリンパ 球と血清アル ブミンに 対する酸化 グラフェン の in vitro の血液適合 性および毒 性メカニズ ム)	<p>■試験物質</p> <ul style="list-style-type: none"> ・本来の酸化グラフェン (p-GO) <p>Hummer 法に少し修正を加えて作成。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・官能基化酸化グラフェン (f-GO ; GO-COOH、GO-PEI を含む) <p>GO-COOH : p-GO 表面上のエポキシおよび水酸基の酸化を通して、化学修飾によって得た。</p> <p>GO-PEI : カルボキシル活性化試薬を使って、p-GO とポリエチレンジアミン (PEI, MW=25KD) の間アミド連鎖の形成を起こして合成された。</p> <p>■試料調整法</p> <p>DI 水に分散。</p> <p>■Hummer 法</p>	<p>■試験生物;分離された T リンパ球は、10%FBS を加えた RPMI 1640 培養液中に維持され、5%CO₂、37°Cの飽和湿度 空気 CO₂培養器内(Thermo, 3111) で培養された。</p> <p>■投与方法・期間</p> <p>T リンパ球 (1X10⁶ mL⁻¹) は、フラスコ内で培養され、24 時間、異なる濃度の p-GO 又は f-GO で処理。</p> <p>沈殿現象は起きなかった。遠心分離後、上澄液廃棄。細胞ペレットは、新しい培養液に分散、下記のバイオアッセイに使用。</p> <p>■試験方法</p> <ul style="list-style-type: none"> ・TEM 撮影 ; T リンパ球中の p-GO、f-GO の位置を明らかにするため。 ・WST-8 細胞毒性アッセイ 細胞増殖と細胞毒性における細胞生存性の敏感な比色分析 (p-GO 又は f-GO、0-100µg mL⁻¹、24 時間処理)。 ・乳酸塩デヒドロゲナーゼ (LDH) 放出アッセイ GO 処理細胞膜の完全性を評価 (p-GO 又は f-GO、100µg mL⁻¹、24 時間処理)。 ・DCFH-DA アッセイ 細胞内の ROS 産生は、2、7 ジクロロフルオロセインアセト酢酸エステルを使って検出さ 	<p>①細胞生存性に対する GO の影響 ; (WST-8 細胞毒性アッセイ)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・p-GO は 25µg mL⁻¹ の濃度未満で小さい毒性影響。50µg mL⁻¹ まで濃度を上昇させると、T リンパ球は細胞生存能力の低下を示し始める。 ・GO-COOH は p-GO と同様な用量依存毒性関係を示した。一方、GO-PEI は 1.6µg mL⁻¹ でさえ激しい毒性を示した(GO、PEI (42.9%) の両方の影響)。 <p>②細胞膜および ROS に対する GO の影響 (TEM)</p> <p>p-GO または GO-COOH : いくつかのアグロゲートが細胞膜上に吸着しているが、T リンパ球の細胞質、核内には見付からない。GO-PEI 処理 T リンパ球は、膜損傷により、GO-PEI が内部に侵入。</p> <p>p-GO 及び f-GO は T 細胞レセプター (TCR) と相互作用し、TCR の免疫応答をブロックする。</p> <p>(LDH 放出アッセイ)</p> <p>p-GO または GO-COOH 処理はともに、顕著な LDH 放出が無かった (高濃度で毒性を示すが、細胞膜の物理的な損傷無し)。</p> <p>GO-PEI 処理 T リンパ球は、ポジの 21.2% (細胞膜の物理的損傷有)。</p> <p>(DCFH-DA アッセイ)</p> <p>p-GO 処理 T リンパ球はネガに比べ強い蛍光シグナルを持ち、細胞内での ROS が増加。</p> <p>GO-COOH 処理は僅かな蛍光シグナルを持ち、ネガに比べ細胞内 ROS は正常なレベル。</p> <p>GO-PEI 処理は、低いシグナルだが、細胞</p>	<ul style="list-style-type: none"> ・T リンパ球に対して、p-GO が用量依存的な細胞毒性を持ち、25 µg mL⁻¹ 未満の低濃度の時に細胞毒性を示さないことが実証され、それは他の細胞タイプでのほとんどの毒性分析と一致している。予想外に、p-GO の存在が HAS における立体配座の変化と、ビリルビンに対するその結合能力の機能不全を引き起こし、潜在的な毒性をもたらすことを示す。従って、GO の血漿蛋白への有毒影響は、さらに調査されなければならない。 ・高濃度での GO の細胞毒性の分析に対して、p-GO は内在化もしくは膜分裂なしで細胞膜に吸着されているのが発見されたが、それは細胞生存能力を低下、増大した細胞内の ROS、適度な DNA 損害、T リンパ球アポトーシスを引き起こす。 p-GO は細胞生存能力の明らかな減少とアポトーシスを引き起こすけれども、T リンパ球免疫応答抑制へのその影響は小さい。GO-COOH は、正常

		<p>によって準備された p-GO のキャラクターゼーション：紫外・可視分光法 (UV-vis)、フーリエ変換赤外分光法 (FT-IR)、ラマン分光法、原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて実施。p-GO は 1-2 層。C=O、C-O 基確認。官能基化確認。p-GO と GO-COOH は負に電荷ではほぼ同レベル。GO-PEI は正に電荷。</p>	<p>れた (p-GO 又は f-GO、100µg mL⁻¹、24 時間処理)。 ・コメットアッセイ 真核細胞中の DNA 系破壊を測定する簡単な方法 (p-GO 又は f-GO、100µg mL⁻¹、24 時間処理)。 ・アネキシン V-FITC/PI アッセイ アネキシン V-フルオレセインイソチオシアネート (FITC) /プロピジウムヨウ化物 (PI) 二重染色法は、細胞のアポトーシスと壊死を「検出するために使用された (p-GO 又は f-GO、100µg /mL、24 時間処理)。 ・リンパ球芽球化試験(LTT)アッセイ;Tリンパ球免疫反応における GO の干渉を評価するために、フィトヘムアグルチニン (PHA) の存在下で培養された Tリンパ球を用いて調べられた (p-GO 又は f-GO、100µg mL⁻¹、24 時間処理)。 ・ウエスタンブロットアッセイ 24 時間 GO 処理後の Tリンパ球中での Bcl-2 の発現量を用いる (p-GO 又は f-GO、24 時間処理)。 ・円偏光二色性 (CD) 測定 CD スペクトルは、0.2 および 1.0cm キュベットをそれぞれ使って 200-250 および 325-500nm の範囲にわたって円偏光二色性分光モデル 410 (AVIV Biomedical Inc.、米</p>	<p>膜の損傷と細胞からの蛍光生産物の放出によるため、結果は信用できない。 ③GO によって引き起こされた DNA 損傷、アポトーシス、免疫毒性 (コメットアッセイ) p-GO と GO-COOH は、ネガに比べ DNA 損傷は穏やか。 GO-PEI は、15.6%の tail DNA 損傷を顕著に起こした。 (アネキシン V-FITC アポトーシス検出キット) p-GO 処理 Tリンパ球は、約 17.2%細胞が初期アポトーシス、9.8%が後期アポトーシスを受けたことを示した。 GO-COOH 処理は、18.3%が初期、9.5%が後期。 一方、GO-PEI 処理は、76.8%が初期。 (ウエスタンブロットアッセイ) p-GO と GO-COOH 処理 Tリンパ球の Bcl-2 レベルがコントロールに比べ約 50%まで減少、Bcl-2 経路を通るパシブアポトーシスであることを示した。 ④表面特性および信号伝達経路の影響 p-GO と GO-COOH は、Tリンパ球に対して同様の生体適合性を示すが、GO-PEI は激しい血液毒性を示し、膜損傷を引き起こす。可能な理由は、表面電荷の違い。 p-GO と GO-COOH はゼロに近い負に荷電、一方、GO-PEI は正。正電荷粒子は、細胞膜に強い静電吸着を示し、細胞摂取を強化し、細胞膜の電荷バランスを壊し、損傷するからであろう。 ⑤HAS の構造と機能に対する GO の影響 p-GO は FBS たん白質と強い相互作用を持ち、FBS を加えた培養液中で、GO の流体力学的サイズが劇的に増大することを示した。FBS の存在は、GO の Tリンパ球への</p>	<p>な細胞内 ROS レベルを保持するのを除いて、Tリンパ球への p-GO と同様な影響を示す。 ・GO-PEI は、細胞膜への物理的損傷、重大な DNA 損傷、Tリンパ球免疫反応能力の抑制を伴う Tリンパ球への厳しい有毒な影響がある。血漿蛋白 HAS に対して、GO-PEI が HSA の構造と機能を厳しく破壊するのに対して GO-COOH は最小の立体配座および機能の変化を伴って HAS と結合する。これまでに、ドラッグデリバリーシステム、細胞撮像、抗ガン療法適用に対して、GO の用量は一般に 25µg mL⁻¹ より低い。結果は、この範囲の濃度の GO-COOH が生物医学の適用のための将来有望なナノ材 a であることを示す。高濃度の GO の全身細胞毒性の分析を通じて、示唆された毒性メカニズムは、p-GO が配位子とのたんぱく質感レセプターの結合を抑制し、ROS の増加に依存して受動的なアポトーシスを引き起こすことである。GO-COOH は膜たんぱく質レセプターと相互作用し、ROS と</p>
--	--	---	--	--	--

			<p>国) に記録された。スペクトルは、$\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$ のモル楕円率$[\theta]$として表現された。立体配座の変化検出のために、$100\mu\text{g mL}^{-1}$ HAS は、2 時間反応の間、$40\mu\text{g mL}^{-1}$ p-GO または f-GO と混ぜられた。官能基の変化検出のために、$100\mu\text{g mL}^{-1}$ GO は、最初、1mg mL^{-1} HAS と混ぜられ、その後 2 時間、混合物に $4.4\mu\text{g mL}^{-1}$ ビリルビンが追加された。沈殿現象は無かった。</p>	<p>細胞毒性を大きく緩和することを示唆する。 GO は HAS 構造に対して有害影響を持ち、その大きさの順は、$\text{GO-PEI} > \text{p-GO} > \text{GO-COOH}$。 p-GO と GO-PEI は、HAS のビリルビン結合の機能への有害影響を持つ一方、GO-COOH は機能を混乱させることなしで HSA と相互作用するかもしれないことが示唆された。 HSA 機能に対する有害影響の大きさの順は、$\text{GO-PEI} > \text{p-GO} > \text{GO-COOH}$。</p>	<p>は独立したメカニズムを通じて受動的なアポトーシスシグナルを核 DNA に手渡す。GO-PEI は膜損傷を引き起こすことによる T リンパ球への激しい血液毒性を示す。正電荷粒子は負電荷粒子より細胞に対してより有毒であり、カルボキシル修飾は、細胞内の ROS 産生を抑制する効果的な方法である。</p>
--	--	--	--	--	--

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間試験方法	試験結果	結論
Si O2 -1	Yoshida T, Yoshioka Y, Takahashi H, Misato K, Mori T, Hirai T, Nagano K, AbeY, Mukai Y, Kamada H, Tsunoda S, Nabeshi H, Yoshikawa T, Higashisaka K, Tsutsumi Y Nanoscale Res Lett. 2014 Sep 26 ;9(1):532	Intestinal absorption and biological effects of orally administered amorphous silica particles (経口投与さ れた非晶質シ リカ粒子の腸 吸収および生 物学的影響)	<p>■試験物質</p> <ul style="list-style-type: none"> ・70nm (nSP70) 直径の非晶質シリカナノ粒子 ・300 または 1,000nm 直径のマイクロシリカ粒子 (mSP300 、 mSP1000) ・カルボキシルまたはアミン基表面修飾 <p>nSP70 (nSP70-C、nSP70-N) 購入先: Micromod Partikeltechnologie (独)</p> <p>■試料調整法</p> <p>全てのシリカ粒子は 5 分間超音波処理、使用に先がけて 1 分間攪拌。</p>	<p>■試験生物</p> <p>ALB/c マウス(雌、6 週)(購入先: 日本 SLC)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・Wister ラット(雄、8 週)(購入先: 清水実験材料(株)) ・動物は、12-時間明/12-時間暗サイクル下、20°C±2°Cに維持された換気された部屋に別々に収納。 <p>■試験方法等</p> <p>①Everted gut sac 分析</p> <ul style="list-style-type: none"> ・Wister ラット ・3~4cm の血抜きした腸断片中に、Tyrode's 緩衝液 (NaCl, 137 mM; KCl, 5.4 mM; NaH2P04, 0.16 mM; MgCl2, 0.5 mM; CaCl2, 1.8mM; HEPES, 5 mM; pH7.4) 0.6~0.8mL のみ満たす (コントロールグループ)、または、シリカ粒子 (12.5mg/mL) 含有 Tyrode's 緩衝液 2.5 mL を満たす。 ・45 分間、37°C 培養 <p>②経口暴露</p> <ul style="list-style-type: none"> ・BALB/c マウス ・nSP70、mSP300、mSP1000、nSP70-C、nSP70-N、または水 (コントロールグループ) ・28 日間経口食事投与、用量 2.5mg/マウス・日 ・マウスは、研究期間 7、14、21、28 日に重量測定。 	<p>① Everted gut sac 分析</p> <p>培養 45 分後、nSP70-C および nSP70-N の囊の粘膜側から漿膜側への吸収が他の粒子より有意に大。表面特性が吸収の決定因子の一つと示唆。</p> <p>②経口暴露</p> <p>■血液バイオマーカーアッセイ</p> <ul style="list-style-type: none"> ・投与 24 時間後、心臓血液採取。遠心分離、血漿取得。 ・アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) と血尿素窒素 (BUN) を測定 (生化学的自動分析器) ・コントロールグループと体重差なし。 ・ALT 値はコントロールグループに比較して若干多いが、健康な範囲にあった。肝機能 ALT レベルに影響していない。 <p>■組織病理学的検査</p> <ul style="list-style-type: none"> ・投与 24 時間後、肝臓、腎臓、脳、肺、脾臓、心臓、胃、小腸、または大腸切除。 ・異常なし。 <p>■血液学的分析</p> <ul style="list-style-type: none"> ・投与 24 時間後、全体の血中の全白血球、リンパ球、単球、赤血球、顆粒球、およびの血小板の数を測定 (自動分析器: VetScan HMII Hematology System, Abaxis, 米)。 ・単球、顆粒球、血小板はコントロールグループとあまり差無し。 ・全白血球、リンパ球、赤血球はコントロールグループと有意差あるが、正常・健康範囲か若干増。 ・全体として、異常な生物学的影響はなし。食物適用での安全性を示唆。 	<p>・ICP-OES と結合した Everted gut sac 分析で、シリカ粒子の腸吸収を調査し、表面特性が腸吸収の程度の主要な決定因子であると分かった。</p> <p>・試験されたどの粒子も 28 日経口投与後に有毒な生物学影響を示さなかった。</p> <p>・この研究の結果は、シリカナノ粒子の安全を評価すること、およびより安全なナノ粒子の作成の方法の開発に有益である。</p>

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
Si O2 -2	Panas A, Comouth A, Saathoff H, Leisner T, Al-Rawi M, Simon M, Seemann G,Dössel O, Mülhopt S, Paur HR, Fritsch-Dec ker S, Weiss C, Diabaté S Beilstein J Nanotechnol . 2014 Sep 19;5:1590-60 2	Silica nanoparticles are less toxic to human lung cells when deposited at the air-liquid interface compared to conventional submerged exposure (従来の水中 暴露と比較し て空気-液体界 面に堆積した 時、シリカナノ 粒子はヒト肺 細胞に対して 毒性が低い)	■試験物質 ・Aerosil@200 粉 (提供 先: Evonik、独) ・SiO ₂ -50nm NPs (フ ルオレセインイソチオ シアネート (FITC) に よるラベルリングあり、 無し)。25 mg/mL 水の 均一分散液として (Postnova Analytics、独) ・Dulbecco 修正 Eagle 培地 (DMEM), Roswell Park Memorial Institute 培 地 (RPMI-1640), Hank 液 (HBSS), Dulbecco 燐酸緩衝生理食塩水: Ca ²⁺ 、Mg ²⁺ 無し (DPBS-1 -), ペニシリン、 ストレプトマイシ ン、トリプシン子牛胎児 血清(FCS). ■試料調整法/試験用量 ・エアロジル生成 (ナノ 粒子モノマーの細胞暴 露のため) とキャラクタ リゼーション SiO ₂ -50nmNP 懸濁液 を合成空気 (3ppm 不純 物) 中へエレクトロスプレ ーエアロジル生成機 で分散。アグロメレート	■試験生物 ・ヒト肺胞上皮細胞株 A549 (入手先: American Type Culture Collection) 10% (v/v) FCS, 2m ML- グルタミン, 100 U·mL ⁻¹ ペニシリン, 100 mg·mL ⁻¹ ストレプトマイシンを含む DMEM 中に保持 (5% CO ₂ , 37 °C) ALI(空気-液体界面)暴露 2 日前に、装置内に Transwell insert に RPMI-1640 培地の細胞を 植え付け (8.5×10 ⁴ 細胞· cm ⁻²) ■投与方法 ①エアロジルへの細胞暴露 ALIDI 暴露システム内で暴 露 (37.5°C、相対湿度 80-90%、100mL·min ⁻¹) ・用量測定 ②細胞の水没処理 ・Aerosil200 粒子は 10% FCS なし細胞培養培地に 10 mg·mL ⁻¹ で分散、細胞 添加前に超音波処理。 ・SiO ₂ -50 nm 粒子は、培地 中で希釈、攪拌。 ■生物学的影響 暴露細胞は、直接溶解され たかもしくは、さらに HEPES なしで、無血清	①粒子のクアラクタリゼーション 一次粒子径 (TEM) 比表面積 Aerosil200 (7-100) nm 200m ² ·g ⁻¹ SiO ₂ -50nm (54±3) nm 60 m ² ·g ⁻¹ ②エアロジルの発生方法 ・アトマイザー (A) とエレクトロスプレ ー(ES) Aerosil200 SiO ₂ -50nm SiO ₂ -50nm (A) (A) (ES・電場) 平均 (アグロメレート) 径 (SMPS 測定) アグロメレートフラクション 100% 92% 7% 粒子堆積 暴露時間 5時間 7時間 5時間 質量用量 (TEM 測定) 52±26) µg/cm (117±46) (0.14±0.05) ③生物学的影響 ・LDH 放出 Aerosil200 エレクトロスプレー (用量: 52µg·cm ⁻²) に比べ、水没 (用量: 15.6) の方が大きい。 SiO ₂ -50nm エレクトロスプレー (用量: 117µg·cm ⁻²) に比べ、水没 (用量: 15.6) の方が大きい。 ・IL-8 放出 LDH と同様の傾向を示した。 ・COX-2 Aerosil200 では、ALI と水没と比較し、水 没の方が用量が低いにもかかわらず、 COX-2 は同レベルであった。SiO ₂ でも同 様。 ・p-p38 p38 のリン酸エステル化は、ALI は	アモルファスシ リカ NPs は、水 没条件下と ALI で性質的に同様 な細胞反応を引 き起こした。 しかし、NPs へ の水没暴露によ りずっと低い細胞 用量でより強い 影響を引き起 こされる。 このため、ALI 中の細胞は NPs に対して一般に それほど脆弱で はないのか、特 定の NPs は暴露 方法に依存する 異なった活性を 示すかどうか を判読するため に、より多くの 研究が是認され る。

			フラクションを7%未満にするため、Nanopure water (type 1 ultrapure Barnstead, 独)で7 mg・mL ⁻¹ に希釈。	RPMI 培地で水没状態 (37°C、95%湿度) で24時間培養 (最上のサイトカイン放出) 後分析。LDH、IL-6、IL-8の放出を分析。	Aerosil200 もしくは水没と比べて ALI の方が強められた。	
--	--	--	--	--	-------------------------------------	--

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整 法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間試験方法	試験結果	結論
SiO 2-3	Nemmar A, Albarwani S, Beegam S, Yuvaraju P, Yasin J, Attoub S, Ali BH Int J Nanomedicine 2014 Jun 2; 9:2779-89	Amorphous silica nanoparticles impair vascular homeostasis and induce systemic inflammation (非晶質シリカナノ粒子は血管内平衡を害し、全身性炎症を引き起こす)	<p>■試験試料</p> <ul style="list-style-type: none"> ・非晶質 SiNPs(50 nm、500 nm) 購入先: Polysciences, Inc. (米) <p>■試料調製法</p> <ul style="list-style-type: none"> ・SiNPs は、Tween 80 (0.01 %)を含む通常生理食塩水 (NaCl 0.9%) に分散。 ・投与前に、アグリゲーション最小化のため、超音波処理、攪拌実施 <p>■試験用量</p> <p>両 SiNPs 分散液 (0.5 mg/kg) か、生理食塩水のみ。用量 150 μL。</p>	<p>■試験生物</p> <ul style="list-style-type: none"> ・雄 Tuck-Ordinary マウス (購入先: HsdOla:TO; Harlan Laboratories UK, Ltd., 英) ・12 時間明: 12 時間暗サイクル、温度 22°C \pm 10°C で飼育。 <p>■投与方法</p> <ul style="list-style-type: none"> ・腹腔内注入 ・24 時間後、様々な血栓性および全身性パラメーターを評価。 <p>■試験方法</p> <ul style="list-style-type: none"> ・血液採取と分析 ・血小板数計測 (ABX VET ABC 血液学分析器 (HORIBA ABXS AS, 仏)。血漿はさらに分析。 ・実験的な軟膜細静脈の血栓症モデル 右頸静脈 (蛍光顕微鏡) ・炎症、酸化ストレス、線維素溶解の全身性マーカーの測定 ・プラスミノゲン活性化抑制因子 (PAI-1)、フィブリノゲン、von Willebrand ファクター (vWF)、腫瘍壊死因子 α (TNF α)、インターロイキン 1 β (IL-1 β)、8-イソプロスタニン。チオバルビツール酸反応性物質 (TBARS)、カタラーゼ、グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST)。乳酸塩デヒドロゲナーゼ (LDH) 活性)。 ・プロトロンビン時間 (出血が始まってから肝臓でプロトロンビン (血液凝固因子) がつくられる 	<p>①軟膜細静脈中で光化学的に引き起こされる血栓症に対する SiNPs の影響; 顕著な血栓症発症時間の短縮が起こった。</p> <p>②循環血小板数、PAI-1、フィブリノゲン、vWF の血漿中の濃度に対する SiNPs の影響;</p> <ul style="list-style-type: none"> ・50nm SiNPs への暴露は、コントロールに比べ循環血小板顕著に減少。500nm SiNPs に対しても同様。 ・血漿中の PAI-1 濃度は、コントロールに比べ両方の投与で顕著に増加。 ・フィブリノゲン濃度は、コントロールに比べ 50nm SiNPs の投与は顕著に増加。 ・vWF 濃度は、コントロールおよび 500nm SiNPs に対して、50nm SiNPs の投与は顕著に増加。 <p>③PT、PTT に対する SiNPs の影響;</p> <ul style="list-style-type: none"> ・PT は、コントロールに比べ、両方の投与で顕著な変化なし。 ・PTT も同様。 <p>④生体外、全血中での血小板凝集に対する SiNPs の影響;</p> <ul style="list-style-type: none"> ・50nm SiNPs および 500nm SiNPs の低濃度 (0.2-5 μg/mL 血) で、用量依存で、血小板凝集が起こった。同濃度で、50nm SiNPs の投与は 500nm SiNPs の投与に比べ、統計的に有意な影響があった。 <p>⑤血漿 LDH 活性に対する SiNPs の影響;</p> <ul style="list-style-type: none"> ・50nm SiNPs、500nm SiNPs はコントロールに比べ顕著な増加。 <p>⑥TNFα、IL-1β の血漿濃度に対する SiNPs の影響;</p> <ul style="list-style-type: none"> ・TNFα は、50nm SiNPs の投与はコント 	<ul style="list-style-type: none"> ・非結晶 SiNPs は生体内および生体外で、投与の 24 時間後に、プロトロンビン影響を引き起こし、TNFα と IL-1s を含め、線維素原 (フィブリノゲン)、PAI-1、vWF、炎症誘発性サイトカインの血漿 (細胞質) 中濃度を増加させる。8-イソプロスタニン、TBARS、カタラーゼ、GST から成る酸化ストレスのマーカーは SiNPs によって影響されなかった。さらに、SiNPs が、生体外で、HUVEC 細胞毒性を引き起こし、小腸間膜動脈の内皮依存の弛緩を減らす。全体として、より多くの顕著な影響が 500 nm SiNPs に比べて 50 nm で記録さ

			<p>までの時間)および活性化部分トロンボプラスチン時間(血漿に接触因子活性化物質を添加した場合の凝固時間)の生体外での測定</p> <ul style="list-style-type: none"> ・生体外でのマウス全血中の血小板凝集 ・生体外でのアセチルコリンによって引き起こされた分離された小腸間膜動脈の弛緩に対する生体外での SiNPs の影響 	<p>ロールに比べ、顕著に増加。500nm SiNPs は無影響。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ IL-18 は、50nm SiNPs の投与はコントロールに比べ、顕著に増加。500nm SiNPs はさらに高い。 <p>⑦8-イソプラスタン、TBARS、カタラーゼ、GST に対する SiNPs の影響;</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ どれも影響なし。 <p>⑧細胞生存能力に対する SiNPs の影響;</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 50nm SiNPs、500nm SiNPs の投与(0.1-100μg/mL)は、24 時間にわたって、HUVEC 細胞の細胞生存能力を濃度依存で減少させた。50nm SiNPs は 500nm SiNPs より大きい影響力を示した。 <p>⑨Ach によって引き起こされた単離された小腸間膜動脈の弛緩に対する生体外での SiNPs の影響;</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 0.1μm Ach 濃度下で、50nm SiNPs、500nm SiNPs の投与の両方とも、(2μg/mL、10μg/mL、50μg/mL)のうち 50μg/mL で顕著な減少を起こした。 	<p>れたため、観察された悪影響はサイズ依存であった。これが高い表面積-体積比(サイズに対して逆方向で減少する)に帰することができる;これは生物学的相互作用に好ましく、その結果、より血管および全身の毒性を起す。発見は SiNPs は血管のホメオスタシスに有害であるという妥当な説明を提供する。</p>
--	--	--	--	--	--

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間試験方法	試験結果	結論
SiO ₂ -4	Nagakura C, Negishi Y, Tsukimoto M, Itou S, Kondo T, Takeda K, Kojima S Toxicology. 2014 Aug 1; 322:61-8	Involvement of P2Y ₁₁ receptor in silica nanoparticle s 30-induced IL-6 production by human keratinocytes (ヒトケラチノサイト (角化細胞) によるシリカナノ粒子 30-誘引 IL-6 産生における P2Y ₁₁ レセプターの関与)	<p>■試験物質</p> <ul style="list-style-type: none"> ・シリカ <p>NP(SNP)(直径: 30、70、300 nm ; SNP30、SNP70、SNP300) (購入先: Micromod Partikeltechnologie GmbH)</p> <p>■試料調整法</p> <p>(キャラクターゼーション)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ Dulbecco 修正 Eagle 培養液 (含 1.0g グルコース/L) (低グルコースタイプ DMEM) 中の粒径分布測定 (動的光散乱法; DLS) ・ SNP30 モルフォロジー (TEM) <p>■試験用量</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 最高 50 μg/cm² 	<p>■試験生物</p> <p>ヒトケラチノサイト細胞株 (HaCaT)</p> <p>■投与方法・期間</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 生体外 ・ 暴露後 24 時間 <p>■試験方法</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR) <p>本研究で使用して P2 受容体の特殊プライマーのシーケンス: P2X1~7、P2Y1,2,4,6,11~14、GAPDH(ポジティブコントロール)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 細胞外 ATP の試験 ENLITEN rLuciferase/Luciferin Reagent (Promega. Madison. WI) で濃度測定 ・ IL-6、TNF-α、IFN-γ の試験 ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) で測定 ・ 細胞生存性の試験 WST-1 リガンドを用いた比色分析法で測定 	<p>①SNPs のキャラクターゼーション</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ SNP30、SNP70、SNP300 の平均径: 35.1、65.6、278.7 nm。 ・ SNP30 大半: 一次粒子径 < 50 nm (TEM)、媒体中でほぼ均一に分散 <p>②HaCaT 細胞による IL-6 産生に対する SNP30 の用量および時間依存影響</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 5 μg/cm² から 50 μg/cm² まで用量依存で増加。 ・ 24 時間まで時間依存で増加。 <p>③HaCaT 中での IL-6 産生に対する SNPs のサイズ依存影響</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 用量 5 μg/cm² で、SNP30 は暴露後 24 時間で、SNP70、SNP300 よりより顕著に産生した。 <p>④HaCaT 細胞による TNF-α と INF-γ 産生に対する SNP30 の影響</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 暴露 24 時間後、産生能力顕著に低く、変化は殆どなかった。 <p>⑤HaCaT 細胞による SNP が引き起こす IL-6 産生での P2 受容体の関与</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ データは、両方の受容体が IL-6 産生の抑制に関与していたことを示唆。 <p>⑥P2 受容体アゴニストによる IL-6 産生の誘発およびそれらのアンチアゴニストによる妨害</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 24 時間後、ATP、UTP のようなアゴニストは IL-6 産生を顕著に増加。 ・ これらの増加は、スラミンによって、ブロックされた。さらに、P2Y₁₁ 受容体-特定アンチアゴニスト NF157 は IL-6 産生を減少させた。 <p>⑦細胞外 ATP リリースに対する SNP30 暴露の影響および異なるサイズを持つ SNPs とのその比較</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ SNP30 の 5 μg/m² 用量で、処理後 40 分から 50 分の間増加し、その後コントロールレベルに戻った。 ・ 3 つの SNPs (SNP30、SNP70、SNP30) 0 の間で ATP リリースが調査された。ATP リリースは SNP30 は顕著、SNP70 は適度、SNP300 は、SPN 不処理のコントロールとほとんど同様であった。 	SNP30 は、P2Y ₁₁ レセプターを通して、HaCaT 細胞中での ATP シグナリングを経て、IL-6 産生を引き起こすことが示唆される。

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法/試験用量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
SiO 2-5	Kusaka T, Nakayama M, Nakamura K, Ishimiya M, Furusawa E, Ogasawara K PLoS One. 2014 Mar 28; 9(3):e92634	Effect of silica particle size on macrophage inflammatory responses (マクロファージ炎症 反応に対するシリカ粒 子サイズの影響)	<p>■試験物質</p> <ul style="list-style-type: none"> ・全てのアモルファスシリカ (購入先: Micromod Paltikeltechnologie GmbH (独)) ・全生体外試験に対して、マクロファージのシリカ粒子の認識は、マクロファージへのシリカ粒子の短い遠心分離と同調させた。 <p>■試料調整法</p> <ul style="list-style-type: none"> ・右記 <p>■試験用量</p> <ul style="list-style-type: none"> ・右記 	<p>■試験生物</p> <ul style="list-style-type: none"> ・C57BL/6N マウス (5-6 週齢) (購入先: 日本 CLEA) 特定の病原体フリー状態で飼育。 ・C57BL/6N マウス骨髄由来マクロファージ (BMDMs) 完全 RPMI 1640(1/10 体積の M-CSF 含有 CMG-1412 を含む) 中で 5 もしくは 6 日間育成。 <p>■投与方法・期間/試験方法</p> <p>①生体外での BMDMs からのインターロイキン(IL)-1β 分泌 LPS 刺激 BMDMs はシリカ粒子または 1 mM ATP で 4 時間、37°C 刺激。いくつかの実験は、LPS 刺激 BMDMs は 20 μM サイトカラシン D もしくは 200 nM のバフィロマイシン A1 で 1 時間前処理後、4 時間シリカ粒子で刺激。細胞培地上澄液中の IL-1β はエライザ診断(enzyme-linked immunosorbent assay) で測定。</p> <p>②BMDMs によるシリカ粒子の取り込み フルオレセインには、フルオレセインイソチオシアネート (FITC)ラベル付けシリカ粒子 (50μg/mL) とともに、1 時間、37°C で培養後、測定。</p> <p>③BMDM におけるリソソーム損傷 BMDMs は LPS(10 mg/mL)、6 時間刺激後、10kDa FTTC-デキストランで負荷、シリカ粒子(0.3 mg/mL) 又は ATP(1mM) に 2 時間暴露後、測定。</p> <p>④イムノブロット分析 細胞は LPS (10ng/mL) 6 時間、37 °C 刺激後、培地を変更し、0.3 mg/mL のシリカ粒子 2 時間、37°C で 刺激後、測定。</p> <p>⑤乳酸脱水素酵素(LDH)放出アッセイ LPS (10ng/mL) 刺戟細胞は、シリカ粒子 2 時間、37°C で刺激後、測定。</p> <p>⑥肺炎症のマウスモデル ・生理食塩水中のシリカ粒子 (25mg/kg)、ピークルは、C57BL/6N マウスに気管内注入された。6 または 24 時間後、</p>	<p>①サブミクロンのアモルファスシリカ粒子は、マクロファージからの IL-1β 分泌の強い誘発者である。</p> <p>②サブミクロンのアモルファスシリカ粒子は、IL-1β 分泌によって引き起こされる相当なリソソーム損傷を起こす。</p> <p>③シリカ粒子は、カスパーゼ-1 と IL-1β 化膿を誘発するが、カスパーゼ-11 活性化を誘発しない。</p> <p>④BMDMs へのシリカ粒子のサイズ依存細胞毒性 30-1000nm シリカ粒子は、3000nm および 10000nm シリカ粒子よりより高く細胞毒性活性を BMDMs に対して持っていた。</p> <p>⑤30nm シリカ粒</p>	<p>・生体外と生体内で、1000nm を超えるシリカ粒子よりサブミクロンアモルファスシリカ粒子がより大きい炎症特性と細胞毒性を持っていた。直径サイズとは無関係に、シリカ粒子はアクチン細胞骨格依存経路を経てマクロファージによって取り込まれ、インフラマソーム活性化を引き起こす。</p> <p>・サブミクロンシリカ粒子はより大きいシリカ粒子より高いレベルでリソソームの不安定化を起こし、どのような大きさのシリカ誘発 IL-1 β 分泌も CA074ME またはバフィロマイ</p>

			<p>肺炎症は、micro computed された CT スキャン LaTheta TM LCT-200 によって分析された (日立 ALOKA、日)。</p> <ul style="list-style-type: none">マウスの気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の IL-1β、TNF-α、IL-6 の濃度は ELISA によって分析された。BALF 中の好中球浸透のために、細胞は、染色され FACSCantoII によって分析された。	<p>子の気管内注入は、マウスにおいて、激しい肺炎症を誘発する。</p>	<p>シンによって抑制されなかった。</p> <ul style="list-style-type: none">30nm シリカの気管内注入後 6 時間後に多くのマウスが瀕死になったが、3000nm ではなかった。
--	--	--	---	--------------------------------------	--

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料 調整法/試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論																				
SiO 2-6	Brown DM, Kanase N, Gaiser B, Johnston H, Stone V Toxicol Lett. 2014 Jan3; 224(1):147-5 6	Inflammation and gene expression in the rat lung after instillation of silica nanoparticle s: effect of size, dispersion medium and particle surface charge (シリカナノ粒子の注入後、ラット肺における炎症および遺伝子発現：サイズ、分散、表面電荷の影響)	<p>■試験物質</p> <ul style="list-style-type: none"> ・シリカ NPs(直径 50、200 nm) (購入先：Kisker Biotech、独) <p>①中性表面電荷 ②正電荷 (NH₂修飾)</p> <p>■試料調整法</p> <ul style="list-style-type: none"> ・RPMI 媒体中に分散。希釈、超音波処理。希釈：62.5μg/ml から 3μg/ml の範囲に (well Plate では 1-16μg/cm² 粒子に相当)。 ・水力直径と電位測定 (Malvern nano ZS zetasizer) <p>■試験用量</p> <ul style="list-style-type: none"> ・30μg/ラット (比較的低用量である) 	<p>■試験生物</p> <ul style="list-style-type: none"> ・Male Sprague Dawley ラット (ほぼ 3 月齢)：研究中食物・水に自由にアクセス。 <p>■投与方法・期間</p> <ul style="list-style-type: none"> ・肺注入 ・注入後、殺処分まで 24 時間放置 <p>■試験方法</p> <p>①気管支肺胞洗浄</p> <ul style="list-style-type: none"> ・好中球の合計数測定。細胞は、Nrf2 の染色へ。 <p>②LDH 評価</p> <ul style="list-style-type: none"> ・BAL 上澄液 (吸収は自動プレートリーダー上で 540nm で読み取り) <p>③アルブミン評価</p> <ul style="list-style-type: none"> ・BAL 液中濃度 (ブロムクレゾールグリーン使用して) 測定 <p>④Nrf2 の染色</p> <ul style="list-style-type: none"> ・Nrf2 の核内分布 (BAL 細胞中の酸化シグナリングの指標に使用) <p>⑤RNA 抽出とリアルタイム PCR</p> <ul style="list-style-type: none"> ・BAL 細胞からの抽出 (Mag MAX total RNA isolation kit (Ambion) 使用) ・RNA 含有量測定 (NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) 使 	<p>①粒子キャラクタリゼーション</p> <ul style="list-style-type: none"> ・水力直径 (DLS で測定) <table border="1"> <tr> <td>粒子</td> <td>生理食塩水中</td> <td>BSA 中</td> <td>LLF 中</td> </tr> <tr> <td>無修飾シリカ 50nm</td> <td>81</td> <td>35</td> <td>75</td> </tr> <tr> <td>無修飾シリカ 200nm</td> <td>192</td> <td>126</td> <td>209</td> </tr> <tr> <td>シリカ NH₂ 50nm</td> <td>348</td> <td>34</td> <td>298</td> </tr> <tr> <td>シリカ NH₂ 200nm</td> <td>206</td> <td>149</td> <td>217</td> </tr> </table> <p>下線数値は、アグロメレート化傾向</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ζ電位測定 <p>②TEM</p> <ul style="list-style-type: none"> ・無修飾シリカ 50nm は、分散媒に関係なく、3 つ中で、均一分散していなかった。他のタイプも同様パターン。 <p>③LLF のエンドトキシン含有量</p> <ul style="list-style-type: none"> ・含有量レベル < 0.25 EU / 1ml ・プロテオミクスによる LLF の分析は、5 つの最も豊富なたんぱく質が、トランスフェリン、アルファ-1 抑制剤 3、JgG 受容体たんぱく質；界面活性剤たんぱく質 A、たんぱく質のようなケラチンであることを示した。 <p>④粒子注入後の好中球動員</p> <ul style="list-style-type: none"> ・生理食塩水、BSA 中分散では、整理無修飾 50nm とアミノ化 50nm NPs は顕著に増加。 ・LLF 中分散では、どの NPs タイプもピークルと同様。ただし、LLF のみで増加することの説明不可であった。 <p>⑤BAL 液の分析</p> <ul style="list-style-type: none"> ・BAL 中の LDH とアルブミン含有量は、ピークルと比べ、どのタイプも顕著な違いなし。 <p>⑥BAL 細胞中での Nrf2 発現</p> <ul style="list-style-type: none"> ・生理食塩水中に分散の場合、粒子タイプでピークルのみに対する核 Nrf2 染色での差はないが、ともに 50nm で顕著な増加あり。 ・BSA 中に分散の場合、無修飾 50nm は顕著な増加。 ・LLF 中に分散の場合、無修飾 50nm、アミノ化 200nm は顕著な増加。 <p>⑦シリカ粒子の貪食</p> <ul style="list-style-type: none"> ・肺胞マクロファージによる貪食は、無修飾 50nm で 	粒子	生理食塩水中	BSA 中	LLF 中	無修飾シリカ 50nm	81	35	75	無修飾シリカ 200nm	192	126	209	シリカ NH ₂ 50nm	348	34	298	シリカ NH ₂ 200nm	206	149	217	<ul style="list-style-type: none"> ・データは、生体内でのシリカ粒子の単回低用量の注入の炎症影響は注入前に粒子が懸濁される分散媒体に依存して調整されることが可能であることを示唆する。 ・また、研究は、粒子のアグロメレート状態に対する分散媒体の重要性を強調し、これは、一度注入され肺細胞に送られた粒子の実表面積において重要な役割を果たすかもしれない。 ・この性質の研究は、これが種々のエンドポイントの結果に影響するかもしれないため、注入前の粒子の分散の問題を主張する。
粒子	生理食塩水中	BSA 中	LLF 中																							
無修飾シリカ 50nm	81	35	75																							
無修飾シリカ 200nm	192	126	209																							
シリカ NH ₂ 50nm	348	34	298																							
シリカ NH ₂ 200nm	206	149	217																							

			<p>用)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・PCRs (triplicate on a 7900 RT fast PCR system 中で実行) <p>⑦GSH 評価</p> <ul style="list-style-type: none"> ・粒子暴露動物の肝臓 (末梢 (遠位の) 酸化ストレスの指標として使用) (Promega GSH/GSSG-Glo kit 使用) 	<p>は、LLF 中に分散されている場合わずかに増加しているだけ。さらに、LLF、生理食塩水中に比べ BSA 中に分散されたものは、さらに顕著に少ない増加であった。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・アルブミンは、生理食塩水中の無修飾 200nm に比べ、無修飾 200nm の摂取を減らし、さらに LLF に対してさえも減らした。 ・アミノ化された 50nm NPs に対して、BSA では食食を顕著に減少させなかったが、LLF を分散剤として使うと顕著な減少があった。 ・生理食塩水と BSA 中のアミノ化された 200nm NPs の分散は、無修飾 50nm NPs と同等レベルの食食であったが、LLF を使いと、生理食塩水と BSA に比べ、無修飾 50nm NPs、アミノ化された 200nm の両方ともに、摂取を減少させた。 <p>⑧肝臓中の GSH 含有量</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ビークル処理に比較し、どれも顕著な変化なし。 <p>⑨遺伝子発現</p> <ul style="list-style-type: none"> ・BAL 中のサイトカイン mRNA 発現はどの処理も変化なし。 ・しかし、特定の遺伝子、特に IL-10、FasL、ICAM の遺伝子発現は、粒子がその中に分散している媒体にある程度影響されているかもしれないことが示唆された。 	
--	--	--	--	--	--

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間試験方法	試験結果	結論
SiO 2-7	Horie M, Nishio K, Kato H, Endoh S, Fujita K, Nakamura A, Hagihara Y, Yoshida Y, Iwahashi H Toxicol Mech Methods. 2014 Mar; 24(3):196-20 3	Evaluation of cellular effects of silicon dioxide nanoparticle s (二酸化珪 素ナノ粒子 の細胞影響 の評価)	<p>■試験物質</p> <p>非晶質 SiO₂ 粒子： ・ nSiO₂-1 (UFP-80：電気化学工業)：34nm、80.0m²/g ・ nSiO₂-2 (REOROSIL；QS-30：トクヤマ)：7nm、300m²/g ・ nSiO₂-3 (NanoTek：CIK NanoTek)：25nm、86.0m²/g ・ fSiO₂ (SFP-20M：電気化学工業)：300nm、11.3 m²/g ・ mSiO₂ (HS-301：日鉄住金)：2400nm、8 m²/g 結晶質 ・ mc-SiO₂ (MIN-U-SIL5：U.S. Silica Company)：1800nm</p> <p>■試料調整法</p> <p>DMEM-FBS 中に分散剤なしで直接分散 (濃度：10、100、1000µg/mL)。いくつかの実験では、安定均一分散液用意。 ・ SiO₂-DMEM-FBS 分散液のキャラクターゼーション：平均粒子径</p>	<p>■試験生物</p> <p>・ HaCaT ヒトケラチン細胞株 (購入先：ドイツ癌研究センター、独) ・ A549 ヒト肺癌細胞 (購入先：理研バイオリソースセンター、日) ・ 細胞は 10% 加熱不活性化ウシ胎児血清(FBS), 100 units/mL のペニシリン、100µg/mL のストレプトマイシン、250ng/mL のアンフォテリシン B を加えた Dulbecco 修正 Eagle 培地 (DMEM) で培養 (37°C、5%CO₂)。</p> <p>■投与方法・期間試験方法</p> <p>・ 細胞生存率アッセイ：1×10⁵ 細胞/mL、24 時間培養。続いて、細胞は培地から移され、金属酸化物分散液を被り 24 時間培養。 ・ SiO₂-DMEM-FBS 分散液中、6 及び 24 時間培養後、ミトコンドリア活性 (MTT アッセイ) と細胞膜ダメージ (LDH リリース) の測定、細胞毒性を計算。 ・ 細胞内酸化ストレス (ROS) レベルの測定；分散液に 2、6、12、24 時間暴露後、分散液を 10µM MCFH-DA を含む血清無し DMEM と置換し 30 分、37°C で培養後測定。 ・ 細胞内過酸化；分散液暴露後</p>	<p>① SiO₂ 粒子のタンパク質および Ca 吸着 10, 100mg/ml で、fSiO₂、mSiO₂ は吸着ほとんどなし。一方、nSiO₂ は、Ca をわずかに、タンパク質を顕著に吸着。 ② SiO₂ 粒子 (不安定) の細胞毒性ミトコンドリア活性：用量依存だが、顕著でない。1000µg/mL で非暴露 (コントロール) の 70%。 細胞膜ダメージ：粒子によって異なり、顕著なものもあり。nSiO₂ だか特別ということはない。 ③ SiO₂ 粒子 (安定) の細胞毒性 nSiO₂-1 (安定)、nSiO₂-2、nSiO₂-3 (不安定：粒度分布複数ピークもつ) で比較した。ミトコンドリア活性：安定は低下させる。細胞膜ダメージ：nSiO₂-1、nSiO₂-2 はわずかだが、nSiO₂-3 は両細胞に対して顕著な変化あり。 ④ SiO₂ 粒子による ROS の誘発 nSiO₂ は 24 時間後でコントロールのせいぜい 1.6 倍と、わずかである。脂質過酸化は n SiO₂-1、n SiO₂-2 はコントロールの 2 倍だが、n SiO₂-3 は 5 倍。 ⑤ SiO₂ 粒子によるカスパーゼ-3 活性の誘発 アポトーシスの誘発能力の評価。</p>	<p>・ nSiO₂ の細胞影響はメーカーによって異なり、この研究において、nSiO₂ によって起こされた細胞影響の物質的なおよび/または化学的なファクターは、明確に決定することができなかった。 ・ nSiO₂ の可溶性および蛋白質吸着能力とその細胞影響の関係性は小さいようであった。 ・ nSiO₂s の細胞影響は金属酸化物ナノ粒子のそれと同様であるにもかかわらず、nSiO₂s の違う細胞効果の原因のうちの 1 つは、違う表面特性であるかもしれない。細胞影響のメカニズムは違うかもしれない。これらの影響はこれらの表面特性に依存でするかも知れず、ミクロスケールの SiO₂ 粒子の細胞影響に比べて、それらが特に強力ではなかったことに注目されるべきである</p>

			<p>(DLS)、SiO₂ 濃度 (XRF)、Ca 量 (SiO₂ から推定)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・粒子のタンパク質、Ca 吸着能力の測定 (遠心分離後、上澄み液を測定) 	<p>24 時間に、DPPP 使用して測定。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・カスバーゼ-3 活性の測定；7-アミノ-4-トリフルオロメチル クマリン (AFC) と複合した Asp-Glu-Val-Asp (DEVD) ペプチドの切断を用いて測定。 	<p>24 時間後測定で、増加あり。特に、n SiO₂-3 は、70.8 μg/mL の時、コントロールの 10 倍と顕著。</p>	<p>る。著者らの先行調査によると、n SiO₂s の細胞毒活性は、ZnO、CuO>n SiO₂>TiO₂、CeO₂ として要約できる (堀江ら、2010、2011、2012)</p>
--	--	--	--	--	---	--

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間試験方法	試験結果	結論
SiO 2-8	Imai S., Yoshioka Y., Morishita Y., Yoshida T., Uji M., Nagano K., Mukai, Y., Kamada H., Tsunoda S., Higashisaka K., Tsutsumi Y. Nanoscale Research Letters 2014, 9:651	Size and surface modificatio n of amorphous silica particles determine their effects on the activity of human CYP3A4 in vitro 非結晶のシリ カ粒子のサイ ズと表面部分 修飾は in vitro のヒト CYP3A4 活 性へのそれ らの影響を 決定する	■試験物質/試料調整法 ・シリカナノ粒子： 直径 30、70nm (nSP30、 nSP70) ・従来のシリカ微粒子： 直径 300、1,000nm (mSP300、mSP1000) ・カルボキシル基修飾 (nSP30-C、nSP70-C) アミ ン修飾 (nSP30-N、nSP70-N) 購入先：Micromod Partikeltechnologie 社 (独)。 水中に分散保管。使用直前に 5 分間超音波、1 分間攪拌。 ・超純水又は 10%胎児牛血 清 (FCS)、1%抗生物質抗か び混合ストック溶液 (Ab) を 加えた Dulbecco 修正 Eagle 培養液で 0.1 又は 0.2 mg/mL に希釈し、平均粒径 と ζ 電位 (zetasizer Nano-ZS)、粒径 (DLS)、ζ 電位 (レーザードップラー電 気泳動) 測定。 ・平均粒径 (DLC 測定)： nSP30, nSP30-C, nSP30-N, nSP70, nSP70-C, nSP70-N, mSP300, mSP1000 : 36.8 ±3.0, 49.0±1.7, 40.4 ±0.9, 86.2±2.7, 78.7± 0.3, 103±0, 293.0± 2.7, 1, 253.3±32.1 nm (水中), 84.9±1.9, 294.0±45.0, 410.3±48.2, 128.3±2.3,	①■試験物質； HLMs (Xtreme 200) (購入先： XenoTech、米国) ・ケトコナゾール〈代表的 CYP3A4 抑制剤〉 ・ルシフェリンイソプロピルアセ タール (LIPA) 〈CYP3A4 によ って物質代謝され、ルシフェリンを 放出。LIPA と ATP ルシフェラー ゼ反応混合物との反応後、蛍光に よって CYP3A4 活性を定量〉 ■投与方法・期間試験方法 ・HLMs 中の CYP3A4 活性評価 培養混合物 HLMs 20µg/mL LIPA 10µmol/L リン酸カリウム緩衝液 15µL シリカ粒子濃度：2, 10, 50, 200, 800 µg/mL 又はケトコナゾール： 200nmol/L を 10 分、37°C で事前培養後、 NADPH 再生システム 15 µL を添 加して酵素反応開始。 加えて、 添加順を変えて、シリカ粒子と LIPA、シリカ粒子とミクロゾーム たんぱく質の物理的な結合の有無 を確認した。 ②■試験生物 HepG2 細胞 (10%FCS、1% Ab を 含む Dulbecco 修正 Eagle メ培養 液に維持) ■投与方法・期間試験方法 ・乳酸塩デヒドロゲナーゼ (LDH) 放出アッセイ	①シリカ粒子の HLMs の CYP3A4 活性への影響 抑制定数 (IC50) は、nSP30、 nSP30-C、nSP30-N、nSP70、 nSP70-C、または mSP300 によ って用量依存的に減少した。 mSP1000-処理グループはコント ロールグループと比較して有意な 差無し。 無修飾シリカ粒子に対して、IC50 は粒度増大に伴い増大した。 対照的に、nSP30 と nSP70 に対 する IC50 値は、nSP30-C、 nSP30-N、nSP70-C に対しての値 より低く、表面部分修飾によって 粒子の抑制ポテンシャルが変更さ れたことを示している。 なお、nSP70-N は増加しており、 アミン基の影響が nSP30-N とは 異なっている。 シリカナノ粒子と mSP300 が、ミ クロゾームたんぱく質と物理的に 結合し、HLMs の CYP3A4 活性に 影響したことを示唆する。 ②HepG2 細胞と HepG2 細胞の CYP3A4 活性へのシリカ粒子の細 胞毒性 25、50、100、200µg/mL のシリ カ粒子濃度、48 時間の処理時にグ ループの生存率は約 100%であり、 この条件では粒子は膜損傷を引き 起こさなかった。 対照的に、nSP70, nSP70-N、m SP300、または mSP1000 処理が CYP3A4 活性への影響が無かった	・シリカ粒子 が生体外で CYP3A4 活 性を抑制す るか、または 活性化でき ることを初 めて報告す る。より小 さい粒子が、 より大きい粒 子より、 CYP3A4 活 動を抑制す る大きい可 能性を持ち、 シリカ粒子 の表面部分 修飾によ ってそれら の CYP3A4 活 性への影響 が変更でき ることを示 した。結果 は、シリカ粒 子のサイズ と表面部分 修飾の最適 化がシリカ ナノ粒子の より安全な 適用の開発 に寄与する ことを示唆

		<p>267.0±28.6, 267.3±2.1, 249.3±24.0, and 1,083.3±35.1 nm (培養液中)。</p> <p>・表面電位 (ドップラーで測定): nSP30, nSP30-C, nSP30-N, nSP70, nSP70-C, nSP70-N, mSP300, mSP1000: -32.5±1.4, -46.9±1.8, -18.3±1.9, -58.4±0.2, -64.3±1.9, -35.6±1.1, -56.4±0.7, -72.4±0.6 mV (水中)、-9.0±1.0, -11.2±0.2, -11.1±1.1, -10.0±0.1, -10.2±0.5, -10.1±1.0, -9.3±0.5, -10.0±1.6m V (培養液中)</p>	<p>商業用の LDH 細胞毒性試験 (和光純薬) を使用して実施。</p> <p>シリカ粒子 (25µg から 200µg まで/mL)、48 時間培養。上澄液の吸光分析。</p> <p>・HepG2 細胞中の CYP3A4 活性評価</p> <p>シリカ粒子処理は LDH 放出アッセイと同様。</p> <p>48 時間培養後、細胞はリン酸塩緩衝液で洗浄後、LIPA(3µmol/L)200µL 添加 1 時間後、培養液採取し、100µL ルシフェリン検知リガンド添加、蛍光分析。</p>	<p>のに対して 50、100、200µg/mL する。</p> <p>の nSP30、100、200µg/mL の nSP30-C、100µg/mL の nSP30-N、200µg/mL の nSP70-C 処理は、コントロールグループに比べて、かなり下の CYP3A4 活性を結果として生じた。</p> <p>これらの結果は、より小さいシリカ粒子が、細胞の CYP3A4 活性を抑制するより大きいポテンシャルを持っていたことを示唆する。</p>
--	--	---	--	--

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質試料 調整法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間試験方法	試験結果	結論
SiO 2-9	Kim YH, Boykin E., Stevens T., Lavrich K., Gilmour M. Journal of Nonobiotechnology 2014, 12:47	Comparative lung toxicity of engineered nanomaterials utilizing in vitro, ex vivo and in vivo approaches (in vitro, ex vivo, in vivo) を利用した工業ナノマテリアルの比較肺毒性)	■試験物質 工業ナノ材料 (ENM) ・SiO ₂ (10) (一次直径 5-15nm; 無定形; Sigma Aldrich) ・CeO ₂ (23) (同 15-30nm; セリアナイト; NanoAmor) ・CeO ₂ (88) (同 70-105nm; セリアナイト; Alfa Aesar) ・TiO ₂ (10) (同 10nm; アナターゼ; Alfa Aesar) ・TiO ₂ (200) (同 200nm; アナターゼ; Acros Organics). DLS で測定した各水力直径 (nm) (水、生理食塩水 (in vitro)、培養液 (ex vivo)、培養	■試験生物 おとな無菌雌 CD-1 マウス (体重: 肺毒性用-20-25g、肺組織スライス用-30-45g) (購入先: Charles River 繁殖研究所) ■投与方法・期間試験方法 ①口咽頭吸引 (in vivo) 50μL 生理食塩水中の 100μg の ENM ネガ: 50μL 生理食塩水 ポジ: 2μg のリポ多糖体 暴露時間: 4、24 時間 ・安楽死後、採血と解剖、肺胞洗浄。血液学値測定 (全白血球、全赤血球、ヘモグロビン、ヘマトクリット、平均血球容積、平均血球ヘモグロビン濃度、血小板)。 ・生化学とサイトカイン分析; 乳酸塩デヒドロゲナーゼ (LDH) と γ-グルタミルトランスフェラーゼ (GGT) 濃度、アルブミンと全たんぱく質濃度、N-アセチル-s-D-glucoaminidase (NAG) 活性、腫瘍壊死因子-α (TNF-α) およびインターロイキン 6 (IL-6) の濃度、および BALF のマクロファージ抑	①肺炎症反応 (in vivo) ・BALF へ放出された LDH 濃度は、コントロールに比べ、CeO ₂ (88) (暴露後 24 時間) を除いてどれもさほど増加しなかった。 ・N-アセチル基-s-D-グルコサミニダーゼに比べて、リソソーム酵素および酸化ストレスのバイオマーカーとしての (NAG) と γ-グルタミルトランスフェラーゼ (GGT) は、不変であった。 ・CeO ₂ (23) (暴露後 4 時間、24 時間) は、BALF 中のアルブミンおよび全たんぱく質濃度を顕著に増加させ、この物質が肺浮腫を起こしたことを示した。 ②肺炎症反応 (ex vivo, in vitro) ・暴露後 24 時間の肺組織スライスからの上澄み液の LDH、GGT、および NAG 濃度は、試験されたどの濃度でも変化がなかった。最も高い濃度 (132μg/mL) の時の SiO ₂ (10) だけがネガティブなコントロールに比べて IL-6 と MIP-2 の濃度をかなり増大させた。また、CeO ₂ (23) は IL-6 濃度を増大させたが、これは統計的に有意ではなかった。 ・暴露後 24 時間の ENM 暴露 MH-S 細胞からの細胞培養上澄み液の評価は、すべての ENM が LDH 放出を用量依存的に増加させることを明らかにした。SiO ₂ (10) と TiO ₂ (10 と 200) は多少細胞毒性を示したが、明白なサイズ依存の影響 (細胞膜完全性についての) は観察されなかった。SiO ₂ (10)、CeO ₂ (23)、	・小さなサイズの ENM (SiO ₂ (10) と CeO ₂ (23)。TiO ₂ (10) を除く) はマウスにおいて急性肺毒性を引き起こした (in vivo)。CeO ₂ (23) はマウス肺中へのサイトカイン (IL-6、TNF-α、MIP-2) 放出、好中球の増加、たんぱく質増加に対して最も強い影響がある一方、より大きい CeO ₂ (88) と TiO ₂ (200) はそれほど強力ではなく、影響が ENM のサイズおよび化学組成に依存することを示した。 ・肺組織スライス (ex vivo) および肺胞マクロファージ (in vitro) 両方からの ENM 毒性の順位は、マウス (in vivo) から順位付け結果とうまく一致し、肺マクロファージがこの影響を反映していることを示唆した。暴露が細胞表面積あたりの質量に基づいた時には、ex vivo と in vitro の炎症反応がほとんど同様なプロファイ

		液 (in vivo) : 100 μ g/mL SiO ₂ (10) : 401, 574, 458, 342 CeO ₂ (23) : 131, 269, 796, 432 CeO ₂ (88) : 162, 239, 500, 220 TiO ₂ (10) : 402, 739, 645, 660 TiO ₂ (200) : 387, 690, 493, 417	制たんぱく質 2 (MIP-2) ②EMN の ex vivo 毒性 ■投与方法・期間試験方法 ENM 懸濁液は 2 分間超音波処理、1 分間攪拌後、22、44、66、132 μ g/mL に培養液で希釈。 2 日間培養後、肺細胞スライスは、24 時間、合計量 0.5mL に暴露 (ポジは 87ng/mL の LPS、ネガは培養液のみに暴露)。 ENM への暴露後の組織培養液の上澄み液と組織ホモジネートは、細胞外の (LDH、NAG) および細胞内 (GGT) 生化学分析、サイトカイン分析 (IL-6、MIP-2、TNF- α) に使用。 ③EMN の in vitro 毒性 ■試験生物 ネズミ科肺泡マクロファージ (MH-S) 細胞 (購入先 : ATCC) ■投与方法・期間試験方法 暴露粒子濃度 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, and 100 μ g/mL (ポジ : 37°C のトリトン X-100、ネガ : 培養液のみに暴露) 培養液中 24 時間暴露。 ・生化学とサイトカイン分析	CeO ₂ (88)、TiO ₂ (10)、TiO ₂ (200) の細胞膜完全性に対する 50% 効果濃度 (EC50) は、それぞれ約 100、295、141、330、384 μ g/mL であった。 ・ミトコンドリアの代謝活性に基づく細胞生存能力は暴露後 24 時間で評価された)。LDH 分析データと同様に、また、ENM の用量依存影響が観察され、細胞生存能力に対する LEC50 は、SiO ₂ (10)、CeO ₂ (23)、CeO ₂ (88)、TiO ₂ (10)、TiO ₂ (200) で、それぞれ約 13、18、55、30、77 μ g/mL であった。 従って、生存能力に対する EC50 に基づく ENM の毒性順位は、SiO ₂ (10) > CeO ₂ (23) > TiO ₂ (10) > CeO ₂ (88) > TiO ₂ (200) の順にあった。LDH に対する EC50 がずっと高かったのも、これは、細胞膜完全性よりミトコンドリアの機能が ENM 暴露に敏感であったことを示す。 ・暴露後 24 時間の DNA 含有量に基づき細胞増殖も測定した結果、細胞数は、高い濃度暴露で ENM-暴露されたグループを除いて、どれも顕著な変化は見られなかった。100 μ g/mL 濃度の時に、SiO ₂ (10) は MH-S 細胞数を顕著に減少させる一方、TiO ₂ (10) と TiO ₂ (200) は細胞数を顕著に増大させた。 ・MH-S 細胞中の炎症誘発サイトカイン IL-6 の濃度を暴露後 24 時間に測定した。SiO ₂ (10) は、IL-6 肺組織スライス反応が同様に並んでいる他の ENM よりもより多い IL-6 生産を引き起こした。	ールであることが明白であった。 ・3 つの異なる試験方法からの急性肺毒性エンドポイントの間で比較的良好な相互関係を示したけれども、影響の可逆性または長期毒性への進行をより一層研究することを未だ必要としている。それにもかかわらず、結果は、細胞または肺組織スライスによって動物肺毒性試験を置き換えることの実現可能性のより一層の証拠を提供し、生物系における ENM 毒性の解釈を改善する重要なパラメーター (例えば、アグロメレーション状態および暴露用量の計量) についての情報を提供する。
--	--	---	---	--	--

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質試料調整法/試験用量	試験生物投与方法・期間/試験方法	試験結果	結論
ナノセルロース	Catalán J, Ilves M, Järventausta H, Hannukainen KS, Kontturi E, Vanhala E, Alenius H, Savolainen KM, Norppa H /Environ Mol Mutagen. 2014 Sep 24	Genotoxic and immunotoxic effects of cellulose nanocrystals in vitro (in vitro でのセルロースナノ結晶の遺伝毒性および免疫毒性効果)	<ul style="list-style-type: none"> ●対象物質 <ul style="list-style-type: none"> ・ CNC : セルロースナノ結晶 ・ サイズ : 幅 7.3±0.2nm ・ フィブリル長さ 135±5nm ・ MCC : 微結晶 (非ナノスケール)セルロース ・ サイズ : 粒子径約 50µm <ul style="list-style-type: none"> ●CNC 試料調整方法 ・ Whatman 1 フィルターの天然綿を硫酸で液体化し、酸を洗浄し、ウイスキーを抽出 ・ sulfur/carbon 比 = 0.015 	<ul style="list-style-type: none"> ●試験生物 ①BEAS 2B : ヒト気管支上皮細胞 ②hMDMs : ヒト単球由来マクロファージ <ul style="list-style-type: none"> ●試験方法 a. 細胞毒性 ①BEAS 2B 20,000セルを含む 1ml の BEGM 液を 24 培養皿に移し、MCC、CNC を添加 <ul style="list-style-type: none"> ・ 濃度 : 5、15、30、60、100、150、300µg/ml ・ 測定時間 : 4、24、48 時間 ②hMDMs 300,000セルを 24 培養皿に移し、半数は 1µg/ml の LPS で処理し、MCC、CNC を添加 <ul style="list-style-type: none"> ・ 濃度 : 30、100、300µg/ml ・ 測定時間 : 6 時間 b. 小核分析—MN アッセイによる ①BEAS 2B 250,000セルを T25 フラスコで 72hr 培養し、MCC、CNC を添加 <ul style="list-style-type: none"> ・ 濃度 : 2.5、5、15、30、60、80、100µg/ml ・ 24hr 後 Cytochalasin B (9µg/ml) 添加 ・ 測定時間 : 48hr ・ コントロール : セルロース無添加 ・ ポジティブコントロール : mitomycin C (150ng/ml) 添加 ・ 1 培養当たり 200セルにつき CBPI をカウント 	<ul style="list-style-type: none"> ●BEAS 2B における細胞毒性、細胞周期遅れ、小核誘発 ・ CNC は 4hr 後および 48hr 後において、他の測定時間に比し高い細胞生存率を示した。MCC は各暴露時間でほぼ同等の生存率であった。 ・ 48hr 暴露後の 55%細胞毒性を細胞生存率、蛍光細胞生存測定両方で評価した結果、CNC、MCC とも 100µg/ml が MN アッセイの最大投与量とした。(Table-1) ・ MN アッセイにより CBPI を評価した結果、両セルロースはいずれも、48 時間の処理 (2.5 ~ 100µg/ml) 後に二核または単核 BEAS 2B 細胞における小核 (MN) を誘導しなかった。 <ul style="list-style-type: none"> ●hMDMs における細胞毒性、サイトカイン放出 ・ CNC、MCC とも 0~300µg/ml の投与に対し、LPS 処理、未処理とも、生存率に差はなかった。 ・ CNC (30-300µg/ml) では IL-18、TNF-α の放出はなかったが、MCC は、LPS 処理の 300µg/ml 投与 6hr 暴露で、IL-18 の有意な放出を誘導し、また LPS 未処理の 300µg/ml 投与で TNF-α の有意な放出を誘導した。この放出は投与量に依存し増加し 	<ul style="list-style-type: none"> ・ MCC、CNC ともヒト気管支上皮細胞に遺伝毒性を示さなかった ・ MCC が IL-18、TNF-α を誘導するのに対し、CNC は、試験した条件下で、炎症反応は示さなかった。

				<p>c. hMDMs におけるサイトカイン放出</p> <ul style="list-style-type: none">・ 12 培養皿培養の LPS 処理及び未処理の各 500,000 セルに MCC、CNC を添加・ 濃度 : 30、100、300μg/ml・ 測定時間 : 6 時間・ コントロール : セルロース無添加・ ネガティブコントロール : LPS1μg/ml 添加・ ELISA アッセイによりサイトカイン放出を測定	た。	
--	--	--	--	---	----	--

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法/試験用量	試験生物/投与方法・期間/試験方法	試験結果	結論
Ag-1	Herzog F, Loza K, Balog S, Clift MJ, Epple M, Gehr P, Petri-Fink A, Rothen-Rutish auser B /Beilstein J Nanotechnol. 2014 Aug 26;5:1357-70	Mimicking exposures to acute and lifetime concentrations of inhaled silver nanoparticles by two different in vitro approaches (二つの異なる in vitro のアプロー チによる吸入銀 ナノ粒子の急性 および生涯濃縮 に対する模擬暴 露)	●対象物質 ・PVP コート AgNPs ポリビニールピロ リロン 平均粒径：116nm ゼータ電位：20mV ●試料調整方法 ・2g ブドウ糖＋ 1gPVP＋40g 水を 90℃に加熱し、1ml の水に溶解した 0.5gAgNO ₃ を添加し 1hr 加熱 ・遠心分離、洗浄し、 ブドウ糖、酸化物、 Ag イオン等を除去 ・24、240、 2400µgAg/ml に調整	●試験生物 ヒト肺胞/気道障壁 (A549 上皮細胞、 ヒト末梢血単球由来樹状細胞および マクロファージ細胞) のトリプル細胞 共培養モデル ・A549 (人肺胞タイプ II 上皮細胞由 来腺癌) を RPMI1640 液で培養 ・培養後、0.5x10 ⁶ cells/ml を培養皿に 移し、RPMI 中で 5 日培養 ・MDDCs (単球由来樹枝状細胞) は 末梢血単球を RPMI 液中に 10ng/ml IL-4+10ng/ml GM-CSF を添加し、7 日培養し作成 ・MDMs (単球由来マクロファージ) は末梢血単球を RPMI 液中に 10ng/ml M-CSF を添加し、7 日培養し作成 ・2.5x10 ⁵ MDDCs に 5x10 ⁴ MDMs を 添加し、24hr 培養し、トリプル細胞 共培養モデルとする。 ●試験方法 a. 浸漬試験 ・トリプル細胞共培養モデルに AgNPs (10、20、30µgAg/ml) 1ml を添加し、 4hr～24hr 培養 ・4hr 後の表面 Ag 濃度：0.6、1.1、 1.7µgAg/cm ² ・24hr 後の表面 Ag 濃度：1.7、3.4、 5.1µgAg/cm ² b. 気液界面 (ALI) の細胞の曝露試験 (ALICE) ・最終表面濃度(0.03、0.3、3µgAg/cm ²) となるよう、AgNPs 液 1ml を ALICE に噴霧	●細胞組織と銀粒子の取込 ・LSM による観察では、a、b と も細胞組織、DNA の変化はなかつ た。 ・トリプル細胞共培養モデルの表 層の細胞とその小胞に AgNPs の 集合体が見出された。 ●細胞毒性 ・b において、細胞毒性 (LDH) の放出の有意な増加はなかつた が、3µgAg/cm ² 、24hr では 2.7±1.3 倍と高いレベルを示した。 ・a において、20、30µgAg/ml、 24hr では、それぞれ 2.0±0.5、 1.9±0.3 倍と有意に増加した。また LPS 処理の 20µgAg/ml では 2.2±0.6 と有意に増加した。 ●サイトカイン/ケモキネ分泌 ELISA アッセイによる調査 ・b において、3µgAg/cm ² 、24hr で TNF-α が若干増加した。 また IL-8 の有意な変化はなかつた が、4hr より 24hr の方が放出は多 い。 ・a において、TNF-α の有意な変 化は観察されない。 また 30µgAg/ml、24hr で IL-8 の 有意な増加があった。 また a,b とも LPS 処理の影響はな かつた。 ●炎症誘発遺伝子発現と酸化スト レスマーカー (SOD-1、HMOX-1)	・二つの曝露方法 により、a の浸漬 試験は、b の ALICE より AgNPs 曝露の影 響が大きいこと が示された。 ・AgNPs の急性 細胞毒性、炎症誘 発性は実際の濃 度では起こり得 ない。 ・Ag NP の慢性的 吸引の研究を考 慮すべきである。

				<ul style="list-style-type: none">・両暴露法とも肺細胞表面の銀の表面濃度はほぼ等価である。	<ul style="list-style-type: none">・b の RNA を 4hr、24hr 後に収集し、分析・0.03$\mu\text{gAg}/\text{cm}^2$ 投与では、TNF-α、IL-8 の変化はないが、0.3$\mu\text{gAg}/\text{cm}^2$、4hr 後で、TNF-$\alpha$、IL-8 の有意な増加があった。しかし、24hr 後には変化がない。・LPS 処理では TNF-α、IL-8 は増加したが、AgNPs 投与量の影響はなかった。・酸化ストレスマーカーの変化はない。	
--	--	--	--	--	--	--

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法/試験用量	試験生物投与方法・期間/試験方法	試験結果	結論
Au-1	Han SG, Lee JS, Ahn K, Kim YS, Kim JK, Lee JH, Shin JH, Jeon KS, Cho WS, Song NW, Gulumian M, Shin BS, Yu IJ /Arch Toxicol. 2014 Jun 17	Size-dependent clearance of gold nanoparticles from lungs of Sprague-Dawley rats after short-term inhalation exposure (短期吸入暴露後の Sprague-Dawley ラットの肺からの金ナノ粒子のサイズ依存排出能)	●対象物質 ・ AuNPs サイズ 小 AuNPs : 平均 12.8nm 大 AuNPs : 平均 105.4nm	●試験生物 ・ Sprague-Dawley ラット : 6 週齢 ●投与方法 ・ ラットを経鼻暴露システムにセットし、AuNPs を投与 ・ AuNPs は 30 l/min の空気で霧化し、各鼻孔で 1l/min に調整 ・ 霧化空気中の AuNPs 濃度 : 13µg/m ³ ・ ラットを小 AuNPs 投与、大 AuNPs 投与、対照群 (無投与) の 3 グループに分離 (1 グループ 24 匹) ・ 1 日 6hr 暴露を 5 日継続 ●試験方法 ・ 投与終了後、1、3、28 日後に 8 匹ずつ解剖し、調査 ・ 血液、精巣、腎臓、脾臓、肝臓、肺、心臓、脳を採取 a. 外観、体重変化 ・ 外観を毎日観察 ・ 購入時、グループ分け時、暴露時毎日、暴露終了後 5 日毎に体重測定 b. 組織内の AuNPs の分布 ・ 臓器をホルマリン処理し、硝酸で溶解し、電子オーブンで 200°C、1h 処理 ・ 処理後、原子吸光分析計で分析 c. 毒物動態評価 ・ 肺組織中の金粒子を、暴露後 1、3、28 日後に測定 ・ 粒子濃度 vs 経過時間より、薬物動態パ	a. 外観、体重変化 ・ 投与中および回復期間中とも、AuNPs 投与の影響は見られない。 b. 組織内の AuNPs の分布 ・ 小 AuNPs 投与群では、回復期間中に AuNPs は肺、脾臓に高度に有意に集積し、また回復 1 日後では肝臓、脳、精巣、血液に有意に集積したが、3、28 日後では有意でない。 ・ 大 AuNPs 投与群では、回復期間中に AuNPs は肺に高度に有意に集積した。 ・ また回復 1 日後のみ血液に有意に集積した。 c. 毒物動態評価 ・ 肺の薬物動態パラメータ (t _{1/2} 、C _{max} 、AUC _{all} 、AUC _{inf} 、MRT _{all} 、MRT _{inf}) は大 AuNPs 投与において、小 AuNPs 投与より長い t _{1/2} 、MRT を示した。 d. 病理組織評価 ハイパースペクトル ・ 肺の病理組織はいずれの AuNPs について変化を示さなかったが、かすかな肺胞の肥厚があった。 ・ 肺胞、肺胞マクロファージ、肺リンパ節に 28 日後も大、小 AuNPs がハイパースペクトル画像で観察される。	・ 本研究データは、小 AuNPs が大 AuNPs よりも速い速度で肺 (一次曝露器官) から肺外臓器へ転位することができることを示唆している。

				<p>ラメータを計算 (MinNonlin : 非線形最小二乗法ソフト)</p> <p>d. 病理組織評価</p> <ul style="list-style-type: none">・臓器をホルマリン処理しヘマトキシリンとエオシンで染色・処理後、ハイパースペクトル顕微鏡で観察	<ul style="list-style-type: none">・肺に比べ、肝臓、脳、精巣、腎臓、脾臓の AuNPs は僅かである。	
--	--	--	--	--	--	--

No	著者/書誌事項	論文題目(和訳)	試験物質/試料調整法/試験用量	試験生物投与方法・期間/試験方法	試験結果	結論
Ag-2	Vandebriel RJ, Tonk EC, de la Fonteyne-Blank estijn LJ, Gremmer ER, Verharen HW, van der Ven LT, van Loveren H, de Jong WH /PartFibre Toxicol. 2014 May 7;11:21	Immunotoxicity of silver nanoparticles in an intravenous 28-day repeated-dose toxicity study in rats (ラットにおける静脈 28 日間 反復投与毒性試験における銀ナノ粒子の免疫毒性)	●対象物質 ・ AgNPs : 平均粒径 21nm 濃度 : 2mg/ml (1mM クエン酸塩中) ・ KLH : キーホールリンペットヘモシアニン	●試験生物 ・ Wistar derived WU ラット : 雄、8 週齢 ●投与方法 ・ AgNP 実験グループ ・ 28 日間 1 回/日 AgNP 尾静脈注射 ・ 投与 AgNP 量 0 (対照群: PB のみ)、0.0082、0.025、0.074、0.22、0.67、2、6mg/kg(体重) ・ KLH200µl を 14 日目、28 日目に首に注射 ・ KLH 免疫効果確認グループ KLH 投与無し + AgNP6mg/kg KLH 投与無し + AgNP 無し ●試験方法 ・ 49 日後に解剖し、臓器、血液を収集し、各種分析 ・ 測定値は統計処理モデル (BMD) により解析 ①AgNP 暴露効果 a. 体重、臓器重量測定 b. 血液分析 ・ Advia 120 Hematology Analyser で分析 赤血球、ヘモグロビン、白血球を分析 c. 脾臓細胞数分析 ・ FACSCalibur フローサイトメーターで分析 d. 骨髄細胞 ・ 大腿骨細胞を集め、有核細胞数を計測 ②KLH 免疫効果 (投与方法 (Fig2))	①AgNP 暴露効果 a. AgNP1.84mg/kg で体重減少、AgNP0.76mg/kg で胸腺重量減、脾臓重量は増加 ・ 肝臓、腎臓重量には AgNP の影響は無い b. 血液分析-AgNP 暴露の影響 ・ RBC、RDW、HDW は、BMDL s 2.04、1.50、1.28mg/kg で増加 ・ MCV、MCH、MCHC は、BMDL s 1.77、1.39、5.65mg/kg で減少 ・ HGB、HCT、PLT、MPV は AgNP の影響はない。 ・ 白血球の好中球、モノサイト、大非染色細胞、網状赤血球の比率は、BMDL s 0.69、0.48、1.24、0.85mg/kg で増加 ・ モノサイト数は BMDL0.35mg/kg で増加 ・ リンパ球は BMDL2.57mg/kg で減少 c. 脾臓細胞数分析 ・ 脾臓細胞数、CD3、CD4、CD8 細胞比は BMDL s 0.74、1.09、1.11、0.73mg/kg で増加 ・ CD3、CD4、CD8 細胞数は BMDL s 0.45、1.09、0.46、0.39mg/kg で増加 ・ CD161a 細胞の比と数は BMLD0.62、0.36mg/kg で増加 ・ CD45RA 細胞の比は影響なく、数は BMLD 0.68mg/kg で増加 ・ CD3/CD45RA 比は BMLD0.86mg/kg で増加 d. 骨髄細胞数への AgNP 投与の影響は無い。 ②KLH 免疫効果 e. KLH 免疫は体重、臓器重量に影響しなかった。	・ Ag-NP の静脈注射は、機能免疫系の抑制をもたらす。・ この効果は AgNP の緩慢な溶解による銀イオンによりもたらされたことを、否定できない。

				<p>e. 体重、臓器重量測定</p> <p>f. KLH による IgG、IgM の測定</p> <ul style="list-style-type: none">・血清を ELISA で IgG、IgM を測定・490nm でスペクトロメータで測定 <p>g. サイトカイン生成</p> <ul style="list-style-type: none">・胸腺と脾臓を圧縮し、細胞を収集し、10^6細胞/ml を細胞培養皿で 24hr 培養・培養後、Bio-Plex で分析	<p>f. KLH による IgG、IgM の測定</p> <ul style="list-style-type: none">・KLH 特定 IgG は BMLD0.4mg/kg で減少し、KLH 特定 IgM は BMLD3.64mg/kg で増加した。 <p>g. サイトカイン生成</p> <ul style="list-style-type: none">・胸腺細胞の IL-10、IL-17 は BMLD0.58、1.47mg/kg で減少し、脾臓細胞の IL-18、IL-6 は BMLD1.57、1.21mg/kg で減少した。・胸腺細胞の IFN-γ、IL-2、TNF-α、脾臓細胞の IL-2、IL-10 は AgNP 暴露の影響はなかった。	
--	--	--	--	--	--	--

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
Au-2	Zhang J, Nie X, Ji Y, Liu Y, Wu X, Chen C, Fang X /J Nanosci Nanotechnol. 2014 Jun; 14(6):4124-38	Quantitative biokinetics and systemic translocation of various gold nanostructures are highly dependent on their size and shape (各種金ナノ構造 体の定量的生体 内動態および全 身転移のサイズ 形状依存性)	<ul style="list-style-type: none"> ●対象物質 <ul style="list-style-type: none"> BSA 被覆各種金ナノ粒子 (GNP) ・金ナノクラスター : GNC <ul style="list-style-type: none"> 平均サイズ: 7.1nm ・加水分解 GNC <ul style="list-style-type: none"> 平均サイズ: 3.2nm ・金ナノロッド: GNR <ul style="list-style-type: none"> 平均サイズ: 57.5x18.2nm ・金ナノスフィア : GNS <ul style="list-style-type: none"> ・20nmGNS 粒径: 17.8nm ・50nmGNS 粒径: 54.2nm ・表面ゼータ電位は全 GNP で負極性 ●試料調整方法 <ul style="list-style-type: none"> ・GNC : 5mlHAuCl₄ (10mM) を 5mlBSA (30mg/ml) に添加後、0.5mlNaOH(1M) を加え、変色後洗浄 ・加水分解 GNC : 5mlGNC を 5mg トリプシン添加の 10mINH₄HCO₃ (50mM) に加え合成し、洗浄 ・GNR : CTAB 被覆 GNR を 1%BSA に添 	<ul style="list-style-type: none"> ●試験生物 <ul style="list-style-type: none"> ・雄 Balb/C マウス : 8 週齢 ●投与方法 <ul style="list-style-type: none"> ・0.5mgAu/kg を含む各種 GNP (GNC、加水分解 GNC、GNR、2 種の GNS) を 200µl の PBS に溶解し、静脈注射 ●試験方法 <ul style="list-style-type: none"> ・投与後、2min、10min、30min、60min、1 日、7 日、28 日に解剖し、血液、臓器 (心臓、肝臓、脾臓、肺、腎臓、脳) を採取 ・投与後、3hr、9hr、1 日、3 日、5 日、9 日に尿を採取 	<p>a. Au 含有量の ICP-MS 分析</p> <p><u>臓器内の Au 分布</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ・サイズ 10nm 以下の小サイズ GNC、加水分解 GNC は腎臓、脳、心臓に蓄積した。腎臓への蓄積は加水分解 GNC が GNC より多かった。 ・心臓、肺、脳への蓄積は 10 分後にピークとなったが、28 日後では大サイズ GNP と同等レベルとなった。(Fig5) ・大サイズの GNP は肝臓に蓄積し、注射 10 分後に、50nmGNS で投入量の 90%、GNR では 60%、20nmGNS では 40% が蓄積された。 <p><u>血中の Au</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ・GNC、加水分解 GNC は注射 10 分後で血中に投入量の約 10% が残ったが、GNR、20nmGNS、50nmGNS では注射 2 分後で血中に投入量の約 5% しか残らなかった。(Fig4C) <p><u>尿中の Au</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ・小サイズ GNP s では尿中 Au は高濃度で、特に加水分解 GNC では注射後 1~7 日で高かった。 ・大サイズ GNP s は殆どなかった。 <p>b. 血清の生化学分析</p> <ul style="list-style-type: none"> ・血清をバイオケミカルアナライザー (日立) で肝臓、腎臓への影響を分析 ・BUN(A)、CREA(B)、ALT(C)、AST(D)、TP(E)、ALB(F)、GLOB(G) を測定 <p>c. 病理組織分析</p> <ul style="list-style-type: none"> ・肝臓では、50nmGNS は投与 10 分で血管周辺細胞浮腫、炎症細胞浸潤が観察され、20nmGNS は 60 分で広範囲の脂質/空胞の 	<ul style="list-style-type: none"> ・20nm 以上の GNP s は血流から速やかに除去され、肝臓に蓄積される。 ・GNC は半分以上は肝臓に、10% は腎臓に蓄積される。 ・加水分解 GNC は殆ど腎臓に蓄積される。 ・尿中への排出は、腎臓への蓄積に密接に関連している。 ・GNS は急性肝臓損傷をもたらすが、GNR は 28 日後に肝臓損傷が見られた。 ・加水分解 GNC では腎組織の損傷が見られたが、同時に尿への排出が始まった。

			<p>加、合成後、遠心分離</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ GNS : 10ml 水、100μlCTAB (0.1M)、105.3μlHAuCL₄(23.9mM)を混合後、400μlL-アスコルビン酸(0.1M)を添加 ・ 10nmGNS を含むタネ溶液 1.6ml、0.75ml を加え、20、50nm の GNS を合成し、1%BSA に添加し、遠心分離 	<p>c. 病理組織分析</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 投与 28 日後、心臓、肝臓、脾臓、肺、腎臓、脳の組織を HE ステイン後光学顕微鏡で観察 	<p>変質、異常小葉構造、肝索の消失が観察された。GNR では 28 日後に血管周辺に小さなネクロシスがあった。GNC、加水分解 GNC では病変は観察されない。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 腎臓では、特に加水分解 GNC で糸球体の減少、浮腫が 1 日後まで観察されたが、28 日後までに徐々に回復した。 ・ 心臓、肺、脳では全 GNP で病変は観察されない。 	
--	--	--	--	--	--	--

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質試料調整法/試験用量	試験生物投与方法・期間試験方法	試験結果	結論
Ag-3	Verano-Braga T, Miethling-Graff R, Wojdyla K, Rogowska-Wrzesniska A, Brewer JR, Erdmann H, Kjeldsen F /ACS Nano.2014 Mar25;8(3):2161-75	Insights into the cellular response triggered by silver nanoparticles using quantitative proteomics (量的プロテオミクスを用いた銀ナノ粒子起因細胞反応に対する考察)	●対象物質 クエン酸塩被覆 AgNPs ・10nmAgNP 平均粒径：20.6nm ・100nmAgNP 平均粒径：93.1nm (Fig1,Table1) ・AgNO3：Ag ⁺ イオンソース ●試料調整方法 ・AgNPs0.02mg/mlを2mMのクエン酸塩バッファに分散	●試験生物 ・LoVo細胞 (人結腸癌細胞) 単層として RPMI1640液 +10%FBS (グルタミン含有) で培養 ●試験方法 ①プロテオーム分析 ・3x10 ⁵ cell/mlをT75フラスコ中で培養 ▼投与方法(Fig2) ・10μg/mlのAgNPs投与グループ 20nmAgNPs、100nmAgNPs投与 ・Ag ⁺ イオングループ AgNPs投与24hr後、粒子を遠心分離で除去し、Ag ⁺ イオンに暴露 Ctrl20nm、Ctrl100nm Ag ⁺ ：対照群：1μg/ml Agイオン (AgNO3添加) ・無投与グループ：Control ▼試験方法 a. プロテオーム分析 ・たんぱく質をトリプシンで消化し、ペプチドをiTRAQで分類、質量分光分析 (MS) で定量する。 b. 遺伝子オントロジー分析 (GO) c. 蛋白質間相互作用 ・STRING (遺伝子/蛋白質相互作用検索ツール) による蛋白質間相互作用の解析 d. 階層的クラスタ分析 蛋白質変化をAgNPs別に6分類し解析 ・クラスタI：20nmによる発現増加 ・クラスタII：両粒子による発現増	①プロテオーム分析 a. 3352の蛋白質の内、AgNPsによる変化(Fig3) ・20nmAgNPs投与：発現減少340、発現増加280 ・100nmAgNPs投与：発現減少378、発現増加339 ・Ctrl20nm投与：発現減少120、発現増加132 ・Ctrl100nm投与：発現減少254、発現増加204 ・粒子単独効果は20nmで467、100nmで306であった。 b. 遺伝子オントロジーによる蛋白質変化分析 ・20nmAgNPsは100nmAgNPsより多くの蛋白質変化をもたらした。 ・特にミトコンドリア蛋白質はAgNPsにより発現減少、細胞基質蛋白質は発現増加の傾向がある。 c. 蛋白質間相互作用のAgNPsの影響(Fig5)、 ・20nmAgNPsは100nmAgNPsより、ミトコンドリア呼吸鎖の蛋白質の発現減少と、DNA損傷応答の蛋白質の発現増加をもたらした。 ・20nmAgNPsのみの蛋白質クラスタ変化 発現減少：ミトコンドリア伝達系、RNA処理、細胞増殖 発現増加：tRNA代謝 ・100nmAgNPsのみの蛋白質クラスタ変化 発現減少：脂質代謝、膜対象蛋白質 発現増加：糖質代謝、新規(de novo)	・小Ag粒子は蛋白質ネットワークに大きな影響を及ぼす。 ・20nmAgNPsは細胞内に取り込まれ、100nmAgNPsは細胞膜外に留まり、20nmAgNPsでROSの高いことと一致する。 ・Ag粒子はAgイオンより、より多くの蛋白質変異をもたらす。 ・AgNPsにより蛋白質ユビキチン化と劣化をもたらされた。 ・20nmAgNPsで蛋白質のSUMO化、100nmAgNPsでMAPK1、PAK2、フォスファターゼ2Aが活性化した。

			<p>加</p> <ul style="list-style-type: none"> ・クラスタⅢ：100nm による発現増加 ・クラスタⅣ：20nm による発現減少 ・クラスタⅤ：100nm による発現減少 ・クラスタⅥ：両粒子による発現減少 <p>②AgNPs による酸化ストレス評価 3x10⁵cell/ml を T75 フラスコ中で培養</p> <p>e. Oxyblot 分析</p> <ul style="list-style-type: none"> ・カルボニル化蛋白質のウェスタンブロット f. 細胞間 ROS レベル測定 ・H2DCF-DA ステイン後フローサイトメトリーで細胞間 ROS を計測 <p>③AgNPs サイズ依存細胞取り込み</p> <ul style="list-style-type: none"> ・共焦レーザー顕微鏡 (CLSM) による検査 	<p>蛋白質 folding</p> <p>d. 階層的クラスタ分析</p> <ul style="list-style-type: none"> ・クラスタⅠでユビキチン関連変更遺伝子(SUMO)が見られた。 ・クラスタⅢでプロテインキナーゼ MAPK1、PAK2、フォスファターゼ 2A(PPP2CA、PPP2R1A)が見られた。 ・クラスタⅡでユビキチン化を伴う蛋白質が見られた。 <p>②AgNPs による酸化ストレス評価</p> <p>e. Oxyblot 分析</p> <ul style="list-style-type: none"> ・20nmAgNPs のみに蛋白質カルボニル化が見られた。 f. 細胞間 ROS レベル測定 ・ROS レベルは 20nmAgNPs >100nmAgNPs≠Ctrl100 >Ctrl20> Ag+≠Control であった。 ・20nmAgNPs は control の 3 倍であった。 <p>③AgNPs サイズ依存細胞取り込み (Fig8)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・20nmAgNPs は細胞内に取り込まれ、凝集した大きなクラスタが観察され、更に病変で丸まった細胞が観察された。 ・100nmAgNPs は数個が細胞内に取り込まれたが、大部分は細胞膜に見られた。 	
--	--	--	---	---	--

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法/試験用量	試験生物投与方法・期間試験方法	試験結果	結論
Pt	Shiny PJ, Mukherjee A, Chandrasekar an N /BioprocessBio syst Eng.2014 Jun;37(6):991- 7	Haemocompatibili ty assessment of synthesised platinum nanoparticles and its implication in biology (合成白金ナノ粒 子の血液適合性 評価ととその生 物学における関 連)	<ul style="list-style-type: none"> ●対象物質 <ul style="list-style-type: none"> ・プラチナナノ粒子: PtNPs ●試料調整方法 <ul style="list-style-type: none"> ・褐藻 <i>Padina gymnospora</i> を乾燥 し、10g を 100ml 水 中に分散、抽出液とす る。 ・ 0.001M H₂PtCl₆(20ml) に上 記抽出液 10ml を 50℃で反応させ、淡 黄色から暗黄褐色に 変色するまで、間欠的 に攪拌 (PtNPs 単体を反応 液から分離せず、反応 液そのまま以後の 実験を行っている。) ●粒子特性 <ul style="list-style-type: none"> ・ XRD 解析では、 (111) 面で粒子径 14nm ・電子顕微鏡による観 察では、粒子は球形で 粒径は 5-20nm、凝集 していない。 	<ul style="list-style-type: none"> ●試験生物 <ul style="list-style-type: none"> ①NADH (還元型ニコチンアミドアデニンジ ヌクレオチド) (注) 全ての真核生物あるいは多く の原核生物で用いられる電子伝達 体 ②人血の RBC(赤血球細胞)ペレット ●試験方法 <ul style="list-style-type: none"> ①NADH の NAD (+) への酸化 <ul style="list-style-type: none"> ・ 200ml の NADH と同量の反応液に 混合 a. UV-分光測光計による測定 波長 200-400nm で測定 ②ヘパリン処理した人の血液を 5℃、 1500rpm で遠心分離し、RBC ペレ ットにする。 ・RBC ペレットを PBS で洗浄後、PBS に溶解 <ul style="list-style-type: none"> ・ 反応液を加え、37℃で 60 分攪拌 (最大添加量 1:1 のようだが、詳細 記載無し) 正対照群: Triton-100 添加 (100% 溶血性) 負対照群: 無添加 PBS のみ (0%溶 血性) b. 吸光分析 波長 540nm で測定 c. 電子顕微鏡 (SEM) 観察 <ul style="list-style-type: none"> ・ FEI Quanta FEG 200 を使用 	<ul style="list-style-type: none"> a. UV-分光測光計による測定 <ul style="list-style-type: none"> ・ NADH の 340、260nm のピー クが、反応液混合 12-16hr 後、 340nm の吸収ピークが減少した。 b. 吸光分析 <ul style="list-style-type: none"> ・ 溶血現象は 10%以下であった。 c. 電子顕微鏡観察 <ul style="list-style-type: none"> ・ PtNPs 処理の赤血球は、未処理 と同様に形態変化は起こさなかつ た。 ・ Triton-100 添加では、上澄みは 赤変し、赤血球は損傷を受け、溶 血性を示した。 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 合成した PtNP s は NADH の酸 化能力を示した。 ・ 合成した PtNP s は赤血球に対 し溶血性を示さ なかった。

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法/試験用量	試験生物投与方法・期間/試験方法	試験結果	結論
Ag-4	Munger MA, Radwanski P, Hadlock GC, Stoddard G, Shaaban A, Falconer J, Grainger DW, Deering-Rice CE /Nanomedicine . 2014 Jan;10(1):1-9	In vivo human time-exposure study of orally dosed commercial silver nanoparticles (経口投与商用銀ナノ粒子の in vivo ヒト長期暴露試験)	<ul style="list-style-type: none"> ●対象物質 <ul style="list-style-type: none"> ・市販 AgNP のコロイド液 American Silver、LLC 製 ●AgNP 粒子の性状 <ul style="list-style-type: none"> ・表面を銀酸化物でカバーされた零価の銀粒子 ・10ppm ロット 粒径 5-10nm ・32ppm ロット 粒径 25-40nm <p>平均粒径 32.8nm (DLS で は 59.8±20nm)</p> <p>銀イオン含有率 : 84.3% (ICP-MS 測定による)</p> <ul style="list-style-type: none"> ●試料調整方法 <ul style="list-style-type: none"> ・銀金属電極を用いた AC 高電圧純水電解質 	<ul style="list-style-type: none"> ●試験生物 <ul style="list-style-type: none"> ・健康な被験者 60 名(男/女 : 35/25) ・年齢 : 18~80 歳 ●投与方法 <ul style="list-style-type: none"> ・2 グループに分離し、15ml の希釈 AgNP コロイド液を経口注入 ・10ppm グループ : 36 名 平均摂取量 : 100µg/day 3 日間、7 日間及び 14 日間摂取 ・32ppm グループ : 24 名 平均摂取量 : 480µg/day 14 日間摂取 (一部被験者にプラセボを投与しているが詳細記載無し) ●試験方法 <ul style="list-style-type: none"> a. 臨床所見 ・試験開始前及び各試験期間終了後、測定を実施 a-1. 体重、BMI、血圧、心拍数測定 a-2. 血液 (代謝、血球) 検査 b. 血清、尿の銀含有量調査 <ul style="list-style-type: none"> ・10ppm グループ 3、7 日は投与 24hr 後に血清、尿を採取 ・10ppm グループ 14 日、32ppm グループは投与 2hr 以内に血清、尿を採取 ・ICP-MS で測定 c. 痰分析 <ul style="list-style-type: none"> ・最終投与後 24hr 以内に吸引し、採取 ・ROS と炎症性サイトカイン 	<ul style="list-style-type: none"> a. 臨床所見 <ul style="list-style-type: none"> a-1 体重、BMI、血圧、心拍数測定 <ul style="list-style-type: none"> ・全項目で、10ppm グループは暴露日数による傾向は無かった。 ・血行動態は両グループで変化は無かった。 ・但し、心拍数は全グループで 2.3 拍有意に減少した。(P=0.05) a-2. 血液 (代謝、血球) 検査 <ul style="list-style-type: none"> ・10ppm グループで BUN、ALT、RBC が有意に減少したが、32ppm グループではこれらに変化が無かった。 b. 血清、尿の銀含有量 <ul style="list-style-type: none"> ・10ppm 投与 3 日、7 日では血清中に銀は未検出 ・10ppm 投与 14 日で 42%の被験者に検出され、平均は 1.6±0.4mcg/L であった。 ・32ppm 投与では 92%の被験者に検出され、平均は 6.8m±4.5cg/L であった。 ・尿中に銀は検出されなかった。 c. 痰分析 <ul style="list-style-type: none"> ・ROS 濃度に有意な変化は無い。 ・RNA(IL-8,IL-1α,IL-1β,MCP1,NQO1) について、AgNP 投与とプラセボ投与間に有意な差は無い。 d. MRI 検査 <ul style="list-style-type: none"> ・腹部の MRI 検査結果、AgNP 投与とプラセボ投与とも、形態、構造の変化は観察されない。 	<ul style="list-style-type: none"> ・市販のナノスケール銀粒子溶液の 14 日間の生体内経口暴露では、人間の代謝、血液学、尿、身体所見及び MRI に重要な変化を誘起しない。

RNA の測定

d. MRI 検査

・各タイムピリオッド毎に胸、
腹部の MRI 検査

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法/試験用量	試験生物投与方法・期間/試験方法	試験結果	結論
Au-3	Park S, Woodhall J, Ma G, Veinot JG, Cresser MS, Boxall AB /Nanotoxicology 2014 Aug; 8(5):583-92	Regulatory ecotoxicity testing of engineered nanoparticles: are the results relevant to the natural environment? (工業ナノ粒子の限定的生態毒性試験: 結果は自然環境に適合しているか?)	<ul style="list-style-type: none"> ●対象物質(Table I) <ul style="list-style-type: none"> ・ Au NPs-citrate(径-30nm) ・ Au NPs-MUDA(径-30nm) ・ Au NPs-NH₂ (市販) ・ Au NPs-PEG (市販) ●試料調整方法 <ul style="list-style-type: none"> ・ Au NPs-citrate HAuCl₄・2H₂O を 90°C、1h 加熱し、透析 ・ Au NPs-MUDA メルカプタンウンデカン酸 (0.12g、3ml) を Au NPs-citrate500ml に添加し、1 週間攪拌後、透析 ●試験用量 <ul style="list-style-type: none"> ・ Au NPs-citrate : 0.5mg/ l ・ Au NPs-MUDA : 0.5mg/ l ・ Au NPs-NH₂ : 1mg/ l ・ Au NPs-PEG : 1mg/ l 	<ul style="list-style-type: none"> ●試験生物 <ul style="list-style-type: none"> ① <i>Daphnia magna</i> : オオミジンコ ② <i>Gammarus pulex</i> : ヨコエビ ③ <i>Lemna minor</i> : コウキクサ ●試験流体 <ul style="list-style-type: none"> Ⓐ DI water : 純水 Ⓑ APW : 人工池水 Ⓒ M4 media : OECD2004 Ⓓ ASW : 人工海水(35%塩分濃度) Ⓔ Algae media : 緑藻類入り Ⓕ Lemna media : Gamborg's B-5 基底物質を攪拌した流体のように思えるが、論文の中で試験方法の記載が混乱) Ⓖ HW : 硬水 米国環境保護局基準 Ⓗ MHW : 弱硬水 同上 ① SW : 軟水 同上 ① 河川水 : 49 の北イングランドの川より収集 ●試験方法 <ul style="list-style-type: none"> a. 試験流体中の NP s の挙動 <ul style="list-style-type: none"> ・ 各試験流体に各 NP s を添加し、15 分超音波攪拌 ・ 1、2、4、6、8、24 時間後、NP s の挙動を NTA (ナノ粒子のブラウン運動を記録する装置) で記録 b. 試験生物の凝集への効果 <ul style="list-style-type: none"> ・ Au NPs-MUDA を試験流体/試験生物/暴露時間の組合せで、NTA で評価 b-1 : 500mlⒸ/①5 匹/48h、 b-2 : 500mlⒷ/②10 匹/96h b-3 : 100mlⒺ/③4 コロニー/24h c. 自然水中 NP s の挙動 <ul style="list-style-type: none"> ・ Au-MUDA を 49 の①に河川水に添加、 ・ AuNPs-citrate、AuNPs-NH₂ は 26 の 	<ul style="list-style-type: none"> a. 試験流体中の NP s の挙動 (Fig1) <ul style="list-style-type: none"> ・ Au--NH₂ はⒶに比較し、Ⓑ~①液中で凝集しなかった。(有意) ・ Au-PEG はⒸを除き、全試験流体で凝集しなかった。(有意) ・ Au-MUDA は全試験流体で凝集した。 ・ Au-citrate はⒽ、①以外で凝集した。 b. 試験生物の凝集への効果 (Fig2) <ul style="list-style-type: none"> ・ b-1、b-2 では生物無添加に比べ、凝集状態は有意に減少した。 ・ b-3 では凝集状態は変化無し (有意) c. 自然水中 NP s の挙動 (Fig3) <ul style="list-style-type: none"> ・ Au-NH₂、Au-PEG は試験流体に比べ、河川水中では若干凝集しやすい。(Fig3C、D) ・ Au-MUDA は試験流体のほうが、河川水より凝集しやすい。(Fig3A) ・ Au-citrate は一部では安定、他では不安定であった。(Fig3B) d. 腐植酸(HA)の凝集への影響 (Fig4) <ul style="list-style-type: none"> ・ Ⓐでは、全 AuNPs で、HA 量に応じ、少ないが、有意な凝集が観察された。 ・ Au-MUDA では、HA 添加により、Ⓒを除き、全試験流体で平均粒径は有意に小さくなっ 	<ul style="list-style-type: none"> ・ ENPs は粒子タイプにより、種々の標準試験流体中で異なる挙動を示す。 ・ ENPs の凝集は水生生物や DOC の存在により、影響される。 ・ NP s の挙動は自然水と試験流体では異なる。 ・ 生態毒性試験には、実際の河川水と同様の特性範囲を用いるのが適当であろう。

				<p>河川水に添加</p> <ul style="list-style-type: none">・ 添加後 15 分超音波攪拌・ 1、2、4、6、8 時間後、NP s の挙動を NTA で記録 <p>d. 腐植酸(HA)の凝集への影響</p> <ul style="list-style-type: none">・ AuNPs-citrate、AuNPs-MUDA、AuNPs-NH₂ 各 0.5mg/1 を各試験流体 ①②③④⑤⑥ に添加し、更に腐植酸(0、1、5mg/1)を加え攪拌・ 攪拌後 1、2、4、6、8 時間後に NTA で測定	<p>た。</p> <ul style="list-style-type: none">・ Au-citrate では、HA 添加により、⑤⑥ で少ないが、有意な凝集が観察され、他の試験流体では変化がなかった。・ Au-NH₂ では、HA 量に応じ、全試験流体で、有意な凝集が観察された。	
--	--	--	--	--	--	--

No	著者/書誌事項	論文題目(和訳)	試験物質/試料調整法/試験用量	試験生物投与方法・期間/試験方法	試験結果	結論
Ag-5	Hong JS, Kim S, Lee SH, Jo E, Lee B, Yoon J, Eom IC, Kim HM, Kim P, Choi K, Lee MY, Seo YR, Kim Y, Lee Y, Choi J, Park K /Nanotoxicology .2014 Jun; 8(4):349-62	Combined repeated-dose toxicity study of silver nanoparticles with the reproduction/developmental toxicity screening test (生殖/発生毒性スクリーニング試験と組み合わせた銀ナノ粒子の反復投与毒性試験)	●対象物質 ・クエン酸被覆 AgNPs 平均粒径: 7.9±0.95 nm ゼータ電位 : -17.55±4.16mV TEM 測定粒径(Fig1) ・調整直後: 8.8±5.2 nm ・調整 1 日後: 7.7±4.8 nm	●試験生物 ・Sprague-Dawley ラット: 雄、雌、7 週齢 ・投与中は雌雄を同一ケージ内で飼育、交配する。 ・妊娠、授乳中の雌は、個別に飼育 ●投与方法 ・10ml/kg(bw)の AgNPs 混濁液を経口投与 ・AgNPs 濃度: 0(control)、62.5、125、250mg/kg ・投与期間: 雄: 42 日、雌: 最大 52 日 ・実験グループ編成 main group は各投与毎に 10 匹 recovery group: 0、250mg/kg 雌雄 5 匹以上 ●試験方法 a. 体重測定 ・1 回/週測定 ・雌は妊娠後は 3,6,9,12,18,20 日に測定及び出産時、その 4 日後に測定 b. 飼育中の観察 b-1. 生殖行動/胎児の観察 ・生殖行動、妊娠期間、黄体数、着床率、出生率、胎児の生存率、体重等の観察 b-2. 運動/感覚機能の観察 ・聴力、瞳孔反射、受傷反射、運動能力を最終 1 日前に測定 c. 解剖試験 ・試験期間終了後、解剖して血液、尿及び臓器(肝臓、腎臓、副腎、心臓、肺、卵巣、脾臓、前立腺/膣、精巣、胸腺、甲状腺、胃、膀胱、膵臓)を採取 c-1. 血液、血清、尿生化学分析 ・雌雄の血液、血漿、血清を分析	a. 体重測定 ・全てのラットで死んだものはない。 ・全投与期間、雌雄で体重変化は AgNPs 投与量に対し有意でない。 b-1. 生殖/胎児の観察(Table VIII) ・交配、受精率、受胎率に銀投与の影響は無い。 ・妊娠期間、黄体数、着床率、出生率、胎児の生存率、体重等に銀投与の影響は無い。 b-2. 運動/感覚機能の観察(Table VIII) ・雌雄とも聴力、瞳孔反射、受傷反射、運動能力に銀投与の影響は無い。 c-1. 血液、血清、尿生化学分析 ・血液分析では有意な変化は無い。 ・血清分析では AST 等に有意な変化があるが、AgNPs によるものではない。 ・尿分析では有意な変化は無い。 c-2. 臓器重量測定 ・recovery group 250mg/kg の雄で肝臓、雌で腎臓、副腎の重量が有意に増加した。 ・他の臓器重量に有意な差はない。 c-3. 解剖、病理組織学的所見(Table VII) ・いくつかの臓器に病変が認められたが、銀投与の影響かどうか確認できない。	・交配、生殖能力、着床、出産、胎児を含む生殖/発生スクリーニング検査の毒性エンドポイントを測定した。 ・毒性の証拠はなかった。

				<ul style="list-style-type: none">・雄の尿を分析c-2. 臓器重量測定<ul style="list-style-type: none">・ main group、recovery group の臓器重量と重量比を測定c-3. 病理組織学的所見<ul style="list-style-type: none">・ 0、250mg/kg 投与の臓器組織を顕微鏡観察d. 銀の細胞内分布<ul style="list-style-type: none">・ 投与後、0、250mg/kg の4匹の雌を解剖し、肝臓、腎臓、肺の組織を採取し、ICP-MSで測定	<ul style="list-style-type: none">d. 銀の細胞内分布<ul style="list-style-type: none">・ 250mg/kg 投与はコントロールと比較し、顕著に肝臓、腎臓、肺に検出された。 (注) 統計的に有意かどうか記載がない。特に肺は平均値に比べ、SDが大き過ぎる。	
--	--	--	--	---	---	--

No	著者/書誌事項	論文題目(和訳)	試験物質/試料調整法/試験用量	試験生物投与方法・期間試験方法	試験結果	結論
ナノクレイ	<p>Janer G, Fernández-Rosas E, Mas del Molino E, González-Gálvez D, Vilar G, López-Iglesias C, Ermini V, Vázquez-Campos S</p> <p>/Nanotoxicology .2014 May; 8(3):279-94</p>	<p>In vitro toxicity of functionalised nanoclays is mainly driven by the presence of organic modifiers</p> <p>(主に有機改質剤の存在による官能化されたナノクレイの in vitro 毒性)</p>	<p>●対象物質</p> <p>・ナノクレイ (MMTdell) 8種類</p> <p>モンモリロナイト (層状珪酸塩鉱物の1種)</p> <p>LAVIOSA CHIMICA MINERARIA 製(Table I)</p> <p>・メーカーで2種の修飾クレイ、無修飾クレイを作成 (Fig1)</p> <p>・修飾基</p> <p>・水添ジメチル獣脂アンモニウム(DDTA と略す): 4種</p> <p>MMTdell72T、MMTdell72Ts、MMTdell67G、MMTdell67Gs</p> <p>・水添ジメチルベンジル獣脂アンモニウム (DBHTA): 2種</p> <p>MMTdell43B、MMTdell43Bs</p> <p>・無修飾(PRS): 2種</p> <p>MMTdell pristine (HPS)</p> <p>・粒子径は各修飾大小2種類</p> <p>: 大 7-9μm、小 5-7μm</p> <p>●乾燥状態の試料特性</p> <p>・粒子径分布 TEM 測定 (Fig2)</p> <p>大: 100-3230nm</p> <p>小: 100-822nm</p> <p>・修飾基の残存率 (クレイ</p>	<p>●試験生物 (5種の人腫瘍細胞株)</p> <p>①Ramos(バーキットリンパ腫)</p> <p>②A-549(肺胞癌)</p> <p>③HCT116(結腸直腸癌)</p> <p>④SK-MEL28(黒色腫)</p> <p>⑤HepG2(肝臓癌)</p> <p>⑥HUVEC (人臍帯静脈内皮初代細胞系)</p> <p>・培養液: DMEM+10%FBS+ペニシリン</p> <p>●投与方法</p> <p>・ナノクレイを培養液に超音波攪拌後 1hr 以内に、①~⑥に添加</p> <p>●試験方法</p> <p>・上記を培養皿で 24hr 培養後、MMT 又は修飾剤に 72hr 暴露後に評価</p> <p>・濃度 0.3~最大 500μg/ml</p> <p>a. 修飾ナノクレイの細胞毒性試験</p> <p>・修飾ナノクレイ添加後、Alamar Blue テストで評価</p> <p>b-1. 有機修飾剤の細胞毒性試験</p> <p>・DDTA、DBHTA 添加し、Alamar Blue テストで評価</p> <p>b-2. 実測 IC₅₀/予想 IC₅₀ の比による評価</p> <p>IC₅₀: 50%抑制濃度</p> <p>実測 IC₅₀: 生存率 vs 濃度カーブより算出</p> <p>予想 IC₅₀: 修飾剤濃度から予想される IC₅₀</p> <p>b-3. 有機修飾剤分離の影響(Fig6)</p> <p>・メタノールまたは水に MMTdell43Bs と 67Gs を分散し、72h 後遠心分離し、ペレット、上澄み液それぞれで②を培養、IC₅₀ で評価</p> <p>c. 純粋なナノクレイの細胞毒性</p>	<p>a. 修飾ナノクレイの細胞毒性試験</p> <p>・DBHTA 修飾 MMT は DDTA 修飾 MMT より強い毒性を示した。</p> <p>・粒子径の影響は観察されない。</p> <p>・①は殆どの MMT に高感度であり、⑥は MMTdell43B(s)に若干高感度であった。</p> <p>b-1. 有機修飾剤の細胞毒性試験</p> <p>・DBHTA は DDTA より強い毒性を示した。</p> <p>b-2. 実測 IC₅₀/予想 IC₅₀ は DDTA ではほぼ 1 に近いが、DBHTA では 3.5~4.1 であった。</p> <p>b-3. メタノール洗浄した 43Bs のペレットは有意に毒性が低下した。</p> <p>・水洗浄 (メーカー実施) した 43Bs、67Gs のペレットの毒性は b-1 と同様であった。上澄み液の毒性は低下した。</p> <p>c. 純粋なナノクレイの細胞毒性</p> <p>・修飾ナノクレイに比較し、純粋なナノクレイの毒性は低い。</p> <p>d-1. カスパーゼ 3/7 活性評価(Fig8)</p> <p>・4.5h 後、④はカスパーゼ 3/7 は増加しないが、⑤で</p>	<p>・ナノクレイは修飾基の4級アンモニウムイオンにより、毒性を示す。</p> <p>・メタノール、エタノール洗浄により、過剰修飾基はある程度除去できるが、イオン結合した修飾基がナノクレイの毒性の大部分である。</p> <p>・無修飾ナノクレイも毒性を示すが、これは細胞内取り込みによるアポトーシスに起因する。</p>

		<p>中)</p> <p>MMTdel143Bs : 5.5%</p> <p>MMTdel67G : 10.4%</p> <p>●培養液中の試料特性</p> <p>・1mg/ml の試料を DMEM または FBS0.6g/l を含む水に溶解、15 分間超音波攪拌し、懸濁液とする。</p> <p>・懸濁液は若干不安定で少量の沈殿物がある。HPS は安定</p> <p>・修飾 MMT の 24hr 後の DLS は、沈殿により顕著に小さくなる。</p> <p>・培養液中の蛋白質等とナノクレイが反応し、沈殿物となる。</p>	<p>・ Alamar Blue テストで評価</p> <p>d. アポトーシス</p> <p>d-1. カスパーゼ 3/7 活性評価</p> <p>・ pristine を④、⑤に添加、4.5h、48h 後に活性評価</p> <p>d-2. フローサイトメトリーアッセイ</p> <p>・⑤を 100µg/ml の pristine (大) に 48h 暴露後、アネキシン V で染色し、フローサイトメトリーで評価</p> <p>e. ナノクレイの細胞内取り込み</p> <p>・②を pristine (100µg/ml)、67Gs(5µg/ml)に 72h 培養し、TEM で観察</p>	<p>100µg/ml 以上で増加した。</p> <p>・ 48h 後、④、⑤ともカスパーゼ 3/7 は 33µg/ml でも有意に増加した。</p> <p>d-2. フローサイトメトリーアッセイ</p> <p>・ 48h 後、染色された細胞は 7 倍 (有意) であった。</p> <p>e. ナノクレイの細胞内取り込み</p> <p>・ 72h 後、両クレイとも細胞質に見られ、小胞内に凝集している。</p> <p>・ pristine の方が 67Gs より細胞内取り込みが多い。(73、86%vs0、16%)</p>	
--	--	---	---	--	--

No	著者/書誌事項	論文題目(和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論																								
Ag-6	Braydich-Stolle LK, Breitner EK, Comfort KK, Schlager JJ, Hussain SM /Langmuir. 2014 Dec 23; 30(50):15309-16	Dynamic characteristics of silver nanoparticles in physiological fluids: toxicological implications (生理的流体中の銀のナノ粒子のダイナミック特性：毒物的意味)	<ul style="list-style-type: none"> ●対象ナノ物質 <ul style="list-style-type: none"> ・ Ag-HC : 炭化水素 coating 25nmAg 炭化水素 coating は不連続 ・ Ag-PS : 多糖類 coating 25nmAg 多糖類 coating は 1-3nm で連続 (いずれも購入物質) ●試験人工体液 <ul style="list-style-type: none"> Stopford 等によるレポートに基づき調整 ①人工肺胞液 PH=7.4 ③ベースに脂質ホスファチジル基コリンを添加 ②人工リソソーム PH=4.5 数種の塩、グリセリン、ホルムアルデヒドの混合 ③人工間質液 PH=7.4 数種の塩で構成 	<ul style="list-style-type: none"> ●試験生物 <ul style="list-style-type: none"> ・ U937 細胞株：肺胞マクロファージ細胞 ●試験方法 <ul style="list-style-type: none"> a. 人工体液中の AgNPs の特性評価 <ul style="list-style-type: none"> ・ 10ml の人工体液中に AgNPs 500µg/ml を添加 ・ 37°C で 2、6、24、72h 保持 a-1. AgNPs の人工液中の粒径、凝集状態 ・ 各種液中に溶解し、24h 後 TEM 測定 a-1-1 TEM 測定 a-1-2 DLS 測定 a-2. Ag イオンの放出 <ul style="list-style-type: none"> ・ 各種液中に溶解し、24h 後 ICP-MS で測定 b. AgNPs の毒性評価 <ul style="list-style-type: none"> ・ U937 の培養 	<p>a-1-1 TEM 測定結果(Fig1)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ Ag-HC 水中：粒子径：27.2nm ②リソソーム：溶着径：120.5nm 凝集径：290.1nm ①肺胞液：溶着径：68.5nm 凝集径：204.2nm ・ Ag-PS 水中：粒子径：23.2nm ②リソソーム：溶着径：50.3 凝集径：160.6nm ①肺胞液：溶着径：53.9nm 凝集径：341.1nm <p>a-1-2 DLS 測定 24h 後の凝集径 (nm)</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Ag-HC</th> <th>Ag-PS</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>水中</td> <td>123.5</td> <td>52.1</td> </tr> <tr> <td>①肺胞液中</td> <td>550</td> <td>964.6</td> </tr> <tr> <td>②リソソーム中</td> <td>550</td> <td>218.7</td> </tr> </tbody> </table> <p>a-2. Ag イオンの放出 (Fig2B) 24h 後の解離率(%)</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Ag-HC</th> <th>Ag-PS</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>水中</td> <td>1.1</td> <td>0.35</td> </tr> <tr> <td>①肺胞液中</td> <td>0.38</td> <td>0.53</td> </tr> <tr> <td>②リソソーム中</td> <td>0.22</td> <td>1.0</td> </tr> </tbody> </table> <p>・時間経過による AgNPs の液中での変化</p>		Ag-HC	Ag-PS	水中	123.5	52.1	①肺胞液中	550	964.6	②リソソーム中	550	218.7		Ag-HC	Ag-PS	水中	1.1	0.35	①肺胞液中	0.38	0.53	②リソソーム中	0.22	1.0	<ul style="list-style-type: none"> ・ Ag-HC は人工体液中で毒性は無かった。 ・ Ag-PS は、特にリソソーム液中で、その酸性により、毒性となった。 ・ 本研究は、生理系において、NM の生理的特性と生物学的結果を変更し、新たな毒性をもたらすことを示した。 <p>*1 別資料に図表がある</p>
	Ag-HC	Ag-PS																												
水中	123.5	52.1																												
①肺胞液中	550	964.6																												
②リソソーム中	550	218.7																												
	Ag-HC	Ag-PS																												
水中	1.1	0.35																												
①肺胞液中	0.38	0.53																												
②リソソーム中	0.22	1.0																												

			<p>b-1. 細胞生存率</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ AgNPs0.5 および 25 ng/ml に暴露 ・ 24h 後 MTS アッセイで評価 <p>b-2. CD68、CSFR-1 の発現</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ AgNPs25ng/ml に 4h 暴露 ・ 染色後 BD Pathway 435 で評価 <p>b-3. 腫瘍反応</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ AgNPs25ng/ml に 8h 暴露 ・ IL-6、TNF-α の存在を ELISA アッセイで評価 	<p>② : Ag-HC の凝集径、解離率は急速に安定</p> <p>Ag-PS は dynamic nature を示す。</p> <p>* 1</p> <p>① : Ag-HS、PS の凝集径は経時的に増加</p> <p>解離率は 24h で安定</p> <p>③ : 両 Ag の凝集径は経時的に増加、解離率は安定</p> <p>b. AgNPs の毒性評価</p> <p>b-1. 細胞生存率</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 水、①②に分散 Ag-HC で生存率低下は僅少 ・ 水に分散 Ag-PS では生存率低下はない。 ・ ①②に分散 Ag-PS では、有意に低下 <p>b-2. CD68、CSFR-1 の発現</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ ②に分散 Ag-PS では CD68 は 50%増加 (有意) ・ CSFR-1 は全てのケースで変化なし <p>b-3. 腫瘍反応</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ ②に分散した Ag-PS で、未処理と比較し IL-6 は 5 倍、TNF-α は増加 (有意) ・ 他のケースでは未処理と差はない。 	
--	--	--	--	---	--

No	著者/書誌事項	論文題目(和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間試験方法	試験結果	結論
Au-4	Ng CT, Yung LY, Swa HL, Poh RW, Gunaratne J, Bay BH /Biomaterials. 2015 Jan;39:31-8	Altered protein expression profile associated with phenotypic changes in lung fibroblasts co-cultured with gold nanoparticle-treated small airway epithelial cells (金ナノ粒子投与をうける小気道上皮細胞で共培養された肺線維芽細胞における表現型変化に伴う改変タンパク質表現プロフィール)	<ul style="list-style-type: none"> ●対象物質 ・AuNPs: 径 20nm ●試料調整方法 ・HAuCl₄ をクエン酸三ナトリウムで脱水 	<ul style="list-style-type: none"> ●試験生物 ①SAECs : 末梢気道上皮細胞 ②MRC5 : 肺線維芽細胞 ・特定アミノ酸の代わりに 2 種の同位体アミノ酸を添加した DMEM 中で最低 4 継代培養し同位体ラベリング ・特定アミノ酸: リシン、アルギニン ・同位体アミノ酸: light、heavy の 2 種 light (L) : KOR0 アイソトープでラベリング heavy(H) : K8R10 アイソトープでラベリング ・SILAC : 細胞培養中のアミノ酸による安定同位体ラベリング ●投与方法 ・①に 1nm の AgNPs を添加し、72h 培養、コントロールは無投与 ・①と②の共培養 ラベリングした②の上にポリカーボネート膜を介して① (AuNPs 投与または無投与) を培養 ・②は AgNPs 無投与は light アイソトープラベリング (Forward)、AgNPs 投与は heavy アイソトープでラベリング (Reverse) ●試験方法 a. SAECs 内の AuNPs の測定 ・FIB-SEM により観察 b. AuNPs 暴露 SAECs による MRCS5 内の蛋白質差別的発現 ・共培養 72h 後、MRCS5 のプロテオームを分離し、light、heavy の蛋白質溶解液を蛋白質量比 1 : 1 に混合 ・トリプシンで消化後、ペプチドを LTQ-Orbitrap 質量スペクトルメータで LC-MS/MS 分析 (定量的プロテオミク分析) 	<ul style="list-style-type: none"> a. SAECs 内の AuNPs の測定 ・核小体を持つ二重膜の核、小胞体、リソソーム、エンドソームを含む細胞小器官のような超構造的詳細が観察された。 ・細胞内に AuNP クラスタが黒点として観察される。 b. AuNPs 暴露 SAECs による MRCS5 内の蛋白質差別的発現 ・SILAC ベースの質量分析により、109 のタンパク質 (アップレギュレート 47、ダウンレギュレーション 62 を含む) を同定した。 c. 蛋白質差別的発現の経路解析 ・調整不全蛋白質は主に細胞癒着、細胞外基質/細胞骨格の改変に係るものであった。(Fig3B) ・細胞移行に関する蛋白質、プラスミノゲン活性化因子、ウロキナーゼ (PLAU、UPA)、GRO - 1 は顕著に減少した。 ・細胞癒着を増加する PXN、BCAR1、Cav-1 の発現が顕著に増加した。 	<ul style="list-style-type: none"> ・AgNPs 暴露の SAECs が下部の肺線維芽細胞に、細胞プロセスに係る蛋白質変質に繋がるバイスタンダー効果を及ぼす。 ・これにより細胞癒着と細胞骨格の増加に繋がる形質変化をもたらす。 ・共培養により異種細胞間のクロストークを外部液体の応答から理解できる。 ・共培養と SILAC-MS の組合せたプロテオーム段階の変化に関する生物情報学アプローチにより NP 毒性の生物学的洞察が可能である。

				<ul style="list-style-type: none"> • 蛋白質同定、定量化は IPI 人蛋白質データベースに関する Mascot ソフトで解析 • 正規化 H/L(Reverse、Forward)で蛋白質差別的発現を評価 c. 蛋白質差別的発現の経路解析 • 遺伝子オントロジー (GO) 分析は遺伝子 ID をソフトに入力し解析、IPA 経路解析は IPI ナンバーをソフトに入力し解析 d. MRCS5 内の細胞癒着と細胞骨格に対する蛋白質不全とその効果 • AgNP 投与①と共培養の②を、5×10^4 cell/100μl の懸濁液にし、コラーゲン又はフィブロネクチン塗布の培養皿で 30 分培養 コントロールはコラーゲン等、unwashed 	<ul style="list-style-type: none"> d. MRCS5 内の細胞癒着と細胞骨格に対する蛋白質不全とその効果 • コラーゲン、フィブロネクチン塗布で細胞癒着はコントロールに比べ顕著に増加した。 • ②の細胞骨格に stress fiber 又は FA 形成を伴う 改変 F-actin 配置の増加と(Fig4C)、F-actin を②の細胞膜に固定する vinculin 結合サイトの増加があった。 	
--	--	--	--	--	---	--

No	著者/書誌事項	論文題目(和訳)	試験物質/試料調整法/試験用量	試験生物/投与方法・期間/試験方法	試験結果	結論
Ag-7	Ahlberg S, Meinke MC, Werner L, Epple M, Diendorf J, Blume-Peytavi U, Lademann J, Vogt A, Rancan F Eur J Pharm /Biopharm. 2014 Nov;88(3):651-7	Comparison of silver nanoparticles stored under air or argon with respect to the induction of intracellular free radicals and toxic effects toward keratinocytes (空気またはアルゴン中に保存された銀ナノ粒子のケラチン生成細胞に対する細胞内フリーラジカルと毒性作用の誘発に関する比較)	<ul style="list-style-type: none"> ●対象物質 ・PVP 被覆 AgNPs PVP: ポリビニールピロリドン ・粒径: 70±20nm ・ゼータ電位: -25mv ・大気中保存: AgNP(O₂) ・Ar 中保存: AgNP(Ar) ●試料調整方法 ・40g の水中に 2g グルコース、1gPVP、1mlAgNO₃ (0.5g/ml) を混合 ・溶液を 90°C、1h 保持後室温まで冷却 ・溶液を遠心分離、水洗 ・AgNP(O₂)は大気中で純水懸濁液とする。 ・AgNP(Ar)は Ar 雰囲気中で純水懸濁液とする。 	<ul style="list-style-type: none"> ●試験生物 ・HaCaT 細胞: ヒト皮膚ケラチノサイト ・10cm² フラスコで 10mlRPMI (10%FCS、4mM グルタミン、10µg/ml ストレプトマイシン、100IE/ml ペニシリン) 中で培養 ・70-80%培養密度時、RPMI 除去、細胞を PBS で洗浄 ・PBS 除去後、5ml トリプシン、EDTA を添加し、細胞を剥離 ・RPMI で洗浄、遠心分離後、RPMI に再懸濁 ●投与方法 ・AgNP 懸濁液を純水で濃度調整し、細胞懸濁液に添加 ●試験方法 a. HaCaT の AgNP の取り込みとアポトーシス ・HaCaT25x10⁵cell/ml に AgNP(O₂)25µg/ml を添加し、24h 間 RPMI 液 (10%FCS 入り) 中で培養 ・染色後 TEM で観察 b. HaCaT に対する AgNP の濃度依存毒性 ・HaCaT1x10⁴cell/well を 1 日培養し、AgNP (O₂) (10、20、40µg/ml) に 1 又は 24h 暴露 (FCS: 9、6、3%) Negative control: 10%FCS で培養 Positive control: 0.1%Triton-X で培養 ・XTT アッセイ (細胞活性アッセイ) で 	<ul style="list-style-type: none"> a. HaCaT の AgNP の取り込みとアポトーシス ・AgNP は小胞内に集積し、充満 ・エンドソム逸脱は見られない。 ・細分化した細胞核、細胞膜の特徴的小胞が観察された。 ・NP は細胞核に入らず、又細胞器官と反応していない。 ・AgNP(O₂)と AgNP(Ar)の形態的差はない。 ・アポトーシス、ネクローシスは AgNP(O₂)に多く見られる。 b. HaCaT に対する AgNP の濃度依存毒性 ・暴露 1h 後 細胞活性に大きな変化は無い。 ・暴露 24h ・AgNP 無しは FCS 減少に応じ、活性は低下する。 ・FCS 9%、AgNP10、20µg/ml では活性は増加するが、AgNP40µg/ml では活性が 70% に減少した。 ・FCS 6、3%では、どの AgNP でも活性は顕著に減少する。 c. EPR による細胞内フリーラジカルの測定 ・UV 照射ほどではないが、AgNP 添加で EPR 信号は時間と共に減少した。 ・3h 後では、AgNP 濃度依存的に EPR は減衰した ・AgNP(O₂)では 30µg/ml で ROS 	<ul style="list-style-type: none"> ・EPR 分光分析により Ag+イオンが細胞内 ROS 発生要因であることが明らかになった。 ・AgNP (O₂) と AgNP (Ar) を比較した結果、準備・保管中に放出された Ag+イオンが細胞内 ROS 発生とそれによる細胞毒性の主因であることを示した。 ・AgNP は HaCaT に有毒である。 ・AgNP(Ar)は皮膚細胞に対する毒性を減少する。 ・不活性ガス雰囲気下で AgNP 製剤、銀含有創傷被覆材を格納することにより、AgNP の治療範囲を改善する可能性を示唆している。

			<p>評価 細胞を PBS で洗浄後、XTT 液を加え、 3h 後測定 波長 492nm、650nm で測定</p> <p>c. 電子常磁性共鳴 (EPR) による細胞内 フリーラジカルの測定</p> <ul style="list-style-type: none"> • HaCaT 1x10⁵cell/well を AgNP(O₂)及 び (Ar) 各 10、30、50μg/ml に 1h 暴 露 • positive control : AgNP 無、1 分間 UV 照射 (210mJ/cm²相当) • 細胞を PBS 洗浄後、TEMPO (5μM : PBS 中) を添加 TEMPO : 2,2,6,6-テトラメチルピペリ ジニロキシ • 添加後、30 分毎に EPR 信号を測定 	<p>を検出した</p> <ul style="list-style-type: none"> • AgNP(Ar)では 50μg/ml で ROS を検出した • AgNP(O₂)は AgNP(Ar)より ROS の発生量が多い 	
--	--	--	---	--	--

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料 調整法/試験用 量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
ZnO -1	Chia SL, Tay CY, Setyawati MI, Leong DT Small, 2014 Oct 20	Biomimicry 3D Gastro- intestinal Spheroid Platform for the Assessment of Toxicity and Inflammator y Effects of Zinc Oxide Nanoparticl es (酸化亜鉛 ナノ粒子の 毒性評価と 炎症作用に 係る生物模 倣 3D 胃腸球 状プラット フォーム)	<p>■ 試験物質 ZnO ナノ粒 子：[TEM]1 次 粒径 24.02± 6.08nm、流体 力学径 222.0nm(水 中)、 142.2nm(Dulb ecco's Modified Eagle Medium supplement with Fetal Bovine Serum : DMEM)</p> <p>■ 試験調整法 ・2D 細胞培 養； CO2 5%、 37℃で培養。 処理用に、 SW480(1.2× 10⁵細胞/well) と NCM460 細胞(1.8×10⁵ 細胞/well)を プレートに播種。 アッセイ用に、 SW480(3.6× 10⁵細胞/well)</p>	<p>■ 試験生物 ・3D NCM460, SW480 細胞回転楕円体 ・細胞炎症反応：炎症遺 伝子(Interleukin-18 (IL18), Toll-like receptor 6 (TLR6), NOD-like receptor family, CARD domain containing 4 (NLRC4), interleukin 18 (IL18)) ・DNA 損傷：pγ-H2AX、 TBP</p> <p>■ 期間・投与方法 ・ROS 発現量：2 時間、 6 時間 ・細胞炎症反応：6 時間、 24 時間 ・DNA 損傷耐性：12 時 間</p> <p>■ 試験方法 ・ROS 発現量：酸化還元 反応性 CellROX オレン ジ染料を用いて検出。 ROS 陽性細胞は、事前決 定蛍光閾値よりも高い 細胞と定義。 ・pγ-H2AX の免疫プロット 法：DNA 損傷の程度の 決定。 ・Annexin V/PI(ヨウ化 ロビシウム) assay : ・細胞を 2D プレート、3D マ</p>	<p>■ ROS 発現量 ・ZnO への 2 時間暴露：2D 細胞に関して、NCM460 細胞の 細胞質 ROS レベルが有意に増加。3D の NCM460 細胞では ROS レベルはわずかに低下。 ・1,000 μM の ZnO への 6 時間暴露：2D、3D とともに NCM460 で ROS 陽性細胞数の劇的増加。ROS 発現増加を伴う 3D 培 養細胞グループにおける NCM460 細胞の割合は、未処理 3D 対照群と比較して 18.8%から 44.6%に増加。 ・がんの SW480 細胞モデル：ZnO が非常に様々な反応を誘発。 2D の SW480 細胞で ROS レベルが統計的に有意に増加。3D 細胞では、2 時間暴露も 6 時間暴露もともに、SW480 細胞 は増加せず。3D 細胞モデルでは、3D で培養されたがん SW480 細胞は、2D 培養細胞と比較して、ZnO への暴露前後ともに、 ROS 陽性細胞割合が高いことを示唆。3D の SW480 細胞は、 内因性 ROS が 32.3%と高く、3D の NCM460 細胞の内因性 ROS の 5.74%よりも明らかに高く、2D の内因性 ROS は NCM460 で 0.30%、SW480 で 0.45%と非常に低かった。 ・ROS：腫瘍形成が可能。過去の研究報告による概念と一致 して、2D と比較して 3D の SW480 細胞の高レベルの内因性 ROS は、3D 培養することで、in vitro 細胞が in vivo の特性 の複製が可能であることを示唆。しかし、2D 細胞になると、 SW480 の ROS 特性は消失することから、細胞の微小環境と 細胞タイプは劇的に、ナノ材料に対する細胞応答と最終的な評価 結果に影響を与えることが可能なことを暗示。</p> <p>■ 細胞炎症反応 ・ZnO への 6 時間暴露：炎症遺伝子は IL18 遺伝子の 2D SW480 以外は全細胞モデルで明らかに上方制御。 ・高濃度 ZnO：NCM460 2D 細胞と SW480 3D 細胞におい て IL-18 と IL-18 の発現の 7 倍以上の増加を誘発することを 確認。6 時間暴露後の NCM460 3D 培養細胞と SW480 2D 細胞では増加はあまりみられない。これらの ZnO 誘発 IL-18、IL-18 過剰発現は、核因子 kappa-B (NF-κB)の下流 活性化が起こる可能性を示唆。 ・免疫染色による 3D SW480 細胞の NF-κB：非常に強い染</p>	<p>・細胞の 次元は、 ZnO ナノ材 料への暴 露による 細胞毒性 と炎症反 応のよう な時空間 的細胞の 結果に影 響を与える 重要な 役割を担 っている。</p> <p>・従来の 2D 細胞モ デルの細 胞は、 ZnO ナノ材 料の毒性 影響によ り敏感で あるのに 対して、 同様の組 織-ECM 構造を有 する 3D 細胞モデル と現実的 な物質移</p>

			<p>と NCM460 細胞(5.4×10^5 細胞/well)を播種。処理溶液導入前に、細胞を1日間静置。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・3D 細胞培養；非生物付着アガロース(2%, First Base, Singapore)マイクロモールドを3Dペトリ皿を用いて鑄造。使用前に、完全 DMEM とマイクロモールドと1日間平衡にする前に凝固したアガロースを30分間 UV 照射して滅菌。完全 DMEM に分散した SW480 と NCM460 細胞懸濁液($50 \mu\text{M}$)を個々のマイクロモールドに播種。5% CO_2、37°Cで細胞を培養。マイクロモールド内に細胞沈殿後5分間、完全 DMEM($500 \mu\text{M}$)を well に 	<p>マイクロモールドに播種。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・2D モデルでは流動性細胞を全て回収後、$1 \times \text{PBS}$ で洗浄、トリプシン-EDTA で 37°C、5分間トリプシン処理。トリプシン処理細胞を流動性細胞と結合し、完全 DMEM で中和後、細胞混合物を遠心分離し、細胞ペレットを回収。 ・3D 回転楕円体細胞モデルについては、処理後の3D 細胞を全て回収・洗浄。細胞楕円体から細胞を分散するために、細胞楕円体を 37°Cで5分間、トリプシン-EDTA によりトリプシン処理。トリプシン処理後の細胞を完全 DMEM で中和後、遠心分離により細胞ペレットから懸濁液を分離。 ・Annexin V 結合バッファと Annexin V-Alexa Flour 488 共役混合物(20:1)を細胞ペレットに添加後、20分間培養。その後、培養細胞懸濁液を遠心分離により除去。Fresh Annexin V 結合バッファとヨウ化プロピジウム (PI)溶液混合物(100:1)を細胞懸濁液に添加し5分間培養。自然細胞死と壊死細胞を Tali Image Cytometer で分析。 	<p>色はほぼ楕円体周縁部のみで観察。NF-κB タンパク質発現の上り調整は、大部分は細胞の2層か3層内に制限され、細胞への ZnO のアクセスが制限された結果。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ZnO への6時間暴露：TLR6 と NLRC4 の過剰発現が2D と3D 細胞モデルで検出。これらの結果から、ZnO が誘発する炎症反応は、NF-κB シグナル伝達経路のほかに複数伝達軸を伴う可能性、トル様受容体シグナル伝達経路のように ZnO ナノ材料は他の炎症経路を引き起こす可能性があることを示唆。 ・6時間暴露後の ROS 陽性細胞：ZnO は顕著な増加を引き起こさなかったが、同時点の3D 形態 SW480 細胞に激しい炎症反応を引き起こした。ZnO は、3D 細胞の ROS レベルの独立した炎症反応を誘発可能なことを示唆。 ・24時間暴露：炎症遺伝子発現レベルが、2D 細胞モデルで、特に2D SW480 でさらに増加するものあり(2D NCM460 の IL-1β と TLR6、2D SW480 の全遺伝子)。3D 細胞モデルケースでは、そうではなかった。大部分の3D 細胞の炎症発現レベルは戻り、発現の中には、対照群のベースレベルよりも低くなるものもあり。これらより、ZnO が2D 細胞に対する長期(慢性)の炎症反応を誘発し、3D 細胞に対しては短期(急性)炎症反応は誘発することを暗示。ZnO が誘発する炎症に関連した遺伝子の異なる発現は、ZnO のような異物に遭遇した際の細胞反応に対する細胞培養システムの基本的効果を示唆。ZnO は、ROS の上方調整を無視した炎症反応の誘発が可能で、それにより、下流方向の事象の他の形態を含むさらなる研究が、ZnO の基本的な毒性メカニズムを決定するのに必要。 ・3D 細胞による ZnO ナノ材料誘発 DNA 損傷への耐性 ・pY-H2AX 免疫プロット法：細胞の DNA 損傷の発生を確認、エネルギー集約型 DNA 修復メカニズムの活性化を立証。激しい DNA 損傷は、2D 細胞モデルの両方について、高濃度 ZnO により誘発。ZnO は、3D SW480 細胞に対する DNA 損傷も誘発したが、3D NCM460 細胞では pY-H2AX のレベルで明確な変化は非検出。2D SW480 と比較して、高濃度 ZnO は、3D SW480 の DNA 損傷を誘発するのに必要。このことは、3D 細胞は、2D 細胞よりも高濃度 ZnO への耐性があることを示唆。しかし、激しい DNA 損傷は12時間暴露後の3D SW480 細胞で検出されるため、ZnO への長期暴露は組織と器官の DNA 損傷の蓄積を引き起こす可能性を高める。 	<p>動勾配から、異物である ZnO ナノ材料に対する組織上の外側細胞の防御作用を説明した。</p>
--	--	--	--	--	---	--

		<p>添加。重力と凝集により細胞は3D 楕円体細胞を形成(1日)。処理溶液を用いて、作製した3D 楕円体細胞をマイクロモールドから非生物アゲロス層を有する培地皿に流出移動。</p> <p>■ 試験用量</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ ROS 発現量: 31.5、125、500、1,000μM ZnO ナノ材料 ・ 細胞炎症反応: 1,000μM ZnO ナノ粒子 ・ DNA 損傷耐性: 0、31.5、125、500、1,000μM ZnO ナノ材料 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 明視野像を倒立顕微鏡で撮影。 ・ NF-κB の免疫蛍光染色 ・ 細胞を SW480 用にマイクロモールドで作製。ZnO ナノ材料で処理した細胞楕円体を処理後に回収し、1\timesPBS で3回洗浄し、パラホルムアルデヒド (PFA, 4%) で1時間固定。固定した細胞楕円体をプロモフェノール・ブルーで30分間染色し、1\timesPBS で3回洗浄後、O.C.T.組織凍結培地に埋め込み。10μm 厚さの楕円体の凍結切片を作製。切片を PBS で15分間、Triton X-100(0.2%)を用いて透過処理し、PBS で1時間、Triton X-100(0.1%)を用いてウシ血清アルブミン (BSA、2%) でブロック。切片を BSA(0.2%) で NF-κB p65 ウサギポリクローナル抗体を用いて4$^{\circ}$C で1晩培養後、1\timesPBS で3回洗浄し、Akexa Flour 488 ニトリ抗ウサギ抗体を用いて1時間培養。ラベルしたスライドを ProLong Gold 退色防止試薬を用いて DAPI とともに埋め込み。 ・ 切片の画像をレーザー走査型共焦点顕微鏡によ 	<p>■ 2D、3D 細胞の細胞死誘因モードの相違</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 500μM の ZnO への24時間暴露: 2D の平らな表面上に培養した細胞の単分子層が丸くなって分離。ZnO が介在した劇的細胞状態の変化は、細胞の健康が危険にさらされていることを示唆。逆に、3D 細胞では一部のみで、楕円球体細胞表面から解離することを観察。おそらく細胞間の接触の損失によるもの。3D 細胞楕円体の細胞解離は、楕円体全体の形態に影響せずに楕円体細胞の径のみを縮小させたことから、解離プロセスは層ごとに起こっていることを示唆。暴露後、3D NCM460 細胞の平均径は 195.0\pm9.5μm で、対照群の 242.6\pm7.1μm とは明らかに相違。同様に、楕円体の平均径の変化は ZnO への暴露後の 3D SW460 でも観察され、対照群 176.3\pm9.6μm に対して、210.2\pm16.7μm。3D 楕円体細胞の NCM460 と比較して、より解離(細分化)した細胞はまだ SW460 にくっついていて。本観察から、ZnO の生物学的効果は、2D と 3D で異なり、細胞タイプに依存する可能性があることを示唆。 ・ Annexin V/PI assay : 細胞は、細胞モデルに関係なく、用量依存的に ZnO の毒性に反応することが明らかとなった。3D 楕円体細胞は、ZnO の毒性に対する反応低下を示唆。1,000μM の ZnO への24時間暴露後の、2D NCM460 の初期自然細胞死、後期自然細胞死、壊死レベルは、それぞれ対照群の 3.5、2.5、2 倍、3D 細胞では、1.8、3.2、1 倍。SW480 細胞株での 2D と 3D の相違は、もっと劇的で、初期自然細胞死細胞は最高濃度 1,000μM の ZnO への暴露時に 2D モデルでは全く観察されず、後期自然細胞死と壊死のレベルは、それぞれ対照群の 5.2、45 倍に対して、3D では初期細胞死、後期細胞死、壊死がそれぞれ対照群の 4.8、8.5、2 倍。1,000μM ZnO への24時間暴露後には、2D 細胞の NCM460 で 58.3%、SW480 で 9.67%のみが生存し続けていたのに対して、3D 細胞では NCM460 で 85.3%、SW480 で 80.3%が生存。 ・ SW480 細胞モデル: 高濃度 ZnO への暴露(500μM、1,000μM)により 2D モデルで誘発される細胞死の主な状態は、自然細胞死よりはむしろ壊死。低濃度 ZnO(31.5、125μM)への暴露でも観察。NCM460 細胞株で観察された細胞死の主状態も大部分は自然細胞死。壊死プロセスは、細胞膜が傷ついた結果として細胞小器官の膨張を引き起こし、2D 細胞モデルの独特の 	
--	--	---	---	---	--

			<p>り撮影。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・細胞代謝速度の決定 ・SW480 と NCM460 用に 2D はプレートで、3D はマイクロモールドで作製。 ・トリプシン処理後の 3D 細胞モデル用に、細胞楕円体を回収後、分散。細胞を、3,4,5-ジメチルイル-2,5-ジフェニルテトラゾウムに 3 時間暴露。その後、懸濁液を除去し、沈殿したホルマリンを等量のジメチルスルホキシドで 30 分間溶解した後、マイクロプレート分光光度計により 570nm で定量。 	<p>溶解した形態を壊死細胞に与える。壊死は、毒素や感染症、外傷のような広範な外的因子が引き金で起こることが可能。同様に、細胞間 ATP の喪失、主要なエネルギーの現在分子が壊死のトリガーとなることも示唆。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・γ-H2AX の免疫ブロット法: ZnO は 2D SW480 の深刻な DNA 損傷を引き起こし、大規模の DNA 修復を引き起こし、細胞間の ATP 貯蔵物を使い尽くし、それにより、2D SW480 細胞が壊死に至る。2D SW480 は、3D 楕円体状態の SW480 よりも広く扁平な形状で、壊死は、堆積したナノ材料に高濃度で暴露した範囲でより起こる可能性がある。 	
--	--	--	--	---	--

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質試料 調整法/試験用量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
Zn O-2	Suzuki Y, Tada- Oikawa S, Ichihara G, Yabata M, Izuoka K, Suzuki M, Sakai K, Ichihara S, Toxicol Appl Pharmacol. 2014 Jul 1; 278(1):16-25	Zinc oxide nano- particles induce migration and adhesion of monocytes to endothelial cells and accelerate foam cell formation (ZnO ナノ 粒子による 内皮細胞に 対する単核 白血球の移 動と接着の 誘導及び、 泡沫細胞形 成の加速)	<ul style="list-style-type: none"> ■ 試験物質 TiO₂ と ZnO のナノサイズ 粒子 TiO₂: AEROXIDE TiO₂ P25 (Degussa AG, Dusseldorf, Germany), 21 nm ZnO: MKN-ZnO-02 0 (mkNANO, Mississauga, ONT, Canada), 20 nm ■ 試料調整法 試験物質は、 培養培地中 で懸濁させ、 超音波破碎機 を使って分散 させた (100W, 15分)。 ■ 試験用量 ・細胞生存ア ッセイ : 1 ~ 100µg/ml ・細胞による ナノ粒子吸 収 : 1, 5, 10 µg/ml 	<ul style="list-style-type: none"> ■ 試験生物 ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVECs) ヒト単球性白血球細胞 (THP-1) ■ 試験方法・期間・投与方法 ・細胞生存アッセイ ・HUVECs: 実験前に1晩、マイクロプレ ート上に1.5×10⁴細胞/ウェルで播種。ナノ粒 子を完全培地に分散。細胞生存率を MTS アッセイにより24時間、懸濁ナノ粒子を培養 後に決定。暴露後、細胞を MTS 試薬含有新 鮮培地で1時間培養後、吸光測定。細胞増殖 に対するナノ粒子の影響を、コントロールに 対する細胞成長抑制割合により算出。 ・THP-1 単核白血球: マイクロウェルプレ ート上に1.5×10⁴細胞/ウェルで播種、ナノ粒 子に3時間暴露後、10%FBS 含有 RPMI 1640 培地を使って16時間、162nM PMA で処理。 細胞生存率は、MTS により決定。 ・細胞によるナノ粒子吸収: HUVECs を、TiO₂ または ZnO に暴露。16時間後に、Hanks' Salt Solution で洗浄、トリプシンで分離、完全細 胞培養培地で培養。細胞ペレットを HBSS1ml に懸濁させ、細胞数算出。溶液は HNO₃ 濃度 3% になるまで HNO₃ を混合、細 胞含有物質が完全に溶解するまで 80°C に加 熱。ブランクコントロール溶液は HNO₃ を 同量添加した溶液で HBSS1ml を混合。最後 に、溶存溶液を 10ml 調整し、ICP-MS で分 析し、Ti と Zn 濃度を決定。 ・細胞内遊離 Zn イオン検出: 細胞内遊離 Zn を、蛍光膜透過プローブ Zinquin ethyl ester により可視化。HUVECs (1×10⁵ cells/ml) をウェルプレートに播種、16時間後に、細胞 	<ul style="list-style-type: none"> ■ 細胞生存率 MTS アッセイで、ZnO 粒子が 25~100 µg/ml で存在する HUVECs の培養時に 細胞生存率が低下したが、TiO₂ 粒子存在 下では低下しなかった。THP-1 単核白 血球/マクロファージでは、細胞生存率 は ZnO 100µg/ml に暴露した後で明ら かに低下した。以降の試験では、10 µ g/ml 以下のナノ粒子濃度を実験で使 用した。 ■ 金属吸収と細胞内遊離 Zn イオン ICP-MS の結果から、HUVECs の金属 吸収量は、媒体中の ZnO 粒子濃度と関 連性があること、HUVECs による ZnO 粒子の明確な用量依存吸収を示した。遊 離細胞内 Zn の可視化のために Znquin ethyl ester を用いた試験では、コント ロール条件では遊離細胞内 Zn は検出され なかった。ZnO 粒子 10 µg/ml による 16 時間培養後に、遊離細胞内 Zn が観察さ れたが、TiO₂ 粒子 10 µg/ml への暴露後 には観察されなかった。 ■ 単核白血球移動と MCP-1 生成における ZnO 粒子の影響 単核白血球の移動が、内皮細胞への単核 白血球の接着を誘導する重要なステッ プであることを確認するために、TiO₂ または ZnO ナノ粒子への暴露後の HUVECs の上澄み中の MCP-1 濃度を 測定した。予備実験では、37°C で ZnO ナノ粒子 10µg/ml に 16 時間 HUVECs を暴露した時間条件で MCP-1 濃度の顕 著な増加が確認できた。MTS アッセイ 	<ul style="list-style-type: none"> ・ ZnO 粒子 への 16 時間 暴露により、 MCP-1 レベ ルが増加し、 MCP-1 の増 加が、 HUVECs へ の THP-1 の 細胞移動及 び接着を誘 導した。 ・ ZnO 粒子 は、修飾され た LDL のメ ンブレンス カベンジャ ー受容体の 発現を増加 させ、THP-1 単核白血球 /マクロファ ージでのコ レステロ ール吸収を 増加したが、 TiO₂ 粒子で はこうした 変化は確認 されず、ZnO 粒子への暴 露がマクロ ファージコ

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料 調整法/試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
			<ul style="list-style-type: none"> ・細胞内遊離 Zn イオン検出： 10μg/ml ・単球走化アッセイ：1, 5, 10μg/ml 	<p>をナノ粒子に 16 時間暴露。HBSS で 3 回洗浄後、細胞を Zinquin ethyl ester 25 μ M、37$^{\circ}$C、30 分間処理。細胞を HBSS で洗浄、蛍光顕微鏡で観察。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・単球走化アッセイ <ul style="list-style-type: none"> ・HUVECs (1\times10⁵ cells/ml)：ウェルプレートに播種、1 晩接着。HUVECs をナノ粒子に 16 時間暴露、遠心分離により懸濁態ナノ粒子を除去後、上澄みを培養、Cell Culture insets のチャンバー下部に化学誘因物質として使用。 ・THP-1：チャンバー上部に 2.5\times10⁵ cells/well を 3 つ入れ 37$^{\circ}$C で 2 時間培養。膜を透過した細胞を 100%エタノールで 5 分間固定クリスタル・バイオレットで染色。移動割合を 200 倍の光学顕微鏡でランダムな 4 か所の細胞数の計数により定量。HUVECs を異なる用量のナノ粒子に 37$^{\circ}$C で 16 時間暴露後に、MCP-1 (単球走化性タンパク質-1) レベルを ELISA により測定。 ・細胞接着アッセイ： <ul style="list-style-type: none"> HUVECs への THP-1 細胞の接着評価。HUVECs (1.5\times10⁴ cells) を 37$^{\circ}$C で、ウェルプレートで 1 晩成長後、アッセイ前に異なる用量のナノ粒子に 37$^{\circ}$C で 16 時間暴露、0.1%BSA 含有 HBSS で 3 回洗浄。THP-1 細胞は、0.1%BSA/HBSS の 1.0\times10⁶ cells/ml 密度で懸濁させ、37$^{\circ}$C 30 分間培養してカルサイン-AM 1μM でラベル後、0.1%BSA/HBSS で 3 回洗浄。ラベルした THP-1 細胞を、37$^{\circ}$C で 30 分間、ナノ粒子に暴露した HUVECs とともに培養。ナノ粒子接着細胞を 0.1%BSA/HBSS で 3 回洗浄して除去、カルサインでラベリングされた THP-1 細胞の接着を、蛍光顕微鏡で、内皮単層数の 	<p>では、1,5,10μg/ml の ZnO 粒子に 16 時間暴露した HUVECs の培養後に、細胞生存率の顕著な変化は確認されなかった。MCP-1 レベルは、37 $^{\circ}$C 16 時間、TiO₂ または ZnO 粒子への異なる容量 (1,5, 10μg/ml) への HUVECs の暴露後に MCP-1 レベルを測定したところ、ZnO 粒子 10μg/ml への暴露により、MCP-1 濃度が顕著に増加したが、HUVECs の上澄み中の MCP-1 レベルは TiO₂ への暴露では全く影響を受けなかった。ZnO 粒子への暴露した HUVECs の上澄み中での MCP-1 生成量の明確な増加結果をもとに、単核白血球の移動における HUVECs の上澄みの効果を調べたところ、HUVECs の上澄みは、ZnO 10 μ g/ml への暴露により、Transwell マイクロポーラメンブレンを通過した THP-1 単核白血球の数が、コントロールと比較して顕著に増加した。THP-1 単核白血球の移動は、TiO₂ 粒子に暴露した HUVECs の上澄みを用いた実験では確認されなかった。</p> <p>■ 単核白血球接着における ZnO 粒子の影響</p> <p>ナノ粒子を用いた 16 時間培養後に HUVECs への THP-1 単核白血球の接着アッセイを行ったところ、HUVECs への THP-1 単核白血球の接着は TiO₂ 粒子により強化されなかったが、ZnO 粒子 5 または 10 マイクロ g/ml への暴露により、接着している THP-1 単核白血球の数は顕著に増加した。さらに、HUVECs における接着分子の発現について調べたところ、ICAM-1 の発現レベ</p>	<p>レステロール吸収を増加させることを確認し、修飾された LDL のメンブレンスカベンジャー受容体の上方調整によるものであった。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・以上の結果から、ナノサイズの ZnO 粒子は、泡沫細胞形成を加速し、アテローム性動脈硬化の発症と進行を増進する可能性があることを示唆した。

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料 調整法/試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
				<p>カウントにより定量。 ウェスタンブロット法：HUVECs を、プロテアーゼ阻害剤含有溶解バッファー-RIPA(放射性免疫沈降アッセイ)に溶解。抽出プロテイン濃度をプロテインアッセイ濃縮色素試薬により 3 回測定。プロテイン試料を 12%SDS-PAGE で分離、PVDF メンブレンで転移。メンブレンを ICAM-1 (細胞内接着分子-1) に対するウサギモノクローナル抗体とともに 500 倍希釈で培養。VCAM-1 (血管細胞接着分子-1) に対するマウスモノクローナル抗体を 500 倍希釈で培養。5000 倍希釈の ACTB (マウス抗 β アクチン) モノクローナル抗体をローディングコントロールとして使用。免疫反応バンドを ECL-選択化学発光により可視化。バンドの明度を定量。プロテイン発現レベルを β アクチンプロテインに対して標準化。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ DiI アセチル化 LDL 吸収アッセイ：THP-1 (3×10^5 cells) をウェルプレートに播種、懸濁ナノ粒子に 3 時間暴露、162nM PMA と 10%FBS 含有 RPMI 1640 中で 16 時間処理。接着細胞を、アセチル化 LDL (Ac-LDL) 吸収アッセイの単核白血球/マクロファージとして使用。分化された THP-1 細胞を、0.2% 脂肪酸遊離 BSA 含有 RPMI 1640 中で DiI-AcLDL 10μg/ml で 37$^{\circ}$C、6 時間培養後、DiI-AcLDL 吸収を分析。 ・ オイルレッド O 染色：泡沫細胞形成を調べる。THP-1 細胞 (2×10^5 cells) を培地スライドに播種、懸濁ナノ粒子に 3 時間暴露、10%FBS 含有 RPMI 1640 中で 16 時間 162nM PMA を使って処理。分化した THP-1 細胞を 0.2% 脂肪酸遊離 BSA 含有 RPMI-1640 中で 6 時間、Ac-LDL 10 μg/ml とともに 37$^{\circ}$C で培 	<p>ルは ZnO 粒子 10μg/ml に暴露した HUVECs でコントロールに比べて明らかに高くなったが、TiO₂ と ZnO 粒子の両方に暴露した HUVECs では、VCAM-1 の発現に変化はみられなかった。</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ THP-1 単核白血球/マクロファージでの Ac-LDL 吸収における ZnO 粒子の影響 In vitro 泡沫細胞形成アッセイに使用した Ac-LDL の吸収を測定した。THP-1 単核白血球を TiO と ZnO 粒子に 3 時間暴露した後、THP-1 単核白血球を PMA を用いてマクロファージに分化したところ、ZnO 粒子 5 または 10 μg/ml に暴露した後に、DiI-AcLDL の吸収が顕著に増加した。逆に、DiI-AcLDL の吸収は、TiO₂ 粒子に暴露した細胞では変化しなかった。オイルレッド O 染色でも、同様に、ZnO 粒子 10μg/ml への暴露で、Ac-LDL 吸収後に THP-1 単核白血球/マクロファージにおける脂質の蓄積の顕著な促進が確認された。 ■ THP-1 単核白血球/マクロファージでの CD36 と SR-A 発現における ZnO 粒子の影響 CD36 と SR-A のスカベンジャー受容体の発現における TiO₂ と ZnO 粒子の影響を調べるために、THP-1 単核白血球を 3 時間、TiO₂ と ZnO 粒子に暴露し、THP-1 単核白血球を PMA とともにマクロファージ中に分化したところ、ZnO 粒子への暴露により、THP-1 単核白血球/マクロファージで SR-A の発現レベルが増加し、CD36 の発現についても、ZnO 	

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料 調整法/試験用量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
				<p>養。細胞を PBS で洗浄後、4%パラホルムアルデヒドで固定。ホルマリン除去後に、細胞を PBS で洗浄、0.2%オイルレッド O 溶液で 30 分間染色。光学顕微鏡で細胞観察。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・スカベンジャー受容体発現：スカベンジャー受容体、CD36、SR-A の発現を、フローサイトメオリーとウェスタンブロット法により測定。THP-1 細胞 (3×10^5 cells) をウェルプレートに播種、懸濁ナノ粒子に 3 時間暴露、162nM PMA を用いて THP-1 単核白血球/マクロファージに分化。THP-1 単核白血球/マクロファージを、プライマリー anti-CD36 またはマウス IgG1 κ アイソタイプコントロール、SR-A またはマウス IgG2b κ アイソタイプコントロール、を使って、メンブレン CD36 または SR-A 発現に対して評価。その後、細胞を Alexa647 でラベルした anti-マウス IgG 抗体で染色、フローサイトメトリーで分析。 ・ウェスタンブロット法：THP-1 細胞 (8×10^5 cells) をディッシュに播種、懸濁ナノ粒子に 3 時間暴露、THP-1 単核白血球/マクロファージに分化。細胞を RIPA 溶解バッファーに溶解、プロテイン試料を 4/20%SDS-PAGE により分離、PVDF メンブレン上に転移。メンブレンを 400 倍希釈の CD36 と SR-A に対するウサギポリクローナル抗体とともに培養。プロテイン発現レベルを B-アクチンプロテインレベルに対して標準化。 	<p>粒子 10μg/ml への暴露後に顕著な増加がみられた。しかし、TiO₂ 粒子への暴露では、CD36 の発現は減少したが、SR-A の発現は変化しなかった。ウェスタン・ブロット法でも、THP-1 単核白血球/マクロファージでの CD36 と SR-A の発現レベルを調べたところ、THP-1 単核白血球/マクロファージでの CD36 と SR-A の発現が、ZnO 粒子 10μg/ml への暴露でコントロールと比較して増加することを示した。</p>	

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整 法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
ZnO ,TiO 2	Filippi C, Pryde A, Cowan P, Lee T, Hayes P, Donaldson K, Plevris J, Stone V, Nanotoxicology. 2014 Apr 8	Toxicology of ZnO and TiO ₂ nanoparticles on hepatocytes: Impact on metabolism and bioenergetics (肝細胞に おける ZnO と TiO ₂ の毒 性：代謝とバ イオエナジ エティック スへの影響)	<ul style="list-style-type: none"> ■ 試験物質 TiO₂ と ZnO 粒 子 ZnO : 10.7± 0.7nm、 NanoScale Corporation, Manhattan, KS TiO₂ : ルテル 型、305± 1.8nm、 Nanostructure and Amorphous Materials Inc., Houston, TX ■ 試料調整法 C3A 細胞株と HepG2 細胞株ク ローン誘導体を、 ナノ粒子に暴露 する前に、6 ウェ ルプレートで、 10%ウシ胎仔血 清と 80%融合化 するまで Pen/Strep とと もに 3ml Minimum Essential Medium Eagle(MEME)で 培養。 	<ul style="list-style-type: none"> ■ 試験生物 ・ C3A 細胞株、 ・ 肝細胞がん HepG2 細胞 株のクローン誘導体 ■ 投与方法・期間 ・ 投与方法超音波破砕機で 破砕後に、最終密度が選択 濃度になるように細胞に添 加。 ・ 期間：4 時間 ■ 試験方法 ➢ 肝臓中間代謝における ナノ物質 (NM) の影 響 NM に暴露後、細胞をリン 酸緩衝食塩水で洗い流し、 その後、4 時間カルシウム とマグネシウムとともに HBSS 中で以下 2 条件で 培養。(i)内在性基質のみか らの代謝を調べるために 外から添加しない条件、 (ii)生理学的基質の混合物 (乳酸塩 20mM、ピルビ ン酸塩 2mM、オクタン酸 塩 4mM、塩化アンモニウ ム 4mM)。乳酸(L)とピル ビン酸(P)のフラックスの 合計 (J_{L+P}) から解糖フラ ックスを、L/P 比とグル コース精製フラックス(J_{glc}) から細胞質酸化還元電位 を評価。 ➢ ミトコンドリア膜電位 	<ul style="list-style-type: none"> ■ in vitro での肝細胞グリコーゲン代謝におけ る ZnO と TiO₂ の影響 ZnO が、肝臓細胞中でのグリコーゲン分解 (2G+L+P) の用量に依存した著しい増加を 誘導し、2.5µg/cm²で 430%まで増加した。グ リコーゲン分解の増加は、解糖とグルコース 生成の両者の大幅な増加と関連していた。解 糖、J_{L+P}、は ZnO が最も高い濃度で、77±13 から 348±44µmol.gTP-1.hr⁻¹まで 450%増加 した。細胞質酸化還元電位 (L/P) は統計的 に優位な増加を示さなかった。グルコースフ ラックス、J_{glc}、は ZnO 濃度 2.5µg/cm²で、8±3 から 46±14µmol.gTP-1.hr⁻¹、で増加した。逆 に、TiO₂は、グリコーゲン分解、グルコース、 LP (リポたんぱく) 放出に関して、最も高用 量条件での試験においても、非常に限定的な 影響しかみられなかった。 ■ 肝細胞 ΔΨ_mにおける ZnO と TiO₂の影響 ZnO がより低用量 (0.08µg/cm²) のときに、 ΔΨ_m が劇的に低下し、古典的なミトコンド リアの脱共役剤 CCCP (カルボニルシアニド m-クロロフェニルヒドラジン) 50µM で得 られたものと同様の値まで低下した。 ■ グルコース新生 (グルコネオゲネシス) に おける NM の影響 LP 由来のグルコース新生を PEPCK 発現レベ ルで調整したが、ATP の生成減少が強く、LP 由来のグルコース生成を下方に調整すること から、ZnO への暴露後に LP 由来のグル コース新生 (J_{glc}) が 20 倍もの増加が観察され (コ ントロールで 4.8±0.8µmol.hr⁻¹.gTP-1) 対して ZnO 10µg/cm²で 101±39µmol.hr⁻¹.gTP-1)、 ミトコンドリアの酸化的リン酸化が影響を受 けているときと一致した。逆に、C3A 細胞の 	<ul style="list-style-type: none"> ・ C3A 細胞株を 用いた 10µg/cm² 濃度での 4 時間 の培養で、ZnO はミトコンドリア の機能に強い 有害影響をもた らし、結果として LP からのグ リコーゲン分解 フラックスを強 く刺激した。 ・ エネルギー欠 乏状況により、 ミトコンドリア の機能低下が、 LP からのグル コース新生フラ ックスの大幅な増 加に付随した が、これは、 PEPCK の過剰 発現と潜在的な 解糖の付随阻害 により生じた。 これらの効果の 一部は、エネル ギー同化におけ る Zn²⁺の影響と 類似し、おそら く粒子の溶解度 と細胞内の Zn²⁺ の放出によるも のである。

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整 法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
			<p>ナノ粒子は、初めにリン酸緩衝食塩水中に1mg/mlで懸濁させ、完全培地1ml中で4時間(NM暴露による、慢性よりはむしろ初期の影響を検出するために選択された時間)、25°Cで16分間休みなく超音波破碎。</p> <p>■ 試験用量 0-10μg/cm² (LC50以下に十分なるように、また、NMの繰り返し吸収あるいは摂取後にin vivoで起こる可能性のある肝細胞暴露用量に類似するような濃度範囲を選択)。0.5, 2.5, 10μg/cm²になるように、10cm²細胞培地ウェルに100, 25, 5μg/ml添加。</p>	<p>($\Delta\Psi_m$)におけるNMの影響</p> <p>NMに暴露後、細胞をHBSSで洗い流し、JC-10(1μM、20分間、37°C)で染色。活動性ミトコンドリア中でのJC-10形態のJ-凝集体を測定。</p> <p>▶ RNA単離とqRT-PCR C3A細胞から、RNAを単離。RNAの量と濃度を分析後に、PRPCK(PCK1)遺伝子発現レベル(ABI Hs00159918_ml)検出のためにone-step qRT-PCRを実施。82mハウスキーピング遺伝子発現に標準化。</p> <p>▶ ZnO分解とZn²⁺の放出 ZnOの溶解度とZn²⁺イオンのその後の放出を調べるために、MEME中で4時間、ZnO NMを、細胞暴露時の同濃度条件で培養。培養培地をその後、Zn²⁺が完全に溶解するようによく攪拌して均一に分散させた後、Vivaspin限外ろ過スピナラムを用いてろ過。ろ液中Zn²⁺イオン濃度を空気/アセチレン原子吸光法により分析。</p>	<p>10μg/cm²濃度のTiO₂への暴露では、LP代謝への影響はみられなかった。</p> <p>■ ZnOの溶解度 細胞上での10μg/cm²の最も高い暴露濃度と一致する、100μg/mlのZnO粒子中の溶存Zn²⁺濃度は、4時間暴露時に3.9\pm0.4μg/mlで、粒子の溶解度は僅かに4%であった。</p> <p>■ PEPCK mRNA発現 LP由来のグルコース新生の長期間の調整は、PEPCKの発現レベルにより制御されていることから、NMへ暴露したC3AsのPEPCKのmRNA発現レベル発現を確認した。PEPCK発現における溶存Znイオンの遷座材的影響を調べるために、ZnO粒子への暴露濃度と同濃度でZnCl₂に暴露した際の影響を分析したところ、ZnOナノ粒子へのC3A細胞の暴露は、用量依存の関係でPEPCKのmRNA発現を増幅し、最高で10μg/cm²用量で約4倍となった。溶存Zn²⁺イオンもまた、PEPCK mRNA発現を増幅した。</p> <p>■ ZnOとTiO₂-ROS生成 酸化ストレスが、肝臓細胞のPEPCK遺伝子の転写を上方調整することが知られているほか、細胞内ROSがミトコンドリアの酸化リン酸化機能障害を誘発し、これは、$\Delta\Psi_m$におけるZnOの影響を説明することができることから、(i)細胞遊離システムにおけるZnOとTiO₂のROS生成能、(ii)細胞内ROS生成を誘発するNMの能力、の評価を行った。実験で用いたZnO NMは、細胞遊離環境でのROSの比較的小規模の生成を示した(EPR intensity 619\pm23)のに対して、TiO₂粒子ではEPR intensity 2004\pm80であった。細胞内ROS生成のDHEとFACS</p>	<p>・TiO₂ナノ粒子では、今回の濃度範囲では、いかなる有害影響も現れず、過去の結果と一致した。</p>

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整 法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
				<p>▶ 細胞内 ROS (活性酸素種) の測定 NM への暴露後、C3A 細胞を単一細胞懸濁液中にトリプシン処理し、HBSS 中で DHE により 37°C、30 分間、染色。細胞蛍光を分析。 H₂O₂(5mM) または銀 NM への暴露を、ポジティブ・コントロールとした。</p>	<p>分析では、ZnO が ROS 生成の用量依存的な細胞内増加を誘導し、それは TiO₂ よりもずっと高レベルであるとの結果 (DHE ポジティブ細胞の 4.5±1.05% に対して、13.7±0.8%) であり、増幅した PEPCK 発現とミトコンドリアの機能障害を潜在的に説明している。</p>	

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料 調整法/試験用 量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
Zn O, Ag	Musee N, Zvimba JN, Schaefer LM, Nota N, Sikhwivhilu LM, Thwala M, J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.2014; 49(1):59-66	Fate and behavior of ZnO- and Ag- engineered nanoparticle s and a bacterial viability assessment in a simulated wastewater treatment plant (シミュレ ートした排 水処理プラ ントでの、 ZnO、Ag の 人工的に製 造されたナ ノ粒子の運 命と挙動、及 びバクテリ アの生存能 力の評価)	<ul style="list-style-type: none"> ■ 試験物質 <ul style="list-style-type: none"> ・ ZnO と Ag の人工的に製造されたナノ粒子 (ENPs) (Sigma-Aldrich) : < 100nm、球状 ・ ZnO : サイズ分布 16-89nm、棒状 ・ 立方体状 ・ 標準的形狀 ・ 規格外形狀を含む不均一混合物、 ・ Ag : サイズ分布 29-50nm、均一な球状形状 ・ 排水 : 排水処理プラントより 1 週間に 1 度、排水を約 100L 収集し、バクテリア活性を抑えるために 4℃ の冷所で保存。 ■ 試料調整法 排水処理プラ 	<ul style="list-style-type: none"> ■ 試験生物 バクテリア ■ 投与方法・期間 <ul style="list-style-type: none"> ・ 投与方法 : 水の滞留時間 6 時間で、シミュレートした WWTP (排水処理プラント) の 3-L バイオリアクターに ENPs を投入。 ・ 期間 : 240 時間 ■ 試験方法 <ul style="list-style-type: none"> ・ シミュレートした排水処理プラントのレイアウト : OECD 設計ガイドライン(303. A, , 2001)に従って設計。2 つのチャンバーから構成されるモデル (攪拌タンクリアクター、活性スラッジシステムを用いた生物処理をシミュレートした浄化装置)。モデルユニットは、試験ユニットとコントロールユニットの 2 つで、ENPs の種類別に並行して同時に実験を実施。排水を各ユニットに 8.3mL/min で連続的に 168 時間以上取り込み、定常状態に到達したところで、ENPs 含有排水と非含有排水を連続的に 240 時間、取込む。 ・ シミュレートした排水処 	<ul style="list-style-type: none"> ■ 排水中の ZnO と Ag ENPs の安定性と pH の影響 ZnO ENPs は、酸性排水条件下 (pH3~4) での溶解度が高く、pH3 で 38.2mg/L Zn であり、ENPs として添加した Zn の 47.5%が溶解した。排水中の pH が上昇すると、溶解度は急激に減少し、pH7.0 以上では溶解度は一定となった。 Ag ENPs は、試験時に曝気していなかったため、排水の pH の変化に関わらず、溶解度はほぼ一定で、限定的にしか溶解しなかった。 ■ シミュレートした排水処理プラント 事前の平衡シミュレート WWTP では、有機物が安定して溶解していることを示し、少なくとも 168 時間後の排水中の COD から、COD 除去効率は ZnO 試験ユニットで 72±8%、Ag ENPs で 74±9%であった。その後、排水中に連続的にナノ粒子を分散したところ、240 時間後の COD 除去効率は、ZnO の試験ユニットで 71±7%、コントロールユニットで 80±5%、Ag ENPs では、試験ユニットで 74±14%、コントロールユニットで 78±8%となり、試験ユニットのほうがコントロールユニットに比べてわずかに COD 除去効率が高くなったが、ZnO と Ag の両者ともに試験ユニットでもコントロールユニットでも同程度の COD 除去効率であり、試験ユニットスラッジ中の Zn 及び Ag の蓄積は、COD 除去効率に顕著な影響を与えず、スラッジ中の有機物を分解するバクテリアの能力への影響も取るに足らない程度であった。 ■ スラッジ中へのナノ粒子の蓄積 ナノ粒子への暴露から 240 時間後に収集したスラッジの SEM からは、個々の ENPs の結晶の存在は不明であったが、ZnO と AG ENPs はどちらも、スラッジ中に蓄積していることが、全 Zn と全 Ag 濃度の測定から確認できた。試験ユニット中では、Zn と Ag 濃度は時間とともに漸進的に増加したのに対して、コントロールユニットでは、 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 金属 ENPs あるいは金属酸化物 ENPs の大部分は、処理された排水に分散した場合よりも下水スラッジへの高い親和性を示すことが明らかとなった。 ・ スラッジ上の ENPs の分散は、おそくらメ生物吸着や生物汚泥への沈着メカニズムによって駆動されており、そのために限定的な溶解度の結果が得られた。 ・ ZnO と Ag ENPs への短期暴露

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料 調整法/試験用 量	試験生物投与方法・ 期間試験方法	試験結果	結論
			<p>ント中にナノ粒子を添加。</p> <p>■ 試験用量</p> <p>・排水処理プラントの排水供給速度：0.83mg/min</p> <p>安定性試験のストック懸濁液濃度：100mg/L</p>	<p>理プラントの運転：攪拌タンクリアクターは 100L/h で曝気。試験ユニットとコントロールユニットからスラッジを毎日 15 分間 ポンプで吸い出す。モデルユニットの設計は、攪拌タンクリアクター内の水の滞留時間を 6 時間 とした。各ユニットの浄化装置から、処理排水と活性化スラッジサンプルをそれぞれ 250ml、毎日採取。浄化装置から収集したスラッジの一部を RAS (返送活性スラッジ) として攪拌タンクリアクターに導入。</p> <p>・排水中人工ナノ粒子の安定性試験：排水中の ZnO と Ag ENPs の安定性を、pH3-11 の範囲で調査 (典型的な排水の pH は 7-8)。ストック懸濁液 (1L) を 9 分割 して pH を調整し、軽く揺すって混合し、96 時間 静置後、Zn と Ag を分析。</p> <p>・細菌生存能力評価：240 時間 後に、試験ユニットとコントロールユニットから収集した一部のスラッジ (1ml) を使って、細菌の生存能力を評価。 L 7007</p>	<p>240 時間 までは実質的に一定であった。試験ユニットスラッジ中の Zn 及び Ag の平均濃度は、それぞれ 54±39mg/g、57±42mg/g で、処理された排水中の濃度は、1.39±0.54、0.12±0.06mg/L に比べて非常に高く、下水スラッジへの ENPs の高い親和性を示した。</p> <p>ナノ粒子への暴露から 240 時間 後の XRD スペクトルパターンは、ZnO の結晶ウルツ鉱構造と、Ag の面心立方部分で点家氣的な回折ピークを示し、ZnO ENPs に暴露したピークのほうが鋭くなった。ナノ粒子への暴露から 240 時間 後の TEM 画像から、ナノ粒子に暴露しなかった場合の ZnO の平均サイズは 44nm で、サイズ分布幅は 16~89nm であったのに対して、暴露後の平均サイズは 70nm で大きな違いはなかった。Ag については、暴露前のサイズは 29-50nm であったが、暴露後には大きな凝集体が形成され、ナノ粒子を単離することは困難であった。Ag ENPs の固まった凝集体は、緩い凝集体を形成した ZnO に比べて表面積が少なくなったが、COD 除去効率の違いは顕著ではなく、短時間の細菌の生存能力の結果からは、Zn と Ag の濃度とは関係がみられなかった。</p> <p>■ 細菌生存能力評価</p> <p>細菌生存キットを用いたコントロールユニットと試験ユニットの試験結果から、フロック形成の証拠として、細胞の厚い凝集体が確認された。ZnO と Ag ENPs を混ぜた試験ユニットの蛍光赤色細胞の偶然の発生は、ネガティブコントロールの結果と比較することで、細菌の細胞膜が損傷したことを示す可能性があるが、蛍光緑色細胞が大量に偶発したことは、このシステムで明確であり、有機物の生物分解を行う排水中細菌の能力に対して、ほとんど影響がないとの観測結果をもたらす可能性がある。また、損傷を受けた膜をもつ細胞は、コントロールユニットでも、自然死により確認された。</p> <p>COR 除去と有機物の分解を行う活性スラッジ (排水中細菌) の能力は、試験ユニットで顕著な妨害は確認されず、コントロールユニットと試験ユニットの活性スラッ</p>	<p>は、COD 除去に関する試験結果が、試験ユニットとコントロールユニットで同等であったとの結果により証拠付けられるように、シミュレートされた WWTP での有機物の生物分解を行う排水中細菌の能力に対する影響は取るに足らないものであることを示した。微生物個体数への ENPs の全体的な有害影響は、ENPs 凝集体により抑制され、環境因子により抑</p>

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料 調整法/試験用 量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
				<p>LIVE/DEAD BacLight Viability kit を使用。キットは、ヨウ化プロピジウム (PI) と SYTO®9 の 2 つの染色からなる。染色液とバクテリア懸濁液を混合して室温で暗条件で 15 分間培養した後、蛍光顕微鏡で観察。</p>	<p>ジブロックにおけるバクテリアの生存を蛍光顕微鏡で観察したところ、排水システムでは、定量データではないが、ZnO と Ag ENPs への短期間の暴露に対する回復が確認できた。</p> <p>排水中での ENPs の溶解と凝集は、ENPs の安定性に影響を与えること、そうしたプロセスはどちらも、pH やイオン強度などの環境因子による影響を受けること、を今回の結果は示唆している。また、排水中のバクテリア細胞は、今回のシミュレートした排水処理過程で観察されたように、ZnO や Ag ENPs への短期間への暴露に対して回復力を示した。これは、COD 除去効率が試験ユニットでもコントロールユニットでも同等であったとの結果からも支持された。</p>	<p>制される生物学的利用、脳を阻害するのと同様に、おそらく ESP (細胞外高分子物質) によって引き起こされる遮蔽効果によるものと考えられる。</p>

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
TiO ₂ -1	Sweeney S, Berhanu D, Ruenraroengsak P, Thorley AJ, Valsami-Jones E, Tetley TD Nanotoxicology 2014 Aug 19: 1-11	Nano-titanium dioxide bioreactivity with human alveolar type-I-like epithelial cells: Investigating crystalline phase as a critical determinant (ナノ二酸化チタンのヒト肺胞 I 型様上皮細胞との生体反応性: 重要決定要因としての結晶相の研究)	試験物質 (NP: TiO ₂): アナターゼ (9.8、10.9nm), ルチル (11.7、9.1nm) 試料調整法: 肺胞上皮細胞 TT1 (擬似ヒト肺胞 I 型) を使用、既定用量の NP を超音波バス中、30 秒処理、TT1 細胞単層に暴露 試験用量: 1,10,50,100µg/ml; 純水または DDCM-1 培地	試験生物: ヒト肺胞上皮細胞 TT1 (擬似ヒト肺胞 I 型)、10%の FCS 新生児仔牛血清、0.05%のジェネティシン、10%のペニシリン/トレプトアビジン/グルタミンの DCCM-1 組織培地を使って培養。シード後 48h 培養し、成長させた。NP に暴露させる 24h 前に培地は、無血清 DCCM-1 培養基と入れ替えた。5%の CO ₂ /95%の空気、37°C で保持。 投与方法/期間試験方法: ・生存率試験・細胞毒性 (24h): 規定用量の NP を添加した培地で TT1 細胞の生存率を、MTT アッセイにより生存率を評価、LDH 分析キットで細胞毒性を評価 ・サイトカインの測定 (4、8、24h): IL-6、IL-8 または MCP-1 の 1000pg/ml の標準液を使用し、ELISA 分析法で測定 ・細胞活性酸素種の同定 (0、0.5、1、2、24h): ジヒドロエチジウム (DHE) の酸化から生じている蛍光プローブを画像化、画像ソフトによって定量化 ・酸化・還元グルタチオンの測定 (2、6、24h): Calbiochem_GSH アッセイキット I 使用、分析は分光光度計 (405nm)	・生存率試験・細胞毒性: 生存率については、アナターゼとルチルともに 500µg/ml の用量のときに、5%危険率で有意に低下し、結晶差は無い。細胞毒性は、アナターゼは 50µg/ml 以上、ルチルは 100µg/ml で、有意 (1%危険率) に増加したが、結晶差は小さい。 ・サイトカインの測定 (4、8、24h): ルチルの方が IL-6、IL-8 および MCP-1 について、一貫してわずか大きな応答を引き起こしたが、炎症性メディエーターの放出プロファイルパターンは、これら二つのナノ TiO ₂ の結晶相と同様である。 ・細胞活性酸素種の同定 (0、0.5、1、2、24h): ジヒドロエチジウム (DHE) の酸化量は、10µg/ml 以上で、ルチルについては、24h 以上で有意 (1%危険率) となり、アナターゼについては、2h で有意 (1%危険率) となり、24h では有意性が 5%危険率となる。 ・酸化・還元グルタチオンの測定 グルタチオンの酸化種/還元種の比は、用量が大きいほど高くなるが、ルチルは、ル 6h で有意性が上がり、さらに 24h で有意性が高くなる。一方、アナターゼの場合は、2h で有意性が高いものの、24h では有意がかなり減少する。結晶種の差は大きい。	結晶相の異なる 2 種のナノ二酸化チタンのヒト肺胞 I 型様上皮細胞との生体反応に関する差異を明確にした。 今回の実験に使用した特別に作製したナノ材料と肺胞上皮細胞モデルは、ナノ材料の細胞反応性に重要な物理化学的特性を調べるための、有用なアプローチを提供した。

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法/ 試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
TiO ₂ -2	Sheng L, Wang L, Sang X, Zhao X, Hong J, Cheng S, Yu X, Liu D, Xu B, Hu R, Sun Q, Cheng J, Cheng Z, Gui S, Hong F JHazard Mater. 2014 Aug 15; 278:180-8	Nano-sized titanium dioxide-induced splenic toxicity: a biological pathway explored using microarray technology (ナノ二酸化チタンによって引き起こされる脾臓毒性：マイクロアレイ技術を使用して探索した生物学的経路)	試験物質： ナノ二酸化チタン (TiO ₂ NP): アナターゼ、平均径 5-6nm、比表面積 174.8m ² /g、水力学的直径 294nm) 試料調整法： 0.5% (w/v) ヒドロキシプロピルメチルセルロース (HPMC) 水溶液の表面上に NP 粉を分散、30 分間超音波処理の後、5 分間機械的に振とうした。 試験用量： 2.5、5、10mg/kg 体重	試験生物： 160 匹の CD-1 (ICR) 雌のマウス (24±2g) 投与方法・期間： 胃内投与、毎日投与、最大 90 日 試験方法： 成長状態、飲食状況、活動状況または死亡率を含むすべての症状を毎日記録。 90 日後、解剖により、血液、脾臓を回収、Ti 量を ICP-MS 測定、組織を顕微鏡観察。 脾臓細胞微細組織は、脾臓 (n = 5 各々) を 2.5% のグルタルアルデヒド、2% のホルムアルデヒドを含む 0.1M のナトリウム・カコジル酸塩バッファ溶液で処理後、50mM のナトリウム・カコジル酸塩 (pH 7.2-7.4) 中、1% の四酸化オスミウムで 40℃、2h 処理し、試料は段階的な一連のエタノール (75%、85%、95%、と 100%) 処理で脱水して、Epon 812 に埋め込んだ。薄片試料は、ウラニル・アセテートとクエン酸鉛でコントラストをつけ、TEM 観察した。脾臓部は共焦ラマン顕微鏡検査実施。 血液学的なパラメータは、抗凝固剤として EDTA を使用、赤血球	体重: TiO ₂ NP 服用は体重の段階的に減少し、脾臓インデックスとチタン蓄積はかなり増加した (p < 0.05 または 0.01)。 血液学的なパラメータ: TiO ₂ NP 暴露で血液中の WBC、LYMPH、NEUT、RBC、HGB と PLT が著しく減少。リンパ球の Cn3+、cn4+、ens+ と B 細胞が、TiO ₂ NP 投与で大きく減少 (p < 0.05 または 0.01) した。 脾臓の組織病理評価: TiO ₂ NP 投与をうけているグループは、マクロファージ浸潤を示し、脾臓で白いパルプ状の複製を観察した。さらに、黒か茶色のかたまりを観察し、共焦ラマン顕微鏡検査により TiO ₂ であることを確認した。 脾細胞微細構造評価: TiO ₂ NP 投与グループは、古典的な形態のアポトーシスの特徴を示した。TEM によって、TiO ₂ NP の黒い析出物を観察した。 遺伝子発現プロファイル: 10mg/kg の暴露検体で最もひどい脾臓損傷を確認した脾臓を、遺伝子発現プロファイル評価に供した。全遺伝子 (45, 000 遺伝子) のおよそ 2.55% 以上 (1194 の遺伝子) が TiO ₂ NP 暴露によって変化した。 1194 の遺伝子のうち 1041 の遺伝子が免疫/刺激的反応、アポトーシス、酸化性ストレス、代謝プロセス、ストレスへの反応、細胞周期、イオン輸送、信号形質導入、細胞増殖、細胞骨格と細胞分化と関係していた。 リアルタイム PCR: 7 つの遺伝子にアポトーシス、酸化性ストレスとストレスに対するレスポンスを確認した。Cfd、Lbp、Cd14、Atf4 と Cyp2e1 を含む 5 つの遺伝子はアップレギュレートされ、Asns と Cdk1 を含む 2 つの遺	TiO ₂ NP 暴露によって、脾臓への NP の蓄積、マクロファージ浸潤、アポトーシス形態を確認した。マイクロアレイ・データは、TiO ₂ NP にさらされた脾臓について、免疫/刺激的反応、アポトーシス、酸化性ストレス、ストレス反応、代謝プロセス、イオン輸送、信号形質導入、細胞増殖/分割、細胞骨格に関する 1041 の遺伝子に重要な変化を示した。

			<p>(RBC)、リンパ球 (リンパ)、白血球 (WBC)、ヘモグロビン (Hgb)、血小板 (PLT) と好中球顆粒白血球は、血液学自動分析装置で測定。</p> <p>illumina 社の illumina BeadChips を用いたマイクロアレイ分析法によって、脾臓組織のマイクロ配列と遺伝子発現プロファイリングをデータ分析。</p>	<p>伝子はダウンレギュレートされた。 エライザ法 (ELISA) 分析結果: 10mg/kg の TiO₂ NPs 暴露によって、Cfd、Lbp、Cd14、Atf4 と脾臓の Cyp2e1 タンパク質レベルはかなり上昇し、Asns、Cdk1 のレベルは低下した。</p>	
--	--	--	---	---	--

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
TiO ₂ -3	Louro H, Tavares A, Vital N, Costa PM, Alverca E, Zwart E, de Jong WH, Fessard V, Lavinha J, Silva MJ Environ Mol Mutagen. 2014 Jul; 55(6):500-9	Integrated approach to the in vivo genotoxic effects of a titanium dioxide nanomaterial using LacZ plasmid-based transgenic mice (LacZプラスミドベースの遺伝子導入マウスを使用した二酸化チタンナノ材料のin vivo 遺伝毒性効果への統合的アプローチ)	試験物質: アナーゼ型 TiO ₂ ナノ粉末 (NM-102、球状、コーティングなし、平均径 22nm) 試料調整法: 陽性対照として、N-エチル-N-nitrosourea (ENU) を DMSO に溶解 (100 mg/ml)、さらにリン酸塩バッファ食塩水で希釈。NM-102の2.56 mg/mlの分散液は、0.05%の血清アルブミン、続いて0.05%のエタノールを添加し、16分超音波処理し、10-1倍のPBSで希釈し、2mg/mlの最終濃度とした。比較対照は、PBSのみ使用 試験用量: 1日あたり 10、15 mg/kg 体重の	試験生物: LacZ プラスミドベースの遺伝子導入マウス 投与方法: 1日2回に分け、尻尾より静脈内注射。尻尾は40°Cに暖め、1mlの注射針を使用。 試験方法: 42時間後、MN (小核) アッセイのため、採血。DNA鎖切断(コメットアッセイ) および遺伝子突然変異は、28日目、最後の処置後の脾臓および肝臓で測定した。病理組織学的および細胞学的分析は、肝臓試料で行った。肝臓と脾臓のおよそ3分の1は、PBSで洗浄し、コメットアッセイに使用。肝臓と脾臓の残りの部分は、冷たい食塩水で洗い、突然変異分析のDNA抽出までの-80°Cで保存。 コメットアッセイ: 肝臓と脾臓からの細胞懸濁液(20 mM EDTA、10% DMSO のPBS溶液)を使用。Tice等と同様の方法にて4°C、0.8V/cm、300mAで電気泳動、無効化(0.4Mのトリス-HClバッファ、pH 7.5)の後、マイクロゲルは臭化エチジウム(0.125g/l)で染色した。高解像度カメラとコメット評価ソフトウェア、Imaging蛍光顕微	病理組織学的および細胞学的分析: 対照動物の肝臓形態は通常通りで、炎症性または循環障害は観察されなかった。血管も、赤血球と他の血球の比率も通常であった。10mg/kgのNM-102を注射された5匹の肝臓は、対照と比較して、重要な組織病理上の差がなかった。しかし、肝細胞の間とマクロファージの中に、対照で観察されなかったナノ粒子の強凝集体と考えられる無色で不規則な大きさと形状の粒子(1-1.5μm)が存在した。10mg/kgを注射されたマウスの肝臓と比較して15mg/kgのNM-102を注射されたマウスで多く観察された。用量に関係なくこれらの粒子は肝細胞の核のいくつかでも検出された。核の内側のNM-102は、常に好塩基性異質染色質によって囲まれていた。NM-102の最も高い用量の動物の肝臓に唯一ははっきりした病理学的変化を検出した。組織病理特徴は、胆管または小管で観察されなかった。TEMによる微細構造分析では電子密度の高い析出物を確認した。NM-102を注射されたマウスの肝臓組織でNMの蓄積と一致する。10mg/kgのNM-102を投与されたマウスは若干の肝細胞で電子密度の高い材料のゆるい集合を観察した。細胞質の範囲内で分散して、ミトコンドリアで蓄積していた。高電子密度の小片は、15mg/kgのNM-102のマウスの肝細胞でも観察され、細胞質でも散らばって、ミトコンドリアでも蓄積していた。クップファー細胞に存在する場合は、NM-102小片が細胞質小囊の範囲内で高密度に蓄積していた。 遺伝毒性評価: MNRET (小核赤血球)の頻度は、NM-102のどちらの用量でも42時間後にも、対照と差がなく、骨髄に細胞障害性でないことを示した。ENU (陽性対象)による処置は対照と比	遺伝毒性は、肝臓で観察された中程度の炎症反応にもかかわらず、使用された実験条件下では、ナノサイズの酸化チタンに暴露したマウスで検出されなかった。マウス肝臓中のTiO ₂ の生体内持続性および適度な炎症反応を考慮すると、より強力な炎症応答をもたらす高用量では二次的な遺伝毒性作用および状態の可能性は、例えば、より長い時間枠内で、さらに調査されるべきである。

			<p>NM-102 (4.6、7.5ml/kg)</p> <p>鏡使用。</p> <p>LacZ変異体頻度：均質化肝臓と脾臓とLacZ-プラスミドレスキューからのゲノムDNA抽出。マン-ホイットニーU-テストを使って、NM-102と比較サンプル間で、平均変異体頻度を比較。</p>	<p>較して、MNRET (P < 0.001) の頻度が増加し、骨髄毒性を示した。NM-102 のどちらの用量でも28 日後のコメット分析で測定される DNA 切断の違いは無かった。しかし、ENU は、28 日後に、脾臓ではなく、肝臓 (P = 0.008) の中の DNA の平均パーセンテージの有意な増加を示した。</p> <p>LacZ 突然変異分析は、対象マウスと比較し、肝臓または脾臓で NM-102 暴露による MF の差は検出できなかった。反対に、ENU は、4 倍以上 (P < 0.021) 、両方の器官で MF の重要な増加を引き起こした。</p>	
--	--	--	--	---	--

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間試験方法	試験結果	結論
TiO ₂ -4	Takaki K, Higuchi Y, Hashii M, Ogino C, Shimizu N J Biosci Bioeng. 2014Jan; 117(1):129-33	Induction of apoptosis associated with chromosomal DNA fragmentation and caspase-3 activation in leukemia L1210 cells by TiO ₂ nanoparticles (二酸化チタンナ ノ粒子による白 血病L1210細胞 における染色体 DNAの断片化お よびカスパーゼ 3活性化に関連 するアポトーシ スの誘導)	試験物質： TiO ₂ (100nm)、水分 散、石原産業 (MPT-422) 試料調整法/試験用 量： ポリアクリル酸を 5mlのN、N-ジメチル ホルムアミドに 10mgのTiO ₂ を添加、 30分の超音波処理。 混合は、150×5hの 保持の後、2倍の量の アセトンを加え、20 分の間200Gで遠心分 離し、ペレットはエタ ノールで洗浄、再度、 遠心分離後、水中に再 懸濁。TiO ₂ 分散液は、 リン酸塩バッファ食 塩水と入れ替えた。 PD-10コラムを通し てのゲル濾過によっ て殺菌し、培地とし た。	試験生物： マウス白血病 L1210 細胞 投与方法： 培地として、10%のウシ胎児 血清 (Fetal bovine serum; FBS) を補充した Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) を使用、 37°C、10%CO ₂ に保持、0.5 m l の媒体に 10 万の細胞を 培養。 期間：最大 96 h 試験方法： 細胞生存能力は、CytoTox-1 分析キットを用いた。 凝縮核は、遠心分離によっ て細胞を集め、PBS で洗浄、室 温で 30 分の間 4%のパラホ ルムアルデヒドで固定。 DNA は特有の蛍光色素 4 (6- ジアミノ-2-フェニルインド ール (DAPI)) で染色の後 蛍光顕微鏡で観察した。 DNA 断片化は、フィール ド・ジェル電気泳動 (PFGE) による。収集された L1210 細胞を、0.5%のアガロースゲ ルに埋め込み、電気泳動後、 ジェルを臭化エチジウムで 染色し、視覚化、写真撮影し た。	細胞毒性影響： 生細胞の数を、0.05、0.1、0.2、0.4、および 0.8 mg/ml の TiO ₂ 濃度で調べると、用量が高 く、時間がたつほど、未処置の対象と差が大 きい。培養基の中に傷ついた細胞から放出さ れる LDH 活性も、用量が高く、時間がたつ ほど高くなった。 凝縮核と DNA 断片化： 細胞死の特徴となる核凝縮は、12h 後、TiO ₂ 無しで 8%に対し、有りでは 14%となった。 また、TiO ₂ 無しでは少なくとも 24h 無傷であ るが、18 h 後に断片化が検出された。TiO ₂ は ROS による DNA 断片化を引き起こす。 カスパーゼ活性：アポトーシスの細胞死を誘 発する指標として調べた結果、TiO ₂ 有り で 24h での活性は、TiO ₂ 無しの 3 倍であ った。またポリスチレンのナノ粒子によ って、活性に影響ないことを確認し、 コーティングの影響がないものと推定 した。 サイトカラシン D による LDH 放出： TiO ₂ の有無と、高い LDH 活性との関係 を調べた結果、エンドサイトーシスの抑 制剤が TiO ₂ によって誘導される LDH の放出を妨げないこと示した。	TiO ₂ がマウス白 血病 L1210 細胞 に及ぼす影響を 調べ、細胞生存率 への悪影響を確 認した。さらに、 ROS による DNA 断片化を引き起 こすこと、エンド サイトーシスの 抑制剤が TiO ₂ によって誘導され る LDH の放出を 妨げないことを 明確にした。

				カスパーゼ活性 : Apo-ONE homogeneouscaspase-3/7 分 析キット		
--	--	--	--	---	--	--

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
TiO ₂ -5	Tassinari R, Cubadda F, Moracci G, Aureli F, D'Amato M, Valeri M, DeBerardis B, Raggi A, Mantovani A, Passeri D, Rossi M, Maranghi F Nanotoxicology. 2014Sep; 8(6):654-62	Oral, short-term exposure to titanium dioxide nanoparticles in Sprague-Dawley rat: focus on reproductive and endocrine systems and spleen (Sprague-Dawleyラットへの二酸化チタンナノ粒子の経口、短期暴露:生殖および内分泌系および脾臓を焦点として)	試験物質:アナターゼ TiO ₂ のナノ粒子(平均直径は、284±43nm) 試料調整法: TiO ₂ ナノ粒子は15分の間超音波処理によって蒸留水に分散、毎日準備 試験用量:一日あたり0,1,2 mg / kg 体重	試験生物:(およそ60日齢)の42匹の若い性的に成熟したスピローグ・ドーリー・ネズミ 投与方法・期間:期間5日間の経口暴露 試験方法: ナノ粒子を走査型電子顕微鏡(SEM)および透過型電子顕微鏡、および脾臓における生物蓄積 組織病理学観察:甲状腺、副腎、卵巣、子宮、精巣および脾臓、パラフィン埋め込み、顕微鏡検査 性的ステロイドと甲状腺ホルモン血清レベルの生化学評価:T ₃ 、E ₂ とTの濃度は、DELFLIAによって複製したネズミ血清で評価。測定は、ウォーレス1420 VICTOR3TMMultilabel マイクロプレート測定器 Ti濃度:ICP-MASおよびSEM/エネルギー分散型X線によって調べた。	TiO ₂ 濃度: Ti濃度は、甲状腺(高用量、2mg/kg)で0.24の±0.09µg/g、卵巣では、2と1mg/kgの用量に対し0.28±0.07と0.12±0.04µg/g、子宮では、0.051±0.006と0.49±0.04µg/gだった。 脾臓に関しては、Ti濃度の雄雌の差は無い。 検出されたTiO ₂ の平均サイズはおよそ130nmであった。球形ナノ構造は、周囲の組織と判別できた。EDXマッピングによってTiとOの存在を確認し、O/Tiの比率が1.999であることも確認した。 雄への影響: 試験期間中、用量差は体重差、臓器重さに影響しなかったが、食事量に差がでて、高用量で食欲減退が観察された。 性的ステロイドと甲状腺ホルモン濃度は、用量が高い場合、T血清は増加、T ₃ 血清は減少、E ₂ 血清には差がなかった。甲状腺は、2mg/kgの用量で、ルーメンに小胞上皮の剥離が発生し、不規則形状の小胞の発生率も増加した。副腎皮質で変化は観察されなかったが、骨髄の核発生率は、有意な増加を示した。精巣または脾臓に関して影響は観察されなかった。 雌への影響: 試験期間中、用量差は体重差、臓器重さに影響しなかった。性的ステロイドと甲状腺ホルモン濃度は、用量が高い場合、用量が高い場合、T血清は低下、T ₃ およびE ₂ 血清には差がなかった。 卵巣において、細胞のアポトーシスの発生率は増加した。組織病理学観察は、グループの間で差がなかった。甲状腺の組織形態計測は、高用量で、小胞上皮の高さ増加した。	アナターゼ TiO ₂ のナノ粒子の甲状腺、副腎、卵巣、子宮、精巣と脾臓および血清ホルモン濃度(テストステロン、17-β-エストラジオールとトリヨードサイロニン)への影響を、ねずみの雄雌の差に焦点をあてて調べた。 甲状腺の機能は、T ₃ 血清について雄で減少した。T血清濃度は高用量で雄は増加して、雌は減少した。低用量で短い暴露でも、脾臓において、TiO ₂ 強凝集体と増加した白いパルプ(高用量の雌)が見られた。

					<p>副腎皮質で壊死の細胞の発生率増加を観察した。骨髄に、濃縮した核の発生率増加が観察された。 脾臓で、白いパルプ域の比率が、高用量で増加した。子宮では影響が見られなかった。</p>	
--	--	--	--	--	---	--

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間試験方法	試験結果	結論
NPs; CuO, ZnO, NiO, CeO ₂ , Fe ₃ O ₄ , TiO ₂ , MWCNT 実験 方法	Karlsson HL, Gliga AR, Calléja FM, Gonçalves CS, Wallinder IO, Vrieling H, Fadeel B, Hendriks G Particle and Fibre Toxicol. 2014 Sep 2;11(1):41	Mechanism-based genotoxicity screening of metal oxide nanoparticles using the ToxTracker panel of reporter cell lines (レポーター 細胞株の「Tox Tracker」を用 いた、金属酸化 物ナノ粒子の 機序に基づく 遺伝毒性スク リーニング)	CuO (20-40 nm)、 ZnO (20-200nm)、 NiO (20-70nm)、 CeO ₂ (4-30nm)、 Fe ₃ O ₄ (20-40 nm)、 TiO ₂ (20-100nm)、 MWCNT (100-200 nm×3-7μm)、 クエン酸コート Ag (10、40 nm)、 ディーゼル粒子、 石英粒子、 可溶性の金属塩 (CuSO ₄ 、ZnSO ₄ 、 NiCl ₂) キャラクターゼー ション： 凝集状態；光子断面 相関スペクトロス コピー (PCCS) で計 測。 セル培養液中のイオ ン放出；ICP-OES で計測。	試験生物； ToxTracker mES 細胞； Bsc12-GFP,Srxn1-GFP,Btg 2-GFP mES reporter cell line 細胞内取り込み：TEM で観 察。 無細胞 ROS 生成： DCFH-DA 試験 GFP レポーターおよび細 胞毒性：フローサイトメト リー (ToxTracker mES レ ポーターセル試験) 8 種の金属酸化物ナノ粒子 を 0~100μg/mL の範囲で、 24 時間暴露。 DNA 損傷としての GFP レ ポーター誘導、酸化スト レス、細胞生存率を測定。 遺伝毒性： ・ コメットアセイ： 8 種の金属酸化物を 20μg/mL で 4 時間暴 露、 ・ γ-H2AX と RAD51 病巣 形成試験 CuO 20μg/mL、ZnO 30μg/mL、NiO 100μg/mL で 4 または 8 時間暴露	キャラクターゼーション： mES 細胞培養液中で凝集するが 100nm 以 下の粒子も存在した。溶解により溶液中の 粒子重量は 24 時間後には、ZnO-20%、 CuO-60%、Ag-80~90%、NiO-95%に減 少した。 細胞内取り込み：全ての粒子が細胞内に取 り込まれることを確認した。ZnO と CuO は溶解するためその数は少なかった。 無細胞 ROS：NiO とそれに続いて CuO が ROS 生成するが、他の粒子では ROS なし。 GFP レポーターおよび細胞毒性：CuO と NiO で酸化ストレスレポーター (Srxn1-GFP) の誘導が見られたが、CeO ₂ 、 Fe ₃ O ₄ 、TiO ₂ 、Ag ナノ粒子では認められな かった。 また、イオンの影響をみるため、CuSO ₄ 、 ZnSO ₄ 、NiCl ₂ を調べたところ、NiCl ₂ のみ ToxTracker の誘導が認められなかった。 発ガン性のクォーツでは GFP レポーター を誘導したが、MWCNT ではそうならな かった。 遺伝毒性試験： コメットアセイ；CuO、NiO、TiO ₂ で重大 な Tailing を示したが、他の粒子では認め られなかった。CuO では酸化ストレスを示 す FPG 反応サイトが 5 倍であった。 γ-H2AX と RAD51 病巣形成試験；CuO、 NiO、TiO ₂ に対し、γ-H2AX のレスポンス は有ったが、RAD51 病巣形成は認められ なかった。	ToxTracker mES レポーター セル試験はナノ 粒子の遺伝毒性 試験に適用でき る。 CuO と NiO は酸 化ストレスによ るレポーターセ ル反応を示した。 CuO では溶解金 属イオンによる のに対し NiO で は粒子そのもの による。

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
NPs 実験 方法	Cohen JM, Teegarden JG, Demokritou P Part Fibre Toxicol.2014 May1;11:20	An integrated approach for the in vitro dosimetry of engineered nanomaterials (工業ナノ材 料の in vitro 投 与到達量の統 合的アプロー チ)	Al ₂ O ₃ 、CeO ₂ 、(4 種)、CoO、Cr ₂ O ₃ 、 Fe ₂ O ₃ (2種)、Fe ₃ O ₄ 、 Gd ₂ O ₃ 、Mn ₂ O ₃ 、SiO ₂ (3種)、TiO ₂ 、ZrO ₂ 、 CB、CNT、Au、 以上、計 20 種のナ ノ粒子 ナノ粒子は、脱イオ ン水中で 3W の超音 波で懸濁化した。	In vitro での投与到達性 (Dosimetry) 予測モデル開発 ナノ粒子のキャラクタリゼーショ ン：流体力学径、ゼータ電位、比導 電度、凝集体の有効密度を計測。 投与到達度の計算： 細胞への到達粒子時間関数 $f_D(t) = 1 - e^{-at}$ t = 時間 (h) a = 粒子到達定数 in vitro 投与到達関数 (RID)： 質量：RID _M = f _D (t) × M 個数：RID _N = f _D (t) × N 表面積：RID _{SA} = f _D (t) × SA M：溶媒中の質量濃度 N：溶媒中の個数濃度 SA：溶媒中の表面積濃度 モデルの確証： 2 種の中性子同位体化のナノ粒子 (CeO ₂ 、SiO ₂ コーティング CeO ₂) を培養時間 2、4、24 時間後に細胞 上および細胞内の粒子個数を γ 線量 計で実測した。	<ul style="list-style-type: none"> 金属酸化物の凝集体有効密度は実密度より極めて小さく、ポーラスな凝集体である。 モデルの検証で、2 種のナノ粒子の in vitro 試験で、細胞への到達粒子量はモデルと実績が良い一致を示した。 20 種のナノ粒子の in vitro 試験での 90% の投与粒子の細胞到達時間を計算し、10 時間以下から 100 時間以上に亘る結果を得た。In vitro 試験で、粒子の細胞への到達は、粒子、媒体、ウェル特性に大きく依存する。 	本研究の In vitro 投与到達性予測モデルは、毒性学者に正確な RID _M 、RID _N 、RID _{SA} を計算するツールを提供する。このモデルは、安価で、正確で、再現性の良い in vitro スクリーニング試験開発の大きな助けとなる。

No	著者/ 書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料 調整法/試験用量	試験生物/投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
SiO ₂ , Coated Ag 実験 方法	Vecchio G, Fenech M, Pompa PP, Voelcker NH Small. 2014 Jul 9; 10(13): 2721-34	Lab-on-a-chip-based high-throughput screening of the genotoxicity of engineered nanomaterials (工業ナノ材料遺 伝毒性のラボオン チップベースのハ イスループットス クリーニング)	10nm および 70nm のクエン 酸または PVP で被覆さ れた銀粒子。 25nm のシリ カナノ粒子。	サイトカインブロック小核試験 (CBMN)、 ラボオンチップ細胞選別、自動画像処理を 組み合わせたハイスループットスクリー ニング (HTS) プラットフォームを開発した。 開発に当たり、2種のマイクロアレイスラ イドを作成した。 マイクロアレイ#1は、3種の抗体(抗 CD2、 抗 CD20、抗 CD45) を載せたアレイで、 細胞捕獲とリンパ球細胞株を用いた自動ス コアリング法開発に用いた。 自動スコアリングには蛍光顕微鏡画像を取 り込み、画像処理に Operetta High Content Imaging System を用いた。 マイクロアレイ#1で、初代ヒトリンパ球に 対する Ag ナノ粒子の影響を調べた。 試験濃度は (0、0.1、1、10、50µg/mL)、 培養時間は (24、48、72 時間)、方法は、 Ag ナノ粒子のみで PHA なし、PHA で培 養後 Ag ナノ粒子添加、PHA と Ag ナノ粒 子の同時添加の 3 法で行った。 マイクロアレイ#2は、5種の抗体(抗 CD2、 抗 CD4、抗 CD8、抗 CD20、抗 CD45) を 載せたアレイである。10 および 70nm のク エン酸または PVP で被覆された銀ナノ粒 子を添加 (0、0.1、1、10µg/mL) 初代ヒト リンパ球細胞の 48 時間培養後細胞生存率 の自動計測を行った。 さらに、他のナノ粒子に適用できることの 確認に、生体適合性がある 25nm シリカナ ノ粒子 (表面電荷の異なる 2 種、“+”と“-”) を 10、100µg/mL で試験を行った。	マイクロアレイ#1の結果 染色した HR1K 細胞株と Jukat 細胞株を用いて、マイク ロアレイ#1で細胞認識と選別 ができることを確認した。ま た、cyt-B で処理した細胞に H ₂ O ₂ またはナノ粒子を入れ 培養することにより、遺伝毒性 に関連する 2 核細胞の数が増 えることが計測できた。 マイクロアレイ#2の結果 銀ナノ粒子による細胞生存率 試験では、粒子径と表面コーテ ィングの影響が確認できた。 CD2+と CD20+の感度が良か った。 遺伝毒性評価では、CD2+と CD4+の感度が良かった。 シリカの試験では、負の電荷の 粒子は細胞生存率に影響しな いが、正電荷の粒子はドーズ依 存性がわずかに見られた。 10µg/mL のドーズ量で Ag ナ ノ粒子は遺伝毒性を示したが、 シリカナノ粒子は示さなかつ た。	ヒト初代リンパ 球サブタイプへ のナノ粒子の影 響を調べること ができる新しい ラボオンチップ を開発した。 これを用いて、ナ ノ粒子のサイズ、 表面処理、表面荷 電の細胞毒性お よび遺伝毒性へ の影響が分かっ た。 HTS-CBMN と 新しいラボオン チップの組み合 わせはナノ粒子 の他の組織への 影響を調査する のに適用できる。

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質試料調整法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間試験方法	試験結果	結論
NPs (16 OEC D refere nce NMs) 実験 方法	Sauer UG, Vogel S, Aumann A, Hess A, Kolle SN, Ma-Hock L, Wohlleben W, Dammann M, Strauss V, Treumann S, Gröters S, Wiench K, van Ravenzwaay B, Landsiedel R ToxicolAppl Pharmacol.2 014 Apr 1;276(1):1-2 0	Applicability of rat precision-cut lung slices in evaluating nanomateria l cytotoxicity, apoptosis, oxidative stress, and inflammatio n (ナノ材料 の細胞毒性、 アポトーシ ス、酸化スト レス、炎症評 価へのラッ トの肺の精 密カットス ライスの適 用性)	サイズ、表面コーティ ング有り、無しの 16 種のナノ粒子(OECD reference NMs) : 3 種のアナターズ TiO ₂ 、 2 種のルチル TiO ₂ 、 1 種のアナターズ-ル チル混合 TiO ₂ 、 2 種の ZnO、 2 種の SiO ₂ 、 2 種の CeO ₂ 、 1 種の Ag、 3 種の MWCNT 各粒子のストック液 に細胞培養液を加え、 10、50、100、500、 1000 µg/mL の試験溶 液とした。	精密カットスライス (PCLuS) の作成;妊娠していないメスの Wister Cr 1 : W1 ラットの肺か ら Krumidiek 組織スライサー により、経 8mm、厚さ 200 - 250nm のスライスを作成。 有効ドーズ量の計算: 試験物質 濃度 50%以下までを AUC 測 定で、それ以下を ISDD モデル で算出。 PCLuS 試験: PCLuS を各試料と 24 時間培 養後、下記を測定した。 ・ 細胞破壊; BCA 試験で PCLuS 中 総蛋白量を測定 ・ 細胞毒性; WST-1 試験でミトコン ドリア活性を測定 ・ カスパーゼ-3 と-7 活性化; PCLuS をカスパーゼ -3/-7 活性化試験実施、 ・ 酸化ストレス; GSH-Glo グルタチオン 試験で細胞内 GSH 量を 測定 ・ サイトカイン誘導; 上澄み液から、細胞内外 の 1L-1α、TNF-α、 CINC-1 (IL-8)、 MCP-1、M-CSF、OPN を測定	有効ドーズ量計算: 有効ドーズ量は、24 時間後で、AUC で は 100%近いもの (TiO ₂ の 1 種と ZnO) から 2% と非常に少ないもの (MWCNT) の範囲であった。ISDD モ デルでは ZnO の 80%から MWCNT の 17%の範囲であった。 PCLuS 試験: ・ 細胞破壊; ZnO、Ag の試験で、総 蛋白質測定により、細胞破壊が認め られた。 ・ 細胞毒性; ミトコンドリア活性試験 で TiO ₂ の 2 種、Ce ₂ O ₃ の 2 種、 MWCNT の 2 種で有意な細胞毒性 が確認された。 ・ カスパーゼ-3、-7 活性化: SiO ₂ と TiO ₂ でカスパーゼ-3、-7 の活性化が 認められた。SiO ₂ では相当する細胞 毒性はなかった。 ・ 酸化ストレス: GHS 試験で TiO ₂ と MWCNT の無細胞毒性濃度を求め た。GSH 濃度上昇は ROS に対する 細胞の防御反応を示す。 ・ サイトカイン誘導; 12 物質に対しサ イトカイン誘導試験を行った。 1L-1α、TNF-α、IL-8、MCP-1、 M-CSF、OPN の測定結果を表に示 した。	PCLuS はナノ材 料の様々な初期 影響を知ること ができる。しかし ながら、これらの 影響は in vivo 試 験で起こる複雑 な影響を予測す るには不十分で ある。また、ドー ズ量は短期吸入 試験の肺負荷量 より 3 桁多く、 PCLuS で見られ た影響が in vivo で現れるとは限 らない。今後の研 究が必要である。

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質試料調整法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
NPs 実験 方法	Wang XZ, Yang Y, Li R, McGuinnes C, Adamson J, Megson IL, Donaldson K Nanotoxicolog y. 2014 Aug; 8(5):465-76	Principal component and causal analysis of structural and acute in vitro toxicity data for nanoparticle s (ナノ材料 の in vitro 構 造的、急性毒 性の主要素 と原因分析)	カーボンブラック(Printex 90)、 ディーゼル排ガス粒子 (EPA)、 ナノチューブ(Vicki Stone)、 フラーレン(Sigma)、 ポリスチレンラテックス 3 種(Unmodified,Amine, Carboxylated)、 酸化アルミニウム 3 種 (7,50,300nm)、 酸化セリウム、 酸化ニッケル、 シリカ、 酸化亜鉛、 二酸化チタン (ルチル、ア ナターズ)、 銀 ()は、供給者。酸化アルミ ニウム以下は、 Nanostructure and amorphous Materials	In vitro 試験 (24h) : A549 上皮細胞で、 LDH リリース試験、 アポトーシス/ネクロ ーシス試験、細胞生存 試験、細胞形態試験、 MTT 試験を行い、ま たエライザ法 (ELISA) により炎症 誘発影響を調べた。 赤血球溶血試験およ び THP-1 細胞で DiOC6 試験を行った。 構造特性 : 粒子径、粒子径分布、 表面積、形状、金属含 有量、反応性、フリー ラジカル生成、ゼータ 電位を測定した。 主成分分析 (PCA) に より、構造特性と毒性 試験結果を整理した。	異なる急性毒性測定値を主成分分析 (PCA) で処理し、4つのナノ材料、酸 化亜鉛、ポリスチレンラテックス、ナノチ ューブ、酸化ニッケルの急性毒性プロフ ァイルを特定した。また、PCA と寄与プ ロット解析による感度分析でこれら 4 つ の材料の急性細胞毒性を決定する構造特 性の特定を行った。酸化亜鉛と酸化ニッ ケルでは金属含有量が支配的変数であり、 ナノチューブでは高アスペクト比が 最も影響する因子でありポリスチレンラ テックスアミンでは粒子電荷が決定因子 であった。	SAR 分析により、 急性毒性の構造因 子として以下の結 論となった。 ナノチューブでは 高アスペクト比が 最も影響する因子 である。 酸化亜鉛と酸化ニ ッケルでは金属含 有量が支配的変数 である。ポリスチ レンラテックスア ミンではゼータ電 位が決定因子であ る。

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質/試料調整法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間/試験方法	試験結果	結論
NPs 実験 方法	Sauer UG, Aumann A, Ma-Hock L, Landsiedel R, Wohlleben W Toxicol In Vitro. 2014 Oct 24; 29(1):182-186	Influence of dispersive agent on nanomateria l agglomerati on and implications for biological effects in vivo or in vitro (ナノマテ リアル凝 集性に及ぼ す分散剤の 影響とその in vivo in vitro の生物 的効果との 関わりあい)	TiO ₂ (アナターズ 3 種、 ルチル 2 種、混合 1 種)、 ZnO 2 種 (コーティング 有り無し)、 アモルファスシリカ 2 種、CeO ₂ 2 種、 Ag 1 種、 MWCNT 3 種、 計 16 種の OECD 試験 ナノマテリアル ナノマテリアル分散原 液: 3mg のナノマテ リアルを 1mL の 1%ペ ニシリン DMEM に添加。 NM - 300K (Ag)、NM - 103 (TiO ₂)、NM - 111 (ZnO)、NM - 102 (TiO ₂)の濃度はそれぞ れ、1、4、10、15mg/mL とした。溶液は 200W で 2 回超音波攪拌した。	Cursorf 社の豚肺表面活性剤と ウシリンパアルブミン (BSA) 溶液中でのナノマテリアルの 分散挙動を調べた。 BSA 分散液は 5%BSA 溶液: ナノマテリアル分散原液=1:9 で混合後 700rpm で 24 時間マ グネット攪拌した。 Cursorf 分散液は 1: 37Cursorf [®] 水溶液 2mL に 1mg のナノマテリアルを添加した。 分散ナノマテリアル粒子の分 離と沈降状況は超遠心分離分 析機 (AUC) と光学的検知器 または UV-Vis 検知器 (MWCNT) でリアルタイムに 観察した。 10 μ m 以下の粒子を分散粒子 と評価した。 12 時間と 24 時間後の in vitro 有効投与量を AUC 測定結果か ら計算し、さらに良好な分散液 (24 時間有効投与量 < 50%) について「In vitro Sedimentation, Diffusion and Dosimetry model」 (Hinderliter 2010)で有効ド ーズを計算した。	総じて、ナノマテリアルの分散性は BSA 方が Cursorf より良かった。 BSA+超音波攪拌は MWCNT の凝集 解除に有効で、他のほとんどの金属酸 化物に対しても凝集を低減した。 サンプル作成時に BSA または Cursorf [®] を添加すると、AUC 沈殿速 度から得られる in vitro 有効ド ーズに大きく影響する。また、サ ンプリング法やインキュベーション 時間も大きく影響する。 AUC 法と ISDD 法の差は有効ド ーズ量を決定するのに、沈降と拡 散の特性値を考慮する必要性を示 した。	サンプルプレパ レーションが in vitro 有効ド ーズに影響を 与え、また その与え方 は材料によ って異なる。 In vitro 試験 の設計に当 たっては、 できるだけ 分散させる のか、より 生体組織へ の吸収と分 散のシミュ レーション に近づける のかによ って、手法 を適正化す る必要があ る。 有効ド ーズ量の 計算は in vitro 試験 結果を解釈 するために 不可欠であ る。

No	著者/書誌事項	論文題目 (和訳)	試験物質試料調整法 /試験用量	試験生物投与方法・ 期間試験方法	試験結果	結論
NPs 実験 方法	Kermanizadeh A, Løhr M, Roursgaard M, Messner S, Gunness P, Kelm JM, Møller P, Stone V, Loft S Part Fibre Toxicol. 2014 Oct 20;11(1):56	Hepatic toxicology following single and multiple exposure of engineered nanomateria ls utilising a novel primary human 3D liver microtissue model (新規のヒ ト肝臓ミク ロ組織の一 次 3D モデル を用いた単 回、複数回の 工業ナノ材 料暴露後の 肝臓毒性)	ZnO(NM 110 (BASF, Z-Cote; ZnO, uncoated, 100 nm)、 Ag(NM 300 (RAS GmbH;Ag capped with polyoxylaurat Tween 20 - <20nm)、 MWCNT(NM400 (Nanocyl; entangled MWCNT, diameter 30 nm))、 TiO2(NRCWE 002 NM was produced from the NRCWE 001 (TiO2 rutile 10 nm) as previously described [Kermanizadeh 2013]) ナノマテリアルは 2% FCS の細胞培養グレ ード水分散させ。16 分 超音波攪拌を行う。分 散液を希釈して試験に 用いた。 試験濃度： TiO2 と MWCNT； 16,31.25,62.5.125.25/ µg/ml ZnO と Ag；0.5、1、2、 4、8µg/ml	ヒトの肝細胞と肝臓由来 の非実質細胞を用いた in vitro 3D モデルで試験 を行った。 投与方法 単回投与 投与後、24、72、168、 216、264、336、360 時 間で培地交換 反復投与 初回投与後、24、96、168、 240、312、360 時間で培 地交換、 72、144、216、288 時間 で再投与 処理後、 アデニル酸キナーゼ試 験、細胞生死染色、サイ トカイン分泌、脂質過酸 化、DNA 損傷、アルブミ ン生成、CYP3A4 レベル 計測を行った。	アデニル酸キナーゼ試験：濃度依存性の細 胞膜健全性低下が見られ、反復投与でより 顕著であったが、統計的には ZnO と Ag が 有意であった。 生死染色：反復投与で細胞死の増加が認め られた。 サイトカイン分泌：単回投与では、各材料 とも濃度依存性で IL8 と IL10 の増加が見 られ、360 時間後には定常レベルになった。 反復投与では、時間が経過しても IL8 と IL10 の増加が見られたが、そのレベルは最 高点の 24 時間に及ばなかった。後半部分で Ag と ZnO が統計的有意に増加していた。 脂質過酸化：単回投与で TBARS の増加は 無かったが、反復投与の ZnO と Ag でのみ 統計的有意に増加した。 DNA 損傷：全ての NM の高濃度で DNA 鎖切断が認めら、特に Ag と ZnO で顕著で あった。また、反復投与のほうが顕著であ った。 アルブミン生成：単回投与では、濃度。時 間依存の変化はなかった。反復投与の ZnO で後半でアルブミン生成の低下が見られ た。 CYP3A4 計測：全ての処理で代謝酵素の低 下は見られなかった。	ナノマテリアル の肝臓毒性研究 に 3D ヒト肝臓 ミクロ組織法は 非常に有効な試 験法である。

