

ナノマテリアル安全対策調査事業
報告書

平成 30 年 3 月

JFE テクノリサーチ株式会社

目次

概要.....	i
1. 消費者製品等に含まれるナノマテリアル等の情報の収集.....	1
1.1. 調査方法.....	1
(1) 調査対象物質.....	1
(2) 調査方法.....	1
1.2. 調査結果概要.....	1
(1) 調査対象物質の使用状況のまとめ.....	1
(2) 調査対象物質ごとの調査結果.....	3
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.....	41
2.1. 検索方法.....	41
(1) データベースの選定.....	41
(2) 検索キーワード.....	41
(3) 検索の頻度・期間.....	41
2.2. 論文選択手順・方法.....	41
2.3. 文献分類表.....	41
2.4. サマリーを作成した文献のまとめ.....	42
2.5. 文献サマリー.....	44
(1) SWCNT.....	44
(2) MWCNT.....	49
(3) グラフェン.....	61
(4) TiO ₂	66
(5) SiO ₂	88
(6) ZnO.....	105
(7) Ag.....	119
(8) Au.....	129
(9) Fe ₂ O ₃	131
(10) Ni.....	134
(11) ナノクレイ.....	136
(12) ナノセルロース.....	139
(13) 量子ドット.....	140
3. ナノマテリアル等の安全対策に係る国際動向調査.....	142
3.1. ナノマテリアル等利用製品の国際規制動向.....	142
(1) 概要.....	142
(2) 規制のためのナノマテリアルの定義.....	143
(3) 各国等における規制動向.....	155

3.2. 主要学会等におけるナノマテリアル等の安全性、ばく露、試験法等に関する動向	193
(1) 第44回日本毒性学会学術年会	193
(2) Inhaled Particles XII	203
(3) Nanosafety2017	233
4. 海外行政機関等の報告書の分析と主要なものの翻訳	250
4.1. 翻訳対象報告書の選定	250
4.2. 翻訳対照報告書の要約	251
(1) いくつかのナノマテリアルと繊維	251

< 附属書 (分冊) >

海外主要報告書の全訳

概要

本報告書は、平成29年度厚生労働省「ナノマテリアル安全対策調査事業」の結果をまとめたものである。

本調査事業では、ナノマテリアルの基礎的な情報収集の一環として、その製造、消費レベルでの使用状況、あるいは学術論文等で報告される安全性情報や各国の規制動向の調査を継続的に行ってきた。今回の調査では、以下に述べるいくつかの観点から情報を収集し、まとめた。

第一にナノマテリアルの国内での製造及び使用状況を調査した。個別には以下のナノマテリアルを取り上げ、調査を行い、結果をまとめた。ただし、今回の調査には食料品とその容器、及び医薬品に関わるものは含まれていない。今回は、個別の調査として単層カーボンナノチューブ、多層カーボンナノチューブ、グラフェン、酸化チタン、銀、ニッケル、ナノセルロース、量子ドット、 dendrimer、カーボンブラック、酸化アルミニウムを取り上げた。

次にそれぞれのナノマテリアルについて、最近1年間に新たに報告された安全性に関する文献情報を収集した。さらに、本調査では海外各国におけるナノマテリアルの規制情報を収集した。調査の対象はEU 及び欧州各国、米国、カナダ、オーストラリア、韓国であるがその他の国際機関についても経緯を含め、最近の状況を詳細にまとめた。

- ・ 各国におけるナノマテリアルの定義
- ・ 上市規制、ラベル規制等の規制の見直し
- ・ ナノマテリアルの規制に関する各国の動向
- ・ ナノマテリアルの安全性に関する主要な学会情報
- ・ 海外行政機関の報告書等の翻訳

なお、学会の報告としては①第 44 回日本毒性学会学術年会、②Inhaled Particles XII、③Nanosafety 2017、の概要についてまとめた。

Summary

This report is the results of “An Investigative Research on Consumer’s Safety in Utilizing Nanomaterials (2017)” administrated by The Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan.

The continuous surveys have been conducted as a part of basic information gathering of the nanomaterials in terms of manufactured nanomaterials, their consumption, the safety information reports, and the regulation trend in each country. This document summarizes the current information on the production and the use of nanomaterials, and the recent progress of R&D on nanomaterials. In particular, single-walled carbon nanotubes, multi-walled carbon nanotubes, nano graphen, nano silver, nano nickel, nano-cellulose, quantum dot, dendrimar, carbon black, and nano aluminum oxide are selected as a research individual. Foods and their containers, and medicines are excluded in this investigation. Then as to each of the nanomaterials, newly reported literature on safety information during the past year was collected and summarized. In particular, reports on the safety of a work area and the environment are of special interest and many reports on ecotoxicity and toxicity in aspiration or inhalation were selected.

In addition, we have gathered information about the regulation of nanomaterials including their history in overseas countries and organizations; EU and European countries, the United States, Canada, Australia, China, and Korea.

-Definition of nanomaterials in each country.

-Review on the market and labelling regulations of nanomaterials and the related products.

-Information on the safety and the regulation of nanomaterials.

-Provisional translation of reports by foreign agencies

As a part of the survey, the reports on the following conferences are also summarized: 1) The 44th Annual Meeting of the Japanease Society of Toxicology. 2) Inhaled Particles XII. 3) Nanosafety 2017.

1. 消費者製品等に含まれるナノマテリアル等の情報の収集

日本国内におけるナノマテリアル等利用製品(食品及び食品容器を除く、以下同じ)に関する情報を収集した。

調査対象物質は、ナノマテリアル等製造・輸入業者より直接情報を収集し、川中・川下ユーザーを追跡することにより、ナノマテリアル等が含有される最終製品を特定し、その含有形態、濃度(使用量)等を調査した。また、それらの開発状況についても調査した。

1.1. 調査方法

(1) 調査対象物質

本調査では、以下の 18 物質等を調査対象とした。

- フラーレン(水酸化フルーレンや誘導体を含む)
- 単層カーボンナノチューブ
- 多層カーボンナノチューブ
- グラフェン
- 酸化チタン(ルチル型、アナターズ型、の両方を対象とする)
- ナノシリカ
- プラチナ
- 金
- 銀
- 鉄
- 亜鉛(主に酸化亜鉛)
- ニッケル
- ナノクレイ
- ナノセルロース
- 量子ドット
- デンドリマー
- カーボンブラック
- 酸化アルミニウム
- 上記のサブナノマテリアルを含む

(2) 調査方法

調査対象物質のうち、既に製品化されている物質について、主要なナノマテリアル等原料製造業者をそれぞれ 2~3 社選定し、ナノマテリアル等が含有される最終製品に関する情報について調査を行い、最終製品の特定を行った。なお、必要に応じて、川中・川下ユーザーについても調査対象とした。また、最終製品における各対象物質の含有形態、濃度(使用量)等については、開発段階のものが中心で、新規に開発された商品がほとんど確認できなかったことから、平成 28 年度までの調査結果を基にした。さらに、各最終製品のリスク評価に関する考え方についても、可能な限り製造業者の情報を得るようにした。なお、平成 27 年度及び 28 年度本事業の調査対象物質については、その調査結果も参考とした。

1.2. 調査結果概要

(1) 調査対象物質の使用状況のまとめ

調査結果のまとめを表 1.2-1 に示した。

フルーレン、酸化チタン、ナノシリカ、銀、ナノクレイ、ナノセルロース、量子ドット、デンドリマーについては、市場は横ばい傾向もしくは研究開発中であり、フルーレン、ナノシリカ及びナノクレイ以外の物質については、現在も、研究開発や用途開発が盛んに行われていた。なお、ナノシリカ、プラチナ、酸化亜鉛については、市場規模はわずかながら年々拡大しているものの、平成 29 年度調査から新たな研究開発事例や用途開発事例を確認することはできなかった。また、金・鉄について

は開発中ではあるものの、平成 29 年度調査から新たな研究開発事例や用途開発事例を確認することはできなかった。こうした国内の市場動向を整理すると、今年度も継続して研究開発や用途開発が盛んに行われている物質、あるいは今年度製品化された事例がある物質、市場規模が大きく変化した物質は以下の 11 物質であった。

- 単層カーボンナノチューブ
- 多層カーボンナノチューブ
- グラフェン
- 酸化チタン(ルチル型、アナターズ型、の両方を対象とする)
- 銀
- ニッケル
- ナノセルロース
- 量子ドット
- デンドリマー
- カーボンブラック
- 酸化アルミニウム

そこで、上記 11 物質を平成 29 年度調査対象物質として選定した。

多層カーボンナノチューブについては、2014 年度以降、生産量が増加傾向にあり、2020 年には 2014 年比 3 倍の増加が予想されている。これに対して、単層カーボンナノチューブの用途開発は、依然として盛んである。他方、グラフェンについては、日本での用途開発は世界に比べると遅れているのが現状ではあるが、2015 年度の用途開発は目覚ましく、大量生産技術に関する特許も取得したことから、今後、国内での市場が拡大することが期待される。

表 1.2-1 調査対象候補物質の使用実態

物質名	市場動向	研究開発・用途開発・製品化等の状況	平成 29 年度本事業の調査結果の記載
フラーレン	横ばい	新たな研究開発は行われていない	-
単層カーボンナノチューブ	開発中	研究開発が盛んである	○
多層カーボンナノチューブ	回復	用途開発が盛んである	○
グラフェン	開発中	用途開発が盛んである	○
酸化チタン	拡大基調	研究開発・用途開発ともに盛んである	○
ナノシリカ	横ばい	新たな研究開発はほとんど行われていない 新たな用途開発も確認できない	-
プラチナ	微増	新たな研究開発は行われていない	-
金	開発中	新たな研究開発はほとんど行われていない	-
銀	横ばい	研究開発、製品化ともに盛んである	○
鉄	開発中	新たな研究開発はほとんど行われていない	-
亜鉛			
酸化亜鉛	微増	新たな研究開発は行われていない	-
ニッケル	増加傾向	新たな研究開発はほとんど行われていない	○
ナノクレイ	横ばい	新たな研究開発はほとんど行われていない	○
ナノセルロース	開発中	研究開発・用途開発ともに盛んである	○
量子ドット	開発中	研究開発・用途開発ともに盛んである	○
デンドリマー	開発中	研究開発・用途開発ともに盛んである	○
カーボンブラック	微増	用途開発は盛んである	○

物質名	市場動向	研究開発・用途開発・製品化等の状況	平成 29 年度 本事業の調査 結果の記載
酸化アルミニウム	開発中	研究開発・用途開発ともに盛んである	○

(2) 調査対象物質ごとの調査結果

(ア) 単層カーボンナノチューブ (SWCNT)

(i) 製品概要

サイズ	直径：0.5nm～3 nm 長さ：～10 μm																																												
形状	アスペクト比の大きな凝集体（バンドル構造）																																												
計測技術	SEM、TEM																																												
物性	<p>・ SWCNT は一般にナノマテリアルの中でも非常に直径が小さくサブナノメートルのものもある。またアスペクト比が大きい。目的により、特性と純度の要求が大きく変わり、研究用に多様な種類が販売されている。以下に例を示す。</p> <table border="1" data-bbox="496 835 1289 1137"> <tbody> <tr> <td>製品</td> <td>ZEONANO SG101</td> </tr> <tr> <td>外観</td> <td>黒色粉体</td> </tr> <tr> <td>比表面積</td> <td>800m²/g 以上</td> </tr> <tr> <td>CNT 配向集合体の長さ</td> <td>100～600μm</td> </tr> <tr> <td>平均直径</td> <td>3～5nm</td> </tr> <tr> <td>Fe 不純物量</td> <td>1%未満</td> </tr> <tr> <td>炭素純度</td> <td>99%以上</td> </tr> </tbody> </table> <p>出典：ゼオンナノテクノロジー株式会社 ホームページ http://www.zeonnanotech.jp/products.html</p> <table border="1" data-bbox="406 1232 1378 1532"> <thead> <tr> <th>製品</th> <th>SWeNT® SG-76</th> <th>SWeNT® SG-65</th> <th>SWeNT® CG-100</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>炭素含量</td> <td>>90%</td> <td>>90%</td> <td>>90%</td> </tr> <tr> <td>SWNT 炭素含量</td> <td>≥77% (carbon as SWNT)</td> <td>≥77% (carbon as SWNT)</td> <td>≥70% (carbon as SWNT)</td> </tr> <tr> <td>直径</td> <td>0.7～1.13 nm</td> <td>0.7～0.93 nm</td> <td>0.7～1.0 nm</td> </tr> <tr> <td>長さ</td> <td>300～2,300 nm</td> <td>≥700 nm</td> <td>450～2,300 nm</td> </tr> <tr> <td>融点</td> <td colspan="3">3,652～3,697 °C (文献値)</td> </tr> <tr> <td>密度</td> <td colspan="3">1.7～1.9 g/cm³ at 25 °C (文献値)</td> </tr> </tbody> </table> <p>出典：シグマアルドリッチ ジャパン (同) ホームページ https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/SAJ/Brochure/1/j_aldrich_cnt_list.pdf</p>			製品	ZEONANO SG101	外観	黒色粉体	比表面積	800m ² /g 以上	CNT 配向集合体の長さ	100～600μm	平均直径	3～5nm	Fe 不純物量	1%未満	炭素純度	99%以上	製品	SWeNT® SG-76	SWeNT® SG-65	SWeNT® CG-100	炭素含量	>90%	>90%	>90%	SWNT 炭素含量	≥77% (carbon as SWNT)	≥77% (carbon as SWNT)	≥70% (carbon as SWNT)	直径	0.7～1.13 nm	0.7～0.93 nm	0.7～1.0 nm	長さ	300～2,300 nm	≥700 nm	450～2,300 nm	融点	3,652～3,697 °C (文献値)			密度	1.7～1.9 g/cm ³ at 25 °C (文献値)		
製品	ZEONANO SG101																																												
外観	黒色粉体																																												
比表面積	800m ² /g 以上																																												
CNT 配向集合体の長さ	100～600μm																																												
平均直径	3～5nm																																												
Fe 不純物量	1%未満																																												
炭素純度	99%以上																																												
製品	SWeNT® SG-76	SWeNT® SG-65	SWeNT® CG-100																																										
炭素含量	>90%	>90%	>90%																																										
SWNT 炭素含量	≥77% (carbon as SWNT)	≥77% (carbon as SWNT)	≥70% (carbon as SWNT)																																										
直径	0.7～1.13 nm	0.7～0.93 nm	0.7～1.0 nm																																										
長さ	300～2,300 nm	≥700 nm	450～2,300 nm																																										
融点	3,652～3,697 °C (文献値)																																												
密度	1.7～1.9 g/cm ³ at 25 °C (文献値)																																												
性能／特性	<ul style="list-style-type: none"> ・ Sp² 炭素構造に基づく高強度（鋼鉄の約 100 倍） ・ CNT 構造に基づく高い柔軟性 ・ 軽量である（アルミの半分程度） ・ 均一性が高く分散性にも優れている ・ 結晶性が高くアスペクト比が大きい ・ 熱伝導性がよい（銅の約 10 倍、ダイヤモンドより高い） ・ 耐食性、摺動性が高い ・ 比表面積が大きい ・ 導電性が高い（銅の約 1,000 倍、銀よりも高い） ・ SWCNT の直径とねじれの度合いによって、電子的特性が大きく変わり金 																																												

	属様の伝導体として挙動するものやバンドキャップ半導体としての挙動を示す。
製造会社	<p>【国内】</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 日本ゼオン（株） ・ （株）名城ナノカーボン ・ （株）マイクロフェーズ ・ 本荘ケミカル（株） <p>【海外】</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ NanoIntegriss（販売：（株）オプトサイエンス、シグマアルドリッチ ジャパン（同）） ・ KH Chemicals（販売：（株）巴工業） ・ CNano Technology（販売：丸紅情報システムズ（株）） ・ South West Nano Technologies（販売：シグマアルドリッチ ジャパン（同）） ・ OCSiAl（販売：楠本化成）

(ii) 市場規模

SWCNT は、開発段階であり、市場規模は小さく、2014 年の世界市場規模はメーカーの出荷量ベースで 0.8 トンと報告されている(矢野経済研究所 ニュースリリース)。SWCNT は非常に高価であるため、量産化のための技術開発が進められてきたが、2015 年 11 月には、日本ゼオンが産業技術総合研究所(以下、「産総研」とする)で開発した「スーパーグロース法」を利用した量産工場が稼働した。また、OCSiAl 社は、生産能力 50t/年の新工場建設を発表した。2017 年稼働予定であり、現状の能力 10t/年と合わせて 60t/年の生産能力となる。日本ゼオンの量産化や OCSiAl の生産能力増強など供給体制は整いつつあり、富士キメラ総研の推定による 2016 年の SWCNT の販売量は 10 トンと大幅に増加している。

SWCNT の量産技術も確立しつつあり、今後は二次電池用途に加え、キャパシタなどのさらに高付加価値の市場をターゲットとしており、新規用途への展開も期待されている。

(iii) 主な用途

SWCNT はその非常に特徴的な性質により多くの用途が期待される。代表的なものを以下に示す。

- ・ エレクトロニクス分野: 透明導電膜、トランジスタ、LSI 配線、薄膜半導体
- ・ エネルギー分野: リチウムイオン電池、キャパシタ、燃料電池
- ・ マテリアル: 導電性塗料/樹脂、導電性ペーパー/繊維、強化樹脂/強化金属、放熱部材
- ・ バイオ: 細胞培養、バイオセンサー、ドラッグデリバリー
- ・ 構造材料: 軽量部材
- ・ 医療分野: 再生医療

SWCNT は多層カーボンナノチューブ(MWCNT)に比べ、非常に均一性が高く、また構造により電氣的性質が大きく変わるため、エレクトロニクス分野での利用の期待が高い。半導体性 SWCNT は薄膜トランジスタの活性層への利用が期待されている。また、半強度と柔軟性という機械的特性と電子的特性との組み合わせによって、プリンタブル及びフレキシブルエレクトロニクス用の材料として有望である。

(iv) 研究開発事例

①カーボンナノチューブを用いた塗料で電磁波遮蔽

開発者: 国立研究開発法人産業技術総合研究所 ナノチューブ実用化研究センターCNT 用途チーム研究員 阿多 誠介、特定集中研究専門員 堅田 有信、物理計測標準研究部門電磁気計測研究グループ研究員 加藤 悠人
開発機構: 国立研究開発法人 産業技術総合研究所

概要:国立研究開発法人 産業技術総合研究所 ナノチューブ実用化研究センターCNT 用途チーム 阿多 誠介 研究員、堅田 有信 特定集中研究専門員、物理計測標準研究部門電磁気計測研究グループ 加藤 悠人研究員らは、スーパーグロース法で作製した単層カーボンナノチューブ (SGCNT)を用いて、高い電磁波遮蔽能を持つ膜を形成する塗料を開発した。さまざまな電子機器の電磁波を遮蔽する方法として、電子機器やそれに接続する部品を金属の筐体に収納する方法が従来用いられている。最近では、電子機器の多様化や小型軽量化に伴い、樹脂やゴムの複雑な形状の筐体やそれらの材料で覆われた部品が用いられることも多くなっており、複雑な形状の筐体や部品を基材として電磁波遮蔽塗料を塗布し、電磁波遮蔽能を付与する方法が注目されている。しかし、既存の電磁波遮蔽塗料は、基材の選択性に制限があったり、付与できる電磁波遮蔽能が低いなどの課題があった。今回、電磁波遮蔽能を持つ塗布膜を形成できる、SGCNTを用いた水性塗料(SGCNT系水性塗料)を開発した。この塗料は、基材の選択性が高く、バーコート法、スプレー法、ディップ法などのさまざまな塗布方法が利用できる。そのため平面ばかりではなく複雑な形状の基材にも塗布膜を形成することができる。さらに形成した塗布膜は高い電磁波遮蔽能と高温での耐久性を持ち、柔軟性があり、基材の変形にも追従できる。今後、高温環境で使用される自動車用ワイヤーハーネスや、可動部や複雑形状を持つ産業用ロボットなど、さまざまな分野での電磁波遮蔽対策への活用が期待される。

出典:産総研ホームページ(2017/06/12 掲載)

http://www.aist.go.jp/aist_j/press_release/pr2017/pr20170612/pr20170612.html

②スーパーグロース単層カーボンナノチューブの生分解性を確認

開発者:国立研究開発法人 産業技術総合研究所ナノチューブ実用化研究センターCNT 評価チーム主任研究員 張 民芳、研究チーム長(兼)同研究センター 副研究センター長 岡崎 俊也

開発機構:国立研究開発法人 産業技術総合研究所、日本ゼオン株式会社

概要:国立研究開発法人 産業技術総合研究所ナノチューブ実用化研究センターCNT 評価チーム 張 民芳 主任研究員、岡崎 俊也 研究チーム長(兼)同研究センター 副研究センター長らは、日本ゼオン株式会社(以下「日本ゼオン」という)と共同で、近赤外光吸収測定法を用いてカーボンナノチューブ(CNT)の細胞への取り込み量を定量化する産総研独自の技術により、スーパーグロース法で作成した単層CNT(SGCNT)量の免疫細胞内での経時変化を測定し、SGCNTが生分解されることを明らかにした。さらに、発生する活性酸素の経時変化を測定した結果、SGCNTが生分解されると活性酸素の発生量は減少し、細胞への毒性が低下することが示唆された。この測定技術は、CNTの安全管理に重要な新しい定量測定法を提供するのみならず、現在産業化が進んでいる単層CNTの安全性に関わる重要な知見をもたらし、CNT産業の発展に貢献することが期待される。

出典:産総研ホームページ(2017/09/12 掲載)

http://www.aist.go.jp/aist_j/press_release/pr2017/pr20170912/pr20170912.html

③耐久性、経済性に優れた実用的な耐熱Oリングを開発

開発者:国立研究開発法人 産業技術総合研究所ナノチューブ実用化研究センターCNT 用途チーム特定集中研究専門員 小松 正明、小坂井 暁史、主任研究員 阿多 誠介

開発機構:国立研究開発法人 産業技術総合研究所

概要:国立研究開発法人 産業技術総合研究所ナノチューブ実用化研究センターCNT 用途チーム 小松 正明 特定集中研究専門員、小坂井 暁史 特定集中研究専門員、阿多 誠介 主任研究員らは、フッ素ゴム(FKM)とスーパーグロース法で作製した単層カーボンナノチューブ(SGCNT)を複合化して、耐久性と経済性を満たした耐熱Oリングを開発した。技術移管先企業からの2018年度中の上市を目指し、CNT複合材料研究拠点からサンプル提供を開始する。今回開発した耐熱Oリングは230℃程度までの高温域での使用を想定している。こ

れを実現するために、初期の強度だけでなく、長時間高温にばく露した後での 230 °Cでの強度を保持できること、長時間シール性を保持する圧縮永久ひずみを有すること、および、耐薬品性を備えることなどの耐久性を満たすための材料設計を CNT 複合材料研究拠点で行った。さらに、経済性を満たすために、同拠点にて低コスト量産プロセスを開発した。

出典：産総研ホームページ(2018/02/08 掲載)

http://www.aist.go.jp/aist_j/press_release/pr2018/pr20180208/pr20180208.html

(v) 利用事例

日本ゼオンでは、スーパーグロース法による SWCNT「ZEONANO™MSG101」を製造・販売している。同製品の代表性状は製品概要に示した。同社は、同製品の個々の特性に応じた用途例を提案している(表 1.2-2)。

表 1.2-2 ZEONANO™MSG101 の特徴と用途例

特徴	利点	用途例
単層	単位重量当たりの強度:大	高強度ポリマー
比表面積大	電荷を多く蓄えることが可能	蓄電デバイス電極
長尺(数 100µm)・ 高アスペクト比	バインダーフリーで自立膜形成	蓄電デバイス電極
	パーコレーション閾値:低	導電性ポリマー、帯電防止ポリマー、導電性塗料
高純度	電解液などと反応しにくい	蓄電デバイス電極

(※ゼオンテクノロジーウェブサイトより)

日本ゼオンでは上記 SWCNT の量産工場を 2015 年より稼働しており、工場の生産能力は、SGCNT の長さや基板上の密度によって変わるが、数トン/年程度である。現在は、まだサンプル出荷がほとんどであり、商品化に至ったものはまだない。

また、日本ゼオンでは従来よりゴム製品の開発・販売を行っており、自社では、既成事業とコラボして、ゴムに SWCNT を練りこむことで、高温でも耐久性が向上し、疲労に強い用途を開発中である。実際の用途としては、高温・高圧装置のリース剤や石油掘削のシール材等をサンプル出荷している。この用途ではシール材交換によるプラント停止が減り稼働率が上がるため、高価なシール材でも適用可能としている。

(vi) ナノリスク評価

単層カーボンナノチューブを製造している事業者は、ばく露等の対策として、CNT を取扱う際には、クリーンルーム内で作業を行い、排気は HEPA フィルター、スクラバー経由で大気に排出している。また、CNT 製造装置は、クリーンルーム内に設置されており、作業とは隔離されている。保管は、密閉性の高い容器での保管を行い、作業記録を徹底している。他の事業者においても、製造設備は完全密閉であり、後工程の製品の取り出し、梱包時には、可能な限り粉じんを除去するように、局所排気設備等を使用している。また、作業者の装備についてもエアラインマスク等を装着する等して、可能な限りの防塵強化を行っている。出入口にはエアシャワー室を設置しているほか、集塵にはバグフィルター、HEPA フィルターを設置している。

労働者に対しては、作業従事者にばく露対策を説明するほか、作業時には、ウェア、手袋、マスク、ゴーグルの保護具の着用を徹底して実施している。また、労働者教育として、関係官庁の動向を説明している。別の事業者では、既に発せられている通知、ガイドラインについては、労働者に教育しているほか、労働安全衛生法上の各種教育、ISO9001、ISO14001 に基づく力量教育等により、資格取得に努め、理解度の向上を進めている。

(経済産業省 ナノマテリアル情報提供シート

http://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/other/nano_program.html)

また、日本ゼオンでは、TASC(技術研究組合単層 CNT 融合新材料研究開発機構)とともに、自主安全管理支援のために排出・ばく露評価技術の開発、自主安全管理支援のための簡易で迅速な有害性評価手法の開発、自主安全管理支援のための安全性情報の提供と技術普及活動、を行っている。その成果として、TASC と AIST(独立行政法人 産業技術総合研究所)の安全科学研究部門(RISS)とともに、「CNT の安全性試験のための試料調整と計測、および細胞を用いたインビトロ試験の手順」、「CNT の作業環境計測の手引き」、「ケーススタディ報告書(安全性データおよび TASC 自主安全管理の紹介)」、「SG-単層 CNT データ&自主安全管理」を作成し、AIST-RISSあるいはゼオンナノテクノロジーのウェブサイトに公開している。また、NEDO 研究プロジェクト「ナノ粒子特性評価手法の研究開発」(2006-2011 年)の結果として策定したリスク評価書、その考え方の概略、有害性試験のための試料調整と計測のための手順書、排出・ばく露評価書、有害性評価のための手順書、気中粒子の校正に関する手順書、フィルタに関する手順書、社会受容のためのビジョンを、ゼオンナノテクノロジーのほか、NEDO、AIST 等のウェブサイトに公開している。(ゼオンテクノロジー ウェブサイト <http://www.zeonnanotech.jp/>)

(イ) 多層カーボンナノチューブ (MWCNT)

(i) 製品概要

サイズ	直径：30 ～100 nm 長さ：～数 10 μm																																																																		
形状	アスペクト比の大きな凝集体 (バンドル構造)																																																																		
計測技術	SEM、TES																																																																		
物性	<ul style="list-style-type: none"> 一般的な MWCNT は SWCNT が数層重なった形状を持つ。目的により、特性と純度の要求が大きく変わり、研究用に多様な種類が販売されている。一方、GSI クレオス (株) の製品はカップ型が重なった形を持ち、全体としては長い繊維状の形状であるが、その性質はかなり違っている。また、最近、東レ (株) では 2 層のカーボンナノチューブを開発している。 <p>1) 一般的な多層カーボンナノチューブ</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">項目</th> <th rowspan="2">単位</th> <th colspan="3">代表値</th> <th rowspan="2">測定法</th> </tr> <tr> <th>NT-7</th> <th>CT-12</th> <th>CT-15</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>繊維径</td> <td>nm</td> <td>65</td> <td>110</td> <td>150</td> <td rowspan="2">FE-SEM</td> </tr> <tr> <td>アスペクト比</td> <td>—</td> <td>>100</td> <td>>100</td> <td>>1</td> </tr> <tr> <td>かさ密度</td> <td>g/cm³</td> <td>0.007</td> <td>0.012</td> <td>0.014</td> <td>沈降嵩密度法 (HCC 法)</td> </tr> <tr> <td>真密度</td> <td>g/cm³</td> <td>2.1</td> <td>2.1</td> <td>2.1</td> <td>ピクノメーター</td> </tr> <tr> <td>比表面積</td> <td>m²/g</td> <td>28</td> <td>17</td> <td>1</td> <td>Ni 吸着法</td> </tr> <tr> <td>D/G 比</td> <td>—</td> <td>0.1</td> <td>0.1</td> <td>0.1</td> <td>ラマン分光光度法</td> </tr> <tr> <td>酸化温度</td> <td>°C</td> <td>600</td> <td>600</td> <td>600</td> <td>TG-DTA</td> </tr> <tr> <td>純度 (炭素純度 ≡ CNT 純度)</td> <td>%</td> <td>>99.5</td> <td>>99.9</td> <td>>99.9</td> <td>蛍光 X 線</td> </tr> </tbody> </table> <p>出典：保土ヶ谷化学工業 (株) カタログデータ</p> <p>2) カップ積層型カーボンナノチューブ 構造はカップ形状で積層し、中空構造である。分散性の良さと線長調整と表面処理を行いやすい点の特徴である。</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>項目</th> <th>24PS</th> <th>AR10</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>外径 (nm)</td> <td>70～80</td> <td>70～80</td> </tr> </tbody> </table>					項目	単位	代表値			測定法	NT-7	CT-12	CT-15	繊維径	nm	65	110	150	FE-SEM	アスペクト比	—	>100	>100	>1	かさ密度	g/cm ³	0.007	0.012	0.014	沈降嵩密度法 (HCC 法)	真密度	g/cm ³	2.1	2.1	2.1	ピクノメーター	比表面積	m ² /g	28	17	1	Ni 吸着法	D/G 比	—	0.1	0.1	0.1	ラマン分光光度法	酸化温度	°C	600	600	600	TG-DTA	純度 (炭素純度 ≡ CNT 純度)	%	>99.5	>99.9	>99.9	蛍光 X 線	項目	24PS	AR10	外径 (nm)	70～80	70～80
項目	単位	代表値			測定法																																																														
		NT-7	CT-12	CT-15																																																															
繊維径	nm	65	110	150	FE-SEM																																																														
アスペクト比	—	>100	>100	>1																																																															
かさ密度	g/cm ³	0.007	0.012	0.014	沈降嵩密度法 (HCC 法)																																																														
真密度	g/cm ³	2.1	2.1	2.1	ピクノメーター																																																														
比表面積	m ² /g	28	17	1	Ni 吸着法																																																														
D/G 比	—	0.1	0.1	0.1	ラマン分光光度法																																																														
酸化温度	°C	600	600	600	TG-DTA																																																														
純度 (炭素純度 ≡ CNT 純度)	%	>99.5	>99.9	>99.9	蛍光 X 線																																																														
項目	24PS	AR10																																																																	
外径 (nm)	70～80	70～80																																																																	

		長さ (μm)	5	1
		比表面積 (m ² /g)	50	70
		かさ密度 (m ² /g)	0.05	0.23
		粉体低効率 (Ω・cm)	0.033	0.045
	出典：GSI クレオス（株）のカルベール®カタログデータ			
性能／特性	<p>製品の種類により多様な物性のものが得られるが、一般的な MWCNT の特徴は以下のとおりである；</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 機械的特性（軽量・強度・柔軟性）：アルミニウムの約半分の軽さ、鋼鉄の 100 倍の引張り強度、硬さはダイヤモンドの 2 倍。また、破断しにくく復元性、柔軟性に富む。 ・ 導電性：銅と比べ、約 1,000 倍という高い電流密度耐性を持つ。LSI に使用される微細な配線幅でも、銅などが断線してしまうような高密度の電流を流しても断線せず効率よく電子を伝える。複合材料内に適切に導入することで高い伝導性材料を得ることができる。ただし、電気伝導に寄与するのは外層のみで、内側の層は関与しない。 ・ 熱伝導性・耐熱性：銅の約 10 倍の熱を伝える。半導体回路の熱を放出し半導体の高温化を抑制するヒートシンクなどで活用が期待されている。また、空気中で 750℃、真空中では 2,300℃程度の耐熱性がある。 ・ 電磁波吸収性：CNT は電磁波をよく吸収する。CNT 繊維内で電磁波が反射を繰り返し減衰し、CNT が光を吸収して熱に変換すると考えられている。 ・ 化学的安定性：CNT は耐薬品性が高く、化学的に安定である。ほとんどの薬品に反応せず、溶けにくい。 			
製造会社	<p>【国内】</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 昭和電工（株） ・ GSI クレオス（株） ・ 宇部興産（株） ・ 本荘ケミカル（株） ・ 三菱マテリアル（株） ・ 東レ（株） ・ 名城ナノカーボン <p>【海外】</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ Nanocyl（巴工業（株）） ・ CNano Technology（販売：丸紅情報システムズ（株）） ・ Hyperion Catalysis International ・ Arkema（アルケマ（株）） 			

(ii) 市場規模

MWCNT の世界市場規模推移及び予測

	2014 年	2015 年	2016 年 見込	2017 年 予測	2018 年 予測	2019 年 予測	2020 年 予測
販売量(トン)	250	400	450	550	600	670	750
販売金額(百万円)	3,750	5,400	6,000	7,000	7,500	8,000	8,700

※販売金額はメーカー出荷ベース

出典：(株)富士キメラ総研「2017 年 高機能添加剤・ハイブリッドマテリアルの将来展望」

MWCNT の NBCI 会員企業の製造量

	2014 年度	2015 年度	2016 年度
製造量(トン)	70-120	80-130	120-170

出典：経済産業省ナノマテリアル情報提供シート

http://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/other/nano_program.html

上記のように、MWCNT の 2015 年度の世界需要は 400 トンと推定され、年々拡大傾向にあると予測されている(富士キメラ総研推定)。国内で経済産業省に報告されたナノマテリアル情報提供シートによれば、ナノテクノロジービジネス推進協議会(NBCI)の会員企業の製造量合計も 2014 年度から年々増加している。

(iii) 主な用途

- ・ エレクトロニクス分野
- ・ エネルギー分野:リチウムイオン電池電極添加剤、キャパシター、燃料電池
- ・ マテリアル:導電性塗料/樹脂、導電性ペーパー/繊維、強化樹脂/強化金属、放熱部材
- ・ バイオ:細胞培養、バイオセンサー、ドラッグデリバリー
- ・ ナノテクノロジー:走査型プローブ顕微鏡、マニピュレーション

(iv) 研究開発事例

①新規多層カーボンナノチューブポリアミドナノ複合逆浸透(RO)膜の耐ファウリング性発現メカニズムの解明

開発者:信州大学特別特任教授 遠藤守信、信州大学 COI 拠点研究員 滝沢善洋、信州大学カーボン科学研究所特任教授 手島正吾、信州大学カーボン科学研究所特任教授 川口武
開発機構:信州大学アクア・イノベーション拠点

概要:信州大学 COI 拠点の研究グループでは、これまでのナノカーボンに関する研究実績を基盤とし、MWCNT-PA ナノ複合 RO 膜を開発し、高い脱塩率に加え高透水性と耐ファウリング性を兼備していることを報告した。今回、MWCNT-PA ナノ複合 RO 膜について、実験的手法と分子動力学法を用いた理論的手法を組み合わせることで、優れた耐ファウリング性発現メカニズムを解明することに成功した。実験的手法として、蛍光成分フルオロセインイソチオシアネート(FITC)を標識としたタンパク質のウシ血清アルブミン(BSA)をモデルファウラントとして用い、ファウリングの試験によって膜表面への付着の様子を蛍光顕微鏡でその場観察した。その結果、膜上へのファウラントの付着は、通常の PA 膜や市販 PA 膜に比べて顕著に少ないことを確認した。さらに、BSA 付着による透水量については、実験室で調製した PA 膜および市販の PA 膜では 34%~50% の低下であり、MWCNT-PA ナノ複合膜では元の値の 15% の低下で極めて劣化レベルは少なくなっている。これにより、開発膜の極めて高い耐ファウリング性を発現することを見出した。

実験的手法と分子動力学法を用いた解析によって、MWCNT が PA 中に存在すると、(1) PA の剛直性が増加することで PA の表面官能基が物理的に拘束されるため、タンパク質の官能基との結合が困難になる、(2)膜の表面構造がより平滑になることでタンパク質が膜の表面に引っかかりにくくなる、(3)PA から MWCNT への電荷移動による効果によって膜表面に一様に薄い界面水が形成、覆うことで、膜表面にタンパク質が付きにくくなるのが理論的にも証明された。さらに、付いたタンパク質膜が離脱して透水性能が自己回復する優れた新機能も見出され、付着した BSA が離れやすいという耐ファウリング性が発現するメカニズムも解明した。今回、MWCNT-PA ナノ複合 RO 膜の耐ファウリング性の実証およびその発現メカニズムを解明したことで、今後、更なる高い耐ファウリング性を有する高ロバスト性(頑強性)の先進 RO 膜の開発を進めることが可能となった。本成果により、我々の開発した革新的な MWCNT-PA ナノ複合 RO 膜を用いることで、ファウリングに対するメンテナンスの所要作業を低減し、低コストで、の運用が可能な海水淡水化システムの実現が期待される。

出典:信州大学アクア・イノベーション拠点ホームページ(2018/09/308 掲載)

http://www.shinshu-u.ac.jp/coi/news/20170920_press%20release_shinshu-u_COI.pdf

f

②世界最高の放熱性能を持つ純カーボンナノチューブ放熱シートの開発に成功

開発者:株式会社富士通研究所

開発機構:株式会社富士通研究所

概要:株式会社富士通研究所は、高熱伝導性と耐熱性を両立する垂直配向カーボンナノチューブから構成された、世界最高の放熱性能を持つ高熱伝導カーボンナノチューブシートの開発に成功した。電気自動車の急速な発展に伴い、高電圧下で電力を制御する車載パワーモジュールには低消費電力・高耐圧が求められており、モジュールの小型化に伴う高温動作への信頼性確保も同時に必要とされている。これに対して、低消費電力・高耐圧の特徴をもつシリコンカーバイド(炭化ケイ素、SiC)がシリコン(Si)に置き換わり利用されつつあるが、200°C以上の高温領域でも安定動作させるため、SiC素子の熱を効率良く排熱する必要がある。今回、高い熱伝導性をもつ素材として知られる円筒状構造のカーボンナノチューブの製造プロセスにおいて、熱伝導性が高い円筒の軸と排熱方向を合わせるため、製造条件である温度と圧力の組み合わせを最適に制御することで、カーボンナノチューブを、垂直方向に高密度かつ均一に成長させる、カーボンナノチューブ成長制御技術を開発した。また、SiCを用いたパワーモジュールの排熱に利用するために、配向成長したカーボンナノチューブを2000°C以上の高温で加熱処理することでシート状に成形し、可搬を容易とするカーボンナノチューブシート化技術の開発に成功した。本技術により作製した放熱シートは、既存のインジウムを原料とする放熱材料と比べて約3倍の放熱性能であり、カーボンナノチューブ放熱シートとして世界最高の放熱性能を確認した。今後、本技術を次世代自動車向け放熱材料として2020年以降の製品化を目指すとともに、次世代HPCや次世代通信機器への適用など、新たな分野への展開も検討する。

出典:富士通ホームページ(2018/02/08掲載)

<http://pr.fujitsu.com/jp/news/2017/11/30.html>

③高性能カーボンナノチューブ/無機金属酸化物ハイブリッド電池触媒の開発に成功

開発者:九州大学大学院工学研究院/カーボンニュートラル・エネルギー国際研究所 教授中嶋直敏、准教授 藤ヶ谷剛彦、特任助教 Jun Yang

開発機構:九州大学

概要:九州大学大学院工学研究院/カーボンニュートラル・エネルギー国際研究所(I2CNER)の中嶋直敏教授、藤ヶ谷剛彦准教授、Jun Yang 特任助教の研究グループは、白金の代わりにポリマー及び無機金属酸化物を用いて高い活性を持つ燃料電池用触媒を開発することに成功した。多くの無機金属酸化物は、酸素還元反応、酸素発生反応、水素発生反応等のエネルギー変換の基幹反応の触媒として注目されてきた。しかしながら、多くの場合、これらの反応に対する触媒能は必ずしも高くないのが現状であった。原因として、無機金属酸化物の電導性の低さ、及び触媒活性サイト面積の小ささが挙げられる。本研究では、電導性が高い高純度多層カーボンナノチューブ(CNT)を素材として用いて、まずこれをポリマー(ポリベンズイミダゾール(PBI))で被覆し、この上にスピネル型無機金属酸化物($NixCo_{3-x}O_4$)のナノ粒子をソルボサーマル法で作製した。この方法により作製した触媒は、非常に効率的な酸素還元反応及び酸素発生反応を示すことが明らかになった。さらに高い耐久性も示すことが判明した。この方法は、九州大学が展開してきたCNT/PBI/Pt触媒作製方法を無機金属材料に応用したものであり、導電性のナノチューブ上にスピネル型無機金属酸化物のナノクリスタルを均質にコートすることを可能にし、これが触媒の高活性に繋がっている。燃料電池の本格普及には、高い活性を持つ(すなわち、現行の白金ベースの触媒に匹敵する)完全非白金型触媒の開発が極めて重要である。本触媒が、完全非白金型触媒であることから、白金を全く使用しない効率的な燃料電池及び酸素発生触媒の開発は、今後のエネルギー材料(触媒)研究へ大きく貢献するものである。

出典:九州大学ホームページ(2017/03/30掲載)

<https://www.kyushu-u.ac.jp/ja/researches/view/109>

(v) 利用事例

新たな利用事例は確認できなかった。

(vi) ナノリスク評価

CNT を輸入している事業者が国内で加工する際には、閉鎖系で加工を行っているほか、局所排気装置等を使用して粉じんの除去を行っている。

また、労働者については、加工装置に CNT を投入する際、あるいは取り出す際に、平成 21 年 3 月公表の経済産業省、厚生労働省、環境省のナノ粒子取扱いガイドラインを参考として、労働者は保護具を着用し、局所排気装置で粉じんを除去し、労働者にばく露しないように管理するとともに、加工記録を管理している。

環境への排出に関しては、CNT の加工は極めて限定された空間で行っており、閉鎖系ない、もしくは局所排気装置を用いており、既存の手法で判断する限りは、環境への排出はほとんどない。

出典：経済産業省 ナノマテリアル情報提供シート

http://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/other/nano_program.html

(ウ) グラフェン

(i) 製品概要

サイズ	厚さ：約 0.335nm (1 層分、炭素原子 1 個分に相当) 形状：葉身形状 (1 層) が 1~10 層重なったもの																																
形状	極薄のシート状																																
計測技術	TEM、SEM																																
物性	<ul style="list-style-type: none"> グラフェンは、炭素同素体の 1 つで、炭素原子が六角形のメッシュ状に整列した、原子 1 個分の厚みしかないシートであり、グラフェンが多層に積み重なったものがグラファイトである。各炭素原子の 4 個の価電子は 3 個の sp² 混成軌道と 2p_z 軌道に分布し、2p_z 軌道を占める価電子は自由電子となって、シート内を自由に行き来しているため、バンドギャップのない半導体または半金属とみなされる。電子移動度の大きさからポストシリコンとして着目されるほか、化学的に安定で機械的強度にも優れ、様々な用途開発への応用が期待される。 <table border="1" data-bbox="592 1323 1163 1458"> <tr> <td>製品名</td> <td>xGnP® Graphen Nanoplatelets</td> </tr> <tr> <td>融点</td> <td>3,600°C</td> </tr> <tr> <td>比重</td> <td>0.03~0.1 g/cm³</td> </tr> </table> <p>出典：XG Sciences HP http://www.newmetals.co.jp/cat07/cat0701/list.html</p> <table border="1" data-bbox="375 1554 1380 1816"> <thead> <tr> <th>型番</th> <th>iGurafen-α</th> <th>iGurafen-αS</th> <th>iGurafen-Σ</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>表面処理</td> <td>無</td> <td>無</td> <td>無</td> </tr> <tr> <td>粒子径</td> <td>100μm</td> <td>10μm</td> <td>100μm</td> </tr> <tr> <td>厚さ</td> <td>約 10nm</td> <td>約 10nm</td> <td>約 10nm</td> </tr> <tr> <td>比表面積 (BET)</td> <td>20~27 m²/g</td> <td>27 m²/g</td> <td>20 m²/g</td> </tr> <tr> <td>吸油量</td> <td>4.5mL/g</td> <td>2.5mL/g</td> <td>8mL/g</td> </tr> </tbody> </table> <p>出典：AS ONE Corporation HP https://axel.as-1.co.jp/asone/g/NC3-7633-01/</p>			製品名	xGnP® Graphen Nanoplatelets	融点	3,600°C	比重	0.03~0.1 g/cm ³	型番	iGurafen-α	iGurafen-αS	iGurafen-Σ	表面処理	無	無	無	粒子径	100μm	10μm	100μm	厚さ	約 10nm	約 10nm	約 10nm	比表面積 (BET)	20~27 m ² /g	27 m ² /g	20 m ² /g	吸油量	4.5mL/g	2.5mL/g	8mL/g
製品名	xGnP® Graphen Nanoplatelets																																
融点	3,600°C																																
比重	0.03~0.1 g/cm ³																																
型番	iGurafen-α	iGurafen-αS	iGurafen-Σ																														
表面処理	無	無	無																														
粒子径	100μm	10μm	100μm																														
厚さ	約 10nm	約 10nm	約 10nm																														
比表面積 (BET)	20~27 m ² /g	27 m ² /g	20 m ² /g																														
吸油量	4.5mL/g	2.5mL/g	8mL/g																														
性能／特性	<ul style="list-style-type: none"> 電子移動度：最も大きい物質の 1 つで、室温で 15,000cm²/Vs 高い熱的・化学的安定性 キャリア運動の相対論性 熱伝導性：現在知られる物質の中で最大 (室温) 																																

	<ul style="list-style-type: none"> ・ 電気伝導度：現在知られる物質の中で最大（室温）。バンドキャップをもたず金属的な電気伝導を示す。シートを2枚重ねて垂直電場を加えるとバンドキャップが生じる。 ・ 重量：現在知られる物質の中で最軽量 ・ 強度：現在知られる物質の中で最も丈夫な物質。同じ厚さの鉄シートの約100倍の強度 ・ 引張り強度：0.1%グラフェン含有ポリエチレンの引張り強度は、ポリエチレン単体の約5倍。 ・ 光透過性：単層グラフェンは可視光に対してほぼ透明（透過度98%）。分散の仕方により、光透過性が大きく異なる。0.1%グラフェン含有ポリエチレンでも分散が良いと、光を透過しないが、分散が悪いと光を透過する。 ・ ガスバリア性：六角形の結晶格子構造の炭素間結合距離が0.1nm程度であるために、水素分子やHe分子であっても透過できない。 ・ 疎水性である
製造会社	<p>【国内】</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ グラフェンプラットフォーム（株） ・ （株）インキュベーション・アライアンス ・ 東芝（株） ・ （株）ニューメタルスエンドケミカルスコーポレーション（XG Science社、Nanointegris社製など） ・ イーエムジャパン（株） <p>【海外】</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ XG-Science（インド） ・ Angstrom（米国） ・ Vorbeck（フランス）

(ii) 市場規模

グラフェンの世界市場規模推移及び予測：グラフェンインクベース

	2014年	2015年	2016年 見込	2017年 予測	2018年 予測	2019年 予測	2020年 予測
販売量(トン)	5	50	70	130	223	335	505
販売金額(百万円)	350	750	870	1,365	1,925	3,050	4,250

※販売金額はメーカー出荷ベース

出典：(株)富士キメラ総研「2017年 高機能添加剤・ハイブリッドマテリアルの将来展望」

グラフェンインクは2015年に50トン、7.5億円程度の市場規模とみられる。研究・開発向けのサンプル販売が中心であったが、2015年にグラフェンプラットフォームが大量生産技術を確立し、市場が本格化しつつあり、今後も拡大が見込まれる。

グラフェンは少量添加するだけで、強度、潤滑性、導電性、帯電防止性、放熱性、バリア性、抗菌性、機水性などさまざまな機能の向上、付与が可能な材料である。そのため、幅広い用途への応用が期待されている。現在も研究・開発向けのサンプル販売が中心であるが、そのなかでもスポーツ用品や包装用品など樹脂・エラストマー添加用途や塗料・潤滑油用途への販売が先行しているとみられる。

当該品の注目度は高く、需要は著しく拡大しているものの、ユーザー側の合成技術や攪拌技術が確立していないことが、抑制要因となっている。

グラフェンプラットフォームは、当該品の分散性を高めた表面改質処理済みグラフェンの供給を行っている。また、樹脂への添加まで一貫生産できる工場を建設中であるため、当該品の採用ハードルが低くなり、市場は大きく拡大していくと考えられる。

将来的には、LiB用導電助剤や電極向けの検討が進められ、採用の増加が予測される。特に車載用LiB向けでは当該品の採用により、走行距離の大幅な伸長や、自動運転技術の向上につ

ながるとされており、実用化が期待される。(富士キメラ総研「2017年 高機能添加剤・ハイブリッドマテリアルの将来展望」)。

当該品は現状、日本や欧米のみで量産しているとみられる。市場が本格化するにつれて、参入する企業が増加する可能性があるが、グラフェンプラットフォームが結晶構造や応用用途に関する特許を取得しているため、ハードルが高い。少量添加でさまざまな機能が付与できる注目の材料であり、市場が本格化してきたことから、各国で需要が拡大している。

2017年4月 - 6月期の価格帯は6,000~1万5,000円/kg(※富士キメラ総研推定)であるが各社で量産体制が確立されたことで、価格は大きく下落している。今後も市場拡大に伴い価格低下が見込まれる。将来的には、5,000円/kg前後の価格にまで下がる見通しである。

(iii) 主な用途

主な用途は以下のとおりである;

- ・ コンポジット(樹脂・ゴム分野):フィルム包材(ラップ、真空パック)、構造部材、ギア、タイヤ、ガasket
樹脂に0.1~0.5%添加することで、強度を30~40%向上させることができる。樹脂に添加することで、強度や帯電防止機能のほかに、抗菌性や酸素バリア性があることから、フィルムや樹脂成形品に対しての機能性アップアイテムとして注目される。
- ・ エレクトロニクス(電気電子分野):透明電極(タッチパネル、太陽電池、LED)、電池負極材、RFIDタグ、光電変換素子、超高速トランジスタ、テラヘルツ発振素子、パワー半導体)
- ・ 電池(エネルギー分野):リチウムイオン電池負極材、空気酸化電池、燃料電池用Pt触媒代替、キャシター、太陽電池、など

そのほか、以下のような用途でも使用されている;

- ・ 塗料・潤滑油分野:エンジンオイル、塗料
グラフェンを添加するだけで潤滑性が得られるという特性を有する。
- ・ 放熱素材:放熱シート、放熱グリース、ヒーター、放熱板
- ・ バイオ・生体:人工網膜、バイオセンサー、生体膜
- ・ その他:海水淡水化膜
海水淡水化膜として、脱塩処理が可能であるとの研究事例がある。グラフェンの膜における孔のサイズをコントロールすることで、透過/非透過物質の選択を行うことが可能である。

(iv) 研究開発事例

①グラフェンとSiC(シリコンカーバイド)の界面に潜む低エネルギーのフォノンの発見

開発者:東北大学多元物質科学研究所 教授 米田忠弘、東京大学大学院工学系研究科 講師 南谷英美、物質材料研究機構 主任研究員 荒船竜一、Donostia International Physics Center 教授 Thomas Frederiksen、東北大学電気通信研究所 准教授 吹留博一

開発機構:東北大学、東京大学、物質材料研究機構、Donostia International Physics Center

概要:東北大学多元物質科学研究所 米田忠弘教授、東京大学大学院工学系研究科 南谷英美講師、物質材料研究機構 荒船竜一主任研究員、Donostia International Physics Center Thomas Frederiksen 教授、東北大学電気通信研究所 吹留博一准教授らの研究グループは、シリコンカーバイド(SiC)上のエピタキシャルグラフェンにおいて、走査トンネル顕微鏡(STM)による電流測定に現れるフォノンのシグナルの空間依存性を高精度に測定し、SiC基板とグラフェンの界面に潜む低エネルギーフォノンの存在を明らかにした。SiCの熱分解によるエピタキシャルグラフェン形成は高品質なグラフェンを絶縁体基板上に作成する方法として着目されているが、グラフェン中での電子移動度が理論値よりも大幅に低下するという問題があった。電子移動度が下がる重要な原因の一つが、基板とグラフェンの界面に存在する

フォノンである。しかし、界面のフォノンを観測することは非常に難しく、その詳細は明らかになっていなかった。今回の研究では、トンネル電子がフォノンと衝突することによってエネルギーを失う非弾性過程の空間依存性を測定する STM 実験と、界面構造と電子・フォノン状態の相関を第一原理計算によって明らかにすることによって、ダングリングボンドを持ったシリコン (Si) 原子によって特徴的な界面フォノンが生じていることを解明した。本研究成果は、界面制御によるグラフェンデバイス性能向上につながることを期待される。

出典：東北大学多元物質科学研究所 (2017/10/19 掲載)

<https://www.tohoku.ac.jp/japanese/2017/10/press20171019-01.html>

②単一原子層薄膜によって赤外光を 1 桁波長の短い可視光に変換することに成功 — グラフェンの新しい光機能の発見 —

開発者：京都大学理学研究科教授田中耕一郎、理学研究科博士課程学生 吉川尚孝、研究員 玉谷知裕

開発機構：京都大学

概要：田中耕一郎 理学研究科教授 (高等研究院物質—細胞統合システム拠点連携主任研究者)、吉川尚孝 理学研究科博士課程学生、玉谷知裕 同研究員 (現・産業技術総合研究所研究員)らの研究グループは、グラフェン (炭素原子が蜂の巣状に結合した、1 原子の厚さのシート) に赤外パルス光を照射すると、波長が 5 分の 1、7 分の 1、9 分の 1 の可視パルス光が生成されることを発見した。これは「高次高調波発生」と呼ばれる現象であり、炭素の単一原子層 (厚さ 0.335 ナノメートル) 超薄膜であるグラフェンで実現したのは世界で初めての発見である。

光の波長を変換する技術は重要な技術であり、すでに社会のいろいろなところで使われている。例えば、緑色のレーザーポインターは 532nm (ナノメートル) の波長の光であるが、これはレーザーポインターの中でまず波長 1064nm のレーザー光を発生し、非線形光学結晶という透明な固体を用いて半分の波長 (周波数は 2 倍) である 532nm のレーザー光を生成している。これは 2 倍高調波発生と呼ばれる現象である。同様な現象はエレクトロニクスの世界で扱う電波の領域の光でも知られており、周波数を 2 倍、3 倍にする周波数逓倍器やオームの法則から逸脱する非線形なデバイスとして利用されている。1980 年代後半にパルス幅が 100 フェムト秒 (100 超分の 1 秒) の高強度のパルスレーザーを希ガス原子気体に照射すると、波長が数 10 分の 1 (周波数が数十倍) の高次の高調波が発生することが発見された。これは「高次高調波発生」と呼ばれ、強いレーザー光照射下で媒質の非線形性に由来する現象である。高次高調波発生については多くの研究が積み重ねられてきたが、固体のように、気体と異なり高い密度の物質では最近まで成功していなかった。これは、レーザー加工に代表されるように高強度のレーザーを物質に照射すると固体が破壊されてしまうことに起因している。しかし、数年前に照射するレーザーの波長を赤外の領域に持っていくことで、破壊現象を起こさずに高次高調波を発生可能であることが報告されて以来、研究が盛んになってきた。固体結晶に関する論文が矢継早に出され、様々な理論モデルも提案されていますが、未だに統一見解が取れていないのが現状である。一つには、これまでの研究は厚い固体の結晶が用いられてきたので、光の伝播方向の積み重ね効果が状況を複雑にしてきたことが挙げられる。そこで本研究グループは、厚さ方向の複雑性を取り除くとともに、なるべくシンプルな構造を持つ固体で実験を行うという狙いのもと、炭素の単一原子層超薄膜であるグラフェンで実験を行った。その結果、世界で初めてグラフェンにおける高次高調波発生を実現したとともに、赤外光の偏光状態を楕円偏光にすると可視光の生成効率が最大となり、その際生成された可視光の偏光状態は元の赤外光とほぼ垂直になることが明らかとなった。本研究グループは、このような特異な偏光特性は、グラフェンの電子状態がバンドギャップ (結晶中の電子が存在し得ない禁制帯のエネルギー幅) を持たない「ディラック電子状態」に起因することを理論的に示した。本発見は、これまで統一見解が得られていない固体を用いた高次高調波発生の物理的メカニズムに、大きな進展を与えるものと期待される。

出典:京都大学ホームページ(2017/5/22 掲載)

http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2017/170519_4.html

③グラフェンの厚さの違いと電子の動きの関係を世界で初めて観察

開発者:高エネルギー加速器研究機構(KEK) 物質構造科学研究所 特任助教 福本恵紀、東京工業大学 理学院 化学系 教授 腰原伸也、フランス国立科学研究センター(CNRS)、ピエール アンド マリー キュリー大学 准教授 Mohamed Boutchich

開発機構:高エネルギー加速器研究機構、東京工業大学、フランス国立科学研究センター、ピエール アンド マリー キュリー大学

概要:高エネルギー加速器研究機構(KEK) 物質構造科学研究所の福本恵紀特任助教は、東京工業大学 理学院 化学系の腰原伸也教授、フランス国立科学研究センター(CNRS)、ピエール アンド マリー キュリー大学の Mohamed Boutchich 准教授らと共同で、グラフェン内の超高速な電子の動きが場所ごとに異なることを世界で初めて観測した。理想的なグラフェンは炭素原子 1 層の厚さをもつ二次元物質であり、高速デバイスなどへの応用が期待されている。しかし実際に作成されるグラフェンの構造はナノスケールで不均一なため、その構造の違いが電子の運動に影響を与えると予測されている。グラフェンの実用化のためには、デバイスの動作を阻害する構造、また高性能化に利用できる構造を明確にする必要がある。本研究では、一般的に使われている方法で作成されたグラフェンの結晶構造の違いに由来した電子輸送特性の観察に成功した。具体的には、ラマン顕微鏡を用いて局所的な結晶構造から電子状態を計算し、同じ試料の同じ場所を独自に開発したフェムト秒時間分解光電子顕微鏡法(TR-PEEM)で観察することで、構造と電子輸送特性を直接関連付ける結果を得た。本研究では、グラフェンの不均一な構造の特性を特定し、電子デバイスの性能を決定する電子輸送特性を直接評価することに成功した。構造と電子輸送特性の直接対比が可能であることを証明した本研究成果は、今後のグラフェン素子作成の重要なツールとなりうる。

出典:東京工業大学ホームページ(2017/9/27 掲載)

<https://www.titech.ac.jp/news/2017/039321.html>

(v) 利用事例

株式会社デサント(本社:大阪府大阪市、代表取締役社長:石本 雅敏)の子会社である INOVEIGHT LTD.(本社:英国カンブリア州、CEO:Ian Bailey(イアン ベイリー))(以下「イノヴェイト社」)は、マンチェスター大学との共同開発により、グラフェンを使用した画期的な商品を『イノヴェイト』ブランドで“G-Series(ジーシリーズ)”シューズとして 2018 年から発売する。

イノヴェイト社は、2003 年に英国に設立され、トレイル・丘陵・山などあらゆる地表を走るランナー、およびジムでワークアウトをするフィットネスアスリート向けの、革新的でグリップ力の高いシューズブランド『イノヴェイト』を展開している。現在同社は、鉄の 200 倍の強度を持つ最強の素材グラフェンをスポーツシューズのアウトソールに使用する開発を、同大学のアラビンド ビジャヤラガバン博士と共同で行い、世界で初めて同素材を使用したランニングシューズ、フィットネスシューズの商品化に成功した。2018 年に発売予定の新シューズのアウトソールは、従来品と比較してより強く、より伸縮性に富み、より耐久性が高いという実験結果が出ている。

主な特徴は以下の通りである。

- ① 2004 年にグラファイトから分離することに成功した世界初の二次元素材
- ② 地球上で最薄(原子一枚分の薄さ)でありながら、最も強度が高い素材(鉄の 200 倍の強度)
- ③ 非常にしなやかで、損傷することなく折り曲げたり、ひねったり、折りたたんだり、伸ばしたりすることが可能(デサント社ホームページ)

http://www.descente.co.jp/jp/press_releases/post-44072.html

(vi) ナノリスク評価

国内でグラフェンを生産している小規模事業者は、黒鉛等の粉体状の炭素を長期的に扱ってきた経験を有する大手事業者と共同で製造しており、それらの黒鉛等の製造事業者の工場において、製造時のリスク管理を行っている。(平成 27 年度本調査事業報告書より)

(エ) 酸化チタン

(i) 製品概要

サイズ	超微粒子：(粒径) 10~50 nm、光触媒用：(粒径) ~200nm																																																																										
形状	粒子状、紡錘状																																																																										
計測技術	粉末 X 線回折法、SEM、TEM																																																																										
物性	<p>・酸化チタンにはルチル型とアナターゼ型、ブルカイト型の 3 種の結晶形態があるが、工業的に利用されているのはルチル型とアナターゼ型のみである。ルチル型はアナターゼ型に比べて原子配列が緻密で物理的性質もより安定している。ルチル型、アナターゼ型ともに、熱濃硫酸、フッ酸、熔融アルカリ塩には溶解するが、それ以外の酸、アルカリ、有機溶媒、水には溶解せず、化学的にも安定な物質である。</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>結晶形 結晶系</th> <th>ルチル 正方晶系</th> <th>アナターゼ 正方晶系</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>密度 (g/cm³)</td> <td>4.27</td> <td>3.90</td> </tr> <tr> <td>屈折率 (<i>n_D</i>)</td> <td>2.72</td> <td>2.52</td> </tr> <tr> <td>モース (度)</td> <td>7.0~7.5</td> <td>5.5~6.0</td> </tr> <tr> <td>比熱 (cal/°C·g at 25°C)</td> <td>0.169</td> <td>0.169</td> </tr> <tr> <td>熱伝導率 (cal/cm/sec/°C)</td> <td>0.148</td> <td>0.430</td> </tr> <tr> <td>電気伝導度 (mho/cm)</td> <td>10⁻¹³~10⁻¹⁴</td> <td>10⁻¹³~10⁻¹⁴ 5.5×10⁻⁸ (500°C)</td> </tr> <tr> <td>誘電率</td> <td>114</td> <td>48</td> </tr> <tr> <td>融点 (°C)</td> <td>1,825</td> <td>ルチル形に転位</td> </tr> </tbody> </table> <p>出典：酸化チタン(ナノ酸化チタンを含む)の安全性等について(日本酸化チタン工業会 http://www.sankatitan.org/sankatitan/2016.12ansen.pdf)</p> <p>テイカ微粒子酸化チタン</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>銘柄</th> <th>平均一次粒子径 (nm)</th> <th>表面処理剤</th> <th>撥水性</th> <th>特徴</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>MT-01</td> <td>10</td> <td>Al、ステアリン酸</td> <td>有</td> <td>高透明性、分散性に優れる</td> </tr> <tr> <td>MT-10EX</td> <td>10</td> <td>Al、イソステアリン酸</td> <td>有</td> <td>高透明性、分散性に加え、油相分散時の粘度が低い</td> </tr> <tr> <td>MT-05</td> <td>10</td> <td>Si、Al</td> <td>有</td> <td>高透明性、活性が低い</td> </tr> <tr> <td>MT-100TV</td> <td>15</td> <td>Al、ステアリン酸</td> <td>有</td> <td>化粧品用 UV 散乱剤の定番、世界で最も普及している銘柄</td> </tr> <tr> <td>MT-100Z</td> <td>15</td> <td>Al、ステアリン酸</td> <td>有</td> <td>高透明性、分散性に優れ、活性が低い</td> </tr> <tr> <td>MT-150EX</td> <td>15</td> <td>Al、イソステアリン酸</td> <td>有</td> <td>透明性、分散性に優れ、活性が低く、油相分散時の粘度が低い</td> </tr> <tr> <td>MT-150W</td> <td>15</td> <td>メタリン酸ソーダ</td> <td>-</td> <td>水への親和性、分散性に優れる</td> </tr> <tr> <td>MT-100AQ</td> <td>15</td> <td>Si、Al、アルギン酸ナトリウム</td> <td>-</td> <td>水への親和性、分散性に優れ、安定性も非常によい</td> </tr> </tbody> </table>			結晶形 結晶系	ルチル 正方晶系	アナターゼ 正方晶系	密度 (g/cm ³)	4.27	3.90	屈折率 (<i>n_D</i>)	2.72	2.52	モース (度)	7.0~7.5	5.5~6.0	比熱 (cal/°C·g at 25°C)	0.169	0.169	熱伝導率 (cal/cm/sec/°C)	0.148	0.430	電気伝導度 (mho/cm)	10 ⁻¹³ ~10 ⁻¹⁴	10 ⁻¹³ ~10 ⁻¹⁴ 5.5×10 ⁻⁸ (500°C)	誘電率	114	48	融点 (°C)	1,825	ルチル形に転位	銘柄	平均一次粒子径 (nm)	表面処理剤	撥水性	特徴	MT-01	10	Al、ステアリン酸	有	高透明性、分散性に優れる	MT-10EX	10	Al、イソステアリン酸	有	高透明性、分散性に加え、油相分散時の粘度が低い	MT-05	10	Si、Al	有	高透明性、活性が低い	MT-100TV	15	Al、ステアリン酸	有	化粧品用 UV 散乱剤の定番、世界で最も普及している銘柄	MT-100Z	15	Al、ステアリン酸	有	高透明性、分散性に優れ、活性が低い	MT-150EX	15	Al、イソステアリン酸	有	透明性、分散性に優れ、活性が低く、油相分散時の粘度が低い	MT-150W	15	メタリン酸ソーダ	-	水への親和性、分散性に優れる	MT-100AQ	15	Si、Al、アルギン酸ナトリウム	-	水への親和性、分散性に優れ、安定性も非常によい
結晶形 結晶系	ルチル 正方晶系	アナターゼ 正方晶系																																																																									
密度 (g/cm ³)	4.27	3.90																																																																									
屈折率 (<i>n_D</i>)	2.72	2.52																																																																									
モース (度)	7.0~7.5	5.5~6.0																																																																									
比熱 (cal/°C·g at 25°C)	0.169	0.169																																																																									
熱伝導率 (cal/cm/sec/°C)	0.148	0.430																																																																									
電気伝導度 (mho/cm)	10 ⁻¹³ ~10 ⁻¹⁴	10 ⁻¹³ ~10 ⁻¹⁴ 5.5×10 ⁻⁸ (500°C)																																																																									
誘電率	114	48																																																																									
融点 (°C)	1,825	ルチル形に転位																																																																									
銘柄	平均一次粒子径 (nm)	表面処理剤	撥水性	特徴																																																																							
MT-01	10	Al、ステアリン酸	有	高透明性、分散性に優れる																																																																							
MT-10EX	10	Al、イソステアリン酸	有	高透明性、分散性に加え、油相分散時の粘度が低い																																																																							
MT-05	10	Si、Al	有	高透明性、活性が低い																																																																							
MT-100TV	15	Al、ステアリン酸	有	化粧品用 UV 散乱剤の定番、世界で最も普及している銘柄																																																																							
MT-100Z	15	Al、ステアリン酸	有	高透明性、分散性に優れ、活性が低い																																																																							
MT-150EX	15	Al、イソステアリン酸	有	透明性、分散性に優れ、活性が低く、油相分散時の粘度が低い																																																																							
MT-150W	15	メタリン酸ソーダ	-	水への親和性、分散性に優れる																																																																							
MT-100AQ	15	Si、Al、アルギン酸ナトリウム	-	水への親和性、分散性に優れ、安定性も非常によい																																																																							

	MT-100WP	15	Si	-	水への親和性、分散性に優れ、水活性増粘剤との相性がよい
	MT-100SA	15	Si、Al	-	透明性、屋外耐候性に優れる
	MT-500B	35	-	-	未処理の微粒子酸化チタン
厚生労働省平成 29 年度 第 1 回 化学物質による労働者の健康障害防止措置に係る検討会 資料 1 http://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-11201000-Roudoukijunkyoku-Soumuka/sochi29_1_siryou1.pdf					
性能／特性	<ul style="list-style-type: none"> ・ 紫外線遮蔽能 ・ 吸着能 ・ 光触媒活性 ・ 触媒活性 ・ 透明性 				
製造会社	【国内】 <ul style="list-style-type: none"> ・ テイカ（株） ・ 石原産業（株） ・ 堺化学工業（株） ・ 昭和電工（株） 【海外】 <ul style="list-style-type: none"> ・ Sachtleben Chemie（ドイツ） 				

(ii) 市場規模

超微粒子酸化チタンの市場規模推移および予測

	2014 年	2015 年	2016 年 見込	2017 年 予測	2018 年 予測	2019 年 予測	2020 年 予測
販売量(トン)	2,850	2,930	3,010	3,100	3,190	3,280	3,370
販売金額(百万円)	11,360	11,730	12,190	12,400	12,700	13,000	13,310

※販売金額はメーカー出荷ベース

出典：(株)富士キメラ総研「2016 年 微粉体市場の現状と将来展望」

酸化チタン(二酸化チタン)の日本酸化チタン工業会会員企業の生産量(触媒用途を含む)

	2014 年度	2015 年度	2016 年度
製造量(トン)	5,780	5,372	5,900

出典：経済産業省ナノマテリアル情報提供シート

http://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/other/nano_program.html

上記のように、ナノサイズの酸化チタンの世界需要は、年々拡大しており、2017 年には超微粒子で 3,100 トンと予測されている(富士キメラ総研推定)。一方、国内の生産量は、経済産業省マテリアル情報提供シートによれば、日本酸化チタン工業会会員企業の合計で、2014 年度は 5,780 トン、2015 年度は 5,372 トン、2016 年度は 5,900 トンとほぼ横ばいである。

(iii) 主な用途

ルチル型は化粧品や塗料などの主用途に利用されるのに対して、アナターゼ型は、発電プラント脱臭等の排煙脱硝触媒用途のほか、光触媒として利用される。

- ・ 電気・電子材料：誘導体材料、抵抗体材料、電解質材料、電解液材料、セパレータ
- ・ 化学プロセス調節剤：触媒、触媒担体
- ・ 印刷インキ、複写用薬剤(トナー等)：電荷制御剤、流動性付与剤、研磨性付与剤、滑り性付与剤

- ・ 医薬品、医薬部外品、化粧品及び医療機器:外用品医薬部外品の有効成分、製剤用基剤及び添加剤、化粧品用の基剤及び添加剤
- ・ 塗料、コーティング剤:着色剤(染料、顔料、色素、色材、光輝剤)、その他
- ・ 着色剤(染料、顔料、色素、色材):着色剤(染料、顔料、色素、色材)
(出典:経済産業省 ナノマテリアル情報提供シート)

また、光触媒用の酸化チタンについては、外装材、内装材、清浄機器、等が主な用途である;

- ・ 外装材:外装建材(タイル、サイディングなど)、塗料・コーティング、テント・幕材、他
- ・ 内装材:内装用タイル、ブラインド、壁、カーテン、照明器具、他
- ・ 清浄機器:空気清浄器、エアコン用フィルター、水処理機用フィルター、他
- ・ その他:道路資材(舗装・ブロック、ガードレール、防音壁、反射鏡など)、生活用品(家電など)、他

(iv) 研究開発事例

①酸化チタンの新機能を発見 —薄膜形状で超伝導を実現—

開発者:東京工業大学 物質理工学院 助教 吉松公平、東京工業大学 物質理工学院 教授 大友明、物質・材料研究機構

開発機構:東京工業大学、物質・材料研究機構

概要:東京工業大学 物質理工学院の吉松公平助教と大友明教授は、物質・材料研究機構と共同で、光触媒材料として知られる二酸化チタンの類縁化合物である七酸化四チタン(Ti_4O_7)とガンマ型の五酸化三チタン($\gamma\text{-Ti}_3\text{O}_5$)で超伝導が発現することを発見した。また、研究グループは、パルスレーザ堆積法と呼ばれる手法を用いて、高温・強還元的环境下で酸化チタンの薄膜合成を行った。大型放射光施設 SPring-8 での高輝度放射光 X 線回折実験で、合成した薄膜の組成・結晶構造を Ti_4O_7 と $\gamma\text{-Ti}_3\text{O}_5$ と決定した。また、電気抵抗率の温度依存性から極低温で電気抵抗がゼロになる超伝導現象が発現することを見出した。これらの超伝導は、過去に理論的に予測されていたながら、実験的には実証されていないバイポーロン超伝導である可能性が考えられる。今回発見した超伝導体の最高転移温度は、液体ヘリウム温度を超える 7 ケルビンであり、安価で安定な酸化物超伝導体として応用が期待される。

出典:東京工業大学ホームページ(2017/10/3 掲載)

<https://www.titech.ac.jp/news/2017/039414.html>

②光触媒ナノ粒子における光照射後 10 兆分の 1 秒での電子の動きを X 線自由電子レーザーで観測

開発者:東京農工大学大学院工学研究院 教授 三沢和彦、京都大学大学院理学研究科 教授鈴木俊法、理化学研究所放射光科学総合研究センターグループ ディレクター 矢橋牧名、高輝度光科学研究センター 研究員 片山哲夫

開発機構:東京農工大学、京都大学、理化学研究所、高輝度光科学研究センター

概要:東京農工大学大学院工学研究院の三沢和彦教授、京都大学大学院理学研究科の鈴木俊法教授、理化学研究所放射光科学総合研究センターの矢橋牧名グループディレクター、高輝度光科学研究センターの片山哲夫研究員らの共同研究グループは、光触媒としてガラスやテントの汚れ防止、殺菌などに用いられるアナタース型酸化チタンナノ粒子に光を照射した直後の超高速な電子状態の変化を、X 線自由電子レーザー施設 SACLA を用いて観測することに成功した。10 兆分の 1 秒(100 フェムト秒)程度で起こる変化を観測したことで、電子が酸化チタン結晶のどこから、どのようなプロセスで生じるかという、これまで未知だった光触媒反応の初期過程を明らかにした。これは反応効率を議論するうえで非常に重要な成果である。近年では、異金属を付着させたり不純物を添加したりして可視光応答性を持たせた酸化チタンの研究も広く行われており、そのような新規材料を本研究と同様の手法で測定し比較することで、反応効率に関わるメカニズムの理解がより一層進むと期待される。

出典:京都大学ホームページ(2017/6/3 掲載)

http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2017/documents/170630_1/01.pdf

③水素生成量が1桁増加する光触媒の開発に成功

開発者:神戸大学分子フォトサイエンス研究センター 准教授 立川貴士、大阪大学産業科学研究所 教授 真嶋哲朗

開発機構:神戸大学、大阪大学

概要:神戸大学分子フォトサイエンス研究センターの立川貴士准教授らと、大阪大学産業科学研究所の真嶋哲朗教授らの研究グループは、光触媒作用による水素生成量が1桁増加する光触媒の開発に成功した。水素は、再生可能エネルギーである太陽光と水から製造できる、次世代のエネルギー源として注目されており、水素を高効率に製造できる光触媒の開発が望まれている。しかしながら、従来の光触媒では、電子と同時に生成する正孔(電子が抜けた孔)のほとんどが触媒表面上で再結合して消失してしまうため、水から水素への光エネルギー変換効率が伸び悩んでいた。今回、立川准教授らは、電子と正孔を空間的に分離できる、光触媒の大きさ・配列の均一性をあえて崩したメソ結晶光触媒の合成方法を開発した。その結果、従来をはるかに超える水素生成の光エネルギー変換効率(約7%)を有する光触媒の開発に成功した。今後は、有用性が実証されたメソ結晶化技術を応用することで、太陽光による高効率な水素製造の実現を目指す。

出典:神戸大学ホームページ(2017/4/10 掲載)

http://www.kobe-u.ac.jp/research_at_kobe/NEWS/news/2017_04_10_01.html

(v) 利用事例

ルチル型は主に化粧品に利用されている。このうち、日焼け止め化粧料へのナノサイズの酸化チタンの配合量は、3~5%(新化粧品学)、多いもので15~20重量%の製品がある。また、ファンデーションへの配合量は5~20%が報告されている(化粧品科学, 1990)。

印刷インキ用途では、白インキ皮膜層に用いられる白色無機顔料としての酸化チタンは、インキ組成物に対して、5~50質量%が適量であるとされ、使用されている。

そのほか、光触媒作用を利用した抗菌・消臭効果を付与するために繊維製品に浸透させて機能性を持たせる製品や、インテリア材表面に塗布することで、シックハウス症候群の原因となる有害物質の分解・無害化や抗菌・消臭効果を付与するための塗料が製品化されている。

(vi) ナノリスク評価

製造事業者は、ばく露等に関して、厚労省局長通知(基発331013号)に沿った管理を行っており、局所排気や捕集効率99.9%の防塵マスクやエアラインマスク及び専用の防塵衣を使用している。袋詰め作業では、プッシュプル型局所排気装置によりばく露低減をはかり、作業場と外部との区画化により外部への排出を防いでいる。製造設備においても密閉化度の向上を進めている。別の事業者においても、労働安全衛生法(粉じん則)及び厚生労働省労働基準局長通知に基づいて、保護具基準の見直しや、密閉化と局所排気の強化による設備対策を検討・実施している。

労働者については、粉じん特別教育を実施しているほか、ナノマテリアルの特性及びばく露防止対策についての教育を行っている。別の事業者では、一般的な労働安全衛生法(粉じん則、特化則)の機会を利用した教育のほか、ナノマテリアルに該当する製品のMSDSを中心とした特性教育を実施している。さらに別の事業者では、年に1度程度、全従業員を対象に粉じん作業の安全教育を実施しているほか、厚生労働省等からの通達、その他ナノ粒子に関する安全性に関する情報を、掲示板等を通じて従業員に周知しているところもある。

(経済産業省 ナノマテリアル情報提供シート)

http://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/other/nano_program.html

(オ) ナノ銀

(i) 製品概要

サイズ	<p>銀ナノ粒子；</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 抗菌用の銀粒子は、数 nm～200μm のものまで幅広く利用されている。 ・ 導電性インクとしては数 nm～数 10nm のものが使用されるが、10nm 以下のより小さいものが求められている。 <p>銀ナノワイヤー；</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 直径数 10μm、長さ数 10μm のものが導電フィルム等に使用されている。 																																																							
形状	粉体、ペースト、分散液																																																							
計測技術	SEM、TEM、AFM（原子間力顕微鏡）																																																							
物性	<ul style="list-style-type: none"> ・ 銀ナノ粒子は独特の光学的、電気的、熱的特性を有する。銀ナノ粒子は、他の多くの色素や段量と異なり、光の吸収や散乱が極めて効率的であり、粒子の大きさや形状に応じて色を持つ。銀ナノ粒子は、特定の波長の光で励起された際に金属表面の伝導電子が集団的な振動を起こす、表面プラズモン共鳴を生じ、この振動は、通常にはない散乱や吸収特性の原因となる。そのため、銀ナノ粒子は、物理的断面積の 10 倍までの有効消光断面積を示す。 ・ 銀ナノワイヤーは、透明性、導電性、柔軟性、伸縮性が非常に高く、ITO フィルム代替として低いコストが期待されている。 <p>(銀ナノ乾粉)</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>品番</th> <th>銀ナノ粒子乾粉-1</th> <th>銀ナノ粒子乾粉-2</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>粒径</td> <td>20 nm</td> <td>60 nm</td> </tr> <tr> <td>比表面積</td> <td>15～20 m²/g</td> <td>5～8 m²/g</td> </tr> <tr> <td>TAP 密度</td> <td>2～4 g/cm³</td> <td>2～4 g/cm³</td> </tr> <tr> <td>Ag 含量</td> <td>≥95wt%</td> <td>≥98wt%</td> </tr> </tbody> </table> <p>出典：DOWA エレクトロニクス（株）HP</p> <p>(銀ナノ粒子分散水溶液)：濃度 0.02mg/l</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>品番</th> <th>730785</th> <th>730793</th> <th>730807</th> <th>730815</th> <th>730777</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>粒径 (nm)</td> <td>10</td> <td>20</td> <td>40</td> <td>60</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>密度 (g/ml[25℃])</td> <td>0.997</td> <td>0.986</td> <td>0.990</td> <td>0.9976</td> <td>0.9978</td> </tr> <tr> <td>粒子数</td> <td>3.6×10¹²</td> <td>4.5×10¹¹</td> <td>5.7×10¹⁰</td> <td>1.7×10¹⁰</td> <td>3.6×10⁹</td> </tr> <tr> <td>蛍光スペクトル</td> <td>λ_{em} = 388nm FWHM59 nm</td> <td>λ_{em} = 401nm FWHM6 6nm</td> <td>λ_{em} = 412nm FWHM6 3nm</td> <td>λ_{em} = 431nm FWHM8 1nm</td> <td>λ_{em} = 504nm FWHM1 67nm</td> </tr> </tbody> </table> <p>出典：シグマ・アルドリッチ（同）カタログ</p> <p>(銀ナノワイヤー)</p> <table border="1"> <tbody> <tr> <td>サイズ</td> <td>φ30nm×20μm、φ50nm×40μm、φ75nm×45μm、φ100nm×10μm</td> </tr> <tr> <td>溶媒種類</td> <td>エタノール、イソプロピルアルコール、エチレングリコール、水</td> </tr> <tr> <td>標準濃度</td> <td>0.625wt%（エタノール）</td> </tr> <tr> <td>標準密度</td> <td>5mg/ml（エタノール）</td> </tr> <tr> <td>外</td> <td>灰色懸濁液</td> </tr> </tbody> </table> <p>出典：イーエムジャパン（株）HP</p>	品番	銀ナノ粒子乾粉-1	銀ナノ粒子乾粉-2	粒径	20 nm	60 nm	比表面積	15～20 m ² /g	5～8 m ² /g	TAP 密度	2～4 g/cm ³	2～4 g/cm ³	Ag 含量	≥95wt%	≥98wt%	品番	730785	730793	730807	730815	730777	粒径 (nm)	10	20	40	60	100	密度 (g/ml[25℃])	0.997	0.986	0.990	0.9976	0.9978	粒子数	3.6×10 ¹²	4.5×10 ¹¹	5.7×10 ¹⁰	1.7×10 ¹⁰	3.6×10 ⁹	蛍光スペクトル	λ _{em} = 388nm FWHM59 nm	λ _{em} = 401nm FWHM6 6nm	λ _{em} = 412nm FWHM6 3nm	λ _{em} = 431nm FWHM8 1nm	λ _{em} = 504nm FWHM1 67nm	サイズ	φ30nm×20μm、φ50nm×40μm、φ75nm×45μm、φ100nm×10μm	溶媒種類	エタノール、イソプロピルアルコール、エチレングリコール、水	標準濃度	0.625wt%（エタノール）	標準密度	5mg/ml（エタノール）	外	灰色懸濁液
品番	銀ナノ粒子乾粉-1	銀ナノ粒子乾粉-2																																																						
粒径	20 nm	60 nm																																																						
比表面積	15～20 m ² /g	5～8 m ² /g																																																						
TAP 密度	2～4 g/cm ³	2～4 g/cm ³																																																						
Ag 含量	≥95wt%	≥98wt%																																																						
品番	730785	730793	730807	730815	730777																																																			
粒径 (nm)	10	20	40	60	100																																																			
密度 (g/ml[25℃])	0.997	0.986	0.990	0.9976	0.9978																																																			
粒子数	3.6×10 ¹²	4.5×10 ¹¹	5.7×10 ¹⁰	1.7×10 ¹⁰	3.6×10 ⁹																																																			
蛍光スペクトル	λ _{em} = 388nm FWHM59 nm	λ _{em} = 401nm FWHM6 6nm	λ _{em} = 412nm FWHM6 3nm	λ _{em} = 431nm FWHM8 1nm	λ _{em} = 504nm FWHM1 67nm																																																			
サイズ	φ30nm×20μm、φ50nm×40μm、φ75nm×45μm、φ100nm×10μm																																																							
溶媒種類	エタノール、イソプロピルアルコール、エチレングリコール、水																																																							
標準濃度	0.625wt%（エタノール）																																																							
標準密度	5mg/ml（エタノール）																																																							
外	灰色懸濁液																																																							
性能／特性	<ul style="list-style-type: none"> ・ 高い電気伝導率 ・ 安定性 ・ 低い焼結温度 ・ 抗菌性（抗菌コーティングなどに利用） ・ 光学特性（粒子サイズにより、紫外・可視吸収スペクトルが変わり、また、 																																																							

	凝集によっても変化するという、ナノ銀特有の光学的特性を有する。) <ul style="list-style-type: none"> 銀ナノ粒子が溶液中に存在する場合、ナノ粒子表面に粒子を安定化させ凝集を伏せず電気二重層が形成される。
製造会社	【国内】 <ul style="list-style-type: none"> DOWA エレクトロニクス (株) : ナノ銀乾粉、インク、ペースト 三ツ星ベルト (株) : ナノ銀ペースト 三菱マテリアル (株) : ナノ銀インク 三菱製紙 (株) : ナノ銀インク (株) アルバック : ナノ銀インク DIC (株) : ナノ銀インク 日本イオン (株) : ナノ銀分散液 イーエムジャパン (株) 【海外】 <ul style="list-style-type: none"> Sigma-Aldrich Nanopoly など

(ii) 市場規模

銀ナノ粒子は主に、プリンタブルエレクトロニクス向け(配線材料)に応用されているが、ナノサイズの銀粉の販売量は少ない(2012年度4トン程度、平成26年度本調査事業報告書より)。

(iii) 主な用途

銀ナノ粒子;

- 診断薬: 定量的検出のための生物学的タグとして、バイオセンサーや多くの分析法で利用
- 抗菌: 衣服や靴、塗料、創傷被覆材、電化製品、化粧品、プラスチックなどに、その抗菌作用が利用
- 導電性: 導電性インクへの利用、熱的特性や電気伝導度の向上のために複合材料の成分として利用
- 光学性: 効率的な集光のために、また、金属増強蛍光(MEF: metal-enhanced fluorescence)や表面増強ラマン散乱(SERS:surface-enhanced Raman scattering)などの光学分光法の性能向上に利用

銀ナノワイヤー;

- 導電性コーティング: 透明導電性膜、フレキシブルエレクトロニクス用途での導電性コーティング
- プラズモンアンテナ: 銀ナノワイヤーに金属性ナノ粒子を付与することで、高いプラズモン効果をもつ、センサーやイメージング用のアンテナとして機能。
- 分子センサー: 銀ナノワイヤーの単層は、ラマン分光法と組み合わせた特定分子の検出の可能なセンサー用アレイの作製に用いられる。
- ナノコンポジット: ナノコンポジット用材料として研究されており、これらシステムにおいて高い誘電率を示す。

(iv) 研究開発事例

①世界最高性能の伸縮性導体を実現～ゴム内で銀ナノ粒子の自然形成現象発見による新素材への応用に期待～

開発者: 東京大学大学院工学系研究科 松久 直司、東京大学大学院工学系研究科 教授 染谷 隆夫

開発機構: 東京大学、科学技術振興機構、理化学研究所

概要: 科学技術振興機構(JST)の戦略的創造研究推進事業において、東京大学大学院工学系研究科の松久 直司 博士と染谷 隆夫 教授を中心とした研究チームは、元の長さの5倍の長さに伸ばしても 935 S/cmという世界最高の導電率を示す伸縮性導体の開発に成功し

た。この伸縮性導体は、ペースト状の材料を印刷することによって、ゴムやテキスタイルなど伸縮する素材の上に自由形の配線パターンを形成することができる。また、新素材の構造を高解像度の電子顕微鏡で詳細に調べたところ、ゴムにマイクロメートル寸法の銀フレークを混ぜるだけで、ナノメートル寸法の銀の粒子がゴムの中に均一に自然に発生する現象を発見した。印刷できる伸縮性導体は、高い伸縮性が要求されるスポーツウェア型のウェアラブルデバイスや人間よりも高い伸縮性を必要とするロボットの人工皮膚を実現する上で必要不可欠な技術である。従来の伸縮性導体は伸長させると導電率が大幅に減少するという課題があったが、本研究で発見した新現象によって解決される。この成果により、スポーツウェアやロボットの関節に簡単に高伸縮性センサーを形成できるようになり、今後ヘルスケアや人工触覚などさまざまな応用が期待される。

出典:JST ホームページ(2017/5/16 掲載)

<https://www.jst.go.jp/pr/announce/20170516-3/index.html>

②光で抗菌作用をコントロールできる銀ナノ粒子を開発

開発者:熊本大学 教授 新留琢郎、慶應義塾大学 准教授 寺川光洋、大日本塗料株式会社 溝口大剛

開発機構:熊本大学、慶應義塾大学、大日本塗料株式会社

概要:銀は様々な細菌の増殖を抑制する抗菌効果を持ち、特に薬剤耐性菌に対しても抗菌作用を示すため、抗生物質が効かない感染症にも効果があると期待されている。銀は、銀イオンあるいは銀ナノ粒子の形で抗菌剤として用いられるが、銀ナノ粒子は不安定で、その抗菌作用がすぐに失われてしまうという欠点があった。今回、熊本大学の新留琢郎教授、慶應義塾大学の寺川光洋准教授、大日本塗料株式会社の溝口大剛博士らの共同研究グループは、銀ナノ粒子を金でコーティングし、銀ナノ粒子の安定性を高めると共に、パルスレーザー光を照射することで、その抗菌作用をコントロールできる技術を開発した。光照射部位のみで抗菌作用を発揮させることができる本技術は、薬剤耐性菌対策や感染症治療への応用が期待できる。

出典:熊本大学ホームページ(2017/11/2 掲載)

<http://www.kumamoto-u.ac.jp/daigakujuhou/kouhou/pressrelease/2017-file/release171102-1.pdf>

③DIC 金属めっき膜の下地となる銀ナノ粒子および高分子密着層材料のパイロット生産を開始

開発者:DIC株式会社

開発機構:DIC株式会社

概要:DIC株式会社(本社:東京都中央区、社長執行役員:中西義之)は、金属めっき膜の触媒として用いる銀ナノ粒子と、銀ナノ粒子と基材の層間で優れた密着性を示す高分子密着層材料を開発し、2013年からサンプルワークを進めてきた。エレクトロニクス関連材料としての採用決定とともに、当社独自の分散・高分子設計技術を活用することで銀ナノ粒子の量産化が可能となったことから、パイロットプラント設備を整え、1月より生産を開始した。同開発品を用いためっき工法は、高密着性を有する高分子層を用いることで、基材表面を粗化(傷つけ)しない平滑な接合面において無電解金属めっき膜を形成できる画期的なプロセスである。一般的な無電解めっき工法では、粗化处理した基材表面にパラジウム触媒を付与し、金属膜を生成させる。高価なパラジウムを使用するためコスト負荷が高いことに加えて、回路基板などでは金属膜のエッチング後にパラジウムが残留し、絶縁信頼性を低下させる懸念があることから、再度パラジウムを除去するためエッチングを行っている。今回開発したプロセスでは、高分子密着層を銀ナノ粒子と組み合わせて使用することで、粗化しない平滑な基材表面に密着力が優れためっき膜下地を形成する。同プロセスは、極薄膜な高分子密着層の上に銀ナノ粒子を塗布し、その上に無電解金属めっきを施して金属めっき膜を生成する。同プロセスにより作製したプリント基板用途では、基材と銅めっき膜の界面が平滑なため、高周波信号の伝送ロスの縮小が可能となる。2020年の実用化が目標とされている第5世代移動体通信システム(5G通信)

や現状の無線 LAN より高速に通信できる超高速近距離無線通信、次世代の大容量無線通信システムなど、適用範囲の拡大が期待されている。また、同プロセスでは、銀ナノ粒子層が銅めっき膜と同じエッチング液で除去できるため、エッチング工程が1度で済み、工程短縮化や微細回路の形成を実現する。また、より厚いめっき膜が必要な場合には、電解めっきを施すことで任意の膜厚に調整することかできる。昨今、耐熱性や耐薬品性に優れるため、自動車部品や住設機器で使用されているポリフェニレンサルファイド(PPS)は、めっき工法や接着剤を使用したラミネート法による金属膜形成が難しいとされてきた。同プロセスは PPS に対しても平滑面での高い密着性を実現するため、金属部品の軽量化として PPS に金属めっき膜を密着させた新たな部品などへの展開が期待できる。

出典: DIC株式会社ホームページ(2017/4/4 掲載)

http://www.dic-global.com/ja/release/2017/20170404_01.html

(v) 利用事例

日本イオン(株)では、銀ナノ粒子の抗菌性を利用して、銀ナノ粒子を添加した抗菌プラスチック原料である、ナノピュア抗菌プラスチックを製造している。ナノピュア抗菌プラスチック内の銀の含有量は、2,000ppm であり、素材プラスチック 90~95%に対して、本製品を5~10%混合し、加熱成形することで、抗菌プラスチック製品が製造可能であり、抗菌剤としての配合率は、最終製品で、0.02~0.05%程度となる。

また、東京大学初のベンチャー企業 AgIC は、東京大学で開発された銀ナノインクを使った電位回路プリント技術をもとに、電子回路印刷キット「AgIC Print」としてクラウドファンディングサイト Kickstarter で資金調達を開始した。この技術は、AgIC の技術アドバイザーである東京大学の川原圭博准教授の研究成果をベースに事業化したものであり、専用の紙に銀ナノインクでペンを使って回路を書いたり、インクジェットプリンタで回路を印刷したりして、導電性テープや導電性接着剤で電位部品をつけることにより、基板製作やはんだ付けなどの手間なしに、また電子回路の試作に使われるブレッドボードなどと比べても簡単に電子回路が作成できる。これにより、製品のプロトタイプの開発期間が飛躍的に短縮され、低コストで開発できる。紙工作や折り紙のように手軽に電子工作を楽しめ、電子回路の教育や学習ツールへの応用も期待できる。

(平成 26 年度本調査事業報告書より)

(vi) ナノリスク評価

主な企業のナノ銀の製造現場では、排気やマスク等の保護具など、作業者の保護対策(マスクや作業着)や排気、装置の設置といった厚生労働省の通知(平成21年3月31日付け基発第0331013号 厚生労働省労働基準局長通達「ナノマテリアルに対するばく露防止等のための予防的対応について」)に基づく対策をとっている。

販売先に対しては、SDS の中で、安全対策や保管、廃棄に関する注意書きをはじめ、取扱いにおける注意や応急措置など細かく説明している場合が多い。

有害性情報についても各種毒性に関する情報について SDS 中に記載しているケースが多い。
(平成 27 年度本調査事業報告書より)

(カ) ナノニッケル

(i) 製品概要

サイズ	ニッケルナノ粒子； ・ ニッケル粉には、平均粒径が 2.2 μ m~7 μ m 程度のニカド電池や粉末冶金、ゲッター、溶接棒などに使用される製品(輸入品)がある。 ・ 積層セラミックコンデンサー(MLCC:Multi-layerCeramic Capacitor)の内部電極に使用されるニッケルナノ粒子は平均粒子 0.1~0.4 μ m である。；
形状	粉体、ペースト
計測技術	SEM、TEM

物性	<ul style="list-style-type: none"> MLCC は、誘電体セラミック材料と誘電体を挟む内部電極、内部電極を並列して接続し、印制回路基板へ接合する外部電極（端子）から構成される。 ニッケル超微粉は MLCC の内部電極として印刷・焼成する際に、膜の連続性に優れ、焼結性も均一で安定しており、MLCC の多層・薄膜化に適している。 電極材料には、かつて銀-パラジウム系ペーストが主に使用されていたが、パラジウム価格の高騰により非金属化が進み、ニッケル超微粉が使用されるようになった。 MLCC では電極材料と誘電材料を何層にも積層して同時焼成するため、誘電体と同レベルの焼結挙動を示す電極材料を選択する必要がある。この点でニッケルは融点が高く、BaTiO₃ などの焼成温度 (>1300℃) と同様の温度で溶融し始めることから金属電極層の形成に適している。 <p>(ニッケル超微粉)</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>製品</th> <th>平均径 (μm)</th> <th>比表面積 (m²/g)</th> <th>タップ密度 (g/cm³)</th> <th>粗粒カットポイント</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>NFP401</td> <td>0.4</td> <td>1.7</td> <td>3.9</td> <td>非分級品</td> </tr> <tr> <td>NFP401S</td> <td>0.4</td> <td>1.7</td> <td>3.9</td> <td>2μm</td> </tr> <tr> <td>NFP301S</td> <td>0.3</td> <td>2.6</td> <td>3.5</td> <td>2μm</td> </tr> <tr> <td>NFP201S/S D</td> <td>0.2</td> <td>3.4</td> <td>3.4/3.1</td> <td>2μm</td> </tr> <tr> <td>NFP201X/X D</td> <td>0.2</td> <td>3.7</td> <td>3.7/2.8</td> <td>0.8μm</td> </tr> <tr> <td>NFP201H</td> <td>0.2</td> <td>3.9</td> <td>3.8</td> <td>0.6μm</td> </tr> <tr> <td>NFP201Z</td> <td>0.2</td> <td>4.4</td> <td>3.7</td> <td>0.4μm</td> </tr> <tr> <td>NFP117J</td> <td>0.17</td> <td>5</td> <td>3.4</td> <td>0.5μm</td> </tr> <tr> <td>NFP113J</td> <td>0.13</td> <td>7</td> <td>3.1</td> <td>0.5μm</td> </tr> </tbody> </table> <p>出典：JFE ミネラル（株）HP http://www.jfe-mineral.co.jp/seihin/pdf/nickel1607_05.pdf</p>	製品	平均径 (μm)	比表面積 (m ² /g)	タップ密度 (g/cm ³)	粗粒カットポイント	NFP401	0.4	1.7	3.9	非分級品	NFP401S	0.4	1.7	3.9	2μm	NFP301S	0.3	2.6	3.5	2μm	NFP201S/S D	0.2	3.4	3.4/3.1	2μm	NFP201X/X D	0.2	3.7	3.7/2.8	0.8μm	NFP201H	0.2	3.9	3.8	0.6μm	NFP201Z	0.2	4.4	3.7	0.4μm	NFP117J	0.17	5	3.4	0.5μm	NFP113J	0.13	7	3.1	0.5μm
製品	平均径 (μm)	比表面積 (m ² /g)	タップ密度 (g/cm ³)	粗粒カットポイント																																															
NFP401	0.4	1.7	3.9	非分級品																																															
NFP401S	0.4	1.7	3.9	2μm																																															
NFP301S	0.3	2.6	3.5	2μm																																															
NFP201S/S D	0.2	3.4	3.4/3.1	2μm																																															
NFP201X/X D	0.2	3.7	3.7/2.8	0.8μm																																															
NFP201H	0.2	3.9	3.8	0.6μm																																															
NFP201Z	0.2	4.4	3.7	0.4μm																																															
NFP117J	0.17	5	3.4	0.5μm																																															
NFP113J	0.13	7	3.1	0.5μm																																															
性能／特性	<ul style="list-style-type: none"> 球形 粒子径の精密な制御が可能 平均粒子径 0.1~0.4μm シャープな粒度分布 幾何標準偏差 1.3~1.5 高い結晶性 平均結晶子サイズ>0.1μm 安定した表面酸化膜 表面が約 3nm の酸化膜で覆われている 平滑な粒子表面 高純度 Ni>99.9% 																																																		
製造会社	<p>【国内】</p> <ul style="list-style-type: none"> JFE ミネラル 昭栄化学工業 住友金属鉱山 東邦チタニウム <p>【海外】</p> <ul style="list-style-type: none"> 寧波広博納米新材料 など 																																																		

(ii) 市場規模

ニッケルナノ粒子の市場規模推移および予測

	2014年	2015年	2016年 見込	2017年 予測	2018年 予測	2019年 予測	2020年 予測
販売量(トン)	2,450	2,900	3,050	3,200	3,360	3,520	3,680
販売金額(百万円)	32,000	35,500	37,000	38,800	41,000	43,000	45,000

※販売金額はメーカー出荷ベース

出典：(株)富士キメラ総研「2016年 微粉体市場の現状と将来展望」

(iii) 主な用途

積層セラミックコンデンサー (MLCC:Multi-layerCeramic Capacitor) の内部電極

(iv) 研究開発事例

①小さな触媒格納庫－非晶質ニッケルナノ粒子の特異な触媒機能を初めて明らかに－
開発者:大阪大学大学院基礎工学研究科 教授 真島和志、准教授 劔隼人、特任助教 百合野大雅、産業技術総合研究所触媒化学融合研究センター 研究センター長 佐藤一彦、研究員 田中真司、ナノ材料研究部門 主任研究員 清水禎樹

開発機構:大阪大学、産業技術総合研究所

概要:大阪大学大学院基礎工学研究科の真島和志教授、劔隼人准教授、百合野大雅特任助教および産業技術総合研究所触媒化学融合研究センターの佐藤一彦研究センター長、田中真司研究員、ナノ材料研究部門の清水禎樹主任研究員の共同研究グループは、安価で入手容易なニッケルを用いて直径が最大 15 nm (nm は 10⁻⁹ m) の非晶質ナノ粒子を世界で初めて合成し、このニッケルナノ粒子を用いることで触媒的な炭素－炭素結合形成反応を達成した。一般的に、安価で毒性の低い非金属(ニッケルや鉄など)のナノ粒子は触媒活性が低く、有機合成反応への応用が難しいことが問題となっていた。今回の研究成果は、ニッケルナノ粒子でこれまで知られていた触媒活性の限界を打ち破り、炭素－炭素結合形成反応に対して、パラジウムや白金などの貴金属ナノ粒子より高活性な触媒として利用可能であることを明らかにしたものである。本研究によって、導電性高分子や医薬品などの部分骨格も安価に合成でき、身近な製品の大幅なコストダウンなど、実用的な展開が期待される。また、本研究の合成手法を用いることで鉄、銅、コバルトなど、ニッケル以外の金属粒子も容易に形成できることから、金属ナノ粒子の代表的な応用法であるナノマシンや量子ドットといった次世代のマテリアルを実現する大きなきっかけとなることが期待される。

出典:産総研ホームページ(2015/10/05 掲載)

http://www.aist.go.jp/aist_j/press_release/pr2015/pr20151005/pr20151005.html

(v) 利用事例

ニッケルナノ粒子は主に積層セラミックコンデンサー (MLCC:Multi-layerCeramic Capacitor) の内部電極に使用される。MLCC は、PC や携帯電話、デジタル家電、自動車電装などのキーデバイスであり、ニッケルナノ粒子は、MLCC の製造に欠かせない材料となっている。

(vi) ナノリスク評価

主な企業のナノニッケルの製造現場では、排気やマスク等の保護具など、作業者の保護対策(マスクや作業着)や排気、装置の設置といった厚生労働省の通知(平成21年3月31日付け基発第0331013号 厚生労働省労働基準局長通達「ナノマテリアルに対するばく露防止等のための予防的対応について」)に基づく対策をとっている。

販売先に対しては、SDS の中で、安全対策や保管、廃棄に関する注意書きをはじめ、取扱いにおける注意や応急措置など細かく説明している場合が多い。

有害性情報についても各種毒性に関する情報について SDS 中に記載しているケースが多い。

(キ) ナノセルローズ

(i) 製品概要

サイズ	セルローズナノファイバー：幅 4~100nm、長さ 5µm 以上 セルローズナノクリスタル：幅 10~50nm、長さ 100~500nm
形状	繊維状
計測技術	SEM
物性	セルローズナノファイバー (補強用繊維)；

	密度	1.5 g/cm ³
	弾性率	140 GPa
	強度	3 GPa (推定値)
	熱膨張	0.1 ppm/K
	出典：京都大学 生存圏研究所 生物機能材料分野	
性能／特性	<ul style="list-style-type: none"> ・ 軽くて強い（鋼鉄の 1/5 の軽さで 5 倍以上の強さ） ・ 大きな比表面積（250m²/g 以上） ・ 熱による変形が小さい（ガラスの 1/50 程度） ・ 植物由来 ・ ガスバリア性が高い ・ 水中で特徴的な粘性を示す 	
製造会社	【国内】 <ul style="list-style-type: none"> ・ 王子ホールディングス（株） ・ 三菱化学（株） ・ 日本製紙（株） ・ （株）スギノマシン ・ 旭化成せんい（株） ・ ダイセルファインケム（株） 	

(ii) 市場規模

セルロースナノファイバー(CNF)は現時点では研究開発段階で、サンプル供給が中心であり、年間数トン規模の需要と推定されている。研究開発が進められているシングル CNF については、本格的な量産開始は数年先となる見込みである。また、2013 年には国内で各社が実証試験設備などを建設または稼働させ、サンプル販売に乗り出したことから、今後順調に用途開拓および技術確立が進めば、2020 年には年間数百トン～1,000 トンレベルまで市場拡大する潜在需要があると予測されている。

ただし、課題も多く、初期段階では食品添加用や増粘剤用途での採用がスタートしているが、これだけでは市場の広がりが期待できないため、市場規模の大きいフィルム用途の需要創出が鍵となると考えられている。

現時点で想定されている用途は、フレキシブル製品向けの透明基板、食品や化粧品・医療などに応用可能なバリアフィルム包材、細胞培養基材、医療用フィルム・シート、電池用のセパレータなどである。高付加価値ニーズが高く、比較的高コストでも採用可能性はある。これらの用途での採用増加により量産性を高め、コストダウンを図る必要がある。中長期的な方向性としては、フィルター用途への展開が期待されるものの、すでにある炭素繊維やアラミド繊維、CNT などの代替にはやはりコストがネックとなる。また、現段階では添加後の均一分散性、樹脂との密着性・相溶性など、技術的課題も残るため、さらなる研究開発が進められている。なお、構造材などの各種用途では、従来の鉄鋼材料やコンクリート材料から、成形性や軽量性に優れる樹脂材料に置き換える動きがあり、その際課題となる機械的強度を補完するために補強用繊維が使用される。潜在的な需要は大きく、今後の高成長が期待できる。CNF はコストを含め、まだ市場の方向性は不透明であるが、植物由来で持続可能な次世代ナノマテリアルとして大きなポテンシャルを秘めた材料と考えられている(富士キメラ総研「2014 年高機能添加剤・ハイブリッドマテリアルの将来展望」)。

なお、CNF は自動車部品や食品の鮮度を保つ包装材、液晶ディスプレイなど様々な用途に利用可能であると考えられており、経済産業省では、2030 年に 1 兆円規模の市場に育てている目標を掲げ、産学連携の支援も始まっている。

(iii) 主な用途

CNF の応用用途は広く、様々な用途が提案されている。現在検討が進められている主要な用途を分野別に以下に示す；

- ・ エレクトロニクス:フレキシブル透明基板、電池用セパレータ、他
- ・ 自動車:構造材、自動車部品

- ・ 包装:ガスバリアフィルム(食品、化粧品、医薬品など)
- ・ 建材:高機能内装材、他
- ・ 医療・医薬:生体適合材料、止血剤、医療用フィルム、他
- ・ その他:増粘剤、化粧品原料、食品添加物、各種補強剤、他

(iv) 研究開発事例

①耐水性に優れたセルロースナノファイバーシート開発

開発者:王子ホールディングス株式会社

開発機構:王子ホールディングス株式会社

概要:王子ホールディングス株式会社は世界で唯一、細さ3~4ナノメートルの超微細CNFを用いたCNF連続透明シートを開発、製造し、商品名「アウロ・ヴェール」「アウロ・ヴェール 3D」としてサンプルワークを進めている。従来品の弱点をカバーする耐水性に優れたCNF連続透明シート「アウロ・ヴェール WP」の開発に成功した。CNFは植物繊維であるため、従来のCNFシートは耐水性に劣るといった欠点があったが、「アウロ・ヴェール WP」は、当社CNF透明シートの特長である、高い透明性、フレキシブル性、低熱膨張性、優れた成形加工性、ガスバリア性に加え、更に耐水性を有するという、まったく新しい特徴を持った画期的なシートである。これにより、従来のCNFシートでは困難であった高湿環境下での使用が可能となり、新たな分野・用途への展開が期待できる。

出典:王子ホールディングス株式会社ホームページ(2017/10/26掲載)

https://www.ojiholdings.co.jp/Portals/0/resources/content/files/news/2017/171026_jp.pdf

②次世代新素材「セルロースナノファイバ」を使用した電子材料を開発 電子材料を開発

開発者:太陽ホールディングス株式会社

開発機構:太陽ホールディングス株式会社

概要:太陽ホールディングス株式会社は、植物由来の次世代新素材として注目される「セルロースナノファイバー(以下、CNF)」を、世界で初めて電子部品用絶縁材料に使用する独自技術を開発した。エレクトロニクス製品の小型軽量化により電子部品の高密度化が進んでおり、電子部品に使われる絶縁材料には、高性能化、高信頼性化が求められている。今回、CNFの高強度、低熱膨張率などの特性に注目し、研究の結果、さらに高性能な電子部品用絶縁材料を実現した。電子部品のプリント配線板に使われる絶縁材料は、プリント配線板上の配線や半導体などと同様の低熱膨張率化が求められる。一般的に、電子部品用絶縁材料に使われる樹脂は、熱膨張率が高く、充填剤を混ぜ合わせて低熱膨張化させる方法が採られている。しかし、充填剤には絶縁材料を脆くする性質があり、現在の方法では、低熱膨張率化と高強度化の両立に限界がある。そこで、CNFが樹脂中で相互作用をもち、少量でも樹脂物性改善に大きな効果が発現することに着目し、電子部品用絶縁材料に応用することで、さらなる低熱膨張率化を図ると同時に強度を向上させる新たな方法を開発した。CNFは親水性が高く、一般的な樹脂に均一に分散することは困難であった。これを解決するため、各種CNF材料と樹脂との組み合わせや、複合化方法を研究し、世界に先駆けて、CNFを使用したより高性能な電子部品用絶縁材料を実現した。

出典:太陽ホールディングス株式会社ホームページ(2017/5/25掲載)

http://www.taiyo-hd.co.jp/_cms/wp-content/uploads/2017/05/20170525_01.pdf

③セルロースナノファイバー(CNF)と日本の伝統工芸「漆」の融合

開発者:日本製紙株式会社

開発機構:日本製紙株式会社

概要:日本製紙株式会社は、明治大学名誉教授の宮腰 哲雄氏、および漆芸家の石井 昭氏と共同で、日本古来の天然塗料である漆への、木材から得られる最先端素材であるセルロース

ナノファイバー(以下CNF、当社製品名「セレンピア TM」)の添加について研究を進めてきたが、今回「セレンピア TM」添加の漆塗料は、通常の漆塗料よりも高光沢、高強度の性能を発揮することを確認した。漆の木から採取した樹液は、古来、精製することにより、主に塗料として使われてきた。木や紙などを原料とする器物に漆を塗る漆器は、漆の効果により強度が増して長持ちさせることができ、また、塗り上がりの美しさから、日本各地で伝統的な美術工芸品としての歴史を誇る。近年、漆の需要増を背景に、漆の塗面の長寿命化など漆自体の性能向上が求められていることから、日本製紙株式会社、宮腰教授および石井氏は、CNFが木質バイオマスであることに着目し、昨年1月より、「セレンピア TM」を漆塗料に添加する共同研究を開始した。共同研究では、漆塗料へのCNF添加の手法確立とともに、その効果の確認を行ってきたが、「セレンピア TM」の添加により、添加しない場合に比べて、塗面の光沢が向上すること、また、曲げ強度は応力として数十パーセント以上アップすることが確認でき、漆の機能性向上に成功した。

さらに、「セレンピア TM」の添加により、高光沢、高強度に加えて、肉持ち感が良く、経時劣化を遅らせる効果も期待できることから、今後は、伝統と最先端の技術を融合させた新しい漆塗料としての商品開発を進めていく。

出典：日本製紙株式会社ホームページ(2017/11/29 掲載)

<http://www.nipponpapergroup.com/news/year/2017/news171129004002.html>

(v) 利用事例

王子ホールディングスと三菱化学は共同で研究開発を行っている。また、両者は NEDO プロジェクトに参加し、京都大学と共同研究開発を行っている。2社はCNFを利用した透明連続シートを開発し、2013年3月よりサンプル供給を開始している。透明性、温度変化による寸法安定性、強度などに優れ、OLEDなどのフレキシブル透明基板向けへの展開が期待される。

スギノマシンは同社独自の加工技術「超高速ウォータージェット技術」により、CNFの製造を行っている。キッチン・キトサンも合わせて製造し、バイオマスナノファイバー「BiNFis(ビんフィス)」シリーズとして販売している。なお、スギノマシンが販売しているCNFはシングル品ではなく、径が約20nm、長さが2 μ mのもので、触媒などを使用せずに、水とCNFのみで構成された素材を生産できるため、食品や医療向けへの展開がしやすいことが強みである。

旭化成せんいでは、球状のセルロースナノビーズを開発し、着色したセルロースナノビーズが、イムノクロマト診断キットの高感度化に寄与できるとして、インフルエンザ診断キットの着色粒子として利用されている。同社の開発したセルロースナノビーズは、高い分散安定性と優れた耐薬品性をもち、沈降回収が可能であるという特徴を有する。高い分散安定性では、界面活性剤を添加しなくても長期間の安定分散が可能であり、耐薬品性では、水だけでなく有機溶媒中でも安定分散が可能であるという特徴を示す。また、沈降回収に関しては、遠心分離により、容易に回収が可能であるという特徴がある。着色したセルロースナノビーズをイムノクロマト診断キットに採用することで、少ない検査対象物質でも検出可能で、病気の早期発見・診断が可能となる。

日本製紙では、セルロースナノファイバーを含有する製紙用コーティング材を開発している。このコーティング材の固形分中のセルロースナノファイバーの含有量は、0.02~0.05重量%である。

(平成27年度本調査事業報告書より)

(vi) ナノリスク評価

・PFI(Paper and Fiber Research Institute)(ノルウェー)

様々な食品、医薬品にセルロースが使用されており、セルロースそれ自身には毒性は無いと考えている。ナノセルロースが毒性を示すとすれば、ナノの形態、残存薬品、添加剤の影響が考えられる。

前処理法や乾燥方法、表面修飾法が異なる様々なタイプのCNF材料の細胞毒性をISO 10993-5(Biological Evaluation of Medical Devices - Part 5: Tests for *In Vitro* Cytotoxicity)で評価した結果、界面活性剤の一種であるCTAB(Cetyl trimethyl ammonium

bromide)を吸着させたCNF 以外のCNF には細胞毒性は認められなかった(イタリアのモテナ大学と共同で実施)。

・UPM-Kymmene Oyj(フィンランド)

Occupational Safety(労働者の安全)については、UPM とStora Enso の両社がフィンランド労働健康研究所(Finnish Institute of Occupational Health)にサンプルを提出し、評価を受けている。製造物の安全関連については、EU 委員会や、ユーザーと協力している。UPM が製造した各種CNF(Biofibrils)に関しては、UPM 独自に試験を行い、細胞毒性、炎症性、遺伝毒性などが無いことを確認。環境、安全、健康問題や標準化の課題については他国のパートナーと協力出来る分野である。

・メイン州立大学(米国)

自らのサンプルについては外部機関に評価を依頼し、無毒との結果を得ている。FPL (ForestProducts Laboratory)が安全性評価に関する費用を出しており、米国ではFPL が主導していると推測される。

・FPInnovations

硫酸基を持ったCNF についてはカナダの安全性評価をクリアし、食品、医薬品に利用できるまでの許可を得ている。現在、同様の申請を米国、EU にて実施中である。国内で開発を行っている企業においても、ナノセルロース自体が健康被害を起こす可能性は低いと様々な食品、医薬品にセルロースが使用されており、セルロースそれ自身には毒性は無いと考えている。ナノセルロースが毒性を示すとすれば、ナノの形態、残存薬品、添加剤の影響が考えられる。

前処理法や乾燥方法、表面修飾法が異なる様々なタイプのCNF 材料の細胞毒性をISO 10993-5(Biological Evaluation of Medical Devices - Part 5: Tests for *In Vitro* Cytotoxicity)で評価した結果、界面活性剤の一種であるCTAB(Cetyl trimethyl ammonium bromide)を吸着させたCNF 以外のCNF には細胞毒性は認められなかった(イタリアのモテナ大学と共同で実施)。

(平成27年度本調査事業報告書より)

(ク) 量子ドット

(i) 製品概要

サイズ	通常、2-10 nm の直径で、10-50 個ほどの原子で構成
形状	コロイドナノ結晶
計測技術	SEM、ゼータ電位
物性	現在のところ、量産された商品での物性値を開示したデータは確認できなかった。
性能/特性	<ul style="list-style-type: none"> ・ 量子ドットは3次元かつナノサイズの半導体結晶に電子が量子力学的に閉じ込められており、従来の材料とは異なる。 ・ 量子ドットのサイズが小さくなると、半導体のバンドギャップが大きくなり、サイズによって半導体の光ルミネセンス発光波長を調節することが可能である。 ・ 量子ドットが非常に鋭い発光スペクトルと高い量子効率をもち、オプトエレクトロニクスおよびイメージングの多くの用途において理想的な発光団となっている。
製造会社	<p>【海外】</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ Mknano (Canada) ・ Attonuclei (France) ・ Qlight Nanotech (Israel)

	<ul style="list-style-type: none"> ・ NanoAxis (USA) ・ Antibodies Incorporated (USA) ・ Cromoz (USA) ・ Crystalplex (USA) ・ Evident Technologies (USA) ・ Ocean Nano Tech (USA) ・ Quantum Materials Corp. (USA) ・ NANOSYS Inc. (USA) <p>出典：平成 28 年度本調査事業報告書より</p>
--	---

(ii) 市場規模

QD ディスプレイは、これまで QD TV を生産する韓国大手 TV メーカー向けに限定して生産されてきており、2016 年の QD 材料世界出荷数量(メーカー出荷ベース)は 30t(前年比 200.0%)、QD シート用バリアフィルム世界出荷数量は 640 万㎡(同 200.0%)となった。今後、中国の複数の TV メーカーが QD TV の量産を開始する予定であり、QD ディスプレイ部材市場も大きく伸長する見通しである。2017 年の QD 材料世界出荷数量(メーカー出荷ベース)を 77t(前年比 256.7%)、QD シート用バリアフィルム世界出荷数量は 1,600 万㎡(同 250.0%)と予測されている(矢野経済研究所)。

(iii) 主な用途

CNF の応用用途は広く、様々な用途が提案されている。現在検討が進められている主要な用途を分野別に以下に示す；

- ・液晶ディスプレイ
- ・LED 照明
- ・太陽電池
- ・熱電変換材料
- ・バイオイメージング

(iv) 研究開発事例

①シリコン量子ドット構造で超高精度量子ビットを実現

開発者：東京大学 大学院工学系研究科 教授 樽茶 清悟、理化学研究所 基礎科学特別研究員 米田 淳

開発機構：科学技術振興機構、理化学研究所、東京大学、東京工業大学、慶應義塾大学、名古屋大学

概要：JST 戦略的創造研究推進事業において、樽茶 清悟 理化学研究所 グループディレクター／東京大学 大学院工学系研究科 教授、米田 淳 理化学研究所 基礎科学特別研究員らの研究グループは、シリコン量子ドットにおいて世界最高水準の演算精度をもつ電子スピン量子ビット素子を開発した。量子コンピューターは次世代コンピューターの候補として注目され、その情報を担う量子ビットの開発競争が、超伝導素子を筆頭にさまざまなシステムにおいて世界的に激化している。半導体素子を用いた量子ビットの実装は、産業応用の観点から重要である一方で、量子演算速度と情報保持時間の両立が難しく、高性能化が大きな課題となっていた。本研究グループは、慶應義塾大学の伊藤 公平 教授と名古屋大学の宇佐美 徳隆 教授らが新たに開発した、磁氣的雑音の極めて少ない同位体制御シリコン基板を用いて量子ドット素子を作製した。これと特殊な形状の微小磁石を用いた高速スピン操作を組み合わせ、従来の量子ビットに比べて約 100 倍の演算速度と約 10 倍の情報保持時間を同時に達成し、量子演算の誤り率の最高値を従来値より約 1 桁減少させることに成功した。半導体同位体技術を適用したことで、この素子における電子スピンの量子情報喪失は、通常の磁氣的雑音ではなく、電荷雑音が支配していることを初めて明らかにした。本研究成果は、産業集積化に適したシリコン・ナノ構造における超高性能の電子スピン量子ビットの実装方法を確立するもの

で、今後これを用いたシリコン量子コンピューター開発の加速が見込まれる。本研究は、東京工業大学の小寺 哲夫 准教授、慶應義塾大学の伊藤 公平 教授、名古屋大学の宇佐美徳隆 教授らと共同で行った。

出典:JST ホームページ

<https://www.jst.go.jp/pr/announce/20171219/index.html> (2017/12/19 掲載)

②DIC 米・Nanosys とともにインクジェット印刷方式によるディスプレイ向け量子ドットカラーフィルタ用インキを共同開発中。

開発者:DIC株式会社、Nanosys, Inc.

開発機構:DIC株式会社、Nanosys, Inc.

概要:DIC株式会社は、Nanosys, Inc. (本社:米国カリフォルニア州ミルピタス)とともにインクジェット印刷方式によるディスプレイ向け量子ドットカラーフィルタ用インキを共同開発している。量子ドット(QD)は、発光性の無機半導体ナノ粒子である。粒子径を変えることで発光色を自在に制御できることから、次世代ディスプレイ材料として注目を集めている。その中でも、量子ドットカラーフィルタ(QD-CF)は、液晶ディスプレイや有機 EL ディスプレイと組み合わせることで、既存のディスプレイと比較して、低消費電力化、色再現範囲拡大、視野角拡大が実現できるデバイスである。また、QD-CF を大型ディスプレイへ適用するためには、既存のカラーフィルタの主要製法であるフォトリソ方式よりも、QD 材料のロスを最小化できるインクジェット印刷方式が理想的である。最先端材料である QD は、その製造コストが高価であることも需要拡大へのハードルとなっているが、インクジェット印刷方式であれば、より低コストで QD-CF を製造することができる。QD のディスプレイへの応用は、カドミウム系材料で先行していたが、サステナビリティの観点から、カドミウムフリーQD の開発が強く望まれている。Nanosys は世界有数のカドミウムフリーQD メーカーであるとともに、QD 材料のノウハウ、特許を多数所有しているトップ QD メーカーである。DIC は、世界最大のインキメーカーであり、これまで培った分散技術、配合技術、樹脂をはじめとした豊富なインキ材料リソースなどのインキ設計に必要な技術を多数所有している。Nanosys のカドミウムフリーQD と、DIC のインキ設計技術をコラボレーションすることで、世界初のカドミウムフリーQD インクジェットインキの開発を目指す。QD インキ設計に際して、現在、さまざまなインクジェットヘッドの種類や生産ラインに対応できるよう、熱硬化型インキおよび UV 硬化型インキでの開発を進めている。DIC では、この QD インクジェットインキを、液晶材料、カラーフィルタ用有機顔料に続くディスプレイ材料として、2020 年の上市を目指して開発を進めていく。

出典:DIC ホームページ(2017/12/06 掲載)

http://www.dic-global.com/ja/release/2017/20171206_01.html

③分子を用いた縦型共鳴トンネルトランジスタを開発。

開発者:物質・材料研究機構 国際ナノアーキテクトニクス研究拠点 量子デバイス工学グループ
主任研究員 早川竜馬、グループリーダー 若山裕、統合型材料開発・情報基盤部門 情報
統合型物質・材料研究拠点 副拠点長 知京豊裕

開発機構:国立研究開発法人物質・材料研究機構

概要:国立研究開発法人物質・材料研究機構 国際ナノアーキテクトニクス研究拠点 量子デバイス工学グループの早川竜馬 主任研究員、若山裕 グループリーダー、統合型材料開発・情報基盤部門 情報統合型物質・材料研究拠点の知京豊裕 副拠点長の研究グループは、分子を量子ドットとして用いた縦型共鳴トンネルトランジスタの作製および動作の実証に成功した。シリコンデバイスと同じ微細化プロセスを適応し、分子の持つ離散的なエネルギー準位を利用して、“0”と“1”の 2 値だけでなくトランジスタの多値制御に繋がる成果を得た。次世代トランジスタに求められる微細化、高集積化、低消費電力化に加え、高速化を同時に実現する分子デバイスの開発につながると期待される。単一分子をトランジスタやメモリの素子に用いる分子デバイスの開発は、究極のナノエレクトロニクスとして期待されており、ここ 20 年の間に、単一分

子の電気伝導を計測する技術が確立され、分子の優れた機能が示されてきた。しかし、分子デバイスを集積する技術が確立されておらず、いまだ基礎物性の評価に留まっている。一方、シリコントランジスタのさらなる高速化、高集積化、低消費電力化を実現するため、電子のトンネルリングを用いたトンネルトランジスタや、多値制御を可能とする単電子トランジスタが注目されている。ただ、トンネルトランジスタは、“0”と“1”の2値動作という点では従来のトランジスタと変わらず、単電子トランジスタも量子ドットのサイズをナノスケールで均一に制御することが難しいため、いまだ実用化されていない。これらの問題を解決するため、本研究グループはこれまで、絶縁体の間に分子を壊すことなく集積する技術を確認し、分子を量子ドットとして、絶縁体間に共鳴トンネル電流が流れることを実証してきた。分子はナノスケールで均一に合成できるため、サイズの制御も容易である。さらに、分子のエネルギー準位が分子設計や外場によって制御できる利点を活かして、共鳴トンネル電流の多値制御も可能であることを2端子構造において実証してきた。今回、上記成果をさらに発展させ、絶縁体部分に分子を内包したチャンネル層を、既存のリソグラフィ技術を用いて微細加工することにより、縦型共鳴トンネルトランジスタを作製した。既存の微細化技術は、有機材料であるレジストや有機溶媒を使用するため、通常の分子デバイスでは使用できない。しかし今回提案したトランジスタ構造では、分子が絶縁膜で保護されているためシリコンプロセスで培った微細化技術が適応できる。さらに、作製したトランジスタを用いて、低温条件下（20K）にて、ゲート電圧によってトンネル電流が階段状に変化する様子を観測した。今回作成したトランジスタ構造は、縦型のため高集積化が可能で、トンネル電流を使うことで低消費電力化も実現できる。さらに、分子設計に基づいたトランジスタの多値制御が実現できることを示しており、シリコントランジスタの限界を超えた高速化、高集積化、低消費電力化を実現する次世代ナノトランジスタの開発が期待できる。

出典:NIMS ホームページ(2017/07/31 掲載)

<http://www.nims.go.jp/news/press/2017/07/201707310.html>

(v) 利用事例

(株)QDレーザは光通信用量子ドットレーザを世界で初めて開発した。温度無依存で高速に動作する量子ドットレーザを世界で初めて実用化、量産化することを開発のターゲットとした。開発した量子ドットレーザは、省電力性(85°Cの高温で従来比30%減)、高温耐性(150°C以上)、温度安定性(100°Cまで発振しきい値電流がほぼ安定)に優れ、光通信装置の小型化・省電力化と高密度実装、及び、温度安定化回路の省略や調整・検査工数の削減を可能とする。また、(株)QDレーザは、コア技術であるGaAs基板上に量子ドットを形成する工程を自社で行い、ウエハをチップ化する工程では既存の大量生産ラインを活用することで、高い生産スループットと、コスト競争力を備え持つ。今後、量子ドットレーザ市場シェアの拡大が進み、地球規模の光通信インフラの発展に寄与すると期待される。開発した量子ドットレーザは、2010年度に20万台出荷され、2011年度は100万台の出荷を見込んでいる。

(NEDO ホームページ <http://www.nedo.go.jp/content/100186175.pdf>)

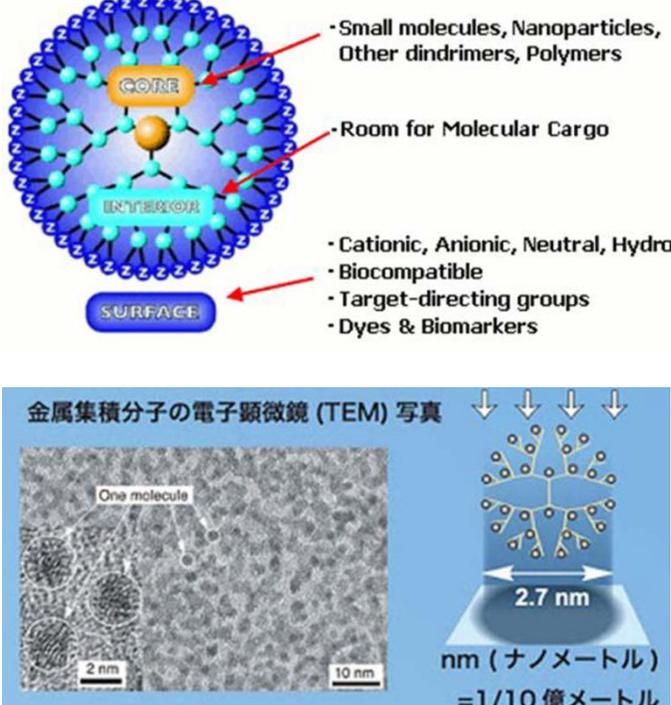
(vi) ナノリスク評価

現在、研究開発段階であり、ナノリスク評価に関する情報は得られなかった。

(ケ) デンドリマー

(i) 製品概要

サイズ	〔一次粒子〕 1~10nm 〔二次粒子〕 該当なし
形状	球状：構造が正確にコントロールされた1~10nmサイズの大きさの樹木状のポリマーである。大きく分けて2つのタイプ「Fréchetタイプ」と「Tomaliaタイプ」に分けられる。

	 <p>金属集積分子の電子顕微鏡 (TEM) 写真</p> <p>nm (ナノメートル) = 1/10 億メートル</p>
物性	<p>「core」、「interior」、および「surface」の 3 つの要素から構成される。各構成要素が特異な機能を発現すると同時に、ジェネレーションごとに成長していく dendrimer 特有のナノ構造の物性を決定する。</p>
性能／特性	<p>一般的に、単一分子量、粘度が低い、非晶性、コアおよび外殻による機能性付与が可能、単分子ミセル形成が可能、直径約 10nm 以下、内部に他分子や金属の包含が可能など、従来の高分子材料には見られない特長を持っている。また高世代 dendrimer では球状の分子形態と見なし、その球状の形態や分子表面に多数の官能基を導入できることから、医薬分野、電子材料、化学分野等において新しい高機能材料として期待されている。</p>
製造会社	<p>【国内】</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 大阪有機化学工業 「STAR-501」 ・ 日産化学工業 「ハイパーブランチポリマー」 ・ 伯東 「エステル型 dendrimer」 ・ ナード研究所 (受託) ・ 東京工業大学 / 山元・今岡研究室 ・ 大阪府立大学 / 河野教授

出典：平成 28 年度本調査事業報告書

(ii) 市場規模

大学や各社で研究開発が進められているが、工業用、医療用としては未だに製品化されたという情報はない。価格が高ことから工業用製品としては特殊用途に限定されるため、実際に製品化されるのかは疑問である。潜在的な市場として、dendrimer の特長である様々なゲスト分子を内部に取り込むことができるため、医療用ドラッグデリバリーシステム (DDS) に採用される可能性がある。採用されれば DDS 分野で大きな市場が立ち上がると見られる。(平成 28 年度本調査事業報告書)

(iii) 主な用途

現在検討が進められている主要な用途を分野別に以下に示す；

- ・ 医療用ドラッグデリバリーシステム (DDS)

- ・光学材料
- ・電子材料
- ・生医学材料などの高機能材料（平成 28 年度本調査事業報告書）

(iv) 研究開発事例

①溶媒蒸気の識別が可能な新しい分子集合体材料を作成一取り込む分子に応じて蛍光が大きく変化する多孔性 dendritic 結晶

開発者:筑波大学数理物質系 教授 山本洋平、西堀英治、数理物質科学研究科大学院生 中嶋紗英、東京工業大学科学技術創成研究院化学生命科学研究所助教 アルブレヒト建、教授 山元公寿、京都大学工学研究科 教授 植村車史准、博士 北尾岳史

開発機構:筑波大学、東京工業大学、京都大学、ハイデルベルグ大学

概要:筑波大学数理物質系山本洋平教授、西堀英治教授、数理物質科学研究科大学院生 中嶋紗英(物性・分子工学専攻博士前期課程)は、東京工業大学科学技術創成研究院化学生命科学研究所アルブレヒト建助教、山元公寿教授、京都大学工学研究科植村車史准教授、北尾岳史博士とハイデルベルグ大学との共同研究で、 π 共役 dendritic から形成する多孔性マイクロ結晶注 2) の作成に成功した。Dendritic は分子量が単一の巨大分子で、樹状高分子とも呼ばれている。その立体的な高さから、Dendritic はアモルファスな凝集構造を形成することが多く、特に世代の大きな dendritic においてその傾向は顕著である。今回、本研究グループは、第 3 世代の dendritic を有する π 共役 dendritic の自己組織化について詳細に検討した。その結果、この dendritic が極めて多孔質な結晶を形成することを見出した。この dendritic 結晶は、大きな細孔表面積と特異な電子状態を備えているために、溶媒蒸気のばく露により蛍光強度が顕著に増大すると同時に大きな蛍光色変化を示すことを明らかにした。蛍光特性と多孔性を併せもつ dendritic 集合体は、溶媒蒸気や気体分子などを識別する新しい蛍光プローブとしての応用が期待できる。

出典:筑波大学ホームページ(2018/02/21 掲載)

<http://www.tsukuba.ac.jp/wp-content/uploads/180221yamamoto-1.pdf>

②蛍光特性を示す CdS 量子ドットと液晶性を示す dendritic から"有機無機ハイブリッド dendritic"を開発

開発者:東北大学 多元物質科学研究所准教授 蟹江澄志、博士 松原正樹、教授村松淳司、シェフィールド大学 教授 Goran Ungar

開発機構:東北大学、シェフィールド大学

概要:東北大学 多元物質科学研究所 蟹江澄志 准教授、松原正樹 博士(現 仙台高等専門学校 助教)、村松淳司 教授(同研究所所長)、シェフィールド大学 Goran Ungar 教授らの研究グループは、東北大学 多元物質科学研究所 秩父重英 教授グループおよび九州大学 先導物質化学研究所 玉田 薫 教授グループと連携して、硫化カドミウム(CdS)量子ドット表面に液晶性を示す dendritic を密に修飾することで、CdS 量子ドットに dendritic 由来の液晶性を付与した。得られた dendritic 修飾量子ドットはこれまでで最も非対称性の高い液晶性立方晶構造を形成し、長周期的に規則配列することを見出した。さらに、CdS 量子ドットが自己集積すると、外部の光エネルギーにより CdS 量子ドット内部に生じた励起エネルギーが周囲の dendritic にほぼ全てエネルギー遷移することで量子ドットの発光強度を自在に制御できることを明らかにし、その機構を解明した。このような量子ドットの発光を制御するエネルギー遷移機構は光のエネルギーを直接電気エネルギーに変換できる可能性があり、高効率太陽電池や高輝度発光ダイオード(LED)の開発につながる事が期待できる。さらに外部の温度変化により発光強度が変化することから生鮮食品の熱履歴センサーなどの開発にもつながると期待できる。

出典:東北大学ホームページ(2017/6/9 掲載)

<https://www.tohoku.ac.jp/japanese/2017/06/press20170605-02.html>

(v) 利用事例

デンドリマーは、そのコアはデンドロンで覆われており周囲から孤立した環境にあるため、特異な発光挙動や反応性を示すことが見出されて新しい機能性物質として期待され、下記に示すような応用が研究されている。

・ドラッグデリバリー

病気の治療の過程で、医薬品の投与に際して体内に持ち込まれた薬剤が、対象の部位・臓器に到達してその効力を発揮することが期待される。治療薬の投与は経口・注射・皮膚への塗布などを通して行われるが、患部に到達する薬の濃度は高くない。一方がんの治療薬では、がん細胞だけではなく健康な細胞も損なわれてしまうこともある。このようなケースでは、薬剤投与後、がん細胞に到達して初めて攻撃を開始することが望まれる。さらにがん治療の対象となっている細胞が、投与する薬の分子を呼び寄せることができれば、大きな治療の効果が期待できる。

デンドリマーはその分子の構成から、薬の分子を抱き込んで運ぶ機能、攻撃対象となる病気の細胞と接触したら薬を放出する機能、さらに例えばがんに侵された細胞が引きつける機能などをデンドリマーが保有するよう、様々な工夫をする必要がある。

(平成 28 年度本調査事業報告書)

(vi) ナノリスク評価

現在、研究開発段階であり、ナノリスク評価に関する情報は得られなかった。

(コ) カーボンブラック (導電性)

(i) 製品概要

サイズ	粒径 30~40nm		
形状	CB の最小単位の集合体は炭素 6 員環が 30 ~ 40 個結合したもの (層平面 (プレート)) であり、この層平面が 3~5 層ファンデルワールス力で約 3.5 Å の間隔に積み重なったものが結晶子である。この結晶子は粒子の外周に沿って平行に配列しているが、内部にいくほどその配列は不規則になっている。この結晶子が 1000 ~ 2000 個集合して 1 個の粒子を形成し、さらにこの粒子が 20 ~ 40 個程度相互に化学的物理的に結合 (ストラクチャー) している。		
計測物性	SEM、TEM		
	(導電性カーボンブラック)		
		ケッチェンブラック EC300J	ケッチェンブラック EC600JD
	DBP 吸油量 (c m ³ /100g)	360 (9g 法)	495 (15g 法)
	BET 比表面積 (m ² /g)	800	1,270
	揮発分 (%)	0.5	0.7
	pH	9	9
	灰分 (%)	0.05	0.1
	一次粒子径 (nm)	39.5	34
	出典：ライオン・スペシャリティ・ケミカルズホームページ http://www.lion-specialty-chem.co.jp/ja/catalog/01/k.php		
	(導電性カーボンブラック (樹脂・ゴム配合時の体積固有抵抗データ))		
		トーカブラック #5500	トーカブラック #4500
		トーカブラック #4400	
	算術平均粒子径 (nm)	25	40
	窒素吸着比表面積 (m ² /g)	225	58
	よう素吸着量 (mg/g)	254	63
	比着色力 (%)	98	68

	DBP 吸収量 (A 法) (c m ³ /100g)	155	168	135
	揮発分 (%)	1.4	0.6	0.7
	出典：東海カーボンホームページ http://www.tokaicarbon.co.jp/products/carbon_b/toka/conductive.html			
性能／特性	<p>・導電性カーボンブラックとしては、アセチレンブラックやケッチェンブラックが代表的であるが、その他ファーネス法によって製造されるカーボンブラックのうち高導電性を有するものもある。</p> <p>・アセチレンブラックはケッチェンブラックよりも比表面積は小さいが、高純度のため、不純物による影響が極めて少なく、比較的 low コストで導電性能を有しているため乾電池や二次電池、ゴムなどで採用されている。添加率は 10~40% である。</p> <p>・ケッチェンブラックは比表面積が極めて高く、単位重量当たりの量子数をアセチレンブラックに比べて 6~8 倍に高めることができる。そのため、低添加で高導電性を付与し、二次電池の中でも車載用途で採用されている。添加率は 5~20% である。</p> <p>・その他ファーネス法で生成された導電性カーボンブラックは低コストであり、樹脂への添加用途として帯電防止塗料向けの採用があり、その他、中国向け LiB の LFP 向け正極導電助剤として CNT と一緒に導電性を付与させ、車載用途で採用されているとみられる。添加率は 30~50% である。</p>			
製造会社	<p>【国内】</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ デンカ ・ ライオン・スペシャリティ・ケミカルズ ・ 旭カーボン ・ 東海カーボン ・ 三菱ケミカル <p>【海外】</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ Imerys Graphite&Carbon (ベルギー) 等 			

(ii) 市場規模

導電性カーボンブラックの市場規模推移および予測

	2014 年	2015 年	2016 年 見込	2017 年 予測	2018 年 予測	2019 年 予測	2020 年 予測
販売量(トン)	38,710	40,210	41,400	42,500	43,800	45,370	46,830
販売金額(百万円)	28,700	31,330	31,050	31,940	32,880	34,020	35,060

※販売金額はメーカー出荷ベース

出典：(株)富士キメラ総研「2017 年高機能添加剤・ハイブリッドマテリアルの現状と将来展望」

(iii) 主な用途

現在検討が進められている主要な用途を分野別に以下に示す；

- ・電線・ケーブル
- ・自動車
- ・一次電池
- ・二次電池
- ・導電ゴム
- ・ICトレイ

(iv) 研究開発事例

ここ数年間の新たな研究開発事例は確認されなかった。

(v) 利用事例

- ・一次電池は主にマンガン電池用正極集電体で採用されており、主にアセチレンブラックが採用されている。
- ・高圧ケーブルは、地域による規格や特性などから、日本ではアセチレンブラック、欧米ではケッチェンブラックが主に採用されている。
- ・海外を中心にフロントフェンダーや外板などの自動車外装用向けに採用されている。欧州の自動車メーカーは軽量化に加えて成形性が高く、設計を反映しやすいことから、プラスチックの需要が増加している。導電性カーボンブラックを添加することで、静電塗装を実現している。
- ・二次電池においては、主に正極の導電助剤として利用されている。主に採用されているのは、アセチレンブラックであり、高容量タイプなどに少量添加で高導電性を発現するケッチェンブラックが利用されている。今後市場をけん引していく用途であり、ウェイトは拡大していくとみられる。
- ・ゴム用途として複写機のローラーや部品があるが、採用は一部であるものの、ペーパーレス化やインクジェットの拡大などにより減少傾向である。

((株)富士キメラ総研「2017年高機能添加剤・ハイブリッドマテリアルの現状と将来展望」)

(vi) ナノリスク評価

カーボンブラックの輸送・貯蔵、使用等取扱上の施設は極力密閉構造としている。容器や配管等も外部に漏れないものを用い、点検孔、マンホール等解放される部分もシールで密閉している。カーボンブラックの袋詰め、解袋等の発塵作業に当たっては局所排気設備を用いると共に、集塵設備も併用して発生した粉じんを発生場所で除去している。また屋内作業場において浮遊粉じん濃度を極力下げるため全体換気設備を用いると共に、集塵設備も併用している。また、集塵設備で捕集した粉じんは産業廃棄物として処分している。

また労働者には、労働安全衛生法粉じん障害防止規則及びじん肺法の規則内容を教育している。例えば、保護具の使用:粉塵作業に従事する場合は、防じんマスク(国家検定に合格したもの)、防塵メガネ、ビニール又はゴム手袋の着用を指導徹底している。

出典:経済産業省 ナノマテリアル情報提供シート

http://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/other/nano_program.html

(サ)酸化アルミニウム

(i) 製品概要

サイズ	0.1~0.2µm			
形状	単粒子			
計測技術	SEM、TEM			
物性	(高純度アルミナ)			
	グレード	TM-DA	TM-DAR	TM-5D
	結晶形	α-アルミナ	α-アルミナ	α-アルミナ
	BET 比表面積 (m ² /g)	13.5	14.5	9
	1次粒子径 (µm)	0.1	0.1	0.2
	静嵩密度 (g/cm ³)	0.8	0.9	0.8
	タップ密度 (g/cm ³)	0.9	1	0.8
	成形密度 (g/cm ³)	2.2	2.3	2.3
	焼結密度 (g/cm ³)	3.95	3.96	3.93
	出典: 大明化学工業ホームページ http://www.taimei-chem.co.jp/product/07.html			
性能/特性	<ul style="list-style-type: none"> ・ 低温 (1250°C~1300°C) の焼成で理論密度の 98%以上まで緻密化する。 ・ 高強度、高硬度、耐摩耗性および耐蝕性に優れたセラミックスとなる 			
製造会社	【国内】 ・ 多木化学株式会社: 酸化アルミニウム分散液 (アルミナゾル バイラー)			

	ル) を製造、販売 ・ 日揮触媒化成株式会社：アルミナ粒子の水分散ゾル Cataloid を製造、販売 ・ 大明化学工業株式会社：各種 Al ₂ O ₃ 微粒子を製造、販売 ・ 日産化学工業株式会社 【海外】 ・ NANOSYS Inc. (USA) 出典：ナノ粒子応用研究会ホームページ https://www.nanoparticle.jp/nanoparticles-infomation/metal-oxide-nanoparticles/al2o3-nanoparticles/
--	--

(ii) 市場規模

ナノ粒子については研究開発段階であり、量産化は未だなされていない。

(iii) 主な用途

- ・光透過性の耐摩耗性コーティング
- ・ナノ構造改質剤
- ・超高性能フィルター材料
- ・触媒担体

(iv) 研究開発事例

①耐熱性に優れ、光をよく反射する断熱アルミナ膜を開発－真珠に似た積層構造によって光を反射－

開発者：産業技術総合研究所化学プロセス研究部門膜分離プロセス研究グループ主任研究員 小平 哲也、客員研究員水上 富士夫

開発機構：産業技術総合研究所、川研ファインケミカル株式会社

概要：国立研究開発法人 産業技術総合研究所(以下「産総研」)化学プロセス研究部門膜分離プロセス研究グループ小平 哲也 主任研究員、水上 富士夫 客員研究員は、川研ファインケミカル株式会社(以下「川研」)と共同で、高い断熱性能と可視光～近赤外領域にて光反射率 70 %以上を併せ持つ銀色の高耐熱性アルミナ膜を開発した。

この膜は 1000 °Cの耐熱性と同時に光反射能力を有するアルミナ多孔質膜であり、アルミナナノファイバー(太さ約 6 nm、長さ約 3000 nm)のゾル溶液にアンモニアを加えて乾燥させるという簡単な方法により調製可能である点も特徴であり、さまざまな応用分野への展開が期待される。

出典：産総研ホームページ(2015/08/26 掲載)

http://www.aist.go.jp/aist_j/press_release/pr2015/pr20150826/pr20150826.html

②アルミニウムのナノ構造体で「色」を作る－半永久的に失われず塗料より軽い「メタマテリアル・カラー」－

開発者：理化学研究所 田中メタマテリアル研究室 主任研究員 田中拓男、国際特別研究員レニルクマール・ムダチャディ

開発機構：理化学研究所

概要：理化学研究所(理研)田中メタマテリアル研究室の田中拓男主任研究員(光量子工学研究領域フォトン操作機能研究チーム チームリーダー)、レニルクマール・ムダチャディ国際特別研究員の研究チームは、アルミニウム薄膜で作った「メタマテリアル」で、可視光全域をカバーする「色」を作り出すことに成功した。光の波長よりも小さいナノメートル(nm、1nm は 10 億分の 1m)サイズの構造体(以下、ナノ構造)を大量に集積化して自然界の物質では実現できない光学特性を持たせた人工物質をメタマテリアルと呼ぶ。ヒトの目は捉える光の波長の違いによって色を区別するので、ナノ構造の大きさや形を変えることでメタマテリアルが吸収する

光の波長を制御すれば、さまざまな色を作り出すことができる。従来のメタマテリアルでは、吸収する光の波長が一つに限定されていたり、吸収する光の波長幅が広いためパステルカラーのような彩度の低い色しか作り出せないといった課題があり、任意の色を自在に作ることはできなかった。今回、研究チームは電子ビームリソグラフィ法と真空蒸着法を用いて、シリコン基板上に厚さ 150nm のポリメチルメタクリレート (PMMA) レジスト材料を塗布し、PMMA 上に四角形パターンを描画後、その四角形上とそれ以外の部分に厚さ 45nm のアルミニウム薄膜を塗布した。この座布団形状のナノ構造を持つメタマテリアルにより、赤色から紫色まで可視光全域をカバーする、さまざまな色を作り出すことに成功した。さらに異なる色を出す構造を混ぜると、絵の具を混ぜたときのように色が混ざり、黒色を作り出すこともできた。有機物質である絵の具やインクの色は、強い光、高温、酸化により除々に失われる。しかし、開発したメタマテリアルの表面は比較的安定な酸化皮膜を持つアルミニウムで覆われているため、ナノ構造が破壊されない限り、半永久的に退色することはない。また、インクなどの塗料と比較すると、はるかに薄くて軽いという特徴もある。研究チームが開発した「メタマテリアル・カラー」は、高解像度ディスプレイやカメラのカラーフィルターとしての利用や、光の散乱を避けたい光学機器の内壁、大型望遠鏡内の黒色塗装などの応用が期待できる。

出典:理化学研究所ホームページ(2017/04/26 掲載)

http://www.riken.jp/pr/press/2017/20170426_1/

③世界で初めてアルミナのレーザー焼結に成功

開発者:ファインセラミックスセンター木村主任研究員

開発機構:ファインセラミックスセンター

概要:セラミックスの製造では、高温で焼く工程が不可欠である。多くの場合、電気炉やガス炉を用いて、数十時間の熱処理を行う。現在、試作や小ロット製品の製造にも同程度の時間を要していることから、積層造形 (3D プリンター) を用いた短時間製造プロセスへの期待が高まっている。ファインセラミックスセンターでは、高強度のレーザーを用いる新たな製造技術の研究開発を進め、「電気炉不要の夢の製造技術」と言われてきたレーザー焼結に、世界で初めて成功した。この技術は、セラミックスの積層造形のコア技術であり、新しいセラミックス製造プロセスの実現に向けた第一歩である。

同センターの木村主任研究員らは、汎用セラミックスのひとつであるアルミナ (酸化アルミニウム) のレーザー焼結に取り組み、新たに開発した2つの要素技術 (①高密度に原料アルミナ粒子が充填した層を形成する技術、②レーザー吸収の低いアルミナを高効率でレーザー加熱する技術) によって、短時間・高効率のレーザー焼結を可能にした。この技術では、10 秒間のレーザー照射で厚み 300ミクロンの層を焼結することができるため、将来的には現在の金属造形と同程度のスピードでセラミックスの積層造形ができると期待される。本成果は、セラミックスのレーザー直接造形を実現する画期的成果である。要素技術の高度化、対象材料の拡大を進め、新たなものづくり技術としての実用化を進めていく。

出典:ファインセラミックスセンターホームページ(2017/07/03 掲載)

http://www.jfcc.or.jp/25_press/r17_6.html

(v) 利用事例

NEDO プロジェクトでは、アルミナナノファイバースルの特徴を活かした機能性部材の検討を行い、自己組織化能を有するアルミナナノファイバースルの量産化技術を確認し、絶縁膜、遮熱膜、酵素固定化担体、低熱膨張フィルムの実現した。今後発展が見込まれるエレクトロニクス分野、環境分野への展開、省エネ分野への貢献など幅広い分野での適用を図っていくとしている。

(NEDO ホームページ <http://www.nedo.go.jp/content/100554506.pdf>)

(vi) ナノリスク評価

現在、研究開発段階であり、ナノリスク評価に関する情報は得られなかった。

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) データベースの選定

検索に使用するデータベースは、本事業において過去に使用してきたデータベースで、かつ毒性情報に関する情報が豊富な「PubMed」を使用した。

(2) 検索キーワード

検索キーワードは、「nanomaterials」と「toxicity」又は「safety」の組み合わせを使用した。

(3) 検索の頻度・期間

検索頻度は毎月1回として、期間は、2017年1月1日～2017年12月31日(文献発行年月日)までの期間とした。

2.2. 論文選択手順・方法

上記した検索方法により検索し、タイトルを出力した。タイトル数は、毎月約70件前後であった。次に、タイトルから内容を判断し、さらにそれらの要旨を確認して絞り込みを行った。

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、レビュー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、酸化チタン、酸化亜鉛、銀、シリカに関するものが多かった。絞り込みは、これらの物質については類似性がある文献の中での選択と、*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とヒトの細胞を対象とした文献を取り上げた。金、セルロース、ナノクレイ、グラフェン、ニッケル、酸化鉄、に関する文献は数が少なかったことから、優先的に取り上げた。プラチナ、 dendrimer、カーボンブラック、酸化アルミニウム、フラーレンについての文献は見当たらなかった。最終的に57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を試験法別に分類した結果を、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。また、一つの文献でいくつかの試験法で実験している場合があるが、それぞれ取り上げた。従ってこの表の総数は読み込んだ文献数の57件以上の60件となった。

表 2.3-1 サマリーを作成した文献の試験法別分類表

ナノマテリアル	<i>in vivo</i>					生態毒性	<i>in vitro</i>	小計
	吸入	気管内注入 咽頭吸引	静脈 注入	腹腔	経口			
SWCNT	-	1	1	-	-	-	3	5
MWCNT	-	2	1	-	-	-	1	4
グラフェン	-	-	-	-	-	1	4	5
TiO ₂	2	1	-	-	3	-	7	13
ZnO	1	-	-	-	-	1	6	8
SiO ₂	-	1	-	-	1	1	6	9
Fe ₂ O ₃	-	-	-	1	-	-	2	3
Ag	-	2	-	-	-	-	4	6
Au	-	-	-	-	-	-	1	1
Ni	-	-	-	-	-	-	1	1
ナノクレイ	-	-	1	-	-	-	1	2
ナノセルロース	-	-	-	-	-	-	1	1
量子ドット	-	-	-	-	-	-	2	2

ナノマテリアル	<i>in vivo</i>					生態	<i>in</i>	小計
合計	3	7	3	1	4	3	39	60

2.4. サマリーを作成した文献のまとめ

ナノマテリアルと生体との相互作用に関する文献は、2.2 で述べたドラッグデリバリーシステムや医療診断のための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が多い。しかし人の健康に害を及ぼさないようにナノマテリアルを利用していくための研究は、欧米ではプロジェクトとして地道に継続されており、研究の範囲は拡がり、内容も深くなっている。特に 2.3 の結果が示すように、*in vitro* の研究が 2/3 を占め、単に細胞毒性のみを調査するにとどまらず、各種生物学的マーカーの動きや遺伝子の変化を通して、有害性のメカニズムの解明を目指す研究が増加している傾向が窺える。

長い間注目を浴びてきたカーボンナノチューブは、最近応用の幅と量を急激に広げており、EHS の分野でもその有害性についての深耕が望まれている。本年度取り上げた文献では、SWCNT については、長さとう有害性の関係(長い方がより重篤な結果を招く)、尾静注であっても肺繊維症を誘発すること、修飾(機能化)は細胞毒性に影響しないことなどが明らかになった。MWCNT については、がん原性があるとされた MWCNT-7 についてのがん化機構についての研究も行われたが、がん原性を完全に把握するまでには至らなかった。また遺伝子に注目した研究もなされた。カーボンナノチューブでは、肺吸入、気管支注入、咽頭吸引という実ばく露に近いばく露での研究も続けられ、ばく露の閾値を決めるため/人健康への影響への確実な予測が続けられている。

応用が広がりつつあるグラフェンの毒性は重篤とはみなされていないが、形態や化学組成にバリエーションが多く、そのことに対応した *in vitro* の研究がなされている。酸化グラフェンは、*in vitro* 毒性、環境毒性を示すので、利用には慎重を期すよう注意が喚起されている。ここでも、毒性研究においては、エンドキシンの作用に充分注意を払う必要性が喚起されている。

酸化チタンナノ粒子についての文献はここでは一番多く取り上げたことになったが、遺伝毒性を取り上げた文献をはじめ、有害性のメカニズムの一部の詳細な解明を目指した *in vitro* の研究が多い。しかし、食品関連に使用されることから、経口、胃内投与の文献もある。酸化チタンナノ粒子の食事摂取は、低用量でとはいえ、頻繁に連続的に起こるため、腸粘膜に及ぼす反復影響は腫瘍発症の増加したリスクもしくは既存腫瘍プロセスの進行に結び付くかもしれないと指摘した研究や、日焼け止めや化粧品、食品や練り歯磨きに酸化チタンナノ粒子を使用すると、ヒトの潜在的なリスクがあり、より注意を払う必要があることを、マウス胸腺への誘発免疫毒性の可能性のある機構を示すことで警告した文献があった。また、ナノ二酸化チタンの経口投与はマウスにおける肝代謝機能を攪乱するとの報告もあり、行政当局によるナノサイズ材料のリスク分析と規制のための有用な情報を提供したとしている。さらに酸化チタンでは、結晶形が異なる方がサイズより毒性への影響が大きいことを報告した文献が 2 件あった。

ナノシリカについては、気管内注入の 2 件を除けば、*in vitro* で、毒性メカニズムの機構解明を目指した文献である。シリカナノ粒子の *in vitro* ばく露によって誘発されたカルシウムシグナル伝達機構へ影響、オートファジーとアポトーシスに及ぼすシリカナノ粒子の影響、表皮成長因子受容体(EGFR)シグナリングカスケードの調節と細胞毒性、ギャップ結合細胞間伝達(GJIC)の変調細胞毒性を増大させることなどが取り上げられている。さらに、ナノ粒子上に形成されたコロナや腎臓シスタチンのナノ粒子による構造転換が細胞毒性に影響があることを指摘する文献があった。

酸化亜鉛については、ラットへの吸入実験がなされ、気管支肺胞洗浄液の比較プロテオーム分析により、特発性肺繊維症の生物マーカーの有意な増大を見出したことから、肺がんを誘起する

可能性があるとした。他は *in vitro* であり、小胞体ストレス誘発因子タプシガルジンは酸化亜鉛ナノ粒子の細胞毒性(ミトコンドリアとリソソームに対する損傷)を高める、PINK1/parkin-介在マイトファジーは BV-2 細胞における酸化亜鉛ナノ粒子の誘導毒性で役割を果たす、オートファジー経路の機能障害が酸化亜鉛ナノ粒子へのばく露に続く異なる臓器から供給された2つの細胞タイプにおけるアポトーシス死に寄与する、等の結果が示された。また、酸化亜鉛ナノ粒子の細胞毒性におけるサイズ効果、サイズと形状の効果、亜鉛イオンとの比較もなされている。

銀ナノ粒子では、10 及び 25nm の銀ナノロッドの単回気管内注入が行われ、ばく露期間後 1 日及び 1 週間後用量依存的酸化ストレスを引き起こしたことが報告された。また、咽頭吸引後 24 h に殺処分されたマウスにより、銀ナノ粒子誘発急性肺炎症に対する感受性の遺伝的決定因子について調査された。*In vitro* 研究では、銀ナノ粒子は、A549 細胞上皮におけるホルミシス(hormesis、閾下増進効果)を誘発すること、ナノ銀の細胞毒性は細胞培養培地中の塩化物濃度および有機物の存在に大きく依存すること、銀ナノ粒子と銀イオンの特異的遺伝毒性メカニズム、銀ナノ粒子とそれらの様々な塩前駆体の毒性学的影響等が調査されたが、銀ナノ粒子の毒性作用の機構は、まだ研究中であるとされた。

金ナノ粒子については、球状、ロッド、スター状の粒子の細胞毒性が比較され、金ナノスターが、PEG のような適切なリガンドによって被覆された場合顕著な毒性を引き起こすこと無しに、健康な及び病気の細胞の両方によって効果的に取り込まれることができ、同等の用量および表面化学で他のナノ粒子形状と比較してより有害性が少ないと考えられることができることを示した。

酸化鉄ナノ粒子についての文献では、単層カーボンナノチューブ、多層カーボンナノチューブと比較し、これらのナノ粒子が、癌細胞におけるミトコンドリアを直接および選択的に標的化することによって抗癌剤候補として有望であり得ることを示唆し、それゆえに、ROS 媒介ミトコンドリア経路を介して細胞死を誘発し、最終的にシトクロム c 放出、カスパーゼ 3 活性化および癌性メラノサイトにおけるアポトーシスを導く可能性があることを示した。もう一つの文献では、反復酸化鉄ナノ粒子投与は、過剰の ROS を生成し、抗酸化剤レベルを枯渇させることによって心臓組織に酸化ストレスをもたらす、持続的な酸化ストレスは、アポトーシスおよび壊死を招き、心筋細胞の変性および心臓機能不全をもたらすとしている。

ニッケルでは、金属ニッケルナノ粒子と酸化ニッケルナノ粒子、イオンとなる塩化ニッケルの細胞毒性が比較され、Ni および NiO ナノ粒子は、Ni イオン/複合体に比較して顕著な(遺伝)毒性効果を示し、より重篤な健康状態の懸念を示すと結論された。遺伝毒性の一次メカニズムとしての酸化ストレスの同定は、発癌性ハザードおよび、DNA と直接相互作用する薬剤に比べて閾値用量応答が低いことを示唆している。

ナノクレイおよび熱的に分解された副産物の毒性評価を行った論文では、そのような試料は製造環境または廃棄環境の両方で使用されると毒性効果を生じる可能性があることを報告しているが、改質していないモンモリロナイトおよびその熱的に分解された対応物は、ほとんど有意な毒性作用を示さなかったとしている。もう一つの文献では、ナノクレイ粒子が肝臓の損傷を引き起こすことがあり、この影響は、肝毒性化学物質や医薬品との相互作用の結果として相乗的に悪化することがあることが実証された、と報告している。

ナノセルロースについては、未修飾、カルボキシメチル化、およびヒドロキシプロピルトリメチルアンモニウム修飾ナノフィブリル化セルロースへのばく露に関連する細胞毒性効果がないことが示されている。

量子ドットに関する文献では、細胞毒性を電気化学的酵素アッセイ方法論を使用する調査法についてのもとの、細胞外生成及び研究室合成 CdTe 量子ドットの毒性に関する比較研究があり、後者では、生合成された量子ドットは、化学的方法で合成されたそれらと比較した場合、大幅に低い毒性を示したとした。

2.5. 文献サマリー

(1) SWCNT

No	SWCNT-1
論文題目 (和訳)	Length effects of single-walled carbon nanotubes on pulmonary toxicity after intratracheal instillation in rats (ラットの気管内注入後の肺毒性に及ぼす単層カーボンナノチューブの長さの影響)
著者 所属機関	Makoto Ema ^{a,b} , Hiroshi Takehara ^c , Masato Naya ^a , Hiromichi Kataura ^d , Katsuhide Fujita ^{a,b} , Kazumasa Honda ^{a,b} . a) Research Institute of Science for Safety and Sustainability, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Tsukuba, Japan, b) Technology Research Association for Single Wall Carbon Nanotubes (TASC), c) Public Interest Incorporated Foundation, BioSefety Research Center (BSRC) d) Nanomaterials Research Institute, AIST
書誌事項	The Journal of Toxicological Sciences, Vol.43, No.3, 367-378, 2017, DOI 10.2131/jts.42.367
試験物質	バルク N-SWCNT (CVD 法により合成, Nikkiso Co. Ltd. より購入): 幾何学的平均直径 1.8nm、表面積 878m ² /g、Fe が 43,650ppm。 S-SWCNT: 金属不純物 Fe、Co、Ni、V がそれぞれ 45、12、1.06、0.55µg/g。溶液中でバンドル形成。平均長 0.40µm。 L-SWCNT: 金属不純物 Fe、Co、Ni、V がそれぞれ 62、24、0.28、0.011µg/g。溶液中でバンドル形成。平均長 2.77µm。
試料調整法	L-SWCNT 溶液は N-SWCNT を 1% のサケ精子製 DNA を含む 10 倍希釈 PBS 中で、ホモジナイザーにて 10 時間均質化し調整。 S-SWCNT 溶液は L-SWCNT 溶液を 5 時間以上超音波ホモジナイズし調整。 ベヒクルコントロール; 1% のサケ精子製 DNA を含む 10 倍希釈 PBS、。ネガティブコントロール; PBS、ポジティブコントロール; U.S.Silica
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	【試験生物】オス CrI:CD (SD) ラット、7 週齢。 【投与方法・期間・用量】S-、L-SWCNT (1mg/ml/kg) を気管内注入、6 ヶ月間観察。 【分析】全身状態を観察。体重、肺重量を測定。 【病理組織学的検査】左肺、肝臓、左腎、脾臓、脳をホルマリンで固定、パラフィンに設置、切片化、ヘマトキシリンおよびエオシンで染色し、観察。 【BALF 分析】右肺から得た BALF を遠心分離。上清の総タンパク質、LDH 量を測定。GM-CSF、インターフェロン-γ、TNF-α、MCP-1、GRO/KC、インターロイキンを測定。細胞画分を PBS に懸濁、血液検査システムで総細胞数を決定。MG 染色で好中球、マクロファージ、リンパ球、好酸球数を決定。
試験結果	・全身状態、体重、肺重量: SWCNT 投与後に臨床症状、体重変化は観察されなかった。肺は重量が増加し、褐~黒色斑が観察された。 ・病理組織学的検査: S-SWCNT 処置群で 7~182 日目にマクロファージが肺胞で観察された。7~91 日目には好酸球の血管周囲浸潤も、91、182 日目には肉芽腫、肺胞タンパク症、好中球の肺胞浸潤、気管支嚢胞の増殖も観察された。L-SWCNT 処置群は 7~182 日目に出血、肺胞中のマクロファージの蓄積、肉芽腫が観察されたが、S-SWCNT 処置群より変化が小さかった。両処理群とも脳、脾臓、肝臓、腎臓の病理組織学的変化は観察されなかった。 ・BALF 分析: S-SWCNT 処置群では 6 ヶ月の観察期間を通じて LDH 量、総タンパク質が高く、L-SWCNT 処置群は 6 ヶ月の観察期間の後期に高かった。MCP-1、IL-18、GRO-KC は連続的に上昇し、S-SWCNT 処置群のパラメータのレベルは、L-SWCNT 処置群より高かった。両処理群とも、その他のサイトカインの変化は観察されなかった。
結論	SWCNT の気管内注入後の肺毒性は SWCNT の長さに依存し、S-SWCNT は L-SWCNT よりも重篤な肺毒性を誘発する。S-SWCNT は持続性の肺炎症を誘発した。一方 L-SWCNT が誘発した炎症は小さく、BALF 中総タンパク質は 6 ヶ月の観察期間の後期に上昇した。

No	SWCNT-2
論文題目 (和訳)	Long-term intravenous administration of carboxylated single-walled carbon nanotubes induces persistent accumulation in the lungs and pulmonary fibrosis via the nuclear factor-kappa B pathway (カルボキシル化された単層カーボンナノチューブの長期静脈内投与による核内因子 κ B 経路を介した肺への持続的な蓄積と肺線維症の誘発)
著者 所属機関	Yue Qin ^a , Suning Li ^b , Gan Zhao ^b , Xuanhao Fu ^a , Xueping Xie ^a , Yiyi Huang ^a , Xiaojing Cheng ^c , Jinbin Wei ^a , Huagang Liu ^a , Zefeng Lai ^a a) Pharmaceutical College, Guangxi Medical University, (Guangxi, People's Republic of China) b) The Maternal and Child Health Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, c) Life Sciences Institute, Guangxi Medical University
書誌事項	International Journal of Nanomedicine, 2017:12,263-277, DOI 10.2147/IJN.S123839
試験物質	カルボキシル化された単層カーボンナノチューブ (c-SWCNT): 長さ 1~3 μ m。カルボキシル含有量 2.73wt%。(Chengdu Organic Chemicals (Chengdu, People's Republic of China) より購入; Co 触媒による CVD 法で作製)。
試料調整法	c-SWCNT を混酸と混合し、65°C で磁気攪拌機で 3hr 攪拌。NaOH 溶液で中和し、1hr 超音波分解。不純物のイオンを除去し得られた短い c-SWCNT の高濃度水溶液を 5.00wt% のグルコース溶液で希釈し、5 分以上超音波処理。4,900 \times g で 10 分間遠心分離して凝集体を除去。最終的に、長さはほとんど 1 μ m 以下、6~15nm ϕ 、GD 比 5.5、 ζ ポテンシャル -44.1mV、金属ほとんど含まず。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	【試験生物】オスおよびメス SD ラット、8 週齢、200~250g。 【投与方法・期間・用量】c-SWCNT グルコース溶液 (2.0mgc-SWCNT/kg 体重/日) を尾静脈注射で 1、7、30、60、90 日間反復投与 30 日後後、肺、肝臓、腎臓を摘出。(投与後 30 日経過したラットをそれぞれ t1、30、60、90、120 日検体と称する。) 【光学顕微鏡観察・TEM 観察】肺をホルマリンで固定、パラフィンに設置、切片化、HE で染色し、光学顕微鏡で観察。肺を切片化、グルタルアルデヒドで固定、四酸化オスミウムで後固定、脱水、樹脂に埋込み、TEM で観察。 【IHC(病理組織学的及び免疫組織学的)分析】切片を脱パラフィンし、ブロッキング(過酸化水素水、ヤギ血清)。次に Col I (I 型コラーゲン)、Col III、MMP-2、TIMP-2、TGF- β 1、 α -SMA、ZSGB-BIO でインキュベートさらにペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンでインキュベート。最後にジアミノベンジデン基質クロモゲン溶液でインキュベート後、ヘマトキシリンで対比染色し、マイクロスコープで分析。 【ウエスタンブロッティング】肺組織を液体窒素を加えて摩砕、再懸濁し、細胞質を抽出。電気泳動により分離。対 Col III 抗体、NF- κ B/p65、I κ B α 、チューブリン、グリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼでインキュベート。TBST で 3 回洗浄後ヤギ(ポリクローナル)対ラビット抗体でインキュベート 【ELISA 法】肺組織中の TNF α 、IL-1 β を定量。
試験結果	・剖検: SWCNT 凝集体 (黒色斑) はすべての肺葉で観察された。60、90 日目に塞栓を形成した。90 日間で肺毛細血管周囲にコラーゲン線維が沈着した。投与 60 日間で SWCNT 凝集体の周囲に肉芽腫が観察された。 ・TEM 観察: c-SWCNT で処置した肺において、層状体が観察された。コラーゲン繊維が形成され、肺間質内を透過した。多くの c-SWCNT が肺間質に取り込まれた。 ・IHC 分析、ウエスタンブロッティング: 肺における c-SWCNT への 30 日以上のお曝露により Col I、Col III が沈着し、肉芽腫周辺で c-SWCNT 凝集体が確認された。c-SWCNT で処置した肺切片において、MMP-2、TIMP-2 陽性細胞が観察された。c-SWCNT への曝露により、7、30 日で細胞質中の I κ B α 、p65 が減少した。 ・ELISA 法: c-SWCNT の静脈内投与により、試験期間に形質転換増殖因子ベータ 1 (TGF- β 1) 陽性細胞、 α -SMA (α -平滑筋アクチン) 陽性細胞の数が増加した。陽性細胞は主に SWCNT 凝集体の周囲に分布していた。前炎症性、前線維性サイトカインの発現は、注射を止めてから 30 日後には減少しなかった。
結論	c-SWCNT の尾静脈注射による長期の反復投与は、肺毛細血管における持続的な塞栓形成を誘発し、核内転写因子 (NF- κ B) シグナル伝達経路によって制御される慢性炎症に起因する肺線維症を誘発した。c-SWCNT による肺胞上皮細胞 (AEC) の永続的損傷は、炎症性サイトカイン、前線維性増殖因子の発現を促進した。TGF- β 1 は、NF- κ B シグナル伝達、線維形成の調節において重要な役割を有していた。

No	SWCNT-3
論文題目 (和訳)	Rheological alteration of erythrocytes exposed to carbon nanotubes. (カーボンナノチューブにばく露された赤血球の粘弾性の変化)
著者 所属機関	Heo Y ¹ , Li CA ² , Kim D ² , Shin S ¹ . 1) School of Mechanical Engineering, Korea University, Seoul, Korea. 2) Department of Nano Mechanics, Korea Institute of Machinery and Materials, Daejeon, Korea.
書誌事項	Clin Hemorheol Microcirc. 2017;65(1):49-56. doi: 10.3233/CH-15081.
試験物質	SWCNT:10mg, raw HiPco SWCNTs, Lot No. R0513 (Unidym)。径 0.8-1.2nm、長さ 100-1,000nm。 SWCNTs を、キトサンヒドロキシルフェニルアセアミド (CHPA、50mi、1mg/mL) 溶液に分散。
試料調整法	異なる分散状態の 2 サンプルを調整;1つ目は、個別化したもので、もう1つは、束ねられた SWCNTs。個別化サンプルの直径は 0.77±0.25nm、束ねられた SWCNTs の直径は 1.71±0.58nm。長さは平均 0.61-0.68μm (違いほとんどなし)。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	【試験生物】健康なドナー (23~25 歳) の肘静脈から採取した全血。 【血液サンプル調整】実験日に、ドナー肘静脈から全血を自動凝固剤 (K2-EDTA) 含有バキュテナーにセット。遠心分離し、血漿、軟膜、細胞最上層の上澄みを別容器に静かに移す。残りのバックされた赤血球 (RBC) を PBS で 2 度洗浄後、バックされた赤血球 500μL を 25%ヘマトクリットで 0.9%塩化ナトリウム溶液で 1.5mL に希釈。希釈赤血球懸濁液 (0.3mL) を 0.9%塩化ナトリウム溶液 (1.2mL) に SWNT 分散液とともに混合 (赤血球に 2 つの異なる分散状態の SWNTs 試料をばく露)。 【培養方法】0.9%塩化ナトリウム溶液 (1.2mL) 中の赤血球懸濁液をコントロールとして使用。室温で 4 時間培養。1 時間ごとに測定。 【試験用量】SWNTs 濃度 (溶血試験): 0, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 μg/mL。 (赤血球凝集): 0, 0.05, 0.1, 0.5μg/mL。 (SEM イメージ): 0.5μg/mL。 【実験種類】溶血試験、赤血球の凝集
試験結果	【溶血試験】赤血球の溶血割合は、同じ SWNTs 濃度にはばく露した場合、個別 SWNT サンプル < 束ねられた SWNTs。SWNTs 濃度の増加により、溶血割合も増加。1μg/mL SWNTs では溶血割合は、それぞれ 39.5、60.4%。溶血は、赤血球の粘弾性特性の変化をもたらした。 【赤血球凝集】SWNTs 濃度 0.1μg/mL では EI (伸長指数) は個別 SWNT サンプルとコントロールサンプル間で見かけの違いなし。SWNTs 濃度 0.5μg/mL では、束ねられた SWNTs の EI は個別 SWNTs よりも明らかに減少。赤血球の変形能は培養時間の違いによる変化なし。凝集指数 (AI) は、個別 SWNT サンプルでは濃度とともに増加。ただし、0 と 0.5μg/mL の有意差なし。束ねられた SWNT サンプルの AIs は濃度の増加に対して徐々に減少。SWNTs 濃度 0.1μg/mL へのばく露による赤血球の AIs は、個別 SWNTs よりも束ねられた SWNTs へのばく露で、全ばく露時間 (0,1,2,3,4 時間) でずっと低い。統計的有意差はみられないが、束ねられた SWNTs サンプルは、個別 SWNTs よりも赤血球の凝集の大きな変化を引き起こした。 赤血球の形状変化の SEM 画像で、0.5μg/mL SWNTs ばく露で、ユニ状赤血球と一般的な形状の赤血球を確認。ユニ状赤血球は SWNT との接触に伴う溶血の結果で、その頻度は、束ねられた SWNT のほうが個別サンプルよりも高い。束ねられた SWNTs では、ユニ状赤血球の形状は平らで、細胞-細胞融合を観察。電子顕微鏡による形態観察では、赤血球のダメージは束ねられた SWNTs よりも個別分散サンプルのほうが小さい。SWNT の分散状態に応じて観察される血液学的変化の相違とよく一致。
結論	束ねられた SWNT は、溶血及び赤血球の凝集の点で、個別 SWNT よりもむしろ赤血球に対してより有毒であることがわかった。溶血がない場合に、赤血球の変形能は SWNTs へのばく露後でさえ、明らかな変化を示さなかった。束ねられた SWNTs は、個別 SWNTs よりも厚く、硬く、これらの物理的特性は、異なる程度の細胞膜相互作用を生じさせ、続いて、細胞膜の近くの空乏層を擾動させた。本研究を通じて、生物学的細胞中のナノ材料の毒性評価のための新しいツールとして、血液学的測定を使用することができることを確認した。このツールは、ナノ材料の毒性評価に便利に使用することができる。

No	SWCNT-4
論文題目 (和訳)	Single-walled carbon nanotubes (SWCNTs) inhibit heat shock protein 90 (HSP90) signaling in human lung fibroblasts and keratinocytes (単層カーボンナノチューブ (SWCNT) は、ヒト肺線維芽細胞およびケラチノサイトにおける熱ショックタンパク質90 (HSP90) シグナル伝達を阻害する)
著者 所属機関	Li-Chu Ong ^{a,b} , Yuen-Fen Tan ^{a,b} , Boon Shing Tan ^c , Felicia Fei-Lei Chung ^a , Soon-Keng Cheong ^d , Chee-Onn Leong ^{a,e} a) Center for Cancer and Stem Cell Research, International Medical University, Bukit Jalil, 57000 Kuala Lumpur, Malaysia b) School of Postgraduate Studies, International Medical University, Bukit Jalil, 57000 Kuala Lumpur, Malaysia c) Institute of Biological Chemistry, Academia Sinica, Taipei, Taiwan d) Faculty of Medicine and Health Sciences, University Tunku Abdul Rahman, Bandar Sungai Long, Selangor, Malaysia e) School of Pharmacy, International Medical University, Bukit Jalil, 57000 Kuala Lumpur, Malaysia
書誌事項	Toxicology and Applied Pharmacology 329 (2017) 347–357
試験物質	SWCNT (Research Nanomaterials, Inc., Texas, USA, 補足表 1); 標準的長さ(5~30µm)と短い(1~3µm)もの。未修飾(製造したままのもの)のもの。カルボキシル基、水酸基で修飾したもの。
試料調整法	次欄参照。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	試験生物: ヒト胚性腎臓細胞 (HEK-293T)、非形質転換乳房上皮細胞 (MCF 10A)、ヒト胎児肺線維芽細胞 (MRC-5)、肝細胞癌細胞 (HepG2)、不死化ヒトケラチノサイト細胞 (HaCaT)、鼻咽頭上皮細胞株 (NP69)、初代ヒト間葉系幹細胞 (CYT-0086)。 CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay: 計 5,000 個の細胞をプレートに播種、24 時間培養。精製未修飾及び修飾(機能化)SWCNT を細胞培養培地に分散、最終濃度 0.1~100µg/mL で細胞に投与。細胞生存率を CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay キットにより測定。少なくとも 3 回実施。 細胞周期分析: MRC-5 及び HaCaT をプレートに 8×10 ⁴ 細胞/mL 細胞密度で播種、細胞接着 24 時間後に細胞を一定長さの SWCNT 25, 50, 100µg/mL とともに 37°C、5% CO ₂ で 72 時間培養。細胞をトリプシン処理、回収、FBS-PBS で 2 回洗浄。次いで、ペレットをエタノールに再懸濁、-20°C で一晩保存。固定した細胞を氷冷した PBS で洗浄、RNアーゼ A (200µg/mL) と共に 37°C で 1 時間培養後、ヨウ化プロピジウム (PI; 10µg/mL) を用いて DNA 染色。蛍光(励起/発光極大: 488/530nm) が記録された FACSCalibur フローサイトメーターと CellQuest を用いて細胞周期を分析。WinMDI 2.8 ソフトウェアを用いて解析。 細胞死検出 ELISA Plus アッセイ: MRC-5 及び HaCaT を未修飾 SWCNTs 100µg/mL で処理前にプレートに 24 時間播種、処理 72 時間後に、細胞死検出 ELISA Plus アッセイを用いて、ヒストン錯化 DNA 断片の定量測定により、アポトーシス及び壊死細胞死に関連する DNA 断片化を評価。TECAN 無限プレートリーダー F200 により吸光度 (405nm) 測定。陰性対照に対して処置群を標準化することにより、アポトーシス及びネクローシス指数を算出。少なくとも 3 回実施。 カスパーゼ活性の測定: カスパーゼ 3/7、8、9 活性を Caspase-Glo Assay キットで定量。 マイクロアレイとコネクティブティマップ解析: ・マイクロアレイ実験: 2 連実施。MRC-5 細胞を、一定長さ(5~30µm)の未修飾 SWCNT 100µg/mL 又は賦形剤で 72 時間処理。細胞からの全 RNA を、Qiagen RNA 単離キットにより抽出。 ・マイクロアレイハイブリダイゼーション: Affymetrix Human Gene 1.0 ST アレイを用いて実施。 定量的リアルタイム PCR (qPCR) 分析: RNeasy Mini Kit を用い全 RNA 抽出。第 1 鎖 cDNA 合成及び qPCR を実施。特異的なフォワード及びリバースプライマー配列(補足表 2)。全ての qPCR 反応は、94°C で 3 分→94°C で 40 秒→60°C で 40 秒及び 25 秒 72°C、40 サイクル。発現データは、ハウスキーピング遺伝子 GAPDH を用いて標準化。 タンパク質単離およびウェスタンブロット分析: 細胞からのタンパク質溶解物を氷冷溶解緩衝液(1% NP-40, 1mM DTT, ホスファターゼ阻害剤カクテル及び PBS 中のプロテアーゼ阻害剤カクテル) 中で抽出。全タンパク質 (25µg) を SDS-PAGE に供し後イムブロッティング。

	<p>細胞ベース HSP90 依存性ルシフェラーゼリポソームフォールディングアッセイ: pGreenFire1-CMVdscGFP/T2A/Fluc 遺伝子を担持するレンチウイルス粒子を形質導入した MRC-5 及び HaCaT で実施。形質導入された細胞をプレート中で 72 時間、未修飾 SWCNT で処理。細胞を予熱した培地 (50°C) で約 6 分間培養、内因性ルシフェラーゼを十分に発現。その後、細胞を 37°C、5%CO₂ で 1 時間培養。ルシフェラーゼリポソームフォールディングの程度は、ルシフェリン基質溶液の添加によって測定、得られたルミネセンスは、ルミノメーターを用いて評価。 HSP90、HSP70 及び HSP40 のトランスフェクション: MRC-5 及び HaCaT を、X-tremeGENE HP DNA トランスフェクション試薬を用いて HSP90、HSP70 又は HSP40 で逆トランスフェクション。</p>
<p>試験結果</p>	<p>・製造したままの (未修飾) SWCNT は、ヒト細胞株において細胞型特異的細胞傷害性を誘導した。未修飾 SWCNT は、濃度及び時間依存的に試験した全ての細胞系において有意な細胞傷害性を誘導した (図 1A、B)。HEK-293T、MCF-10A、MRC-5、HepG2、HaCaT 及び CYT-0086 の短い SWCNT と比較して、一定長さの SWCNT は比較的より細胞毒性があったが、NP69 は短い SWCNT の毒性影響に対してより感受性であった (図 1A)。本結果は、未修飾 SWCNT の細胞毒性効果は、未修飾 SWCNT の長さによる影響を受け、高度に細胞型に依存することを示唆している。</p> <p>・SWCNT のヒドロキシル及びカルボキシル機能化 (修飾) は、ヒト細胞株における細胞毒性に影響した。SWCNT のカルボキシル化及びヒドロキシル化は、MRC-5、HaCaT 及び HEK-293T 細胞における一定長さの SWCNT の細胞毒性を有意に低下させた (図 2)。HepG2 肝細胞及び CYT-0086 ヒト間充織幹細胞は、未修飾 SWCNT と比較して、ヒドロキシル化及びカルボキシル化された一定長さの SWCNT に対して感受性が低いことが判明した。NP69 の鼻咽頭上皮細胞は、一定長さのカルボキシル化 SWCNT に対して感受性が高かった。対照的に、ヒドロキシル又はカルボキシル基を有する短い SWCNT の機能化は、細胞傷害性の有意な減少が観察された NP69 を除いて、試験した全細胞系において、未修飾 SWCNT と比較して細胞毒性に有意な影響を及ぼさなかった。全体として、SWCNT の機能化が SWCNT の細胞毒性効果に影響を与え得ることを示した。細胞生存率に対する機能化の効果は、細胞型に依存していた。</p> <p>・SWCNT は、細胞型依存的にアポトーシスおよびネクローシスを誘導した。MRC-5 胚性肺線維芽細胞におけるカスパーゼ 3 及び 9 活性、ミトコンドリア膜脱分極、と有意なアポトーシス及び壊死を誘導した (図 3A~D)。パンカスパーゼ又はカスパーゼ 3 又は 9 特異的阻害剤との SWCNT の共処理は、SWCNT のアポトーシス効果を完全に排除し、SWCNT が MRC-5 におけるミトコンドリア依存性アポトーシス細胞死を誘導することを示唆した。SWCNT は MRC-5 細胞においてわずかな S 及び G2/M 細胞周期停止を誘導した (補足図 1A)。対照的に、SWCNT は、HaCaT ヒトケラチン細胞の増殖を細胞死を誘導することなく阻害した。</p> <p>・SWCNT は、熱ショックタンパク質 90 (HSP90) 阻害に関連する示差的遺伝子発現シグネチャーを誘導した。遺伝子発現プロファイリング及びコネクティブティマップ分析により、SWCNT が、MRC-5 細胞における熱ショックタンパク質 90 (HSP90) 阻害の特徴的な遺伝子発現シグネチャーを誘導し、SWCNT が HSP90 シグナル伝達経路を阻害し得ることを示唆した (図 4A、4B、表 1)。マイクロアレイ及びコネクティブティマップ分析データは、SWCNT が HSP90 シグナル伝達及びコレステロール生合成の調節を介してその毒性作用を発揮する可能性があるという仮説を導いた。</p> <p>・SWCNTs が HSP90 クライアントを阻害した。HSP70 タンパク質発現の増加に裏付けられた SWCNT $\geq 50\mu\text{g}/\text{mL}$ にばく露された細胞における AKT、CDK4 及び BCL2 タンパク質発現の有意な減少を観察した (図 5A)。対照的に、HSP90、HSP60 及び HSP40 の発現レベルは、細胞の SWCNT へのばく露によって影響を受けなかった。既知の HSP90 阻害剤であるゲルタナマイシン (GA) 及びタネスピマイシン (17AAG) で処理した細胞でも同様の生物学的効果が観察され、SWCNT が HSP90 の発現に影響を与えずに HSP90 クライアントタンパク質の分解を促進することが示唆された。</p> <p>・SWCNT は HSP90 依存性タンパク質リポソームフォールディング活性を有意に阻害した。HSP90 依存性ルシフェラーゼリポソームフォールディング活性は、濃度に依存して一定長さ及び短いものの初期 SWCNT の両方にばく露された MRC-5 細胞において有意に減少した (図 5B)。一定長さの初期 SWCNT にばく露された HaCaT 細胞でも同様の効果が観察されたが、短い SWCNT で処理された細胞では観察されなかった。</p> <p>・HSP90 の異所性発現は、SWCNT 誘導細胞傷害を抑制した (図 6A)。HSP90 の異所性発現は、HSP40 又は HSP70 ではなく、SWCNT の細胞傷害効果を完全に排除し、SWCNT 誘導細胞毒性が HSP90 依存性であることを示した。</p>
<p>結論</p>	<p>本研究結果は、標準的長さの未修飾 SWCNT が、HSP90 活性を阻害することによってヒト肺線維芽細胞およびケラチノサイトにおいて細胞傷害性を誘導することを示唆した。</p>

(2) MWCNT

No	MWCNT-1
論文題目 (和訳)	Multi-walled carbon nanotube-induced genotoxic, inflammatory and profibrotic responses in mice: Investigating the mechanisms of pulmonary carcinogenesis マウスにおける多層カーボンナノチューブ誘発遺伝毒性、炎症性及び繊維症進行の応答： 肺発癌のメカニズムを解明
著者 所属機関	Luna Rahman ^a , Nicklas Raun Jacobsen ^b , Syed Abdul Aziz ^c , Dongmei Wu ^a , Andrew Williams ^a , Carole L. Yauk ^a , Paul White ^a , Hakan Wallin ^{b,d} , Ulla Vogel ^{b,e} , Sabina Halappanavar ^a , a Environmental Health Science and Research Bureau, Health Canada, Ottawa, Canada b The National Research Centre for the Working Environment, Copenhagen, Denmark c Food Directorate, Health Products and Food Branch, Health Canada Ottawa, ON, Canada d STAMI, National Institute of Occupational Health, Gydas vei 8, Oslo, Norway e Department of Micro- and Nanotechnology, Technical University of Denmark, Lyngby, Denmark
書誌事項	Mutat Res Gen Tox En 823 (2017) 28-44
試験物質	2 つの異なる MWCNTs ・ Mitsui XNRI-MWNT-7 (Mitsui-7; Lot# 05072001K28) : Mitsui Company (Tokyo, Japan) (now Hadoga Chemical Industry)から入手。 直径 49-100 nm、長さ 3-5.7 μ m。BET; 22 m ² /g。 ・ NM-401: the European Union Joint Research Centre (JRC), Ispra, Italy から寄付。 直径 30-90 nm、長さ 3.6-4.4 μ m。BET; 18 m ² /g。 共に、不純物<5%。誘導結合プラズマ質量分析法 (ICP-MS) 分析では、共に、Fe、Na、Al などの不純物を含む。エネルギー分散型 X 線分光法 (EDS) 分析では、NM-401 は Si、Cu と Zn も含む。
試料調整法	ストック懸濁液は、Muta TM マウスから収集された 2% 血清を含む NanoPure 水中 3.2 mg/mL の濃度で、ばく露の日に新たに調製。超音波処理、希釈して使用。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	試験生物： 大人 12 週齢雌 Muta TM マウス; Health Canada, Ottawa, Canada で繁殖、維持。 誘発突然変異頻度の決定のために標的遺伝子 (すなわち、lacZ) を含む非転写 λ gt10lacZ シヤトルベクター [49, 50] の 29 \pm 4 の安定的に統合され、連結されたコピーを持つトランスジェニックマウス (strain 40.6)。 投与方法・ 期間・試験用量(Mitsui-7 と NM-401、それぞれ)： 4 週連続週 1 回気管内注入 (1 回注入量 50 μ l)。0 (溶媒 (vehicle) のみにばく露されたコントロールマウス 2 粒子タイプ間で共有)、36 \pm 6 又は 26 \pm 2 μ g/マウス(低用量)と 109 \pm 18 又は 78 \pm 5 μ g/マウス(高用量)。最初のばく露の後に続く 90 日に殺処分。
試験結果	・肺切片中の MWCNTs のハイパー スペクトルマッピング： MWCNTs のハイパースペクトルマッピングは、顕著な量の Mitsui-7 と NM-401 が両方の用量群で肺組織中に最初のばく露後 90 日でさえ保持された、ことを明らかにした。バイモーダルピークが組織マトリックス中の MWCNTs に対して観察された (不均一性を示唆)。 ・BALF および肺組織の遺伝毒性および変異原性評価 (コメットアッセイを用いた DNA 損傷の定量化)： 尾長さ (TL) 及び尾%DNA として表示されるデータは、溶媒 (vehicle) ばく露マウスを基準にして MWCNT ばく露マウスの BALF 中の DNA 損傷の大幅な増加を示さなかった (図 3、上部パネル)。同様に、一致するコントロールに比べて Mitsui-7 ばく露肺において大きな変化は観察されなかった。ただし、DNA 鎖切断の大幅な増加は、両コメットパラメーター-TL と尾%DNA による測定のように、NM-401 の高用量で処理されたマウスの肺で観察された (図 3、下パネル b、補助表 I) (高用量 NM-401 とコントロールに対して、それぞれ 18 \pm 1.05 と 6.1 \pm 1.63 対 24 \pm 2.42 と 12.7 \pm 1.86)。 導入遺伝子 (LacZ) 突然変異頻度 (MF) 解析は、MWCNTs の突然変異能を決定するために使用された。コントロールマウスの平均 MF 頻度は 6.8 \pm 0.7 \times 10 ⁻⁵ だった。Mitsui-7 または NM-401 へばく露されたマウスは、コントロール (図 4) と比較して、最初のばく露後 90 日での用量でも、導入遺伝子 MF のレベルの統計的に有意な増加を示さなかった (6.1 \pm 0.3 \times 10 ⁻⁵ または 6.4 \pm 0.5 \times 10 ⁻⁵ 、それぞれ)。 ・細胞増殖： 肺切片は、細胞増殖に及ぼす MWCNT ばく露の影響を調べるために、Ki-67 発現のために分析された。一致したコントロールと比較された細胞増殖の増加が、低用量 (図 5A-b, g)

と高用量 (図 5A-c, h) Mitsui-7 処理肺切片で観察された。NM-401 によって誘発された細胞増殖は、低用量群では一致したコントロールに匹敵した (図 5A-d, i) が、高用量群では一致したコントロールと比較して、より高かった (図 A-e, j)。Ki-67 に対する増加染色が主にこれらの用量群動物の細気管支ダクト近くで観察された。

・p53 発現:

p53 の発現は高用量群でのみ調べられた。増加した p53 の発現が、コントロール肺組織切片 (図 5B-a, d) と比較して、Mitsui-7 (図 5B-b, e) と NM-401 (図 5B-c, f) の高用量へばく露された肺切片で観察された。P53 染色は、線維化病変領域で主に発見され、NM-401 ばく露群で比較的より高かった。

・肺の炎症と線維化:

BALF 細胞数;

コントロール群に対して 8 匹のマウスとそれぞれのばく露群に対して 6 匹のマウスからの BALF は、差別的炎症細胞数が評価された (図 6 および補足表 II a-b)。90 日間ばく露後、細胞合計数は、溶媒ばく露マウスと比較されて、Mitsui-7 または NM-401 へばく露されたマウスからの BALF 中で、それぞれ、~7- と~4.6-倍高かった (図 6a)。同様の傾向がマクロファージに対して見付かった (図 6b)。

図 6 c に示される細胞プロファイルは、MWCNT ばく露に続く好中球数の増加を明らかにした。特に、一致するコントロールと比較して、Mitsui-7 の低、高用量へのばく露に続く好中球で、それぞれ 134、160 倍の増加があり、NM-401 の低、高用量へのばく露、それぞれ、に続く 76 と 100 倍の増加があった (補足表 IIb)。

リンパ球の数も Mitsui-7 へのばく露に続いて 67 倍と 60 倍まで、NM-401 へのばく露に続いて 12 倍と 20 倍まで、低および高用量でそれぞれ増加した (図 6d; 補足表 IIb)。コントロール及び MWCNT ばく露サンプルに対し、好酸球数の有意な差は観察されなかった (図 6 e)。

上皮細胞の総数は、一致するコントロールと比較して、それぞれ、低および高用量ばく露 Mitsui-7 群で 10 倍、14 倍高く、低および高用量 NM-401 ばく露群で 3 倍と 5 倍高かった (図 6f; 補足表 IIb)。Mitsui-7 または NM-401 へばく露されたマウスの BALF 細胞プロファイル間のトレンドは、総好中球及び上皮細胞を除いて、同等だった。

病理組織学;

ハイパースペクトルマッピングの結果と一致して、H-E 染色 MWCNT ばく露肺組織の病理組織学的解析は、肺のばく露 90 日後で大量の MWCNT がまだ存在していたことを示した (図 7A a-e)。

MWCNTs は、主に線維化巢中でバンドルで頻繁に発見された。MWCNT ばく露群における肉芽腫性の病変は、マクロファージによって支配されていた。病変は、主に、しかし独占的ではなく、小葉中心性領域 (CA) 中で、または終末細気管支と肺胞管の交差点に発生した (図 7A a-e, 補足表 III)。病気にかけた領域の定量化は、一致するコントロールから溶媒処理肺に比べて、MWCNT ばく露肺中の疾患領域で大幅な増加を示した (図 7A-a)。

肺切片は、線維化病変の指標であるコラーゲン沈着を評価するために、Masson Trichrome 染色 (青い領域) で染色された。少量から軽度なコラーゲン沈着 (総面積の 1.2 %, 7B-b) が溶媒処理肺 (図 7A-f); より具体的には、細気管支及び血管の間質および肺胞管の壁、で見付かった。

MWCNT ばく露マウスにおいて、コラーゲン量は、肺胞管、肺胞、気道の壁と間質中での沈着を伴い、2-2.6% へと控えめに増加した (図 7A g-j, 7B-b)。また、軽度なコラーゲン沈着が、炎症性細胞の近く、肉芽腫内の肺胞領域中で観察された。線維芽細胞のマーカーであるビメンチンに対する抗体を用いた免疫組織化学は、MWCNT ばく露肺切片中で (図 7A l-o); より具体的には、最大のビメンチン染色を持っていた高用量 NM-401 群における線維症の領域 (図 7 a-o) 中で、増加したビメンチン染色 (総面積の 1-1.2% (茶色染色)、図 7B-c) を示した。

対照的に、溶媒処理コントロール (図 7A-k) は、最小のビメンチン染色を示した (総面積の 0.6 %, 7B-c)。ムチン生産のためのマーカーである PAS を用いた肺切片の染色は、溶媒ばく露肺と比べて、すべてのテスト用量で MWCNTs の両タイプへばく露された肺中の気道上皮 (補足図 1a-e) 領域中で高められたムチン合成 (黒矢印) を示した。

プルシアン ブルーを使用した鉄含有量のための追加的染色は、MWCNTs へばく露された肺中のマクロファージの最小限の染色を示した。1 匹のマウスは、溶媒処理コントロールに比べて、鉄ポジティブマクロファージの有意な増加を示した (補足図 1f-j)。

遺伝子発現解析;

Mitsui-7 または NM-401 へのばく露後 90 日に採取されたサンプルからの DEGs (発現変動遺伝子、すなわち、上方と下方調節された遺伝子) のリストが、溶媒コントロールと比較して表示されて、補足表 IV 中に提示している。図 8A は、すべての用量粒子タイプの組み合わせに対して、上向きと下向き調節された遺伝子の数をまとめている。

Mitsui-7 は、低および高用量群のマウス肺において、それぞれ、1372 DEGs (902 の上

向き調節と 470 の下向き調節) と 1411 DEGs (958 の上向き調節と 453 の下向き調節)を誘発した。

最大の発現変更は、chloride channel calcium activated 3 (Clca3, 172- and 153-fold increases for the low and high dose, respectively), chemokine (C-X-C motif) ligand 5 (Cxcl5, 8- and 4-fold), serum amyloid A 3 (Saa3, 25- and 19-fold), chemokine (C-C motif) ligand 7 (Ccl7, 13- and 10-fold), triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (Trem2, 13- and 13-fold), glycoprotein (transmembrane) nmb (Gpnmb, 12- and 16-fold), Spp1 (16- and 20-fold), lymphocyte antigen 6 complex, locus I, interferon (Ly6i, 8- and 6-fold), alpha-inducible protein 27 like 2A (Ifi27l2a, 6- and 4-fold), mucin 5, subtype B, tracheobronchial (Muc5b, 11- and 12-fold), fibrinogen gamma chain (Fgg, 6- and 9-fold)のメンバーに対して観察された。

Mitsui 7 と NM-401 の両方に対して、それぞれ、低および高用量群 (図 8B-a)の間で共通だった 1073 DEGs (すなわち、731 の上向きと 342 の下向き調節された)があった。低用量 NM-401 群における DEGs の数(1205)が低用量 Mitsui-7 群 (1372 DEGs)に匹敵し、2 つの MWCNT 群間の 874 共通 DEGs を伴った(図 8B-b)。

しかし、高用量 Mitsui-7 群 (1411 DEGs)と比較して、高用量で、NM-401 ばく露肺サンプル中の DEGs の数の大幅な増加があった (214 %, 2585 DEGs、1459 の上方と 1126 の下方調節)。

溶媒コントロールと比較して最大の発現変更は、NM-401 の低と高用量で、それぞれ、Clca3 (62-, 177-fold), Cxcl5, (17- and 12-fold), Saa3 (17- and, 53-fold), Ccl7 (11-, 25-fold), Trem2 (11-, 25-fold), Gpnmb (10- and, 32-fold), Spp1 (7- and 30-fold), Ly6i (9- and 8-fold), Ifi27l2a (9- and, 13-fold), Muc5b (9-, 13-fold), Fgg (9- and 14-fold) 遺伝子に対して観察された。

NM-401 の用量群に共通な 978 DEGs (すなわち、679 の上向きと 299 の下向き調節された)があった(図 8B-c)。合計 1199 DEGS (すなわち、781 の上向きと 418 の下向き調節された)は、高用量群での両方の MWCNTs によって影響を受けた(図 8B-d)。

NM-401 に対して最大の発現変更を示す遺伝子が Mitsui-7 群で観察されるものと同じであったにもかかわらず、公開 NM-401 ばく露マウスでの発現変更は、明確な用量依存応答を示し、Mitsui-7 群よりもより大きい倍率変更を示した。ただし、応答はすべての遺伝子に対して用量依存性ではなく、より高い発現が高用量と比較して低用量群でしばしば観察された。

GO 用語の Enrichment 分析は、Mitsui-7 と NM-401 への肺ばく露が、両方の用量で、多くの生物学的プロセス (図 9) (免疫応答 (GO: 0006955)、炎症反応 (GO: 0006954)、恒常的プロセス (GO:0042592)、リンパ球活性化 (GO: 0019882)、抗原プロセッシングおよび提示 (GO: 0046649)、細胞接着 (GO: 0007155)、骨髄白血球活性化 (GO: 0002274)、および細胞増殖 (GO: 0008283) を含む)において摂動を誘発した(図 9A)。

これらの生物学的プロセスは、炎症と線維化に関連付けられる。高用量での Mitsui-7 や NM-401 ばく露肺で強化される生物プロセスは:急性炎症反応 (GO: 0002526)、サイトカイン産生の調節 (GO: 0001817)、イオン恒常性 (GO: 0050801)、骨格系発育 (GO:0001501)、上皮発育 (GO: 0060429)、細胞外構造組織化 (GO: 0043062)、骨化 (GO: 0001503)、細胞骨格組織化の調節 (GO: 0051493)、補体活性化古典経路 (GO: 0006958)、および細胞死 (GO: 0008219) :のみを含んでいた(図 9B)。

さらに、DNA 損傷に関連する生物学的プロセス (細胞内シグナル伝達カスケード (GO: 0007242)、アポトーシス (GO: 0006915)、血管新生 (GO: 0001525)、MAPKKK カスケードの調節 (GO: 0043408)、ATP 代謝プロセス (GO: 0046034)酸化ストレスへの応答 (GO: 0006979)、抗アポトーシス (GO: 0006916) と DNA 結合の調節 (GO: 0051101)) も高用量での処理肺で混乱させられた。

全体的遺伝子発現・創意工夫生体機能解析は、両粒子タイプへの応答で膨大な数の生体機能の摂動を明らかにした。炎症反応と関連する機能がそれらの機能の中で主に影響を受ける一方、線維化に関連する他のプロセス (例えば、結合組織障害)、癌 (例えば、細胞毒性、細胞生存率、進行性悪性腫瘍、転移、および腫瘍の侵入)、関節症と心血管疾患も有意に (p -値 $< 5 \times 10^{-8}$) 影響を受けた。

両方の用量で Mitsui-7 または NM-401 へばく露された肺サンプル中の DEGs に関連付けられたトップインパクトな病気と機能を示す経路分析の結果が、補足図 2A 中に表示されている。これらの経路や機能に関連付けられている DEGs の数は、Mitsui-7 よりも NM-401 へばく露された肺において、より高かった。

疾患のメカニズムを理解するために、標準経路が IPA を使用して分析された(補足図 2B)。最も重要な摂動経路は、炎症、肝線維化と酸化的損傷に関連付けられ、これらの経路中の遺伝子は両方 MWCNT 群で強化された。線維化および DNA 損傷経路に関連付けられている遺伝子の数と DEGs の倍率変更は、Mitsui-7 ばく露マウス肺よりも NM-401 でより高かった。

いくつかの上方調節遺伝子は1.3より上の倍率変更値を持ち、調節遺伝子のアクティブ化状態と有意性は IPA 中で計算された Z-スコアから予測された。正の Z-スコアを持つ上方調節遺伝子は活性化される可能性があると考えられた一方、負の Z-スコアを持つ上方調節遺伝子は、抑制される可能性があると考えられた。Z-スコア ≥ 2 を持つ上方調節遺伝子は、有意性があると考えられた。

上方調節遺伝子 Tnf、インターロイキン 6 (Il6)、Myd88、コロニー刺激因子 (Csf1、Csf2)、インターフェロン制御因子 7 (Irf7)、Jun oncogene (Jun)、インスリン様成長因子 I (Igf1)、一酸化窒素合成酵素 2 (Nos2)、Cd44、ケモカイン (C-C motif) 配位子 2 (Ccl2)、BCL2 関連 Xタンパク質 (Bax)、分泌リンタンパク質 1 (Spp1) は、両用量群で Mitsui-7 と M-401 へばく露された肺サンプル中で有意に活性化された(補足図 2C)。

interleukin 10 receptor-alpha (Il10ra), atypical chemokine receptor 2, (Acr2), suppressor of cytokine signaling 1 (Socs1), apolipoprotein E precursor (ApoE) は、抑制はこれらの群で抑制されているようだった (Z-スコア ≤ 2)。さらに、低、高用量群での Mitsui-7 と高用量群での NM-401 は、prostaglandin E receptor 4 (Ptger4) の調節を抑制した。しかし、NM-401 は、interleukin 1 receptor antagonist (Il1rn) の調節を抑制した。

炎症と線維症に関連付けられた遺伝子のリストは、Qiagen マウス RT2 プロファイラー経路特定の PCR アレイを使用してコンパイルされ、MWCNT 誘発遺伝子リストは、Poulsen et al., 2015 [6] で公表された。

同様に、我々は、Qiagen マウス RT2 プロファイラーアレイ上に存在する遺伝子と [67] で報告されている MWCNT 誘発 35 がん遺伝子サインを使用して肺がん遺伝子リストをコンパイルした。これらのリストは、炎症、線維症、癌に関連付けられている Mitsui-7 または NM-401 へばく露された肺中の DEGs の数を評価するために使用された(図 10A-D)。

Mitsui-7 ばく露の後に続き、合計 61 と 58 の DEGs が、それぞれ、低および高用量群での炎症と関連付けられ(図 10A と B)、45 と 42 の DEGs が、それぞれ、低および高用量群での線維症と関連付けられた(図 10A と B)。

線維症進行遺伝子の中で、低用量群での 37 遺伝子(図 10 A) および高用量群での 35 遺伝子(図 10B) は炎症と関連付けられる DEGs に共通だった。

癌に関連付けられていた低用量群での 27 DEGs (図 10 a) と高用量群での 29 DEGs (図 10 b) があり、そのうちの 8 つは各用量群での炎症と線維化に共通だった(図 10A-B)。

NM-401 ばく露に対し、合計 61 と 75 の DEGs が炎症に関連付けられ(図 10C と D)、42 と 55 の DEGs が低および高用量での線維化にそれぞれ関連付けられた(図 10C と D)。

線維症進行遺伝子の中で、低用量群での 37 DEGs (図 10C)、高用量群での 42 DEGs (10D) は炎症とも関連付けられた。

癌に関連付けられた低用量群での 29 DEGs(図 10C)と高用量群での 39 DEGs (図 10D) があり、低用量群でのこれらの DEGs の 7 つ(図 10C)と高用量群での 9 つ(図 10D) は 炎症と線維化に共通だった。

Mitsui-7 または NM-401 によって誘発された線維化 DEGs の約 20% (例えば、matrix metalloproteinase 12 (Mmp12), matrix metalloproteinase 14 (Mmp14), chemokine (C-X-C motif) ligand 10 (Cxcl10), insulin-like growth factor 1 (Igf1), interleukin 6 (Il6) and Ptk2) も癌と関連付けられた。

結論

本研究は、まっすぐ硬い炭素ナノファイバーを代表する Mitsui-7 と NM-401 の高用量の反復注入が 90 日間ばく露後で遺伝子導入 MutaMouse の DNA 変異を誘発しない、ことを示した。DNA 鎖切断は、NM-401 にばく露された動物の肺でのみ観察され、Mitsui-7 ではされなかった。NM-401 で観測された DNA 鎖切断は、明確に線維化病変に局在化した、増加された p53 発現を伴い、DNA 損傷への線維組織の潜在的な脆弱性を示唆した。DNA の損傷も p53 の活性化も、NM-401 群において見られたのと同程度が Mitsui-7 ばく露マウス肺において観察されなかった。ただし、両 MWCNT は、肺において強く(robust)慢性的な炎症や線維化病変を誘発させた。もっと重要なことに、両 MWCNT が、発癌性形質転換の活性化だけでなく、癌の特徴と関連付けられる何百もの遺伝子の発現—細胞の恒常性の維持に関与する細胞プロセスにおける変化を誘発した。結果は、炎症と線維症に連付けられた DEGs のサブセットも癌にリンクしていることを示した。の誘導における DNA 修復に関連する細胞活動、細胞死カスケードの活性化および他の腫瘍性形質転換プロセスの研究を伴う、MWCNT の低用量への慢性ばく露を含むより多くの研究が、MWCNT のような有毒繊維の発癌可能性を完全に認識するために必要である。

No	MWCNT-2
論文題目 (和訳)	Systemic and immunotoxicity of pristine and PEGylated multi-walled carbon nanotubes in an intravenous 28 days repeated dose toxicity study (静脈内 28 日反復投与毒性研究における製造状態の及び PEG 化多層カーボンナノチューブの全身および免疫毒性)
著者 所属機関	Ting Zhang ¹⁻³ , Meng Tang ¹⁻³ , Shanshan Zhang ¹⁻³ , Yuanyuan Hu ¹⁻³ , Han Li ⁴ , Tao Zhang ⁴ , Yuying Xue ¹⁻³ , Yuepu Pu ¹⁻³ 1 Key Laboratory of Environmental Medicine Engineering, Ministry of Education, School of Public Health, Southeast University, Nanjing, China; 2 Jiangsu key Laboratory for Biomaterials and Devices, Southeast University, Nanjing, China; 3 Collaborative Innovation Center of Suzhou Nano Science and Technology, Suzhou, China; 4 Department of Material Science and Engineering, National Key Laboratory of Solid State Microstructures, Nanjing University, Nanjing, China
書誌事項	International Journal of Nanomedicine 2017;12: 1539–1554
試験物質	・p-MWCNTs(製造されたままの状態の);Shenzhen Nano harbor Co.から入手(平均直径 10-20nm、長さ範囲 5-15µm、純度>95%)。 ・MWCNTs-PEG ;PEG 修飾は、ポリエチレン・グリコールを用いて、アシル化された COOH-MWCNTs のエステル化により導入。長さが合成中に 300-600nm まで短縮。 ・両タイプとも、内毒素汚染なし。
試料調整法	0.5% Tween-80 を含むリン酸塩緩衝液 (PBST) を用いて適切な濃度に希釈。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	・試験生物: 7 週齢雌 BALB/c マウス(Yangzhou University Comparative Medicine Center(揚州大学比較医学センター)により提供)。 ・投与方法・ 期間・試験用量: 28 日の間 1 週あたり 1 回静脈注射(尾部静脈)。一回の注射において、溶媒コントロール (PBST)、0.02mg/kg·bw、0.1mg/kg·bw、0.5mg/kg·bw の p-MWCNTs 、0.1mg/kg·bw の MWCNTs-PEG を投与。
試験結果	①肉眼評価と体重に対する影響(最後の注射後 7 日に殺処分): p-MWCNTs または MWCNTs-PEG のどちらかを用いた処理のための 28 日ばく露期間の間に毒性のための臨床兆候は無かった。体重分析は、処理群が用量関連変化において統計的に有意に異なっていなかった。 ②特定器官総括的観察 (gross observation) と器官係数に対する影響: マウスの総括的観察は、肥大した茶色っぽく着色された肺、脾臓および肝臓、および肥大した浮腫性および鬱血したリンパ節を明らかにした。MWCNTs は、主に、肺、肝臓、および脾臓中に沈着されている。p-MWCNTs 処理の最高用量群において、鼠蹊部リンパ節の肥大や鬱血肺の鬱血箇所、肝臓の鬱血性および浮腫性変化、または脾臓萎縮のようないくつかの所見が観察された。特定器官の総括的所見についての顕著な変化は、コントロール群のそれに比べて、p-MWCNT 群の高用量において観察された。肺、肝臓、脾臓および胸腺の器官重量/体重係数の増加が観察された一方、心臓、腎臓、脳、精巣、および精巣上体の器官重量/体重係数は、コントロール群に比べて、種々の用量群において、違いを全く示さなかった。p-MWCNTs の相対的な脾臓重量の有意な (P<0.05) 用量関連増加、及び 0.1mg/kg·bw MWCNTs-PEG によって処理された後の脾臓重量の有意な増加 (P、0.05) があった。 ③組織病理学: 静脈内注入 MWCNTs は、外因的な粒子とみなされるべきであり、それは免疫系によって認識された。マクロファージは食細胞のタイプであり、特に注入部位で、免疫系に微粒子の抗原の存在の警報を出す役割を果たす。従って、注入 MWCNTs が尾部静脈まわりのマクロファージによって飲み込まれたかどうかを組織化学の観察を通じて調査した。大量の p-MWCNTs 沈着が注入部位の尾部静脈において観察されて、多い細胞が注入 p-MWCNTs の飲み込みの 28 日後に黒くなった H&E 切片を示す。マクロファージが相対的に大きい細胞であり、微粒子を受入れてきたので、観察された黒い細胞は、主にマクロファージとして組織学的に区別できた。結果は、静脈内注入 p-MWCNTs がその場マクロファージによって迅速に飲み込まれることを示した。また、これは、マクロファージ細胞がそれらの食食機能を表すように活性化されたことを暗示した。組織病理学的な観察は、p-MWCNTs と MWCNTs-PEG の高及び中間の用量の静脈内投与が病理学的変化を用量依存で引き起こすかもしれないことを示した。肺組織においていくつかの好中球浸潤および肺胞中隔肥厚が観察された。肝臓の組織病理学的写真は、肝小葉の構造破壊および類洞スペースのいくつかの損失を示した。p-MWCNT

群のマウスの肝臓は、主に最高 p-MWCNT 濃度の時に、肝細胞の穏やかな空胞変性、明らかな壊死細胞無し、および穏やかな類洞鬱血を示した。個々の肝細胞が見られ、それは少量の CNTs が間質細胞中で沈着することを示した。

要約すると、結果は、p-MWCNT 処理が、肺、肝臓、および注入部位の尾部静脈において異なる程度の病理学的損傷を起こすかもしれないことを示す。しかし、明らかな病理学変化は、MWCNTs-PEG-処理マウスの脾臓とリンパ節において発見されなかった。

④脾細胞の TEM 超微細構造画像:

コントロール群のマウス脾細胞は均等に分布された真正染色体を持つ丸い核を含んでいた。MWCNTs-PEG を用いて処理された脾臓マクロファージは目立って変化しなかった一方、0.5mg/kg-bw p-MWCNT 群からの脾臓マクロファージの超微構造は、脾細胞におけるミトコンドリア膨潤、不規則な形の核、クロマチン凝縮、および空胞化を示す、ことを観察した。さらに、TEM は高い電子密度として視覚化された脾臓マクロファージ中の p-MWCNTs 内在化を確認した。結果は、より高い用量 p-MWCNTs がマウスの脾細胞マクロファージ壊死を起こすかもしれないことを示唆した。

⑤血液学および臨床化学:

血液学パラメータの顕著な変化が MWCNTs の静脈内投与後に観察された。p-MWCNTs および MWCNTs-PEG はすべての処理群において WBC 数を大幅に減少させ、0.5mg/kg-bw p-MWCNT 群において最も大幅だった。コントロール群と比較される時、0.5mg/kg-bw 群における NEUT%と EOS%が大幅に減少された一方、LYM%と BASO%は、p-MWCNT 群において増加された(注:白血球数(WBC)、好中球パーセンテージ(Neutrophils)(NEUT%)、リンパ球パーセンテージ(LYM%)、好酸球パーセンテージ(EOS%)、好塩基球パーセンテージ(BASO%))。

一般に、少ない変更が臨床化学パラメータにおいて観察された。ALP、ALT、および AST を含むいくつかの臨床化学パラメータは、用量関連影響を示した。増加された ALP、ALT、および AST は、肝臓損傷を暗示している。腎機能パラメータ(CREとBUN)は、如何なる用量群とコントロールの間でも大幅には違わなかった(注:アルカリホスファターゼ(ALP)、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)、アスパラギン酸塩アミノトランスフェラーゼ(AST)、尿素窒素(BUN)、クレアチニン(CRE))。

⑥マウス末梢血中のリンパ球および Tリンパ球サブセット活性に対する MWCNTs の影響:

28 日間、MWCNTs の種々の用量での静脈内投与によって引き起こされたマウスにおけるリンパ球部分集団の変化は、表 5 中に示される。結果によると、0.5mg/kg-bw p-MWCNTs によって引き起こされた全 T(CD3+)および全 B(CD19+)と 0.1 及び 0.5mg/kg-bw によって起こされた CD4+T リンパ球は、コントロールのそれらに比べてかなり減少された。さらに、0.5mg/kg-bw 群の CD8+(CD4+/CD8+)に対する CD4+の比率は、コントロール群のそれよりかなり低かった。投与後の CD8+および NK(CD49+)細胞サブセットのための絶対細胞数に対して群間の統計的有意差はなかった。細胞数のこの増加は、脾臓の重量増加の原因であると考えられる。

⑦血清中の免疫グロブリン(Ig)生産:

全身免疫反応を評価するために、p-MWCNTs と MWCNTs-PEG の投与後に IgM 及び IgG 抗体レベルが観察された。IgM 及び IgG は血液中に存在し、様々な病原菌と結合でき、凝集および固定化、補体活性化(古典経路)、及びそれらの毒素の中和を通じて、それらから身体を保護できる。コントロール群に比べて、IgM 及び IgG のかなり増加されたレベルが、0.1 及び 0.5mg/kg-bw の用量で、p-MWCNTs-処理マウスにおいて検出された。しかし、IgM 及び IgG 抗体レベルの同等の濃度は MWCNTs-PEG-処理マウスにおいて変化を示した。

⑧マウスの免疫機能に対する MWCNTs の影響:

プラーク形成細胞(PFC)分析と溶血テストは体液性免疫を評価するために一般的に用いられ、マイトゲン刺激脾細胞増殖は細胞免疫を検出するために一般的に用いられ、NK 細胞活性は非特異的な免疫反応を検出するために通常用いられた。28 日投与後、p-MWCNTs の高用量(0.5mg/kg-bw)は、ネガティブコントロール群と比較される時、PFC/106 脾細胞、HC50、ConA-誘発脾細胞増殖、およびリポ多糖体(LPS)-誘発脾細胞増殖のかなりの減少を引き起こした。MWCNTs-PEG 群において、HC50 および ConA-誘発脾細胞増殖は、ネガティブコントロール群に比べてわずかに減少したけれども、それは大幅ではなかった。4 群間で NK 細胞活性に明らかな違いがなかった。結果は、p-MWCNTs の高濃度が、マウスの体液性および細胞免疫機能に対して潜在的な影響があるかもしれないことを示唆する。

結論	MWCNTs の修飾の影響を調査するために、マウスにおける p-MWCNTs と MWCNTs-PEG の全身と免疫毒性を比較した。p-MWCNTs を用いて処理されたマウスは、脾臓、胸腺、および肺重量の増加と、変更された末梢血中のリンパ球数(CD3、CD4、CD8、CD19)と血清 IgM 及び IgG レベルを引き起こした。形態学的な結果は、肺及び肝臓の組織学的変化、注射部位での局所的な炎症反応、および脾臓マクロファージの超微構造変化を示す。特別な免疫機能結果は、p-MWCNTs が体液性および細胞の免疫機能を抑制し、羊赤血球と血清溶
----	--

血レベルに対する減少した免疫反応と関連することを示した。結果は、p-MWCNTs への *in vivo* ばく露が MWCNTs-PEG に比べて脾臓の異常調節を通じて全身性免疫へより多くの損害を起こしたことを示唆する。免疫毒性影響を理解することは生体適合性 CNTs の合理的なデザインをガイドするだけでなく、どのように全身性免疫毒性が引き起こされるのかに洞察を提供する。将来の研究は、CNTs のより良い生物学的適応性を開発するために、全身性免疫毒性だけでなく特別な免疫機能変化にも焦点を当てることにこの研究の結果を使用すべきである。

No	MWCNT-3
論文題目 (和訳)	Stromelysin-2 (MMP-10) facilitates clearance and moderates inflammation and cell death following lung exposure to long multiwalled carbon nanotubes (ストロメライシン-2 (MMP-10) は、長い多層カーボンナノチューブへの肺ばく露の後に続く、クリアランスを容易にし、炎症と細胞死を調節する)
著者 所属機関	Tyler C Vandivort ^{1,2} , Timothy P Birkland ¹ , Talita P Domiciano ³ , Somenath Mitra ⁴ , Terrance J Kavanagh ² , William C Parks ¹ 1 Cedars-Sinai Medical Center, Women's Guild Lung Institute, Los Angeles, CA 2 Department of Environmental and Occupational Health Sciences, University of Washington, Seattle, WA 3 Department of Pediatrics, Cedars-Sinai Medical Center, Los Angeles, CA 4 Department of Chemistry and Environmental Science, New Jersey Institute of Technology, Newark, NJ, USA
書誌事項	International Journal of Nanomedicine 2017;12 1019–1031
試験物質	MWCNT: Cheap Tubes, Inc. (Cambridgeport, VT, 米国) から購入され、NIEHS Centers for Nanotechnology Health Implications Research (NCNHIR) Consortium での参加を通じてワシントン大学の Nanotoxicology Center に提供された。 元素組成; 炭素 95.8%±0.6% (SD)、酸素 3.4%±0.2%、微量の Ni (0.5%±0.5%) と Fe (0.3%±0.3%)。
試料調整法	<i>in vivo</i> 及び <i>in vitro</i> 研究用のチューブ調製は、0.6mg/mL マウス血清アルブミン、PBS の 10µg/mL 1, 2-dipalmitoylsn-グリセロ-3-ホスホコリンおよび 0.1%エタノール(v/v) から成る分散媒体(DM)中の懸濁物から成った。MWCNTs のストックアリコト(1.6µg/µL)は、使用前に超音波処理、攪拌。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	・試験生物: Mmp10 ^{-/-} マウス(MMP10 なし; C57BL/6J 遺伝的背景の)、および野生型の同腹子(雌雄、8-12 週齢) ・投与方法・期間・試験用量: 試験結果中に記述。
試験結果	①MMP-10 の MWCNT-誘発発現: MWCNTs に対する肺の反応に対する MMP-10 のインパクトをはっきりさせるために、野生型 (Mmp10 ^{+/+}) および Mmp10 ^{-/-} マウスは 80µg の MWCNTs を用いて口腔咽頭吸引によって、または分散媒体(DM)の同等体積によって、処理された。MWCNT のこの用量は、他の研究において使われたばく露に基づいた。24 時間後、肺は収集され、mRNA 分離のために処理された。挑戦されない野生型マウス(すなわち、無 MWCNTs、無 DM)からの肺において、Mmp10 mRNA に対して、発現の無または非常に低いレベルを本質的に示している 36 から 37 までの Ct 範囲を検出した。Mmp10 の発現は DM だけの投与によって控え目に引き起こされ、処理手順が穏やかな肺損傷を起こしたことを示し、それは肺中への直接注入に関係する処理方法の間で共通である。しかし、MWCNTs へばく露される時、Mmp10 mRNA の発現は、DM-コントロールレベルより 3 倍以上上に刺激された。予期されるように、Mmp10 mRNA は Mmp10 ^{-/-} サンプルにおいて検出されなかった。 ②炎症細胞に対するインパクト: BAL 中の全細胞は、挑戦されない野生型と Mmp10 ^{-/-} マウスの間で異ならず、これらのほぼ全てはマクロファージだった。DM に対する応答で、BAL 中の全細胞は控え目に増加したが、遺伝子型の間でまだ大幅には異ならなかった。しかし、MWCNTs によって処理された時、全細胞数はコントロールと比較して減少され、Mmp10 ^{-/-} サンプルにおいてかなりより低かった。百分率細胞数は、遺伝子型及び処理の間のリンパ球のパーセンテージ又は全数における有意な差を明らかにしなかった。対照的に、野生型 BAL に比べて MWCNT-処理 Mmp10 ^{-/-} BAL 中の好中球のより高いパーセンテージだけでなく、マクロファージの減少されたパーセンテージおよび数を見付けた。しかし、MWCNTs によって上昇されたけれども、好中球の全数は、野生型と Mmp10 ^{-/-} マウスの間で大幅には異ならなかった。同様に、CXCL1/KC、ヒト CXCL8/IL-8 のマウスのオルソログをエンコードする Cxcl1 および重要な急性フェーズ好中球ケモカインの発現レベルを試験した。好中球の推定値と一致して、MWCNT 処理が増加された Cxcl1 発現を刺激したこと、及びこの増加が Mmp10 ^{-/-} マウスにおいてより大きいことへの穏やかな傾向だけを示した。減らされたケモカイン発現が Mmp10 ^{-/-} マウスにおける低下されたマクロファージ数に寄与したかどうか、評価した。Cxcl1 と同様に、Ccl2 レベルは、MWCNT 処理によってかなり増加したけれども、野生型と Mmp10 ^{-/-} マウスの間で違わなかった。これらの調査結果は、MWCNT-処理 Mmp10 ^{-/-} マウスにおける減少されたマクロファージ数が、正常に機能しない動員よりもむしろ、細胞の損失に起因していたことを示唆する。 全体的に、これらの調査結果は、MWCNT が、好中球数の増加およびマクロファージの減少の両方によって現わされた炎症促進反応を仲介したことを示す。Mmp10 ^{-/-} マウスにおいてこれ

らの観察の両方が誇張された一方、マクロファージの減少だけが統計的に有意であった。

③MWCNTs は炎症促進因子の生産を引き起こす:

多くのグループは、MWCNT が、肺中への注入の後に続く頑強な炎症促進反応 (Il1b、Il6、Tnfa、および Nos2 mRNA を含む) を引き起こすことを証明した。それ故、野生型及び Mmp10^{-/-}マウスの肺においてこれらの mRNA のそれぞれを評価した。MWCNT-処理マウスにおいて Il6 と Nos2 のための mRNA レベルが増大し、それらのレベルが野生型と Mmp10^{-/-}マウスの間で異なることを見付けた。Il1b の発現が全肺 RNA において増加傾向であったけれども、増加は有意に達しなかった。Tnfa と mRNA レベルは影響されなかった。これらの観察と一致して、肺出血または全 BAL たんぱく質、急性肺損傷の両マーカー、遺伝子型の間で違いを観察しなかった。細胞数での最も突出した応答は、マクロファージ数の減少であるとすれば、全肺転写産物がマクロファージにおいて潜在的な炎症促進表現型をマスキングしているかもしれないと仮定した。従って、観察された MWCNTs に対する *in vivo* 応答がマクロファージに帰され得るかどうかを評価するために、野生型および Mmp10^{-/-}マウスからの脊髄由来マクロファージ (BMDM) を使用した。全 *in vitro* 実験において、可能な内毒素汚染のためにコントロールに 10 μ g/mL の PmB を加えた。*in vivo* で観察したものを反映させて、MWCNTs の 10-100 μ g/mL を用いた 2 時間の BMDM の処理は、DM コントロールに比べて Mmp10 mRNA の統計的に有意な増加を結果として生じさせた。さらに、MWCNT が、野生型細胞中での Il1b、Il6、Il12a、および Tnfa のための mRNA の発現を刺激し、これらの値が Mmp10^{-/-} BMDMs においてさらに高められたことを見付けた。野生型マクロファージからの IL-18 たんぱく質の放出は、また、MWCNTs によって—しかし DM によってではなく—引き起こされ、Mmp10^{-/-}マクロファージからかなり増加された。

④MMP-10 は MWCNTs のクリアランスを容易にする:

マクロファージは吸入された粒子のクリアにとって重要なので、私達は、Mmp10^{-/-}マウスにおけるマクロファージの減少された数が MWCNTs の保持に影響を与えるかどうかを評価した。実験に、肺ホモジネートにおいて、野生型サンプルに比べて Mmp10^{-/-}溶解産物ペレットにおいてより多くの MWCNT 粒子を観察し、遺伝子型の間でのこの違いはポストばく露 28 日 (at 28 d postexposure) 明らかであり続けた。

他のグループは、吸入された MWCNTs がポストばく露 1 年 (1 year postexposure) までの間、肺中に残留することを見付けた。さらに、Mmp10^{-/-}肺切片において、肺胞マクロファージ中での粒子の蓄積を観察した。

内部カウント (internal counts) と盲目形態計測分析の両方によって、有意により多い (約 2.5 倍) 残存粒子および野生型組織に比べて Mmp10^{-/-}肺中の MWCNT によって占められた全組織のより大きいパーセンテージを測定した。DM-コントロール肺において粒子シグナルは見えなかったか、検出されなかった。肺中の残存粒子の全体的増加にもかかわらず、野生型と Mmp10^{-/-}サンプルの間での MWCNT-含有マクロファージのパーセンテージ、またはエンドサイトーシス空胞中の平均 MWCNT-占領領域のどちらかにおける差も見付けなかった。しかし、両方の遺伝子型において、マクロファージ数と MWCNT-ポジティブマクロファージのパーセンテージの間の逆関係を見付けたが、このネガティブな相関関係は Mmp10^{-/-}サンプルにおいてより頑強だった。これらのデータは、MMP-10 が、マクロファージ細胞死からの保護と MWCNT ばく露後肺から粒子クリアランスを仲介することに関与していることを示唆する。

⑤MMP-10 はマクロファージにおける MWCNT 仲介アポトーシスに対して保護する:

居住マクロファージ数が挑戦されない野生型と Mmp10^{-/-}マウスの間で異ならなかった。Mmp10^{-/-}マウスにおいて観察されたマクロファージの減少がこれらの細胞の MWCNT-誘発アポトーシスに起因していたかどうかを評価した。肺溶解産物における、MWCNT-誘発セル死の設立されたエンドポイントであるカスパーゼ-3 活性は、MWCNT ばく露によって影響されず、野生型および Mmp10^{-/-}マウスの間で異ならなかった。しかし、野生型サンプルにおいて測定されたレベルに比べて、MWCNT-処理 Mmp10^{-/-}マウスからの BAL におけるカスパーゼ-3 活性の約 2 倍の増大を見た。マクロファージが Mmp10^{-/-} BAL の細胞フラクションにおけるカスパーゼ-3 活性の頑強な増加の原因であるかどうかを評価した。*in vivo* 調査結果と一致して、MWCNT-ポジティブマクロファージ数が野生型および Mmp10^{-/-}の間で異なる一方、MWCNTs が Mmp10^{-/-} BMDM におけるカスパーゼ-3 活性のかなりより大きい増加を仲介したことを見付けた。これらのデータは、MMP-10 が、MWCNT-誘発アポトーシスからマクロファージを保護することを示唆する。肺—または任意の組織—中へ流入するマクロファージが現住集団とは別のものである、野生型及び Mmp10^{-/-}肺胞マクロファージが、動員された細胞集団をモデルする BMDM がするように、MWCNT ばく露に対して同様に反応するかどうか評価した。BMDM を用いて見たように、Mmp10 の発現は、MWCNT へばく露された野生型肺胞マクロファージにおいてかなり上向き調節された。さらに、野生型および Mmp10^{-/-}肺胞マクロファージからの IL-18 の著しい放出を見た。それは、BMDM を用いて見た応答と同様に、Mmp10^{-/-}セルからより大きい傾向であった。さらに、MWCNTs が野生型肺胞マクロファージにおけるカスパーゼ-3 活性に影響しなかった一方、それらが Mmp10^{-/-}細胞においてほぼ 3 倍の増加を仲介することを見付けた。これらのデータは、居住肺胞マクロファージと浸入マクロファ

	<p>ジの両方が MWCNT に対して同様に応答し、Mmp-10 が、MWCNT-誘発マクロファージアポトーシスを仲介することによって、両集団において保護的役割を持っているという結論を支持する。</p>
<p>結論</p>	<p>マクロファージは、MWCNT ばく露に対する重要な応答者であり、他の <i>in vivo</i> 及び <i>in vitro</i> 研究と一致している発見物である。その上、私達のグループおよび他は、Mmp10 がマクロファージ反応の重要な決定因子であり、緑膿菌を持つ急性大腸傷害、皮膚創傷、および肺感染のモデルにおける区別ステータス(differentiation status)であることを示した。とりわけ、皮膚創傷および肺感染のモデルの両方において、Mmp10-/-マウス中への野生型マクロファージの養子免疫伝達は、Mmp10-/-動物において観察された主要な表現型(皮膚創傷における余分な傷跡;肺感染における罹患率)を救うのに十分であった。この反応の根底にある正確なメカニズムが未知である(すなわち、基質 MMP-10 は、マクロファージ機能をコントロールするために作用する)一方、これらの研究すべては、Mmp-10 が傷つけられた組織中でのマクロファージ活性化の重要な変更者であると結論付けた。本研究において、私達は、MWCNT ばく露への急性反応におけるマクロファージ Mmp-10 が果たす役割を報告することによってこれらの観察を拡張する。さらに、私達の調査結果は、MWCNT ばく露への影響反応における MMP-10 の長期のインパクトに疑問を投げ掛ける。</p>

No	MWCNT-4
論文題目 (和訳)	Thrombospondin-1 and microRNA-1 expression in response to multiwalled carbon nanotubes in alveolar epithelial cells (肺胞上皮細胞における多層カーボンナノチューブへの応答としてのトロンボスポンジン-1 と microRNA-1 の発現)
著者 所属機関	M. Pacurari ^{1,2} , R. Kafoury ^{1,2} , T. Turner ¹ , S. Taylor ¹ , P. B. Tchounwou ^{1,2} 1 Department of Biology, College of Science, Engineering, and Technology, Jackson State University 2 NIH/NIMHD RCM! Center for Environmental Health, College of Science, Engineering, and Technology, Jackson State University
書誌事項	Environmental Toxicology. 2017; 32: 1596–1606
試験物質	MWCNT: Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) から購入。
試料調整法	Ca ²⁺ /Mg ²⁺ フリーリン酸緩衝生理食塩水(PBS)、pH7.4 中で MWCNT ストック(2mg/mL) は調製。分散液は超音波処理(定期的)、4°C 保持、2-3 週以内に使用。使用直前に再超音波処理。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	・試験生物: 肺胞上皮 A549 細胞 (American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) から入手)。 ・投与方法・期間・試験用量: 50 μL 分散媒体 (DM) の口腔咽頭吸引または 80 μg の MWCNTs を含む等体積によって処理。詳細は、試験結果中に記載。
試験結果	①Mir-1 標的遺伝子の識別: 潜在的 miR-1 標的遺伝子を識別するために、肺線維症および改造 (remodeling) 関連遺伝子が、miR-1 のための予測された標的であるかどうかを決定するために TargetScan 及び microRNA.org エンジンを使用した。TargetScan は 2456 個の潜在的標的遺伝子を識別し、microRNA.org は miR-1 のための 7204 個の潜在的標的遺伝子を識別し、Co13A1, Co113A1, Co119A1, TGIF1, Adams 9, 及び TSP-1 のような線維症及び細胞外マトリックス (ECM) 改造遺伝子を含んでいた。microRNA.org データベース中で検索質問として Thrombospondin-1 (TSP-1) を使い、TSP-1 が -1.1233 の全標的 miR-1 サイトのための結合された mirSVR スコアを持つ 3 つの miR-1 結合サイトを含むことが見付かった。mirSVR スコアは、6-mer またはより良好な種サイト (seed site)、または、mirSVR スコア ≤ -0.1 を持つ mRNA 中の miRNA のための標的サイトに関する回帰分析に基づく、miRNA による mRNA の下向き調節の可能性を表している。 ②TSP-1 に対する MWCNT の影響: TSP-1 mRNA は、処理 6 時間後に MWCNT の 20 μg/mL によって大幅な増加はなく、対コントロールで 1.13 倍の変化だった一方、50 μg/mL は、対コントロールで 2.25 倍まで TSP-1 mRNA を大幅に増大させた。24 時間後に 20 及び 50 μg/mL の両方の用量で、MWCNT は対コントロールでそれぞれ 2.59 及び 2.28 倍 TSP-1 mRNA を大幅に増加させた。MWCNT 処理の後に続く TSP-1 の免疫組織化学分析は、コントロールサンプルに比べて、MWCNT-処理サンプルにおける TSP-1 の強い免疫検出 (緑色) を明らかにした。免疫組織化学分析は、特に 50 μg/mL MWCNT を用いた処理の 6 時間後に、細胞周囲で強い TSP-1 検出を示した。Western blot 分析は、コントロールに比べて、50 μg/mL MWCNT を用いた後に続く 6 時間及び両用量を用いた処理の 24 時間後に TSP-1 タンパク質レベルの増加を示した。 ③MiR-1 に対する MWCNT の影響: MWCNT 処理の後に続く肺胞上皮 A549 細胞における miR-1 の分析は、コントロールと比較して、miR-1 発現の大幅な抑制を明らかにした。MWCNT は用量依存的に miR-1 発現を抑制した。20 μg/mL での MWCNT は、処理の 24 時間後、miR-1 レベル発現を 75% まで抑制した一方、コントロールと比較して、20 μg/mL での処理の 24 時間後 miR-1 発現は 60% まで抑制されただけだった。50 μg/mL での MWCNT は、処理 6 時間後 miR-1 を 80% まで抑制した一方、処理の 24 時間後、miR-1 はほとんど検知できなかった。TSP-1 が、miR-1 の予測された標的であると分かったので、TSP-1 の発現レベルと miR-1 の間の相関関係分析を実行した。ピアソン相関関係分析は、r = -0.58 を持つ miR-1 と TSP-1 mRNA の間の強い逆関係を見つけた。 ④細胞移動に対する MWCNT の影響: さらに、処理 24 時間後、創傷治癒への細胞移動に対する MWCNT の用量依存影響を分析した。20 または 50 μg/mL での MWCNT は、創傷治癒への弱い細胞移動を刺激した。20 及び 50 μg/mL での MWCNT は、対コントロールで 1.67 及び 1.49 倍まで細胞移動を刺激した。既に、48 時間後に 20 μg/mL MWCNT に応答したより高い細胞移動を示してお

	<p>り、これらの結果は、MWCNT-誘発細胞移動が、時間的に、空間的に調節されたプロセスである複雑なプロセスであることを示唆する。</p> <p>⑤細胞形態学に対する異所性 miR-1 の影響： 細胞形態学に対する miR-1 の一時的な発現または抑制の影響は、miR-1 模倣体または miR-1 抑制剤を用いて細胞にトランスフェクト(導入)することによって分析された。異所性 miR-1 模倣体は、引き起こされたセル形態学が、細胞が互いに接触することを伴う細胞クラスタリングのような細胞形態学変化を引き起こした。対照的に、異所性 miR-1 抑制剤は、細胞が互いに別れているより少ない細胞と細胞の接触を引き起こし、細胞周囲突起を持つ引き延ばされた形態学を示した。</p> <p>⑥分子ネットワーク解析： TSP-1 とその相互作用たんぱく質に関連する分子ネットワーク相互作用は、IntAct を使って検索された。分子ネットワークマップは、TSP-1 が、他の 16 遺伝子、4 多糖類、および 2 分子 (ssRNA_AG 及び Q9WMX2-pro_0000037551 (その機能が未知である)) と相互作用したことを示す。TSP-1 と相互作用している 16 遺伝子の間で、TGFβ、コラーゲンタイプ (Col 1A1 およびそのパラログ Col3A1, Col 11A1, Col VI)、FN1, BGN, TGM2、及び TUBB5 を識別した。識別された 16 遺伝子の大多数は ECM のコンポーネントであり、小道結合 ECM 組織、コラーゲン合成、細胞粘着、および細胞間通信、および TGFβ シグナリング経路と関連するシグナリング経路に関与している。識別された多糖類は、ヘパラン硫酸塩、コンドロイチン硫酸塩、及び既知のコンポーネント 細胞表面上と ECM 中で見付けられるプロテオグリカンの既知コンポーネントであるデルマタン硫酸塩を含んでいる。さらに、また、TSP-1 は既知の抗凝血因子であるヘパリンと相互作用したが、ヘパリンの正確な生理学的役割は完全には知られているわけではなく、いくつかの研究は、ヘパリンが ECM 内の FN の触媒活性化において役割を果たしているかもしれないことを示唆している。</p>
結論	<p>この研究の結果は、MWCNT-誘発 ECMリモデリングにおける TSP-1 の役割を示す。また、それらは MWCNT が肺胞上皮細胞中の miR-1 の発現を変更することを示す。研究は、TSP-1 が TGFβ を活性化させ、それゆえ線維症において役割を果たすことを示した。本結果は、miR-1 と TGFβ シグナリングの間の関係も示し、従って、肺 ECM リモデリングと線維症の MWCNT 変調への応答における miR-1 と TSP-1 の役割を示唆する。以前に出版された研究からの調査結果とともに、得られたこれらの結果は、miR-1、TSP-1、および TGFβ を通じての MWCNT-誘発肺リモデリングと線維症のための可能なメカニズムを示唆する。我々は、MWCNT が ROS の形成を引き起こし、NF-KB を活性化し、MMP-9 と MMP-12 の発現を増加させることを既に報告している。本研究を用いて我々の以前に公表した研究を裏付けて、MWCNT-誘発の肺 ECMリモデリングおよび線維症は、TSP-1 の増加された発現、および細胞膜へのその局在化を含む多くのステップに関与する。平行して、また、MWCNT は TGFβ の発現を引き起こし、それは TSP-1 と TGFβ のそれに続く活性化によって活性化される。活性化された TGFβ は、下流に信号で伝えて、Col3A1 の合成、および ECMリモデリングと肺線維症と関連した遺伝子の発現を引き起こす。</p>

(3) グラフェン

No	Graphen-1
論文題目 (和訳)	Toxicity studies of six types of carbon nanoparticles in a chicken-embryo model. (6種類のカーボンナノ粒子の鶏胎児による毒性研究)
著者 所属機関	Kurantowicz N, Sawosz E, Halik G, Strojny B, Hotowy A, Grodzik M, Piast R, Pasanphan W, Chwalibog A. Department of Animal Nutrition and Biotechnology, Warsaw University of Life Sciences
書誌事項	Int J Nanomedicine. 2017 Apr 7;12:2887-2898. doi: 10.2147/IJN.S131960. eCollection 2017.
試験物質	<ol style="list-style-type: none"> ダイヤモンドナノ粒子 (DNPs); 球状、3-4nm、デトネーション法で製造、純度>95%、比表面積 282m²/g; ζ;-21.4mV、表面化学結合; -O-H, -C=O, -C-N, -C-O-C, -COOH 黒鉛ナノ粒子 (GNPs); 球状、3-4nm、爆発法で製造、純度>93%、比表面積 540-650m²/g; ζ; 35.57mV、表面化学結合; -O-H, -C-O, -C-O-C, -C=C グラフェンナノ粒子 (pG); 不規則形状、厚さ 1-5nm、平均フレーク径 4μm、天然黒鉛の液相剥離法で製造、純度>99.5%、比表面積; 120-150m²/g、ζ; 4.15mV、表面化学結合; -O-H, -C=C, -C=O, 酸化グラフェン(小) (sGO); 不規則形状、8-25nm、天然黒鉛片から修正 Hummers 法で作成、ζ;-4.49mV、表面化学結合; -O-H, -C=C, -C=O, -C-O 酸化グラフェン(大) (lGO); 膜状、1.27μm、天然黒鉛片から修正 Hummers 法で作成、ζ; -16.73mV、表面化学結合; -O-H, C=C, -C-O-C, C-O 還元酸化グラフェン (rGO); 不規則形状、2.53μm、50mg の lGO の水分散液から作成、ζ; -20.93mV、表面化学結合; -O-H, C=C, -C-O-C, C-O <p>1-3 は SkySpring Nanomaterials (Houston, TX, USA) から購入 4-5 は Institute of Electronic Materials Technology, Warsaw, Poland で作成</p>
試料調整法	水中に WFI; Aqua Pro injection; Polpharma, Starogard Gdański, Poland) で射出し、500μg/ml とし、超音波浴中で1時間保持 (550W/m ²)
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	<ul style="list-style-type: none"> 透過電顕、ζ ポテンシャル測定、FTIR 測定 (表面化学結合) で各粒子をキャラクタライズした。 鶏胎毒性試験; 鶏卵のアルブミン中に 500μg/ml の CNPs を 0.3ml 注入する。37°C、湿度 70% でインキュベート。5、10、15、20 日後胎仔の成長度合いを調査。 血液検査; 5μL 採取し、赤血球のモルフォロジー調査及び血清の生化学分析を実施。
試験結果	<ul style="list-style-type: none"> キャラクタリゼーションの結果は、上記「試験物質」の項に掲載した。 鶏胎毒性; 生存率; DNPs は何も CNPs を混入しない場合と変わらず。それとの相対的な生存率は、rGO が 95%、pG が 92.5%、GNPs が 89%、sGO は 87.5%、lGO は 80% であり、毒性は moderate と言える。 胎仔重量に統計的にグループ差はなかった。肝臓、脳、心臓、腎臓、脾臓の重量も同様。 全グループにおいて赤血球に炎症はなく、形状等に変化は見られなかった。 血清の生化学試験; AST、ALT、ALP、グルコース、クレアチニン、尿素窒素、全蛋白、アルブミン、LDH、トリグリセリドに各物質間に有意な変化はなかった。 肝臓溶解物中マロンアルデヒド (MDA) 濃度 (脂質酸化による損傷の指標) も同様であった。
結論	カーボンナノ粒子は、大きな副作用なしに血液循環に留まり、薬物送達のための媒体または活性化化合物それ自体としての潜在的な適用性を示唆している。しかしながら、それらの特性についてさらに検討する必要がある、これらの特性は製造方法および表面機能化によって異なる。

No	Graphen-2
論文題目 (和訳)	Graphene and carbon nanotubes activate different cell surface receptors on macrophages before and after deactivation of endotoxins エンドトキシン(内毒素)の不活性化の前後で、グラフェンとカーボンナノチューブはマクロファージ上の異なる細胞表面レセプターを活性化させる。
著者 所属機関	Mohamed H. Lahiani ^{a,†} , Kuppan Gokulan ^{a,*} , Katherine Williams ^a , Mariya V. Khodakovskaya ^{b,c} and Sangeeta Khare ^{a*} *Correspondence to: Kuppan Gokulan and Sangeeta Khare, Division of Microbiology, National Center for Toxicological Research, US-FDA, 3900 NCTR Rd, Jefferson, AR, 72079, USA. E-mail: kuppan.gokulan@fda.hhs.gov; sangeeta.khare@fda.hhs.gov † Authors contributed equally to the study. a Division of Microbiology National Center for Toxicological Research, US Food and Drug Administration, Jefferson, AR, 72079, USA b Department of Biology, University of Arkansas at Little Rock, Little Rock, AR, 72204, USA c Institute of Biology and Soil Sciences, Vladivostok, Russian Federation, 690024
書誌事項	J. Appl. Toxicol. 2017; 37: 1305-1316
試験物質	<ul style="list-style-type: none"> ・元状態グラフェン: the NanoCore facility at the National Center for Toxicological Research (NCTR) in Jefferson, AR, USA から供給。 ・グラフェン平板 (< 3 層; 横方向の寸法 1-2 um): Cheap Tubes (Brattleboro, VT, USA) から購入。 ・長 MWCNT [MWCNT-COOH-ロング(外径 13-18nm; 長さ 1-12um)]、短 MWCNT [MWCNT-COOH-ショート (外径 < 7nm; 長さ 0.5-2 um)]: US Research Nanomaterials Inc (Houston, TX, USA) から購入。 ・ヘリカル炭素ナノチューブ [ヘリカル MWent (外径 100-200 nm; 長さ 1-10 um)]: ・単層炭素ナノホーン (SWCNHs): Dr Puretzky from Oak Ridge National Laboratory から提供。 ・活性炭: Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入。 <p>*キャラクターゼーション結果は、別途論文または既存公開と説明されているのみ。 このうち、ばく露試験には、元状態グラフェン、長 MWCNT の 2 つを使用。共に、オートクレーブ処理(AU-)で、汚染エンドトキシン濃度レベルを下げています(不活性化)ものと、オートクレーブ未処理品の 2 種類を使用。</p>
試料調整法	すべて 炭素系ナノマテリアル(CBNs) は水中に懸濁され、15 分間超音波処理。超音波処理後、ウシ血清アルブミン (BSA) は 0.05% の最終的濃度を達成するためにこれらの懸濁液に添加。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	試験生物: J774 マウスのマクロファージ細胞 (TIB-67; ATCC, Manassas, VA, USA) 投与方法・期間・試験用量: <i>in vitro</i> . 1, 20µg/ml. 48 時間培養(1, 3, 48 時間ポストインキュベーションで、培養上澄液除去)。 コントロールは、未処理(0µg/ml)及び精製エンドトキシン(1, 2 EU/ml)と培養。
試験結果	<ul style="list-style-type: none"> ・食食: マクロファージは、オートクレーブ処理材料よりも非処理材料と培養された時、より多くの NM sを取り込んだ(撮像)。CBNs は液胞に局在し、これは非処理(NA)グラフェンに比べて NA-MWCNT で最も明白。 ・細胞毒性(LDH 活性を評価): pyrogenated と depyrogenated (外因性発熱物質(パイロジェン)除去) CBNs の両方は 1, 3h 時点で細胞毒性を引き起こすことができないことを示した。対照的に、24, 48 h 培養されたマクロファージは 1, 3 h 培養やコントロールの細胞と比較して有意に高い細胞毒性があり、24 h と比較して 48 h がはるかに高いことを示した。Pyrogenated CBNs (グラフェンと異なる MWCNTs) はより多くの LDH を生成し一般的に大きい細胞毒性を示した。この同様なパターンは、1 と 20µg/ml の濃度の両方で観察され、グラフェンと MWCNTs の両方で観察された。主な違いは、1µg/ml 濃度の pyrogenated または非オートクレーブ処理 MWCNT が 20µg/ml と比較して有意に高い LDH を生成するようマクロファージを誘導したことである。 ・遺伝子発現解析(免疫毒性評価)(細胞から、RNA 分離、cDNA 生成、遺伝子発現評価は Antibacterial Response PCR Arrays (SA Biosciences/ Qiagen, Valencia, CA, USA) in an Applied Biosystems 7500 DNA Sequence Detection System を使用。):

	<p>遺伝子発現データ（図 5）から生成したヒートマップは、グラフェン又は MWCNTs 介在活性化の間の遺伝子発現の分離があっただけでなく、CBNs を介した遺伝子発現のパターンはオートクレーブ処理と非処理のグループに分離したことを示した。</p> <p>全体的に見て、遺伝子発現パターンは、バクテリアエンドトキシン（ポジコン）、グラフェン、MWCNTs を用いて処理されたマクロファージにおいて、遺伝子発現の異なるパターンがあったことを明示した。また、下流のシグナル分子/エフェクター分子だけでなく、病原体認識レセプターの発現差異があった。</p>
<p>結論</p>	<p>研究者は、depyrogenated NMs が免疫学的アプローチを含む研究のために使用されることを確保するように注意すべきである。また、科学者は、エンドトキシンや製造条件のための材料試験を記述する対応するデータなしでの、健康への CBNs の悪化影響に関する結果やレポートを解釈することに慎重であるべきである。</p>

No	Graphen-3
論文題目 (和訳)	Graphene oxide nanosheets induce DNA damage and activate the base excision repair (BER) signaling pathway both <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> (酸化グラフェンナノシートは、DNA損傷を誘発し、 <i>in vitro</i> および <i>in vivo</i> の両方で塩基除去修復(BER)シグナル伝達経路を活性化する)
著者 所属機関	Chun-Jiao Lu ^a , Xue-Feng Jiang ^a , Muhammad Junaid ^{a, b} , Yan-Bo Ma ^a , Pan-Pan Jia ^{a, b} , Hua-Bin Wang ^a , De-Sheng Pei ^a a) Chongqing Institute of Green and Intelligent Technology, Chinese Academy of Sciences, Chongqing, 400714, China b) University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China
書誌事項	Chemosphere 184 (2017) 795e805
試験物質	酸化グラフェンナノシート(GO):GOシートは、雲母表面上に、約1.5nmの高さで良好に分散、単一のGO層の高さと一致。横方向サイズは約1.5 μ m。
試料調整法	GOの調整:GO粉末(Sigma-Aldrich)を超純水に懸濁、50分間超音波処理、1g/Lストック溶液を調整。その後、実験ごとの濃度に希釈。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	試験生物: 生後3か月の野生型ゼブラフィッシュ(Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences) GOのAFM特徴づけ: Dimension Edge Instrumentを用いて室温で実施。トッピングされたシリコンカンチレバーを用いて、公称スプリング定数40N/mおよび公称プローブ曲率半径10nmを用いて空气中でGOを特徴づけるために、最適化された操作パラメータを用いたタッピングモードAFMを使用。 細胞培養、GOばく露および細胞生存率測定: 10%ウシ胎仔血清(FBS)と1%ペニシリンストレプトマイシン溶液を補充したRPMI培地1640中でHEK293T細胞を、空气中5%CO ₂ の雰囲気に加湿インキュベーター内で37°Cで培養。GOばく露のために、細胞をウェルプレート(約2.4x10 ⁵ 細胞/ウェル、3mL/ウェル)に播種、37°Cで12時間培養。次いで、異なる濃度のGO(0,5,25,50mg/mL)含有培地に細胞をばく露。各処理を3回繰返し、全細胞を37°Cで24時間培養。GOへのばく露後のHEK293T細胞の生存率を調べるために、CCK-8アッセイを使用。細胞をウェルプレートに播種(約1x10 ⁵ 細胞/ウェル、100mL/ウェル)、37°Cで12時間培養。上清を除去、細胞をPBSで2回洗浄。その後、ブランク培地(対照群)および異なる濃度のGO(試験群)含有培地を添加。各処理を6回繰返し、5%CO ₂ 雰囲気に加湿インキュベーター内で37°Cで24時間培養。CCK-8溶液を添加、波長450nmのマикроプレートリーダーで4時間後に吸光度測定。 コメットアッセイ: DNA損傷をアルカリコメットアッセイにより測定。 AFMを用いた細胞への機械的作用の影響: 力の曲線は、PBS緩衝液中の接触モードを有する寸法辺縁器具を使用。校正後、力曲線を1mm/sの速度で記録。少なくとも10個の力曲線を各細胞について集め、3回の独立した実験から30個以上の細胞を測定。力曲線の生データは、Igor Proに基づく自己書き込み手順を用いて、力-距離曲線に変換。得られた力-距離曲線に基づいて細胞の変形を評価し、P=粘性変形/(粘性変形+弾性変形)に従って計算した粘性係数(P)を用いて定量。全ての計算は、Matlabに基づく自己記述手順を使用して実施。 ゼブラフィッシュの繁殖とGOナノシートへのばく露: ゼブラフィッシュを明暗14時間:10時間で自動水循環システムに入れ、1日3回、フラインシュリップを摂餌。正常な成体ゼブラフィッシュ雄2匹、雌1匹を選定し、1晩タンク内で産卵させた。産卵後、胞胚期の150個の胚を同定、ペトリ皿に移し、異なる濃度のGO(0,5,25,50mg/mL)含有培地にばく露。各処理は28±5°Cの照明光インキュベーター内で独立して3回繰返し実施。72 hpf(受精後数時間)における生存率および孵化率は、以下の式を用いて計算; ・生存率/孵化率=(生存数/孵化胚)/全胚×100・・・(1) HEK293T細胞とゼブラフィッシュ胚における遺伝子発現プロファイリング: GOに24時間ばく露後、RNAiso Plus試薬を用いて、ウェルプレート(約2.4x10 ⁵ 細胞/ウェル、3mL/ウェル)からHEK293T細胞の全RNAを抽出。cDNAの合成は、Primer Script RT試薬キットを用いて実施。qRT-PCRは、ABI 7300システム上のSYBR Green RCR Kitを用いて実施。選択された遺伝子プライマー及び配列を表1に列挙。ハウスキープ遺伝子 β -アクチンを内部対照として選択。全サンプルを3回繰返し実施。遺伝子発現レベルは、2 ^{-$\Delta\Delta$CT} 法を用いて β -アクチンに対して標準化。ゼブラフィッシュの胚をペトリ皿で培養、GOに24時間ばく露。各処理を3回繰返し実

	<p>施。全 RNA を 30 個の均質化ゼブラフィッシュ胚から抽出。HEK293T 細胞と同じプロトコールに従って、qRT-PCR のために cDNA を合成。</p>
<p>試験結果</p>	<p>HEK293T 細胞において GO により誘導される細胞毒性と DNA 損傷: CCK-8 アッセイを用いて細胞生存率を測定。GO (5,25,50mg/mL) で 24 時間処理した HEK293T 細胞の細胞生存率は 87.7% から 75% に低下 ($p < 0.01$)。GO ばく露後、HEK293T 細胞の形態変化は、対照群と比較して、GO ばく露群では細胞が変形し、GO ばく露濃度の増加に伴って細胞の異常形態が増加した (図 3A)。細胞生存率は、GO 濃度の増加とともに減少 (図 3B)、GO の細胞毒性が用量依存的であることが実証された。コメットアッセイの結果 (図 4A、4B) から、GO ばく露が HEK293T 細胞における DNA 損傷を誘導したことを示した。対照群と比較して、GO (5,25,50mg/mL) に 24 時間ばく露後の尾部 DNA 百分率、尾の長さ、尾のモーメント、オリブの尾のモーメントに有意差が観察された。</p> <p>GO ばく露後の HEK293T 細胞の生物物理的特性: 異なる GO ばく露濃度での HEK293T 細胞の変形を特徴付けるために、AFM 機械的技術を用いた。計算された粘性係数をヒストグラムにプロットし、ガウス関数に適合させた (図 5)。対照 (0.73) と比較して、GO ばく露後の細胞の粘度因子は用量依存的に減少 (5mg/mL については 0.53、25mg/mL は 0.52、0.5mg/mL は 0.52)、GO ばく露が細胞構造における変形を誘導することを示した。</p> <p>GO にばく露されたゼブラフィッシュ胚の生存率と孵化率: 12,24,48,72 時間の異なる濃度の GO (0,5,25,50mg / mL) へのばく露後のゼブラフィッシュ胚の生存率 (表 3) は、すべての GO ばく露濃度で 12-24 時間のばく露時間の増加とともに有意に減少。しかし、生存率は、ばく露時間 48 時間、72 時間で一定であった。異なる GO 濃度に 72 時間ばく露後、対照群と比較して孵化率は 5mg/mL からわずかに減少、その後はより高濃度 (25,50mg/mL) でわずかに増加したが、その差は有意ではなかった ($p > 0.05$) (表 3)。</p> <p>GO ばく露は BER 経路の遺伝子発現レベルを妨げた: HEK293T 細胞では、より低い GO 濃度 (5mg/mL) では、標的遺伝子の発現レベルに有意な変化を誘導することができなかった。対照群 (図 6A) と比較して、CREB1 (サイクリック AMP 応答要素結合タンパク質) は、それぞれ GO 25、50mg/mL で 1.73 倍、1.8 倍に有意に上方調節された。APEX、OGG1、UNG もまた、それぞれ 50mg/mL で 1.38 倍、1.2 倍、1.57 倍にわずかに上方調節された (図 6A)。POLB 発現は、異なるばく露濃度で対照と比較して、有意ではなかった ($p > 0.05$) (図 6A)。DNA 損傷パラメータと BER 経路遺伝子発現との間に有意な正の相関があることを確認した (表 4)。DNA 損傷パラメータと他の 2 つの BER 経路調査遺伝子 (APEX1、POLB) 間に相関が存在したが、相関係数は有意ではなかった ($p > 0.05$)。DNA 損傷を遺伝子発現の予測因子として使用すると、$OGG1 (0.965) > UNG (0.962) > CREB1 (0.883) > APEX1 (0.578) > POLB (0.549)$ の順で有意に高い線形回帰係数 (r^2) が明らかになった。BER 経路の遺伝子発現が、GO ばく露によって引き起こされる HEK293T 細胞における DNA 損傷の帰属であることを示唆した。ゼブラフィッシュ胚では、apex1 遺伝子の転写レベルは、それぞれ GO 25、50mg/mL へのばく露後に、1.57 倍、1.31 倍に有意に上方調節された (図 6B)。GO 50mg/mL にばく露した場合、ogg1、polb、creb1 の発現レベルもそれぞれ 1.36 倍、1.47 倍、1.77 倍に有意に増大した (図 6B)。他の GO 濃度については、これら遺伝子の発現に関して明らかな差異は観察されなかった。</p>
<p>結論</p>	<p>本研究の発見は、酸化グラフェン (GO) が HEK293T 細胞における DNA 損傷を引き起こし、HEK293T 細胞およびゼブラフィッシュ胚の両方で塩基除去修復経路を誘導することを実証した。GO ナノシートはまた、細胞の物理的特性を乱す可能性を有し、GO の細胞毒性の別の指標である。さらに、本研究は、生物医学装置および他の用途における GO の使用を規制することを思い出させる、過剰な GO ばく露の結果としての BER 経路の活性化を強調した。</p>

(4) TiO₂

No	TiO2-1
論文題目 (和訳)	Nanoparticles-induced apoptosis of human airway epithelium is mediated by proNGF/p75(NTR) signaling. (ヒト気道上皮のナノ粒子誘発アポトーシスは、proNGF/p75(NTR)シグナル伝達により媒介される)
著者 所属機関	Sreeparna Chakraborty ^a , Vincent Castranova ^b , Miriam K. Perez ^c , and Giovanni Piedimonte ^c a Department of Pediatrics , West Virginia University School of Medicine , Morgantown , West Virginia , USA. b Department of Pharmaceutical Science , West Virginia University School of Pharmacy , Morgantown , West Virginia , USA. c Pediatric Institute and Children's Hospital, Cleveland Clinic Foundation , Cleveland , Ohio , USA.
書誌事項	Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A. 2017, Vol.80, No. 1, p.53-68. doi: 10.1080/15287394.2016.1238329.
試験物質	TiO ₂ ナノ粒子 (TiO ₂ -NP) : 商用グレード二酸化チタン TiO ₂ 微粒子 (TiO ₂ -FP) : 酸化チタン(IV)微粒子
試料調整法	ストック溶液(10mg/ml) : TiO ₂ -NP 又は TiO ₂ -FP を、無菌リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中に 30 秒間超音波処理、15 秒間氷で冷却、合計 3 分間、で調整。 粒子 : 使用前に、無菌条件で PBS 中に 0-100µg/ml に希釈後、1 分間超音波処理。 サイズ分布測定用 : PBS 中に 100µg/ml で粒子懸濁、2 分間 (TiO ₂ -FP) 又は 1 分間 (TiO ₂ -NP) 超音波処理 (TiO ₂ -NP は 1 分以上の超音波処理で弱凝集体が増加)。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	【細胞株】ヒト鼻上皮細胞、ヒト気管上皮細胞、ヒト気管支上皮細胞、タイプ I 肺胞細胞。全ヒト上皮細胞は、5%CO ₂ 雰囲気、37°C で各培地で成長。細胞が 70-80%コンフルエント(細胞密度)で、かつ 5-6 代継代内に到達してから実験実施。肺胞細胞のみ、3-4 代継代内で実施。 【試験種類】細胞毒性試験、RT-PCR(逆転写ポリメラーゼ連鎖反応)、蛍光活性化細胞選別(FACS)、免疫染色、免疫沈降/イムノブロット、JNK 細胞死経路の p75 ^{NTR} 媒介活性化の役割・IL-1α の役割・p75 ^{NTR} の役割の確認試験。アポトーシス/壊死試験、NGF 抑制試験。統計解析。 【投与期間】24 時間 【試験用量】TiO ₂ -FP 又は TiO ₂ -NP(0-100µg/ml) 【試験・投与方法】 ・細胞毒性試験 : 上皮細胞をウェルプレートに設置。細胞密度が約 70%到達後、培地を TiO ₂ -FP 又は TiO ₂ -NP 含有 200µl 新鮮培地に再設置し 24 時間培養。ばく露後、細胞生存率を 10µl MTT 試薬添加により測定、3 時間 37°C で培養。結晶化 MTT を溶解し、光学密度(OD)を 575nm で測定。生存率を計算。 ・RT-PCR(逆転写ポリメラーゼ連鎖反応) : 神経栄養因子と受容体の遺伝子発現を RT-PCR で解析。神経栄養発現の倍の変化を B2M でノーマライズ、ΔΔCt 手法で計算。 ・蛍光活性化細胞選別(FACS) : TiO ₂ 粒子への 24 時間ばく露後の神経栄養タンパク質発現を FACS で測定。NGF、BDNF、TrkA、TrkB、p75 ^{NTR} 受容体を 1 次抗体で染色。気道上皮細胞をトリプシン処理で単離、4%パラホルムアルデヒドに固定、PBS 中 0.5%トライト X-100 で透過処理。非特異的結合をヒト免疫グロブリン(Ig)G 添加により除去。細胞を NGF、BDNF、TrkA、TrkB、又は p75 ^{NTR} 用 1 次抗体を用いて培養、各蛍光共役 2 次抗体を培養、FACSCalibur を用いて CellPro ソフトウェアにより解析。 ・免疫染色 : ポリ-L-リシン被覆ガラスカバースリップ上で成長、24 時間 TiO ₂ -FP 又は TiO ₂ -NP 10µg/ml にばく露させたヒト気道上皮細胞で画像試験。その後、細胞を PBS でリンス、4%パラホルムアルデヒドで固定、抗 NGF 抗体で、その後 AlexaFluor488 ラベル 2 次抗体で免疫染色。カバースリップに DAPI 含有 Prolong Gold 消泡剤を装着。EC Plan-Neofluar 40x1.30 oil DIC M27 オブジェクトを用いて細胞可視化、共焦点顕微鏡により撮影。 ・免疫沈降/イムノブロット : タンパク質を、コントロールと TiO ₂ 処理細胞ペレットからプロテアーゼ阻害剤カクテル含有 RIPA 溶解緩衝液を用いて抽出。同量(50µg)タンパク質を 10%SDS-PAGE ジェルにより分離、ニトロセルロース膜に 4°C で移行。タンパク質サンプル含有膜を TBS-T 緩衝液中に 5%ミルクでブロック後、抗 NGF 抗体あるいはリン酸 - JNK で培養。タンパク質鎖を化学発光検出で可視化。イムノブロットを、β-アクチン、GAPDH、又は前 JNK 用特異的抗体で剥ぎ取り、ブロック、再プローブし、定量。 ・JNK 細胞死経路の p75 ^{NTR} 媒介活性化の役割 : TiO ₂ 粒子ばく露又は未処理コントロール細胞由来タンパク質 200µg を抗 p75 ^{NTR} マウスモノクローナル抗体(sc-56448)を用いて 4°C で 1 晩培養。抗原抗体複合体を A/G プラスアガロースビーズ(sc-2003)に 4°C で 2 時間結合させ沈降、ピ

	<p>ーズから一度溶出したものはイムノブロッティングを実施。その後、膜をウサギポリクローナル抗 NGF 抗体(sc-33602)を用いて、ブロッッキング緩衝液中で 4°C で1晩培養、化学発光シグナルを開発。</p> <p>・IL-1α の役割:TiO₂-NP ばく露気管支上皮細胞中の NGF 発現を調節時の IL-1α の役割。気管支上皮細胞の密度(80%)プレートを経換え IL-1α(0.5mg/ml)にばく露又は、IL1-ra(2-100μM)で3時間、前処理後、TiO₂-NP(10μg/ml)でさらに24時間ばく露。培養後、細胞を RNA 抽出、-80°C で保存又は、ウェスタンブロット及び免疫発光アッセイ用に処理。 p75^{NTR} の役割:神経栄養誘発死媒介時。特異的ブロッカ抗体(抗ヒト NGFR p75^{NTR}, SPM299)を使用。気管支及び肺胞上皮細胞を 1μg/ml 抗体で 24 時間、前培養後、TiO₂-NP に 24 時間ばく露。ブロッカ抗体の特異性評価用に、アイソタイプ IgG 抗体をコントロールとして使用。細胞死を FACS で測定。</p> <p>・アポトーシス/壊死アッセイ:TiO₂ 誘発細胞死モード理解のために、アネキシン V/ヨウカプロピシウム(PI)アッセイを利用。気道上皮細胞をプレート上で成長、TiO₂-NP 又は TiO₂-FP に 24 時間ばく露。全浮遊細胞を遠心分離で捕集、接着細胞をトリプシン処理により分離。細胞を FITC 共役アネキシン V と PI を用いて、室温、暗条件下で 15 分間培養し、FACSCalibur フローサイトメーターと CellQuest Pro ソフトウェアで解析。</p> <p>・NGF 抑制:トランスフェクション試薬として Lipofectamine 2000 を有する特異的 siRNA を使用。抑制効率を RT-PCR で測定。NGF 欠損気管支上皮細胞をその後 TiO₂ 粒子(10μg/ml)に 24 時間ばく露。細胞をトリプシン処理で捕集。アポトーシスと壊死を FACS により測定。proNGF 誘発アポトーシスにおける p75^{NTR} の役割を、コンフルエント気管支上皮細胞を抗ヒト p75^{NTR} 抗体 1μg/ml に 24 時間前処理後、TiO₂-NP にさらに 24 時間ばく露により確認。抗ヒト IgG 抗体をアイソタイプコントロールとして使用。細胞を培養後回収し、アポトーシスを FACS により測定。</p> <p>・統計解析:平均\pm平均の標準偏差(SD)。複数比較用に ANOVA 解析、グループ内比較用に t-テスト。グループ間事後比較を Holm-Sidak 法又は Tukey-Kramer テスト。P 値 < 0.05 は有意。</p>
試験結果	<p>・TiO₂ 誘発細胞毒性:肺胞・気管支細胞は、気管・鼻細胞よりも TiO₂ 毒性の毒性を受けやすい傾向をしめした。同質量濃度の MTT アッセイで、TiO₂-FP よりも TiO₂-NP へのばく露後の細胞生存率が数値的に大きく低下した。</p> <p>・TiO₂ 誘発神経栄養発現:TiO₂-NP へのばく露で、気道上皮細胞の神経栄養合成と表面受容体発現が上昇し、気道タイプに依存した重要な違いを示した。TiO₂-NP ばく露で、鼻、気管支、肺胞上皮細胞の NGF と p75^{NTR} 受容体遺伝子の発現が有意に高まったが、TrkA 受容体発現は肺胞上皮細胞でのみ増加。BDNF と TrkB 遺伝子発現は、鼻上皮細胞の TrkB 以外は、全細胞種で基底レベル近くに留まった。気管上皮細胞は少なくとも TiO₂-NP に反応し、神経栄養遺伝子発現の有意な変化なし。同質量濃度の TiO₂-FP は、気管、気管支、肺胞上皮細胞の NGF 遺伝子発現を増加、気管上皮細胞の p75^{NTR} の上昇、気管支上皮細胞の TrkA 上昇。</p> <p>肺胞上皮細胞は、コントロールと比較して、10μg/ml TiO₂-NP 又は TiO₂-FP へのばく露後に NGF タンパク質合成が明らかに上方に調節。鼻上皮細胞も、TiO₂-NP へのばく露で明らかに高い NGF タンパク質濃度であったが、気管上皮細胞ではコントロールと比較して NGF の明確な変化なし。TiO₂-NP 処理した鼻と肺胞細胞は、NGF の細胞内染色が有意に増加したが、TiO₂-FP ではベースラインレベルに近かった。気管支上皮細胞は TiO₂-NP 又は TiO₂-FP へのばく露で内因性 NGF が有意に上方に調節。IL-1α タンパク質濃度は TiO₂-NP 又は TiO₂-FP へのばく露後に細胞上澄みで有意に上昇した。外因性 IL-1α は TiO₂-NP と同レベルまで NGF 遺伝子発現を増加、特異的受容体抑制因子(IL1-ra)による前処理は、NGF 遺伝子発現に対する TiO₂-NP ばく露の効果を無効化した。IL1-ra は、気管支上皮細胞のウェスタンブロット又は FACS 解析により測定された TiO₂-NP 誘発 NGF タンパク質合成に対して同様の阻害効果。</p> <p>・ProNGF/p75^{NTR} 媒介細胞死: TiO₂-NP ばく露後の気管支上皮細胞で最高濃度で NGF 二量体形態を明らかにした。免疫沈降は、proNGF が高親和性で p75^{NTR} 受容体に結合することを示した。ウェスタンブロットは、気管支上皮細胞の JNK リン酸化後、TiO₂-NP へのばく露で、有意な増加を示し、本経路が proNGF-p75^{NTR} 軸からのシグナル伝達により開始される細胞の遊走において重要な役割を果たすことを示唆。TiO₂ は、アポトーシスによる著しい気道上皮細胞死を、特に気管支上皮細胞間で誘発。初期アポトーシス細胞の増加割合は、TiO₂-NP 処理後は、肺胞 > 気管支 > 鼻上皮細胞、TiO₂-FP ばく露では、主に壊死による細胞死を誘発し、鼻 > 肺胞 > 気管 > 気管支上皮細胞。p75^{NTR} は TiO₂-NP 誘発細胞死を防ぐ阻害剤で、気管支及び肺胞上皮細胞の両方の生存を有意に高め、proNGF-p75^{NTR} 軸を介したシグナル伝達が NP 誘発アポトーシスに重要であることを示した。24 時間の TiO₂-NP ばく露前に NGF 特異的 siRNA (NGFsiRNA) で核酸導入した気管支細胞は、アポトーシスはばく露していない細胞よりも有意に高かったが、スクランブル siRNA を用いて核酸誘導したコントロールと比較して、初期アポトーシスの有意な減少とともに、壊死の増加を示した。ばく露していないスクランブル siRNA 核酸誘導の生存率は、未処理細胞と類似。</p>

結論	<p>データから、TiO₂-NP へのばく露は、重要な神経栄養タンパク質と、呼吸器上皮におけるそれらの同族受容体の発現パターンの複雑な変化を、呼吸器における気道深度に依存した違いとともに、生成することを示した。特に、NGF 前駆体は、TiO₂-NP にばく露した気管支上皮細胞で過剰発現されたが、成熟したニューロトロフィン(神経栄養因子)に変換することができず、したがって、主に p75NTR 死受容体に結合した。同じ細胞で、p75NTR はそのタンパク質リガンドと並行して、それに対応した抗アポトーシス TrkA 受容体の変化していない発現と比較して有意に過剰発現する。結果として生じた proNGF/p75NTR シグナル伝達の増加は、SAPK-JNK 経路の下流で活性化し、その結果、アポトーシス死及び気管支上皮の早期老化をもたらした。したがって、未成熟 NGF 前駆体とその成熟形態との不均衡は、細胞死を促進する受容体の優先的発現と対になって、気道 NP に対する空气中 NP の有害作用に寄与する。</p>
----	--

No	TiO ₂ -2
論文題目 (和訳)	Toxicokinetics of titanium dioxide (TiO ₂) nanoparticles after inhalation in rats (二酸化チタンナノ粒子のラットの吸入後の体内動態)
著者 所属機関	Pujalté ^a , D. Dieme ^a , S. Haddad ^a , A.M. Serventi ^b , M. Bouchard ^a a Department of Environmental and Occupational Health, University of Montreal b Institute of Research of Hydro-Quebec
書誌事項	Toxicology Letters 265 (2017) 77–85; .doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.11.014
試験物質	TiO ₂ ; Nanostructured & Amorphous Materials Inc. (Houston, Texas, USA) より購入。アナターゼ(正方晶)99%。平均一次粒径 10~30nm、比表面積 200–220m ² /g。数百 nm から数 μm のカリフラワー状の凝集体。
試料調整法	二酸化チタンを濃度 6.5mg/mL で超純水(脱イオン水)中で攪拌し、Collision 6-jet aerosolizer (BGI Inc., Waltham, USA)により液体エアロゾルを生成。(空気流量 7.25L/min,最大圧力 2.76 bar)分散、空気希釈後の吸入エアロゾル中の二酸化チタンは、幾何平均 76.9nm(幾何標準偏差 1.87)の凝集粒子で、DustTrak Aerosol Monitor (Model 8520, TSI Inc., USA)による平均個数濃度は、6時間平均で 665,000±26,000 個/m ³ (変動係数 3.9%)。これらの値は労働衛生上のばく露を代表しているとみなせる。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	雄 Sprague-Dawley ラット(5-6 週齢、150-170g、順化、二次吸入防止等に注意)への鼻部吸入 6 時間。0,3,6,12,24,48,72,168,336 時間後調査。用量 15mg/m ³ 。(実績 15.57 mg/m ³ ;min9-max21)吸入後の異常は見られなかった。適時尿、便、採取。吸入後のラット(6 匹)は CO ₂ 窒息後、血液、組織、内臓採取、前処理して、ICP-MS により Ti を分析して、二酸化チタン含量を決定。TEM 観察用切片採取。酸化損傷の指標であるマロンジアルデヒド(MDA)測定。
試験結果	<ul style="list-style-type: none"> 二酸化チタン粒子の肺への堆積、滞留、排出;肺中の TiO₂ 量は、ばく露開始から 48h で最高値 3623±663ng に達した。それは実験中の平均ばく露濃度と吸入体積から推定した肺中に滞留した TiO₂ 投与量の 0.53±0.36%である。14 日後には定常値 1794±1279ng となる。吸入された粒子の大部分は上気道に堆積し粘液に捉えられ便となる。肺中に移行した粒子は長時間留まったのち他の臓器に移行する。肺切片の TEM 観察によれば、TiO₂ 粒子は肺尾部にのみ見出された。 血液中には、6h で見られ 12h で最高値 331±52ng となり、その後緩やかに低下し、7 日後ベースラインになる。リンパ節中の値はずっと小さい。これらの値は肺中に移行した量に比べて少ない。マクロファージによる貪食や粘液による捕集の方が大きい。 72h を最高値として臭球や脳への移行も見られた。 肺以降の臓器では、12-48h をピークとして、肝臓がもっとも高く、次いで腎臓、脾臓、に見られた。胸腺、唾液腺、膵臓、心臓、脳ではそれらより低い値でほぼ一定。 排泄物;14 日後の総計は、尿中 1027ng、便中 46414ng に達し、それらの値は便で 72h、尿で 48h で大部分が排泄された。 脂質過酸化の指標である MDA レベルは、吸入開始後 24 時間で、血液と肺で有意に高い値を示した。
結論	この研究は、20nm の初期直径を有する、殆ど凝集していない NP の 6 時間吸入後の典型的な TiO ₂ 作業員へのばく露の新しいデータを与えた。吸入中及び吸入後の肺における滞留後は、便中に排泄される量や、最も多い粘液線毛クリアランスに比べて、血液およびリンパ系への転移は少ない。それにもかかわらず、吸入量の一定割合が全身循環系に移行して到達したとみられる肝臓、腎臓、脾臓などの二次臓器で、検出可能なレベルの TiO ₂ を含有していた。吸入後 14 日までの肺で観察されたナノ粒子のレベルは、反復ばく露後の酸化的損傷の割合の増加を起す可能性がある。嗅球および脳への一定の転移も観察された。そのような現象が起きるメカニズムをさらに調査すべきである。

No	TiO ₂ -3
論文題目 (和訳)	Biopersistence and translocation to extrapulmonary organs of titanium dioxide nanoparticles after subacute inhalation exposure to aerosol in adult and elderly rats (成年及び高齢ラットの二酸化チタンナノ粒子の亜急性吸入ばく露後の肺外器官への転移と生体内持続性)
著者 所属機関	L. Gatéa, ^a C. Disdier ^b , F. Cosniera, ^a F. Gagnaire, ^a J. Devoy, ^a W. Saba, E. Brun, M. Chalansonnet ^{a,*} , A. Mabondzo a Institut National de Recherche et de Sécurité, Département Toxicologie et Biométrie
書誌事項	Toxicology Letters 265 (2017) 61–69
試験物質	TiO ₂ ナノ粒子;P25 (Aeroxide1 P25, 75% anatase 25% rutile, Evonik) 21.5±7.2nm 比表面積;51m ² /g
試料調整法	購入した TiO ₂ ナノ粒子をそのまま、回転ブラシ型エアロゾル発生器(詳細は Disdier et al, Part. Fibre Toxicol. 12, 27(2015)).に供給。 器官中の Ti 分析(ICP-MS)用の試料前処理;濃硝酸 - フッ化水素酸、マイクロ波処理後、硝酸・塩酸で加熱分解したのち、硝酸溶液で3回リンスする。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	・雄フィッシャーラット(12–13 週齢、300–320g→若成年ラット、19 月齢、400–425g→高齢ラット) ・鼻部吸入;エアロゾル発生器と鼻部吸入ばく露タワーで構成する 100 匹にばく露可能なシステムを使用;Cosnier et al.; Aerosol Air Qual. Res. doi: http://dx.doi.org/10.4209/aaqr.2016.01.0034 . ・1日に3時間ずつ2回吸入、5日/週、4週間ばく露;吸入直後、3、28、90、180日後麻酔、全採血、肺、肺関連リンパ節、肝臓、脳、腎臓、脾臓を採取 ・吸入濃度約 10mg/m ³ ;実績;若成年ラット 10.17±3.29mg/m ³ 、エアロゾル粒子個数濃度 24000±6400 個/cm ³ ;高齢ラット 10.42±1.80 mg/m ³
試験結果	・若成年及び高齢群のラットの肺にばく露した Ti の負荷は、分析された各時点での対応する対照群の負荷よりも有意に高く、ばく露の停止後は時間とともに減少した。 ・ばく露した若成年群では、肺 Ti のクリアランスは、吸入期間終了後観察された。90日の回復後、肺負荷ばく露された若年成人群では、0日目の肺負荷の54%の減少で(肺における平均 Ti 含量は0日目は2.08mg/肺、90日目は0.95mg/肺)、これは遅いクリアランス率である。高齢群で観察された Ti クリアランスは、少し遅くなる。実際、90日の回復後の高齢者群では、ばく露された動物における平均肺負荷は、0日目の2.19mg/肺と比較して1.2mg/肺であり、したがって、約45%の減少である。しかしこれらに有意差はない。若年成人および高齢ラットにおけるチタンの肺クリアランス速度は、96.5日(R ₂ = 0.9339)および103.1日(R ₂ = 0.9575)の排出半減期を有する一次モデルに適合した。 ・ばく露された若成年および高齢ラットの他の臓器における Ti 分析において、大きなチタンの量が見出される肺の後の組織は、肺関連リンパ節であった。チタンの蓄積は、ばく露終了後180日まで観察された。ばく露された若成年における Ti の有意な増加もまた、脾臓で28日目から180日目で見られた。 ・両方の年齢群において、TiO ₂ NPs ばく露が肝臓の Ti 濃度に及ぼす影響も観察された。たとえ群内で変動性がより大きくても、ばく露された老齢ラットの肺外器官で検出される Ti の量は、若成年ラットよりもはるかに高かった(それぞれ中央値 315.5ng/g 対 90.0ng/g)ことは注目に値する。 ・さらに、ばく露された動物の結果が採取されたとき個別に、脾臓および肝臓における Ti のレベル間の関連性が観察された。実際、所与の動物において、より多量の Ti が脾臓が観察された多くの場合、同じ傾向が肝臓で見られた。組織 Ti 含量に関するこのような有意な相関は、腎臓および脾臓、腎臓および肝臓のいずれにも見られなかった。これは、肺から二次臓器への NP の転移に関する動物間のある異質性を示唆している可能性がある。 ・対照と比較して、若成年または高齢の TiO ₂ ばく露群の腎臓では測定された Ti の有意な増加はなかった。同様に、若成年および高齢の TiO ₂ ばく露ラットの脳への有意な Ti 転移は、対照と比較して有意ではなかった。
結論	粒径 21.5nm の TiO ₂ ナノエアロゾル亜急性吸入ばく露後の、若成年および高齢ラットにおける Ti の肺摂取、クリアランス、および再分布を調査した。 4 週間の吸入期間の後、肺の Ti は徐々にクリアされた。ICP-MS の感度によるが、ばく露された用量のうちの少量が、ばく露後 28–180 日の間に脾臓および肝臓に転移した。以前に同じ TiO ₂ ナノ粒子(NPs)で行った静脈注射後の観察では、これらの NPs はそのような肺外器官において少なくとも1年間の持続性を示唆した(Disdier et al., 2015)。この Ti の再分布は、全身の副作用のみならず、関与する輸送メカニズムを説明する将来の転移のメカニズム研究の必要性を強調する。

No	TiO ₂ -4
論文題目 (和訳)	Surface modification does not influence the genotoxic and inflammatory effects of TiO ₂ nanoparticles after pulmonary exposure by instillation in mice (二酸化チタンナノ粒子のマウスへの気管内投与による肺ばく露後の遺伝毒性及び炎症誘発に粒子表面修飾は影響しない)
著者 所属機関	Hakan Wallin ^{1,2} , Zdenka O. Kyjovska ¹ , Sarah S. Poulsen ¹ , Nicklas R. Jacobsen ¹ , Anne T. Saber ¹ , Stefan Bengtson ¹ , Petra Jackson ¹ and Ulla Vogel ¹ ¹ National Research Centre for the Working Environment (NRCWE,Denmark)
書誌事項	Mutagenesis, 2017, 32, 47–57 doi:10.1093/mutage/gew046
試験物質	NRCWE-001 (未修飾); NanoAmor (Houston, TX, USA) から購入、比表面積 99m ² /g、DLS 測定粒径; 3 投与濃度とも水力学径ピーク値 50.8,58.5,68.1nm でほぼ同じで大きな凝集なし。ζポテンシャル; -26 mV at pH 7.0 NRCWE-002 (NRCWE-001 を NRCWE に於いて 3-aminopropyltriethoxysilane で修飾して作製); 比表面積 84m ² /g、DLS 測定粒径; 投与 3 濃度により、水力学径ピーク値 1281,1484,1718nm。ζポテンシャル; 25 mV at pH 7.0
試料調整法	0.2 μm フィルター濾過、γ線照射した Nanopure Diamond UV water (発熱物質 <0.001 EU/ml, 全有機炭素<3.0 ppb) 中で氷上超音波懸濁
試験生物 投与方法・期間 試験用量	雌 C57BL/6J BomTac マウス(8 週齢)、体重 18.5±1.3mg 気管内投与一回、18, 54 or 162 μg/マウス(デンマークの TiO ₂ の労働衛生ばく露濃度 10mg/m ³ での 1.5,5,15 労働日に相当)、1, 3, 28 日後定法に従い屠殺、気管支肺胞液 (BALF) を採取、肺、肝臓を取り出す。BALF 分析とアルカリコメットアッセイ(遺伝毒性)による DNA 鎖切断調査を実施。
試験結果	<ul style="list-style-type: none"> ・体重; NRCWE-001 ではベヒクルのみの投与と変わらず、NRCWE-001 では 28 日後のみ体重が減少した。 ・肺中への TiO₂ ナノ粒子転移は確認されたが、炎症応答(好中球、マクロファージ、好酸球、リンパ球等 BAL 細胞数)は、投与量依存性は示したが、未修飾、修飾で有意な差はなかった。BALF 中の全蛋白も投与量、日数による変化はあるが、二つのナノ粒子で有意差がなかった。 ・NRCWE-001 および NRCWE-002 の気管内投与後、1 日目の肝臓における遺伝的応答および BAL における全体的な遺伝毒性の応答に統計的に有意な差があった。しかし、肺組織における NRCWE-001 および NRCWE-002 に対する遺伝毒性応答に統計的な有意差はなかった。 ・好中球の流入として決定される炎症は、二つのナノ粒子について時間および用量依存性であり、ばく露から 28 日後に最高値で持続したが、BAL 細胞数には統計的有意差がなかった。同様に、BALF 中の増加したタンパク質濃度でけっさいされる肺細胞の損傷は、NRCWE-001 および NRCWE-002 については統計的に異ならなかった。
結論	研究されたルチル TiO ₂ NP の表面修飾は、肺ばく露後の毒物学的反応に影響を及ぼさなかった。

No	TiO2-5
論文題目 (和訳)	Short-term oral exposure to low doses of nano-sized TiO ₂ and potential modulatory effects on intestinal cells. (ナノサイズ TiO ₂ の低用量への短期経口ばく露と腸細胞に及ぼす潜在的な調節影響)
著者 所属機関	Ammendolia MG1, Iosi F2, Maranghi F2, Tassinari R2, Cubadda F2, Aureli F2, Raggi A2, Superti F2, Mantovani A2, De Berardis B2. 1 Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena, 299, Rome, Italy. Electronic address: maria.ammendolia@iss.it. 2 Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena, 299, Rome, Italy.
書誌事項	Food Chem Toxicol. 2017 Apr;102:63-75. doi: 10.1016/j.fct.2017.01.031. Epub 2017 Jan 31.
試験物質	TiO ₂ NP (アナターゼ、一次サイズ < 25nm、BET 表面積 45-55m ² /g、純度 99% -Sigma-Aldrich, Gillingham, Dorset, 英国)
試料調整法	超純水、DMEM 培地中に分散(それぞれ、 <i>in vivo</i> 、 <i>in vitro</i> 研究用)。凝集を減らすため、温度管理下超音波処理。 Z-平均 (nm) と PdI は、Milli-Q 水中で 604±24、0.221±0.035、DMEM 中で 831±106、0.126±0.049。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	< <i>in vivo</i> 試験 > ・試験生物: 成体雌雄 Sprague-Dawley ラット ・投与方法・期間・試験用量: 経口・強制飼養、5 連続日、2 又は 1mg/kg bw/日。最後の処理後 24 時間に屠殺。小腸摘出、空腸は組織病理学、残りは粒子蓄積、有害影響を調べるため使用。 < <i>in vitro</i> 試験 > ・試験生物: ヒト結腸直腸腺癌細胞株 HT-29; American Type Culture Collection (Rockville, MD, 米国) から入手。 ・投与方法・期間・試験用量 (LDH 及び MTT 細胞毒性試験): 6、24、48 時間、1.8、4.5、9、36µg/mL に対応する 1、2.5、5、20µg/cm ²
試験結果	< <i>in vivo</i> 試験 > ・健康、体重増加、餌消費に両性とも影響無。空腸の病理組織学解析は量的変化無。雄で、組織形態計測的データは、2 mg/kg bw でのみ絨毛高さの顕著で用量関連増加を示した。杯細胞の密度は、両用量で、顕著で用量関連増加の結果になった。雌の空腸で、モルフォロジーは量的変化がなく、アポトーシスに影響を与えなかった (TUNEL アッセイ)。小腸中の Ti レベルは、コントロール、1mg/kg bw/日、2 mg/kg bw/日、それぞれ、0.08±0.02、0.09±0.02、0.13±0.03µg/g だった。 < <i>in vitro</i> 試験 > LDH、MTT アッセイにおいて、全ての用量、時間で統計的に有意な細胞毒性影響は無かった。 6 時間後全ての用量で、細胞内酸化ストレスの指標である DCHF 蛍光が、増加傾向。ROS レベルは、2.5 から 20µg/cm ² で、大幅に上昇。24 時間では、6 時間に比較して、DCHF 蛍光強度は低下。 ミトコンドリア膜電位 (MMP) は変更なし。 SEM 観察結果; 6 時間では観察できる細胞内組織学的差異はなく、24 時間でも劇的なモルフォロジー変化は見られず、細胞膜損傷はなかった。ほんの僅かのミトコンドリアが膨れまたは損傷し、NPs 凝集体を含む多胞体を現した。 テストステロン (200nM) 及び IGF-1 (50nM) の影響; TiO ₂ NP とテストステロン (200nM) の複合溶液で処理した細胞の成長レベルは、48 時間まで (6、24 時間) では全ての TiO ₂ NP 用量でコントロール細胞の成長レベルと匹敵。48 時間では、複合溶液がより成長が速く、用量増加とともに速度低下。 IGF-1 (50nM) との複合液の場合も、同様の結果を示した。
結論	TiO ₂ NP の食事摂取は、低用量でとはいえ、頻繁に連続的に起こるため、腸粘膜に及ぼす反復影響は腫瘍発症の増加したリスクもしくは既存腫瘍プロセスの進行に結び付くかもしれない。本結果は、更なる研究が必要とされるが、腸での発ガンに結び付く増殖プロセスに関与するかもしれない因子としての TiO ₂ NP へのより大きな注目を引き起こす。

No	TiO2-6
論文題目 (和訳)	Interaction of New-Developed TiO2-Based Photocatalytic Nanoparticles with Pathogenic Microorganisms and Human Dermal and Pulmonary Fibroblasts. (新開発の TiO2 系光触媒ナノ粒子の病原性微生物と人間の皮膚と肺線維芽細胞との相互作用)
著者 所属機関	Nica IC ¹ , Stan MS ¹ , Popa M ^{2,3} , Chifiriuc MC ^{2,3} , Lazar V ^{2,3} , Pircalabioru GG ³ , Dumitrescu I ⁴ , Ignat M ⁵ , Feder M ⁶ , Tanase LC ⁶ , Mercioniu I ⁶ , Diamandescu L ⁶ , Dinischiotu A ¹ . 1 Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biology, University of Buchares. 2 Department of Botanic-Microbiology, Faculty of Biology, University of Bucharest 3 Research Institute of the University of Bucharest-ICUB, University of Bucharest 4 National R&D Institute for Textiles and Leather Bucharest (INCDTP) 5 National Research and Development Institute for Textiles and Leather (INCDTP) Leather and Footwear Research Institute (ICPI) 6 National Institute of Materials Physics (NIMP)
書誌事項	Int J Mol Sci. 2017 Jan 25;18(2). pii: E249. doi: 10.3390/ijms18020249.
試験物質	P25 粉(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA,米国) に 1% Fe と N 原子を含浸: 適量の TiO ₂ 、FeCl ₃ ・6 H ₂ O、尿素を蒸留水中で機械及び超音波攪拌を介して分散/解散し、混合物を 200°C/2 時間で加熱。結果として出来た粉を塩を除去するために超純水で洗浄(pH 6.5 ~)、乾燥、および最終的に 400°C で 2 時間焼成。 PH 5.5 と 8.5 で TiO ₂ -1% Fe-N 合成: 適量の TiCl ₃ と FeCl ₃ ・6H ₂ O 純水中で攪拌混合、pH 値を 25% NH ₄ OH 溶液で調整。その後、得られた Ti(III) の沈殿物を空気中で色が紫から白に変化するまで酸化。塩を除去するため、Ti(IV)と Fe(III)の水酸化物の共沈殿を超純水で洗浄し、空気乾燥。尿素存在下、水熱処理による窒素ドーピング (200°C/2 時間)。乾燥結果粉末を空气中 400°C で 2 時間焼成。 ・キャラクタリゼーション: P25、P25-1% Fe-N、TiO ₂ -1% Fe-N pH ~5.5、TiO ₂ -1% Fe-N pH ~8.5 の相構成;アナターゼ((83%)・ルチル(~17%)、同左、アナターゼ(~80%)・ブルッカイト(~20%)、アナターゼ(~85%)・ブルッカイト(~15%)。 注)TiO ₂ -1% Fe-N pH ~8.5;HT1、TiO ₂ -1% Fe-N pH ~5.5;HT2 で略記。 同上の粒子平均サイズ;29±15nm、30±10nm、15±2.8nm、10±4nm。 同上是大きい凝集体を形成(SEM 観察)(77.7-105.5nm、-、300.4-511.3nm、79.9-112.3nm)。 ・流体力学サイズ: 純水中新規分散;P25、TiO ₂ -1% Fe-N pH ~5.5、TiO ₂ -1% Fe-N pH ~8.5;765、1168、1692 d.nm。 PBS 中加熱分散時;ほぼ同上。 細胞培養培地中加熱分散;TiO ₂ -1% Fe-N pH ~5.5、TiO ₂ -1% Fe-N pH ~8.5;3309、3787 d.nm。培地イオンが電位を変化。 モルフォロジー:P25、TiO ₂ -1% Fe-N pH ~5.5、TiO ₂ -1% Fe-N pH ~8.5;角の丸い多面体形状、優勢な二次形態(prevaling quadratic morphology)、複合形態(三角形、球形、等)。 紫外可視拡散反射スペクトル:P25、TiO ₂ -1% Fe-N pH ~5.5、TiO ₂ -1% Fe-N pH ~8.5;347、352、350nm。 ・光触媒活性(紫外線、可視光によるメチレンブルー (MB)の分解で評価): The TiO ₂ -1% Fe-N, pH ~8.5 > TiO ₂ -1% Fe-N, pH ~5.5 > P25 系。 <抗菌活性アッセイ> 得られた粉末の原核生物と真核微生物系統に及ぼす影響評価):グラム陰性菌株(大腸菌 <i>E. coli</i> ATCC 8739、緑膿菌 <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853)、グラム陽性細菌株(黄色ブドウ球菌 <i>S. aureus</i> ATCC 6538、フェカリス菌 <i>E. faecalis</i> ATCC 29212)、真菌株(カンジダ・アルビカンス <i>C. albicans</i> ATCC 10231)使用。液体媒体微量希釈法により抗菌活性の定量。 紫外線より可視光で抗菌性改良。 最小発育阻止濃度 (MIC) 値(TiO ₂ -1% Fe-N, pH 8.5 及び TiO ₂ -1% Fe-N, pH 5.5); <i>S. aureus</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. coli</i> ;0.0625 mg・mL ⁻¹ 。 <i>P. aeruginosa</i> ;0.002 mg・mL ⁻¹ (最高の抗菌活性); <i>C. albicans</i> ;0.015 及び 0.004 mg・mL ⁻¹ 。

試料調整法	テストされる粉末は、10 mg・mL ⁻¹ の濃度で貯蔵液を得るためにジメチルスルホキシド (DMSO) 中に懸濁された。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	<ul style="list-style-type: none"> ・試験生物: 皮膚、肺からの正常ヒト繊維芽細胞 (CCD-1070Sk 細胞株, ATCC Cat. No. CRL-2091)、(MRC-5 細胞株, ATCC Cat. No. CCL-171) ・投与方法・期間・試験用量: 31.25、62.5、125µg/mL の TiO₂-1% Fe-N ナノ粒子、24、72 時間。
試験結果	<ul style="list-style-type: none"> ・細胞生存率 (Trypan Blue 染色使用): ばく露時間又は光触媒濃度にかかわらず肺と皮膚細胞は細胞生存率の面で顕著な変化を示さなかった。 ・細胞膜完全性 (培地への LDH 放出量; 商業キット (TOX7, Sigma-Aldrich) 使用): 乳酸脱水素酵素 (LDH) 放出レベルから、皮膚線維芽細胞の場合、TiO₂-1% Fe-N NPs は細胞膜完全性に影響しなかったが、肺細胞では 72 時間でわずかな減少、それまでは顕著な変化無し。 ・炎症性ポテンシャル (培地への NO 放出レベル; Griess 試薬使用): 一酸化窒素 (NO) 放出量は、2 つの細胞、2 つの TiO₂ NPs 試料の間で大差無し。試験された NPs へのばく露後に誘発される炎症は低すぎ、厳しいとは考えられない。 ・細胞拡散およびアクチン細胞骨格モルフォロジー (蛍光顕微鏡観察): 蛋白質濃度アッセイ (細胞抽出液のタンパク質濃度; Bradford による方法) ・抗酸化酵素アッセイ: <ul style="list-style-type: none"> ・抗酸化酵素活性 (吸光度法) / カタラーゼ (CAT) (EC 1.11.1.6) 活性 (Aebi's 法) / グルタチオンペルオキシダーゼ (GPX) (EC 1.11.1.9) 活性 (Beutler 法) / グルタチオン s-トランスフェラーゼ (GST) (EC 2.5.1.18) 活性 (Habig らの方法) / 細胞溶解物からの蛋白質中のグルタチオン (GSH) 含有量 (商業グルタチオンアッセイキット (Sigma-Aldrich) 使用) <p>カタラーゼ活性は 2 細胞間で有意差あり。皮膚線維芽細胞の CAT 活性のレベルは、125µg/mL HT1 による両方の時間間隔 (24、72 時間) のばく露後、コントロールのほぼ 35% まで増加した一方、HT2 試料は、72 時間ばく露後 20% だけまでしか増加せず、長時間ばく露後の抗酸化防御機構の活性化が示唆された。対照的に、TiO₂-1% Fe-N NPs は、MRC 5 肺細胞に対してより深刻な影響を持っていた。最初の 24 時間後でさえも CAT 活性が低下、低下は 72 時間後ほぼ 20% に到達した。</p> <p>皮膚線維芽細胞において、TiO₂ NPs の両タイプの高用量でだけ、GPx 活性の有意な増加が観察されたが、肺細胞において、コントロールと比較してテストされた濃度のすべてに対して強い上昇された活性が測定された。皮膚線維芽細胞において、GST 活性プロファイルがグルタチオン (GSH) 含有量の増加によって伴われる GPx 活性 (高用量に対する増加されたレベル) と似ていることを考慮して、酵素的及び非酵素的抗酸化機構両方の活性化が、酸化傷害に対する適切な細胞の防御のために協力することを示唆した。対照的に、TiO₂-1% Fe-N NPs への肺細胞の 24、72 時間のばく露後、GST 活性のレベルは大きく変化しない (コントロールに比べ約 20%)。これらの結果は、2 つの時間間隔の間の GSH 含有量減少と相関し、72 時間での高 GPx 活性が、解毒プロセスがこのタイプ細胞に対して、特に抗酸化防系のこの酵素を通じてより強い実現されたことを明確に示した。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・脂質過酸化 (マロンジアルデヒド (MDA) レベルによって表現される; Dinischiotu らによる吸光度法): ヒト皮膚および肺線維芽細胞における脂質過酸化反応に対する TiO₂-1% Fe-N NPs の影響は、HT1 と HT2 の試料間で大きな違いは見られなかった。両細胞株中のマロンジアルデヒド (MDA) 含有量は、24 時間ばく露後、コントロールと比較して大幅に変更されず、TiO₂ NPs は、用量依存のわずかな増加をさせた。CCD-1070Sk 細胞において、ナノ光触媒との 72 時間の培養は、125µg/mL の濃度に対して、90% まで増加された MDA レベルにつながった。72 時間後の MRC 5 細胞における脂質過酸化レベルは少し低くなった。しかし、皮膚細胞と比較して、肺線維芽細胞は、62.5 と 125µg/mL の用量に対して、70% MDA 含有量の同じ増加を記録した。 ・アクチン細胞骨格の動的変化: TiO₂-1% Fe-N NPs へのばく露後の MRC-5 と CCD-1070Sk 細胞モルフォロジーの変化を位相差顕微鏡で調べた。表示されるアクチン細胞骨格形成の動的変化は、細胞生存率分析に関する所見と一致していた。したがって、人間の皮膚や肺線維芽細胞は、24、72 時間ばく露後、線維芽細胞固有の細長い形態を維持し、コントロールと比較して、サンプル間で有意差が無かった。多数のストレスファイバーは、ヒト細胞が多数の接着斑を作り、それらの挙動は、ナノ光触媒への応答で特に変更されなかった。
結論	増大した光触媒作用効率を持つ共ドーブされた TiO ₂ ナノ粒子を得ることに成功した。合成の間に pH 値を修正することによって、粉の光触媒作用挙動だけでなく、相対相含有量 (アナターゼ/ブルッカイト)、結晶子及び粒度は、明らかに変わった。結果は、肺および皮膚の

細胞に対する低用量での $\text{TiO}_2\text{-1\% Fe-N}$ の生体適合性を示し、それは酸化ストレスを用量依存方法で開始するかもしれず、将来の光化学触媒作用アプリケーションのために有益な情報を提供する、ことを示した。さらに、これらの粒子は、顕著な殺菌および抗バイオフィルム活性を表し、産業、食品、調剤、医療分野からの種々の環境の微生物の浄化のためのそれらの潜在的なアプリケーションを示唆している。

No	TiO2-7
論文題目 (和訳)	Oral administration of nano-titanium dioxide particle disrupts hepatic metabolic functions in a mouse model. (ナノ酸化チタンの経口投与はマウスにおける肝代謝機能を攪乱する。)
著者 所属機関	Yang J ¹ , Luo M ² , Tan Z ² , Dai M ² , Xie M ² , Lin J ² , Hua H ² , Ma Q ² , Zhao J ² , Liu A ³ . 1 Ningbo College of Health Sciences, Ningbo 315100, China. 2 Medical School of Ningbo University, Ningbo 315211, China. 3 Medical School of Ningbo University, Ningbo 315211, China. Electronic address: liuaiming@nbu.edu.cn.
書誌事項	Environ Toxicol Pharmacol. 2017 Jan;49:112-118. doi: 10.1016/j.etap.2016.12.006. Epub 2016 Dec 11.
試験物質	TiO ₂ ナノ粒子 (21nm, TiO ₂ NP); Sigma-Aldrich (Product Number 718476, Lot MKBR0084V, MO, 米国) から購入。仕様書情報; 表面積 35-65m ² /g、微量金属基準(根拠) 99.5%以上、一次粒子サイズ 21nm。
試料調整法	0.5% CMC-Na (w/v) 溶液中に分散、30 分超音波処理、10 分攪拌。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	・試験生物: 雄 5-7 週齢 C57/BL6 マウス; The Experimental Animal Center of Ningbo University. ・投与方法・期間・試験用量: 経口投与、1日 1 回、14 日。処理終了後、後眼窩静脈叢からの採血。屠殺後、肝臓採取。
試験結果	・生化学分析; 血清中の IBIL、TBIL、TBA、ALP、AST、ALT 分析 (Spectra Max M5 (CA, 米国) 使用): IBIL、TBIL は、TiO ₂ NP 500mg/kg/日投与で、大幅に上昇、統計的差異、用量反応相関を示した。TBA は、わずかに上昇したが、コントロール群との差は無し。ALP と一致。AST、ALT は変更されず、肝損傷示されず。 ・組織病理学及び超微細構造解析: 組織病理学解析; 変更なし。 超微細構造解析; 250mg/kg/日 で処理されたマウスにおいて、小胞体で増加されたミトコンドリア数と浮腫が観察された。TiO ₂ NP は、細胞質中で見付けられた (500mg/kg/日投与で)。500mg/kg/日投与群では、浮腫は激しくなり、TiO ₂ NP 粒子は肝細胞中でクラスターになっていた。 ・定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (Q-PCR) 解析及び Western blot 解析 (CYP3a、CYP2b、CYP2c の発現を評価 (肝臓蛋白質)): <i>Cyp7a1</i> 、 <i>Cyp8b1</i> 、 <i>Cyp27a1</i> の発現は 2 つの投与群 (250、500mg/kg/日) で変更無し。 <i>Oapt1</i> は、高用量群で、7 倍以上まで上昇。 遺伝子 <i>Bsep</i> 、 <i>Mrp2</i> の発現は変更無し。 <i>Ostb</i> 、 <i>Mrp4</i> は変更無し。 <i>Mrp3</i> は、高用量群で、5 倍まで上昇。 CYP サブファミリー <i>Cyp2b10</i> 、 <i>2c37</i> はそれぞれ、4、2 倍まで上昇。誘発もしくは抑制は <i>Cyp3a11</i> 、 <i>2c39</i> に対して観察されず。 <i>Ugt1a1</i> 、 <i>1a2</i> は変更されなかった。 <i>Tnfa</i> 、 <i>Il-6</i> 、 <i>Il-10</i> は、変更無し。炎症結果と一致して、4 つの典型的アポトーシス遺伝子 <i>Bax</i> 、 <i>Bcl-xl</i> 、 <i>Bcl-2</i> 、 <i>Bim</i> は変化しないままだった。 これらのデータは、生化学指標 ALP、AST、ALT と合致していなかった。炎症もアポトーシスも、TiO ₂ NP チャレンジとその後の代謝の変更によって、始動されなかった。
結論	2 週間の TiO ₂ NP (21nm) の経口投与は、肝細胞の細胞質中のナノ粒子の沈着とミトコンドリア浮腫につながった。TiO ₂ NP による肝代謝の部分的変更は、代謝性疾患のリスクをもたらすかもしれない、他の毒性学的エンドポイントよりも敏感だった。これらのデータは、行政当局によるナノサイズ材料のリスク分析と規制のための有用な情報を提供した。

No	TiO2-8																													
論文題目 (和訳)	<i>In vitro</i> genotoxicity testing of four reference metal nanomaterials, titanium dioxide, zinc oxide, cerium oxide and silver: towards reliable hazard assessment. (4つの参照金属ナノマテリアル、二酸化チタン、酸化亜鉛、酸化セリウム、銀の <i>in vitro</i> 遺伝毒性試験:信用できるハザード評価に向けて)																													
著者 所属機関	El Yamani N ^{1,2} , Collins AR ^{2,3} , Rundén-Pran E ¹ , Fjellsbø LM ¹ , Shaposhnikov S ² , Zienolddiny S ⁴ , Dusinska M ⁵ . 1 Health Effects Group, Department of Environmental Chemistry, NILU-Norwegian Institute for Air Research, Kjeller 2007, Norway. 2 Comet Biotech AS, Oslo 0372, Norway. 3 Department of Nutrition, University of Oslo, Oslo 0372, Norway and. 4 STAMI-The National Institute of Occupational Health, Oslo 0363, Norway. 5 Health Effects Group, Department of Environmental Chemistry, NILU-Norwegian Institute for Air Research, Kjeller 2007, Norway, maria.dusinska@nilu.no.																													
書誌事項	Mutagenesis. 2017 Jan;32(1):117-126. doi: 10.1093/mutage/gew060. Epub 2016 Nov 12. Erratum in: Mutagenesis. 2017 May 1;32(3):409.																													
試験物質	Ag NM300K : Fraunhofer-Gesellschaft (Institute for Molecular Biology and Applied Ecology, Aachen, ドイツ)から入手。 TiO2 NM100, ZnO NM110, CeO2 MN212:the Joint Research Centre (Ispra, イタリア)から入手。 キャラクタリゼーション(NM100, NM110, NM212, NM300K の順に下記): 多形;アナターゼ、ジシカイト、セライト、金属 粉体タイプ;粉、粉、粉、分散液 モルフオロジー;-、-、-、球 XRD サイズ(nm);56.7->100、>100、NA、14±2 TEM 直径(nm);110±57、147±149、33、16.7±4.0																													
試料調整法	The Nanogenotox dispersion protocol に従って、分散し、ストック液に。																													
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	・試験生物: ヒト肺胞基底上皮細胞株 A549;European Collection of Cell Culture (ECACC)より入手。 ヒトリンパ芽球様細胞 TK6;ECACC から購入。 ・投与方法・期間・試験用量: 付着 A549 細胞に対して、0.01-75 µg/cm ² 分散液培地中 TK6 細胞に対して、0.14-140µg/mL(上記濃度と等しい) alamarBlue 及びコメットアッセイ;3 又は 24 時間 慢性ばく露(コロニー形成効率;は CFE);9-12 日間																													
試験結果	細胞毒性(alamarBlue®使用;生細胞の細胞内減少代謝への比色応答を通して測定): NM100 は、3µg/cm ² での A549 の生存率をわずかに低下させた(24 時間後では戻される)が、NM100 と NM212 への 3 又は 24 時間の A549 細胞のばく露は、細胞生存率をさほど低下させなかった。しかし、NM110 と NM300K は高濃度で非常に細胞毒性であり、中程度の濃度で生存率の大幅な低下を引き起こした。 細胞毒性(クローン原性アッセイで測定;コロニー形成効率(ばく露/非ばく露)、80%より低いと細胞毒性): NM100 と NM212 は、CFE に影響及ぼさず、NM110 と NM300K は濃度依存的に細胞毒性だった。NM110 と NM300K を用いた処理後、コロニーは非常に小さかった。 DNA(SBs と Fpg サイト)損傷(コメットアッセイ(ハイスルーブット)で測定): SBs+Fpg サイト(% tail DNA) <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <thead> <tr> <th rowspan="2"></th> <th colspan="2">3h ばく露</th> <th colspan="2">24h ばく露</th> </tr> <tr> <th>TK6</th> <th>A549</th> <th>TK6</th> <th>A549</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>TiO2 NM100</td> <td>23</td> <td>40</td> <td>9.0</td> <td>17</td> </tr> <tr> <td>ZnO MN110</td> <td>37</td> <td>58</td> <td>8.0</td> <td>25</td> </tr> <tr> <td>CeO2 NM120</td> <td>21</td> <td>15</td> <td>9.1</td> <td>27</td> </tr> <tr> <td>Ag NM300K</td> <td>29</td> <td>37</td> <td>25</td> <td>46</td> </tr> </tbody> </table>		3h ばく露		24h ばく露		TK6	A549	TK6	A549	TiO2 NM100	23	40	9.0	17	ZnO MN110	37	58	8.0	25	CeO2 NM120	21	15	9.1	27	Ag NM300K	29	37	25	46
	3h ばく露		24h ばく露																											
	TK6	A549	TK6	A549																										
TiO2 NM100	23	40	9.0	17																										
ZnO MN110	37	58	8.0	25																										
CeO2 NM120	21	15	9.1	27																										
Ag NM300K	29	37	25	46																										
結論	NMs の遺伝毒性影響の調査を計画する際の考慮のために、いくつかの一般的なステートメントが為されることができる。 ・24 時間培養だけでは、DNA に対する或る NMs の損傷影響を検知するためには、不十分である。																													

- NMsへの応答は、試験のために選ばれた細胞タイプによって変化する。
- 遺伝毒性は細胞毒性(alarBluet®のような試験による多分 80%生存率の閾値を設定する)でない濃度で評価されるべきである。
- Fpgの使用はDNAへの酸化損傷の検出を可能にし、それはさもないと物がされるだろう。
- 濃度のわずかな増加は、遺伝毒性の面で、計り知れない影響を持つことがある。
- DNA損傷を測定する comet assay のハイスループット版の使用は、堅牢さを増し、実験変動を減らす。

No	TiO2-9
論文題目 (和訳)	Effects of titanium dioxide nanoparticles on human keratinocytes. (ヒトケラチノサイトに及ぼす二酸化チタンナノ粒子の影響)
著者 所属機関	Wright C ¹ , Iyer AK ¹ , Wang L ² , Wu N ³ , Yakisich JS ¹ , Rojanasakul Y ⁴ , Azad N ¹ . 1 Department of Pharmaceutical Sciences , Hampton University , Hampton , VA , USA. 2 Allergy and Clinical Immunology Branch, National Institute for Occupational Safety and Health , Morgantown , WV , USA. 3 Department of Mechanical & Aerospace Engineering. 4 Department of Pharmaceutical and Pharmacological Sciences , West Virginia University , Morgantown , WV , USA.
書誌事項	Drug Chem Toxicol. 2017 Jan;40(1):90-100. doi: 10.1080/01480545.2016.1185111. Epub 2016 Jun 16.
試験物質	粒子: West Virginia University 寄贈 F-TiO ₂ ; 粒子サイズは 1µm、100%ルチルから成る。 UF-TiO ₂ ; 粒子サイズは 21nm、80% アナターゼと 20%ルチルから成る。H ₂ TiO ₇ ; 粒子サイズは 12nm、100%アナターゼから成る。
試料調整法	H ₂ TiO ₇ ナノ粒子 (NP)、微粒子 (F) と超微粒子 (UF) 粒子の保存液 (2 mg/mL) は、10 mg の粉体を 5 mL 滅菌 PBS に溶解することによって調製。この溶液は、超音波処理分散。溶液は 4 °C で保管、1-2 週間以内に実験に使用。各実験前に原液は超音波処理、すぐに培地で作業濃度に希釈。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	・試験生物: 全ての細胞の入手先; American Type Culture Collection (Manassas, VA) 不死化ヒト表皮細胞株 (HaCaT) ヒト気管支上皮 Beas-2B 細胞 ヒト肺線維芽細胞 CRL-1490 ・投与方法・期間・試験用量 粒子ばく露濃度; 0.1、1、10、25、100 µg/cm ²
試験結果	<試験方法> 活性酸素種/活性窒素種 (ROS/RNS) 検出: 細胞 ROS/RNS 生産は、活性酸素、過酸化物質、窒素酸化物、それぞれの蛍光プローブとして DHE、DCF DA と DAF-DA を使用し測定。 ・カスパーゼ 8/9 アッセイ: CaspGLOW™ Fluorescein Active Caspase-8 and -9 Staining Kit (BioVision, Milpitas, CA) それぞれ使用 ・Western blotting: 蛋白質含有量; bicinchoninic acid assay kit (Thermo Scientific) アポトーシスアッセイ: Hoechst 33342 DNA fragmentation assay 使用 ・MTT アッセイ: 細胞生存率 ・酵素結合免疫吸着検査法 (ELISA): VEGF 蛋白質レベル測定に Human VEGFA ELISA kit (Thermo Scientific) 使用 コラーゲンアッセイ: 細胞コラーゲン含有量はメーカーのプロトコルに従って Sircol® assay (Biocolor Ltd., Belfast, 英国) によって測定 <結果> ・細胞の酸化及びニトロ化ストレスに及ぼす微細 (F)、超微粒子 (UF) と H ₂ TiO ₇ の影響: 15 分時点で、TiO ₂ の 3 形態全てが、コントロールを上回り、過酸化水素やスーパーオキシド レベルを用量依存的に増加する。しかし、TiO ₂ のいずれかの形態も NO レベルを大幅な増加させない。さらに、皮膚細胞に対する F、UF、H ₂ TiO ₇ によって誘発される効果に有意差は認められなかった。 過酸化水素で NO レベルが徐々に減少に対し、TiO ₂ の 3 形態すべてによって 30 分と 1 時間の両時点で活性酸素レベルの用量依存増加を示す。F-TiO ₂ と UF-TiO ₂ 対 H ₂ TiO ₇ の影響に有意差は認められなかった。 ・アポトーシス調節蛋白質に及ぼす影響: カスパーゼ活性アッセイ結果は、6 時間後に全ての TiO ₂ 形態がコントロールと比べてカスパーゼ 8 活性の大幅な増加を示す (Z-VAD-FMK (汎カスパーゼ阻害剤) を用いた前処

	<p>理で検証)。 TiO₂ 処理後活性化カスパーゼ 9 の増加があったが、カスパーゼ 8 活性レベルの違いと比較するとはるかに小さい。 24 時間時点でカスパーゼ 8 または 9 の分割、活性化胸の変化はコントロールと比べて TiO₂ のいずれかの形態でもなかった。 1、10 μg/cm² の処理用量で特に 3 つの TiO₂ 粒子すべてによって抗アポトーシス蛋白 Bcl-2 のダウンレギュレーションが観察された。また、TiO₂ 粒子を用いた処理はアポトーシス誘導タンパク質 Bid のダウンレギュレーションにつながったし、抗アポトーシス蛋白 FLIP の発現に対する最小の影響を持っていた。 ・アポトーシスに及ぼす影響: TiO₂ 処理は、12 と 24 時間時点でコントロールと比べアポトーシスの大幅な増加を引き起こした。 TiO₂ の 3 つの形態すべてと全ての用量に対してコントロール比較で細胞死の増加があった。ただし、一酸化窒素合成酵素 (NOS) 阻害剤、アミノグアニジン (AG) 又はスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) 模倣剤とペルオキシ亜硝酸スカベンジャー、MnTBAP のいずれかで前処理は TiO₂ によるアポトーシスの誘導に大きな影響がなかった。 UV-C への曝けを伴う TiO₂ 処理後様々な時点 (0.5、1、5 時間) での観察された細胞死の割合は、TiO₂ 単独処理 (図 3 (A と B)) 後に観察された細胞死と比較して、違いがなかった。 ・細胞増殖と血管新生に及ぼす影響: F-TiO₂ および UF-TiO₂ は 24 時間での細胞生存率に対してポジティブな影響を持つ一方、H2TiO7 処理は反対の影響を観察した。さらに、細胞増殖は 48 時間時点で F-TiO₂、UF-TiO₂ および H2TiO7 のすべての処理用量にตอบสนองしてネガティブに影響された。 VEGF 細胞レベルは、24 時間時点で 3 つの TiO₂ 粒子すべてで様々な用量で処理された細胞中で、顕著な変化はなかった。 ・細胞の生存と分化の経路に及ぼす影響 6 時間時点で TiO₂ 粒子はリン酸化 EGFR レベルに対して最小の影響を持った一方、Akt リン酸化、それ故活性化は 10μg/cm² UF-TiO₂ と 1 mg/cm² H2TiO7 用量を用いて特異的に増加した。 UF-TiO₂ および H2TiO7 処理の E-カドヘリンと β-カテニンを含む分化マーカー蛋白質の発現に対する影響は最小限であった。 ヒト肺上皮と線維芽細胞の細胞増殖に及ぼす影響: 全ての TiO₂ 粒子は、24 時間と 48 時間の両時点で、Beas-2B 細胞増殖に対する抑制影響を示した。 CRL 1490 細胞における細胞増殖の中等度の増加を示した。 TiO₂ のさまざまな形態と様々な用量で、両方の細胞は、コントロールと比較してコラーゲンレベルの変動する変化を示した。</p>
結論	<p>F-TiO₂、UF-TiO₂、H2TiO7 粒子は、カスパーゼ 8 と Fas/FADD 経路を通じて、ケラチノサイトにおいてアポトーシスを誘発する。過酸化物の蓄積とカスパーゼ 8 及び 9 の活性の用量依存性の増加がある;これはアポトーシスにおける同様の傾向が後に続く。しかし、F-TiO₂ および UF-TiO₂ と比べて H2TiO7 ナノ粒子の影響に有意差はなかった。また、様々な TiO₂ 粒子は、HaCaT ケラチノサイトと 2 つの異なる肺細胞タイプ (Beas-2B と CRL-1490) における細胞の増殖、生存、血管新生/移行/侵入可能性に対する一貫性のある影響を持たなかったことを報告する。増大された表面積とより小さい粒子サイズによる、H2TiO7 の増加された発がん可能性は、TiO₂ の他の形態と比較して、皮膚及び肺の細胞におけるより有害な影響に変換されない。本研究が TiO₂ へのばく露が皮膚細胞に対してもつかかもしれない長期的な影響に焦点を当てていない中、矛盾し、決定的でない結果は、ここで、皮膚細胞に及ぼす TiO₂ の影響に関する以前に公表されたデータを裏付ける。このデータは、TiO₂ の影響が表皮皮膚層の完全性 (傷つけられた組織に対するより効果的な) とナノ粒子にばく露されている皮膚層の遺伝的特徴に依存しているという受け入れられた結論を再確認する。長期ばく露調査を使用する詳細な分析が、ヒト皮膚細胞に対する TiO₂ ナノ粒子の細胞毒性または悪性の可能性を判断するために間違いなく必要である。この分析は、もしあれば、どのような影響を TiO₂ への慢性ばく露が多くの人間に対して持っているか、の決定的な決定を行うことができるようにしていく。</p>

No	TiO2-10
論文題目 (和訳)	Different toxicity of anatase and rutile TiO2 nanoparticles on macrophages: Involvement of difference in affinity to proteins and phospholipids (マクロファージに対するアナターゼおよびルチル型TiO ₂ ナノ粒子の異なる毒性:タンパク質およびリン脂質に対する親和性の差異の関与)
著者 所属機関	Qilin Yu ^a , Honggang Wang ^a , Qi Penga, Ye Li ^a , Zhe Liu ^{a,b} , Mingchun Li ^a a) Ministry of Education Key Laboratory of Molecular Microbiology and Technology, Department of Microbiology, College of Life Science, Nankai University, Tianjin 300071, China b) Water Environment Monitoring Center of Yellow River Basin, Zhengzhou, Henan 450002, China
書誌事項	Journal of Hazardous Materials 335 (2017) 125–134
試験物質	TiO ₂ ナノ粒子;類似の粒径(20-40nm)、表面積(51-52m ² /g)、ゼータ電位(-13.4~-13.7mV)のアナターゼ型(TiO ₂ -A)とルチル型(TiO ₂ -R)。 合成後 TiO ₂ NPs: 粒子サイズ 20-40nm、平均サイズ 27-28nm。
試料調整法	TiO₂ の合成: Sun の方法。蒸留水を用いて四塩化チタン水溶液(0.3M)を調製→激しく攪拌しながら、70℃で 4M NH ₄ OHを用いて pH を 4.0 に調整→ろ過した沈殿物を 50℃で 24 時間乾燥させた後、450℃で 2 時間焼成して TiO ₂ -A を、または 700℃で 2 時間焼成して TiO ₂ -R を合成。 TiO₂ NP ストック溶液(10mg/mL): TiO ₂ -A/TiO ₂ -R NP を 10%FBS を含む DMEM 培地に懸濁。ストック溶液を 30 分間超音波処理、続いて同じ培地で希釈。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	細胞株: マウスマクロファージ系 RAW264.7(中国科学院細胞資源センター) 培養条件: プレートに、10%FBS を補充した DMEM 培地中で 37℃の加湿インキュベーターで 5%CO ₂ 、24 時間培養。 MTT assay: プレートで 24 時間前培養後、培養上清を除去。10%FBS 及び TiO ₂ NPs を (0mg/L、12.5mg/L、25mg/L、50mg/L、100mg/L、200mg/L) の濃度範囲で含有する DMEM 培地(500μL)をウェルに添加。プレートを 24 時間培養、PBS 洗浄、3-(4,5-ジメチル-2-チアゾリル)-2,5-ジフェニル-2H-テトラゾリウムプロト ⁵ 500μL を添加。37℃で 4 時間培養後、生成したホルマザンを DMSO500μL で抽出。抽出溶液の光学密度(495nm)をマイクロプレートリーダーにより決定。 細胞生存率アッセイ: ヨウ化プロピジウム (PI) 染色により決定。マクロファージをアナターゼ又はルチル TiO ₂ NP で 24 時間処理後、2μL の PI(1mg/mL)を各ウェルに添加。5 分間染色後、蛍光顕微鏡により細胞を観察。PI 陽性細胞と各領域の総細胞数を数え、PI 陽性細胞の割合 (PI 陽性細胞の数×100 /全細胞数)を算出。TiO ₂ NP 処理下での細胞生存率に対する ROS スカベンジャー N-アセチル-L-システインの効果の評価用に、前培養した細胞をアナターゼまたはルチルで処理(2mM NAC を dH ₂ O に 24 時間溶解)、又は NAC の非存在下で培養。その後、全細胞生存率を試験。 アポトーシスとネクローシス(壊死)アッセイ: FITC-AnnexinV/PI アポトーシスキットを用いて評価。アナターゼ又はルチル TiO ₂ NP を 24 時間処理後、細胞をアポトーシスアッセイに使用。フローサイトメリーにより染色細胞の蛍光密度を評価。 ROS 検出: 1mL の細胞懸濁液を 5μL のジクロロフルオレセインジアクトート(DCFH-DA、10mg/mL、エタノールに溶解)で染色。37℃で 30 分間培養後、細胞を採取、洗浄、PBS 緩衝液に再懸濁。蛍光マイクロプレートリーダーを用いて、染色細胞の蛍光密度 (FLU、励起波長 488nm、発光波長 520nm)を検出。 ウェスタンブロッティング: TiO ₂ NP 処理細胞におけるオートファジーマーカー LC3 を検出するために、RIPA 緩衝液(プロテアーゼ阻害剤カクテルを含む)を用いて細胞から総タンパク質を抽出、SDS-PAGE により分離。タンパク質をポリビニリデンフルオリド膜に移し、LC3-I 及び LC3-II の両方に対応する抗体(Abcam、USA)を用いて検出。 NPs の細胞内取込み: 最終濃度 25mg/L を用いて、24 時間、アナターゼ又はルチル TiO ₂ NP で細胞を処理。細胞を PBS で洗浄、細胞に侵入することなく NP を除去、血球計算盤で計数、H/HNO ₃ (V:V=2:8) で 180℃、30 分間消化。消化液のチタン含量を誘導結合プラズマ質量分析法(ICP-MSe)で測定。 LMP 検出: LysoTracker Red 染色を用いて LMP を検出。ウェル底部の TiO ₂ NP 処理マクロファージを 500μL の PBS で保護、5μL の LysoTrackerRed で 37℃で 60 分間染色。細胞

	<p>を PBS で洗浄、蛍光顕微鏡で観察。全細胞分布不全蛍光 (LMP 陽性) 及び各視野の全細胞数を計数、LMP 陽性細胞のパーセント (LMP 陽性細胞の数×100/全細胞の数) を計算。少なくとも 20 の異なるフィールドを観察・分析。</p> <p>マクロファージの TEM 観察: 細胞超微細構造を観察。TiO₂NP 処理細胞をグルタルアルデヒド溶液で 4℃で 12 時間固定、四酸化オスmium溶液で 1 時間後固定。試料を脱水、包埋、超薄切片に切断、酢酸ウラニル及びケン酸鉛で染色、TEM により観察。</p> <p>ミトコンドリア膜電位 (MMP) 測定: TiO₂NP を 24 時間処理後、マクロファージをアポトーシス及び壊死アッセイに記載の通り採取。PBS 緩衝液中の細胞 1mL を 37℃で 30 分間、2μL JC-1 (0.5mg/mL DMSO に溶解) で染色。フローサイトメトリーを用いて、染色された細胞の蛍光密度を調べた。J - 凝集体の蛍光発光は、蛍光チャネル 2 (FL2) におけるフローサイトメトリー及び蛍光チャネル 1 (FL1) におけるモノマー蛍光によって記録。減少した MMP (FL2 における低い蛍光強度) を有する細胞の割合を記録。</p> <p>逆電子伝達 (RET) アッセイ: ミトコンドリアの RET 活性を Knobeloch の方法で試験。マクロファージをミトコンドリア緩衝液中に懸濁、ホモジナイズ。溶解物 1000g で 10 分間遠心分離、核及び未処理細胞を除去。次いで上清 10,000g で 15 分間遠心分離、ミトコンドリアペレットを得た。ミトコンドリアを異なる濃度の TiO₂ NP 含有ミトコンドリア緩衝液中に懸濁、ATP と共に 5 分間培養。各試料 OD₃₄₀ 変化を記録、RET 阻害率計算。</p> <p>吸着実験: 以前の方法[40]に従って、牛血清アルブミン (BSA) の TiO₂-A 及び TiO₂-R への吸着等温線が得られた。それぞれ 100μg/mL の TiO₂ NP 及び異なる量の BSA を含む dH₂O を含有する一連のバイアルを、180rpm、37℃で 24 時間振盪。上清を使用してクマシーブルーリアントブルーアッセイを用いて BSA の濃度を検出。各平衡濃度での吸着質量は、物質収支法に基づいて計算。両方の NP に対する重要な原形質膜リン脂質、ホスファチジルエタノールアミン (PE) の吸着等温線をバイアル中で得た。バイアルには 100μL の 10mg/mL TiO₂NP ストック懸濁液と異なる量の PE ストック溶液 (1:1 クロロホルム/メタノール) が含まれ、最終液量は 1:1 クロロホルム/メタノールで 10mL に調整。バイアルを 180rpm、37℃で 24 時間振盪、各バイアルの上清を LC-MS システムにより PE 含量決定。各平衡濃度での吸着質量も計算。</p> <p>統計解析: Statistical Packages for the Social Sciences (SPSS) Version 20.0.3 を用いて統計解析を実施。各実験は 3 回反復して各試験条件で実施、値は 5 回の実験平均±標準偏差。一元配置 ANOVA を用いて、処置間の有意差 (P < 0.05) を決定。</p>
<p>試験結果</p>	<ul style="list-style-type: none"> ・アナターゼ及びルチル TiO₂ NP は、マクロファージに対して明確な毒性を示した。MTT アッセイで 12.5mg/L 以上の TiO₂-R は、代謝活性の明らかな低下を引き起こしたが、TiO₂-A は、50mg/L 以上の濃度でのみ減少した (図 2A)。PI 染色による細胞生存率の評価でも、TiO₂-R は 12.5mg/L までの生存細胞で有意な減少をもたらした、TiO₂-R によって誘導された PI 陽性細胞のパーセントは 25mg/L 以上の濃度で TiO₂-A よりも高く (図 2B)、アナターゼ型 TiO₂ NP がルチル型 TiO₂ NP よりも毒性が低いことを示した。TiO₂-R による代謝活性の低下は 12.5mg/L で開始したが、両タイプの NP による細胞生存率の低下は 25mg/L で開始し、細胞死の増強以外の他のメカニズムが、ルチル TiO₂ に関連した毒性で機能していた。 ・ROS の蓄積とオートファジーの両方は、アナターゼとルチル型 TiO₂NP との間の毒性の違いに関与していなかった。細胞 ROS レベルの測定で、DCFH-DA 染色は、TiO₂-NP の両タイプがマクロファージにおける ROS 蓄積の増加をもたらしたが、両タイプで処理した細胞間 ROS レベルに有意差はなかった (図 3A)。ROS スカベンジャー NAC は、両タイプ処理細胞間で細胞生存率の差を減少させなかった (図 3B)。試験濃度 TiO₂ NP で、NAC は TiO₂-R の細胞損傷への影響を与えなかったが、TiO₂-A の毒性を効果的に弱めた (図 3B)。ウェスタンブロッティングでは、両タイプが LC3-II 含量を僅かに増加させたが、の LC-I・LC-II 含有量に明確な差はなかった (図 S2)。 ・マクロファージは、マクロファージにおいてアナターゼ及びルチル型 TiO₂NP と同様の取込み能力を示した (図 3)。 ・アナターゼ TiO₂ NP は、ルチル TiO₂ NP よりも重度の壊死を引き起こさなかった。アポトーシスの検出により、12.5mg/L 及び 50mg/L 濃度の TiO₂-A は、TiO₂-R よりもより深刻なアポトーシスを引き起こしたが、100mg/L に達すると、TiO₂-R と同様のアポトーシス誘導活性を有した (図 4A)。アポトーシスは、TiO₂-R よりも TiO₂-A の毒性が低いことと関連していなかった。FITC-アネキシン V/PI 染色による壊死の検出は、MTT アッセイおよび細胞生存率アッセイの結果と一致し、TiO₂-A は、示された濃度で TiO₂-R よりも低いレベルの壊死細胞を誘導した (図 4B)。アポトーシスではなく、壊死がアナターゼ TiO₂NP のより低い毒性に関与していることを示唆した。 ・アナターゼ TiO₂NP は、ルチル TiO₂NP よりも重度の LMP を引き起こした。TiO₂-A で処理された細胞のほとんどは、対照細胞と同様に、リソソーム蛍光の点で分布した (図 5A) のに対し

	<p>て、TiO₂-R で処理された豊富な細胞は、全細胞蛍光の分布を有しており(図 5A)、細胞が TiO₂-R の処理下で LMP の網状化を起こした。LMP 陽性細胞の計数から、TiO₂-R は、濃度が 12.5mg/L でも、TiO₂-A よりも LMP 陽性細胞の方がはるかに高かった(図 5B)。TEM 観察により、TiO₂-R に起因する重度のリソソーム損傷が確認されたが、ほとんどの TiO₂-A 含有リソソームは無傷のままであった(図 5C)。対照的に、TiO₂-R NP はリソソームの内面に付着する傾向があり(図 4S)、リソソーム膜が明らかに破壊された(図 5C)。損傷したリソソームは、TiO₂-A によって引き起こされるものよりもはるかに豊富であった(図 5D)。さらに、PM に付着した TiO₂-R NPs は PM 損傷を引き起こし、細胞内の細胞質の放出が続いた(図 5C)。これらの観察は、TiO₂-A 及び TiO₂-R がリソソームに損傷を与える別個の能力を有し、LMP の増加が壊死の増強及び TiO₂-R の高い毒性に関連することを示唆した。</p> <p>・アナターゼ TiO₂ NP は、ミトコンドリアのルチル TiO₂ NP に対してより高い毒性を示した。マクロファージにおけるミトコンドリア機能の評価のための MMP アッセイで、12.5~50mg/L 濃度の TiO₂-A が TiO₂-R よりも MMP のより深刻な低下を引き起こすことを示した。TiO₂-A と TiO₂-R の処理(図 6A)の間で、MMP を低下させた細胞の割合に差はなかった。RET アッセイにより、マクロファージのミトコンドリアとの相互作用の間に、両タイプで RET に対して顕著な阻害効果を示した。TiO₂-A は、全濃度で TiO₂-R よりも強い RET 阻害活性を示した(図 6B)。観察結果から、TiO₂-A がミトコンドリアに強い影響を与え、TiO₂-A 処理マクロファージにおけるアポトーシスの増強に寄与する可能性のある TiO₂-R よりも重度のミトコンドリア機能障害をもたらすことを示した。</p> <p>・アナターゼ及びルチル TiO₂NP は、タンパク質及びリン脂質に明確な吸着活性を有した。タンパク質及びリン脂質との吸着実験による相互作用の検出から、BSA/TiO₂ NP の吸着等温線は、TiO₂-A が TiO₂-R よりもこのモデルタンパク質に対して高い吸着親和性を示すことを示した(図 7A)が、モデルリン脂質 PE の吸着等温線は、リン脂質に対する TiO₂-A よりも TiO₂-R の吸着活性が大きいことを明らかにした(図 7B)。</p>
結論	<p>本研究は、類似のサイズ及びゼータ電位を有するアナターゼ及びルチル型 TiO₂ NP が、タンパク質およびリン脂質に対するそれらの異なる親和性のために、マクロファージ中のオルガネラに対して異なる毒性及び異なる損傷効果を有することを実証した。以前の所見とは対照的に、TiO₂-A は、TiO₂-R(10%対 50mg/L で 20%)と比較して低い細胞死割合を示し、TiO₂-R と比較してより低い毒性を示した。TiO₂-A 及び TiO₂-R で処理されたマクロファージは、類似の活性酸素種(ROS)およびオートファジーマーカー LC3 を有し、我々の観察された毒性の差異は酸化損傷およびオートファジーに起因しないことを示唆している。興味深いことに、TiO₂-A は、重度の壊死およびリソソーム膜透過性(LMP)を引き起こすが、より重篤なミトコンドリア機能不全を引き起こす。吸着アッセイはさらに、TiO₂-A 及び TiO₂-R がそれぞれタンパク質およびリン脂質に対してより高い親和性を有することを明らかにする。本研究は、ナノ毒性における異なる生体分子に対する結晶相関連表面親和力の重要な役割を明らかにした。したがって、NP と生物系との間の相互作用を減弱または増強するために、NP の結晶相を合成手順中に制御することができる。</p>

No	TiO2-11
論文題目 (和訳)	Exposure to nano-size titanium dioxide causes oxidative damages in human mesothelial cells: The crystal form rather than size of particle contributes to cytotoxicity (ナノサイズの二酸化チタンへのばく露が、ヒト中皮細胞における酸化損傷を引き起こす: 粒子サイズよりも結晶形が細胞傷害性に寄与する)
著者 所属機関	Kenji Hattori ^a , Kazuhiko Nakadate ^b , Akane Morii ^a , Takumi Noguchi ^a , Yuki Ogasawara ^c , *, Kazuyuki Ishii ^a a) Department of Hygienic Chemistry, Meiji Pharmaceutical University, Japan b) Department of Basic Science, Educational and Research Center for Pharmacy, Meiji Pharmaceutical University, Japan c) Department of Analytical Biochemistry, Meiji Pharmaceutical University, Japan
書誌事項	Biochemical and Biophysical Research Communications 492 (2017) 218e223
試験物質	nTiO2、微細 TiO2 粒子 (アナターゼ型)
試料調整法	TiO2 粒子を分散媒中に懸濁し、超音波ホモジナイザーで 5 分間超音波処理。全ての対照実験で、細胞を等量分散培地で処理。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	試験生物: ヒト胸膜中皮細胞 (American Type Culture Collection) 細胞培養・処理: ヒト胸膜中皮細胞 (MeT-5A) 株を、10% FBS、ペニシリン (100mg/mL)、ストレプトマイシン (100mg/mL) を補充した M199 中で、37°C の加湿インキュベーター中で 5% CO ₂ 、95% 空気の雰囲気下で培養。細胞を、図に示されている時間間隔で、6cm ディッシュまたはウェルプレートに TiO ₂ 粒子の有無で培養。 LDH アッセイ: 透過性アッセイを用いて細胞膜の完全性をモニターし、乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) の培地への放出を測定。LDH 漏出は、細胞毒性 LDH アッセイキット-WST により測定。試料の吸光度は、マイクロプレートリーダーにより測定 (450nm)。 細胞内 ROS の測定: MeT-5A 細胞をウェルプレート (2.5×10 ⁴ 細胞/ウェル) で培養。細胞を異なる時間および異なる濃度で nTiO ₂ で処理。nTiO ₂ を含む、または含まない処理後、細胞を PBS で洗浄、37°C で FBS を含まない M199 培地中の 10mM DCF-DA で処理。30 分間培養後、細胞をウェルプレートに移動。485nm、535nm の励起波長及び発光波長で蛍光強度を測定、蛍光単位として表現。 DNA 中の 8-OHdG の定量: サンプル調製中の人工 8-OHdG 生成を最小にするために、カトリック NaI 法を用いて DNA を抽出、鉄キレート剤であるデフェロキサミンを添加し鉄触媒フェントン反応を抑制。DNA Extractor キットを用いて MeT-5A (5~10 ⁶ 細胞) から核 DNA を抽出。沈殿した DNA を、ヒドロキシル化ブチルヒドロキシル含有エタノール中に一晩保存。蒸留水に溶解した DNA 等量を 95°C で 2 分間変性、氷上で急速冷却。熱変性 DNA を、酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.5) 中で 37°C で 30 分間、ヌクレアーゼ P1 (20 単位/ mL) とともに消化、アルカリホスファターゼをトリス緩衝液 (pH8.5) 中で 37°C で 30 分間培養。この溶液を遠心分離。上清をフィルターユニットを備えたチューブに移し、遠心分離、電気化学的検出器および UV 検出器を備えた HPLC カラムに注入。標準試料として 2-デオキシグアノシン (0.5mg/mL) および 8-OH-dG (5ng/mL) 溶液を使用。8-OHdG の値は、106dG あたりの残基数として計算。 TEM 観察: TiO ₂ の細胞内への摂取について超構造的に調べた。異なるタイプの TiO ₂ にばく露し培養した MeT-5A 細胞を、15 分/24 時間/48 時間の処理後、リン酸緩衝液 (pH7.4) 中のパラホルムアルデヒドおよびグルタルアルデヒド中に固定。細胞をリン酸緩衝液中の 1% OsO ₄ で後固定。1% ウラニルアセテートで一括染色、段階的濃度のエタノールで脱水、プロピレンオキシドに浸漬。細胞を Epon-812 樹脂に包埋、60°C で 48 時間重合。Epon-812 樹脂に包埋した細胞を、光学顕微鏡下でトリミング。超薄切片 (厚さ 70nm) を切断、超薄切片を透過型電子顕微鏡で検査、画像を CCD カメラで捕捉。
試験結果	nTiO₂ の細胞毒性: LDH アッセイから、コントロール細胞と比較して 48 時間の処理後に nTiO ₂ のアナターゼ型で細胞毒性が有意に観察された (図 1)。対照的に、媒体中に 200mg/mL の TiO ₂ 粒子で処理した場合、ルチル型の nTiO ₂ またはアナターゼ型微粒子 TiO ₂ で著しい LDH の漏出は観察されなかった (図 1A)。放出された LDH 活性は全 LDH 活性の約 5% であったが、nTiO ₂ アナターゼ型で細胞傷害性の用量および時間依存性が観察された (図 1B)。 TiO₂ ばく露により誘導される MeT-5A の細胞内 ROS 生成: nTiO ₂ アナターゼ型が、処理 2

	<p>時間後に 100mg/mL 濃度のルチル型 nTiO₂ 処理と比較して、ROS レベルが 2.5 倍増加することを示唆した (図 2A)。8 時間または 24 時間の処理後に、アナターゼ型 nTiO₂ から用量依存的に RPS が生成されたことが明らかに示された (図 2B)。</p> <p>DNA 中の 8-OHdG 形成は、MeT-5A 細胞において nTiO₂ によって増加: 3 種類の TiO₂ 粒子にばく露後の MeT-5A 細胞は、8-OHdG 形成の傾向が異なった。細胞を各形態の TiO₂ で 24 時間処理すると、アナターゼ型 nTiO₂ のみが、未処理細胞の値 (コントロール) と比較して 8-OHdG のレベルを有意に増加させた (図 3)。12~48 時間までの全測定点で、未処理対照と比較して 8-OHdG の有意な減少が観察されたが (p < 0.05)、nTiO₂ のアナターゼ型処理の 24 時間後に最大の蓄積が見られた。これらの結果は、8-OHdG 形成が、単に nTiO₂ へのばく露によって引き起こされる ROS 形成と単に相関するものではないことを示した。</p> <p>MeT-5A 細胞における nTiO₂ の取込み: nTiO₂ のアナターゼ型にばく露されたすべての細胞はかなりの量の nTiO₂ を摂取し、蓄積した nTiO₂ が細胞質で観察された (図 4A, a)。アナターゼ TiO₂ (アナターゼ) の微粒子にばく露で、少数の細胞が TiO₂ 粒子を蓄積したが (図 4A, b-1)、大部分の細胞では TiO₂ 粒子は吸収されなかった (図 4A, b-2)。ルチル型 nTiO₂ (ルチル) にばく露した場合、TiO₂ 粒子の細胞取込みは観察されなかった (図 4A, C)。アナターゼ型 nTiO₂ の長期間ばく露による細胞形態の変化の観察 (図 4B) で、TiO₂ 処理なし細胞及び TiO₂ に 15 分間ばく露した細胞は、健康な形態を示した (図 4B, a)。TiO₂ への 24 時間ばく露細胞は、大量の TiO₂ を取込んだが、ほとんどの細胞は健康な形態を有していた (図 4B, b)。TiO₂ への 48 時間ばく露後、細胞質中の TiO₂ の蓄積が、24 時間ばく露後細胞のと同様であることを観察した (図 4B, c)。大部分の細胞は、特に核膜において、健康な形態を示さなかった (図 4B, d)。ほとんどの細胞において、多くのオートファゴソーム様構造または液胞が観察された。</p>
<p>結論</p>	<p>この研究では、二酸化チタン粒子の形態および形態に焦点を当てた。ヒト由来胸膜中皮細胞に対するナノサイズのアナターゼとルチル型二酸化チタンとの効果を比較すると、アナターゼ型は細胞に活発に吸収され、活性酸素種を生成し、DNA に酸化的損傷を引き起こすことが示された。対照的に、ルチル型が細胞に容易に吸収されず、したがって、酸化的 DNA 損傷を引き起こさず、細胞に著しく損傷を与えないことを初めて示した。これらの結果は、ヒト由来の中皮細胞に対する二酸化チタン粒子の毒性に関して、粒径よりも結晶形が細胞吸収に対してより大きな効果を有することを示唆している。また、吸収の差は、中皮細胞に対する毒性の差の主な原因であることが示された。</p>

No	TiO2-12
論文題目 (和訳)	Immunotoxic effects of thymus in mice following exposure to nanoparticulate TiO2 (ナノ粒子TiO2にばく露したマウスにおける胸腺の免疫毒性効果)
著者 所属機関	Fashui Hong ^{1,2,3,4} Yaoming Zhou ⁵ Yingjun Zhou ^{1,2,3,4} Ling Wang ⁶ 1) Department of Food, Jiangsu Collaborative Innovation Center of Regional Modern Agriculture and Environmental Protection, Huaiyin Normal University, China 2) Department of Food, Laboratory for Food Safety and Nutritional Function, Huaiyin Normal University, China 3) Department of Food, Jiangsu Key Laboratory for Eco-Agricultural Biotechnology Around Hongze Lake, Huaiyin Normal University, China 4) Department of Food, School of Life Sciences, Huaiyin Normal University, China 5) Department of Food, Jiangsu Food and Pharmaceutical Science College, China 6) Department of Food, Library of Soochow University, China
書誌事項	Environmental Toxicology. 2017;32:2234–2243.
試験物質	TiO2 NP: アナターゼ型。粒子サイズ 約 5~6nm、表面積 174.8m ² g ⁻¹ 、流体力学的直径 294nm、ゼータ電位 9.28mV (特性は参考文献 22・23 を参照。)
試料調整法	TiO2 NP の調整: 参考文献 22・23 を参照。TiO2 NP 粉末を 0.5%w/v ヒドロキシプロピルメチルセルロース (HPMC) K4M 溶液中に分散、懸濁溶液を 30 分間超音波処理、機械的に 5 分間振動。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	試験生物: 5 週齢の雌性 ICR マウス (18-22g) (蘇州大学動物センター) ばく露条件: TiO2 NP 懸濁液 (0/1.25/2.5/5mg/kg-体重) を毎日 9 か月間、胃内栄養により投与。温度制御下 (24±2°C)、明暗 12 時間サイクル、相対湿度 (60±10%) の動物室でオートクレーブ処理水とげっ歯類の食餌を自由に与えた。投与前にマウスを 5 日間馴化。 胸腺指標の評価: TiO2 NPs 処理後に体重を測定し、麻酔後屠殺。血液サンプルを眼静脈から回収。胸腺を迅速単離、胸腺重量を測定、胸腺の固有指標を胸腺 (湿重量、mg) 対体重 (g) の比として算出。各群の 5 匹のマウスから新鮮な胸腺を、組織病理学的検査用にパラホルムアルデヒド溶液にすばやく浸漬。残った新鮮な胸腺を液体窒素中に迅速貯蔵、タンパク質発現について試験。 チタン含量分析: 約 0.1g の胸腺を秤量、解凍、消化、チタン含量を分析。 血液学的パラメータ決定: 抗凝固剤としてエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) 含有チューブに血液試料 (各 n=5) を採取。赤血球 (RBC)、網状赤血球 (Ret)、白血球 (WBC)、ヘモグロビン (HGB)、血小板 (PLT)、平均赤血球ヘモグロビン濃度 (MCHC)、平均赤血球ヘモグロビン (MCH)、平均赤血球体積、及び平均血小板容積 (MPV) を、血液自動分析装置で測定。 細胞調製およびフローサイトメリー分析: 胸腺をマウスから切開、単細胞浮遊液を無菌条件下で調製。懸濁液をステンレススチールメッシュに通し、4°C、200×g で 10 分間遠心分離、完全細胞培養培地に再懸濁、細胞密度を 1.5×10 ⁶ 細胞 cell mL ⁻¹ に調整。胸腺の収穫後、胸腺組織切片を廃棄してシリンジのプランジャーで粉碎し、RPMI 1640 培地に懸濁させることで、単一細胞懸濁液を調製。赤血球を除去するために溶血緩衝液で胸腺細胞を処理。5×10 ⁵ 個の胸腺細胞を、フルオレセイン活性化細胞選別機 (FACS) 緩衝液で 1 回洗浄。細胞を、CD3、CD4、CD8、CD19 および NK1.1 に対する抗マウスモノクローナル抗体で染色。FACSCaliber で 4 色フローサイトメリーにより細胞分析。B 細胞、CD3T 細胞、CD4T 細胞、CD8T 細胞、二重陽性胸腺細胞、二重陰性胸腺細胞、および NK 細胞含有リンパ球サブセットを分析。各細胞集団サイズは、Hemavet または血球計によって記録された全リンパ球数とフローサイトメーターにより記録された陽性リンパ球の百分率との積として計算。全データを BD Biosciences Cellquest 分析ソフトウェアで解析。 組織病理学的評価: 各群 5 匹のマウスからの胸腺を、組織学的評価のために中性緩衝ホルマリン中に固定。光学顕微鏡法を用いて形態学的評価のために、パラフィン包埋組織切片を切開、ヘマトキシリンおよびエオシンで染色。 ELISA を用いたタンパク質発現アッセイ: 胸腺組織由来タンパク質を抽出。組織の 1.00g 等量を抽出緩衝液 (RIPA 緩衝液) と混合、25 分間連続振とう、遠心分離。上清を回収、220°C で保存。全試料を 2 回抽出。胸腺組織中の、正常な T 細胞発現および分泌 (RANTES)、ヘルペス増殖因子活性化受容体 γ 共活性化因子-1 アルファの活性化に調節される IκB、IκB キナーゼ (IKK) 1、IKK2、インターロイキン-16 (IL-16)、IL-好中球セラーチナーゼ関連リポカン

	<p>(NGAL)、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 γ (PPAR-γ)、プリン作動性 (P2X) 受容体-7 (P2X7)、プロスタグランジン E2 (PGC1-α)、シクロオキシゲナーゼ 2 (COX-胸腺組織における低酸素誘導因子 1-α (HIF-1α)、インターフェロン誘導性タンパク質 10 (IP-10)、および葉柄因子 1 (TFF1) タンパク質の発現のレベルをそれぞれのタンパク質に選択的な市販キットを用い、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) 法により測定。吸光度は、450nm のマイクロプレートリーダーで測定、IκB、IKK1、IKK2、IL-1β、IL-4、RANTES、PGC1-α、COX-2、NGAL、PPAR-γ、P2X7、PGE2、HIF-1α、IP-10、TFF1 を、各サンプル(各 n=5) についての標準曲線から計算。</p> <p>ウェスタンブロットを用いたタンパク質発現アッセイ: 胸腺組織を氷冷 RIPA 溶解緩衝液中でホモジナイズ、プロテアーゼ阻害剤を 1% RIPA 溶解緩衝液の用量で添加。全タンパク質 (30-50μg) を 8% または 12% SDS-PAGE に供し、ニトロセルロースメンブレンに移し、1 次抗体 (抗 NF-κB (1:1,000)、抗 t/p-ERK1/抗 t/ p-JNK (1:500)、抗 t/p-p38 (1:500)、および抗 β-アクチン (1:2,000)) で培養。TBST で洗浄後、室温で 2 時間、膜を HRP コンジュゲート二次抗体 (1:10,000) と共に培養後、増強化学発光を用いて検出。免疫反応性バンドを X 線フィルムを用いて視覚化。定量分析のために、バンドを ImageJ ソフトウェアで評価、β-アクチン密度について標準化。</p> <p>統計解析: SPSS 19.0 ソフトウェアを用いて統計解析、一元配置 ANOVA、続いて Tukey's HSD post hoc test を用いて統計的比較分析。</p>
<p>試験結果</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 体重、胸腺重量、胸腺指標およびチタン蓄積: 体重は明らかに減少したが (P <0.05)、胸腺の胸腺重量、胸腺指標およびチタン含量は有意に増加した (図 1、P <0.05)。コントロールのチタン含量は検出できなかった。 • 血液学的パラメーター: 血液学的パラメーターから、TiO₂ NPs ばく露は、WBC、RBC、Ret、HGB 及び MCHC を大幅に減少させる一方で、血液中で用量依存的に MCV、MCH、PLT、及び MPV を有意に上昇させることを示唆した (表 1、P <0.05)。 • 胸腺由来のリンパ球サブセット: CD31 については 19.03%、33.6%、51.1% の減少を伴ってリンパ球サブセットが顕著に減少したことが観察された (図 2)。CD41 は 26.78%、35.84%、50.46%、CD81 は 24.81%、31.23%、36.18%、B 細胞では 12.11%、26.21%、35.75%、NK 細胞では 18.57%、37.98%、48.99% であった (p <0.05)。種々の TiO₂ NP ばく露マウスにおける CD41 対 CD81 比は、各々 2.84%、6.7% および 22.38% 減少した (P <0.05)。 • 組織病理学的評価: 非ばく露胸腺サンプルは、皮質、小葉で見える無傷の包皮で囲まれた髄質を伴う正常な構造を示したが、TiO₂ NP ばく露群は、マクロファージの身体によって出現する皮質の典型的な外観、出血、重度の溶血または鬱血、脂肪変性、及び細胞アポトーシスまたは壊死を含む、顕著な病理学的変化を示した (図 3)。この結果は TiO₂ NP への慢性ばく露はマウスの胸腺損傷をもたらす、これは胸腺免疫および/または炎症関連マーカー発現の変化に関連する可能性があることを示唆している。 • 免疫/炎症因子を含むタンパク質発現: TiO₂ NP がそれぞれ IKK1/2、IL-1β、IL-4、RANTES、COX-2、NGAL、P2X7、IP-10、及び HIF-1α タンパク質の発現を大きく誘導すること、胸腺における IκB、PPAR-γ、PGC-1α、PGE2、及び TFF1 タンパク質の発現をそれぞれ用量依存的に有意に抑制すること、を示唆した (表 2)。 • NF-κB 媒介性 MAPK 経路の活性化: 胸腺における NF-κB、p-JNK、p-p38、および p-ERK1/2 の発現は、TiO₂ NP の用量が増加するにつれて用量依存的に有意に上昇し、0.14、0.95、1.03 倍; 0.69、0.81、1.21 倍; 0.38、0.63、0.86 倍; 0.04、0.48、0.85 倍または 0.02-0.24 および 0.77 倍であった (図 4、P <0.05)。
<p>結論</p>	<p>本研究では、TiO₂ NP に長期間ばく露することで、マウスの胸腺損傷、血液中の WBC、RBC、Ret、HGB、MCHC および CD31、CD41、CD81、B 細胞の減少による免疫刺激効果、及び胸腺における NK 細胞、血中の MCV、MCH、PLT 及び MPV の増加が生じる可能性があることが示唆された。さらに、TiO₂ NP によって引き起こされるこれら免疫感作効果は、マウス胸腺における、NF-κB、IKK1/2、IL-1β、IL-4、RANTES、COX-2、NGAL、P2X7、IP-10、HIF-1α、p-JNK、p-p38、と p-ERK1/2 タンパク質の発現増加と、IκB、PPAR-γ、TFF1、PGC-1α、と PGE2 の発現低下による NF-κB 媒介性 MAPK 経路の活性化と免疫/炎症因子の発現の変化と関連していた。これらの結果は、動物またはヒトにおける免疫器官の潜在的な毒性としての TiO₂ NP の免疫毒性作用についての洞察を提供する。そのため、日焼け止めや化粧品、食品や練り歯磨きに TiO₂ NP を使用すると、ヒトの潜在的なリスクがあり、より注意を払う必要がある。マウス胸腺の TiO₂ NPs 誘発免疫毒性の可能性のある機構を示す概略図を図 5 に示した。</p>

(5) SiO₂

No	SiO ₂ - 1
著者 所属機関	Inhibition of gap junction intercellular communication is involved in silica nanoparticles-induced H9c2 cardiomyocytes apoptosis via the mitochondrial pathway. (ギャップ結合細胞間伝達の阻害はミトコンドリア経路を経由したシリカナノ粒子誘発 H9c2 心筋細胞アポトーシスに關与する)
論文題目 (和訳)	Du ZJ ¹ , Cui GQ ² , Zhang J ¹ , Liu XM ³ , Zhang ZH ¹ , Jia Q ¹ , Ng JC ⁴ , Peng C ⁵ , Bo CX ¹ , Shao H ¹ . 1Department of Toxicology, Shandong Academy of Occupational Health and Occupational Medicine, Shandong Academy of Medical Sciences. 2Department of Respiratory Medicine, Qilu Children's Hospital of Shandong University, Jinan. 3Department of Radiation Chemistry and Toxicology, School of Public Health, Jilin University, Changchun, People's Republic of China. 4National Research Centre for Environmental Toxicology-Entox, The University of Queensland, Brisbane, QLD, Australia. 5Department of Toxicology, Shandong Academy of Occupational Health and Occupational Medicine, Shandong Academy of Medical Sciences; National Research Centre for Environmental Toxicology-Entox, The University of Queensland, Brisbane, QLD, Australia.
書誌事項	Int J Nanomedicine. 2017 Mar 20;12:2179-2188. doi: 10.2147/IJN.S127904. eCollection 2017.
試験物質	シリカナノ粒子 (SNP) : 直径 = 60 nm、質量濃度 = 12.4 g/L。 提供先: School of Chemistry, Jilin University
試料調整法	保存媒体: 無血清 DMEM
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	試験生物: ラット心筋細胞株 H9c2 (2-1) (カタログ番号: GNR 5) 購入先: Cell Resource Center, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences. 投与方法・ 期間及び試験用量 ①細胞生存性 (CC K-8 アッセイ) (WST-8 cell counting kit (CCK-8 Kit; Dojindo, Kumamoto, Japan) 使用) H9c2 細胞は SNPs にばく露 (12.5、25、50、100、200 µg/mL ; 1、6、12、24、48 時間)。それから、10 µL の CCK-8 溶液を各 well に添加し、追加の 1 時間、37°C で培養。 ②ギャップ結合活性分析 (ギャップ結合細胞間伝達 (GJIC) の評価のためにスクレイプ - ローディング/色素移動法を使用) 処理後、実施。 ③ギャップ結合細胞間伝達 (GJIC) の変調 GJIC 変調のための薬理的薬品は保存溶液としての DMSO に溶解。相乗作用プロセスのために、細胞は、SNPs ばく露に先立って及び処理を通じて、24 時間、ギャップ結合活性化剤レチノイン酸と共に培養 (RA, 10 µM in DMSO)。また、遮断薬カルベノキソロン二ナトリウム (CBX, 50 mM in DMSO) と共に培養。コントロール細胞は、DMSO だけで培養。 ④ Annexin V-FITC/PI アポトーシスアッセイ (アポトーシスの定量化: Annexin V-FITC/PI 二重染色アッセイ付きフローサイトメーター (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)) 100 µg/mL の SNPs への 24 時間ばく露後、細胞採取。 ⑤Western blot アッセイ (GJIC-アポトーシス-関連蛋白質の発現を測定) 処理後、すぐに細胞採取。
試験結果	①細胞生存率テスト SNPs へのばく露後、細胞生存率は濃度・および時間依存的に、コントロールセルに比べて減少した。SNPs の明らかな細胞毒性は、100µg/mL、24 時間で観察 (対コントロールの生存率 = 約 75%)。SNPs によって引き起こされたアポトーシスにおける GJIC の役割の検討条件を 100µg/mL 以下、24 時間を選定。 ②GJIC 阻害 GJIC 阻害は用量依存的。24 時間 SNPs 処理後、Cx43 蛋白質発現は有意にダウンレギュレート、P-Cx43 のレベルは有意に上昇。 ③SNPs 誘発アポトーシスに及ぼす GJIC の影響 ギャップ結合機能は 2 つの方法で操作される (RA による結合チャンネルの強化、CBX による阻害)。特に、100µg/mL SNPs と組み合わせられた RA は、SNPs 処理だけと比較し大幅に細胞生存率を増大させた、大幅に減少した細胞毒性を産出した。

	<p>④Annexin V-FITC/PI 二重染色 アポトーシス比は、③同様の結果(100µg/mL、24 時間処理)。 ⑤SNPs 処理の後に続くアポトーシス関連蛋白質の発現に及ぼす GJIC の影響 RA-前処置群で Bcl-2/Bax 比率有意に増大、一方 CBX-前処置群で有意に減少。SNPs- 処理群に比べて、カスパーゼ-3 とカスパーゼ-9 の発現は、SNPs および RA による処理群 で有意にアップレギュレート、一方、SNPs と CBX による処理による処理群で有意にダウンレ ギュレートされた。これらの結果は、GJIC が、SNPs 誘発アポトーシスにおいてミトコンドリア 経路を調整することを示唆する。</p>
<p>結論</p>	<p>本研究は、SNPs がアポトーシスに加えて GJIC 阻害を引き起こすことを示した。重要な意味 は、強化された GJIC がオフターゲットの損傷または防御を発揮するのに対して、抑制された GJIC が H9c2 セルの細胞毒性を増大させることである。それは、また、GJIC ダウンレギュレ ーションが H9c2 細胞における細胞毒性影響のための潜在的なメカニズムと考えられること を示唆する。</p>

No	SiO ₂ - 2
論文題目 (和訳)	Silica nanoparticles induce cardiotoxicity interfering with energetic status and Ca (2+) handling in adult rat cardiomyocytes. (シリカナノ粒子は、成体ラット心筋細胞におけるエネルギー状態及びCa(2+) handlingに害を与える心毒性を誘発する)
著者 所属機関	Guerrero-Beltrán CE ^{1,2} , Bernal-Ramírez J ¹ , Lozano O ^{1,3} , Oropeza-Almazán Y ¹ , Castillo EC ¹ , Garza JR ¹ , García N ^{1,2} , Vela J ¹ , García-García A ⁴ , Ortega E ⁵ , Torre-Amione G ^{1,2,6} , Ornelas-Soto N ⁷ , García-Rivas G ^{8,2} . 1Cátedra de Cardiología y Medicina Vascular, Escuela Nacional de Medicina, Tecnológico de Monterrey, Monterrey, México. 2Centro de Investigación Biomédica, Hospital Zambrano-Hellion, Tecnológico de Monterrey, San Pedro Garza-García, México. 3Namur Nanosafety Centre, Namur Research Institute for Life Sciences, Research Centre for the Physics of Matter and Radiation, University of Namur, Namur, Belgium. 4Centro de Investigación en Materiales Avanzados S.C. Unidad Monterrey, Apodaca Nuevo León, México. 5Department of Physics and Astronomy, The University of Texas at San Antonio, San Antonio, Texas. 6Methodist DeBakey Heart and Vascular Center, The Methodist Hospital, Houston, Texas; and. 7Laboratorio de Nanotecnología Ambiental, Centro del Agua, Tecnológico de Monterrey, Monterrey, México. 8Cátedra de Cardiología y Medicina Vascular, Escuela Nacional de Medicina, Tecnológico de Monterrey, Monterrey, México
書誌事項	Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2017 Apr 1;312(4):H645-H661. doi:10.1152/ajpheart.00564.2016. Epub 2017 Jan 27.
試験物質	・nano-SiO ₂ (Degussa, Parsippany, NJ) : 平均直径 = 7nm (メーカー情報)、水力直径 (超純水中) = 91±22nm。ζ電位 = -27.1±4.4mV。非晶質。純度 95%以上。 ・micro-SiO ₂ (St Ober 法で合成) : 670±32nm (FEG-SEM)、水力直径 = 712±212nm。ζ電位 = -14.4±5.48mV。非晶質。純度 95%以上。 ・F- micro-SiO ₂ (蛍光 micro-SiO ₂) 蛍光は、(3-アミノプロピル)トリエトキシシランの仮焼後のシリカネットワーク中の炭素及び酸素の欠損の導入に寄与する。
試料調整法	粒子の DLS 測定は、超純水、Tyrode 液、M-199、M-199+ウシ血清アルブミン (BSA) (5%) 溶液中に懸濁させて実施。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	試験生物: ラット心室筋細胞 (灌流心臓のコラゲナーゼ II ダイジェッションのよって分離) 投与方法・ 期間及び試験用量: 様々な濃度、24 時間培養
試験結果	①細胞毒性 (Alamar blue 生存率試験 (Life Technologies, Carlsbad, CA) で測定)。ネクロシス・アポトーシス (BD FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences, Heidelberg, Germany) で測定) : nano-SiO ₂ 、micro-SiO ₂ は、両方とも、用量依存の顕著な細胞毒性影響を示し、それぞれ、IC ₅₀ = 99.5±12.4µg/mL、>1,500µg/mL。細胞毒性はネクロシス経路で起こり、nano-SiO ₂ の方が早く起こる (LDH 放出によって示される)。 ②心筋細胞中の粒子 (nano-SiO ₂ 、micro-SiO ₂) のキャラクタリゼーション (FEG-SEM、粒子誘起 X 線放射 (PIXE) (細胞内粒子の定量) で分析。) : nano-SiO ₂ 、micro-SiO ₂ は、両方とも、時間依存で内在化し、nano-SiO ₂ の方が内在化により好ましい。細胞膜とは単独及び凝集/凝結体で結合。 ③共焦点顕微鏡による F- micro-SiO ₂ の細胞内配置: 3次元像から、単独及び凝集/凝結体の内在化、細胞核域付近での配置を確認。 ④無傷の心筋細胞における Ca ²⁺ handling と細胞短縮 (Ca ²⁺ 過渡電流、Ca ²⁺ スパーク、細胞短縮を測定) : SiO ₂ 処理は、細胞収縮の減少、SERCA (注: 遺伝子名) 活性の低下、β-アドレナリン刺激の損傷を引き起した。心筋細胞サルコメラ (筋節) 短縮は、コントロール群比較で、nano-SiO ₂ 、micro-SiO ₂ は 34、36% 減少。減少は、0.5 と 2.0Hz で残り、nano-、micro-SiO で差がなかった。 ⑤生体エネルギー状態測定 (ミトコンドリア膜電位を共焦点顕微鏡によって評価) :

	<p>SiO₂ 処理は、ミトコンドリア膜電位と ATP 含有量の低下を引き起した。 ⑥酸化ストレスマーカー(培地中の H₂O₂ 濃度の変化を検知): SiO₂ 処理は、ROS 産生とグルタチオン枯渇を引き起した。</p>
<p>結論</p>	<p>本研究の所見は、SiO₂ 誘発心筋細胞毒性が強いサイズ依存性であるという意見を支持する。①differential な時間依存的なネクロシスによる細胞死を伴い、アポトーシスの活性化がない、培養 24 時間後の differential な用量依存毒性を示した。②共焦点顕微鏡を用いて、非分裂・非食食性初代培養細胞における内在化現象を可視化した。③結果は、細胞機能に対する酸化ストレスの役割と SiO₂ 粒子に直接的影響: 害された Ca⁺ handling と細胞短縮の減少、を示した。これらの影響は、すべて、ミトコンドリア機能不全により、膜電位と ATP 含有量の低下として示された。</p>

No	SiO ₂ - 3
論文題目 (和訳)	Specifically Formed Corona on Silica Nanoparticles Enhances Transforming Growth Factor β 1 Activity in Triggering Lung Fibrosis. (シリカナノ粒子上の特別に形成されコロナは、肺線維症を起こすトランスフォーミング増殖因子 β 1 活性を高める)
著者 所属機関	Wang Z ¹ , Wang C ² , Liu S ¹ , He W ¹ , Wang L ¹ , Gan J ¹ , Huang Z ¹ , Wang Z ¹ , Wei H ¹ , Zhang J ^{1,3} , Dong L ¹ . 1State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, NJU Advanced Institute for Life Sciences (NAILS), School of Life Sciences, Nanjing University, 163 Xianlin Avenue, Nanjing 210093, China. 2State Key Laboratory of Quality Research in Chinese Medicine, Institute of Chinese Medical Sciences, University of Macau, Taipa, Macau SAR, China. 3Jiangsu Provincial Laboratory for Nano-Technology, Nanjing University, Nanjing 210093, China.
書誌事項	ACS Nano. 2017 Feb 28;11(2):1659-1672. doi: 10.1021/acsnano.6b07461. Epub 2017 Jan 19.
試験物質	・フルオレセインイソチオシアネート(FITC)ラベルシリカナノ粒子(F-SiNPs)、シリカナノ粒子(SiNPs)(SiNPs-10、-30、-100、-200、-1000を含む):入手先;Kisker Biotech (Steinfurt, Germany) ・炭素ナノ粒子(CNP-100)、その他材料(CaCO ₃ 、Au、鉄-コバルト-ニッケル合金(FeCoNi)、Fe ₃ O ₄)から造ったナノ粒子:購入先;DK Nano (Beijing, China)
試料調整法	SiNPs-100 はさらに修飾;水和(H- SiNPs)、アミノ化(N- SiNPs)、ポリマー修飾(PEI(P-SiNPs)、デキストラン(D- SiNPs)、ゼラチン(G- SiNPs))
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	・試験生物: ・ヒト肺癌上皮細胞 A549. 提供先;Stem Cell Bank, Chinese Academy of Science (Shanghai, China) ・雄 ICR マウス(20±2g)。購入先;Model Animal Research Center of Nanjing University (Nanjing, China) ・投与方法・期間及び試験用量: 試験結果の項に記載。
試験結果	①エンドトキシン(内毒素)アッセイ ②・マウスにおける珪肺モデル(シリカ誘発肺繊維化発生のため) 異なるサイズ、修飾シリカ(0.02、0.1、1、2、4mg)、TGF- β 1(1 μ g)、TGF- β 1/SiNP-100 が懸濁している無菌生理食塩水(合計 50 μ L)をマウス気管に経口的に投与(首切開し、針で)。ばく露後 20 日(4mg 群)、56 日に殺処分。シリカは、1N HCl 中で煮沸、洗浄・乾燥後、生理食塩水に懸濁、超音波処理。 ・肺ホモゲネート調製 ・TGF- β 1 の酵素結合免疫吸着検査法(ELISA)(肺ホモゲネート中の TGF- β 1 濃度測定) ⇒SiNP-100 が肺線維化誘発の能力が他より高い。CNP は非誘発。健康な及び線維化の肺ホモゲネート中の TGF- β 1 濃度は、348.8±41.23 及び 1145±130.8pg/mL。 ③・SiNPs のコロナの形成と分離 SiNP は LH 又は TGF- β 1(10 μ g/mL)と、4°C、2 時間培養。遠心分離でナノ粒子-コロナ複合体を分離(ショ糖クッションを通して)。コロナから蛋白質を抽出。 ・蛋白質濃度アッセイ(コロナから抽出された蛋白質の全濃度検知;BCA アッセイ) ・SDS(Sodium dodecyl sulfate)-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE) コロナ中の蛋白質は、PAGE 試料緩衝液で抽出、熱変性、遠心分離後、12%SDS-PAGE ゲルにかけて、分離。 ・未変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動(Native PAGE)(TGF- β 1 と SiNP の結合を分析) ・LC-MS 分析のための試料調製、トリプシン消化物の LC-MS 分析(抽出された蛋白質の分析) ・データベース検索、階層的クラスター分析、ヒートマップ解析、経路解析 LC-MS データからのペプチド及び蛋白質の識別は、ProteinPilot 4.5 software (AB SCIEX)を用いて実行。潜在的繊維化関連蛋白質の分析。 ・Western Blotting、定量的 Western Blotting(コロナ蛋白質の定量化) ・粒子当たりの蛋白質吸収数(PANPP)の絶対定量 定量的 Western Blotting の結果をもとに、mg SiNP-100 当たりの TGF- β 1 の相当量を計算。 ・フローサイトメトリーベースの粒子分析(FABA)(SiNP-コロナの表面上に TGF- β 1 がばく露されているか測定)

	<p>⇒SiNP 上のコロナ成分は CNP のそれとは異なり、より多くの線維化関連蛋白質を含んでいた。SiNP フラクシオン中では TGF-β1 が多く検知された。SiNP-100、-200 は他のサイズよりもより多く TGF-β1 を動員した (LH との培養)。2 時間培養の間、1 時間後にコロナ中の TGF-β1 含有量がピーク。Native PAGE で、SiNP は TGF-β1 の移動を遅らせることができた (TGF-β1 の SiNP 上への動員、安定化を示唆)。N-及び P-SiNP は TGF-β1 を動員しなかった (SiNP の負電位表面が動員促進)。</p> <p>④・上皮間葉転換 (ETM) 進行 A549 細胞は、PBS、TGF-β1 (5µg/mL)、SiNP-100 (50µg/mL)、TGF-β1/ SiNP-100、LH、又は LH/ SiNP-100 を用いて 48 時間刺激された。ETM は倒立位相差顕微鏡で評価。 ・創傷スクラッチアッセイ (ETM が細胞の増殖、移動を増加させる。その定量的評価に用いる。) ⇒SiNP-100 コロナ結合 TGF-β1 は肺上皮細胞中の ETM (肺線維化のキーステップ) を悪化させることを示唆。他のサイズの SiNP、N-及び P- SiNP は ETM 又は細胞移動を促進しなかった。</p> <p>⑤・RNA 分離と定量的リアルタイム PCR (A549 細胞及び肺組織の RNA は Trizol reagent を使用して抽出。PCR を用いて、mRNA 検知。)</p> <p>⑥・トランスフォーミング増殖因子-β1 (Transforming Growth Factor-β1: TGF-β1) インターナリゼーションアッセイ (TGF-β1 結合媒体で A549 洗浄後、A549 は媒体中で 30 分、4°C で培養) ・膜蛋白質抽出 (Western Blotting によって膜上の TGF-β1 の量を分析するため) 共沈アッセイ (SiNP 表面の TGF-β1 の生物反応性 (細胞上のレセプターと結合できる) の確認。沈殿物中の蛋白質を Western Blotting によって測定) ⇒SiNP が分解のため細胞質ゾル中へ内在化されることから TGF-β1 を防ぐことができた、と示唆された。</p> <p>⑦・免疫蛍光抗体染色法 (マウス中への F-SiNPs の気管内注入後 6 時間に肺組織採取) ・組織学的調査 (肺組織の繊維化の激しさ; ヘマトキシリンエオジン染色、マッソントリクローム染色) ・肺のヒドロキシプロリン含有量の定量 (ヒドロキシプロリンアッセイキット使用、コラーゲン含有量測定)</p>
結論	<p>本研究は、100nm サイズで SiNPs が肺中の蛋白質コロナ中に TGF-β1 を特に動員し豊富にすることができることを示す。SiNP コロナ結合 TGF-β1 は細胞レセプターと結合し肺線維化を引き起こす生物学的活性を保存しないだけでなく、細胞線維化を直接促進する TGF-β/Smad2 経路の緩慢な劣化と長期の活性化を示さない。所見は、近年広く感づかれている、ナノ粒子上のコロナが生物学的系における病理学的変化のような有害応答を引き起こす直接的な証拠を提供する。コロナ形成の制御を目的とした更なる研究は、珪肺症及びその他の関連疾患に対する有望な治療的アプローチを活気づけるかもしれない。</p>

No	SiO ₂ - 4
論文題目 (和訳)	Calcium signalling induced by <i>in vitro</i> exposure to silicium dioxide nanoparticles in rat pulmonary artery smooth muscle cells. (ラット肺動脈平滑筋細胞における二酸化珪素への <i>in vitro</i> ばく露によって誘発されたカルシウムシグナル伝達)
著者 所属機関	Dubes V ¹ , Parpaite T ¹ , Ducret T ¹ , Quignard JF ¹ , Mornet S ² , Reinhardt N ² , Baudrimont I ² , Dubois M ² , Freund-Michel V ² , Marthan R ³ , Muller B ² , Savineau JP ² , Courtois A ⁴ . 1 Université de Bordeaux, France; Inserm U1045, Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, France. 2 Université de Bordeaux, France; CNRS, ICMCB, France. 3 Université de Bordeaux, France; Inserm U1045, Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, France; Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux, Hôpital du Haut-Lévêque, Service d'Exploration Fonctionnelle Respiratoire, France. 4 Université de Bordeaux, France; Inserm U1045, Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, France; Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux, Centre AntiPoison et de Toxicovigilance d'Aquitaine et de Poitou Charente, France.
書誌事項	Toxicology. 2017 Jan 15;375:37-47. doi: 10.1016/j.tox.2016.12.002. Epub 2016 Dec 7.
試験物質	・15nm-SiO ₂ NPs (テトラエトキシシランを EtOH、水、アンモニアの溶液に投入し、室温で一晩反応させて合成後、精製ろ過して作製)。TEM 測定直径 = 15±2.5nm。DLS 測定粒度分布、多分散指数 = 24nm, 0.235。ζ 電位 = 約 -55mV (pH7.4)。 ・炭素 NP (一次直径 = 13-14nm)、入手先; Degussa (Germany) ・(TiO ₂) NP (一次直径 = 15nm)、入手先; Sigma Chemical Co. (St Quentin-Fallavier, France)
試料調整法	NP は、脱イオン水に 10 mg/mL 濃度で懸濁、使用前に超音波処理。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	・試験生物: 雄 Wisper ラット (200-300 g; Janvier Labs, Le Genest Saint-Isle, France) 第一群 (正常酸素ラット, n=6); 大気ばく露。 第二群 (低酸素ラット, n=10); 3 週間連続 (慢性) 低酸素ばく露。低酸素肺高血圧症 (Fulton 比 0.51 以上)。 新鮮な分離した肺動脈平滑筋細胞 (PASM) は酵素解離法を使用して、得た。 試験前に、細胞質カルシウム [Ca ²⁺] _i を蛍光イメージングで測定。 ・投与方法・期間及び試験用量: 増殖試験 (Ducret ら、2008 のように); 1-500 µg/mL、48 時間 (DNA 合成は、Cell Proliferation ELISA, BrdU colorimetric method を使用して評価)
試験結果	① NP への急性ばく露による細胞内カルシウムシグナルの活性化 (FURA-PE3 (カルシウム蛍光高感度プローブ) 負荷 PASM に 50µg/mL の各 NP を急性添加): 蛍光比 (F340/F380) ([Ca ²⁺] _i を意味する) を約 10 分間測定。NP 添加が [Ca ²⁺] _i を数秒以内に増加させた (ピーク応答し、その後減少)。Δ 比 (F340/F380) はどの NP でも増加したが、SiO ₂ NP で最も大幅増加。また、用量依存で増加。 ② 細胞外カルシウム源とカルシウム侵入経路 細胞外カルシウム源不在は SiO ₂ NP 誘発カルシウム応答の増幅を減少、カルシウム侵入チャンネルのうち電圧操作チャンネル関与に注目する。 ③ 細胞内カルシウム源 (筋小胞体成分の関与) タプシナルギン (小胞体膜状の Ca ²⁺ -ATPase (SERCA) 阻害剤) で前処理した PASM は、SiO ₂ NP 誘発 [Ca ²⁺] _i 上昇を阻害。 ④ 酸化ストレスの関与 SiO ₂ NP は酸化ストレスを誘発できるが、わずか。抗酸化剤 N-アセチルシスチンが SiO ₂ NP 誘発 [Ca ²⁺] _i 上昇を阻害した。
結論	NP が、細胞膜でカルシウムチャンネルの活性化を介したラット PASM におけるカルシウム応答及び CICR メカニズムを介したさらなるカルシウム増加を引き起す証拠を提供する。このカルシウム増加は、増殖応答と関係づけられた (図 8)。本研究はいくつかの課題を生じさせる。一つの疑問は、カルシウムシグナル伝達が、NP によるカルシウムチャンネルの直接的刺激を通して、または、膜電位の変更のような他のメカニズムを通して電圧開閉カルシウムチャンネルの間接的の結果として、起こるのかどうか、である。加えて、カルシウム応答での TRPV チャンネルの影響のための証拠を提供してさえも、この課題は更なる研究に値する。

NP にとっての細胞標的として TRP チャンネルと識別することを許すので、特に関心がある。この文脈で、TRPV4 チャンネルを過剰に発現することが知られている肺高血圧症に苦しむ動物における SiO₂ NP のより大きな影響の観察は、NP 及び一般的な粒子状物質の有害影響でのこれらのチャンネルの役割を、さらに問う。

No	SiO ₂ - 5
論文題目 (和訳)	Structural transition of kidney cystatin induced by silicon dioxide nanoparticles: An implication for renal diseases. (二酸化珪素ナノ粒子によって誘発された腎臓シスタチンの構造転移:腎疾患に対する影響)
著者 所属機関	Shamsi A ¹ , Ahmed A ¹ , Bano B ² . 1 Department of Biochemistry, Faculty of Life Sciences, Aligarh Muslim University, Aligarh 202002, India. 2 Department of Biochemistry, Faculty of Life Sciences, Aligarh Muslim University, Aligarh 202002, India. Electronic address: bbbano17@gmail.com.
書誌事項	Int J Biol Macromol. 2017 Jan;94 (Pt B) :754-761. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.10.019. Epub 2016 Oct 19.
試験物質	SiO ₂ ナノ粒子 (Cat.No.69294) (APS 15nm) 購入先: SRL (Mumbai, India)
試料調整法	リン酸ナトリウム緩衝液
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	・試験試料: バッフアロー腎臓シスタチン (BKC; バッフアロー腎臓から分離; 血清たんぱく質の一つ、ポリペプチド) ・投与方法・期間及び試験用量: 4, 8, 12, 16 μ M SiO ₂ NP を伴う 0.4 mg/mL (6 μ M) の BKC 標本を調製。アジ化ナトリウム (.20%) 添加後、37 $^{\circ}$ C、24 時間培養後、分光試験。 なお、下記⑧~⑩の試験生物等は、試験法で定まった生物を使用、下記。
試験結果	①固有蛍光測定 (標本: BKC+ SiO ₂ NP) : SiO ₂ NP が本来の BKC の蛍光強度より、減少。蛋白質の構造を歪めた。 ②UV 吸収分光分析 (本来の BKC、SiO ₂ NP と培養した BKC) : ① に一致。 ③ATR-FTIR 分光分析 (本来の BKC、SiO ₂ NP と培養した BKC) : 本来の BKC の構造変化を確認。 ④CD 測定: BKC+ SiO ₂ NP (12 μ M) は本来の BKC は α -ヘリカル成分が減少し、本来の BKC が構造を変化。 ⑤SEM 分析 (SiO ₂ NP と BKC との相互作用の可視化) : SiO ₂ NP が本来の BKC の構造を留め金 (clumped) 構造に変形。 ⑥TEM 分析 (SiO ₂ NP と BKC との相互作用パターンの洞察) : 穴部に SiO ₂ NP クラスター化。 ⑦等温滴定量測定 (ITC) : SiO ₂ NP と BKC との相互作用は発熱反応。 ⑧チオールプロテアーゼ阻害活性試験 (BKC と BKC と培養した SiO ₂ NP) : 抗パパイン (システインプロテアーゼ) 活性分析で、本来の BKC が最大の抗パパイン阻害を示し、16 μ M SiO ₂ NP で最大に減少。 ⑨MTT アッセイ (処理リンパ球における細胞生存率用: リンパ球サンプルは本来の BKC、BKC+ SiO ₂ NP (12 μ M 及び 16 μ M SiO ₂ NP) と 37 $^{\circ}$ C、5% CO ₂ で 24 時間培養) : コントロール群比較で、SiO ₂ NP のみ (12 μ M 及び 16 μ M)、本来の BKC では細胞生存率に影響を与えなかったが、BKC+ SiO ₂ NP (12 μ M 及び 16 μ M SiO ₂ NP) では生存率を下げた。本来の BKC が毒性構造に変化。 ⑩コメットアッセイ (健康非喫煙ボランティアから静脈せん刺によって得たヘパリン添加血液サンプルから分離したリンパ球は BKC+ SiO ₂ NP へばく露) 本来の BKC はリンパ球に及ぼす毒性影響は無いが、BKC+ SiO ₂ NP (12 μ M 及び 16 μ M SiO ₂ NP) は核 DNA 損傷を引き起こした。本来の BKC が毒性構造に変化。
結論	これらの試験は、SiO ₂ NP 培養 BKC の有毒な性質を明確に示した。SiO ₂ NP の存在で、BKC は有毒な非本来の BKC に構造転換され、細胞生存率の低下を引き起こした。有毒な非本来の BKC に構造は、前フィブリル集合体で、この構造の蛋白質は性質が毒性であるとして知られている。

No	SiO ₂ - 6
論文題目 (和訳)	Silica dioxide nanoparticles combined with cold exposure induce stronger systemic inflammatory response. (寒冷ばく露と複合された二酸化珪素ナノ粒子はより強い全身炎症反応を誘発する)
著者 所属機関	Zhang Y ¹ , Lin Y ¹ , Li X ¹ , Zhang L ¹ , Pan W ² , Zhu H ¹ , Xi Z ³ , Yang D ⁴ . 1 Tianjin Institute of Health and Environmental Medicine, No.1 DaLi Road, Tianjin, 300050, China. 2 Tianjin No. 254 Hospital, Tianjin, 300142, China. 3 Tianjin Institute of Health and Environmental Medicine, No.1 DaLi Road, Tianjin, 300050, China. 4 Tianjin Institute of Health and Environmental Medicine, No.1 DaLi Road, Tianjin, 300050, China. fengdyd@126.com.
書誌事項	Environ Sci Pollut Res Int. 2017 Jan;24 (1) :291-298. doi: 10.1007/s11356-016-7649-2. Epub 2016 Oct 6.
試験物質	SiO ₂ NPs (直径 > 40 nm)
試料調整法	リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に分散、50°C 以下で 6 時間超音波処理。その間、90 分に 1 回渦乱流装置で混合。SiO ₂ 濃度 = 3 mg/mL。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	・試験生物: 特定病原体フリー雄 Sprague-Dawley ラット (8-10 週齢、230-250 g 体重)。入手先; Tianjin Institute of Health and Environmental Medicine (Tianjin, China) 及び認定済み自施設。 ・投与方法・期間及び試験用量: 1 回の気管内注入 (5mg/kg 体重)、投与後 28 日後に殺処分。寒気ばく露は 4°C、4 時間/日 (8:30-12:30)。複合ばく露は両方の組合せ。関心の臓器取り出し (副睾丸白色脂肪組織 (eWAT)、肩甲骨間褐色脂肪組織 (iBAT)、肺、全血)。
試験結果	①肺の組織病理学 (E&H 染色): 全肺域に位置する肺構造の組織病理学的変化の発症。複合ばく露後は、肺胞が変形し、つぶれてさえた。加えて、SiO ₂ NPs 又は寒気へばく露後、炎症細胞浸潤が主に観察された。 ②定量リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (qRT-PCR) (標的組織中の関心の遺伝子の相対 mRNA レベルを定量)、③血清分析 (腹部大動脈から血液採取。血清の生化学パラメーター; IL-6、IL-8、IL-10、TNF-α レベルを含む): <WAT 中> IL-6 の mRNA レベルは SiO ₂ NPs ばく露でアップレギュレート、複合ばく露でさらに増した。炎症性促進サイトカイン遺伝子 IL-6、IL-8、TNF-α、IL-1β の発現が SiO ₂ NPs ばく露、複合ばく露群で有意に増加 (コントロール群比較)。寒気ばく露群で、IL-6、TNF-α、IL-1β の発現がアップレギュレートの傾向、IL-8 の発現がダウンレギュレート、IL-10 の発現は有意にアップレギュレート。IL-10 の発現は、SiO ₂ NPs ばく露と複合ばく露で有意にダウンレギュレート (コントロール群比較)。 <BAT 中> IL-6、IL-8、TNF-α、IL-1β の mRNA レベルが SiO ₂ NPs ばく露でアップレギュレート、特に複合ばく露で。寒気群でもアップレギュレート傾向。IL-10 の mRNA 発現は SiO ₂ NPs ばく露で増加、寒気ばく露で減少した。 <血清> IL-8、TNF-α の蛋白質存在量は他群に比べ、複合ばく露群で有意に増加した。IL-8 に及ぼす SiO ₂ NPs、寒気の影響は有意で、相乗効果あり。TNF-α に及ぼす SiO ₂ NPs の主影響は有意、寒気は有意でなかった。両者の相互作用はなかった。IL-6 のレベルは SiO ₂ NPs、複合で増加傾向、複合でより明確。抗炎症性サイトカイン IL-10 の発現は、他群に比べ、寒気群で増加傾向だった。
結論	本研究の結果は、SiO ₂ NP が、肺を通して吸入された場合、炎症応答を引き起こすことを明確に示した。SiO ₂ NP と寒気は一緒に、炎症促進サイトカインのアップレギュレートによる白/褐色脂肪組織における肺可塑性及び代謝に影響を与えた。それ故、人間も同様の応答を示すと推測する。所見は、煙霧と冬条件の組み合わせの潜在的健康リスクをさらに理解することに貢献していく。

No	SiO ₂ -7
論文題目 (和訳)	Altered microRNA expression profiles in lung damage induced by nanosized SiO ₂ . (ナノシリカによって誘発された肺損傷における変化したマイクロ RNA 発現プロファイル)
著者 所属機関	Yang H ¹ , Zhang Y ¹ , Li W ¹ , Lao C ¹ , Li M ¹ , Zheng Y ¹ . 1 Key Laboratory of Environmental Medicine Engineering, Ministry of Education, School of Public Health, Southeast University, Nanjing, China.
書誌事項	Bioengineered. 2017 Jan 2;8(1):45-54. Epub 2016 Sep 30.
試験物質	・ナノ SiO ₂ : 表面積 = 640 ± 50 m ² /g. 純度 = 99.5%、水酸基含有量 = 45%. 提供先; Zhejiang Hongsheng Material Technology Co., Ltd. (Zhejiang, China). ・マイクロ SiO ₂ : 80% が直径 1–5 μm. 入手先; Sigma-Aldrich (cat. no. 5631, USA)
試料調整法	生理活性食塩水中に懸濁。気管内注入前に 15 分間超音波で懸濁液を分散。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	・試験生物: 特定病原体フリー雄健康 Sprague Dawley ラット。重量 180–220 g、7 週齢。 購入先; Shanghai Laboratory Animal Research Center (Shanghai, China) ・投与方法・ 期間及び試験用量: 生理活性食塩水の 1mL 懸濁液 (6.25, 12.5, 25 mg/mL ナノ SiO ₂ 及び 25 mg/mL のマ イクロ SiO ₂ 粒子濃度) を気管内注入。ばく露後 7、15、30、60、90 日に殺処分。肺組織除 去。肺組織の総 RNA 抽出 (TRIzol® Regent (Invitrogen, USA) を用いて)。 総 RNA の量と質は、Nanodrop2000 Micro-spectrophotometer (Thermo Scientific, USA) で検出。各サンプル中の RNA integrity はアガロースゲル電気泳動によって測定。
試験結果	①miRNA 配列解析: コントロール群と比較して、6.25、12.5、25 mg/mL ナノ SiO ₂ 及び 25 mg/ml マイクロ SiO ₂ 群、それぞれで、miRNA のアップレギュレートされた発現の数は 395、314、278、 241、及びダウンレギュレートされた発現の数は 127、167、135、412 だった。ナノサイズ SiO ₂ によって引き起こされた初期の段階 (7、15、30 日目) での肺損傷の共通に変動されて 発現された miRNAs は、それぞれ、アップレギュレートされた rno-miR-208 と rno-miR-212 で、後期段階 (60、90 日目) での肺損傷の共通に変動されて発現された miRNAs は、アップレギュレートされた rno-miR-18a だった。 rno-miR-208、rno-miR-212、rno-miR-18a は異なる表現であったことを示した。 rno-miR-208、rno-miR-212、rno-miR-18a がナノサイズ SiO ₂ によって引き起こされるラ ットの肺損傷過程に関与するかどうかを探索するためにさらなる研究が必要である。 ②リアルタイム定量 PCR 解析: 結果は、テスト群における rno-miR-208、rno-miR-212、rno-miR-18a の発現レベルが (表 4) のコントロール群のそれらより有意に高いことを確認した。 ③標的遺伝子予測と変動して発現された miRNA の解析: 予測結果は、rno-miR-208、rno-miR-212、rno-miR-18a の標的遺伝子の量が、それぞ れ、146、310、184 であることを示した。 ④蛋白質解離と western blotting: 標的遺伝子の分析と文献レポートは、rno-miR-208 及び rno-miR-212 が、それぞれ、炎 症シグナル伝達経路の調節に関与するそれらの標的遺伝子 PDCD4、LIN28B に作用 することを示した。rno-miR-18a は、組織線維化の形成に関与するそのターゲット遺伝子 CTGF に作用した。リアルタイム定量 PCR および Western blotting テストは、正常な生理 食塩水群と比較された、ラット肺組織における、SiO ₂ へのばく露後 7 日での PDCD4、 LIN28B mRNA 及び蛋白質、とナノサイズ SiO ₂ へのばく露後 60 日での CTGF mRNA 及び蛋白質のレベルを検出した。
結論	この研究は、ナノサイズ SiO ₂ によって引き起こされたラットの肺損傷の miRNA 発現プロフ ァイルを初めて記述した。ナノサイズ SiO ₂ によって起こされた初期段階の肺損傷の共通に変 動して発現された microRNAs は、それぞれ miR-208 と miR-212 であり、後期段階では miR-18a だった。行われた標的遺伝子予測と KEGG 経路は、変動して発現された miRNAs が肺の形成不全、MAPK と TGF-β のシグナル経路を調節することを示唆した。 PDCD4、LIN28B、および CTGF のそれらの標的遺伝子は、ナノサイズ SiO ₂ によって引き 起こされたラットの肺損傷の調節の標的遺伝子の翻訳レベルにおいて機能した。miRNA プ ロファイル、標的遺伝子とナノサイズ SiO ₂ によって引き起こされたラットの肺損傷の病因論の 間の関係の全体の理解を得るために、追加的 <i>in vitro</i> 調査が行われることが必要である。

No	SiO ₂ - 8
論文題目 (和訳)	The Effects of Silica Nanoparticles on Apoptosis and Autophagy of Glioblastoma Cell Lines 神経膠芽腫細胞株のオートファジーとアポトーシスに及ぼすシリカナノ粒子の影響
著者 所属機関	Rafał Krętowski ^{1,*} , ID, Magdalena Kusaczuk ¹ , Monika Naumowicz ² , Joanna Kotyńska ² , Beata Szynaka ³ and Marzanna Cechowska-Pasko ¹ 1 Department of Pharmaceutical Biochemistry, Medical University of Białystok, Mickiewiczza 2A, 15-222 Białystok, Poland; mkusaczuk@wp.pl (M.K.); mapasko@gmail.com (M.C.-P.) 2 Institute of Chemistry, University of Białystok, K. Ciołkowskiego 1K, 15-245 Białystok, Poland; monikan@uwb.edu.pl (M.N.); joannak@uwb.edu.pl (J.K.) 3 Department of Histology and Embryology, Medical University of Białystok, Waszyngtona 13, 15-269 Białystok, Poland; beataszynaka@gmail.com * Correspondence: r.kretowski@umb.edu.pl; Tel.: +48-85-748-56-39; Fax: +48-85-748-56-91
書誌事項	Nanomaterials 2017, 7, 230; doi: 10.3390/nano7080230
試験物質	ヒュームド二酸化珪素アモルファスパウダー(7nm)、二酸化珪素球状多孔質ナノパウダー(5-15nm)、二酸化珪素ナノパウダー(10-20nm):Sigma (St. Louis, MO, USA)のよって提供。
試料調整法	超音波処理で脱イオン水中に分散
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	試験生物: ・LBC3 細胞株(外科的腫瘍切除を受けた56歳女性患者から採取した神経膠芽腫多形性組織から育成):Prof. Cezary Marcinkiewicz (Department of Neuroscience, Temple University, Philadelphia, PA, USA)が贈呈。 ・LN-18 とヒト皮膚線維芽細胞 (CRL1474) 細胞株:American Type Culture Collection (ATCC)が提供。 投与方法・期間・試験用量: 12.5~1000g/mLの範囲濃度でSiNPsを含むDMEM中で24、48h培養。
試験結果	・細胞生存率(MTTアッセイで測定): すべてのサイズのSiNPsがLBC3、LN-18細胞株の両方において細胞生存率の時間依存、用量依存低下を誘発したことが示された。細胞生存率の低下は、SiNPsのサイズに依存していた。LBC3とLN-18細胞における細胞生存率の低下は、使用されたSiNPsサイズ全部で24時間後に観察された。SiNPsの高濃度で処理された細胞において、細胞生存率に及ぼす影響は、LBC3細胞の場合著しくより顕著であった一方、LN-18細胞の生存率ははるかに大きかった。SiNPsと培養された細胞において、培養時間の48hまでの延長は、生LN-18細胞と比較して生LBC3細胞の数の強い減少を結果としてつながった。最も高い細胞毒性は、LBC3とLN-18の両細胞において、中サイズSiNPs(5-15nm)で処理された細胞の場合に観察された。強力な細胞毒性影響は、LBC3細胞において5-15nm SiNPsと培養された両時点後に観察された。LN-18及びLBC3細胞と対照的に、12.5から1000g/mL濃度で5-15nm SiNPsを使用して、正常な皮膚線維芽細胞の生存率の弱い、用量依存性の低減だけを観察した(図1G)。 ・ゼータ電位に及ぼす分散媒体の影響: すべての粒子にとって、大きいサイズ領域中のピークは、粒子の凝集を表している。DLS法で測定されたSiNPsのサイズは、脱イオン水および10%FBSのDMEMの両方で、元のサイズよりも大きく、ファンデルワールス力と媒体との疎水性相互作用の両方に拠るかもしれない。 ・アポトーシスと壊死(ネクローシス)(flow cytometry on FACSCanto II (BD, San Diego, CA, USA)で評価): 50と100g/mLの5-15nm SiNPsで処理された細胞において24時間培養後に、アポトーシス細胞の割合はコントロール細胞と比較して有意に高かった。 LBC3細胞の壊死の用量依存性だが時間依存でない増加が観察された。 LBC3細胞と対照的に、LN-18細胞のアポトーシスに対するSiNPsの影響は見られなかった。LN-18細胞のアポトーシスの割合は、培養時間と、SiNPsの用量と独立して変化しなかった。アポトーシスとは対照的に、LN-18細胞の壊死に及ぼすSiNPsの強い時間と用量依存的影響を観察した(図4D、F)。 50g/mLの5-15nm SiNPsと24h、DMEM中で培養された培地の場合、壊死細胞の割合の変化は観察されなかった。100g/mLのSiNPsと培養された細胞において、コントロール細胞と比較して壊死の顕著な増加が観察された。両方の濃度の5-15nm SiNPsとのLN

	<p>-18 細胞の培養 48h 後、コントロールと比較して、壊死の上昇に気づいた。</p> <p>・細胞内 ROS 産生: 20,70-ジクロロフルオレッセン (DCF) の蛍光性は細胞内の ROS 産生の増加によって強化され、培養時間と SiNPs の濃度に依存していた。50 又は 100g/mL の 5-15 nm SiNPs との LBC3 細胞の 24h 培養後、細胞内の ROS 産生は未処理の細胞と比較して約 2 倍高かった。未処理のコントロールと比較して、48 h 後、50g/mL の 5-15 nm SiNPs と培養された LBC3 細胞における約 2 倍高い ROS 産生、100g/mL で処理された細胞の場合 3 倍高い結果に結び付いた (図 4A)。</p> <p>・ミトコンドリア膜電位の変化: LBC3 細胞におけるミトコンドリア膜電位 (DYm) の用量依存低下を観察した。48h 培養だけでなく 24 h 後、DYm の大きな損失が観察された。コントロール細胞と比較して、50 g/mL の SiNPs で処理された細胞は、DYm の約 10 倍低下を示し、100g/mL の SiNPs で培養された細胞は、DYm のほぼ 11 倍低下を示した。</p> <p>・カスパーゼ-9 活性: LBC3 細胞において、未処理細胞と比較して、SiNPs の両方の濃度に対して、48h 後、カスパーゼ-9 活性の 2 倍の上昇を観察した。</p> <p>・アポトーシス促進遺伝子発現: LBC3 細胞において、Bax、Bim、Noxa、Puma 遺伝子の mRNA レベルが 5-15 nm SiNPs と培養された細胞において用量及び時間依存的に上向き調節された。</p> <p>・LBC3 細胞の形態変化: 24h、5-15 nm SiNPs へばく露された LBC3 細胞において、マトリックス中の巣状増白、ミトコンドリア膜変形、ミトコンドリア膨潤、クリステ (鶏冠《ミトコンドリアの内側の薄膜などにある隆起部分》) 破裂のようなミトコンドリアの構造の破壊に気づいた (図 5C、赤矢印)。 それを除いて、図 5 B に示されたように、細胞の部分が、フリーなまたは細胞質中で膜結合凝集体として小さな電子密度の高い物質 (SiNPs) で構成されている (図 5B、黄色矢印)。 48 h、5-15 nm SiNPs へばく露された LBC3 細胞の変化は、24h、SiNPs と培養された細胞で観察されたそれと類似していた。いくつかの変更が、48 h 後により判定された。ミトコンドリアにおける変化は、変更されたサイズ、形状およびミトコンドリア膜への損傷を持つ巣状浮腫、ミトコンドリアの膨潤とクリステ破裂から成っている (図 5B、赤矢印)。また、細胞質に分散させた多くの SiNPs を観察した (図 5E、黄色矢印)。</p> <p>・オートファジーマーカーの発現 (LBC3 細胞におけるオートファジーのマーカー Light Chain 3 (LC3-I and LC3-II) の発現の Western blot 分析): 50 と 100g/mL の SiNPs と 24 および 48 h 培養された細胞は、LC3-II 型の発現を示したが、LC3-I 型は弱い発現しか発現を示さなかった。また、コントロール (レーン: 1, 4) と比較して、24、48 h 後、膜結合 LC3-II 型、(ホスファチジルエタノールアミン共役型) の発現は、50g/mL (レーン: 2, 5) 及び 100g/mL (レーン: 3, 6) の SiNPs と培養された細胞において増加されたことが観察された。 SiNPs の両方の濃度で培養された細胞において LC3-II/LC3-I 比の時間と用量依存の増加に気づいた。 Atg5 の転写は、LBC3 細胞において大幅に時間と用量依存的で上向き調節された (図 6C)。したがって、LC3-II/LC3-I 比増加と Atg5 遺伝子発現の上向き調節との共存に気づき、SiNPs 処理を施された細胞におけるオートファジーの発生を確認した。</p> <p>・酸性小胞細胞内小器官 (オルガネラ) の形成 (オートファジーは、AVOs (酸性小胞細胞器) の形成によってキャラクタライズ): LBC3 細胞の細胞質中の AVOs 形成の時間と用量依存 (48h 培養後にのみ) の増加を観察した。 培養 24 時間後、コントロール細胞と比較して、AVOs-陽性細胞の割合が 50 g/mL と 100 g/mL SiNPs で処理された LBC3 細胞において、約 4 倍高かった。48 h までの培養時間の長は、コントロール細胞と比較して、50 g/mL の SiNPs で処理された時 6 倍高い割合の AVOs-陽性 LBC3 細胞、100 g/mL の SiNPs で処理された時 7 倍高い割合の AVOs-陽性 LBC3 細胞に結果としてつながった。</p>
結論	<p>結論としては、我々の結果は、SiNPs が神経膠芽腫 LBC3 において細胞毒性を引き起こすことができるが、ヒト皮膚線維芽細胞ではできないことを示唆する。興味深いことに、LBC3 細胞においてオートファジーの共存を観察した一方、LN-18 において壊死だけに気づいた。SiNPs 処理は、LBC3 細胞における酸化ストレスと MMP の損失に結果としてつながった。さらに、アポトーシス促進性遺伝子: Bim, Bax, Puma, Noxa の上向き調節とカスパーゼ-9 の活性の増加が LBC3 神経膠腫細胞において観察された。これらの結果は、アポトーシスのミトコンドリア依存経路が SiNPs 介在の LBC3 細胞死に関与していることを示しているかもしれない (図 7)。</p> <p>SiNPs についての大量の情報が既に利用できるが、まだ集中的な調査の主題ではない。我々の調査結果は、SiNPs が細胞タイプ固有の方法で作用でき、それらのばく露への応</p>

答において変化し易く複雑な機構を開始することができることを示す。したがって、総合的に神経膠芽腫多形性療法のための潜在的な治療剤として成功理にそれを使用するに、SiNPs 処理によって活性化された分子機構を包括的に明らかにすることは価値がある。

No	SiO ₂ - 9
論文題目 (和訳)	Cytotoxic Effect of Nano-SiO ₂ in Human Breast Cancer Cells <i>via</i> Modulation of EGFR Signaling Cascades (ヒト乳癌細胞におけるEGFRシグナリングカスケードの調節によるNano-SiO ₂ の細胞毒性)
著者 所属機関	DONGHWAN JEON ¹ , HYUNGJOO KIM ¹ , KEESOO NAM ¹ , SUNHWA OH ¹ , SEOG-HO SON ¹ and INCHEOL SHIN ^{1,2} 1) Department of Life Science, 2) Natural Science Institute, Hanyang University, Seoul, Republic of Korea
書誌事項	ANTICANCER RESEARCH 37: 6189-6197 (2017)
試験物質	シリカナノ粒子 (Nano-SiO ₂) (Kisker-biotech) : 直径 30nm
試料調整法	ナノ粒子の調整: ストック溶液を、60kHzで20分間超音波処理した後、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中の粒子を 5mg/ml に希釈することで作製。使用直前に、原液を同じ条件下で超音波処理。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	<p>試験生物: ヒト乳癌細胞株 MDA-MB-231、Hs578T (American Type Culture Collection)</p> <p>抗体: リン-表皮成長因子受容体 (p-EGFR) に特異的な抗体、カスパーゼ-3、ポリ ADP リボースポリメラーゼ (PARP)、リン酸シグナルトランスデュサーおよび転写 3 の活性化因子 (p-STAT3) (Y705)、p-STAT3 (S727)、リン-焦点接着キナーゼ (p-FAK)、FAK、燐光体-細胞肉腫キナーゼ (p-SRC)、SRC (Cell Signaling Technology); β-チューブリン (H-235)、サイクリン D1 (A-12)、サイクリン B1 (D-11)、p27 (C-19)、フィブロネクチン (A-11)、スルビビリン (D-8)、STAT3 (H-190) に対する抗体 (Santa Cruz Biotechnology); EGFR 検出用抗体 (Abcam)。</p> <p>細胞培養: 10%ウシ胎仔血清 (FBS)、100U/ml ペニシリン、100mg/ml スレプトマイシンを補充したダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) に、37°Cの加湿空気中で 5%CO₂ を補充したインキュベーター中で細胞を維持。</p> <p>ナノ-SiO₂ へのばく露: 原液と通常培地混合物を用いてナノ-SiO₂ に個々にばく露し、混合物を処理直前に調製。等量の PBS 溶液と混合した培地を陰性対照として使用。</p> <p>細胞増殖アッセイ: 細胞をウェル細胞培養プレート中に 2×10⁴ 細胞/ウェルで播種。24 時間後、最終濃度 100µg/ml でナノ-SiO₂ を添加。24 時間毎に 4 日間、細胞数を血球計数器で 3 回計数。</p> <p>二次元コロニー形成アッセイ: 細胞をウェル細胞培養プレート中に 100 細胞/ウェルで播種。最終濃度 100µg/ml で細胞播種の 3 日後にナノ-SiO₂ を添加。5 日後、細胞をクリスタルバイオレットで 30 分間染色。PBS で洗浄後、光学顕微鏡下でコロニー数を計測。実験は 3 回実施。</p> <p>MTT アッセイ: 細胞生存率を、3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムプロモイト (MTT) チアゾリウムアッセイを用いて測定。</p> <p>トキシロピシン処理: 細胞処理前に、トキシロピシンを DMSO 中に 10mM 濃度で最初に溶解、トキシロピシンのストック溶液を希釈、最終濃度 10,50,100,500,1000nM でナノ-SiO₂ 100 又は 200µg/ml で細胞に添加。24 時間後、細胞生存率を MTT アッセイで測定。</p> <p>フローサイトメリーによる細胞周期分析: 最終濃度 100µg/ml ナノ SiO₂ に 24 時間ばく露後、細胞を氷冷マナール中で -20°C で 3 時間固定。固定細胞を、1mg/ml RNase 含有 PBS 中の 50µg/ml ヨウ化プロピジウム (PI) 中で 30 分間培養。細胞周期分析は、FACScan フローサイトメーターを用いて実施。データは Cell Quest ソフトウェアを用いて分析。少なくとも 3 回実施。</p> <p>細胞接着アッセイ: 細胞を、ナノ-SiO₂ 100µg/ml 含有ウェル細胞培養プレートに 5×10⁵ 細胞/ウェルで播種。3 時間後、未接着細胞を洗い流し、付着細胞数を血球計数器で推定。少なくとも 3 回繰返し実施。</p> <p>創傷治癒アッセイ: 播種前に、細胞をナノ-SiO₂ 100µg/ml に 24 時間ばく露。SiO₂ 処理細胞を採取、ウェル細胞培養プレートに 4×10⁵ 細胞/ウェルで再播種、24 時間培養。無血清培地中でさらに 24 時間培養後、培養プレートをピペットチップで擦って創傷領域を生成、顕微鏡下で創傷閉鎖を観察。創傷治癒率 (%) は、以下の式を用いて算出; [(0 時間の創傷領域の幅 - x 時間の創傷領域の幅) / 0 時間の創傷領域の幅] × 100、x = 24, 48, 72。</p> <p>トランスウェルの走査・浸潤アッセイ: 細胞をナノ-SiO₂ 100µg/ml に 24 時間ばく露後、細胞を無血清培地に懸濁、8µm 孔サイズのトランスウェルチャンバーに播種。無血清培地中細胞を、1×10⁴ 個細胞/チャンバーで上部チャンバーに移し、下部チャンバーを血清含有培地で満たした。18 時間後、ポリカーボネート膜底面の細胞をクリスタルバイオレットで染色、光学顕微鏡を用いて細胞数を計</p>

	<p>算。マトリゲル充填上部チャンバーを用いて同じ方法で細胞浸潤アッセイを実施。</p> <p>ウェスタンブロット分析: ナノ-SiO₂ 100µg/ml に 24 時間ばく露した細胞を溶解緩衝液に溶解。溶解物を SDS サンプル緩衝液で煮沸、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動ゲル上で分離、ニトロセルロース膜上にブロット。スキムミルクで 1 時間ブロッキング後、膜を適切な一次抗体とともに培養。18 時間後、それらを西洋ワサビペロオキシダーゼ結合二次抗体とともにさらに培養。タンパク質バンドを、Dyne ECL STAR ウェスタンブロット検出キットで視覚化。</p> <p>ゲフィチニブ処理: 細胞処理前に、ゲフィチニブのストック溶液を、最初に DMSO に 10µM で溶解することで作製。ストック溶液を最終濃度 10nM で細胞培養培地でさらに希釈、乳癌細胞に添加。等量の DMSO と混合した培地を陰性対照として用いた。</p> <p>定量的リアルタイムポリマーゼ連鎖反応 (qPCR): ナノ-SiO₂ 100µg/ml に 24 時間ばく露後、Trizol 試薬を用いて RNA を細胞から単離。Thermal Cycler Dice で SYBR FAST qPCR キット (KAPA) を用いて、定量的リアルタイム PCR を実施。グリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) を用いて C(t) 値を標準化。プライマー: GAPDH: forward: 5'-TCA GTG GTG GAC CTG ACC TGA CC-3', reverse: 5'-TGC TGT AGC CAA ATT CGT TGT CAT ACC-3'; fibronectin: forward: 5'-GTT GTT ACC GTG GGC AAC TCT GTC-3', reverse: 5'-AAA GCC TAA GCA CTG GCA CAA CAG-3'; survivin: forward: 5'-CTT GGA GGG CTG CGC CTG CAC CC-3', reverse: 5'-CTG GCT CCC AGC CTT CCA GCT CCT TG-3'; FAK: forward: 5'-ATG GCA GCT GCT TAC CTT GAC CCC A-3', reverse: 5'-TGC ATT GCC CCG CAT CTC CCA-3'。</p> <p>共有結合架橋: 細胞をナノ-SiO₂ 100µg/ml に 24 時間ばく露後、1mM ビス(スルホスクシンイミド) スペレート (BS3) 架橋試薬を 4°C で 30 分間添加。架橋反応は、10mM トリス (pH 7.5) 処理によって 5 分間で終了。二量体化 EGFR の検出を、EGFR に対する抗体を用いたウェスタンブロットによってモニター。</p>
<p>試験結果</p>	<ul style="list-style-type: none"> ・ナノ-SiO₂ は、乳癌細胞に対して細胞毒性作用を有する。人乳癌細胞株の増殖測定 (図 1A) により、細胞増殖はナノ-SiO₂ へのばく露で有意に減少した。形成されたコロニー数は、対照細胞と比較して SiO₂ 処理後に有意に減少した (図 1B)。MTT アッセイでは、ナノ-SiO₂ 50µg/ml 以上の濃度に 24 時間ばく露で、両細胞株で細胞生存率がわずかに低下した (図 1C)。処理後 48 時間に、ナノ-SiO₂ の全濃度の MDA-MB-231 と、100µg/ml を超える濃度の Hs578T 細胞で、細胞生存率が有意に低下した。乳癌細胞に対する抗癌剤ドキシルピシンとナノ粒子の併用効果のモニターでは、ナノ-SiO₂ の共処理により、ドキシルピシン毒性が付加的に増加した (図 1D)。しかし、1000nM のドキシルピシン処理 Hs578T 細胞を除くと、SiO₂ 濃度を 100µg/ml から 200µg/ml の 2 倍に増加させても、細胞生存率の有意なさらなる低下はなかった。 ・ナノ-SiO₂ は、細胞周期分布を変化させ、乳癌細胞のアポトーシスを誘導する。細胞周期プロファイルの分析から、ナノ-SiO₂ ばく露癌細胞におけるサブ G1 画分の有意な増加があり、ナノ-SiO₂ 活性化アポトーシスシグナルが示された (図 2A)。乳癌細胞をナノ-SiO₂ ばく露後の関連タンパク質量の測定では、PARP およびカスパーゼ-3 の切断型が増加し、サイクリン D1、サイクリン B1 およびサバヒンの量がナノ-SiO₂ 処理で有意に減少したが、p27 レベルは変化しないことを見出し、ナノ-SiO₂ が乳癌細胞のアポトーシスの誘導を介して癌細胞の生存率を低下させることを示した (図 2B)。 ・ナノ-SiO₂ は、癌細胞の接着・移動を妨げる。細胞接着アッセイから、ナノ-SiO₂ 処理が乳癌細胞の細胞培養プレート表面への接着を妨害することを見出した (図 3A)。創傷治癒率の観察から、癌細胞はナノ-SiO₂ へのばく露により、細胞運動性が著しく損なわれた (図 3B)。癌細胞の移動・湿潤能はナノ-SiO₂ により妨害された (図 3C・D)。 ・ナノ-SiO₂ は、EGFR シグナル伝達カスケードの調節を介して癌細胞の細胞毒性を発揮する。EGFR シグナル伝達影響を調べたところ、全 EGFR の変化を伴わずに、ナノ-SiO₂ ばく露後に EGFR のリン酸化が減少すること、c-SRC のリン酸化が減少し、続いて STAT3 リン酸化が減少することを見出した (図 4A)。サイクリン B1、サイクリン D およびサバヒンを含む STAT3 標的の抑制も確認した。フィブロネクチンおよび FAK、ならびにリン酸化された FAK の総量が有意に減少した。SiO₂ 処理癌細胞の転写レベルの調査から、FAK、フィブロネクチンおよびサバヒン発現の下方調節がナノ粒子へのばく露により誘導されることを見出した (図 4B)。ゲフィチニブ処理後の分子パターンでも同様の変化を見出した (図 4A)。ナノ-SiO₂ ばく露による EGFR 二量体の形成破壊を調べたところ、両癌細胞株において、二量体 EGFR 量がナノ-SiO₂ へのばく露で有意に減少し、ナノ-SiO₂ が EGFR 二量体化を妨げることを示した (図 4C)。
<p>結論</p>	<p>MDA-MB-231 と Hs578T の 2 つの乳がん細胞株を用いて毒性と可能性のある分子機構を調べるために、いくつかの試験を行った。ナノ SiO₂ 処理は、乳癌細胞株の増殖を抑制し</p>

た。アポトーシスも増加し、細胞運動性も低下した。さらに、ナノ SiO₂ へのばく露は、表皮成長因子受容体(EGFR)の二量体化、続いて下流の細胞肉腫キナーゼ(c-SRC)およびシグナルトランスデュサーおよび転写 3 の活性化因子(STAT3)シグナル伝達カスケードの下方調節を著しく妨げた。ナノ-SiO₂ は、EGFR シグナル伝達カスケードの調節を介して、MDA-MB-231 および Hs578T 乳癌細胞に細胞毒性効果を有する。

(6) ZnO

No	ZnO-1
論文題目 (和訳)	Comparative Proteomic Analysis of Rat Bronchoalveolar Lavage Fluid after Exposure to Zinc Oxide Nanoparticles. (酸化亜鉛ナノ粒子ばく露後の、ラット気管支肺胞洗浄液の比較プロテオーム分析)
著者 所属機関	Yu-Min Juang ¹ , Han-Ju Chien ¹ , Cheng-Yu Yang ¹ , Hsiao-Chien Yeh ¹ , Tsun-Jen Cheng ² , and Chien-Chen Lai ^{1,3,4} 1) Institute of Molecular Biology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, 2) Institute of Occupational Medicine and Industrial Hygiene, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, 3) Graduate Institute of Chinese Medical Science, China Medical University, Taichung, Taiwan, 4) Rong Hsing Research Center for Translational Medicine, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan
書誌事項	Mass Spectrom (Tokyo). 2017; doi: 10.5702/massspectrometry.S0066.
試験物質	酸化亜鉛ナノ粒子 (ZnO NPs) (以下、粒子サイズと濃度は、GRIMM SMPS+C (逐次の移動性粒子寸法測定器とカウンター、モデル5.403で測定。) 粒度 (高用量35nmの場合) ~ 35nm、直径: 35.6nm (中央値)、表面積: $1 \times 10^5 \text{ mm}^2/\text{m}^3$ (幾何標準偏差 2.0)。
試料調整法	亜鉛粉末をろつぽに入れて、蒸発した亜鉛を窒素+酸素気流中で酸化して製造 (蒸発凝縮法)。ばく露室に入る手前でろ過空気と混合して所定の粒子数濃度に調整。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	【試験生物】オスSDラット、7週齢、体重285-302g。これらは、ばく露群 (N=6) と対照群 (N=6) に分割。ばく露群: 高用量35nmのZnO NPsに吸入ばく露、対照群: 空気にはばく露、ばく露濃度: 質量濃度12.1mg/m ³ ; 数濃度 7.9×10^6 粒子/cm ³ 。ばく露: 午前8時~午後2時。 【採取試料】BALF、【測定項目】たんぱく質濃度、【測定法】ブラッドフォード法 【タンパク質スポット分析】採取したBALFは次の要領でタンパク質スポット分析を行った。 ・分析対象: 4匹のコントロールと6匹のばく露ラットからの2つのプールされたBALF。 ・サンプルの処理: 180μlの固定pH勾配 (immobilized pH gradient IPG) 緩衝液で希釈後、室温で1時間放置 (200μg)。 ・対象サンプル: スポット強度に有意な増加あるいは、減少が認められたタンパク質。 【ゲルの消化】本研究で用いられたゲルは、1.5倍以上または0.66倍以下の変化を示したタンパク質スポットを対象に、25mM重炭酸アンモニウム緩衝液 (pH 8.0) で消化後、ペプチドをゲル溶出溶液 (5.0% TFA中の50% CAN) の上澄みから抽出。その後、真空乾燥して、ナノ噴霧液体クロマトグラフィタンデム型質量分析 (ナノLC/MS/MS) に供試。
試験結果	・タンパク質スポット1-22は、1.61~24.82倍に増加していたタンパク質であった。一方、タンパク質スポット23-31は0.56~0.32倍に減少していたタンパク質であった。(図2) ・これらの特定されたタンパク質の間で、11だけはゲル・ベースのアプローチとLCベースの双方の方法によって検出された。この結果は、異常制御されたタンパク質同定のための、双方の方法を取り込んだ統合したアプローチの必要性を示す。 ・細胞成分領域のタンパク質のほとんどは細胞外領域 (72%) に分泌された (図3A)。生物学のプロセス領域のタンパク質のほとんどは刺激 (43%)、炎症反応 (17%)、酸化ストレス (15%) に対する応答または免疫応答 (10%) 関係していた (図3B)。 ・分子機能領域のタンパク質のほとんどが結合 (35%)、触媒活性 (23%)、酵素阻害剤活性 (16%)、酸化還元酵素活性 (9%)、抗酸化剤活性 (7%) で役割を果たしていた (図3C)。 ・これらの結果は、最も差別的に表現されたタンパク質は細胞外領域にあって、刺激へ応答に関係していたとする我々の先行研究の結果と整合している。 ・興味深いことに、ZnO NPsばく露の後ラットBALF中で増加したタンパク質の多くは、炎症関連のタンパク質と免疫応答関連のタンパク質であった。前者には、α-1-抗-蛋白質分解酵素 (スポット1)、ムリノグロブリン-1 (スポット5)、complement C3 (spot 6)、血清トランスフェリン (スポット9)、タンパク質deglycase DJ-1 (スポット15)、α-2-HS-糖蛋白 (スポット18と20) とC反応性蛋白 (スポット19) が含まれる。後者には、肺表面活性物質関連のタンパク質D (SPD、スポット3)、BPIフォールドを含む族Aメンバー1 (スポット8、11、13と22)、好中性セラチナーゼ関連のlipocalin (スポット14) が含まれる。(表1)。 ・SPDは、生来の免疫応答で重要である、そして、肺の免疫応答の多くの調節性側面に関与する。本研究では、SPDは2.42倍 (表1、図4) であった。 ・福井らによって報告された (脂質過酸化物質、ヘム・オキシゲナーゼ-1とα-トコフェロールを含む) 抗酸化剤に関連したタンパク質が本研究では特定されなかったものの、他の同様の抗酸化剤タンパク質 (過酸化redoxin-6と-1) がZnO NPsばく露ラットのBALF中で増大していた事が観察された (表1)。 ・タンパク質ゲルソリン (スポット2) がZnO NPsばく露の後のラットのBALFで有意に増大していた (2.84倍、表1、図4) ことも発見された。 ・ZnO NPsへのばく露によって、6.1 (DJ-1/6.1、スポット15) のπ状態pI stateをもつDJ-1タ

	<p>ンパク質の発現は1.66倍に増加し、6.4(DJ-1/6.4、スポット25)のπ状態をもつDJ-1は0.33倍に減少したことも確認された(表1、図4、図S1C・D)。</p>
結論	<ul style="list-style-type: none"> ・nanoLCMS/MSと結合された二次元電気泳動法(2-DE)を用いて、高用量ZnO NPsにばく露したラットのBALFにおける差別的タンパク質を分離・定量・特定した。 ・その結果、S100A8とS100A9(特発性肺線維症と肺癌の候補マーカー)は特定されなかったものの、肺表面活性物質関連のタンパク質Dとゲルソリン(特発性肺線維症の生物マーカー)は、有意に増大した(それぞれ2.42と2.84倍)。 ・これらの炎症反応は、特発性肺線維症即ち肺癌を誘起する可能性がある。 ・以上の結果は、ZnO NPsへのばく露が主にラットの肺炎症と免疫応答を誘起することを示した我々の先行研究の結果と一致している。

No	ZnO-2
論文題目 (和訳)	The endoplasmic reticulum stress inducer thapsigargin enhances the toxicity of ZnO nanoparticles to macrophages and macrophage-endothelial co-culture. (小胞体ストレス誘発因子タプシガルジンは、マクロファージとマクロファージ内皮との共培養に対する ZnO ナノ粒子の毒性を高める。)
著者 所属機関	Gui Chen ^{a,1} , Yuexin Shen ^{a,1} , Xiyue Li ^a , Qin Jiang ^a , Shanshan Cheng ^a , Yuxiu Gu ^a , Liangliang Liu ^b , Yi Cao ^a , a Key Laboratory of Environment-Friendly Chemistry and Application of Ministry of Education, Lab of Biochemistry, College of Chemistry, Xiangtan University, Xiangtan 411105, PR China b Institute of Bast Fiber Crops, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changsha 410205, PR China
書誌事項	Environ Toxicol Pharmacol. 2017, doi: 10.1016/j.etap.2017.01.020.Mar;50:103-110.
試験物質	酸化亜鉛ナノ粒子 (ZnO NPs;コード:NM110)、メーカー: BASF、被覆無し、Prof. Peter Moller より提供。 透過電子顕微鏡 (TEM)、X線回折 (XRD)、BET、動的光散乱 (DLS)、ナノ粒子追跡分析 (NTA) などによって特徴づけ。 XRD サイズ: 70~>100nm。TEM サイズ: 20-250/50~350nm。BET 表面面積: 14m ² /g。媒体中の DLS サイズ: 306nm。水中の NTA サイズ: 約 155nm。 流体力学サイズ分布とゼータ電位も測定 (測定対象: MilliQ 水中の 16µg/mL NM110)。 ・粒子特性 NM110 のサイズ: 195.4±20.1nm (図 1A)、ゼータ電位: -17.7±6.6nm (図 1B)、形状: 楕円形、あるいは、不規則な形状 (SEM、TEM) (図 1C,D)
試料調整法	NM110 懸濁液の調整: 懸濁媒体: 2%FBS を含む MilliQ 水、粒子濃度: 2.56µg/mL、ばく露時に THP-1 媒体で希釈。(2.2)
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	【試験生物】phorbol 12-myristate 13-acetate 処理によって THP-1 単球 (ATCC) から分化した THP-1 マクロファージと HUVECs (継代 1) (2.1) 【投与方法・期間・用量】 THP-1 マクロファージの培養 (2.2): 250nM タプシガルジン (TG; 他は endoplasmic reticulum stress inducer; ER ストレス誘発因子) のありと無しで培養、培養媒体: 補充された THP-1 媒体、NM110 粒子濃度: 0µg/mL, 2µg/mL, 4µg/mL, 8µg/mL, 16µg/mL, 32µg/mL、ばく露時間: 24h 共培養 (2.2): 250nMTG のありと無しで培養、NM110 粒子濃度: 0µg/mL, 2µg/mL, 8µg/mL, 32µg/mL、培養媒体: 補充された THP-1 媒体。HUVECs は、750 µL の補充された内皮媒体で培養、ばく露時間: 24h 【測定項目・方法】 ・WST-1 分析: 測定項目: THP-1 マクロファージのミトコンドリア生存度、測定方法: 水溶性テトラゾリウム-1 (WST-1) 分析。THP-1 マクロファージは、TG のありなしで各種濃度の NM110 にばく露。共培養のミトコンドリア生存度を決定するために、上澄みは、エリサ分析のために除去されて、上室で 200µL10% WST-1 試薬を、下室では 300µL10% WST-1 試薬を用いて共培養 (2h)。TG の影響を見るために、HUVECs は 24 時間各種濃度の TG にばく露後 WST-1 アッセイを実行。 ・LDH 分析: 測定項目: 膜健全性 ・中性赤取り込み分析: 測定項目: リソソーム不安定化、 ・細胞内 ROS: 測定項目: 細胞内 ROS、測定: 2',7'-ジクロロフルオレセイン・ジアセテート (DCFHDA) を用いることにより推定。 ・細胞内 Zn イオン蓄積: 測定項目: 細胞内の Zn イオン蓄積、測定: 細胞透過性 Zn イオン蛍光プローブ Zinquin エチル・エステルを用いることにより、TG の有となしで、各種濃度の NM110 に 24h ばく露後、THP-1 マクロファージで測定 ・エリサ: 測定項目: 腫瘍壊死因子 α (TNFα) の放出、測定: エリサ・キットによって測定。
試験結果	・THP-1 マクロファージに対する細胞毒性 3.2: WST-1 分析では、NM110 または TG 単独で各種濃度へのばく露では、THP-1 マクロファージの生存度は減少しなかった。(図 2A) TG+16µg/mL と 32µg/mL NM110 へのばく露は、ミトコンドリア生存度を有意に減少させた。対照的に、LDH の放出は、TG の存在の有無にかかわらず NM110 による影響は受けなかった (図 2B)。中性赤の取り込み分析では、NM110 と TG の単一要因の影響ならびに NM110 と TG の間の相互作用を示した (図 3)。EC50 値は、NM110 単独の場合は 11.2µg/mL であったが、NM110+TG の場合は、6.4µg/mL に減少した (図 3A)。中性赤染色は TG の有無にかかわらず NM110 へのばく露によって減少した (光顕微鏡観察、図 3B) ・細胞内 ROS 3.3: 細胞内 ROS は、TG の有無とも NM110 へのばく露によっては影響を受

	<p>けなかった(図 4A)。ポジティブコントロールとして、0.5%と1% H2O2 にばく露した場合は、細胞内 ROS はそれぞれ 189.2%と 289.5%に増加した(図 4B)。</p> <p>・細胞内 Zn イオンの蓄積 3.4.:細胞内 Zn イオンは、NM110 へのばく露によって用量依存的に増加した(図 5)。TG なし、8μg/mL, 16μg/mL 32μg/mL NM110 へのばく露は、細胞内 Zn イオンの蓄積を有意に増進した。TG は細胞内 Zn イオンに有意に影響を及ぼさなかった。NM110 と TG の間の相互作用は認められなかった。</p> <p>・マクロファージ-HUVEC 共培養に対する細胞毒性 3.5: 上室における THP-1 マクロファージの生存度は、TG の有無とも NM110 へのばく露によっては影響を受けなかった(図 6A)。下室で間接的にばく露された HUVECs は、TG の存在で、0μg/mL, 2μg/mL, 8μg/mL, 32μg/mL NM110 へのばく露によって、生存度は減少した(図 6B)。HUVECs の生存度は、TG へのばく露によって減少した。図 6C</p> <p>・TNFα の放出 3.6.: 上室または下室への TNFα の放出は、TG の有無とも、NM110 ばく露の影響は受けなかった(図、7)。</p>
結論	<p>・ER ストレス誘発因子 TG を使って THP-1 マクロファージにストレスを加えることによって、NM110 の細胞毒性(ミトコンドリアとリソソームに対する損傷)を高めることができる。</p> <p>・この毒性は、マクロファージ内皮共培養によって HUVECs に移すことができる。</p> <p>・NM110 ばく露による細胞内 ROS、細胞内 Zn イオンの蓄積、TNFα の放出は、TG の有りなしの影響を受けなかった。</p> <p>・以上の結果は、ZnO NP 誘起細胞毒性における ER ストレスの役割を示す。</p>

No	ZnO-3
論文題目 (和訳)	Comparative <i>in vitro</i> genotoxicity study of ZnO nanoparticles, ZnO macroparticles and ZnCl ₂ to MDCK kidney cells: Size matters. (MDCK 腎臓細胞に対する ZnO ナノ粒子、ZnO マクロ粒子、ZnCl ₂ の <i>in vitro</i> 比較遺伝毒性研究: サイズは重要である。)
著者 所属機関	Veno Kononenko ^a , Neza Repar ^a , Nika Marusic ^a , Barbara Drasler ^a , Tea Romih ^a , Samo Hocevar ^b , Damjana Drobne ^a a Department of Biology, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Vefna pot 111, 51-1000 Ljubljana, Slovenia b Department of Analytical Chemistry, National Institute of Chemistry, Hajdrihova 19, 51-1000 Ljubljana, Slovenia
書誌事項	Toxicol <i>In Vitro</i> . 2017 Apr;40:256-263. doi: 10.1016/j.tiv.2017.01.015.
試験物質	<p>・酸化亜鉛ナノ粒子 ZnO NPs、酸化亜鉛マクロ粒子 (ZnO MPs)。ラベル表示サイズ: それぞれ、<100nm、<1 μm。Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) から入手。</p> <p>・粒子懸濁液の調製と特徴づけ</p> <p><測定項目、分析法、分析対象></p> <p>①粒子直径: 透過電子顕微鏡分析 (TEM) で測定。試料調製: ZnO NPs、MPs の水性懸濁液は銅のグリッド上におかれた透明炭素箔の上で室温で乾燥することによって調整、</p> <p>②流体力学サイズ: 動的光散乱分析 (DLS) で測定。懸濁液調整後 20 分放置し後上澄みを分析、対象: 脱イオン水中の 737 μM 粒子懸濁液、細胞培養液中の 737 μM と 123μM 粒子懸濁液。</p> <p>③ゼータ (ζ) 電位: ZetaPALS 電位アナライザで測定、対象: DPB 中の 737 μM ZnO NPs、MPs</p> <p>・粒子特性</p> <p><平均直径> ZnO NPs: 72±46nm、ZnO MPs: 237±119nm (TEM 測定、図 1)</p> <p>サイズ分布は広いものの、ZnO NPs の大多数 (84%) は 100nm 以下であった。MPs の大部分 (96%) は 100nm 以上であった。</p> <p><ゼータ電位></p> <p>ZnO NPs: -13.3±2.3mV (脱イオン水)、-33.7±1.6mV (pH 7.4DPB)</p> <p>ZnO MPs: -16.6±1.5mV (脱イオン水)、-36.5±2.7mV (pH 7.4DPB)</p> <p>DPBS Dulbecco's Phosphate Buffer Saline</p> <p><平均流体力学直径> (DLS 測定)</p> <p>・737 μM 水性懸濁液中 ZnO NPs: 85.5nm (PdI = 0.809)、ZnO MPs: 112.8nm (PdI = 0.738)</p> <p>・123μM 細胞培養液中 ZnO NPs: 253nm (PdI = 0.363)、ZnO MPs: 456nm (PdI = 0.214)</p>
試料調整法	ZnO NPs と ZnO MPs の 123mM ストック懸濁液は、脱イオン水中で調製され、各実験の前に、超音波で 15 分間破壊後、細胞培養液中で最終濃度に希釈。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	<p>・細胞培養</p> <p>【試験生物】マディン・ダービー犬の腎臓細胞 (MDCK 細胞)</p> <p>培養媒体: 4mM L-グルタミンと 5% (v/v) ウシ胎児血清 (FB) で補充されたダルベッコの修正イーグル培地 (DMEM) と F-12K の 1:1 の混合物 (v/v)</p> <p>・細胞培養液における ZnO NP の溶解分析</p> <p>ZnO NPs 濃度: 2 水準 (0.61、123μM)。</p> <p>細胞実験と同じ条件下で 24h 保持。この後、超遠心分離 (10 万 rcf×30 分) にかけた後、上澄みの一部を HNO₃ で酸性とし。火炎原子吸光分析 flame atomic absorption spectroscopy で全 Zn 濃度を測定。残りの一部は酸性化せず、矩形波陽極のストリッピング・ボルタンメリーによって分析。</p> <p>・細胞毒性分析</p> <p>測定項目: Zn 化合物の細胞毒性。分析方法: 3 種。陽性対照: 0.5mM H₂O₂ 以下、①②③とも MDCK 細胞濃度: 2.2×10⁴ 細胞/cm²、培養時間: 24h、培養液: ZnO NPs、ZnO MPs と ZnCl₂ の等モル濃度の媒体。</p> <p>培養液濃度: 12、61、123、184、369、737 μM (それぞれ、1、5、10、15、30、60μg/mL ZnO に、1.67、8.37、16.7、25.1、50.2、100μg/mL ZnCl₂ に対応)</p> <p>①MTT 分析 測定項目: ミトコンドリア酵素活性の評価。測定: 570nm の吸光度を spectrophotometry で測定。</p> <p>②NRU 分析 測定項目: リソソーム (ATP-依存的プロセス) 中の酸性 pH を維持する細胞の能力。培養の後、中性赤染料 (最終濃度 0.04mg/mL) を加えて再度 2 時間培養後、中性赤染料の蛍光を測定 (励起波長: 530nm、測定波長: 645nm)。</p>

	<p>③トリパンブルー除外分析 測定項目:細胞膜安定性の評価。培養後、細胞は収穫されて(トリプシン/EDTA)、0.2%(w/v)トリパンブルー溶液で染色し、細胞生存度を顕微鏡的観察によって評価。</p> <p>・アルカリ性コメット分析 測定項目:一本鎖と二本鎖のDNA破壊、アルカリ不安定な部位、不完全な除去修復部位。MDCK細胞濃度:2.2×10⁴細胞/cm²。培養時間:24h。細胞培養液(12、61、123 μM)の中に調製されるZnO NPs、ZnO MPsまたはZnCl₂溶液。陽性対照:メタンサルホン酸メチル(MMS)溶液(0.45μM)。ばく露の後、細胞懸濁液は1.6%低融点アガロースを混合され、冷電気泳動緩衝液(0.3M NaOH、1mM EDTA、pH>13)に30分間浸漬。この後、電気泳動を実施(1V/cm、40分)。電気泳動の後、エピ蛍光顕微鏡を用いて検査。コメットの尾部に存在するDNAの割合を、DNA損傷のパラメータとして使用。</p> <p>・細胞分裂-遮断小核分析 測定項目:一度分けられた二有核細胞 once-divided bi-nucleated cells における染色体損傷の評価。MDCK細胞濃度:1.2×10⁴細胞/cm²。培養時間:24h。細胞培養液(12、61、123 μM)の中に調製されるZnO NPs、ZnO MPsまたはZnCl₂溶液。陽性対照:Methyl methanesulfonate (MMS) 溶液(0.45μM)。ばく露後、細胞は1.5μg/mLヘキスト33258と1μg/mLプロピジウム・ヨウ化物で染色されエピ蛍光顕微鏡二有核細胞の小核の存在を調査。アポトーシス or 壊死性細胞、単核、二有核、トリ有核および四有核細胞の頻度も評価。</p> <p>・カタラーゼとグルタチオン-S-トランスフェラーゼ活性分析 測定項目:2つのストレス関連酵素の活性度の測定(CATとGST)(細胞ストレス-防衛力の評価)。MDCK細胞密度:2.2×10⁴細胞/cm²。培養液:ZnO NPs、ZnO MPsまたはZnCl₂の溶液(12、61、123μM)。陽性対照:H₂O₂溶液(0.5mM)。培養時間:24h。培養後、細胞ホモジネートの総蛋白濃度を、ピアスニシンコニン酸(BCA)タンパク質分析キットで測定。CAT活性:全細胞タンパク質量当たりのCAT活性は、H₂O₂に対する消滅係数より計算。GST活性:全細胞タンパク質の質量当たりのCDNBGSH複合物(GSTによって引き起こされる反応の生成物)に対する吸光係数を用いて計算。</p> <p>・無細胞ROS測定 測定項目:全てのZn化合物の酸化性ポテンシャルの評価。培養時間:24h。陽性対照:0.025mM H₂O₂。培養後、酸化されたDCFH(DCF)の蛍光は、495nmの励起波長と520nmの放出波長で測定。</p>
試験結果	<p>・ZnO NPsの24時間培養の細胞培養液中のZn含有量 細胞がない以外は細胞毒性実験と同じ条件で測定した結果、ZnO NPsの細胞培養液中への溶解は高かった(表1)。超遠心分離前の測定では、Znのおよそ50%は非粒子の形状(表1)で存在した。それはZnイオンならびに有機分子とそれらの錯体から成る。</p> <p>・細胞毒性分析(2.5に対応) 全てのZn化合物が同様の濃度依存的細胞毒性を示した。これは、184μM以上の濃度で対コントロールで有意であった(MTTとNRU分析)。トリパンブルー除外分析では、369μM以上で対コントロールで有意であった(図2)。</p> <p>・アルカリ性コメット分析 ZnO NPsばく露の場合、61μMと123μM以上の濃度で二本鎖および一本鎖DNA破壊の増加が観察された。ZnO MPsとZnCl₂の場合、123μM以下の濃度ではDNA損傷の増加は認められなかった。(図3A)。</p> <p>・細胞分裂-遮断小核分析 cytokinesis-block micronucleus assay (CBMN) assay ZnO NPsの場合のみ、61μMの濃度で遺伝毒性は増加した。ZnO MPsとZnCl₂は、全ての濃度で(<123μM)染色体異常の増加は認められなかった(CBMN分析、図3B)。</p> <p>・カタラーゼとグルタチオン-S-トランスフェラーゼ活性分析 123μM ZnO NPsで処理された場合だけGST活性は減少した。ZnO MPsとZnCl₂は、培養後、12μMから123μMの濃度範囲でGST活性を変化させなかった(図4A)。 ZnO NPs(61μMと123μM)で培養の場合、CAT活性は減少した。ZnO MPsは、最高の試験濃度(123μM)でさえ、CAT活性に影響しなかった。ZnCl₂はばく露濃度123μMでCAT活性にわずかに影響した(図4B)。</p> <p>・無細胞ROS 細胞培養媒体中のROS含有量は、ZnO NPs、ZnO MPs、ZnCl₂の場合とも、有意な増加を示さなかった(図5)。</p>
結論	<p>ZnO NPsのサブ細胞毒性濃度は、遺伝毒性影響を誘起する。この影響は粒子サイズ依存的である。ZnO NPsの遺伝毒性は、GSTとCAT活性の減少を伴う。細胞培養液中のZnO NPsから溶出したZnイオンが細胞影響の唯一の原因とはいえない。試験遺伝毒性の陽性結果、細胞防御システムの損傷と細胞毒性の欠如は、NPsの有り得る副作用の早期警戒と考えられる。</p>

No	ZnO-4
論文題目 (和訳)	Involvement of <i>PINK1</i> /parkin-mediated mitophagy in ZnO nanoparticle-induced toxicity in BV-2 cells. (BV-2 細胞における ZnO ナノ粒子誘発毒性での <i>PINK1</i> /parkin 介在マイトファジーの関与)
著者 所属機関	Wei L ¹ , Wang J ¹ , Chen A ² , Liu J ² , Feng X ² , Shao L ² . 1 Department of Stomatology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, People's Republic of China; Department of Pediatric Dentistry, School and Hospital of Stomatology, Wenzhou Medical University, Wenzhou, People's Republic of China. 2 Department of Stomatology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, People's Republic of China.
書誌事項	Int J Nanomedicine. 2017 Mar 8;12:1891-1903. doi: 10.2147/IJN.S129375. eCollection 2017.
試験物質	ZnO NPs:購入先;Sigma Chemical (St Louis, MO, 米) 直径約 50 nm、六角形プリズム形状(TEM)。 水溶液中に分散時に小凝集体を形成(ZnO NPs の流体力学的サイズが示唆)。
試料調整法	ZnO NPs は、最終ストック濃度 10 mg/mL で脱イオン水中に懸濁。懸濁液は、使用前に毎回 30 分間超音波処理。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	・試験生物: 不死化マウスミクログリア細胞株、BV-2:購入先;CBCAS (Cell Bank of the Chinese Academy of Sciences, Shanghai, 中国) 播種後 2 日目、細胞は Lipofectamine 3000 (Invitrogen) を使って <i>PINK1</i> siRNA または GFP LC3 を遺伝子導入(トランスフェクト)された。実験では <i>PINK1</i> siRNA の 3 つのペアを BV-2 細胞中の <i>PINK1</i> 遺伝子をノックダウンするために使用。 ・投与方法・期間・試験用量: MTT アッセイ; 細胞成長曲線、ZnO NPs 処理後の細胞生存率の両方を MTT アッセイを用いて評価。野生型 BV-2 細、empty ベクター導入 BV-2 細胞クローン、 <i>PINK1</i> siRNA 導入 BV-2 細胞クローンは、ZnO NPs の異なる濃度に 24 時間ばく露。 ミトコンドリアの分離および Western blot 分析(タンパク質発現評価); 異なる期間 (4, 8, 12, 24 h) ZnO NPs にばく露。放射性免疫沈降法により細胞内総蛋白を抽出。細胞ミトコンドリア分離キットを使ってミトコンドリア蛋白質を抽出。 免疫細胞化学; ZnO NP 処理後。 細胞内活性酸素種 (ROS) レベル(ジクロロジヒドロフルオレセインジアセテートアッセイ (DCFH-DA, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, 米国); 10µg/mL ZnO NPs、4、8、12、24 時間で処理後。 MDC 染色; ダンシルカダベリン(MDC) <蛍光色素および自食作用胞の特定マーカー>を、ZnO NPs が BV-2 細胞でオートファジーを誘発させたかどうかを確認するため使用。 JC-1 アッセイ(Sigma JC-1 Assay Kit;ミトコンドリア膜電位の変化(ΔΨm)測定); 10µg/mL ZnO NPs、4、8、12、24 時間で処理後。
試験結果	・ZnO NPs の BV-2 細胞生存率に及ぼす影響: 野生型 BV 2 セルで ZnO NP 治療後の細胞生存率; ZnO NPs は、用量依存的に BV-2 細胞生存率に影響。10µg/mL よりも低濃度で、ZnO NPs は細胞の生存率に大きな影響を示さなかった。 3 タイプの細胞の細胞成長曲線; 成長曲線に基づき、細胞生存率に有意差無し。細胞の形態に明らかな差無し。 3 タイプの細胞間の NPs を用いた処理に続く細胞生存率の比較; <i>PINK1</i> の機能の損失が ZnO NPs に対する BV-2 細胞の脆弱性を増加した。 ・ZnO NPs は BV-2 細胞における酸化的ストレスを時間依存で誘発した。 ・ZnO NPs はミトコンドリアの膨潤を誘発し、BV-2 細胞においてオートファジープロセスの誘因となった。 LC3 GFP プラスミド導入野生型 BV-2 細胞は ZnO NP 処理後、オートファジー空胞の形成が観察された(蛍光顕微鏡、MDC 染色、TEM)。ZnO NPs が NPs ZnO を用いた処理後すぐにオートファジープロセスを誘発した(Western blot 分析を用いたオートファジー指標 LC3 の発現の評価結果)。 ・BV-2 細胞における ZnO ナノ粒子誘発毒性での <i>PINK1</i> /parkin 介在マイトファジーの関

	<p>与： LC3、総 parkin、細胞質中の parkin、ミトコンドリア中の parkin、PINK1、カスパーゼ-9 の蛋白質発現評価 (Western blot 分析)、ZnO NP 処理後、PINK1 発現上昇していることを示した。総 parkin は処置前後有意差無し、cyto-parkin レベル低下、mito-parkin レベル上昇し、細胞質からミトコンドリアへの parkin の移行を示した (マイトファジーの関与を意味する)。</p> <p>・PINK1^{-/-}BV-2 細胞を 10µg/mL ZnO NPs、4、8、12、24 時間で処理： JC-1 アッセイおよび Western blot の結果は、総 parkin レベルが維持されたことを明らかにした。しかし、ミトコンドリア中の parkin の発現は野生型細胞のミトコンドリア中でより低く、ZnO NPs 処理後 parkin はほとんどミトコンドリア中に移行しなかった。野生型細胞と比べて、PINK1^{-/-}細胞は、ZnO NPs 処理後、より高いカスパーゼ-9 発現を示し、ZnO NP によって誘発された PINK1 の損失が細胞アポトーシスを増加させた。</p>
結論	<p>PINK1/parkin-介在マイトファジーは、BV-2 細胞における ZnO NP 誘導毒性で役割を果たすと示唆された。ただし、<i>in vitro</i> 細胞モデルは正確に身体中に存在する様々な細胞間相互作用を模倣できない。これらのデータだけを使用して、生物中での ZnO NPs の毒性学的挙動を正確に予測することは困難で、これは本研究の避けられない制限だった。最終的な結論に達するために、さらに動物実験が必要である。ZnO NPs のユニークな物理化学的特性が傷害の新しいメカニズムを起こすかどうか、これらの傷害が新しい病理学に結果としてつながるかどうかは未定である。</p>

No	ZnO-5
論文題目 (和訳)	Zinc oxide nanoparticles exhibit cytotoxicity and genotoxicity through oxidative stress responses in human lung fibroblasts and <i>Drosophila melanogaster</i> . (酸化亜鉛ナノ粒子はヒト肺線維芽細胞及びキイロショウジョウバエにおいて酸化ストレス反応を通じた細胞毒性および遺伝毒性を示す。)
著者 所属機関	Ng CT ¹ , Yong LQ ² , Hande MP ³ , Ong CN ⁴ , Yu LE ⁵ , Bay BH ² , Baeg GH ² . 1 Department of Anatomy, Yong Loo Lin School of Medicine, National University of Singapore, Singapore; Environmental Research Institute, National University of Singapore, Singapore. 2 Department of Anatomy, Yong Loo Lin School of Medicine, National University of Singapore, Singapore. 3 Department of Physiology, Yong Loo Lin School of Medicine. 4 Environmental Research Institute, National University of Singapore, Singapore. 5 Department of Civil and Environmental Engineering, National University of Singapore, Singapore, Singapore.
書誌事項	Int J Nanomedicine. 2017 Feb 28;12:1621-1637. doi: 10.2147/IJN.S124403. eCollection 2017.
試験物質	・ZnO NPs (Sigma-Aldrich から、製品番号 721077) ; <100 nm 粒子サイズ (動的 光散乱法 [DL]; Milli-Q water 中) (TEM 観察) 球状、直径~70 nm の平均流体力学サイズ、表面電荷 = +5.8 mV。ZnO NPs の凝集体が観察された。 ・比較用 (異なるサイズ) ZnO NPs (US Research Nanomaterials, Inc.); 水溶液中粒子 サイズ = ~50-80 nm
試料調整法	実験で使用する前に、在庫濃度 1 mg/mL の溶液は、新たに調製され、超音波処理、滅菌 フィルター処理。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	・試験生物: 継代 20-30 であるヒト MRC5 胎児肺線維芽細胞 (ATCC® CCL 171™); Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640) で培養された。 ・投与方法・期間・試験用量: ZnO NPs の <i>in vitro</i> 処理; 濃度範囲 (0, 1, 10, 25, 50, 75, 100 µg/mL)、24, 48, 72 時 間。 リポ酸 (LA) とグルタチオン (GSH) は、300µM と 3mM で、ZnO NP 誘発細胞毒性に及 ぼす抗酸化影響を調べるため、ZnO NP 処理前 24 時間に添加。 *ハエ系は、下欄に記載。
試験結果	<ヒトMRC5 胎児肺線維芽細胞におけるばく露影響> ・LDHアッセイ: 上澄液中のLDH 活性を490 nm でSpectraMax M5 MicroPlateリーダ ーを用いて定量化。 ・AlamarBlue® アッセイ: 細胞毒性をモニター。 FACS (fluorescence activated cell sorter) 解析: 染色; Annexin V and fluorescein isothiocyanate (FITC) Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences)、細胞周期解 析; Dako Cyan フローサイトメトリー (DakoCytomation) で解析・点数化。 ・細胞ROS検出アッセイ: DCFDAで染色、蛍光強度を測定。 ・RNA抽出、逆転写 (RT) と定量的リアルタイム RT-ポリメラーゼ連鎖反応 (qRT-PCR): 総RNA分離; Purelink RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific) 使 用。RNA品質評価; NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer使用。cDNA変換; Agilent AffinityScript qPCR cDNA synthesis kit (Genomax Technologies) 使用。 mixture consisting of 希釈cDNA, SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific)、各遺伝子のためのプライマーの混合物解析; 7900HT Fast Real-Time PCR machine (Thermo Fisher Scientific) 使用。 ・8-ohdG DNA 損傷の定量化: 酸化的 DNA 損傷をモニター; EpiQuik™ 8-ohdG DNA 損傷定量キット (Epigentek) 使用。DNA抽出; PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific) 使用。 ・コメットアッセイ: 【試験結果】 ・ZnO NPs の内面化、顕著な形態変化、核変化とアポトーシスの形成体、細胞の収縮を確 認。 ・ZnO NP 処理MRC5 細胞の膜完全性を失っていることは、用量依存的LDH 放出に関 連付けら、細胞生存率は早ければ処理後24時間で減少、ZnO NPs濃度 50µg/mL で総 細胞死を引き起こした。FACS 解析は、アポトーシス細胞死を見付けた。

	<p>・RC5 線維芽細胞において、ZnO NPs へのばく露は、ROS誘発と小胞体ストレスに関連する遺伝子の発現の増加を起こした。DNA damage inducible transcript 3 (DDIT3) と ER to nucleus signaling 1 (ERN1)の発現が大幅にアップレギュレーションされることが分かった。</p> <p>遺伝毒性試験;ZnO NP は結果としてROS産生に結び付き、コメットアッセイ (図 5 b) によって示されるように、酸化的 DNA 損傷に続いて、8-OHdGの蓄積につながった。</p> <p>＜ハエ系統におけるばく露影響＞</p> <p>キイロショウジョウバエの次の系統はこの研究で使用された: 野生型 <i>Canton-S; Sod2N308/CyO</i> (NIG-FLYから入手); と <i>cncCK6/TM3, Sb</i> (Dr Kerppola T からの贈り物)。 <i>in vivo</i>生存率分析で、野生型成虫は0, 0.1, 0.25, 0.5, 1 mg/mL の ZnO NPs を添加した食品メディアを含んだバイアルの中に置かれた。親のハエはその後 5 日後に取り出され、大人の段階への産まれた卵の生存率をモニターしていた。出現したF1 (雑種第一世代) ハエは収集され、カウントされ、コントロール(未処理; 0 mg ZnO NPs)に比べての生存率が計算された。</p> <p>CncC (転写因子Nrf2 のショウジョウバエの相同物) またはスーパーオキシドジスムターゼ 2 (SOD2) 活性の抑制が、ZnO NP 誘発ROSを減少させ、ZnO NP 誘発生存率を上昇させるかどうか評価するために、処女雌and <i>cncCK6/TM3, Sb</i> または <i>Sod2N308/CyO</i>ハエは、雄 <i>Canton-S</i>ハエと交配された。ハエは0, 0.25 や 0.5 mg/mL ZnO NPs を含む食品メディアへ移され、出現した成体が収集され、カウントされ、コントロールに対する生存率の割合を算出した。</p> <p>ジヒドロエチジウム(DHE)染色を用いた ROS検出は、幼虫の内臓で実施。</p> <p>【試験結果: <i>in vivo</i>】</p> <ul style="list-style-type: none"> ・処理ハエの F1 子孫の 3 齢幼虫の腸中へ摂取され内面化された ZnO NPs が見つかった。いくつかの ZnO NPs は腸管内の微絨毛に付着して、いくつかは、腸の細胞の細胞質内小胞内に囲まれているのが観察された(電子顕微鏡)。 ・ <i>Canton-S</i>ハエの F1 子孫の卵の成人での生存率は、試験された ZnO NPs の 0から 10 mg/mL の範囲で用量依存的に低下し、0.5 mg/mL で 49.8%。 ・ROS の中間レベルは 0.25 mg/ml ZnO NPs で観察された一方、0.5 mg/mL ZnO NP では過剰量の ROS を誘発させた。 ・低下された生存率は、Sod2 または CncC (Nrf2 のショウジョウバエの相同物)に対してヘテロ接合しているハエにおいて、コントロール ファイルと比較して、強化された。
結論	<p>この研究は、ZnO NPs が、ER ストレス、細胞毒性、および遺伝毒性によって毒性を起こすことができ、それはROS生成と密接に関連し、必然的に、<i>in vitro</i>で細胞死を引き起こす、ことを示した。また、<i>in vivo</i>研究は、摂取経路による ZnO NPs ばく露が、酸化ストレスを引き起こすことによって生体に毒性を起こすことができ、ショウジョウバエの減らされた生存能力に結果としてつながった、ことを示した。<i>in vitro</i> 及び <i>in vivo</i> 調査両方からの結果は、それらの毒性に寄与している重要なメカニズムであるかもしれない ZnO NPs の有害影響をより良く評価するのに役立つかもしれない。</p>

No	ZnO-6
論文題目 (和訳)	Nanomaterial-induced cell death in pulmonary and hepatic cells following exposure to three different metallic materials: The role of autophagy and apoptosis. (3つの異なる金属材料へのばく露の後に続く肺と肝臓の細胞におけるナノマテリアル誘発細胞死:オートファジーとアポトーシスの役割)
著者 所属機関	Kermanizadeh A ¹ , Jantzen K ¹ , Ward MB ² , Durhuus JA ³ , Juel Rasmussen L ³ , Loft S ¹ , Møller P ¹ . 1 Department of Public Health, Section of Environmental Health, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark. 2 Leeds Electron Microscopy and Spectroscopy (LEMAS) Centre, University of Leeds, Leeds, UK. 3 Department of Cellular and Molecular Medicine, University of Copenhagen, Center for Healthy Aging, Copenhagen, Denmark.
書誌事項	Nanotoxicology. 2017 Mar;11(2):184-200. doi: 10.1080/17435390.2017.1279359. Epub 2017 Jan 24.
試験物質	ZnO-BASF Z-Cote; 非被覆、100nm。乾燥粉。 Ag-RAS GmbH; Capped; <20nm。Ag NPs は安定剤を含む脱イオン水中で供給。 TiO2 試料は、The National Research Center for the Working Environment (Copenhagen, デンマーク)によって入手され、中性電荷ルチル材料(10nm)から製造された。乾燥粉。 キャラクタリゼーション(文献値); NM 型、XRD サイズ(nm)、TEM サイズ、表面積(BET;m ² /g)、完全 MEM 中サイズ(平均、nm)、完全 F-12 中サイズ(平均、nm)の順で記述。 ZnO、70- > 100、20-250/50-350、14、100.6、81.8。Ag、(7、14、< 18)、8-47(平均 17.5)、NA、59.2、47.6。TiO2、10、80-400、84、160.6、149. 3。 MEM: minimum essential Eagle cell culture medium F-12: Ham's F-12 cell culture medium 添加 ZnO の約 50%は、24 時間後、細胞培養培地中で溶解したが、Ag は 1%より少なかった。
試料調整法	分散液は超音波処理、培地希釈前に氷上で保存、30 分以内に使用。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	ヒト肝癌細胞株 HepG2; Sigma-Aldrich (Paisley, 英国) ヒト肺上皮細胞株 A549; ACTT (American Type Culture Collection) から。 全実験は、passage 3 と 20 の間の細胞使用。 ・投与方法・期間・試験用量: 試験結果欄で記述。
試験結果	・WST-1 細胞毒性試験 (WST-1 細胞増殖試薬使用; NMs 濃度 0.31-156.25µg/cm ² (1-500µg/mL に相当)、24 時間ばく露後): 細胞生存率は濃度依存的に低下した。 HepG2-LC20 (µg/cm ²)、-LC50、A549-LC20、-LC50 ZnO 1.25 2.5 0.62 2.5 Ag 2.5 5 0.62 2.5 TiO2 39 未到達 78 未到達 LC20: 20% 致死濃度 ・遺伝子発現レベル評価 (NMs へ 6 時間ばく露後。追加的に 100nM のラピマイイン (オートファジー誘発剤) 及びバフィロマイシン (オートファジー阻害剤) へ 2 時間ばく露。3 処理に対して、RNA 抽出・分離、RNA 濃度・純度測定、cDNA へ転写、RT-PCR。遺伝子発現の 6 時間解析後、NMs へのばく露後の HepG2 細胞において LC3B、p62、atg12 レベルの広い時間コース (1、2、4、6、12 時間) 調査実施。): アポトーシス; 幅広い細胞周期プロセスで重要な遺伝子 (LC3B、atg12、atg3、atg4b、atg5、p62) の発現調査。Ag、ZnO ばく露後の両細胞で、LC3B、atg4b、p62 がアップレギュレーション、atg12、atg5 がダウンレギュレーションされた。 LC3B、atg4b、p62 のうち LC3B、p62 は、Ag、ZnO ばく露後の HepG2 細胞において、時間依存的にポジティブだった。TiO2 NMs は顕著な変化無。 ・Western blotting 解析 (標的蛋白質 (LC3、p62) の発現検知; NMs への HepG2 の 4、6、24 時間ばく露後): オートファジー; Ag、ZnO ばく露後の HepG2 細胞において、LC3- II レベルが時間依存的に上昇した。p62 蓄積も見られ、後半時点で最も見付けられやすかった。 ・TEM (NMs への 6 時間ばく露後):

	<p>Ag、ZnO ばく露後の HepG2 細胞において、ばく露後の細胞内コンポーネントの隔離のために形成された二重膜オートファゴソーム様構造を示した。TiO₂ NMs では、単一膜小胞を容易に検知したが、検知できるオートファゴソームの数はより少なかった。肝細胞による Ag、ZnO NMs の取込みは EDX で確認されたが、ZnO はその高い溶解性のためより困難だった。</p> <p>・蛍光顕微鏡 (NMs (LC20) への 6 時間ばく露後) 共焦免疫蛍光顕微鏡からは、LC3- I と II の区別ができなかった (抗体が蛋白質の両蛋白質を認識するため)。Ag、ZnO ばく露後、細胞はオートファジーを形成した。TiO₂ は起こさないか極めて少なかった。</p> <p>蛍光顕微鏡 (細胞骨格の構造変更; NMs (LC20) への 6 時間ばく露後の HepG2 細胞中のアクチンフィラメントを染色して測定): NM 処理とコントロール (ラピマイイン) との間で F-アクチンネットワークでほとんど変動なく、これらのフィラメントはオートファジーに可視的に関与していないことが示唆された。しかし、Ag、ZnO ばく露後、G-アクチンネットワークが多数変動しているのが観察された。</p> <p>アポトーシス細胞検知 (NMs への 24 時間ばく露後): オートファジー経路の疑わしい機能不全はアポトーシス/ネクローシスの細胞死にリンクする。サイトフローメトリーで確認の結果、アポトーシスが主要メカニズムであった。</p> <p>カテプシン B の酵素活性 (NMs への 24 時間ばく露後の HepG2 細胞): ネガティブコントロールを超えるカテプシン B の酵素活性の変化はどの NMs に対しても観察されず、オートファジーとアポトーシスの間の相互作用はなかった。</p> <p>カスパーゼ 3 の酵素活性 (NMs (又は 6µM のカンプトテシン (アポトーシス誘発剤)) への 6 時間ばく露後): カスパーゼ 3 発現はアポトーシスとよく一致し、これらの NMs へのばく露後のカスパーゼ 3 依存アポトーシス細胞死が確認された。</p>
<p>結論</p>	<p>オートファジーの生理学的な機能の新しい理解を基に、オートファジーにおける基底レベルとストレス誘発増加の両方が哺乳類健康を促進することで重要であることは明確である。本研究で、このオートファジー経路の機能障害が ZnO 及び An NMs、しかし TiO₂ NMs でない、へのばく露に続く異なる臓器から供給された 2 つの細胞タイプにおけるアポトーシス死に寄与することが示された。従って、全オートファジー過程の包括的な解析を実行することは重要であり、それは、ナノテクノロジーリスクの理解、安全なナノ材料、ナノ医療の設計に役立つ巨大な可能性を持っている。</p>

No	ZnO-7
論文題目 (和訳)	Effect of size and shape on toxicity of zinc oxide (ZnO) nanomaterials in human peripheral blood lymphocytes (ヒト末梢血リンパ球における酸化亜鉛 (ZnO) ナノ材料の毒性に及ぼすサイズおよび形状の影響)
著者 所属機関	D. Shalini, S. Senthilkumar & P. Rajaguru Department of Biotechnology, Anna University-BIT Campus, Tiruchirappalli, India
書誌事項	TOXICOLOGY MECHANISMS AND METHODS, 2018, VOL. 28, NO. 2, 87-94
試験物質	ZnO ナノ粒子 (NPs)、ナノロッド (NRs)
試料調整法	ZnO NPs の合成; 50mg 酢酸亜鉛二水和物を室温で超音波処理により 25ml メタノールに溶解、濾過、キシレン 25ml で希釈、30 分間超音波処理により完全混合。反応を 60°C、10 時間継続。合成 ZnO NP を濾過により回収、過剰のメタノールで洗浄。ZnONP を種として ZnONP を用いて水熱成長。シード層被覆サンプルを、60°C で 90 分間の二重蒸留水中の硝酸亜鉛及びヘキサメチレンテトラミンのそれぞれ等モル溶液 (0.01M) と混合。ZnO NR は、メタノールで穏やかに超音波処理後、収集、乾燥。 ZnO 微粒子 (MP)、マイクロロッド (MR) の合成; ZnO 粉末 (Sigma-Aldrich (St.Louis, MO)) を使用。MR は、ZnO MPs を種として水熱合成法で合成。ZnO MP を二重蒸留水中の硝酸亜鉛とヘキサメチレンテトラミンの等モル溶液 (0.02M) に入れ、90°C で 90 分間保持。ろ過により集めた ZnO MR を二重蒸留水で 2 回洗浄、乾燥。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	試験生物: 健康な男性供与者 (22~25 歳) から得られた HPBL 細胞 試験用量: [細胞毒性] ZnO NM (NP、NR、MP および MR) 50-1000mg/ml、[遺伝毒性] PBS (25,50,100mg/ml)、ZnO NM (細胞毒性と同じ)、[遺伝毒性に対する抗酸化作用] ZnO PBS 中の NMs (NP 及び NR: 25mg/ml; MP 及び MR: 50mg/ml) 酸化電位; DTT アッセイ。 ZnO NMs の細胞毒性・遺伝毒性; フィコール-ヒストパーク (Ficoll-Histopaque) 密度勾配法使用。ヒト HPBL により評価。細胞懸濁液を血清を含まない RPMI-1640 培地で希釈 (100µl 懸濁液中に約 1×10 ⁶ 個の細胞)。無血清で分散した ZnO NM (NP、NR、MP 及び MR) の異なる濃度を有する 96 ウェルプレート中の HPBL 細胞 (1~104 細胞/ウェル) を処理することにより、ZnO NMs の細胞毒性を評価。RPMI-1640 培地中で 37°C、24 時間培養後、MTT アッセイ。各濃度について、少なくとも 6 回の反復維持。細胞添加前に、ZnO NM ストック懸濁液 (2000mg/ml) を 30 秒間 3 回超音波処理。遺伝毒性測定用に、24 ウェルプレート上の細胞を PBS 中の異なる濃度の ZnO NM で 37°C、3 時間処理し、アルカリコメットアッセイ。 ZnO NMs の遺伝毒性に対する抗酸化物質の役割; 37°C、2 時間、ビタミン C、ケルセチン又はアポシニン (各 50mM) で細胞処理後、ZnO PBS 中の NMs を 37°C、4 時間培養。3 つの培養物及びコントロールを全サンプルについて維持。コメットアッセイ用の陽性対照 H ₂ O ₂ (100mM、5 分、37°C)。コメットアッセイは、Ramkumar et al. (2012)。臭化エチジウム (10mg/ml) で染色したスライドを 20°C で試験。蛍光顕微鏡で測定。3 つの複製スライド (50 細胞/1 スライド) から無作為選択された 150 の細胞の合計を 1 試料につき検査。尾部 DNA パーセントを Comet Score TM バージョン 1.5 ソフトウェアで測定。 エンドトキシン検出; 全 NM を Limulus Amebocyte Assay で試験。エンドトキシンの存在を、100mg/ml 濃度で三連アッセイ。NM は検出可能な量のエンドトキシンを含まなかった。 脂質過酸化の推定; ZnO NMs 誘導脂質過酸化を測定するために、試験物質 (24 ウェルプレートで 5~10 ⁴ 細胞/ウェル、37°C で 1 時間) にばく露後、細胞を遠心分離、上清除去。細胞ペレットを PBS に再懸濁、超音波処理。透明な溶解物をチオバルビツール酸反応性物質 (TBARS) (Nichens Niehaus and Samuelsson 1968) と脂質ヒドロペルオキシド (Jiang ら、1992) の推定に使用。 乳酸脱水素酵素 (LDH) 放出; 細胞から放出された LDH のレベルを測定して、処理した細胞の膜完全性に対する ZnO NMs の効果を評価。新たに単離された HPBL 細胞 (37°C) を 25,50 及び 100mg/ml ZnO NM で 4 時間処理。LDH 放出は、ピルビン酸ナトリウム存在下で NAD ⁺ からの NADH の酵素的形成をモニターにより決定 (Qiu ら、2007)。4 時間後、試料採取、遠心分離、PBS (pH7.4) で 5 倍希釈。100ml 希釈サンプル等量を 100ml 試薬と混合、96 ウェルプレート中の PBS、pH7.4 中の 1.5mM NADH 及び 25mM ピルビン酸ナトリウム最終濃度を得、吸光度を 340nm で測定。

	<p>細胞内活性酸素種(ROS)測定; ROSの細胞内レベルを、DCFH-DAの蛍光化合物ジクロロフルオレセイン(DCFH)への酸化変換の測定により決定。24ウェルプレートに採取したHPBL細胞(5~104細胞/ウェル)を25,50及び100mg/ml ZnO NMsで4時間、37°Cで処理、DCFジASETと培養培地中で15日間培養した冷PBSで3回洗浄。緑色蛍光強度(酸化DCFH)をマルチモード検出器で測定。</p>
<p>試験結果</p>	<p>SEM画像;なめらか、六角形。球形(NP、MP)。平均φは、NP187nm、MP683.5nm。水中表面電荷は、-20.0~-29.9mV。 酸化電位レベル;NP・NR>MP・MR(図2)。 ZnO NMs誘発細胞内ROS生成レベル; ZnO NM4種類全てで、細胞内ROS生成の用量依存的増加の誘導を示す。全用量レベル(25,50 および 100mg/ml)で、ROS 産生は、NP・NR>MP・MR(図3、DTTアッセイと一致)。 細胞生存率;生存率における用量依存的な減少を示した(図4)。ZnO NPは、本研究で使用した他の3形態のZnO NMと比較して、より少ない細胞傷害性を有した。これにもかかわらず、全てのNMsは、最高試験濃度(1000mg/ml)でさえ50%未満の毒性を誘導することが判明。 LDH放出;より低用量レベル(25及び50mg/ml)でのZnO NM全4種類が、未処理対照細胞と比較してLDH放出において有意な変化を誘導しなかったことを示した。100mg/mlでは、MR単独ではLDH放出レベルが有意に高かった。 HPBL細胞の遺伝毒性; ZnO NPのみが用量依存的にDNA損傷を誘導、試験レベル(25,50及び100mg/ml)の他の形態のZnO NMは検出可能なDNA鎖を誘導しなかった(図6)。ZnO NP処理細胞では、%tail DNAの中央値は線量とともに線量増加し、100mg/mlでは%tail DNAは陽性対照(H2O2処理細胞)のそれと同等であった。箱の大きさとボックスの中央線は、より高レベルのDNA損傷を有する多数の細胞を示すより大きな値に向かって%tail DNA値が歪められることを示唆した。他の処理群では、有意なレベルのDNA損傷は観察されなかった。さらに、全処理群において、多数の外れ値の存在は、各処理群における小グループの細胞が、より高レベルのDNA損傷を被ったことを示した。 抗酸化物質の効果;抗酸化剤の中で、ビタミンC又はケルセチンによる前処置は全処理群でDNA損傷を減少させたが、アポニン前処置はZnO NPの遺伝毒性を増加させた(図7)。3つの化合物は全て、H2O2処理細胞のDNA損傷を減少させ、50mM濃度でHPBL細胞に検出可能なDNA損傷を誘導しなかった。しかし、全ての実験において、全処理群における多数の細胞が、DNA損傷からの細胞の不完全な回収を示す異常値のままであった。 脂質過酸化;全てのZnO NMsは、TBARS及びLOOH値により示されるように、用量依存的に有意な脂質過酸化を誘導した(図8(a,b))。微小粒子及びMRは、より高レベルの脂質過酸化を引き起こすことが見出されている。 相関分析;細胞傷害性がLDH放出、TBARSおよびLOOHと有意な正の相関を、値および遺伝毒性がDTT及びDCF値と正の相関を有することを示した(表2)。DTT値とDCF値の間には有意な相関が見られた。</p>
<p>結論</p>	<p>本研究の結果は、ナノ物質のサイズと形状がその毒性に大きな影響を与えることを示唆した。NPおよびナノロッド(NR)は、微粒(MP)およびマイクロローズ(MR)より高いレベルの酸化電位およびROS生成能力を有していた。対照的に、MPおよびMRは、より高いレベルの脂質過酸化能力を有していた。より小さなNPはより遺伝毒性であり、より大きなMPおよびMRは本質的により細胞傷害性であった。ビタミンC又はケルセチンによる処理は、ZnO NMに伴う遺伝毒性を有意に減少させる。より小さなNP及びNRが<i>in vitro</i>でHPBLにおいてより遺伝毒性であることを示唆した。毒性の差は主として粒子の大きさによるものであり、細胞膜に浸透し核に達し、DNA損傷を誘発する能力に影響する。粒子の物理的特性によるこの異なる毒性は、特に生物医学的用途のためのナノ材料の調製のために考慮すべき重要な概念であり得る。抗酸化剤の補充が毒性を緩和する可能性がある。<i>in vitro</i>でHPBL細胞から得られた現在の結果が<i>in vivo</i>環境にも適用可能であるかどうかを確認することが重要である。</p>

(7) Ag

No	Ag-1
論文題目 (和訳)	Silver nanoparticles induce hormesis in A549 human epithelial cells. (銀ナノ粒子は、A549 細胞上皮におけるホルミシス(hormesis、閾下増進効果)を誘発する。)
著者 所属機関	Sthijns MM ¹ , Thongkam W ² , Albrecht C ² , Hellack B ³ , Bast A ⁴ , Haenen GR ⁴ , Schins RP ² . 1 Department of Pharmacology and Toxicology, Maastricht University, The Netherlands. 2 IUF - Leibniz Research Institute for Environmental Medicine, Auf'm Hennekamp, Germany. 3 Institute of Energy and Environmental Technology e.V. (IUTA), Germany. 4 Department of Pharmacology and Toxicology, Maastricht University, The Netherlands.
書誌事項	Toxicol <i>In Vitro</i> . 2017 Apr;40:223-233. doi: 10.1016/j.tiv.2017.01.010. Epub 2017 Jan 18.
試験物質	AgNP1: Skyspring Nanomaterials, Inc. (米国)から購入。粉体。一次粒子径 = 37.0 nm ± 13.0 nm。 AgNP2: European Commission Joint Research Centre (Ispra, イタリア)から受け取る。NM-300 リファレンスナノマテリアルのサンプルを代表。分散体。一次粒子径 = 16.6 nm ± 4.4 nm。 脱イオン水 (常温) への溶解度は、72 時間で、AgNP1 = 約 0.2%、AgNP2 = 5%。
試料調整法	<i>in vitro</i> 実験で使用されたすべての粒子懸濁液は、EU 第 7 フレームワークプロジェクト ENPRA と SIINN ERANET プロジェクト NanOxiMet 内で開発されたナノ粒子分散プロトコルに基づいて調製された。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	・試験生物: ヒト肺腺癌細胞 (A549) 投与方法・期間・試験用量: 細胞用量応答関係評価; 0, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80 µg/cm ² の AgNPs, 24 時間ばく露 細胞毒性、GSH レベル; AgNP1; (前処理) 2.5 µg/cm ² , 24 時間、(2 回目投与) 60µg/cm ² , 24 時間。AgNP2; 5µg/cm ² , 24 時間、(2 回目投与) 80µg/cm ² , 24 時間。 RNA 発現解析; 2.5µg/cm ² (AgNP1), 5µg/cm ² (AgNP2), 8 時間 免疫組織化学的評価; 2.5µg/cm ² (AgNP1), 5µg/cm ² (AgNP2), 4 時間 細胞処理条件 (すなわち 10 %FCS 含有培地) 下で、Z-平均(流体力学的直径) は、AgNP1 と AgNP2 に対して、642 nm と 408 nm。細胞は、比較的広いサイズ範囲を持つ凝集体へばく露していたことを示唆。
試験結果	細胞毒性 (WST-1 assay (Roche, Mannheim, ドイツ) 使用): 計算されたアクロレイン (参照; 30 分ばく露)、AgNP1、AgNP2 (24 時間ばく露) の TC50 値は、0.15±1.62µg/cm ² , 55±12µg/cm ² , N 80µg/cm ² 。 細胞内 GSH レベル (蛋白質含有量; bicinchoninic acid assay (BCA; Pierce, Thermo Fisher Scientific, Etten-Leur, 蘭; オランダ) 使用): 両タイプの AgNPs は、細胞内 GSH レベルを用量依存的に減少させた。ただし、A549 細胞のグルタチオンの減少の程度は調査した 3 つの化合物の細胞毒性の同じレベルに結び付かなかった。 また、前処理の影響が判明した。 ヘム酸素添加酵素 1、γ-グルタミルシステイン合成酵素の発現 (RNA 量測定 (NanoDrop (Thermo scientific nanodrop 1000 spectrophotometer, isogen life science, De Meern, 蘭) 使用)。cDNA 作製 (iScript cDNA synthesis kit (Biorad, Veenendaal, 蘭) 使用)。定量的リアルタイム PCR で測定。) 及び免疫組織化学 (一次 Nrf2 抗体 (C-20, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), AlexaFluor 594 二次ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Life Technologies, Darmstadt, ドイツ) 使用): 10µM アクロレイン、2.5 µg/cm ² AgNP1 と 5µg/cm ² AgNP2 を用いた 8 時間の細胞ばく露は、HO-1 発現における顕著な増加に結び付いた (図 6)。 gNP1 (2.5 µg/cm ²) 及び AgNP1 (5 µg/cm ²) を用いた 4 時間ばく露後、高められた免疫反応性が観察された。
結論	AgNPs は、ホルミシス (hormesis、閾下増進効果) 適応を引き起こすことができる。GSH は毒性と関連するけれども、ホルミシスとはせず、それは GSH が毒性とホルミシスと結び付けられるアクロレインについての調査結果と対照的である。これらの調査結果は、消費者が AgNPs の相対的に高い濃度に繰り返しばく露されるので、リスクアセスメントだけでなく医学における AgNPs の使用についての意味を持っている。AgNPs によるホルミシスの精密な分

子メカニズムはまだ不可解であるけれども、Nrf2 介在シグナリングは関係するようである。多くのナノマテリアルの毒性における酸化ストレス及び酸化還元シグナリングの確立された重要性を考慮して、ナノ粒子の他のタイプが AgNPs と同様なメカニズムによってホルミシス適応を引き起こすことができるかどうか、調査することは、興味深い。

No	Ag-2
論文題目 (和訳)	Cytotoxic effects of nanosilver are highly dependent on the chloride concentration and the presence of organic compounds in the cell culture media. (ナノ銀の細胞毒性は細胞培養培地中の塩化物濃度および有機物の存在に大きく依存する)
著者 所属機関	Kaiser JP ¹ , Roesslein M ¹ , Diener L ¹ , Wichser A ¹ , Nowack B ² , Wick P ¹ . 1 Particles-Biology Interactions Laboratory, Empa, Swiss Federal Laboratories for Materials Science and Technology, Switzerland. 2 Technology and Society Laboratory, Empa, Swiss Federal Laboratories for Materials Science and Technology, Lerchenfeldstrasse 5, 9014, St. Gallen, Switzerland.
書誌事項	J Nanobiotechnology. 2017 Jan 6;15(1):5. doi: 10.1186/s12951-016-0244-3.
試験物質	ナノ銀:PPG Industries Europe BV (蘭)より入手。
試料調整法	ナノシルバー粒子 (100 µg/mL) は、10 % FCSを持つ培地で、37°C、0、24、48、72 時間培養。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	・試験生物:CaCo-2 cells Health Protection Agency Culture Collections (Salisbury, 英国)から入手。 細胞は、異なる濃度の熱不活化 FCS (1、5、10%)、1% ペニシリン-ストレプトマイシン-ネオマイシン溶液、1% グルタミン溶液、1% 非必須アミノ酸溶液、1 mM ピルビン酸ナトリウムおよび 1% ビタミン溶液と一緒に、均一細胞培養条件 (5 %CO ₂ 、湿度 95%、37°C) 下、MEM 中で培養。培地は、実験で使用する前に週 1 回交換。 細胞毒性試験用培地 15 の異なる培地でナノ銀の細胞毒性を調べた: 5 つの異なる塩化物濃度と 3 つの異なる FCS 濃度 (1、5、10%)。A 培地:124.5 mM の塩化物濃度、B-E 培地:塩化物濃度が段階的に 25% 減および硫酸置換。E 培地:0.05 mM。 ・投与方法・期間・試験用量: 20 µg/mL のナノ銀添加した試験用培地で、浮遊細胞培養。 細胞生存率(アポトーシス/ネクローシス):フローサイトメリーにより分析 細胞モルフォロジー:48 時間ばく露後 ナノ粒子の取込み:TEM 活性酸素種の放出、サイトカインの放出
試験結果	・ナノ粒子の凝集:全ての培地ですぐに同様のサイズ範囲で形成 (65–235 nm)。 ・フリーの銀および無機銀錯体量の計算: 1.5 µg/mL の総銀に対して、培地 A 中の固体 AgCl の予測沈殿量は 28%、銀錯体の残りの種分化は、0.08% Ag ⁺ 、7.6% AgCl _{aq} 、80.7% AgCl ₂ ⁻ 、11.6% AgCl ₃ ²⁻ 。培地 E 中で、AgCl は沈殿が予想されず、Ag ⁻ 種分化は、65.7% Ag ⁺ 、3.4% AgCl _{aq} 、10.0% Ag-glutamate and 20.8% Ag ₂ SO ₄ 。 ・細胞毒性試験: 培養培地中の塩化物および FCS 濃度は、浮遊培養細胞の生存率に対して著しく影響しなかった。対照的に、培養皿の底で成長する培養細胞は大きく沈殿する銀錯体および沈降銀凝集物にばく露された。培養細胞は、20µg/mL のナノ銀存在下で培地 A で培養したとき、死んだ細胞数の増加が観察された。したがって培地中の塩化物濃度は適用ナノ銀の細胞毒性の影響を増加した。 培養皿底上の培地 A 中で成長する細胞は、ナノ銀へ 48 時間ばく露後、銀ナノ粒子を取り込んでおり(TEM)、膜結合構造、おそらくエンドソーム-リソソーム区画中に銀凝集体として見付かった。いずれの培養培地でもばく露の最初の 4 時間以内 caco-2 細胞によって ROS の顕著な量の生産はなかった。Caco-2 細胞はナノ銀存在下で FCS 濃度の高い培地で育っていたときに細胞生存性と IL-8 の間の相関が見られた。
結論	本研究で使用される培地中での銀の凝集と銀錯体の形成は、塩化物濃度と有機炭素(この場合は大抵 FCS)の存在の影響を受け、この相互作用はさらに細胞培養の生存率を決定した。細胞は懸濁液中の銀粒子にばく露されるだけで、溶存銀錯体は、すべての条件下で任如何なる影響も示さなかった。培養皿底部上で成長する細胞は、銀凝集体の沈殿を通して銀にばく露された。これらの銀化合物の溶解は、培地の組成によって決定される LEEC に結果としてなる可能性が高く、最終的なばく露条件は十分分散された粒子の系のそれらとは完全に異なっていた。したがって、要求され報告された材料キャラクタリゼーションに加えて、細胞培養条件は、細胞がばく露される銀錯体の種類と用量を推定するために、慎重に検討されなければならない。これらの因子は、真核対原核生物のような異なる生物学的系が比較される場合より関連性が高くなり、それは、例えば、細菌コロニー形成およびバイオフィーム形

成を防ぐためにインプラント用抗菌コーティングとして銀の使用を評価するとき、重要であるかもしれない。ヘルスケア製品上の銀コーティングは、静菌性または殺菌だけでなく、細胞毒性であるかもしれない。よく管理され理解された培養条件のみが、銀のような反応性ナノ材料を使用するさまざまな研究の比較を向上させることができている。

No	Ag-3
論文題目 (和訳)	Evaluation of oxidative stress induction in rats following exposure to silver nanorods. (銀ナノロッドへのばく露の後に続くラットにおける酸化ストレス誘発の評価)
著者 所属機関	Lingabathula H ¹ , Yellu N ¹ . 1 Department of Pharmacology and Toxicology , University College of Pharmaceutical Sciences, Kakatiya University , Warangal , Telangana , India.
書誌事項	Toxicol Mech Methods. 2017 May;27 (4) :272-278. doi: 10.1080/15376516.2016.1274351. Epub 2017 Jan 25.
試験物質	10、25nm SNRs;Sigma-Aldrich, St. Louis, MO から購入。 QTZ 粒子 (58-68 μ m;99.95%純度);Berkely Springs, Morgan County, WV から入手。
試料調整法	—
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	・試験生物:6 週齢の雄 Wistar ラット;Sainath agencies, Hyderabad,インドから購入。 ・投与方法・ 期間・試験用量: 10nm SNRs、25nm SNRs、QTZ 粒子の 1mg/kg 及び 5mg/kg b.w.の気管内注入による 単回投与。注入期間後、1 日、1 週、1 月、3 月に眼窩叢で血液採取。血清を得る。
試験結果	酸化ストレス評価;MDA、GSH、SOD、カタラーゼ、TAC; MDA レベルは、SNRs、QTZ 注入期間後、1 日、1 週で上昇され、脂質過酸化を示した。 10nm SNRs は 1mg/kg (p<.01) 及び 5mg/kg (p<.001) で、注入期間後、1 日、1 週で有意に脂質過酸化を上昇した。25nm SNRs は 5mg/kg で、注入期間後、1 週 (p<.01) で有意に脂質過酸化を上昇した。 10nm SNRs は 1mg/kg 及び 5mg/kg で、注入期間後、1 日 (p<.001)、1 週 (p<.001)、1 月 (p<.05) で、有意に低下された GSH レベルを示した。 25nm SNRs は 5mg/kg で、注入期間後、1 日 (p<.001)、1 週 (p<.001)、1 月 (p<.01) で、有意に低下された GSH レベルを示した。 10nm 及び 25nm SNRs は、 5mg/kg で、注入期間後、1 日、1 週で、SOD レベルを有意に (p<.001) 低下させた。 10nm SNRs は両用量で、25nm SNRs は 5mg/kg で、注入期間後、1 日、1 週で、有意に (p<.001) カタラーゼレベルを低下させた。10nm SNRs、5mg/kg (p<.01) では、1 月でも低下させた。25nm SNRs は 1mg/kg で、注入期間後、1 日 (p<.001)、1 週 (p<.01) で、カタラーゼレベルを低下させた。 10nm SNRs は両用量で、注入期間後、1 日、1 週で、有意に (p<.001) TAC を低下させ、5mg/kg で、1 月でも低下させた。25nm SNRs は 5mg/kg で、注入期間後、1 日 (p<.001)、1 週 (p<.001)、1 月 (p<.05) で、TAC を低下させた。
結論	ラットにおける 10 及び 25nm の SNRs の気管内注入は、脂質過酸化の上昇したレベルと GSH、SOD、カタラーゼ及び TAC の低下したレベルに結果として結び付き、試験 SNRs による酸化ストレス誘発を示した。最終的に、SNRs は、ばく露期間後 1 日及び 1 週間後、気管内注入の後に続く用量依存的酸化ストレスを引き起こした。

No	Ag-4
論文題目 (和訳)	Toxicological effects of three types of silver nanoparticles and their salt precursors acting on human U-937 and HL-60 cells. (ヒト U-937 及び HL-60 細胞に作用する 3 タイプの銀ナノ粒子とそれらの塩前駆体の毒性学的影響)
著者 所属機関	Barbasz A ¹ , Oćwieja M ² , Walas S ³ . 1 Institute of Biology, Pedagogical University of Cracow, Cracow, Poland. 2 Jerzy Haber Institute of Catalysis and Surface Chemistry, Polish Academy of Sciences, Cracow, Poland. 3 Faculty of Chemistry, Jagiellonian University, Cracow, Poland.
書誌事項	Toxicol Mech Methods. 2017 Jan;27 (1) :58-71. doi: 10.1080/15376516.2016.1251520. Epub 2016 Nov 15.
試験物質	銀分散液;硝酸銀、酢酸銀、過塩素酸銀の溶解起源の銀イオンの化学的還元(タンニン酸を還元剤として使用)。それぞれ、TAN、TAA、TAC と表示。 3 つの分散粒子は、同様の物理化学的特性だった。球状、低多分散性。 TAN の場合は、ストック溶液濃度 452mg/L(密度から)、流体力学直径 13.7±1.1nm (DLS 測定)、平均粒子サイズ 13.6±6.1nm (TEM 観察)、 ζ 電位 ($T=298K$, $I=0.001M$) -64±3mV(電気泳動移動度測定)。
試料調整法	ストック溶液は、要求される濃度に RPMI 1640 培地で希釈。 30mg/L 分散液への粒子の溶解は、約 7 日まで速く、擬似直線だったが、長期間後、約 8-10%が溶解。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	・試験生物: ヒト組織球性肉腫細胞株 U-937(ATCC から); 活性化マクロファージは、フル培地中 PMA と一緒に 24 時間 U-937 を誘導して得た。 ヒト前骨髄球細胞株 HL-60(ATCC から); ⇒マクロファージ様細胞への分化、顆粒球への分化。 ・投与方法・期間・試験用量: 試験結果欄で記述。
試験結果	MTT アッセイ(細胞毒性): 銀塩は、AgNPs に比べ、大幅に低い用量で試験細胞の死を誘発した。U-937 細胞生存は用量依存。25mg/L 濃度の AgNPs は、非処理細胞比較で、約 30%までの生存率の低下に結び付いた。U-937 の活性化は生存率に影響しなかった。HL-60 は U-937 に比べ、より生存能力が高かった。顆粒球への分化の細胞生存率に及ぼす影響は無視できるほどだった。マクロファージへ分化された細胞では、生存率に変化が観察された。マクロファージは TAC に関して最も敏感。 炎症誘発(一酸化窒素レベル): U-937 では、コントロール比較で、TAC 処理は 1.5 倍(25mg/L)まで、TAN、TAA 処理は 1.3 倍(25mg/L)まで NO 生成増加させた。活性化で微増。 HL-60 では、非分化、分化細胞とも、コントロール比較で、どの粒子処理も 1.5 倍まで増加。 牛血清アルブミン(BSA;モデル蛋白質)と粒子の相互作用(銀塩の違いの影響): 結合し易い順:TAC>TAN>TAA。アルブミン添加での粒子処理は、アルブミン濃度の上昇とともに、細胞生存率が上昇し、銀粒子の毒性影響をほとんど消せる。
結論	Ag NPs の毒性作用の機構は、まだ研究中である。非常に似た物理化学的特性の、また異なる前駆体塩から得た粒子の影響の比較は、これらの研究の新しいコースを明らかにした。ゾル精製の最良の方法でさえ、粒子表面に残ることがある、反応混合物中に存在する全ての化学種を除去しなかった。これらの存在は、ナノ粒子のバイオ-特性に大きく影響する。試験されたナノ粒子の細胞毒性は、それらの用量と細胞タイプに依存する。LD50 の測定は、試験された物質の最も細胞毒性なものとして、銀塩がヒト細胞に関係する Ag NPs よりもより毒性である、TAC と塩前駆体(AgClO ₄)を示した。Ag NPs は、免疫細胞による NO 産生を大幅に強化し、TAC 粒子は、分析された Ag NP 中で最も免疫原性である。TAC は、BSA との最高の親和性を示し、蛋白質過剰はナノ粒子の毒性影響を除去することができる。合成前駆体についての情報は、商業的に入手可能なナノ粒子に取り付けられるべきである。

No	Ag-5
論文題目 (和訳)	Differential genotoxicity mechanisms of silver nanoparticles and silver ions. (銀ナノ粒子と銀イオンの特異的遺伝毒性メカニズム)
著者 所属機関	Li Y ^{1,2} , Qin T ^{1,3} , Ingle T ⁴ , Yan J ¹ , He W ^{5,6} , Yin JJ ⁵ , Chen T ⁷ . 1 Division of Genetic and Molecular Toxicology, National Center for Toxicological Research, US Food and Drug Administration, USA. 2 Covance Laboratories Inc., USA. 3 Bio-Medical Pharmaceutical Manufacturing Corporation, USA. 4 Division of Biochemical Toxicology, National Center for Toxicological Research, U.S. Food and Drug Administration, Jefferson, AR, USA. 5 Division of Analytical Chemistry, Office of Regulatory Science, Center for Food Safety and Applied Nutrition, US Food and Drug Administration, USA. 6 Key Laboratory of Micro-Nano Materials for Energy Storage and Conversion of Henan Province, Institute of Surface Micro and Nano Materials, Kuching University, People's Republic of China. 7 Division of Genetic and Molecular Toxicology, National Center for Toxicological Research, US Food and Drug Administration, USA.
書誌事項	Arch Toxicol. 2017 Jan;91(1):509-519. doi: 10.1007/s00204-016-1730-y. Epub 2016 May 14.
試験物質	5nm PVP-被覆 AgNPs (Liら、2014 に記述されるものと同じ) AgNO ₃
試料調整法	水中(1mg/mL) AgNPs は、攪拌、超音波処理で分散。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	・試験生物: KT6 細胞; American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, 米国) から入手。 ・投与方法・期間・試験用量: AgNPs; 濃度 (0, 1, 1.25, 1.5 µg/mL)、28 時間。 AgNO ₃ ; 濃度 (0, 1.25, 1.5, 1.75 µg/mL)、28 時間。
試験結果	・ <i>in vitro</i> 小核試験 (FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, 米国) 使用。細胞毒性は、RPD によって推定 (OECD TG487 (OECD 2014) 推奨): 28 時間後、AgNPs 1.5 µg/mL, AgNO ₃ 1.75 µg/mL で、50% 細胞毒性 (小核試験) で、両者は同様な用量で細胞毒性を起こすことを示唆。 遺伝毒性 (<i>in vitro</i> 小核試験); 用量依存で、小核誘発。両者最高用量で 2 倍。 ・遺伝子発現 (カスタマイズ PCR 発現アレイ (酸化ストレス、金属イオン結合、DNA 損傷・修復、細胞周期、小胞体ストレス応答、アポトーシス、増殖に関係する 89 遺伝子の応答を測定; 著者設計、Qiagen (Valencia, CA, 米国) 製作) 使用。Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Life Technologies) 上で実施): AgNPs ばく露は、酸化ストレス (GPX7、TPO、HMOX1、MT1B、MT1H、MT1X、MT2A)、金属イオン結合 (MT1B、MT1H、MT1X、MT2A) に関与する遺伝子を主に調節不全した。AgNO ₃ 処理も同様で、メタロチオネイン遺伝子をより高く誘発。 ・ROS 産生 (DCFH-DA 使用; AgNPs は 0-1.5 µg/mL、24 時間処理、AgNO ₃ は 0-1.75 µg/mL、28 時間処理。処理開始後、30 分、2、4、6、24 時間で蛍光強度測定): AgNO ₃ 処理は 30 分から 24 時間まで、コントロールを超えて、ROS レベルを大幅に上昇した一方、AgNPs 処理は 24 時間時点で大幅に上昇しただけ。 ・AgNPs 又は AgNO ₃ によって誘発された細胞毒性、小核、ROS に及ぼす NAC 又は Trolox の影響 (NAC (銀イオンキレート剤; 61.5 µM)、Trolox (ROS 捕捉剤; 23 µM)、AgNPs (1.5 µg/mL)、AgNO ₃ (1.75 µg/mL)、28 時間で処理して誘発): NAC 又は Trolox は、小核、ROS レベルの低下、相対的細胞集団倍加 (RPD) の上昇の結果につながった。 ・AgNPs から放出される Ag ⁺ イオンは、TK6 細胞において、細胞毒性、遺伝毒性を引き起こさなかった。AgNPs 1.5 µg/mL、28 時間で培養培地の溶解した Ag は、7.4 ng/mL で培地中の AgNPs のわずか 0.5% だった。 AgNPs と AgNO ₃ は両方、ROS を誘発させるので、それらはフリーラジカル生産者または酸化還元剤として活性である。AgNPs は用量依存的にヒドロキシルラジカルを増加させるが、AgNO ₃ は増加させない。
結論	TK6 細胞における遺伝毒性と酸化ストレスを誘発させるための Ag NPs と AgNO ₃ の潜在能力は同様である。しかし、フリーラジカルスカベンジャー Trolox は、両作用剤の細胞毒性を無効にする一方、銀イオンキレート剤 NAC の添加は AgNO ₃ の遺伝毒性を大幅に減少さ

せるが、Ag NPs はさせない。さらに、非常に小さい量の Ag⁺だけが Ag NPs から細胞媒体中へ放出され、放出された Ag⁺はこの濃度で遺伝毒性でなかった。ESR を使用した詳細分析は、Ag NPs はヒドロキシラジカルを直接生成した一方、AgNO₃ はしなかったことを示した。これらの結果は、Ag NPs と Ag⁺の両方が酸化ストレスを産すことによって遺伝毒性を誘発できるにもかかわらず、メカニズムは異なり、ナノ粒子、しかし放出されたイオンでない、は、Ag NPs の遺伝毒性を主に担っている。

No	Ag-6
論文題目 (和訳)	Genetic determinants of susceptibility to silver nanoparticle-induced acute lung inflammation in mice マウスにおける銀ナノ粒子誘発急性肺炎症に対する感受性の遺伝的決定因子
著者 所属機関	David K. Scoville,* Dianne Botta,* Karen Galdanes,† Stefanie C. Schmuck,* Collin C. White,* Patricia L. Stapleton,* Theo K. Bammler,* James W. MacDonald,* William A. Altemeier,‡ Michelle Hernandez,† Steven R. Kleeberger,§ Lung-Chi Chen,† Terry Gordon,† and Terrance J. Kavanagh* * Department of Environmental and Occupational Health Sciences and ‡ Department of Medicine, University of Washington, Seattle, Washington, USA; † Department of Environmental Medicine, New York University, Tuxedo, New York, USA; and § Immunity, Inflammation, and Disease Laboratory, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, North Carolina, USA
書誌事項	The FASEB Journal Vol. 31, No. 10, pp. 4600-4611
試験物質	AgNPs(名目上 20 nm で、安定化のためにクエン酸中でコーティング): the National Institute of Environmental Health Sciences Centers for Nanotechnology Health Implications Research Consortium が入手可能ないくつかのナノマテリアルの 1 つ。
試料調整法	1 mM クエン酸緩衝液中に懸濁
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	試験生物: 雄マウス; The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) から購入。 ・T.J.K. laboratory 表現型の 11 の近交系 (CBA/J, C57L/J, MRL/MpJ, NOD/ShiLtJ, NZB/BINJ, NZO/HILtJ, NZW/LacJ, PL/J, PWD/PhJ, PWK/PhJ, TALLYHO/JngJ, and WSB/EiJ) ・T.G./L.-C.C. laboratory 表現型の 10 の異なる系統 (BALB/cJ, BTBRT+tf/J, C3H/HeJ, C57BL/10J, DBA/2J, FVB/NJ, SJL/J, SM/J, and SWR/J) ・追加 4 系統 (129S1/ SvImJ, A/J, AKR/J, and C57BL/6J mice) 投与方法・期間・試験用量: 口腔咽頭吸引後 24 h に殺処分。0.25 mg/kg 体重又は 1 mM クエン酸緩衝液のみ。
試験結果	・肺炎症: コントロール比較で、AgNPs 処理マウスにおける BALF 中の好中球のパーセンテージが顕著な系統依存的上昇。SWR/J, DBA/2J, SM/J, BTBRT+tf/J, C57BL/10J 系統を除いて、ほとんどの系統で、統計的に有意な AgNP 誘発肺炎症が見られた。 ・AgNP 誘発肺炎症の遺伝可能性: AgNP が含まれ、混合モデルにおける処理のために調整される場合、BALF 好中球の割合に対する遺伝可能性は 0.37 であることが分かった。個別に評価される場合、遺伝可能性推定値は、クエン酸処理動物で 0.43、AgNP 処理動物で 0.73 だった。また、これらの結果は、遺伝的背景が AgNP 誘発肺炎症における系統間変異の重要な決定要因であることを示す。 ・ゲノムワイド関連 (GWA) マッピング (AgNPs への感受性における系統間差異に貢献するかもしれない特定のゲノム領域と候補遺伝子を識別するために、行った): 一塩基多型 (SNPs) の不足している遺伝子型 calls をフィルタリング後、65,493 個の SNPs が BALF 好中球の割合とのそれらの関連付けを評価するために EMMA (The efficient mixed-model association) で使用された (図 2)。我々は、染色体 4、15、および 18 上の量的形質遺伝子座 (QTL) ピーク中の 6 つの重要な SNPs を見付けた (図 3、表 1)。最強の QTL は染色体 18 の qE1 領域中で 3 Mb に及んだ。 この領域は、#1[rs29865915、St8sia3 ((ST8 a-N-acetyl-neuraminide a-2,8-sialyltransferase3) に近い)、#2 (rs29959933、Nedd4l に近い)、#4 (rs29778747、Nedd4l に近い; 図 3A および表 1) の -log ₁₀ (P) 順位を持つ 6 つの重要な SNPs の 3 つを保持していた。 また、この領域は 17 個の他の既知遺伝子と 2 つのマイクロ RNAs を含んでいた (Fig. 3A)。染色体 15 上の QTL は、遠位 qE3 と近位 qF1 領域を横切って 10 Mb に及び、#3 (rs31581766、Ano6 の遺伝子内) の順位を持つ 1 つの重要な SNP と #6 の順位を持つ SNP (rs3688273、遺伝子に近くない) を含んでいた。 また、この QTL 領域は、100 個以上のその他の既知遺伝子を含んでいた (図 3B および表 1)。染色体 4 上の QTL ピーク領域は 62.5 Mb 幅であり、qD3 の近位部分の一部を通して qC3 領域をカバーし、#5 (rs27482013、Rnf220 の遺伝子内) の順位を持つ 1 つの重要な SNP を含み、また、100 以上の既知遺伝子を含んでいた (図 3C、表 1)。SNP 対立遺伝子と AgNP が BALF 好中球に対して持つ影響を視覚化するため、処理群と

6 つの重要な NPs の SNP 対立遺伝子による BALF 好中球の割合の分布を評価した。遺伝子の中又は近くにいた 6 つの SNPs の内の 5 つのためのプロットを図 4 に示した。これらの同じ 5 つの SNPs の Cohen 効果サイズ d 統計は 0.9 で、それは AgNP 誘発好中球流入に対する大きな影響を抑えることを示す(表 1) (40)。系統による対立遺伝子の分布も調べられ、これら 5 SNPs に対してすべて異なっていた(補足図 3)。

・マウスフェノーム情報データベースを用いた候補遺伝子探索:

潜在的な候補遺伝子のための最初のスクリーニングとして、染色体 18 QTL 中で識別された潜在的候補遺伝子及び、Ano6、Rnf220 に対する mRNA 発現値が、Berndt and Stearns (48) によってマウスフェノーム情報データベース (MPD) に提出された、非処理雌マウスに対する 9 系統マイクロアレイベース遺伝子発現の調査(系統当たり $n = 3$) から得られた。

遺伝子内染色体 15 および 4 上の QTL 領域が 100 遺伝子以上を含んでいたもので、これらの地域中の最も重要な SNPs が遺伝子内だったと仮定し、Ano6、Rnf220 の発現に焦点を絞った。MPD からの発現値は、本研究で使用された 8 つの重複する系統からの AgNP 処理マウスからの BALF 好中球の割合によって、系統と比較された。

いくつかの潜候補遺伝子の報告されているベースライン発現レベルと我々の研究からの BALF 好中球の割合との間の正・逆両方の相関を見付けた。最も逆相関の遺伝子は、染色体 18 上の Nedd4l と、染色体 15 上の Ano6 だった(図 5A, B)。

重要な遺伝子内の SNP を含むにもかかわらず、染色体 4 上の Rnf220 の発現は BALF 好中球の割合と相関しなかった(図 5C)。最も正に相関した遺伝子は Ccbe1、Cplx4 で、両方とも染色体 18 上にあった(図 5D, E)。また染色体 18 にある St8sia3 は、中程度に相関したが、統計的に有意ではなかった(図 5F)。

・候補遺伝子に関する定量的 RT-PCR:

候補遺伝子が AgNP へばく露された肺で差別的に発現したかどうかを確認するために、低い(C57BL/6J, 129S1/SvImJ)及び中程度から高い(MRL/MpJ, A/J)好中球を代表した我々の系統のサブセットからの右肺組織に対して定量的 RT-PCR (qRT-PCR) を実行した(図 6A)。

重要な遺伝子内 SNPs を持つ遺伝子および/または Berndt and Stearns (48) からのデータを使用して BALF 好中球の割合と有意に相関または逆相関するそれらのリストに加え、最も重要な SNP (rs26865915) に隣接しているので、St8sia3 に関しても qRT-PCR を行った。

我々は、AgNP 処理とコントロールマウスとの間の Nedd4l、Ano6、Rnf220 の mRNA 発現の倍変化が、AgNP 処理マウスにおける BALF 好中球の割合とすべて大幅に逆相関したことを見付けた(図 6B-D)。

興味深いことに、MPD (Ccbe1 と Cplx4) (48)からの mRNA 発現データを用いた BALF 好中球の割合と有意に相関していたか、又は非常に重要な SNP (St8sia3)に隣接させていたかいずれかである、染色体 18 の QTL からの遺伝子の 3 つは、AgNP-またはクエン酸-処理マウスのいずれかから採取された肺組織で表現されなかった。

結論

mRNA レベルが AgNP 誘発肺炎と逆に関連する、複雑なポリジーン形質である可能性が高い、3 つの有望な候補遺伝子、Nedd4l、Rnf220、Ano6 を識別した。ヒト GWA 研究で、さまざまな程度で、Nedd4l と Rnf220 も肺機能におけるヒト変化に関連付けられてきている; Ano6 は、C-反応性蛋白と、したがって、全体的な炎症と適度に関連付けられてきている。医薬品ばく露に対するヒトの感受性の違いがマウス GWA マッピングを使用することによって特定される遺伝子多型に関連付けられてきているため、AgNP 誘発肺炎に対する感受性を調節することにおけるこれらの遺伝子の役割はさらに探究されなければならない。遺伝的背景が 25 の近交系マウス系統にわたって観測された炎症性応答の変化に寄与することを示すこと及び識別追加的研究のために候補遺伝子を識別することによって、将来の AgNP のメカニスティック研究の指針となる情報が生み出してきた;ただし、そのような実験は、現在の研究の範囲を超えている。また、AgNP 誘発肺炎に対する感受性の異なるマウスの系統間変異に関する情報は、AgNP リスク評価における種内の不確か因子を判断するために役に立つかもしれず、それ故、AgNP 誘発肺炎の遺伝的傾向があるかもしれない脆弱性個人に対する十分な保護を確保していく。

(8) Au

No	Au-1
論文題目 (和訳)	Multiparametric Assessment of Gold Nanoparticle Cytotoxicity in Cancerous and Healthy Cells: The Role of Size, Shape, and Surface Chemistry. (癌の及び健康な細胞における金ナノ粒子細胞毒性の多パラメーター評価)
著者 所属機関	Bhamidipati M ¹ , Fabris L. 1Department of Biomedical Engineering, Rutgers University, United States.
書誌事項	Bioconjug Chem. 2017 Feb 15;28 (2) :449-460. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.6b00605. Epub 2017 Jan 6.
試験物質	<ul style="list-style-type: none"> ・クエン酸被覆金ナノ球(citrate NSp):修正 Turkevich 法によって合成(TEM;平均直径=18.4±1.9nm) ・金ナノロッド:Nikoobakht & EL Sayed によって開発された種介在成長法によって合成(TEM;平均長さ=52.7±5.9nm、幅=23.0±3.6nm) ・金ナノスター:Yuan らによる界面活性剤フリーナノスター合成の修正版によって合成(TEM;平均先端-先端距離=62.5±11.2nm)
試料調整法	<p>AuNPs の表面官能基化:</p> <ul style="list-style-type: none"> ・臭化セチルトリメチルアンモニウム(CTAB)被覆:クエン酸被覆金ナノ球、ナノスターを被覆 ・ポリ(エチレングリコール)(PEG)被覆:クエン酸被覆金ナノ球、CTAB 被覆ナノロッド、金ナノスターを被覆 ・ヒト血清アルブミン(HAS)被覆:クエン酸被覆金ナノ球、CTAB 被覆ナノロッド、CTAB 被覆金ナノスターを被覆 <p>注)CTAB:陽イオン性の界面活性剤(逆性石鹸) <DLS 測定の水力直径;被覆により増加> citrate NSp⇒CTAB 被覆;25.1±0.2nm⇒35.2±1.4nm citrate NSp⇒PEG 被覆;25.1±0.2nm⇒30.5±0.7nm citrate NSp⇒HPA 被覆;25.1±0.2nm⇒39.4±0.4nm CTAB ナノスター⇒PEG 被覆;80.0±0.5nm⇒83.9±3.0nm CTAB ナノスター⇒HPA 被覆;80.0±0.5nm⇒82.2±2.7nm 注)ナノロッドは、アルゴリズム上、DLS で測定不可。 <ζ 電位> 被覆粒子の電位は、文献値と同様だった。 <AuNPs 上のリガンド濃度> 100mL の合成 AuNPs 中の CTAB 濃度(1H NMR);2.168mg(ナノ球)、1.148mg(ナノロッド)、2.041mg(ナノスター) PEG 濃度(TGA);0.307mg(ナノ球)、0.136mg(ナノロッド)、0.274mg(ナノスター) HAS 濃度(Pierce BCA アッセイ);正確な濃度測定不可のため、合成されたままの AuNPs の 50mL 中で 20、100、151.5μg を細胞毒性試験で使用。</p>
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	<ul style="list-style-type: none"> ・試験生物: ヒト神経膠芽腫細胞(U87、継代(passage)5~11) 初代ヒト皮膚線維芽細胞(継代 20~28)(略して、hfb) ・投与方法・期間及び試験用量: 100μg/mL の濃度で AuNPs を含む細胞培養媒体を培養(4 及び 24 時間)
試験結果	<p>① <i>In vitro</i> 細胞毒性試験:</p> <ul style="list-style-type: none"> ・MTT 細胞増殖アッセイ(V13154 Vybrant MTT 細胞増殖アッセイキット、Termo Fisher): —適正用量の探索のため、PEG ナノスター(0~200μg/mL)への4、24時間ばく露。細胞生存率は、両細胞において、異なる濃度で顕著な差異なく、U87 において、200μg/mL で78.3±9.3%(⇒適正用量として、100μg/mL 選択)。 —100μg/mL の AuNPs に相当するリガンドだけの細胞毒性は、U87 において、CTAB(ナノ球、4時間)は、ナノロッド、ナノスターでよりも顕著に低かった。PEG は、両細胞において、異なる濃度で顕著な差異なし。20 から 151.1μg への HAS の濃度増加は、24 時間ばく露で、U87 において細胞毒性が顕著な低下を示したが、hfb においては示さなかった。 —両細胞において、100μg/mL の異なる AuNPs、24 時間ばく露。細胞生存率(コントロール比較)は、CTAB ナノ球が最低(14%)。PEG ナノ球は、U87 のほうが良かった。(PEG、HAS)-(ロッド、スター)は、同様で、コントロールと差異無かった。 ⇒CTAB(リガンド)と NP との相互作用の強さは、NP のモルフォロジーが影響。 ・細胞からの乳酸脱水素酵素(LDH)の放出(Pierce LDH 細胞毒性アッセイキット、Termo Fisher;細胞膜破壊(⇒ネクローシス)情報提供): 4、24 時間ばく露後、放出 LDH 量は、hfb においてより多い。しかし、CTAB-ナノ球は、細胞を問わず、大規模な細胞膜破壊を起こしたようだ。CTAB、PEG-ナノスターは、24 時間後

	<p>に、hfbにおいてより多くの量を放出したが、U87 では変化なしで、hfbが影響を受けた(ネクローシス)。</p> <p>・細胞活性酸素種産生 (DCFDA 細胞 ROS 検知アッセイキット(Abcam) ;ネクローシス、アポトーシスによる細胞死を起こす炎症情報) :</p> <p>ROS 産生は、hfbより U87 において、より低かった。経時的に増加。CTAB-ナノ球は、両細胞において、低かった(リン脂質二重層の効果)が、CTAB-ナノスターは高かった(サイズの効果)。(PEG、HAS)-(球、スター)の両細胞において増加、スターは穏やかだった。</p> <p>・アポトーシスの誘発(EnzChek Caspase-3 アッセイキット、Termo Fisher;アポトーシス情報) :</p> <p>ばく露 24 時間後、U87 において、細胞内 Caspase 3/7 活性増加し、CTAB、HAS に比べ、PEG-粒子のほうがより多く活性。</p> <p>⇒U87 はアポトーシス、hfbはネクローシスを被ったようだ。</p> <p>②細胞摂取(取込み)試験(100µg/mL の PEG 及び HAS 被覆金ナノスターへばく露:細胞中の金属濃度を ICP-MS で測定) :</p> <p>(TEM 観察)</p> <p>PEG、HAS-ナノスターは、24 時間ばく露後、両細胞中に内在化。核中には粒子なし。HAS-は、hfbにおいて、核周囲域に多く位置し、PEG-は HAS-よりも多く、U87 内で見つめられた。両細胞において、粒子のほとんどは異なったサイズの小胞内にあるのが見つかかり、ほんのわずかがサイトゾル中で観察された。U87 は、激しい細胞質膜損傷、核周囲でのクロマチン濃縮、液胞形成(オートファジーを示す)、アポトーシス体を示した(⇒これらはアポトーシスを示す)。hfbは、広範囲なミトコンドリア損傷、細胞膜損傷を示し、ネクローシス経路の死に繋がった。</p> <p>(ICP-MS)</p> <p>hfbに比べ、U87 はより高い金摂取を示した(100ng/細胞、500 ng/細胞)。ナノスターが最高に摂取された(表面化学)。細胞毒性と摂取量の明確な相関は無かった(影響を及ぼすナノ粒子の用量ではなかったことを示唆)。</p>
<p>結論</p>	<p>本研究は、金ナノスターが、PEG のような適切なりガンドによって被覆された場合顕著な毒性を引き起こすこと無しに、健康な及び病気の細胞の両方によって効果的に取り込まれることができ、同等の用量および表面化学で他のナノ粒子形状と比較してより少なく有害であると考えられることができることを示した。特にナノ粒子の <i>in vivo</i> アプリケーションにとって、標的病気細胞の周辺の健康な細胞及び組織を含む完全な細胞毒性評価は、医療分野でのこれらのナノ構造の適用性に影響を与える健康関連懸念を減らすために、実行されるべきである。</p>

(9) Fe₂O₃

No	Fe2O3-1 (SWCNT、MWCNT についても記載)
論文題目 (和訳)	Single-walled carbon nanotube, multi-walled carbon nanotube and Fe ₂ O ₃ nanoparticles induced mitochondria mediated apoptosis in melanoma cells (単層カーボンナノチューブ、多層カーボンナノチューブ及びFe ₂ O ₃ ナノ粒子は、メラノーマ細胞におけるミトコンドリア媒介アポトーシスを誘導した)
著者 所属機関	Parvaneh Naserzadeh ^a , Fatemeh Ansari Esfeh ^a , Mahboubeh Kaviani ^a , Khadijeh Ashtari ^d , Raheleh Kheirbakhsh ^b , Ahmad Salimi ^c & Jalal Pourahmad ^a a) Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran; b) Cancer Biology Research Center, Cancer Institute of Iran, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran; c) Department of Pharmacology and Toxicology, School of Pharmacy, Ardabil University of Medical Science, Ardabil, Iran; d) Department of Medical Nanotechnology, Faculty of Advanced Technology in Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
書誌事項	CUTANEOUS AND OCULAR TOXICOLOGY, 2017
試験物質	単層カーボンナノチューブ [†] (SWCNT)、多層カーボンナノチューブ [†] (MWCNT)、Fe ₂ O ₃ ナノ粒子 (IONPs)を含む高密度で現在生産されている3つのナノ粒子。
試料調整法	メラノーマ腫瘍の調製 ;腫瘍を、F10 メラノーマ細胞を有する別のマウスから皮膚内に接種。麻酔後、体外の後胸部の小さな切開を行い、腫瘍の一部を抜き取り、小さな部分(各約 2mm)に分けた。メスを使用して、それらを皮膚の下に置き、これらの部分すべてを縫合。腫瘍の大きさは、デジタルキャリパーを用いて3日毎に測定。体積は O'reilly et al. の、52v=(腫瘍重量) 2(腫瘍長)0.52により計算。本研究は、Shahid Beheshti 医科大学研究倫理委員会により承認。 ミトコンドリアの調整;動物を断頭し、がん性の正常な皮膚を切開後、ミトコンドリアを4℃で単離、分画遠心分離により新たに調製した試料を採取。全ての実験において「フラットフォード」試験(標準としてのBSA)からのミトコンドリアタンパク質濃度を0.5mg タンパク質/mlに調整、試料の実験条件の均一化及び標準化を達成。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	細胞毒性試験 ;細胞(1~10 ⁴ 細胞/ウェル)をプレート中で、50mLの最終容量で48時間、アセチン存在下/非存在下で培養。処理終了時に、20ml MTT(PBS中5mg/ml)を各ウェルに添加、37℃でさらに4時間培養。紫色のMTTホルマサン沈殿物を100ml DMSOに溶解、ELISAリーダーで吸光度(570nm)測定。 カスパーゼ3活性 ; 「シグマのカスパーゼ3アッセイキット(CASP-3-C)」 を用い異なる処理からの細胞溶解物中で測定。 コハク酸デヒドロゲナーゼ活性 ;ミトコンドリア複合体II(コハク酸デヒドロゲナーゼ又はSDH)の活性を、MTT減少の測定により試験。 ミトコンドリア膨潤アッセイ ;ミトコンドリア懸濁液(100mg タンパク質/ウェル)を、25℃で、膨潤緩衝液(140mmol/l KCl、10mmol/l NaCl、2mmol/l MgCl ₂ 、0.5mmol/l KH ₂ PO ₄ 、20mmol/l HEPES、0.5mmol/l EGTA; 1mg/ml ロテンン及び10mmol/l コハク酸塩を補充したKOHでpH7.2に調整)。ミトコンドリアの腫瘍長を、1時間の持続時間で分光光度的に測定。ミトコンドリアの腫瘍長は、540nmでモニターされる吸光度を減少。 ミトコンドリア ROS 形成アッセイ ;精製ミトコンドリアを単離、呼吸緩衝液(0.32mM スクロース、10mM Tris、20mM Mops、50μMEGTA、0.5mM MgCl ₂ 、0.1mM KH ₂ PO ₄ 及び5mM コハク酸ナトリウム)に入れた。この後、DCFH-DA 添加(最終濃度10μM)、37℃で1時間、種々の濃度のナノ粒子を添加。フローサイトメリー(BD)で蛍光強度変化を測定。 ミトコンドリア MMP 崩壊アッセイ ;MMP アッセイ緩衝液(220mM スクロース、68mM D-マンニトール、10mM KCl、5mM KH ₂ PO ₄ 、4.2mM MgCl ₂ 、50μMEGTA、5mM コハク酸ナトリウム、10mM リン酸緩衝液)中の10mM ローダミン123と共にミトコンドリア画分(1000mg タンパク質/ HEPES、2μM ロテンン)を添加、次に37℃で1時間、種々の濃度のナノ粒子を添加。フローサイトメリー(BD)を用いて蛍光強度変化を測定。 シクロム c 放出アッセイ ;シクロム c の濃度は、Quantikine Rat / Mouse Cytochrome c Immunoassay キット(Minneapolis, MN)を用いて測定。at / Mouse Cytochrome c Immunoassay キット(Minneapolis, MN)を用いて測定。
試験結果	細胞生存率 ;濃度に対して細胞生存率の有意な低下を示した。特に Fe ₂ O ₃ ナノ粒子は最大の細胞傷害活性を示した。活性は、この化合物のサイズおよび磁気効果に起因すると推定

	<p>される。本知見は、毒性に対する分子サイズ/親油性の増強効果に関する一般的な傾向に従うかもしれない。Fe₂O₃ > SWCNT > MWCNT の順に増加する試験化合物の細胞傷害活性を図 1 に示す。</p> <p>カスパーゼ-3 アッセイ; 全ナノ粒子は、正常細胞ではなくメラノーマ細胞でのみアポトーシス最終メディエーター、カスパーゼ-3 の活性を有意に増加させた(図 2)。Cs.A 及び BHT のみが Z-IETD によってナノ粒子がカスパーゼ-3 活性化を誘導するのを妨げ ($p < .001$)、これらナノ粒子がアポトーシスで終結するメラノーマ細胞における ROS 介在ミトコンドリア内因性経路を活性化することを示唆した。</p> <p>SDH 活性; SWCNT、MWCNT、及び Fe₂O₃ ナノ粒子は、癌性で健康ではないミトコンドリアで用量依存的にコハク酸デヒドロゲナーゼ活性のみを阻害した。特に、Fe₂O₃ ナノ粒子は、癌性ミトコンドリアにおいて SDH に対して最大の阻害効果を示した(図 3)。</p> <p>ROS 形成; 全ナノ粒子は、使用濃度で癌性ミトコンドリアにおいて ROS 生成を有意に誘導した ($p < .05$、図 4)。これらの結果は、ROS 生成を誘導するこれらナノ粒子が CLL 細胞アポトーシス促進への影響の根底にある可能性を示唆したが、使用濃度が正常ミトコンドリアにおいて ROS 生成を上昇させないことを示した。</p> <p>MMP アッセイ; SWCNT、MWCNT 及び Fe₂O₃ ナノ粒子への添加で、1 時間は、これらのナノ粒子へのばく露後にメラノーマ細胞から得られたミトコンドリアにおいて $\Delta\Psi_m$ の減少を示した(図 5)。正常ミトコンドリア上へのナノ粒子の同濃度の添加は、全てのナノ粒子において $\Delta\Psi_m$ の有意な減少を示さなかった(図 5)。</p> <p>ミトコンドリアの腫瘍長; SWCNT、MWCNT、及び Fe₂O₃ ナノ粒子の添加は、メラノーマ細胞から得られた癌性ミトコンドリアにおけるミトコンドリアの腫瘍長をもたらした(図 6)。同濃度で試験したナノ粒子を正常ミトコンドリアに添加しても、ミトコンドリアの腫瘍長は誘発されなかった(図 6)。</p> <p>シクロム c; SWCNT、MWCNT 及び Fe₂O₃ ナノ粒子が、ミトコンドリア膜電位のミトコンドリア膨潤および崩壊を有意に引き起こすことを示した。これらの事象は、ミトコンドリア透過性移行 (MPT) 及びミトコンドリアから培養緩衝液へのシクロム c 放出をもたらし得る。試験した全てのナノ粒子は、癌性ミトコンドリア上で有意な ($p < .05$) シクロム c 放出を誘導したが、正常な健康ドナーでは誘導しなかった(図 7)。重要なことに、MPT 阻害剤、Cs. A 及び ROS スカベンジャーである BHT によるナノ粒子処理ミトコンドリアの前処理は、酸化ストレス及び MPT の役割を示す唯一のナノ粒子で処理したグループと比較して、使用したナノ粒子の細孔開口はシクロム c 放出を誘導した。</p>
結論	<p>3 つのナノ粒子の毒性を、正常細胞および黒色腫細胞と比較した。</p> <p>すべての試験ナノ粒子は、メラノーマ細胞およびミトコンドリアにおけるミトコンドリア経路を介した選択的毒性およびカスパーゼ-3 活性化を引き起こし、活性酸素種 (ROS)、ミトコンドリア膜電位低下 (MMP 崩壊)、ミトコンドリア膨潤およびシクロム c 放出を引き起こした。ブチル化ヒドロキシルエン (BHT) の前処理、細胞透過性酸化防止剤とシクロスポリン A (Cs.A)、ミトコンドリア透過性転移 (MPT)、細胞毒性を低下させる細孔封鎖剤、カスパーゼ-3 活性化、ROS 生成、とミトコンドリア損傷は、MWCNT、および IONPs により誘発された。本研究結果は、SWCNT、MWCNT、及び Fe₂O₃ ナノ粒子が、癌細胞におけるミトコンドリアを直接および選択的に標的化することによって抗癌剤候補として有望であり得ることを示唆し、それゆえに、これらは ROS 媒介ミトコンドリア経路を介して細胞死を誘発し、最終的にシクロム c 放出、カスパーゼ-3 活性化および癌性メラノサイトにおけるアポトーシスを導く可能性がある。</p>

No	Fe2O3-2
論文題目 (和訳)	Recurrent exposure to ferric oxide nanoparticles alters myocardial oxidative stress, apoptosis and necrotic markers in male mice (酸化鉄ナノ粒子への反復ばく露は、雄マウスにおける、心筋酸化ストレス、アポトーシスおよび壊死マーカーを変化させる)
著者 所属機関	V. Manickam, M. Periyasamy, V. Dhakshinamoorthy, L. Panneerselvam, E. Perumal Department of Biotechnology, Bharathiar University, India
書誌事項	Chemico-Biological Interactions; 278 (2017), 54-64 http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2017.10.003
試験物質	Fe ₂ O ₃ ナノ粒子(酸化鉄 NPs)は Sigma-Aldrich より購入;詳細は著者らの以前の研究、Toxicol. Appl. Pharmacol. 317 (2017) 12-24 に。粒子はナノ粒子の微細な凝集体で、ゼータ値は正味の正の電荷を示し、水溶液中で安定。
試料調整法	ナノ粒子(< 50 nm)は 0.9%生理食塩水に溶解し、4℃で 5 分間、20Hz で超音波処理したものを所定の濃度で使用する。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	<ul style="list-style-type: none"> ・インド、トリスールのケララ農業大学実験動物センターから調達された、25~30g の体重範囲の雄性アルビノマウス(8 週齢)を使用。 ・対照および実験群の動物に、0.9%生理食塩水および Fe₂O₃ ナノ粒子をそれぞれ 25mg/kg(低用量)および 50mg/kg(高用量)で、30 日間、腹腔内投与した(それぞれ 7 日間隔で投与する)。(用量は著者らの過去の研究から決められた。) ・最後の処理の 24 時間後、動物は頸部を切断し、血液を採取し血清を分離。心臓は切除し、組織をホモジナイズする。 ・解析方法 心電図(ECG)解析、MRI による酸化鉄ナノ粒子の存在のイメージング、プルシアンブルーによる組織中の鉄の染色、心臓機能評価のマーカー(LDH、CK-MB)分析、心筋組織中の全たんぱく質・AChE 活性の推定、心筋組織中のオキシダント・抗酸化物質の生化学的分析、ミトコンドリア分析、ATP レベル決定、細胞死マーカーのウェスタンブロットング分析、細胞死マーカーのための心筋の免疫組織染色、心房直下の心臓の TTC 染色。
試験結果	<ul style="list-style-type: none"> ・食物消費と水分摂取において、対照群および実験群で大きな変化はなかったが、酸化鉄 NPs を与えられた動物において体重増加の有意な減少が観察され、さらに、有機体質指数の、用量に依存した減少が見られた。 ・心電図解析 高容量で HR, PR, QTc, QST, ST(心電図形の指標)の有意な上昇と RR 間隔の減少が見られ、低用量でも同様であった。 ・観測された MR 信号の差は、25mg/kg - 体重にばく露されたマウスについて、心臓および肝臓でそれぞれ、7.1 および 14.9%であった。投与量が 50mg/kg に増加したときも同様であった。 ・酸化鉄 NPs を与えられた動物では、鉄含有量の有意な用量依存性増加が、血清、肝臓および心臓組織で見出された。プルシアンブルー染色は、対照群と比較して、酸化鉄 NPs の蓄積による鉄の増加を示した。 ・酸化鉄 NPs は、全たんぱく質の増加、AChE 活性の減少、心臓機能マーカー酵素(LDH,CK-MB)のレベルの増加をもたらした。 ・酸化鉄 NPs は、心臓オキシダントマーカー、オキシダント(ROS,LPO,PC,NO)のレベルを増加させた。 ・損傷していないミトコンドリアの有意な減少が、ばく露した動物で観察された。ルシフェラーゼアッセイは、対照と比較してばく露群における ATP 濃度の用量依存的な減少を示した。 ・酸化鉄 NPsは、心臓の抗酸化物質(SOD, CAT, GSH-Px, GST, GSH, VitaminC)レベルを枯渇させ、心臓組織における酸化ストレス、アポトーシスおよび壊死マーカーに変化をもたらした。 ・心臓切片の免疫染色は、酸化鉄 NPsにばく露された動物において陽性に染色された細胞の数が増加した。一方、カスパーゼ-3p20 染色では、陽性染色された細胞の数は、25mg/kg 処置群で、50mg/kg 処置群およびコントロールと比較した場合、増加した。 ・TTC 染色は、白い壊死領域の輪郭の存在を示した。
結論	本研究は、酸化鉄 NPs へのばく露がマウスモデルにおける心臓毒性を誘起することを示した。反復酸化鉄 NPs 投与は、過剰の ROS を生成し、抗酸化剤レベルを枯渇させることによって心臓組織に酸化ストレスをもたらす。持続的な酸化ストレスは、アポトーシスおよび壊死をもたらす、心筋細胞の変性および心臓機能不全をもたらす。しかし、これらの研究結果のメカニズムの詳細を理解するためにはさらなる研究が必要である。

(10) Ni

No	Ni-1																																				
論文題目 (和訳)	Genotoxic and Mutagenic Properties of Ni and NiO Nanoparticles Investigated by Comet Assay, c-H2AX Staining, Hpvt Mutation Assay and ToxTracker Reporter Cell Lines (コメットアッセイ、c-H2AX 染色、Hpvt 突然変異アッセイおよびトックストラッカーレポーター細胞株によって調べられた Ni および NiO ナノ粒子の遺伝毒性および変異原性)																																				
著者 所属機関	E. Åkerlund, ¹ F. Cappellini, ¹ S. Di Bucchianico, ¹ S. Islam, ¹ S. Skoglund, ² R. Derr, ³ I. Odnevall Wallinder, ² G. Hendriks ³ and H. L. Karlsson ¹ ¹ Karolinska Institutet, Sweden ² KTH Royal Institute of Technology, Sweden ³ Toxys, Netherlands																																				
書誌事項	Environmental and Molecular Mutagenesis. 2017 Dec 15. doi: 10.1002/em.22163. [Epub ahead of print]																																				
試験物質	試験対象ナノ粒子 (Sigma-Aldrich より購入) の特性: <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>BET 面積</th> <th>一次粒径</th> <th>純度</th> <th>DMEM (含血清) 中 Ni 放出量</th> <th>RPMI/LIC-9 中 Ni 放出量</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Ni</td> <td>6.41 m²/g</td> <td><100 nm</td> <td>>99%</td> <td>~2%</td> <td>~2%</td> </tr> <tr> <td>NiO</td> <td>102 m²/g</td> <td><50 nm</td> <td>>99.8%</td> <td>~3%</td> <td>~6%</td> </tr> </tbody> </table> <ul style="list-style-type: none"> 参照 (比較) 物質; NiCl₂·6H₂O (溶解してイオン化) 細胞媒体中 Ni 放出量は ICP-MS で、粒径は動的光散乱法 (PCCS) により測定。 		BET 面積	一次粒径	純度	DMEM (含血清) 中 Ni 放出量	RPMI/LIC-9 中 Ni 放出量	Ni	6.41 m ² /g	<100 nm	>99%	~2%	~2%	NiO	102 m ² /g	<50 nm	>99.8%	~3%	~6%																		
	BET 面積	一次粒径	純度	DMEM (含血清) 中 Ni 放出量	RPMI/LIC-9 中 Ni 放出量																																
Ni	6.41 m ² /g	<100 nm	>99%	~2%	~2%																																
NiO	102 m ² /g	<50 nm	>99.8%	~3%	~6%																																
試料調整法	<ul style="list-style-type: none"> 対応する細胞媒体中に濃度 1mg/mL の粒子懸濁液を作成。 次に室温中で、水浴中 15 分間、ボルテックス及び超音波攪拌し、100µg/mL に希釈した溶液を実験ごとに作成し、対応する用量を細胞に直接加える。細胞はそれぞれの物質の新鮮な質量濃度にばく露されることになる。 																																				
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	<ul style="list-style-type: none"> アラマールブルーアッセイ (細胞増殖アッセイ); HBEC (ヒト気管支上皮細胞)、用量 5, 10, 25, and 50 mg Ni/mL、ばく露 24 時間、96-well plates、最終体積 100µL コメットアッセイ (DNA 鎖切断測定); HBEC 細胞、用量 5, 10, 25, and 50 mg Ni/mL、ばく露 24 時間、24-well plates、最終体積 600µL γ-H2AX アッセイ (DNA 損傷レベル検出); HBEC 細胞、用量 5, 10, and 25 mg Ni/mL、ばく露 3, 24 時間、最終体積 2mL 無細胞 DCFH-DA アッセイ; 25 mL の 10, 25, and 50 µg/mL of Ni と 15 µM DCFH in a black 96-well plate 細胞内 ROS 産生分析; 1×10⁴ HBEC 細胞を well 毎に接種/black and clear bottom 96-well plates、用量 5, 10, 25, and 50µg Ni/mL で 3 時間ばく露 トックストラッカーアッセイ・レポーター細胞ライン実験; 6 種類の緑色蛍光たんぱく質 (GFP) 導入細胞ライン、Srxn1-GFP, Blvrb-GFP, Bsc12-GFP, Rtkn-GFP, Btg2-GFP, and Ddit3-GFP をゼラチンコートした 96-well plates に接種し NP にばく露。 Hpvt 突然変異アッセイ; IB10mES (マウス胎児幹細胞、用量 0.5, 1, 5, and 10 µg Ni/mL) 及び V79-4 細胞 																																				
試験結果	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Ni ナノ粒子</th> <th>NiO ナノ粒子</th> <th>NiCl₂</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>細胞毒性 (HBEC ≤50µg/mL)</td> <td>無</td> <td>無</td> <td>小 50µg/mL で</td> </tr> <tr> <td>DNA 鎖切断 (HBEC ≤25µg/mL)</td> <td>有 10µg/mL から</td> <td>有 5µg/mL から</td> <td>無</td> </tr> <tr> <td>DNA 二重鎖切断 (HBEC ≤25µg/mL)</td> <td>無</td> <td>無</td> <td>無</td> </tr> <tr> <td>無細胞 ROS</td> <td>僅少</td> <td>有</td> <td>僅少</td> </tr> <tr> <td>細胞内 ROS</td> <td>僅少</td> <td>有</td> <td>無</td> </tr> <tr> <td>細胞毒性 (レポーター細胞)</td> <td>有</td> <td>有</td> <td>有</td> </tr> <tr> <td>酸化ストレス (レポーター誘起)</td> <td>有</td> <td>有</td> <td>有</td> </tr> <tr> <td>DNA 損傷 (レポーター誘起)</td> <td>無*</td> <td>無*</td> <td>無*</td> </tr> </tbody> </table>		Ni ナノ粒子	NiO ナノ粒子	NiCl ₂	細胞毒性 (HBEC ≤50µg/mL)	無	無	小 50µg/mL で	DNA 鎖切断 (HBEC ≤25µg/mL)	有 10µg/mL から	有 5µg/mL から	無	DNA 二重鎖切断 (HBEC ≤25µg/mL)	無	無	無	無細胞 ROS	僅少	有	僅少	細胞内 ROS	僅少	有	無	細胞毒性 (レポーター細胞)	有	有	有	酸化ストレス (レポーター誘起)	有	有	有	DNA 損傷 (レポーター誘起)	無*	無*	無*
	Ni ナノ粒子	NiO ナノ粒子	NiCl ₂																																		
細胞毒性 (HBEC ≤50µg/mL)	無	無	小 50µg/mL で																																		
DNA 鎖切断 (HBEC ≤25µg/mL)	有 10µg/mL から	有 5µg/mL から	無																																		
DNA 二重鎖切断 (HBEC ≤25µg/mL)	無	無	無																																		
無細胞 ROS	僅少	有	僅少																																		
細胞内 ROS	僅少	有	無																																		
細胞毒性 (レポーター細胞)	有	有	有																																		
酸化ストレス (レポーター誘起)	有	有	有																																		
DNA 損傷 (レポーター誘起)	無*	無*	無*																																		

	たんぱく質ストレス(レポーター誘起)	有 (高細胞毒性時 で)	有 (高細胞毒性時 で)	有 (高細胞毒性時 で)
	Hprt 突然変異 (mES ≤ 5µg/mL)	無	1 用量のみ	無
	*Rtkn レポーターで緩やかな増加、閾値の 2 倍には達しない。			
結論	<p>•DNA 損傷が、肺上皮細胞(血清を含まない条件で培養)において、主に DNA 一本鎖切断の形で、Ni および NiO の NP にばく露することによって誘発され、一方、可溶性 NiCl₂ で導入された Ni イオン/錯体については効果が観察されなかった。</p> <p>•NiO について、1 回の用量でのみ、小さいが統計的に有意な Hprt 突然変異の増加が観察された。</p> <p>•6 つの異なるレポーター細胞株では、酸化ストレスが主な(遺伝)毒性機序であると結論づけられ、高用量でタンパク質の折り畳みのアンフォールディングが発生した。いずれの Ni 含有材料も、直接的な DNA 損傷レポーターに関連した DNA 損傷および DNA 複製フォークを誘起しなかった。</p> <p>•総じて、Ni および NiO ナノ粒子は、Ni イオン/複合体に比較して顕著な(遺伝)毒性効果を示し、より重篤な健康状態の懸念を示すと結論される。遺伝毒性の一次メカニズムとしての酸化ストレスの同定は、発癌性ハザードおよび、DNA と直接相互作用する薬剤に比べて閾値用量応答が低いことを示唆している。</p>			

(11) ナノクレイ

No	クレイ-1
論文題目 (和訳)	Toxicity evaluations of nanoclays and thermally degraded byproducts through spectroscopical and microscopical approaches. (分光学的および顕微鏡的アプローチによるナノクレイおよび熱的に分解された副産物の毒性評価)
著者 所属機関	Wagner A ¹ , Eldawud R ¹ , White A ¹ , Agarwal S ¹ , Stueckle TA ² , Sierros KA ³ , Rojanasakul Y ⁴ , Gupta RK ¹ , Dinu CZ ¹ . 1 Department of Chemical and Biomedical Engineering, West Virginia University, Morgantown, WV 26506, USA. 2 National Institute for Occupational Safety and Health, Morgantown, WV 26505, USA. 3 Department of Mechanical and Aerospace Engineering, West Virginia University, Morgantown, WV 26506, USA. 4 Department of Pharmaceutical Sciences, West Virginia University, Morgantown, WV, 26506, USA.
書誌事項	Biochim Biophys Acta. 2017 Jan;1861 (1 Pt A) :3406-3415. doi:10.1016/j.bbagen.2016.09.003. Epub 2016 Sep 7.
試験物質	・未処理 Cloisite Na+ (UC):改質なしモンモリロナイト、 ・Cloisite 30B (CC):90meq/100g クレイ濃度で、メチル、獣脂、ビス-2-ヒドロキシエチル、第4級アンモニウムと:有機的にイオン交換反応により改質。 ・熱分解 Cloisite Na+ (UC900) ・熱分解 Cloisite 30B (CC900)
試料調整法	・UC、CC:熱分解
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	【細胞株】不死化ヒト気管支上皮細胞 (BEAS-2B):1%L-glutaminin,1%ペニシリン-ストレプトマイシン含有培地中で培養。全細胞は、0.25%トリプシン (Invitrogen)を用いて規則的に継代し、37℃、5%CO ₂ 、80%相対湿度で培養。各実験の前に、細胞を融合性単層に増殖。 【試験種類】 ・電気セル基板インピーダンス試験 ・生存細胞数計数:BEAS-2B 細胞に、100µg/ml 用量の UC、CC、熱分解副生成物を 24 時間、48 時間、72 時間ばく露。 ・細胞生存率:BEAS-2B 細胞に、100µg/ml UC、CC、UC900、CC900 を 24、48、72 時間ばく露。 ・細胞イメージング:BEAS-2B 細胞に、100µg/ml UC、CC、UC900、CC900 を 24 時間ばく露。
試験結果	・ナノクレイとその熱分解副生成物の特性:UC は CC に比べて層化が少なく、滑らかなエッジを有する (図 2)。UC900 と CC900 は凝集した形態で存在し、均一な表面。UC と熱分解副生成物 UC900 との元素組成の有意差なし。CC900 と CC の炭素量鎖は熱分解による有機変性剤の損失による。有機修飾物質の存在により、CC は他の 3 サンプルと比較して、培地と PBS の両方でより直径が小さくなったが、CC900 の熱分解サンプルは、CC と比較して、それぞれ 35、36%増加。 ・ナノクレイ又は熱分解副生成物へのばく露による細胞挙動評価:BEAS-2B 上皮細胞は、物質がヒト肺中に呼吸により導入された場合に、第 1 の防御システムとして機能することを示した。クレイ又は副生成物で処理した細胞の抵抗性がコントロールと比較して低下することを示した (図 4)。特に、CC の抵抗性が最大で、処置後 6 時間後にはほぼ完全な損失を示した。UC、UC900、CC900 で処置した細胞は、抵抗性 (領域 C) を回復/維持できた。耐性の傾向は、UC 及び UC900 で同様、CC900 でわずかに低い。 ・ナノクレイ又は熱分解副生成物の細胞変化に関与するメカニズム:CC は細胞-基質相互作用において完全な損失を示したのに対し、UC 処理細胞は α の減少を示したが、クレイ除去後に細胞-基質相互作用 (領域 C) を維持した。UC900 と CC900 は細胞-基質間相互作用が維持されていることを示したが、抵抗性が低く、細胞形態の変化が起こったことを示した。CC900 は細胞回復を確認。ナノクレイは有意な毒性効果を誘導し、時間依存性を示した Cloisite 30B は、それぞれコントロールと初期ナノクレイと関連した時間依存性を示す生存細胞数および細胞生存率の低下を示した。副産物はより少ない毒性効果をもたらした。全ての処置は、ばく露時に細胞形態の変化を引き起こした。
結論	ECIS (電気セル基板インピーダンス試験) は、非侵襲的で高スループットでリアルタイムの方法でクレイまたは副生成物の毒性プロファイルを同定する新しい手段を提供した。具体的には、クレイまたは熱分解された副生成物として処理した後の BEAS-2B 細胞で観察された形

態学的、行動的および生存率の変化は、そのような試料が製造環境または廃棄環境の両方で使用されると毒性効果を生じる可能性があることを示した。有機改質ナノクレイ CC は、細胞－基質および細胞－細胞相互作用における大きな損失および 72 時間までの最大細胞集団損失に最も近い、最も大きな毒性効果を有していた。対照的に、その熱的に分解された副生成物である CC900 は、既知の発癌性カーボンブラックと同様の毒性プロファイルを示唆する可能性がある細胞増殖を誘導した。UC およびその熱的に分解された対応物、UC900 は、ほとんど有意な毒性作用を示さなかった。

No	クレイ-2
論文題目 (和訳)	Hepatotoxicity and Drug/Chemical Interaction Toxicity of Nanoclay Particles in Mice マウスにおけるナノクレイ粒子の肝毒性と医薬品/化学物質相互作用毒性
著者 所属機関	Katsuhiko Isoda*, Ryutaro Nagata, Tomoya Hasegawa, Yuichiro Taira, Ikuko Taira, Yoshimi Shimizu, Kazuo Isama, Tetsuji Nishimura and Isao Ishida * Correspondence: k.isoda@thu.ac.jp Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo Heisei University, 4-21-2 Nakano-ku, Tokyo 164-8530, Japan
書誌事項	Nanoscale Research Letters (2017) 12:199
試験物質	<ul style="list-style-type: none"> ・ナノクレイ粒子(モンモリロナイト):Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO)から購入。 1nm の1つの側を持つ層状粒子サイズの粉体。Zetasizer (Sysmex Co., Kobe, Japan) 測定の粒子サイズ分布は、57.8±12.3nm(ピーク1、体積43.6%)、1nmの1つの側を持つ層状粒子サイズの粉体。Zetasizer (Sysmex Co., Kobe, Japan)測定の粒子サイズ分布は、57.8±12.3nm(一次粒子;ピーク1、体積43.6%)、648.3±232.2648nm(凝集粒子;ピーク2、体積56.4%)。 ・パラコート(除草剤)(生理食塩水に溶解) ・シスプラチン(生理食塩水に溶解) ・四塩化炭素(オリーブ油に溶解) ・医療用水(vehicle control)
試料調整法	医療用水(扶桑薬品工業、日本)中に20mg/mlの濃度で分散。使用前に超音波処理して分散、水希釈。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	<p>試験生物:8週齢BALB/cマウス;船橋ファーム株式会社(千葉県)から購入。 投与方法・期間・試験用量: 注射1回。投与24時間後、殺処分。</p> <p>① ナノクレイ粒子(単独での肝毒性用量依存性);0、1、5、10、20mg/kg ② 化学物質(腹腔内投与)とナノクレイ(尾静脈内注入)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・四塩化炭素;0.01ml/kg(肝障害を誘発しない用量)+NC;5mg/kg ・パラコート;50mg/kg+NC;5mg/kg ・シスプラチン;80μmol/kg+NC;5mg/kg
試験結果	<p>生化学的解析(血清アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)とアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)は、酵素で肝障害で血液中に漏れ、肝障害の重要な指標。血液尿素窒素(BUN)は、腎臓が正常に働いている時に検査されるインデックスで、BUN値の上昇は腎機能の劣化の尺度。)および組織学的分析:</p> <p>① 20mg/kg(最大用量)のナノクレイ粒子で、急性肝障害観察。広範な損傷を示した。 ② 共投与</p> <ul style="list-style-type: none"> ・四塩化炭素とナノクレイ粒子5mg/kgの投与で、血清ALTとASTレベル上昇。 ・ALTレベル:NC単独;41.5、パラコート単独;48.3→共投与;126.6(相乗的上昇) ・ASTレベル:NC単独;257.6、パラコート単独;354.6→共投与;634.1(相加的上昇) ・シスプラチンとNCの共投与は、ALTとASTレベルを相乗的に上昇。血清BUNレベルも上昇。
結論	ナノクレイ粒子が肝臓の損傷を引き起こすことがあり、この影響は、肝毒性化学物質や医薬品との相互作用の結果として相乗的に悪化することがあることが実証された。これらのデータに基づくさらなる研究は、人間の医学での使用のために提案されたナノ粒子の毒性プロファイルを完全に明らかにするために必要とされている。

(12) ナノセルロース

No	セルロース-1
論文題目 (和訳)	<i>In vitro</i> biological responses to nanofibrillated cellulose by human dermal, lung and immune cells: surface chemistry aspect. (ヒト皮膚、肺、免疫細胞によるナノフィブリル化セルロースに対する <i>in vitro</i> の生物学的応答: 表面化学アспект)
著者 所属機関	Viviana R. Lopes ¹ , Carla Sanchez-Martinez ² , Maria Strømme ¹ and Natalia Ferraz ¹ 1 Nanotechnology and Functional Materials, Department of Engineering Sciences, Uppsala University, Box 53475121 Uppsala, Sweden. 2 Present affiliation: Ocular Biology and Therapeutics, UCL Institute of Ophthalmology, 11-43 Bath Street, EC1V 9EL London, UK.
書誌事項	Part Fibre Toxicol. 2017 Jan 10;14(1):1. doi: 10.1186/s12989-016-0182-0.
試験物質	NFC(ナノフィブリル化セルロース): 商用で、全く乾燥していない、漂白された軟質木材溶解パルプより生成。未修飾 NFC(U-NFC)、カルボキシメチル化 NFC、ヒドロキシプロピルトリメチルアンモニウム NFC、アニオン NFC(A-NFC)、カチオン NFC(CNFC)。参照物質: 食品グレード微結晶セルロース(MCC)。ポジティブコントロール: DMSO、ネガティブコントロール: 未処理細胞。 NFC ばく露懸濁液: U-NFC、A-NFC、C-NFC のストック溶液を PBS 中で 5mg/ml で調整し、超音波プローブで 12 分間分散
試料調整法	NFC の合成・表面修飾;【U-NFC】パルプの酵素前処理により調整。【A-NFC、CNFC】カルボキシメチル化及び、ボックスプロピルトリメチルアンモニウムクロライド(EPTMAC)四級化前処理により調整。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	【細胞培地】ヒト皮膚線維芽細胞(HDF)、ヒト MRC-5 肺線維芽細胞株、ヒト THP-1 単球細胞株。 【投与方法】最終ストック溶液を、それぞれ 45 分 2 サイクル中に UV 処理した C-NFC を除き、オートクレーブにより滅菌。ばく露前に、ストック溶液を細胞培養培地(濃度範囲 50-500µg/ml)で希釈、水浴超音波処理器で 30 分間超音波処理後、細胞に添加。 MRC-5 と HDF 細胞は DMEM/F12 培地、THP-1 細胞は 10%(v/v) 熱不活性化ウシ胎児血清 UFBS)、100IU/ml ペニシリン、100µg/ml ストレプトマイシンを補完した RPMI1640 培地で培養。細胞を 37°C、5%CO ₂ 加湿大気中で培養、70-80%細胞密度で継代培養。 【試験種類・試験用量・ばく露期間】 ・細胞毒性評価; NFC50-500µg/ml に 24 時間ばく露。 ・細胞代謝活性: アラマーブルアッセイ(AB アッセイ)、細胞膜完全性: 乳酸デヒドロゲナーゼアッセイ ・細胞形態 - 光学顕微鏡 ・炎症評価: サイトカイン腫瘍壊死因子 α(TNF-α) およびインターロイキン 1β(IL1-β) の分泌レベルを定量化することによって評価。 ・ROS 生成: シクロジヒドロフルオレセイン二酢酸(DCFH-DA)アッセイ。 ・NFC の細胞取込み - TEM: NFC500µg/ml に 24 時間ばく露。
試験結果	【NFC の特徴】表面荷電基の導入は、個々のナノフィブリルを生じたが、フィブリル凝集体は、透過型電子顕微鏡で観察される未修飾 NFC ゲル懸濁液中で優勢。タンパク質の存在下では、表面修飾された NFC はコンパクトな凝集体を形成したが、非修飾 NFC の凝集パターンはタンパク質の存在下および生理学的緩衝液中で類似。 【細胞毒性】非改変および修飾 NFC ゲルは、ヒト真皮線維芽細胞、肺、マクロファージ細胞において細胞毒性を誘導せず。 【ROS 産生】THP-1 マクロファージによる有意な ROS 産生は見られず、細胞取り込みは観察されなかった。 【炎症応答】TNF-α および IL1-β レベルの上昇によって評価される非修飾 NFC で THP-1 マクロファージを処置した場合、炎症応答が検出。これは、表面荷電基が NFC に導入された場合には存在しなかった。
結論	データは、未修飾、カルボキシメチル化、およびヒドロキシプロピルトリメチルアンモニウム修飾 NFCs へのばく露に関連する細胞毒性効果がないことを示している。非修飾 NFC は、カルボキシメチルおよびヒドロキシプロピルトリメチルアンモニウム基などの表面修飾をナノフィブリルに導入することによって、さらに緩和される前炎症効果を示した。本知見は、NFC に対する炎症反応が物質表面化学によって引き起こされ、安全なナノセルロース材料を設計する可能性を開くことを示唆している。細胞が未修飾および表面修飾された NFC ゲルにばく露された場合、細胞毒性または有意な ROS 産生の徴候は見出されなかった。さらに、細胞の取り込みは観察されなかった。サイトカイン分泌の点で U-NFC による前炎症反応が見られ、この作用は、ナノフィブリル上に表面荷電基が存在する場合に抑制された。この知見は、NFC ゲルに対する炎症応答が、表面化学によって引き起こされ、安全なナノセルロース材料の設計の可能性を開くことを示唆している。

(13) 量子ドット

No	QD-1
論文題目 (和訳)	Quantum Dot Nanotoxicity Investigations Using Human Lung Cells and TOXOR Electrochemical Enzyme Assay Methodology. (ヒト肺細胞及び TOXOR 電気化学的酵素アッセイ方法論を使用する量子ドットナノ毒性調査)
著者 所属機関	O'Hara T, Seddon B, O'Connor A, McClean S, Singh B, Iwuoha E ¹ , Fuku X ¹ , Dempsey E. 1SensorLab, Department of Chemistry, University of the Western Cape, South Africa.
書誌事項	ACS Sens. 2017 Jan 27;2(1):165-171. doi: 10.1021/acssensors.6b00673. Epub 2017 Jan 5.
試験物質	メルカプトコハク酸(MHA)被覆 CdTe 量子ドット
試料調整法	MHA 被覆 CdTe 量子ドットは、Vaishnavi & Renganathan による方法の修正版に従って作製。原料は、CdCl ₂ 、MSA、NaHTe (Te 粉を NaBH ₄ で還元)。平均径 = 3.3±0.7 nm。量子ドットの内面空間 (d) = 0.39、0.32、0.24 nm。一部凝集(写真)。表面酸化あり。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	試験細胞: A549 ヒト肺上皮細胞 投与方法・期間: <i>in vitro</i> 、24 時間 試験用量: 0~1,000 µg/mL
試験結果	・電気化学的細胞毒性アッセイ: ≥ 50 µg/mL までの 24 時間ばく露の後に続く、酸性ホスファターゼ活性の濃度(細胞中の免疫活性の指標となる)による依存低下を検知。IC ₅₀ 値 = 118±49 µg/mL。 ・MTT アッセイ: 代謝活性の類似した濃度依存低下を検知。IC ₅₀ 値 = 157±31 µg/mL。 ・細胞摂取(ばく露 30 分後): オプティカルセクションング、XZ 面イメージングが、細胞面内への量子ドットの入り込みを示し、内在化を示した。
結論	インハウス TOXOR 電気化学的細胞毒性アッセイを用い、MHA 被覆 CdTe 量子ドットの哺乳類細胞への細胞毒性を初めて測定した。両法の 24 時間 IC ₅₀ 値は良く合致した。ナノ粒子が電気化学的アッセイシグナルを干渉した証拠はなかった。更なる作業は、他のタイプのナノマテリアル(TiO ₂ 、CNT など)などのスクリーニングに対する電気化学的アッセイの使用に焦点を当てていく。

No	QD-2
論文題目 (和訳)	Comparative study on toxicity of extracellularly biosynthesized and laboratory synthesized CdTe quantum dots. (細胞外生合成及び研究室合成 CdTe 量子ドットの毒性に関する比較研究)
著者 所属機関	Kominkova M ¹ , Milosavljevic V ¹ , Vitek P ² , Polanska H ³ , Cihalova K ¹ , Dostalova S ¹ , Hynstova V ¹ , Guran R ¹ , Kopel P ¹ , Richtera L ¹ , Masarik M ³ , Brtnicky M ³ , Kynicky J ³ , Zitka O ¹ , Adam V ¹ . 1 Department of Chemistry and Biochemistry, Mendel University in Brno, Czech Republic; Central European Institute of Technology, Brno University of Technology, Czech Republic. 2 Global Change Research Institute, The Czech Academy of Sciences, Czech Republic. 3 Central European Institute of Technology, Brno University of Technology, Czech Republic; Department of Physiology and Department of Pathological Physiology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Czech Republic.
書誌事項	J Biotechnol. 2017 Jan 10;241:193-200. doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.10.024. Epub 2016 Oct 29.
試験物質	・生物合成 CdTe 量子ドット(BioS) (大腸菌(NCTC 13216)による) 大腸菌溶液を CdCl ₂ 、クエン酸ナトリウム水和物、Na ₂ TeO ₃ 、MSA、Na ₂ BH ₄ 液で希釈。24 時間 37°Cで培養後、精製。Milli-Q 水に溶解保存。 ・研究室合成 CdTe 量子ドット(MW) (マイクロ波加熱:Moulick ら 2015;Skalickova ら 2013 参考) 酢酸カドミウムに MSA 液添加、次にアンモニア溶液、NaTeO ₃ 溶液、次に NaBH ₄ 添加。2 時間攪拌、水希釈後、50°Cでマイクロ波照射(加熱)。4°C暗室保存。
試料調整法	試験試料の項に記載。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	・試験生物: ヒト細胞株(HFF、PC-3、MCF-7) 購入先:Health protection Agency Culture Collection (Salisbury, UK) ・投与方法・ 期間及び試験用量 ①MTT 試験 培地量子ドット濃度:0、2、3、5、10、15、30、50、100、150 nM 培養時間:24 時間
試験結果	①MTT 試験 HFF 及び MCF-3 に対する細胞毒性(IC ₅₀)の差は、2つのタイプの量子ドットで 10%の範囲内であったが、PC-3 細胞株では、MW に対してより低い IC ₅₀ が測定された。
結論	量子ドットの細胞外合成は、いくつかの方法を使って、確かめられた。加えて、これらの粒子はキャラクタライズされ、マイクロ波合成を使って得られた粒子と比較された。ラマン分光法、質量分析、ゲル電気泳動を用いて得たデータを基に、量子ドットの表面が、それらの生物合成を仲介する有機化合物、多分 E.coli の分泌蛋白質、によって修飾されることが結論づけられる。加えて、Bios 量子ドットと MW 量子ドットの毒性が比較された。生物合成と研究室合成量子ドットの光学特性は、粒子の凝集が異なる条件で行われるため、大幅に違った。HFF 及び MCF-7 細胞株の MTT 試験によって立証された毒性の非常に小さい差違が、量子ドットの両タイプで観察された。しかし、PC-3 細胞株で、Bios 量子ドットは、化学的方法で合成されたそれらと比較した場合、大幅に低い毒性を示した。

3. ナノマテリアル等の安全対策に係る国際動向調査

3.1. ナノマテリアル等利用製品の国際規制動向

(1) 概要

ナノマテリアル及びナノマテリアルを含有する利用製品の規制は、国別に提案されたり、一部開始されたりしているが、国際的な規制は存在しない。国別、地域別に規制が行われている現状は(3)で詳述する。また、規制のためには、規制対象を明確にしなければならないので、定義が必要であるが、その点については(2)で取り上げる。本節では全体的な動向を概観する。

ナノマテリアルの規制は、先ず規制当局による生産・使用の実態の把握から始まる。ナノマテリアルの企業からの報告/通知の制度である。先ず米国の EPA が 2008 年にスタートさせた「ナノマテリアルスチュワードシッププログラム」がある。企業から自主的な報告を求めたものであったが、参加する企業が少ないため 2 年後には中止された。しかし EPA はその後も意思を変えず、2017 年 8 月に一回限りのナノマテリアル報告規則が発効するに至っている。今後このデータをもとにどのように EPA が規制を考えるか注目される。

欧州ではかねてより NGO から、ナノマテリアルの生産・使用実態を EU 当局が把握し公開するよう求めてきたが、議論が長引いていた状況の中で、各国は独自に国内で実施し始めた。これは EU 加盟国にとどまらない動きである。EU としては、制度ではなく、ECHA が独自に収集したデータを公開するウェブサイトを立ち上げることで、EU 市場での情報の透明性を高めることとした。以上の動向の詳細は(2)で紹介する。

化学物質の規制は、それぞれの国で独自の法律が定められており、新規物質については、その認可の際にいろいろな規制(有害性を調査する実験を課する、生産量を制限する、生産・取り扱い時・環境放出時の安全対策を求める等)がある。ナノマテリアルはその多くが新規化合物でなく、既存物質の粒径が小さくなっただけのものであるため、すでに対応が決まっており、規制はできない。

米国ではカーボンナノマテリアルは新規物質であるために TSCA が適用されており、2017 年度においても多層カーボンナノチューブへの SNUR 適用などの動きがあったが、既存物質には適用されない。多くの国が米国と似た状況である。我が国は化審法が元素に適用されないため、カーボンナノマテリアルは新規物質であっても届け出が必要ではない。

EU では、2006 年からすべての化学物質は REACH によって新たに登録、評価、認可、制限が生産量・輸入量によって段階的に行われており、2018 年 5 月末が最終期限である。当局は既存物質のナノマテリアルもこの中で規制できるとしている。さらに既存物質のナノ形態の物質には、登録文書をアップデートしなければならないとしている。しかし現在、ナノマテリアルに対して実施しなければならない安全性試験等については提案中である。

ナノマテリアルを含む製品の規制では、EU が先行し、2009 年に化粧品規則が改訂され 2013 年から施行されている。ナノマテリアル条項が含まれ、安全性報告書の作成等とともに成分リストへの明記が規定されている。そのほかに医療機器、食品、殺生物剤規則にも及んでいる。本年度では、化粧品チェックリストやインベントリーの発表や食品接触材料での動きがあった。米国では、FDA や CPSC がナノマテリアルに関して活動している。

ナノマテリアルを扱う労働者のナノマテリアルへのばく露からの保護も当局の規制が関係している。米国では NIOSH がこの分野に注力しており、研究も含めて活発な活動を展開している。

(2) 規制のためのナノマテリアルの定義

ナノマテリアルを規制するには、規制上の厳密な定義が必須である。。ここではナノマテリアルの定義をめぐる各国・地域の動向を述べる。

既に、2008年に国際標準化機構(ISO)は、ナノテクノロジーの用語について標準化を検討し、ナノマテリアルについては「何らかの外径寸法がナノスケールであるか、又はナノスケールにある内部構造若しくは表面構造を有する材料」と定義し、ナノスケールとは概ね1 nmから100 nmの範囲とした。しかしこの定義は個々の粒子がナノマテリアルかどうかを決めるものであって、現実の材料はサイズや形状の異なる粒子の集合体であり、サイズの分布がある。また粒子同士がいろいろな結合/凝集状態にある場合も多い。従って規制においてナノマテリアルを特定するには、その定義を明確に規定しておかなければならない。

欧州委員会は、さらに規制に用いる定義として含有量や起源の要素を加味し、以下の定義を策定した。『ナノマテリアル』とは、非結合の状態にあるか、又は強凝集体(アグリゲート)若しくは弱凝集体(アグロメレート)であり、かつ、個数基準サイズ分布で50%以上の粒子が、一つ以上の外径が1nmから100 nmのサイズ範囲にある粒子を含有する、天然産、又は偶然にできた、又は製造された材料(マテリアル)をいう。欧州委員会は、本定義を欧州連合(EU)の法令その他で、共通に用いるべきナノマテリアルの定義として勧告した。

その後制定されたEUの殺生物製品規則、EU加盟国であるフランスが制定した年次報告制度、またベルギー、デンマークで制定を予定している登録、報告制度では、起源について製造されたものに限定するか、天然産や偶成物を含めるかの点では各様であるが、その他はこの勧告に基づいた定義を採用している。

また、米国連邦殺虫剤・殺菌剤・殺鼠剤法(FIFRA)でも今後の規制案の中で、同様のサイズに基づく定義を示している。

一方、カナダ、米国食品医薬品局(FDA)(ナノマテリアルへのアプローチ draft)、米国環境庁(EPA)、中国では、サイズとともに、ナノスケールで発現する特異な特性も定義の要素とし、100 nm以下のサイズ又はサイズ故に特別な性質を有するものとしてナノマテリアルを定義している。

なお、欧州委員会が策定した定義に対して、欧州委員会の共同研究センター(JRC)が、ナノマテリアル定義に関する欧州委員会の勧告についての評価報告書第3弾を2015年10月19日に発表した。JRCはこれまで、この評価報告書の第1弾を2014年3月に、第2弾を2014年8月に発表している。

欧州委員会は2011年に発効した「ナノマテリアル」の定義に関する勧告(2011/696/EU)の中で、その定義を用いた経験や科学技術の発展に鑑みて2014年12月までに同定義の見直しを行うとしていた。これに基づき、JRCは3段階に分けて本報告書を発表する予定となっていた。その最終章となる第3弾では、これまでの2本の報告書で示した課題や専門家意見を反映し、ナノマテリアルの定義をより明確にして実施するための科学技術的根拠に基づく具体的な措置を提案している。即ち、粒子(Particle)、粒径(Particle Size)、外部次元(External Dimension)、構成粒子(Constituent Particle)等の用語をもっと厳格に、あるいはより良く定義すべきだとしている。

さらに、2017年に入って、欧州委員会環境総局(EC DG Environment)は、ナノ物質の定義に関する勧告の改訂について、長い間待たれていた公開協議を9月15日に開始し、コメントは10月13日に締め切られた。今後は、上記で回収されたコメントを集約し、ナノ物質の定義に関する勧告の改訂作業が進むものと予想される。

表 3.1-1に各国・地域又は特定法令における定義全文を示し、表 3.1-2に定義を要素に分解して比較を行った。

表 3.1-1 定義一覧

国・地域/規則	定義	備考
EU	<p>「ナノマテリアル」とは、非結合の状態にあるか、又は強凝集体（アグリゲート）若しくは弱凝集体（アグロメレート）であり、かつ、個数基準サイズ分布で 50%以上の粒子が、一つ以上の外径が 1 nm から 100 nm のサイズ範囲にある粒子を含有する、天然産、又は偶然にできた、又は製造された材料（マテリアル）をいう。</p> <p>特定のケース、及び環境、健康、安全又は競争力に関する懸念が正当である場合には、個数基準サイズ分布の閾値である 50%を、1%~50%の間の閾値に変更してもよい。</p> <p>上記の例外として、一つ以上の外径が 1 nm 未満のフラーレン、グラフェンフレーク及び単層カーボンナノチューブはナノマテリアルと見なすべきである。</p>	
	化粧品規則	
	殺生物製品規則	殺生物製品に関連する「活性物質又は不活性物質」という語が含まれている他は、委員会勧告と同内容である。
	REACH 規則	
	RoHS 指令	前文における記載より。
欧州	フランス	「ある比率」は別途省令により、50%に設定されている。

国・地域/規則		定義	備考
	ベルギー	ナノスケールで製造された物質：非結合の状態にある粒子か、又は強凝集体（アグリゲート）若しくは弱凝集体（アグロメレート）の形態をとる粒子であり、かつ、個数基準サイズ分布で最低限 50%の粒子が、一つ以上の外径が 1 nm から 100 nm のサイズ範囲にある粒子を含有する物質。化学修飾を受けていない天然物質、偶成物及び 1 nm から 10 nm 間の区分が何らかの人的活動の副生成物である物質は除く。 一つ以上の外径が 1 nm 未満のフラーレン、グラフェンフレーク及び単層カーボンナノチューブはナノスケールで製造された物質として取り扱う。	
	デンマーク	非結合の状態にあるか、又は強凝集体（アグリゲート）若しくは弱凝集体（アグロメレート）であり、かつ、個数基準サイズ分布で 50%以上の粒子が、一つ以上の外径が 1 nm から 100 nm のサイズ範囲にある粒子を含有する、天然産、又は偶然にできた、又は製造された材料。本定義はナノマテリアルの定義に関する委員会勧告 2011/696/EU に従っている。	
	ノルウェー	欧州委員会勧告定義	
カナダ		以下に該当する製造された物質・製品、部材、成分、デバイス、構造物はすべてナノマテリアルとみなす。 1~100 nm の外径、内部構造若しくは表面構造のいずれかを有するもの、又はサイズはナノスケールではないがナノスケールに特有の特性／現象を示すものの、いずれかに該当する製造された物質等。	
米国	TSCA	TSCA はナノマテリアルを特別視していない。TSCA において、ある物質が他の物質と同一かどうかの判定基準は「分子アイデンティティ」が同一かどうかにより、粒子サイズは「分子アイデンティティ」の要素とはなっていない。「分子アイデンティティ」とは「分子中の原子の種類と数、化学結合の種類と数、分子中の原子の結合性、及び分子中の原子の空間配置といった、構造的・組成的な特徴に基づくもの」と説明されている。 (一回限りの報告制度) 少なくとも 1 つの次元が 1nm から 100nm のサイズの範囲内にある一次粒子、強凝集体 (agregate)、弱凝集体 (agglomerate) を含む化学物質で、そのサイズゆえにユニークで新しい特性や性質を示すような形態 (form) で製造又は加工されている、25℃及び大気圧で固体である化学物質。なお、サイズ故にユニークで新しい特性や性質を示さない、又は 1nm から 100nm のサイズ範囲にある 1 次粒子、強凝集体、弱凝集体が 1 重量% 以下の化学物質には適用しない。	定義とは関連しないが、「カーボンナノチューブは、TSCA インベントリに記載されているグラファイトその他の炭素同素体とは異なる化学物質であるとみなす」とされている。
	FIFRA (現状)	現状の FIFRA は、ナノマテリアルを特別視していない。	
	FIFRA (提案)	活性又は不活性成分、又はその構成成分の一部が、最終的に強凝集又は弱凝集状態であるうとなかると、1~100 nm の範囲にある次元を少なくとも一つ有するように意図的に製造された場合はナノマテリアルとして検討の対象とする。	情報収集ルールの提案、及びナノ形態品審査へのアプローチにおける説明

国・地域/規則		定義	備考
	FDA ナノマテリアルへの該否判定検討のためのガイダンス（案）	(a) 加工された材料（engineered material）又は最終製品は、少なくとも一つのナノスケール範囲（約 1nm から 100nm）の寸法を有しているかどうか；又は (b) 加工された材料又は最終製品は、たとえ寸法がナノスケールの範囲外にあっても（1 マイクロメートルまで）、その寸法に起因する物理化学的特性又は生物学的作用などの特性や現象を示すかどうか。	ナノマテリアル含有製品又はナノテクノロジー応用製品に該当するか否かの検討の際に考慮すべき項目
	NIOSH 二酸化チタンの許容ばく露濃度	呼吸性粒子のサンプリングで捕捉された粒子サイズの中で、一次粒子径が 100 nm 未満の部分。	本定義は超微粉（ultrafine）に対して与えられた定義であるが、「100 nm 未満の粒子はナノ粒子とも定義されている」。
オーストラリア 工業化学品（届出・審査）法に基づき、国家工業化学品届出・審査機構（NICNAS）が審査を行う際の定義		ナノスケールでの特異な特性を有するように、又は特定の組成を持つように、意図的に生産、製造又は加工された材料であって、代表的なサイズ範囲が 1 nm から 100 nm であり、ナノ物体（すなわち一、二、又は三次元がナノスケールである）、又はナノ構造体（ナノスケールの内部又は表面構造を有する）のいずれかである工業材料。	10%以上の左記定義（サイズ、特異な特性、意図的生産）を満たす粒子を個数基準で 10%以上含有する材料は、NICNAS はナノマテリアルとみなすこととする。
中国 国家標準 GB/T 19619-2004 「ナノマテリアルの用語」		この規格は、一般的な概念と技術固有の概念によるナノマテリアルの用語を規定する。ただしナノマテリアルで製造された製品は含まない。本規格は、ナノマテリアルとその関連分野における標準文書及び技術文書に使用される一般的な用語の定義に適用される。 ナノスケール： 1 nm から 100 nm（1 nm=10 ⁻⁹ m）の範囲の幾何学的寸法。 ナノ構造材料単位： ナノスケール構造の特性を有する物質単位であり、安定したクラスタ又は人工原子クラスタ、ナノ結晶、ナノ粒子、ナノチューブ、ナノロッド、ナノワイヤ、単層膜及びナノポア等を含む。 ナノマテリアル： 3次元空間において少なくとも一つの次元がナノスケールである物質、又はナノ構造単位から成りかつ特別な性質を有する材料。	
台湾	ナノ物質の安全衛生管理マニュアル	ナノマテリアルとは、1つあるいはそれ以上の次元が 1~100nm の間の粒子を含む材料で、被覆ナノ粒子、ナノ繊維、ナノ粉末、カーボンナノチューブ、ナノワイヤ、等である。一般的な超微細ナノ粒子（ultrafine particle）は、直径が 100nm 以下のものであるが、本管理マニュアルでは、自然界に存在する微粒子または意図せずに生成されるナノ粒子は含まない。	
	国家標準「CNS 14975 H1010」 (Terminology for nanomaterials)	3次元空間における材料構造の少なくとも 1次元がナノスケールで、又はナノ構造によって、材料の特殊な性質を有するユニット。	

国・地域/規則	定義	備考
韓国 ナノ製品の安全管理に関するガイドライン KS A 6203	ナノ物体及びナノ構造材料（内部ナノ構造やナノ粒子凝集材料を含む）であって、固体状であり、何らかの次元が 100 nm より小さいものを意味する。	ガイダンスには、ナノマテリアルの例として、フラーレン、カーボンナノチューブ、ナノワイヤ及び量子ドットが列挙されている。
作業場／研究室でのナノマテリアルの安全な取扱いに関するガイドライン KS A 6202	ナノ物体及びナノ構造材料（内部にナノ構造やナノ粒子凝集材料を含む）であって、固体状で、3次元のうち少なくとも1つの次元が 100nm より小さいものをいう。	
ナノテク－ナノ物体に関するお用語と定義－ナノ粒子、ナノ繊維、ナノプレート KS A ISO TS 27687	何らかの外形寸法がナノスケール（概ね 1nm～100nm までのサイズ範囲）であるか、又はナノスケールにある内部構造もしくは表面構造を有する材料。 ナノ物体とは、1つ、2つ又は3つの外形寸法がナノスケールである材料。	
ナノマテリアルの製造、取扱、労働者安全衛生に関する技術ガイドライン	(a)「ナノ粒子 (Nanoparticles)」とは、1～100 nm の範囲の直径を有する粒子をいう。 (b)「ナノ構造材料 (Nanostructured material)」とは、ナノサイズの粒子を含んでいる構造の物質又はナノ粒子が凝集したものをいう。 (c)「ナノマテリアル (Nanomaterials)」とは、粒子の大きさが3次元のうち少なくとも一つの次元の長さが 100 nm よりも小さいナノ粒子とナノ構造材料をいう。 (d)「ナノエアロゾル (Nanoaerosol)」とは、空気中に浮遊するナノマテリアルの集合体をいう。 (e)「極微細粒子 (Ultrafine particles)」とは、意図的に製造されたものではなく、燃焼、溶接又はディーゼルエンジンの作動等の過程で非意図的に製造されたナノサイズの粒子をいう。	
化学物質の登録、評価等に関する法律施行令	「ナノ物質」とは、次の各項目のいずれかに該当する物質をいう。 ア) 3次元の外径寸法のうち少なくとも1次元の大きさが 1～100 ナノメートルの粒子分布 50%以上である物質 イ) 3次元の外形寸法のうち少なくとも1次元の大きさが 1 ナノメートル以下であるフラーレン、グラフェンフレーク、又は単層カーボンナノチューブ。	

国・地域/規則	定義	備考
ISO ISO/TS 80004-1: 2010	<p>ナノマテリアル：何らかの外径寸法がナノスケールであるか、又はナノスケールにある内部構造若しくは表面構造を有する材料 (原注 この用語にはナノ物体及びナノ構造材料を包含する)</p> <p>ナノ物体：一つ、二つ又は三つの外径寸法がナノスケールである材料</p> <p>ナノ構造材料：内部ナノ構造又は表面ナノ構造を有する材料</p> <p>ナノスケール：概ね 1 nm から 100 nm までのサイズ範囲</p> <p>ナノ構造：相互に関連した (inter-related) 構成要素の組み合わせであり、これら要素の一つ又は複数がナノスケール域にあるもの</p>	

表 3.1-2 定義の要素

国・地域/規則		要素							備考	
		サイズ	含有量	含有量の基準	状態	比表面積	固有特性	起源		対象
EU	委員会勧告	一つ以上の外径が 1 nm から 100 nm	50%以上	個数基準サイズ分布	非結合の状態にあるか、又は強凝集体若しくは弱凝集体			天然産、又は偶然にできた、又は製造された材料		
	(特定のケース、妥当な場合は変更してもよい)		1~50%							含有量の閾値変更を認めている
	(サイズの特例)	一つ又は複数の外径が 1 nm 未満							フラーレン、グラフェンフレーク及び単層カーボンナノチューブ	勧告における下限値の特例
	化粧品規則	一つ又は複数の外径又は内部構造が 1~100nm					非溶解性又は生体内残留性	意図的に製造された物質		
	殺生物製品規則	一つ又は複数の外径が 1-100 nm	50%以上	個数基準サイズ分布	非結合の状態、又は強凝集体若しくは弱凝集体			天然又は人工	活性物質又は不活性物質	委員会勧告を採用
	(サイズの特例)	一つ又は複数の外径が 1 nm 未満							フラーレン、グラフェンフレーク及び単層カーボンナノチューブ	定義における下限値の特例
	REACH									委員会勧告を採用か？
	RoHS 指令	微小サイズ				微小内部表面構造を有する				サイズと構造要件は「又は」

国・地域/規則		要素							備考	
		サイズ	含有量	含有量の基準	状態	比表面積	固有特性	起源		対象
フランス	年次申告制度	一つ以上の外径が1 nm から100 nm のサイズ範囲	ある比率(50%)以上	個数基準サイズ分布	非結合の状態にあるか、又は強凝集体若しくは弱凝集体			意図的に製造された物質		起源を除き、委員会勧告どおり
ベルギー	ナノスケールで製造された物質の上市に関する王令	一つ以上の外径が1 nm から100 nm	最低限50%	個数基準サイズ分布	非結合の状態にある粒子か、又は強凝集体若しくは弱凝集体の形態			ナノスケールで製造された物質		起源を除き、委員会勧告どおり
	(サイズの特例)	一つ以上の外径が1 nm 未満						フラーレン、グラフェンフレーク及び単層カーボンナノチューブ		定義における下限値の特例
デンマーク	ナノマテリアル含有品の登録と報告制度	一つ以上の外径が1 nm から100 nm	50%以上	個数基準サイズ分布	非結合の状態にあるか、又は強凝集体若しくは弱凝集体			天然産、又は偶然にできた、又は製造された材料		委員会勧告どおり
カナダ	作業定義に関するステートメント	1~100 nm の外径、内部構造若しくは表面構造のいずれか						製造された物質・製品、部材、成分、デバイス、構造物		サイズ又は特性のいずれかが合致すれば、ナノマテリアルとみなす
		(非ナノスケール)					ナノスケールに特有の特性/現象を示す			
米国	EPA TSCA	一つ以上の次元が1 nm から100 nm	1%以上	重量	1次粒子、強凝集体、弱凝集体			ナノスケールに特有の特性/現象を示す		25℃及び大気圧で固体である化学物質

国・地域/規則		要素							備考	
		サイズ	含有量	含有量の基準	状態	比表面積	固有特性	起源		対象
	EPA FIFRA (ルール提 案)	1~100 nmの範 囲にある次元 を少なくとも 一つ有する			強凝集又は弱凝 集状態であらう となかろうと			意図的に製造さ れた場合	活性若しくは 不活性成分、又 はその構成成 分の一部	
	FDA ナノマテリア ルへの該否判 定検討のため のガイダンス (案)	少なくとも一つ のナノスケ ール範囲(約 1nm から 100nm)の 寸法						加工された材料 又は最終製品		サイズ又は特 性のいずれか が合致すれば、 ナノマテリア ルとして検討 対象とする
		1 μm まで					寸法に起因 する物理化 学的特性、 生物学的作 用などの特 性や現象			
	NIOSH 二酸化チタン の許容ばく露 濃度	一次粒子径が 100 nm 未満						呼吸性粒子のサ ンプリングで捕 捉された粒子		
オース トラリ ア	工業化学品 (届出・審査) 法	代表的なサイズ 範囲が 1 nm か ら 100 nm			ナノ物体(すなわ ち一、二又は三次 元がナノスケ ールである)、又は ナノ構造体(ナノ スケールの内部 又は表面構造を 有する)		ナノスケ ールでの特異 な特性を有 するよう に、又は特 定の組成を 持つよう に、意図的 に生産、製 造又は加工 された材料			
中国	GB/T 19619-2004	1 nm から 100 nm の範囲								「サイズ」又は 「特性」のい ずれ

国・地域/規則		要素							備考	
		サイズ	含有量	含有量の基準	状態	比表面積	固有特性	起源		対象
							特別な性質を有する	ナノ構造単位	ナノ構造単位等：安定したクラスタ又は人工原子クラスタ、ナノ結晶、ナノ粒子、ナノチューブ、ナノロッド、ナノワイヤ、単層膜及びナノポア等	れかが合致すればナノマテリアル
台湾	ナノ物質の安全衛生管理マニュアル	一つ以上の次元が1 nm から100 nm							被覆ナノ粒子、ナノ繊維、ナノ粉末、カーボンナノチューブ、ナノワイヤ、等	自然界に存在する微粒子または意図せずに生成されるナノ粒子は含まない。
	国家標準「CNS 14975 H1010」Terminology for nanomaterials	一つ以上の次元が1 nm から100 nm					特別な性質を有する	ナノ構造単位		
韓国	ナノ製品の安全管理に関するガイドライン KS A 6203	何らかの次元が100 nm 以下			ナノ物体又はナノ構造材料（内部ナノ構造やナノ粒子凝集材料を含む）		固体状			

国・地域/規則	要素							備考	
	サイズ	含有量	含有量の基準	状態	比表面積	固有特性	起源		対象
作業場／研究室でのナノマテリアルの安全な取扱いに関するガイドライン KS A 6202	3次元のうち少なくとも1つの次元が 100nm 以下			ナノ物体及びナノ構造材料（内部にナノ構造やナノ粒子凝集材料を含む）					
ナノテク－ナノ物体に関するお用語と定義－ナノ粒子、ナノ繊維、ナノプレート KS A ISO TS 27687	何らかの次元が 100 nm 以下			ナノスケールにある内部構造もしくは表面構造を有する材料					
ナノマテリアルの製造、取扱、労働者安全衛生に関する技術ガイドライン	3次元のうち少なくとも一つの次元の長さが 100 nm よりも小さい			ナノ粒子又はナノ構造材料（ナノサイズの粒子を含んでいる構造の物質又はナノ粒子が凝集したもの）					
化学物質の登録、評価等に関する法律施行令の一部改正令	3次元の外形寸法のうち少なくとも1次元の大きさが 1～100nm	50%以上	粒子分布						
（サイズの特例）	1次元の大きさが 1 nm 以下							フラーレン、グラフェン、フレキとカーボンナノチューブ	定義における下限値の特例

国・地域/規則		要素							備考	
		サイズ	含有量	含有量の基準	状態	比表面積	固有特性	起源		対象
ISO	ISO/TS 80004-1: 2010	約 1 nm から 100 nm までの サイズ範囲			何らかの外径寸 法がナノスケ ール、又はナノスケ ールにある内部 構造若しくは表 面構造					

(3) 各国等における規制動向

1) 米国

(ア) EPA (環境保護庁)

(i) ナノマテリアルの報告／規則保管に関する規則

EPA では、10 年以上の議論の末に、2017 年 1 月 12 日に、ナノマテリアルの報告/記録保管に関する最終規則を発表した。この発行された最終規則は、既存のナノスケール材料の 1 回限りの報告を要求するものであった。また、製造業者または加工業者に、報告対象化学物質の別個の形態については、製造または加工を開始する少なくとも 135 日前までに、同様の報告要件を課していた。米国 EPA は、5 月 8 日の連邦官報で、このナノスケール報告規則の発効日を 5 月 12 日から 8 月 14 日に延期した。その後、無事に、2017 年 8 月 14 日、TSCA8(a)の下で、最終のナノマテリアル報告規則が発効した。同時に EPA は、5 月に発表されたガイダンス草案に関する公開意見募集を受けて、ナノマテリアル情報収集規則に関する最新ガイダンスを発表した。質問と回答の形式で提示されたこの文書では、以下の点について説明している。

- ・報告対象物質を構成するもの
- ・誰が報告する必要があるか
- ・いつ、どんな情報を報告しなければならないか
- ・機密性
- ・免除やナノマテリアル利用製品に関する規則などの追加的事項

このガイダンスは、規則が発効した 8 月 14 日に発表された。この規則は、5 月 12 日に発効する予定だったが、業界からガイダンスを増やす要請が繰り返されて、3 ヶ月以上遅れた。EPA は、この文書に対して質問と回答がなされると、さらに追加すると述べている。

10 年以上の議論の末に決まった最終的な規則は、1 月 12 日に発行され、2017 年 8 月 14 日より前の 3 年間に報告すべき化学物質を製造または加工した者は、制定日から 1 年以内に EPA に一回報告しなければならない。また、ナノ形態の報告対象化学物質をこれから製造または加工する業者は、その活動を開始する少なくとも 135 日前までに、報告しなければならない。

(ii) ナノマテリアル、ナノ製品の認可

(a) SNUR

a) 2017 年 6 月に 2 種類のカーボンナノチューブ混合物の SNUR 提案

EPA は、製造前通知 (PMN) の対象となったカーボンナノチューブ (PMN Number ;P-11-482) に重要新規利用規則 (Snur) を提案した。この多層カーボンナノチューブと他の種類のカーボンナノチューブ (一般) からなる物質 - バイモーダル (2 種物質) 混合物 - は、PMN によると、特殊添加物として使用されることを意図している。EPA は、類似の吸入可能で難溶性の微粒子およびナノカーボン材料の試験データに基づいて、その物質の肺毒性および発癌性に関する懸念を確認し、以下の条件で同意命令を課した。

- ・特定の個人用保護具 (PPE) の使用。

- ・製造開始通知 (NOC) から 6 ヶ月以内にダスティネス試験を提出する。
- ・特定の物理化学的特性の提出。
- ・蒸気、ミスト、またはエアロゾルを発生させる使用方法 (使用方法が密閉されたプロセスで行われている場合を除く) を含む、同意書に記載された以外の物質の不使用。
- ・PMN に記載されている範囲を超えて水に放出しない。廃棄は埋め立てまたは燃焼による。
- ・記録保持
 - ・特定の試験データの開発。

コメントは 7 月 10 日まで受け付ける。

b) 2017 年 9 月にカーボンナノチューブ及びナノカーボンを含む 6 物質の最終 SNUR 公表

米国環境保護庁 (EPA) は、9 月 21 日に、製造前通知 (PMN) の対象となった 37 の化学物質に関する重要新規利用規則 (SNUR) を公布した。これらのうち、カーボンナノチューブ (一般) およびナノカーボン (一般) を含む 6 つの化学物質は、毒物管理法 (TSCA) 第 4 条の下で EPA によって発行された同意命令の対象となる。重要新規利用として指定された活動のために、37 種の化学物質のいずれかを (輸入を含む法令によって定める) 製造または加工しようとする者に、その活動を開始する少なくとも 90 日前に EPA に通知することを要求する。要求された通知により、意図された利用の EPA 評価が開始される。重要新規利用のための製造および加工は、EPA が通知の審査を行い、通知を適切に決定し、その決定に必要な措置をとるまで開始することができない。公表された SNUR は、以下を含む。

カーボンナノチューブ (一般名) (PMN 番号 P-15-672) : PMN 物質の一般的な (機密ではない) 利用はる過媒体中にある。EPA は、環境毒性のみならず肺毒性および発がん性に対する懸念を確認した。同意命令は次のものを要求している。

- ① 不浸透性手袋および防護服 (皮膚ばく露の可能性がある場合) 及び 国立労働衛生研究所 (NIOSH) 認定の N-100、P-100、または R-100 カートリッジを使用した呼吸器 (吸入ばく露の可能性がある場合) を含む個人用保護具の使用。
- ② 同意命令に記載されている利用のためだけの PMN 物質の加工と利用。
- ③ PMN に記載されているように、水性スラリー、湿潤形態、または乾燥形態では密閉された状態での、PMN 物質の加工および利用。
- ④ PMN 物質の表層水への放出を招く利用をしないこと及び埋立または焼却のみによる PMN 物質の処分。

ナノカーボン (一般名) (PMN 番号 P-16-170) : この物質は複合材料の添加物として使用される。EPA は、肺毒性および発がん性ならびに環境毒性に対する懸念を確認したため、同意命令には次のものを要求している。ナノカーボン (一般名) (PMN 番号 P-16-170) : この物質は複合材料の添加物として使用される。EPA は、肺毒性および発がん性ならびに環境毒性に対する懸念を確

認した。同意命令には次のものを要求している。

- ① 不浸透性の手袋と防護服(皮膚ばく露の可能性がある場合)および N-100、P-100、または R-100 カートリッジを備えた NIOSH 認証呼吸器(レスピレーター)を使用した個人用保護具の使用(吸入ばく露の可能性がある場合)
- ② 開始の通知を受けてから 6 ヶ月以内にダスティネス試験結果を提出する。
- ③ 同意命令で指定された機密の生産量限度を超える前に、90 日間の慢性吸入試験結果を提出する。
- ④ 適用方法が密閉されたプロセスで行われない場合、蒸気、ミスト、またはエアロゾルを発生させる適用方法を含まない、同意命令で指定された使用のみのための、PMN 物質の加工と利用。
- ⑤ PMN 物質の表層水への放出がない利用及び埋立処分または焼却による PMN 物質の処分。

どちらの SNUR も、指定された保護措置がない場合、「重要新規利用」と指定される。通知には、各物質の推奨試験が含まれている。これらの SNUR は 2017 年 11 月 20 日に発効する。

c) MWCNT と他のクラスの CNT からなる二峰性混合物の最終 SNUR 公表

10 月 3 日、米国環境保護庁(EPA)は、(PMN)P-11-482 の対象である多層カーボンナノチューブ(MWCNT)および他のクラスのカーボンナノチューブ(CNT)からなる混合物を含む、バイモーダル(二峰性)として一般的に特定された化学物質について、有害物質管理法(TSCA)第 5 条(a)(2)に基づき最終的に重要新規使用規則を公布した。この決定は、化学物質を製造する意思がある者(輸入を含む法令で定める者)またはこの最終規則により重要新規利用と指定された利用のために化学物質を処理して、少なくともその活動を開始する 90 日前に EPA に通知することが必要である。

重要な新規利用のための製造および処理は、EPA が通知の審査を行い、通知を適切に審査し、その決定に必要な措置をとるまで開始することができない。2017年6月8日に提案された SNUR によれば、PMN 物質の一般的な利用は特殊添加物である。

類似の吸入可能で難溶性の微粒子およびナノカーボン材料に関する試験データに基づいて、EPA は肺毒性および発癌性に対する懸念を確認した。また、他のナノカーボン材料の試験データに基づいて、EPA は環境毒性への懸念を特定した。SNUR のもとで、重要新規利用は、

- ① 職場における保護:40 CFR に規定された要件。第 721.63 項(1)、(a)(2)(i)、(a)(2)(ii)、(a)(3)、(a)(4)、(a)(6)(微粒子)、および(c)。第 721.63 項(a)(1)および(a)(4)で要求されるように合理的にばく露される可能性のある人物を決定する際には、工学的管理措置(例えば、操作の包囲または閉じ込め、一般および局所換気)あるいは、実現可能であれば、ばく露を防止するための措置(例えば、職場の方針と手順)を検討し、実施しなければならない。国立労働衛生研究所(NIOSH)が保証した N-100、P-100、または

R-100 カートリッジを装備した空気清浄、密着型フルフェイス式呼吸器、または少なくとも 50 の割り当てられた保護係数 (APF) を備えたパティキュレート空気呼吸器が第 721.63 項 (a) (4) 項の要件を満たしていること。

- ② 産業、商業、消費者活動: 第 721.80 (k) 項および (q) 項に規定された要件。重要な新規利用は、蒸気、霧、またはエアロゾルを生成する応用方法を伴う利用である。
- ③ 処分: セクション 721.85 (a) (1)、(a) (2)、(b) (1)、(b) (2)、(c) (1)、および (c) において特定された要件
- ④ 水への放出: セクション 721.90 (b) (1) および (c) (1) に規定されている要件。PMN P-11-482 の製造プロセスに記載されている水の放出以外に、どのサイトからであってもその物質の使用に関連する製造ストリームからの予測可能または意図的な放出は、重要新規利用である。

この最終規則は、2017 年 11 月 2 日に発効する。

d) MWCNT の SNUR

EPA は、10 月 19 日に、製造前通知の対象となった 29 の化学物質について、重要新規利用規則 (SNUR) を公布する直接最終規則を発行した。29 の化学物質は、EPA 毒性物質管理法 (TSCA) セクション 5 (e) によって同意命令の下にある。直接最終規則には、多層カーボンナノチューブ (MWCNT) (一般名) の SNUR (PMN 番号 P-15-487、P-15-488、P-15-489、P-15-490 および P-15-491) が含まれている。連邦公報によると、PMN 物質は、電子デバイス、エレクトロニクス、および材料における静電放電のための添加物; 材料の減量のための添加剤; 機械的特性または電気伝導性を改善するための添加剤; 加熱装置および材料中の発熱素子; 電子デバイスおよび材料における熱伝達および熱放出のための添加剤; 電子回路およびデバイス内の半導体、導電性、または抵抗素子; 電子回路、エネルギー貯蔵システム、およびデバイスの導電性を改善するための添加剤; 照明および X 線源のための電子エミッタ; 電子デバイスにおける電磁界遮蔽のための添加剤; 電子材料および電子デバイスにおける電極のための添加剤; 化学的製造における触媒担体; 耐食性または導電性を改善するためのコーティング添加剤; 構造用及び電気用の繊維用添加剤; 織物および繊維製品の繊維用添加剤; ナノスケールの材料を除去するための濾過材添加物; 高電圧ケーブル用半導電性配合添加剤; 超疎水性のための添加剤 として使用される。The consent order requires: 同意命令は以下を要求している。

- ① 皮膚ばく露を防止する個人保護装備の使用、及び (吸入ばく露の可能性がある場合) 国立労働安全衛生研究所保証の、少なくとも 50 の保護係数が設定された N-100、P-100、または R-100 カートリッジを使用した空気呼吸器の使用。
- ② PMN 物質の使用は、同意命令で指定された用途にのみ使用すること。
- ③ ダスト、ミスト、またはエアロゾルを発生させる施工方法では、その施工方法が閉鎖されたプロセスで行われない限り使用しない。
- ④ PMN 物質を表層水への放出を招く用途に使用しない。PMN 物質の処分は埋立または焼

却のみによる。

重要新規利用とは、ダスト、ミスト、またはエアロゾルを生成する施工方法を使用するあらゆる用途である。機械的処理以外の処理を施工される意図がなく、永久固体ポリマー中に反応（硬化）または埋め込まれた形で、PMN 物質がポリマーマトリックス中に組み込まれている場合、SNUR 要件は適用されない。EPA は、亜慢性 90 日吸入毒性試験 (DEPPP 870.3465 または OECD 413)、2 年吸入バイオアッセイ (OPPTS 870.4200)、魚の早期生存段階毒性試験 (OCSPP 試験ガイドライン 850.1400)、ミジンコ慢性毒性試験 (OCSPP 試験ガイドライン 850.1300)、および藻類毒性試験 (OCSPP 試験ガイドライン 850.4500) は、物質の健康および環境への影響の可能性を特徴づけるのに役立つだろうと述べている。EPA は、同意命令はこれらの試験を要求しないが、製造または加工、商業流通および廃棄に関する同意命令の制限は、これらのまたは他の関連情報の提出に基づいて、EPA によって同意命令が変更または取り消されるまで有効であると述べている。

(iii) ガイドライン、ガイダンス

EPA は、2017 年 5 月 16 日に「上市されているナノ物質に関する EPA の第 8 章(a) 情報収集規則に関するガイダンス」と題したガイダンス文書が入手可能でコメントを求めているとする連邦官報を公布した。公表されたガイダンスは、2017 年 1 月 12 日付の TSCA 第 8 条 (a) 最終規則に記載されているように、ナノスケールで製造または加工されている場合に製造（輸入を含む）および加工業者から受けた質問への回答を与えている。特定のナノスケール材料の新しい区分された形態に関する 1 回限りの報告要件が必要となる。EPA は、ガイダンスのドラフトに関するコメントを受け入れるが、既に確定されているルール自体については言及しないと述べていた。

EPA は、その後 2017 年 8 月 14 日に、ナノマテリアル報告に関する最終規則を発表するとともに、5 月に発表されたガイダンス草案に関する公開意見募集を受けて、ナノマテリアル情報収集規則に関する最新ガイダンスを発表した。質問と回答の形式で提示されたこの文書では、以下の点について説明している；

- 報告対象物質を構成するもの
- 誰が報告する必要があるか
- いつ、どんな情報を報告しなければならないか
- 機密性
- 免除やナノマテリアル利用製品に関する規則などの追加的事項

(イ) FDA（食品医薬品局）

米国 FDA は、2017 年 12 月に『Drug Products, Including Biological Products, that Contain Nanomaterials Guidance for Industry (Draft Guidance)』（ナノマテリアルを含有する、生物学的製剤を含む医薬品に係る産業界向けガイダンス(ドラフト版)）と題する産業界向けガイダンスのドラフト版の可用性を発表する、連邦官報を発表した。

官報によると、FDA は、ナノマテリアルが最終的な投与形態に存在する生物製剤を含むヒト医薬品の開発のための現在の考え方を業界に提供するためのガイダンスを開発した。ガイダンス・ドラフト版は、ナノマテリアルを含有する医薬品の開発に関する一般原則と具体的な考慮事項の両方について検討し、そのような製品と他の医薬品との同等性を確立するための考慮事項を含む。ガイダンス・ドラフト版は、製品の開発および生産を通じてナノマテリアルを含む医薬品に関連する品質、非臨床、および臨床研究に関する考慮事項について論じている。ガイダンス・ドラフト版は、医薬品に使用できるナノマテリアルの種類を制限または分類していない。その代わりに、安全性、有効性、性能、および品質に関してさらなる評価を保証する「特定の物理化学的特性を生み出すための、意図的かつ、次元の意図的操作と制御」に焦点を当てている。FDA は、ガイダンス・ドラフト版が、「ナノマテリアルを含む特定の医薬品に、最終的に規制上の結果がどうなるかについては言及しておらず、また前提もしていない」と述べている。FDA は現在、既存のレビュープロセスを使用して、ケースバイケースでナノマテリアルを含む医薬品の安全性、有効性、公衆衛生上の影響、または規制状態などの問題に取り組んでいる。FDA は、「特定の一般的に使用されるタイプのナノマテリアル、例えば、いくつかのリポソーム、を取り入れた医薬品の品質と性能を評価し、評価する際の課題に取り組むためのガイダンス」を策定し続けると述べている。ガイダンスには、これらの製品の調査、販売前および納品後の提出者の応募者およびスポンサーに対する推奨事項が含まれている。FDA は、ガイダンス・ドラフト版で使用されている用語「ナノマテリアル」を含む用語についてコメントを求めている。コメントは 2018 年 3 月 19 日に終了する予定である。

(ウ) その他

(i) AIHA

American Industrial Hygiene Association(米国産業衛生協会;AIHA)は、3月29日、同協会のナノテクノロジーワーキンググループが作成したナノマテリアルスチュワードシップのガイダンスを承認し公開した。ナノマテリアルスチュワードシップとは、ナノマテリアルの製造から、それを使用した製品の使用、廃棄に至るライフサイクル全般にわたってナノマテリアルを管理し、その有害性とヒトと環境へのばく露を抑制する営為をいう。ガイダンスによると、全体のライフサイクル・アプローチは、潜在的な環境、健康、安全(EHS)、および規制の影響について、1) 製品およびプロセスの設計と開発の早期段階から考慮する。2) 製品設計、原材料選択、製造(流通作業を含む)、使用(保守を含む)、再使用、リサイクル、廃棄を扱う。そして3) 定期的に新しい情報が入手可能になったときに再評価する、よう図るものである。

またガイダンスは、製品スチュワードシップおよび他の EHS 専門家に、1) 州、地方、および国の規制を含む、責任を負うナノマテリアルおよびナノ製品に適用される規制を特定する 2) 要件を詳細に理解する 3) 商業化に影響を及ぼす可能性のある変化と新たな要求について、規制環境を注意深く監視する、よう勧める。そして、このガイダンスは、一貫した有意義な有害性の伝達とばく露可能性の理解への挑戦を行わなければならないと記述している。

ガイダンスは、以下のような点について研究すれば、ナノ物質安全性データシートの品質と完全

性に関する改善の余地があることを示していると述べている。

- 1) どの成分がナノスケールであるかを特定する。サイズ/サイズ範囲情報を含む。
- 2) ナノ粒子の形状、密度、溶解度などの既知の物理化学的性質。
- 3) ハザード分類、毒性データ、または職業ばく露限界がナノスケールの材料に由来しない場合の示唆。

ガイダンスには、著者らが集めたナノ材料スチュワードシップに関連する参照文献およびリンクが含まれる。

(ii) NIOSH

(a) 「セルロース混合エステル・フィルター上に捕捉されたカーボンナノチューブおよびナノファイバーの透過型電子顕微鏡による解析」への意見募集

2017年2月27日、米国立労働安全衛生研究所(NIOSH)は、「セルロース混合エステル・フィルター上に捕捉されたカーボンナノチューブおよびナノファイバーの透過型電子顕微鏡による解析」ドラフトについての一般からの意見募集開始を告知した。このドラフトは、NIOSH解析手法マニュアル(NIOSH Manual of Analytical Methods, NMAM)に収められて公開されることを予定している。NMAMは1974年に最初に公開されて以来、現在では300以上の解析手法が収められており、これらの解析手法は職業安全衛生専門家によって化学物質や微生物への労働者のばく露を評価するために用いられている。Transmission Electron Microscope TEM12ドラフトでは、カーボンナノ粒子解析のための標準化された取り組みが紹介されている。これらの標準化された取り組みは、解析手法の調和を図り、研究間の結果の比較を可能とし、データの質を高めることを目指している。ここでは、職場環境から採取されたカーボンナノチューブとナノファイバーについてのTEM解析をおこなう上での効果的な方法についての詳細なガイダンスが述べられている。手順が図解されていて理解し易く、多くの事例のTEM像が掲載されている。

科学的なピアレビューを経て、現在、NIOSH はカーボンナノ粒子の解析について関心を持つ一般に向けた公開と意見募集を実施している。コメントの締め切りは2017年4月28日であり、詳しい情報は連邦官報で公開されている。

(b) 10年間の研究業務のハイライトを報告

2017年8月10日、国立労働安全衛生研究所(NIOSH)は、「National Occupational Research Agenda: Second decade in Review/ 2006-2016」という報告書(同時に Supplement report も)を発表した。報告書は、国家労働衛生研究アジェンダ(NORA)の第二の十年間にわたる労働安全衛生研究のニーズに取り組んだ際に得られた進捗とその影響を概説している。

報告書の内容はNIOSHの多岐にわたる活動を反映したものであるが、含まれている21のセクター間プログラムには、「100 ナノメートル以下の長さの構造を含む材料のばく露による悪影響を軽減するための研究の実施とアプローチの採用を促進するナノテクノロジープログラム」が含まれている。ナノ関連の成果として以下が挙げられている。

- カーボンナノチューブと二酸化チタンのNIOSH推奨ばく露限度(REL)は、EPAに工業ナノマテリアルを扱う労働者を保護するための規制を作成するための情報を提供した。
- 保護服のナノ粒子に対する耐性を測定するためのNIOSH法は、他の政府機関、組織、および製造業者からの新しいガイダンス文書、要件、および試験方法の作成に貢献した。
- NIOSHの研究は、労働安全衛生局(OSHA)とEPAが多層カーボンナノチューブの使用に関する勧告を作成することにつながった。
- NIOSH 仮想ナノテクノロジー研究センター(NTRC)は、ナノテクノロジー産業における潜在的な労働安全衛生リスクをよりよく理解し、産業が成長するにつれて効果的な予防措置を組み込むために、先駆的研究で90人以上の研究者を支援または影響力を及ぼしてきた。
- 呼吸器を貫通するナノ粒子を測定するためのNIOSHの研究は、研究者および機関に、この分野における新規または改訂された標準の開発を知らしめた。
- NIOSHの科学者は、空気中のカーボンナノチューブを懸濁させ、粒子の濃度を制御する方法を発明した。「カーボンナノチューブの制御されたエアロゾルが初めて生成されたのは真のブレイクスルーであった。それは性質と特性が十分に理解されていない微小粒子の研究のためのリソースを提供した。」

(c) ナノマテリアル製造に関わる研究課題公表

2017年8月23日、米国国立労働安全衛生研究所(NIOSH)は、パブリックコメントのために職業衛生上の研究課題(NORA)の制定に関するコメントを求める連邦官報を発表した。NORAの製造セクターの評議会は、「次の10年間(2016-2026)の最も重要な労働安全衛生の研究ニーズを特定する」アジェンダについて述べた。NIOSHによれば、アジェンダは、その中で最も関連の深い事項、ギャップ、およびセクターの安全衛生の必要性を記述するための手段を提供している。

その後、2018年1月31日に製造業のための利用可能な最終的国家労働衛生研究アジェンダを発表した連邦登録通知(Registernotice)を発行した。

NIOSHは、製造業の国家労働衛生研究アジェンダが労働者の健康への悪影響を回避するために、労働リスク要因を特定する最も緊急に必要な知識と行動を特定することを意図していると述べている。「アジェンダ」は、ステークホルダーが製造部門の最も関連性の高い問題、研究ギャップ、安全衛生のニーズを説明する手段を提供している」と述べた。2017年8月24日の「製造業向け国家労働衛生研究アジェンダ」はナノマテリアルに言及している。最終のアジェンダには、以下のナノマテリアルの目標と言及が含まれる。

- ✓ 目標1: 製造業における急性および慢性の職業病、負傷、および死亡事故の負担を軽減するには、(a)労働安全衛生上の危険性およびその影響に関する知識を強化する。(b)既知の労働安全衛生上の災害へのばく露を減らすための効果的な処置の開発。最終アジェンダは、「繰返し手作業、人手による材料の組み立てと取り扱い、ナノマテリアル、過度の騒音、および化学物質に関連する危険へのばく露は、製造業における急性および慢性条件の弱

体化に大きく貢献する」と述べている。

- ✓ 目標 2: 製造業における労働関連の危険、ばく露、および病気の監視を改善する。
- ✓ 目標 3: 新技術による新たなリスクを調査し、新技術が製造上の労働安全衛生を向上させる方法を模索する。最終アジェンダによれば、製造業を再編している新技術には、ナノテクノロジーが含まれる。
- ✓ 目標 4: 非伝統的雇用契約の労働者の労働安全衛生を改善する。
- ✓ 目標 5: 製造における能力強化と教育努力を進める。
- ✓ 目標 6: 製造業における研究の実践への効果的な移行のためのメカニズムを開発する。

(d) ナノマテリアルから労働者を守るための WHO ガイドラインの実行サポート計画

2017年12月15日、NIOSHは『ナノマテリアルから労働者を守るための WHO ガイドライン』を題するブログアイテムを掲載した。2017年12月13日のブログアイテムに報告されたように、WHOは最近、『WHO Guidelines on Protecting Workers from Potential Risks of Manufactured Nanomaterials』（人工ナノマテリアルの潜在的リスクからの労働者保護に関する WHO ガイドライン）を公表した。NIOSHのディレクター、John Howard, MDは、WHOガイドラインを、「人工ナノマテリアルの潜在的リスクから広く労働者を保護する重要なステップ」と表現している。NIOSH事務局長で、シニア・サイエンティストである、Vladimir Murashov, Ph.D.は、ガイドライン開発グループのチェアを務めた。NIOSHはまた、11の系統的レビューの1つ（Eastlake Aa, Zumwalde R, Geraci C. “Can Control Banding be Useful for the Safe Handling of Nanomaterials? A Systematic Review.” J Nanoparticle Res.）に貢献し、外部専門家レビューに参加した。プラグアイテムは、NIOSHが「ガイドライン実行段階で、WHOの取り組みを引き続きサポートする予定である。それはこれらガイドラインを実践することに重点を置くものとなるであろう」と述べた。

(iii) 消費者製品安全委員会

(a) ナノマテリアルの EHS に重点を置き、他機関との協力を継続

2018年2月12日、米国消費者製品安全委員会(CPSC)は、2017年度の業績報告書を発表した。報告書によると、2017年度のCPSCは、ナノマテリアルの環境健康および安全(EHS)に関する7つの研究協力を確立して、当初5つとした協力の目標を上回ったという。研究協力は、「ナノマテリアルを含む製品からの消費者へのばく露の可能性に関する知識を高め、消費者製品からの放出を測定する方法を探求する」ことである。報告書によれば、ナノテクノロジーの研究開発を進める上で、CPSCは、2017年に国立標準技術研究所(NIST)、国立ナノテクノロジー調整局(NNCO)、および国立職業安全衛生研究所(NIOSH)との研究協力を継続した:

- CPSCとNISTとの協力:NISTは、ナノマテリアルのための試験方法を検証するのみならず、米国住宅都市開発(HUD)健康住宅調査から集められた粉塵サンプル中のナノマテリアルの放出および消費者製品からの放出を評価するための方法を評価することで、CPSC

と協力している。

- CPSC と NNCO との協力:2017 年度に CPSC は NNCO との間で、製造された製品からのナノマテリアルの放出可能性を評価するための科学と測定の課題に焦点を当てるワークショップを開催する協定を結んだ。ワークショップの主な焦点は、製品中のナノマテリアルの存在、その放出の可能性、および人口ばく露の可能性を特徴づけ、定量化するために利用できる科学の水準、ツールおよび方法を決定することである。そして
- NIOSH は、CPSC との共同研究で、最近ナノ粒子の次の側面を研究するための第 1 段階の研究を実施した。粒子生成、特徴付け、および分画; *in vitro* の用量測定; 複数の細胞株における *in vitro* 毒性調査; 吸入によるポジティブな呼吸圧力誘発性心血管作用の *in vivo* 評価に関する。2017 年度に NIOSH は、ターゲットとされた研究分野での消費者の使用中にナノ製品から放出された工業ナノマテリアルの環境健康と安全への影響を調査するフォローアップ第 2 段階研究を実施した。

報告書は、パフォーマンス向上のための計画について、2018 年度に CPSC は「ナノマテリアルのための活動の資源が少なくなっている状況で、他の連邦機関との協力を通じて環境健康安全問題に引き続き焦点を当てる」と述べた。

(iv) ACGIH

(a) ACGIH®TLV®-CS 委員会がカーボンナノチューブに関する情報を求める

米国政府産業衛生学者会議 (ACGIH®) の化学物質の閾値限界値 (TLV®-CS) 委員会は、2018 年の化学物質リストおよび調査中のその他の問題にカーボンナノチューブを含めた。調査対象リストに載せられていることは、TLV®-CS 委員会が限界値 (TLV®) の開発のためにカーボンナノチューブを選択したことを示している。ACGIH®は、TLV®のレベル以下のばく露が疾患や傷害の不合理なリスクを生じさせないという、科学界の意見を表す健康基準値として TLVs®を定めている。TLV®-CS 委員会は、実質的なデータおよびコメントを求めるが、経済的または技術的実現可能性ではなく、健康およびばく露の問題に関連するもののみを対象とする。ACGIH®は、2018 年 7 月 31 日までに調査対象リストを 2 段階リストに情報を記載する:

- 第 1 段階へのエントリーは、開発プロセスの現状に基づいて、今後の年の経過とともに、意図的な変更 (NIC) または確立の意向 (NIE) の通知として進む可能性のある化学物質および物理的傷害源 (騒音、振動など) を示す。そして
- Tier 2 は、それ以上議論が進まない化学物質と物理的傷害源で構成されるが、翌年の調査対象リストに残るか、または削除される。

委員会がカーボンナノチューブの提案 TLV®を進めることを決定した場合、ACGIH®理事会は最初に提案された値を批准し、TLV®-CS 委員会の 2018 年次報告書で NIEとして公表される。

(v) ニューヨーク州

2017年4月25日、ニューヨーク州知事 Andrew Cuomo は、「California and New York は、洗浄剤の成分を製造者に開示することを要求した。提案されている家庭用クレンジング製品情報開示プログラム(案)では、ニューヨークで販売される家庭用クレンジング製品の製造業者に、ウェブサイト上に化学成分を開示することが求められる。ニューヨークは、製造業者が洗浄製品における化学成分を開示することを要求する米国の最初の州になるとしている。なお、最大の標的はドライクリーニングに使用されるパークロロエチレンである。このプログラムでは、ナノマテリアルを含む特定の成分に関する情報を開示する必要がある。ガイダンス草案では、「ナノマテリアルである各成分について、ナノマテリアルを記述する用語を開示すべきであるとしている。ガイダンス草案に関するコメントは、2017年7月14日に期限が来た。

草案には、ナノマテリアルについては以下の記述がある；

- ナノマテリアルは、特性および機能がサイズ依存性を達成するために意図的に設計された物質であり、1 つ以上の外形寸法または内部構造が、100 ナノメートル未満であると測定される。ナノ材料である各成分について、ナノマテリアルを記述する用語を開示すべきである。例えば、ナノマテリアルが炭素であるならば、ナノ材料開示は、用語「ナノ」炭素を使用すべきである。

2) 欧州

(ア) 欧州委員会 (EC)

(i) 環境総局

EC 環境総局 (EC DG Environment) は、ナノ物質の定義に関する勧告の改訂について、長い間待たれていた公開協議 (コンサルテーション) を開始した (9 月 15 日)。2011 年に合意した定義では、1nm~100nm の間に 50% 以上の粒子を有する物質とした。EC が共同研究センター (JRC) からの第 3 の最終報告を待つ間、2014 年 12 月の元の改訂締め切りは延期された。最初の改訂は 2015 年 7 月に発表され、レビューのために考慮されるべき技術的および科学的勧告事項を含んでいた。この遅れは、多くのステークホルダーの間で不満を募らせた。2017 年 3 月 14-15 日に開催された最後のナノマテリアル所管官庁サブグループ (CASG-Nano) 会議では、NGO、加盟国、および Echa は、定義を取り巻く明確さの欠如に「失望した」と NGO the European Environmental Bureau の Tatiana Santos は言った。会合では、委員会の関係者は、定義のレビューに関する公開コンサルテーションが「1 ヶ月以内に」開始されると述べた。欧州委員会は最近発表された改訂のロードマップで、次のような問題に取り組むことを目標としていると述べている。

- 殺生物剤製品の場合のように、勧告の EU 規制への「取り込み」が開始されたが、「予想されたように包括的ではなかった」。これは、定義に含める予定のプロセスの遅延によるものである。
- 法律で直接適用することは困難である。たとえば、事前に完全に定義されていないデフォ

ルト値であるしきい値が含まれており、その値を決定するために追加のプロセスが必要な場合がある。これは規制間の矛盾を引き起こす可能性がある。

- いくつかの用語の使用法と基準の適用方法を明確にする必要がある。
- 普遍的な適用可能な測定方法はなく、材料がナノマテリアルであるかを迅速に判断するための「容易な」実行ルートもない。

(ii) ECHA

(a) ナノ物質登録のための REACH 附属書の改訂

EC は、ナノ物質登録のための REACH 附属書 I、III、VI、VII、VIII、IX、X、XI および XII の改訂に関する公開協議を 2017 年 10 月 9 日に開始したことを発表した。この改訂は、ナノ形態を REACH の下に登録する際の法的要件が何であるかをさらに明確にし、ECHA のナノ物質に対する REACH をより効果的に実施する能力を向上させるものである。パブリックコメントは 2017 年 11 月 6 日までとし、改訂案が承認されれば、2020 年 1 月 1 日より適用される。規則案の概要は以下の通りである；

- ナノ形態を有する物質の登録要件および関連する下流ユーザーの義務に関する明確化は、附属書 I、III および VI～XII に含まれるべきである。
- 製造業者と輸入業者は、ナノ形態を有する物質の特定された用途から生じるリスクが適切に管理されていることを化学物質安全性報告書で評価し、関連する場合は必要な情報と文書を作成する必要がある。
- ナノ物質の大部分はナノ形態の段階的導入物質であると予想されているため、低生産量の段階的導入物質に関する新しい毒性学および生態毒性情報の生成の要件の条件は、評価基準が ナノ形態の予測される特性に基づくものであるということを保証するようなものでなければならない。
- すべての異なるナノ形態およびナノ形態のセットは、安全性の実証において登録者によって考慮されるべきである。
- 吸入可能なナノ形態の、特に作業場での潜在的なばく露を効率的に評価するために、異なるナノ形態またはナノ形態のセットについて、ダスティネスに関する情報を提供する必要がある。
- 最小生産量の急性毒性試験は経口経路を介した試験が必要とされるが、ナノ形態については、吸入、または非常に特殊な場合には、皮膚経路がより適切なばく露経路と考えられる。
- 異なるナノ形態またはナノ形態のセットを特定するために使用されるものに加えて、多くの特定の物理化学的特性が、個々の場合に応じて必要なパラメータについてのナノマテリアルの特性の科学的理解に適切であるとみなすことができる。作業性およびつり合いの理由から、他の粒子特性が、これらのナノ形態のハザードあるいはばく露に有意に影響を及ぼす場合には、100 トン以上の高生産量物質の登録者のみが明示的に

そのような情報を考慮する必要がある。

- 提案された改訂の規定の遵守は、すべての登録者および川下のユーザーがナノ形態を有する物質のより具体的な要件に適応するのに十分な時間を与えるために、直ちに要求される必要はない。

上記のパブリックコンサルテーションで EC に寄せられたコメントが、EC によりオンラインに掲載された。コメントは全部で 36 件提出され、受け取ったコメントは以下のカテゴリーに分類される；

- 米国化学協議会 (ACC) のナノテクノロジーパネルを含むビジネス協会。Fachverband der Chemischen Industrie (FCIO) ; 合成アモルファスシリカ生産者協会 (ASASP) ; ヨーロッパの日本ビジネス協議会 (JBCE) ; 塗料、印刷インク、アーティストの色彩産業 (CEPE) の欧州評議会； ナノテクノロジー産業協会 (NIA) ; ドイツの塗料および印刷インク協会 (VdL) ; 日本化学工業協会； ドイツ化学工業協会 (VCI) ; 欧州化学工業協議会 (Cefic) 等
- フランスの食品、環境および労働安全衛生機関 (ANSES) を含む公的機関。連邦公共サービス (FPS) の健康、食品連鎖安全と環境、DG 環境-化学物質のリスク管理
- ナノテクノロジーとナノテクノロジー (アビシエン) を含む、非政府組織。ヨーロッパ環境局 (EEB)。動物のためのユーログループ； ZERO-Associação Sistema Terrestre Sustentavel； および Peta 国際科学コンソーシアム Ltd
- Evonik Industries AG などの会社/ビジネス組織。BASF SE； SwedNano Tech； Eckart GmbH； Merck KGaA； 欧州中小企業連盟 (UEAPME) および DaneColor UK Ltd
- GRACE GmbH を含む環境団体。インターエンバイロメント・ワロニー (IEW)； ヨーロッパ環境市民組織 (ECOS)； 国際環境法センター (CIEL)
- その他。Society for Institutional Analysis (sofia)； グラフェン旗艦； Wirtschaftskammer Österreich (WKÖ) など

(b) 各種ガイダンス文書の更新・発表

ECHA では、REACH 規則に係るガイダンス文書の更新作業を行っており、REACH 規則の下で、2018 年の登録〆切前にナノ形態をカバーするドシエを準備する登録者を支援するための以下の文書を 2017 年 5 月～7 月にかけて発表した；

- ① 『How to prepare registration dossiers that cover nanoforms – best practices』
(ナノ形態をカバーする登録ドシエの準備方法に関するベストプラクティス)
- ② 『Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment』
関連
 - ✓ 『Appendix R.6-1 for nanomaterials applicable to the Guidance on QSARs and Grouping of Chemicals』(化学物質の QSARs とグルーピングに関するガイダンスへのナノマテリアルの適用に関する付録 R.6 章、2017 年 5 月、

version 1.0)

- ✓ 『Chapter R.7a:Endpoint specific guidance』(第 R.7a 章:エンドポイント固有のガイダンス、2017 年 7 月、version 6.0)
- ✓ 『Appendix R7-1 for nanomaterials applicable to Chapter R7a Endpoint specific guidance』(第 R7a 章エンドポイント固有のガイダンスに適用するナノマテリアルに関する付録 R7-1、2017 年 5 月、version 2.0)
- ✓ 『Appendix R7-1 for nanomaterials applicable to Chapter R7b Endpoint specific guidance』(第 R7b 章エンドポイント固有のガイダンスに適用するナノマテリアルに関する付録 R7-1、2017 年 5 月、version 2.0)
- ✓ 『Appendix R7-2 for nanomaterials applicable to Chapter R7c Endpoint specific guidance』(第 R7c 章エンドポイント固有のガイダンスに適用するナノマテリアルに関する付録 R7-2、2017 年 5 月、version 2.0)
- ✓ 『Chapter R.7b:Endpoint specific guidance』(第 R. 7b 章:エンドポイント固有のガイダンス、2017 年 6 月、version 4.0)
- ✓ 『Chapter R.7c:Endpoint specific guidance』(第 R. 7c 章:エンドポイント固有のガイダンス、2017 年 6 月、version 3.0)
- ✓ 『Part C:PBT/vPvB assessment』(Chapter R.11) (パート C:PBT/vPvB 評価、2017 年 6 月、Version 3.0)

上記のように ECHA では、REACH 規則に係るガイダンス文書の更新作業を随時進めているが、ガイダンス文書については、ドラフト文書についても、2018 年の登録期限までの登録に際して、その内容を踏まえることが有益であろう、との見解を示している。

a) ナノ形態をカバーする登録ドシエの準備方法に関するベストプラクティス

ECHA では、REACH 及び CLP 規則に関する解説書を公表しており、その 1 つに、ナノマテリアルに関する解説書として、『How to prepare registration dossiers that cover nanoforms: best practices』(ナノ形態をカバーする登録ドシエの準備の仕方:ベストプラクティス、2017 年 5 月、version 1.0)がある。

本文書は、1 つの物質の異なる形態を区別するための推奨事項と、ナノ形態に関する情報を一貫してドシエに報告する方法を提供している。また、ナノ形態を網羅する登録ドシエを準備する登録者への助言を与えるために作成されたもので、本文書で提供される助言は、登録者のためのものであり、ベストプラクティスあるいは推奨事項を示す。ここで示されるベストプラクティスは、ナノマテリアルの定義に関する委員会勧告を満たす物質を登録する際に、最低限推奨される要素を特定するもので、これらの特定された要素は、登録ドシエの対象となる物質の性質を理解する上で重要であると考えられている。なお、ナノ形態を含む登録が対象とするすべての可能性のある物質の有害性は、登録ドシエに記載されている毒性学および生態毒性学的情報により解決されなければ

ならない。また、本文書は、ナノマテリアルに特有の助言を提供することを目的としたものであり、登録に関するガイダンスに示された一般原則の適用を排除するものではない。なお、ECHA は当初ガイダンス文書を意図していたが、ケース A-011-2014 における審議会 (BoA) の決定の結果、勧告ベストプラクティス文書として発行することとなった。

本文書で、どんなナノマテリアルであっても、以下の 3 つの共通要素については区別することができるため、潜在的な登録者は、最低限以下の 3 つの要素の影響について考慮する必要がある、としている；

- ✓ 粒子サイズ (ナノマテリアルの定義を満たすかどうか)
- ✓ 粒子の形状
- ✓ 表面化学 (例: 粒子表面の化学的性質)

上記は、登録ドシエに登録されたナノ形態の特徴づけを行うために推奨される最小限の要素であり、登録された物質により、これら 3 つの要素に、要素を追加したり、又はこれらの要素を修正して報告することは、情報要件を満たすために収集あるいは生成されたデータで決定されるように、特性に対する影響に応じて、必要とされている。

粒子サイズは、ナノマテリアルの定義に関する欧州委員会勧告にもみられるように、ナノマテリアルの用語を定義する上で中心的な役割を果たしている。したがって、サイズは、ナノ形態を報告するための最小限の要素として推奨されている。

粒子形状は、粒子の挙動に影響を与え、毒性に影響を与える可能性があることが、推奨される最小限の要素の 1 つとして、粒子形状を考慮する根拠とされている。

表面化学は、ナノマテリアルは比表面積が大きいため、粒子表面の化学的性質が、その物質の性質に大きな影響を与える可能性があり、表面化学は、表面処理剤による処理により表面に導入された構造及び化学的官能基を生成するために使用されるプロセス条件に依存する。表面化学が粒子特性に及ぼす影響を考慮すると、登録により網羅される物質の全ての可能性のある形態により引き起こされる有害性を決定するための義務を果たす際に、物質の表面化学の変動性は、常に潜在的な登録者により考慮される必要があり、登録者が、表面処理したナノ形態の物質により引き起こされる有害性を決定する際に、表面化学の変化をどのように考慮したかを示す必要がある場合に、表面処理剤の化学的同一性を最小限考慮する必要があるためである。

b) Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment 関連の付録

① Appendix R.6-1 for nanomaterials applicable to the Guidance on QSARs and Grouping of Chemicals

『Appendix R.6-1 for nanomaterials applicable to the Guidance on QSARs and Grouping of Chemicals』(化学物質の QSARs とグルーピングに関するガイダンスへのナノマテリアルの適用に関する付録 R.6 章、2017 年 5 月、version 1.0) は、『Guidance on information

requirements and chemical safety assessment』のうち、化学物質の QSARs とグルーピングに関するガイダンスのナノマテリアル固有の付録として発表されたもので、登録者にナノ形態間(及び非ナノ形態間)と、同じ物質のナノ形態のグループ内で、有害性データの使用を正当化する方法に関するアプローチを提供することを目的としている。ただし、ナノマテリアルに関する QSARs に関しての具体的な助言は、現時点の最先端技術では推奨事項を提供することができないことから、本バージョンでは提供されていない。

表面化学のような物理化学パラメータが異なることで、同じ物質のナノ形態が、潜在的に異なる有害性プロファイルを有する可能性がある。したがって、登録者にとって重要なことは、ナノ形態(及び非ナノ形態)の(生態)毒性学的特性に違いがあるかどうか、すなわち特定のエンドポイントについて追加の有害性データを生成する必要があるかどうかを決定する方法である。本文書では、登録によりカバーされるナノ形態(及び非ナノ形態)の(生態)毒性学的特性及び運命に違いがあるかどうかを評価する方法に関する体系的かつ実用的なアプローチを提供している。ここで示すアプローチは、関連する物理化学パラメータ(考慮するエンドポイントにより異なる可能性がある)に基づいてナノ形態をグループ化する 3 段階からなるアプローチである。なお、本文書で説明しているアプローチは、『the updated OECD 2014 Guidance on Grouping of Chemicals』で概説されている原則に従っている。本文書で推奨する段階的アプローチを図 3.1-1 に示す。

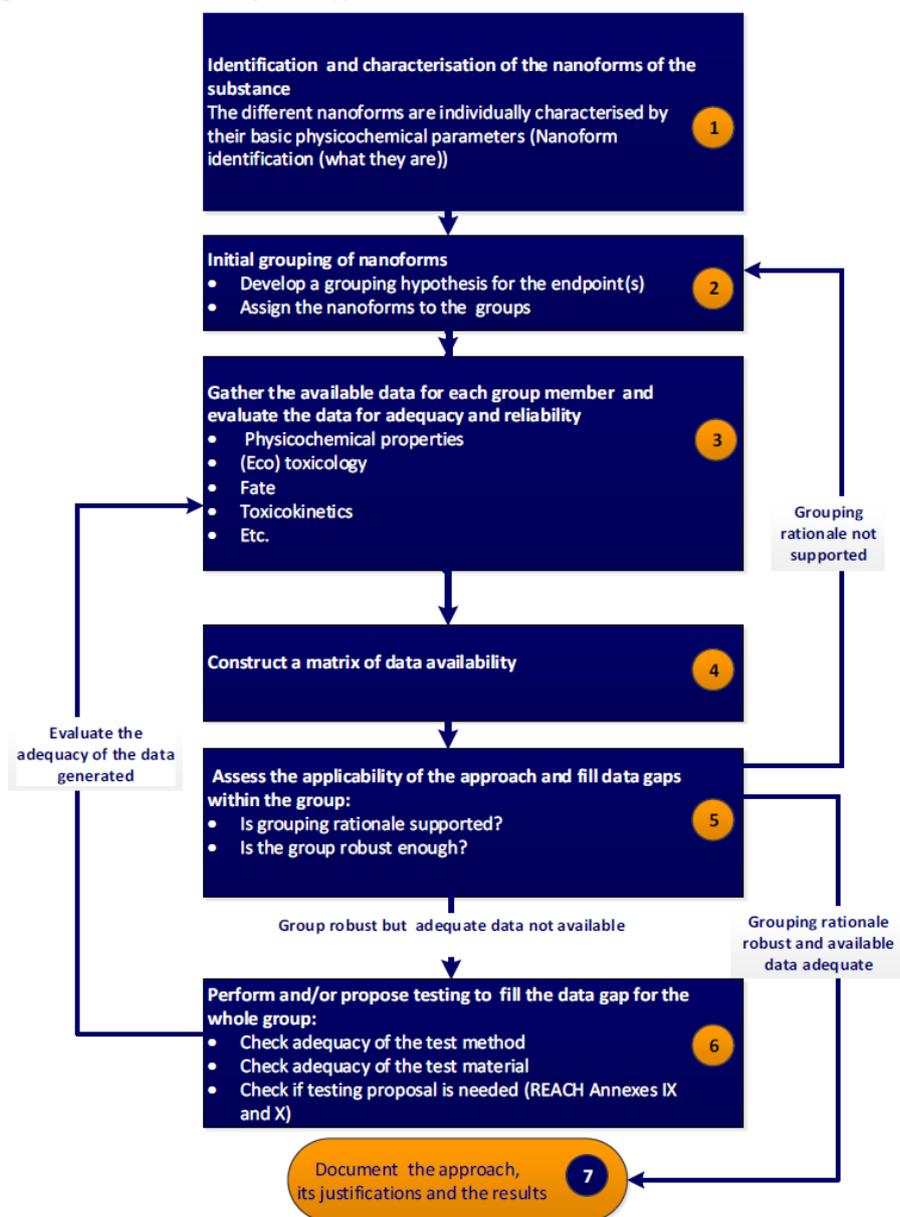


図 3.1-1 化学物質の QSARs とグルーピングに関するガイダンスへのナノマテリアルの適用に関する付録 R.6 章で推奨する段階的アプローチ (同文書 Figure 1)

② Appendix R7-1 for nanomaterials applicable to Chapter R7b Endpoint specific guidance

『Appendix R7-1 for nanomaterials applicable to Chapter R7b Endpoint specific guidance』(第 R7a 章エンドポイント固有のガイダンスに適用するナノマテリアルに関する付録 R7-1、2017 年 5 月、version 2.0) は、『Guidance on information requirements and chemical safety assessment』のうち、R7a 章に適用するナノマテリアルに関する付録 R7-1 の更

新版として発表されたもので、バージョン 1 は 2012 年 4 月に公表されている。本文書は、ナノマテリアルである試験材料に対する特定の推奨事項に焦点を当てている。

本文書は、「第 2 章 物理化学パラメータに関する推奨事項」と「第 3 章 ナノマテリアルに対する毒性学的情報要件に関する推奨事項」の 2 つからなる。

「第 2 章 物理化学パラメータに関する推奨事項」では、「2.1.1 試料調整」で、ナノマテリアルの特徴づけ及びその後の試験に向けた最も重要なステップの 1 つが試料調整であり、試料調整の方法を検討する際に考慮すべき多くの変数があり、かつナノマテリアルについては、強凝集体や弱凝集体が分散したり、粉末になったり、エアロゾルの形態で存在する可能性があるため、それらの形態の存在が、合成、貯蔵、取扱いの方法を含む多くの要因によって影響を受けることに留意する必要がある。強凝集や弱凝集の状態は、ナノマテリアルの特徴づけと試験の解釈に影響を与える重要なパラメータであると認識されているため、試料調整中も考慮する必要がある。また、液体媒体中の粒子の挙動は、溶液中での分散時期と溶解時期を区別することが困難であり、認識に当たっていくつかの追加の重要な側面と課題がある。また、関連する試料調整を開始するためには、『Guidance on Sample Preparation and Dosimetry for the Safety Testing of Manufactured Nanomaterials, OECD No. 36, ENV/JM/MONO (2012) 40』(製造されたナノマテリアルの安全性試験のための試料調整及び投与量測定ガイド)を考慮する必要がある。例えば、試料調整に当たって、以下の側面は重要であると考えられている；

- ナノマテリアルの物理化学的特性(例えば、粒度分布、形状、比表面積、組成、不純物、表面化学)と、試験媒体中に存在する状態(凝集/沈殿の程度)の特徴づけ
- ナノマテリアルの試験項目の調整と分散は、試験媒体の特徴を考慮すべきである。(生態)毒性試験媒体におけるその特性により、ナノマテリアルの物理化学的特性は、生物学的な(生態)毒性学的影響と同様に、これらの媒体における生物-物理化学的条件との相互作用による影響を大きく受ける。したがって、試験では、ばく露濃度を監視するための分析を同時に実施すべきである。
- 粉末の使用及び/又はエンドポイントに依存した分散などの試験段階を含む可能性があるため、試料調整もまた、管理、一貫性、関連性、信頼性、堅牢性が必要であり、試験項目は多段階の調整プロセスを受ける可能性がある。
- 選択された試料調整手順(及び、適用されている場合は、管理)は正当化され、研究の要約で十分に報告されるべきである。
- 最適な投与量測定基準(dose metrics)は知られていない可能性があるため、利用可能な場合には、質量測定基準に加えて、質量ベースのものよりも、表面積や粒子数などの他の投与量測定基準を使用する。

「2.2 エンドポイントに関する具体的な助言」では、「2.2.1 水溶性」、「2.2.2 n-オクタノール/水分係数」、「2.2.3 粒度分布」、「2.2.4 吸着/脱着」について記載し、それぞれについて、その他のガイドラインやプロトコルも紹介/参照している。

「第 3 章 ナノマテリアルに対する毒性学的情報要件に関する推奨事項」では、「3.1 一般的な注意書き」と「3.2 個別エンドポイントに関する特定の助言」を記載している。「3.1 一般的な注意書き」では、「3.1.1 ヒト健康のエンドポイントに関する試験実施とサンプリング戦略、及び試料調整に関する一般的な注意書き」として、試験材料の特徴と報告、生物学的サンプリング、非動物試験アプローチの使用、*in-vitro* 試験、について記載している。「3.1.2 試験妨害の考慮に関する注意書き」では、選択する試験法による妨害効果について記載している。「3.2 個別エンドポイントに関する特定の助言」では、「3.2.1 反復投与毒性」、「3.2.2 変異原性と発がん性」について、試験実施時に考慮すべき点等の助言を記している。

③ Appendix R7-1 for nanomaterials applicable to Chapter R7b Endpoint specific guidance

『Appendix R7-1 for nanomaterials applicable to Chapter R7b Endpoint specific guidance』(第 R7b 章エンドポイント固有のガイダンスに適用するナノマテリアルに関する付録 R7-1、2017 年 5 月、version 2.0)は、『Guidance on information requirements and chemical safety assessment』のうち、R7b 章に適用するナノマテリアルに関する付録 R7-1 の更新版として発表されたもので、バージョン 1 は 2012 年 4 月に公表されている。

本文書は、ナノマテリアルである試験材料に対する特定の推奨事項に焦点を当て、ナノマテリアルに関する生態毒性学的なエンドポイントに対する推奨事項と、ナノマテリアルの生態毒性と運命に関する試験実施方法に関する一般的助言と、水生生物や堆積物に関する試験ガイドライン、分解/生分解/輸送、といった個別のエンドポイントに関する具体的な助言を記している。

④ Appendix R7-2 for nanomaterials applicable to Chapter R7c Endpoint specific guidance

『Appendix R7-2 for nanomaterials applicable to Chapter R7c Endpoint specific guidance』(第 R7c 章エンドポイント固有のガイダンスに適用するナノマテリアルに関する付録 R7-2、2017 年 5 月、version 2.0)は、『Guidance on information requirements and chemical safety assessment』のうち、R7c 章に適用するナノマテリアルに関する付録 R7-2 の更新版として発表されたもので、バージョン 1 は 2012 年 4 月に公表されている。

本文書は、ナノマテリアルに関する生態毒性学的なエンドポイントに対する推奨事項と、水中での生物蓄積性や陸上生物への影響、といった個別エンドポイントに対する具体的な助言を記している。

(c) ナノマテリアルの EU オブザーバトリ (EUON)

2017 年 6 月 14 日に、ECHA は、EU 市場でのナノマテリアルに関する情報の透明性を高めることを目的とした公開ウェブサイトである、European Observatory for Nanomaterials (ナノマテ

リアルな EU オブザーバトリ (EUON)¹ を立ち上げた²。ECHA は、2016 年に欧州委員会との間で、オブザーバトリを開発し主催することに関する合意に調印した。

EUON は 3 段階で開発される予定である。最初に、EHCA は使用されている用途や潜在的な安全衛生上の問題など、ナノマテリアルに関する EU 市場での既存データを収集する。プラットフォームはまた、EU やその他の管轄区域でどのように規制されているか、また関連する進行中の研究プロジェクトに関する情報を提供する。次の 2 段階では、それぞれ 2018 年と 2019 年のリリースが予定されており、様々な情報源からのデータの統合と、オブザーバトリ ウェブサイト上の検索機能の改善に取り組むとしている。同時に、欧州の研究データや消費者の選択に関する研究など、より多くの情報を外部情報源から検索する予定である。新しいデータは、1 つ 1 つ次の年または 2 年間でオブザーバトリに追加される予定である。

また、次のフェーズに貢献する 2 つの研究を開始する予定である。その 1 つは、よく知られている、消費者製品のナノ顔料の潜在的な使用リスクと労働者のための文献レビュー、である。第 2 の研究では、市場のナノマテリアルに関するより多くの情報を収集するために、市場調査と関連性と信頼性を生み出すために使用されるパラメータに焦点を当てる。

a) ステークホルダー・ダイアログ会合³

ECHA は、認可されたステークホルダーと加盟国に対し、6 月 30 日、EUON (EU Union of Observatory Nanomaterials) の傘下にあるステークホルダー・ダイアログ会合に参加するよう招待した。この会合の目的は、EUON の将来の発展に関する招待された締約国からの意見を集めることでした。詳細な議題は附属書 I に、参加者のリストは附属書 II に記載されている。

イベントに先立って、最初の打ち上げ時のフィードバックを収集するための調査が開始された。これを受けて、このイベントは、受け取ったコメントを明確にするとともに、ステークホルダー間の共通の見解に向けて議論を進める機会となった。

一般的に、この会合では、オブザーバトリーをさらに発展させる方法の見解やアイデアを取り上げることに焦点を絞った。ユーザーの多様なニーズに対応するためにウェブサイトのコンテンツを拡大し、外部のデータベースや出版物を利用して研究成果や既存のデータを配布したり、EUON に対する新たな研究を実施したりする。これは、3 つのテーマに基づいた世界的なカフェ・アプローチを通じて行われた;

① コンテンツに関する将来のアイデア

オブザーバトリーのコンテンツは、多くの異なる視聴者をターゲットにする必要がある。本セッションでは、将来の可能性のあるコンテンツに関するブレインストーミングが行われた。参加者には、コンテンツを提案する際に、以下のターゲットオーディエンスを念頭に置くように求められた;

¹ <https://euon.echa.europa.eu/>

² <https://echa.europa.eu/-/eu-observatory-for-nanomaterials-launched>

³

https://euon.echa.europa.eu/documents/23168237/23372605/workshop_report_en.pdf/4fd4bb2d-bc12-244d-d997-29d855c2cadd

- ✓ 一般市民／消費者
- ✓ 規制者
- ✓ 科学者
- ✓ 労働者
- ✓ 産業

この議論の結果、以下に要約されるいくつかの重要な提案が得られた。

● 一般的な提案

参加者は、EUONの将来の発展についてECHAが検討するための、多くの一般的な提案やコメントを提出した。これらには、

- 野心の正しいレベルの設定:いくつかの参加者は、相当量の情報が利用可能である一方、情報の収集、検証、および審査は膨大な作業であると指摘した。タスクのサイズは、対象となるさまざまな視聴者の数によってさらに複雑になる。一部の参加者は、この野望を達成するためのコストは法外なものになるかもしれないと警告した。いくつかの参加者は、特定の視聴者および/または情報源に焦点を当てることを提案した。
- データを収集するための機関を設置する:参加者は、EUONに必要なデータ/情報を収集する責任者を設置することを提案した。そのような機関は、1)ステークホルダーにデータ提出を促すために異なるステークホルダー/組織と連絡をとること、および2)天文台を通して伝えられる情報/データの品質を管理するためのシステムを提供すること。

● 推奨されるコンテンツ／データベース

参加者は、EUONは以下の情報源を考慮すべきであると示唆した:

- ナノ材料関連研究プロジェクトの要約:少なくとも1つの加盟国は、その加盟国が資金を提供する研究プロジェクト(例えば、英国研究評議会が主催するResearch Fish)の概要を持っている。他の加盟国も同様の制度を有する可能性がある。
- DaNa
- SRI ビジネスインテリジェンストラッカー

さらに、EUONは、ナノマテリアルに関する会議出席者の要約をEUONに提供するために、ナノマテリアルに関する会議/会議主催者との調整を検討することが提案された。

● EUONのための提案された機能

参加者は、今後のEUONの立ち上げに向けて以下の機能を提案した。

- ライフサイクルベースのエントリーポイント:物質への一般的なアプローチは、物質中心のアプローチで情報を構造化し、それによって問題の物質に基づいて情報を見つける。

ライフサイクルのさまざまな段階(物質、労働者/製造、製品/消費者、ライフサイクル/廃棄物の終わり)に異なるエントリーポイントがあることが示唆された。これにより、さまざまな視聴者が最も興味のある分野を選択することが可能になる。

- 参加者は、個々の製品に関する情報を収集し、それらを含むナノマテリアルにリンクすることが可能かどうかについて議論したが、これは不可能ではないにしても難しいと見なされた。代わりに、EUON は製品データベースの構築を試みるのではなく、製品カテゴリに焦点を当てるべきであると提案された。カテゴリ内の個々のナノマテリアルと、特定の製品カテゴリ内のナノマテリアルの機能の説明を提供することができる。
- 国の法律を含む立法に関するより包括的な情報が必要と考えられた。

● 推奨される研究

参加者は、ナノマテリアルに関する将来の外部研究のためのいくつかの潜在的トピックを提案した。これらには、

- 職場におけるナノ物質の規制:異なる加盟国のナノマテリアルに対してどのように労働安全衛生が実施されているか? この結果はハンドブック/ガイドラインになる可能性がある。
- 異なる研究プロジェクトの成果はどのようにしてさらに活用できるのか。

② 促進、マルチプレイヤー、他のプラットフォームへの接続

ECHA は、EUON の目標と目的を説明するためのいくつかの重要なメッセージを開発している。グループは、EUON のマルチプレイヤーとして誰が行動できるのかと同様に、これらを反映するように求められた。

- ナノ物質は、それらを有用にする特定の特性を有するが、場合によっては、それらが人の健康および環境に有害になる可能性もある
- ナノマテリアルは他の化学物質と同じ規制によって規制されている
- ナノマテリアルは他の物質と似ており、一部は有害であり、一部は有害ではなく、その危険性や危険性はケースバイケースで評価されなければならない
- 現在、リスクアセスメントを防止する多くの場合に使用されるナノマテリアルの潜在的な危険性に関する情報が不足している

業界を代表する多数の参加者とのディスカッションにより、以下に列挙された主要メッセージに関するいくつかの有用なアイデアやフィードバックが得られた;

- 聴衆にアプローチする
- 重要なメッセージのフィードバック
- コンテンツに関する一般的なコメント

③ 3年後の成功要因の特定

成功はさまざまな方法で測定できる。これには、成功の定量的測定（例えば、研究または物質の数、EUON ウェブサイトのヒット数）、ならびに定性的指標が含まれる。参加者は、成功の定量的および定性的尺度の両方の提案を提供するよう求められた。

成功要因と関連したいくつかの有用な点が議論で提起された：

- 定量的成功要因
- 定性的成功要因
- 広義での潜在的なリスク

b) 登録データに化粧品に使用されるナノマテリアルをリンク

欧州委員会 (EC) は、欧州連合 (EU) 市場で化粧品に使用されるナノマテリアルのカタログを発表しているが、2018年2月5日、EUON (European Union Observatory for Nanomaterials) は、欧州化学物質庁 (ECHA) のデータベースにある登録、評価、認可、制限 (REACH) の登録データカタログ中のナノマテリアルにリンクしている表を公表した。EUON によると、ECHA データベース内の化学物質をケミカルアブストラクトサービス (Chemical Abstracts Service: CAS) 番号および/またはカタログ内のナノマテリアル名と照合することによってリンクしている。EUON は、化粧品規制の下でのナノマテリアルの登録と REACH 下の化学物質の登録は異なる範囲を有するので、常に完璧に一致をすることはできないと注意している。

いくつかのカタログエントリーは、REACH の下で登録された化学物質よりも範囲がより具体的である。EUON は、REACH 登録が、化粧品に使用される化学物質のナノ形態のものを特別にカバーしていない可能性があるかと警告している。

(d) EU の化学物質“ファインダー”

2017年3月末に、ECHA は EU 内で物質がどのように規制されているかを概観する「EU 化学物質規制ファインダー」データベースを導入すべきかどうかを決定するためのフィージビリティ・スタディの作業を開始した。ファインダーは、ECHA が化学物質についてのさまざまな法律や規制プロセスに関する情報を統合するために使用する、普及用のポータルサイトの継続的な機能強化である。このスタディは11月までに終了する予定で、来年にそれを先に進めることに決ったら、ECHA は2019年の第1四半期に向けての開発を開始することになる。これは ECHA が進めてきた「透明性 (Transparency) を向上させる」努力の一環である。

(e) ナノマテリアル専門家グループのための web ページ

ECHA は2012年10月に創設されたナノマテリアル専門家グループ (NMEP) のウェブページを作成した。NMEP は、ナノマテリアルについての化学物質の登録、評価、認可および制限 (REACH) 規制、分類、表示、包装 (CLP) 規制、および殺生物製品規制 (BPR) の実施に関する科学技術上の問題についての専門家間の共通の基盤を求めることを目的としている。ECHA によ

れば、このページには、NMEP の任務や活動に関する情報、メンバーリスト、会議のスケジュールが含まれており、将来は会議の議事録も含まれる。

(f) 二酸化チタンの分類と表示のための RAC の結論

ECHA は、2017 年 9 月 27 日に、リスク評価委員会 (RAC) が、調和分類・表示 (CLH) に関する、二酸化チタンを含む 10 件の意見をまとめたと発表した。2016 年 5 月、フランスは二酸化チタンは、吸入すると人に発がん性を示す可能性があるとのみならず、カテゴリー 1B-H350i に分類されるべきであるという CLH 提案を提出した。フランスは、この分類は、「形態、結晶相および表面処理の点で区別することなく、」二酸化チタンの微粒子およびナノ物質の両方に適用することを提案した。

2017 年 5 月 29 日～6 月 2 日および 6 月 8 日～9 日に開催された RAC-41 で、RAC は、「利用可能な科学的証拠が[分類、表示および包装 (CLP)]規制において、二酸化チタンを吸入経路で癌の疑いのある物質とする基準に合致すると結論した。」

ECHA のプレスリリースの附属書には、RAC が 2017 年 9 月 18-22 日に開催された RAC-42 の前に書面による手続きで最終意見を採択したことが記載されている。RAC は二酸化チタンをヒトの発癌物質である可能性があるカテゴリー 1B と分類する提案に同意しなかったが、「ヒト発がんが疑われるカテゴリー 2, Carc.2; H350(吸入)、すなわち口腔または経皮経路ではない、として分類することに同意した。」 ECHA は、この意見は RAC のウェブページで「近い将来に」利用可能であると述べている。

(iii) 欧州委員会共同研究センター (JRC)

(a) ナノマテリアルの安全性評価のための NANoREG フレームワーク報告書

EC の共同研究センター (JRC) は、『JRC Science for policy report: NANoREG framework for the safety assessment of nanomaterials』(ナノマテリアルの安全性評価のための NANoREG フレームワーク、2017 年 4 月)と題する政策科学報告書を発表した。報告書は、NANoREG プロジェクト「ナノマテリアルの規制試験に関する欧州共通の取組み」の中で開発された。

NANoREG フレームワークは、現在の欧州の規制枠組み下で、REACH 規則に焦点を当て、ナノマテリアルの環境健康安全 (EHS) 評価の分野における共通理解のためのプロジェクトの提案を表している。この報告書はまた、ナノマテリアルのための REACH の実施を促進する必要性に関する進行中の議論に貢献することを意図している。

主要な結論は、EC、ECHA、OECD、科学界が、「近年、ナノマテリアルの EHS に関する知識を改善し、障害を除去し、ナノマテリアルの規制要件に取り組んでいるステークホルダーを具体的に支援するために緊密に協力してきた」という指摘である。フレームワークは、safe-by-design、ナノマテリアル特有の優先順位づけとリスク評価、ライフサイクルアセスメント、という将来を見据えた戦略を提供しており、科学専門家、規制当局、業界を対象としたものである。

(b) Nanocomput プロジェクト報告書

2017年7月に、JRCがNanocomputプロジェクトの最終報告書「ナノマテリアルの安全性評価における計算手法(computational approach)の有用性と適用性の評価」を公表した。

Nanocomputプロジェクトの主目的は、工業ナノ粒子の性質を予測するのに有用である可能性のある計算手法の現状をレビューし、評価することにより、これらのアプローチが、REACH規制の目的のために役立つかどうかの助言を提供することである。このプロジェクトは、定量的構造・物性関係(QSPR)と定量的構造・活性関係(QSAR)モデル、およびそれらのナノマテリアルの特性を予測する潜在的役割を強調した。さらに、Nanocomputプロジェクトは、多様な配列のコンパートメントベースの数学モデルの状態を評価した。これらのモデルは、毒物動学的、毒物動態学的、インビトロおよびインビボの用量決定、ならびに環境運命モデルを含んでいた。このレポートには、Nanocomputプロジェクトの全体的な結論が含まれている。これには、文献レビューやグループピングとリードアクロスに関する研究ベースの事例研究からの教訓が含まれている。ナノ材料の挙動の知識やツール(データベースや予測モデルなど)の適用性における現状の知識の欠点を克服することを意図した勧告およびナノマテリアルの規制査定にそのようなツールを使用する実践的なガイダンスを提供している。

(c) ナノマテリアル安全性評価のための NANoREG Toolbox

JRCは、2017年10月に、ナノマテリアルの安全性評価のための NANoREG ツールボックスを発行した。JRCはこれまで、ナノマテリアルの安全性評価のための NANoREG フレームワークと名付けられた科学政策の報告書を発表した。報告書は、NANoREG プロジェクト「ナノマテリアルの規制試験に関する欧州共通の取り組み」の中で開発された。NANoREG フレームワークは、化学物質の登録、評価、認可および規制(REACH)に焦点を当て、現在の欧州の規制枠組みのもとでのナノマテリアルの環境健康安全評価の分野における共通理解のためのプロジェクトの提案を提示したものである。

ツールボックスは、欧州 REACH の文脈における規制当局やその他の利害関係者にとって有用な利用可能なツール(試験方法、データセット、モデル、ガイダンス文書、デシジョンツリー)の概要を提供することによって、フレームワークの実行を支援する。これらのツールは、NANoREG の科学的成果物で公開されたものだけでなく、安全性評価において1つ以上の「ナノに特異的なハードル」に取り組んできたヨーロッパレベルおよび他のイニシアチブからのものも含んでいる。ツールボックスは、現在の(現在利用可能なツールとアクセス可能な)ツールと将来の(約束された)ツールを区別する。結果として得られる2つの Excel®ワークブックは、1つのファイルに圧縮され、詳細な情報とメタデータが添付されたカテゴリー化されたツールの幅広いレビューを含んでいる。このデータセットは、「拡張または活用のために、規制当局や産業界のグローバルナノ EHS コミュニティが自由に入手できる。」

(iv) 消費者安全科学委員会 (SCCS)

(a) 紫外線遮蔽用の皮膚に塗布する化粧品の二酸化チタンナノ粒子のコーティングに関する最終オピニオン

2017年3月7日、SCCSは、リン酸セチル、二酸化マンガンあるいはトリエトキシカプリルシランで被覆された二酸化チタン(ナノ形態)の、紫外線遮蔽用の皮膚に塗布する化粧品としての使用に関する最終的なオピニオンを発表した。

この3種類のコーティングをしたナノ二酸化チタンについて、皮膚吸収や一般的な毒性データは充分ではないが、健康で、無傷の、あるいは日焼けした皮膚への塗布という化粧品としての使用は安全であるとした。ただ、経口吸収の可能性があるような使い方には注意が必要であると指摘した。また、肺からの吸収はないものとし、環境影響も考慮していない。

(b) 紫外線遮蔽用途の二酸化チタンナノ粒子を使用したスプレーについてのオピニオン

2015年7月にECは、紫外線遮蔽用途の二酸化チタンナノ粒子と5.5%の濃度までの個人用のスプレー製品の安全性を支持するデータを産業界から提出されていた。ECはSCCSにそのデータの検討を依頼していたが、3月10日、このデータでは、安全性を保証するには不十分であるとの結論を出した。提出されたデータには、スプレー製品からのばく露や吸入による毒性実験が含まれておらず、皮膚への塗布の実験結果のみであったからである。このオピニオンに関して5月14日までコメントを受け付けた。

二酸化チタンを含む噴霧可能な日焼け止めのいくつかの製品は、安全ではない可能性がある、とECの科学委員会が結論づけた。SCCS(消費者安全科学委員会)からの意見書では、UVフィルターとして濃度上限5.5%で二酸化チタンを含む噴霧可能なパーソナルケア製品に限定されている。委員会は、産業界から提供された情報は、安全性評価を行うには不十分であった、と述べている。特に、産業界のドシエには、EUの噴霧可能な日焼け止め市場の20%を占める非水系ベースで形成されたもののばく露データは含まれていなかった。また、吸入に関連する適切な毒性評価も提供しなかった。提供された情報によれば、SCCSは、ナノスケールの二酸化チタンを含む市場では既に噴霧可能な製品が存在する。「消費者の吸入による肺のばく露による有害な影響を避けるために、このような使用法は慎重に評価する必要がある」と付け加えている。意見書では、だれがドシエを提供したかは明らかにしていない。対応する「SCCS要求に対する要求」は、オランダ企業DSM Nutritional Productsが噴霧可能なパーソナルケア製品におけるUVフィルターとしての二酸化チタンの使用を支援するためのドシエを提出した、と述べている。

(v) 欧州食品安全機関 (EFSA)

(a) Efsa パネルは2つの食品接触材料を許可

欧州食品安全局(Efsa)の科学パネルは、2つの公表された意見書で、食品接触材料(FCM)への使用に関して、セレンナノ粒子とイソブタンを通過させた。

セレンナノ粒子は、参加の影響を受けやすい FCMs の酸化防止剤として使用される。EFSA の食品接触材・酵素・香料・加工助剤 (CEF) パネルは、ポリオレフィン層によって食品から分離された多層フィルムに使用される際に、食品中へのセレンの移行を検出しなかった。このようにして、ナノ粒子は消費者に安全上のリスクをもたらさない、と結論づけた。

イソブタンは果実、野菜、肉、魚及びチーズなどの食品を包装するために使用される発泡ポリスチレン (EPS) を製造するための発泡剤として使用される。

CEF は、この物質の使用に対して安全性の懸念がなかった。移行データに基づいて、ばく露は「極めて低い」と推定された。

(b) 活性な食品接触材料に使用するためのセレンナノ粒子の安全性評価を発表

上記に関連して、欧州食品安全局 (EFSA) の、食品接触材料、酵素、香料、および加工助剤に関するパネルは、(PET) 層と内部ポリオレフィン (食品接触) 層とを含む多層ラミネートの接着中間層にセレンナノ粒子を組み込んだ食品接触材料 (FCM) 物質番号 1070 を評価した。パネルの評価結果は、EFSA ジャーナルの 2018 年 1 月号に「活性な食物接触材料に使用するための活性物質セレンナノ粒子の安全性評価」と題する論文に掲載されている。要約によると、すべての試験において、セレンの移動は検出できなかった。この論文では、ポリマー中のナノ粒子の拡散特性に関する現在の知識を考慮して、パネルは以下のように結論している。「セレンナノ粒子を多層フィルムに用い、ポリオレフィン食品接触層によって食品から分離した場合、どんなタイプの食べ物でも、どんな食べ物の接触状態でも消費者にとって安全性の懸念はない。」用いられた活性セレンナノ粒子は 50–90nm のサイズ範囲である。

(c) ナノリスク評価ガイダンスに関するコンサルティングを開始

Efsa は、ナノマテリアルのリスク評価のためのガイダンス文書のパブリックコンサルテーションを開始した。この文書は、食品接触材料及び農薬を含む、食品及び飼料連鎖におけるそれらの使用を包含している。コンサルテーションは 3 月 4 日まで開かれている。

Efsa は、「特に、ナノマテリアルを開発する人々及び安全性試験を行う人々」からの科学的コメントを期待している、と述べている。3 月と 4 月に回答を検討した後、夏までに最終文書を発表する予定である。

これは、2011 年にガイダンスが作成されて以来、Efsa のナノマテリアルガイダンスの最初の改訂である。Efsa は、それ以来行われている関連する科学的発展を含む、と述べている。

例えば、ナノマテリアルが消化管間にある状態で迅速かつ完全に分解するかどうかに関心が置かれている、ということがある。Efsa はこれを段階的提案の重要な第一歩として含めた。

また、ばく露評価へのアプローチが再設計された、と述べている。文書には、ハザードの特徴づけのための新しい階層化された方法 (tiered method) を含んでいる。最初の階層結果に応じて、以下を調査する研究を依頼する：

- ✓ 生殖発生毒性；

- ✓ 免疫毒性;
- ✓ アレルギー誘発性;
- ✓ 神経毒性;
- ✓ 腸内微生物に対する影響;そして
- ✓ 内分泌活動

2011年のガイダンスと同様に、Efsaは、経口摂取によるナノマテリアルへの経口ばく露に焦点を当てている。しかし、飼料添加物や農薬の存在を評価するために、皮膚ばく露と吸入の要素を新たに追加した。

● 定義

古いガイダンスのもう1つの重要な違いは、最新の文書がナノマテリアルをどのように定義しているか、であり、化合物がナノマテリアルか否かを決定する方法に関わる最近公表された定義及び法的枠組みを考慮している。

化粧品規則、殺生物性製品規則(BPR)、食品に関する規制の枠組みなどのEUの部門別規制には、様々な法的定義を有する同様のナノ固有の規定が含まれている。

これらの多くは、ある材料がEfsaのガイダンスの範囲内にあるかどうかを決定する検討することができる。例えば、BPRにおける定義は、ナノ農薬を特定するためのガイドとして用いられるべきである。

しかし、食品の法律で定義が確定するまで、どの材料がガイダンスの範囲にあるべきかは不明である、とEfsaは述べている。大まかな指針としてEC勧告により、1nm~100nmの粒子の50%以上の物質を含む物質として定義することができる。

しかし、長期延期された勧告は未だ採択されていない。現在、ステークホルダー・グループによりレビューが行われている。

(vi) EU Nano セーフティークラスタ

2017年12月30日に、EUナノセーフティークラスタ(NanoSafety Cluster : NSC)は、『EU US Roadmap Nanoinformatics 2030』(version for final commenting to 2017-12-30)と題するロードマップ報告書を発表した。

ナノインフォマティクス2030ロードマップは、ナノマテリアル(NM)のリスクアセスメントとガバナンスに関する問題と相まって、複数の相互接続する科学分野の最先端の解説をまとめたものである。ナノインフォマティクスロードマップでは、正式な環境、安全衛生(EHS)データの要件を取込むという別の検討事項が追加されている。例えば、規制当局の評価とガバナンスに関連する優れた実験室慣行、プログラムの方向性ではなく、今後の研究努力と共有ビジョンの調整が、ロードマップの役割である。

(vii) 化粧品関連

(a) 化粧品成分チェックリスト

EC は、消費者安全科学委員会 (SCCS) によって評価される化粧品成分に関するドシエを提出する申請者のためのチェックリストを発行した。(SCCS/1588/17; 3月7日付) チェックリストの中には、ナノマテリアルのチェックリストがある。化粧品規制では、ナノマテリアルを含む化粧品は上市の6ヶ月前に EC に通知し、そのナノスケール成分をラベルに表示することが義務付けられている。チェックリストの主な目的は、申請者とSCCSの両方が、書類が完全であるかどうかを迅速に評価し、不完全であるか不適当な/関連のないデータを含むドシエの提出を防止することである。これにより、安全性評価プロセスが合理化され、両方の時間とリソースが節約される。EC は、化粧品規制によって要求されるナノ物質のインベントリーの公開が遅れていると批判されていた。EC は、これに対し業界からの情報の品質の低さを非難している。

ナノマテリアルについては、それ以外の成分とは別に示されている。

(b) 化粧品のナノインベントリー

EC は6月15日、EU市場における化粧品中のナノ物質のインベントリの最初のバージョンを発行した。EC は当初、およそ3年半前にインベントリをリリースする予定であった。この遅れは、製造業者と輸入業者が不正確で一貫性のないデータを化粧品通知ポータル (CPNP) に提出し、それらにナノ物質が含まれているかどうかを知らせないためであった。さらに加盟国が市場監視を行うよう求められたため、準備に時間がかかった。このカタログには、着色剤、防腐剤、UV フィルターなどとして使用される43の物質が含まれている。各物質について、それが使用されている化粧品のカテゴリー、ならびに予測可能なばく露条件が含まれる。委員会は、インベントリは情報提供のみを目的としており、許可されたナノ物質のリストではないと述べている。カタログは変更されたまま作業中であり、定期的に更新される」とメンバー国の援助を得て述べている。2016年未までに、CPNP で通知された化粧品の1%未満がナノ物質を含むと特定されたと委員会は付け加えた。

3) 欧州各国

(ア) ドイツ

(i) 「ナノマテリアルのグルーピングのための物理化学的性質と水生毒性との関係の考察」報告書を発表

ドイツ環境保護庁 (UBA) は、2017年11月7日に、藻類、ダニ類及び魚類の胚に対する生態毒性作用による人工ナノ物質のグループ分けのコンセプトを開発することを目指した報告書『Considerations about the relationship of nanomaterial's physical-chemical properties and aquatic toxicity for the purpose of grouping』を発表した。

報告書は、1つの物理化学的性質だけに基づいて有意義なグループ化仮説を構築することは不可能であることを見出した。それは、パラメータのセット及び追加の物理化学的特性を考慮する必要があることを提案する。

この報告書では、規制試験のグループ化のコンセプトをさらに進歩させるために、以下の点を調査する必要があると述べている；

- 表面改質
- 低感度であることが明らかな魚の胚試験の代替
- 反応性の測定法の適応
- 凝集挙動、ゼータ電位、反応性及び溶解度などの試験中の選択された物理化学的パラメータの動態の詳細分析
- 統計解析用のより堅牢なデータセットを実現するために、ナノマテリアル及び試験生物当たりの効果値の数を増やす

(ii) 自動車分野のナノテクノロジーに関する専門家対話

2017年9月26-27日、連邦環境・自然保護・建設・原子力安全省(BMUB)は、自動車分野におけるナノテクノロジーの適用の機会とリスクに関する専門家との対話(エキスパート・ダイアログ)を開催した。そこでは、自動車にナノ材料の現在および将来の適用の概要が示された。プレゼンテーションの多くはドイツ語だがオンラインで入手できる。2006年以来、ナノダイアログ(NanoDialogue)はドイツ政府のNano Action Planの一環として実施されており、BMUBはその責任を主導している。目標は、ナノマテリアルの責任ある持続可能な利用を促進するために、ナノテクノロジーの機会とリスクに関するステークホルダー間のアイデアの交換を支援することである。

(イ) スウェーデン

2016年4月、スウェーデン化学物質庁(Kemi)は、2019年2月28日までに化学物質のナノ物質に関する情報を国の製品登録簿に提供するための企業向け規則を作成していると報じられた。2017年6月7日、スウェーデンの貿易委員会(Board of Trade)は、EU委員会に対し、ナノマテリアルに関する化学物質検査官規則の変更計画を通知した。

新規則は、同国の化学物質検査官製品登録簿への通知者は、品目内のナノ物質に関する情報を含まなければならないということである。これには、ナノマテリアルの濃度にかかわらず、製品に注意深く加えられたものも含まれる。

委員会の技術規制情報システム(Tris)への通知には、以下を含むいくつかの免除事項が記載されている；

- 天然に存在するか、または偶発的に生成されたナノ物質。
- 年間売上高が、500万スウェーデンクローナ未満の企業の場合。
- 顔料ナノ材料。

免除は、評価が行われている間、3年間続く。免除された者は、製品の構成要素がナノマテリアルであるかどうかに関する情報を提供すればよい。

貿易委員会は、スウェーデンで使用されるナノマテリアルの概観を作成することを目標としていると述べた。収集されたデータは、それらを識別し、その使用に関する統計を提供するのに役立つとしている。また、これらは、「健康、環境、および職場環境における将来の規制開発の基礎となる監督」にためにも使用することができるという。

上記規則は、2018年1月1日に発効した。スウェーデンの企業は、2019年2月28日までに、化学製品中のナノ物質に関するデータを、その化学物質当局の製品登録簿に通知することが求められる。製品の製造と輸入に適用される義務は、スウェーデン化学物質庁(Kemi)が国内で使用されるナノ物質の種類と量に関する情報を得ることを可能にする。このデータは、今後の健康、環境、職場における規制の進展の基盤となる可能性がある」と当局は述べている。

(ウ) スイス

(i) 市場に出ている繊維状ナノマテリアルの通知を求める

スイスは、2017年9月29日に、欧州委員会(EC)に、危険物質と調製品からの保護に関する条例の改正案を通知した。この告知は、危険物質および調製品からの保護に関する条例が、化学物質のリスク評価と、人の健康または環境を危険にさらす可能性のある化学物質が市場を使用し、それを市場に出すための要件を規定していると述べている。この通知によれば、改正案は、とりわけ、製造業者/輸入業者が伝達するためのリスクに基づく義務を導入している。

- ① スイスで取引されている化学品中間体
- ② 市販されている繊維状ナノ材料

義務は、市場に最初に出されてから3ヶ月以内に遂行されなければならない。この通知には、繊維状ナノ材料の要件に関する以下の根拠が含まれている。「新たな義務として、市場に置かれた繊維状ナノマテリアルに関して、当局および一般に全体像を与えるべきである。特別なリスクが認識されれば、規制上のリスク軽減措置が可能である。」

(ii) 合成ナノマテリアルの新規開示規則を採択

スイスは、いくつかの合成繊維質または管状のナノマテリアルおよび中間化学製品に新しい開示義務を採用した。しかし、業界からの否定的なフィードバックの後、ナノマテリアルの定義に向けて提案された更新が削除された。スイスの化学物質条例(ChemO)の改訂版は、昨年、ステークホルダーとの協議を受けている。これにより、連邦公衆衛生局(BAG)は、ナノマテリアルの通知のための規制を改正する提案を修正した。最終的な変更は1月31日に連邦理事会で採択された。したがって、以下の物質は、3月1日から製品登録簿に報告され、3ヵ月間のリマーケティングの移行期間となる。それらは、以下のとおりである；

- そのまま市販されている5 μm よりも長い繊維またはチューブの形態の生体内残留ナノマテリアル。これらは吸入すると肺に病変を引き起こすことがある。

- 100 kg /年以上の量でスイスで商品化されている中間体。BAGの消費者保護局の Olivier Depallens は、「報告は、市場に初めて出されてから 3 カ月以内に電子的に履行されなければならない簡単な義務である」と述べた。中間生成物は、化学変換プロセスのためにのみ製造され使用される物質であり、1 つ以上の他の物質に変換されるもの。スイスでの報告は免除されていたが、REACH の下で登録されなければならない。公衆衛生局は、「スイス当局は少なくとも、中間体としてのアイデンティティーを知っておくべきだ」と述べている。これにより、中毒相談サービスの Tox Info Switzerland が「中毒の場合の適切な措置」を提案することができるようになる。コンサルテーション・ペーパーの草案には、すべてのナノマテリアルのコミュニケーション要件も含まれていたが、定義と並んでこれも廃止された。現在、危険なナノ物質のみが開示される。昨年の協議は、企業や業界から激しい批判を受けた。スイスの基準を EU の基準と整合させるために、通知要件の削減とナノ物質の定義の先送りが求められた。欧州委員会は最近、2020 年に発効する定義の改訂について協議した。スイスで採択された変更は、連邦議会の合成ナノマテリアルの行動計画の第 1 段階に対応している。第 2 段階は 2019 年から 2020 年にかけて予定されており、REACH (スイス市場では 1t / y 以上) に登録されていない物質の通知を含む。国の化学物質条例は、新規物質の届出; SVHC の同定; 物質および混合物の分類、表示および安全性データシート; を規制している。

(iii) 殺生物剤規制の改正

連邦公衆衛生局は、殺菌剤の規制のための 3 つの条例を 2017 年 9 月に改訂した。これは、EU との調和とそのような認可の相互承認を確保するためである。その他の変更には、OPBio の内分泌かく乱物質の EU 基準の導入、インターネットを通じた有効物質リストの新しい発行方法などがある。同時に、連邦内務省 (DFI) は、BAG によると、EU 内の開発に沿って「同じ殺菌製品」プロセスをもたらすために、殺菌製品に関する施行令を改正した。EU と同じ殺生物剤製品規制により、殺菌製品の「ファミリー製品」の認可手続きが簡単になる。「改正の目的は、人間と環境に対する高いレベルの保護と貿易障壁の回避を保証することである」とオリビエ・デパレンズ氏は述べた。スイス当局は、今後数ヶ月以内に改正条例の非公式英語版を公表する、と付け加えた。

(エ) ベルギー

ベルギーでは、ナノマテリアルを含有する混合物をベルギー当局に登録するよう企業に要求する法律を発効し、ナノ登録を改正する法律は、ベルギー公式ジャーナル (Moniteur Belge) に 1 月 15 日に掲載された。ベルギーは、締切を 1 年遅らせて、2018 年 1 月 1 日としていた。ベルギーのナノ登録は、2014 年の Royal Decree で制定された。このデクレでは、ナノマテリアルを上市した企業に、ナノマテリアルの登録を要求しているが、殺生物剤、医薬品、食品接触材等の製品に対する免除を含んでいる。

ナノテクノロジー産業協会(NIA)の公的・規制業務担当官である Guillaume Flament 氏は、ナノマテリアルを含む混合物の登録は複雑なプロセスであり、長い時間を要した、と業界が述べた後に、延長することが合意された、と Chemical Watch 誌に伝えた。

ベルギーの規制は3か月間の移行期間が提供される、と Flament 氏は追加し、そのため、企業は、登録を3月31日までに修正することになる。化粧品はまた、ナノ登録から免除されていて、その後、EUの化粧品中のナノマテリアルのカタログが発行される。

(オ) フランス

(a) フランスによる検査で化粧品にナノに関するラベルの間違いを確認

フランス市場監視団である DGCCRF(競争・消費者問題・詐欺防止総局)は、2017年中に、40個のマスカラとアイライナーのサンプルのナノのラベルをチェックし、化粧品中にナノ形態でしばしば使用される着色剤であるカーボンブラックについて、8個の製品が正しく言及していないことを確認した。DGCCRF は、2つの製品については、カーボンブラックが検出されたが、物質(カーボンブラック)を表示しておらず、6つの製品は何も確認されなかったが、着色剤にカーボンブラックを含んでいた、と報告書で述べている。

EU は、製品に正しく表示されていれば、特定の用途でのナノ形態のカーボンブラックの使用を認可している。これはスプレーを除く EU が認可している4つのナノ物質のうちの1つである。その他の物質は、UV フィルターのトリスービフェニルトリアジン、二酸化チタン、酸化亜鉛、である。別の UV フィルターの、MBBT(メチレンビスーベンジドリアゾリステトラメチルブチルフェノール)が認可プロセス中である。

EU 化粧品規則では、企業に、化粧品届出ポータル(the Cosmetic Product Notification Portal; CPNP)に全てのナノ材料を宣言することを要求している。また、EC は昨年6月に、化粧品のナノマテリアルカタログを公開した。

検査活動は、8つの NGO からの圧力により促された。これらの NGO は、7月にフランスの首相とその他の大臣に宛ててレターを書き、全ての消費財のナノラベリングの強制と、「緊急の課題として」ナノマテリアルの制限を呼びかけた。DGCCRF は、3つの NGO に対してナノラベルに関する予備調査結果を1月中旬に提示し、それら NGO に対して、2018年中も市場調査と「規制に違反する制裁措置」を継続する予定である、と述べた。

2017年の調査ではまた、33の化粧品サンプルに、カーボンブラック以外のナノ粒子が含まれることが明らかとなった。これらのために、DGCCRF は、「これらの存在理由を確認するために製造者と調査を継続している」と述べた。

フランスのナノ監視団である NGO Avicenn-1月の会合に出席した NGO の1つーの Mathilde Detcheverry 氏によれば、DGCCRF は「全てではないにしても、それらの一部は認可されていないことを疑っている」。

フランスは、化粧品のナノ表示を強化するように欧州で努力を続けている。食品のナノ表示を監視している、フランスの監視団は、欧州レベルでの作業を継続し、「規制の実施を促し、規制を明

確化して改善する」ことを目標としている、と語っている。少なくとも1つのナノマテリアルを含むEU市場の化粧品サンプルは全部で9,000あり、それらはフランスの研究所から押収された、と言う。

DGCCRFは、「テストプロトコルで非常に精力的に作業しており、政府はこの作業をEUレベルで共有したいと考えている」と、NGO Agir pour l'EnvironnementのMagali Ringoot氏は述べている。「我々は、ナノラベルが2018年に、フランスと全てのEU諸国で優先されることを願っている」と述べた。

(カ) その他

(i) 材料技術の革新を加速するエコシステム報告書

EU加盟国の高水準グループ及びナノ科学、ナノテクノロジー、及び高度材料に関連する国々により、2017年10月31日に『材料技術の革新を加速するエコシステム』と題する報告書が発表され、その中で、ナノテクノロジーや先端材料の産業への取込みを加速するために取組む必要のある障壁について検討している。

(ii) ドイツ語圏環境大臣会合

2017年6月19日に開催されたEUの環境大臣会合において、2020年までにREACHの法的枠組みのナノ特有の適応の要請が発表された。ドイツ、オーストリア、スイス、ルクセンブルク、リヒテンシュタインの要請は、最近のナノ当局のダイアログ(Nano-Authorities Dialogue; NAD)の年次会合で採択された「ウィーン宣言」の中で提言されたものであった。これらは、ルクセンブルクで開かれたEU環境審議会の閣僚によって「注目された」ものであった。3年前、ドイツ、オーストリア、ルクセンブルクの環境大臣は、欧州委員会に対し、早急にREACHを更新してナノ物質の詳細を説明するよう促す大きなグループに入った。しかし、欧州委員会の正式な提案はまだ出ていない。

5カ国は、「ナノマテリアルによってもたらされる潜在的な健康および環境リスクを評価するためには、統一された健全な試験および検出技術、測定方法および基準が不可欠である」とし、「OECDがすでに対象としている要素を、法的拘束力のある方法で早急に適用する」。

4) カナダ

2017年は、ナノマテリアルの安全性に係る規制関連の活動は特になかった。

5) オーストラリア

2017年は、ナノマテリアルの安全性に係る規制関連の活動は特になかった。

6) 韓国

韓国 K-REACH(化評法)では、改正案の検討が進められており、上記したナノマテリアルに関

する記載のある施行令が改正され、ナノ物質に関して、以下の条文が新たに追記された⁴。

化学物質の登録、評価等に関する法律施行令(施行 2017.12.26、大統領令大 28502 号、一部改正)

第 2 条第 7 号を次のように新設する。

7.「ナノ物質」とは、次の各項目のいずれかに該当する物質をいう。

- ア) 3 次元の外径寸法のうち少なくとも 1 次元の大きさが 1~100 ナノメートルの粒子分布 50%以上である物質
- イ) 3 次元の外形寸法のうち少なくとも 1 次元の大きさが 1 ナノメートル以下であるフラーレン、グラフェンフレーク、又は単層カーボンナノチューブ

7) その他

(ア) OECD

OECD は、2017 年 10 月 9 日に、ナノマテリアル向けに特別に開発された 3 つのテストガイドラインを発表した;

- Test Guideline 318 : Dispersion Stability of Nnomaterials in Simulated Environmental Media (環境をシミュレーションした媒体におけるナノ物質の分散安定性)
- Test Guideline 412 : Subacute Inhalation Toxicity: 28-Day Study (亜急性吸入毒性試験:28 日間)
- Test Guideline 413 : Subchronic Inhalation Toxicity : 90-day Study (亜急性吸入毒性試験:90 日間)

OECD は、これらの新しいエンドポイントを通じて収集される情報が、ナノマテリアルの潜在的吸入ハザードを評価するためにテストガイドラインを適用できると同時に、ナノマテリアルが作用する可能性のある作用機序 (mode of action) についての理解を高めるであろうと述べている。

また、2017 年に上記以外に以下の 4 文書を公開した;

- No.84 - Consumer and Eivironmental Exposure to Manufactured Nanomaterials – Information Used to Characterize Exposures : Analysis of a Survey (2017/11/7)
- No.83 – Silver Nanoparticles : Summary of the Dossier (2017/10/16)
- No.82 – Strategies, Techniques and Sampling Protocols for Determining the Concentrations of Manufactures Nanomaterials in Air at the Workplace (2017/10/30)
- No.81 – Developments in Delegations on the safety of manufactured nanomaterials (March 2017 – August 2017) (2017/9/26)

(イ) ISO

ISO では、2017 年に新たに以下の文書が公開された。

⁴ <http://www.law.go.kr/lsInfoP.do?lsiSeq=200258&viewCls=lsRvsDocInfoR#0000>

- ISO/TS 10868:2017; Nanotechnologies –Characterization of single-wall carbon nanotubes unig ultraviolet-visible-near infrared (UV-Vis-NIR) absorption spectroscopy(ナノテクノロジー—紫外可視近赤外(UV-Vis-NIR)吸収分光法を用いた単層カーボンナノチューブ(SWCNT)の特徴づけ)
ISO/TS 11888:2017; Nanotechnologies—Characterization of multiwall carbon nanotubes—Mesoscopic shape factor(ナノテクノロジー—多層カーボンナノチューブの特徴づけ—メゾスコピック形状因子)
- ISO/TS 13278:2017; Nanotechnologies -- Determination of elemental impurities in samples of carbon nanotubes using inductively coupled plasma mass spectrometry(ナノテクノロジー—誘導結合プラズマ質量分析法を用いたカーボンナノチューブ試料中の元素不純物の定量)
- ISO/TR 18401:2017; Nanotechnologies -- Plain language explanation of selected terms from the ISO/IEC 80004 series(ナノテクノロジー—ISO/IEC 80004 シリーズから選択された用語の平易な言語説明)
- ISO/TS 18827:2017; Nanotechnologies -- Electron spin resonance (ESR) as a method for measuring reactive oxygen species (ROS) generated by metal oxide nanomaterials(ナノテクノロジー—金属酸化物ナノマテリアルによって生成される活性酸素種(ROS)を測定する方法としての電子スピン共鳴(ESR))
- ISO/TR 19057:2017; Nanotechnologies -- Use and application of acellular *in vitro* tests and methodologies to assess nanomaterial biodurability(ナノテクノロジー—ナノ物質の生体耐性を評価するための無細胞インビトロ試験及び方法論の使用と適用)
- ISO/TS 19590:2017; Nanotechnologies -- Size distribution and concentration of inorganic nanoparticles in aqueous media via single particle inductively coupled plasma mass spectrometry (ナノテクノロジー—単粒子誘導結合プラズマ質量分析法による水性媒体中の無機ナノ粒子のサイズ分布と濃度)
- ISO/TR 19601:2017; Nanotechnologies -- Aerosol generation for air exposure studies of nano-objects and their aggregates and agglomerates (NOAA)(ナノテクノロジー—ナノ物体及びその強弱凝集体(NOAA)の空気ばく露研究のためのエアロゾル生成)
- ISO/TS 20477:2017; Nanotechnologies -- Standard terms and their definition for cellulose nanomaterial(ナノテクノロジー—セルロースナノマテリアルの標準用語とその定義)
- ISO/TS 80004-11:2017; Nanotechnologies -- Vocabulary -- Part 11: Nanolayer, nanocoating, nanofilm, and related terms(ナノテクノロジー—用語集 - 第11部: ナノレイヤー、ナノコーティング、ナノフィルム、及び関連用語)

- ISO/TS 80004-13:2017; Nanotechnologies -- Vocabulary -- Part 13: Graphene and related two-dimensional (2D) materials (ナノテクノロジー用語集 - 第 13 部: グラフェン及び関連する 2 次元 (2D) 材料)

(ウ) IARC

国際がん研究機関 (IARC) は、2017 年 6 月、カーボンナノチューブ、フルオロエデナイト、シリコンカーバイドに関するモノグラフを発行した。本報告書の内容については、本報告書「4. 海外行政機関等の報告書の分析と翻訳」に記載した。

8) 各国・地域の規制動向まとめ

2017 年の各国・地域の主要な規制動向を一覧にして、表 3.1-3～表 3.1-5 に示す。

表 3.1-3 各国のナノマテリアル上市規制

国	法律・規則	内容
EU	REACH	行 REACH でナノマテリアルに対応。REACH 付属文書改訂で安全性試験を強化していく方針。付属文書の改訂を提案し、公開討議中。
	殺生物製品規則	ナノマテリアルが使用されている場合は、ヒト健康、動物健康、環境へのリスクが評価されていること (2013 年 9 月施行)
	改正化粧品規則	ナノマテリアルを含む成分の事前登録、化粧品安全報告書の提出が義務化 (2013 年 7 月施行)
	新規食品規則改正案	人工ナノマテリアルを含む新規食品の上市は認可が必要 (2018 年 1 月 1 日施行)
米国	TSCA (有害物質管理法)	現行 TSCA でナノマテリアルにも対応。CNT 等を新規化学物質としている。懸念物質には SNUR を出し使用条件等に制限を付ける。
	FIFRA (連邦殺虫剤・殺菌剤・殺鼠剤法)	ナノ銀製品に適用 (時限で認可)、但しナノマテリアル故ではない。
カナダ	CEPA (カナダ環境保護法)	現行環境保護法でナノマテリアルに対応。多層 CNT を有害性が疑われる新規化学物質として届出義務化
その他の国		現行化学物質管理の枠組みでナノマテリアルに対応

表 3.1-4 各国のナノマテリアル利用製品の表示規制

国等	法律・規則	内容
EU	改正化粧品規則	成分にナノマテリアルが含まれる場合、製品の成分名称において (nano) と表記しなければならない (2013 年 7 月施行)
	殺生物製品規則	同様な表示規制 (2013 年 9 月施行)
	食品情報の提供に関する規則	同様な表示規制 (2014 年 12 月施行)
	乳幼児食品	同様な表示規制 (2016 年以降)
ニュージーランド	化粧品グループ規準	ナノマテリアル使用化粧品の表示義務 (2016 年～)

国等	法律・規則	内容
その他の国		表示義務なし

表 3.1-5 各国のナノマテリアルの強制報告制度

国等	ナノマテリアルの報告	
EU 加盟国	フランス	年次報告制度（2013年1月施行）
	デンマーク	2014年6月施行
	ベルギー	2015年9月運用開始、ナノ材料を含む製品の報告（2016年1月までに）、複合材料の報告（2017年1月までに）
	スウェーデン	2018年1月1日発効。データ登録×切 2019年2月28日
ノルウェー	2013年1月施行	
米国	1回限りのナノマテリアルの報告・記録保管を義務付ける規則、2017年8月14日発効。	
カナダ	206種類のナノマテリアルについて情報提供を義務化	
その他の国	表示義務なし	

3.2. 主要学会等におけるナノマテリアル等の安全性、ばく露、試験法等に関する動向

(1) 第44回日本毒性学会学術年会

1) 概要

- 期間:2017年7月10日～12日
- 場所:パシフィコ横浜 会議センター

今回の学術年会のテーマは「トランスボーダー:学問領域の枠を超えた毒性学」であった。本学会では、一般公演に加えて、多数のシンポジウムも開催された。一般公演のセッション一覧とシンポジウムのプログラムの一覧を表 3.2-1 に示す。今回、表 3.2-1 の網掛け(太字)で示した「Nanotoxicology」に関する一般公演のセッション9と、シンポジウム S2 に参加し、国内の最新の研究動向を確認した。

表 3.2-1 第44回日本毒性学会学術年会プログラム

カテゴリー	No.	表題	一般公演/ シンポジウム
Genetic Toxicology / Developmental Toxicology	1	セッション1	一般公演
Pharmacotoxicology	2	セッション2	一般公演
Clinical Toxicology / Human Toxicology	3	セッション3	一般公演
Food Toxicology	4	セッション4	一般公演
Drug Toxicology	5	セッション5	一般公演
Organelle Toxicology / Agricultural Toxicology	6	セッション6	一般公演
Environmental Toxicology (1)	7	セッション7	一般公演
Environmental Toxicology (2)	8	セッション8	一般公演
Nanotoxicology	9	セッション9	一般公演
Redox Toxicology	10	セッション10	一般公演
Omics Toxicology / Immunotoxicology	11	セッション11	一般公演
Neurotoxicology	12	セッション12	一般公演
Molecular Toxicology	13	セッション13	一般公演
Organ Toxicology (1)	14	セッション14	一般公演
Organ Toxicology (2)	15	セッション15	一般公演
In Silico Toxicology	S1	インビトロ・インシリコ手法による 全身毒性予測評価の現状と課題	シンポジウム
Nanotoxicology	S2	カーボンナノチューブの「剛性」と 発がん性(アスベストとの比較)	シンポジウム
Redox Toxicology	S3	日本中毒学会合同シンポジウム: 低 分子量ガス体の基礎と臨床	シンポジウム
Agricultural Toxicology	S4	ケミカルエコロジーと毒性学	シンポジウム
Drug Toxicology	S5	毒性解明に向けた薬物代謝・動態研 究の融合 / Collaboration of drug metabolism/pharmacokinetic and toxicological researchers for understanding of toxicity	シンポジウム
Transgenerational Toxicology	S6	継世代影響広域企画: 環境要因によ る多世代・継世代影響	シンポジウム

カテゴリー	No.	表題	一般公演/ シンポジウム
		そのメカニズムと考察	
Molecular Toxicology	S7	ストレスバイオロジーから分子毒性学への展望	シンポジウム
Analytical Toxicology	S8	メタルトキシコロジーを牽引する最先端分析法の現状と展望	シンポジウム
Pharmacotoxicology	S9	医薬品開発における探索安全性評価の戦略について	シンポジウム
Redox Toxicology	S10	抗酸化レドックスと活性イオウによる解毒代謝機構の新展開	シンポジウム
Omics Toxicology	S11	エピジェネティクス機構を考慮したトキシコゲノミクスの展開	シンポジウム
Clinical Toxicology	S12	非臨床安全性評価から臨床へのトランスレーショナル臨床化学 - 副作用を回避する従来型検査法に加わる新規バイオマーカの有用性 -	シンポジウム
Chronotoxicology	S13	「時間毒性学」～古くて新しい毒性学～	シンポジウム
Human Toxicology	S14	大気汚染物質に関する健康影響評価研究の最新動向：越境大気汚染から国内起源まで	シンポジウム
Immunotoxicology	S15	環境汚染物質と免疫・アレルギー～基礎免疫学、疫学、毒性学の視点から～	シンポジウム
Organ Toxicology	S16	日本薬理学会合同シンポジウム：細胞内小器官シグナルネットワークを介する臓器毒性制御	シンポジウム
Food Toxicology	S17	食品汚染と毒性影響：恒常性機能の攪乱による毒性発現メカニズム	シンポジウム
Organ Toxicology	S18	SOT-JSOT Exchange Promotion Program - Insights into mechanisms of drug-induced liver injury - / 日米毒性学会の交流促進プログラム - 薬剤性肝障害メカニズムに対する洞察 -	シンポジウム
-	S19	企業研究者のキャリア形成支援プログラム - トキシコロジストのキャリア形成 -	シンポジウム
Environmental Toxicology	S20	A new era: Exposome and toxicology	シンポジウム
Genetic Toxicology	S21	遺伝毒性発がん物質の‘閾値’とリスク評価	シンポジウム
Neurotoxicology	S22	子ども期への低用量化学物質ばく露が誘発する情動認知行動影響の定量的解析法の開発状況と評価法確立への未来	シンポジウム
Clinical Toxicology	S23	毒作用発現におけるエピジェネティック毒性とその臨床展開	シンポジウム
Organelle Toxicology	S24	オートファジーによる細胞死の制御	シンポジウム
Clinical Toxicology	S25	臨床フェーズ1 試験の安全性を考える - BIA 10-2474 事件から何を	シンポジウム

カテゴリー	No.	表題	一般公演／シンポジウム
		学ぶかー	
Applied Toxicology	S26	応用トキシコロジー：トキシコロジストに求められる新たなチャレンジ	シンポジウム
Environmental Toxicology	S27	日本毒性病理学会合同シンポジウム：環境中の微量元素の毒性学	シンポジウム
-	S28	次世代研究者セミナー：人工知能やBig Data で広がる創薬とトキシコロジー	シンポジウム
Environmental Toxicology	S29	重金属の細胞毒性に対する新しい防御分子と防御	シンポジウム

2) 発表内容

(ア) S2-1：イントロダクション：カーボンナノチューブの発がん性—各種アスベストの比較知識からわかること

- 講演者: 菅野 純
- 所属機関: 独立行政法人労働省健康安全機構日本バイオアッセイ研究センター

多層カーボンナノチューブの発がん性については、アスベストで明らかとなった線維性発がんの知見に基づきいくつかのモデル試験を含む動物試験が行われ、中皮腫に加えて肺腺癌も誘発することが明らかにされた。アスベストは中皮腫が有名であるが、ヒトにおける主な標的は、肺がんであり、タバコなどの交絡因子の問題が常にあるものの、中皮腫症例の2～数倍と言われている。また、肺がんの病理組織型は、肺がんに限定されず、扁平上皮癌を含むあらゆる上皮系腫瘍を含むことがヒトでは報告されている。大きく肺がんと中皮腫を分けて考えた場合でも、その誘発機構は、違いがあるのか否かも含め、明確にされてきてはいなかった。特に、太さや硬さが異なる蛇紋石族 (serpentine) の白アスベスト (crisotile) と、角閃石族 (amphibole) の青アスベスト (crocidolite) や茶アスベスト (amosite) などの発がん性の差異について、発がん標的、異物肉芽腫や繊維痕跡の有無、用量相関性の差異、など、不明な点が多い。そのような状況でも、演者が問合せたヒト・アスベスト症例に経験のある医師や病理学者、毒性学者は、押し並べて、硬い太い、太い細いにかかわらず、「繊維は吸入した場合、危ない」との意見であった。それにもかかわらず、一部で「白アスベストのように細く柔軟な CNT は発がん性が低い」という論議を生んだ背景には、アスベストによる繊維発がん機構の解明が、残念ながら多種にわたる CNT の評価に利用できるほどには進んでいなかったことが考えられる。

今般の多種の CNT にわかる毒性研究を概説すると、繊維状粒子の形状と剛性、投与経路に依存した発がんメカニズムが存在する可能性が示されつつある。

講演では、アスベストの臨床病理から得られる知識を最大限利用し、様々な分野で市場化が進みつつある CNT をもいた製品の市場動向を配慮し、様々な形状を持つ繊維状粒子の総合的なリスクの検証や今後必要となる研究分野について討論され、特にアスベストについて以下の点が表示された;

- アスベストばく露は、石綿肺、胸膜プラーク、中皮腫、肺腺癌を引き起こす。
- アスベストと同様、MWCNT は中皮腫、肺腺癌を起こす。メカニズムに共通な部分と違う部分がある。
- アスベストによる肺がんの中皮腫の誘発機構は、違いがあるかも知れ、明確になっていない。
- アスベストでは、太さや硬さの差異による発がん性の差異に関して、未だ不明な点が多い。
- 「白アスベスト(クリソタイル)のように細く柔軟な CNT は発がん性が低い」という議論を生んだ背景には、(残念ながら)アスベストの機構解明不足が影響していた。
- アスベストの使用から 37 年で中皮腫発症(経年カーブに 37 年のタイムラグあり)。
- シングル1本ずつだけでは肉芽腫を作らない、繊維化だけ起こる。シングルプラス分岐だと、2年後には肉芽腫が起こる。
- (マクロファージに貪食された)剛直 CNTは肺胞膜を通過するが、(マクロファージに貪食された)tangled(もつれ) CNTは通過しない。
- 閾値の議論がある(閾値無しは、CNT1本でも問題「有害」ということを意味する)。
- 敏感な遺伝子の問題があり、結果の解釈を難しくしている。

(イ) S2-2 人体病理学にみたクリソタイルによる発がんの特徴と推測される発がんメカニズム

- 講演者:井内 康輝
- 所属機関:株式会社病理診断センター、NPO 法人総合遠隔医療支援機構

アスベストは、IARC により発がん物質とされているが、繊維状ケイ酸塩鉱物の総称であり、蛇紋石族(クリソタイル)と角閃行族(クロシドライトなど)に分かれる。繊維状とは、顕微鏡レベルでアスペクト比が3:1以上の粒子として確認された場合である。そのうち、クリソタイルの化学組成は、ほぼ等量 noSiO_2 と MgO からなり、Fe を含まない。光学顕微鏡や低倍率の電位顕微鏡での観察では、クリソタイルはしなやかにカールしているように見える。また、クリソタイルは、体内で溶解する、あるいはマクロファージによって貪食される、また、表面がプラスに帯電しているため鉄蛋白を吸着しにくいなどの脂性質から、石綿小体(アスベスト小体)を形成しにくく、石綿繊維あるいは石綿小体の計測では、石綿へのばく露状態を評価しにくいとされている。

1980 年代から疫学的調査では、クリソタイルばく露者のがんによる死亡リスクの上昇は明らかでなく、クリソタイルの肺の発がん離 s 九は垂もサイトの 1/10、クロシドライトの 1/50 とされてきた。しかし、2000 年代に入って、10 μm 以上の長くて細いクリソタイルは、肺がんあるいは石綿肺のみならず、中皮腫についても発がんリスクを上げるとの指摘がみられ、発がん性に関する見解は一定であるとはいいがたい。クリソタイルによる発がん機序としては、マクロファージによる不完全な貪食採用 (frustrated phagocytosis) がもたらす活性酸素種 (ROS) の産生による DNA 損傷などが考えられている。実験的には、ラット腹腔内へのクリソタイルの投与によって肉腫型中皮腫が生じると報告

されるが、その要因としてはクリソタイルが局所に体内鉄を集めることが重視されている。

ナノマテリアルによる発がんは、クリソタイルによる発がんと同様の機序によるかもしれない。

講演では、アスベストばく露による発がん性等について概説された；

- アスベストばく露による中皮腫と肺がんの発生について、太さ、硬さの違い(Stanton 仮説、等)、化学組成(Feの有無:クリソタイルは無)、喫煙の相乗効果、など)。
- クリソタイルによる発がんに関する文献中の議論の推移;クリソタイルは「溶ける」が、用量依存でもある。クリソタイルは、長くて細い(10 μm 以上、幅 0.25 μm 未満)。クリソタイルの発がん性については、①体内移動経路、②中皮細胞が標的になる理由、③中皮がん発生:量・反応関係(アスベストの沈着量)、④敏感な遺伝子の影響)、について説明し、それらの結果から、クリソタイルは、「肺がんを発生させない」とは言えない(長さ、喫煙、遺伝子、用量、などの因子あり)、と説明。
- 発がん性に関するまとめとして、長さ、溶解性、フリーラジカル発生(クリソタイルは低い)、などがあり、*in vitro* でよく見直す必要がある、と指摘。代替繊維(セラミック繊維、炭化ケイ素ウイスキー、等)に、危ないものがある、と指摘した。

(ウ) S2-3 長さの違いによる単層カーボンナノチューブの慢性呼吸器毒性の比較

- 講演者:藤田 克英
- 所属機関:国立研究開発法人産業技術総合研究所安全科学研究部門、技術研究組合単層 CNT 融合新材料研究開発機構

単層カーボンナノチューブの平均長が異なる分散液を F344 雄性ラットの気管内に単回投与し、投与後 104 週までの慢性呼吸器毒性を比較した。平均長 8.6 μm (長尺)試料について、0.2 または 1.0mg/kg、及び平均長 0.55 μm (短尺)試料について 1.0mg/kg を投与し、26、52、104 週後の呼吸器の反応を病理組織学的検査により評価した。104 週観察用には各群 50 隻を使用した。いずれの剖検時点においても書く CNT 投与群に共通して肺の黒色、褐色及び灰色斑点がほぼ全例に観察された。短尺投与群にのみリンパ節の黒色化または灰色かが、傍胸腺リンパ節、肺リンパ節及び縦隔リンパ節において散見された。短尺投与群では 52 週及び 104 週時点においてほぼ全例に被験物質沈着を伴う炎症性変化、マクロファージの被験物質貪食像及び肺胞の線維化が観察された。これらの頻度は長尺投与群で低かった。長尺投与群ではほぼ全例に被験物質の沈着を伴う終末細気管支の繊維の腫瘍が 104 週経過後の媒体投与群、長尺高用量投与群、短尺投与群でそれぞれ 2、1、9 齢に認められたが、いずれも統計学的有意差はなかった。以上の結果から、長尺 CNT の大部分は細気管支部で沈着し炎症性変化を起こすのに対し、短尺 CNT は相当量が肺胞まで到達し持続的炎症を引き起こすものと考えられる。投与後 26 週の肺細胞を用いて *in vivo* コメント試験を実施したところ、各 CNT 投与群に % tail DNA の増加は認められず、肺に対する遺伝毒性を示さないことが示唆された。

講演では、単層カーボンナノチューブアスベストについて以下の点が示された；

- 粒子病原性仮説(小さいものは危ない)、繊維病原性仮説((真っすぐで、長いもの危ない)(リンパ節への排泄規制、マクロファージの貪食失敗)がある。
- 投与試料: 日機装単層 CNT(eDIPS)分散液

試料	投与濃度	長さ(SD) μm	太さ(SD) μm
SWCNT-1(長尺)	0.2 mg/mL	8.6(4.3)	2.4(2.0)
SWCNT-2(長尺)	0.1 mg/mL		
SWCNT-3(短尺)	0.1 mg/mL	0.55(0.36)	1.4(0.7)

なお、投与液は、絡まっていない(TEM 像)。Fe、Al は残っているが、低い(製法由来)。

- 結果；
 - ・ 長尺: 終末細気管支変化あり。
 - ・ 短尺: 炎症性の変化あり。
 - ・ 短尺: リンパ節マクロファージの集しゆく。
 - ・ 細気管支/肺胞上上皮癌が、長短で 1~3 例あり。
 - ・ 剖検・病理所見は「発がん性は認められない」。
 - ・ CNT(肺実質中)；
 - ✓ 長尺は絡まっていない。
 - ✓ 短尺は凝集あるが、絡まっていない(国武仮説「短いものは絡まりやすい」とは違った結果)。
 - ✓ 短尺は、肺から縦隔リンパ節に移動している。
 - ✓ DNA 損傷なし(コメットアッセイ)
 - ・ 「長い CNT は危ない」は、単層 CNT においては成立しない、という結果になった。

(E) S2-4 気管内噴霧投与方法による各種の MWCNT の毒性と発がん性試験結果の比較

- 講演者: 津田 洋幸
- 所属機関: 名古屋市立大学津田特任教授研究室

(i) 背景等

多層カーボンナノチューブの発がん性試験には吸入ばく露法がすすめられているが、専用施設と高額な稼働費用が必要であるために、現状では MWCNT-7 について実施されたのみである(肺発がん性あり)。MWCNT は世界で 300 トン以上(日本では 60 トン程度)生産されているが、慢性毒性・肺がん性試験は未実施である。本研究では吸入ばく露装置を使わない低予算で実施できる経気管はない噴霧投与(TIPS)法を開発してきた。

(ii) 方法

- 1) *in vivo in vitro* マクロファージ(M ϕ) 負荷試験

10 週齢ラット MWCNT を投与後に肺より採取した Mφ を初代培養に移して得られた上澄みは、ヒト由来の A549(肺がん細胞)Met5A(中皮細胞)、MESO-1/2(上皮型/肉腫型悪性中皮腫細胞)に対して増殖活性を示すことを明らかにした。

2) 肺内噴霧投与 (TIPS 法) 試験

MWCNT-N(Nikkiso)、MWCNT-7(Hodogaya, IARC Group 2B・動物発がん物質)、crocidolite (UICC grade, IARC Group 1・ヒト発がん物質)について、2週間に8回(計 1.0 ~ 1.5mg/ラット)投与後の肺と胸膜の短期・長期毒性・発がん性について解析した。

(iii) 結果

短期(投与終了後)屠殺群では肺胞と臓側胸膜の持続炎症と中皮の増殖が観察され、胸腔洗浄液中には MWCNT と炎症細胞(Mφ、好中球、リンパ球、等)がみられた。肺組織と胸腔洗浄液には主として Mφ 由来の CCL 種が高値であり、活性化 Mφ の関与が考えられた。投与終了後2年間冊では MWCNT-N(Nikkiso)と MWCNT-7(投与量 1.5mg/ラット)ではいずれも肺または胸膜中皮に発がんが認められた。

本法は短気管内投与後に観察するのみであり、MWCNT の発がん性試験法として勘弁にして安価な方法と考える。

(オ) O-31 工業用ナノ材料の有害性評価システムの検討

- 講演者: 森本 泰夫
- 所属機関: 産業医科大学産業生態科学研究所

(i) 目的

工業用ナノ材料の有害性評価システムを開発するために、既知の肺毒性のナノ材料を吸入および注入試験を行い、炎症をエンドポイントとして、有害性評価の有用性を検討した。

(ii) 方法

肺毒性の低いナノ材料として酸化亜鉛ナノ粒子(ZnO)、二酸化チタン(TiO₂)、肺毒性が高い材料として酸化ニッケルナノ粒子(NiO)、参加セリウムナノ粒子(CeO₂)の計4種類を用いた。

吸入ばく露試験では、4材料とも約 2mg/m³の重量濃度にて4週間(6時間/日、5日/週)の吸入ばく露を行い、ばく露終了3日、1ヶ月、3か月後に、気管支肺胞洗浄液(BALF)の好中球数、抗伸秋比率、好中球遊走因子である cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 (CINC-1)濃度、酸化ストレスマーカーである heme oxygenase-1(HO-1)濃度の測定を行った。気管内注入試験では、4材料ともラットに 0.2mg/rat、1mg/rat を気管内投与し、3日、1週間、1ヶ月、3か月、6か月後に同じ評価項目にて測定を行った。

(iii) 結果

吸入ばく露試験においては、毒性の高い NiO、CeO₂ では BALF の好中球数、好中球比率、CINC-1、HO-1濃度の上昇を認めたが、毒性の低い TiO₂ と ZnO では、上昇を認めなかった。

気管内注入試験では、NiO、CeO₂ において BALF の好中球数、好中球比率、CINC-1、HO-1 濃度が、3 か月後まで持続的増加を認めたが、TiO₂、ZnO では一過性の増加を認めたのみであった。

(iv) 結論

吸入ばく露試験、気管内注入試験とも、肺毒性の差異を炎症の評価項目が反映した。したがって、吸入ばく露試験と気管内注入試験による工業用ナノ材料の有害性評価システムは有用であることが示唆された。

(カ) O-32 N-SHOt Cyclone による多層カーボンナノチューブの浮遊係数の比較

- 講演者: 大藪 誠
- 所属機関: 独立行政法人労働省健康安全機構日本バイオアッセイ研究センター

微粉末の飛散は、労働現場等での呼吸器系へリスクとなる。従来、その「飛散しやすさ」の計測方法として、粉体に物体を落とす、回転ドラムや試験管内の粉体の挙動を見る方法などがあった。しかし、これらは飛散粒子を定量的に測定することが困難であった。そこで、本研究では、呼吸器(肺泡領域まで)に侵入するリスクの評価指標としての「浮遊係数」を考案した。円筒チャンバーの同軸底面にファンを設置し、同軸天井に吸引捕集フィルタ(径 37mm)を設置、少量の原体粉末を投入度、ファンを回転し、フィルタへ吸引される粒子の量、形状等を測定する機器 N-SHOt Cyclone を開発した。そして、その中の肺泡腔に到達する可能性のある微粉末文庫を捕集・秤量し、対照物質として設定したカーボンブラック(日本粉体鋳業技術協会: JIS 試験用粉体)と比較した係数を、浮遊係数とした。本発表では、多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の形状と浮遊係数との関係について報告した。

(i) 方法

MWCNT は、NT-5(71nm、7.7 μ m)、MWCNT-7(85nm、7.5 μ m)、CT-12(127nm、4.2 μ m)、CT-15(144nm、3.6 μ m)(平均径、平均長、いずれも保土ヶ谷化学工業(株)製)を用いた。N-SHOt Cyclone(内容積 10L)に、試料 0.1g を投入し、ファン 1400rpm、サンプリングは 2.75L/min により 60 分間、飼料をフィルタに捕集した。サンプリング終了後、試料秤量値から、下記の計算式を用いてサイクロン内中心点の濃度を算出し、比較対照物質の値と比較して浮遊係数を求めた。

- 捕集点の濃度(mg/m³) = 秤量値(mg) ÷ (捕集流量(L/min) × 捕集時間(min)) ÷ 1000
- 浮遊係数 = 被験物質の濃度 ÷ 対照物質の濃度

(ii) 結果

浮遊係数は、NT-5=6.50、MWCNT-7=2.81、CT-12=1.44、CT-5=0.44、であった。捕集した SEM 観察の形状はいずれも繊維状であった。

細く長い NT-5 は、浮遊係数が最大で、太く短い CT-15 は最小の傾向であった。このことは、MWCNT の繊維径及び繊維長が浮遊係数に反映することが考えられた。したがって、繊維状の MWCNT の形状によって対照物質よりも浮遊性が高いことから、労働現場でのリスク対策を強化する必要がある。

なお、繊維状以外の毛玉上の MWCNT の浮遊係数についても現在、検討中である。

(キ) O-33 チタン酸ナノシートのヒト免疫細胞への毒性影響

- 講演者: 西村 泰光
- 所属機関: 川崎医科大学衛生学

チタン酸ナノシート(TNS)は厚さが 1nm のシート形状を示す 2D 家豪物であり、その物理化学的特徴から防汚素材や半導体素材としての開発が進められている。一方、従来よりチタン酸化物は毒性の低い安全な化合物として幅広く利用されてきたが、近年そのナノ粒子の毒性が器具される状況にある。そこで、ヒト末梢血単核球(PBMC)および単離した細胞文革を TNS ばく露下で培養し、TNS の与える毒性影響について調べた。

(i) 方法

PBMC 又は磁気分離により単離した細胞を $10\mu\text{g/ml}$ の TNS 存在下で 2 又は 7 日間培養した。凡カスパーゼ阻害剤として $10\mu\text{M}$ Q-VD-OPh を用いた。FITC 標識 Annexin V (Anx) / PI 染色で同定されるアポトーシス細胞比率をフローサイトメーターで測定した。固定した細胞の超薄切片を作成し、透過型電子顕微鏡で解析した。パラフィン包埋切片を作成し、走査型電子顕微鏡で空胞内部を解析し、エネルギー分散型 X 線分析でチタンの有無を確認した。PBMC を 1 日培養し接着細胞として単球を得て、3 日間の予備培養土 Alexa 568 Dextran で標識し、TNS を加え 12 時間培養し空胞形成とエンドソーム構造を蛍光顕微鏡(BZ-9000)で解析した。

(ii) 結果

PBMC 培養時に TNS は早期に特徴的な空胞形成を誘導し、7 日後にはアポトーシスが観察され、濃度依存性はアスベストと同程度であった。アポトーシスは Q-VD-OPh で阻害され、CD14+ 単球だけでなく CD4+T 細胞もアポトーシスを示したが、空胞形成は単球のみであった。TEM により空胞内に TNS 様物質が確認し、SEM・EDX 分析により空胞内壁にチタンのピークが確認された。蛍光エキストラクトでエンドソームを標識した細胞を TNS ばく露下で培養し空胞への蛍光の局在を

確認した。

以上より、①TNS がカスパーゼ依存性アポトーシスを誘導すること、②単球内に取り込まれた TNS は空胞内部に存在すること、③TNS ばく露による空胞形成がエンドソーム経路と関連することが明らかとなった。

TNS の毒性機序と正保内膜機能との関連が示唆される。

(ク) O-34 Potassium octatitanate (K₂O·8TiO₂) fiber is a potent inducer of lung and pleural injury – A comparative study to titanium dioxide nano particles

● 講演者: Mohamed A. M. ABDELGIED

● 所属機関:

Nanotoxicology project, Nagoya city university, Nagoya, Japan

Department of Experimental Pathology and Tumor Biology, Nagoya City University

Graduate School of Medical Sciences, Nagoya, Japan

オクタチタン酸カリウム繊維 (K₂O·8TiO₂、POT) は摩擦性能が良好であることから、アスベスト繊維の代替品として様々な産業で一般的に使用されている。本研究では、非繊維及び短繊維 TiO₂ ナノ粒子を参照して、POT の肺及び胸膜毒性を研究した。使用したのは、アナターゼ型 (anTiO₂) とルチル型 (ruTiO₂) である。

(i) 方法

雄 F344 ラットに、POT、anTiO₂、ruTiO₂ の 250µg/ml 懸濁液 0.5ml を 8 回 (1mg/rat)、2 週間の期間、経気管内肺内噴霧 (TIPS) 法により投与し、最後の投与後、6 時間及び 4 週間後に屠殺した。

(ii) 結果

- 肺: 肺胞マクロファージの数の有意な増加が全投与群で観察された。4 週では、CCL2 の mRNA とタンパク質のレベルは、POT が他の群よりも著しく高くなった。全投与群の 4 週のケモカイン CCL2、CCL3、CCL4 の mRNA レベルは、6 時間のものの約半分に減少した。
- 内臓胸膜炎: 全処置群の内臓中皮腫の PCNA ラベルは、6 時間及び 4 週の対照群よりも有意に高かった。
- 胸腔洗浄液: LHD タンパク質と全タンパク質のレベルは、第 4 週に全投与群において、対照群よりも有意に増加した。

本研究の結果から、POT 繊維は anTiO₂ や ruTiO₂ よりも肺及び胸膜腔の炎症性病変及び中皮細胞増殖の強力な誘発剤であることを示唆した。これらの値は、6 時間よりも 4 週目で高かった。

(2) Inhaled Particles XII

1) 概要

- 期間:2017年9月25日～27日
- 場所:グラスゴー(英国)マリオットホテル

本コンファレンスは、粒子の吸入に関するコンファレンス・シリーズの第12回に当たるもので、一連の粒子吸入に関するコンファレンスは、57年前から行われている。これまでのコンファレンス・シリーズでは、幅広い粒子エアロゾルへのばく露に起因する健康影響と、ばく露と病気のモニタリング、測定、予見のための継続的開発について議論が行われてきた。

本コンファレンスは、粒子吸入による健康への影響について、ばく露科学、疫学及び毒物学における最新研究に基づき、議論を促進することを目的として小規模で先見的な議論を行うことを目的としている。本コンファレンスでは、肺や他の標的組織への粒子による悪影響に関する研究者が集まり、この分野で現在直面している課題や新たな課題に対する解決策が議論された。

参加者は120人程度で、ホテルの大ホールで3日間にかけて行われた。小規模ではあるが、全日ともに、各発表に対して活発な議論が行われた。セッションは、表3.2-2に示したように、全部で15から構成された。

表 3.2-2 IPXII のセッション一覧

セッション No.	表題
Session 1	Looking to the Future of Particle Inhalation & Health
Session 2	New Approaches in Inhaled Particles: Exposure & Hazard Assessment
Session 3	New Approaches in Inhaled Particles: Exposure & Hazard Assessment (Cont)
Session 4	Low Toxicity Particles - Exposures, Health Impact & Regulation
Session 5	Debate on the Classification of TiO ₂ as a Human Carcinogen
Session 6	Outdoor Air Pollution
Session 7	Traffic-related Particulates
Session 8	Particle Toxicology: Pathways to Disease
Session 9	Mineral Fibers
Session 10	Posters
Session 11	Lung Exposure and Beyond
Session 12	Respiratory Protection
Session 13	Nanotoxicology
Session 14	Indoor Air Pollution
Session 15	Future Priorities in Inhaled Particles

表 3.2-2 から本調査と関連性が高く、興味深い研究発表について以下に概略を報告する。

2) 発表内容

(ア) Welcome プレゼンテーション

ウェルカムプレゼンテーションは、本大会のチェアである Vicki Stone と Craig Poland より発表があった。

(イ) Session 1: Looking to the Future of Particle Inhalation & Health

(i) **Inhaled ultrafine particles matter affects microglial morphology and learning and memory behavior in an Alzheimer's disease mouse model**

- 講演者: Alison Elder
- 所属機関: Department of Environmental Medicine, University of Rochester, Rochester, USA

本発表は、アルツハイマー疾患と大気汚染との関係について研究した結果についての研究結果であった。

- 背景: アルツハイマー病 (AD) は、大気汚染などの環境因子との因果関係を仮定した進行性の神経変性疾患である。周辺超微粒子 (UFPs、直径 100nm 未満) は、気道に効率的に堆積し、脳のような二次標的器官に転位し、炎症を誘発する。
- 仮定: 本研究では、繰り返し周辺の UFP にばく露することで、脳における炎症プロセスを増強することにより、アルツハイマーの進行と認知低下を促進する、と仮定した。
- 実験方法: 2 グループのコホート研究。HUCAPS (Harvard Ultrafine Concentration of Ambient Particle System; ハーバード周辺超微粒子濃度システム) を使用した。質量濃度範囲は、13.9~84.7 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、平均直径は 70–90 nm。

若齢および老齢のトランスジェニック雄性 AD マウス (3xTgAD; 2.5-3 または 12.5-13mos) のコホートを、濃縮周辺 UFPs (HUCAPS) またはろ過した空気に 2 週間 (4 時間/日、4 日間/週) ばく露した。ばく露後数ヶ月にわたって、若いマウスは、放射状腕迷路 (RAM)、新規物体認識 (NOR)、および運動機能検査を行った。

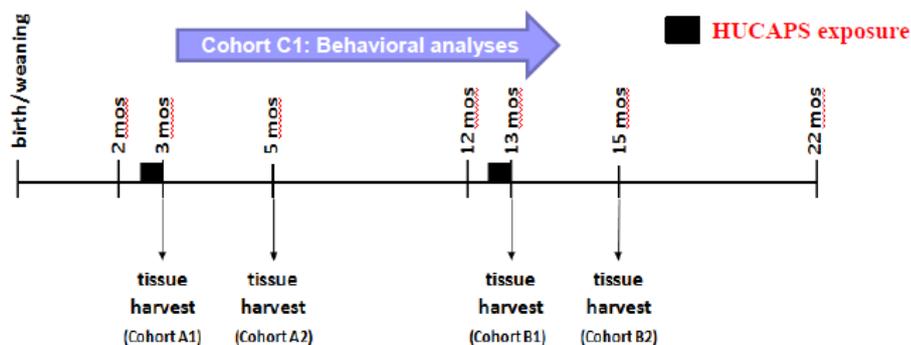


図 3.2-1 実験パラダイム

- 結論:
 - HUCAPS ばく露マウスは、海馬依存性参照記憶を欠損する。
 - HUCAPS ばく露は、3xTgAD マウスからのプラーク関連海馬ミクログリアの形態変化を引き起こす。
 - これらの影響は、明白な肺の炎症がない場合に生じる。

(ウ) Session 2: New Approached in Inhaled Particles: Exposure & Hazard Assessment

(i) Development of samplers for aerosol fractions deposited in two regions of the respiratory tract – gas – exchange region and posterior head airways

- 講演者: Göran Lidén
- 所属機関: Stockholm University, Stockholm, Sweden

本発表は、Mn の溶接作業における Mn 粒子へのばく露の可能性について調査するために開発した、肺胞領域および鼻の後部に配置された浮遊粒子用の 2 つのサンプラーを用いて測定した結果を報告したものである。

- 背景: Mn は主に脳の大脳基底核に蓄積し、血液脳関門を介して侵入することで、神経毒性を示すことが知られている。溶接作業中の Mn へのばく露について測定したところ、2 つの領域で重要な沈着を確認した。ガス交換領域に続いて、溶解と血液への輸送が起こった。嗅上嗅粘膜では、嗅神経経由で嗅球に移動するほか、脳内神経節へのさらなる脳内輸送が可能となる。そのほか、他の領域に沈着した Mn は胃腸管に移動する。
- 実験方法:
 - 沈着効率の測定: EN ISO 13138:2012 を用いて測定
 - サンプラーの設計原則: 小さくて軽い。使用可能なフィルタ(13mm)、拡散スクリーン(25mm)使用。2 段階捕集。
 - 空気力学および拡散によって堆積した画分は、2 つの異なるカスケード基材上に集められる。保護インパクターは、2 つの基板を分離する。衝突および拡散段階の捕集効率は、空気力学的直径が 1 μ m を超える粒子については APS を用い、小粒子については SMPS または DMPS のいずれかとして DMA を用いて試験した。
- まとめ:
 - 神経毒性の Mn は、主に、ガス交換領域と胸腔外領域の 2 領域に蓄積することを確認した。
 - 上記の 2 つの領域に浮遊粒子を堆積させるための 2 つのサンプラーを設計し試験した。サンプラーは、2 つの収集段階(空力及び拡散による捕集)から構成され、拡散メッシュネットの空気力学的堆積を防ぐための保護インパクターを設置した。
 - 空力分離では、サンプラー分離曲線とサンプリングコンベンションは定性的に一致し

た。

- 拡散分離については、サンプラー分離曲線とサンプリング規則との間の良好な一致が確認できた。

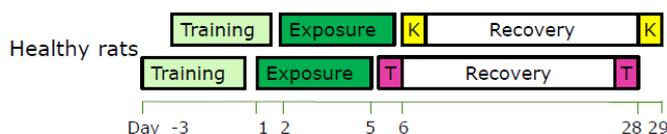
(ii) **Pulmonary toxicity of surface modified copper oxide nanoparticles**

- 講演者: Ilse Gosens
- 所属機関: National Institute for Public health and the Environment, Bilthoven, Netherlands

本発表は、EU プロジェクトの 1 つである SUN プロジェクトに一貫として行われた研究成果である。また、CuO ナノ粒子の毒性を安全な設計により軽減できるかについても調べた。

- 背景: 酸化銅ナノ粒子 (CuO NP) は、様々な工業的用途を有し、食品包装における抗菌製品およびコーティングに使用されている。これまで、講演者らは、CuO NP の吸入がラットにおいて用量依存性の肺毒性をもたらすことを示した。この研究では、10nm の CuO NP を正に帯電したポリエチレンイミン (PEI) または負に帯電したアスコルビン酸コーティング (ASC) で修飾した。
- 仮定: 本研究では、RAW264.7 細胞マクロファージ様細胞を用いたインビトロの研究結果に基づいて、ASC コーティングは PEI コーティング CuO NP と比較して肺毒性を誘導し得ないと仮定した。
- 実験①【未修飾 CuO】: ラットは、5 日間連続して、ASC および PEI 被覆 CuO NP の固定ばく露濃度にのみ鼻にばく露した。ばく露期間を変えることにより、ASC については 0, 0.8, 2.3, 7.5 および 21.9 mg / m³、PEI については 0.6, 1.8, 6 および 17.3 mg / m³ の 3 時間濃度当量が生成された。ばく露後、6 日目、および 27 日目に、気管支肺胞洗浄液中の肺毒性マーカーを分析し、ベンチマーク用量応答分析を行った。(図 3.2-2)

Short term inhalation study CuO



Training for adaptation to nose-only tubes

Exposure to CuO or filtered air during 5 days

The dose is expressed as 6 h-concentration equivalents of 0, 0.6, 2.4, 3.3, 6.3, and 13.2 mg/m³

Recovery period of three weeks

K is kinetic analysis

T is toxicological assessment

図 3.2-2 CuO の短期吸入試験の実験概要

- 結果①;

- 肺の炎症と細胞損傷:肺炎と細胞損傷が確認された(図 3.2-3)。

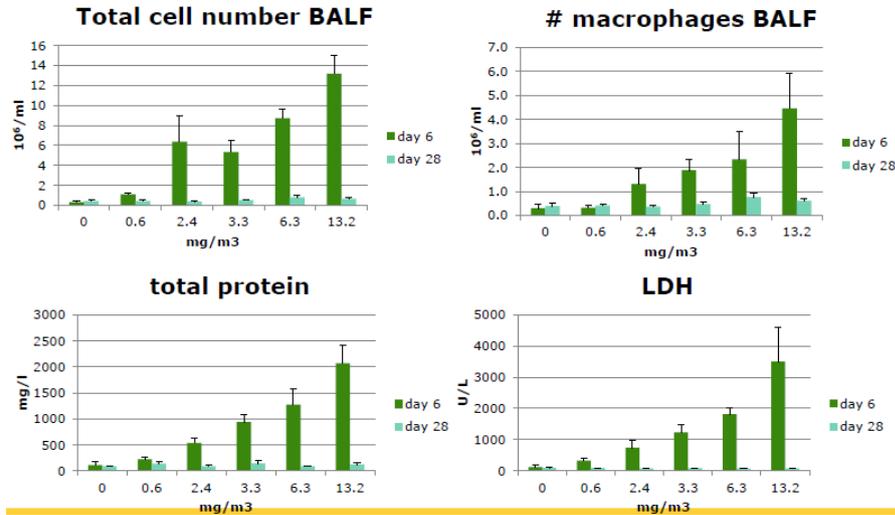


図 3.2-3 肺の炎症と細胞損傷結果

- 肺の負荷:Cu 濃度が高くなるほど、肺への Cu の負荷も大きくなり、Cu 濃度と肺負荷との間には 1 次相関が確認された(図 3.2-4)。

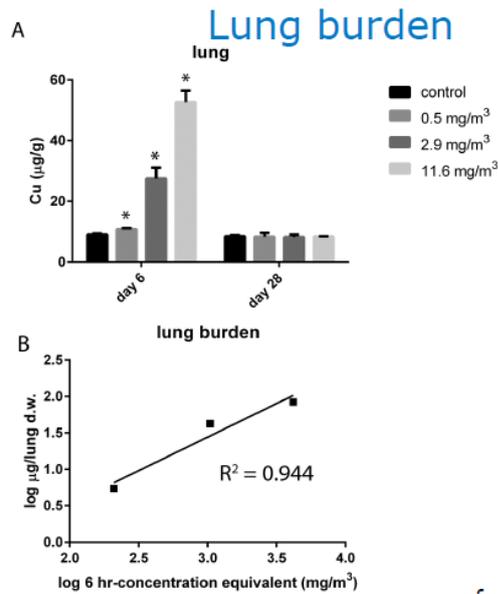


図 3.2-4 肺への負荷結果

- リスク評価に関するベンチマーク用量: 確実な影響を誘発するのに必要な用量があることが確認された(エラー! 参照元が見つかりません)。細胞損傷は完全に可逆的であったが、炎症反応はばく露 3 週間後に完全に可逆的ではなかった。
- 未修飾 CuO の結果のまとめ;
 - 6 日目の肺において、細胞損傷を伴う用量依存性炎症反応が確認された。
 - 肺負荷は、6 日目には、ばく露濃度が高いほど、肺負荷が高くなり、肺負荷とばく露濃度の関係は線形増加を示したが、検出限界を超える Cu レベルは、回復期後には確

認められなかった。

- 28日目にはCuレベルは検出されず、肺には炎症に関わる残存物が確認された。
- 予想通り、流入リンパ節の活性化が確認された。
- 嗅上皮の変性は完全に回復した。
- 他の器官の炎症や変性は確認されず、他の器官ではCuレベルは検出されなかった。

● 実験②【修飾 CuO】:

- 背景: CuO NPの毒性を低減できるような安全な設計の可能性について検討した。正に荷電したNPは、マクロファージの認識が増強されることで、部分的に負に帯電したNPと比較してより毒性が高いことが示されている(Bhattacharjee et al 2010)。また、10 nm CuO NPは、ポリエチレンイミン(PEI、正電荷)またはアスコルビン酸(ASC、負電荷)コーティングのいずれかで修飾されている。アスコルビン酸塩は、炎症反応中に生成されるフリーラジカルを保護する可能性がある。
- 仮定: マイナスに帯電したCuO-ASC NPは、その後帯電したCuO-PEI NPと比較してより低い肺毒性を誘導することにより、より安全な設計に寄与すると仮定した。
- 実験概要: 5日間吸入、3週間回復期間を設けて、肺への負荷を調べた。

● 実験②の結果;

- 肺への負荷: PEIコーティングの場合も、ASCコーティングの場合もともに、6日目の肺中のCuは、ばく露濃度が高いほど多くなり、肺負荷は濃度と相関関係を示した(図3.2-5)。

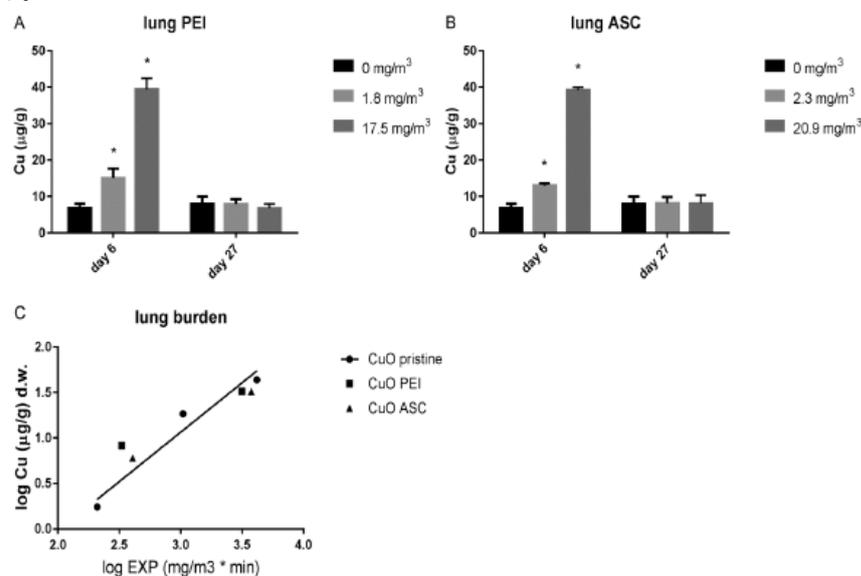


図 3.2-5 PEI/ASC コーティング Cu の肺負荷

- 肺へのLDHの放出: ばく露後3週間で、LDH放出はベースラインレベルに回復した(図3.2-6)。

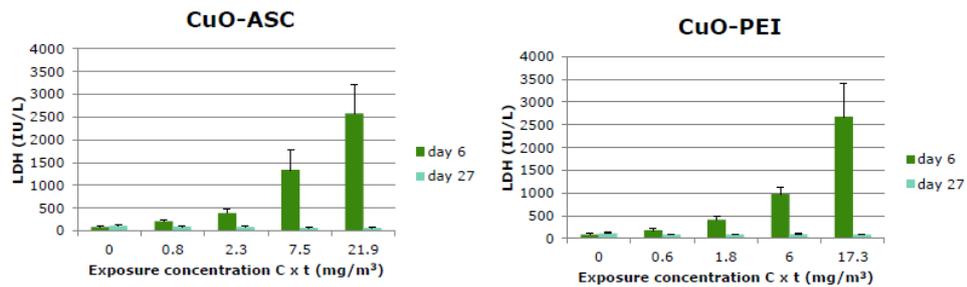


図 3.2-6 肺への LDH 放出状況

- 未修飾 CuO と修飾した CuO の比較: 修飾した CuO は、未修飾の CuO よりも、わずかに強力な炎症誘導を示すようであった(図 3.2-7)。

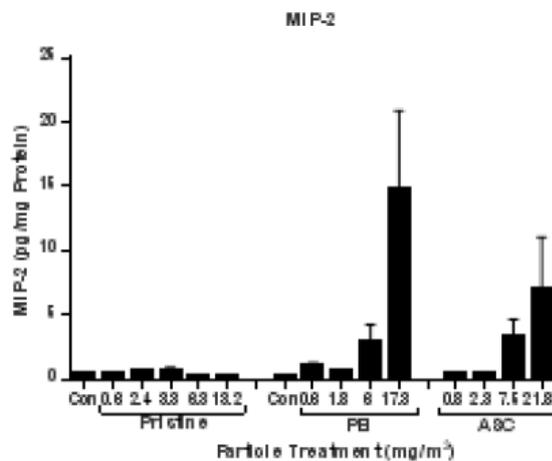


図 3.2-7 炎症誘発性の比較

- 正に帯電した CuO および負に帯電した CuO の NP の両方が、肺の炎症および細胞の損傷をもたらした。
- 組織病理学的マーカーである気管支および肺胞肥大を除いて、CuO-ASC および CuO-PEI へのばく露後に差異は見られなかった。
- 実験②の結論: 実験仮説とは対照的に、アスコルビン酸塩コーティング(ASC)は肺の影響を防御しなかった。

(Ⅰ) Session 3: New Approaches in Inhaled Particles: Exposure & Hazard Assessment (Cont)

(i) Comparing nanomaterial toxicity with lung cells cultured under air-liquid interface and submerged conditions

- 講演者: Yaobo Ding
- 所属機関: Institute of Lung Biology and Disease, Helmholtz Zentrum München, Munich, Germany

本発表は、気液界面での細胞ばく露に関する研究結果である。

- 背景: 伝統的なインビトロ細胞ばく露研究では、ENM (人工ナノマテリアル) と細胞培養培地との相互作用は、事実上ナノ粒子の特性を改変し、現実的な肺-ナノ粒子相互作用の代表性を低下させる可能性がある。結果として、より生理学的な気液界面 (ALI) 培養条件下での ENM 細胞ばく露が代替法としてますます採用されている (Lenz et al. 2014)。異なる培養条件下で得られた ENM 毒性の定量的比較は、典型的には、細胞送達 ENM 用量に関する信頼できる情報の欠如によって妨げられる。
- 目的: 本研究は、VITROCELLCLOUD (登録商標) システムを用いて、用量制御された ENM 細胞ばく露を行い、水中および ALI ばく露条件下で細胞応答を比較することを目的とした。
- ZnO および TiO₂ ナノ粒子は、ヒトおよびマウスの肺上皮細胞 (A549 および LA4) をばく露するために使用した。細胞生存度 (WST-1)、膜損傷 (LDH) およびサイトカイン放出 (IL-8) は、毒物学的エンドポイントとして特徴付けられる。細胞送達 ENM 用量は、水晶微量天秤および ALI および水中培養条件のための粒子動力学モデルを用いてそれぞれ決定した。
- 実験方法: 実験は、物理化学的に現実的な試験を行うことを目的として、図 3.2-8 のようなチャンバーを設計して実験を行った。

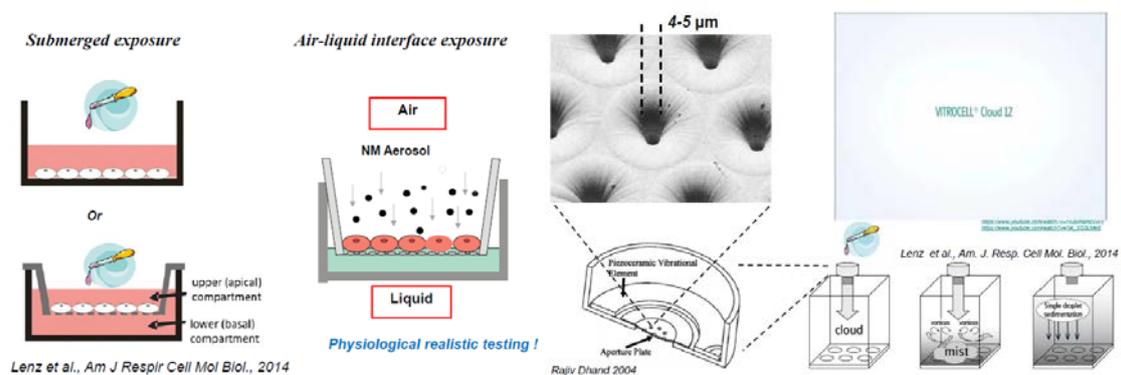


図 3.2-8 チャンバーの概要

- チャンバーの特徴: ナノマテリアルエアロゾルは、均一で早く輸送可能 (200 秒で沈着量が最大)。
- 懸濁液の調整方法: ナノ粉末を純水に懸濁 → (NaCl を添加) → ボルテックスシェーカー → 超音波処理 → 動的散乱。
- 細胞成長とばく露条件: 以下表に示す条件で行った。

表 3.2-3 細胞成長とばく露条件

	Submerged	Sub-Insert	ALI
Plate type	6-well plate	6-well insert	6-well insert
Cell type	A549 IL-8	A549 IL-8	A549 IL-8
Seeding surface	9.6 cm ²	4.2 cm ²	4.2 cm ²
Seeding Nr.	1 mil.	1 mil.	1 mil.
Growth time	3 day	4 day	4d+1d (in air)
Apical Med.vol.exp.	1 ml	1 ml	0 ml
Med. Height	ca. 1 mm	ca. 2.4 mm	0.01 mm (ZnO suspension)
	Type	Size, TEM	BET SA
Nanomaterial	ZnO NM110	50-150 nm	12 m ² /g

- 結果:
 - 細胞生存率[24 時間] (WST-1 アッセイ)、細胞毒性[24 時間] (LDH 放出)、IL-8 誘導[24 時間]: 細胞数が増加すると細胞生存率が低下し、LDH 放出と IL-8 誘導が増加した(
 - 図 3.2-9)。

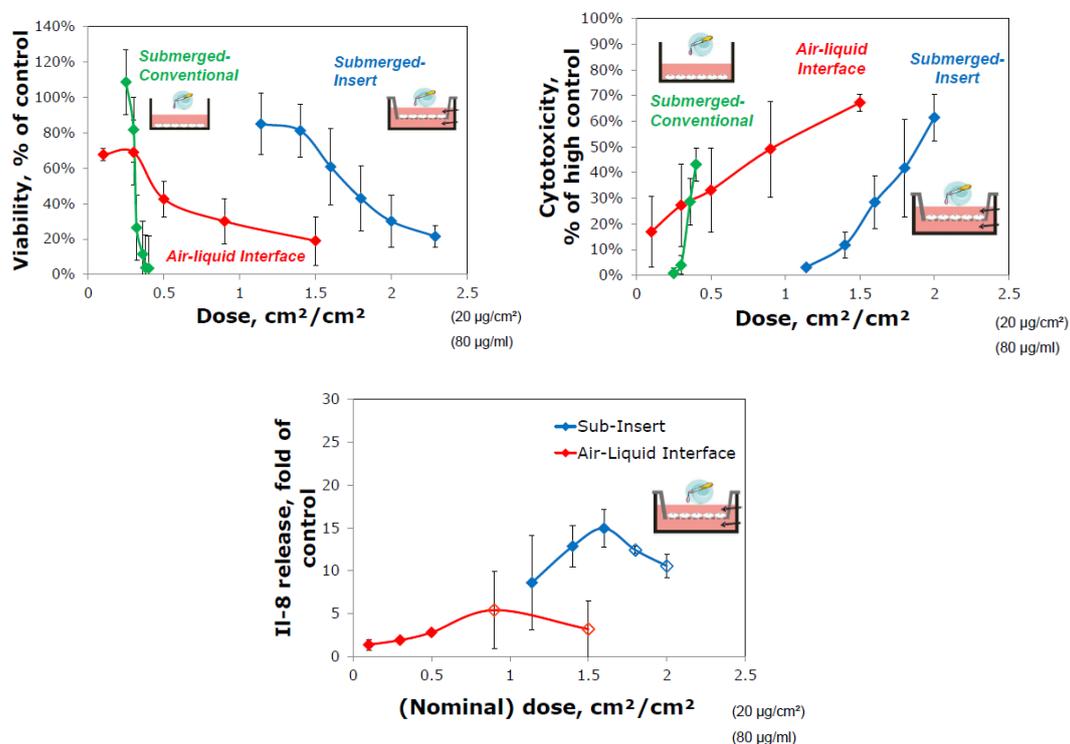


図 3.2-9 細胞生存率・細胞毒性・IL-8 誘導に関する結果

- 沈着量の計算: 図 3.2-10

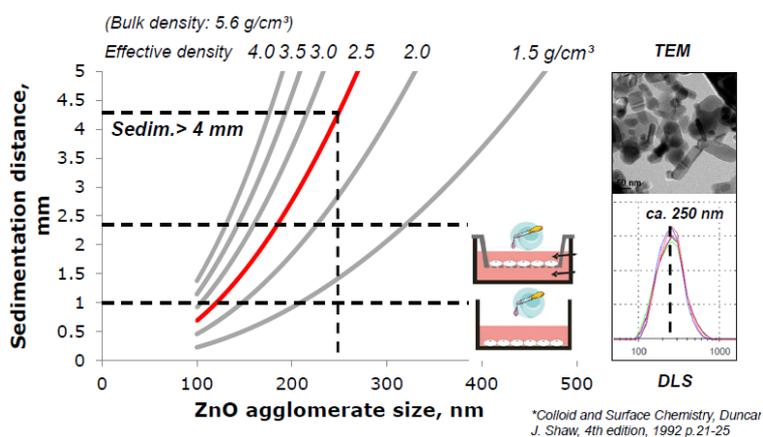


図 3.2-10 沈着量の計算結果

- まとめ;
 - VITROCELL-CLOUD (ALICE-CLOUD)を用いて、5 分間のばく露時間で均一で効率的なエアロゾル送達を達成した。懸濁液の品質を、エアロゾル化のために制御した。
 - 細胞数が増加すると細胞生存率が低下し、LDH / IL-8 誘導が増加した。
 - ZnO ナノ粒子の肺上皮細胞の用量応答曲線は、水中(狭い)及び気液界面(広い)ばく露で異なった。
 - プラスチック表面(ウェル)および多孔質インサート表面で増殖した細胞は、用量濃度、プラスチックウェルに対する細胞の感受性が高い、その両方等の、異なる挙動を示した。

(オ) Session 4: Low Toxicity Particles – Exposures, Health Impact & Regulation

(i) **Significance of Agglomerate Aerosol and Particle Densities for Effects and Mechanisms of Inhaled Particles**

- 講演者: Günter Oberdörster
- 所属機関: University of Rochester, Rochester, NY, USA

本発表は SiO₂ と TiO₂ 粒子の凝集体の吸入影響に関する研究結果の報告である。

- 背景:凝集粒子を用いたげっ歯類の吸入試験では、線量測定モデル化のために有効なエアロゾル密度の知識が必要である。AM のファゴリソーム中の粒子は、肺負荷を保持するのに有用な用量である。そうした凝集体密度はどの程度で、生体内溶解の程度はどうか、は不明である。
- 目的:ラット吸入を用いた有効エアロゾル密度 (ρ_{eff})とインビボ溶解の推定値、および(ii)ファゴリソーム流体擬似体 (PFS)の凝集体密度を決定することを目的として、*in vivo*および非生物学的 *in vitro* 試験を設計した。
- *In vivo*による有効エアロゾル密度 (ρ_{eff})の算出試験;

- 目的: vivo での peffin 値の算出。
- 方法: ナノシリカ(アモルファス型、1次粒子サイズ: 31.2±7.1nm)を4時間ラット(4匹、BW216g)に吸入。ラットへの吸入濃度は 5mg/m³、平均粒子径 0.4μm、幾何学標準偏差 2.0。肺負荷 a を測定するために、ばく露後すぐに殺傷。a は以下の式により算出;

$$a = TV \times BF \times \text{expos.conc.} \times \text{expos.time} \times \text{Deposition Fraction (DF)}$$

上記で a 算出後、再度、DF を以下の式により計算;

$$DF = a / (TV \times BF \times \text{expos.conc.} \times \text{expos.time})$$

相対成長的にインプットを調整した BW を用いて、相ラット MPPD モデル(バージョン 3.04)を実行し、計算された DF に適合するまで繰り返し入力値を ρ に対して変更する。これが、*in vivo* での有効密度 peff、になる。

- 算出結果: 4 時間ラット吸入試験のデータを用いて、SiO₂ スラリーエアロゾルに MPPD モデルを適用すると、peff は 0.165g/cm³、となり、SiO₂ 材料密度 2.65g/cm³ とは大きく異なった。
- *In vitro* による TiO₂ 凝集密度の算出試験;
 - 方法: 大気及び生理学的液体を模擬。ファゴリソーム(PFS、pH4.5)、細胞外(EFS、pH7.4)
 - ✓ 大気: 容積充填 1-5,000gn、50ml コニカルチューブ内で 10 分間遠心分離
 - ✓ 生理学的液体: 容積充填 50-5,000gn、1gn で 1~7 日間沈殿。
 - 材料: NanoTiO₂ (P-25 アナターゼ/ルチル)、micro-TiO₂ (~250nm、アナターゼ)
 - 結果;
 - ✓ 大気での TiO₂ 遠心分離結果: 注入密度 ナノ 0.108g/cm³、マイクロ 0.619 g/cm³。充填密度 5,000g ナノ 0.348 g/cm³、マイクロ 1.211 g/cm³。
 - ✓ 生理学的液体の充填密度 5,000g での充填密度: ファゴリソーム 微粒子 1.431 g/cm³、超微粒子 0.433 g/cm³。水 微粒子、超微粒子ともに決定不可。
 - ✓ TiO₂ の沈殿密度: ファゴリソームでも細胞外液体でもナノ TiO₂ とマイクロ TiO₂ の日数による沈殿密度の違いはほとんど見られなかった。
 - ✓ TiO₂ 凝集体密度:
 - TiO₂ 凝集体の密度; Micro-TiO₂ と Nano-TiO₂ で、空気、ファゴリソーム液、細胞外液、表 3.2-4 の結果のようになった。

表 3.2-4 Micro-TiO₂ と Nano-TiO₂ の凝集体密度

Medium	Method	MicroTiO ₂	NanoTiO ₂
Air, powder	Pouring 1 g _n (m/s ²)	0.619	0.108
	Tapping	0.753	0.122
	Packing 5000 g _n (m/s ²)	1.211	0.348
Phagolysosomal Fluid ph 4.5	Packing 50 g _n (m/s ²)	0.577	0.120
	Packing 5000 g _n (m/s ²)	1.431	0.433
	Settling 1 day	0.352	0.085
	Settling 7 days	0.396	0.102
Extracellular Fluid ph 7.4	Packing 50 g _n (m/s ²)	0.555	0.118
	Packing 5000 g _n (m/s ²)	1.337	0.432
	Settling 1 day	0.391	0.090
	Settling 7 days	0.414	0.108

- *In vivo* 肺溶解速度算出試験；
 - 材料: ナノシリカ(アモルファス、1次粒子径 20-40nm)
 - 方法: 亜急性 4 週間ラット吸収試験(4 匹、BW250g)。1 日 4 時間ばく露。濃度 4.6mg/m³、平均粒子径 0.49μm。幾何学標準偏差 1.91。肺負荷を 1 日目と 28 日目に測定し、ビルドアップ曲線を作成。全体での肺クリアランス速度 $btot$ を MPPD モデルを用いて推定。
 - 結果；
 - ✓ 吸入した SiO₂ のナノ粒子及び PSPs のラット肺への蓄積を確認し、肺負荷は、ナノ粒子よりも PSPs の方が多く、したがって計算された半減期も PSPs の方が長くなった(図 3.2-11)。

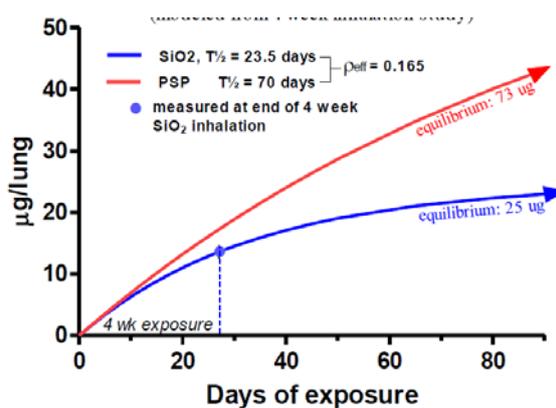


図 3.2-11 ばく露中/後の日数による肺負荷量

- ✓ ラット肺でのクリアランス速度は、 $btot = 0.0295 \text{ day}^{-1}$ 、 $T1/2tot = 23.5 \text{ day}$ 、と計算された。これを用いて、 $b_{diss} (=btot - b_{mech} = 0.0295 - 0.01)$ を計算すると、 $T1/2 = 32.5 \text{ day}$ $b_{diss} = 0.0195 \text{ day}^{-1}$ 、 $T1/2diss = 35.5 \text{ day}$ 、となった。

- HR-TEM/STEM/EELS 分析による SiO₂ NPS の *in vivo* 溶解の検証
 - 実験: 前駆体 SiO₂ NP の溶解の近傍における超微小 (<4nm) Si-NP の生体内形成について、27 日間ばく露により検証した。
 - 結果: 27 日ばく露では、前駆体 SiO₂ NP が溶解した Zone1 の周辺の Zone2 に、超微小シリカ粒子 (<4nm) が確認された (図 3.2-12)。

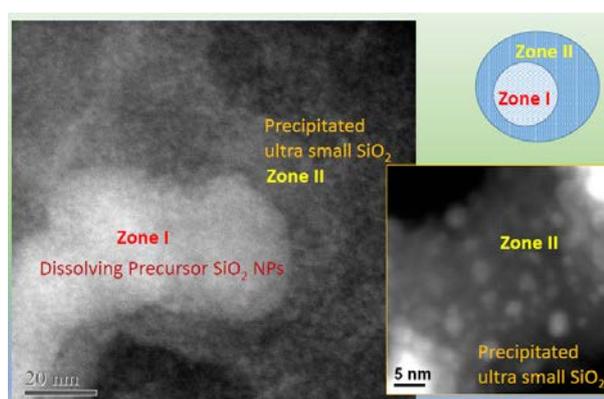


図 3.2-12 前駆体 SiO₂ NP の溶解の近傍における超微小 (<4nm) Si-NP の生体内形成

- 結論;
 - 大気と液体中の粒子の凝集密度は異なることが確認された。
 - 粒子サイズ(ナノ/マイクロ)は、凝集密度に影響を与え、ナノ粒子のほうが低くなることが確認できた。
 - 大気中で乾燥粉末について決定された凝集密度(ナノ/マイクロ)は、*in vivo* 実験に用いるべきではない。
 - 肺における *In vivo* 粒子溶解速度の結果の解釈には、生物プロセス/生物学的輸送、に関する知識が要求される。

(ii) **Exposure assessment in a factory of barium sulfate particles**

- 講演者: Gaku Ichihara
- 所属機関: Tokyo University of Science, Noda, Japan

本発表は BaSO₄ を扱う作業場内での BaSO₄ のばく露評価に関する報告である。

- 背景: 硫酸バリウム (BaSO₄) は、油井掘削液、放射線造影剤、顔料または紙の増白剤の成分として広く使用されている。最近では、プラスチックの充填剤として使用されており、ポリマーの密度を高め、酸およびアルカリの耐性および不透明度を増加させる。なお、BaSO₄ は TiO₂ よりも安価であるため、TiO₂ から代替することが可能である。
- 目的: 工場で硫酸バリウム粒子を破碎して梱包するプロセスがあり、作業領域別の BaSO₄ 粒子へのばく露状況を調査した。

- 方法:施設内に、サイズ選択性個人サンプラーを設置(>2.5 μm 、1.0-2.5 μm 、0.5-1.0 μm 、0.25-0.5 μm 、<0.25 μm)して、作業種類によるばく露の違いを測定した。各作業領域の作業員には、個人カスケードインパクトサンプラー(PCIS)を取り付けた。光学粒子計数器(OPC)、凝縮粒子計数器(CPC)、および走査型移動度粒子サイザー分光計(SMPS)を用いて、粒子の数濃度を測定した。1次粒子径はSEMより計算した。X線による微量分析により元素濃度を特定した。製品BaSO₄の粒子サイズは200nmと、中間体製品である。また、製品は金でコーティングされている。
- 結果;
 - 粒子の質量濃度は破砕区域で0.4~1.9 mg / m³、パッキング領域で78~98 mg / m³、メンテナンス領域で0.03 mg / m³、倉庫で0.004 mg / m³、ストック領域で0.99 mg / m³、工場外では0.05mg / m³、となった。パッキング領域(50mg/cm³以上)で高く、特に>2.5 μm 粒子数の割合が高くなった。
 - 総数濃度(CPC)では、破砕領域とパッキング領域で濃度が高くなった。
 - 粒子サイズ範囲は、パッキング領域で大きく、またサイズ範囲も広がった。
- 結論:硫酸バリウム粒子の数および質量濃度は、破砕領域よりもパッキング領域が高くなることを確認した。この研究は、パッキング作業が、硫酸バリウム粒子のより高いレベルのばく露及びより大きな凝集をもたらすことを示唆した。また、パッキング作業領域で測定された総数濃度は50mg/cm³を超えていた。最近の動物実験によれば、90日間の硫酸バリウムナノ粒子の吸入では、50mg/m³レベルで肺の炎症反応が誘発されることが示されている。パッキング領域の硫酸バリウム粒子の質量濃度は、実験動物において炎症反応を誘導するレベルである50mg/m³以上であった。したがって、硫酸バリウムにばく露された労働者の健康状態に焦点を当てて、さらなる研究が必要である。

(iii) First Results of a lung-term Inhalation Study with nano Barium sulfate

- 講演者:Lan Ma-Hock
- 所属機関:Experimental Toxicology and Ecology, BASF SE, Ludwigshafen / Rhein, Germany

本発表は、BaSO₄ ナノ粒子を用いた肺への吸入試験結果を報告したものである。

- 実験方法:CeO₂ および BaSO₄ はいずれも粒状難溶性粒子である。このうち、BaSO₄ を用いてラットにおける吸入試験を行った。BaSO₄ (NM-220)を雌のラットに、50mg/m²濃度で2011-2013年の2年間(24か月)ばく露した。試験ラットは、1、3、12、24か月ばく露後に検査した。また、追加の群について、6か月ばく露後に検査を行った。試験方法は、OECD TG453(全身ばく露)とした。
- 結果;
 - 高いエアロゾル濃度にもかかわらず、BaSO₄ ばく露動物の肺負荷は、3ヶ月ばく露

(肺あたり 1.7mg) 後には比較的 low、12 ヶ月後には 10mg に急激に増加し、肺への負荷は、13 週 < 104 週 < 52 週、であった。

- 気管支肺胞洗浄は、1 ヶ月ばく露後の肺の変化は明確ではなかった。ばく露 3 ヶ月後に好中球の増加が観察され、肺胞/間質性炎症細胞浸潤、間質性線維症及び肺胞性リポタンパク症を含むいくつかの有害な知見が 12 及び 24 ヶ月ばく露後に進行した。
- 本研究は、BaSO₄ の最初の速い肺クリアランスと 1 年後の減速を明らかにした。
- 肺の影響は肺の負荷と相関したが、CeO₂ の場合と比較して、相関は低かった。

● 結論;

- BaSO₄ は、ばく露初期に非常に早くクリアランスされた。
- 肺への負荷は、3-12 か月で著しく増加したが、24 か月後には増加しなかった。
- BALF の変化は肺負荷とよく一致した。
- 慢性炎症は、12 か月から起こった。
- 全体として、BaSO₄ は低毒性であるが、部分的に生体溶解性の粒子であることが判明した。

(iv) **Long-term Inhalation Study with Nano Ceria – Histopathology of the Lung**

- 講演者: Dirk Schaudien
- 所属機関: Fraunhofer Institute for Toxicology and Experimental Medicine ITEM, Hannover, Germany

本発表は (iii) と同様の実験条件で CeO₂ ナノ粒子による吸入試験を行った結果を報告したものである。

- 目的: 長期の CeO₂ ナノ粒子の吸入により可能性のある慢性毒性及びまたは発癌性の影響を調べることを目的とした。
- 試験物質: CeO₂ ナノ粒子
- 実験条件・方法: 雌の Wistar ラット [CrI : WI (Han)] 使用。1 群当たり 100 匹の動物に、4 つの異なる用量群 (0.1; 0.3; 1; 3mg / m³) の酸化セリウム (CeO₂, NM-212) を用いた。清浄な空気吸入は陰性対照として用いた。OECD ガイドライン No.453。肺負荷 (13, 52, 104 週) 後、24 又は 30 か月後に、殺傷。非常に小さな腫瘍および前腫瘍性病変を検出するために、肺の拡大組織病理学的検査を行った。肺は 500µm の間隔で段階的に切開され、肺あたり 60~70 切片が得られた。肺病変は、ラットおよびマウス (INHAND) の命名法の国際調和および病変の診断基準に従って診断された。
- 結果;
 - 予備的結果から、粒子を含むマクロファージの用量依存的蓄積、合胞体巨細胞の発生、間質線維症および肺胞間質肉芽腫性炎症を示した。炎症性変化は、最低用量群 (0.1mg / m³) において既に見られた。さらに、高用量群 (1mg / m³ および 3mg / m³)

の両方においてのみ、肺胞のリポタンパク質症および骨の化生が増加した。さらに、気管支喘息 - 肺胞過形成は、すべての粒子ばく露群で上昇した。しかし、CeO₂ の 12 および 24 ヶ月の吸入は、いずれの群の肺においても腫瘍発生率を増加させなかった。

- 結論;粒子を過剰ばく露することで、慢性炎症が生じる。ただし、0.1mgCeO₂ の過剰ばく露でなくても慢性炎症は起こる。

(カ) Session 8: Particle Toxicology: Pathways to Disease

(i) **Development of an adverse outcome pathway based on toxicogenomic data for ENM-induced risk of developing atherosclerotic plaques**

- 講演者: Ulla Vogel
- 所属機関: National Research Centre for the Working Environment, Copenhagen, Denmark

本発表は、マウスを用いた吸入試験による肺の遺伝子発現について調べた結果を報告したものである。

- 背景と目的: 人工ナノ物質 (ENM) への肺ばく露後の有害な肺の影響は、げっ歯類で十分に立証されている。これらの影響の原因となる分子変化を理解する目的で、多層壁カーボンナノチューブ、カーボンブラック、TiO₂ またはグラフェンに気管内点滴注入したマウスの肺における全面的な転写変化を調べた。
- 試験物質: TiO₂、カーボンブラック、MWCNT
- 試験方法: マウスへの 5 日間吸入試験。吸入量 40mg。
- 結果;
 - 試験した ENM の物理化学的特性の大きな差異にもかかわらず、それらはすべて強く持続的な肺急性期応答を誘発した。すべてのばく露タイプで最も差別的に調節される遺伝子は、急性期タンパク質血清アミロイド A アイソフォーム 3 (Saa3) であり、他のアイソフォーム (Saa1 および Saa2) も強く誘発された。
 - さらに、ばく露後の肺 Saa3 mRNA レベル、血漿 SAA3 タンパク質レベル及び肺好中球流入と強い相関を確立した。これは、血漿タンパク質レベルに対する肺由来 Saa 発現の有意な影響を示した。
- まとめ: SAA タンパク質の血漿レベルの上昇は、疫学研究における心血管疾患の予測因子である。提案されたメカニズムは、ApoA-1 を HDL リポタンパク質上の SAA で置換することによるものであり、マクロファージからのコレステロール流出を媒介する HDL の能力を損なう。これにより、逆コレステロール輸送の低下、末梢コレステロールの封鎖、および HDL からマクロファージへのコレステロールの輸送がもたらされ、それによってマクロファージの泡沫細胞への変換が促進される。本研究では、上記の仮説を示す AOP を開発した。

この AOP は、2017 年 6 月に OECD AOP プログラムに受理された。

(ii) **Long-fibre Carbon Nanotubes and Asbestos induce Pleural Pathology with a Common Molecular Signature**

- 講演者: Tatyana Chernova
- 所属機関: MRC Toxicology Unit, Leicester, United Kingdom

本発表は、マウスに CNT を吸入ばく露した際の影響を調べた結果を報告したものである。

- 背景: 最近の研究では、中皮腫を含む胸膜におけるカーボンナノチューブ (CNT) の潜在的な病原性が強調されている。アスベストも CNT も、共通した長さ依存的な分子変化を誘発することが報告されている。観察された組織学的変化は、アスベストばく露および複製中皮腫によって誘発されたものと類似しているが、関与する分子メカニズム及びこれらがアスベスト誘発疾患とどのように比較されるかについては未だ調査されていない。
- 実験方法; 胸膜腔への直接注入モデルを用いて、短期及び長期のアスベストばく露後の胸膜および 20 ヶ月での短い/長い CNT の分子変化を比較した。
 - 試験動物: Wild type C57/Bl6 マウス
 - 試験材料と濃度;
 - ✓ SFA (short-fiber amosite) / LFA (long-fiber amosite) : 25 µg/mouse
 - ✓ SNT (short nanotubes) / LNT (long nanotubes) : 0.5、1.0、2.5、5 µg/mouse
 - ばく露期間: 1 週間、12 週間、6 か月、最大 20 か月。
- 結果;
 - 長い CNT に誘導された炎症性病変は、悪性中皮腫に進行した。
 - 長い CNT に誘導された腫瘍は、腫瘍抑制遺伝子 CdKn2a の喪失を示した。
 - 長い CNT に誘導された炎症性病変は、腫瘍抑制遺伝子 Cdkn2a のタンパク質 p16 と p19 の喪失を示した。
 - 長い CNT に誘導された中皮腫および長い繊維状アモサイト (アスベスト) に誘導された炎症性病変における CdKn2a (p16^{ink4a} / p19^{Arf}) 遺伝子座の過剰メチル化が観察された。
 - 共通の分子変化が、長繊維アモサイトと長い CNT に誘導された炎症病変で起こった。
 - 短いものではなく長いアスベストや CNT へのばく露は、Akt、mTOR、ERK1 / 2 および Src ファミリーキナーゼを含む発がん性シグナル伝達経路の活性化をもたらし、ばく露 1 週間後に検出され、それは研究機関全体にわたって持続した。
 - 異常な細胞シグナル伝達に対する中皮細胞および間質の差異の寄与は、病変発生の間に明らかであり、重要なことに、ヒト患者の末期中皮腫で検出されたものと同様で

あった。

- 酸化的 DNA 損傷、有糸分裂および増殖の増加は、長いアスベスト及び長い CNT が誘発する病変が進行するにつれて明らかになった。
 - 中皮細胞層の増殖及び「反応性」中皮細胞の発生は、活性化前発癌経路を有する間質細胞と標的中皮細胞との間のクロストークを示唆する。併せて、これらのデータは、長い CNT へのばく露は、ヒトの病気の病因を複製し、長いアスベストおよび長い CNT 誘発病変の共通の分子サインを強調する胸膜病変の発生を誘導することを実証した。
- 結論；
- 中皮腫に進行する LFA および LNT 誘発胸膜病変には、共通の分子変化が起こった。
 - LNT 誘発腫瘍における異常なシグナル伝達経路の活性化、Cdkn2a の過剰メチル化、および p19Arf の欠失は、ヒト中皮腫の共通の特徴を再現した。
 - LFA および LNT 誘発性病変の共通の分子徴候は、悪性中皮腫を含む胸膜疾患に至る類似の危険メカニズムを示した。

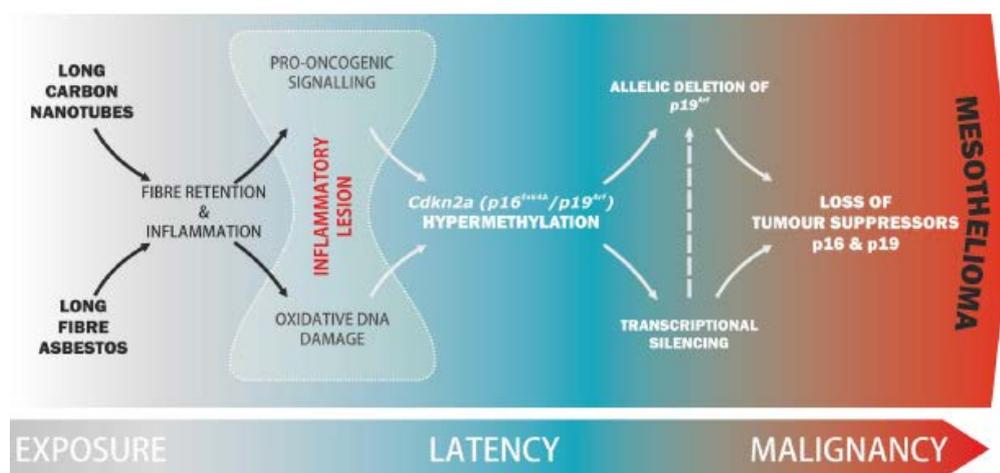


図 3.2-13 まとめ図

(iii) **Inhaled multi-walled carbon nanotubes-induced gene expression profile in rat lung**

- 講演者: Carole Seidel
- 所属機関: INRS, Vandoeuvre les Nancy, France

本発表は、職業ばく露の主な経路である吸入による毒性学的影響を調べるために、MWCNTを用いたラット鼻のみの亜急性吸入試験の結果を報告したものである。

- 実験プロトコル；
 - 試験材料: NM-401 (MMAD; 790nm)、NM-403 (MMAD; 1940nm)

- 試験動物:ラット
 - エアロゾル濃度:0.5 および 1.5mg / m³
 - ばく露条件:2×3 時間/日、5 日間/1 週間、4 週間。その後、短期間(3 日、30 日)と、長期間(90 日、180 日)後に組織採取。転写分析実施。
 - 遺伝子発現プロファイル:Agilent 技術を用いた転写物実験によって行い、データは GeneSpring ソフトウェアで分析した。
- 結果;
- 観察された CNT によるばく露終了後の炎症反応の誘発に従って、いくつかのケモカインおよび炎症に関与する他の因子をコードする遺伝子の調節が観察された。
 - 炎症応答を誘導しなかった最低用量の NM-401 でさえ、遺伝子発現を調節した。
 - 遺伝子発現プロファイル:3 日後の NM401 と NM403 の遺伝子発現は図 3.2-14 のようであり、NM-403 の遺伝子発現はクラスタリングに対して十分な遺伝子がなかった。

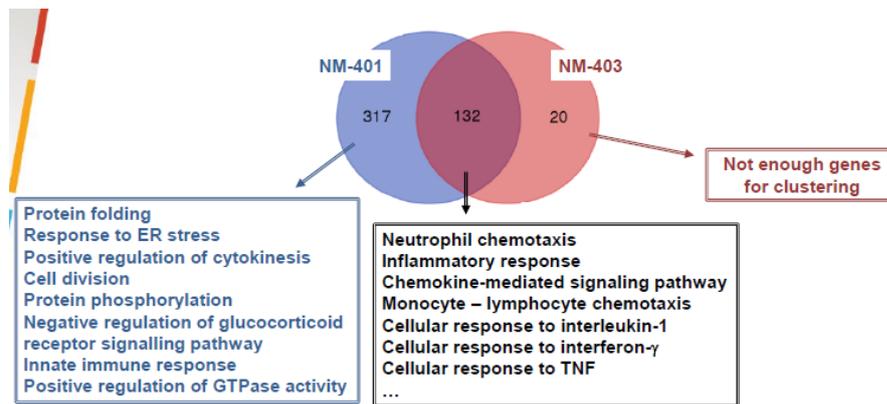


図 3.2-14 3 日後の遺伝子発現プロファイル

- NM-401 の長期/短期影響は図 3.2-15 のようであり、遺伝子発現は短期 > 長期、であった。

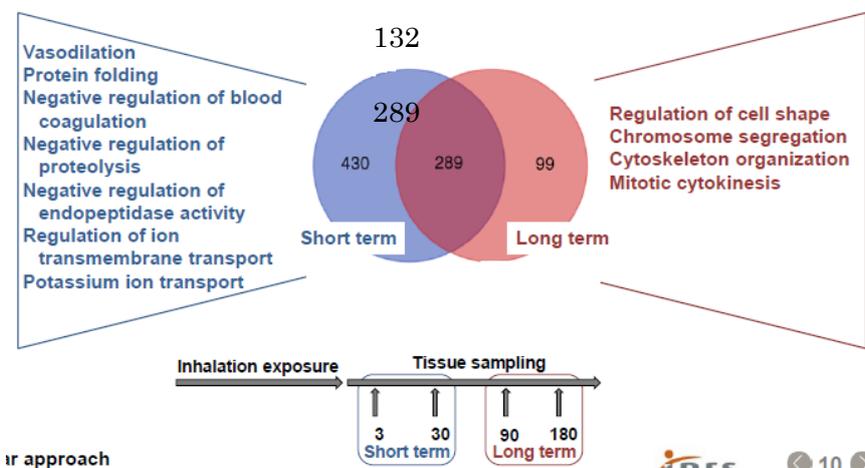


図 3.2-15 短期と長期の遺伝子発現の影響 (NM-401)

- 結論;
 - 3日後の NM401/403:
 - ✓ どちらも調節された遺伝子発現で、炎症反応を伴った。
 - ✓ 両方の CNT が、炎症応答に関与する遺伝子の発現を調節した。
 - ✓ NM401: タンパク質の折り畳み、細胞分裂、タンパク質リン酸化、が観察された。
 - ✓ NM-403: 一部の遺伝子はクラスター化されなかった。
 - NM-401 の短期と長期の影響:
 - ✓ NM-401 は、低用量でさえ、ばく露期間の終了後 3 日から 180 日までの炎症応答に関与する遺伝子の発現を調節した。
 - ✓ 短期影響: 血管拡張、タンパク質折り畳み、イオン輸送。
 - ✓ 長期影響: 細胞サイクルの促進、細胞骨格構成。
 - まとめ:
 - ✓ NM-403 をばく露したラット肺における短期および長期の影響による遺伝子発現プロファイルを比較した。長期間に特異的に調節される遺伝子のさらなる解析が必要である。

(キ) Session11: Lung Exposure and Beyond

(i) **Nanomaterial dosimetry in inhalation toxicology: Bridging the gaps between *in-vitro* and *in-vivo* models as well as real world exposure**

- 講演者: Otmar Schmid
- 所属機関: Comprehensive Pneumology Center, 81377 Munich, Germany; Helmholtz Zentrum Munchen, 85764 Neuherberg / Munich, Germany

本発表は、28 日間の肺炎から健康への悪影響の予測可能性について検討した結果を報告したものである。

- 実験の背景
 - ばく露レベル: これまで一般的に行われてきたばく露レベルの設定は、動物/細胞モデルからばく露レベルを決定し、設定したばく露レベルでの送達濃度を確認することで、組織に送達された用量-反応関係を調査していた。送達濃度は、モデルから得られたばく露レベルから、エアロゾルサイズでの分布・組成により変化する。また、送達濃度は、組織に投与される濃度と関連性がある。そこで、組織に送達された用量-反応関係からは、組織送達用量[用量/cm²-組織]と毒性反応/健康影響との関係を確認することができ、得られた毒性反応/健康影響から、モデル生物における最大許容組織特異用量である NOAEL/LOAEL が算出される。この NOAEL/LOAEL からヒト健康における NOAEL/LOAEL を推定し、この値を基に、ヒトでのばく露レベルが計算される。しかし、ここで算出されるばく露レベルは、最初にモデルから算出される

ばく露レベルとは一致しない。

- *In vitro*での粒子導体は、細胞投与量に影響する。
- ナノ毒性試験に関する粒子濃度測定には根本的な欠陥がある。1 つは、重要な組織送達用量の測定は、ほとんど無視されている。2 つ目は、組織送達用量のパラダイムは、投与割合を含めるように拡大されなければならいかもしれない。
- 表面積は、*In vitro* 用量測定と最も関連性が高い。生存率と表面積は反比例の関係を示す。
- 組織送達線量を、例えば直接的に測定することができない場合、誘導結合プラズマ質量分析法(ICP-MS)または水晶振動子微量天秤(QCM)実効密度アプローチを用いた非球形の粒子形状効果のための信頼性のある組織線量推定のために、公的に利用可能な肺播種/粒子動態モデルを使用すべきである。
- 実験概要: ENM の用量制御されたインビトロおよびインビボ試験のための様々な方法を、組織送達用量に特に重点を置いて検討した。ラットの *in vivo* での慢性吸入試験では、難溶解性粒子を用い、毒性開始用量と現実世界での粒子負荷をばく露種類別に調べた。
- 結果; 実験条件別の結果は以下表のとおりであった。

実験種類	投与方法	観察結果	濃度
【<i>In vivo</i>】			
Acute	点滴/注射	PMN (多形核好中球) influx at 1d	0.02 cm ² /cm ²
Sub acute	点滴/注射	PMN influx at 28 d	1 cm ² /cm ²
chronic	吸入	腫瘍の拡大	1 cm ² /cm ²
【<i>In vitro</i>】	—	IL-8 遺伝子発現 WST-1	-1~10 cm ² /cm ²

- 結論: 現在観察されているインビトロおよびインビボの用量-反応曲線は、現在使用されている肺のインビトロモデルにおいて驚くほど高い組織用量が毒性を誘発することが必要であることを明らかにする現実のばく露シナリオでの視点に置かれる。これらのギャップを橋渡しする可能性は、より多くの生体模倣的および臨床的に関連する肺のモデルの使用、および現実的なばく露シナリオの間に遭遇する生理学的用量の理解におそらく関係している。

(ii) **Translocation and fate of inhaled gold nanoparticles in mice and man**

- 講演者: Jennifer Raftis
- 所属機関: University of Edinburgh., Edinburgh, United Kingdom

本発表は、金ナノ粒子へのばく露後の挙動について研究した結果を報告したものである。

- 背景・目的: 吸入された燃焼由来のナノ粒子は、心血管疾患と関連している。肺ばく露と心血管効果を結ぶ経路は不明なままである。吸入されたナノ粒子は肺から人の血液に移行するのか、という根本的な疑問が残る。本研究では、金ナノ粒子が肺から血液に移行し、血管病変の発生部位に蓄積するかどうかを調べることを目的とした。

- 実験;
 - ナノ材料: 金ナノ粒子。1 次粒径 3.8nm。平均空気力学的直径 18nm。金ナノ粒子を用いた理由は、排気ガス中の粒子サイズが類似していること、大部分が不活性であること、非常に低レベルまで測定可能な特殊な技術があること、体内の金の濃度が非常に低いこと、ということである。
 - ヒトでの実験: 14 人の健康な男性に、運動中に 2 時間、金ナノ粒子を吸入ばく露。血液サンプルを、15 分~24 時間、3 か月後、に採取。24 時間の全尿を収集。
 - マウスでの実験: western diet マウスに、生理食塩水を対照群として、金ナノ粒子を吸入させた。
- 結果;
 - ヒトでの実験:
 - ✓ 金は、ばく露から 15 分後に最初に血液中に検出され、その後 6 時間にわたってゆっくりと増加した。24 時間までに、すべての被験者の血中に、金を検出することができた。
 - ✓ 尿中にも金が検出され、これがナノ粒子が身体から排除された方法の 1 つであることが示唆された。
 - ✓ 3 ヶ月後でも、血液や尿中に金が検出され、これらの粒子が長時間体内に留まっていることが示唆された。
 - ✓ 血中及び尿中の金濃度は、吸入したナノ粒子のサイズが小さいほど高くなった。

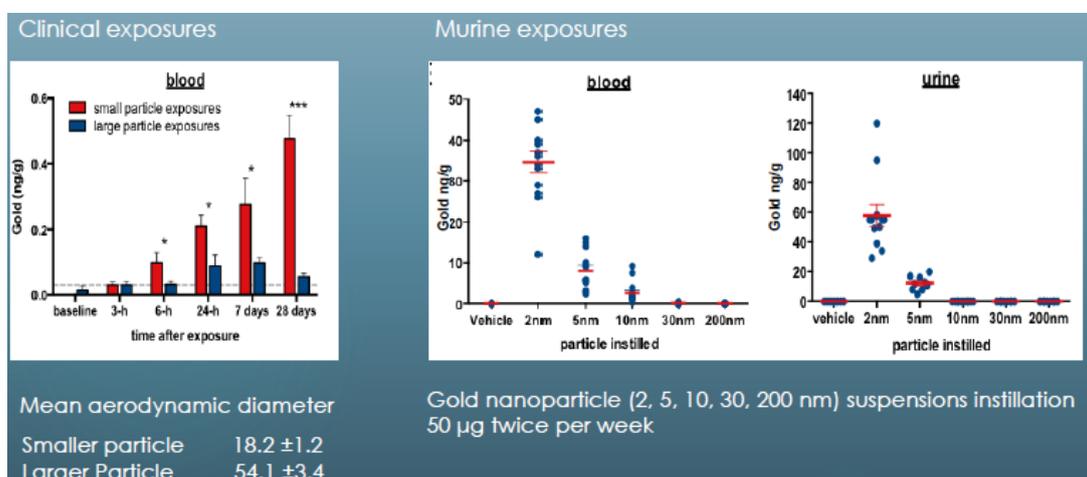


図 3.2-16 血中及び尿中で検出された金ナノ粒子のサイズ分布

- マウスでの実験:
 - ✓ 金ナノ粒子(2~200nm)のより広いサイズ範囲への肺ばく露後の血液および肝臓における蓄積を実証し、10nm 未満の粒子の転位がより大きかった。
 - ✓ 高脂肪摂食アポリポタンパク質-E 欠損マウスでは、病変発生に関連する脈管構造の領域において、より高い濃度で金ナノ粒子が検出された。

- ✓ 外科手術 24 時間前に金ナノ粒子を吸入した内膜切除患者から切除された頸動脈病変において、ラマン分光法を用いて金が検出された。

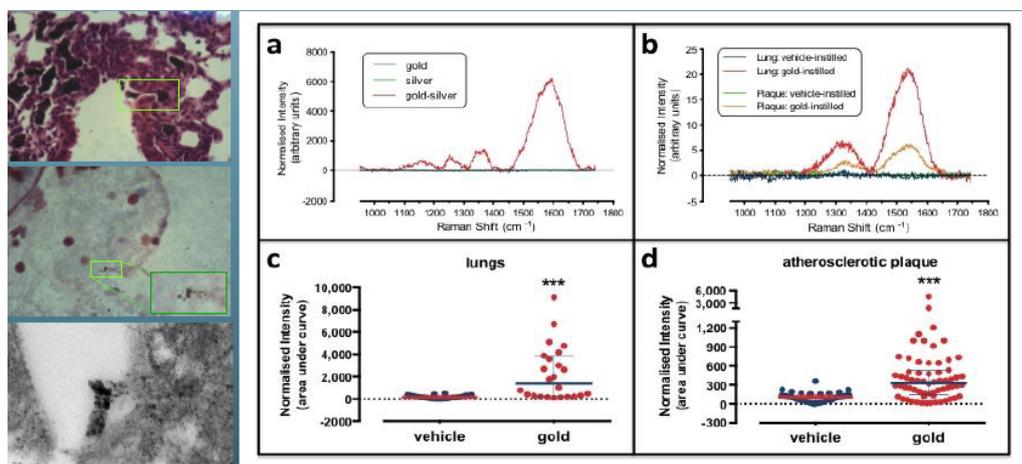


図 3.2-17 マウス組織での金の検出状況

- 金ナノ粒子の、ヒトでの血管疾患領域への蓄積の検討: 包含基準を“CEA を受けるために頸動脈狭窄を有する患者”、除外基準を“最新のボディピアスまたは金歯充填の歴史”、“貿易によるジュエラー”、“研究要件への遵守を制限する精神病/社会的状況”、“新しい脳卒中とランキンスコアが 3 以上の患者”、“妊娠中の女性”、“研究への参加が手術を遅らせる結果となる”、“元素金または金を含む分子に起因するアレルギー反応の歴史”と設定すると、金ナノ粒子は、ヒトの血液疾患領域に蓄積することが確認できた。

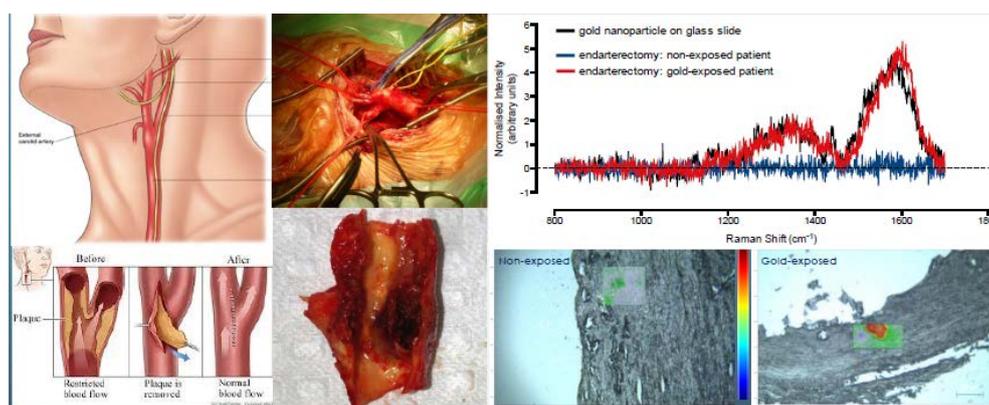


図 3.2-18 ヒトの血液疾患領域への金ナノ粒子の蓄積

- まとめ;
 - マウスへの金ナノ粒子吸入後、15 分～24 時間以内に、血液中と尿中に金ナノ粒子が検出された。
 - 移行は、30nm 粒子と比較して 5nm 粒子(一次粒子)の吸入後に検出された金のレベ

ルがより高かった。

- マウス研究から、サイズ依存性移行が直径<10nm の粒子について顕著に大きな移行を伴って確認された。
- 金ナノ粒子は、脈管構造の非罹患領域とは対照的に ApoE - / - マウスの炎症性血管病変に優先的に蓄積した。吸入後、脳卒中リスクのある患者の頸動脈疾患の外科標本において金粒子が検出された。
- 吸入されたナノ粒子の全身循環への移行と血管炎症部位への集積は、環境ナノ粒子と心臓血管疾患との間に直接的な機械的関係をもたらし、人工ナノ材料の使用におけるリスク管理に大きな影響を及ぼす。
- 結論:吸入されたナノ粒子の移動および血管炎症部位における蓄積は、環境ナノ粒子と心臓血管疾患との間の関係を説明することができる直接的なメカニズムを提供する。疾患部位でナノ粒子がどのように移行および蓄積するかをより深く理解することは、環境および人工ナノ粒子両方のリスク評価にとって最も重要である。

(ク) Session 13: Nanotoxicology

(i) Toxicity of different types of layered silicates

- 講演者: Krystyna Maciaszek
- 所属機関: Heriot-Watt University, Edinburgh, United Kingdom

本発表は、シリカナノ粒子の種類の違いによる細胞への影響を調べた結果を報告したものである。

- 背景:層状ケイ酸塩(例えば粘土)の非常に魅力的な特性から、シリカナノ粒子は広範囲の用途で利用されているが、ヒトの健康に対する潜在的な毒物学的影響は十分に調査されていない。層状ケイ酸塩に関する健康上の懸念は、(i) ナノスケールサイズ、(ii) 高アスペクト比(約 1nm の厚さおよび数ミクロンまでの長さおよび/または幅)及び(iii) 化学組成、があげられる。
- SiO₂ の種類;

種類	流体力学的サイズ[nm]	
	T=0	T=24 時間
S-ヘクトライト (SLS)	88±0.43	77±0.6
N-ヘクトライト (NLS)	318±13	325±2

- 実験方法:24 時間のばく露後に、マウス単球マクロファージ細胞株 (J774A.1) およびヒト初代マクロファージを用いた *in vitro* 毒物学的研究により、広範囲の合成層状ケイ酸塩 (SLS) および天然層状ケイ酸塩 (NLS) の潜在的危険性を調べた。細胞毒性、サイトカインの分泌および SLS および NLS 粒子の細胞形態への影響などの異なる終点を調べた。試験された粒子のパネルは、大きさ、電荷、化学組成などの異なる物理化学的性質において変化する

SLS および NLS からなる。

- 結果;細胞毒性:
 - J774 細胞(マウス由来マクロファージ細胞)では、NLS のほうが SLS よりも大きな細胞毒性を引き起こした。
- 結果;TNF(腫瘍壊死因子)- α 分泌:
 - J774 細胞の TNF- α 分泌は、SLS あるいは NLS の濃度が増加するにつれて増加した。
 - J774 細胞の TNF- α 分泌は、同じ濃度では、SLS よりも NLS のほうが大きかった。
 - ヒト 1 次 MDM(ヒト単球由来マクロファージ)は、24 時間後に細胞を取り込んだ。
 - J774 細胞も、24 時間後に細胞を取り込んだ。
 - 細胞形態に関して、J774 細胞は、細胞空胞化が確認された。
- まとめ;
 - J774 細胞(マウス由来マクロファージ細胞)では、NLS のほうが SLS よりも大きな細胞毒性を引き起こした。NLS は、J774 細胞で、高いレベルの前炎症反応を引き起こした。
 - NLS および SLS のすべてのタイプは、用量依存的な細胞毒性効果および炎症促進性サイトカインの分泌を誘発したが、誘発される程度は層状ケイ酸塩のタイプによって異なった。
 - 光学顕微鏡、SEM および TEM 検査により、層状ケイ酸塩でのマクロファージの処理が、広範囲の空胞の形成を引き起こすことが明らかになった。
 - バキューム形成および液胞サイズ分布は、時間および用量の両方に依存した。
 - これらの結果は、SLS および NLS のマクロファージ毒性を介したヒトの健康への潜在的危険性を示している。

(ii) **Nanoparticles and persistent virus infection – a dangerous liaison for the development of chronic lung disease (s) ?**

- 講演者:Tobias Stoeger
- 所属機関:Helmholtz Zentrum München, Comprehensive Pneumology Center, Institute of Lung Biology and Disease, Munich, Germany

本発表は、ヘルペスウイルスと肺疾患について研究した結果を報告したものである。

- 背景と目的:周囲ナノ粒子(NP)の吸入および持続性ヘルペスウイルス感染の両方が、慢性肺疾患の発症に寄与することが示唆されている。本研究では、潜在的ウイルス感染中の NP ばく露が抗ウイルス免疫制御を妨げ、ウイルス再活性化を誘発するかどうか、を調べた。
- 仮定:ナノ粒子へのばく露が、ウイルス潜伏の制御を混乱させる可能性があり、ウイルスの再活性化を誘発する可能性がある。

- 実験;
 - ナノ材料:カーボンブラック(Printex90;Ptx90、14nm)、CNT(二層カーボンナノチューブ;DWCNT、4nm×1-10µm)
 - 一過性の炎症は、二重壁カーボンナノチューブ(CNT)ではなく球状 NP(CNP)にばく露した際に生じたことから、ネズミガンヘルペスウイルス 68(MHV-68)モデル系を用いて、潜在的に感染した細胞系を用いたインビトロ研究およびマウスを用いたインビボ研究を行った。MH-S 細胞(マウス)を MHV-68 に感染させた。
 - MH-S 細胞を用いた肺胞マクロファージ細胞株試験:MH-S 細胞を MHV-68 で一晩感染させ、50µg/ml の NP で処理し、さらに 2 時間培養。遊離溶解ウイルスは、クエン酸緩衝液(pH = 3.0)との培養により不活性化。指標細胞上にプレーティングした後、細胞変性効果(CPE)の量を決定。感染細胞のゲノム負荷に対して標準化した相対値として示した。
 - ウイルス再活性化に対する NP の影響実験:細胞は S11(潜伏性 MHV-68 感染 B 細胞リンパ腫株)と ANA-1/MHV-68(BMDM/マクロファージ系、潜在的に MHV-68 感染)を用いた。潜伏感染細胞を、50µgNP に 72 時間ばく露。上清中の溶菌性ウイルスの量の決定(プラークアッセイ)と、RT-PCR によるウイルス遺伝子発現の分析(ORF50 =溶菌対 ORF73 =溶菌および潜伏)、を実施。
 - TiO₂ NP または DEP への持続感染細胞のばく露は、*in vitro* でのウイルス再活性化に異なる効果を有することを確認する実験:S11 および ANA-1 / MHV-68 細胞を 50µg/ml の TiO₂ NP または DEP と共に培養し、72 時間後にプラークアッセイによって上清中に溶解ウイルスを決定(パネル a および b)。ORF50 / ORF73 比(パネル c および d)として示されるウイルス遺伝子 ORF50(溶解相に特異的)及び ORF73(溶解相および潜伏相中に発現される)の発現を、S11 および ANA-1 / MHV-68 細胞に NP をばく露後 72 時間後に、RT-PCR によって分析。未処理細胞の値を「1」とし、NP 処理後の細胞の値を対照と比較して算出。示されたデータは、3 つの独立した実験からの平均+ SD とした。アスタリスクは、未処置コントロール(*:P <0.05)と統計的に有意な差を示す。
 - *In vivo* 試験:マウスに MVH-68 を用いて鼻腔内感染後、28 日間待機。DWCNT または Ptx90 を 50µg 注入。24 時間後に、肺組織を回収して分析。
- 結果(*in vitro* マウス細胞);
 - マウス細胞:*in vitro* 実験で、96 時間までばく露したところ、約 50µg/ml の投与で NP の細胞毒性はごくわずかであった。
 - NP 細胞は AM(肺胞マクロファージ)細胞株において溶解性の MHV-68 複製を増強した。
 - インビトロにおけるウイルス再活性化に対する NP の影響:図 3.2-19

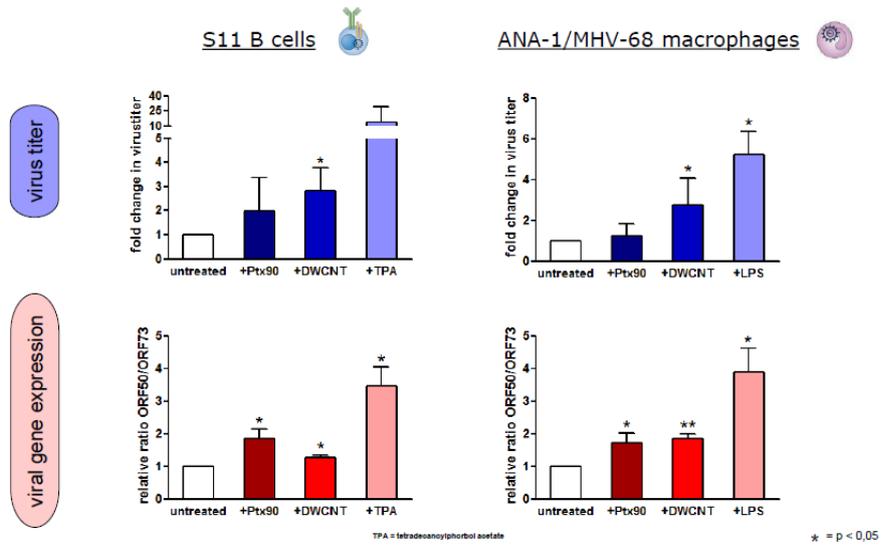


図 3.2-19 インビトロにおけるウイルス再活性化に対する NP の影響

➤ TiO₂ NP または DEP への持続感染細胞のばく露: 図 3.2-20

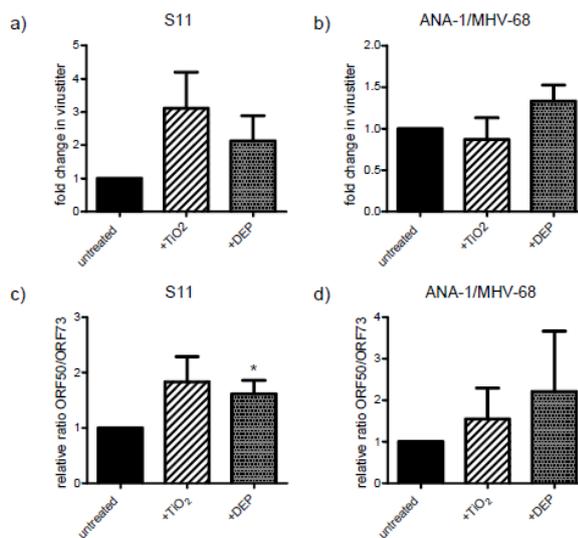


図 3.2-20 TiO₂ NP または DEP への持続感染細胞のばく露結果

- 潜伏感染した細胞または動物のナノ粒子へのばく露は、潜伏的ウイルスを再活性化し、しばしば急性ウイルス感染を回復させる可能性がある。これは、特に慢性肺炎症を患う個体に重要である可能性がある。
- 結果 (*in vitro* ヒト細胞);
 - ヒト細胞におけるウイルス再活性化: 図 3.2-21

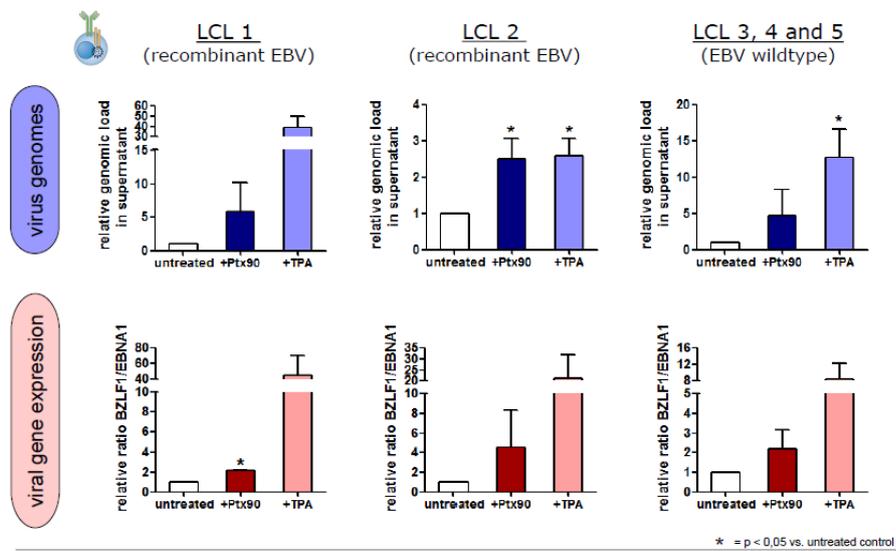


図 3.2-21 *in vitro* ヒト細胞におけるウイルス再活性化試験の結果

● 結果 (*in vivo*);

- 組織学的結果: 溶解相の MHV-68 タンパク質に対する IHC 染色を確認。

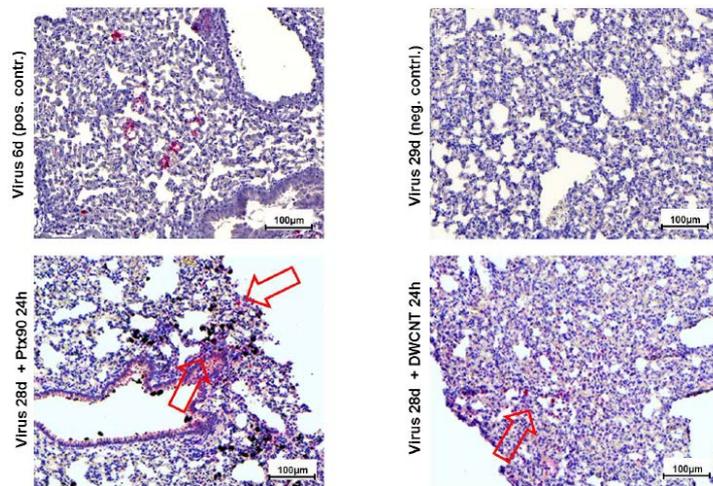


図 3.2-22 マウス組織学的結果

- トランスクリプトーム解析: 急性感染(ウイルス 6d)と潜伏性ウイルス+ NP との間に調節された遺伝子の重複が確認された。

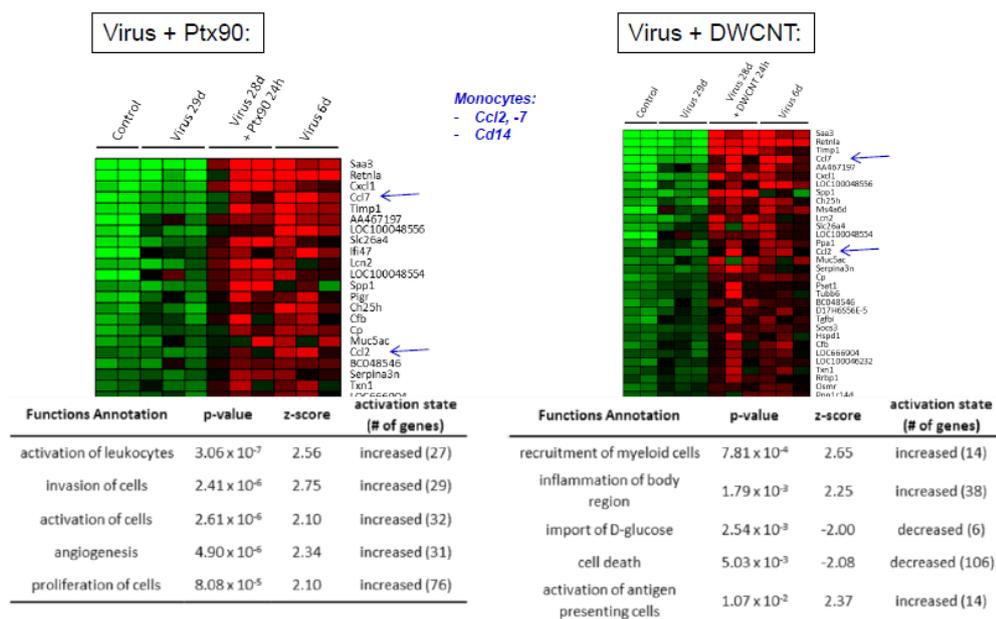


図 3.2-23 トランスクリプトーム解析結果

- ICR-FT MS によるメタボローム解析: CNP ばく露後の潜伏感染マウスの肺において、リン脂質の濃縮が確認された。
- まとめ;
 - 潜伏感染細胞(マウスまたはヒト)の NP による処理により、ウイルストランスアクチベーター遺伝子(ORF50 または BZLF1)の発現を誘発した。また、感染性ウイルスまたはウイルスゲノムの量を増加させた。
 - NP への潜伏感染マウスのばく露により、溶解性ウイルスタンパク質(単球/マクロファージ)の産生を増強した。また、急性感染と実質的に類似したトランスクリプトームのサインを導いた。さらに、急性感染中のものと同様の代謝物組成物が生成された。
 - 潜伏感染細胞(マウスまたはヒト)の NP による処理により、ウイルストランスアクチベーター遺伝子(ORF50 または BZLF1)の発現が誘発された。また、感染性ウイルスまたはウイルスゲノムの量が増加した。このことは、潜伏感染した細胞または動物の NP へのばく露は潜伏性ウイルスを再活性化し、急性ウイルス感染の特徴を回復させることを示している。急性感染中のものと同様の代謝物組成物を生成した。
- (iii) **Nanomaterial-induced Pulmonary Acute Phase Response Constitutes a Casual Link between Inhalation of Nanomaterials and Risk of Cardiovascular Disease**
 - 講演者: Ulla Vogel
 - 所属機関: National Research Centre for the Working Environment, Copenhagen, Denmark

本発表は、急性期タンパク質 CRP と SAA は、CDC (補体依存性細胞傷害; Complement-Dependent Cytotoxicity) のリスクと関係するか、を既存の研究結果に基づき検討した結果を報告したものである。

- 背景: 粒子の吸入は、疫学研究における心血管疾患のリスク増加と関連している。ナノ物質の吸入は、吸入されたナノ物質の総表面積に比例する肺の炎症を誘発することが知られている。安全設計に関する規制を行うために、ナノマテリアルについては、グルーピングとランキングが行われている。講演者らは、最近、カーボンブラック、二酸化チタン粒子、カーボンナノチューブおよびディーゼル排気粒子を含むナノ材料への肺へのばく露が、mRNA およびタンパク質レベルの両方で時間および用量依存性の急性期応答を誘導することを示した。急性期反応は全身性のアラーム反応であり、急性期タンパク質 CRP および SAA の血中レベルは、将来の疫学研究において心血管疾患のリスクと関連している。マウスでは、ナノマテリアルへの用量依存による肺急性期反応が、ディーゼル排ガス粒子やバイオ燃料ダストなどで観察されている。
- 既存研究結果;
 - AOP に関してサポートする証拠がある。
 - 前炎症性サイトカイン及び急性期タンパク質レベルは、気道に続いて肺組織で増加する。
 - Saa3 mRNA レベルと好中球の流入との間には密接な相関がある。
 - 肺沈着表面積 (lung deposited surface area; LDSA) も肺の Saa3 発現を予測する。
 - 肺の Saa3 mRNA レベルと好中球流入は、マウスの SAA3 の血漿レベルの予測因子である。
 - 肺に投与された Saa1 は、ADOE -/マウスにおいてプラークの発達を促進する。
 - 吸入粒子が、肺急性期反応を引き起こす。
 - ヒトでの証拠として、Madsen et al., 2016 や Li et al., 2015 がある。
 - サポートする証拠として、CNTs が強い炎症反応に並行して、強い肺急性期反応を誘発するほか、CNTs はアスベスト様特性を示し、アスベストも CNTs 様特性を有する。
- まとめ: 気道への輸送由来粒子へのばく露が、マウスで肺急性期応答を引き起こす。Saa3 mRNA レベルとして測定される肺急性期応答は、好中球の流入と沈着したナノ材料の全表面積と密接に相関する。これは、ナノサイズの粒子の吸入が、より大きな粒子の吸入よりも質量単位当たりのはるかに強い急性期応答を誘発し、付随する心血管疾患のリスクは、付着した全表面積に比例することを意味する。これは、特にナノ粒子特異的な職業ばく露レベルの検討に関連し、心血管疾患の危険因子としての職業ばく露の重要性を強調している。

(3) Nanosafety2017

1) 概要

- 期間:2017年10月11日~13日
- 場所:ザールブリュッケン(ドイツ)ザールブリュッケン城

Nanosafety2017 はドイツ ライプニッツ研究所アライアンス ナノセーフティーの主催で行われた。このアライアンスでは、ナノマテリアルとナノ製品に関する安全性とセキュリティの問題を扱っており、中心的な目的はナノ粒子に起因する効果を理解し、安全なナノ材料を開発し、ナノ関連の問題を説明することです。アライアンスには、材料科学、健康と毒物学、気圧学、労働安全衛生、科学的データベースと知識コミュニケーションを研究する6つの研究所からなる協会である。

本コンファレンスでは、設計上の安全、神経毒性、ナノマテリアルの効果とメカニズム、ナノオブジェクトの定量化と検出、規制上の問題と長期的な研究、環境ばく露経路に関する研究報告があった。

参加者は80人程度で、ザールブリュッケン城の会議場で3日間にかけて行われた。各発表に対して活発な議論が行われた。セッションは、表3.2-5に示したように全部で6から構成された。

表3.2-5から本調査と関連性が高く、興味深い研究発表について、以下概略を報告する。

表 3.2-5 Nanosafety2017 セッション一覧

セッションNo.	表題	座長
SESSION 1	Environmental Exposure Pathways	Christoph van Thriel
SESSION 2	Safe by Design	Annette Kraegeloh
SESSION 3	Regulatory Issues and Long Term Effects	Heinz Fehrenbach
SESSION 4.1	Quantification and Detection of Nanoobjects	Annette Kraegeloh
SESSION 4.2	Quantification and Detection of Nanoobjects	Eduard Arzt
SESSION 4.3	Quantification and Detection of Nanoobjects	Annette Kraegeloh
SESSION 5.1	Neurotoxicity	Klaus Unfried
SESSION 5.2	Neurotoxicity	Christoph van Thriel
SESSION 6.1	Nanomaterials: Effects and Mechanisms	Heinz Fehrenbach
SESSION 6.2	Nanomaterials: Effects and Mechanisms	Klaus Unfried

2) 発表内容

(ア) Session 3: Regulatory Issues and Long Term Effects

(i) **Risk, Regulation and Responsible Innovation**

- 講演者: Maurice Brennan
- 所属機関: University of Birmingham, UK

本発表は、EUでの規制評価とリスクマネジメントに関するものである。

EUの戦略的、科学的、規制上の枠組みをナノ物質のために採用することは、人や環境の健康と安全を保護する上で重要な役割を担っている。「イノベーションプロセスの中心に責任ある研究

とイノベーションを設定するという政策(RRI)の推進で、より望ましい将来であろうとも、ナノ革命の全面的な利益を実現することは、EU内で野心的なものである。このプレゼンテーションは、EUのリスクガバナンスの方針と手段が、ナノマテリアルの安全で責任ある発展のための戦略的目標をどの程度達成したかに挑戦している。結果は、上記の戦略目標を達成するための進展と欧州委員会(EC)ナノマテリアルリスクガバナンス戦略に示された重要な目的について、部門横断的な専門家の評価を評価するために実施された定性的研究から提示される。主要な知見は、EUの水平的化学物質安全規制とリスク評価試験プロトコルでナノ特異性が欠如しているため、現在ナノ物質が規制境界を超えていることを示している。RRIの分野横断的な認識がある一方、その解釈上の柔軟性は、責任あるイノベーションのコンセプトの実施が、効果的な業界の参画、特に中小企業の参画がみられない兆候がと一致しないことを意味する。その結果、ECの戦略目標と目標はまだ満たされていないと評価される。しかし、緊急の科学的リスクアセスメントプロトコルが規制試験制度を支えるためにナノ特異性を提供することができる道標があり、設計プロセスのコンセプトによるECの推進は、ナノ材料のイノベーションバリューチェーン内でRRIを運用することができる。

- 結論:

- ECの戦略的目標は達成されていない。
- REACHはナノマテリアルに適用されておらず、ナノ特有の試験法も出現していない。
- 毒物学のテストに対する新たな対応策が一つの回答として促進されているが、「実証という概念」が欠けている。
- RRIは今やEU中央の政策手段として公式に支持されているが、運用する方法に欠ける。
- 設計による安全は、RRIを「安全な」ナノマテリアルを製造するためのイノベーションペースに統合するためのリンクを提供する可能性がある。
- 設計による安全は産業と規制安全の意思決定の土台と成りうる。

(ii) **European Standardization in Nanotechnologies and Relation with International Work. How Standardization Can Help Industry and Regulators in Developing Safe Products?**

- 講演者: Patrice Conner
- 所属機関: AFNOR, La Plaine Saint-Denis, France

ナノ技術は、責任ある持続可能な方法で人間の繁栄に貢献する巨大な可能性を秘めている科学技術、技術革新の分野を急速に発展させている。技術を可能にするため、アプリケーションの全範囲が潜在的に非常に広い。主な意味合いは、多くの分野で期待されている。エネルギー生産と貯蔵、材料科学/化学工学、製造、環境保護、消費者製品などが含まれますが、これらに関連する社会的および倫理的問題が適切に行われなければ、ナノテクノロジーはその潜在力を十分に発揮することはできない。つまり、ナノテクノロジーやナノ粒子は、ヒトや環境に新たな健康リスクをもたら

し、おそらくは人間や環境種の生理との干渉のメカニズムがかなり異なる可能性がある。

「安全で統合された責任ある」アプローチまたは「安全な設計による」アプローチの構築物の 1 つは、標準化である。経済社会委員会と欧州議会は共に、ナノテクノロジー市場とナノマテリアルの市場導入に伴う標準化と、規制の実施を促進する手段としての標準化に付随する重要性を強調した。ISO および CEN は、2005 年および 2006 年に、この新興かつ可能性のある技術に関連する選択されたテーマに対処を開始した。

2010 年の初めに、EC DG「企業と産業」(現 EC DG 成長、国内市場、産業、起業家精神および中小企業)は、ナノテクノロジーおよびナノマテリアルに関する標準化活動のために CEN、CENELEC および ETSI に M / 461 を任命した。このように、CEN / TC 352「ナノテクノロジー」は、M / 461 (標準化されるべき 46 のトピック)の実施における調整のためのリーダーシップをとり、適切な欧州および国際技術委員会および関係するステークホルダーに連絡するよう求められている同定された)。M / 461 の事前の要請は、ナノマテリアルの特性評価およびばく露、ならびに健康、安全および環境に関連する事項を扱う。

(iii) **Nano Valid: Developing Reference Methods for Risk Assessment of Engineered Nanomaterials**

- 講演者: Rudolf Reuther
- 所属機関: NordMiljö AB, Arvika, Sweden

工業化されたナノ材料(EN)の生産と製品化の成長は、これら新規物質への人間と環境のばく露を増加させる。これらの大きな革新の可能性は、ナノスケール(1~100nm)で起こる基本的に新しい特性にあり、生物学および環境的挙動において観察される変化を引き起こす可能性がある。世界中の激しい研究の10年にもかかわらず、ENが生態系システムに入るときに何が起こっているのかについての明確で一貫した認識が未だ不十分である。これは、従来の化学物質用に開発された電流測定および試験ツールが、粒子サイズ依存特性および関連する可能性のある影響を反映しないことが多いからである。得られたデータの不確実性は、既存の材料および知識のデータベースとを改善するのに役立つ有効な方法の開発、ナノ粒子と生体系との相互作用を制御する重要な物質特性およびメカニズムに関する現在の理解を深めるのに有用であり得、ENに規制上のリスクアプローチを適用することに役立つ有効な方法を開発することを至急必要であることを提唱している。

Nano Valid は、大きさに関連する特性、危険性および EN のばく露を信頼性をもって特徴付けるために必要とされる検証された参照方法および材料の開発に完全に専念した最初のヨーロッパの「旗艦」プロジェクトであった。業界および規制機関のリスクアセスメント担当者がナノマテリアルから生じる可能性のあるリスクを認識し管理できるようにする、厳密に検証された標準操作手順(SOP)や認定基準資料(CRM)など、Nano Valid は、人間や自然界におけるこれらの新物質の挙動に関する膨大な数の新しい科学的知見を生み出した。重要な用量・反応関係、毒性(有害

な)経路およびエンドポイント、ならびに様々なライフサイクル段階に沿った生物学的システムにおけるナノ粒子の放出、分布、バイオアベイラビリティおよび取り込みを支配するプロセスに関する新しい洞察が得られた。

これらの新しい科学的知見に基づいて、Nano Valid はまた、実用的で商業的に利用可能なサンプリング、測定および試験装置を新たに生み出しました。特に、浮遊粒子の物理的および生物学的分析検査と新しいホットガスナノサンプラーとを組み合わせた新規のオンライン露光装置が開発されている。CEN / TC 352 "ナノテクノロジー"、ISO / TC 229 "ナノテクノロジー"、ISO / TC 24 / SC 4 "粒子などの標準化活動には、CEN や ISO などの標準化団体と協力して、メソッド標準化のための新しい作業項目 (NWI) を提案することによって、「特徴付け」を行う。プロジェクトのもう一つのハイライトで直接的な実績は、ナノ物質の安全な取り扱いのためのガイダンス文書と訓練マニュアルの作成であった。これは、調査会社、機器メーカー、施工研究所などの小規模な産業で、労働安全衛生上のリスクを低減し、最小化する。

新しく開発された方法論、特にサイズ分布または表面電荷測定、分散制御、ラベリングおよびインビトロ/インビボ試験に関する標準操作手順は、他の関連プロジェクトで今後行われる方法バリエーションの取り組みを強化し、現在のリスクおよびライフサイクルアセスメントツールのパフォーマンスを改善し、それゆえに REACH などの関連する法律の施行を緊急に必要とする、信頼性の高いデータベースである。これらの検証された方法の使用は、重要なプロセス、材料の特性およびライフサイクルの段階を早期に特定し、安全なナノ材料の設計を促進し、最終的に人間または環境への害(「設計による安全」)を防止する助けとなる。

(iv) **Tuball™ Single Wall Carbon Nanotubes: Health, Safety & Environmental Issues**

- 講演者: Gunther van Kerckhove
- 所属機関: OCSiAl Europe S.a.r.l., Leudelange, Luxembourg

OCSiAl は、2009 年に世界規模で設立された。SWCNT の最初のメーカーは、2013 年から特許取得済みの拡張可能な製造プロセスを採用しており、2015 年以来、10 トン/年を製造する世界最大の SWCNT 製造者である。Tuball™ を含むさまざまな製品ラインは、@ OCSiAl またはそのパートナーが利用できる。0.02% (質量%) で始まる Tuball™ SWCNT の極端に低い負荷では、必要な電気伝導度を提供し、同時にこの Tuball™ 製品の機械的特性を保持することができる。

OCSiAl はまた、最大 10 トン単位の EU-REACH 登録を完了した最初の SWCNT メーカーである。Tuball™ は世界中で多くの関心を集めており、継続的にさまざまなアプリケーションで使用され、テストされている。OCSiAl が世界中の必要な規制および品質基準を確立しているのはこれ故である。

このプレゼンテーションの最初の部分は、Tuball™ 物質とその製品ラインの簡単な紹介を目的としている。プレゼンテーションの第 2 部は、進行中の登録の状況と計画の概要であり、3 番目と最後の部分では、Tuball™ 物質とさまざまなアプリケーションの健康、安全、環境の側面に焦点を当てる。SWCNT の製造元として、OCSiAl は、(新しい) Tuball 製品の理解を向上させ、ライフサイク

ル全体を通じて潜在的な危険を改善するための投資を継続しています。私たちは、追加のテストデータを作成し、業界団体やネットワークと協力して作業している。

このプレゼンテーションでは、当社のカーボンナノチューブ (SWCNT) の規制状況を成功裏に導入するために、H&S のリードマネージャー Van Kerckhove Gunther が講じているステップについて説明する。数多くの研究のための (将来の) 計画を概説し、異なる種類の組成物を含む当社の Tuball (商標) 物質の適格性を証明する。

(イ) Session 4: Quantification and Detection of Nanoobjects

(i) **Cryo Electron Tomography: Imaging Cells at the Nanoscale**

- 講演者: Wolfgang Baumeister
- 所属機関: Max Planck Institute of Biochemistry, Planegg, Germany

基調講演である。

伝統的に、構造生物学者は、単離され精製された分子成分を特徴づけることによって還元的に細胞の複雑性に近づいてきた。この「分裂と征服」アプローチは、PDB の驚くべき数のエントリーによって証明されているように、非常に成功している。しかしながら、近年、生物学的機能が個々の巨大分子に起因することは稀であるという認識が高まっている。ほとんどの細胞機能は、彼らが一斉に行動することから生じる。したがって、インサイチュで、すなわち摂動のない細胞環境において行われる研究を可能にする方法の開発が必要とされている。「構造生物学」という用語は、細胞環境が完全に保存されているシナリオにのみ適用されるべきである。クライオ電子トモグラフィーは、細胞の超分子構造または「分子社会学」を研究するユニークな可能性を秘めている。それは物理的に可能な最良の構造保存と 3 次元イメージングの力を組み合わせる。相関 LM / EM、集束イオンビームミリング (cryo FIB) または位相プレートイメージングなどの主要な方法開発について、構造生物学に対するこの還元的アプローチの潜在的な可能性を強調する用途と同様に議論された。

(ii) **Uptake Monitoring and Quantification of Nanomaterials at Single Cell Level by Means of Element- and Molecule Based Imaging and Dosimetric Techniques**

- 講演者: Irina Estrela-Lopis
- 所属機関: Institute of Medical Physics and Biophysics, University Leipzig, Germany
- 背景: 細胞および器官におけるナノ物質 (NM) の取り込み、局在および分布の程度および機構は、NM の新規製品の毒性およびリスク評価に関する主要な問題である。さらに、診断および治療目的のためのデバイスとしての NM の適用は、細胞とのそれらの相互作用のモニタリングを必要とする。したがって、ラベルフリーのイメージング技術が必要とされる。
- 実験方法: 原形質膜を横切る NM の転位は、インビトロでの癌培養細胞とエレメントおよび分子分析に基づくラベルフリーイメージング法 (図 3.2-33) を用いたインビボでばく露された

ラットの肺組織で研究された。プロトン誘導 X 線放射 (μ PIXE) およびラザフォード後方散乱 (μ RBS) の 2 つのイオンビーム技術を、細胞分析のためにライブチヒイオンナプローブ LIPSION で同時に使用した。インビトロでの NM 取り込みの結果を、インビボ予測と比較してインビトロデータの関連性を推定するためのツールを提供するインビボ研究と比較した。単細胞レベルでの NP 負荷による微量元素および微量元素の定量分析を行い、細胞性有害反応と関連させた。

さらに、共焦点ラマン顕微分光法 (CRM) を使用して、NM 亜細胞局在および細胞コンパートメントおよび生体分子との共局在を調べた。

- まとめ;ラベルフリーイメージング法はナノテクノロジー、ナノ薬剤、および診断において有力な手段である。
 - NM のサブミクロンオーダーでの生物学環境における 3D 可視化と共局在
 - 細胞内の薬剂量の定量化と NM ばく露に基づく新陳代謝に関連する要素
 - インビトロとインビボの妥当性:細胞内の効果的薬剂量の知識に基づくインビトロとインビボの毒性効果の比較
 - ハイコンテンツスクリーニング手法としての CRM
 - ✓ スペクトル組織学への展開
 - ✓ NM または病気によりもたらされる悪影響の診断および予測

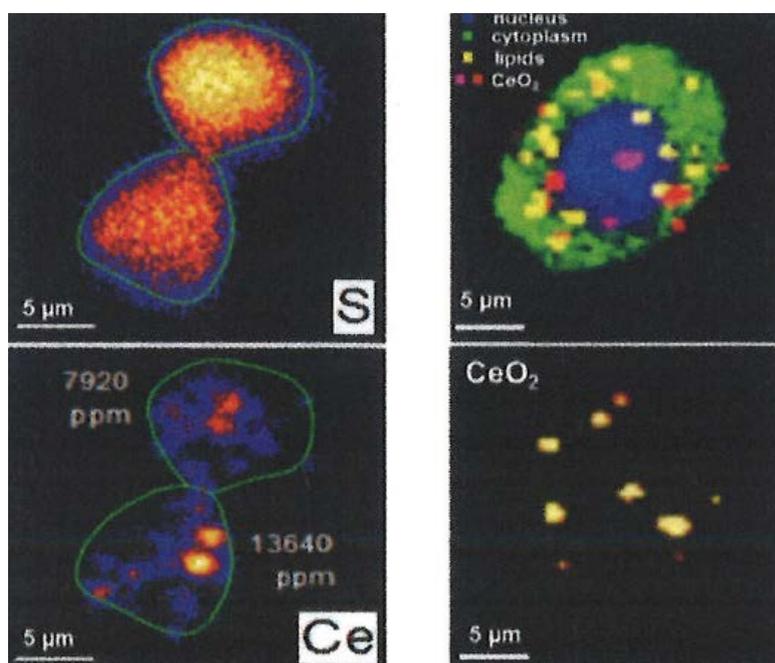


図 3.2-33 肺癌細胞における CeO_2 ナノ粒子の分布のラベルフリーイメージング
 μ PIXE : 左、CRM : 右

(iii) **Ultrasensitive Detection, Quantification and Identification of Engineered and Natural Nanoparticles Using Wide-Field Surface Plasmon Microscopy**

- 講演者: Vladimir Mirsky
- 所属機関: Institute of Biotechnology / Nanobiotechnology, Brandenburg University of Technology, Senftenberg, Germany

- 背景: 工業的なナノ粒子の製造量の増加は、潜在的に危険な物質との人間の接触の危険性を増加させる。このため、液体および気体媒体中のナノ粒子の定量化および同定のための高感度分析法の開発が求められている。この目的のために、単一ナノ粒子の吸着による表面プラズモン共鳴 (SPR) 画像の微小信号の検出および分析に基づく方法が開発された。
- 新たな分析技術;
 - 抽出不要のリアルタイム、その場測定
 - 高感度: 目視表面上の単一ナノ粒子
 - 高ダイナミックレンジ (1~1000000/flame)
 - ノイズに対する安定性 (複合培地での測定が可能)
 - 吸着したナノ粒子のトラッキング及びマッピング
 - ナノ粒子の特徴的なイメージ像
 - 電気化学溶解による物質の同定
 - ウィルス、エクソソーム、リポソーム、バクテリアに適用可能

(ウ) **Session 5: Neurotoxicity**

(i) **Air Pollution, Microglia, and the Lung-Brain Axis**

- 講演者: Michelle L. Block
- 所属機関: The Stark Neuroscience Research Institute, Indianapolis, Indiana, USA

- 背景: 都市の大気汚染ばく露は、最近、認識低下およびアルツハイマー病 (AD) を含むいくつかの中樞神経系 (CNS) 疾患および状態のリスクの増加と関連している。これらの影響を媒介するメカニズムはほとんど理解されていない。最近の知見は、脳の先天性免疫細胞であるミクログリアが吸入された汚染物質を検出し、それに応答することを示しており、肺損傷は循環因子 (Lung Brain Axis) を介して脳に伝達される可能性がある。ここでは、ディーゼル排気粒子に対するミクログリア応答における損傷関連分子パターン (DAMP) の役割を明らかにし、3x-TG マウス AD モデルにおける循環因子の影響を検討し、老化がこのプロセスにどのように影響するかを調べる。これらの知見は、大気汚染が小膠細胞を活性化させ、中樞神経系の健康に有害な影響を与えるメカニズムの根底にある洞察を提供する。
- まとめ①;

- ミクログリアの反応が共通点。炎症誘発は極めて一般的である
 - ミクログリアは DEP の神経炎症の原因の一つである。
 - 遺伝的背景が大気粒子 (DEP) との反応に影響がある。
- まとめ: 肺-脳軸 吸入粒子との反応において
 - 肺: 肺の免疫反応が神経炎症と関連がある可能性がある
 - 血液: 脳由来神経栄養因子が循環する
 - 脳: 血清因子が信号を送り、ミクログリアに検出され、プライミングをもたらす。
 - ナノ粒子安全に対する示唆;
 - 神経病理学は、必ずしも末梢毒性を模倣するとは限らない。
 - NP は CNS 効果を得るために脳に転位する必要はないかもしれない。
 - CNS 生物活性循環ファクトおよび神経炎症は、
 - A. 末梢と脳間のコミュニケーション。
 - B. 神経毒性プライミングの可能性
 を示唆しうる。
- (ii) **Investigation of Neurotoxic Effects of Manganese Nanoparticles in 3D Neural Microtissue**
- 講演者: Christoph van Thriel
 - 所属機関: Leibniz Research Centre for Working Environment and Human Factors (IfADo), Dortmund, Germany
 - 背景: 溶接ヒュームは、金属酸化物 (例えば、酸化マンガンまたは二酸化マンガンの) のナノ粒子 (NP) を含む様々な化合物の複雑な混合物である。特にマンガン (Mn) 含有粒子 (MnxOx) は、この必須元素によって引き起こされる神経毒性と関連していると考えられている。吸入により Mn にばく露された溶接者に見られるように、胃腸管 (GT) における恒常性調節を回避すると、神経行動障害が起こる可能性がある。気道にマンガン NP を沈着させた後、Mn は嗅覚系を介して脳に直接移行するか、または肺泡領域から血液蒸気に流入し、全 Mn 質量の約 14% が可溶性で生体利用可能である。これらの経路を経て、Mn は脳に入り、そこでは主に大脳基底核 (BG) ならびに前頭皮質領域に蓄積される。近年、Mn の PBPK モデルが開発され、BG の 0.55 ng / g Mn の濃度が神経行動障害のリスクの 10% 増加と関連しているとの分類的回帰モデリングと結びついている。これらの行動障害を引き起こす根底にある機構は完全には理解されていないが、様々な神経細胞型および神経伝達物質が関与しているようである。
 - 研究内容;
 - (a) PBPK モデルからのインビボ濃度および (b) ラット皮質調製物 (PND1-2; ニューロン、

星状細胞およびミクログリアからなる)由来の三次元神経組織(MT)を、*in vitro* モデル。平均 MT 量に基づいて、5.3ng の Mn / MT がヒト脳濃度と同等であると計算した。

- MTs を Mn²⁺ ナノ粒子(直径 50-80nm)および可溶性塩 MnCl₂ を 50~500μM の範囲の濃度(135μM はインビボ濃度に等しい)で培養し、24 時間および 48 時間後に、ミクログリアおよび星状細胞およびニューロンの微細構造(免疫細胞化学)の活性化である細胞毒性(ATP アッセイ)を測定した。予備的結果は、MnO₂ も MnCl₂ も選択された濃度で細胞傷害性ではないことを示した。最初の生物学的複製の分析は、MnCl₂ に 48 時間ばく露した後のミクログリアの活性化を示しているが、135μM の条件では MnO₂ は活性化していない。

(iii) Development of an *in vitro* Model of NanoNeurotoxicity Using Human 3D Neural Tissues

- 講演者: Luc Stoppini
- 所属機関: Hepia/HES-SO, Univ. of Appl. Sciences Western Switzerland, Geneva
- 背景: 神経行動/神経変性疾患の多くは環境に起因する可能性があることを考えると、NPに関連する神経炎症および神経変性に至る様々な機構の誘導を含むノ粒子(NP)の潜在的な神経毒性効果に関するさらなる研究が急務である。このニーズに答えるために、幹細胞由来のヒトインビトロモデルを使用して、脳実質に浸透し得る神経グリアネットワークに対する NP の効果を調べることにより、中枢神経系(CNS)における NP によって誘導される生物学的小および毒物学的効果を研究する。
- 材料および方法: 誘導性多能性幹細胞(MTI GlobalStem, ThermoFisher)由来の神経幹細胞は、組織学的研究によって確認されるように、異なるタイプのニューロンおよびグリア細胞を含む異種の神経組織を生成するために使用される。ニューロスフェア(NS)は、ニューロジェネゲーターの回転によって 24 ウェルプレートに凝集することによって生成される。NPs は、凝集プロセス中または NSs の形成後に添加される。Au-NP またはシリカ-FITC ナノ粒子を第 1 の一連の実験で試験した。蛍光顕微鏡および透過電子顕微鏡(TEM)を使用して、神経実質内の NP を視覚化した。ニューラルネットワークの活動の電気生理学的記録を行って、NP にばく露されたときの神経組織の機能性を評価した。
- 結果(図 3.2-24): 予期されたように、集成プロセス中のシリカ-FITC NP (200nm; 10μg/ml)の含有は、NSS 全体(A1 は 4 日後)に分布し、それらは組織の外層に位置したままである(4 日後の A2)。別の一連の実験では、NSS 形成中に AuNP (50nm)を加えた(D1 対照、D2 0.5ppm、D3 5ppm および TEM 挿入)。1 ヶ月培養後のこれらの培養物からの電気生理学的記録は、NP の封入物の用量に依存して、活性の明らかな減少を示す(スパイク: B1 対照、B2 0.5ppm、B3 5ppm)タイムスタンプ(C1 =対照、C2 = 0.5ppm、C3 = 5ppm)。

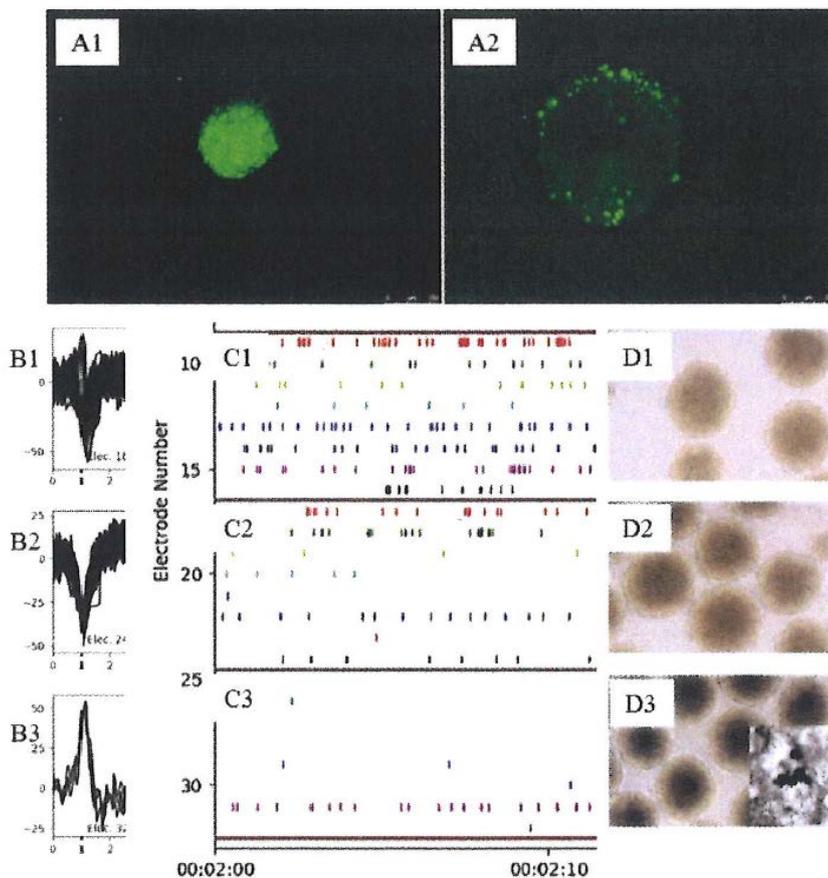


図 3.2-24 実験結果

(iv) **A Daily Exposure of Rabbit Dams to Diesel Exhaust Nanoparticles during Gestation Impairs the Brain and Olfactory Dopaminergic Pathways of Offspring**

- 講演者: Estefania Bernal-Meléndez
- 所属機関: URAFPA, INRA UC340, University of Lorraine, Vandoeuvre-les-Nancy, France
- 背景: 大気汚染、特にディーゼル排気 (DE) からの汚染は、全身または気道のいずれかを介して、ばく露されたヒト集団の神経系 (NS) に悪影響を与えることが知られている。しかし、NS 上の DE に対する妊娠ばく露の結果は、未だに調査されていないままである。したがって、開発中の NS に対する短期および長期の影響を研究するために、妊娠したウサギダム (ヒトの血液凝固胎盤モデル) をヒトの都市部におけるばく露条件を模擬する DE ナノ粒子に曝す実験モデルを開発した。
- 実験方法および結果;
 - 妊娠したメスは、浄化された空気または妊娠 3 日目 (GD3) から GD27, 2h / d, 5d / w ままで希釈された (1mg / m³) 濾過 DE にばく露された。GD28 では、嗅覚細胞 (OB) の嗅覚

ニューロンおよび糸球体層に、ナノサイズ粒子(20~48nm)の存在が細胞および軸索肥大とともに観察された。特にドーパミン作動系に影響を及ぼすバルバルモノアミン作動性ホメオスタシス擾乱が観察された。

- ドーパミン作動系に焦点を当てた DE ばく露の影響をさらに調べるために、GD28(8匹の対照; 8匹のばく露)および成人(8匹の対照; 10匹のばく露)ウサギの OB および脳を採取した。これらの2つの状態で、嗅覚系と脳の他の中心構造との間の解剖学のおよび機能的連続体を評価するために、免疫組織化学およびクロマトグラフィー分析を用いてモノアミン作動性経路を分析した。
- GD28 では、OB の組織学的分析は、ドーパミン作動性ニューロンの数を増加させることなく、ばく露された胎児における細胞あたりの TH 標識強度の増加を示した。成体段階では、ばく露された動物のうち 08 頭がドーパミンおよびその代謝産物(DOPAC および HVA)のレベルが高かった。同じウサギの脳内では、シトクロムオキシダーゼ活性、活発な代謝のマーカ、および TH 標識強度は、脳の報酬回路に関与する重要な領域である腹側被蓋領域(VTA)において増加し、両方のマーカは細かい運動制御の調節において役割を果たす黒質のドーパミン作動性塊状コンパートメントにおいて変化しないままであった。
- これらのすべての知見は、妊娠末期の露出した胎児の嗅球に見られるドーパミン作動系の不均衡が成人期に持続するようであり、より中心的な構造の変化に関連していることを示唆している。

(v) **Effects of Nanoparticles in the 5xFAD Mouse Model of Alzheimer's Disease**

- 講演者: Catrin Albrecht
- 所属機関: IUF – Leibniz Research Institute for Environmental Medicine, Düsseldorf, Germany
- 背景: 周囲の超微粒子への長期間のばく露が、アルツハイマー病(AD)のような加齢に関連する神経変性疾患の発症および進行に寄与し得るという懸念が高まっている。この仮説を扱うために、私たちは、作業記憶および運動機能ならびに海馬および皮質アミロイドプラーク負荷に対する効果の評価を伴うトランスジェニック SX 家族性アルツハイマー病モデル(SXFAD)マウスモデルを使用した。我々は以前に、ディーゼルエンジン排気(DEE)への吸入ばく露は、これらのマウスにおけるプラーク形成および運動機能障害の加速を引き起こすことを示した。DEE は、都市環境における超微粒子の主要な供給源であり、製造されたナノ粒子へのばく露もまた、AD 発病に寄与し得ることを示唆している。しかしながら、(吸入または経口ばく露による)CeO₂ および SiO₂ ナノ粒子による長期ばく露研究では、我々は 5XFAD マウスモデルにおいて AD 様特徴の有意な悪化を観察しなかった。観察された差異は、ナノサイズの粒子の物理化学的性質ならびにばく露の用量および経路を対照するこ

とによって説明することができる。さらに、DEE 吸入試験の結果は、この汚染物質混合物の微粒子成分対非微粒子成分の特定の寄与についてのさらなる調査を保証する。

- まとめと結論

- DEE 吸入は、5xFAD トランスジェニックマウスにおいて、A β プラークおよび運動機能障害の形成を促進する。
- (ZR ドープ) CeO₂ NP の吸入は、プラークの形成を促進せず、行動に悪影響を及ぼさない(5xFAD および WT 同腹仔)。
- CeO₂ および SiO₂ NP への長期経口ばく露は、5xFAD および WT マウスに有害作用を及ぼさない。1%CeO₂ への 13 週間の経口ばく露は、5xFAD マウスの脳における A β プラーク形成の減少をもたらす。
- 結果は、以前の研究と一致している。
 - (1) ヒト大気汚染および A β プラーク病理
 - (2) 交通ばく露(道路接近)および認知障害/認知症→DEE の(非微粒子の)構成成分の役割?
- これまでに設計された NP を用いた研究は、AD の 5xFAD モデルにおける有害作用を示していない。CeO₂ の有益な効果は、さらなる研究を保証する。

(工) Session 6: Nanomaterials: Effects and Mechanisms

(i) **The Effect of Gold Nanoparticles in Asthma Mouse Model**

- 講演者: Thai Dinh
- 所属機関: Universitätsklinikum des Saarlandes, Saarbrücken, Germany
- 要約: ナノ粒子は医学療法にもますます使用されるようになってきている。健常者および喘息患者におけるナノ粒子の効果は依然として調査中である。ここでは、BALB/c オボアルブミン(OVA)喘息マウスモデルにおけるナノ粒子の効果、取り込みおよび分布を調べる。ポリエチレングリコール被覆(PEG化)およびクエン酸塩/タンニン酸被覆(クエン酸塩化) 5nm 金ナノ粒子の分散液を、喘息および対照群に鼻腔内投与する。アレルギー性気道炎症および気道抵抗を測定する。非経口器官へのナノ粒子の取り込みは、誘導結合プラズマ質量分析法によって定量化される。喘息前提条件は、ナノ粒子の取り込みを増加させる。さらに、全身摂取は、クエン酸処理したナノ粒子と比較してPEG化金ナノ粒子の方が高い。ナノ粒子は、炎症性浸潤および気道過敏性、特にクエン酸処理された金ナノ粒子の両方を阻害する。アレルギー性喘息マウスにおけるクエン酸処理およびPEG化NP処理は、マクロファージ集団の強い上昇を有意に防止する。マクロファージをより正確に見ると、NPの両方の種類がM1およびM2マクロファージの分極にいかなる変化も生じないことがわかった。金ナノ粒子は、喘息マウスにおいて抗炎症効果を有し得る。喘息状態は、金ナノ粒子の全身摂取を増加させる。その結果、ナノ粒子を設計および試験する際に悪影響を考慮する必要がある

ある。

- まとめ;
 - 喘息の前提条件を有するマウス、特に心臓、腎臓および脾臓に対するナノ粒子取り込みの増加があった。
 - これは、潜在的なナノ粒子の毒性を評価する際に気道炎症の宿主因子を考慮する必要があることを示唆している。
 - 呼吸適用後、クエン酸処理されたナノ粒子よりも PEG 化金ナノ粒子の全身的取り込みがより大きくなり、喘息のコーティングよりも大きな影響が金ナノ粒子の取り込みに及んだ。
 - 本発明者らは、OVA 誘発気道炎症に対する金ナノ粒子 (特にクエン酸塩) の抗炎症効果を実証した。
 - 我々の結果は、金ナノ粒子ベースの喘息薬が治療可能性を有することを示唆している。
 - しかし、気道を通した金ナノ粒子の体系的摂取は喘息によって増加し、潜在的な副作用を避けるために考慮されなければならない。

(ii) **The Impact of CuO and TiO₂ Nanoparticles on Gene Expression Following Air-Liquid Interface Exposure**

- 講演者: Matthias Hufnagel
- 所属機関: Karlsruhe Institute of Technology, Germany

- 背景: 異なる産業におけるナノマテリアルの使用の増加は、ナノ毒性研究の重要性を強化する。今まで、空気中のナノ粒子 (NP) のほとんどのインビトロ毒性試験は、水中条件下で実施されている。しかし、このばく露方法は吸入毒性を調べるためのかなり人工的な試験システムである。より現実的なばく露シナリオを達成するために、空気 - 液体界面 (ALI) で細胞を培養することが有効である。ここで、細胞はトランスウェル系で培養され、基底側から細胞培養培地が供給され、頂端側の空気にばく露される。さらに、適切な ALI 露光システム、例えば、VITROCELL®Cloud は、水晶振動子微量天びんが装備されている場合、実際の粒子の堆積を定量化する。
- 実験方法および結果: この研究では、A549 細胞を ALI で培養し、VITROCELL®Cloud の CuO または TiO₂ NP にばく露した。続いて、コロニー形成アッセイを用いて細胞毒性効果を測定した。さらに、高スループット RT-qPCR による遺伝子発現プロファイリングが行われた。CuO NP は用量関連の細胞毒性効果を示したが、TiO₂ NP は細胞毒性を示さなかった。同じパターンが、遺伝子発現プロファイリングで観察され、TiO₂ NP による遺伝子発現との干渉を示さなかった。対照的に、CuO NP ばく露は、酸化ストレスマーカー、酸化還元感受性転写因子、DNA 修復に関与する遺伝子、アポトーシス因子および細胞周期調節遺伝子の発現を誘導した。
- 結論;

- CuO および TiO₂ NP を使用して、空中 NP の新しいばく露システムが確立された。
- 高レベルの ROS によって誘発されるいくつかの遺伝子の発現に CuO NP が影響した。
- しかし、機能レベルで転写結果を確認するためにはさらなる研究が必要である。

(iii) How the Protein Corona Evolves on a Nanoparticle

- 講演者: Giancarlo Franzese
- 所属機関: Física de la Matèria Condensada, Universitat de Barcelona, Spain
- 背景: 元来のナノ粒子 (NP) が生体液中に遭遇すると、生体分子は NP の周りに自発的に「プロテインコロナ」と呼ばれる吸着層を形成する。コロナ組成は、時間依存環境条件に依存し、生物内の NP の運命を決定する。コロナがどのように進化するかを理解することは、ナノ毒物学だけでなく医療応用においても基本的なことであるが、コロナ形成のプロセスは、関与する分子の数が多く、関連する時間スケールが 100 μ 秒 (実験では検出困難) から数時間 (全原子シミュレーションの到達時間) に及ぶため、課題が多い。
- 実験方法と結果: 以下の 2 つの研究のための実験、シミュレーション、および理論を組み合わせた。(i) コロナ動態及び(ii) 3 つの血液タンパク質で作られたモデルの血漿中のシリカの NP のためのその最終組成物 (ヒト血清アルブミン、トランスフェリン、およびフィブリノーゲン)。単一タンパク質溶液中で測定した実験的タンパク質-N 結合親和性によってコンピュータシミュレーションを校正すると、理論モデルは、独立した実験によって証明された競合タンパク質置換を正確に再現する。3 つのタンパク質の投与順序を変えると、私たちのモデルで説明できる最終コロナ組成の記憶効果が観察された。我々の実験的および計算的手法を組み合わせることは、平衡タンパク質結合定数の階層に基づいたタンパク質-NP コロナ組成の系統的予測および制御の開発への一歩である

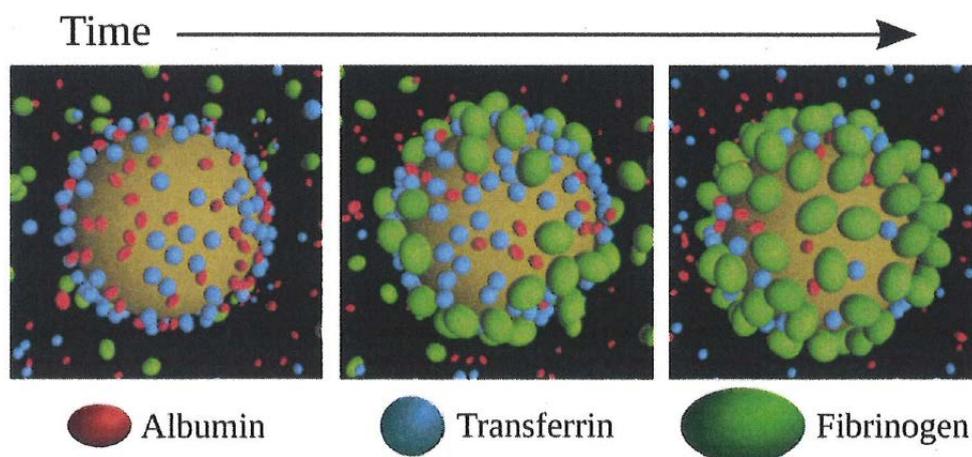


図 3.2-25 直径 100nm のシリカ NP 上に集まる競合タンパク質 (ヒト血清アルブミン、トランスフェリンおよびフィブリノーゲン) の動態。

3つの異なる時点でのシミュレーションスナップショット：1回目アルブミンを導入、2
番目トランスフェリン添加、3番目フィブリノゲン添加

(iv) **Low-Dose Carbon Black Nanoparticles Exposure of the Lung Does Not Aggravate Allergic Airway Inflammation in Mice**

- 講演者: Heinz Fehrenbach
- 所属機関: Priority Area Asthma & Allergy, Research Centre Borstel, Germany
- 背景: 喘息は気道過敏症 (AHR) および炎症によって定義される多因子性疾患である。それは、増加した粘液分泌、上皮傷害、平滑筋細胞の過形成、および過剰細胞外マトリックスの沈着に関連する。吸入されたナノ粒子による「炎症」上皮のさらなる刺激は、喘息反応を悪化させ、最悪の場合、喘息発作を誘発すると考えられている。
- 実験方法: カーボンブラックナノ粒子 (CBNP) がオボアルブミン誘発アレルギー性気道炎症をマウスにおいて悪化させるか否かを試験した。参照粒子として Printex®90 (P90) を使用し、表面に Benzo [a] pyren (P90-BaP) または 9-Nitroanthracen (P90-9NA) で P90 をコーティングした。さらに、表面に多環芳香族炭化水素 (AS-PAH) の混合物を示すアセチレン燃焼 (AS) からのすすを分析した。野生型マウスをオボアルブミン (OVA) に対して感作させ、3日間連続して OVA エアロゾルでチャレンジした。CBNP は、3回目のチャレンジ前および 24 時間後に口腔咽頭吸引 (70µl, 100ng /µl) によって適用した。気管内の繊毛駆動粒子輸送、細胞死および粘液放出、およびエキソスピボで解析し、気管上皮および遠位気道における PAH 代謝 (Cyp1a1, Cyp1b1)、遠位気道の酸化ストレス (Gr, Gpx3) とムチン Muc5ac のマーカーの mRNA 発現を分析した。さらに、BAL 液および AHR 中の免疫細胞および TH2-サイトカインレベルの量を分析した。
- 実験結果: すべての CBNP は、最近、懸濁液中で同様の流体力学的直径およびゼータ電位を示すことが示された。急性アレルギー性気道炎症マウスでは、CBNP ばく露が AHR、BAL サイトカインレベルまたは白血球の気道への浸潤に影響しないことを示した。気管内では、粒子輸送速度および壊死上皮細胞の数は、OVA 対照群で見出された結果と類似していた。P90 のみが、OVA コントロール群と比較して Muc5ac mRNA 発現の増加によって示された粘液放出の増加により、毛様体ビート周波数をおそらく低下させた。いずれの CBNP 種も気管上皮における Cyp1a1, Cyp1b1, Grand Gpx-3 の mRNA 発現に影響を及ぼさなかった。末梢気道では、Cyp1a1, Cyp1b1, Grand Gpx-3 の mRNA 発現は OVA 対照群と比較して P90-BAP および AS-PAH によってわずかに増加した。本結果は、低濃度の CBNP (表面修飾とは独立して) がアレルギー性気道炎症を悪化させないことを示す。P90 のみが毛様体ビート頻度を低下させ、ムチン mRNA を増加させ、おそらく粘液クリアランスを減少させた。

(v) **Understanding Nanosafety – The Importance of Assay Performance *in vitro***

- 講演者: Cordula Hirsch
- 所属機関: Empa, St. Gallen, Switzerland

- 背景: ナノテクノロジーは 21 世紀の実現可能な技術とみなされている。しかし、過去数十年の間に作られた多くの発明と比較して、最終的に少数のナノ可能な製品しか最終的に市場に進出していない。この理由の一つとして新しい材料の安全性評価の不確実性がある。ナノ材料がインビトロ研究で偽陽性または偽陰性結果を生成することによって科学者を欺いた多くの例が存在する。このような誤った結果を防止し、信頼できるインビトロ安全性評価を保証するためには、以下のパラメータが重要である。(1)材料特性、(2)異なる分析成分との干渉反応、(3)線量測定、(4)ベンチマーキングと一般的な分析性能。特に、新しいスマート(ナノ)材料の初期開発段階では、技術的に適切な多数の候補者の安全性が評価されなければならない。潜在的な有害生物学的影響は、最も有望な物質を選択するために「設計」する必要がある。技術的有効性の観点だけでなく、安全性の点でも重要である。したがって、迅速なインビトロツール/方法が必要とされる。一方、スピード以上に信頼性、堅牢性、再現性(代替 3R)の成果が求められる。このプレゼンテーションでは、先に詳述したナノ関連のインビトロ課題に厳密に取り組む進行中のスイスプロジェクト(NanoScreen.ch)の研究に焦点を当てる。
- まとめと結論;
 - 非常に単純なインビトロアッセイ(MTS)でさえ、潜在的な変動性の原因は多様であり、原因と結果の図で視覚化される。
 - 忍容性と信頼性の高い結果を得るには、一般的にアッセイの性能を制御し、ナノ粒子間界面を制御することが重要である。
 - 偽陽性/陰性の結果:線量測定の考慮事項と同様にインターフェースを念頭に置くこと。
 - 数学的モデルは、送達された線量の推定値を与えるが、実験的に検証されなければならない。
 - 好ましい用量 - 測定基準:送達された質量($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)。
 - 線量測定モデルに不可欠な材料特性(サイズ分布、(凝集体密度)、形状)は、線量メトリック($\#/ \text{cm}^2$ 、表面積/ cm^2)の再計算と結果の合理的な解釈。

(vi) **Exposure to Nanoparticles Specifically Extends Neutrophilic Life Span: A Toxicologically Relevant Endpoint for Nanoparticle Safety**

- 講演者: Tamara Hornstein
- 所属機関: IUF – Leibniz Research Institute for Environmental Medicine, Düsseldorf, Germany

- 背景、目的:吸入されたナノ粒子は、好中球性肺炎症を誘発すると記載されている。しかしながら、好中球自体との相互作用による進行中の炎症の間のこれらの粒子の効果は、よく理解されていない。好中球アポトーシスは、好中球誘導性炎症反応の主要調節因子であると考えられている。現在の研究では、好中球寿命に及ぼすナノ粒子の影響、およびインビボで肺炎症に対するこれらの影響の影響を調べることを目的とした。
- 実験方法:ボランティアからの血液好中球だけでなく、好中球アポトーシスおよびシグナル伝達事象を調べる COPD 患者からの機械的エクスピロ研究も実施した。さらに、肺炎症 (BAL) の炎症パラメータの強さと好中球アポトーシス率を相関させるために、フィッシャー 344 ラットにおけるナノ粒子の気管内適用によって肺炎症を誘発した。我々は以前に、ナノ粒子誘導シグナル伝達を妨害する化合物の新しいグループを記載したので、これらの物質 (適合溶質) が好中球における抗アポトーシスシグナル伝達に対して予防効果を有するかどうかを調べた。
- 結果:血中好中球をカーボンナノ粒子にばく露すると、自然発生のアポトーシス率が有意に低下した。この効果は、Akt の活性化、続いて Mcl-1 の活性化によって媒介された。さらなる機能的実験は、酸化ストレスの誘発および膜構造の変化が、これらのナノ粒子特異的有害転帰の原因であることを示している。興味深いことに、適合性溶質エクトインによるこれらのシグナル伝達事象の活性化の防止は、自然アポトーシス速度の非常に効果的な回復をもたらした。このアプローチの *in vivo* 関連性は、動物実験で実証されたエクトイン介入後の著しく減少した好中球の炎症により、肺およびヒトにおける好中球のアポトーシス率の回復と関連し、28 日間毎日エクトインを吸入した後の炎症性痰のパラメータが低下した。データは、ナノ粒子の前炎症効果のメカニズムとして、好中球顆粒球の自然アポトーシスの減少を同定する。さらに、適合する溶質はヒトに十分耐えられるので、COPD のような慢性好中性炎症の治療に治療的に使用することができる。
- 結論;
 - ナノ粒子 - 好中球相互作用は、エクスピロおよびインビボでのアポトーシスの減少を引き起こす。
 - このメカニズムは、ROS の生成および細胞膜の変化に依存する。
 - 好中球のアポトーシスに関連するナノ物質の毒性学的エンドポイントの仲介か？

4. 海外行政機関等の報告書の分析と主要なものの翻訳

4.1. 翻訳対象報告書の選定

海外行政機関・国際機関が発行する、ナノマテリアル等の安全対策等に関わる報告書の翻訳を行った。

翻訳対象となる2017年に発行されたナノマテリアル等の安全性に関する報告書は、数多く公表されている。特に、ECHAにより、ナノマテリアルに係る各種ガイダンス文書が公表されているほか、「nanoform」の用語の使い方に関するベストプラクティス、JRCによるNANoREGプロジェクトによる安全性評価の枠組みに関する文書、ECの消費者安全に関する科学委員会によるTiO₂製品に関する意見書、等が公表されている(表 4.1-1)。これらの翻訳候補報告書から、厚生労働省担当官と相談の上、カーボンナノチューブの安全性に関して報告している、IARCのモノグラフ文書(No.111)のカーボンナノチューブに関する報告部分を中心に翻訳を行うこととした。

表 4.1-1 2017年に公表されたナノマテリアルの安全性に係る海外行政機関等の主な報告書一覧

No.	報告書タイトル	海外行政機関・国際機関名	公開年月
1	Nanomaterial Stewardship Guidance Sponsored by the AIHA® Nanotechnology Working Group	AIHA Board	2017.3
2	Guidance on information requirements and chemical safety assessment Appendix R.6-1 for nanomaterials applicable to the Guidance on QSARs and Grouping of Chemicals (Version 1.0)	ECHA	2017.5
3	Guidance on information requirements and chemical safety assessment Appendix R7-1 for nanomaterials applicable to Chapter R7a Endpoint specific guidance (Version 2.0)	ECHA	2017.5
4	Guidance on information requirements and chemical safety assessment Appendix R7-1 for nanomaterials applicable to Chapter R7b Endpoint specific guidance (Version 2.0)	ECHA	2017.5
5	Guidance on information requirements and chemical safety assessment Appendix R7-2 for nanomaterials applicable to Chapter R7c Endpoint specific guidance (Version 2.0)	ECHA	2017.5
6	How to prepare registration dossiers that cover nanoforms: best practices (Version 1.0)	ECHA	2017.5
7	SOME NANOMATERIALS AND SOME FIBRES VOLUME 111 IARC MONOGRAPHS ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS	IARC	2017.5
8	JRC Scientific for Policy Report NANoREG framework for the safety assessment of nanomaterials	JRC	2017.4
9	OPINION ON Titanium Dioxide (nano form) as UV-Filter in sprays	Scientific Committee on Consumer	2017.3

		Safety (SCCS)	
10	OPINION ON Titanium Dioxide (nano form) coated with Cetyl Phosphate, Manganese Dioxide or Triethoxycaprylylsilane as UV-filter in dermally applied cosmetic	Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS)	2017.3
11	ALTERNATIVE TESTING STRATEGIES IN RISK ASSESSMENT OF MANUFACTURED NANOMATERIALS: CURRENT STATE OF KNOWLEDGE AND RESEARCH NEEDS TO ADVANCE THEIR USE Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 80	OECD	2017.1

4.2. 翻訳対照報告書の要約

表 4.1-1 の No.7 の報告書の概要をまとめた。また、全文の翻訳を別添資料として添付した。

(1) いくつかのナノマテリアルと繊維

- タイトル: SOME NANOMATERIALS AND SOME FIBRES
- 機関: がんの研究のための国際機関 (IARC)
- 報告年: 2017 年 5 月
- 要約:

この IARC モノグラフの 111 巻には、フルオロエデナイト線維性角閃石、炭化ケイ素(シリコンカーバイト)繊維とウイスキー、カーボンナノチューブ、のヒトに対する発がん性の危険性の評価が含まれる。これらの物質(作用因子)はいずれも、以前にワーキンググループにより評価されていない。この巻の所見の概要は、The Lancet Oncology (Grosse ら、2014) に掲載されている。

人が繊維又はカーボンナノチューブにこの経路でばく露される可能性が最も高いために、実験動物における繊維又はカーボンナノチューブを用いた発がん性の研究に係るばく露の関連経路は吸入である。繊維又はカーボンナノチューブへの吸入ばく露は、胚からの分布、沈着、クリアランス、及び胸膜への繊維の潜在的転位を伴う。しかし、この巻でレビューされた実験動物における発がん性の研究のほとんどにおいて、繊維又はカーボンナノチューブは、線維又はカーボンナノチューブの急速静注の腹腔内又は胸腔内注射によって、直接的に中皮に投与され、そのために、高用量となる。これらの非生理的なばく露経路は、比較的短い潜伏期を有する中皮腫を誘発することができ、歴史的に、繊維によって引き起こされた発がん性の評価のための敏感な手法として使用されている。この巻で評価された物質(作用因子)については、後者のタイプの研究のいくつかは、使用した実験動物数が不十分、研究期間が短い、又は同時制御の欠如、により不十分であると判断された。しかし、ワーキンググループは、十分な数の動物を含む十分な期間の研究にいくつか配慮を示したが、中皮腫がまれな自発性腫瘍であるために、同時制御についてはなかった。

カーボンナノチューブに関する膨大なメカニズム(作用機序)研究の評価により、試験したカーボンナノチューブの物理化学的特性の変動、評価された毒性学的エンドポイント、採用された実験手順、が明らかになった。さらに、多くのタイプのカーボンナノチューブでは、慢性毒性に関連するエンドポイントのデータが欠けていた。結果として、ワーキンググループは、特定のタイプのカーボンナノチューブ(Kuempel ら、2017 も参照)の発がん性に関して、全体的なメカニズム(作用機序)のデータが情報価値がないとみなした。