

第 2 回検討会における指摘事項に基づく修正内容

ナノ材料の有害性情報について

1. ナノ材料の有害性の特徴に関する一般的な知見

ナノ材料の有害性については、「サイズが小さいこと、表面積が大きいこと、及び酸素反応の活性化の能力の複合作用が、意図的に製造されたナノ物質による肺損傷の重要な要素になっている (U. S. EPA(2007))」とした報告にあるように、ナノ材料の持つ特性のためにその有害性が他の化学物質とは異なることが指摘されている。

以下に、ナノ材料の有害性に関する特徴に関連した情報を、ヒト健康影響及び生態系影響に区別して集約した。

削除: および

(1) ナノ材料のヒト健康影響に関する特徴について

1) サイズ及び表面積の関係について

ナノ材料はサイズが小さく、また、サイズを小さくすることによって重量あたりの表面積が大きいことにより、特定の機能を発揮する。これらの特徴によって、他の物質とは異なる有害性を有することが懸念されている。

一般的な指摘事項は以下のとおりである。

- 超微粒子 (100nm 未満) は、同じ成分のより大きな粒子よりも、重量ベースで見れば毒性が強いことが一般に知られている。
- 吸入ばく露の場合、重量よりも表面積が毒性あるいは病理学的な反応に対する良い指標になるとされている。
- ナノスケールの二酸化チタンの毒性は、粒子のサイズや表面積には関連がなく、特異な結晶構造及び活性酸素種の形成能力が重要であるとした報告がある。
(以上、U. S. EPA(2007))

コメント [y1]: 元の英文: Other studies have shown that particle surface area dose is a better predictor of the toxic and pathologic responses to inhaled particles than is particle mass dose

削除: 経気道投与した

- 類似の性質を持つナノ粒子では、同じ投与量でも粒子径の低下、即ち表面積の増大によって毒性が大きくなることが示されている。しかし、用量-作用関係は粒子の種類及び化学特性によって異なる。
- ラットの試験からは、同じ重量でも同じ化学組成のより大きな粒子より不溶性のナノ粒子が肺の炎症や組織の損傷及び肺炎の誘発といった影響が大きく、難溶性で毒性の低い粒子では、用量-作用関係は粒子の表面積で表された粒子サイズと一定の関係があった。
- 吸入毒性が小さいと思われる粒子 (例えば二酸化チタン) でも、粒子の表面の用量に応じて、肺の炎症、組織の損傷、繊維化を示す。
- ヒトにおける研究では、大きな粒子に比べて、吸入されたナノ粒子は呼吸器に沈着

コメント [y2]: 元の英文: These authors reported that specific crystal structure and the ability to generate reactive oxygen species are important factors to consider in evaluating nanomaterial toxicity.

削除: 酸化活性の

削除: 物質

する率が高い。

(以上、U. S. NIOSH(2006))

- 用量反応関係の決定については、ナノ粒子ばく露量の用量メトリクス（重量、表面積等）の表現に細心の注意を払うべきである。重量濃度は、これらの物質に関するばく露量の最適な記述であるようには見えない。個数濃度及び表面積は、用量反応関係のより適正な記述である可能性がある。
- 必ずしもすべてのナノ粒子形態が同じ物質のバルク形態より顕著な毒性を誘発させるとは明確になっていない。

(以上、EC. SCENIHR¹ (2007))

- 可溶性で生分解性の物質についてはこれまでの重量ベースのリスク評価方法が適用できる。一方、不溶性で生物分解のないものについては、粒子の個数や表面積といった異なる目安を用いる必要性が考えられる。
- ナノ材料はサイズの大きなものよりも大きな酸化作用を持っている。したがって、ナノ材料は標的器官において健康影響を与える可能性がある。

(以上、EC. SCCP² (2007))

2) 表面活性等

ナノ材料表面の荷電状況等の表面特性がナノ材料の有害性に関係しているという指摘もなされている。

- ナノ粒子の毒性は非常に複雑で多種類の要素が関与しており、サイズや形状、荷電状況といった表面特性等の種々の物理化学的特性に左右されていることが幾つかの報告で示されている。
- ナノスケールの二酸化チタンの毒性は、粒子のサイズや表面積には関連がなく、特異な結晶構造及び活性酸素種の能力が重要であるとした報告がある。(再掲)

削除: 酸化活性の

(以上、U. S. EPA(2007))

- 動物実験によれば、ナノ物質は単位重量あたりの表面積の増大のため、同じ化学組成のより大きな粒子よりも生物学的活性が大きい (U. S. NIOSH(2006))
- ナノ粒子の荷電は、皮膚透過性の決定因子であり、樹状細胞やリンパ節を経て血流に到達することが報告されている。

¹ Scientific Committee on Emerging and Newly-Identified Health Risks (新規及び新たに特定された健康リスクに関する科学委員会)

² Scientific Committee on Consumer Products (消費者製品科学委員会)

- ナノ粒子の材料自体が毒性の低いものであっても、その毒性及び酸化ストレスや炎症を引き起こす能力は、ナノ粒子の表面積及び反応性に由来する可能性があることが示唆されている
(以上、EC. SCENIHR (2007))

3) 形状等

ナノ材料の有害性に対しては形状（特に繊維状か否か）も関与すると指摘されている。

- カーボンナノチューブ類の肺への影響に関する試験では、意図的に製造されたナノ物質はそれぞれ特異な毒性を示し、粒子の大きさのみでは説明できなかった。また、ナノスケールの二酸化チタンの毒性は粒子の大きさや表面積に関連がなく、特異な結晶構造及び活性酸素種の形成能力が重要であるとした報告がある。(U. S. EPA (2007))
- 多層カーボンナノチューブ（以下、MWCNT）といった繊維状のナノ材料については、ラットの腹腔内注射により中皮腫の発現が確認されている。(Takagi et. al. (2008))
- 単層カーボンナノチューブ（以下、SWCNT）のマウスへのばく露により、一時的な肺の炎症、酸化ストレス、肺機能の低下、細菌の排除機能の低下、及び初期の間質の線維化が生じた。凝集物の沈着によって肉芽腫の形成が認められたが、より分散したナノチューブの沈着では間質の急速な線維化が認められ（7日以内）、ばく露後60日間以上も進行した。(U. S. NIOSH (2006))

削除: 酸化活性の

削除: おり、さらにその発現には繊維の長さが関与する（一定の長さのものが短いものよりも中皮腫の発現性が高い）といった報告がある

削除: Polland et. al. (2008)、

4) 皮膚の透過性

ナノ材料のばく露経路の一つとして想定される経皮ばく露に関連し、ナノ材料の皮膚の透過性を示す報告がある。

- 皮膚に塗布したサブミクロン粒子が人の皮膚の角質層を透過することが認められ、そのことからナノ粒子の皮膚接触によって人の免疫系も影響を受けるという経路の可能性が示唆された。
- 表皮の硬くなった細胞に生じた割れ目を通してのナノ粒子の吸収が考えられるとした報告がある。隙間に侵入したナノ粒子はより深部に進み、ついには皮膚の下に到達し、血流によって吸収されるおそれもある。
(以上、U. S. EPA (2007))
- ある種のナノ粒子はまた皮膚を通して体内に入り込むことが知られている。
(U. S. NIOSH (2006))
- ナノ材料の皮膚の透過については現状では明確な考察結果はないが、その可能性はある（ここでは、量子ドット(CdSe)、デキストラン、フラーレンの皮膚透過の報告例を示している)。(EC. SCCP (2007))

コメント [y3]:

元の英文: Submicron particles have been shown to penetrate the stratum corneum of human skin following dermal application, suggesting a potential route by which the immune system may be affected by dermal exposure to nanoparticles

削除: 認められた

なお、消化管からのナノ材料の侵入については、下記のような記載がある。

- 経口暴露に関する情報はない。食品、添加物、薬品、土壌ダスト、吸入した粒子の摂食といったものが考えられるが、質量ベースでは少ないと思われる。

削除: を考慮すると

(U. S. EPA (2007))

- 摂食はナノ粒子が体内に入り込む別の経路で、非意図的にナノ粒子を含む物質の取り扱い中に生じると想定することは科学的に合理的である。
- 気管支に吸入されたナノ粒子は粘膜の活動で排除されることから、摂食は吸入と同時に生じる。
- 摂食されたナノ粒子の悪影響についてはほとんど知られていない。

(以上、U. S. NIOSH (2006))

- 消化管のパイエル板細胞及びリンパ小胞、消化管上皮から、ナノ粒子が取り込まれる可能性がある。
- 消化管から血液へ摂取された粒子の移動は、ラット及び人間において示唆されている。これらの報告によれば摂取された二酸化チタン粒子 (150-500 の範囲 nm) が、血液へ移動し肝臓及び脾臓で濃縮されることが示されている

(以上、EC. SCENIHR (2007))

5) 体内での分布、移動

ナノ材料の体内での分布及び移動についても以下のような点が注目されている。

- 粒子の健康影響に関する衝撃的な発見の一つは、最初の沈着部位ばかりでなく、より広い範囲で毒性反応を生じさせることである。ポリスチレンのナノ粒子の肺の沈着は、肺の炎症だけでなく血管の血栓を引き起こした。カーボンブラックのナノ粒子の肺の沈着は、ラットの心拍数の変動性を低下させ、若く健康な個体の心筋の細分極を長引かせることが最近の研究で認められている。肺に沈着したカーボンブラックのナノ粒子の肺の外部への転移が報告されている。
- ナノ粒子の模擬ワックスを用いた薬物送達に関する試験では、ナノ粒子の荷電が血液脳関門の完全性及び透過性を変化させることが認められている。

(以上、U. S. EPA (2007))

- ヒト及び動物実験によれば、大気中に浮遊したナノ粒子は吸入され、気管支に沈着する。そして動物実験によれば、ナノ粒子は血流によって他の器官に移行する。
- 鼻部に沈着したナノ粒子 (中央粒径は 35-37nm) は嗅覚神経に沿った輸送で脳に入り込むことが、近年のラットによる実験で観察されている。

(以上、U. S. NIOSH (2006))

- 浮遊粒子の主要な侵入経路は呼吸気管である。非溶解性粒子が沈着する気道内の部位は、粒子の空力学的挙動及びそれらの粒径に依存し、マクロファージ及び粘膜繊毛系による排出によって消化管へ排出される可能性がある。
 - しかし、特定の粒子は肺の間質へ侵入しリンパ節へ移動する可能性がある。
 - ナノ粒子の上気道から脳への移動が確認されている。また、同位体で標識されたナノ粒子を用いたラットにおける研究では、ナノ粒子が高い効率で鼻に沈着した後、嗅覚細胞へ移動し脳の嗅球へ侵入することが示唆されている。
- (以上、EC. SCENIHR (2007))

- ナノ粒子の呼吸器を介した取込みについては、下図のような経路が推定されている。即ち、10-100nm の粒子は肺胞に沈着しやすく (1nm と非常に小さい粒子は鼻部への沈着が多い)、その後は繊毛活動で喉頭へ送られ排出されるか、マクロファージにより排除されるが、血管内に移行するものもあると推定されている。

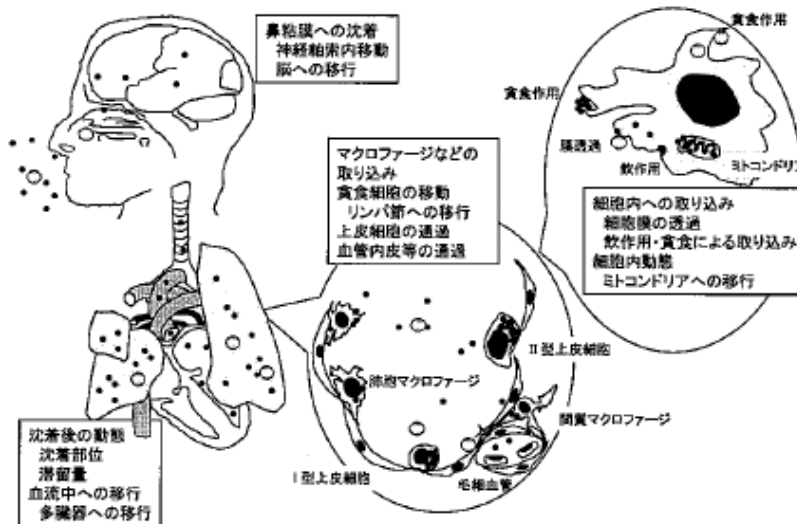


図1 粒子の物理・化学的性状と体内動態に係わる課題 呼吸器を解した取り込みの場合 (小林(2007)から引用)

6) ナノ材料の毒性の発現機序

ナノ材料の毒性の発現機序としては、酸化ストレス及び細胞の障害(炎症)を引き起こすという指摘がなされている。

- 培養された人の上皮の角質細胞に対する SWCNT のばく露により、酸化ストレス及び

細胞活性の消失を含む皮膚に対する毒性がもたらされる。(U. S. EPA (2007))

- 呼吸器系に関する毒性学的研究により、肺においてナノ粒子は酸化ストレス及び炎症を引き起こし、呼吸器へ影響を及ぼす可能性が示されている。
 - ナノ粒子に関する in vitro 試験からは、活性酸素種及び酸化ストレスの生成を引き起こす可能性が示されている。ただし、結果として生じる疾患については未知である。
- (以上、EC. SCENIHR (2007))

- 下図は、皮膚ばく露を想定した体内での懸念される影響の模式図であるが、個々の組織において、沈着⇒酸化ストレスといった影響が懸念されている。(厚生労働省 (2008))

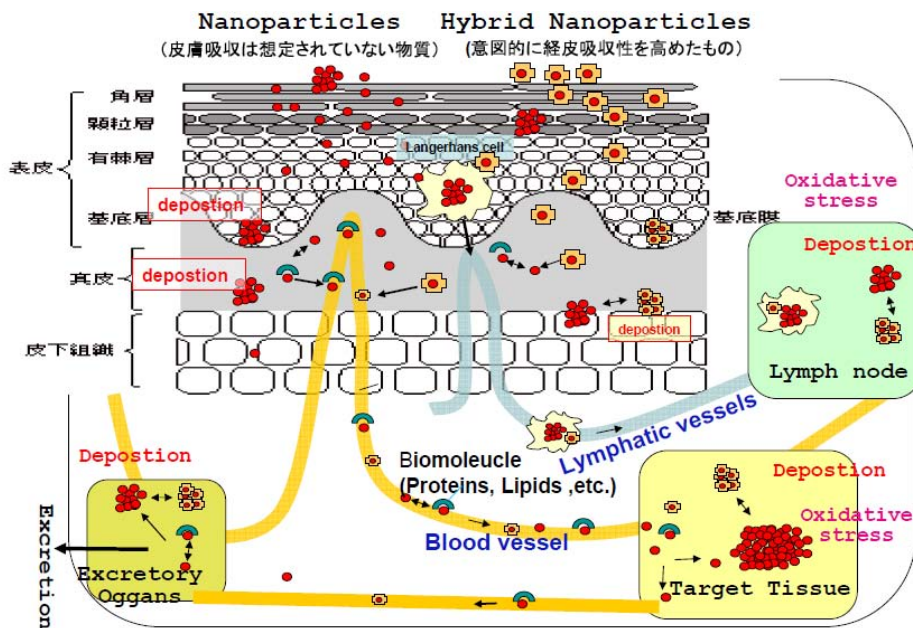


図2 懸念されるナノマテリアルの皮膚吸収—分布—蓄積

(図2の出典)

厚生労働省 第3回ヒトに対する有害性が明らかでない化学物質に対する労働者ばく露の予防的対策に関する検討会、第3回ナノマテリアルの安全対策に関する検討会(第3回合同会合)資料「ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法の開発のための有害性評価及び体内動態評価に関する基盤研究」から引用

一方、繊維状のナノ材料については、中皮腫等の発がん性を示す報告がある。

- MWCNT といった繊維状のナノ材料については、ラットの腹腔内注射により中皮腫の出現が確認されている。(Takagi et. al. (2008))

コメント [y4]:

元の英文: Exposure of human epidermal keratinocyte cells in culture to single-walled carbon nanotubes was reported to cause dermal toxicity, including oxidative stress and loss of cell viability

削除: 生細胞

削除: おり、さらにその発現には繊維の長さが関与する(一定の長さのものが短いものよりも中皮腫の発現性が高い)といった報告がある

削除: Polland et. al. (2008)、

- SWCNTs のマウスへのばく露により、一時的な肺の炎症、酸化ストレス、肺機能の低下、細菌の排除機能の低下、及び初期の間質の線維化が生じた。凝集物の沈着によって肉芽腫の形成が認められたが、より分散したナノチューブの沈着では間質の急速な線維化が認められ（7日以内）、ばく露後 60 日間以上も進行した。（U. S. NIOSH (2006)）
- なお、ナノ材料の発がん性に関連し、第 1 回検討会資料 4 に示した各物質に関する IARC による評価を表 1 に示す。ただし、IARC の評価は当該物質に対するものであり、サイズに着目したものではないことに留意する必要がある。

表 1 各物質の発がん性に関する情報（IARC による評価結果（※））

種類	発がん性の評価	種類	発がん性の評価
カーボンブラック	2 (B)	鉄	—
ポリスチレン	3	酸化亜鉛	—
アクリル	3	モンモリロナイト	—
フラーレン	—	酸化セリウム	—
多層カーボン ナノチューブ	—	ニッケル	2 (B)
単層カーボン ナノチューブ	—	酸化イットリウム	—
銀	—	酸化アルミニウム	—
二酸化チタン	2 (B)	二酸化ケイ素	1 (結晶質シリカ) 3 (非晶質シリカ)

※ 1：ヒトに対する発癌性が認められる、2 (B)：ヒトに対する発がん性が疑われる、
3：ヒトに対する発がん性が分類できない、—：記載なし
(なお、 dendrimer、顔料微粒子は化学組成が同定されないことから、この表からは削除した)

(2) ナノ材料の生態系への影響に関する特徴について

次に、生態系への影響に関する記述を以下に抽出した。

1) 生態系全般について

- 人の健康に関する知見から哺乳類についてはある程度想像ができて、他の生物では状況が異なることから（例えば、水生生物の鰓呼吸、鳥類の気嚢及び一定方向の空気の流れ）、想像されないような経路が存在するかもしれない。（U. S. EPA (2007)）
- いくつかの種は、抗酸化機能が乏しく、活性酸素の生成を促進するナノ粒子に対して特別に脆弱である可能性がある。
- いったん生物がばく露すると、短期あるいは長期の毒性影響が生じる可能性がある。

長期の毒性影響には、生態系内のバランスの擾乱を引き起こす生物濃縮を含む。特に、非分解性のナノ粒子の残留性あるいは濃縮性の評価は、慢性試験において重要である。

- 環境中のナノ粒子の挙動及び分布を決定することに加えて、多くの種に対する毒性を評価することは不可欠でありこれらに関する報告がある
(以上、EC. SCENIHR (2007))

2) 水生生物への影響について

水生生物に対する影響については、近年のレビュー資料 (Handy et. al (2008a)、Handy et. al (2008b)) では下記のように取りまとめられている。

- コロイド粒子の水中での挙動から推測して、イオン強度の大きな水中では凝集しやすくなる。
- したがって、海水中では淡水中よりも凝集が起こり易い。pHも同様に影響する。ただし、有機物がナノ粒子の表面を覆っていると凝集は起こりにくくなる。
- 水生生物については、その表面に存在する粘液層（物質交換の主体となる鰓においても粘液層が存在する）が、ナノ材料に対する保護膜になると推測する報告がある。
- 粘液層内では、粒子はイオンに比べれば粘液層にトラップされ易いうえ、粘液層内のプラスイオンと作用して凝集し易くなり、膜を通過することは難しくなる（次頁図参照）。
- したがって、水生生物については、取り込みによる毒性だけでなく、鰓や体表の表面付着による影響も考慮する必要がある。
- ナノ材料は凝集後には沈降し易くなることから、海底の表面に生息する生物は影響を受け易いと考えられる。
- また、海洋表面においては、粘性がナノ粒子に影響することでトラップされ易いとされており、海洋表面に存在する生物、卵、動物プランクトンの初期ステージ等の生物は特に影響を受け易いと考えられる。

また、水生生物に関するナノ材料の取り込みや体内挙動については、下記の報告がある。

- 蛍光ポリスチレンのシースルーメダカにおける体内分布に関する試験では、卵に接触させた場合は、卵膜、油球、卵黄、胆のうに付着・蓄積した。また、孵化し魚では鰓、消化管に分布し、さらに脳、精巣、肝臓、血液中にも観察された (Kashiwada (2006))。
- 11.6nm の銀ナノ粒子をゼブラフィッシュの卵にばく露させ、暗視野顕微鏡で観察した結果では、卵膜の孔を通じて胚に侵入することが確認された。(Lee et. al. (2007))

なお、US. EPA (2007) は天然のナノ粒子との関連について、下記のように述べている。

- (カーボンブラック及び粘土の粒子を用いた試験から) 天然のナノ粒子は水生生物にとって毒性は小さく、閾値は 10-1000ppm の範囲とされた。この結論はナノ粒子にもあてはまるものと推測される予備試験結果がある。
- しかし、天然由来のナノ粒子と工業的に製造されたナノ粒子との相違には留意が必要である。ある種のナノ粒子は特異なメカニズムで器官を損傷する可能性が示唆される。

(以上、U. S. EPA (2007))

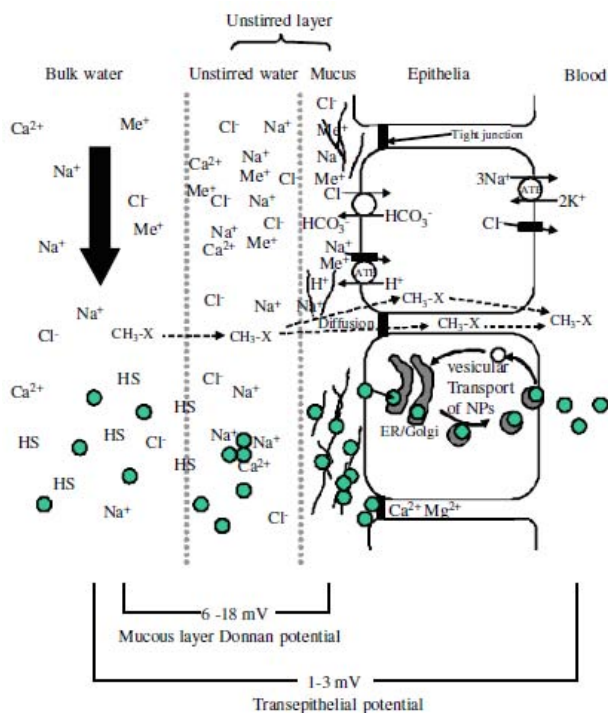


図3 水生生物の鰓表面、粘液層等でのナノ材料の移送の模式図

((Handy et. al. (2008b)から引用)

3) その他の生態系への影響について

その他の生態系への影響については、下記のような情報がある。

- 抗菌性物質として開発されてきた金属酸化物及び銀のナノ粒子の、環境中の生物化学的循環を含む(抗菌剤の)非標的生物に関するナノ粒子の影響は重要である。
- アルミニウムのナノ粒子は、植物の根の成長を阻害することが認められている。

(以上、EC. SCENIHR (2007))

2. ナノ材料の有害性に関する毒性試験結果等の情報

ナノ材料の有害性に関する毒性試験結果等の情報を集約した。なお、別添では細胞系を用いた in vitro 試験は省略している。

以下にナノ材料ごとの有害性情報の概要を整理した。

(1) フラーレン (C60) 及びその関連物質 (別添 1~3/9)

◆ ヒト健康影響に関連した情報

- フラーレンを遺伝子変異マウス (P53+/-) の腹腔に 3mg/匹の量を腹腔内投与 (単回) した結果、152 日後でも腫瘍の発生及び途中死亡は認められなかった (同様に実施した MWCNT では 25 週後の観察で中皮腫の形成が確認された)。(Takagi et. al. (2008))。
- また、マウスの肺にフルーレンを滴下した試験では、0.2~3.0mg/kg の投与のいずれにおいてもばく露後 1 日で炎症及び細胞の損傷が確認されたが、その他の所見では顕著な影響は確認されなかった。(Sayes et. al. (2007))

削除: 0

◆ 生態系影響に関連した情報

- ミジンコの急性遊泳阻害試験では、EC50 は 7.9mg/L 以上とされた (下表参照)。
- フラーレンのFatheadminnowに対する影響では、LC50 は 0.5ppm以上とされたが (Obedorster et. al (2006))、別の試験では 0.5ppmで脳及び鰓の過酸化脂質濃度の上昇及び肝臓中のCYP2 関連酵素³の有意な増加が確認された。(Zhu et. al. (2006))
- 水溶性のフルーレン (フレロール) のゼブラフィッシュ受精卵の LC50 は 96 時間後でも 50mg/L 以上であった (直径: 分散後約 100nm)。(Zhu et. al. (2007))

なお、フルーレンについては、その分散方法に有機溶媒 (THF) を用いた場合、水で分散した場合よりも毒性が高くなることが知られていることから (Oberdorster et. al. (2006) 等) (下表参照)、ここでは分散方法の相違も含めて結果を整理した。

表 2 フラーレンの分散方法の相違によるミジンコ急性遊泳阻害試験結果の比較 (単位: mg/L)

物質	大きさ等	分散方法	EC50	NOEC	出典
フルーレン (C60)	93 nm	THF を用	0.46	0.18	Lovern & Klaper (2006)
	10-200 nm	いた分散	0.8		Zhu et. al. (2006)
	20-100 nm	水への 直接分散	7.9	0.2	Lovern & Klaper (2006)
	10-200 nm		35 以上		Zhu et. al. (2006)
	10-200 nm		35 以上		Overdorster et. al. (2006)

³ 水酸化酵素であるシトクロム P450 の一種。シトクロム P450 は肝臓において解毒を行うほか、脂肪酸の代謝や植物の二次代謝などの多くの働きを持つ。その増加は化学物質に対する解毒作用の増加反応の増加の指標となる。

(2) ポリスチレン (別添 3/9)

◆ 生態系影響に関連した情報

- 蛍光ポリスチレン (直径 39.4nm) のシースルーメダカにおける体内分布に関する試験では、卵に接触させた場合は、卵膜、油球、卵黄、胆のうに付着・蓄積した。また、孵化し魚では鰓、消化管に分布し、さらに脳、精巣、肝臓、血液にも観察された (Kashiwada(2006))。
- 蛍光ポリスチレン (39.4nm) のシースルーメダカに対する毒性 (1mg/L の濃度) は塩分依存的に大きくなることが認められた (Kashiwada(2006))。

(3) MWCNT 及び SWCNT (別添 4~5/9)

◆ ヒト健康影響に関連した情報

- マウス及びラットを用いた MWCNT 及び SWCNT の試験では、気管内注入、肺滴下、口咽頭部吸入、によるばく露は炎症を生じさせたとする複数の試験結果がある。(Sato et.al.(2005)、Miller et.al.(2005)、Lo et.al.(2007)、Nmmar et.al.(2007))
- MWCNT 及び SWCNT のマウスの気管内注入で2ヵ月後(MWCNT)及び3ヵ月後(SWCNT)に肺に肉芽腫が形成された (Miller et.al.(2005)、Lam et.al.(2004))。
- MWCNT をマウスの腹腔内注射した試験では (単回)、クロシドライトでの発症率 (14/18) を上回る中皮腫の形成が確認された (14/16)。(Takagi et.al.(2008))

◆ 生態系影響に関連した情報

- ¹⁴C でラベルした MWCNT (直径 30-70nm、最大 0.37mg/g 乾泥) 及び SWCNT (直径 1-2nm 最大 0.03mg/g 乾泥) を含む底泥で 28 日間飼育したオヨギゴカイでは、ばく露後 3 日後には 80% が排泄され、濃縮率は MWCNT : 0.40±0.1、SWCNT : 0.28±0.03 であった。また、その間の死亡は確認されなかった (陽性対照としたピレンでは濃縮率は 3.6 であった)。(Petersen et.al.(2008))。
- 微小なコペポダを使用した 28-35 日間の飼育試験では、最大 10mg/L の SWCNT は死亡及び生長に影響は与えなかった。(Templeton et.al.(2006))
- SWCNT 懸濁液中 (直径 1.1nm、0.1~0.5mg/L) でニジマスの未成魚を飼育した試験では (最大 10 日間)、鰓の水腫、粘液の増加、鰓蓋活動の増加が確認された。また、Na⁺K⁺ATPase 及びグルタチオンの増加が鰓及び消化管で確認されたが、脳及び肝臓では確認されなかった (直径 : 分散前は 1.1nm (メーカー値) ⇒ 分散後 5nm 未満)。(Smith et.al.(2007))
- 表面を脂質でコーティングして分散性を増大させた SWCNT (直径 1.2nm) によるミジンコの 96hrEC50 は、餌を与えた場合は 10-20mg/L であった。一方、餌を与えなかった場合は約 2.5mg/L で約 60% の死亡が確認されたが、それ以下の濃度で死亡率が増加した。(Roberts et.al.(2007))
- 表面を酸化して分散性を高めた SWCNT (直径 2-10nm) は繊毛虫の凝集、運動の

削除: ○ 長さ (及び太さ) が異なる MWCNT をマウスの腹腔内に注射した試験では、長い (太い) MWCNT とアモサイトで巨大異型細胞及び病変部面積の増加が確認された。(Poland et.al.(2008))

消失、死亡を招くが、 $6.8 \mu\text{g/mL}$ では一時的な運動の消失のみが生じ、 $11.9 \mu\text{g/mL}$ では全ての個体の死亡が確認された。(Ghafari et.al. (2008))

(4) 二酸化チタン (別添 6~7/9)

◆ ヒト健康影響に関連した情報

- 二酸化チタン (直径 136-150nm) の復帰突然変異試験 (OECD テストガイドライン 471) 及び染色体異常試験 (同 473) では両者とも陰性であった。(Warheit et.al. (2007))
- 二酸化チタン (直径 136-150nm) を用いた、急性毒性 (局所リンパ節検定) : OECD ガイドライン 429、皮膚刺激性 : 同 404、目刺激性 : 同 405、急性経口毒性 : 同 425 では、急性毒性 (局所リンパ節検定) : 低い (EC3 が算出できなかった)、皮膚刺激性 : 少ない、眼刺激性 : 発赤、急性毒性 (経口) : 低い (5000mg/kg 以上) といった結果が得られている。(Warheit et.al. (2007))
- 29nm と 250nm の二酸化チタンをマウスに鼻腔投与 (1 回/日 × 3 日) した試験では小さい粒子でアジュバンド効果が確認された。(de Haar et.al. (2006))
- マウスの気管内注入 (19-21nm, 0.1mg/匹) により肺気腫、マクロファージ湿潤、肺胞隔壁破壊、上皮細胞アポトーシス等の影響が確認された。(Chen et.al. (2006))
- 3nm の二酸化チタンの肺注入試験では、急性毒性は 0.4mg/kg では出現せず、4mg/kg でわずかに毒性が認められた。(Li et.al. (2007))
- 5nm の二酸化チタンの全身ばく露試験 (4 時間/日、10 日間) では、8.88mg/m³ のばく露で、ばく露後 1-2 週間で肺胞マクロファージ数の増加が確認され、3 週間で回復した。(Grassian et.al. (2007))
- 25nm 及び 80nm の二酸化チタンの経口ばく露試験 (単回) では、5g/kg のばく露で腎臓影響 (BUN)、血清 LDH、αHBDH (心筋障害)、肝臓の病理 (中心性静脈部の肝細胞ネクローシス) が確認されたが、心臓、肺、睾丸 (卵巣)、及び脾臓組織には病理学的異常はなかった。(Wang et.al. (2007))

◆ 生態系影響に関連した情報

- 藻類の成長阻害試験 (OECD テストガイドライン 201 等) では EC50 は 44mg/L (直径 25nm) 及び 50mg/L 以上 (直径 100nm) であった (Hunde-Rinke & Simon (2006))。また、直径 136-150nm のものでは中程度の影響があるとされた。(Warheit et.al. (2007))
- ミジンコの急性遊泳阻害試験 (OECD テストガイドライン 202、U.S. EPA プロトコル) では、影響は小さいとした報告がある。(直径 136-150nm、Warheit et.al. (2007))、500ppm 以上 (直径 100-500nm、Lovern & Klaper (2006))
- 直径 25nm 及び 100nm の二酸化チタンを用いたミジンコの急性遊泳阻害試験 (OECD テストガイドライン 202 等) では (作用濃度最大 50mg/L)、照明をした場

合に影響が大きくなったとした報告がある。(Hunde-Rinke & Simon(2006))

- ミジンコの遊泳活動の観察事例では、最大濃度 2.0ppm(直径 10-20nm)で Hopping、拍動数、付属肢の活動、尾爪等で影響は認められなかった。(Lovern et. al. (2007))
- ニジマスを用いた魚類急性毒性試験 (OECD テストガイドライン 203) (直径 136-150nm) では影響は小さいとされた。(Warheit et. al. (2007))。
- ニジマス未成魚に 0.1-1.0mg/L の二酸化チタン (直径 21nm) 懸濁液中で飼育したところ (14 日間)、粘液の放出、鰓の水腫・肥厚が見られ、1.0mg/L では試験後半に位置の喪失 (縦に泳ぐ) ものが観察されたが、それ以外の異常は見られず、血液性状等でも大きな変化はなかった (粒子直径: 21nm⇒24.1±2.8nm、一部 160nm サイズの凝集物も認められた)。(Federici et. al. (2007))

(二酸化チタンに関する水生生物を用いた有害性試験結果を表 3 にまとめた。)

(5) 銀ナノ粒子 (別添 8/9)

◆ ヒト健康影響に関連した情報

- 最大 61 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ を噴霧してラットにばく露させた試験では (28 日間反復、6 時間/日、5 日/週)、肺組織中の銀濃度はばく露量に依存したが、体重や血液性状に優位な影響は確認されなかった。(Ji et. al. (2007))

◆ 生態系影響に関連した情報

- 銀ナノ粒子 (でんぷんあるいは BSE⁴ でコーティングしたもの、直径 5-20nm) をゼブラフィッシュの胚にばく露させた試験では (濃度 5-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、濃度の増加につれて茶色に着色し、粘膜で覆われるようになった。また、LC50 は 25-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の間にあった。(Asharani et. al. (2008))
- 11.6nm の銀ナノ粒子 (試験の最終時の直径は 5-46nm) をゼブラフィッシュの卵にばく露させ、暗視野顕微鏡で観察した結果では、卵膜の孔を通じて胚に侵入することが確認された。(Lee et. al. (2007))

⁴ bovine serum albumin

表3 二酸化チタンに関する水生生物への影響試験結果

粒子の大きさ (nm)	分散方法	試験の内容	試験結果	出典
136.0-149.4	・水分散 ・PBS分散	遺伝子毒性試験(復帰突然変異試験)(OECDテストガイドライン471)	陰性	Warheit et. al. (2007)
136.0-149.4	・水分散 ・PBS分散	遺伝子毒性試験(染色体異常試験)(OECDテストガイドライン473)	陰性	Warheit et. al. (2007)
136.0-149.4	・水分散 ・PBS分散	藻類成長阻害試験(OECDテストガイドライン201) EC50	中程度の影響	Warheit et. al. (2007)
25nm (主にアナターゼ)	水分散	藻類成長阻害試験(ISO8692、OECD201、DIN38412-33) EC50	50%影響濃度は44mg/L	Hund-Rinke & Simon(2006)
100 (100%アナターゼ)	水分散	藻類成長阻害試験(ISO8692、OECD201、DIN38412-33) EC50	50mg/L以上	Hund-Rinke & Simon(2006)
136.0-149.4	・水分散 ・PBS分散	ミジンコ急性遊泳阻害試験(OECDテストガイドライン202) EC50	影響は小さい	Warheit et. al. (2007)
100-500	水分散 (超音波)	ミジンコ急性遊泳阻害試験(USEPAプロトコル(EPA(1994))) EC50	500ppm以上	Lovern & Klaper(2006)
25nm (主にアナターゼ)	水分散	ミジンコ急性遊泳阻害試験(OECD202他) 48hrEC50	最大作用濃度50ppm 短時間の強い照明(250W、30分)では、照明なしの場合よりも影響が大きくなった	Hund-Rinke & Simon(2006)
100 (100%アナターゼ)	水分散	ミジンコ急性遊泳阻害試験(OECD202他) 48hrEC50	同上	Hund-Rinke & Simon(2006)
10-20nm	THF分散	行動観察:hopping、心臓拍動数、付属肢、尾爪等	Hopping: -、拍動数: -、付属肢の活動: -、尾爪: -、回復状況: -	Lovern et. al. (2007)
136.0-149.4	・水分散 ・PBS分散	魚類急性毒性試験(OECDテストガイドライン203) LC50	影響は小さい	Warheit et. al. (2007)
平均直径: 21nm、比表面積 50±15m ² /g ↓ (分散後) 24.1nm(一部 160nmサイズの 凝集物)	水分散 (超音波)	<ul style="list-style-type: none"> 血液性状 組織中金属等の濃度 行動観察 	<ul style="list-style-type: none"> 鰓の膜の水腫及び肥厚。 ヘマトクリット等の血液性状や組織のNa+K+濃度、金属濃度(Na, K, Ca, Mn)は変化はないが、CuとZnは特に脳で濃度依存的に増加した。 Na⁺K⁺ATPase活性は、鰓及び消化管では顕著に減少し、脳では減少したが、肝臓では変化は無かった。 鰓のグルタチオン濃度は有意に増加したが、脳及び消化管では変化は無かった。 試験後半に粘液を放出するものが多かった。 1.0mg/Lの試験区では試験の後半で位置を喪失した(水中で縦になる)以外は異常行動はなかった。 	Federici et. al. (2007)

(6) その他の金属及び金属酸化物 (別添 8/9)

◆ ヒト健康影響に関連した情報

- 酸化マンガン (MnO 、 Mn_2O_4 、 Mn_2O_3 、 MnO_2 の混合物、直径 30nm) をラットに鼻腔注入 ($5-7 \mu g/匹$ 、6 時間/日、5 日/週、12 日間) した試験では、11 日目でも肺の炎症はみられなかったが、ばく露 12 日後に嗅球、肺、線条体、前頭皮質、小脳で Mn 量が増加していた。(Elder et. al. (2006))
- 酸化亜鉛 (直径 50-70nm) をラットの気管内に点滴した試験では (1.5mg/kg)、TNF- α はほとんど活性していないが、IL-6 が産生した。(Sayes et. al. (2007))
- 銅ナノ粒子 (平均直径 23.5nm) を用いた急性毒性試験 (OECD テストガイドライン 425) では、LD50 は 413mg/kg であった。また、腎臓及び脾臓の形態学的変化、血清 BUN、Cr、TBR、ALP に対する影響が認められた。(Chen et. al. (2006))

(7) 量子ドット (別添 9/9)

◆ ヒト健康影響に関連した情報

- ラットに対する CdTe の量子ドットのばく露試験 (静脈注射、 $2 \mu mol/kg$) では、投与後 2 時間で自発運動の低下が確認されたが、24 時間後には増加し、その他の事項では影響は認められなかった。(Zhang et. al. (2007))
- CdSe の量子ドット (37nm) をヘアレスマウスに皮膚注射した試験では、皮膚への沈着以外に、流入領域リンパ節や肝臓、その他の臓器に分布することが確認された。(Gopee et. al. (2007))

◆ 生態系影響に関連した情報

- 淡水産の二枚貝を用いた CdTe の量子ドット (直径 100nm 未満は全体の 15%) のばく露試験では (1.6-8mg/L)、CdTe 濃度の増加により、免疫機能 (細胞殺傷能) の増加 (K562 細胞による試験)、脂質過酸化酵素活性 (鰓) の上昇、DNA の損傷 (鰓) 等の結果が確認され、免疫系及び鰓・消化管に対して酸化ストレスを与えるとした報告がある。(Gangne et. al. (2008))

(8) シリカ (別添 9/9)

◆ ヒト健康影響に関連した情報

- シリカ (10nm) を用いたラットに対するばく露試験では、20mg の気管内滴下で、ばく露後 1, 2 か月で細胞小結節 Stage I で、ナノ粒子のほうが線維の形成が軽度とした報告があり (Chen et. al. (2004))、同様に 12, 50, 300-2000nm のシリカ粒子をラットに気管内滴下した試験では、肺毒性は粒子の大きさよりも界面の活性状況に影響されるとした報告がある。(Warheit et. al. (2007))

ナノ材料に関する有害性試験方法について

本稿では、ナノ材料の有害性に関する試験方法について、OECD 等での議論の状況や現状での実施状況等を俯瞰し、今後の課題と考えられる点をまとめた。

1. 諸外国等における有害性試験方法に関する議論

(1) OECD における検討状況等

現在、OECD 化学物質委員会の下に設置された工業用ナノ材料作業部会 (WPMN: Working Party on Manufactured Nanomaterials) 及びその下に設置されたステアリンググループにおいて、ナノ材料の厳格な安全性評価の開発を促進するため、工業ナノ材料のヒト健康及び環境の安全性に係る側面における国際協力が OECD をベースに進められている。活動の枠組みは次のとおりである。

- ・ 2006 年から 2008 年までの作業計画 (Programme of Work) を以下の 3 作業分野から構成
 - 1) 同定、特性、定義、専門用語及び基準
 - 2) 試験方法とリスク評価
 - 3) 情報共有、協力及び普及
- ・ これらの作業を実行するため、以下の作業グループ (SG: Steering Group) を設置されている。
 - SG1 安全性研究に関するデータベース構築
 - SG2 工業ナノ材料の研究戦略
 - SG3 代表的ナノマテリアルの安全性試験
 - SG4 工業ナノ材料とテストガイドライン
 - SG5 ボランタリースキームと規制制度に関する協力
 - SG6 リスク評価に関する協力
 - SG7 ナノ毒性学における代替試験の役割
 - SG8 ばく露測定と低減に関する協力

①優先検討物質

SG3 では、優先検討物質や当面の目標とするデータセット等が定められ、現在はスポンサーシッププログラムにおいて、優先検討物質に関する試験研究が進められている。

SG3 で定められた当面の目標とするデータセットは表 1 に示すとおりである。

表1 SG3 で設定された当面の目標とするデータセット

○ナノ物質の情報/分類 (構造式/分子構造等 9 項目、省略)
○物理化学特性及び物質の特性 (水溶解性、ゼータ荷電 (表面荷電) 等 17 項目、省略)
○環境中挙動
<ul style="list-style-type: none"> ・ 水中での分散能 ・ 生物分解性 (易分解性等) ・ 非生物分解性及び挙動 (吸着、加水分解性等) ・ 生物濃縮の可能性 ・ その他の適切な情報 (使用可能なら)
○環境毒性
<ul style="list-style-type: none"> ・ 遊泳生物に対する影響 (短期/長期) ・ 底生生物に対する影響 (短期/長期) ・ 土壌生物に対する影響 (短期/長期) ・ 陸生生物に対する影響 ・ 微生物に対する影響 ・ その他の有用な情報 (使用可能なら)
○哺乳類に対する毒性
<ul style="list-style-type: none"> ・ 薬物動態 (ADME) ・ 急性毒性 ・ 反復投与毒性 <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-left: 20px;"> <p>(もし可能ならば)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 慢性毒性 ・ 成長毒性 ・ 人のばく露に関する実験 </div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-left: 20px;"> <ul style="list-style-type: none"> ・ 生殖毒性 ・ 遺伝毒性 (遺伝子障害) ・ その他の有用なデータ </div>
○物質の安全性 (引火性等 3 項目、省略)

②SG4

SG4 では、下記の 5 つのセクションに分かれ、既に公表されている試験ガイドライン等をレビューし、ナノ材料の試験方法としての適否が検討されている。

- セクション 1 : 物理化学特性
- セクション 2 : 生態に対する影響
- セクション 3 : 分解及び蓄積
- セクション 4 : 健康影響
- セクション 5 : その他の試験ガイドライン

③まとめ

試験方法の詳細について検討された SG4 の結論を集約すると、健康影響に関する試験では現状のガイドラインがおおむね適用可能であり、生態毒性試験も基本的な枠組みは適用できるとされている。

ただし、下記のような点で課題が残されている。

- ・ 媒体中 (特に水中) での分散性
- ・ ナノ材料の物理化学特性に適した指標 (表面積、ゼータ電位等)
- ・ 計測方法

一方、分解試験及び濃縮試験は現状の試験方法の適用は困難とされている。

特に濃縮試験は、元来の試験が水からの直接吸収を想定したものであり、0.5nm以上の粒子では適用できないとされている。

(2) U. S. EPA

U. S. EPA では、TSCA（有害物質規制法）に基づく化学物質の審査について、試験方法を SOP（Standard Operating Procedure）として取りまとめており、現在、FIFRA（連邦殺虫剤・殺菌剤・殺鼠剤法）にも適合するテストガイドラインとして集約している。

現時点までに、種々の試験方法が 10 種類に分類されて整理されており、その中でヒト健康及び生態影響に関係のある項目は下記の 3 種類である。

◇ 835 - Fate, Transport and Transformation Test Guidelines

（挙動、輸送、変換に関する試験指針）：

生物及び非生物による分解性試験を含む、約 20 種類の試験の指針

◇ 850 - Ecological Effects Test Guidelines（生態影響に関する試験指針）：

下記の 7 種類の対象生物群に対する合計約 50 種類の試験の指針

- ・水生生物（急性毒性、慢性毒性、濃縮試験等を含む約 22 種類）
- ・陸生生物（微生物や急性経口毒性試験を含む 6 種類）
- ・益虫等（ミツバチ等 3 種類）
- ・目的外の陸生植物（13 種類）
- ・微生物（2 種類）
- ・化学物質に特化した試験（ミミズを用いた試験を含む 2 種類）
- ・野外試験報告（1 種類）

◇ 870 - Health Effects Test Guidelines（ヒト健康影響に関する試験指針）：

下記の 7 種類の試験について合計約 50 種類の試験の指針

- ・急性毒性試験（経口、経皮、経気道、眼等のばく露経路を含む 7 種類）
- ・亜急性毒性試験（28 日間反復投与、90 日間反復投与、90 日間皮膚ばく露、90 日間吸入ばく露等の試験を含む 10 種類）
- ・慢性毒性試験（3 種類）
- ・遺伝毒性（復帰突然変異試験等を含む 18 種類）
- ・神経毒性（6 種類）
- ・特殊試験（皮膚透過性試験等を含む 4 種類）
- ・特殊な化学物質の試験（繊維状粒子の慢性毒性及び発がん性試験 1 種類）

なお、ナノ材料についての今後の研究の方向性に関する最新のEPAの報告（Draft Nanomaterial Research Strategy January 24, 2008）では、「ナノ材料の試験方法に関する検討はOECDで進められている」と記述されており、試験方法の検討はOECDとの協働作業で進められている。

2. ナノ材料の有害性に関する試験事例

平成20年3月末までに諸外国関連機関におけるレビュー及び学術誌に報告されているナノ材料の有害性試験において採用されている試験方法を整理した。

(1) 遺伝毒性、皮膚刺激性等、急性経口毒性

ナノ材料に関する遺伝毒性、皮膚刺激性等、急性経口毒性に関しては、表2に示すようにOECDのテストガイドラインに準拠した事例があるが、二酸化チタン他の2例のみである。表中のガイドライン404, 405, 425, 429, 471, 473はいずれもSG4-4での検討でナノ材料に有効とされているものである。

準拠したガイドラインが特に存在しない試験結果は下記の4例で、量子ドットについては皮膚投与及び静脈注射後の臓器での分布を計測したものである。

表2 ナノ材料の遺伝毒性等に関する試験方法の状況

<テストガイドラインに準拠したもの>

種類	毒性の種類	準拠した試験方法	出典
二酸化チタン	遺伝毒性	OECD テストガイドライン 471	Warheit et. al. (2007)
	遺伝毒性	OECD テストガイドライン 473	
	皮膚刺激性	OECD ガイドライン 404	
	目刺激性	OECD ガイドライン 405	
	皮膚感査性 (局所リンパ節検定)	OECD ガイドライン 429	
	急性経口毒性	OECD ガイドライン 425	
銅(ナノ)	急性経口毒性	OECD テストガイドライン 425	Chen et. Al. (2006)

<その他>

種類	試験生物	ばく露方法	試験方法等	出典
ポリスチレン	ラット(Wistar、雄、220~240g)	肝臓(還流)	肝臓での取り込み量	Nagayama et. al. (2007)
MWCNT	ラット(Wistar、雄、6週齢)	皮膚(埋込み)	4週間皮下埋め込み。炎症反応を判定	Sato et. al. (2005)
二酸化チタン	マウス(CD-1、雌雄40匹ずつ、19±2g)	経口(単回)	2週間観察、解剖後各臓器の異常	Wang et. al. (2007)
量子ドット(CdSe)	ヘアレスマウス(Crl: SKH-1(hr/hr)、雌、9週齢)	皮膚(単回)	皮内投与4、8、12、24時間後解剖し、各臓器のCd、Se分析	Gopee et. al. (2007)
量子ドット(CdTe)	ラット(SD、雄、1ヶ月齢)	静脈注射(単回)	ばく露後0、0.5、1、2、4時間後に、臓器別のCdの測定、24時間後解剖	Zhang et. al. (2007)

(2) 経気道ばく露試験

げっ歯類を用いた経気道ばく露に関連した試験例は数多いが、テストガイドラインに完全に準拠したものはなかった。各報告の試験方法を表3に示した。なお、

試験に供された生物は全てラットあるいはマウスであった。

表3 ナノ材料の経気道ばく露試験における試験実施方法

対象物質	ばく露方法	ばく露の回数、 期間	試験事項	出典
SWCNT	吸引 (咽頭)	単回	DNA ダメージ検査	Li et. al. (2007)
SWCNT	吸引 (咽頭)	単回	炎症反応、間質性繊維性病変の有無	Mangum et. al. (2006)
SWCNT	吸引 (咽頭)	単回	BAL 検査	Shvedova et. al. (2005)
SWCNT、 石英	注入 (気管)	単回	ばく露後 7 日、90 日に解剖 (間質性肉芽腫等)	Lam et. Al. (2004)
MWCNT	注入 (気管)	単回	ばく露後 1 時間後、28 日、60 日に検査 (炎症反応)	Miller et. al (2005)
MWCNT	注入 (気管)	単回	ばく露 24 時間後解剖 (肺の炎症、全身性炎症)、BAL 試験	Nemmar et. al. (2007)
二酸化チタン	注入 (気管)	単回	肺組織の解析 (肺気腫、マクロファージ浸潤、肺胞隔壁破壊、タイプ II 肺胞細胞の肥厚化、上皮細胞アポトーシス)	Chen et. al. (2006)
二酸化チタン	注入 (気管)	単回	肺組織の解析	Cha et. al. (2007)
酸化亜鉛	注入 (気管)	単回	BAL 検査	Sayes et. al. (2007)
シリカ	注入 (気管)	単回	BAL 検査	Warheit et. al. (2007)
シリカ	注入 (気管)	単回	ばく露 1, 2 月後に解剖、線維形成等観察	Chen et. al. (2004)
MWCNT, N-dopedMWCNT	注入 (鼻腔、気管) (+腹腔投与)	単回	投与後 24、48、72 時間、7 日後に解剖	Garrero-Sanchez et. al. (2006)
二酸化チタン	注入 (鼻腔)	0 日目、1 日目、2 日目の 3 回	8 日目に解剖し気管支の炎症を観察、21 日、28 日後の血清中の抗リンゴ酸測定、最後の鼻腔投与後 24 時間後に BAL 検査	de Haar et. al. (2006)
MnO	注入 (鼻腔)	6 時間/日、5 日/週、12 日間	11 日目にシアン及びプロテインアッセイを実施、12 日目に全身組織中の Mn 測定	Elder et. al. (2006)
フラーレン C60, C60(OH)24	注入 (気管)	単回	1 日、1 週間、1 ヶ月、3 ヶ月肺組織観察 (炎症と細胞傷害)、BAL 試験	Sayes et. al. (2007)
MWCNT	注入 (気管)	単回	8、16、24 日後病理検査実施。	Li et. al. (2007)
SWCNT	注入 (気管)	8 時間/日	1, 3, 7, 28, 60 日目に解剖 (炎症反応)、BAL 検査	Warheit et. al. (2004)
二酸化チタン	注入 (気管)	単回	ばく露後 3 日目に BAL 試験	Li et. al. (2007)
MWCNT	吸入ばく露 (全身)	5、10、15 日間 (6 時間/日)	5 日間⇒8 日目、10 日間⇒16 日目、15 日間⇒24 日目に解剖し、病理検査実施	Li et. al. (2007)
二酸化チタン	吸入ばく露	急性: 4 時間×1	LDH、BAL 検査	Grassian

削除: 経路
書式変更: 中央揃え
削除: (滴下)
書式変更: 中央揃え
削除: (吸入)
書式変更: 中央揃え
削除: (⇒肺)
書式変更: 中央揃え
削除: (注入)
書式変更: 中央揃え
削除: (気管 (注入))
書式変更: 中央揃え
削除: (気管 (滴下))
書式変更: 中央揃え
削除: (気管内投与)
書式変更: 中央揃え
削除: (気管 (注入))
書式変更: 中央揃え
削除: (気管 (滴下))
書式変更: 中央揃え
削除: (気管 (滴下))
書式変更: 中央揃え
削除: ()
削除: ()
削除: ()
削除: (鼻腔 (投与))
書式変更: 中央揃え
書式変更: 中央揃え
削除: (鼻腔 (注入))
削除: (肺 (滴下))
書式変更: 中央揃え
削除: (肺 (滴下))
書式変更: 中央揃え
削除: (肺 (滴下))
書式変更: 中央揃え
削除: (肺 (注入))
削除: (全身 (チャンバー内))
書式変更: 中央揃え

ン	(全身)	回、亜急性:4時間/日×10日		et. al. (2007)	書式変更: 中央揃え 削除: 全身(チャンバー内)
ナノ銀	吸入ばく露(全身)	28日間、6時間/日、5日/週	28日ばく露後の肺組織中の銀の量 体重、血液生化学指標	Ji et. al. (2007)	削除: 全身(チャンバー内) 書式変更: 中央揃え

現状で実施されている経気道ばく露関連の試験方法は以下のように整理される。

- ばく露方法は、単回の注入とした事例がもっとも多い。注入部位は気管が最も多く、その他にも咽頭、鼻腔、肺と様々である。
- 吸入ばく露試験の事例は少ないが、その多くはチャンバーを用いた全身ばく露試験で、その場合は反復ばく露試験が実施されている。
- 試験項目としては、BAL 検査以外では剖検・病理検査の事例が多く、検査項目は炎症反応及び肉芽腫等の検査の事例が多い。

- 削除: 経路
- 削除: 気管内への注入
- 削除: いが、
- 削除: ばく露の回数は単回が最も多く、反復ばく露を実施している試験では鼻腔及び全身ばく露試験が実施されている。

(3) 生態毒性試験

生態毒性試験では、表4に示すように、藻類生長阻害試験、ミジンコ急性遊泳阻害試験、及び魚類急性毒性試験が実施されており、ほとんどの試験が OECD テストガイドライン等の公定法に準拠しており、試験方法としては確立されている。

ただし、OECD テストガイドライン 201, 202, 203 は、WPMN SG4-2 での検討では計測方法や水中での分散方法に問題があるとされており、今後の適用のためにはこの点の解決が必要である(後述)。

- ・藻類生長阻害試験 : ISO8692、OECD201、DIN38412-33、ISO 8692 の改法
- ・ミジンコ急性遊泳阻害試験 : US EPA プロトコル(1994)、ISO6341、OECD202、DIN38412-30
- ・魚類急性毒性試験 : OECD 203

(4) 急性毒性試験以外の水生生物に対する試験事例

表5に急性毒性試験以外の水生生物試験の試験事例を示す。

微生物の呼吸量、微生物の膜の挙動、原生動物の健康度、ゴカイの長期毒性及び濃縮試験、ミジンコの活動性、二枚貝の免疫機能、魚類の卵の死亡、魚類の mRNA の損傷度、魚類の過酸化脂質濃度、魚類の行動といった様々な事例があるが、いずれも一定の試験方法に準拠したものではない。

表4 ナノ材料に関する生態毒性試験の実施事例

試験生物	試験項目	試験方法（標準方法等）	対象物質	出典
藻類	藻類生長阻害試験	OECD テストガイドライン 201	二酸化チタン	Warheit et. al. (2007)
藻類	藻類生長阻害試験	OECD テストガイドライン 201、ISO8692、DIN38412-33	二酸化チタン	Hund-Rinke & Simon (2006)
藻類	藻類生長阻害試験	ISO 8692 の改法	フラーレン (C60)	Baun et. al. (2008)
ミジンコ	ミジンコ急性遊泳阻害試験	US EPA プロトコル (EPA(1994))	フラーレン (C60)	Zhu et. al. (2006)
ミジンコ	ミジンコ急性遊泳阻害試験	OECD テストガイドライン 202、ISO6341、DIN38412-30	二酸化チタン	Hund-Rinke & Simon (2006)
ミジンコ	ミジンコ急性遊泳阻害試験	試験溶液 (M7) - OECD 試験方法 - ISO6341	フラーレン (C60)	Baun et. al. (2008)
ミジンコ	ミジンコ急性遊泳阻害試験	US EPA プロトコル (EPA(1994))	フラーレン (C60)	Oberdorster et. al. (2006)
ミジンコ	ミジンコ急性遊泳阻害試験	US EPA プロトコル (EPA(1994))	フラーレン (C60)、二酸化チタン	Lovern & Klaper (2006)
ミジンコ	ミジンコ急性遊泳阻害試験	US EPA プロトコル (EPA(1993))	SWCNT (脂質でコート)	Roberts et. al. (2007)
ミジンコ	ミジンコ急性遊泳阻害試験	OECD テストガイドライン 202	二酸化チタン	Warheit et. al. (2007)
微小コペポダ	急性死亡	ASTM E-2317-04	SWCNT (表面酸化)	Templeton et. al. (2006)
Copepods (海底匍匐性)	急性死亡	96hrLC50	フラーレン (C60)	Oberdorster et. al. (2006)
ヨコエビ	急性死亡	US EPA プロトコル (EPA(1994))	フラーレン (C60)	Oberdorster et. al. (2006)
ニジマス	96LC50	OECD テストガイドライン 203	二酸化チタン	Warheit et. al. (2007)
シースルーメダカ	急性死亡	26°C、16L/8D、毎日換水、ERM 溶液、蛍光粒子を3日間接触、その後ナノ粒子のない溶液で飼育し孵化	蛍光ポリスチレン	Kashiwada (2006)
ゼブラフィッシュの受精卵	死亡率、孵化率、心臓の拍動数	24, 48, 72hrLC50 及び 24, 48, 72hrEC50	フラーレン (C60)	Zhu et. al. (2007)
ゼブラフィッシュの胚	孵化率、孵化後72時間の拍動数	24, 48, 72hrLC50 及び 24, 48, 72hrEC50	銀ナノ粒子	Asharani et. al. (2008)

表5 ナノ材料に関する生態毒性以外の水生生物試験の実施事例

試験生物	試験事項及び試験方法	対象物質	出典
グラム陰性菌	CO2 発生量、増殖試験(培地の濁時測定)	フラーレン (C60) C60 (OH) 22-24	Fortner et. al. (2005)
グラム陽性菌	CO2 発生量、増殖試験(培地の濁時測定)	フラーレン (C60) C60 (OH) 22-24	Fortner et. al. (2005)
微生物	呼吸量、細菌群集量、細菌群集の組成、細菌の機能(酵素活性)	フラーレン (C60)	Tong et. al. (2007)
グラム陰性菌 グラム陽性菌	細菌の膜の脂質組成、相挙動(輸送温度)	フラーレン (C60)	Fang et. al. (2007)
繊毛虫(原生動物)	健康度(繊毛の運動、CB 試験)	SWCNT(酸化 SWCNT =水溶性)	Ghafari et. al. (2008)
オヨギゴカイ	長期毒性(28日間) 濃縮試験	SWCNT(C14ラベル) MWCNT(C14ラベル)	Petersen et. al. (2008)
ミジンコ	行動観察: hopping 行動、心臓の拍動数、付属肢の活動、尾爪の巻き具合、ばく露後の回復状況	二酸化チタン、フラーレン(C60)、フラーレン派生物(C60HxC70Hx)	Lovern et. al. (2007)
淡水の二枚貝	血液中の免疫機構、脂質酸化酵素活性、の DNA の損傷度	CdTe 量子ドット	Gagne et. al. (2008)
Fathead minnow、メダカ	mRNA の損傷度	フラーレン (C60)	Oberdorster et. al. (2006)
fathead minnow	過酸化脂質濃度(malonaldehyde method)、CYP2 酵素濃度	フラーレン (C60)	Zhu et. al. (2006)
オオクチバス幼魚	過酸化脂質濃度、グルタチオン(酸素ラジカル・スカベンジャー指標)濃度、酸化たんぱく質濃度	フラーレン (C60)	Oberdorster (2004)
ニジマス未成魚	行動観察、血液性状、Na ⁺ , K ⁺ -ATPase 分析	SWCNT、二酸化チタン	Federici et. al. (2007)
ニジマス未成魚	行動観察、鰓の活動量	SWCNT	Smith et. al. (2007)
ゼブラフィッシュの胚	細胞の死亡、卵内への核酸の放出状況	銀ナノ粒子	Asharani et. al. (2008)

3. ナノ材料の分散方法について

(1) 報告例における分散方法の使用事例

表6は、これまでの水生生物に関する試験報告における分散方法の使用状況を、対象物質別に示したものである。

試験事例の多いフラーレンでも有機溶媒（THF）を用いた分散方法と攪拌のみによって水に分散させる方法のいずれかが採用されており、統一されてはいない。また、他の物質についても必ずしもいずれかの手法に統一されているわけではない。

表6 水生生物に対する試験におけるナノ材料の分散方法の状況

対象物質	有機溶媒（THF等）に分散後に水に分散	水に直接分散（超音波を使用）	水に直接分散（超音波の使用はない）
フラーレン（C60）	3、6、11、14、16、22、25、27、		2、11、15、25、
C60HxC70Hx （フラーレン派生物）	12、		
C60（OH）22-24	5、		26、
SWCNT （酸化SWCNT＝水溶性）		8、	
SWCNT	18、	20、	19、21、
MWCNT	17、		
二酸化チタン	13、	4、23、	9、10、24、
銀ナノ粒子		1、	1、
CdTe量子ドット			7、

表中の番号は以下の文献番号に一致する。

1 Asharani et. al. (2008)	15 Oberdorster et. al. (2006)
2 Baun et. al. (2008)	16 Oberdorster (2004)
3 Fang et. al. (2007)	17 Petersen et. al. (2008)
4 Federici et. al. (2007)	18 Petersen et. al. (2008)
5 Fortner et. al. (2005)	19 Roberts et. al. (2007)
6 Fortner et. al. (2005)	20 Smith et. al. (2007)
7 Gagne et. al. (2008)	21 Templeton, et. al. (2006)
8 Ghafari et. al. (2008)	22 Tong et. al. (2007)
9 Hund-Rinke & Simon (2006)	23 Vevers & Jha (2008)
10 Lovern & Klaper (2006)	24 Warheit et. al. (2007)
11 Lovern & Klaper (2006)	25 Zhu et. al. (2006)
12 Lovern et. al. (2007)	26 Zhu et. al. (2007)
13 Lovern et. al. (2007)	27 Zhu et. al. (2007)
14 Lovern et. al. (2007)	

上記のほか、産業技術総合研究所では数種類のナノ材料について下記のような調整で、二酸化チタンでは1ヶ月以上、フラーレンでは3週間以上粒径が変化せず、安定した試料の作成に成功している。

表7 産業技術総合研究所による調整方法で作成された試料

(NEDO et. al. (2008)から作成)

<無機化合物、in vivo 試験>

物質名 (略号)	NiO2	TiO2 (ST01) Anatase	TiO2 (ST21) Anatase	TiO2 (ST41) Anatase	TiO2 (ST01) Anatase		
一次粒子:平均粒径 (nm) [BET 表面積 (m ² /g)]	20 (105)	5 (316)	23 (66)	154 (10)	5 (316)		
試験液中平均粒径 (nm)	26	19	28	176	19	65	300
気相中平均粒径 (nm)	59	—	—	—	—		
分散剤	なし	DSP	DSP	DSP	DSP		

(DSP:Disodium Phosphate)

<炭素系、in vivo 試験 & in vitro 試験>

物質名 (略号)	C60 (SU)	MWCNT	SWCNT
一次粒子:粒径 (nm) [BET 表面積 (m ² /g)]	— (0.92)	32 (9)	3nm、長さ1mm以上 (878)
試験液中粒径 (nm)	26	500	13(長さ420)
気相中粒径 (nm)	約100	180(長さ4.5μm以下)	
分散剤	Tween80	<u>Triton 100X</u>	Tween80

(Tween80: Polyoxyethylene (20) Sorbitan Monooleate、界面活性剤の一種)

(Triton 100X: Polyethylene Glycol mono-p-iso-Octylphenyl ether、界面活性剤の一種)

削除: Tween80

書式変更: インデント: ぶら下げインデント: 2.04 字, 左 0.01 字, 最初の行: -2.04 字, 単語の途中で改行する

書式変更: フォント: (英) MS 明朝

(2) フラーレンの分散方法に関する論議

フラーレンについては、分散方法によって毒性試験の結果が顕著に異なることが知られている(資料2、表2)。この原因について、Oberdorsterら(2006)は下記のように述べ、Oberdorsterら自身は水による分散(2ヶ月間の攪拌)を採用している。

- THF といった溶媒の使用はフラーレンによる有機溶媒の取込み等の作用で毒性影響が大きくみえる可能性がある。
- 即ち、フラーレンには他の毒性物質の輸送能力がある可能性がある。
- また、超音波もフラーレンの毒性に影響を与えるので良くない。

削除: なる

一方、この点に対し、Lovernら(2007)は、下記のように述べ、THFの使用の妥当性を主張している。

- THFの使用については最近論議があるが、私の実験では粒子サイズを10-20nmに保つために使用した。サイズの相違はフラーレンでは毒性に大きく影響する。
- THFはほとんど除去され、作成された溶液を紫外線分光光度計で確認してもピークはなかった(検出されなかった)。

- THF の LD50 は 5930ppm で本実験で使用した粒子の毒性の 20 倍以上ある。
- この分散方法によって得られたものは、科学的かつ工業的に使用されているものを正確に代表している。

他方、フラーレンと毒性物質との相互作用に関する Baun ら (2008) の報告では、フラーレンの分散方法によっては、下記のように特定の有機物の毒性試験の結果が異なることが認められている。

- phenanthrene の 85% が C60 凝集物 (200nm 以上) に溶解した (atrazine、methyl parathion、PCP は 10% 以下)。
- ミジンコの急性死亡毒性あるいは藻類の増殖阻害度は、phenanthrene では 10 倍ないしは 1.6 倍に増大したが、PCP、atrazine、methyl parathion では減少あるいは有意な変化なしであった。

上記の現象がフラーレンに特有であるかは現状では不明であるが、今後の水生生物に対する試験のためには、このような対象物質による他の物質との複合的作用についても検討が必要であるものと思われる。

(3) ナノ材料の分散方法に関する現状の採用方法の集約

有害性試験時のナノ材料の分散方法の問題について、DEFRA (2007) は現状で使用されている数種類の方法について表 8 のように整理している。処理後の持続性や対照試験の設定等の問題を別にすれば、各処理方法の根本的な問題は下記のように集約できる。

- 溶媒等の利用は上記のフラーレンのように、使用する溶媒の毒性が付加される危険性がある。
- 超音波や攪拌ではナノ材料の破壊や表面構造の変化等の問題が生じる可能性がある。
- 加えて、超音波処理は活性酸素の発生による問題が生じる可能性が高い。

削除: については

削除: 大きく

表 8 ナノ材料の水中への分散方法の長所及び短所

分散方法	長所	短所
無処理	<ul style="list-style-type: none"> ・ 化学物質や溶媒の添加がない ・ 溶液の準備時間が短い ・ 対照試験が不要 ・ 硬水や海水といった状態に近似すると想定される 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 凝集の程度が希釈で変化し毒性も変化する ・ 粒子や凝集物の大きさが無制御 ・ 腐食質や他の自然の分散剤のある水には近似しない
溶媒や化学物質による分散	<ul style="list-style-type: none"> ・ 攪拌や超音波処置なしでナノ材料を分散できる ・ 処理が早い ・ 粒子数：凝集物の比率の管理が可能で類似の試験状態が設定できる ・ 溶媒等が存在する間は分散していると想定される 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 追加する溶媒や化学物質が毒性を有するかもしれない ・ 過剰の溶媒でナノチューブの形状や毒性が変化かもしれない ・ ナノチューブや凝集物の内部に溶媒が残留し毒性が生じるかもしれない ・ 上記の点で溶媒と物質の比率を一定にする必要があり管理が煩雑
超音波処理	<ul style="list-style-type: none"> ・ 溶媒や化学物質の添加がない ・ 処理が早い（数時間から 1 日程度） ・ 溶液の管理が不要 ・ 対照が不要（超純粋及び活性酸素の発生リスクのない水の場合） 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 処理時間で濃度が変化する ・ ナノチューブの破壊やナノ粒子表面への損傷が生じる可能性がある ・ 処理後長時間分散したままではないかもしれない ・ 自然の水あるいは電子の受容体がある水では活性酸素が発生する その場合は対照試験が必要になる
攪拌	<ul style="list-style-type: none"> ・ 溶媒や化学物質の添加がない ・ 溶液の管理が不要 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 超音波処理と同様の問題がある ・ 処理時間が長い（数週間） ・ 攪拌時間で濃度が変化する ・ ナノチューブの破壊やナノ粒子の表面の磨耗が生じるかもしれない ・ 攪拌後に長時間分散したままではないかもしれない ・ 無攪拌のナノ粒子の性質は異なる可能性があり、対照試験の設定が困難

DEFRA (2007) から作成

4. 有害性試験方法に関し、今後の検討が必要な課題

1～3. で集約した情報に基づき、ナノ材料の有害性試験に関する今後の課題と考えられる点は以下の通りである。なお、この項は、有害性試験方法そのものの課題をまとめたものであり、今後、化学物質管理に関する既存法制度等においてナノ材料に関する有害試験の手法を検討する必要がある場合には、更に内容や課題について精査する必要がある。

(1) 既存の有害性試験方法のナノ材料への適用性

OECD テストガイドライン等従来の試験方法は、試験液の調整等の幾つかの問題を除いては、ナノ材料の有害性試験方法として有効であるとの指摘が OECD の関連作業部会でなされている。具体的には、遺伝毒性、皮膚刺激性、皮膚の感査性、眼の刺激性、急性経口試験、藻類生長阻害試験、ミジンコ急性遊泳阻害試験、魚類急性毒性試験については OECD テストガイドラインの使用が可能と分析されている。実際にナノ材料を用いて有害性試験を実施するに当たっては、当該物質の物理化学的性状等を勘案し、これら既存の有害性試験方法が適用可能か、検討する必要がある。

反復投与試験のうち経口ばく露に関しては OECD テストガイドラインが有効であるとの見解も示されているが、一方、経気道ばく露については神経毒性や免疫毒性を扱っていないため、ナノ材料の有害性（酸化ストレス）を考慮した適切な検査項目の追加実施も検討する必要がある。

削除: 変異原性

一方、分解性試験及び濃縮試験については、ナノ材料は不溶性のものが多く、金属は分解試験を実施する対象として不相当であること等から、現状の OECD テストガイドラインをそのまま適用することは困難であるとの指摘がある。これら試験を実施する上では、先行研究を参照し、適切な試験方法を選択・検討する必要がある。

(2) 水中での分散、凝集性

ナノ材料の有害性試験の実施に当たっては、ナノ材料の媒体（水、底泥、土壌）中での分散、凝集及び均一性をどのように整理するかを検討する必要がある。特に、水生生物を用いた生態毒性試験については水中でのナノ材料の凝集をどのように判断するかを整理する必要がある。

ナノ材料に関する既存の有害性試験においては、分散剤の使用、超音波処理、攪拌などによって試験媒体中のナノ材料の分散を図っているが、それぞれに長所及び短所が存在する。このため、試験実施に当たってはこれら長所及び短所を理解した上で分散方法を検討する必要がある。なお、ナノ材料については、一般環境水中の挙動に関する知見が少ないことから、実環境を想定した上で、分散等についての検討を行うことも必要であろう。更に、一般環境水中では凝集するとの知見もある

一方、凝集したナノ材料が体内摂取後にどのような挙動をとるのか（マクロファージの関与等）についても留意する必要がある。

（3）ナノ材料の測定項目、測定方法

有害性試験の実施に当たっては、ナノ材料の実験媒体中の濃度等についての測定が必要である。

しかしながら、環境中での測定はもちろん試験系での測定についても微量かつ微小な粒子の測定であり、既存の測定法の適用性を含め、測定方法に関する検討を進める必要がある。

なお、水中での分散状態を示す項目としてゼータ電位の測定が相当との指摘もあり、従来の試験では項目としてあげられていないこれらの項目の測定の必要性についても検討が必要であろう。

(参考) OECD におけるナノ材料の有害性試験に関する議論の概要

1) セクション2 (SG4-2)

藻類生長阻害試験、ミジンコ急性遊泳阻害試験等の水生生物、微生物、陸生生物等に関する 24 種類の OECD テストガイドライン及び数種のそれ以外のガイドラインをレビューした結果は下記のとおりである。

- これらのテストガイドラインの基本的考え方はナノ材料の試験方法として適切であるが、ナノ材料の試験方法として用いるには共通した問題がある。
- 特に、物質の特性の表記、試験時の調整、ばく露の定量性、用量メトリクス⁵に関して問題がある。
- OECD テストガイドラインでのエンドポイントは複数の生物作用が統合された結果のものが多く、また溶液を想定したものであり、必ずしもナノ材料に適しているのではないが、現状ではナノ材料の環境中挙動等の情報がない等のことから、新しいテストガイドラインの作成の提言まではできない。
- ナノ材料の持つ特性のために、試験で用いる媒体（水、底泥、土壌）中でのナノ材料の挙動が大きな問題である。SG4-2 はこの点について現状のテストガイドラインの改訂あるいは新しく作成することを進言する。
- 溶媒中での安定性、均一性、についてもナノ材料の持つ特性ゆえの問題があり、SG4-1（物理化学特性）の成果に準じた検討が必要である。
- 用量メトリクスについては、今後の有害性試験研究の成果を踏まえた再検討が必要である。
- なお、検討の当初対象にしていなかった下記のガイドラインは、現状の OECD テストガイドラインでは調整や測定に不都合のある物質を対象としたものである。

「Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures」

水生生物に関する試験しか含まれていないため他の試験方法の追加、及びナノ材料に適した記載の追加が必要であるものの、ナノ材料の問題を一つのガイドラインで対応できる。SG4-2 はこのテストガイドラインのレビューを検討に加えることを提言する。

2) セクション3 (SG4-3)

分解性試験及び濃縮試験に関する OECD テストガイドラインをレビューした結果は下記のとおりである。

- ナノ材料の計測方法がもっとも大きな課題。
- 水中での分散状態を示す指標としてはゼータ電位の測定が適していると考えられる。

⁵ dose metrics : 質量、比表面積、粒子数、等

- 分解性試験に関しては OECD310 がもっとも適用可能な方法であるが、下記の点で問題がある。
 - － 炭素からなる多くのナノ材料が水に溶解しにくいこと
 - － 試験が CO2 発生量や O2 消費量を指標としており多量の化学物質が必要であること
- 分解性に関する模擬試験においては、その測定等は課題が多いが、C14 でラベルしたナノ材料による試験が適用可能である。
- 生物蓄積性 (BCF) に関するテストガイドライン OECD305 及びミミズを用いた試験 (準備中) では、直径 0.5nm 以上の物質には直接の取り込みに限界があることから、適用は困難と考えられる。
- 餌に混入させた場合の濃縮度 (BAF) はナノ材料に適用可能であるが、現状では定まった OECD ガイドラインはない。
- ナノ材料の計測方法が環境中挙動に関するガイドラインの検討に先立って検討されるべき課題である。その点で、C14 を用いた方法は今後検討すべき課題であると思われる。

3) セクション 4 (SG4-4)

急性毒性、皮膚や目の炎症等、反復投与試験、遺伝毒性、生殖毒性等のヒトの健康に関する OECD テストガイドラインをレビューした結果は下記のとおりである。

- 急性毒性に関するテストガイドライン 420, 423, 425 は初期検討には有効である。403 についてナノ材料に適用するには BAL 検査や細胞の増殖性等の試験を追加することが適当である。なお、皮膚ばく露に関する 402 はナノ材料に適当である。
- 皮膚、眼の炎症、腐食及び皮膚の感査性に関するガイドライン 404, 405, 406, 429 はナノマテリアルに有効である。ただし、430, 431, 435 は MTT アッセイ等の細胞活性測定は適当でない可能性がある点に注意が必要である。
- 反復投与試験に関するガイドライン 407, 409 (経口ばく露) はナノ材料に有効である。ただし、412, 413 (経気道ばく露) は神経毒性や免疫毒性を扱っていないこと等から注意が必要である。
- 遺伝毒性については、in vitro のテストガイドライン 471, 473, 476 は有効であるが、ナノ材料のような不溶性の粒子の場合は結果に誤解が生じる可能性がある。また、in vivo でのテストガイドライン 474, 475, 486 は骨髄や肝臓に影響があると推定された場合のもので、吸入後の気管を標的にしたものではない点に注意が必要である。
- 生殖毒性に関するガイドライン 421, 422, 415, 416, (414) はナノ材料に有効である。ただし、全ての試験が経口ばく露であるため、吸入ばく露の試験では十分な注意が必要である。
- 結論として、健康影響に関する OECD のテストガイドラインはナノ材料に有効で

削除: 変異原性

ある。ただし、ナノ材料の物理化学特性を考慮すれば、試験の用量の問題には注意が必要であり、その点でガイドラインの修正が必要な場合もあると想定される。