

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関係す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
（もし可能ならば）
<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
<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
○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	ばく露経路	ばく露の回数、 期間	試験事項	出典
SWCNT	咽頭(滴下)	単回	DNA ダメージ検査	Li et. al. (2007)
SWCNT	咽頭(吸入)	単回	炎症反応、間質性繊維性病変の有無	Mangum et. al. (2006)
SWCNT	咽頭(⇒肺)	単回	BAL 検査	Shvedova et. al. (2005)
SWCNT、 石英	気管(注入)	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	気管(注入)	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	気管(滴下)	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	気管内投与	単回	肺組織の解析(肺気腫、マクロファージ浸潤、肺泡隔壁破壊、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	気管(注入)	単回	肺組織の解析	Cha et. al. (2007)
酸化亜鉛	気管(滴下)	単回	BAL 検査	Sayes et. al. (2007)
シリカ	気管(滴下)	単回	BAL 検査	Warheit et. al. (2007)
シリカ	気管(滴下)	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	鼻腔、気管、 腹腔(投与)	単回	投与後24、48、72時間、7日後に解剖	Carrero-Sanchez et. al. (2006)
二酸化チタン	鼻腔(投与)	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アルブミン測定 最後の鼻腔投与後24時間後にBAL 検査	de Haar et. al. (2006)
MnO	鼻腔(注入)	6時間/日、5日 /週、12日間	11日目にジーン及びブドウ糖アッセイを実施 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	肺(滴下)	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	肺(滴下)	単回	8、16、24日後病理検査実施。	Li et. al. (2007)
SWCNT	肺(滴下)	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	肺(注入)	単回	ばく露後3日目にBAL 試験	Li et. al. (2007)
MWCNT	全身(チャンパー内)	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	全身(チャンパー内)	急性:4時間×1 回、亜急性:4時間/日×10日	LDH、BAL 検査	Grassian et. al. (2007)
ナノ銀	全身(チャンパー内)	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)

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。

- ばく露経路は、気管内への注入事例が多いが、その他にも咽頭、鼻腔、肺と様々である。
- 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。
- 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。

(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 : IS08692、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	CO ₂ 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	CO ₂ 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 Oberdorster2004)
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)	NiO ₂	TiO ₂ (ST01) Anatase	TiO ₂ (ST21) Anatase	TiO ₂ (ST41) Anatase	TiO ₂ (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 4.5 μm 以下)	
分散剤	Tween80	Tween80	Tween80

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

(2) フラーレンの分散方法に関する論議

フルーレンについては、分散方法によって毒性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ル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なる可能性がある。
- 即ち、フル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、超音波もフルーレンの毒性に影響を与えるので良くない。

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。サイズの相違はフル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、下記のように特定の有機物については毒性が大きく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。

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変異原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。

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適当との指摘もあり、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¹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。

¹ 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) は神経毒性や変異原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

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。