

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

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
および体内動態評価に関する基盤研究
(H18・化学・一般・007)

平成18年度 総括・分担研究報告書
主任研究者 広瀬 明彦

平成19年(2007年)4月

目 次

I. 総括研究報告書	1
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および体内動態評価に関する基盤研究	
広瀬 明彦	2
II. 分担研究報告書	19
1. 高生産量ナノマテリアルの有害性評価指標の開発に関する研究	
菅野 純	20
2. ナノマテリアルの発がん性評価手法の開発に関する研究	
津田 洋幸	23
3. ナノマテリアルの生体内分析法の確立と体内動態の評価手法に関する研究	
西村 哲治	26
4. ナノマテリアルの吸入暴露手法の開発に関する研究	
一瀬 文雄	38
5. 高生産量ナノマテリアルの環境中での分解代謝等に関する研究	
屋形 直明	59
6. ナノマテリアルの脂質二重膜との相互作用および細胞内導入に関する基礎的研究	
新井 洋由	64
7. ナノマテリアルの遺伝毒性評価系における基礎的研究	
本間 正充	68
8. ナノマテリアルの神経細胞機能影響における基礎的研究	
中澤 憲一	73
9. ナノマテリアルの血漿リポタンパク質や細胞との相互作用に関する基礎的研究	
最上 知子	76
10. 産業用ナノマテリアルの経気道および粉体暴露手法に関する基礎的研究	
涌生 聖	82
11. 産業用ナノマテリアルのリスクに関する国内外の動向調査研究	
高月 峰夫	85
12. 高生産量ナノマテリアルの健康影響評価に関する吸入暴露に関する調査研究 及び研究班総括	
広瀬 明彦	95
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	103
IV. 研究成果の刊行物・別冊	107

平成 18 年度厚生労働科学研究費補助金
(化学物質リスク研究事業)

I. 総括研究報告書

研究課題名: 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および
体内動態評価に関する基盤研究

主任研究者 広瀬 明彦 国立医薬品食品衛生研究所 総合評価研究室 主任研究官

研究要旨

産業用途のナノマテリアルの物理化学的性状は、同一化学組成を持つ大きな構造体とは著しく異なり、ナノマテリアルが産業的な新用途への展開に期待されている一方で、未知の生体影響も予測されているところでもある。従って、ナノマテリアルの物理化学的特性を考慮した毒性試験法や有害性評価手法の開発が急務となっており、本研究では既に生産量の多いナノマテリアルを検証物質として選びし、測定法から *in vitro* および *in vivo* 試験法にわたる総合的な評価法の確立のための基盤研究を行うことを目的としている。

in vivo 生体影響評価手法の開発、ナノ粒子の吸入毒性評価手法の開発、暴露測定法および動態解析法の開発、*in vitro* 試験系の開発および、国際動向調査の 5 部門により研究班を構成した。

緊急性が高いと考えられる多層カーボンナノチューブ(MWCNT)やフラーレン(C60)の発がん・慢性影響についてプロモーション作用検出法や遺伝子改変動物を使った系の検証を開始し、より短期間での影響検出において有用であるとの予備的結果を得ることができた。吸入試験法では、MWCNT の気管内投与における分散法の確立と吸入暴露における粒子の発生条件を検討した。測定法および動態解析では、MWCNTを電頭で測定する際の分散法を検討すると共に、C60について通常の分解度試験法では分解しないことを確認した。*In vitro* 系では、C60に関して脂質/リポソームを使った細胞系への分散方法を検証し、細胞内への導入法と ACh 受容体への影響を検討すると共に、TiO₂ については、上皮系細胞や腸肝系細胞を用いた細胞毒性や透過性、および遺伝毒性について検討した。さらに、国際動向調査では、国際的な情報の共有化や、研究および評価法に関する調和化が求められている中、OECD 産業用ナノマテリアルの作業グループ等の国際的調和に関する動向について情報収集した。

フラーレンや多層カーボンナノチューブ、酸化チタン粒子などを対象物質として、*in vivo* 系における短期発がん性試験の有用性が示唆されると共に、気管内投与や吸入試験法の開発における MWCNT の分散法に目処が立った他、*In vitro* 系での C60 等の脂質成分等を用いた分散手法の有効性を確認し、国際動向としては、OECD 等で、試験法の調和化に向けた動きが具体化し始めていることを確認した。

分担研究者

菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所
毒性部 部長
津田 洋幸 名古屋市立大学大学院医学研究科
生体防御総合医学専攻 生体機能分
子医学講座 分子毒性学 教授

西村 哲治 国立医薬品食品衛生研究所
環境衛生化学部 室長
一瀬 文雄 (財) 化学物質評価研究機構
日田事業所 毒性学 主任
屋形 直明 (財) 化学物質評価研究機構
久留米事業所 分析化学 課長

新井 洋由 東京大学大学院薬学系研究科・
薬学部・機能薬学・細胞生化学
衛生化学 教授
本間 正充 国立医薬品食品衛生研究所
変異遺伝部 室長
中澤 憲一 国立医薬品食品衛生研究所
薬理部 部長
最上 知子 国立医薬品食品衛生研究所
代謝生化学部 室長
涌生 聖 (株)三菱化学安全科学研究所・
鹿島研究所 毒性第1研究部
副主任研究員
高月 峰夫 (財)化学物質評価研究機構
安全性評価技術研究所 所長

協力研究者

高木 篤也 国立医薬品食品衛生研究所
毒性部 室長
深町 勝巳 名古屋市立大学大学院医学研究科
生体機能分子医学講座
分子毒性学 助手
徐 結苟 名古屋市立大学大学院医学研究科
生体機能分子医学講座
分子毒性学 研究員
David B. Alexander
名古屋市立大学大学院医学研究科
生体機能分子医学講座
分子毒性学 客員教授
上村 尚 東京都健康安全研究センター
環境保健部
小縣 昭夫 東京都健康安全研究センター
環境保健部 生体影響研究科
大橋 則雄 東京都健康安全研究センター
環境保健部 環境衛生研究科
福原 信隆 東京都健康安全研究センター
環境保健部 生体影響研究科
内野 正 国立医薬品食品衛生研究所
環境衛生化学部
久保田領志 国立医薬品食品衛生研究所
環境衛生化学部
清水久美子 国立医薬品食品衛生研究所
環境衛生化学部
辻村 和也 (財)化学物質評価研究機構
日田事業所 副長
後藤 純平 (財)化学物質評価研究機構

日田事業所 研究員
日野 敦史 (財)化学物質評価研究機構
日田事業所 研究員
秦 ユカリ (財)化学物質評価研究機構
日田事業所 研究員
井上 義之 (財)化学物質評価研究機構
久留米事業所 試験第二課 副長
佐藤 薫 国立医薬品食品衛生研究所
薬理部 主任研究官
重本-最上由香里 国立医薬品食品衛生研究所
代謝生化学部
内野 正 国立医薬品食品衛生研究所
環境衛生化学部 主任研究官

A. 研究目的

ナノテクノロジーは、「ナノメートルサイズのスケールで物質の構造・配列を制御することで、新機能や優れた特性を持つ物質を作り出す技術」とされ、国家戦略としてその開発が進められており、少なくとも1次元の大きさが100ナノメートル以下である物質がナノマテリアルと定義され、ナノテクノロジーの中心的な役割を担う新規物質として、近年急速にその種類や生産量が増加しつつある。これらナノマテリアルの物理化学的性状は、同一組成を持つ大きな構造体とは著しく異なり、この違いが産業的に新しい用途への開発として期待されているところであるが、一方で生体に対して、特にヒト健康影響に対する有害性評価に対しては、新たな危惧として捉えられる可能性も含まれている。

これまでの通常の毒性試験は構造体そのものの大きさに対しては、アスベストや塵肺症原因物質などを除き、特別の考慮はされて来ていないことから、ナノマテリアルの粒径に基づく物理化学的的特性を考慮した毒性試験法や有害性評価手法の開発が急務となっている。化審法等これまでの化学物質組成を対象にした安全性評価システムでは、生体内へ吸収されないと考えられる高分子ポリマーを除いて、物質の大きさを意識した評価システムになっておらず、化学物質の行政的申請/認可体制における産業用ナノマテリアルの安全性評価においても、その大きさに依存した特性を評価するシステムの追加、あるいは新たな

枠組みに基づく登録(レジストレーション)システム構築の必要性が想定されている。また、既存化学物質として評価済みの単一元素、或いは組成からできたナノマテリアル、例えば、炭素のみから成るカーボンナノチューブやフラーレンは、現行の化審法などでは新たな審査を必要とせず大量使用可能な状態である。また、酸化チタンなどはすでに化粧品原料としてとして広く使用されており、それらの安全性の評価は急務である。

本研究ではこれらの高生産量(HPV)ナノマテリアルに対する安全性評価手法の開発検討を優先して行うことを通して、ナノマテリアルの安全性評価に必要な条件を探ることを目的とする。特に、ナノマテリアルの多くが難溶性、難分解性で凝集しやすい性質であることより、その生体影響は同じ物質であっても投与経路および投与形態や使用する分散剤によって異なることが予想され、安全性評価試験の開発にはこれらの因子を考慮する必要がある。

B. 研究方法

本研究では、大きく分けて、①in vivo 生体影響評価手法の開発、②ナノ粒子の吸入毒性評価手法の開発、③暴露測定法および動態解析法の開発、④in vitro 試験系の開発、⑤国際動向調査の5部門体制で研究を行った。

①in vivo 生体影響評価手法の開発:

MWCNT およびフラーレンについては、腹腔内投与による発がん試験法を、その感受性が高まるとされる p53 遺伝子ヘテロ欠失マウスと組み合わせ、単回腹腔内投与による中皮腫誘発試験を行った(菅野)。また、ラットへの経気管噴霧法による、ナノ粒子の発がんプロモーション作用・発がん性についての簡便で安全な試験システムの開発を行い、c-Ha-ras トランスジェニックラット(Tg)を用いた DHPN 誘発性の TiO₂ 粒子発がんイニシエーション、および通常ラットにおける C60 投与による肺と乳腺の発がんプロモーション作用を検討した(津田)。

②ナノ粒子の吸入毒性評価手法:

MWCNT を気管内投与する際の媒体および調製法の検討を行った(涌生)。MWCNTの吸入暴露法の

開発としては、ダスト状態およびミスト状態でのナノレベルでの吸入暴露法を検討した(広瀬、一瀬)。

③暴露測定法および動態解析法の開発:

測定法の開発研究としては、MWCNT の電子顕微鏡による解析方法の検討を行った(西村)。C60 の体内挙動解析研究としては、マウスへの腹腔内投与(溶媒:1-メチル-2-ピロリドン)による各臓器からの検出を試みた(西村)。また、C60 の環境残留性の確認と水溶性変化物の検討では、OECD テストガイドライン 301C 試験法の検討を行った(屋形)。

④in vitro 試験系の開発:

培養細胞系への C60 暴露研究のための分散剤の検討では、リン脂質や細胞内導入試薬等の検討を行った(西村)。また、腹腔マクロファージを培養し、リポソーム添加による C60 の細胞内導入を試みた(新井)。神経系への影響としてはγ-シクロデキストリンで可溶化した C60 を用いて、卵母細胞に発現させたヒトの神経型アセチルコリン受容体チャンネルを介するイオン電流に対する検討を行った(中澤)。TiO₂ について6種類の培養細胞を用い、細胞毒性および細胞内への取り込みについて検討した(西村)。腸管吸収評価モデルである Caco-2 細胞単層膜を用いた TiO₂ 粒子の透過に関する検討を行った(最上)。TiO₂ の CHL 細胞およびヒトリンパ芽球 TK6 細胞を用いた遺伝毒性に対する検討を行った(本間)。

⑤国際動向調査:ナノマテリアルのハザードに関する文献を収集して査読を行い、その信頼性等を評価したうえで整理を行った(高月)。また、本研究の研究計画全般について、米国トキシコロジー協会での公表に加えて、OECD における産業用ナノマテリアルの作業グループ会合に出席し、安全性評価の国際的調和に関する動向について情報収集した(広瀬)。

(倫理面への配慮)

実験動物を用いる実験では、動物への苦痛の少ない方法を用いるといった、当該研究所の実験動物取り扱い倫理規定に準拠した対応を行った。

C. 研究結果

①in vivo 生体影響評価手法の開発、

MWCNT 投与群及びアスベスト投与群に、死亡が認められ、前群では、26 週間に 90%以上が死亡した。半数生存期間はMWCNT群で20週、アスベスト群で25週であった。フラーレン投与群で1匹死亡が観られた。対照群に死亡は観られなかった。肉眼的観察から、MWCNT 群で強い腹腔内臓器の癒着が観られた。また、アスベスト群でも中程度の腹腔内臓器の癒着が観られた。また、腹腔内に腫瘍が MWCNT 群で17匹中14匹(82%)、アスベスト群で18匹中12匹(67%)観られた。一方、フラーレン及び対照群には腹腔内臓器の癒着は観られず、腫瘍も観られなかった。現在、病理組織学的検査を実施中である。

TiO₂ の肺発がん・発がんプロモーション作用実験では、腺腫の頻度と数(/ラット)は生食群 0%、0 個、250ppm 群 10%、0.1 個、500ppm 群 36%、0.4 個であり 500ppm 群において有意の増加が見られた。肺以外に乳腺においても腫瘍が発生し、投与部位以外にも腫瘍を発生させることも明らかとなった。フラーレン(C₆₀)の肺発がん・発がんプロモーション作用の検索実験では、肺の腫瘍性病変、炎症性の程度・サイトカインの誘導等の病理学的、生化学的解析を行っている。

②ナノ粒子の吸入毒性評価手法の開発、

気管内投与における媒体および調製法の検討としては、CMC-Na 水溶液では、MWCNT と媒体がなじまず、懸濁液の調製は不能であった。Tween80 水溶液で懸濁した場合には、凝集塊が多く、単離した MWCNT は非常に少ない状態であった。Tween80+CMC-Na 水溶液の場合には、Tween80 のみの場合と比べ、単離した MWCNT が多く認められる状態となることが確認された。さらにサーファクテン®を用いた場合には、MWCNT の単離状況が改善され、単離の状況はメノウ乳鉢で懸濁液を粉碎することでより改善されることが判明した。そこで、5 mg/mL の懸濁液の調製結果が比較的良好であった媒体としてサーファクテン®を選択し、メノウ乳鉢使用の有無による懸濁液中の MWCNT の単離状況が異なる投与液、すなわち懸濁液中の MWCNT の凝集塊が多い状態

および単離した MWCNT が比較的多い状態の MWCNT 懸濁液を SD 系ラットの雌に 5 mg/kg の用量で投与した。陽性対照として結晶性シリカ (Min-U Sil #5)、陰性対照として溶媒のみを投与した。BALF 中の LDH では、第 8 日には MWCNT 群、第 29 日には凝固塊の少ない MWCNT 投与群と陽性対照群に対照群と比較して統計学的に有意な高値が認められた。BALF 中の細胞数および構成比、HO-1 遺伝子発現およびサイトカイン測定については測定中である。また、現在、病理標本を作製中である。

吸入暴露として、ダスト状態での発生方法としては、MWNT の原体粉末約 2~5 g を丸底フラスコに入れ、そこへ清浄圧縮空気を、イオナイザーを介して導入した。フラスコ外へ排出された MWNT を希釈給気と混合後、2 個のサイクロンを経由して鼻部暴露チャンバーに導入した。発生給気量により暴露濃度を調節し、発生給気と希釈給気との和が 20 L/min になるように設定した。この手法により、MWCNT のダストによる 4 時間の連続発生が可能であった。本法においては、約 0.5~6 mg/m³ の濃度範囲における MWNT 発生が確認できた。しかし、経時的に濃度が低下していく傾向がみられ、3日間の再現性に関しては良好な再現性を得られなかった。

ミスト状態での発生としては、MWCNT を噴霧乾燥法により気相中に発生させる手法を用いた。400 mL の水に Tween 20 0.2 g を添加し、そこへ MWNT を加え、よく攪拌した後、30 分以上、超音波処理したものを MWNT 懸濁液として、ネブライザーを用いてミストとして発生させた。発生したミストは希釈給気と混合した後、加熱器 (120°C) により可能な限り水分を揮発させ、ニュートライザーを経て暴露チャンバーに導入した。発生及び希釈給気量はそれぞれ 5 及び 15 L/min とした。TWEEN20 のみでも SMPS で粒子状物質の発生が認められ、それに CNT を懸濁させて発生させた場合に粒子径の移動は 4 nm 程度移動した。ただし、濃度の変化は 1.2 倍程度現れ、T60A20 ろ紙によるミストの捕集により MWCNT の発生を確認した。ミスト発生については、粒度分布のヒストグラム及び発生された粒子

数の顕著な経時的変動は認められなかった。

③暴露測定法および動態解析法の開発、

電子顕微鏡(電顕)による MWCNT の分散および形状分布の検討では、バイアル瓶中の蒸留水および分散剤として 5%のドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、TritonX-100(TX-100)、Tween-20、アルブミン、カルボキシメチルセルロース(CMC)、高分子化合物であるデキストラン、エチルセルロース、コルコート、ポリエリジン等の分散性を有する薬剤やアセトン、エタノール、メタノール、テトラヒドロフラン(THF)等の溶媒の各種を用いて目視で沈殿状態を比較したところ、TX-100の懸濁状態が良好であった。次に Tween-20、アルブミン、CMC、高分子化合物が比較的良好に分散することができ、SDS はこれらに次いで中程度であった。その他は、水と同様に分散が不良であった。熱処理を行った後の CNT を走査型電顕で確認できた分散剤は、5%の TX-100、Tween-20、アルブミンであった。以上の観察結果から、TX-100 が検討した分散剤の中で最もよく分散することができると認められた。MWCNTの長さとの幅の分布の測定に関しては、分散の明瞭な像を写真撮影し、大きく伸ばして MWCNT 像をマニュアルにて長さとの幅(直径)を計測した。長さは約 400 本、幅は約 100 本の MWCNT を数えてそれぞれの分布を示した。MWCNTの長さは、1 から 5 μm の分布が多く、10 μm を超える長い CNT も散見された(平均長 $4.9 \pm 3.2 \mu\text{m}$)。幅(直径)は、70nm から 90nm に多く分布している傾向がみられた(平均幅 $100.0 \pm 26.5\text{nm}$)。これらの分布から、比較的長い MWCNT が存在していることがわかった。MWCNT 中に混入している微量元素の測定では、検出された主な元素は、鉄およびイオウで、塩素およびアルミニウムをあわせて検出された。ICP-MS による、鉄(質量数 56)の平均濃度は 0.35%であった。なお、透過型電子顕微鏡に付属したエネルギー分散型 X 線マイクロアナライザーによる観察では、MWCNT の構造中に鉄およびその他の元素は観察されていない。イオウの平均値含量は、455ppm~486ppm で、F 及び Br は検出限界以下であり、塩素は 20ppm 前後検出された。

フラーレンのマウスへの腹腔内投与法の検討および体内分布の評価においては、フラーレンの溶解度と既報の LD₅₀ 値を考慮し、1-メチル-2-ピロリドン、1-オクタノール、ヘキサンの3物質について検討した。フラーレンの溶解度は 1-メチル-2-ピロリドンが最も高く、約 800mg/L であったため、1.92 $\mu\text{l/g body wt}$ を投与したところ、外観的観察による異常や致死作用は認められなかった。フラーレンは、投与群の脾臓、肝臓、腎臓からフラーレンが検出され、投与 1 日目のグループについては 5 検体中 4 検体の肝臓、脾臓から、投与 3 日目のグループについては 5 検体中 3 検体の肝臓、腎臓から、また、その中の 1 検体からは腎臓からも検出された。脳、肺、血液からは検出されなかった。検出された三種の臓器では、単位湿重量当たりの濃度は脾臓が最も高く、最高値で 8058 ng/g 湿重当りであった。

また、C60 の環境残留性の確認と水溶性変化物の検討として、OECD テストガイドライン 301C 試験法を行った。28 日後の分析結果は、(水+被験物質)系、(汚泥+被験物質)系共に被験物質はほぼ理論量残留し、HPLC クロマトグラム上に被験物質以外のピークは認められなかった。よって、変化物は生成しなかったと判断された。また、28 日後の分解度に関しては、BOD による分解度は、-2%、-2%、-2%(平均-2%)であり、HPLC による被験物質の分解度は、-1%、3%、1%(平均 1%)であった。

④in vitro 試験系の開発、

培養細胞系への C60 暴露研究のための分散剤の検討では、9 種の分散剤を用いて暴露した結果、PS、PG、PI、PC および TransFast™ Transfection Reagent を暴露した細胞からのみフラーレンが検出された。最も多量に取り込み・付着しているのは TransFast™ Transfection Reagent であり、その他は、PS > PG > PI > PC の順であった。、全ての分散剤の場合もフラーレンを添加したことによる細胞毒性は認められなかった。

腹腔マクロファージを培養し、リポソーム添加による C60 の細胞内導入を試みたところ、導入 1 日後では、1:グルコース溶液のみ、2:フラーレンのみ、の添加条

件では泡沫化は観察されず目立った変化はなかった。一方、3: PC/PS/リポソーム、4:PC/PS/フラーレンリポソームの添加条件では細胞内に脂質ドロップレットが観察され泡沫化が起こっていた。リポソーム添加後、1-7 日後までの毒性を調べたところ、1、2 の添加条件では無添加時とほとんど変化がなかったが、リポソーム添加群の 3、4 では、むしろ細胞の増殖が観察された。しかしながらフラーレンの有無で有為な差は見られなかった。

神経系への影響としては卵母細胞に神経型アセチルコリン受容体チャネル($\alpha 3$ および $\beta 4$ サブユニットの組み合わせ)を発現させ、このチャネルを介するイオン電流を検討したところ、 γ -シクロデキストリンを用いて可溶化した C60 は、約 10%減少させた。アセチルコリン受容体チャネルを抑制する有名な物質 d-トボクラリン(d-TC)は単独でアセチルコリン受容体チャネルを介する電流を約 40%減少させたが、C60 存在下では、d-TC はほとんど抑制作用を示さなかった。また、C60 を ATP 受容体チャネルの cRNA と共にアフリカツメガエル卵母細胞に注入したところ、C60 存在下では ATP により誘発されるイオン電流の大きさは約半分になったが、卵母細胞間でばらつきが大きく、有意な差ではなかった。

TiO₂ について 6 種類の培養細胞を用い、LU175 および LU205 の細胞毒性を調べた結果、LU175 の IC₅₀ 値は、CHO 細胞では 0.12%、NHSF では 0.02%、RBL-2H3 細胞では 0.2%と、上皮系の細胞(A431(0.4%以上)、B16 メラノーマ(0.9%以上)、NHEK(F)(0.5%以上))に比べ低い値を示し、細胞毒性が強く表れた。一方、LU205 では 6 種類全てが 0.5%以上を示した。CHO 細胞への LU175 による細胞毒性に関しての抗酸化剤の効果を調べたところ、SOD、マンニトール、アスコルビン酸、グルタチオンペルオキシターゼ作用時に対照より有意に生存率が増加した。SOD が最も高い細胞毒性発現抑制効果を示し、1000 u/mL 作用時で約 70%の抑制率を示した。カタラーゼ 1 mg/mL 作用時でも細胞毒性発現抑制効果が見られたが、同時に酸化チタン非存在下で細胞毒性を示したので現在検討中である。また、6種類の細胞に 0.01%暴露した後の取り込み量を調べた

結果、LU175 では NHSF がサイトゾール画分の局在が 20.9%、ミクロソーム画分の局在が 2.5%と細胞膜を通過して細胞内への移行性が最も高かった。次いで CHO 細胞(4.6%)、A431(3.2%)、16 メラノーマ及び RBL-2H3 細胞(1%)、NHEK(F) (0.1%)、であった。一方、LU205 では 6 種全ての細胞において 97%以上が細胞膜画分に存在し、サイトゾール画分の存在量は 0.2%以下、ミクロソーム画分の存在量は 2.7%以下であり、細胞膜に局在することが明らかとなった。

腸管吸収評価モデルである Caco-2 細胞単層膜を用いた TiO₂ 粒子の透過に関する検討において LU175 および LU205 は、共に 1 %の濃度まで Caco-2 細胞に対して細胞毒性を示さないことが確認された。また、酸化チタン粒子を 0.01~0.1 %の濃度で混在させ、トランスレートに及ぼす効果を調べたところ、LU175 および LU205 は共にテキサスレッド蛍光デキストラン(分子量 3,000)蛍光デキストランの透過に影響を及ぼさなかった。そこで、酸化チタン粒子が Caco-2 細胞単層膜を透過するか否か検討を行ったところ、LU175、LU205 共に腸上皮細胞単層膜を透過することが明らかになった。特に LU205 に関しては濃度依存的な透過が確認された。透過率は LU175(0.1%)の場合に約 0.2%、LU205(0.1%)では 0.1%であった。また、Caco-2 細胞への酸化チタンの取り込みの様子を顕微鏡で観察したところ、LU175(平均粒子径 20 nm)および LU205(平均粒子径 250 nm)共に、細胞に凝集して存在している様子が観察された。

遺伝毒性に対する検討では、まず、CHL 細胞に TiO₂ 懸濁液を添加し、72 時間培養後、その細胞増殖性と、小核誘発性を調べた。その結果、最低用量の 0.3125mg/ml で細胞毒性が現れ、0.6255mg/ml まで用量依存性のある小核の誘発が観察された。それ以上の濃度では、細胞毒性のため小核頻度は逆に下がった。小核の最大誘発頻度は無処理の約 2 倍程度であった。また、ヒトリンパ芽球 TK6 細胞を用いた検討(48 時間培養後、生存率、コメット試験による DNA 損傷性、小核誘発性)では、用量依存的な細胞毒性と、DNA 損傷が観察されたが、その程度は軽微であった。また、小核の誘発も観察されたが、その

程度は低かった。その後行った TK 突然変異試験においても、用量依存的な突然変異の増加が観察された。最高用量での突然変異の増加は、無処理対照群の約 5 倍であった。

⑤国際動向調査

ナノマテリアルのハザードに関する文献を収集して査読を行い、その信頼性等を評価したうえで整理を行った。文献は、(1)カーボンナノチューブ、(2)フラーレン、(3)金属粒子、(4)量子ドット、およびその他の(5)ナノ粒子一般に分けられ、整理された。また、各国のナノ材料における取り組みの流れとしては、米国、ヨーロッパと日本において、市販アプリケーションのためにナノテクノロジーの利用を促進し、拡大するための計画があるが、その中でヒトの健康と環境への安全性を確保するためのこれらの材料に対する信頼性の高いリスク評価と安全性評価法の開発が、重要事項として取り上げられている(Thomas, K. et al., 2006)。

また、11月に行われた第27回の American College of Toxicology 学術年会において、“EVALUATING THE HUMAN HAZARDS FROM EXPOSURE TO NANOMATERIALS”というテーマでシンポジウムが開催され、その中で、当研究班の背景や研究計画と一部の成果について発表する機会を得た。当シンポジウムは、主催者である ILSI-Health & Environmental Sciences Institute (HESI)は現在、国際的なナノマテリアルの評価研究に関する研究所間コンソーシアムを組織して共同研究を行っており、当研究班との情報共有が、今後の研究進展にとって重要であるという意見交換が行われた。

OECD では、ナノマテリアルの厳密な安全性評価手法の開発を支援するために、ヒト健康および環境に対する産業用ナノマテリアルの安全性に関する国際協力を促すことを目的として(WPMN: Working Party on Manufactured Nanomaterials)が設立された。この WPMN で優先的おこなう事項としては、

1. 定義、用語、特性、2. 環境影響 (有害性の確認、有害性および暴露評価法)、3. ヒト健康影響 (有害

性の確認、有害性および暴露評価法)、4. 規制の枠組み (情報交換)、をあげており、以下の 6 つのプロジェクトが WPMN のサブグループ(SG)として進行している。

- SG1: EHS Researchに関する OECD データベース
- SG2: 産業用ナノマテリアルに関する研究戦略
- SG3: 代表的な産業用ナノマテリアルの安全性試験
- SG4: 産業用ナノマテリアルとテストガイドライン
- SG5: 任意の枠組みおよび規制プログラムの協調
- SG6: リスクアセスメントの協調

各国の関連活動との連携が WPMN にとって非常に重要であることを念頭において、WPMN 内 (プロジェクト間)、OECD 内 (その他の OECD プログラム)、およびその他の国の国際的なイニシアティブとの間で調整が行われている

D. 考察

in vivo 生体影響評価手法の開発研究においては、アスベストの短期発がんモデル系として p53(+/-) マウスを用いて、MWCNT の短期発がん試験を実施した。今回の投与経路は、腹腔内投与である。本実験結果は、病理組織学的検査を待たなければならないところであるが、MWCNT が、中皮細胞と長期間接触することにより、中皮腫を誘発する可能性があることを示唆するものであるが、使用した動物種が P53 ヘテロノックアウトマウスであり、催腫瘍性に鋭敏なマウスであることは、有害性評価上考慮すべき点である。吸入暴露による検証の必要性については、論議の分かれるところであり、齧歯類の吸入暴露手法がまだまだ確立していないこともあるが、過去の吸入暴露実験による齧歯類の発癌感受性が人のそれに対して著しく低く、発癌ポテンシャルを過小評価する可能性、そして、むしろ齧歯類における腹腔内投与結果との対応の方が、人における発癌ポテンシャルを正に評価するのではないかと指摘がある。何れにせよ、吸入暴露系の確立にはさらに多くの研究リソースを必要とする。さらに手法確立後も慢性影響を検討するために相応の時間が必要な状況である。人における発癌過程には 10 年単位の時間を要する。その為、

齧歯類(最長 2 年程度)で発癌性を発揮するファイバー状物質でも、ガラス繊維の如く体内での変性、分解、或いは排泄が10年単位で進行するものでは、人における発がん性は著しく低下するが殆ど認められない。従って、MWCNT の 10 年単位で見た場合の生体内運命を明らかにすることが、人における発がん性を評価する次善の策として考えられる。これには、EC の基準でもある、肺内からの排出半減期を気管内投与方により求めること、及び、生体内変性・分解速度を求める実験の実施が考えられる。

被検物質を水溶液の状態ですべて肺内に噴霧する我々の開発した方法は、色素等を用いた予備試験では肺胞内に十分送達され、また呼吸からの排出は殆どなかった。この方法において、雌ラットにおいてプロモーション作用が観察されたことは、既に知られている TiO₂ による雌ラットの肺発がん性を示すこととの結果の整合性が確認された。しかし、今回の実験では DHPN によるバックグラウンドの肺腫瘍が少なかったために用量効果を確認するには至らなかった。また過去の TiO₂ やカーボンブラックについての報告では発生した腫瘍は扁平上皮腫やがんが多いので、次年度にて DHPN の投与量を多くした実験を計画している。また、TiO₂ は肺、肝、卵巣、腎、リンパ節等に蓄積されていることが分かった。従って、サテライト実験等を組んで TiO₂ による炎症反応や ROS 産生について解析を進める予定である。

ナノ粒子の気管内投与評価手法の開発において、MWCNT の投与液調製は、使用する媒体により単離する繊維が異なることが示唆された。また、メノウ乳鉢を用いて懸濁液をすりつぶすことで、単離繊維が増加することも確認された。しかし、MWCNT の易凝集性の強さから、これらの方法においても懸濁液中の凝集塊を取り除くことは不可能であった。このため、サイズの大きな凝集塊をマイクロレベルのフィルター濾過により取り除くことで単離繊維が多く含有される懸濁液を調製可能であることを今回の研究では明らかにした。ただし、その懸濁液中の MWCNT 濃度が低くなり、文献報告と比較可能な濃度の単離繊維を多く有する懸濁液の調整法については、今後の検討

が必要なものと考えられた。凝集塊の多い懸濁液と単離繊維の多い懸濁液との比較では、投与後すぐに発現する短期毒性については凝集塊の多い懸濁液において強く発現する傾向が認められた。これに対し、投与から 4 週間を経過した時点での影響は、単離繊維の多い懸濁液において強く発現する傾向が認められた。しかし、これらの変化の詳細については、継続して実施する各種検査データにより明らかにするものである。

吸入暴露装置の開発における、ダスト状態での発生では、従来法に変わる発生法を考案し、MWNT のダストによる 4 時間の連続発生が可能であった。しかし、再現性と経時的な濃度低下の問題は、時間経過ごとの発生粒子数の減少に依存した暴露濃度の低下と推測された。また、MWNT 粒子の分散にはある程度の空気量が必要であることが示唆された。さらに、いずれの発生条件においても測定器(Model 3034)の測定範囲(10-487 nm)を超えて巨大粒子が存在することが明らかなヒストグラムが得られ、MWNT が凝集した状態で発生されている可能性が高いものと思われた。今後の課題として、時間経過ごとの安定な発生法の確立、あるいは日間での再現性の向上を図る必要がある。今回の結果から、500 nm 以上の粒子の存在も示唆されており、発生された MWNT 粒子の全体像を捕らえることも必要と考える。また、粒子の凝集が疑われることから、MWNT の分散性については今後も検討の必要があると思われる。

ミスト状態での発生に関しては、暴露濃度測定で媒体のみの発生も含め、いずれの濃度の懸濁液においても明確な差は見出せなかった。しかし、濃度測定時の捕集フィルターについては、濃度依存的に MWNT 由来の着色(黒色)が認められ、懸濁液濃度に依存した MWNT の発生が行われていることが明らかであった。粒度分布測定で得られたヒストグラムは、媒体と MWNT 含有懸濁液のヒストグラムがほぼ同様の形状であることから、本懸濁液中での MWNT の分散性は良好であったと推察される。しかし、今回、界面活性剤として動物への毒性影響が明らかな Tween 20 を用いており、動物への暴露実験には、界面活性剤の選択など改善の余地が有る。

また、濃度測定においても、重量法以外の方法を検討する必要があると思われる。

電子顕微鏡(電顕)による MWCNT の分散および形状分布の検討では、測定の分散剤として、TX-100 が検討した分散剤の中で最もよく分散することができると認められた。長さとの幅の計測結果ではその分布から、 $10\mu\text{m}$ を超える長い比較的長い MWCNT が存在していることがわかった。鉄(質量数 56)の平均濃度は 0.35% であり、その他にイオウおよび塩素が検出された。

フラーレンのマウスへの腹腔内投与法の検討および体内分布の評価では、臓器重量と臓器中フラーレン濃度の積から各臓器中のフラーレン量を算出し、測定対象の臓器におけるフラーレンの負荷量分布を調査した。その結果、肝臓における負荷量が 59.9~85.6% であったが、脾臓の負荷量も 13.8%~36.2% と比較的高値を示し、体内に取り込まれた C60 が脾臓のマクロファージによって貪食されていることが推測された。今後詳細に検討する予定である。

C60 の OECD テストガイドライン 301C 試験法による分解性試験では、変化物は生成しなかったと判断されたが、使用した活性汚泥は、国内の限定された地域の環境条件を均質にしたものであり、処理場汚泥などを使用した場合の本質的な生分解の有無を結論付けるものではないと考えられる。よって、更に異なる環境条件での試験を実施し、確認することが望まれる。特に、光による変化の有無についても調査する必要があると考えられた。

in vitro 試験系における培養細胞に対するフラーレンの暴露条件の検討で9種の分散剤を用いて暴露した結果、PS、PG、PI、PC および TransFast™ Transfection Reagent のみが検出可能な濃度でフラーレンを細胞に取り込ませることができると明らかとなった。取り込み・付着量は、添加濃度依存的に増加し、TransFast™ Transfection Reagent > PS > PG > PI > PC の順であることが明らかとなり、添加量に対する取り込み・付着効率は、リン脂質の種類に依存することが明らかとなった。したがって、リポソームを構成するリン脂質としては PS が最もよいと考えられる。一般的に、PC と PS を濃度比1:1で混合してリポソーム

を作製することが多く、PC/PS のリポソームによる取り込み量および取り込み率についても検討する予定である。

フラーレンを内包したリポソームをマクロファージに添加した結果、マクロファージ内にフラーレンが取り込まれる様子が観察されたが、マクロファージに取り込まれたフラーレンの量が明らかでない。フラーレンの定量系を構築し、調整したリポソームにおけるフラーレン、マクロファージに取り込まれたフラーレンを定量する必要がある。

γ -シクロデキストリンを用いて可溶化した C60 により、アセチルコリン受容体チャネルの活性は約 10% 低下した。以前に検討した ATP 受容体チャネルに対しては、C60 は活性を約 50% 低下させており、これに比べて作用はかなり弱いと考えられる。また、C60 は d-TC のアセチルコリン受容体チャネルに対する抑制作用をほぼ消失させた。このことは、C60 が d-TC の作用点(おそらくはチャネル孔)において、競合的に阻害する可能性を示唆している。これらの検討を通じ、この発現系は C60 の神経等の細胞機能への影響を評価するのに有用であることが示された。

TiO_2 は難溶性の粒子物質で白色色素として、ペンキ、紙、プラスチック、溶接棒のコーティング物質、食品着色料等に広く用いられている。また、近年ナノサイズの TiO_2 は化粧品や、医薬品等に使用されるようになった。通常、またはナノサイズの TiO_2 はヒト、および動物では生物学的に不活化物質とされている。しかしながら最近、動物実験や疫学的研究からナノサイズの TiO_2 の暴露により、肺の炎症、繊維化、さらには肺ガンの発生等が起こることが指摘されている。

酸化チタンの培養細胞系に対する検討で、粒子径の小さい酸化チタンは大きいものに比較して NHSF、CHO 細胞 RBL-2H3 細胞に対しては明らかに強い細胞毒性を示し、NHSF に対しては最も強い細胞毒性を示し、サイトゾール画分及びミクロソーム画分への移行性も高かった。一方、NHEK(F)などの上皮系の細胞ではサイトゾール画分及びミクロソーム画分への移行は少なく、細胞毒性もほとんど認められないか、弱かった。一方、粒子径の大きい酸化チタンは細胞の種類によらず細胞毒性をほとんど示さず、サイトゾ

ール画分及びマイクロソーム画分への移行は少なかった。これらの結果より細胞内に移行した酸化チタンが細胞毒性に関与している可能性が示唆された。抗酸化剤の影響を検討した所、SOD が最も細胞毒性防御効果が高かったことから、細胞毒性発現にスーパーオキシド等、酸化ストレスの増大が関与している可能性が示唆された。

ヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞に対して、酸化チタン粒子 LU175(平均粒子径 20 nm) および LU205(平均粒子径 250 nm) は 1% の高濃度まで細胞毒性を示さなかった。さらにメンブランフィルター上に細胞単層膜を形成させた場合にも、膜の安定性には影響を与えなかった。蛍光標識デキストランの温度依存的輸送に対して、酸化チタン粒子は、影響を与えなかった。しかしながら、どちらの粒子を添加した場合にも、下部ウェルにチタンが検出され、Caco-2 細胞は、酸化チタン粒子を apical 側 から basolateral 側 へと輸送してた。この輸送が積極的なものであるのか否かを明らかにするためには、今後、温度やエネルギー依存性を検討する必要があると考えられる。

細胞レベルにおいてもナノサイズ TiO_2 は線維芽細胞、リンパ球細胞において、細胞毒性を示し、小核や、姉妹染色体交換、遺伝子突然変異を誘発することが報告されている。これら遺伝毒性の程度は強くないが、再現性があるため、弱いながらも TiO_2 は遺伝毒性物質と考えられる。今回の我々の研究結果もこれら報告を支持するものである。DNA 損傷性、小核誘発性、TK 遺伝子突然変異は全て陽性を示した。CHL では低濃度から毒性を示したが、それはおそらく TiO_2 の凝集物が細胞表面を圧迫するため、物理的損傷による影響と考えられる。しかしながら、低濃度領域では濃度依存的に小核の誘発が観察されたことから、小核誘発の遺伝毒性は細胞毒性の影響だけとは思われない。ナノ物質のような不溶性物質の *in vitro* 試験にはリンパ球のような浮遊性細胞の方が適しているのかもしれない。また、細胞処理時の TiO_2 を観察したが、そのほとんどは凝集し、約 1 μm の直径をもつ不溶物であった。従って、厳密にはこれら試験結果はナノサイズの TiO_2 を評価したものであるのではない。懸濁方法の検討や、フィルター濾過等により、細胞処理レベル

でナノサイズ TiO_2 の評価が必要と考える。 TiO_2 の遺伝毒性のメカニズムに関してはほとんどわかっていないが、一方、 TiO_2 は光を照射することにその毒性が増強することが報告されている。この反応は、カタラーゼや、SOD の処理によって抑制されることから、損傷には過酸化水素や、活性酸素の産生が関与するものと考えられる。 TiO_2 は化粧品等に使用されていることから、光によるその毒性の影響を検討することは重要な課題である。*In vitro* 遺伝毒性試験で、光照射の影響を検討することが時期のテーマである。

ナノマテリアルのハザードに関する文献を収集した結果、現時点での、これらの報告の多くは断片的なものであるとともに、再現性等それらの信頼性を確認する必要があるものもあり、ナノマテリアルのヒトの健康や環境中生物に対する有害性の程度を定量的に把握することは困難である。さらなる知見の蓄積が必要である。国際動向調査では、国際的な情報の共有化や、研究および評価法に関する調和化が求められている中、OECD で産業用ナノマテリアルに関する作業グループが設置されるなど、国際的に代表的ナノマテリアルでの試験研究や試験法の調和化に向けた動きが具体化し始めていることを確認した。

E. 結論

ナノマテリアルの短期発がんモデルとして、雄 p53(+/-)マウスにMWCNTを単回腹腔内投与し、26週間観察した結果、肉眼的所見の結果からは、腹腔内に腫瘍が発生し、その程度は重量ベースではアスベストと同程度であると考えられた。一方、同期間内のフラレーン投与では発がん促進性は見られなかった。

TiO_2 粒子などを中心的な対象物質として、専用の設備を要しない肺内投与法を検討し、経気管噴霧法を開発した。これを応用してラットにおける肺発がんプロモーション作用が検出された。従って過去の報告のように TiO_2 の発がん性を検出するモデルとしては実用化の可能性が示された。

MWCNT を気管内投与する際の懸濁液調製において、人造肺サーファクタントであるサーファクテンは MWCNT の易凝集性を軽減する

ことのできる媒体であること、単離 MWCNT 繊維を得るためにはフィルター濾過が有用な方法であることが判明した。MWCNT の凝集塊および単離繊維のバランスが異なる懸濁液を気管内投与した結果、そのバランスが生体に対して異なる影響を及ぼすことが示唆された。

ダスト状態での MWNT 発生法の検討を行った結果、粒子の凝集が疑われるものの、MWNT の有り姿での発生方法についての技術基盤が構築できたと考える。ミスト状態での MWNT 発生法の検討を行った結果、暴露濃度の実測定には至らなかったものの、MWNT がナノ粒子として発生できる可能性が見出された。

電子顕微鏡(電顕)による MWCNT の分散および形状分布の検討では、分散剤として TritonX-100 が検討した分散剤の中で最もよいことが認められた。検討した MWCNT の長さは 1 から 5 μm の分布が多く、10 μm を超える長い MWCNT も散見された。幅(直径)は、70nm から 90nm に多く分布している傾向がみられた。検出された主な元素は、鉄およびイオウで、塩素およびアルミニウムがあわせて検出された。ICP-MS による、鉄(質量数 56)の平均濃度は 0.35% であった。

フラレーンのマウスへの腹腔内投与法の検討および体内分布の評価において、1.92 $\mu\text{l/g body wt}$ の容量で、1-メチル-2-ピロリドンに溶解したフラレーンをマウス C57BL/6CrSlc 雄 8 週齢に、腹腔内投与した結果、投与群の脾臓、肝臓、腎臓からフラレーンが検出された。検出された三種の臓器では、単位湿重量当たりの濃度は脾臓が最も高く、最高値で 8058 ng/g 湿重当りであった。

OECD テストガイドライン 301C に準拠した試験法による分解性試験では、フラレーン(C60)は微生物により分解されなかった。

培養細胞に対するフラレーンの暴露条件の検討で、検討した9種の分散剤では、PS、PG、PI、PC および TransFast™ Transfection Reagent が検出可能な濃度でフラレーンを細胞に取り込ませることができ、取り込み・付着量は添加濃度依存的に増加し、TransFast™ Transfection Reagent > PS > PG > PI >

PC の順であることが明らかとなった。

フラレーン C60 を内包したリポソームを作成し、培養腹腔マクロファージに添加し、C60 の細胞内導入を試みたところ、細胞内に脂質ドロップレットが観察され泡沫化が引き起こされることが示されたが、細胞増殖性に関する急性毒性は認められなかった。

発現系を用いてナノマテリアルの神経細胞機能に対する影響を評価する系について検討を行ない、 γ -シクロデキストリンで可溶化された C60 がヒトニコチン様アセチルコリン受容体に対して弱い抑制作用を示すこと、ATP 受容体チャネルの発現過程に明確な作用を示さないことが明らかとなった。

酸化チタンの培養細胞系に対する暴露評価では、細胞の種類により細胞毒性に与える影響が異なり、また、粒子径がナノサイズの酸化チタンは粒子径の大きいものに比較して単層培養細胞に対する細胞毒性が強く、細胞内に移行しやすいことが示唆された。細胞毒性発現にスーパーオキシド等、酸化ストレスの増大が関与している可能性が示唆された。

腸管吸収評価モデルである Caco-2 細胞単層膜を用い、酸化チタンの透過を検討した。Apical 側に LU175(平均粒子径 20 nm)あるいは LU205(平均粒子径 250 nm)を添加すると、basolateral 側にチタンが検出されることが判明した。両粒子とも細胞に凝集して存在する様子が観察されたが、細胞毒性を示さず、細胞単層膜の安定性や、細胞のトランスサイトシス機能には影響を与えなかった。

ナノ粒子の一つである超微粒子酸化チタン(TiO_2)について、その in vitro 遺伝毒性を評価した。 TiO_2 をチャイニーズハムスター由来 CHL 細胞で 72 時間処理したところ、強い細胞毒性と、小核の誘発が観察された。また、ヒトリンパ芽球 TK6 細胞で 48 時間処理したところ、 comet 試験による DNA の損傷と、小核の誘発が観察された。その後、TK 突然変異の誘発も用量依存的に観察された。全ての遺伝毒性エンドポイントで陽性を示したことから、 TiO_2 は in vitro において遺伝毒性を有すると考えられる。しかしながら、その用量と反応の程度を考慮すると、その強さは大きくはない。

ナノマテリアルのハザードに関する文献を収集した結果、現時点での、これらの報告の多くは断片的なものであるとともに、再現性等それらの信頼性を確認する必要があるものもあり、ナノマテリアルのヒトの健康や環境中生物に対する有害性の程度を定量的に把握することは困難であることが示された。国際動向調査では、国際的な情報の共有化や、研究および評価法に関する調和化が求められている中、OECDで産業用ナノマテリアルに関する作業グループが設置されるなど、国際的に代表的ナノマテリアルでの試験研究や試験法の調和化に向けた動きが具体化し始めていることを確認した。

F. 健康危機情報

該当なし

F. 研究発表

1. 論文発表

Fukushima, S., Wanibuchi, H., Morimura, K., Nakae, D., Tsuda, H., Imaida, K., Shirai, T., Tatematsu M., Tsukamoto, T., Hirose, M. and Furukawa, F. Lack of potential of low dose N-nitrosodimethylamine to induce preneoplastic lesions, glutathione S-transferase placental form-positive foci, in rat liver. *Cancer Lett.* 222:11-15, 2005.

Tsuda, H., Fukamachi, K., Ohima, Y., Ueda, S., Matsuoka, Y., Hamaguchi, T., Ohnishi T., Takasuka N. and Naito, A. High susceptibility of human c-Ha-ras protooncogene transgenic rats to carcinogenesis: A cancer-prone animal model. *Cancer Sci.* 96(6): 309-316, 2005.

Kohno, H., Suzuki, R., Sugie S., Tsuda, H. and Tanaka, T. Dietary Supplementation with silymarin inhibits 3,2'-/4-Dimethyl-4 Aminobiphenyl-induced Prostate Carcinogenesis in Male F344 rats. *Clin Cancer Res.* 11(13): 4962-67, 2005.

Morimura, K., Kang, J.S., Wei, M., Wanibuchi, H., Tsuda, H. and Fukushima, S. Lack of Urinary Bladder Carcinogenicity of Sodium L-Ascorbate in

Human c-Ha-ras Proto-Oncogene Transgenic Rats. *Toxi Path.*, 33:764-767, 2005.

Suzuki, R., Kohno, H., Suzui, M., Yoshimi, N., Tsuda, H., Wakabayashi, K. and Tanaka, T. An animal model for the rapid induction of tongue neoplasms in human c-ha-ras proto-oncogene transgenic rats by 4-nitroquinoline 1-oxide: its potential use for preclinical chemoprevention studies. *Carcinogenesis.* 27(3): 619-630, 2006

Tsuda, H., Fukamachi, K., Jiegou, X., Sekine, K., Ohkubo, S., Takasuka, N. and Iigo, M. Prevention of carcinogenesis and cancer metastasis by bovine lactoferrin. *Proc. Jpn. Acad., Ser.B* 82: 208-215, 2006

Ueda, S., Fukamachi, K., Matsuoka, Y., Takasuka, N., Takeshita, F., Naito, A., Iigo, M., Alexander, D.B., Moore, M. A., Saito, I., Ochiya, T., and Tsuda, H. Ductal origin of pancreatic adenocarcinomas induced by conditional activation of a human Ha-ras oncogene in rat pancreas. *Carcinogenesis.* 24(12): 2497-2510, 2006

Onishi, T., Fukamachi, K., Ohshima, Y., Jiegou, X., Ueda, S., Iigo, U, Takasuka, N., Naito, A., Fujita K., Matsuoka Y., Izumi K., and Tsuda, H. Possible application of human c-Ha-ras proto-oncogene transgenic rats in a medium-term bioassay model for carcinogens. *Tox. Pathol.* 2006, in press.

Koyama, N., Sakamoto, H., Sakuraba, M., Koizumi, T., Takashima, Y., Hayashi, M., Matsufuji, H., Yamagata, K., Masuda, S., Kinae, N., and Honma, M. Genotoxicity of acrylamide and glycidamide in human lymphoblastoid TK6 cells. *Mutat. Res.*, 603, 151-158 (2006)

Oka, H., Ikeda, K., Yoshimura, H., Ohuchida, A., Honma, M. Relationship between p53 status and 5-fluorouracil sensitivity in 3 cell lines. *Mutat. Res.*, 606, 52-60 (2006)

Umebayashi, Y. Honma, M., Abe, T., Ryuto, H. Suzuki, H., Shimazu, T., Ishioka, N., Iwaki, M.,

- Yatagai, F. Mutation induction after low-dose carbon-ion beam irradiation of frozen human cultured cells. *Biological Sci. in Space*, 19, 237-241 (2006)
- Burlinson, B., Tice, RR., Speit, G., Agurell, E., Brendler-Schwaab, SY., Collins, AR., Escobar, P., Honma, M., Kumaravel, TS., Nakajima, M., Sasaki, YF., Thybaud, V., Uno, Y., Vasquez, M., and Hartmann, A. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: Results of the in vivo Comet assay workgroup *Mutat. Res.*, 627, 31-35 (2007)
- Moore, MM., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, J., Burlinson, B., Cifone, M., Clark, J., Clay, P., Doppalapudi, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, J., Muster, W., Pant, K., Kidd, DA., Lorge, E., Lloyd, M., Myhr, B., O'Donovan, M., Riach, C., Stankowski, Jr. LF., Thakur, AK., and Van Goethem, F. Mouse lymphoma thymidine kinase gene mutation assay: Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Testing, San Francisco, 2005, recommendations for 24-h treatment. *Mutat. Res.*, 627, 36-40 (2007)
- Ku, WW., Bigger, A., Brambilla, G., Glatt, H., Gocke, E., Guzzie, PJ., Hakura, A., Honma, M., Martus, H-J., Obach, RS., and Roberts, R. Strategy for genotoxicity testing—Metabolic considerations *Mutat. Res.*, 627, 59-77 (2007)
- Wang, J., Chen, T., Honma, M., Chen, L., Moore, M. 3'-Azido-3'-deoxythymidine induces deletions in L5178Y mouse lymphoma cells. *Environ. Mol. Mutagen.*, 48, 248-257 (2007)
- Usami, M., Mitsunaga, K. and Nakazawa, K. Two-dimensional electrophoresis of protein from cultured postimplantation rat embryos for developmental toxicity studies. *Toxicology In Vitro*, 21, 521-526(2007)
- Sato, K., Nakazawa, K. β -Estradiol induces synaptogenesis in the hippocampus by enhancing brain-derived neurotrophic factor release from dentate gyrus granule cells. *Brain Res.*, 1150, 108-120(2007)
- 山越葉子, 中澤憲一, 土屋利江:原子間力顕微鏡 (AFM)によるタンパク質のイメージング, *日本臨床* 65:270-277 (2007)
- Ema M, Fujii S, Ikka T, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E. Early pregnancy failure induced by dibutyltin dichloride in mice. *Environ Toxicol*, 22, 44-52, 2007.
- Ema M, Fujii S, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E. Prenatal developmental toxicity study of basic rubber accelerator, 1,3-di-o-tolylguanidine, in rats. *Reprod Toxicol*, 22, 672-678, 2006.
- Ema M, Fukunishi K, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E, Ihara T. Developmental toxicity of dibutyltin dichloride in cynomolgus monkeys. *Reprod Toxicol*, 23, 12-19, 2007.
- 高橋美加, 松本真理子, 川原和三, 菅野誠一郎, 菅谷芳雄, 広瀬明彦, 鎌田栄一, 江馬 眞. OECD 化学物質対策の動向(第9報) — 第17回 OECD 高生産量化学物質初期評価会議(2003年アローナ), *化学生物総合管理学会誌*, 2, 163-175, 2006.
- 高橋美加, 松本真理子, 川原和三, 菅野誠一郎, 菅谷芳雄, 広瀬明彦, 鎌田栄一, 江馬 眞. OECD 化学物質対策の動向(第10報) — 第18回 OECD 高生産量化学物質初期評価会議(2004年パリ), *化学生物総合管理学会雑誌*, 2, 286-301, 2006.
- 高橋美加, 松本真理子, 川原和三, 菅野誠一郎, 菅谷芳雄, 広瀬明彦, 鎌田栄一, 江馬 眞. OECD 化学物質対策の動向(第11報) — 第19回 OECD 高生産量化学物質初期評価会議(2004年ベルリン), *国立医薬品食品衛生研究所報告*, 124, 62-68, 2006.
2. 学会発表
- 菅野 純, ナノテクノロジー商品化における安全性確認の要諦、ナノテクノロジー商品化調査研究委員会, 三井業際研究所(2006.9.8)
- 「毒性学からみたアスベスト」、平成18年度日本癌学会シンポジウム「環境発がんについて考える:リスク評価からリスクマネージメントの時代へ」、国立が

- んセンター国際研究交流会館、2006年7月29日
「夢の素材—ナノ粒子は安全か？」日本学術会議第1
3回界面シンポジウム「アスベスト問題における理・
工学と医学の接点」日本学術会議講堂、2006年
9月22日
内野 正、五十嵐良明、徳永裕司、広瀬明彦：酸化
チタンの培養細胞に対する生体影響評価、第 12
回バイオアッセイ研究会・日本環境毒性学会合同
研究発表会 2006.9
- Nishimura T., Kubota R., Tahara M.,
Nagaoka-Hamano M., Shimizu K., Hirose A. and
Tokunaga H. :Biological Effects of Fullerene C60 in
Mouse Embryonic Stem Cells. EUROTOX2006/6
CTDC Congress. 2006.9.
- 西村哲治, 清水久美子, 久保田領志, 田原麻衣子,
広瀬明彦, 徳永祐司:培養細胞に対するフラー
レン(C60)の影響評価法の検討, フォーラム 2006 衛
生薬学・環境トキシコロジー講演要旨集, p270,
2006.10.
- 西村哲治, 清水久美子, 久保田領志, 田原麻衣子,
長岡(浜野)恵, 広瀬明彦, 徳永祐司:フラー
レンのマウス幹細胞に対する影響, 第 43 回全国衛生
化学技術協議会年会, p155-156, 2006.11.
- Kubota, R., Tahara, M., Shimizu, K., Tokunaga, H.,
Hirose A., and Nishimura, T. (2006) : Tissue
distribution of C60 fullerene in mice after
intraperitoneal administration by liquid
chromatography – tandem mass spectrometry. 27th
Annual Meeting of American College of Toxicology,
Indian Wells, USA, November, abstract, 66.
- Nishimura T., Hirose A., Kanno J., Nakazawa K.,
Honma M., Mogami T., Tuda H., Arai H.,
Takatsuki M., Ichinose F., Yakata N. and Wako K.:
The Framework of the Research Projects for
Establishment of Health Risk Assessment
Methodology of The Manufactured Nanomaterials
in Japan NIHS. Twenty-Seventh Annual Meeting of
The American College of Toxicology. 2006.11.
- 大村香織, 安達玲子, 西村哲治, 奥直人, 鈴木和
博:化学物質が免疫系食細胞の分化に及ぼす影
響について, 日本薬学会第 127 年会要旨集,
2007.03.
- 福森信隆, 大橋則雄, 高畑淳, 高橋博, 安藤弘, 久
保喜一, 長澤明道, 小縣昭夫, 西村哲治, 上村尚:
多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の形状およ
び分散に関する検討, 日本薬学会第 127 年会要
旨集, 2007.03.
- 本間正充 In vitro コメット試験は遺伝毒性のエビデ
ンスになりうるか? 日本環境変異原学会 MMS 研
究会第 49 回定例会 (2006.5)
- Honma M., Sakuraba M., Koizumi T., Takashima Y.,
Sakamoto H. and Hayashi M., Error-prone and
error-free nonhomologous end-joining for
repairing DNA double strand breaks in human cells.
36th Annual Meeting of the European
Environmental Mutagen Society (2006.7)
- Honma M., Yamakage K. *In vitro* Comet assay—A
possible candidate as a member of the standard
test battery. JaCVAM/MMS Joint Seminar –Pros
& Cons of Comet Assay– (2006.8)
- 本間正充, 高島良生, 安井学, 谷田貝文夫, 鈴木雅
雄, 林 真 低放射線繊維による相同組換え修飾効果
日本放射線影響学会第 46 回大会 (2006.9)
- 谷田貝文夫, 梅林志浩, 本間正充, 阿部知子, 鈴木
ひろみ, 島津徹, 石岡憲昭, 岩本正哉 ISS 利用
実験計画:宇宙環境の突然変異に及ぼす影響の
推定 日本放射線影響学会第 46 回大会
(2006.9)
- 高島良生, 櫻庭真弓, 小泉朋子, 坂本浩子, 安井学,
林 真, 本間正充 ヒト細胞に誘導された DNA 二
重鎖切断修復とその細胞周期依存性 日本放射
線影響学会第 46 回大会 (2006.9)
- Kohara A., Ozawa Y., Ohtani A., Shioda S., Takeuchi
K., Morita K., Hirano T., Honma M., Suzuki T.,
Masui T., Mizusawa H. High resolution genomic
analysis of immortal human cells and tumor cells
using array-based comparative genomic
hybridization. Environmental Mutagen Society 37th
Annual Meeting (2006.9)
- Luan Y., Honma M., Suresh T., Kogi M., Yamaguchi

- T., Suzuki T. CGH and SNP array are powerful tools for chromosome analysis. Environmental Mutagen Society 37th Annual Meeting (2006.9)
- Matsufuji H., Chino M., Hayashi M., Honma M., Yamagata K. Genotoxicity of quercetin in the presence of reactive oxygen species using human lymphoblastoid TK6 cells. Environmental Mutagen Society 37th Annual Meeting (2006.9)
- 本間正充, 鈴木雅雄, 谷田貝文夫 染色体切断に対する放射線影響の検討 日本宇宙生物科学会第 20 回大会(2006.9)
- 梅林志浩, 菅澤薫, 本間正充, 島津徹, 鈴木ひろみ, 石岡憲昭, 岩本正哉, 谷田貝文夫 放射セン適応答による突然変異の抑制 ISS 利用実験計画: 宇宙環境の突然変異に及ぼす影響の推定 日本宇宙生物科学会第 20 回大会(2006.9)
- Honma M., Sakuraba M., Koizumi T., Takashima Y., Sakamoto H. and Hayashi M., Requirement of p53 for maintenance of chromosome integrity against DNA double strand breaks. DNA Repair 2006 (2006.9)
- 本間正充 DNA2 本鎖切断修復によるゲノム安定化機構 日本環境変異原学会第 35 回大会 (2006.11)
- 斉藤美香, 高島良生, 坂本浩子, 林 真, 松藤寛, 山形一雄, 本間正充 簡便な in vitro コメット試験法の確立とその評価 日本環境変異原学会第 35 回大会(2006.11)
- 小山直己, 加藤竜也, 本間正充, 林 真, 増田修一, 木苗直秀 ヒトリンパ芽球トランスジェニック細胞を用いたアクリルアミドおよびグリシダミドの遺伝毒性試験 日本環境変異原学会第 35 回大会 (2006.11)
- 谷田貝文夫, 梅林志浩, 鈴木雅雄, 岩本正哉 染色体特定部位 DSB の修復: 低線量/低線量率ガンマ線照射による影響 日本環境変異原学会第 35 回大会(2006.11)
- 高島良生, 小泉朋子, 櫻庭真弓, 林 真, 本間正充 ライブセルイメージングによる小核の運命の追跡 日本環境変異原学会第 35 回大会(2006.11)
- 松藤寛, 千野誠, 本間正充, 林 真, 山形一雄 ヒトリンパ芽球細胞株 TK6 を用いた亜硝酸ナトリウムと抗酸化剤の複合遺伝毒性 日本環境変異原学会第 35 回大会(2006.11)
- Honma M. DNA double strand break inducing chromosome instability and its genetic consequences. International Conference on Biomarkers in Health and Environmental Management & XXXII Annual Meeting Environmental Mutagen Society of India (2007.1)
- Honma M. DNA double strand breaks inducing chromosome instability in p53-deficient human cells. Key Stone Symposia -Genome Instability and Repair (2007.1)
- Sato K, Ohno Y, Goldman JE, Nakazawa K: The establishment of the organotypic slice culture of postnatal rat forebrain involving neural progenitors labeled by eGFP-encoding retrovirus. Annual meeting of society for neuroscience 2006. 10 (Atlanta, USA)
- 佐藤 薫, 大野泰雄, James E. Goldman, 中澤憲一. 神経系前駆細胞の遊走および分化の薬理学的検討に適した実験系の確立. 第 80 回 日本薬理学会年会 2007. 3(名古屋市)
- T. Nishimaki-Mogami, Y. Kawahara, N. Tamehiro, T. Yoshida, K. Inoue, Y. Ohno, T. Nagao, M. Une Identification of 5 α -bile alcohols as farnesoid X receptor antagonists 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology (2006.6)
- 為広紀正, 河原陽介, 吉田武美, 植田和光, 横山信治, 鈴木和博, 長尾拓, 最上(西巻)知子 Verapamil による ABCA1 発現誘導機構 第38回日本動脈硬化学会総会・学術集会(2006.7)
- Hirose A: Japan NIHS efforts to evaluate the human health hazards associated with exposure to nanomaterials. The 27th Annual meeting of American College of Toxicology (2006.11)
- Hirose A, Kamata E, Akiyama H, Takahashi M, Ema M, Hayashi M: Development of in silico

genotoxicity predicting system on chromosomal aberration for existing industrial chemicals. EUROTOX 2006 (2006.9)

Ema M, Matsumoto M, Takahashi M, Hirata-Koizumi M, Hirose A, Kamata E, Hasegawa R, Yamamoto N: The Contribution of the Japanese Government to the OECD High Production Volume Chemicals Programme: Summary of 1st to 21st SIDS Initial Assessment Meetings. First U.S. Conference on Characterizing Chemicals in Commerce: Using Data on High Production Volume (HPV) Chemicals (2006. 12)

Hirose A, Yamazoe Y, Ema M, Kawamura Y: Toxicity testing schema for the initial risk assessment of food contact plastics based on the concept of TTC and usage probabilistic factors. The 46th Annual Meeting of the Society of Toxicology (2007.3)

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

平成 18 年度厚生労働科学研究費補助金
(化学物質リスク研究事業)

Ⅱ. 分担研究報告書