

厚生労働科学研究費補助金研究報告書

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

平成 20 年度

総括・分担研究報告書

研究代表者 広瀬 明彦

国立医薬品食品衛生研究所

平成 21 年 (2009 年) 4 月

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20年度 総括・分担研究報告書  
研究代表者 広瀬 明彦

平成21年(2009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. 研究分担報告書	17
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	18
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	27
4. ナノ粒子の繊維状形態に関わる生体反応マーカーの開発研究	
樋野 興夫	33
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	36
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	41
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	44
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	52
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	56
10. 産業用ナノマテリアルの経気道投与および粉体暴露手法に関する基礎的研究	
涌生 聖	63
11. 高生産量ナノマテリアルの健康影響評価に関する調査研究	
広瀬 明彦	75
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	83
IV. 研究成果の刊行物・別冊	87

平成20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



平成 20 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)  
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

研究代表者: 広瀬 明彦 国立医薬品食品衛生研究所 総合評価研究室長

### 研究要旨

産業用ナノマテリアルは新用途への展開が期待されている一方で、未知の生体影響も予測され、その物理化学的特性を考慮した有害性評価手法の開発が急務であり、評価法の確立のための総合的な基盤研究を行うことを目的としている。本研究班では、このような状況の下、18 年度より高生産量のナノマテリアル(酸化チタン(TiO<sub>2</sub>)、フラーレン(C60)、多層カーボンナノチューブ(MWCNT))を検証物質として選び、*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 部門による研究を行ってきた。

平成 20 年度は、①*in vivo* 研究: 中皮腫誘発の用量依存性や分子マーカーの作成、発がん性のメカニズム解析、②吸入試験法研究: 気管内投与液における分散性の検討、③暴露測定法/動態解析研究: MWCNT の電子顕微鏡による確認法と C60 の体内挙動、C60 の土壌中の動態、④*in vitro* 研究: TiO<sub>2</sub> の紫外線との複合効果、MWCNT による神経細胞機能とリポソーム分散手法の違いによる差異等の検討、⑤国際動向調査: 19 年度に引き続き OECD のナノマテリアル作業グループ(WPMN)等の動向調査を行った。その結果、①p53(+/-)マウスへの MWCNT の ip 投与による中皮腫誘発がより低用量からの量依存性を示すことを確認すると共に、マウスの中皮腫マーカー用のメソセリン抗体を作成した。一方、C60 の ip 投与により腎臓の瘢痕状萎縮が誘発されることを示した。また、TiO<sub>2</sub> の発がんプロモーション作用に MIP1  $\alpha$  増殖因子による肺胞上皮の増殖作用が関与することを明らかにした。②MWCNT 気管内投与時の分散状態によってマクロファージによる貪食能に差が有る可能性を示した。③MWCNT の気管内投与後の肺における半定量的検出法を確立すると共に、C60 の反復尾静脈内投与により肝臓、肺、脾臓および低濃度ではあるが腎臓への蓄積を明らかにした。また、環境中では C60 の土壌中での生分解性は認められないことが示された。④アナターゼ TiO<sub>2</sub> の光細胞毒性、MWCNT の神経系イオンチャネルや L-glu トランスポーター機能への影響、リポソーム構成成分による炎症サイトカインの産生能の差異について知見を集積した。⑤OECD の WPMN での代表的ナノマテリアルに関するスポンサーシッププログラムの開始に伴う初期評価文書作成計画書(DDP)が作成された。

以上のことより、本研究では、ナノマテリアルの健康影響を検討する際には、*in vivo* 試験法研究を中心とした研究成果より、長期体内残留による慢性影響研究の重要性や、これらの慢性影響の評価系確立のためには、慢性影響の発現メカニズム研究を行うことが必要であることを示すことができた。さらに、今後、OECD の WG で本格化する代表的なナノマテリアルによる評価試験と初期評価文書作成作業を支援できる体制が整備されたと考えられる。

## 研究分担者

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 部長

樋野 興夫 順天堂大学・医学部・病理・腫瘍学  
教授

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

最上 知子 国立医薬品食品衛生研究所  
機能生化学部 室長

涌生 聖 (株)三菱化学安全科学研究所・  
鹿島研究所 安全性第1研究部  
毒性学 副主任研究員

## 研究協力者

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 助教

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

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

福森 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

久保田領志 国立医薬品食品衛生研究所  
環境衛生化学部 主任研究官

清水久美子 国立医薬品食品衛生研究所  
環境衛生化学部

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

石田 和也 (財)化学物質評価研究機構  
久留米事業所 試験第二課

山影 康次 (財)食品薬品安全センター  
秦野研究所

中川ゆづき (財)食品薬品安全センター  
秦野研究所

佐藤 薫 国立医薬品食品衛生研究所  
薬理部 室長

奥平 桂一郎 国立医薬品食品衛生研究所  
機能生化学部

崔 紅艶 国立医薬品食品衛生研究所  
機能生化学部

## 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、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んでおり、ナノマテリアルの粒径に基づく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いない。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。これらの物理特性を考慮して、生体内挙動を把握するための分析手法の開発、in vivo では、生体内蓄積性を考慮した慢性影響を検出する手法と暴露の懸念に比較的高い吸入暴露手法の開発、生体内に取り込まれたあとの影響のメカニズムやスクリーニング法としての in vitro 系の開発、および国際動向の把握をも視野に入れた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。

## 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。

### ① in vivo 生体影響評価手法の開発:

多層カーボンナノチューブに関する試験としては、C57BL/6 背景(戻し交配 20 代以上)雄 p53 ヘテロ欠失(p53(+/-))マウス(9~11 週齢、一群 20 匹)に、前回の実験の投与量(3mg/animal(線維数として  $1 \times 10^9$  本/animal))の 1/10 の 0.3mg( $10^8$  本)を最高用量に、以下 10 の公比で、0.03( $1 \times 10^7$  本)、0.003 mg( $1 \times 10^6$  本)/animal とし、MWCNT を単回腹腔内投与した。観察期間は投与後 1 年とした。一方、雄 C57BL/6 マウス(9 週齢、一群 30 匹)にフラーレンを 3mg/animal の用量にて単回腹腔内投与し、慢性影響(特に腎への影響)を検索した。観察期間は投与後 1 年とした。また、毒性メカニズム解析の一環として、雄 C57BL/6 マウス(12 週齢)にクロシドライトを腹腔内投与後、0、2、4、8、24、48、72 時間、7 日、14 日目に腸間膜を採

取し、RNA を抽出、アフィメトリクス社の Gene Chip Mouse Genome 430 2.0 Array を用いて遺伝子発現解析を行った。その解析には定量的比較を正確に行うために、我々の開発した Percellome 手法(細胞1個当たりの mRNA 絶対量を得る遺伝子発現解析手法)を適用した(菅野)。また、腫瘍マーカーとして中皮腫等に特異的に発現する ERC 遺伝子を検出するために、5種のマウス ERC 抗体を作製してマウス ELISA 系の構築・開発を行った(樋野)。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、nTiO<sub>2</sub> 長期投与実験としては、雌 Hras128 ラットを用いた発がんプロモーション実験を行った。また、短期投与実験として野生型の雌 SD ラット(Hras128 の野生型に相当)8 日間に 5 回、気管内噴霧し、肺および乳腺における 8-OHdG の測定や各種炎症性分子マーカーの測定を行った。さらに、メカニズム解析の一環として、nTiO<sub>2</sub> で 24 時間インキュベートした初代培養肺胞マクロファージの培養上清の回収し、ヒト肺がん培養 A549 細胞の増殖への影響を検討した。(津田)

### ②ナノ粒子の吸入毒性評価手法:

多層カーボンナノチューブ(MWCNT)として、MITSUI MWCNT-7 と Sigma-Aldrich 社から購入した MWCNT の 2 種(略称:MWCNT-2 および MWCNT-3)、計 3 種を気管内投与の検討対象とした。不活化ラット血清を PBS と混合したものを媒体とし、懸濁法の投与方法検討を行った。また、最適条件で雄性 SD 系ラットに 1 mg/kg の用量で単回、気管内投与し、1 週間観察した。検査項目は、体重測定、気管支肺胞洗浄液(BALF)中の細胞数および細胞構成比、BALF 中 LDH、タンパクおよび ALP 測定、肺重量測定および肉眼的剖検とした。(涌生、広瀬)。

サンプル	頒布元	OD (nm)	ID (nm)	Length (μm)	Lot No.
MWCNT-7	MITSUI				0601250-01k
MWCNT-1	Aldrich-Sigma	40-70	5-40	0.5-2	04519DC
MWCNT-2	Aldrich-Sigma	10-15	2-6	0.1-10	12127PE
MWCNT-3	Aldrich-Sigma	110-170		5-9	03121TH



### 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 を暴露したマウス各臓器における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、ラットにフラーレン C60 のリポソーム懸濁溶液を尾静脈投与し、体内分布を調べた。各臓器から抽出したフラーレン C60 は、LC/MS/MS により定量した(西村)。また、自然環境中において、微生物により分解されないと予想されるフラーレン(フロンティアカーボン株式会社、純度99%)を用い、環境動態として水生貧毛類蓄積性試験を実施し、土壤中のフラーレン動態及び底生生物であるイトミミズ(*Tubifex tubifex*)への濃縮性の有無を調べた(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、氷砂糖と HCO-40 でらいかいしたフラーレン水分散液について、Hela 細胞の細胞毒性とマウス腹腔マクロファージの炎症性サイトカイン放出能について検討した(新井)。神経系への影響としては MITSUI MWCNT-7 と Sigma-Aldrich 社から購入した3種類の MWCNT(MWCNT-1、MWCNT-2、MWCNT-3)について、グルタミン酸(L-glu)トランスポーター機能ならびに ATP 受容体機能に対する影響評価を試みた(中澤)。リン脂質を用いた分散手法に関する検討では、Caco-2 細胞単層膜のトランスサイトーシス機能、マクロファージ系 RAW264 細胞のサイトカイン産生能に関して、肺サーファクタント脂質であるホスファチジルコリン(PC)およびホスファチジルグリセロール(PG)を利用した検討と、肺サーファクタント主成分 dipalmitoyl-PC(C16PC)と卵由来 PC を用いた分散の比較を行った(最上)。0.5w/v%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液(CMC Na)に懸濁するという条件で、二酸化チタン LU175(ルチル型)、二酸化チタン p-25(アナターズ型) および、Nanom purple SUH(C60)を用いて、マウス BALB3T3 細胞に対する光毒性を検討した(本間)。

### ⑤国際動向調査:

OECD における産業用ナノマテリアルの作業グループ、特に SG3 において本格的に開始することとなった代表的なナノマテリアルを用いた物質を選定して

各国が自主的に行うおこなうスポンサーシッププログラムについて、その動向調査を行った(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:

雄p53(+/-)マウスにMWNCTを単回腹腔内投与した結果、肉眼所見的に、0.3mg/kg群で強い腹膜癒着が、0.03mg/kgで中程度の腹膜癒着が観られた。0.003mg/kgでは、ごく軽微であった。腹腔内腫瘍の発生頻度は0.003mg/kg群で3/20(15%)、0.03mg/kg群で5/20(25%)、0.3mg/kg群で15/20(75%)であった。なお、対照群にも死亡が2匹観られたが、p53欠失マウスに自然発生することが知られている胸腺腫によるものであり、腹腔内腫瘍は観られなかった。現在、病理組織学的検査を実施しているが、最低用量の0.003mg/kg群にも中皮腫の発生が確認された。

雄 C57BL/6 マウスにフラーレンを投与した結果、体重増加抑制が有意に認められた。9ヶ月の時点において、両群より6匹ずつ途中解剖をしたところ、肉眼的にフラーレン投与群で6匹中5匹の腎に退色を伴う巣状の癍痕様萎縮巣ないし、片側腎全体の高度萎縮を認めた。この萎縮は、組織学的に尿細管の高度の巣状の萎縮より成り、一部「甲状腺様変化」を伴っていた。また、腎組織の巣状萎縮の肉眼的な程度(スコア化値)と体重増加抑制の程度には正の相関が認められた。一方、対照群には異常は認められなかった。投与46週に残り全ての動物を解剖した結果、フラーレン投与群の約2/3の動物に肉眼的に明らかな腎の萎縮を認めたが、対照群には認められず、フラーレンが少なくとも腎障害を起こすことが確認された。

アスベストによる中皮腫誘発メカニズムを解析するため、中皮反応モデルとして、腸間膜を対象にマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、細胞膜の水の通過に関わる蛋白、アクア



ポリンの増加、Wnt シグナルに関連する遺伝子発現増加を始め、細胞増殖、DNA 複製、DNA 修復関連遺伝子の増加が認められた。

腫瘍マーカーとして、マウス ERC 抗体を用いた ELISA 系の構築・開発研究では、Recombinant Mouse ERC の発現確認が終了し、各抗体(5 種)の WB 解析を行い N-ERC、C-ERC ともに反応性する事が判明した。予定通りマウス抗体の作成に成功した。31kDa 断片に結合する2種類の抗体を組み合わせ、サンドイッチ ELISA 法に基づいた測定キットの開発を進めており、さらに40kDa に対する特異的な抗体も作製した。

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・発がん性に関する研究では、無コーティングルチル型粒径 20nm 二酸化チタン ( $\text{TiO}_2$ ) の肺と乳腺に対する発がんプロモーション作用およびその発がんメカニズムを追究した。その結果、肺および乳腺において発がんプロモーション作用を示すことが明らかとなった。そのメカニズムとして、 $\text{nTiO}_2$  を貪食した肺胞マクロファージが分泌した MIP1 $\alpha$  が肺の上皮細胞に作用し細胞増殖を促進すること、さらに肺胞マクロファージが分泌した MIP1 $\alpha$  は血中に移行し、乳腺の細胞増殖を促進した結果、乳癌の促進作用も示すことを明らかにした。

## ②ナノ粒子の吸入毒性評価手法:

MWCNT を分散させる媒体のラット血清濃度としては、1 v/w%が適切であることが判明した。所定量を秤取した MWCNT に、最終濃度が 1 w/v%となる量のラット血清を添加・混合した後、所定量の PBS を加えて混和する方法が懸濁液調製の望ましい方法のひとつであった。調製した懸濁液中の MWCNT の状態は、懸濁前の MWCNT 物性により異なった。MWCNT-7 では 300  $\mu\text{m}$  程度の凝集塊を含むものの、単離した MWCNT 繊維も認められた。MWCNT-2 では、5~10  $\mu\text{m}$  程度の凝集体、200  $\mu\text{m}$  程度の凝集塊を含む懸濁液となり、単離した MWCNT は殆ど認められなかった。MWCNT-3 では、単離した MWCNT 繊維を多く含む懸濁液となり、凝集塊の大きさも 50  $\mu\text{m}$  以下の

ものが殆どであり、その数も少なかった。

気管内投与実験の結果、死亡例、一般状態の変化はいずれの群にも認められなかった。MWCNT-7 群の体重は、媒体のみを投与した対照群と比べ、投与翌日に有意に低下した。BALF 検査の結果、各測定パラメータに対照群と比べ、有意な差異は認められなかった。ただし、MWCNT-7 群および MWCNT-2 群では BALF 中の好中球の増加傾向を伴う総細胞数の上昇傾向、MWCNT-3 群ではマクロファージ数の増加傾向を主体とした総細胞数の上昇傾向が認められた。また、BALF 中の LDH、タンパク、ALP も MWCNT-7 群で高値傾向を示した。肺重量の測定の結果、MWCNT-7 群では実重量および対体重比が、MWCNT-3 群では対体重比が対照群と比べ有意な高値を示した。剖検所見では、全 MWCNT 投与群に肺の黒色化が認められ、肺門リンパ節の腫大が MWCNT-7 群および MWCNT-3 群で顕著に認められ、MWCNT-2 群では当該所見の発現例数が半数以下であった。MWCNT-3 群においてのみ、肺門リンパ節の褐色化が認められた。

## ③暴露測定法および動態解析法の開発:

測定法および動態解析に関する研究では、MWCNT を暴露したマウスの肺組織について、透過型電子顕微鏡により観察を行った結果、暴露後 3 日の 3 匹および暴露後 7 日の 1 匹で MWCNT の存在が観察された。暴露後 14 日および 28 日の観察においては MWCNT の存在は現在まで確認できていない。暴露後 3 日と 7 日で認められた MWCNT の数の比較では、暴露後 3 日で MWCNT が多く観察された。

フラーレン C60 の単回尾静脈内投与では、3 個体中 1 個体からそれぞれ肝臓と肺からのみ検出された。腎臓、脾臓、腸管リンパ節、脳および血液からは検出できなかった。一方、フラーレン C60 の反復尾静脈内投与では、投与後 1 日目および 4 日目の投与個体全て (5/5) の肝臓、肺、脾臓、腎臓から検出された。脳および血液からは検出できなかった。肝臓、肺および脾臓の検出濃度は同程度 (7.89~64.5 $\cdot\text{g/g,wet wt.}$ ) であった。腎臓の検出濃度は、他の 3 臓器に比べ低濃度 (0.120~0.944 $\cdot\text{g/g,wet wt.}$ ) であった。脳および



血液からは検出できなかった。

フラーレン環境動態としての水生貧毛類蓄積性試験において、試験開始前の試験底質中の $C_{60}$ 濃度 $[C_s]$ は平均  $9.83 \times 10^{-2}$  mg/g-dry ( $9.72 \times 10^{-2} \sim 9.99 \times 10^{-2}$  mg/g-dry)であり、被覆水中の $C_{60}$ 濃度 $[C_w]$ については平均  $5.38 \times 10^{-3}$  mg/L ( $1.81 \times 10^{-3} \sim 11.6 \times 10^{-3}$  mg/L)であった。また、試験終了時試験底質中の $C_{60}$ 濃度 $[C_s]$ は平均  $6.26 \times 10^{-2}$  mg/g-dry ( $4.82 \times 10^{-2} \sim 7.33 \times 10^{-2}$  mg/g-dry)であり、被覆水中の $C_{60}$ 濃度 $[C_w]$ については平均  $3.74 \times 10^{-1}$  mg/L ( $3.06 \times 10^{-1} \sim 4.58 \times 10^{-1}$  mg/L)であった。また、試験生物中の $C_{60}$ 濃度 $[C_a]$ は平均  $7.62 \times 10^{-4}$  mg/g-wet ( $6.79 \times 10^{-4} \sim 9.11 \times 10^{-4}$  mg/g-wet)であった。これらの結果から、イトミズスのフラーレンに対する生物蓄積係数(BAF)は0.0121であった。

#### ④in vitro 試験系の開発:

HeLa 細胞に対するフラーレン水分散液(氷砂糖、HCO-40 らいかい法)の影響研究について、フラーレン添加後 24 時間の細胞の生存率を MTT 法により評価した結果、フラーレン水分散液、対照群の溶媒ともに 2.5%の濃度から細胞死が見られ、10%の濃度ではほとんどの細胞が死滅した。フラーレンを含まない溶媒のみの添加でも同様の細胞死が観察されたことから、フラーレン自体の毒性ではなく、溶媒に含まれる界面活性剤が影響していると考えられた。マウス腹腔マクロファージに対するフラーレン水分散液(氷砂糖、HCO-40 らいかい法)の影響研究については、680nM、6.8 $\mu$ M いずれのフラーレン濃度においても、形態的な変化は認められず、TNF- $\alpha$ 、IL-6 の放出も検出されなかった。

神経細胞系への影響研究として、L-glu トランスポーターに対する影響評価系の検討では、MWCNT-7、-1、-2 は MTT reduction を減少させた。MWCNT-3 は 100  $\mu$ g/ml の濃度で明らかな細胞毒性を示した。MWCNT-1 は 100  $\mu$ g/ml の濃度で L-glu クリアランスを有意に促進した。MWCNT-3 は 100  $\mu$ g/ml の濃度で L-glu クリアランスを有意に阻害した。その他のサンプルは L-glu クリアランスに何ら影響を与えなかった。P2X 受容体機能に対する影響評価系の検

討では、MWCNT-7 は -50 mV および -80 mV において 1-100  $\mu$ g/ml の濃度で P2X2 電流を濃度依存的に抑制する傾向を示した。MWCNT-1 は -80 mV において、1-10  $\mu$ g/ml の濃度で P2X2 電流を抑制する傾向を示した。50 mV においてはこのような作用は見られなかった。MWCNT-2 は -50 mV および -80 mV の両者において 1-100  $\mu$ g/ml の濃度で P2X2 電流を濃度依存的に抑制する傾向を示した。MWCNT-3 は -50 mV と -80 mV の両者において 1-10  $\mu$ g/ml の濃度で P2X2 電流を濃度依存的に抑制する傾向を示した。

リン脂質を用いた分散手法に関する検討では、MWCNT を等量の Tween 20 を用いて分散し、続いて PC/PG(2:1)リポソームで希釈する二段階で MWCNT を分散する方法を確立した。肺サーファクタント主要脂質である C16PC/PG を用いた場合、および Tween 20 のみで分散した場合に比較し、卵由来 PC/PG を用いた場合が凝集塊を生じにくく、もっとも優れた分散性を示した。C16PC/PG(2:1)で分散した MWCNT は、等量の Tween 20 のみで分散した MWCNT と同様に、マクロファージ系 RAW264 細胞において 6.67  $\mu$ g/ml の濃度で GM-CSF および TNF  $\alpha$  産生を促進した。これに対し、卵由来 PC/PG を用いた MWCNT は分散性により優れ、同濃度でもサイトカイン産生を促進しなかった。MWCNT は Caco-2 細胞単層膜の安定性には影響せず、トランスサイトーシスを抑制しなかった。

二酸化チタン LU175(ルチル型)、p-25(アナタース型)の光毒性に関する検討では、1mg/ml の濃度まで試験した結果、アナタース型 TiO<sub>2</sub> で 0.01 ~ 1.0mg/ml の濃度域で用量依存的な光毒性が観察され、IC50 は 0.09mg/ml と計算された。ルチル型 TiO<sub>2</sub> の光毒性作用は観察されなかった。一方、Nanom purple SUH(C60)を用いた光毒性に関する検討では、光の有無にかかわらず C60 は 1.0mg/ml までの濃度で BALB3T3 細胞に対して細胞毒性を示さず、また光毒性作用も観察されなかった。

#### ⑤国際動向調査:

第 4 回 WPMN(産業用ナノ材料作業部会:



Working Party on Manufactured Nanomaterials) 会議において、産業用ナノ材料試験のスポンサー国が、2009年3月の第5回 WPMN 会議までに Dossier 作成計画書(Dossier Development Plans: DDPs)を提示することが確認され、2008年11月の韓国・釜山で開催されたワークショップでは、スポンサーシッププログラム用のガイダンスマニュアルに関する検討も行われた。我が国は、このスポンサーシッププログラムの中では、フラーレン(C60)と SWCNT(単層カーボンナノチューブ)および MWCNT(多層カーボンナノチューブ)のリードスポンサーとなることになっており、Dossier 作成計画書(DDP)が作成された。

#### D. 考察

①昨年度より新たに実施した MWCNT の用量反応性試験では各用量群にわたり、用量依存的に中皮腫と思われる腫瘍が腹腔内に肉眼的に認められた。今回、0.003mg/kg 群(1x10<sup>6</sup> 本/動物)において腹膜の癒着が肉眼的に認められない条件下においても中皮腫発生が認められたことは、この長繊維型誘発が、MWCNT の中皮腫アスベスト等の繊維状物質の中皮腫発癌に対して提唱される発癌機構仮説に矛盾しないことを示唆している。フラーレンに関してはマウス単回腹腔内投与の結果、体重増加抑制の程度と概ね相関する形で、腎の高度の巣状萎縮が誘発され、組織学的に尿細管を標的とする可能性が示唆された。現時点ではその発症機序は不明であるが、病理組織学的検査から、腎の糸球体障害に起因するものではないことが示唆された。アスベスト投与マウスの腸間膜のマイクロアレイ解析の結果、WNT シグナルなどの他、細胞増殖、DNA 複製、DNA 修復に関与する遺伝子発現に影響を支えることが示され、今後の解析によりメカニズムの解析が進むものと考えられた。また、作成されたマウス抗体を用いて、マウスモデルを用いて ELISA 試験を実施する体制もほぼ整ったところである。

TiO<sub>2</sub> の発がん性に関しては WHO/IARC により pigment grade やアナターゼ 型の TiO<sub>2</sub> に肺発がん性があると報告されており、ヒトに対して発がん

性が疑われる group 2B に分類されている。本研究では、ルチル型の TiO<sub>2</sub> の発がん性促進作用を、雌ラットを用いたイニシエーション・プロモーション実験プロトコルを用いて明らかにした。さらに、nTiO<sub>2</sub> の発がん性を示すには、nTiO<sub>2</sub> を食食した肺胞マクロファージが重要であることを示した。しかし、nTiO<sub>2</sub> は非常に安定であるために、肺胞マクロファージは nTiO<sub>2</sub> を完全に消化することができず、“Frustrated” の状態となる。このようなマクロファージは、reactive oxygen species (ROS) の上昇や細胞障害と関連することが報告されており、本研究で観察された 8-OHdG の上昇や、肺発がん性の促進作用との関連が示唆される。また、発現が上昇した MIP1 $\alpha$  が、ヒト肺がん細胞 A549 とラット乳腺腫瘍由来の C3 の細胞増殖を促進させることを確認し、MIP1 $\alpha$  が肺のみならず、血液を介して乳腺の細胞増殖を促進し、ラット乳腺発がんの促進作用も示したと考えた。長期間の吸入曝露によっても同様のメカニズムが起こっていると考えられ、本研究における nTiO<sub>2</sub> の発がん促進作用は、IARC の結果とも一致する。従って、本研究で用いた気管内噴霧による発がん性試験法は、長期吸入曝露試験の結果を予測することが可能であることが示唆された。

②MWCNT の気管内投与法の開発に関する研究では、1 w/v%のラット血清を含む PBS は、MWCNT の有する物性によっては有用な懸濁媒体のひとつであると考えられた。しかし、MWCNT-7 群および MWCNT-2 群で発現した BALF 中の好中球の増加傾向、MWCNT-7 群の LDH、タンパクおよび ALP の増加傾向は、粗大な凝集塊が気道を閉塞したことに伴う急性期の炎症性反応である可能性を否定できなかった。MWCNT-3 群で認められた BALF 中マクロファージの増加傾向、肺門リンパ節の褐色化については、MWCNT-3 群の投与液には単離した MWCNT 繊維が多く含まれていたことから、肺の深部に到達した MWCNT-3 が肺胞マクロファージの遊走を惹起し、投与された MWCNT がこのマクロファージに食食され、リンパ節経由で処理される過程を反映した変化と考えられた。これらのことから、肺に対する毒性影響は、



投与液中の MWCNT の状態に大きく依存し、質的、量的に異なる発現様式となる可能性が強いものと考えられた。

③ 吸入曝露させたマウスの肺組織中の MWCNT 存在と挙動について、組織をアルカリ加熱融解することにより、透過型電子顕微鏡を用いることにより検出する手法の開発に成功した。体内に吸収された後の体内動態を調べるために、フラレーン C60 の反復尾静脈内投与を行った結果、肝臓、肺および脾臓に優先的に蓄積し、3 臓器に比べ低濃度ではあるが腎臓にも蓄積することが明らかとなった。血液から検出できなかったことから、体内に取り込まれたフラレーン C60 の体内循環量は多くはないが、時間とともに肝臓から血中への放出もしくは代謝されて減少していくことが推測された。また、腎臓に一時的に貯留したフラレーン C60 は、速やかに尿中排泄されるか、もしくは代謝産物に変化して検出できない濃度に低下していると考えられた。

試験開始前の試験底質中のフラレーン濃度はほぼ設定値であったことから、土壌中のフラレーンの多くは安定に存在すると考えられた。試験生物であるイトミミズについては、フラレーンの取込みが認められ、その量は  $6.79 \times 10^{-4} \sim 9.11 \times 10^{-4}$  mg/g-wet であった。試験終了時のイトミミズの観察で生物の組織に沿って黒い線がみられたことから、腸管等の組織に底質と共にフラレーンが取込まれたと考えられる。一方、イトミミズのような底生生物を捕食するコイを用いて、フラレーンの蓄積性を調べたところ、フラレーンの蓄積性は認められなかった。従って、底生生物へのフラレーンの蓄積性については、排泄試験等の実施により、その濃縮性を詳細に調べる必要がある。

④ 界面活性剤により細胞は腫脹することが知られており、HeLa 細胞に対するフラレーン水分散液（氷砂糖、HCO-40 らいかい法）の影響を検討した実験で、フラレーン処理した細胞の顕微鏡像において、2.5%以上の濃度では腫脹した細胞が観察されたことから、界面活性剤による細胞死であることが確認された。溶媒中の界面活性剤の細胞毒性はみられたものの、HeLa 細胞の生存率および形態におけるフラレーン自体の毒性は、少なくとも

1.25%（最終フラレーン濃度：8.7 $\mu$ M）以下の濃度ではみられなかった。また、マウス腹腔マクロファージに対するフラレーン水分散液（氷砂糖、HCO-40 らいかい法）の影響を検討した実験では、6.8 $\mu$ M までの濃度で、形態変化や炎症性サイトカインの放出性において、顕著な影響をあたえないことが示された。

神経細胞に対する研究では、培養アストロサイトにおいてサンプル MWCNT-7、MWCNT-1、MWCNT-2 はミトコンドリア酵素活性に影響を与えることが示唆された。MWCNT-3 は 100  $\mu$ g/ml の濃度で細胞毒性を示した。MWCNT-71 は 100  $\mu$ g/ml の濃度で L-glu クリアランスを有意に促進した。MWCNT-3 は 100  $\mu$ g/ml の濃度で L-glu クリアランスを有意に阻害したが、この濃度で明らかな細胞毒性が観察されたことから死細胞からの L-glu の漏出に由来する現象と考えられる。CNT の直径、壁厚、長さ与作用との関連についてはさらなる検討を要する。P2X2 電流に対する作用では、-50 mV および -80 mV における抑制率から、MWCNT-7 は電位依存的、サンプル 1 も電位依存的、MWCNT-2 および MWCNT-3 は電位非依存的な作用を持つことが示唆された。CNT は電気的には負の極性を有すると考えられる。もし、CNT が P2X2 受容体のチャネル孔を塞ぐのであれば、過分極状態では負の極性同士から抑制が減弱されることが予想される。電位依存的抑制はこのような機序が関与している可能性が考えられる。CNT の直径、壁厚、長さ、分子内極性などの物理的性質と作用との関連についてはさらなる検討を要すると考えられた。

MWCNT の分散剤として肺サーファクタント脂質 PC/PG を利用する方法は、気管内投与時に界面活性剤の毒性低減の面から有用性が期待される。また、異種の肺サーファクタント蛋白に起因するアレルギーを回避でき、安価である点で有用と考えられる。Tween 20 分散-PC/PG 希釈の二段階法により、MWCNT を効率よく分散することができた。意外なことに、卵由来 PC/PG は、肺サーファクタント主成分の C16PC/PG より MWCNT の分散に優れ、卵由来 PC/PG で分散した MWCNT はサイトカイン



産生を惹起しなかった。構成脂肪酸の異なる PC の物理化学的性質の違いが MWCNT の分散性や凝集塊の形状・大きさを変化させ、細胞のサイトカイン産生促進作用に違いをもたらした可能性が考えられる。今後、MWCNT の分散の程度や形状を計測し、脂質の物理化学的性質およびサイトカイン産生作用との関係を明らかにすることが、安全性評価に必要と思われる。

C60 の遺伝毒性に関しては昨年度、CHL 細胞において、用量依存的に細胞毒性と、染色体の倍数性細胞の有意な増加が観察したことを報告したが、同じサンプルについて BALB3T3 細胞で *in vitro* 光毒性を検討したが、毒性は観察されず今回の結果は C60 が光毒性を示さないことを支持する結果となった。TiO<sub>2</sub> に関しては *in vitro* で小核や、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おり、本研究のこれまでの結果でも DNA 損傷、小核、突然変異の僅かな誘発を報告しており、弱いながらも TiO<sub>2</sub> は遺伝毒性物質と考えられる。TiO<sub>2</sub> に関して光毒性試験を行った結果、アナターゼ型 TiO<sub>2</sub> で 0.01～1.0mg/ml の濃度域で用量依存的な光毒性が観察された。一方、ルチル型 TiO<sub>2</sub>、C60 には光毒性作用は観察されなかった。

⑤本研究班の OECDWPMN のスポンサーシッププログラムへの貢献としては、まず、C60 の ADME に関するデータを提供できると考えら、MWCNT の ADME データの入手の可能性も示唆されている。さらに、C60 や MWCNT の *in vivo* 投与のための分散手法に関する研究を進めている観点からは、*in vivo* (まずは Acute toxicity など) 試験を行う際の有用な情報を提供できることが可能であると考えられる。*in vitro* の試験法開発に関する研究からは、C60 の遺伝毒性 (In vitro Genotoxicity) に関する成果や、その他の C60 や MWCNT の *in vitro* データの提供にも対応可能であると考えられた。

## E. 結論

平成 20 年度は、①*in vivo* 研究では、中皮腫誘発の用量依存性や分子マーカーの作成、発がん性のメカニズム解析、②吸入試験法研究では、気管内投与

液における分散性の検討、③暴露測定法/動態解析研究では、MWCNT の電子顕微鏡による確認法と C60 の体内挙動、C60 の土壤中の動態、④*in vitro* 研究では、TiO<sub>2</sub> の紫外線との複合効果、MWCNT による神経細胞機能とリボソーム分散手法の違いによる差異等の検討、⑤国際動向調査では OECD のナノマテリアル作業グループ (WPMN) 等の動向調査を行った。その結果、①p53(+/-)マウスへの MWCNT の ip 投与による中皮腫誘発がより低用量からの量依存性を示すことを確認すると共に、マウスの中皮腫マーカー用のメソセリン抗体を作成した。一方、C60 の ip 投与により腎臓の瘢痕状萎縮が誘発されることを示した。また、TiO<sub>2</sub> の発がんプロモーション作用に MIP1 $\alpha$  増殖因子による肺胞上皮の増殖作用が関与することを明らかにした。②MWCNT 気管内投与時の分散状態によってマクロファージによる貪食能に差が有る可能性を示した。③MWCNT の気管内投与後の肺における半定量的検出法を確立すると共に、C60 の反復尾静脈内投与により肝臓、肺、脾臓および低濃度ではあるが腎臓への蓄積を明らかにした。また、環境中では C60 の土壤中での生分解性は認められないことが示された。④アナターゼ TiO<sub>2</sub> の光細胞毒性、MWCNT の神経系イオンチャンネルや GLAST 機能への影響、リボソーム構成成分による炎症サイトカインの産生能の差異について知見を集積することができた。⑤OECD の WPMN での代表的ナノマテリアルに関するスポンサーシッププログラムの開始に伴う初期評価文書作成計画書 (DDP) が作成されたことが明らかになった。以上のことより、本研究では、ナノマテリアルの健康影響を検討する際には、*in vivo* 試験法研究を中心とした研究成果より、長期体内残留による慢性影響研究の重要性や、これらの慢性影響の評価系確立のためには、慢性影響の発現メカニズム研究を行うことが必要であることを示すことができた。さらに、今後、OECD の WG で本格化する代表的なナノマテリアルによる評価試験と初期評価文書作成作業を支援できる体制が整備されたと考えられる。

## F. 健康危機情報

なし



## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- Sakamoto Y, Nakae D, Fukumori N, Tayama K, Maekawa A, Imai K, Hirose A, Nishimura T, Ohashi N and Ogata A(2009) Induction of mesothelioma by a single intrascrotal administration of multi-wall carbon nanotube in intact male Fischer 344 rats. *J. Toxicol Sci.*, 34, 65-76.
- 広瀬明彦, 平野靖史郎\*: フロンティアレポート ナノ粒子・ナノ材料の健康問題 - その3 - 「ナノ粒子の毒性・健康問題」 日本衛生学雑誌., 63, 739-745 (2008)
- Takagi A, Hirose A, Nishimura T, Fukumori N, Ogata A, Ohashi N, Kitajima S, Kanno J. Induction of mesothelioma in p53+/- mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube. *J Toxicol Sci.* 2008 Feb;33(1):105-16.
- Tsuda H, Tokunaga H, Hirose A, Kanno J. (2008), Hazard identification of nanomaterials, *Yakugaku Zasshi.* 2008 Dec;128(12): 1727-32.
- Matsuoka, M., Fukamachi, K., Uehara, N., Tsuda, H. and Tsubura, A. Induction of a novel histone deacetylase 1/c-Myc/Mnt/Max complex formation is implicated in parity-induced refractoriness to mammary carcinogenesis. *Cancer Sci* 99:309-315, 2008.
- Kurosawa, G., Akahori, Y., Morita, M., Sumitomo, M., Sato, N., Muramatsu, C., Eguchi, K., Matsuda, K., Takasaki, A., Tanaka, M., Iba, Y., Hamada-Tsutsumi, S., Ukai, Y., Shiraishi, M., Suzuki, K., Kurosawa, M., Fujiyama, S., Takahashi, N., Kato, Ryoichi., Mizoguchi, Y., Shamoto, M., Tsuda, H., Sugiura, M., Hattori, Y., Miyakawa, S., Shiroki, R., Hoshinaga, K., Hayashi, N., Sugioka, A. and Kurosawa, Y. Comprehensive screening for antigens overexpressed on carcinomas via isolation of human mAbs that may be therapeutic. *PNAS* 105:7287-7292.2008
- Matsuoka, Y., Kawaguchi, H., Yoshida, H., Tsuda, H. and Tsubura, A. Rat mammary preneoplasia and neoplasia: a model for human breast cancer research. *Trends in Cancer Reseach.* 3, 1-13, 2007.
- Fukamachi, K., Imada, T., Ohshima, Y., Xu, Jiegou. and Tsuda, H. Purple corn color suppresses Ras protein level and inhibits 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary carcinogenesis in the rat. *Cancer Sci* 99:1841-1846. 2008
- Tamano, S., Sekine, K., Takase, M., Yamauchi, K., Iigo, M. and Tsuda, H. Lack of Chronic Oral Tpxicity of Chemopreventive Bovine Lactoferrin in F344/DuCrj Rats. *Asian Pacific J Cancer Prev*, 9, 313-316, 2008
- Iigo, M., Alexander, D, B., Long, N., Xu, J., Fukamachi, K., Futakuchi, M., Takase, H. and Tsuda, H. Anticarcinogenesis pathways activated by bovine lactoferrin in the murine small intestine. *Biochimie.* (Epub) 2008
- Shiomi K., Hagiwara Y., Sonoue K., Segawa T., Miyashita K., Maeda M., Izumi H., Masuda K., Hirabayashi M., Moroboshi T., Yoshiyama T., Ishida A., Natori Y., Inoue A., Kobayashi M., Sakao Y., Miyamoto H., Takahashi K. and Hino O.: Sensitive and specific new enzyme-linked immunosorbent assay for N-ERC/mesothelin increases its potential as a useful serum tumor marker for mesothelioma. *Clinical Cancer Res.*, 14: 1431-1437, 2008
- Segawa T., Hagiwara Y., Ishikawa K., Aoki N., Maeda M., Shiomi K. and Hino O.: Mesomark kit detects C-ERC/mesothelin, but not SMRP with C-terminus. *BBRC*, 369: 915-918, 2008
- Imamura O., Okada H., Takashima Y., Zhang D., Kobayashi T. and Hino O.: siRNA-mediated *Erc* gene silencing suppresses tumor growth in *Tsc2* mutant renal carcinoma model. *Cancer*



- Letters, 268: 278-285, 2008
- Inami K., Kajino K., Abe M., Hgiwara Y., Maeda M., Suyama M., Watanabe Su. And Hino O.: Secretion of N-ERC/mesothelin and expression of C-ERC/mesothelin in human pancreatic ductal carcinoma. *Oncology Reports* 20: 1375-1380, 2008
- Hagiwara Y., Hamada Y., Kuwahara M., Maeda M., Segawa T., Ishikawa K. and Hino O.: Establishment of a Novel Specific ELISA system for rat N- and C-ERC/Mesothelin.-Rat ERC/Mesothelin in the body fluids of mice bearing mesothelioma-. *Cancer Science*, 99:666-670, 2008.
- Ishikawa K., Segawa T., Hagiwara Y., Maeda M., Abe M., Hino O.: Establishment of novel monoclonal antibody to human ERC/mesothelin useful for study and diagnosis of ERC/mesothelin-expressing cancers. *Pathol. Int.* 59:161-166, 2009
- Yatagai, F., Umebayashi, Y., Honma, M., Sugawara, K., Takayama, Y., and Hanaoka, F. Mutagenic radioadaptation in a human lymphoblastoid cell line. *Mutat. Res.*, 638, 48-55 (2008)
- Yasui, M., Suenaga, E., Koyama, N., Masutani, C., Hanaoka, F., Gruz, P., Shibutani, S., Nohmi T., Hayashi, M., and Honma, M. Miscoding properties of 2'-deoxyinosine, a nitric oxide-derived DNA Adduct, during translesion synthesis catalyzed by human DNA polymerases. *J Mol Biol*, 377, 1015-1023 (2008)
- Yatagai, F., Suzuki, M., Ishioka, N., Ohmori, H., Honma, M. Repair of I-SceI Induced DSB at a specific site of chromosome in human cells: influence of low-dose, low-dose-rate gamma-rays. *Radiat Environ Biophys* 47, 439-44 (2008)
- Nhomi, T., Toyoda-Hokaiwado, N., Yamada, M., Masumura, K., Honma, M., and Fukushima, S. International Symposium on Genotoxic and Carcinogenic Thresholds. *Genes and Environment*, 30, 101-107 (2008)
- 本間正充; 遺伝毒性物質に閾値はあるのか? *ファルマシア* 45, 143-148 (2009)
- Sato K., Saito Y, Oka J, Ohwada T, Nakazawa K, Effects of tamoxifen on L-glu transporters of astrocytes. *J. Pharmacol. Sci.*, 107, 226-230 (2008)
2. 学会発表
- 広瀬明彦, 「カーボンナノチューブ等ナノファイバーと中皮腫」, 第44回公開講演会 ナノ粒子の健康影響評価の視点と対策, ナノ粒子研究会(東京) (2008.9)
- 広瀬明彦, 「産業用ナノ物質の健康影響評価について」, 第15回免疫毒性学会シンポジウム1「ナノ粒子の生体影響」(東京) (2008).
- 広瀬明彦, 国立医薬品食品衛生研究所の取り組み(シンポジウム:先端物質の安全性評価に対応するための連携)、第35回日本トキシコロジー学会学術年会、2008年6月、東京
- 津田洋幸、徐結苟、深町勝巳、井上義之、高月峰夫、徳永裕司、内野 正、西村哲治、広瀬明彦、菅野 純、発がんプロモーション試験によるナノ粒子のがん原生早期検出の試み、第35回日本トキシコロジー学会学術年会、2008年6月26日、東京、口演
- 北嶋 聡、菅野 純、トキシコゲノミクスによる毒性評価法の高精細化、第35回日本トキシコロジー学会学術年会、2008年6月27日、東京、口演
- 種村健太郎、五十嵐勝秀、相崎健一、北嶋 聡、菅野 純、発生期ドローモイ酸暴露によるマウス脳微細構造異常と情動-認知行動障害、第35回日本トキシコロジー学会学術年会、2008年6月27日、東京、口演
- 平林容子、李光勲、尹 秉一、藤井義明、金子豊蔵、黒川雄二、菅野 純、井上 達、アリアルハイドロカーボン受容体の生物学とトキシコロジー、第35回日本トキシコロジー学会学術年会、2008年6月26日、東京、口演

壺井 功、平林容子、原田智紀、児玉幸夫、菅野 純、井上 達、相澤 信、加齢に伴う造血微小環境の機能低下は抗癌剤投与後のB細胞産制を遅延させる、第35回日本トキシコロジー学会学術年会、2008年6月27日、東京、口演

高木篤也、広瀬明彦、西村哲治、福森信隆、小縣昭夫、大橋則雄、北嶋 聡、菅野 純、p53+/-マウス腹腔内投与による多層型カーボンナノチューブの中皮腫誘発作用について、第35回日本トキシコロジー学会学術年会、2008年6月26日、東京、ポスター

種村健太郎、五十嵐勝秀、相崎健一、北嶋 聡、菅野 純、エストロゲン受容体( $\alpha$ 型)ノックダウンマウスの神経行動解析、第35回日本トキシコロジー学会学術年会、2008年6月27日、東京、ポスター

今井 清、坪井 優、向井大輔、山下 龍、関田清司、高木篤也、北嶋 聡、菅野 純、フタル酸エステルDEHPとその活性代謝産物MEHPの比較毒性学的研究、第35回日本トキシコロジー学会学術年会、2008年6月27日、東京、ポスター

北嶋 聡、相崎健一、五十嵐勝秀、児玉幸夫、高木篤也、関田清司、今井 清、菅野 純、Percellome手法を用いたフタル酸エステルDEHPとその活性代謝産物MEHPの腎に及ぼす遺伝子発現変動の比較、第35回日本トキシコロジー学会学術年会、2008年6月28日、東京、ポスター

五十嵐勝秀、小川幸男、笠井辰也、長野嘉介、北嶋聡、相崎健一、菅野 純、シックハウス指針値レベルの経気道暴露による遺伝子発現変化のPercellome解析、第35回日本トキシコロジー学会学術年会、2008年6月28日、東京、ポスター

菅野 純、多層カーボンナノチューブのp53ヘテロ欠失マウス腹腔内投与による中皮腫の誘発、ナノ社会受容研究会講演会、2008年8月5日、つくば、口演

菅野 純、高木篤也、広瀬明彦、西村哲治、福森信隆、小縣昭夫、大橋則雄、北嶋 聡、関田清司、

多層カーボンナノチューブのp53ヘテロ欠失マウス腹腔内投与による中皮腫の誘発、第23回発癌病理研究会、2008年8月25日、鳥羽、口演

菅野 純、高木篤也、広瀬明彦、西村哲治、福森信隆、小縣昭夫、大橋則雄、北嶋 聡、関田清司、多層カーボンナノチューブのp53ヘテロ欠失マウス腹腔内投与による中皮腫の誘発—異物発癌としての若干の考察を副えて—、モロシヌス研究会、2008年9月12日、東京、口演

菅野 純、MWCNTに含まれるアスベスト様粒子が生体へ及ぼす影響、化学生物総合管理学会特別講演会、2008年9月26日、東京、口演

菅野 純、ナノ材料の有害性評価、第2回統合研究院環境プロジェクト・ワークショップ、2008年10月8日、東京、口演

菅野 純、カーボンナノチューブの生体影響、中央労働災害防止協会企画セミナー、2008年10月16日、東京、口演

菅野 純、高木篤也、広瀬明彦、西村哲治、福森信隆、小縣昭夫、大橋則雄、北嶋 聡、関田清司、多層カーボンナノチューブのp53ヘテロ欠失マウス腹腔内投与による中皮腫の誘発、第67回日本癌学会総会、2008年10月28日、名古屋

菅野 純、広瀬明彦、MHLW study projects on nanomaterial safety and some thoughts on the toxicity of nanomaterials including mesotheliomagenesis of MWCNT., Recent Progress on Environmental, Health and Safety Research on Manufactured Nanomaterials 名古屋大学国際シンポジウム、2008年12月12日、名古屋

菅野 純、ナノマテリアルの毒性予測—発癌性を中心に、学術会議シンポジウム、2008年12月26日、東京

菅野 純、Percellome 遺伝子発現解析標準化及び解析手法、第11回癌治療増感研究シンポジウム、2009年2月14日、奈良

菅野 純、ナノ材料粒子の有害性について、色材セミナー「ナノ粒子の安全性と応用」、2009年3月



- 12日、名古屋
- 津田洋幸、発がんプロモーション試験によるナノ粒子のがん原性早期検出の試み、第35回日本トキシコロジー学会、2008年6月26-28日、東京
- Tsuda, H., Lessons from possible carcinogenic mechanism of asbestos, 67<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Oct28-30, 2008, Nagoya
- Tsuda, H., Promotion of Nano-sized TiO<sub>2</sub> on lung and mammary gland carcinogenesis in female human H-ras gene Transgenic Rats, 67<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Oct28-30, 2008, Nagoya
- 津田洋幸、ナノサイズ二酸化チタンおよびフルーレン(C60)の肺発がん促進作用とその機序の解析、第23回発がん病理研究会、2008年8月25-27日、鳥羽
- 津田洋幸、ナノサイズ二酸化チタンの肺と乳腺発がん促進作用とその機序の解析、第25回日本毒性病理学会、2009年1月27-28日、浜松
- 坂本義光, 福森信隆, 上原眞一, 広瀬明彦, 西村哲治, 前川昭彦, 今井清, 小縣昭夫, 中江大: ラットにおける多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の陰嚢腔内投与による中皮腫の誘発。第35回日本トキシコロジー学会学術年会、0-35, (2008.6)
- 津田洋幸, 徐結苟, 深町勝巳, 井上義之, 高月峰夫, 徳永裕司, 内野正, 西村哲治, 広瀬明彦, 菅野純: 発がんプロモーション試験によるナノ粒子のがん原性早期検出の試み。第35回日本トキシコロジー学会学術年会, NS2-4, (2008.6)
- 高木篤也, 広瀬明彦, 西村哲治, 福森信隆, 小縣昭夫, 大橋則雄, 北嶋聡, 菅野純: p53<sup>+/-</sup>マウス腹腔内投与による多層型カーボンナノチューブの中皮腫誘発作用について, 第35回日本トキシコロジー学会学術年会, P-001, (2008.6)
- 西村哲治, 清水久美子, 田原麻衣子, 久保田領志, 広瀬明彦: フルーレン(C60)の培養細胞への取り込みと影響, 第14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 p79 (2008.8)
- Nishimura, T., Shimizu, K., Kubota, R., Tahara, M., Hirata-Koizumi, M. and Hirose, A.: Biological Effects of Fullerene (C60) Exposed Using Liposome in HepG2 Cells, 45<sup>th</sup> Eurotox 2008 (2008.10)
- Kubota, R., Tahara, M., Shimizu, Hirose, A., Shimizu, K., Oku, N., Nishimura, T.: Tissue distribution of fullerene C60 in rat after oral and tail-vein administration by LC-MS/MS, 45<sup>th</sup> Eurotox 2008 (2008.10)
- Uchino, T., Ikarashi, Y., Nishimura, T., Tokunaga, H.: Studies for effect of surface containing on cytotoxicity of nano-size titanium dioxide for the culture cell lines, 45<sup>th</sup> Eurotox 2008 (2008.10)
- 菅野純, 高木篤也, 広瀬明彦, 西村哲治, 福森信隆, 小縣昭夫, 大橋則雄, 北嶋聡: 多層カーボンナノチューブの p53 ヘテロ欠失マウス腹腔内投与による中皮腫の誘発, 第67回日本癌学会学術総会, 0-008 (2008.10)
- 徐結苟, 二口充, 飯郷正明, 深町勝巳, アレクサンダーダビッド, 内野正, 徳永裕司, 西村哲治, 広瀬明彦, 菅野純, 津田洋幸: H-ras トランスジェニックラットにおける肺及び乳腺発ガンに対するナノ TiO<sub>2</sub> の促進作用, 第67回日本癌学会学術総会, P-1019 (2008.10)
- 中江大, 坂本義光, 前川昭彦, 今井清, 西村哲治, 広瀬明彦, 小縣昭夫: ラットにおける多層カーボンナノチューブの陰嚢腔内投与による中皮腫の誘発, 第67回日本癌学会学術総会, P-1025 (2008.10)
- 小濱とも子, 徳永裕司, 五十嵐良明, 内野正, 西村哲治: ナノマテリアル酸化チタンの経皮的な吸収及び体内分布, 第45回全国衛生化学技術協議会年会, p181-182 (2008.11)
- 本間正充: 医薬品に不純物として含まれる遺伝毒性物質の分類と許容量 第35回日本トキシコロジー学会学術年会(2008.6)
- 本間正充: ICH における新しい遺伝毒性試験ガイド

- ライン(S2R1)と試験実施タイミング 第35回日本トキシコロジー学会学術年会(2008.6)
- Honma, M. Ultimate Threshold and Genetic Consequence of A Single Double Strand Break in Human Cells. International Symposium on Genotoxic and Carcinogenic Thresholds (2008.7)
- Honma, M. Genome Mapping of Damaged Chromosome Regions Induced by Ionizing Irradiation Using DNA Microarray Analysis. 38<sup>th</sup> European Environmental Mutagen Society (2008.9)
- 鈴木孝昌、小木美恵子、小原有弘、本間正充、田邊思帆里、山口照英:SNP および CGH マイクロアレイを用いた c-myc 遺伝子増幅に関する詳細解析 第67回日本癌学会総会(2008.10)
- 谷田貝文夫、菅澤薫、榎本秀一、本間正充:DSB 修復効率からの適応応答の追求 日本放射線影響学会第51回大会(2008.11)
- 本間正充:DNA 二本鎖切断修復と遺伝的不安定性 日本環境変異原学会第37回大会(2008.12)
- 安井 学、本間正充:ヒトリンパ球細胞のゲノム内に導入させた 8-オキソグアニン1分子の突然変異誘発能 日本環境変異原学会第37回大会(2008.12)
- 小山直己、木村葵、安井学、高見成昭、高橋美和、今井俊夫、山本歩、汲田和歌子、増村健一、増田修一、木苗直秀、松田知成、能美健彦、本間正充:ライフステージを考慮したアクリルアミドの多臓器遺伝毒性評価 日本環境変異原学会第37回大会(2008.12)
- 斉藤美香、松藤寛、千野誠、林真、本間正充、山形一雄:過酸化水素によって誘導されたヒトリンパ芽球細胞 TK6 の細胞増殖と遺伝毒性に対する天然抗酸化物質の保護効果 日本環境変異原学会第37回大会(2008.12)
- 木村葵、坂本浩子、西郷和彦、洲加本孝幸、本間正充:*In vitro* コメットアッセイプロトコルの検証 日本環境変異原学会第37回大会(2008.12)
- Wang, J., Sawyer, J., Honma, M., Chen, T., and Moore, M. The Mouse Lymphoma Assay detects recombination, deletion, and aneuploidy. 日本環境変異原学会第37回大会(2008.12)
- 谷田貝文夫、高橋昭久、本間正充、鈴木ひろみ、大森克徳、関真也、橋爪藤子、島津徹、榎本秀一、大西武雄、石岡憲昭:宇宙実験:放射線影響の LOH 検出系による解析 日本環境変異原学会第37回大会(2008.12)
- 鈴木孝昌、小泉朋子、本間正充、中嶋圓、濱田修一、渡辺貴志、降旗千恵:トキシコゲノミクスに関する JEMS/MMS 共同研究 II: 遺伝子傷害性発癌物質の迅速スクリーニング系としての TaqMan Low Density Array の評価 日本環境変異原学会第37回大会(2008.12)
- 本間正充、櫻庭真弓、汲田和歌子、林 真:DNA マイクロアレイによる放射線損傷領域のゲノムマッピング 日本環境変異原学会第37回大会(2008.12)
- 中嶋圓、鈴木雅也、田中仁、本間正充、林真:*In vitro* コメットアッセイ国際バリデーションデータ解析に関する一考察 日本環境変異原学会第37回大会(2008.12)
- 安井学、Suzuki, N.、本間正充、Shibutani, S.:一酸化窒素によって形成する DNA 付加体の誤塩基対形成メカニズム 第31回分子生物学会(2008.12)
- Sato K, Saito Y, Oka JI, Ohwada T, Nakazawa K, Effects of Tamoxifen on L-glutamate transporter. Neuroscience 2008 (2008. 9, Tokyo, Japan)
- Sato K, Saito Y, Oka JI, Ohwada T, Nakazawa K, Effects of tamoxifen and the related compounds on L-glutamate transport activity of cultured astrocytes. Neuroscience2008 (2008. 11, Washington D.C., USA)
- Shigemoto-mogami Y, Nakazawa K, Sato K, Microglia instructs neurogenesis and gliogenesis in the subventricular zone. 日本薬学会第129年会(2009年3月, 京都)
- Takahashi K, Nakazawa K, Nozawa R, Ohno Y,



Takeuchi T, Sato K, Inhibitory effects of NSAIDs on excitatory amino acid transporter EAAT1/GLAST in Xenopus oocytes 日本薬学会第129年会(2009年3月, 京都)

Sato K, Saito Y, Oka JI, Goldman JE, Nakazawa K, Establishment of the risk assessment system for the brain at an early postnatal stage. 第82回日本薬理学会(2008年3月, 横浜)

#### G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

##### 1. 特許取得(出願中)

発明の名称: ナノ粒子の吸入曝露による発がんリスクマーカーおよびその用途

出願日: 平成21年3月24日

出願番号: 特願2009-071951

発明者 津田洋幸、二口 充、徐 結苛

特許出願人: 公立大学法人名古屋市立大学

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

平成20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. 研究分担報告書