

200839020A

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 に関する総合研究

(H20-化学-一般-006)

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者

福島昭治

平成 21(2009)年 3 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 に関する総合研究

(H20-化学-一般-006)

平成 20 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者

福島昭治

平成 21 (2009) 年 3 月

## 厚生労働科学研究費補助金研究報告書目次

### 目 次

#### I. 総括研究報告書

ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法に関する総合研究	1
-----------------------------	---

#### II. 分担研究報告書

##### I. ナノマテリアルの吸入暴露手法の開発

実験動物への暴露量および暴露形態を把握するための、ナノマテリアルの性状、 拡散状態及び濃度を把握する方法に関する研究	16
鷹屋光俊	

ナノマテリアルの気中への拡散法、及び吸入チャンバー内へ安定供給する方法 に関する研究	24
西沢共司	

##### II. ナノマテリアルの吸入暴露による健康影響の評価手法の確立

ナノマテリアルの吸入暴露による呼吸器への生体影響の評価手法に関する研究	40
相磯成敏	

ナノマテリアルの吸入暴露による肺外影響の評価手法に関する研究	46
甲田茂樹	

超微形態学的手法を用いたナノマテリアルの吸入暴露による中枢神経系 への影響の特徴と検出系の確立	52
吉田 緑	

ナノマテリアルの吸入暴露肺の c-DNA マイクロアレイによる毒性評価 に関する研究	57
小川幸男	

ナノマテリアルの吸入暴露肺における酸化的ストレスの関与	62
木下アンナ	

ナノマテリアルの吸入暴露による中期発がん試験法の開発に関する研究 ..... 68  
長野嘉介

Ⅲ. *in vitro*及び*in vivo*試験系によるスクリーニング法の有効性の評価

ナノマテリアルの発がん性スクリーニングのための*in vitro*系での遺伝毒性試験  
による評価手法に関する研究 ..... 75  
浅倉真澄

ナノマテリアルの吸入による発がん性スクリーニングのための*in vivo*系での  
遺伝毒性試験による評価手法に関する研究 ..... 82  
野口 忠

Ⅲ. ナノマテリアルの吸入暴露情報に関する調査研究 ..... 88  
平田 睦子

# I. 総括研究報告書



ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法に関する総合研究（H20-化学-一般-006）

研究代表者 福島昭治

中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究センター 所長

#### 研究要旨

ナノマテリアルは極めて微細であり一般生活環境や産業現場の気中に拡散しやすいため、ナノマテリアルは経気道的に容易に体内に侵入する可能性が高く、その吸入暴露によるヒトへの健康影響が深刻に懸念される。本研究の目的は、ナノマテリアルの吸入によるヒトへの健康影響の評価に役立つ手法を開発することである。この目的のため、ナノマテリアルの吸入暴露実験手法の開発（鷹屋、西沢）、ナノマテリアルの吸入暴露による健康影響の評価手法の確立（相磯、甲田、吉田、小川、木下、長野）、および*in vitro*と*in vivo*試験系によるスクリーニング法の有効性の評価（浅倉、野口）に関する研究、ならびに、ナノマテリアルの吸入暴露情報に関する調査研究（平田）を行う。

本年度は、鷹屋は、多層カーボンナノチューブ（MWCNT）に含まれる不純物金属元素の定性・定量について、レーザー気化誘導結合プラズマ質量分析、レーザーブレイクダウンプラズマ分光分析・蛍光X線分析などの条件を検討し、動物実験に用いた被験試料MWCNT中に鉄が含まれることを確認した。また、動的光散乱法および走査電子顕微鏡観察により、ラットに気管内投与したMWCNTの肺内における分散状態が良好であることを確認した。

西沢は、湿式法および乾式法の2つの方法でMWCNTの吸入暴露法の検討を行った。湿式法による検討では、Tween 20を分散剤として用い、Tween 20水溶液中にMWCNTを懸濁し、そのMWCNT懸濁液をミスト化する方法をとった。ミスト発生器の改良により、チャンバー内MWCNT濃度は0.143 mg/m<sup>3</sup>となった。乾式法による検討では、エアロゾル発生部にMWCNTの輸送を行うフィーダー部とエアロゾルの発塵を行う発生部の検討を行った。フィーダーについては、機械式の粉体用超微量フィーダーは、短時間の運転ではMWCNTの供給量の制御が可能であった。発生器は流動層方式の発生器の開発を試みた。発生器は流動層内のMWCNTの分散化をめざし、流動層部に振動を与え、流動層に攪拌子として流星ミルとガラスビーズを封入した。エアロゾル発生試験では、吸入チャンバー内MWCNT濃度は0.21 mg/m<sup>3</sup>となった。しかし、目標とする濃度で精度よく継続的に暴露することは困難であり、今後、湿式法および乾式法とも発生装置の実用化にはさらなる検討が必要である。また、吸入チャンバー内の気中へのMWCNT拡散法については別途、検討が必要である。

相磯は、ラットの気管内投与試験ではMWCNTを気管内に単回噴霧し、投与後1日、7日、28日、91日目に解剖し、気管支・肺胞洗浄液の細胞学的検査、生化学的検査、

光学顕微鏡レベルでの肺を含む胸部臓器の病理組織学的検査を行った。MWCNTを単回気管内投与したラット肺の変化は次のような経過を辿ることが明らかとなった。投与後1日目に、肺組織の傷害と急性炎症みられ、投与後7日以降では急性炎症は終息した。MWCNTを貪食したマクロファージの肺胞壁への集簇がみられ、マクロファージによるMWCNTの肺内からのクリアランスが示唆された。肺の線維化は投与後28日以降にみられた。陽性対照としたQuartzとの比較では肺への生体影響はMWCNTの方がQuartzよりも強く現れることが判明した。来年度以降、ナノサイズのマテリアルの体内動態について電子顕微鏡を用いた検索を展開する準備として、胸腔内の各臓器間の連携を保った状態で検索が可能な大型のエポキシ樹脂包埋標本の作製を目標として「複合臓器包埋による電子顕微鏡試料作製」技術を酒井電子顕微鏡応用研究所と共同開発し、十分評価に耐えるレベルであることが確認できた。

甲田は、相磯班員の研究で得られたラットを用いて、呼吸器以外の臓器や血液への影響について検索した。その結果、血液学的検査では投与後7日に40および160 µg/匹投与により好酸球と赤血球数の増加、血液生化学的検査では投与後1日に160 µg/匹投与群の総蛋白、総コレステロール、リン脂質、ALP、尿素窒素、カリウム、カルシウムおよび無機リンの高値、A/G比とクロールの低値が認められた。また、投与後28日に160 µg/匹投与群の肝臓の実重量と体重比の低値がみられた。この結果から、MWCNTは気管内投与により肺外影響がみられることが実証された。

吉田は、カーボンナノチューブのミストおよびリポゾームを用いたフラールを雄ラットに単回吸入暴露し、神経系器官を中心に経時的な病理形態学的検索を実施した。その結果、嗅球を始めとする神経系組織には光学顕微鏡レベルでは異常は認められなかった。投与物質の嗅球への移行については今後電顕微鏡での観察を予定しているが、本投与量において、これらの物質の単回吸入暴露は、光学顕微鏡レベルでの器質的な毒性を及ぼさないと結論した。

小川は、野口班員の研究で得られたgpt deltaラットを用いて、MWCNTを単回気管内投与したラットの肺を対象とした定量的なマイクロアレイ解析 (Percellome法) 研究に着手した。さらに、肺の遺伝子発現データの解析に資するため、雄C57BL/6マウスの肺の遺伝子発現データベースを構築するとともに、酸化的ストレス応答関連遺伝子等の肺での発現レベルを明らかにした。

木下は、相磯班員の研究で得られたラットを用いて、MWCNTの単回気管内投与後、1、7、28および91日のラット肺における8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) 形成レベルをHPLC-ECD法を用いて検討した。その結果、7日と28日後に8-OHdG形成レベルが用量依存性に上昇していることを見出した。

長野は、多くのナノマテリアルで共通して標的臓器となる可能性が高い肺を標的とした中期発がん試験に利用可能なイニシエーション処理と試験プロトコールについて検討した。その結果、ラットを使用した中期発がん試験では、雌雄F344系ラットを使用し、イニシエーション処理としてDHPNを腹腔内、あるいは飲水に混入して投与し、その後、ナノマテリアルを経気道投与する方法をプロトコールの基本とするのが適切であると結論した。



浅倉は、発がん性スクリーニング法のための *in vitro* 系での遺伝毒性試験による評価手法の開発を目的として、MWCNTを用い、溶媒、分散方法、細胞種、細胞毒性指標の検討を実施した。その結果、以下の手法を確立することが出来た。1) 溶媒はDMSO/培養液に懸濁する。2) 超音波ホモジナイザーにより分散(3分)する。3) 試験した3種の細胞ともに感受性があり、変異原性の評価に広く用いられている細胞の使用が可能である。4) 毒性指標としては、コロニー法、酵素放出法のどちらを用いることも可能である。

野口は、ナノマテリアルの *in vivo* 突然変異原試験を開発する目的として、トランスジェニック動物であるgpt delta ラットにMWCNTを気管内投与し肺での突然変異検出試験を実施した。その結果、28日後の肺ではgpt 突然変異頻度の増加は認められなかった。現在、Spi-突然変異頻度分析、その他 BAL および精巣について突然変異の分析を実施中である。

平田は、フラーレンおよびカーボンナノチューブの職業暴露および吸入毒性に関する公開情報を収集し、整理した。職業暴露に関する情報は非常に限られていたが、毒性影響に関しては、近年、気管内投与、咽頭吸引、エアロゾルへの鼻部/全身暴露による *in vivo* 試験の結果が蓄積されつつある。しかし、これらの多くは比較的高用量を投与/暴露させた際の短期的な影響を調べたものであるから、職業暴露に関する更なる調査を実施し、その暴露状況を反映した慢性試験の実施が望まれると結論した。

#### 研究分担者氏名・所属施設名および所属における職名 (50音順)

相磯 成敏	中央労働災害防止協会日本バイオアッセイ研究センター病理検査部病理検査室長
浅倉 眞澄	中央労働災害防止協会日本バイオアッセイ研究センター病理検査部培養細胞試験室 室長
小川 幸男	国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター毒性部 室長
木下アンナ	大阪市立大学大学院医学研究科都市環境病理学 助教
甲田 茂樹	独立行政法人労働安全衛生総合研究所、研究企画調整部 上席研究員
鷹屋 光俊	独立行政法人労働安全衛生総合研究所環境計測管理研究グループ 上席研究員
長野 嘉介	中央労働災害防止協会日本バイオアッセイ研究センター 副所長
西沢 共司	中央労働災害防止協会日本バイオアッセイ研究センター試験管理部 部長
野口 忠	中央労働災害防止協会日本バイオアッセイ研究センター試験管理部動物管理室・病理検査部微生物試験室 室長
平田 睦子	国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター総合評価研究室主任研究官
吉田 緑	国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター病理部 室長



## A. 研究目的

ナノマテリアルは極めて微細であり一般生活環境や産業現場の気中に拡散しやすいため、経気道的に容易に体内に侵入する可能性が高く、その吸入暴露によるヒトへの健康影響が深刻に懸念される。本研究の目的は、ナノマテリアルの吸入によるヒトへの健康影響の評価に役立つ手法を開発することである。

この目的のため、ナノマテリアルの吸入暴露実験手法の開発、すなわち実験動物への暴露量および暴露形態を把握するための、ナノマテリアルの性状、拡散状態および濃度を把握する方法、ならびにナノマテリアルの気中への拡散法および吸入チャンパー内へ安定供給する方法について研究する。また、この暴露技術を用いて動物にナノマテリアルを吸入暴露させ、長期毒性を視野に入れた健康影響の評価手法、すなわち、呼吸器および呼吸器以外の臓器への影響を調べるための光顕および電顕レベルでの病理学的検査法、ナノマテリアルの体内動態、すなわち肺への蓄積およびリンパ節等の種々の組織への移行を調べる手法、吸入暴露肺におけるc-DNAマイクロアレイによる毒性評価、毒性発現における酸化ストレスの関与について研究する。

さらに、ナノマテリアルの長期吸入暴露は現状では不可であることから、ナノマテリアルの長期暴露による発がん性等の健康影響を短期かつ効率的に評価するための手法を確立するために、吸入暴露による肺を標的とした中期発がん試験法の開発、培養細胞を用いた*in vitro*試験系、遺伝子改変動物を用いた*in vivo*試験系による遺伝毒性スクリーニング法を開発する。

また、吸入暴露システムの開発のために適切な吸入暴露条件を検討することを目的として、産業用ナノマテリアルの暴露情報、特に吸入暴露に関する情報を収集・整理する。これらの研

究成果を基にナノマテリアルの吸入によるヒトへの健康影響の総合的評価手法を確立する。

## B. 研究方法

### I. ナノマテリアルの吸入暴露手法の開発

I-1. 実験動物への暴露量および暴露形態を把握するための、ナノマテリアルの性状、拡散状態及び濃度を把握する方法に関する研究

鷹屋は、多層カーボンナノチューブ (MWCNT) (三井物産(株)提供: MWNT-7) に含まれる不純物金属元素の定性・定量について、レーザー気化誘導結合プラズマ質量分析 (LA-ICP-MS)、レーザーブレイクダウンプラズマ分光分析 (LIBS)・蛍光X線分析 (XRF) などの条件を検討した。また、不純物とともに重要な情報である粒子の分散状態について、動的光散乱法 (DLS) および走査電子顕微鏡観察 (SEM) による観察を行った。

I-2. ナノマテリアルの気中への拡散法、及び吸入チャンパー内へ安定供給する方法に関する研究

西沢は、ナノマテリアルの一種である MWCNT の吸入暴露法を湿式法および乾式法の 2 つの方法で検討した。湿式法による検討では、Tween 20 水溶液中に MWCNT を懸濁し、その MWCNT 懸濁液をミスト化する方法をとった。乾式法による検討では、エアロゾル発生器 (部) に MWCNT の輸送を行うフィーダー部とエアロゾルの発塵を行う発生器の検討を行った。発生器については、流動層方式の発生器の開発を試みた。

II. ナノマテリアルの吸入暴露による健康影響の評価手法の確立

II-1. ナノマテリアルの吸入暴露による呼吸器への生体影響の評価手法に関する研究

MWCNT をラットの気管内に単回噴霧し、投与後 1

日、7日、28日、91日に解剖し、気管支・肺胞洗浄液の細胞学的検査、生化学的検査、光学顕微鏡レベルでの肺を含む胸部臓器の病理組織学的検査を行なった。陽性対照としてQuartzを用いた。また、ナノマテリアルの体内動態を把握するのに不可欠な電子顕微鏡による超微細形態検索では、剖検や病理組織学的検索で影響が認められた部位を確実に検索できる方法として、胸腔内の各臓器間の連携を保った状態で大型のエポキシ樹脂包埋標本を作製する技術の開発に酒井電子顕微鏡応用研究所と共同で取り組んだ。

(倫理面への配慮) 本研究は、日本バイオアッセイ研究センターの「動物実験に関する指針」に基づき実施した。

## II-2. ナノマテリアルの吸入暴露による肺外影響の評価手法に関する研究

甲田は、ラットにMWCNTを40および160  $\mu\text{g}/\text{匹}$  単回気管内投与し、投与後1、7、28および91日に動物を解剖し、血液学的検査、血液生化学的検査、病理学的検査を行ない、肺外影響を検索した。陽性対照としてQuartzを単回気管内投与したラット、および対照群として溶媒のみを気管内投与したラットを用いた。

(倫理面への配慮) 本研究は日本バイオアッセイ研究センターの「動物実験に関する指針」に基づき実施した実験により得られた材料を使用した。

## II-3. 超微細形態学的手法を用いたナノマテリアルの吸入暴露による中枢神経系への影響の特徴と検出系の確立

吉田は以下の二種類の物質について実験を行った。1) MWCNTのミストを単回吸入暴露したラットの神経系器官における経時的な病理形態学的変化 および 2) リポソームを用いたフラージェン単回吸入ラットの神経系器官の経時的な病理

組織学的変化。いずれの実験についても、6週齢の雄20匹のSDラットに被験物質を単回吸入暴露させ、暴露後0、3、7、14および28日後に各5匹を安楽死させ検索した。対照群には溶媒のみ投与し同様に検索した。これらの動物から得られた嗅球、脳および肺などについて病理組織学的検索を実施した。また嗅球等一部の組織について電子顕微鏡で観察するためグルタルアルデヒドで固定し、エポキシ樹脂包埋を行った。

(倫理面への配慮) 上記の2試験において使用した動物については、実験動物の適切な扱いに関する国内外の法規・規則・ガイドライン等に準拠しており、動物実験についても試験実施施設における動物実験委員会による事前審査とモニタリングを受けることにより、適切な倫理面への配慮を行った。

## II-4. ナノマテリアルの吸入暴露肺のc-DNAマイクロアレイによる毒性評価に関する研究

小川は、MWCNTを単回経気道暴露した動物(ラット)について、経時的に肺を採取し、定量的マイクロアレイ解析を行った。サンプルは、野口班員の研究から得られた肺を使用した。また、マイクロアレイデータの解析には定量的比較を正確に行うために、国立衛研毒性部で開発したPercellome手法(細胞1個当たりのmRNA絶対値を得る遺伝子発現解析手法)を用いた。さらに、ナノマテリアル標的臓器の遺伝子発現解析に資するための、無処置肺(マウス)の遺伝子発現日内変動のデータベースの構築を行った。

(倫理面への配慮) 動物の屠殺に当たっては、麻酔薬の使用や頸椎脱臼法など苦痛の少ない方法を用いること等、本研究の実験動物取り扱い倫理規定に準拠した対応を行った。

## II-5. ナノマテリアルの吸入暴露肺における酸化ストレスの関与



木下は、ナノマテリアルの肺における毒性影響に酸化DNA傷害が関与しているかどうかを解析するために、MWCNT (0 µg, 40 µgおよび160 µg/匹) とquartz (0 µgおよび160 µg/匹) を単回気管内投与したラットの投与後1日、7日、28日および91日の肺について、HPLC-ECD法を用い、8-OHdGの形成レベルを検討した。

(倫理面への配慮) 本研究は日本バイオアッセイ研究センターの「動物実験に関する指針」に基づき実施した実験により得られた材料を使用した。

#### II-6. ナノマテリアルの吸入暴露による中期発がん試験法の開発に関する研究

長野は、ナノマテリアルの吸入暴露による中期発がん試験を開発することを目的として、多くのナノマテリアルで共通して標的臓器となる可能性が高い肺を標的とした中期発がん試験について、動物種、動物の系統、性および週齢、イニシエーション処理の方法 (イニシエーターの種類、投与経路、投与期間、用量、イニシエーション処理後の休薬期間)、ナノマテリアルの投与期間、発がん性の検出方法について文献等の情報を収集し、ナノマテリアルの吸入暴露による中期発がん試験のイニシエーション処理と試験プロトコルの検討を行った。

#### III. *in vitro*及び*in vivo*試験系によるスクリーニング法の有効性の評価

##### III-1. ナノマテリアルの発がん性スクリーニングのための*in vitro*系での遺伝毒性試験による評価手法に関する研究

浅倉は、MWCNT を用い、培養液に均一に懸濁するための溶媒の検討、分散方法および分散時間の検討、細胞種の検討、細胞毒性指標の検討を実施した。細胞は、チャイニーズハムスター肺由来の細胞株 (CHL/IU, V79) および、BALB/cマウス由来の細胞株 (BALB/c3T3) を使用した。

培養液は、MEM + 10% 牛胎児血清 (V79, BALB/c3T3) または、MEM + 10% 仔牛血清 (CHL/IU) を使用した。

(倫理面への配慮) 使用した細胞は、マウスまたはチャイニーズハムスター由来の細胞株であり、ヒト由来の細胞は使用していない。

##### III-2. ナノマテリアルの吸入による発がん性スクリーニングのための*in vivo*系での遺伝毒性試験による評価手法に関する研究

gpt delta ラットは、大腸菌gpt遺伝子をレポーターとする6-TGセレクションを用いる点突然変異と、ラムダーファージred/gam遺伝子をレポーターとする欠失変異の検出が可能なトランスジェニック動物で、遺伝子に欠失を誘発するような化学物質の遺伝子変異を検出するのに有効な試験系である。野口は、MWCNTおよびQuartzを気管内に投与し、肺の突然変異誘発性を検索することにより、ナノマテリアルに対する安全性評価における gpt delta ラットを用いる突然変異試験の有効性を検討した。

(倫理面への配慮) 本研究は、日本バイオアッセイ研究センターの「動物実験に関する指針」に基づき実施した。

#### IV. ナノマテリアルの吸入暴露情報に関する調査研究

平田は、産業用ナノマテリアルの吸入暴露による健康影響を評価するための適切な暴露条件や毒性評価法等に関する論点を明らかにするために、職業暴露情報や吸入暴露を介した毒性影響に関する情報を収集し、整理した。本年度は、炭素系ナノマテリアル (フラーレンおよびカーボンナノチューブ) に焦点を当て、文献情報等の公開情報の収集・整理を行った。文献検索にはMedlineを用い、2004年以降の最新情報に焦点をあてて検索を行った。

(倫理面への配慮)本研究は、公表情報を収集し、整理したものであり、倫理面での問題はない。

## C. 研究結果

### I. ナノマテリアルの吸入暴露手法の開発

I-1. 実験動物への暴露量および暴露形態を把握するための、ナノマテリアルの性状、拡散状態及び濃度を把握する方法に関する研究(鷹屋)

XRF測定による定性で、MWCNT中には不純物として鉄が含まれていることが解った。MWCNT試料を既知量の金属酸化物と混合してXRF測定を行うことにより、オーダー分析を行った結果、鉄の含有量は1%内外であった。また、LA-ICP-MSを用いた高感度分析により、鉄の他に銅やマンガンが微量含まれている可能性を見いだした。

SEMおよびDLSにより、当研究班の「ナノマテリアルの吸入暴露による呼吸器への生体影響の評価手法に関する研究(相磯)」における投与試料の分散性を調べた結果、動物に投与した0.1% Tween80添加PBS中では、MWCNTの分散性は良好であることが確認された。

気管内投与したラット肺切片のSEM観察を試み、ほぼ無処理の切片においてMWCNT繊維の観察が可能であった。一方繊維の分布をより明確に把握するために行った、酸素プラズマ処理切片では、肺組織とともにMWCNT繊維も灰化され、十分な観察が行えなかった。

I-2. ナノマテリアルの気中への拡散法、及び吸入チャンパー内へ安定供給する方法に関する研究(西沢)

湿式法による検討では、ミスト発生部の改良等により、吸入チャンパー内のMWCNTの濃度は0.143 mg/m<sup>3</sup>となった。

乾式法による検討では、フィーダーについては

機械式の粉体用超微量フィーダーが30分以内の運転ではMWCNTの供給量の制御が可能であった。発生器については、流動層内のMWCNTの分散化をめざし、流動層部に振動を与え、流動層に攪拌子として流星ミルとガラスビーズを封入した。この発生器によるMWCNTエアロゾル発生試験では、吸入チャンパー内MWCNT濃度は0.21 mg/m<sup>3</sup>となった。

II. ナノマテリアルの吸入暴露による健康影響の評価手法の確立

II-1. ナノマテリアルの吸入暴露による呼吸器への生体影響の評価手法に関する研究(相磯)

MWCNTの単回気管内投与によるラットの肺への影響として、投与後1日に好中球の遊走を中心とした急性炎症、肺毛細血管からの血漿蛋白の漏出、II型肺胞上皮細胞をはじめとする肺組織の傷害が病理組織学的検査および気管支・肺胞洗浄液の細胞学的および生化学的検査結果で示された。また、MWCNTを食食したマクロファージが肺胞腔内や壁内に認められ、マクロファージによるMWCNTのクリアランスも示唆された。肺の急性炎症は投与後7日にはほぼ終息した。投与後28日以降、MWCNT投与群とQuartz投与群に病理組織学的検査で肺に軽度な線維化が認められた。MWCNT投与群とQuartz投与群の肺への影響を比較すると、MWCNT投与群の肺重量、気管支・肺胞洗浄液、肺の線維化はQuartz投与群よりも強かった。

超微細形態検索のための技術開発では、0.5% glutaraldehyde添加2% paraformaldehyde固定液で頭部から胸部を還流固定した胸腔内臓器(気管、縦隔の組織、肺、胸腺、リンパ節、食道)を一塊として摘出、頭側から腹側方向に胸腔内臓器全長に渡り約0.5mm厚で連続的に切り出す方法を開発し、大型のエポキシ樹脂包埋試料を作製した。このエポキシ樹脂包埋試料で光学顕微鏡用の厚切り切片と透過型電子顕微鏡用の超薄切片を作製して、光学顕微鏡と電子顕微鏡の像を観察した。その結



果、本研究で開発した技術が今後の研究で十分評価に耐えるレベルであることが確認できた。

## II-2. ナノマテリアルの吸入暴露による肺外影響の評価手法に関する研究 (甲田)

MWCNTの投与による動物の死亡や臨床症状の異常は認められなかったが、血液学的検査により投与後7日に40および160 $\mu$ g/匹投与により好酸球と赤血球数の増加が認められた。血液生化学的検査では、投与後1日に160 $\mu$ g/匹投与群の総蛋白、総コレステロール、リン脂質、ALP、尿素窒素、カリウム、カルシウムおよび無機リンが高値、A/G比とクロールが低値を示した。また、投与後28日に160 $\mu$ g/匹投与群の肝臓の実重量と体重比の低値がみられた。Quartz (160 $\mu$ g/匹)を投与した動物は、血液学的検査で投与後1日に好中球の高値と平均赤血球ヘモグロビン濃度の低値、投与後91日に赤血球数とヘマトクリット値の高値、血液生化学的検査で投与1日後にカルシウムの高値、臓器重量の測定で投与後91日に副腎の体重比の高値がみられた。

## II-3. 超微形態学的手法を用いたナノマテリアルの吸入暴露による中枢神経系への影響の特徴と検出系の確立 (吉田)

全ての検査時期において、対照群および投与群ともに嗅球に病理組織学的な異常は認められなかった。また、検索したその他の臓器においても、投与に関連した変化はいずれの検査時期にも認められなかった。

## II-4. ナノマテリアルの吸入暴露肺のc-DNAマイクロアレイによる毒性評価に関する研究 (小川)

MWCNTを単回経気道暴露した動物(ラット)のマイクロアレイ解析については、暴露実験を開始し、経時的に肺を採取、保存し、マイクロアレイ解

析の準備を進めた。また、雄C57BL/6マウスの肺の24時間の遺伝子発現データベースを構築し、既知のcircadian geneの変動について調べたところ、Arntl、Clock、DPP、Per1、Per2、Per3が、日内変動を示すことを確認した。また、これら以外に、各臓器に共通した、あるいは、各臓器に特異的に日内変動する遺伝子を同定した。その他、oxidative stress response gene等の恒常的な発現レベル(mRNAの細胞個当たりの平均コピー数)の変動を明らかにした。

## II-5. ナノマテリアルの吸入暴露肺における酸化ストレスの関与 (木下)

MWCNTを気管内投与したラットの肺の8-OHdG形成レベルは、投与1日後から上昇を示し、投与後7日と28日では低用量(40  $\mu$ g/匹)及び高用量(160  $\mu$ g/匹)投与とも有意な上昇がみられ、その上昇は用量依存性であった。しかし、91日後では8-OHdG形成レベルの上昇は認められなかった。

## II-6. ナノマテリアルの吸入暴露による中期発がん試験法の開発に関する研究 (長野)

ラットを使用した中期発がん試験については、イニシエーターとしてDHPNを使用した報告が多い。マウスを使用した中期発がん試験については、ウレタン、4-NQO、3-MC、DMBA等、ラットに比べ多くの種類のイニシエーターを用いた試験系がある。また、動物の系統もA/J系、ddY系、C3H系、BC3F1系等、多くの系統が使用されている。ハムスターを使用した中期発がん試験については、BOPやBPを使用した報告がある。

## III. *in vitro*及び*in vivo*試験系によるスクリーニング法の有効性の評価

### III-1. ナノマテリアルの発がん性スクリーニングのための*in vitro*系での遺伝毒性試験による評価手法に関する研究 (浅倉)

試験の結果、溶媒の種類による細胞毒性の強さは、DMSO/培養液>培養液>Tween80 (0.1mg/ml水溶液)>PBS>CMC (1%水溶液)の順となった。分散方法による細胞毒性の強さは、超音波ホモジナイザーによる直接分散>超音波槽内での間接分散となり、超音波ホモジナイザーでの分散時間は、3分>1分>10分>0.3分となった。試験した3種類の細胞ともにコロニー法では、ほとんど同じ用量で細胞毒性を示した。毒性指標としては、コロニー法、酵素放出法のどちらとも、MWCNTに対して感受性が示された。

### Ⅲ-2. ナノマテリアルの吸入による発がん性スクリーニングのための *in vivo*系での遺伝毒性試験による評価手法に関する研究 (野口)

投与後29日の肺の重量では、MWCNTの投与群で用量相関的な増加傾向が認められ、160 $\mu$ g/匹投与群では、肺の実重量および体重比共に対照群と比べ有意な増加を示した。Quartz投与群では増加は認められなかった。投与後29日の肺におけるMWCNTおよびQuartz投与群のgpt突然変異頻度に関しては、対照群に比べ増加は認められなかった。投与後90日における点突然変異、および欠失変異は、現在検討中である。

### Ⅳ. ナノマテリアルの吸入暴露情報に関する調査研究 (平田)

職業暴露に関する報告は非常に少なく、十分な情報は得られなかった。一方、毒性影響に関しては、気管内投与や咽頭吸引試験に加え、最近、エアロゾルへの鼻部/全身暴露試験の結果が公表されてきている。フローレンに関しては、投与/暴露後、一過性の炎症反応が見られたものの、肺の病理組織への影響の報告はなかった。カーボンナノチューブに関する試験では、投与/暴露後、比較的初期から、肺に肉芽腫性変化や線維性変化が

みられたことが報告されており、最近の研究結果は、その毒性には、粒子の形状や大きさ、分散状態等が重要な役割を果たしていることを示している。

## D. 考察

### I. ナノマテリアルの吸入暴露手法の開発

I-1. 実験動物への暴露量および暴露形態を把握するための、ナノマテリアルの性状、拡散状態及び濃度を把握する方法に関する研究 (鷹屋)

XRFによるMWCNT中金属不純物の濃度測定は、今回用いた試料に限らず、CNT一般に適用可能であると考えられるが、凝集性の高いMWCNTと濃度測定用に既知量添加するある金属酸化物とを均質に混合する方法など、尚改良の余地がある。LA-ICP-MSは、XRFでは検出できなかった微量金属成分の検出も行えたため、この方法で、定性だけでなく定量を行うための方法の開発が重要だと考える。

酸素プラズマ処理は、MWCNTの分解温度とされる800 $^{\circ}$ Cより低い200 $^{\circ}$ C程度で処理する手法にも係わらずプラズマ処理したラット肺切片では、MWCNT繊維が検出できなかった。その理由として、組織中に含まれる塩類影響だと考えられ、前処理条件のさらなる検討が必要だと考える。

I-2. ナノマテリアルの気中への拡散法、及び吸入チャンパー内へ安定供給する方法に関する研究 (西沢)

湿式法については、ミスト発生部の改良等により、チャンパー内MWCNT濃度は昨年度より高濃度となったが、より高濃度を目指すにはさらなる発生器の改良が必要である。また、実際の動物試験においては、Tween 20の生体への影響も懸念される。



乾式法については、流動層方式の発生器の開発を試み、チャンバー内濃度として0.21 mg/m<sup>3</sup>を得た。しかし、MWCNTを目標とする濃度で精度よく継続的に暴露することは困難であることが分かった。今後、発生器の材質、流動層内のMWCNTの分散法、大型チャンバーに対応するためのエアロゾル発生量等の検討が必要である。

## II. ナノマテリアルの吸入暴露による健康影響の評価手法の確立

### II-1. ナノマテリアルの吸入暴露による呼吸器への生体影響の評価手法に関する研究（相磯）

これまでの報告では単層カーボンナノチューブやMWCNTを実験動物に気管内投与すると病理組織学的には肺に肉芽腫が形成され、気管支・肺胞洗浄液の検査で炎症細胞、総蛋白、LDHおよびALPの増加がみられることが報告されており、本研究の結果はこれらの報告と概ね一致するものであったが、相違点も幾つかみられた。Quartzと比較するとMWCNTは肺への影響がより強く現れると考えられた。本研究では肺重量、気管支・肺胞洗浄液での各検査項目で投与濃度に良く対応した結果を得ており、MWCNT、Quartzそれぞれについて肺毒性の量-反応関係を明らかにすることができる。また、透過型電子顕微鏡を用いたナノマテリアルの体内動態の検索で用いる方法として開発した「複合臓器包埋による電子顕微鏡試料作製」が十分実用の域に達したと考えられ、ナノマテリアルの体内動態を検索するのに極めて有効な研究手段になると考える。

### II-2. ナノマテリアルの吸入暴露による肺外影響の評価手法に関する研究（甲田）

MWCNTの経気道的暴露による肺以外への影響が起きる可能性があることが示めされた。好酸球の増加は、アレルギー等の免疫系への影響を示唆する変化であり、注目すべき知見と考えられる。ま

た、MWCNTとQuartzの気管内投与による肺外影響は異なることが示めされた。ナノマテリアルについては、体内の侵入経路が気道以外にも存在する可能性があるとの指摘もあることから、経気道以外の体内侵入による肺外影響についても留意する必要がある。今後は、これらを考慮してMWCNTの肺から他臓器への移行とその経路および移行先の組織との生体反応などの課題を研究する必要がある。

### II-3. 超微形態学的手法を用いたナノマテリアルの吸入暴露による中枢神経系への影響の特徴と検出系の確立（吉田）

MWCNTのミストおよびリポソームを用いたフラレンを雄ラットに単回吸入暴露は、嗅球を始めとする神経系組織および呼吸器系組織には光学顕微鏡レベルでの異常を誘発しなかった。文献的に鼻腔の嗅細胞を介した神経系への移行は、古くからチンパンジーの実験でウイルス、近年ではラットの酸化マグネシウム粒子（粒子径30 nm）の実験等で報告されている。本年度の検討で、投与群に病理形態学的な異常が観察されないことから、今回の投与物質が細胞に変性・壊死など明らかな器質的な変化を及ぼすとは考えにくい。しかし、投与物質の嗅球への移行の確認は、ナノサイズの粒子の神経系への影響を研究する上で重要であることから、次年度は、本年度実施の2試験で得られた嗅球を用いて超微形態学的な検索を行い、さらに神経系への影響について検討を進める予定である。

### II-4. ナノマテリアルの吸入暴露肺のc-DNAマイクロアレイによる毒性評価に関する研究（小川）

雄 C57BL/6 マウスの肺、肝の 24 時間の遺伝子発現データベースの解析で、両臓器に共通して、あるいは、特異的に日内変動する遺伝子を同定す

ることが出来、今後の遺伝子発現データの解釈に役立つことが期待された。また、oxidative stress response gene の恒常的な発現レベルについて検討した結果、肺で分泌型の SOD-3 の相対的に高い発現が認められ、肺の細胞外で活性酸素の除去に働いていることが示唆された。

#### II-5. ナノマテリアルの吸入暴露肺における酸化ストレスの関与(木下)

MWCNTの気管内投与により、肺の8-OHdGの形成レベルの上昇が起きることが示された。今後、MWCNTによる8-OHdG形成レベルの上昇を分子生物学的に追究する。また、91日後において8-OHdG形成の上昇が見られなかった点については、8-OHdGの修復酵素の活性化との関連が推定されるため分子生物学的に詳細に検索を進めることが必要である。

#### II-6. ナノマテリアルの吸入暴露による中期発がん試験法の開発に関する研究(長野)

ラットを使用した中期発がん試験では、雌雄F344系ラットを使用し、イニシエーション処理としてDHPNを250~1000 mg/kgの用量で2回~4回腹腔内投与、あるいは飲水に1000 ppmの濃度で混入し2週間投与し、その後、ナノマテリアルを22~30週間、経気道投与する方法をプロトコールの基本とするのが適切と考える。マウスを使用した中期発がん試験では、A/J系マウスを使用し、イニシエーション処理としてウレタンを1000 mg/kgの用量で1回腹腔内投与し、その後、ナノマテリアルを16週間、経気道投与する方法をプロトコールの基本とするのが適切と考える。DHPNやウレタンの投与用量やナノマテリアルの投与期間に関する検討が今後の課題となる。

#### III. *in vitro*及び*in vivo*試験系によるスクリーニング法の有効性の評価

#### III-1. ナノマテリアルの発がん性スクリーニングのための*in vitro*系での遺伝毒性試験による評価手法に関する研究(浅倉)

通常の細胞毒性試験や変異原性試験で用いられているDMSOを使用すると強い細胞毒性を示したことから、不溶性でナノサイズのMWCNTの培養液への分散においても、DMSOが有効であることが確認された。エネルギー効率が高い超音波ホモジナイザーによる直接分散が良いと考えられるが、分散時間が長すぎると逆に凝集する危険性があることがわかった。また、試験した3種の細胞ともに感受性があり、変異原性の評価に広く用いられている細胞の使用が可能であること、毒性指標としてはコロニー法、酵素放出法のどちらを用いることも可能であることがわかった。

#### III-2. ナノマテリアルの吸入による発がん性スクリーニングのための*in vivo*系での遺伝毒性試験による評価手法に関する研究(野口)

gpt delta ラットに難溶性粒子状物質のMWCNTを気管内投与し肺での突然変異検出試験を実施した。その結果、投与後29日ではゲノム遺伝子に対して点突然変異は認められなかった。投与後90日における点突然変異、および欠失変異は、現在検討中である。

#### IV. ナノマテリアルの吸入暴露情報に関する調査研究(平田)

フラーレンおよびナノチューブの職業暴露に関する報告は非常に少なく、十分な情報は得られなかった。毒性影響に関しては、近年、*in vivo*試験の結果が蓄積されつつあるが、現時点では、吸入暴露による慢性的な影響を評価した試験の報告はなく、早期の実施が望まれる。最近の研究では、カーボンナノチューブの吸入毒性には、粒子の形状や大きさ、分散状態等が重要な役割を果たしていることが明らかとなっており、労働環境気



中の粒子の形状やその存在比率などについて詳細な調査が必要と考えられる。

## E. 結論

### I. ナノマテリアルの吸入暴露手法の開発

I-1. 実験動物への暴露量および暴露形態を把握するための、ナノマテリアルの性状、拡散状態及び濃度を把握する方法に関する研究（鷹屋）

蛍光X線分析、DLS、脱パラフィン切片のSEM観察といった比較的簡便な前処理しか要しない分析方法でも、MW-CNTの性状をある程度知ることが可能であり、長期間にわたり、大量の試料を扱う吸入暴露実験を行う際のドーズの管理には、このような手法を用いるのが適切であると考えられる。一方、微量不純物の定量など、より精密にMW-CNTの性質を把握するためには、尚研究を継続して手法の確立を図る必要がある。

I-2. ナノマテリアルの気中への拡散法、及び吸入チャンパー内へ安定供給する方法に関する研究（西沢）

主に湿式法と乾式法によるMWCNTエアロゾルの発生法について検討を行ったが、目標とする濃度で精度よく継続的に暴露することは困難であり、今後、湿式法および乾式法とも発生装置の実用化にはさらなる検討が必要である。また、吸入チャンパー内の気中へのMWCNT拡散法については別途、検討が必要である。

### II. ナノマテリアルの吸入暴露による健康影響の評価手法の確立

II-1. ナノマテリアルの吸入暴露による呼吸器への生体影響の評価手法に関する研究（相磯）

MWCNT単回気管内投与ラットの肺に、投与後1日に肺の急性炎症、マクロファージによるMWCNT

の貪食、投与後28日以降に肺に軽度の線維化がみられ、肺への影響の強さはMWCNTの方が陽性対照としたQuartzよりも強いことがわかった。また、ナノマテリアル研究のための電子顕微鏡試料作製技術を開発できた。

II-2. ナノマテリアルの吸入暴露による肺外影響の評価手法に関する研究（甲田）

ラットにMWCNT（40および160 $\mu$ g/匹）を単回気管内投与し、経時的に投与後91日まで動物を観察し、血液学的検査、血液生化学的検査、病理学的検査を行なった結果、血液学的検査により投与後7日に40および160 $\mu$ g/匹投与により好酸球と赤血球数の増加、血液生化学的検査では投与後1日に160 $\mu$ g/匹投与群の総蛋白、総コレステロール、リン脂質、ALP、尿素窒素、カリウム、カルシウムおよび無機リンが高値、A/G比とクロールが低値を示した。また、投与後28日に160 $\mu$ g/匹投与群の肝臓の実重量と体重比の低値がみられた。この結果から、MWCNTは経気道暴露により肺外影響を起こすことが示唆された。

II-3. 超微形態学的手法を用いたナノマテリアルの吸入暴露による中枢神経系への影響の特徴と検出系の確立（吉田）

カーボンナノチューブのミストおよびリポソームを用いたフラレンを雄ラットに単回吸入暴露し、神経系器官を中心に経時的な病理形態学的検索を実施した。その結果、嗅球を始めとする神経系組織には光学顕微鏡レベルでは異常は認められなかった。投与物質の嗅球への移行を含め超微形態学的レベルでの影響については、今後電子顕微鏡での観察を予定しているが、本投与量でこれらの物質の単回吸入暴露は、光学顕微鏡レベルで明らかな器質的な変化を及ぼさないと結論した。

## II-4. ナノマテリアルの吸入暴露肺のc-DNAマイクロアレイによる毒性評価に関する研究（小川）

ナノマテリアルの生体障害作用を分子レベルで明らかにするため、野口班員との共同で、gpt deltaラット雄にMWCNTを単回気管内投与後、31と90日後の肺を対象にした定量的なマイクロアレイ解析（Percellome法）研究に着手した。さらに、今後の肺の遺伝子発現データの解析に資するため、雄C57BL/6マウスの肺の遺伝子発現データベースを構築し、種々の遺伝子の日内変動、発現量等を明らかにした。

## II-5. ナノマテリアルの吸入暴露肺における酸化ストレスの関与（木下）

ナノマテリアルの単回暴露により、ラット肺のDNAの8-OHdG形成レベルが有意に増加していたが、時間と共に減少し、正常レベルに戻った。

## II-6. ナノマテリアルの吸入暴露による中期発がん試験法の開発に関する研究（長野）

ラットを使用した中期発がん試験は、F344系ラットを使用し、イニシエーション処理としてDHPNを腹腔内あるいは飲水に混入して投与し、その後、ナノマテリアルを経気道投与する方法をプロトコールの基本とするのが適切と結論された。また、マウスを使用した中期発がん試験は、A/J系マウスを使用し、イニシエーション処理としてウレタンを腹腔内投与する方法をプロトコールの基本とするのが適切と結論された。

## III. *in vitro*及び*in vivo*試験系によるスクリーニング法の有効性の評価

### III-1. ナノマテリアルの発がん性スクリーニングのための*in vitro*系での遺伝毒性試験による評価手法に関する研究（浅倉）

本年度の結果から、以下の手法を確立するこ

とが出来た。1) 溶媒はDMSO/培養液に懸濁する。超音波ホモジナイザーにより分散(3分)する。2) 試験した3種の細胞ともに感受性があり、変異原性の評価に広く用いられている細胞の使用が可能である。3) 毒性指標としては、コロニー法、酵素放出法のどちらを用いることも可能である。今後、この条件を基にして、細胞毒性試験、遺伝毒性試験等を用いた評価を行うこととする。

### III-2. ナノマテリアルの吸入による発がん性スクリーニングのための*in vivo*系での遺伝毒性試験による評価手法に関する研究（野口）

ナノマテリアルの*in vivo*突然変異原評価方法を検討する目的で、比較的大きな欠失変異の検出が可能なトランスジェニック動物gpt deltaラットに難溶性粒子状物質のMWCNTを気管内投与し肺での突然変異検出試験を実施した。その結果、投与後29日ではゲノム遺伝子に対して点突然変異は認められなかった。投与後90日における点突然変異、および欠失変異は、現在検討中である。

## IV. ナノマテリアルの吸入暴露情報に関する調査研究（平田）

フラーレンおよびカーボンナノチューブの職業暴露および吸入毒性に関する公開情報を収集し、整理した。職業暴露に関する情報は非常に限られていたが、毒性影響に関しては、近年、気管内投与、咽頭吸引、エアロゾルへの鼻部/全身暴露による*in vivo*試験の結果が蓄積されつつある。しかし、これらの多くは比較的高用量を投与/暴露させた際の短期的な影響を調べたものであるから、職業暴露に関する更なる調査を実施し、その暴露状況を反映した慢性試験の実施が望まれる。

## F. 健康危機情報



該当しない

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Take, M., Ohnishi, M., Nagano, K., Yamamoto, S., Fukushima, S. Design and performance of a system for blood collection of rats under whole-body inhalation exposure. *The Journal of Toxicologic Sciences*. 34, 221-226 (2009).

Ohnishi, M., Take, M., Yamamoto, S., Fukushima, S., Yajima, H. Identification of an N-acetylcysteine conjugate in the urine after oral administration of 2,4-dichloro-1-nitrobenzene to rats. *The Journal of Toxicologic Sciences*. 34, 233-237 (2009).

Kasai, T., Kano, H., Umeda, Y., Sasaki, T., Ikawa, N., Nishizawa, T., Nagano, K., Arito, H., Nagashima, H., Fukushima, S. Two-year inhalation study of carcinogenicity and chronic toxicity of 1,4-dioxane in male rats. *Inhalation Toxicology*. (in press).

Ohbayashi, H., Umeda, Y., Senoh, H., Kasai, T., Kano, H., Nagano, K., Arito, H., Fukushima, S. Enhanced hepatocarcinogenicity by combined inhalation and oral exposures to *N,N*-dimethylformamide in male rats. *The Journal of Toxicologic Sciences*. 34, 53-63 (2009).

Kasai, T., Saito, M., Senoh, H., Umeda, Y., Aiso, S., Ohbayashi, H., Nishizawa, T., Nagano, K., Fukushima, S. Thirteen-week inhalation toxicity of 1,4-dioxane in rats. *Inhalation Toxicology*. 20, 961-971 (2008).

Ohbayashi, H., Yamazaki, K., Aiso, S., Nagano, K., Fukushima, S., Ohta, H. Enhanced proliferative response of

hepatocytes to combined inhalation and oral exposures to *N,N*-dimethylformamide in male rats. *The Journal of Toxicologic Sciences*. 33, 327-338 (2008).

Ohbayashi, H., Saito, Senoh, H., Umeda, Y., Aiso, S., M., Yamazaki, K., Nagano, K., Yamamoto, S., Fukushima, S. Occurrence of two different types of glutathion s-transferase placental form positive hepatocytes after a single administration of 2,3,7,8-tetrabromo dibenzo-p-dioxin in rats. *Industrial Health*. 46, 281-288 (2008).

Kano, H., Umeda, Y., Saito, M., Senoh, H., Ohbayashi, H., Aiso, S., Yamazaki, K., Nagano, K., Fukushima, S. Thirteen-week oral toxicity of 1,4-dioxane in rats and mice. *The Journal of Toxicologic Sciences*. 33, 141-153 (2008).

福島昭治 発がん物質の同定：新しい発がん試験法の開発と動物から人への外挿。労働安全衛生研究、1, 141-149 (2008)

福島昭治 発がん物質のリスクアセスメント：科学的根拠に基づく新しい対応。Foods & Food Ingredients Journal of Japan、213, 392-401 (2008)

### 2. 学会発表

浅倉真澄、長野嘉介、有藤平八郎、福島昭治、多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の培養細胞を用いる細胞毒性および変異原性 第82回日本産業衛生学会(2009年05月、採択通知受領、演題番号：P1052)

相磯成敏、梅田ゆみ、山崎一法、長野嘉介、戸谷忠雄、鷹屋光俊、甲田茂樹、有藤平八郎、福島昭治、多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の単回強制気管内投与によるラットの肺及び肺外への影響：I 病理学的検索 第82回日本産業衛生学会(2009年05月、採択通知受領、演題番号：

P1053)

魏 民, 梯 アンナ, 福島昭治, 鰐淵英機. 膀胱発がん物質の早期検出マーカーの検討. 第25回日本毒性病理学会(2009年1月、浜松).

妹尾英樹, 梅田ゆみ, 片桐 卓, 相磯成敏, 長野嘉介, 福島昭治. N,N-Dimethylformamideの吸入曝露と飲水投与における肝臓病変の比較. 第25回日本毒性病理学会(2009年1月、浜松).

浅倉眞澄, 杉山淑江, 長野嘉介, 松岡厚子, 福島昭治, ナノ材料のin vitro安全性評価手法の開発-1- 二酸化チタン 第37回日本環境変異原学会(2008年11月)

加納浩和, 山崎一法, 梅田ゆみ, 大林久雄, 松本道治, 有藤平八郎, 福島昭治. 2-フェノキシエタノールのラット及びマウスへの経口投与による発がん性と慢性毒性. 第81回日本産業衛生学会(2008年6月、札幌).

高信健司, 竹内哲也, 奥田裕計, 長野嘉介, 福島昭治. アクリル酸エステル吸入曝露によるラットの生殖機能や児の発育に及ぼす影響. 第81回日本産業衛生学会(2008年6月、札幌).

笠井辰也, 斎藤 新, 武 信, 妹尾英樹, 相磯成敏, 野口 忠, 福島昭治. プロピオニトリルのラット及びマウスへの吸入投与による発がん性と慢性毒性. 第81回日本産業衛生学会(2008年6月、札幌).

H. 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