

- Shibutani, M., Takagi, H., Hirose, M., Nishikawa, A.: Induction of kidney and liver cancers by the natural food additive madder color in a two-year rat carcinogenicity study. *Food Chem. Toxicol.* 2009, 47: 184-191.
- ② Takanashi, M., Inoue, K., Yoshida, M., Morikawa, T., Shibutani, M., Nishikawa, A.: Lack of chronic toxicity or carcinogenicity of dietary N-acetylglucosamine in F344 rats. *Food Chem Toxicol.*, 2009, 47: 462-471.
- ③ Yahia, D., Tsukaba, C., Yoshida, M., Sata, I., Tsuda, S.: Neonatal death of mice treated with perfluorooctane sulfonate. *J. Toxicol. Sci.* 2008, 33: 219-226.
- ④ Abe, M., Suzuki, N., Yoshida, M., Usuda, K., Furukawa, S., Juneja, L.R., Okubo, T., Nakae D.: Possible carcinogenic risks of copper gluconate and their prevention by co-administered green tea catechins evaluated by a rat medium-term multi-organ carcinogenicity bioassay protocol. *Food Chem. Toxicol.* 2008, 46: 1760-1770.
- ⑤ Yoshida M., Watanabe G, Suzuki T, Inoue K, Takahashi M, Maekawa A, Taya K, Nishikawa A.: Long-Term Treatment with Bromocriptine Inhibits Endometrial Adenocarcinoma Development in Rats. *J. Reprod. Dev.* 2008. In press
- ⑥ Yoshida, M., Sanbuisso, A., Hisada, S., Takahashi, M., Ohno, Y., Nishikawa, A.: Morphological characterization of the ovary under normal cycling in rats and its viewpoints of ovarian toxicity detection. *J. Toxicol. Sci.* 2009, In press.
- ⑦ Sanbuisso, A., Yoshida M., Hisada, S., Sagami, F., Kudo, S., Kumazawa, T., Ube, M., Komatsu, S., Ohno, Y.: Collaborative work on evaluation of ovarian toxicity by repeated-dose and fertility studies in female rats. *J. Toxicol. Sci.*, 2009 In press.
2. 学会発表
- ① Yoshida, M., Maekawa A., Nishikawa, A.: Neonatal exposure to DES induces dose-dependent delayed effects at doses showing estrogenic activity in female Donryu rats. Program 47<sup>th</sup> Annual Meeting and ToxExpo. P.186, 2008.
- ② Yoshida, M., Tsuzuki, N., Watanabe, E., Ozawa, S., Suzuki, K., Nishikawa, A.: Dog and mouse studies: Merits in risk assessment of pesticides in Japan. *J. Toxicol. Sci. Suppl* 33, P.203, 2008.
- ③ 吉田緑、井上薫、高橋美和、西川秋佳。正常性周期におけるラット卵巣の形態学的特徴。第 25 回日本毒性病理学会講演要旨集。P.24、2009。
- H. 知的財産所有権の出願・登録状況  
なし

実験計画  
カーボンナノチューブのミストを暴露したラットにおける  
体内解析用サンプルにおける病理形態特徴

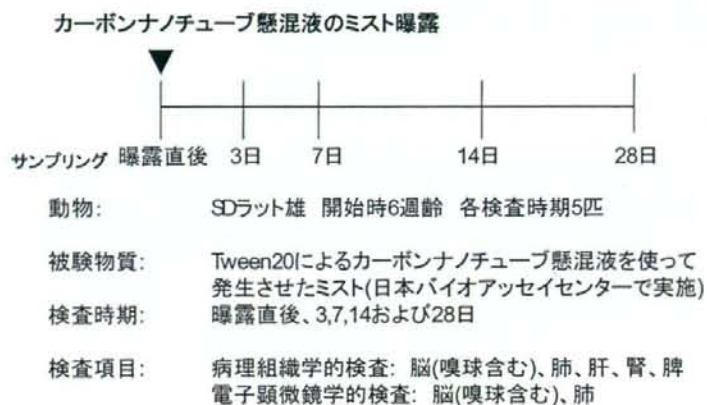


Figure 1 実験計画「カーボンナノチューブ(CNT)のミストを単回吸入暴露したラットの神経系器官における経時的な病理形態学的変化」

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

研究分担者 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

研究協力者 高木篤也 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

研究要旨

本分担研究では、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、平成 20 年度は野口班員との共同で、gpt delta ラット雄にナノマテリアルとして MWCNT を単回経気道暴露後、1ヶ月と3ヶ月後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。

A. 研究目的

近年、ナノマテリアルの健康影響について懸念が高まっている。本研究では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、国立衛研毒性部で開発した定量的なマイクロアレイ解析手法（Percellome 法）を用いて、肺を中心とした標的臓器の遺伝子発現に及ぼすナノマテリアルの影響について検討する。

B. 研究方法

今年度はマルチウォールカーボンナノチューブ（MWCNT）を単回経気道暴露（気管内投与）した動物について、経時的に肺を採取し、定量的マイクロアレイ解析を行う。動物実験プロトコールは、当研究班の野口班員の実施する動物実験により、そこから得られた臓器サンプルを使用することとした。すなわち、gpt delta ラット雄にナノマテリアルとして MWCNT を単回気管内投与後、31 と 90 日後に解剖を行い、肺のサンプリングを行う。臓器は遺伝子発現解析用に RNA 抽出用の溶液（RNAlater）に入れて、凍結保存する。なお、マイクロアレイ解析用の 1 群の匹数は 3 匹とした。RNA はキアゲン社の RNeasy にて抽出、40,000 以上の

遺伝子発現の解析が可能なアフィメトリクス社の Gene Chip Rat Genome 230 2.0 Array を用いて遺伝子発現解析を行う。また、定量的比較を正確に行うために、その解析には 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）を用いる。また、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、正常な肺の 24 時間内の遺伝子発現変動のデータベースの構築を行った。動物は C57BL/6 雄マウス（12 週令）を対象に、吸入暴露試験の対照群（暴露開始時間は午前 10 時、2 時間全身暴露後、通常の飼育環境に戻す）のデータを用いた。なお、暴露開始、投与開始時間（午前 10 時）をそれぞれ 0hr とした。データ解析には当研究部の独自開発ソフト MF analyzer を用いた。

（倫理面への配慮）

マイクロアレイのデータ解析に使用した動物の屠殺に当たっては、麻酔薬の使用や頸動脈結紮など苦痛の少ない方法を用いること等、当該研究所の実験動物取扱い倫理規定に準拠した対応を行っている。



## C,D.研究結果及び考察

1)MWCNTを単回経気道暴露したラットのマイクロアレイ解析については、動物実験を開始し、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ている。

2)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た。このデータベースを基に各臓器で発現する遺伝子の解析を行った。

### 2-1)House keeping gene の解析

House keeping gene である beta-actin, G3PDH, Hprt 遺伝子は、いずれも肺で高発現していたが、比較に用いた肝よりも低レベルであった。これらは各臓器毎の mRNA の産生量の特徴を反映していると考えられた。また、これらの遺伝子の日内変動は認められなかった(図 1)。臓器での mRNA の発現の絶対量が大きく異なることから、臓器間の遺伝子発現量を比較する際に、これらの house keeping gene を基準とした相対的遺伝子発現量を用いることは適当ではないと判断された。

### 2-2)Circadian gene の解析

遺伝子の中には日内変動を示すものが存在することが知られている。そこで、既知の circadian gene の変動について調べたところ、Arntl, Clock, DPP, Per1, Per2, Per3 とも肺で日内変動を示すことが確認された(図 2)。また、これら以外に、肺と肝に共通して、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。

### 2-3)Oxidative stress response gene の解析

ナノマテリアルの生体毒性における酸化ストレスの関与が指摘されている。そこで、oxidative stress response gene の恒常的な発現レベルについて検討した。その結果、catalase、SOD(superoxide dismutase)-1, 2, 3, thioredoxin-1, 2 とも肺での発現が認められたが、おおむね肝より低かった。SOD3は細胞外で働くことが知られており、肺で相対的に高い発現が認められ、肺胞等で活性酸素の除去に働いているものと思われた。

### 2-4) Prostaglandin 関連遺伝子の解析

ナノマテリアルの生体影響として組織の炎症反応が生じることが知られている。そこで、炎症に関与するプロスタグランジン関連遺伝子発現について調べた。その結果、肺では、Ltb4dh (leucotrien B14 12-hydroxydehydrogenase)と Ptgfrn (prostaglandin F2 receptor negative regulator)が高い発現を示していた。また、Ptgis (prostaglandin I2 (prostacyclin) synthase と Ptgsg2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2)が、肺に比べ相対的に高く発現しており、臓器特異的なプロスタグランジン代謝系を有していることが示唆された。

## E. 結論

マウス肺の遺伝子発現に及ぼす MWCNT の影響を分子レベルで明らかにするための定量的マイクロアレイ解析実験に着手するとともに、遺伝子発現解析に資するためのデータベースを構築した。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Induction of mesothelioma in p53+/- mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube, Atsuya Takagi, Akihiko Hirose, Tetsuji Nishimura, Nobutaka Fukumori, Akio Ogata, Norio Ohashi, Satoshi Kitajima and Jun Kanno, J. Toxicol. Sci., 33, 105-116, 2008.

### 2. 学会発表

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

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

Quantitative microarray analysis by “Percellome”  
method on murine embryonic stem cells and  
embryoid bodies, TAKAGI A, KITAJIMA S,  
NAKATSU N, IGARASHI K, AISAKI K, EMA M  
AND KANNO J, 47<sup>th</sup> Annual Meeting of Society of  
Toxicology, USA, 2008年3月

#### H. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

図1. 肺、肝で発現するhouse keeping gene

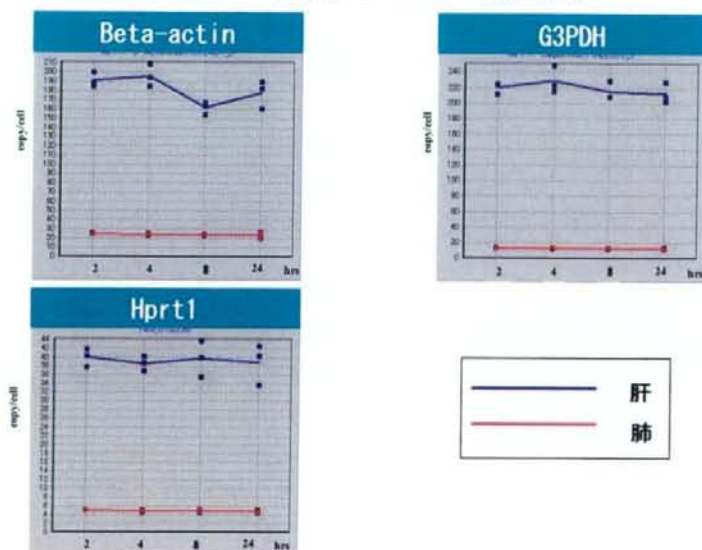


図2. 肺、肝で日内変動を起こすcircadian gene

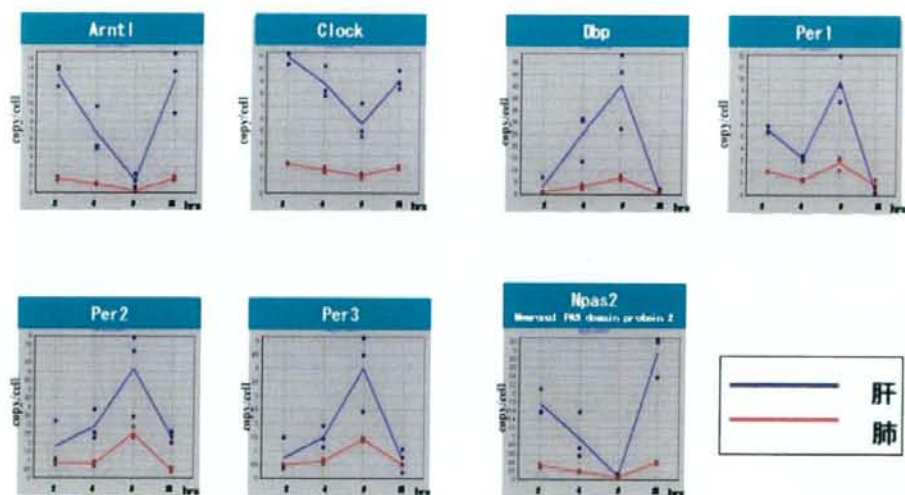


図3. 肺、肝で発現するoxidative stress response gene

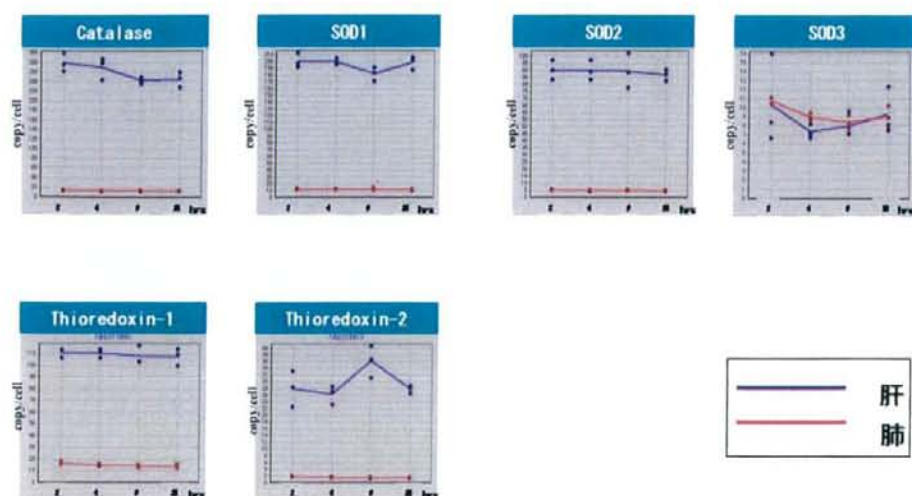
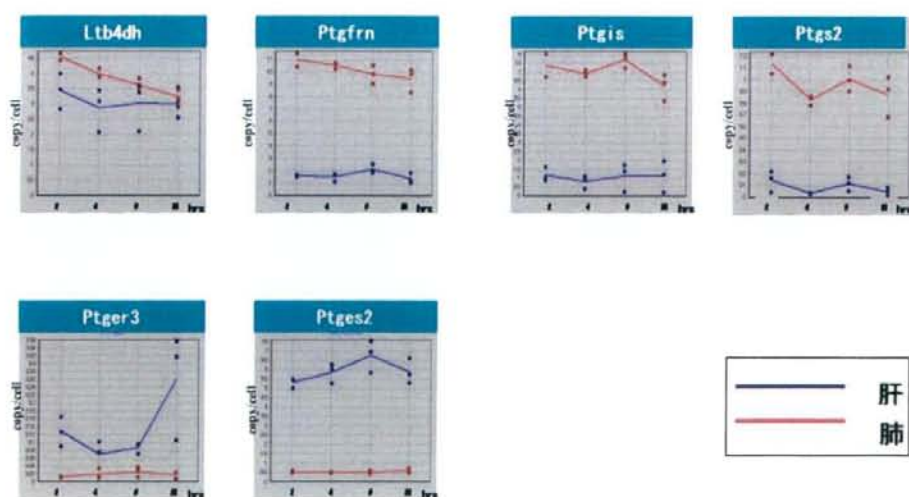


図4. 肺、肝で発現するプロスタグランジン関連gene





厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業、H20-化学-一般-006）  
分担研究報告書

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に関する研究

研究分担者 木下 アンナ 大阪市立大学大学院医学研究科助教

研究要旨： 本研究はナノマテリアルであるmulti-wall carbon nanotubes (MWCNT) 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ことを目的とした。MWCNT (40  $\mu\text{g}/0.3 \text{ ml}$  及び160  $\mu\text{g}/0.3 \text{ ml}$ ) の気管内噴霧投与を単回行い、1、7、28 及び91 日後ラット肺における8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) 形成レベルをHPLC-ECD法を用いて検討した。また、quartzを陽性対照群として用いた。その結果、MWCNTの低用量(40 $\mu\text{g}/0.3 \text{ ml}$ ) 及び高用量(160 $\mu\text{g}/0.3 \text{ ml}$ ) 投与により、ラット肺において短期間に8-OHdG形成レベルの有意な上昇が見られ、さらに、7日間と28日間後ではラット肺の8-OHdG形成レベルが用量依存性に上昇していることが観察された。しかし、91日後では差は認められなかった。

A. 研究目的

Multi-wall carbon nanotubes (MWCNT) のラット肺暴露における酸化DNA傷害の有無を調べるため、MWCNTの気管内噴霧投与を行い、8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) 形成レベルをHPLC-ECD法を用いて経時的に解析する。さらに、ナノマテリアルの暴露肺における8-OHdG修復酵素であるoxoguanine glycosylase 1 (Ogg1) の遺伝子の発現及び酸化ストレスに関与している蛋白質の発現について検討する。

B. 研究方法

本試験では6週齢F344/DuCr1Cr1j雄ラット40匹を用いて、0.1% Tween 80を添加したPBS溶媒に

混入したMWCNT(0, 40 及び160  $\mu\text{g}/0.3 \text{ ml}$ ) を単回気管内噴霧投与し、1、7、28 及び91 日後に動物を屠殺、解剖した。また、陽性対照としてquartz(160  $\mu\text{g}/0.3 \text{ ml}$ ) 投与を行った群を設けた。凍結保存したMWCNT及びquartz暴露肺における8-OHdGの形成レベルをHPLC-ECD法を用いて検討した。また、real-time quantitative PCR法を用いて、肺におけるOgg1 mRNAの発現解析、iTRAQ試薬を用いたQSTAR LC-Ms/Msプロテオーム解析を行う。

(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。



### C. 研究結果

MWCNT 気管内噴霧投与を単回行ったラット肺において1日後では、溶媒のみの対照群 ( $0.51 \pm 0.11$  8-OHdG/ $10^5$ dG) に対して、MWCNT の低用量 ( $40 \mu\text{g}/0.3 \text{ ml}$ ) 投与で肺の 8-OHdG 形成レベルの有意な上昇が認められたが ( $0.71 \pm 0.15$  8-OHdG/ $10^5$ dG;  $P < 0.005$ )、MWCNT の高用量 ( $160 \mu\text{g}/0.3 \text{ ml}$ ) 投与1日後における 8-OHdG の形成レベルは増加してなかった ( $0.55 \pm 0.13$  8-OHdG/ $10^5$ dG)。しかし、7日後では 8-OHdG 形成レベルが用量依存性をもって上昇した。すなわち、MWCNT の低用量 ( $40 \mu\text{g}/0.3 \text{ ml}$ ) 投与7日後では、溶媒対照群に対して ( $0.44 \pm 0.15$  8-OHdG/ $10^5$ dG)、8-OHdG 形成レベルの上昇傾向が見られた ( $0.54 \pm 0.13$  8-OHdG/ $10^5$ dG)。さらに、MWCNT の高用量 ( $160 \mu\text{g}/0.3 \text{ ml}$ ) 投与7日後における 8-OHdG の形成レベルが対照群に対して、有意に増加していた ( $0.59 \pm 0.15$  8-OHdG/ $10^5$ dG;  $P < 0.05$ )。MWCNT 投与を行った28日後において、MWCNT の低用量及び高用量投与群では、8-OHdG 形成レベルが用量依存性をもって上昇した (対照群:  $0.34 \pm 0.11$  8-OHdG/ $10^5$ dG; 低用量投与群:  $0.37 \pm 0.10$  8-OHdG/ $10^5$ dG; 高用量投与群:  $0.41 \pm 0.07$  8-OHdG/ $10^5$ dG)。MWCNT の低用量及び高用量投与の91日後における 8-OHdG の形成レベルの差は認められなかった (対照群:  $0.25 \pm 0.11$  8-OHdG/ $10^5$ dG; 低用量投与群:  $0.25 \pm 0.10$  8-OHdG/ $10^5$ dG; 高用量投与群:  $0.25 \pm 0.07$  8-OHdG/ $10^5$ dG)。Quartz

投与では1日後のみ、肺において 8-OHdG 形成レベルの上昇傾向が観察された。

肺における Ogg1 の mRNA 及びプロテオーム解析については現在、検索中である。

### D. 考察

カーボンナノチューブは独特の物性学的特性を持っており、その形状はアスベストと比較されてきている。最近、MWCNT のマウス及びラットへの腹腔内投与により、腹膜中皮腫の発生が報告されており、MWCNT 投与により胸膜中皮腫や肺がんの発生に対する懸念が高まっている。アスベストをハムスターまたはラットに気管内投与すると、8-OHdG レベルの増加とその修復活性の亢進が報告されている。本実験において、MWCNT 投与により肺の 8-OHdG の形成レベルの上昇が認められたが、91日後の 8-OHdG 形成レベルは対照群と差異を認めなかった。

今後、分子生物学的にその機序を追究するとともに、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、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検索を進める予定である。

### E. 結論

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。

F. 健康危惧情報  
特段無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) ○Fukushima, S., Kakehashi, A., Wei, M., Wanibuchi, H. Existence of a threshold for the genotoxic carcinogens: Evidence from mechanism-based carcinogenicity studies. *Genes and Environment*, 2009 (in press). (Kinoshita A.→Kakehashi A.)

2) Yamaguchi, C., Wanibuchi, H., Kakehashi, A., Tanaka, R., Fukushima, S. Chemopreventive effects of a serratane-type triterpenoid, 3 $\alpha$ -methoxyserrat-14-en-21 $\beta$ -ol (PJ-1), against rat lung carcinogenesis. *Food Chem. Toxicol.*, 46: 1882-1888, 2008.

3) ○福島 昭治, 魏 民, 梯 アンナ, 鰐淵 英機. 発がん物質にも閾値が存在する. *Mytotoxins*, 58: 119-128, 2008.

4) 福島 昭治, 魏 民, 梯 アンナ, 鰐淵 英機. 食品などに含まれる発がん物質に閾値が存在するのか. *食衛誌* 49: J314-J318, 2008.

5) 福島 昭治, 魏 民, 梯 アンナ,

鰐淵 英機. 環境化学発がん物質とその閾値 食品などに含まれる発がん物質を例として. *グリーンテクノロジ*, 18, 20-25, 2008.

6) 鰐淵 英機, 魏 民, 梯 アンナ, 福島 昭治. 尿路上皮癌の組織分類: 新WHO分類とその対比. *病理と臨床*・別刷, 26, 124-129, 2008.

2. 学会発表

1) ○梯 アンナ, 魏 民, 森村 圭一朗, 串田 昌彦, 福島 昭治, 鰐淵 英機. ラット肝発がんにおけるGST-P陽性細胞巢のプロテオームおよびバイオマーカー解析. 第24回日本2008 (第24回日本毒性病理学会講演毒性病理学会総会及び学術集会, 2月6-7日, 名古屋, 要旨集 p. 79).

2) 加藤 あゆみ, 梯 アンナ, 魏 民, 多胡 善幸, 山野 荘太郎, 村井 隆, 鰐淵 英機. マウス肝発がんにおける前がん病変マーカーの検索および機序解析. 第24回日本毒性病理学会総会及び学術集会, 2月6-7日, 名古屋, 2008 (第24回日本毒性病理学会講演要旨集 p. 79).

3) ○植松 真美, 梯 アンナ, 魏 民, 森村 圭一朗, 北野 光昭, 福島 昭治, 鰐淵 英機. OGG1 遺伝子欠損マウスにおける多臓器発がんの検討. 第24回日本毒性病理学会総会及び学術集会, 2月6-7日, 名古屋, 2008 (第24回日本毒性病理学会講演要旨集 p. 84).



4) 魏 民, 森村 圭一朗, 梯 アンナ, 串田 昌彦, 當真 香織, 鰐 淵 英機, 福島 昭治. 臭素酸カリウムのラット腎臓における変異原性と発がん性の閾値の存在. 第 24 回日本毒性病理学会総会及び学術集会, 2 月 6-7 日, 名古屋, 2008 (第 24 回日本毒性病理学会講演要旨集 p. 88).

5) 山野 荘太郎, 柚木 孝之, 梯 アンナ, 森 聖, 福島 昭治, 鰐 淵 英機. ラット膀胱発癌におけるロイシン, イソゾイシンの修飾作用の検討. 第 24 回日本毒性病理学会総会及び学術集会, 2 月 6-7 日, 名古屋, 2008 (第 24 回日本毒性病理学会講演要旨集 p. 92).

6) 多胡 善幸, 梯 アンナ, 今中 麻幸代, 魏 民, 森村 圭一朗, 林 修次, 鰐 淵 英機. 大豆イソフラボンのラット乳腺発がんおよび子宮に対する修飾作用. 第 24 回日本毒性病理学会総会及び学術集会, 2 月 6-7 日, 名古屋, 2008 (第 24 回日本毒性病理学会講演要旨集 p. 94).

7) Yamano, S., Kato, A., Kakehashi, A., Wei, Min., Morimura, K., Doi, K., Toma, K., Wanibuchi, H. Cytokeratin 8/18 as a novel biomarker of preneoplastic lesions in mice hepatocarcinogenesis. 99th AACR Annual Meeting, American association for Cancer Research,

April 12-16, San Diego, CA, USA, 2008 (Proceedings of the 99th Annual Meeting of the AACR, April 2008, 2202).

8) Wei, M., Kakehashi, A., Doi, K., Toma, K., Morimura, K., Wanibuchi, H. Promoting effects of diphenylarsinic acid on hepatocarcinogenesis induced by diethylnitrosamine in rats. 99th Association for Cancer Research, April 12-16, San Diego, CA, USA, 2008 (Proceedings of the 99th Annual AACR Annual Meeting, American Meeting of the AACR, April 2008, 5594).

9) 魏 民, 梯 アンナ, 土井 賢一郎, 森村 圭一朗, 福島 昭治. ジフェニルアルシン酸のラット肝発がんプロモーション作用. 第 92 回日本病理学会 5 月 15-17 日, 金沢, 2008 (日本病理学会会誌第 97 巻第 1 号, p. 267).

10) 多胡 善幸, 梯 アンナ, 北野 光昭, 森村 圭一朗, 林 修次, 鰐 淵 英機. 大豆イソフラボンのラット乳腺発がんおよび子宮に対する修飾作用. 第 92 回日本病理学会 5 月 15-17 日, 金沢, 2008 (日本病理学会会誌第 97 巻第 1 号, p. 326).

11) 梯 アンナ, 森村 圭一朗, 猪 上 麻幸代, 魏 民, 福島 昭治, 鰐 淵 英機. チェルノブイリ原発事故後の長期低用量放射線暴露による

膀胱がんの発生. 第 92 回日本病理学会 5 月 15-17 日, 金沢, 2008 (日本病理学会会誌第 97 巻第 1 号, p. 343).

12) 植松 真美, 梯 アンナ, 魏 民, 北野 光昭, 福島 昭治, 鰐淵 英機. OGG1 遺伝子欠損マウスにおける多臓器発がんの検討. 第 92 回日本病理学会 5 月 15-17 日, 金沢, 2008 (日本病理学会会誌第 97 巻第 1 号, p. 368).

13) 梯 アンナ, 魏 民, 猪上 麻幸代, 當真 香織, 多胡 善幸, 福島 昭治, 鰐淵 英機. プロボリスはラットに発癌性を示さない. 第 15 回がん予防学会 5 月 22-23 日, 福岡, 2008 (がん予防大会 2008 福岡プログラム・抄録集, p. 77).

14) 魏 民, 森村 圭一郎, 梯 アンナ, 土井 賢一郎, 福島 昭治, 鰐淵 英機. Oncomodulin はラット膀胱発がんの早期マーカーとして有用である. 第 67 回日本癌学会学術総会, 10 月 28-30, 2008 (Proceedings of 67<sup>th</sup> Annual Meeting of Japanese Cancer Association, p. 118).

15) 植松 真美, 梯 アンナ, 今中 麻幸代, 魏 民, 森 聖, 鰐淵 英機. マウスにおける肝がん病変の検索. 第 67 回日本癌学会学術総会, 10 月 28-30, 2008 (Proceedings of 67<sup>th</sup> Annual Meeting of Japanese Cancer Association, p. 122).

16) 〇梯 アンナ, 今中 麻幸代, 魏 民, 大西 真里子, 福島 昭治, 鰐淵 英機. ラット肝発がんにおける GST-P 陽性細胞巢のプロテオーム及びバイオマーカーの検討. 第 67 回日本癌学会学術総会, 10 月 28-30, 2008 (Proceedings of 67<sup>th</sup> Annual Meeting of Japanese Cancer Association, p. 122).

17) 山野 荘太郎, 多胡 善幸, 梯 アンナ, 植松 真美, 大西 真里子, 鰐淵 英機. A/J マウスを用いた NTCU 誘発肺扁平上皮癌の経時変化観察. 第 67 回日本癌学会学術総会, 10 月 28-30, 2008 (Proceedings of 67<sup>th</sup> Annual Meeting of Japanese Cancer Association, p. 179).

18) 多胡 善幸, 梯 アンナ, 北野 光昭, 山野 荘太郎, 大西 真里子, 鰐淵 英機. 大豆イソフラボンのラット乳腺発がんおよび子宮に対する修飾作用. 第 67 回日本癌学会学術総会, 10 月 28-30, 2008 (Proceedings of 67<sup>th</sup> Annual Meeting of Japanese Cancer Association, p. 181).

19) 山野 荘太郎, 多胡 善幸, 梯 アンナ, 魏 民, 鰐淵 英機. マウス肺扁平上皮がんモデルの開発. 第 23 回発癌病理研究会, 8 月 25-27 日, 2008 (23 回発癌病理研究会プログラム, p. 30).



20) 梯 アンナ, 石井 真美, 山野 莊太郎, 魏 民, 鰐淵 英機. マウス肝発がんにおけるプロテオームおよびバイオマーカー解析. 第 25 回日本毒性病理学会総会及び学術集会, 1 月 27-28 日, 浜松, 2009 (第 25 回日本毒性病理学会講演要旨集 p. 88).

21) 梯 アンナ, 魏 民, 猪上 麻幸代, 當真 香織, 多胡 善幸, 福島 昭治, 鰐淵 英機. ラットを用いたプロボリスの発がん性試験. 日本食品化学学会第 14 回総会・学術大会, 講演, 5 月 29-30 日, 西宮市, 2008 (日本食品化学学会第 14 回総会講演要旨集, p. 47).

22) 多胡 善幸, 梯 アンナ, 魏 民, 鰐淵 英機. スギナの安全性評価に関する研究. 日本食品化学学会第 14 回総会・学術大会, 講演, 5 月 29-30 日, 西宮市, 2008 (日本食品化学学会第 14 回総会講演要旨集, p. 48).

#### H. 知的財産所有権の出願・登録状

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

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

研究分担者 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

研究要旨

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利用可能なイニシエーション処理と試験プロトコ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ルの基本とするのが適切であると結論された。また、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腹腔内投与する方法をプロトコルの基本とするのが適切と結論された。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。

A. 研究目的

ナノマテリアルのヒトへの健康影響を評価する上で、長期暴露による発がん性が懸念されている。動物実験により化学物質の発がん性を調べるために、動物の寿命に相当する長期間にわたり化学物質を動物に投与する長期発がん性試験が行われてきた。ナノマテリアルは現在でも多くの種類があり、されに用途や製法により形状や不純物が異なる製品が多く存在している。また、ナノマテリアルの技術の進歩に伴いこれからはさらに多様なナノマテリアルが開発されていくことが予測される。ナノマテリアルの生体影響は、その形状や不純物などの物理化学的性質が関与していると考えられており、個々のナノマテリアルで発がん性が異なることが予測される。一方、現在行われている長期発がん性試験は、多数の動物、莫大な費用、期間がかかるため、個々のナノマテリアルについて長期試験を実施することは不可能である。このため、より短期間で多くの物質の発がん性を推定でき

るスクリーニング手法を開発することが必要である。化学物質の発がん性を推測するスクリーニング手法としては、微生物や培養細胞を用いた短期スクリーニング手法がある。しかし、ヒトへの外挿性を高めるためには、ほ乳動物を用い、腫瘍の発生をエンドポイントとしたスクリーニングを併用することが必要である。Itoら（1988、1989、1992、2003）は、ラットの肝を標的とする発がん物質を検出するための中期発がん性試験法を開発し、高い確率で被験物質の肝発がん性を検出することができることを証明している。

ナノマテリアルおよびナノマテリアル製品のヒトへの暴露経路としては、経気道的暴露が重要な位置を占めている。経気道的に暴露されたナノマテリアルは、気道、特に肺に沈着するため、肺に対する発がん性が検索すべき課題になる。また、カーボンナノチューブはその形状がアスベストと類似しているため、中皮腫の発生が懸念されている。このため、ナノマテリアル

の経気道投による肺や中皮を標的とした中期発がん性試験法を開発する必要がある。

本年度は、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利用可能なイニシエーション処理と試験プロトコルの選択を行った。

## B. 研究方法

ナノマテリアルは基本的に非遺伝毒性物質と考えられているため、今回の検討では既知の発がん物質（イニシエーター）を投与し、その発がんへの修飾作用を検出する方法を基本とした。また、中期発がん試験に实际的に使用しうる動物種は、ラット、マウスおよびハムスターであるため、これらの動物種別に下記の項目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。

- 1) 使用する動物の系統、性および週齢
- 2) イニシエーション処理の方法、すなわち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業期間
- 3) ナノマテリアルの投与期間
- 4) 発がん性の検出方法

なお、近年多用されつつある遺伝子改変動物の使用についても検討した。

## C. 研究結果

### C-1 ラットを使用した中期発がん試験

イニシエーターとして N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN) や diethylnitrosamine (DEN) を使用した中期発がん試験の報告がある。

Moorら(1986)は、6週齢のF344系雄ラットにイニシエーション処理としてDHPNを2週間

おきに4回(1000 mg/kgの用量で1回、250 mg/kgの用量で3回)腹腔内投与し、その後、被験物質であるdehydroepiandrosteroneを2週間混餌投与し、肺の過形成を指標として肺発がんへの修飾作用を調べている。この試験系におけるイニシエーション処理のみの群での肺の過形成は95%である。なお、肺以外の臓器については、肝臓と甲状腺への腫瘍の発生がみられている。また、彼らは、6週齢のF344系雄ラットにイニシエーション処理として1000 mg/kgの用量のDHPNを1週間おきに2回、腹腔内投与した試験も行っている(Moorら,1988)。この試験系におけるイニシエーション処理のみの群は、肺の過形成と腺腫の発生率が80%である。また、肺以外の臓器については肝臓への腫瘍の発生がみられている。Hasegawaら(1990)は、F344系雄ラットにイニシエーション処理としてDHPNを飲水に1000 ppmの濃度で混入し2週間投与し、その後、被験物質を餌に混ぜ30週間投与し、肺の過形成、腺腫およびがんの発生匹数、個数および面積を調べている。この試験系におけるイニシエーション処理のみの群の肺の腺腫とがんの発生率はそれぞれ100%と45%である。また、肺以外の臓器については、甲状腺(25%)と腎臓(10%)への腫瘍の発生がみられている。また、イニシエーション処理として、修復過程で高いDNA合成を引き起こす物質である4-methylthiobenzamideを1回腹腔内投与し、その後、DHPNを飲水に1000 ppmの濃度で混入し13日間投与する方法も報告されている(加藤ら,1998)。

NoronhaとGoodall(1983)は、85日齢のNZR/Gd系雌ラットにイニシエーション処理として、20 mg/kgの用量のDENを1回腹腔内投与し、その後、被験物質を生生涯にわたって皮下投与し、肺の腫瘍の発生を調べている。この試験系におけるイニシエーション処理のみの群の肺腫瘍



の発生率は24%であり、肺以外の臓器については、腎臓(20%)と肝臓(24%)への腫瘍の発生がみられている。

#### C-2 マウスを使用した中期発がん試験

マウス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3-methylcholanthrene(3-MC)、ウレタン、4-nitroquinoline 1-oxide(4-NQO)、7,12-dimethylbenz[ $\alpha$ ]anthracene(DMBA)等を使用した報告がある。

Henryら(1981)は、8~12週齢のC3H系とBC3F1系(C57BL $\times$ C3H)雌マウスにイニシエーション処理として3-MCを0.25 mg/kgの用量で1回、気管内投与し、被験物質を生生涯にわたって投与し、肺腫瘍の発生を病理組織学的に検査し、3-MCの肺発がん性への修飾作用を調べている。この試験系のイニシエーション処理のみの群での肺腫瘍の発生率は88~95%である。

Lindenschmidtら(1986)は、肺腫瘍好発系であるA/J系マウスの6~8週齢の雄に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、酸素濃度70%の空気を16週間吸入させ、肺腫瘍の発生数を拡大鏡で数え、ウレタンの肺発がん性への修飾作用を調べている。この試験系のイニシエーション処理のみの群での肺腫瘍の発生率は100%である。

Inayama(1986)は、6週齢のddY系雄マウスにイニシエーション処理として4-NQOを10 mg/kgの用量で1回、皮下投与し、4週間の休業期間の後、被験物質を餌に混ぜ25週間与え、肺腫瘍の発生数を拡大鏡で数え、4-NQOの肺発がん性への修飾作用を調べている。この試験系のイニシエーション処理のみの群での肺腫瘍の発生率は27%である。

PashkoとSchwartz(1996)は、8週齢のA/J系雄マウスにイニシエーション処理としてDMBAを0.5 mg/kgの用量で1回、経口投与し、その後、副腎を摘出し、14週間後に肺腫瘍の発

生数を拡大鏡で数え、DMBAの肺発がん性への修飾作用を調べている。イニシエーション処理のみの群での肺腫瘍の発生数は2個/匹である。

五十嵐ら(2006)は、6週齢のA/J系雄マウスにイニシエーション処理として6 mg/匹の用量の4-(methylnitrosamine)-1-(3-pyridyl)-1-butanone(NNK)を浸透圧ポンプを用いて1週間かけて皮下投与すると、28週に最も顕著に肺の増殖性病変が発生したことを報告している。

#### C-3 ハムスターを使用した中期発がん試験

ハムスターを使用した中期発がん試験は少ないが、N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine(BOP)等をイニシエーターとして用いた試験の報告がある。

Nishikawaら(1983)は、5週齢の雄のシリアンゴールデンハムスターにイニシエーション処理としてBOPを10 mg/kgの用量で1週間隔で3回皮下投与し、その後、タバコ煙を27週間吸入させ、肺の過形成と腺腫の発生を病理組織学的に検査し、BOPの肺発がん性への修飾作用を調べている。この試験系のイニシエーション処理のみの群での過形成の発生率は17%、腺腫の発生率は80%である。肺以外の臓器については、膀胱腫瘍の発生が57%の動物にみられる。また、BiitとPour(1983)は、8週齢の雌雄のシリアンゴールデンハムスターにイニシエーション処理としてBOPを10 mg/kgの用量で1回、皮下投与し、高脂肪食と低脂肪食を生生涯にわたって与え、肺腫瘍の発生を病理組織学的に検査し、BOPの肺発がん性への修飾作用を調べている。

その他のイニシエーション処理として、Beems(1984)は、雌雄のシリアンゴールデンハムスターにビタミンAを飼料に混ぜ生涯にわたって与え、その間に、イニシエーション処理としてBenzo[ $a$ ]pyrene(BP)と酸化鉄を2週間隔で5回気管内投与し、肺腫瘍の発生を病理組織学的に検査し、BPの肺発がん性へのビタミンA



の修飾作用を調べている。

#### C-4 遺伝子改変動物を使用した中期発がん試験

遺伝子改変動物にイニシエーション処理を行い、より短期間に発がん性を調べる試みが行われている。特に、ヒトプロト型c-Ha-ras遺伝子を導入したマウスを用いた中期発がん試験の報告が多い。例えば、田村ら(2000)は、CB6F1マウスにc-Ha-ras遺伝子を導入したトランスジェニックマウス(CB6F1-Tg rasH2マウス)に、イニシエーション処理としてウレタンを250 mg/kgの用量で1回、腹腔内投与し、その後、被験物質を26週間投与し、肺の病理検査を行っている。また、安原ら(2001)や高橋ら(2001)は、CB6F1-Tg rasH2マウスに、イニシエーション処理としてNNKを3 mg/kgの用量で2回腹腔内投与し、その後、被験物質を26週間投与し、肺の過形成、腺腫および腺癌の観察を行っている。

また、DNA酸化損傷の修復酵素である8-oxoguanine DNA glycosylase 1 (OGG1) 遺伝子欠損マウスに、イニシエーション処理としてNNKを浸透圧ポンプを用いて1週間皮下投与し、その後、被験物質を27~33週間投与し、肺の増殖性病変を調べた報告もある(五十嵐ら、2007)。

遺伝子改変ラットについては、Hras250ラットに気管よりCreloxPリコンビナーゼ発現アデノウイルスベクターを投与し、変異型Ha-rasV12遺伝子を発現させたラットを使用して、早期肺がんモデルを確立する試みが行われている。この系ではウイルス投与2週間後に組織学的に肺胞上皮および呼吸細気管支上皮の過形成や腺癌がみられたことが報告されている(大島ら、2008)。

#### D. 考察

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(Moorら、1986、1988、Hasegawaら、1990、加藤ら、1998)。現在までの知見では、DHPNに比べラットの肺腫瘍をより確実に誘発させる化学物質の情報は得られないことから、ラットを使用した中期発がん試験のイニシエーターとしてはDHPNを選択するのが適切と考える。使用する動物の系統については、長期がん原性試験で多用されているF344系雄ラットを使用できるため(Moorら、1986、1988、Hasegawaら、1990)、長期がん原性試験との比較を考慮してF344系ラットが選択できる。また、使用動物の週齢については、Moorら(1986、1988)は6週齢からイニシエーション処理を開始していること、また、6週齢の動物は入手が容易であることから、6週齢が適切と考える。性については雄を使った報告が多く雄を選択できるが、雌の使用についても検討することが課題と考える。DHPNの投与経路、投与期間、用量およびナノマテリアルの投与期間については、①DHPNを250~1000 mg/kgの用量で2回~4回腹腔内投与し、その後、被験物質を22週間投与する方法(Moorら、1986、1988)、および②DHPNを飲水に1000 ppmの濃度で混入し2週間投与し、その後、被験物質を餌に混ぜ30週間投与する方法(Hasegawaら、1990)がある。いずれの報告も、肺の増殖性病変の発生率が100%に近いこと、肺への発がん性の抑制効果を調べるためには適したプロトコールであるが、促進効果を目的とするためにはDHPNの用量の低減、またはナノマテリアルの投与期間の短縮について検討することが課題になる。従って、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。また、DHPNの用量の低減やナノマテリアルの投与期間の短縮が今後の課題になる。

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。すなわち、①3-MCをC3H系やBC3F1系マウスに投与した後、被験物質を生体投与する方法(Henryら,1981)、②ウレタンをA/J系マウスに投与した後、被験物質を16週間投与する方法(Lindenschmidtら,1986)、③4-NQOをddY系雄マウスに投与した後、被験物質を25週間投与する方法(Inayama,1986)、④DMBAをA/J系雄マウスに投与した後、被験物質を14週間投与する方法(PashkoとSchwartz,1996)、⑤NNKをA/J系雄マウスに投与した後、28週目に解剖する方法(五十嵐ら,2006)等が報告されている。いずれの方法も1回の投与で肺の過形成や腫瘍が高率に発生する方法であり、ナノマテリアルの中期発がん試験に利用できる可能性がある。特に、A/J系マウスに、ウレタンを腹腔内投与する方法やDMBAを経口投与する方法は、それぞれ16週間と14週間で肺に腫瘍を高率に発生させることができるため、試験期間をより短くした中期発がん試験の開発が可能と考えられる。また、試験従事者が発がん物質を取り扱う際の安全性を考慮すると、ウレタンがDMBAより安全性が高い。従って、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。また、ラットのDHPN処理

と同様に、このプロトコールではイニシエーション処理だけの群における肺の増殖性病変の発生率が100%であるため、用量の低減やナノマテリアルの投与期間の短縮が今後の課題になる。

発がん性の検出方法については、 $\gamma$ -glutamyltransferase (GGT) 陽性表現系に着目した検討が報告されているが(吉田ら,2003)、肺の増殖性病変の陽性率が低い実用化されていない。従って、現時点では、ラット、マウスとも、肉眼的および病理組織学的な検査による肺の過形成や腫瘍の発生匹数、個数および面積の測定が基本となる。

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が(Nishikawaら,1983、BiitとPour,1983、Beems,1984)、ラットやマウスに比べ情報が少ない。また、ハムスターはラットやマウスに比べ動物の供給体制が整っていない。ナノマテリアルの中期発がん試験へのハムスターの利用は、今後の課題と考えられる。

また、遺伝子改変動物にイニシエーション処理を行いより短期間に発がん性を調べる試みが行われており(田村ら,2000、安原ら,2001、大島ら,2008)、特にヒトプロト型c-Ha-ras遺伝子を導入した動物の利用を考慮すべきと考える。

## E. 結論

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、文献等の情報を基に検討した。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腹腔内投与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。DHPNやウレタンの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。

#### 参考文献

- Beems, R.B. (1984). *Carcinogenesis* 5, 1057-1060.
- Birt, D.F., Pour, P.M. (1983). *JNCI* 70, 1135-1138.
- Hasegawa, R., Furukawa, F., Toyoda, K., et al. (1990). *Jpn. J. Cancer Res.* 81, 871-877.
- Henly, C.J., Billups, L.H., Avery, M.D. (1981). *Cancer Res.* 41, 5027-5032.
- Inayama, Y. (1986). *Jpn. J. Cancer Res.* 77, 345-350.
- Ito, N., Tsuda, H., Tarematu, M., et al. (1988). *Carcinogenesis* 9, 387-394.
- Ito, N., Tatematsu, M., Hasegawa, R., et al. (1989). *Toxicol. Pathol.* 17, 630-641.
- Ito, N., Shirai, T., Hasegawa, R., et al. (1992). *IARC Scientific Publications* No. 116, 352-388.
- Ito, N., Tamano, S., Shirai, T. (2003). *Cancer Sci.* 94, 3-8.
- Lindenschmidt, R.C., Tryka, A.F., Witschi, H.P. (1986). *Cancer Res.* 46, 1994-2000.
- Moor, A.K., Thamavit, W., Tsuda, H., et al. (1986). *Carcinogenesis* 7, 311-316.
- Moor, A.K., Weber, E., Thornton, M., et al. (1988). *Carcinogenesis* 9, 1507-1509.
- Nishikawa, A., Furukawa, F., Imazawa, T., et al. (1994). *Jpn. J. Cancer Res.* 85,

1000-1004.

Noronha, R.F.X., Goodwall, C.M. (1983). *Carcinogenesis* 4, 613-616.

Pashko, L.L., Schwartz, A.G. (1996). *Carcinogenesis* 17, 209-212.

大嶋浩, 深町勝己, アレキサンダー デビット(2008). 第24回日本毒性病理学会.

加藤浩司, 今井田克己, 山口剛他(1998). 第14回日本毒性病理学会.

五十嵐麻希, 吉田緑, 高橋正一他(2006). 第22回日本毒性病理学会.

五十嵐麻希, 吉田緑, 渡邊学他(2007). 第23回日本毒性病理学会.

高橋明子, 三森国敏, 安原加壽雄他(2002). 第18回日本毒性病理学会.

田村啓, 三森国敏, 安原加壽雄他(2000). 第16回日本毒性病理学会.

安原加壽雄, 三森国敏, 梶谷高敏他(2001). 第17回日本毒性病理学会.

吉田緑, 片嶋紗弓, 前川昭彦他(2003). 第19回日本毒性病理学会.

#### F. 健康危機情報

なし

#### 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).

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).

## 2. 学会発表

浅倉眞澄、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)

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)

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)。

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