

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

ナノマテリアルの経皮毒性に関する
評価手法の開発に関する研究

平成19年度～21年度

総合研究報告書

研究代表者 津田 洋幸

名古屋市立大学

平成22年(2010年)5月

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

ナノマテリアルの経皮毒性に関する
評価手法の開発に関する研究
(H19-化学-一般-006)

平成 19 年度～21 年度 総合研究報告書
研究代表者 津田 洋幸

平成 22 年 (2010 年) 5 月

目 次

I. 総合研究報告

ナノマテリアルの経皮毒性に関する評価手法の開発に関する研究	1
津田 洋幸、徳永 裕司、五十嵐 良明、藤井 まき子、宮澤 眞紀、菊地 克子、 西村 哲治、内野 正、泉水 美香、小島 尚、鈴木 弘実、伊藤 由美子、 飯郷 正明、深町 勝巳、David B. Alexander、徐 結苟、佐川 容子	2

II. 研究成果の刊行に関する一覧表	13
--------------------------	----

III. 研究成果の刊行物・別冊	17
------------------------	----

平成19年度～21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)

ナノマテリアルの経皮毒性に関する

評価手法の開発に関する研究

I. 総合研究報告

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

総合研究報告書

研究課題：ナノマテリアルの経皮毒性に関する評価手法の開発に関する研究

- 研究代表者：津田 洋幸 名古屋市立大学大学院医学研究科 特任教授
研究分担者：徳永 裕司 国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生部 部長(～H19)
研究分担者：五十嵐 良明 国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生化学部 室長
研究分担者：藤井 まき子 昭和薬科大学薬学部 薬剤学研究室 准教授
研究分担者：宮澤 眞紀 神奈川県衛生研究所理化学部 主任研究員
研究分担者：菊地 克子 東北大学大学院医学系研究科 皮膚科学講座 研究員
研究協力者：西村 哲治 国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生部 部長(H20～)
研究協力者：内野 正 国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生部 主任研究員
研究協力者：泉水 美香 昭和薬科大学薬学部薬剤学研究室 大学院生
研究協力者：小島 尚 神奈川県衛生研究所理化学部 主任研究員
研究協力者：鈴木 弘実 東北大学大学院医学系研究科 皮膚科学講座 研究員
研究協力者：伊藤 由美子 東北大学大学院医学系研究科 皮膚科学講座 技官
研究協力者：飯郷 正明 名古屋市立大学大学院医学研究科 分子毒性学分野 客員教授
研究協力者：深町 勝巳 名古屋市立大学大学院医学研究科 分子毒性学分野 助教
研究協力者：David B.Alexander 名古屋市立大学大学院医学研究科 分子毒性学分野客員教授
研究協力者：徐 結苟 名古屋市立大学大学院医学研究科 分子毒性学分野 大学院生
研究協力者：佐川容子 名古屋市立大学大学院医学研究科 感覚器・形成学講座
加齢環境皮膚学加齢分野 大学院生

研究要旨

目的：ナノマテリアル（平均一次粒子径 100nm 以下の粒子）のうち二酸化チタニウム（nTD）、酸化亜鉛等は化粧品等に広く用いられているが、皮膚からの吸収の有無は不明であり、大きな理由は皮膚透過性遠隔臓器組織へ移行する可能性等についての評価法は確立されていないことによる。本研究では、化粧品等として最も多く使用されているナノマテリアルである nTD と酸化亜鉛等（nZO）の皮膚透過性、皮膚機能及び免疫能への影響、長期暴露による発がんへの関与について、一次粒子径（以後、粒径）と溶媒中の分散状態の異なるナノマテリアルで明らかにし、それらの評価法を開発することを目的とした。方法：ラット、ヘアレスマウス及びミ

ミニブタの正常皮膚、これら動物の角質除去・脱脂・脱毛した障害皮膚、マウス・ブタやヒト培養細胞を用いた *in vitro* 皮膚透過モデルに対して塗布による透過性と有害作用について検討し、評価モデルの構築を目指した。結果：すべての動物において、nTD、nZO およびポリスチレンは実験した範囲では、その大きさに関わらず健常皮膚は透過しないことが示された。とくに nTD や nZO は検体調製中または塗布時に容易にミクロンサイズの凝集塊を作るために皮膚の角質、表皮細胞間は通過しにくいためと考えられていたが、凝集塊が 100nm 以下でも通過しないことが分かった。さらに、角質層を除去した障害皮膚を用いた評価モデルも通過性を検証したところ、生理的バリア機能が障害されているため少量は通過するという予測に反して通過しなかった。*in vitro* 皮膚透過モデルにおいてもインタクト・障害状態の両方で通過しなかった。いずれの評価法でも毛嚢までは侵入したが周囲真皮組織への移行は見られなかった。毒性については、マウス耳介角質除去皮膚にシリコン分散 35nm の nTD とハプテン (DNCB) を塗布した場合、耳下リンパ節の感受性がやや増強された。これは毛嚢を介して炎症反応が及んだものと推察された。また、発がん試験では nTD は粒径、分散溶媒の差による凝集体のサイズに拘わらず、発がん感受性の高いラット、マウスを用いた二段階皮膚発がんモデルにおいて、再現実験を含めて発がんプロモーション作用は観察されなかった。以上のように、毒性変化の評価系として、マウス (ヘアレスを含む)・ラット・ミニブタへの皮膚塗布モデル、毛嚢の無い系として *in vitro* モデル、二段階発癌モデルが実用に供する評価法と考える。なお、以上の研究では、一次径粒子のままのわずかな量の粒子の有無の観察・測定は技術的に困難なためデータは得られていない。得られた結果から、実施可能な標準的経皮吸収・毒性・発がん性に関わる評価プロトコール構築のための基礎データが得られた。

A. 研究目的

二酸化チタニウム、酸化亜鉛、銀等のナノマテリアルは化粧品等の成分として広く流通しており、製造者、消費者が暴露されている。これらの主な曝露経路は製造現場では吸入、消費者では主として経皮吸収である。

本研究では、健常および障害されたラット、マウス、ミニブタの皮膚及びヒト皮膚モデルを用いて、主に化粧品として多用されているナノサイズの二酸化チタニウム (nTD)、酸化亜鉛 (nZO) 及び蛍光標識ポリスチレン粒子

(ufPS) について、皮膚透過性、皮膚感作の増強反応、全身毒性及び化学発がん・紫外線発がんへの関与について、粒子、粒子径及び溶媒における分散状態と皮膚透過性の関連と障害作用の評価法、さらに発がんでの関与の評価手法の開発を行った。

B. 研究方法

【皮膚透過性試験】

① ラットにおいて、一次粒子径 (以下粒径) 20nm の nDT (ルチル型・無コーティング・ペンタラン分散・凝集塊径 1.3-5.1 μm が全体

の80%)を剃毛した健常およびテープストリッピング30回によって角層～真皮の一部まで除去した損傷皮膚に100mg/0.5mlを週2回3週間に7回塗布し、臓器中のチタン濃度を分析するとともに、病理学的、電顕観察を行った。

②ゲルの上に5～6層のヒト角化扁平上皮を乗せた毛囊のない皮膚モデル(ヒト三次元培養皮膚モデル)における20nmのnDT(ルチル型・無コーティング・ペンタラン分散)の透過の有無を観察した。二層の培養プレートの上層ヒト皮膚扁平上皮の上にnTDまたは溶媒を43.6mlペンタランにnTDを4.4または8.8mg/well(ラットの試験と同じ濃度)塗布した。12時間インキュベートした後、下層に透過移行したnTD量を、ICP-MSによる原子吸光度として測定した(測定:五十嵐)。

③ラットで粒径20nm nDT(ルチル型・無コーティング・ペンタラン分散)を100mg/0.5mlの用量で毎日1回10日間塗布する短期サテライト実験を行い、皮膚組織(真皮+皮下組織)を採取して炎症性並びにMIP1 α 等の細胞増殖関連サイトカイン等のアレイ解析を行った。なお、これらの試験に供した二酸化チタニウムは調製後には平均粒径は497nm(レーザー回析式粒度分布測定・島津テクノロジー)であり、凝集体を形成していた(①～③津田)。

④粒径約35nmのnDT(ルチル型・無コーティング及びアナターゼ型非コーティング・ボールミル分散により凝集塊径100nm以下を半分以上含む)、並びにnZOをペンタラン、シリコン油、または水に懸濁し、個別飼育ラ

ットの剃毛した背部に塗布した。塗布部はリント布2枚、不透性シート(ブレンダーーム)で覆ったのち、背腹部伸縮性包帯を巻いて固定・閉塞パッチとしてし、ラットが被験物質を経口摂取できないようにした。塗布は毎日行い、20～24時間後に閉塞パッチを除去し、この操作を28日間反復して行った。除毛は雄では7日、雌では5日以降に毎日実施した。臓器中の亜鉛及びチタン濃度をICP-MS分析するとともに、血液学的検査、病理学的検査、電顕観察を行った(徳永、五十嵐)。

⑤化学物質の透過性については、性状がヒトの皮膚と類似している雌Yucatan micropig(YMP、ミニブタ)摘出皮膚モデル(改良Franz型拡散セル)を用いた。被験物質として、蛍光ポリスチレン(nPS、PS)(粒径25、100、1000nm)、及び表面コーティングの異なるnDT(粒径250nm・ルチル型・非コーティング、粒径35nm・テイカ社、粒径35nmルチル型・アルミナ・シリカ及びシリコンコーティング)について透過性を検討した。健常及び角層除去、脱毛損傷したYMP皮膚を、拡散セルに取り付け、24時間後に皮膚移行を共焦点レーザー顕微鏡及びICP-MSにより測定した。また毛囊を介する皮膚透過性を明らかにする目的で、毛囊の多いヘアレスマウス(HM)の皮膚を用いた同様の実験を行った(藤井)。

⑥ヘアレスマウス(Hos/HR-1 σ^7)を用いて、nTD(粒径35nm、コーティング・1%シリコン分散・超音波処理)100mg/mlを背部皮膚に塗布し皮膚機能指標である角層水分量、経表皮水分喪失量TEWL、皮膚色を経時的に測定

し、損傷皮膚における影響について組織学的検討を行った。塗布1時間後、3時間後の皮膚では電顕による皮膚透過性について確認した。さらに、化学物質の塗布によりアトピー性皮膚炎様の湿疹を生じるマウス(NCヘアレスマウス[♂])に試料を塗布し、皮膚症状、血液生化学的データ(好酸球%, LDH, IgE, TARC)の変化を調べた(菊地)。

【免疫毒性試験】

雌CBA/JNマウスの耳において、テープストリッピングによる損傷皮膚モデルを作製し、これにnTD(一次粒径35nm・シリカ・アルミナ・シリコンコーティング、粒径250nm・シリコンコーティング及び無コーティング)を0%、2%および20%分散液を12日間、毎日合計13回塗布した後、2日を経て、第14、15、16日にハプテンである

2,4-dinitrochlorobenzene(DNCB)をアセトン・オリーブ油(AO)(4:1, v/v)で溶解し、0.1、0.2、0.4及び0.5%溶液を調製塗布し、第18日にBrdUを投与した。耳下リンパ節のリンパ球の増殖をBrdU取り込み値(ELISA法)を指標としてStimulation index(SI)として表し、35nm及び250nmのTDの感作性強度を検討した(宮澤)。

【発がん(発がんプロモーション作用)試験】
検索期間の可及的短期化を図るため、皮膚発がん二段階モデルに基づく、発がんプロモーション評価システムの開発を行った。動物は、皮膚発がん高感受性のヒトプロト型c-Ha-ras遺伝子トランスジェニックラット(Hras128)

及び同じ遺伝子のトランスジェニックマウス(RasH2)を、既知の発がんプロモーター(弱い発がん物質)である

12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate(TPA)を陽性対照とするとともに、それらの野生型動物も用いた。また通常の皮膚発がん実験に使われる雌CD1マウスによる実験も行った。いずれの動物も発がんイニシエーションには7,12-dimethylbenz[a]anthracene(DMBA)を剃毛皮膚に塗布し、その2週後より、nTDを1週間に100mg/0.5ml溶媒を1回または2回塗布した。

① Hras128ラットでは、DMBA 2.5mg塗布し、nTD(粒径20nm、ルチル型・無コーティング・溶媒ペンタラン)を28週まで、Wild型は40週まで投与し屠殺した。

② CD1マウスではDMBA 0.1mg塗布し、nDT(粒径20nm、ルチル型・無コーティング)を溶媒ペンタラン0.5mlに20mgまたは10mg懸濁し50週投与して屠殺した。

③ の実験でnTDの透過性が問題となったために、RasH2マウスでは、上記検体よりさらに分散性がよく、毛囊中にも入りこむ可能性のあるnDT(粒径30nm、ルチル型・シリコンコーティング・溶媒シリコン油)を用いた。分散溶媒中の粒径はペンタラン中より小さい160nm(レーザー回折式粒度分布測定)であった。DMBAは0.2mg塗布し、実験期間は20週とした。陽性対照としてTPAを週1回塗布した。

④ Hras128ラットの剃毛背部皮膚に紫外線UVB(800mJ、距離20cm、3分)週2回10週間照射後にnDT(粒径20nm、ルチル型・無

コーティング・溶媒ペンタラン) 100mg/0.5ml 溶媒を週 2 回、開始から 52 週まで塗布してプロモーション作用を検証した。(津田)

注：ペンタラン：Pentalan 408、化学名：テトラ 2-エチルヘキサン酸ペンタエリスリトール

倫理面への配慮

本研究における倫理面への配慮については、各班員は動物実験及び所属施設において、

「動物の保護及び管理に関する法律 (昭和 48 年 10 月 1 日、法律第 105)」並びに「実験動物の飼育及び保管等に関する基準 (昭和 53 年 3 月 27 日、総理府告示第 6 号)に準拠するとともに、当該規程に基づく各施設の動物実験倫理委員会の審査を経て研究を実施した。ヒト材料を用いる実験は実施しなかった。

C. 研究成果

【皮膚透過性試験評価法】

ナノマテリアルは、健常皮膚において通過性は認められなかった。粘着テープ 30 回ストリップングによる重度損傷皮膚における通過性については、組織学的には損傷後に浸出物による痂皮の形成、肉芽組織の形成、新生上皮の形成が迅速に進行し、3 日目には肉芽と真皮の境界の肉芽上に上皮が再生して nTD の少量見られる痂皮を押し上げて排除してしまうことが分かった。すなわち、nTD は肉芽を透過することなく落屑した。新生上皮と皮下組織中の検体の光顕・電顕検索では粒体は見いだされなかった (津田)。

ヒト皮膚モデル (三次元モデル) では、塗布後 1 2 および 4 8 時間後採取の計 2 回行

ったが、ICP-MS 解析・組織学的観察では透過は観察されなかった (津田)

短期サテライト実験における炎症性・細胞増殖関連サイトカインの解析では溶媒と比べて変化 (増減) したものはなく、粒子による炎症反応は殆ど誘発されていなかった (①-③津田)。

チタニウムおよび亜鉛の臓器中濃度は、表面コーティングの違いにかかわらず、対照群と有意差はなかった。また試験物質投与に起因した毒性学的変化は認められなかった。また電顕観察においても粒子が角質層より下層まで到達している像は認められなかった (五十嵐)。

Franz 型拡散セルに装着させた YMP の健常皮膚、角層除去損傷皮膚では、nTD、TD、nPS いずれも粒子径・分散溶媒にかかわらず皮膚へ移行しなかった。ヘアレスマウス (HM) における nTD の皮膚移行性は、健常、角層除去、脱毛のいずれの状態の皮膚においても、Franz セルのレセプター層 (培養液) 中の nTD 濃度の増加はなかった。ナノサイズポリスチレン PS-25 を YMP 皮膚に適用した場合、前年度は一部の角層除去皮膚の生きた表皮中に蛍光が認められたが、この原因としてマーキングに用いたマジックインクに付着した PS-25 が切片作成・観察時に表面に残った可能性が考えられた。これらの要因を排除したところ、毛包以外での蛍光は全く認めなかった。また、表面電荷の異なる COOH、NH₂、PS-25、およびプロピレングリコール、グリセリン、界面活性剤共存下においてもバリア機能の破壊された角層除去皮膚においても皮

膚組織中に蛍光物質は認められなかった。脱毛皮膚では毛嚢においてのみ蛍光が認められることがあった（藤井）。

①角層損傷マウスへの塗布試験では、nTD（粒径 20nm、ルチル型・無コーティング）塗布群は、対照塗布群と比較して、塗布 3～24 時間後に、発赤がやや強く、角層水分量低下がみられたが、経表皮水分喪失量（TEWL）では対照とほぼ同等であった。② 化学物質によりアトピー性皮膚炎様の湿疹を生じるモデルマウスを用いた試験では角層の防御機能が低下しているため、ナノマテリアル二酸化チタンが角層バリアを透過して皮膚に吸収されるかについては結論し得なかった（菊地）。

【免疫毒性試験法】

雌 CBA/JN マウスへ nTD の 2 週間連続投与試験において、DNCB 投与前に nTD を洗浄したにも関わらず、非投与群に比べ DNCB の作用を増強した。35nm および 250nm の粒子径の両方で同様の反応がみられたことからこの反応は粒子径に依存しないことが示された（宮澤）。

【発がんへの関与（発がんプロモーション作用）】

① ラット：nTD（ルチル型・無コーティング・ペンタラン・凝集体粒径 497nm）でトランスジェニック、野生型でそれぞれ 2 回実施、1 回目では週 2 回塗布群で扁平上皮乳頭腫・がん（合計）の発生において弱いプロモーション作用がみられたが（ $P<0.048$ ）、2 回目では動物数を倍にした同じプロトコールでは肉

眼的に腫瘍数には有意差は全くなかった（病理標本作製中）。Wild 型でもプロモーション作用は認められなかった。TPA 投与では 2 回とも有意の増加が見られ、この試験システムの実効性が検証された。

② CD1 マウスの実験では、皮膚腫瘍の頻度・数は、溶媒では 6%・0.06 個、10mg で 12%・0.19 個、20mg は 13%・0.20 個であって、溶媒と有意差はなかった。TPA では 92%・4.5 個で有意に増加した。

③ RasH2 マウスに、分散性の良いシリコンコーティング・シリコン溶媒の nDT を投与した実験（凝集体粒径 160nm）では、扁平上皮乳頭腫+がんの発生数は、溶媒 8.0 個、50mg は 9.0 個、100mg は 7.5 個で、溶媒と有意差はなかった。

④ 雄 Hras128 ラットに紫外線 UVB 照射後に nDT を塗布した実験では紫外線による背景腫瘍は発生せず、nTD 投与群で増加傾向が見られたが、有意差はなかった（津田）

以上の実験において、全身臓器における TD の粒子と元素解析を行ったが、肉食系の肝クッパー細胞、主要リンパ節を含めてどの臓器にも検出されなかった。

D. 考察

【皮膚透過性試験】

ラットにおいては健常皮膚において nTD の透過性は認めなかった。テープストリッピングによる損傷皮膚においても新生上皮の形成とともに外表に押しだされてしまい、真皮・皮下組織には検出されなかった。また、これはサイズ、溶媒に依らなかった。さらに、

塗布部からの経口摂取の出来ないように閉塞した状態、及び通常状態で飼育をした長期投与の発がんプロモーション試験においても、肝クッパー細胞、主要リンパ節を含め全ての臓器で検出されなかった。被検物質の通過性ないことは、真皮・皮下組織に炎症・異物反応についてサイトカインアレイ解析においても確認できた。ヒトの皮膚上皮を用いた三次元モデルでも、上皮及び上皮間を通過する可能性は無いと考えられる。

マウスに皮膚においても、粒子径や分散状態にかかわらず、角層除去皮膚でも nTD、ポリスチレン粒子ともに皮膚内へ移行しないことが示された。一方、脱毛皮膚では 100 nm 以下の粒子の皮膚中濃度が高くなったことは毛嚢内へ移行して残留するためと考えられる。これは、脱毛時には毛乳頭部が外界に露出されていることにより、皮膚内へ到達する可能性があると考えられる。このことについて、損傷皮膚において、毛嚢経由で炎症が起こる可能性は否定できない。炎症性サイトカインの詳細な検討では透過による明らかな組織反応は惹起されていないと考えられた。

【免疫毒性試験】

損傷皮膚において、nTD と DNCB 投与より弱い DNCB の作用増強がみられた。このことは被検物質が皮膚を通過したと考えるより、毛嚢内に留まった粒子が毛嚢に炎症刺激を起こし、何らかの因子（サイトカイン等）が介在してごく軽度の免疫反応を起こして DNCB の感作性を増強させる可能性が示唆されたと考える。この方法は、かなり鋭敏であり、

透過性の低いナノマテリアルのように免疫毒性の弱い物質の検索法として応用できる。

【発がん（発がんプロモーション作用）試験】

皮膚発がん感受性の高いトランスジェニックラットとマウス及び通常のラットとマウスを用いた 4 つの二段階発がんモデル実験において、nTD の発がんプロモーション作用は観察されなかった。用いた二段階発がんモデル自体は発がん感度の高い評価系であり、使用した動物も皮膚発がん感受性の非常に高い系統である。とくに、分散状態が良く、凝集体のサイズが小さく、より均一な検体を用いたシリコン被覆・シリコンオイル分散試料を発がん感受性の極めて高いトランスジェニックマウスに投与した実験でもプロモーション作用はみられなかったことで、この結果が再確認された。一般に分散性の良いナノマテリアルほど皮膚透過性が高く、有害性・発がん性が危惧されていたが、この研究ではそれを支持する結果は見られなかった。すでに皮膚の他に多くの臓器において発がんプロモーション作用物質は発がん物質であることが知られていることを勘案すると、今回得られた結果から、nTD は粒径、溶媒の差による凝集体のサイズに関わらず発がんプロモーション作用はないと考えられる。このヒトプロト型 c-Ha-ras 遺伝子を導入したラット・マウスを用いる発がん二段階法評価法は、長期実験より遙かに短い期間で結果が得られるため、今後実用に供する事が可能である。また、nTD は日焼け防止クリームとして市販されているが少なくともラットにおける実験ではプロモーション作用は見出せな

かった。しかし、ラットにおいてイニシエーターとして UVB は充分ではなかったため、ヒトへの外挿には慎重を期する必要がある。皮膚の防御機構を担う表皮の角質層を除去する粘着テープストリッピング法を用いて、角質層を除去した場合の nTD の表皮層透過性は無いと判断された（津田）。

E. 結論

皮膚透過性試験において、nTD は一次粒径、分散状態に関わりなく、健常皮膚組織を通過する可能性は極めて低いことが明らかになった。これは、調製段階でミクロンサイズの凝集塊をつくるためと考えられる。しかし、障害、乾燥及び脱毛皮膚からは毛嚢に侵入し局所に軽度の起炎症作用を示す。しかし毛嚢から周囲組織や遠隔臓器への移行は観察されなかった。すなわち、塗布による侵入門戸は障害皮膚の毛嚢であり、これら金属粒子を日常的に使用する状況で健常皮膚からの透過・吸収される可能性は少ないと考えた。

以上から、正常、障害皮膚モデルにおいて標準的なプロトコールを構築する基礎データが得られた。免疫毒性試験において、バリア機能が傷害された皮膚において、TiO₂ は直接に感作性を有しないが、ハプテン等の存在で間接的に免疫を軽度に増強させる作用を有している可能性が示唆された。皮膚損傷時には軽度の炎症因子、免疫細胞などの影響があるためと考えられた。発がん試験では非常に感受性の高い動物を用いた二段階発がんモデルにおいても、発がんプロモーション作用は観察されなかったことから、nTD は粒径、

溶媒の差による凝集体のサイズに関わらず発がんプロモーション作用はないと考えられた。この型は短期で長期発がん試験と同等の結果が得られることから、評価系としての高い実用性が見込まれる。投与物質が凝集塊をつくらずに、一次径粒子のまま侵入したと仮定した場合のわずかな量の粒子の有無については、観察・測定は技術的に困難なためにデータは得られていない。

以上から、実施可能な標準的経皮吸収・毒性・発がん性に関わる評価プロトコール構築のための基礎データが得られた。

F. 健康危機情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tsuda, H., Iigo, M., Takasuka, N., Ueda, S., Ohshima Y., Fukamachi, K., Shirai, T., Hirano, S., Matsuda, E., and Wakabayashi, K. Possible enhancing activity of diacylglycerol on 4-nitroquinoline 1-oxide induced carcinogenesis of the tongue in human c-Ha-ras proto-oncogene transgenic rats. *Food and Chemical Toxicology* 45: 1013-1019, 2007.
2. 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.
3. 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
 4. 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 Research. 3, 1-13, 2007.
 5. 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
 6. Tamano, S., Sekine, K., Takase, M., Yamauchi, K., Iigo, M. and Tsuda, H. Lack of Chronic Oral Toxicity of Chemopreventive Bovine Lactoferrin in F344/DuCrj Rats. Asian Pacific J Cancer Prev, 9, 313-316, 2008
 7. Iigo M, Alexander DB, Long N, Xu J, Fukamachi K, Futakuchi M, Takase M, Tsuda H. Anticarcinogenesis pathways activated by bovine lactoferrin in the murine small intestine. Biochimie; 91: 86-101, 2009
 8. Tanaka H, Fukamachi K, Futakuchi M, Alexander DB, Long N, Tamamushi S, Minami K, Seino S, Ohara H, Joh T, Tsuda H. Mature acinar cells are refractory to carcinoma development by targeted activation of Ras oncogene in adult rats. Cancer Sci; 101: 341-346, 2010
 9. Tsuda H, Xu J, Sakai Y, Futakuchi M, Fukamachi K. Toxicology of Engineered Nanomaterials - A review of Carcinogenic Potential. Asian Pacific J Cancer Prev; 10: 975-980, 2010
 10. Long N, Shirai T, Hardiville S, Pierce A, Fukamachi K, Futakuchi M, Alexander DB, Tsuda H. Construction of a Multi Functional Helper Dependent Adenovirus Based System. Asian Pacific J Cancer Prev, in press
 11. Tsuda H, Futakuchi M, Fukamachi K, Shirai T, Imaida K, Fukushima S, Tatematsu M, Furukawa F, Tamano S, Ito N. A medium-term, rapid rat bioassay model for the detection of carcinogenic the potential of chemicals. Toxicol Pathol, in press
 12. Tsuda H, Kozu T, Iinuma G, Ohashi Y, Saito Y, Saito D, Akasu T, Alexander DB, Futakuchi M, Fukamachi K, Xu J, Kakizoe T, Iigo M. Cancer prevention by bovine

- lactoferrin: from animal studies to human trial. *Biometals*, in press
13. Xu J, Futakuchi M, Iigo M, Fukamachi K, Alexander DB, Shimizu H, Sakai Y, Tamano S, Furukawa F, Uchino T, Tokunaga H, Nishimura T, Hirose A, Kanno J, Tsuda H. Involvement of macrophage inflammation protein 1 α (MIP1 α) in promotion of rat lung and mammary carcinogenic activity of nano-scale titanium dioxide particles administered by intra-pulmonary spraying. *Carcinogenesis*, in press
2. 学会発表
 1. Carcinogenicity of nanomaterials, is it specific to nanoscale? *Nanomaterials: Evaluating The Benefits And The Risks, Symposium in The 11th International Congress of Toxicology (ICTXI)*, July 15-19, 2007, Montreal, Canada,
 2. 「ナノ粒子の発がん性評価の現状—社会受容は可能か—」
 3. 日本薬学会第128年会シンポジウム「ナノマテリアルの医薬品への展開とリスク」
 4. パシフィコ横浜、2008年3月28日
 5. 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
 6. Lessons from possible carcinogenic mechanism of asbestos, 67th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Oct28-30, 2008, Nagoya
 7. Promotion of Nano-sized TiO₂ on lung and mammary gland carcinogenesis in female human H-ras gene Transgenic Rats, 67th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Oct28-30, 2008, Nagoya
 8. ナノサイズ二酸化チタニウムおよびフルーレン(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
 9. ナノサイズ二酸化チタニウム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
 10. Alexander DB, 内野正, 西村哲治, 徳永裕司, 広瀬明彦, 菅野純. ナノサイズ二酸化チタニウム投与による肺発がん促進作用とその機序の解析. 第36回日本トキシコロジー学会学術集会; 盛岡: 7月8日, 2009
 11. Tsuda H, Xu J, Futakuchi M, Iigo M, Fukamachi K, Alexander DB, Uchino T, Nishimura T, Hirose A, Kanno J. Involvement of MIP1 alpha in rat lung and mammary carcinogenesis by intra-tracheal spray of nano-size titanium dioxide. 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association; Yokohama: Oct. 1, 2009
 12. Xu J, Futakuchi M, Fukamachi K, Iigo M, Alexander DB, Tanaka H, Iigo M, Tsuda H. Intratracheal Administration of Nano-size TiO₂, C60 and Multiwall Carbon Nanotube

- Elicits Different Lung Responses. 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association; Yokohama: Oct. 1, 2009
13. Fukamachi K, Xu J, Futakuchi M, Iigo M, Uchino T, Nishimura T, Hirose A, Kannno J, Tsuda H. Promotion Effects of Fulleren (C60) on Rat Lung Carcinogenesis. 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association; Yokohama: Oct. 1, 2009
14. Sagawa Y, Xu J, Futakuchi M, Maeda A, Morita A, Tsuda H. Effect of titanium dioxide application on skin carcinogenesis. The 34th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative dermatology; Fukuoka: Dec. 4, 2009
15. 二口充, 深町勝巳, 徐結苟, 津田洋幸. 肺吸入曝露による発がんメカニズムにおいてナノ粒子の種類により異なる因子の関与. 第26回日本毒性病理学会学術集会; 金沢: 2月3日, 2010
- よる発がんのリスクマーカーおよびその用途」
 発明者：津田洋幸、二口 充、徐結苟
 出願人：津田洋幸、
 公開番号：公開準備中
 出願日：平成21年9月25日
2. 実用新案登録
 該当なし
3. その他
 該当なし

H. 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）

特許名称：ナノ粒子の吸入曝露による発がんのリスクマーカーおよびその用途

発明者：津田洋幸、二口 充、徐結苟

出願人：公立大学法人名古屋市立大学、

公開番号：特願 2009-071951

出願日：平成21年3月24日

特許名称：PCT 出願「ナノ粒子の吸入曝露に

Ⅱ. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者名	論文タイトル	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Mika Senzui, Toshiaki Tamura, Keiko Miura, Yoshiaki Ikarashi, Yoshiteru Watanabe, Makiko Fujii.	Study on penetration of titanium dioxide nanoparticles into intact and damaged skin <i>in vitro</i>	J. Toxicol. Sci.	35	107-113	2010
Tsuda, H., Iigo, M., Takasuka, N., Ueda, S., Ohshima Y., Fukamachi, K., Shirai, T., Hirano, S., Matsuda, E., and Wakabayashi, K.	Possible enhancing activity of diacylglycerol on 4-nitroquinoline 1-oxide induced carcinogenesis of the tongue in human c-Ha-ras proto-oncogene transgenic rats.	Food and Chemical Toxicology	45	1013-1019	2007
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
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.,	Comprehensive screening for antigens overexpressed on carcinomas via isolation of human mAbs that may be therapeutic.	PNAS	105	7287-7292	2008

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, 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
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	318 -316	2008
Iigo M, Alexander DB, Long N, Xu J, Fukamachi K, Futakuchi M, Takase M, <u>Tsuda H</u>	Anticarcinogenesis pathways activated by bovine lactoferrin in the murine small intestine.	Biochimie	91	86-101	2009
<u>Tsuda H</u> , Futakuchi M, Fukamachi K, Shirai T, Imaida K, Fukushima S, Tatematsu M, Furukawa F, Tamano S, Ito N.	A medium-term, rapid rat bioassay model for the detection of carcinogenic the potential of chemicals.	Toxicol Pathol	38	182 -187	2010
Xu J, Futakuchi M, Iigo M, Fukamachi K, Alexander DB, Shimizu H, Sakai Y, Tamano S, Furukawa F, Uchino T, Tokunaga H, Nishimura T, Hirose A, Kanno J, <u>Tsuda H</u> .	Involvement of macrophage inflammation protein 1 α (MIP1 α) in promotion of rat lung and mammary carcinogenic activity of nano-scale titanium dioxide particles administered by intra-pulmonary spraying.	Carcinogenesis	31	927 -935	2010

Tsuda H, Xu J, Sakai Y, Futakuchi M, Fukamachi K.	Toxicology of Engineered Nanomaterials - A review of Carcinogenic Potential.	Asian Pacific J Cancer Prev;	10	975 -980	2010
Tanaka H, Fukamachi K, Futakuchi M, Alexander DB, Long N, Tamamushi S, Minami K, Seino S, Ohara H, Joh T, <u>Tsuda H.</u>	Mature acinar cells are refractory to carcinoma development by targeted activation of Ras oncogene in adult rats.	Cancer Sci	101	341 -346	2010
Long N, Shirai T, Hardiville S, Pierce A, Fukamachi K, Futakuchi M, Alexander DB, <u>Tsuda H.</u>	Construction of a Multi Functional Helper Dependent Adenovirus Based System.	Asian Pacific J Cancer Prev			in press

Ⅲ. 研究成果の刊行物・別冊