

2009 4/10 24A

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

ナノマテリアルの健康影響評価手法の 総合的開発および体内動態を含む 基礎的有害性情報の集積に関する研究

平成 21 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 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

ナノマテリアルの健康影響評価手法の総合的開発および体内動態を含む
基礎的有害性情報の集積に関する研究

(H21-化学-一般-008)

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 広瀬 明彦

平成22年(2010年)5月

目 次

I. 総括研究報告書	1
ナノマテリアルの健康影響評価手法の総合的開発および体内動態を含む 基礎的有害性情報の集積に関する研究 広瀬 明彦	2
II. 研究分担報告書	17
1. ナノマテリアルの慢性暴露による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ガン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動態解析法と短期的スクリーニング評価手法の 開発に関する研究 西村 哲治	28
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	32
5. ナノマテリアルの遺伝毒性影響評価系における基礎的研究 本間 正充	35
6. 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	43
7. ナノマテリアルの神経細胞機能・分化に与える影響に関する基礎的研究 佐藤 薫	56
8. ナノマテリアルによる細胞内酸化ストレス評価法の開発に関する研究 奥 直人	60
9. ナノマテリアルの血管系へ及ぼす影響に関する基礎的研究 最上 知子	64
10. 炭素系ナノマテリアルの生体影響試験における物性測定に関する研究 宮澤 薫一	68
11. ナノマテリアルの基礎的有害性情報の集積に関する研究 広瀬 明彦	72
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	89
IV. 研究成果の刊行物・別冊	93

平成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)

I. 総括研究報告書

研究課題名：ナノマテリアルの健康影響評価手法の総合的開発および体内動態を含む
基礎的有害性情報の集積に関する研究

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の物理化学的特性を考慮した有害性評価手法の開発が国内外で急務となっていることを受け、本研究では 20 年度までの研究で得られた成果を基盤としての慢性影響を標的とした評価法開発研究と、国際貢献としての OECD スポンサーシッププログラムに対応するための基礎的な有害性情報収集の実施を行うことを目的としている。

21 年度は、慢性影響評価研究として、繊維状粒子による中皮腫誘発の用量と形状依存性に関する研究と動脈硬化促進作用、発がんプロモーション作用に関する研究を行った。基礎的有害性情報の収集としては、体内動態解析の分析感度の向上と皮膚刺激性試験、染色体異常試験を行うと共に、カーボンナノチューブ(CNT)等のマクロファージや神経系細胞に及ぼす影響について検討を行った。

慢性影響研究としては、多層 CNT(MWCNT)による中皮腫誘発の用量依存性を病理学的に確認すると共に、ラット N-ERC の有効性確認とマウスELISA系の開発を行った。また、中皮腫誘発の繊維長依存性を検討するために、C60 ナノウイスカ(C60NW)を熱処理して、鉄のない長短 2 種類の非晶質カーボンファイバーを作成した。一方、C60 の腹腔内投与により病理学的腎障害の増強の可能性を示したが、単層 CNT で報告された動脈硬化促進作用は MWCNT においては再現されず、肺発がんプロモーション作用中期検索法において MWCNT の明確な発がんプロモーション作用は認められなかった。しかし、MWCNT 暴露の初代培養マクロファージの培養上清は、肺胞上皮系細胞の増殖を促進した。基礎的有害性情報の収集に関して、体内の C60 検出感度を著しく向上させた他、MWCNT による皮膚刺激性試験の陰性結果と、長い MWCNT による倍数性細胞の誘発性を確認した。また、CNT 懸濁液の調整時に得られる上清にはマクロファージや神経系細胞に対して細胞毒性作用のあることが示された。未熱処理の C60NW は長期培養により細胞内で生分解を受けることが示唆された。

慢性研究では繊維長さ依存する中皮腫誘発性の検討と ERC マーカや遺伝毒性指標による検証を行える準備が整った。一方、中皮腫以外の慢性影響や急性影響では必ずしも明確な有害影響が検出されていないが、in vitro 研究は培養中や調整に分解したナノマテリアル成分や培養上清に間接的な有害作用のあることを示唆した。

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 特任教授研究室
特任教授

西村 哲治 国立医薬品食品衛生研究所
生活衛生化学部 部長

本間 正充 国立医薬品食品衛生研究所
変異遺伝部 室長

樋野 興夫 順天堂大学・医学部・病理・腫瘍学
教授

佐藤 薫 国立医薬品食品衛生研究所
薬理部 第一室長

奥 直人 静岡県立大学薬学部 医薬生命科学
教室 教授

最上 知子 国立医薬品食品衛生研究所
機能生化学部 室長

宮澤 薫一 独立行政法人物質・材料研究機構
ナノテクノロジー・基盤萌芽ホップ・フラーレン工学グループ グループリーダー

機能生化学部 主任研究官

梶島 真一 独立行政法人物質・材料研究機構
ナノテクノロジー・基盤萌芽ホップ・フラーレン工学グループ NIMS 研究員

高橋 美加 国立医薬品食品衛生研究所
総合評価研究室 研究員

小野 敦 国立医薬品食品衛生研究所
総合評価研究室 主任研究官

平田 睦子 国立医薬品食品衛生研究所
総合評価研究室 主任研究官

加藤 日菜 国立医薬品食品衛生研究所
総合評価研究室 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 特任教授研究室
助教

徐 結苟 名古屋市立大学 特任教授研究室
研究員

David B. Alexander
名古屋市立大学 特任教授研究室 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

大橋 則雄 東京都健康安全研究センター
環境保健部

福森 信隆 東京都健康安全研究センター
環境保健部

久保田領志 国立医薬品食品衛生研究所
生活衛生化学部

清水久美子 国立医薬品食品衛生研究所
生活衛生化学部

山影 康次 (財)食品薬品安全センター
秦野研究所

高橋 俊孝 (財)食品薬品安全センター
秦野研究所

浅田 晋 (財)食品薬品安全センター
秦野研究所

原 巧 (財)食品薬品安全センター
秦野研究所

清水 広介 静岡県立大学薬学部 医薬生命科学
教室 助教

奥平桂一郎 国立医薬品食品衛生研究所

A. 研究目的

産業用ナノマテリアルはナノテクノロジーの中心的な新規物質として、近年急速にその種類や生産量が増加しつつあるが、産業用途として期待されている物理化学特性は、同一化学組成を持つ大きな構造体とは異なる生理活性やヒト健康影響に対する懸念をもたらす可能性も含んでいる。このような懸念に対して、これまでの通常の毒性試験で検出できるエンドポイントで対応できるかどうかについては今後の検証が必要である共に、少なくとも、ナノマテリアル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となっている。本問題に関しては、2004年頃にカーボンナノチューブ(CNT)やフラーレン(C60)に対する *in vivo* 研究で有害性を示唆する報告がなされてから、国内外共にナノマテリアルの健康影響問題に注目が高まり、2006年からはOECDでも産業用ナノマテリアルの安全性に関する国際協力を目的とした特別の作業グループが設置され、国際的な共同作業として、試験法の検討や代表的なナノマテリアルにおける初期評価情報の収集作業がすすめられているところである。

本研究班の前身である厚生労働科学研究費補助金「ナノマテリアルの健康影響評価手法の総合的開発および体内動態を含む基盤的有害性情報の集積に関する研究」の研究班においては、18年度より、本問題に対処するための *in vitro* と *in*

vivo の両方を含めた総合的な評価法に関する研究を進めてきており、懸念される体内吸収性や蓄積性に基づく影響を評価するための、CNTやC60、酸化チタン(TiO₂)体内動態解析法を確立すると共に、分散しにくいナノマテリアルの毒性試験への適用を目的とした分散法を検討してきた。さらに、慢性影響としては、繊維状粒子の吸入影響として懸念される中皮腫形成について、CNTがそのポテンシャルを持つことと、体内で再分散したC60などのナノマテリアルが再分布して影響を引き起こす可能性を示唆する知見を得た。一方、国外では短期的な影響の報告例は増えてきているが、慢性的影響を検討した報告はまだ少ない。

本研究では20年度までの上記基盤的研究で得られた成果を用い、OECD作業グループでの共同作業への直接的な貢献として、CNTやC60の体内挙動の把握も含めた基礎的な有害性情報の収集を行うと共に、中皮腫形成やナノ粒子の体内再分布に伴う慢性影響の発現メカニズムや新たな慢性影響の検索を行う。さらに、得られたエンドポイントを検出するための適切な指標を用いた短期的試験法やスクリーニング系の開発を行うことを目的とする。

B. 研究方法

本研究は、ナノマテリアルの慢性影響に対する評価手法の開発を目標として、ナノマテリアルが長期間各種臓器に蓄積した結果引き起こされる影響を検討しつつ、OECDの産業用ナノマテリアル作業グループにおけるスポンサーシッププログラムへ貢献も念頭に、短期的に収集できる基礎的な有害性情報(体内動態を含む)の収集を行った。本年度は、慢性影響評価のための検討と基礎的な有害性情報の収集として、以下に示す研究を行った。**慢性影響評価のための検討:**

- ①多層CNT(MWCNT)によるマウス中皮腫誘発実験についての病理学的性解析を行った(菅野)。
- ②MWCNTで誘発したラット中皮腫に関するメソセリン抗体の有用性を確認すると共に、マウスにたいするメソセリン抗体としてマウスELISA系(マウスN-ERC)

の開発を進めた。(樋野)

③繊維状粒子による影響を検討するための材料として、長さの異なる2種のフラーレンナノワイスカー(C60NW)を熱処理することにより、鉄を含まない長短の炭素系繊維カーボンファイバーの作成を試みた。

④長期間の体内滞留性に関する影響に関して、単層CNT(SWCNT)で報告された動脈硬化促進作用について多層CNTを用いて検討した(最上、広瀬)。

⑤C60を腹腔内投与して誘発された腎臓萎縮作用について、病理学的解析を行った(菅野)。

⑥発がんプロモーション作用に関して、MWCNTに関して、発がん二段階法を応用した肺発がんプロモーション作用中期検索法を検討した。また、in vitroで被検CNTを貪食させた初代培養マクロファージ培養上清の肺胞上皮(ヒト肺がん細胞)に対する増殖活性を検討した(津田)。

基礎的な有害性情報の収集:

①21年度は2種のMWCNTについて、皮膚塗布のための分散性の検討と皮膚刺激性試験(OECD_TG404)行いうと共に皮膚感作性試験(OECD_TG406)の試験計画を策定した。(広瀬)

②体内動態解析手法の向上に関しては、C60の分析において、凍結乾燥-粉碎-均一化-振とう抽出するという方法と濃縮操作を加えることにより定量下限値の向上を試みた(西村)。

③遺伝毒性試験については、2種類のCNTを用いたin vitro染色体異常試験とB has42細胞を用いたin vitro二段階発がん性試験を行った(本間)。

④標的組織由来の細胞を用いた評価系として、酸化ストレスに由来するヒトの免疫機能への影響を調べるために、SWCNTおよびMWCNTの細胞毒性試験を行った(奥)

⑤CNTの神経幹細胞の増殖活性への影響と神経幹細胞とミクログリアへの細胞毒性について検討した(佐藤)。

⑥未熱処理のC60NWのマクロファージ長期培養による生分解性を検討した(宮澤)

⑦OECDのスポンサーシッププログラムやOECDナノマテリアル作業グループ会合やナノマテリアル関連の国際学会を通しての国際動向情報収集と国際貢

献を行った(広瀬、西村、菅野、津田)。

(倫理面への配慮)

実験動物を用いる実験では、「動物の愛護及び管理に関する法律」等の精神に則り、動物への苦痛の少ない方法を用いるといった、該当研究所でそれぞれ定められている実験動物取り扱いに関する倫理規定等の規則に準拠した対応がとられている。

C. 研究結果

①ナノマテリアルの短期発がんモデルとして、雄p53(+/-)マウスにMWCNTの用量を前回実施した試験より1/10、1/100あるいは1/1000に下げて発がん性試験を同様のプロトコールにて実施したところ(最高用量は0.3mg/animal)、組織学的に最低用量群で中皮腫の発生が確認され、その発生率には用量相関性が観られた(菅野)。

②マウスに対するメソセリン抗体の作成を目的としてELISA系の構築を進めており、今年度はRecombinant Mouse ERCの発現確認が終了し、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。また、ラット中皮腫の腫瘍マーカーとなるラットELISA系(ラットN-ERC)の開発とその有用性を確認した。用いた実験系は(a)カーボンナノチューブの腹腔内投与にて作成した中皮腫担癌ラットの血液測定によるN-ERCの高値化の確認を行った(中江らとの共同研究)。(b)津田らの開発したラット膀胱癌発生系を用いて、ラットELISA系(ラットN-ERC)による発症前診断・早期発見の実証を行った。さらに、マウスELISA系の開発(マウスN-ERC)に成功した。(樋野)

③繊維状粒子による影響を検討するための材料としての長さの異なるカーボンファイバーの作成に関して、C₆₀を飽和したトルエン溶液2.25 mLに2-プロパノール6.75 mLを加え、攪拌後15°Cで静置し、平均長さ1.7 μmの短い長さ分布をもつC₆₀NWを合成した。また、C₆₀を飽和したトルエン溶液4 mLに2-プロパノール4 mLを加え、攪拌後20°Cで静置することにより、長い長さ分布をもつC₆₀NWとして、平均長

さ10.1 μmのC₆₀NWを合成した。短い長さ分布のC₆₀NWと長い長さ分布のC₆₀NWをそれぞれ熱処理して、難生分解性繊維形状ナノマテリアルを得た。熱処理後、長さを測定したところ、それぞれの平均長さは1.3 μm、7.6 μmであった。(宮澤)

④長期間の体内滞留性に関する影響に関して、ナノマテリアルの血管系への影響評価として、多層CNT(MWCNT)を動脈硬化モデルであるアポE KOマウスに8週間気管内投与し、動脈硬化病変の形成への影響を調べた。高脂肪・高コレステロール食投与により、血中VLDL・LDLコレステロールが著しく上昇し、対照群においても大動脈弁ならびに大動脈内壁に著しい脂質沈着が認められた。しかしながら、MWCNT投与による影響は認められなかった。炎症は動脈硬化の修飾因子であり、全身性の炎症は病態を増悪する。血中の抑制性サイトカインIL-10は低下したが、炎症性サイトカインの有意な上昇は認められなかった(最上、広瀬)。

⑤フラーレンのC57BL/6マウスを用いた単回腹腔内投与試験(溶媒にメチルセルロース(MC)含有)を実施し、46週間観察したところ、溶媒対照群に比べて有意に、高度の慢性腎障害が認められた。そこで、腎障害誘発過程を経時的に調べる実験ならびに陰性対照群にgraphiteを投与した比較実験を開始した(菅野)。

⑥発がんプロモーション作用に関しては、すでに確立した経気管肺内噴霧法を用い、a.発がん二段階法を応用した肺発がんプロモーション作用中期検索法を用いた肺発がん性の評価、b.被検物質の短期(9日間)肺内噴霧による肺発がんプロモーション機序の検索、およびc.in vitro発がんメカニズムの検索を行う一連の作業で、吸入曝露による肺発がんリスク評価が短期間で可能となるプロトコールの開発を検討した。被検物質として、日機装製単層カーボンナノチューブ(SWCNT)、日機装製多層カーボンナノチューブ(MWCNT-N)、また、吸入曝露による発がん性の陽性対照として、三井製多層カーボンナノチューブ(MWCNT-M)およびアスベストであるクロシドライト(CRO)

を被検物質として吸入曝露による肺癌がんリスクを検索した a .ラットを途中屠殺した群の検索した結果、MWCNT-M は明らかな発がんプロモーション作用は見いだされなかった。b 繊維状ナノマテリアルはいずれも CRO と同様に肺胞マクロファージに貪食された。c さらに *in vitro* で被検ナノマテリアルを貪食させた初代培養マクロファージの培養上清は、肺胞上皮（ヒト肺がん細胞）の増殖を促進することが明らかとなった。この増殖促進作用に関与するサイトカイン等の因子を検索した結果、被検物質を貪食したマクロファージが分泌するサイトカインの種類は、ナノマテリアルの種類により異なることが示唆された（津田）

基礎的有害性情報の収集:

①産業用ナノマテリアル作業グループにおける代表的なナノマテリアルによる検証プロジェクト(SG3)で行われているスポンサーシッププログラムにおける日本政府担当物質である CNT に関して、基礎的な毒性試験データ提供を目的として、多層型カーボンナノチューブ(30 ナノクラス CNT (Nikkiso) & MWCNT パウダーサンプル (MWCNT-7:Mitsui)) の皮膚刺激性試験(OECD_TG404)を行った。その結果、多層型カーボンナノチューブの皮膚刺激性試験では、塗布方法として、直接塗布およびシリコーンオイル懸濁液による塗布のどちらの手法を用いても刺激性は認められ無いことが示された。また、この実験で検討した分散手法を用いて、皮膚感作性試験(OECD_TG406)の試験計画を策定した。(広瀬)

②これまでの投与群個体毎の各臓器中 C_{60} 濃度分布幅は大きく(相対標準偏差: 43.5% (肝臓) ~75.3% (肺))、前処理上に問題がある可能性が考えられた。そこで、従来法に比べ定量下限値をさらに低くすること、および前処理における変動要因を最小化することを目的とし、前処理法における変動要因を最小化するための検討を行った。

凍結乾燥-粉碎・均一化-振とう抽出する方法により、従来の方法に比べて臓器当たりの定量下限値を未濃縮試料においては 20 倍程度、さらに

濃縮により 100~200 倍まで大幅に向上でき、臓器の供試部位や臓器重量等によるフラーレン C_{60} の定量値のばらつきを排除することが可能となった。また、従来の抽出法に比べ操作の短時間化、簡便化が図れることができた(西村)。

③ 遺伝毒性試験の染色体異常誘発作用について、2 種類の CNT (0312TH: ϕ 110~170 nm \times 5~9 μ m および 04519DC: ϕ 40~70 nm \times 0.5~2 μ m) で CHL/IU 細胞(チャイニーズ・ハムスター肺由来)を処理した場合、CNT (04519DC) は染色体の構造異常および倍数性細胞ともに誘発しなかったが、CNT (0312TH) は構造異常を誘発しないものの、8 μ g/mL~211 μ g/mL の濃度範囲で倍数性細胞を誘発(出現率: 3.4~26.8%)した。また、*in vitro* 二段階発がん性試験において、これらの CNT の発がん過程におけるイニシエーションおよびプロモーション作用を調べるため、Bhas 42 細胞を用いる形質転換試験を実施した結果、10 μ g/mL までの濃度範囲では、陽性形質転換率の増加は認められなかった。染色体異常試験の結果、外径および長さともに長い CNT (0312TH) ではアスベストと同様に倍数性細胞が誘発されたが、その両方とも短い CNT (04519DC) では倍数性細胞が誘発されないことから、この異常誘発には CNT の形状が関与していると考えられた。(本間)。

④標的組織由来の細胞を用いた評価系として、カーボンナノチューブ(CNT)暴露によって生じる酸化ストレスに由来するヒトの免疫機能への影響を調べるために、単層 CNT (SWCNT) および多層 CNT (MWCNT) のマクロファージ細胞に対する細胞毒性試験を行ったところ、弱いながらも SWCNT および MWCNT とともに細胞増殖抑制作用を示した。特に、CNT 懸濁液中の浮遊微粒子画分においても細胞増殖抑制作用を示したことから、細胞毒性の本体は微小となった CNT にあることが示唆された。(奥)

⑤CNT の神経細胞機能・分化に与える影響について基礎検討を行う過程において、本年度はカーボンナノチューブ(CNT)の神経幹細胞の増殖に対する影響、神経幹細胞、ミクログリアへの細胞毒性につ

いて検討した。CNT を PBS に入れ超音波処理すると、上清に新たな活性(神経幹細胞増殖抑制, ミクログリア細胞毒性)が生じることを見いだした。その原因は現在検討中であるが, CNT を超音波処理することによって金属イオンが溶出することがわかった。金属イオンが作用に関連している可能性もある。(佐藤)。

⑥炭素系繊維形状ナノマテリアルの生分解性と長さの生体に及ぼす影響を調べるため、まずマクロファージ様細胞を用いて、未熱処理の C₆₀NW(平均長さ 6.0 μm)の生分解性を確認した。マクロファージ様細胞に未熱処理の C₆₀NW を曝露したところ、時間経過とともに C₆₀NW を取込む細胞数は増え、曝露 48 時間後には 7 割以上の細胞が C₆₀NW を取込んだ。C₆₀NW を曝露したマクロファージ様細胞を長期培養したところ、細胞内に分解した C₆₀NW を確認した。曝露 28 日後、C₆₀NW を回収したところ、短い長さ(< 3 μm)の C₆₀NW の割合が増えた。また、回収した C₆₀NW とともに C₆₀ からなる微結晶を確認した。これは、マクロファージ様細胞により C₆₀NW が分解され、分散した C₆₀ が再結晶化した微結晶であると考えられた。これらの結果から、未熱処理の C₆₀NW は生体内ではマクロファージにより分解されることが示唆され、生分解性繊維形状ナノマテリアルであると考えられた(宮澤)。

⑦産業用ナノマテリアル作業グループにおける代表的なナノマテリアルによる検証プロジェクト(SG3)と、その中で行われているスポンサーシッププログラムの進捗状況について調査し、ナノマテリアルの各種試験の実行において注目すべきナノマテリアルの分散手法に関するガイダンス(SG4 作成)について情報の収集を行った。また、OECD のスポンサーシッププログラムにおける初期評価文書作成計画文書への情報提供や OECD ナノマテリアル作業グループ会合やナノマテリアル関連の国際学会等発表(第 4 回 NanOE2009、米国トキシコロジー学会)を通しての国際動向情報収集と国際貢献を行った(広瀬、西村、菅野、津田)。

D. 考察

20 年度は、慢性影響評価研究として、繊維状粒子による中皮腫誘発の用量と形状依存性に関する研究と動脈硬化促進作用、発がんプロモーション作用に関する研究を行った。基礎的有害性情報の収集としては、体内動態解析の分析感度の向上と皮膚刺激性試験、染色体異常試験を行うと共に、カーボンナノチューブ(CNT)等のマクロファージや神経系細胞に及ぼす影響について検討を行った。

慢性影響研究としては、多層 CNT (MWCNT) による中皮腫誘発の用量依存性を病理学的に確認すると共に、ラット N-ERC の有効性確認とマウス ELISA 系の開発を行った。また、中皮腫誘発の繊維長依存性を検討するために、C60 ナノウイスカ (C60NW) を熱処理して、鉄のない長短 2 種類の非晶質カーボンファイバーを作成した。一方、C60 の腹腔内投与により病理学的腎障害の増強の可能性を示したが、単層 CNT で報告された動脈硬化促進作用は MWCNT においては再現されず、肺発がんプロモーション作用中期検索法において MWCNT の明確な発がんプロモーション作用は認められなかった。しかし、MWCNT 暴露の初代培養マクロファージの培養上清は、肺胞上皮系細胞の増殖を促進した。基礎的有害性情報の収集に関して、体内の C60 検出感度を著しく向上させた他、MWCNT による皮膚刺激性試験の陰性結果と、長い MWCNT による倍数性細胞の誘発性を確認した。また、CNT 懸濁液の調整時に得られる上清にはマクロファージや神経系細胞に対して細胞毒性作用のあることが示された。熱未処理の C60NW は長期培養により細胞内で生分解を受けることが示唆された。

これらの研究の結果、慢性研究では繊維長さ依存する中皮腫誘発性の検討と ERC マーカや遺伝毒性指標による検証を行える準備が整った。一方、中皮腫以外の慢性影響や急性影響では必ずしも明確な有害影響が検出されていないが、*in vitro* 研究は培養中や調整に分解したナノマテリアル成分や培養上清に間接的な有害作用のあることを示唆した。

また、国際的な評価基準の調和を目的とした OECD の作業グループにおいて、試験法ガイドラインの見直しの可能性と代表的ナノマテリアルを用いたスポンサーシッププログラムの基に Phase1 として基礎的な安全性情報の収集行っており、我が国も単層および多層 CNT と C60 に関する毒性試験情報の収集と初期評価文書の作成に関してその役割を分担している。本研究班で得られる成果の一部は、この情報収集に直接貢献すると共に、Phase2 以降に必要なってくる慢性影響の確認や、懸念される有害性エンドポイントを検出するスクリーニング系あるいは短期検出系の開発に資するための基礎的な情報を提供できるものと考えられる。特に、繊維系粒子の暴露によって懸念される中皮腫の誘発能に関してその評価系を構築するために、繊維長や内在する鉄原子等の因子の関与について指針を与えることが可能になる他、短期検出のための生体マーカーを提供することが可能となったと考えられる。その他の懸念される慢性影響についても、細胞との長期的な相互作用等において認められる間接作用等を介した影響を検索することが必要であることを示唆できた考えられる。また、これらの活動を通して得られた知見は、我が国における評価基準・指針等の作成のための基本的な科学的要件を提案できるものと考えられる。

E. 結論

慢性影響評価研究として、繊維状粒子による中皮腫誘発の用量と形状依存性に関する研究と動脈硬化促進作用、発がんプロモーション作用に関する研究を行った。基礎的有害性情報の収集としては、体内動態解析の分析感度の向上と皮膚刺激性試験、染色体異常試験を行うと共に、カーボンナノチューブ(CNT)等のマクロファージや神経系細胞に及ぼす影響について検討を行った。

慢性影響評価研究：

- ① 多層 CNT (MWCNT) による中皮腫誘発の用量依存性を病理学的に確認した
- ② メソセリン抗体としてのラット N-ERC の有効

性確認とマウス ELISA 系の開発を行った。

- ③ 中皮腫誘発の繊維長依存性を検討するために、C60 ナノウイスカ (C60NW) を熱処理して、鉄のない長短 2 種類の非晶質カーボンファイバーを作成した。
- ④ C60 の腹腔内投与により病理学的腎障害の増強の可能性を示した
- ⑤ 単層 CNT で報告された動脈硬化促進作用は MWCNT においては再現されなかった
- ⑥ 肺発がんプロモーション作用中期検索法において MWCNT の明確な発がんプロモーション作用は認められなかったが、MWCNT 暴露の初代培養マクロファージの培養上清は、肺胞上皮系細胞の増殖を促進した。

基礎的有害性情報の収集：

- ⑦ 体内の C60 検出感度を著しく向上することに成功した
- ⑧ MWCNT による皮膚刺激性試験は陰性であった
- ⑨ *in vitro* 染色体異常試験で、長い MWCNT による倍数性細胞の誘発性を確認したが、*in vitro* 二段階発がん性試験では、長短 2 種類の CNT 共に Bhas 42 細胞を用いた形質転換試験で陽性形質転換巢の増加は認められなかった。
- ⑩ CNT 懸濁液の調整時に得られる上清にはマクロファージや神経系細胞に対して細胞毒性作用のあることが示された。
- ⑪ 熱未処理の C60NW は長期培養により細胞内で生分解を受けることが示唆された。
- ⑫ OECD のスポンサーシッププログラムにおける初期評価文書作成計画文書への情報提供を行うと共に OECD ナノマテリアル作業グループ会合やナノマテリアル関連の国際学会等発表を通しての国際動向情報収集と国際貢献を行った。

F. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 広瀬明彦, 西村哲治, 菅野純:産業用ナノマテリアルの健康影響評価法開発における課題と慢性影響研究の重要性, (2009) 国立衛研報, 第 127 号, 15-25.
- Sakamoto Y, Nakae D, Hagiwara Y, Satoh K, Ohashi N, Fukamachi K, Tsuda H, Hirose A, Nishimura T, Hino O and Ogata A (2010) Serum level of expressed in renal carcinoma (ERC)/ mesothelin in rats with mesothelial proliferative lesions induced by multi-wall carbon nanotube (MWCNT) J. Toxicol Sci., 35, 265-270.
- 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. (2010) Involvement of macrophage inflammatory protein 1alpha (MIP1alpha) in promotion of rat lung and mammary carcinogenic activity of nanoscale titanium dioxide particles administered by intra-pulmonary spraying. Carcinogenesis. 31: 927-935.
- 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
- 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
- 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
- Tsuda H. Risk assesment studies of nanomaterials in Japan and other countries. Asian Pacific J Cancer Prev; 10, DIMS 30th Anniverrrsary Supplement: 11-12, 2010
- 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
- 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
- 久保田領志, 田原麻衣子, 清水久美子, 杉本直樹, 広瀬明彦, 西村哲治:高速液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法による生物試料中フラウレンの分析法の開発, (2009) 国立衛研報, 第 127 号, 65-68.
- 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)
- Takashima Y, Sakuraba M, Koizumi T, Sakamoto H, Hayashi M, Honma M.: Dependence of DNA double strand break repair pathways on cell cycle phase in human lymphoblastoid cells. Environ Mol Mutagen. 815-822 (2009)
- Wang J, Sawyer JR, Chen L, Chen T, Honma M, Mei N, Moore MM.: The mouse lymphoma assay detects recombination, deletion, and aneuploidy. Toxicol Sci. 109, 96-105 (2009)
- Yatagai, F., Sugasawa, K., Enomoto, S., and Honma, M.: An approach to estimation from DSB Repair Efficiency. J. Radiat. Res., 50, 407-413 (2009)

- Koyama, N., Yasui, M., Oda, Y., Suzuki, S., Satoh, T., Suzuki, T., Matsuda, T., Masuda, S., Kinae, N., Honma, M.: Genotoxicity of acrylamide in vitro: Acrylamide is not metabolically activated in standard in vitro systems. *Environ Mol Mutagen.* (in press)
- 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
- Fukamachi K., Tanaka H., Hagiwara Y., Ohara H., Joh T., Iigo M., Alexander D.B., Xu J., Long N., Takigahira M., Yonagihara K., Hino O., Saito I.: An animal model of preclinical diagnosis of pancreatic ductal carcinomas. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 390: 636-641, 2009
(Corresponding Author: Dr. Hiroyuki Tsuda)
- Yoshida C., Sogawa C., Tsuji A., Sudo H., Sugyo A., Uehara T., Hino O., Yoshii Y., Fujibayashi Y., Fukumura T., Koizumi M., Arano Y. and Saga T.: Development of positron emission tomography imaging by ⁶⁴Cu-labeled Fab for detecting ERC/mesothelin in mesothelioma mouse model. *Nuclear Medicine Communications*, in press.
- Sudo H., Tsuji A., Sugyo A., Kohda M., Sogawa C., Yoshida C., Harada Y., Hino O. and Saga T.: Knockdown of COPA, identified by loss-of-function screen, induces apoptosis and suppresses tumor growth in mesothelioma mouse model. *Genomics*, in press.
- Takahashi K, Ishii-Nozawa R, Takeuchi K, Nakazawa K, Sato K, Two NSAIDs, niflumic acid and diclofenac, inhibit the human glutamate transporter EAAT1 through different mechanisms. *J. Pharmacol. Sci.*, 112, 113-117 (2010)
- Nudejima S, Miyazawa K, Okuda-Shimazaki J and Taniguchi A (2009) Observation of phagocytosis of fullerene nanowhiskers by PMA-treated THP-1 cells, *J. Physics: Conf. Series*, 159, 012008.
- Nudejima S, Miyazawa K, Okuda-Shimazaki J and Taniguchi A (2010) Biodegradation of C60 Fullerene Nanowhiskers by Macrophage-like Cells, *Proc. Int'l. Conf. Biochem. Med. Chem.*, 1, 89-94.
2. 学会発表
- 広瀬 明彦, 高木 篤也, 西村 哲治, 菅野 純, ナノマテリアルの慢性影響研究の重要性、第36回日本トキシコロジー学会学術年会、2009年7月、盛岡
- Akihiko Hirose, Importance of long-term studies for health effects evaluation of nanomaterials. NIMS symposium on the social acceptance of nanomaterials in Satellite Symposia of NIMS WEEK09 2009, July. Tsukuba.
- Akihiko Hirose, Tetsusji Nishimura, Masamitsu Honnma, Tomoko Mogami, Kaoru Sato, Kun'ichi Miyazawa, Naoto Oku, Okio Hino, Jun Kanno, Hiroyuki Tsuda. Research Strategy of focusing on the evaluation of the chronic health effects by manufactured nanomaterials in NIHS, Japan. 4th International Conference on Nanotechnology – Occupational and Environmental Health (NanOEh2009) 2009, Aug. Helsinki
- 広瀬明彦、ナノマテリアルの慢性健康影響評価のための研究、ナノマテリアルの環境・健康影響評価および管理技術研究会、2009.10、名古屋
- 広瀬明彦、衛研の有害性評価研究の取り組み状況、

- ナノテクセミナー2009 ～みんなで学ぼう リスク管理策～、2009.10、大阪
- 広瀬明彦、ナノ物質の生体への影響、第2回化学物質リスクマネジメント講座－ナノテク物質の安全性と化学物質管理のマネジメント－、2010年2月、東京
- 広瀬明彦、高木篤也、西村哲治、津田洋幸、坂本義光、小縣昭夫、中江 大、樋野興夫、菅野 純、ナノマテリアルの慢性影響、日本薬学会第130年会、2010年3月、岡山
- 菅野 純、高木篤也、広瀬明彦、小縣昭夫、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98回日本病理学会総会、2009年5月3日、京都
- Kanno J, Takagi A, Nishimura T, Hirose A., Long-term animal testing of nanoparticles for detection of chronic toxicity, 4th International Conference on Nanotechnology –Occupational and Environmental Health (NanOE2009), 2009.8.28, Helsinki, Finland
- Jun Kanno, Atsuya Takagi, Akihiko Hirose, Tetsuji Nishimura, Nobutaka Fukumori, Akio Ogata, Norio Ohashi, and Satoshi Kitajima, Induction of mesothelioma in p53+/- mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube, The 5th International Congress of Asian Society of Toxicology (ASIATOX V), 2009.9.12, Taipei
- 菅野 純、ナノマテリアルの毒性－発がん性を中心に、第68回日本癌学会学術総会、2009年10月2日、横浜
- Kanno J, Takagi A, Nishimura T, Hirose A, Nanomaterial toxicology – chronic toxicity assessment, CDBIM Symposium 21st Century Advances in the Molecular Toxicology of Environmental Chemicals and Pathogenesis of Disease (疾患生命工学センターシンポジウム、環境化学物質と疾患解明 分子トキシコロジーの新たな展開), 2009.10.26, Tokyo
- 菅野 純、カーボンナノチューブの生体への影響－先端素材の安全の問題の一考察例として－、日本学術振興会「材料の微細組織と機能性」第133委員会第203回研究会、東京理科大学理窓会館、2009年10月23日
- Kanno, Jun, Takagi, Atsuya, Nishimura, Tetsuji, Hirose, Akihiko, Mesothelioma induction by micrometer-sized multi-wall carbon nanotube intraperitoneally injected to p53 heterozygous mice., the 49th Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2010.3.9, Salt Lake City, USA, Platform Presentation
- Tsuda H, Promotion Effects of Fulleren (C60) on Rat Lung Carcinogenesis. 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association; Yokohama: Oct. 1, 2009
- Tsuda H, 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
- 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
- 津田洋幸、ナノサイズ二酸化チタニウム肺の促進作用とその機序の解析。第25回日本毒性病理学会学術集会; 浜松: 2009年1月27日、
- 津田洋幸、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: 2009年7月8日、
- 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: 2010 年2月3日
- 五十嵐良明、瀧田葉子、小濱とも子、内野正、西村哲治:ラットに反復経皮投与した酸化チタン粒子の体内分布と毒性、第36回日本トキシコロジー学会学術年会プログラム・要旨集、S194 (2009.07, 盛岡)
- Nishimura, T., Shimizu, K., Kubota, R., Sugimoto, N., Hirose, A.: Cytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes for HepG2 cells. 4th International Conference on NanOEHP100 (2009.8 Helsinki)
- 五十嵐良明、瀧田葉子、小濱とも子、内野正、徳永裕司*, 西村哲治:経皮投与した微小金属酸化チタン粒子の体内分布と毒性について、フォーラム 2009: 衛生化学・環境トキシコロジー (2009.11, 那覇)
- 久保田領志、田原麻衣子、清水久美子、杉本直樹、広瀬明彦、西村哲治:ラットを用いたフラーレンの体内動態評価, 第 46 回全国衛生化学技術協議会年会 (2009.11, 盛岡)
- 五十嵐良明、瀧田葉子、相場友里恵、小濱とも子、内野正、西村哲治:反復経皮投与したナノサイズ酸化チタンの吸収性及び毒性について、日本薬学会第 130 年会 (2010.3, 岡山)
- Nishimura, T., Kubota, R., Tahara, M., Shimizu, K., Obama, T., Sugimoto, N., Kanno, J., Hirose, A., Tissue Distribution of Fullerene after Injection into Tail Vein in Rat, SOT, 49th Annual Meeting (2010.3, Salt Lake City)
- Honma, M., Kumita, W., and Sakuraba, M.: Demonstration of ionizing irradiation inducing genomic instability via breakage-reunion-bridge cycle in human cells by CGH-microarray.
- Keystone symposia "Genome Instability and DNA Repair (2009.3)
- Honma, M., Koyama, N., Kimura, A., Yasui, M., Takami, S., Takahashi, M., Imai, T., Yamamoto, Y., Kumita, W., Masumura, K., Masuda, S., Kinae, N., Matsuda, T., and Nohmi, T.: Child-adult differences in evaluation of in vivo genotoxicity of acrylamide. 48th Annual Meeting for Society of Toxicology (2009.3)
- Kimura, A., Sakamoto, H., Saigo, K., Sukamoto, T., and Honma, M.: Establishment of simple in vitro Comet Assay Protocol. 48th Annual Meeting for Society of Toxicology (2009.3)
- Honma, M.: DNA double strand break repair and genomic stability. The 14th Academic Conference of Chinese Environmental Mutagen Society (2009. 7)
- Honma, M.: The new ICH guidance on genotoxicity. The 5th National Congress of Chinese Society of Toxicology.(2009.8)
- Uno, Y., Kojima, H., Honma, M., Tice, R., Corvi, R., Schechtman, and Hayashi, M.: In vivo Comet assay: update on going international validation coordinated by JaCVAM. 10th International Conference on Environmental Mutagens (2009.8)
- Yamamoto, A., sakamoto, Y., Matsumura, K., Honma, M., and Nohmi, T.: Combined genotoxic effects of a methylating agent and radiation on human cells. 10th International Conference on Environmental Mutagens (2009.8)
- Yasui, M., Koyama, N., Koizumi, T., Sakuraba, M., Takashima, Y., Hayashi, M., Sugimoto, K., and Honma, M.: Life cycle of micronucleus analyzed by confocal live cell imaging. 10th International Conference on Environmental Mutagens (2009.8)
- Koyama, N., Kimura, A., Yasui, M., Takami, S., Takahashi, M., Inoue, K., Yoshida, M., Imai, T., Shibutani, M., Suzuki, T., Yamamoto, A., Kumita, W., Masumura, K.,

- Horibata, K., Masuda, S., Kinae, N., Nohmi, T., and Honma, M.: Child-adult difference in evaluation of in vitro genotoxicity of acrylamide. 10th International Conference on Environmental Mutagens (2009.8)
- Suzuki, T., Kohara, A., Ramadan, A., Kikuchi, Y., Honma, M., and Hayashi, M.: Comparative study of in vitro genotoxicity of ochratoxin A and aristolochic acid as a causative for Balkan endemic nephropathy. 10th International Conference on Environmental Mutagens (2009.8)
- Honma, M., Yamakage, K., Burlingson, B., Escobar, P., Pant, K., Kraynak, A., Hayashi, M., Nakajima, M., Suzuki, M., Corvi, R., Uno, Y., Schechtman, L., Tice, R., and Kojima, H.: International validation study of the in vitro alkaline Comet assay. 10th International Conference on Environmental Mutagens (2009.8)
- Hirose, A., Kamata, T., Yamazaki, T., Sato, K., Yamada, M., Ono, A., Fukumoto, T., Okamura, H., Mirokuji, Y., and Honma, M.: Validation of the (Q)SAR combination approach for mutagenicity prediction of flavour chemicals. 10th International Conference on Environmental Mutagens (2009.8)
- Honma, M.: The new ICH guidance on genotoxicity International Conference on Environment, Occupational & Lifestyle Concern- Transdisciplinary Approach (2009.9)
- 鈴木孝昌、小原有弘、小木美恵子、田邊思帆里、本間正充; 8 番染色体特異的 CGH アレイ解析による各種がん細胞株での c-myc 遺伝子増幅形式の解析 第 68 回日本癌学会学術総会 (200.10)
- Honma M, Takashima Y, Sakuraba M, Koizumi T, Sakamoto H, and Hayashi M: DNA double strand break repair pathways and its dependence on cell cycle phases in human lymphoblastoid cells. Environmental Mutagen society 40th Annual Meeting (2009.10)
- 本間正充; In vitro 遺伝毒性試験における最高用量と細胞毒性の評価 日本環境変異原学会第 38 回大会(2009.11)
- 真田尚和、櫻田直美、米澤豊、入山昌美、本間正充; コルヒチン及び、ビンブラスチンのラット末梢血を用いた小核試験 日本環境変異原学会第 38 回大会(2009.11)
- 小山直己、木村葵、安井学、高見成昭、高橋美和、井上薫、吉田緑、今井俊夫、渋谷淳、鈴木拓也、増村健一、堀端克良、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(週齢)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 38 回大会 (2009.11)
- 安井学、小山直己、高島良生、林真、杉本憲治、本間正充; 共焦点ライブセルイメージングによって明らかとなった小核のライフサイクル 日本環境変異原学会第 38 回大会(2009.11)
- 鈴木孝昌、小原有弘、ラマダンアリ、菊池裕、本間正充、林真; バルカン腎症の原因物質としてのアリストロキア酸およびオクラトキシン A 日本環境変異原学会第 38 回大会(2009.11)
- 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、鶴飼明子、島津徹、榎本秀一、堂前直、大西武雄、石岡憲昭; 国際宇宙ステーション利用実験: ヒト培養細胞の突然変異解析から宇宙環境の生物影響を解明する試み 日本環境変異原学会第 38 回大会 (2009.11)
- 山本歩、本間正充; Unconectable I-SceI サイトの挿入による放射線損傷様二本鎖 DNA 切断の修復機構の解析 日本放射線影響学会第 52 回大会(2009.11)
- 安井学、本間正充; 8-オキソグアニン 1 分子のゲノム

- 内における突然変異誘発能の解析系の確立；
低線量電離放射線の暴露モデルとして 日本
放射線影響学会第 52 回大会(2009.11)
- 本間正充、山影康次、Burlingson, B., Escobar, P.,
Pant, K., Kraynak, A., 林真、中嶋まどか、鈴
木雅也、Corvi, R., 宇野芳文、Schechtman,
L., Tice, R., 小島肇; In vitro アルカリコメット
アッセイ国際バリデーション研究 第 22 回日本
動物実験代替法学会総会(2009.11)
- Honma M, The new paradigm of genotoxicity
testing in regulatory science –ICH
guideline and IWGT consensus· The 1st
International Symposium on the Drug
Safety Evaluation (2009.12)
- 高橋華奈子, 中澤憲一, 野澤(石井)玲子, 大野泰雄,
竹内幸一, 佐藤 薫, 非ステロイド性抗炎症薬
であるニフルミック酸, ジクロフェナクは, 異なる
メカニズムを介してアストロサイトグルタミン酸トランス
ポーターEAAT1/GLAST 電流を阻害する.
第 4 回トランスポーター研究会 (2009. 5, 東京)
- Sato K, Shigemoto-Mogami Y, Yasuo Ohno The
relationship between the expression
pattern of P2 receptors and functional
roles of microglial cells in the postnatal
SVZ Fukuoka Purine 2009 (2009. 7, 福岡)
- Shigemoto-Mogami Y, Nakazawa K, Sato K.,
Microglia instructs neurogenesis and
gliogenesis in the subventricular zone. 第
36 回国際生理学会世界大会 (IUPS
2009)(2009. 7, 京都)
- 高木 淳平, 栗脇 淳一, 佐藤 薫, 鈴木 岳,
Effects of SSRI on L-glutamate uptake
activity of cultured astrocytes. 第 32 回日本
神経科学大会 (2009. 9, 名古屋)
- 佐藤 薫, James E. Goldman, 大野 泰雄 In
vitro risk assessment system for the brain
development at an early postnatal stage.
第 32 回日本神経科学大会 (2009. 9, 名古屋)
- 佐藤 薫, 高橋 華奈子, 石井-野澤 玲子, 竹内
幸一, 中澤 憲, 大野 泰雄, Two NSAIDs,
niflumic acid and diclofenac, inhibit the
human glutamate transporter EAAT1
through distinct mechanisms SFN2009
(2009. 10, 米国シカゴ市)
- Suzuki T, Takaki J, Kamiya Y, Nakamura Y,
Mashino T, Sato K, Nakazawa K,
Takahashi T, Haruyama A, Mori K, Iwai T,
Oka J-I, Neuropharmacological effects of
fullerene derivatives SFN2009 (2009. 10,
米国シカゴ市)
- 佐藤 薫, 重本-最上 由香里, 大野 泰雄, ミクログ
リアを介した新たな創薬の可能性-ミクログリアと
神経新生・グリア申請との関連 日本薬学会
130 回年会シンポジウム(2010. 3, 岡山)
- 佐藤 薫, 重本-最上 由香里, 大野 泰雄, 生後初
期脳におけるミクログリアの役割 第 83 回 日本
薬理学会(2010. 3, 大阪)
- 高木 淳平, 栗脇 淳一, 佐藤 薫, 鈴木 岳志,
SSRI は培養アストロサイトグルタミン酸トランス
ポーターの取り込みを促進する. 第 83 回 日本
薬理学会(2010. 3, 大阪)
- 最上(西巻)知子: ABCA1 遺伝子の肝型コレステロー
ル応答の分子機構 第 51 回日本脂質生化学
会シンポジウム(2009.7)
- Tomoko Nishimaki-Mogami: Liver X receptor
(LXR) modulators: potential therapeutic
agents for raising HDL levels and
protecting against atherosclerosis 第 41 回
日本動脈硬化学会総会シンポジウム(2009.7)
- Nudejima S, Miyazawa K, Okuda-Shimazaki J
and Taniguchi A. Phagocytosis of FNWs by
PMA-treated THP-1 cells, Carbon 2009,
June 2009, Biarritz.
- Nudejima S, Miyazawa K, Okuda-Shimazaki J
and Taniguchi A, Interaction between
PMA-Treated THP-1 Cells and Fullerene
Nanowhiskers, NIMS WEEK 2009, July
2009, Tsukuba (招待講演).
- ぬで島真一、宮澤薫一、奥田順子、谷口彰良、マクロ
ファージ様細胞によるフラレンナノウィスカー

の生分解、第 37 回フラーレン・ナノチューブ総合シンポジウム、2009 年 9 月、つくば。

Nudejima S, Miyazawa K, Okuda-Shimazaki J, Taniguchi A, Phagocytosis of Fullerene Nanowhiskers by Macrophage-like Cells, 11th Pacific Polymer Conference 2009, Dec. 2009, Cairns.

Nudejima S, Miyazawa K, Okuda-Shimazaki J, Taniguchi A, Biodegradation of C60 Fullerene Nanowhiskers by Macrophage-like Cells, Int'l Conf. BIOCHEM. MED. CHEM., Feb. 2010, Cambridge (招待講演).

ぬで島真一、宮澤薫一、奥田順子、谷口彰良、マクロファージ様細胞を用いたフラーレンナノウiskerの生分解性評価、第 38 回フラーレン・ナノチューブ総合シンポジウム、2010 年 3 月、名古屋。

ぬで島真一、宮澤薫一、奥田順子、谷口彰良、マクロファージ様細胞を用いたフラーレンナノウiskerの生分解の研究、日本物理学会 第 65 回年次大会、2010 年 3 月、岡山。

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 結苟
特許出願人: 公立大学法人名古屋市立大学

- 発明の名称: PCT 出願「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 9 月 25 日

出願番号: PCT/JP2009/004848

発明者 津田洋幸、二口 充、徐 結苟

特許出願人: 津田洋幸

- 発明の名称: 国内優先出願「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 22 年 3 月 26 日

出願番号: 特願 2010-58903

発明者 津田洋幸、二口 充、徐 結苟

特許出願人: 公立大学法人名古屋市立大学

- 発明の名称: 生分解性試験方法及びフラーレンファイバー含有医用材料

発明者氏名: 礒島真一、宮澤薫一、奥田順子、谷口彰良

出願番号: 特願 2010-035688

出願人: 独立行政法人物質・材料研究機構

出願日: 2010 年 2 月 22 日

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

平成 2 1 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

平成 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）

分担研究報告書

研究課題名：ナノマテリアルの健康影響評価手法の総合的開発および体内動態を含む基礎的有害性情報の集積に関する研究

分担研究課題名：ナノマテリアルの慢性暴露による有害性評価指標の開発に関する研究

研究分担者： 菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部長

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

研究要旨

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に、ナノマテリアルの短期発がんモデルとして、雄p53(+/-)マウスにMWCNTの用量を前回実施した試験より1/10、1/100あるいは1/1000に下げて発がん性試験を同様のプロトコールにて実施したところ（最高用量は0.3mg/animal）、組織学的に最低用量群で中皮腫の発生が確認され、その発生率には用量相関性が窺われた。フラレンのC57BL/6マウスを用いた単回腹腔内投与試験（溶媒にメチルセルロース（MC）含有）を実施し、46週間観察したところ、溶媒対照群に比べて有意に、高度の慢性腎障害が認められた。そこで、腎障害誘発過程を経時的に調べる実験ならびに陰性対照群にgraphiteを投与した比較実験を開始した。

A. 研究目的

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いる。平成 18～20 年度の厚生労働科学研究「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」の分担研究課題「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」でマルチウォールカーボンナノチューブ（MWCNT）をp53+/-マウスに腹腔内投与すると中皮腫が発生することを明らかにした。また、体内で再分散したC₆₀などのナノマテリアルが再分布して影響を引き起こす可能性を示唆する知見を得た。一方、国外ではナノマテリアルの短期的影響の報告例は増えてきているが、慢性的影響を検討した報告はまだ少ない。そこで、中皮腫形成やナノ粒子の体内再分布に伴う慢性影響の発現メカニズムや新たな慢性影響の検索を行う。さらに、得られた