

(表 1~3)。

一方、04519DC では、顕微鏡レベルの観察では 0312TH と同様の処理状態と考えられるが (図 4、5)、その増殖抑制作用は 0312TH よりも弱く、構造異常も倍数性細胞も誘発しなかった (表 4~6)。

なお、染色体標本上で認められた CNT は、0312TH は染色体と同程度の長さや形状を維持しているものが多いように思われるが、04519DC はほとんどが絡まり合った状態を呈しているように思われた (図 6)。

## (2) 形質転換試験

イニシエーション試験では、増殖期の 3 日間 CNT で処理し、細胞を洗浄 (播種 4 日後) してさらに 3 日間培養後 (播種 7 日後) に増殖率を測定したが、0312TH で処理した場合には 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で増殖率が 52.0%まで低下した。しかしながら、04519DC で処理した場合には増殖率の低下は認められず、細胞毒性作用については、染色体異常試験と同様の傾向が認められた (表 7)。プロモーション試験では、イニシエーション試験の 3.5 倍の細胞を播種し、増殖期が終了に近い播種 4 日後から 3 日間処理して増殖率を測定 (播種 7 日後) したが、0312TH および 04519DC とともに増殖率の低下は認められなかった (表 7)。

形質転換試験については、今回用いた最高濃度である 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  までの濃度範囲では 0312TH および 04519DC とともに形質転換巢の誘発は認められなかった (表 7)。

なお、イニシエーション試験およびプロモーション試験ともに、処理終了後に細胞を洗浄したが、播種 21 日後の顕微鏡写真から分かるように、CNT を完全には除去でき

なかった (図 7、8)。

## D. 考察

ナノマテリアルの発がん性は活性酸素や窒素の発生、炎症反応が関与しているとされている<sup>16)、17)、18)</sup>が、今回試験した CNT では活性酸素で誘発されるような染色体の構造異常誘発は認められなかった。

一方、太くて長い CNT である 0312TH で処理すると、アスベストと同様に倍数性細胞を誘発したが、細くて短い 04519DC では倍数性細胞を誘発しなかった。染色体標本上で観察された光学顕微鏡像 (図 6) から考えると、0312TH はおそらく個々のチューブがその形状を維持した状態と考えられるが、04519DC はその細さのためか、チューブ状というよりは、糸様で単独よりも絡み合った状態で CHL/IU 細胞に作用したと考えられる。

CHL/IU 細胞には食食能のあることが知られていることから、これらの CNT の作用部位は細胞内と細胞外の両方が考えられるが、いずれにしろ CNT の物理的形狀の差が倍数性細胞誘発に関連している可能性が高いと考えられる。

Bhas 42 細胞を用いる形質転換試験は、試験に用いる血清の種類やロットにより、コントロールにおける形質転換率 (ウェルあたりの平均陽性形質転換巢数) が異なるため、血清に懸濁した CNT を 1 vol%までしか添加できず、最高濃度が 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  とかなり低い濃度での評価となった。0312TH については、染色体異常試験では 30%の増殖率まで評価しているが、形質転換試験では、増殖率の低下が認められたイニシエーション試験でも 52%の増殖率までの評価である。

イニシエーション試験の陽性対照物質である MCA は 19.4%の増殖率で明らかな陽性反応を示していることから、CNT のイニシエーション作用を評価するためには、さらに高い濃度での試験が必要と考えられる。

また、CHL/IU 細胞と異なり、Bhas 42 細胞の貧食能は不明であることから、貧食能の有無と形質転換能の関連性を検討する必要がある。さらに、形質転換試験では、増殖期に処理を行うイニシエーション作用とサブコンフルエント期以降に連続的に処理を行うプロモーション作用の両方を評価することから、処理時期による CNT の細胞内取り込みの差異についても確認する必要がある。

#### E 参考文献

- 1) He, P., Bayachou, M., 2005. Layer-by-layer fabrication and characterization of DNA-wrapped single-walled carbon nanotube particles. *Langmuir* 21 (13), 6086–6092
- 2) Lam, C.W., James, J.T., McCluskey, R., Arepalli, S., Hunter, R.L., 2006. A review of carbon nanotube toxicity and assessment of potential occupational and environmental health risks. *Crit. Rev. Toxicol.* 36 (3), 189–217.
- 3) Lam, C.W., James, J.T., McCluskey, R., Hunter, R.L., 2004. Pulmonary toxicity of singlewall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. *Toxicol. Sci.* 77 (1), 126–134.
- 4) Li, J.G., Li, W.X., Xu, J.Y., Cai, X.Q., Liu, R.L., Li, Y.J., Zhao, Q.F., Li, Q.N., 2007a. Comparative study of pathological lesions induced by multiwalled carbon nanotubes in lungs of mice by intratracheal instillation and inhalation. *Environ. Toxicol.* 22 (4), 415–421.
- 5) Li, Z., Hulderman, T., Salmen, R., Chapman, R., Leonard, S.S., Young, S.H., Shvedova, A., Luster, M.I., Simeonova, P.P., 2007b. Cardiovascular effects of pulmonary exposure to single-wall carbon nanotubes. *Environ. Health Perspect.* 115 (3), 377–382.
- 6) Muller, J., Huaux, F., Moreau, N., Misson, P., Heilier, J.F., Delos, M., Arras, M., Fonseca, A., Nagy, J.B., Lison, D., 2005. Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 207 (3), 221–231.
- 7) Shvedova, A.A., Kisin, E.R., Mercer, R., Murray, A.R., Johnson, V.J., Potapovich, A.I., Tyurina, Y.Y., Gorelik, O., Arepalli, S., Schwegler-Berry, D., Hubbs, A.F., Antonini, J., Evans, D.E., Ku, B.K., Ramsey, D., Maynard, A., Kagan, V.E., Castranova, V., Baron, P., 2005. Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to singlewalled carbon nanotubes in mice. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 289 (5), L698–L708.
- 8) Warheit, D.B., Laurence, E.R., Reed, K.L., Roach, D.H., Reynolds, G.A., Webb, T.R., 2004. Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats. *Toxicol. Sci.* 77 (1), 117–125.
- 9) Mangum, J.B., Turpin, E.A., Antao-Menezes, A., Cesta, M.F., Bermudez, E., Bonner, J.C., 2006. Single-walled

- carbon nanotube (SWCNT)-induced interstitial fibrosis in the lungs of rats is associated with increased levels of PDGF mRNA and the formation of unique intercellular carbon structures that bridge alveolar macrophages in situ. *Part. Fibre Toxicol.* 3, 15.
- 10) Takagi, A., Hirose, A., Nishimura, T., Fukumori, N., Ogata, A., Ohashi, N., Kitajima, S., Kanno, J., 2008. Induction of mesothelioma in p53<sup>+/-</sup> mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube. *J. Toxicol. Sci.* 33 (1), 105–116.
- 11) Mouchet, F., Landois, P., Sarremejean, E., Bernard, G., Puech, P., Pinelli, E., Flahaut, E., Gauthier, L., 2008. Characterisation and in vivo ecotoxicity evaluation of doublewall carbon nanotubes in larvae of the amphibian *Xenopus laevis*. *Aquat. Toxicol.* 87 (2), 127–137.
- 12) K. Sasaki, H. Mizusawa, M. Ishidate, 1988. Isolation and characterization of ras-transfected BALB/3T3 clone showing morphological transformation by 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate, *Jpn. J. Cancer Res.* 79, 921–930.
- 13) K. Sasaki, H. Mizusawa, M. Ishidate, N. Tanaka, 1990. Establishment of a highly reproducible transformation assay of a ras-transfected BALB 3T3 clone by treatment with promoters, *Basic Life Sci.* 52, 411–416.
- 14) S. Asada, K. Sasaki, N. Tanaka, K. Takeda, M. Hayashi, M. Umeda, 2005. Detection of initiating as well as promoting activity of chemicals by a novel cell transformation assay using v-Ha-ras-transfected BALB/c 3T3 cells (Bhas 42 cells), *Mutat. Res.* 588, 7–21.
- 15) K. Ohmori, K. Sasaki, S. Asada, N. Tanaka, M. Umeda, 2004. An assay method for the prediction of tumor promoting potential of chemicals by the use of Bhas 42 cells, *Mutat. Res.* 557, 191–202.
- 16) Ayres JG, Borm P, Cassee FR, Castranova V, Donaldson K, Ghio A, et al. 2008. Evaluating the toxicity of airborne particulate matter and nanoparticles by measuring oxidative stress potential – a workshop report and consensus statement. *Inhal Toxicol* 20:75–99.
- 17) Nel A, Xia T, Madler L, Li N. 2006. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 311:622–627.
- 18) Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. 2005. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect* 113:823–839.

## F 研究発表

### 1. 論文発表

本間正充; 遺伝毒性物質に閾値はあるのか? フ  
アルマシア 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)

## 2. 学会発表

Honma, M., Kumita, W., and Sakuraba, M.: Demonstration of ionizing irradiation inducing genomic instability via breakage–fusion–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、鵜飼明子、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説明する試み

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)

#### G. 知的所有権の取得状況

なし

表1 カーボンナノチューブ(0312TH)でチャイニーニーズ・ハムスター培養細胞(ChL/U細胞)を6時間処理(S9 mix非存在下)したときの染色体分析結果

群	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	S9 mix	処理 時間 (hrs)	細胞 増殖率 (%)	分裂 <sup>3)</sup> 指数 (%)	分析 細胞数	構造異常の種類と数				倍 数 <sup>6)</sup> 細胞の数 (%)	傾向性検定 <sup>7)</sup> 構 造 異常					
							gap	ctb	cte	csb			cse	mul <sup>4)</sup>	合計	その他 <sup>5)</sup> の異常	構造異常を有する細胞の数を ギャップを 除く(%)
陰性対照 <sup>1)</sup>	0	-	6-(18)	100	NA	100	0	0	0	1	0	0	1 ( 1.0 )	1 ( 0.3 )			
						100	1	0	0	0	1	0	1 ( 1.0 )	0 ( 0.0 )	2 ( 0.5 )		
						200	1	0	0	1	0	0	2 ( 1.0 )	1 ( 0.5 )	3 ( 0.4 )		
0312TH	8	-	6-(18)	85	NA	観察せず											
0312TH	16	-	6-(18)	78	NA	観察せず											
0312TH	32	-	6-(18)	60	NA	100	0	1	0	0	0	1	1 ( 1.0 )	1 ( 1.0 )	45 ( 11.3 )		
						100	1	2	0	0	0	3	2 ( 2.0 )	2 ( 2.0 )	38 ( 9.5 )		
						200	1	3	0	0	0	4	3 ( 1.5 )	3 ( 1.5 )	83 *( 10.4 )		
0312TH	63	-	6-(18)	43	NA	100	1	1	0	0	0	2	2 ( 2.0 )	1 ( 1.0 )	53 ( 13.3 )		
						100	1	1	1	0	0	3	3 ( 3.0 )	2 ( 2.0 )	56 ( 14.0 )		
						200	2	2	1	0	0	5	5 ( 2.5 )	3 ( 1.5 )	109 *( 13.6 )		
0312TH	127	-	6-(18)	30	3.0, 2.8	100	1	1	1	0	0	3	3 ( 3.0 )	2 ( 2.0 )	83 ( 20.8 )		
						100	1	1	2	0	0	4	4 ( 4.0 )	3 ( 3.0 )	75 ( 18.8 )		
						200	2	2	3	0	0	7	7 ( 3.5 )	5 ( 2.5 )	158 *( 19.8 )		
0312TH	254	-	6-(18)	21	1.6, 1.4	強い細胞毒性のため観察せず											
0312TH	507	-	6-(18)	15	2.2, 1.6	強い細胞毒性のため観察せず											
MMC	0.1	-	6-(18)	NA	NA	100	2	26	23	4	0	0	55	8	39 ( 39.0 )	39 ( 39.0 )	1 ( 0.3 )
						100	2	28	33	1	0	0	64	0	42 ( 42.0 )	42 ( 42.0 )	0 ( 0.0 )
						200	4	54	56	5	0	0	119	8	81 ( 40.5 )	81 *( 40.5 )	1 ( 0.1 )

gap: 染色体型および染色体型のギャップ, ctb: 染色体切断, cte: 染色体切断, csb: 染色体交換, cse: 染色体交換 (二動原体性染色体および環状染色体), mul: 多染色体異常, MMC: マイトマイシンC, NA: 分析せず.

1) 溶媒として培養液を用いた. 2) コールターカウンターにより各デイスシミュにおける細胞数を測定し, 増殖抑制の指標とした. 3) デイスシミュあたり500細胞分析した. 4) 1細胞中に10個以上の異常がある場合は異常の数を10とスコアした. 5) アネユエーションおよび未成熟染色体凝縮などであるが, 構造異常からは除外した. 6) 各群800細胞分析した. 7) コクラン・アーマイツジの傾向性検定 ( $p < 0.01$ , 片側).  
\*: フイツジヤーの直接確率法で有意差あり ( $p < 0.01$ , 片側).

表2 カーボンナノチューブ (0312TH) でチャイニーズ・ハムスター培養細胞 (CHL/U 細胞) を 6時間処理 (S9 mix存在下) したときの染色体分析結果

群	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	S9 mix	処理 時間 (hrs)	細胞 <sup>2)</sup> 増殖率 (%)	分裂 <sup>3)</sup> 指数 (%)	分析				傾向性検定 <sup>7)</sup> 構造 数的 異常											
						細胞数	分類 <sup>3)</sup> 指数 (%)	分裂 <sup>3)</sup> 指数 (%)	細胞の数 (%)												
						gap	ctb	cte	csb	cse	mul <sup>4)</sup>	合計	倍 数 性 <sup>6)</sup> 細胞の数 (%)								
陰性対照 <sup>1)</sup>	0	+	6-(18)	100	NA	100	1	1	0	0	0	2	1	2	(2.0)	1	(1.0)	0	(0.0)		
						100	1	1	0	0	0	2	1	1	(1.0)	1	(1.0)	0	(0.0)		
						200	2	2	0	0	0	4	2	3	(1.5)	2	(1.0)	0	(0.0)		
						観察せず															
0312TH	7	+	6-(18)	94	NA	観察せず															
0312TH	13	+	6-(18)	83	NA	観察せず															
0312TH	26	+	6-(18)	85	NA	観察せず															
0312TH	53	+	6-(18)	63	NA	100	0	1	1	0	0	2	0	2	(2.0)	2	(2.0)	2	(2.0)	0	(0.0)
						100	1	1	2	0	0	4	0	4	(4.0)	3	(3.0)	62	(15.5)		
						200	1	2	3	0	0	6	0	6	(3.0)	5	(2.5)	112	*(14.0)		
0312TH	106	+	6-(18)	45	4.0, 3.4	100	0	0	2	0	0	2	0	2	(2.0)	2	(2.0)	113	(28.3)		
						100	0	0	4	0	0	4	0	3	(3.0)	3	(3.0)	101	(25.3)		
						200	0	0	6	0	0	6	0	5	(2.5)	5	(2.5)	214	*(26.8)		
0312TH	211	+	6-(18)	30	3.2, 2.2	100	1	1	2	1	1	0	6	0	4	(4.0)	3	(3.0)	114	(28.5)	
						100	0	6	3	0	0	9	0	7	(7.0)	7	(7.0)	79	(19.8)		
						200	1	7	5	1	1	0	15	0	11	(5.5)	10	(5.0)	193	*(24.1)	
0312TH	423	+	6-(18)	24	1.4, 1.4	強い細胞毒性のため観察せず															
CP	10	+	6-(18)	NA	NA	100	7	10	36	1	0	0	54	2	42	(42.0)	37	(37.0)	1	(0.3)	
						100	7	6	18	0	1	0	32	0	22	(22.0)	19	(19.0)	0	(0.0)	
						200	14	16	54	1	1	0	86	2	64	(32.0)	56	*(28.0)	1	(0.1)	

gap: 染色体型および染色体型のギャップ, ctb: 染色体分体切断, cte: 染色体分体切断, cse: 染色体分体交換 (二動原体性染色体および環状染色体), mul: 多染色体異常, CP: シクロホスファミド, NA: 分析せず。

1) 媒体として培養液を用いた。 2) コールターカウンターにより各ディンシュにより各ディンシュにおける細胞数を測定し、増殖抑制の指標とした。 3) デインシュあたり500細胞分析した。 4) 1細胞中に10個以上の異常がある場合は異常の数を10とスコアした。 5) アデニエーションおよび未成熟染色体凝縮などであるが、構造異常からは除外した。 6) 各群800細胞分析した。 7) コ克蘭・アーム・アディンジの傾向性検定 ( $p < 0.01$ , 片側) を行った。

\*: フイツジャーの直接確率法で有意差あり ( $p < 0.01$ , 片側)。



表3 カーボンナノチューブ (0312TH) でチャイニーズ・ハムスター培養細胞 (CHL/IU 細胞) を 24時間連続処理 (S9 mix 非存在下) したときの染色体分析結果

群	濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	処理 時間 (hrs)	細胞 増殖率 (%)	分裂 <sup>3)</sup> 指数 (%)	分析 細胞数	構造異常の種類と数				倍 数 <sup>6)</sup> 細胞の数 (%)	傾向性検定 <sup>7)</sup>								
						gap	ctb	cte	csb		cse	mul <sup>4)</sup>	合計	その他 <sup>5)</sup> の異常	ギャップを 含む (%)	ギャップを 除く (%)	構造異常	数 的 異常	
陰性対照 <sup>1)</sup>	0	22-(2)	100	NA	100	0	2	0	0	0	0	2	( 2.0 )	2	( 2.0 )	0	( 0.0 )		
					100	0	1	1	9	0	0	11	0	3	( 3.0 )	3	( 3.0 )	1	( 0.3 )
					200	0	3	1	9	0	0	13	0	5	( 2.5 )	5	( 2.5 )	1	( 0.1 )
0312TH	8	22-(2)	84	NA	100	0	0	0	0	0	0	0	( 0.0 )	0	( 0.0 )	17	( 4.3 )		
					100	0	1	2	0	0	3	1	3	( 3.0 )	3	( 3.0 )	10	( 2.5 )	
					200	0	1	2	0	0	3	1	3	( 1.5 )	3	( 1.5 )	27*	( 3.4 )	
0312TH	16	22-(2)	68	NA	100	0	1	1	0	0	2	0	2	( 2.0 )	2	( 2.0 )	26	( 6.5 )	
					100	2	0	0	0	0	2	0	2	( 2.0 )	0	( 0.0 )	40	( 10.0 )	
					200	2	1	1	0	0	4	0	4	( 2.0 )	2	( 1.0 )	66*	( 8.3 )	
0312TH	32	22-(2)	45	2.4, 1.2	100	0	0	0	0	0	0	0	( 0.0 )	0	( 0.0 )	56	( 14.0 )		
					100	0	2	0	0	0	2	2	2	( 2.0 )	2	( 2.0 )	39	( 9.8 )	
					200	0	2	0	0	0	2	2	2	( 1.0 )	2	( 1.0 )	95*	( 11.9 )	
0312TH	63	22-(2)	26	0.6, 1.4	強い細胞毒性のため観察せず														
0312TH	127	22-(2)	15	0.6, 1.2	強い細胞毒性のため観察せず														
0312TH	254	22-(2)	10	0.2, 0.4	強い細胞毒性のため観察せず														
0312TH	507	22-(2)	9	0.2, 0.2	強い細胞毒性のため観察せず														
MMC	0.05	22-(2)	NA	NA	100	0	19	38	0	0	57	3	43	( 43.0 )	43	( 43.0 )	0	( 0.0 )	
					100	5	18	28	0	0	51	1	34	( 34.0 )	33	( 33.0 )	0	( 0.0 )	
					200	5	37	66	0	0	108	4	77	( 38.5 )	76*	( 38.0 )	0	( 0.0 )	

gap: 染色体型および染色体型のギャップ, ctb: 染色体分体切断, cte: 染色体分体切断, csb: 染色体交換, cse: 染色体交換 (二動原体性染色体および環状染色体), mul: 多染色体異常, MMC: マイトマイシンC, NA: 分析せず.

1) 溶媒として培養液を用いた. 2) コールターカウンターにより各デイスクにおける細胞数を測定し, 増殖抑制の指標とした. 3) デイスクあたり500細胞分析した. 4) 1細胞中に10個以上の異常がある場合は異常の数を10とスコアした. 5) アテニエーションおよび成熟染色体凝縮などであるが, 構造異常からは除外した. 6) 各群800細胞分析した. 7) コクラン・アーマティッジの傾向性検定 ( $p < 0.01$ , 片側) を行った.

\*: フインジャーの直接確率法で有意差あり ( $p < 0.01$ , 片側).

表4 カーボンナノチューブ (04519DC) でチャイニーズ・ハムスター培養細胞 (CHL/U 細胞) を 6時間処理 (S9 mix非存在下) したときの染色体分析結果

群	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	S9 mix	処理 時間 (hrs)	細胞 増殖率 (%)	分裂 <sup>3)</sup> 指数 (%)	分析 細胞数	構造異常の種類と数				合計	その他 <sup>5)</sup> の異常	構造異常を有する細胞の数		倍率性 <sup>6)</sup> 細胞の数 (%)	傾向性検定 <sup>7)</sup> 構造的 異常				
							gap	ctb	cte	csb			cse	mul <sup>4)</sup>			ギャップを 含む (%)	ギャップを 除く (%)		
陰性対照 <sup>1)</sup>	0	-	6-(18)	100	NA	100	1	0	2	0	1	0	4	4	(4.0)	3	(3.0)	2	(0.5)	
						100	0	0	0	0	0	0	0	0	(0.0)	0	(0.0)	1	(0.3)	
						200	1	0	2	0	1	0	4	4	(2.0)	3	(1.5)	3	(0.4)	
04519DC	8	-	6-(18)	93	NA		観察せず													
04519DC	16	-	6-(18)	83	NA		観察せず													
04519DC	32	-	6-(18)	81	NA		観察せず													
04519DC	64	-	6-(18)	78	NA		観察せず													
04519DC	128	-	6-(18)	73	NA	100	0	0	0	2	0	0	2	0	(1.0)	1	(1.0)	0	(0.0)	
						100	1	0	1	2	0	0	4	0	(3.0)	2	(2.0)	5	(1.3)	
						200	1	0	1	4	0	0	6	0	(2.0)	3	(1.5)	5	(0.6)	
04519DC	256	-	6-(18)	67	NA	100	0	0	0	1	0	1	0	0	(1.0)	1	(1.0)	2	(0.5)	
						100	1	3	0	0	0	4	1	4	(4.0)	3	(3.0)	0	(0.0)	
						200	1	3	0	0	1	0	5	1	(2.5)	4	(2.0)	2	(0.3)	
04519DC	513	-	6-(18)	56	3.8, 4.0	100	0	1	0	1	0	0	2	0	(2.0)	2	(2.0)	4	(1.0)	
					4	100	1	1	2	2	0	0	6	0	(5.0)	4	(4.0)	7	(1.8)	
						200	1	2	2	3	0	0	8	0	(3.5)	6	(3.0)	11	(1.4)	
MMC	0.1	-	6-(18)	NA	NA	100	8	31	36	0	0	0	75	0	(48.0)	45	(45.0)	2	(0.5)	
						100	5	27	44	0	0	0	76	1	(45.0)	43	(43.0)	0	(0.0)	
						200	13	58	80	0	0	0	151	1	(46.5)	88*	(44.0)	2	(0.3)	

gap: 染色体型および染色体型のギャップ, ctb: 染色体切断, cte: 染色体切断, csb: 染色体交換, cse: 染色体交換 (二動原体性染色体および環状染色体), mul: 多染色体異常, MMC: マイトマイシンC, NA: 分析せず.

1) 溶媒として培養液を用いた. 2) コールター・カウンターにより各ディンシユにおける細胞数を測定し, 増殖抑制の指標とした. 3) ディンシユあたり500細胞分析した. 4) 1細胞中に10個以上の異常がある場合は異常の数を10とスコアした. 5) アデニユエーションおよび未成熟染色体凝縮などであるが, 構造異常からは除外した. 6) 各群800細胞分析した. 7) コクラン・アーマー・フィッツの傾向性検定 ( $p < 0.01$ , 片側) を行った.  
\*: フィンジャーの直接確率法で有意差あり ( $p < 0.01$ , 片側).

表5 カーボンナノチューブ(04519DC)でチャイニーニーズ・ハムスター培養細胞(CHL/TU細胞)を6時間処理(S9 mix存在下)したときの染色体分析結果

群	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	S9 mix	処理 時間 (hrs)	細胞 増殖率 (%)	分裂 <sup>3)</sup> 指数 (%)	分析 細胞数	構造異常の種類と数				倍 数 性 <sup>6)</sup> 細胞の数 (%)	傾向性検定 <sup>7)</sup>							
							gap	ctb	cte	csb		cse	mul <sup>4)</sup>	合計	構造異常を有する細胞の数 キヤップを 含む(%)	キヤップを 除く(%)	構造異常	数 的 異常	
陰性対照 <sup>1)</sup>	0	+	6-(18)	100	NA	100	1	1	0	0	0	2	2	(2.0)	1	(1.0)	0	(0.0)	
						100	0	0	0	0	0	0	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)	
						200	1	1	0	0	0	2	2	(1.0)	1	(0.5)	0	(0.0)	
04519DC	7	+	6-(18)	90	NA		観察せず												
04519DC	13	+	6-(18)	86	NA		観察せず												
04519DC	27	+	6-(18)	87	NA		観察せず												
04519DC	53	+	6-(18)	84	NA		観察せず												
04519DC	107	+	6-(18)	75	NA	100	0	2	0	0	0	2	2	(2.0)	2	(2.0)	3	(0.8)	
						100	0	0	0	0	0	0	0	(0.0)	0	(0.0)	2	(0.5)	
						200	0	2	0	0	0	2	2	(1.0)	2	(1.0)	5	(0.6)	
04519DC	214	+	6-(18)	71	NA	100	1	0	0	0	0	1	1	(1.0)	0	(0.0)	6	(1.5)	
						100	0	1	0	0	0	1	0	(1.0)	1	(1.0)	3	(0.8)	
						200	1	1	0	0	0	2	1	(1.0)	1	(0.5)	9	(1.1)	
04519DC	427	+	6-(18)	60	3.8, 3.4	100	1	2	0	0	0	3	0	(3.0)	2	(2.0)	2	(0.5)	
						100	0	1	0	0	0	1	0	(1.0)	1	(1.0)	3	(0.8)	
						200	1	3	0	0	0	4	0	(2.0)	3	(1.5)	5	(0.6)	
CP	10	+	6-(18)	NA	NA	100	4	41	73	1	0	119	1	(66.0)	65	(65.0)	0	(0.0)	
						100	4	33	82	0	0	10	129	1	(61.0)	61	(61.0)	0	(0.0)
						200	8	74	155	1	0	10	248	2	(63.5)	126	*(63.0)	0	(0.0)

gap: 染色体型および染色体型のキヤップ, ctb: 染色体切断, cte: 染色体切断, cse: 染色体交換, csb: 染色体交換 (二動原体染色体および環状染色体), mul: 多染色体異常, CP: シクロホスファミド, NA: 分析せず。

1) 溶媒として培養液を用いた。 2) コールターカウンターにより各ディンジェンにおける細胞数を測定し、増殖抑制の指標とした。 3) ディンジェンあたり500細胞分析した。 4) 1細胞中に10個以上の異常がある場合は異常の数を10とスコアした。 5) アラニエーションおよび未成熟染色体凝縮などであるが、構造異常からは除外した。 6) 各群800細胞分析した。 7) コクラン・アーミティンジの傾向性検定 ( $p < 0.01$ , 片側)を行った。  
\*: フィンジャーの直接確率法で有意差あり ( $p < 0.01$ , 片側)。



表7 カーボンナノチューブ(03121THおよび04519DC)でBhas 42細胞を処理したのきの形質転換試験結果

物質名	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	イニシエーション試験					プロモーション試験				
		細胞増殖率 <sup>3)</sup>		陽性形質転換巢			細胞増殖率 <sup>3)</sup>		陽性形質転換巢		
		ウェル数	(%)	ウェル数	総数	平均 <sup>4)</sup>	ウェル数	(%)	ウェル数	総数	平均 <sup>4)</sup>
無処理対照 <sup>1)</sup>		3	94.2	6	12	2.0	3	73.7	6	12	2.0
陰性対照 <sup>2)</sup>	0	3	100.0	6	21	3.5	3	100.0	6	22	3.7
03121TH	0.0049	3	108.6	6	17	2.8	3	102.1	6	14	2.3
	0.0098	3	100.7	6	19	3.2	3	105.3	6	20	3.3
	0.019	3	102.0	6	15	2.5	3	118.4	6	21	3.5
	0.039	3	102.8	6	14	2.3	3	117.5	6	21	3.5
	0.078	3	99.2	6	14	2.3	3	118.8	6	16	2.7
	0.16	3	102.8	6	18	3.0	3	110.1	6	18	3.0
	0.31	3	108.0	6	14	2.3	3	101.4	6	18	3.0
	0.63	3	108.1	6	20	3.3	3	104.5	6	21	4.2
	1.3	3	91.0	6	15	2.5	3	101.2	6	20	3.3
	2.5	3	90.9	6	11	1.8	3	103.7	6	14	2.3
	5.0	3	105.2	6	15	2.5	3	125.6	6	12	2.4
10	3	52.0	6	17	2.8	3	130.6	6	9	1.5	
04519DC	0.0049	3	124.5	6	12	2.0	3	90.8	6	17	2.8
	0.0098	3	133.3	6	21	3.5	3	97.5	6	21	3.5
	0.019	3	106.3	6	20	3.3	3	99.8	6	21	3.5
	0.039	3	114.8	6	14	2.3	3	102.7	6	21	3.5
	0.078	3	124.6	6	22	3.7	3	99.4	6	24	4.0
	0.16	3	123.6	6	28	4.7	3	102.3	6	21	3.5
	0.31	3	117.2	6	18	3.0	3	97.3	6	21	3.5
	0.63	3	109.1	6	11	1.8	3	105.2	6	17	2.8
	1.3	3	109.1	6	17	2.8	3	95.5	6	16	2.7
	2.5	3	116.6	6	25	4.2	3	98.3	6	20	3.3
	5.0	3	112.2	6	10	1.7	3	101.6	6	16	2.7
10	3	114.3	6	22	3.7	3	103.6	6	16	2.7	
MCA	1	3	19.4	6	77 *	12.8					
TPA	0.05						3	162.5	6	67 *	11.2

MCA: 3-メチルコラントレン(イニシエーター)

TPA: ホルボール 12-ミリストート 13-アセタート(プロモーター)

1): 培養液交換のみ行った。

2): 媒体として仔ウシ血清(CS)を用い、1 vol%添加した。

3): 細胞をクリスタルバイオレット液で染色し、抽出した色素の吸光度を測定し、BCS 1vol%群を100%とする相対値を算出し

4): ウェルあたりの平均陽性形質転換巢数を形質転換率とした。

\*: Dunnett検定により、陰性対照群と比較して陽性形質転換巢数に有意差(p<0.05)あり。

**[短時間処理]**



**[連続処理]**



6 cmディッシュあたり $2 \times 10^4$ 個のCHL/IU細胞を播種

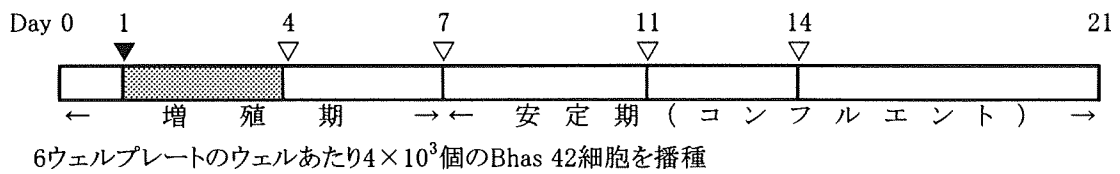
▼: 処理液 (被験物質を含む培養液) と交換

■: 処理時間

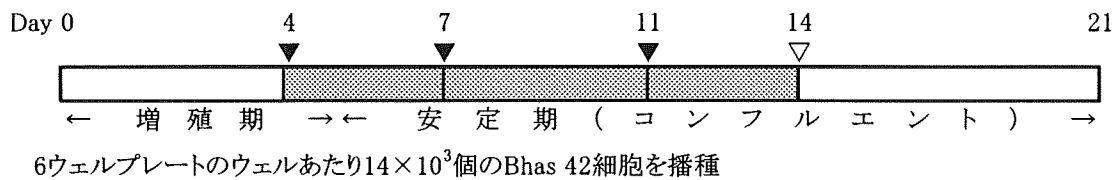
▽: コルセミドを添加

**図 1 CHL/IU 細胞を用いる染色体異常試験スケジュール**

**[イニシエーション試験]**



**[プロモーション試験]**



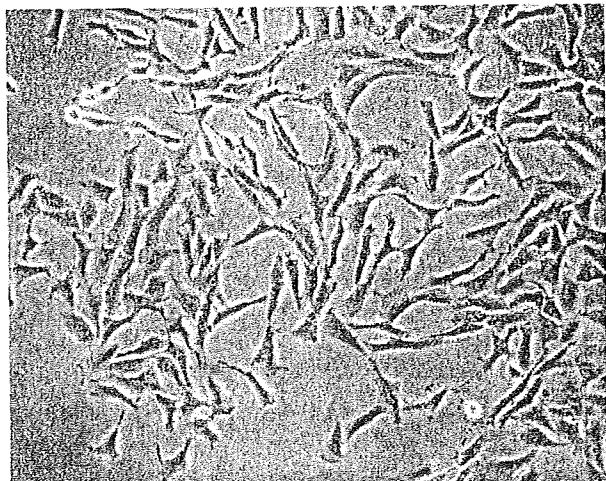
▼: 処理液 (被験物質を含む培養液) と交換

▽: 培養液と交換

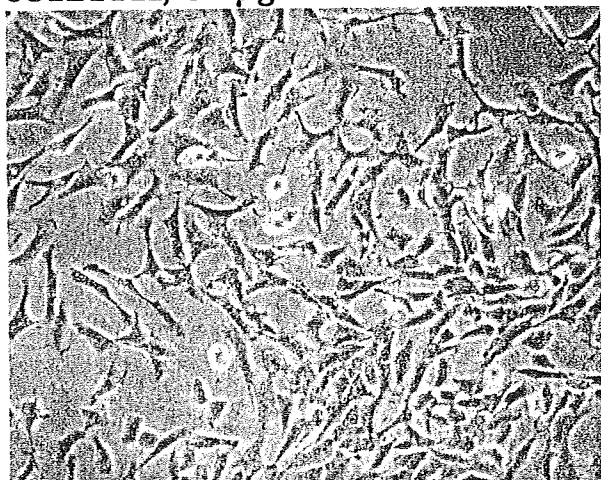
**図 2 Bhas42 細胞を用いる形質転換試験スケジュール**

[6 hr treatment without S9 mix]

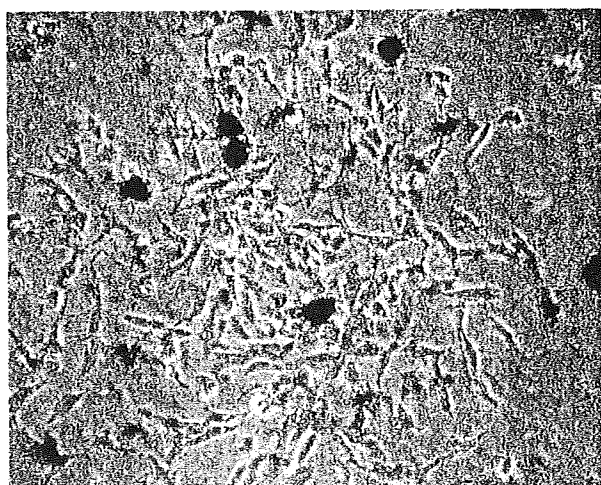
Control



03121TH, 32 µg/mL

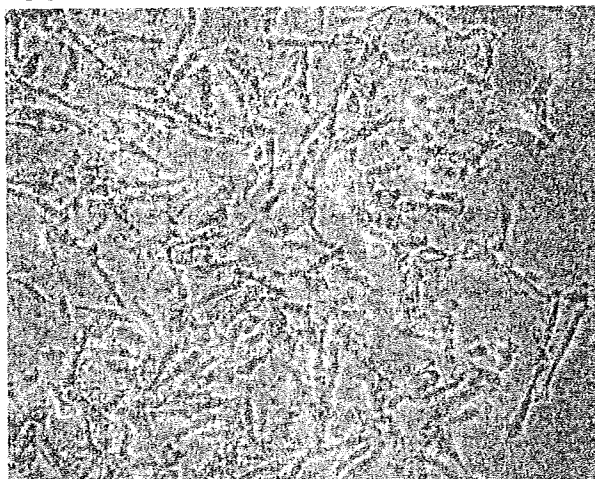


03121TH, 127 µg/mL



[6 hr treatment with S9 mix]

Control



03121TH, 53 µg/mL



03121TH, 211 µg/mL

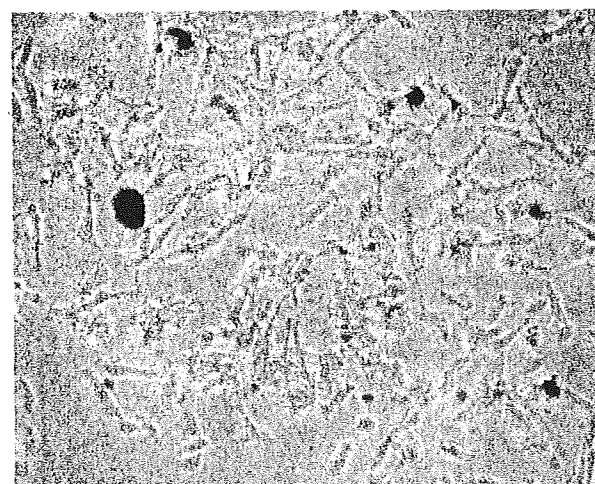
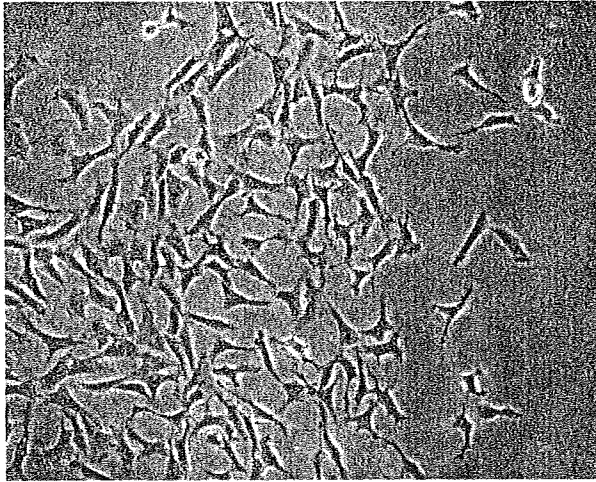


図 3 CHL/IU 細胞を 03121TH で短時間処理した位相差顕微鏡像

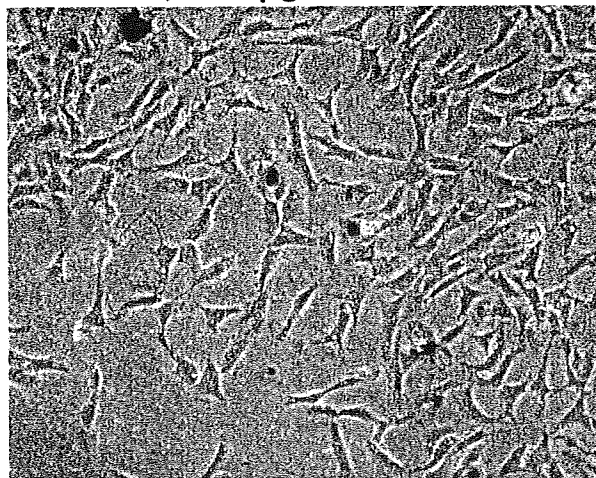


[6hr treatment without S9 mix]

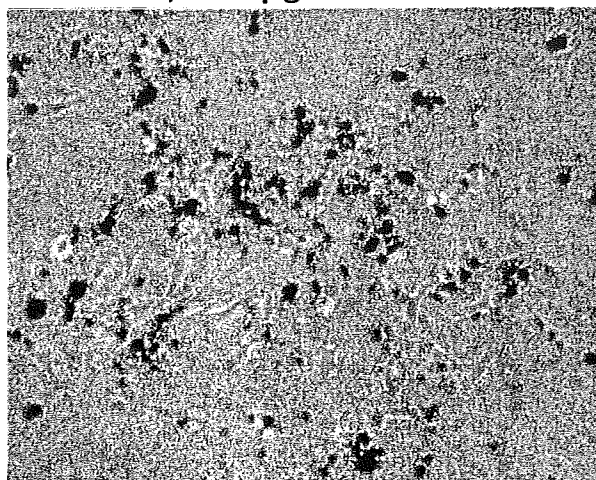
Control



04519DC, 128 µg/mL

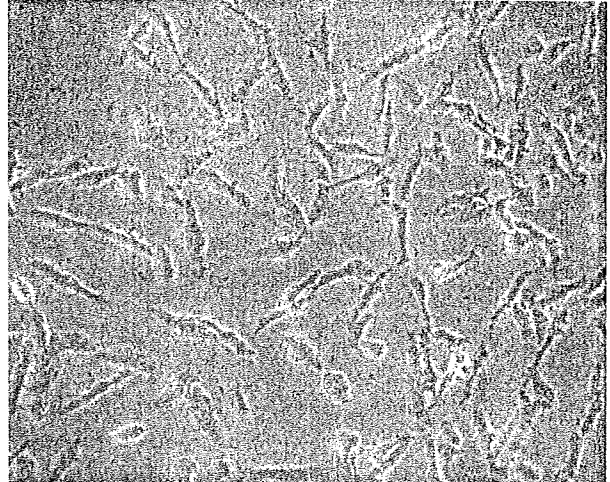


04519DC, 513 µg/mL

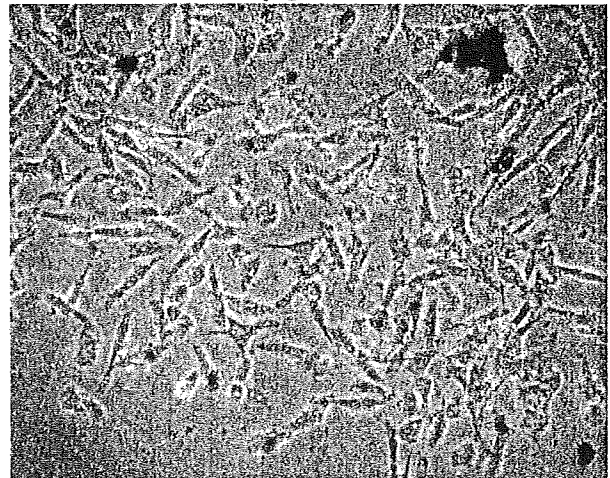


[6hr treatment with S9 mix]

Control



04519DC, 107 µg/mL



04519DC, 427 µg/mL

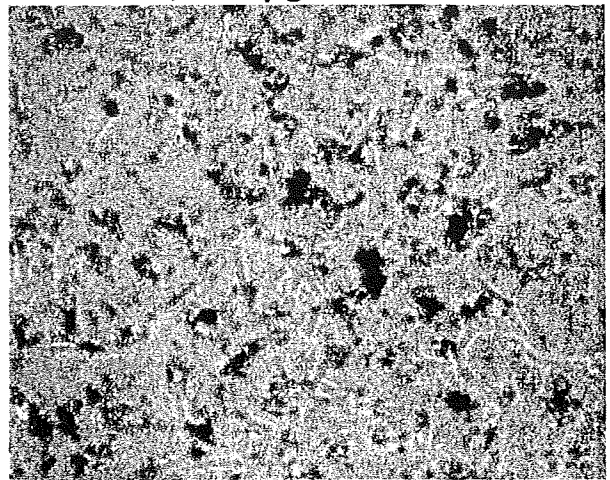
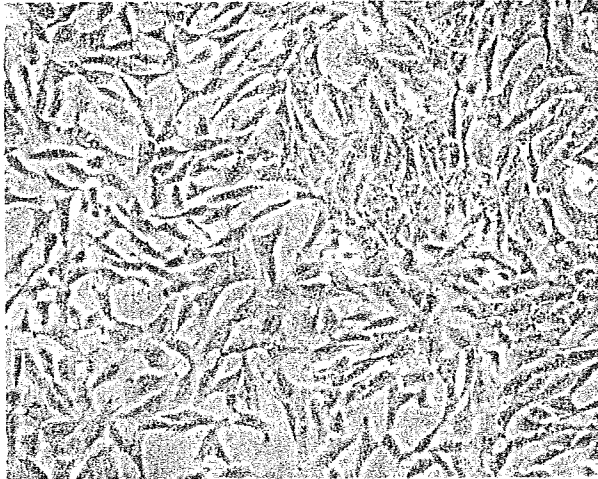


図 4 CHL/IU 細胞を 04519DC で短時間処理した位相差顕微鏡像

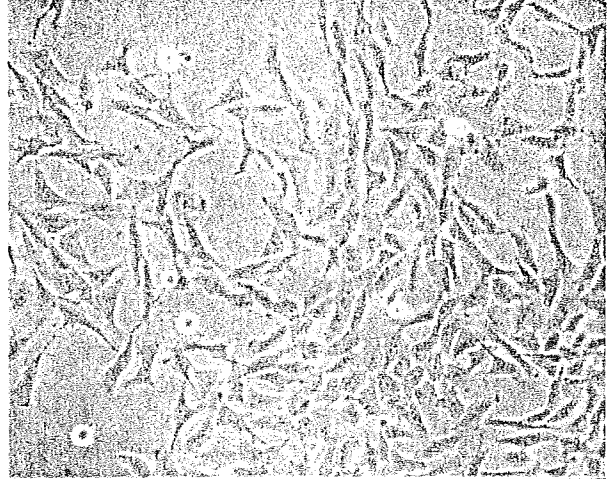


[24 hr continuous treatment]

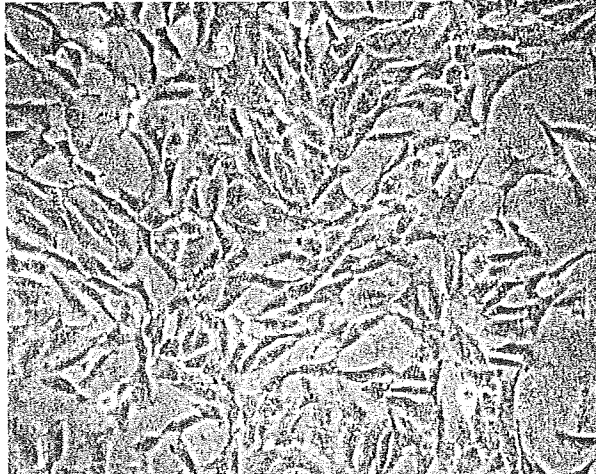
Control



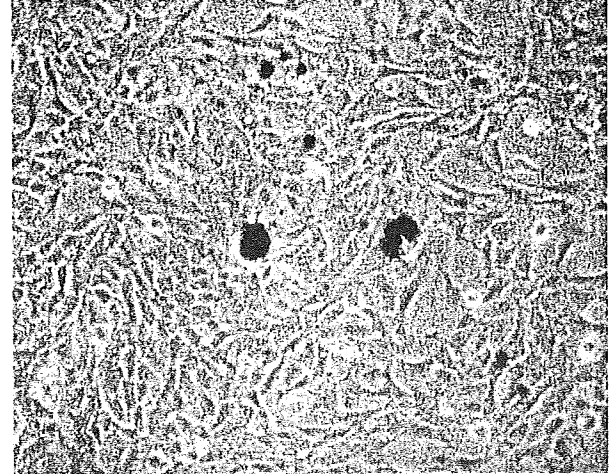
Control



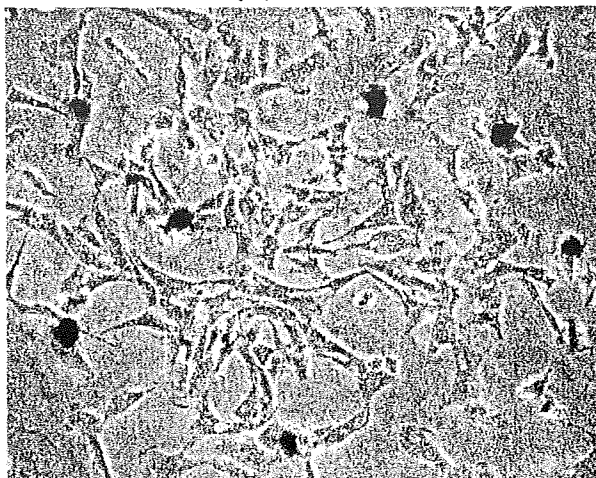
03121TH, 8  $\mu\text{g/mL}$



04519DC, 64  $\mu\text{g/mL}$



03121TH, 32  $\mu\text{g/mL}$



04519DC, 256  $\mu\text{g/mL}$

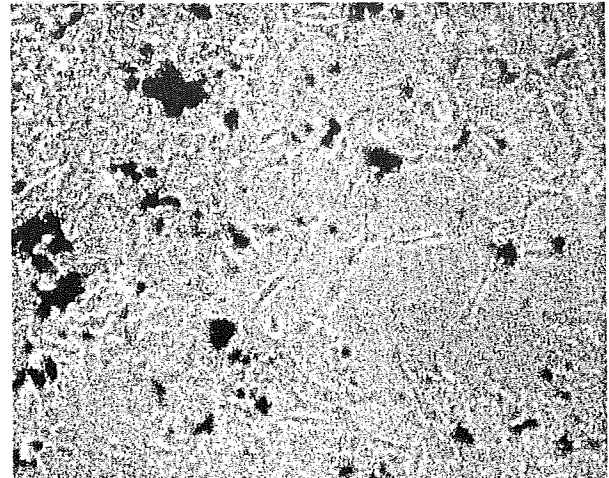


図 5 CHL/IU 細胞をカーボンナノチューブで連続処理した位相差顕微鏡像

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及び体内動態を含む  
基礎的有害性情報の集積に関する研究

分担研究課題名: ナノマテリアルの神経細胞機能・分化に  
与える影響に関する基礎的研究

分担研究者: 佐藤 薫 国立医薬品食品衛生研究所・薬理部第一室長

## 研究要旨

本研究はナノマテリアルの健康影響評価の一環として、神経細胞機能・分化に与える影響について基礎検討をおこなっている。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。

## A. 研究目的

本研究はナノマテリアルの健康影響評価の一環として、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。本年度は日機装より供与された 2 種の CNT を用いて、ミクログリア、神経幹細胞への細胞毒性、および、神経幹細胞の増殖に対する影響について検討した。

## B. 研究方法

### 0. CNT 調整

CNT は日機装より供与された。

- ① 30 ナノクラス CNT (30CNT)
- ② 日機装量産単層カーボンナノチューブ (Lot. No. SW1S081016/081029-1F&1D ) (MCNT)

CNT は 1 mg/ml となるように PBS に入れ、10

min あるいは 5 hr 超音波処理を行った。この上清を培地で 1/10, 1/100, 1/1000 に希釈した。

### 1. 神経幹細胞に対する影響の検討

胎生 17 日齢ラット全脳を培地中でミンスし、EGF, FGF, B27 supplement を添加した培地により一週間培養した。Neurosphere が現れたら CNT 上清で 24 時間処理し、BrdU assay (Promega) により細胞増殖を、MTT assay (Millipore) により細胞毒性を検討した。

### 2. ミクログリアに対する影響の検討

哺乳 0-1 日齢ラット全脳をミンスし、トリプシン処理を行い、75 cm<sup>2</sup> フラスコに播種した。7-10 日後にフラスコを振とうして回収したミクログリアを 96 穴プレートに再播種し、CNT 上清で 24 時間処理し、MTT assay (Millipore) により細胞毒性を検討し

た。

### 3. 元素分析による金属イオン検出

CNT を PBS に入れ、超音波処理後に PBS 中に増加する金属イオンを元素分析により検出した。検出を国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生化学部 五十嵐 良明 博士に依頼した。

(倫理面への配慮)

動物実験においては国立医薬品食品衛生研究所「動物実験の適正な実施に関する規程」に従い、動物愛護の精神に則って実験を進めた。ウイルスおよび遺伝子組み換え動物の取り扱いには「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」(所謂カルタヘナ法)および国立医薬品食品衛生研究所「遺伝子組換え実験安全管理規則」に準拠して取り扱った。

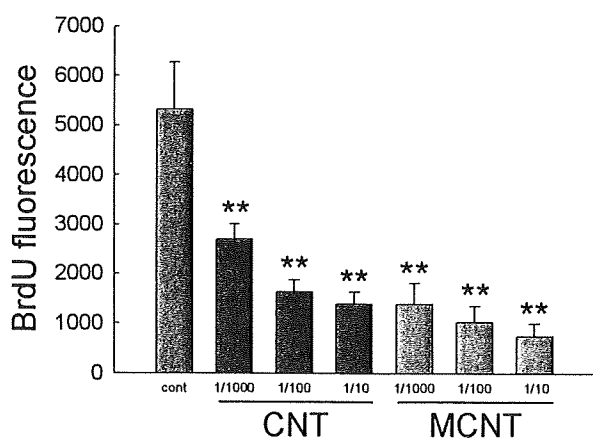
## C. 研究結果

### 0. CNT サンプルについて

CNT は PBS に入れて 5 hr 超音波処理を行っても、見た目はそれほど変わらない。実験には超音波処理後の上清を用いた。

### 1. 神経幹細胞に対する影響の検討

#### 1-1 CNT の神経幹細胞増殖に対する影響



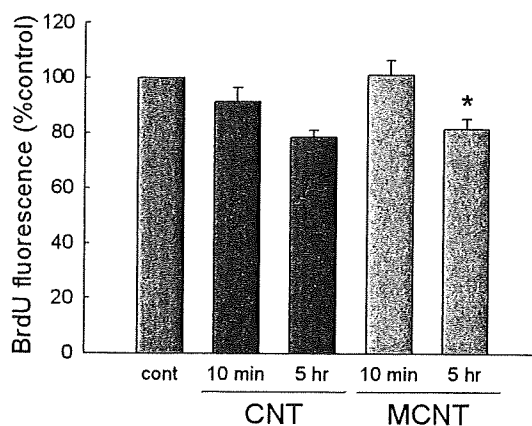
30CNT および MCNT はともに濃度依存的に神経幹細胞の増殖を阻害した。1/10 の濃度では 30CNT はコントロール群の 25%, MCNT はコントロール群の 13.5% であったが、両者とも作用本体が何か、またその濃度について明らかでないため、一概に作用強度を比較することはできない(図 1)。

\*\* : P<0.01 vs. cont group, Tukey's test following ANOVA, N=4

図 1. CNT の神経幹細胞増殖に対する影響

#### 1-2 CNT の神経幹細胞への細胞毒性

30CNT および MCNT はともに、適用した濃度範囲では神経幹細胞に対して細胞毒性を示さなかつ



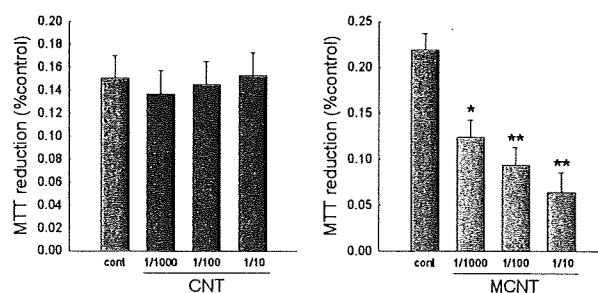
た。

#### 1-3 CNT の神経幹細胞増殖阻害作用と超音波処理時間との関連

試料の超音波処理時間を 10 min, 5 hr としたところ、30CNT, MCNT とともに超音波処理時間に依存して作用強度が増すことが明らかとなった(図 2)。

\*\* : P<0.01 vs. cont group, Tukey's test following ANOVA, N=4

図 2. CNT の作用の超音波処理時間依存性



### 2. ミクログリアに対する影響の検討

#### 2-1 CNT のミクログリアへの細胞毒性

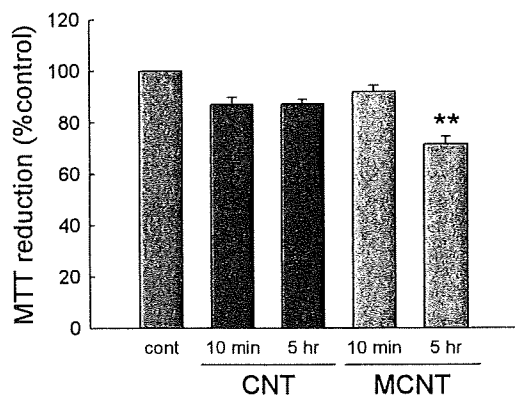
30CNT は適用した濃度範囲では毒性を示さなかった。MCNT は濃度依存的に細胞毒性を示した(図 3)。MTT reduction は 1/10 の濃度において、コントロール群の 27.3% まで低下した。

\* : P<0.05, \*\* : P<0.01 vs. cont group, Tukey's test following ANOVA, N=4

図 3. CNT のミクログリアへの細胞毒性

#### 2-2 CNT のミクログリア細胞毒性と超音波処理時間との関連

試料の超音波処理時間を 10 min, 5 hr としたところ, MCNT の細胞毒性は超音波処理時間に依存



して強度が増すことが明らかとなった(図4)

### 3. 元素分析による金属イオン検出

上記 1, 2 で見いだされた作用の原因物質が試料より溶出した金属イオンである可能性を考慮し, CNT

		試料中濃度 (ppb)					
		PBS	PBS sonication	MCNT	MCNT sonication	CNT	CNT sonication
Mn	55	nd	nd	0.33	16.04	nd	0.26
Rb	85	3.97	3.84	6.88	13.33	4.06	4.61
Cs	133	nd	nd	0.1	0.32	nd	0.59
W	182	nd	0.05	nd	0.08	nd	0.4
Tl	205	nd	nd	0.05	0.17	nd	0.37
Fe	57	nd	nd	nd	7110	nd	nd

超音波処理後 (5 hr) に溶出する金属イオンを元素

\*\*p<0.01 vs. cont group, Tukey's test following ANOVA, N=4

図 4. CNT の作用の超音波処理時間依存性分析によって分析したところ, 30 CNT では Cs, Tl, Fe, MCNT では Mn, Rb, Cs, Tl, Fe を検出した(表 1)

表 1. 超音波処理によって溶出する金属イオン

### D. 考察

30CNT, MCNT 両者とも超音波処理時間依存的に神経幹細胞増殖を阻害した. MCNT は超音波処理時間依存的にミクログリア細胞毒性を示した. この原因として予想されるのは断片化した CNT, あるいは金属イオンであるが, 断片化 CNT の検出については技術提供を受ける必要があるため, まず最初に元素分析を行い, 超音波処理により溶出する金属イオンを同定した. その結果, 神経幹細胞増殖阻害作用に Cs, Tl, ミクログリア細胞毒性に Mn, Rb, Fe が関与している可能

性が示された. 今後はこれらの金属単独での影響について確認する予定である. また, 30CNT および MCNT 断片の関与についてはキャビテーションによって調整した試料を用いて検討する予定である. 電子顕微鏡によって CNT 断片のイメージングを行うことも検討中である.

### E. 結論

30CNT および MCNT を超音波処理することにより新たな活性を見いだした. 神経幹細胞増殖に対しては 30CNT, MCNT の両者が抑制作用を, ミクログリア細胞毒性は MCNT のみが作用を呈した. 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. これが作用に関連している可能性も考えられる.

### F. 健康危機情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

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)

#### 2. 学会発表

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.,