

てきた。導入されたレポーター遺伝子は、個体の全ての細胞に存在することから、あらゆる臓器において遺伝子突然変異を検出することが可能である。特に gpt delta ラットは、大腸菌 *gpt* 遺伝子をレポーターとする 6-TGセクションを用いる点突然変異と、ラムダーファージ *red/gam* 遺伝子をレポーターとする欠失変異の検出が可能なトランスジェニック動物で、遺伝子に欠失を誘発するような化学物質の遺伝子変異を検出するのに有効な試験系である。^{2) 3)}

これまでに、MWCNTを1匹当たり40 及び 160 μg の用量で gpt delta ラットに単回気管内に投与し、肺の突然変異誘発性を調べ肺重量の有意な増加を示すが、gpt 突然変異及び Spi-欠失変異誘発性共に認められなかった。今年度は、MWCNTを gpt delta ラットに2週間間隔で4回投与して肺の突然変異誘発性を検討することにより、ナノマテリアルに対する安全性評価 における gpt delta ラットを用いる突然変異試験の有効性を検討した。

B. 研究方法

使用動物

日本エスエルシー株式会社から、5週齢の雄 gpt delta (F344) ラットを導入し、13週齢(体重 $276 \pm 12\text{g}$)で投与した。飼育条件は、温湿度を $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、 $55 \pm 15\%$ で管理した飼育室で、飼料(30kGy γ 線照射滅菌CRF1固形飼料、オリエンタル酵母工業株式会社)及び飲水(秦野市水をフィルターろ過した後、紫外線照射滅菌)を自由摂取させた。

被験物質

被験物質は、Nano Carbon Technologies 社の MWCNT (MWNT-7) 及び Chrysotile (UICC Chrysotile A) を用いた。

MWCNT (MWNT-7)

Property	Specification Range
Diameter	40~90 nm
Aspect Ratio	>100
Bulk Density	0.005~0.01 g/cm ³
Surface Area	25~30 m ² /g
Defect/Graphite Ratio	0.06~0.15
Purity	99.5%

被験物質懸濁液の調製方法

Tween80 を 0.1% 添加した PBS (Phosphate buffered saline) に、各設定濃度となる様、被験物質を加え超音波ホモジナイザー (VP-30S 型 TAITEC) を用いて懸濁した。被験物質懸濁液は用時調製とし、投与直前に超音波で再拡散した。

被験物質の投与方法

イソフルランの吸入による麻酔下で液体気管内投与器具(ゾンデ、18G)を使用して、被験物質懸濁液を気管内に投与した。

投与用量

MWCNT の投与用量は 40 μg /匹、160 μg /匹の二段階(公比 4)とし、Chrysotile の投与用量は 1000 μg /匹として、2 週間隔で4回投与した。なお、対照群の動物には被験物質の懸濁媒体として使用した PBS に Tween80 を 0.1% 添加したものを投与 (0.3ml/匹) した。

試料採取方法

被験物質を初回投与 49 日または 90 日に、ペントバルビタールナトリウム麻酔下で後大動脈より放血屠殺した。開胸後、肺を摘出し直ちに -80°C で凍結した。

突然変異分析方法

1) gpt 突然変異検出方法

各種臓器から、ゲノム DNA を抽出し

(RecoverEase DNA Isolation Kit : Stradagene 社)、in vitro パッケージング (Transpack Packaging Extract : Stradagene 社) によりトランスジーンを入ファージとして回収した。

回収したファージを大腸菌 YG6020 に感染させ、gpt 領域に変異をもつ大腸菌を 6-Thioguanine の耐性変異コロニーを選択して点突然変異頻度を測定した。

2) Spi- 変異検出方法

1)と同様に、回収したファージを大腸菌 XL-1Blue MRA 及び XL-1BlueMRA (P2) に感染させ、Spi-セレクションにより欠失変異頻度を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究は、日本バイオアッセイ研究センターの実験動物委員会に承認され、「動物実験に関する指針」に基づき実施した。

C. 研究結果

1) 体重変化

MWCNT及びChrysotile投与による体重増加抑制は認められなかった。

2) 肺重量変化

MWCNT初回投与後49日及び90日後の肺重量は、用量相関関係を示し、対照群に比べ有意な増加をした。Chrysotile 投与群は、初回投与後49日または90日後共に対照群と比べ有意な増加を示した。

3) 肺突然変異頻度

MWCNT及びChrysotileの初回投与後49日または90日後の肺における gpt 突然変異頻度及び Spi-欠失変異頻度は共に対照群に比べ増加は認められなかった。

D. 考察

MWCNT を40または160 μ g、またChrysotileを1000 μ g の用量でgpt deltaラットに2週間隔の4

回気管内投与により、初回投与後49日及び90日の肺重量は有意な増加を示したが、gpt突然変異及び Spi-欠失変異の誘発性に変化は認められなかった。

今までに、MWCNTを40及び160 μ gの用量で gpt delta ラットに単回気管内に投与し、投与後29日及び90日の肺で炎症性影響によるII型肺上皮細胞（肺幹細胞）の増生が認められたことから突然変異の増加が想定されたが、突然変異の増加は認められていない。

さらに、我々が実施した動物の肺に腫瘍誘発性のある難溶性粒子状物質の亜硫化ニッケルをgptラットに気管内投与した試験においても、肺の遺伝子突然変異の増加は認められていない。

Xuら(2009)は、C₆₀を gpt delta マウスの初代胚線維芽細胞に暴露し活性酸素種 (ONOO⁻) の増加及びSpi-欠失変異の増加を示した。また、Totsukaら(2009)は、gpt delta マウスに C₆₀ を気管内投与し、肺のDNA損傷及び gpt 突然変異の増加を示している。さらに Topinkaら(2004、2006)は、アスベスト (Amosite) 及び人造鉱物繊維 (Rock wool、Glass wool) を BigBlue™ ラットに気管内投与し、肺の *lacI* 突然変異の増加を示している。

カーボンナノチューブ (CNT) の in vitro 遺伝毒性に関しては、哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験において構造異常及び数的異常を誘発するとの報告はあるが、in vitro 突然変異試験においてCNTが突然変異を誘発するとの報告はない。同様に、in vivo 遺伝毒性試験に関しては、Shvedovaら(2008)のSWCNTをマウスに吸入暴露した肺の k-ras 遺伝子に突然変異を誘発するとの報告のみである。

CNTの人への暴露経路は主に経気道によるものと推定されることから、肺に対する毒性影響を調べることは重要である。またCNTのアスベストとの構造類似性によりCNTの肺及び中皮発

がん性が懸念されていることから、CNTの肺における突然変異誘発性を検討することは、そのリスクを評価する上からも重要である。今後、CNTの有効なトランスジェニック動物を用いる in vivo 突然変異試験の試験プロトコールに関する研究、さらに有効な試験方法の開発が必要である。

E. 結論

ナノマテリアルの in vivo 突然変異原性評価方法を検討する目的で、点突然変異及び欠失変異の検出が可能なトランスジェニック動物である gpt delta ラットにMWCNTを気管内投与し、肺での突然変異誘発性を検討したが、現プロトコールではその突然変異誘発性を認めることはできなかった。難溶性のナノマテリアルの主要な標的臓器は肺であるので、in vivo で肺における遺伝毒性を検出する試験系を開発することはその毒性を評価する上で重要である。現在開発されている遺伝毒性を調べるトランスジェニック動物の中でgpt delta 動物は欠失変異を評価できる点からも最も有効な試験系である。さらに gpt delta 動物を用いる in vivo 突然変異試験の肺における評価方法の検討及び新に有効な試験系の開発が必要である。

参考文献

- 1) Illei PB, Rusch VW, Zakowski MF, Ladanyi M. Homozygous deletion of CDKN2A and codeletion of the methylthioadenosine phosphorylase gene in the majority of pleural mesotheliomas. Clin Cancer Res, 9:2108-2113. 2003.
- 2) Nohmi T, Katoh M, Suzuki H, Matsui M, Yamada M, Watanabe M, Suzuki M, Horiya N, Ueda O, Shibuya H, Ikeda H, Sofuni T. A new transgenic mouse mutagenesis test system using Spi- and 6-thioguanine selections. Environ Mol Mutagenesis, 28: 465-470. 1993.

- 3) Hayashi H, Kondo H, Masumura K, Shindo Y, Nohmi T. Novel transgenic rat for in vivo genotoxicity assays using 6-thioguanine and Spi- selections. Environ Mol Mutagenesis, 28:465-470. 1993.

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

野口 忠、上垣外 智之、成見 香瑞範、高島 理恵、濱田 修一、真田 尚和、増村 健一、蓮子 雅之、能美 健彦：gpt delta トランスジェニックラットを用いた遺伝毒性試験の共同研究 3) 亜硫化ニッケルの気管内投与による遺伝毒性評価、2009年、第38回日本環境変異原学会（2009年11月清水市）

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

表 1 試験結果 体重、肺重量変化

群	初回投与後 49 日目解剖			初回投与後 90 日目解剖		
	体重 (g)	肺重量 (g)	肺重量/体重 (%)	体重 (g)	肺重量 (g)	肺重量/体重 (%)
Control 0 $\mu\text{g}/\text{匹} \times 4$	325 \pm 7	1.077 \pm 0.076	0.33 \pm 0.02	361 \pm 15	1.258 \pm 0.054	0.35 \pm 0.01
MWCNT 40 $\mu\text{g}/\text{匹} \times 4$	322 \pm 15	1.268 \pm 0.060**	0.39 \pm 0.01**	356 \pm 24	1.452 \pm 0.127**	0.41 \pm 0.01**
MWCNT 160 $\mu\text{g}/\text{匹} \times 4$	321 \pm 14	1.514 \pm 0.082**	0.47 \pm 0.02**	354 \pm 17	1.630 \pm 0.087**	0.46 \pm 0.02**
Chrysotile 1000 $\mu\text{g}/\text{匹} \times 4$	320 \pm 7	1.321 \pm 0.093**	0.41 \pm 0.03**	358 \pm 19	1.524 \pm 0.080**	0.43 \pm 0.01**

** : p<0.01 (Dunnett's test)、## : p<0.01 (Students' t-test)

表 2 試験結果 肺の gpt 突然変異頻度

群	動物番号	Total Population	Confirmed Mutants	Mutant Frequency ($\times 10^{-6}$)	Average	SD
MWCNT 0 $\mu\text{g}/\text{匹} \times 4$ 初回投与後 49 日目解剖	1004	813,000	1	1.23	1.10	0.13
	1005	2,238,000	2	0.89		
	1006	897,000	1	1.11		
	1007	846,000	1	1.18		
	1008	921,000	1	1.09		
MWCNT 40 $\mu\text{g}/\text{匹} \times 4$ 初回投与後 49 日目解剖	1103	924,000	1	1.08	0.87	0.31
	1105	1,215,000	1	0.82		
	1106	2,193,000	1	0.46		
	1107	789,000	1	1.27		
	1109	1,371,000	1	0.73		
MWCNT 160 $\mu\text{g}/\text{匹} \times 4$ 初回投与後 49 日目解剖	1201	1,179,000	2	1.70	1.52	0.52
	1204	855,000	1	1.17		
	1207	903,000	2	2.21		
	1208	2,424,000	4	1.65		
	1209	1,152,000	1	0.87		
Chrysotile 1000 $\mu\text{g}/\text{匹} \times 4$ 初回投与後 49 日目解剖	1301	1,110,000	1	0.90	1.58	1.45
	1302	882,000	1	1.13		
	1306	483,000	1	2.07		
	1307	786,000	3	3.82		
	1310	774,000	0	0.00		
MWCNT 0 $\mu\text{g}/\text{匹} \times 4$ 初回投与後 90 日目解剖	1001	927,000	2	2.16	1.72	0.96
	1002	1,317,000	1	0.76		
	1003	543,000	1	1.84		
	1009	987,000	3	3.04		
	1010	1,254,000	1	0.80		
MWCNT 40 $\mu\text{g}/\text{匹} \times 4$ 初回投与後 90 日目解剖	1101	438,000	1	2.28	1.42	0.99
	1102	909,000	2	2.20		
	1104	1,239,000	1	0.81		
	1108	1,191,000	0	0.00		
	1110	1,110,000	2	1.80		
MWCNT 160 $\mu\text{g}/\text{匹} \times 4$ 初回投与後 90 日目解剖	1202	519,000	2	3.85	2.10	1.41
	1203	393,000	0	0.00		
	1205	396,000	1	2.53		
	1206	1,230,000	3	2.44		
	1210	1,173,000	2	1.71		
Chrysotile 1000 $\mu\text{g}/\text{匹} \times 4$ 初回投与後 90 日目解剖	1303	810,000	1	1.23	1.66	0.69
	1304	669,000	1	1.49		
	1305	735,000	2	2.72		
	1308	1,050,000	1	0.95		
	1309	1,065,000	2	1.88		

表 3 試験結果 肺の Spi- 変異頻度

群	動物番号	Total Population	Confirmed Mutants	Mutant Frequency ($\times 10^{-6}$)	Average	SD
MWCNT 0 $\mu\text{g}/\text{匹} \times 4$ 初回投与後 49 日目解剖	1004	1,659,000	15	9.04	6.31	2.82
	1005	720,000	2	2.78		
	1006	918,000	4	4.36		
	1007	801,000	5	6.24		
	1008	876,000	8	9.13		
MWCNT 40 $\mu\text{g}/\text{匹} \times 4$ 初回投与後 49 日目解剖	1103	762,000	4	5.25	7.91	1.50
	1105	930,000	8	8.60		
	1106	786,000	7	8.91		
	1107	1,563,000	13	8.32		
	1109	2,358,000	20	8.48		
MWCNT 160 $\mu\text{g}/\text{匹} \times 4$ 初回投与後 49 日目解剖	1201	2,223,000	15	6.75	11.78	10.97
	1204	1,272,000	9	7.08		
	1207	1,365,000	4	2.93		
	1208	2,175,000	25	11.49		
	1209	1,926,000	59	30.63		
Chrysotile 1000 $\mu\text{g}/\text{匹} \times 4$ 初回投与後 49 日目解剖	1301	1,095,000	4	3.65	4.69	2.10
	1302	1,083,000	9	8.31		
	1306	558,000	2	3.58		
	1307	942,000	3	3.18		
	1310	1,059,000	5	4.72		
MWCNT 0 $\mu\text{g}/\text{匹} \times 4$ 初回投与後 90 日目解剖	1001	1,134,000	6	5.29	4.46	1.51
	1002	723,000	3	4.15		
	1003	993,000	4	4.03		
	1009	777,000	5	6.44		
	1010	831,000	2	2.41		
MWCNT 40 $\mu\text{g}/\text{匹} \times 4$ 初回投与後 90 日目解剖	1101	900,000	2	2.22	2.33	1.99
	1102	993,000	0	0.00		
	1104	849,000	1	1.18		
	1108	948,000	5	5.27		
	1110	672,000	2	2.98		
MWCNT 160 $\mu\text{g}/\text{匹} \times 4$ 初回投与後 90 日目解剖	1202	648,000	5	7.72	4.33	2.32
	1203	1,200,000	3	2.50		
	1205	519,000	1	1.93		
	1206	945,000	5	5.29		
	1210	474,000	2	4.22		
Chrysotile 1000 $\mu\text{g}/\text{匹} \times 4$ 初回投与後 90 日目解剖	1303	900,000	2	2.22	3.83	1.37
	1304	771,000	2	2.59		
	1305	870,000	4	4.60		
	1308	939,000	4	4.26		
	1309	1,284,000	7	5.45		

ナノマテリアルの吸入暴露情報に関する調査研究

研究分担者 山本雅也 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 主任研究官

研究協力者 平田睦子 国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター
総合評価研究室 主任研究官

研究要旨

フラーレン及びカーボンナノチューブ、酸化チタンのナノマテリアルの暴露及び吸入毒性に関する公開情報を、収集し、整理した。暴露情報に関しては、測定法の検討が進み、いくつかの労働現場の測定結果が得られた。毒性影響に関しては、従来に比べて長期の吸入暴露試験結果や、肺以外での液性因子を介した免疫系や他の臓器への影響や発がん性のメカニズムに関する研究が報告された。本格的な暴露調査及び慢性影響や毒性メカニズム解明を意図した試験・研究が必要である。

A. 研究目的

産業用ナノマテリアルは、その物理化学的性状が同一化学組成を持つ大きな構造体とは著しく異なり、電気的、光学的、磁氣的、生物学的なその特異な性質から、様々な分野への応用が見込まれている。今後、多方面に利用が拡大し、生産、使用量が増加すると、生産現場のみならず、流通課程、商品等の廃棄により環境経由の暴露などヒト健康への影響が懸念される。しかし、その生体影響に関しては、未知な部分がほとんどある。産業用ナノマテリアルは、気中に拡散し、経気道的に容易に体内に侵入する可能性が高く、ヒトの健康への影響を評価するためには、実験動物にナノマテリアルを吸入暴露させ、その毒性影響を適切に評価する手法を確立することが必要である。そこで、本研究では、リスク評価法としての吸入暴露システムの開発のための適切な吸入暴露条件や毒性評価法等を提言することを目的として、暴露情報と吸入暴露を介した毒性影響に関する情報を収集し、整理した。

B. 研究方法

現時点では暴露情報は、労働現場に限定されているため、産業用ナノマテリアルの職業暴露情報に焦点をあてて、その暴露情報及び気管内投与、咽頭吸引、吸入暴露による毒性発現に関する文献情報等の公開

情報を収集し、整理した。文献検索には Medline を用いた。本年度は、平成 20 年度に行った炭素系ナノマテリアル（フラーレン及びカーボンナノチューブ）及び平成 21 年度に行った金属系ナノマテリアル（酸化チタン）及びその他のナノマテリアルについて、最新情報の検索を行った。

（倫理面への配慮）

本研究は、公表情報を収集し、整理したものであり、倫理面での問題はない。

C. 研究結果

1. 暴露情報

Takayaらは、多層カーボンナノチューブ (Multi-walled Carbon Nanotube: MWCNT)製造工場の袋詰め作業における気中粒子の測定を行った。調査方法は、個人サンプラーによる曝露濃度測定と粒子数と粒径分布をリアルタイムモニタリングする測定器を作業場所近傍に設置し、これと同じ場所で粉じんの質量濃度を測定した。粉じんの質量濃度は、インパクター式分粒装置を用い測定した。リアルタイムモニタリングには、ナノスケール粒子測定には、走査型移動度粒径測定器 (Scanning Mobility Particle Sizer: SMPS)を、サブミクロン・ミクロンスケール粒子の測定に光散乱式粒子計数器 (Optical Particle Counter: OPC)を使用した。環境の質量濃度は、

外気で 0.17 mg/m^3 、手動工程と自動工程はいずれも 0.24 mg/m^3 だった。また、個人サンプラーを用いて測定した作業者の曝露濃度は、手動工程が $2.39/0.39 \text{ mg/m}^3$ (粉じん/吸入性)、自動が $0.29/0.08 \text{ mg/m}^3$

(粉じん/吸入性)であった。また、捕集した粒子中のMWCNT量を、元素状/有機炭素モニター

(EC/OC)を用いて測定したところ、屋外のバックグラウンド濃度は 0.001 mg/m^3 、手動工程の袋詰め作業場近傍では、作業が無いときでも、環境濃度が 0.01 mg/m^3 、曝露濃度が 0.01 mg/m^3 であり、ともに一定量のMWCNTが観察された。手動工程の作業時では、環境濃度は 0.068 mg/m^3 、作業者の曝露濃度は 0.063 mg/m^3 であった。自動工程の作業では、作業者が普段立ち入らない自動製袋機が設置されている部屋の環境濃度が 0.027 mg/m^3 で、個人曝露濃度は 0.009 mg/m^3 と著しく低下していた(Takaya *et al.*)。Leeらは、7つの製造工場などMWCNTを取り扱っている作業現場の暴露アセスメントを行った。空気中のエアロゾルをSMPS等で測定した結果、個人環境エリアと作業環境エリアでそれぞれ $0.0078\text{-}0.3208$ (平均 0.1063) mg/m^3 と $0.0126\text{-}0.1873$ (平均 0.0813) mg/m^3 であり、化学蒸着法によるMWCNTを製造している工場で採取した気体サンプルを、透過型電子顕微鏡(TEM)で解析したところ、MWCNTのチューブ構造が見られた(Lee *et al.* 2010)。

Huangらは、酸化チタン顔料生産工場で、多穴式捕集装置(Multi-orifice Uniform Deposit Impactors: MOUDI)により収拾したサンプルの粒子径は、 $1\text{-}10 \mu\text{m}$ であり、呼吸域粒子濃度と粒子数が最大であったのは、 TiO_2 を梱包する場所近辺であった。金属分析の結果、 TiO_2 の空気中濃度は最大で $0.1738 \mu\text{g/m}^3$ であった(Huang *et al.* 2010)。

2. 吸入暴露による毒性影響に関する情報

2.1 フラーレン (Fullerene: C_{60})

Morimotoらは、 C_{60} (平均粒径: 33 nm)を 0.1% Tween 80 含有蒸留水に懸濁し、 $0.1, 0.2, 1.0 \text{ mg/kg}$ の用量で、雄 Wistar ラットに気管内投与し、投与3日後、1, 3, 6ヶ月後の気管支肺胞洗浄液(BAL)中の炎症反応やサイトカインの遺伝子発現を検討した。その結果、

1.0 mg/kg 気管内投与群のみ好中球の一過性の増加と肺でのCINC-1, $-\alpha\beta$, 3の発現がみられたが、肺の病理組織学所見に変化は見られなかった。また、Wistar ラットに 0.12 mg/m^3 の C_{60} (平均粒径: 96 nm)を4週間(6時間/日、5日/週)吸入暴露させ、3日後、1, 3, 6ヶ月後について同様の検討を行ったものでは、いずれも変化はみられなかった(Morimoto *et al.* 2010)。

Parkらは、 C_{60} (平均粒径: 46.7 nm)をリン酸緩衝生理食塩水(Phosphate Buffered Saline: PBS)に懸濁し、雄 ICR マウスに $0.5, 1, 2 \text{ mg/kg}$ の用量で気管内投与し、1, 7, 14, 28日後のBAL内の細胞周期、サイトカイン濃度、及び血液の免疫検査などを行った。 C_{60} は、BAL細胞のG1休止を増加させ、IL-1、TNF- α 、IL-6などの炎症性サイトカインや、IL-12、IFN- γ などのTh1サイトカインを増加させた。また、血清中のIgE増加やMHC class II分子の発現やT細胞の分布の増加見られた(Park *et al.* 2009)。

Naotaらは、 C_{60} (粒径: 0.68 nm)をPBSに懸濁し、雌 ICR マウスに $625, 1000 \mu\text{g}$ 気管内投与し、肺から血液循環系の移行経路を検討した。 C_{60} は、光学顕微鏡で投与直後に肺毛細管腔及び肺リンパ節に見られた。電子顕微鏡では、I型肺胞上皮細胞と内皮細胞内に様々なサイズの飲小胞の数の増加が認められ、その中には C_{60} を含有したものも見られた。また、様々なサイズの C_{60} が血液-空気関門に見られた(Naota *et al.* 2009)。

2.2 カーボンナノチューブ

単層カーボンナノチューブ (SWCNT)

Chouらは、SWCNTをICRマウスに、 0.5 mg/animal の用量で、気管内投与し、投与3, 14日後の肺の組織学的検査を行った。投与3日後には、マクロファージの浸潤の増加、肺胞領域のSWCNTを取り込んだ泡状マクロファージ形成が見られた。投与14日後には、多病巣性肉芽腫形成が見られた(Chou *et al.* 2008)。

Teeguardenらは、C57BL/6マウスに $40 \mu\text{g}$ のSWCNTとアスベスト(クロシドライト)をカルシウム・マグネシウム不含PBSに懸濁後、週2回、3週間、咽頭吸入し、プロテオミックス、組織学的検査及びBAL中のサイトカインの解析を行い、両者を比

較した。プロテオミックス解析では、SWCNT 暴露とアスベスト暴露による肺組織や炎症に対する反応は似ていたが、炎症と繊維化の頻度と強さなど組織学的検査では、SWCNT 暴露が同質量濃度では作用が大きかった(Teeguarden *et al.* 2010)。

二層カーボンナノチューブ(Double-walled Carbon Nanotube: DWCNT)

Crouzier らは、1.5 mg/kg の DWCNT を雄 Swiss マウスに、気管支内投与し、6, 24, 48 時間後に肺での顕微鏡検査や血液検査を行ったところ、レプチンや IL-6 などの炎症性サイトカインの上昇に伴って、肺での炎症がみられた。また、この時、電子スピン共鳴分光装置で測定したところ、局所的な酸化的ストレスは減少していた(Crouzier *et al.* 2010)。

多層カーボンナノチューブ (MWCNT)

MWCNT の比較的長期(三ヶ月)の吸入暴露試験が2報報告されている。Ma-Hock らは、GLP 遵守の OECD413 に従い、Wistar ラットにブラッシュ発生機によるエアロゾルの MWCNT (0.1, 0.5, 2.5 mg/m³)を6時間/日、5日/週、13週(65日間)頭-鼻部吸入暴露した。0.5, 2.5 mg/m³では、濃度依存的に肺の臓器重量の増加、肺及び肺関連リンパ節で多病巣性肉芽性炎、びまん性組織球・好中球炎症、肺胞内リポ蛋白化みられた。2.5 mg/m³では、わずかな血液の好中球増加を伴っていた。0.1 mg/m³では、肺及び肺関連リンパ節でわずかな肉芽性炎がみられた

((Ma-Hock *et al.* 2009b))。Pauluhn らは Wistar ラットに MWCNT (0.1, 0.4, 1.5, 6 mg/m³)を6時間/日、5日/週、13週鼻部吸入暴露し、BAL 検査と病理組織学的検査を投与後6ヶ月後まで行い、気管支及び全身毒性、肺及び肺リンパ節での MWCNT のキネティックスを検討した。MWCNT のリンパ節への移動には1.5 mg/m³以上の濃度で13週を要し、肺及びリンパ節重量が増加した。0.4 mg/m³以上の MWCNT 暴露では、BAL 中の多形核好中球及び可溶性コラーゲンの増加、病理組織学的検査では、気道に杯状細胞過形成・化生、好酸性杯状細胞、下気道の細気管支-肺胞に炎症変化及びコラーゲン陽性間質の増加などが見られた。6 mg/m³の MWCNT 暴露では肉芽腫形成及び継時的な細気管支-肺胞増生がみられた。

NOAEL は0.1 mg/m³としている(Pauluhn 2010)。

Ryman-Rasmussen らは、吸入暴露による胸膜繊維化と中皮腫の可能性を検討するため、雄 C57BL/6 マウス MWCNT (30 mg/m³)を単回6時間鼻部吸入暴露し、1日、2, 6, 14 週後の肺の組織を観察した。MWCNT は暴露1日後に胸膜下壁に到達し、胸膜下マクロファージ内に存在した。胸膜表面の単核球細胞の凝集塊の数とサイズの増加が暴露1日後にみられ、病巣の中にはナノチューブを取り込んだマクロファージがみられた。胸膜下の繊維化の顕著な増加が暴露2週後と6週後に見られた(Ryman-Rasmussen *et al.* 2009)。

Porter らは C57BL/6J マウスに MWCNT (10, 20, 40 µg)を咽頭吸引し、1, 7, 28, 56 日後の肺への影響を検討した。BAL 中のマーカーの解析により、肺の炎症と損傷は濃度依存的であり、投与7日がピークであることが示された。投与56日まで、最高用量を除いて肺の炎症と損傷は対照群と同様のレベルまで回復した。病理組織学的検査では、MWCNT は投与7日まで肺の繊維化を引き起こし、持続的な肉芽性炎が投与56日までみられた。また、MWCNT は胸膜に到達することが示された(Porter *et al.* 2010)。

Mercer らは、上記の試験について、暴露した MWCNT の分布を検討し、投与1日後、気道、肺胞、胸膜下で、18%、81.4%、0.6%であった。胸膜下組織及び胸膜内へ到達した MWCNT の繊維の数は、投与7日には、投与1日後に比べ肺胞マクロファージやリンパ球による除去のためか減少するが、投与28日から56日後では、増加し定常状態になった(Mercer *et al.* 2010)。

Ellinger-Ziegelbauer らは、Wistar ラットに MWCNT (11, 241 mg/m³)を6時間単回吸入暴露し、3ヶ月後まで BAL 検査と肺の病理組織学的検査、負荷試験及び遺伝子発現解析を行った。肺の炎症は濃度依存的で、時間経過とともに減少した。逆に、陽性対照として暴露したクオーツでは、炎症は時間経過とともに増悪した。MWCNT による炎症の時間経過は、不純物として含有するコバルトの量に寄らなかった(Ellinger-Ziegelbauer & Pauluhn 2009)。

Kobayashi らは、Sprague Dawley (SD) ラットに

MWCNT (0.04, 0.2, 1 mg/kg)を気管内投与し、3日、1週、1, 3, 6ヶ月後のBAL検査と肺、肝臓、腎臓、脾臓、大脳の病理組織学的検査を行った。1 mg/kg投与群のみで肺の一時的な炎症が見られた。肺に沈着したMWCNTは、肺胞マクロファージに貪食され、暴露6ヶ月後までにマクロファージは気泡に集積した。TEM解析によるとMWCNTは肺胞マクロファージと間質のマクロファージ内に存在し、間質組織には存在しなかった。また、血管新生や繊維化などは見られなかった (Kobayashi *et al.* 2010)。

Kimらは、雄C57BL/Cマウスに気管支内投与で無処理のMWCNTと酸処理したMWCNTそれぞれ (0.01, 0.1 mg/animal)を生理食塩水に懸濁後、気管支内投与し、24時間後、1, 2週間後、3, 4ヶ月後に解剖した。BAL検査では、無処理のMWCNTが酸処理したものに比べ、より強い急性炎症細胞の集積を誘導した。肺の病理組織学検査では、濃度依存的な多病巣炎症肉芽腫がみられたが可逆的であり、酸処理MWCNTによる肉芽腫は無処理MWCNTによるものに比べて、早く回復した。時間経過と共に、肉芽腫の領域は減少したが、過形成や有糸分裂像、核大小不同、赤血球大小不同のような形成異常が依然見られた (Kim *et al.* 2010)。

Aisoらは、雄F344ラットにMWCNT (40, 160 mg)をPBS-Tween 80に懸濁後、気管支内投与し、1, 7, 28, 91日後に解剖し、BAL検査及び肺の病理組織学検査を行った。肺重量、BAL中の総蛋白、アルブミン、乳酸脱水素酵素、アルカリホスファターゼ、炎症に伴う肺病変、II型肺胞上皮細胞増生、小肉芽腫、繊維化が時間及び濃度依存的に見られ、MWCNTによる肺病変は投与91日後も保持された。貪食及びフリーのMWCNTは細気管及び肺胞に存在した。気管支のリンパ節中へのMWCNT沈着は投与後徐々に増加した。持続したマクロファージの浸潤、主に好中球による細胞炎症の浸潤、MWCNTを貪食マクロファージに関連した小肉芽腫、肺胞肥厚を伴う肺胞II型肺胞上皮細胞増生と繊維化、多核肺胞マクロファージの数が濃度依存的に上昇した (Aiso *et al.* 2010)。

Hanらは、雌C57BL/6マウスにMWCNT (20, 40 mg)をPBSに懸濁後、気管支内投与し、1, 7日後に解剖し、BAL、血液及び肺組織について炎症と酸化

的ストレスマーカーの検討を行った。投与1, 7日後のBAL中の総細胞数と多形核白血球数の増加が見られた。投与1日後では顕著な増加を見せた多くの炎症マーカーが、投与7日後には対照群と同じレベルに減少したが、MUC-5ac ムチンと Surfactant protein-D (SP-D)は、増加がしたままであった。また、尿中の8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシンのレベルは上昇しており、全身性の酸化的ストレスが示唆された。ウェスタン分析では、細胞外スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)は減少していたが、銅/亜鉛及びマンガン SOD は変化しなかった (Han *et al.* 2010)。

Elgrabliらは、MWCNT中に含まれるニッケルを指標に、MWCNTの体内動態を調べた。雄SDラットにウシ血清アルブミンを用いて分散させたMWCNT (1, 10, 100 µg/animal, 凝集体の80%が10 µm未満)を気管内投与した結果、MWCNTは顕著に肺領域 (pulmonary barrier)を超えず、肺内に留まり、数は減るが6ヶ月後には残存が確認された。その時、MWCNTは化学的修飾を受け、短くなっていた。また、その際、周囲に炎症性細胞は観察されなかった ((Elgrabli *et al.* 2008))。

Mitchellらは免疫抑制のメカニズムを検討した。C57BL/6マウスにMWCNT (0.3, 1.0 mg/m³)を6時間/日、14日間吸入チャンバーで全身暴露した。T細胞依存性の抗体反応など免疫抑制が見られる1.0 mg/m³のMWCNT暴露の脾臓では、シクロオキシゲナーゼ活性が上昇していた。シクロオキシゲナーゼ阻害剤イブプロフェンを飲ませたマウスでは、MWCNT暴露による免疫機能の抑制は、部分的に回復した。また、シクロオキシゲナーゼCox-2のノックアウトマウスでは、MWCNTを暴露しても免疫抑制は見られなかった。暴露動物のBAL由来のタンパク質を添加すると、無処置動物の脾臓細胞の抗体産生やT細胞増殖が抑制されたが、Cox-2 ノックアウトマウスにMWCNTを暴露した動物のBAL由来のものでは抑制されなかった。暴露動物のBAL由来のタンパク質による脾臓細胞の免疫細胞の抑制は、抗TGF-β抗体で阻害された。またMWCNT暴露によりBAL中のTGF-β濃度が上昇した。無処置の脾臓細胞

胞を BAL 由来のタンパク質で 24 時間処理すると TGF- β 処理と同様に、プロスタグランジン E2 や IL-10 が浮遊細胞液中に分泌され、その分泌は抗 TGF- β 抗体で阻害された。著者らは、MWCNT 暴露により肺から分泌された TGF- β が、脾臓のシクロオキシゲナーゼ系を活性化することにより、プロスタグランジンや IL-10 の産生を引き起こし、結果として T 細胞不全や全身の免疫機能に影響を与えたと推測している (Mitchell *et al.* 2009)。

2.3 酸化チタン (TiO₂)

Ma-Hock らは、雄 Wistar ラットに TiO₂ (rutile:14%, anatase:86%, 直径 25.1 nm) のエアロゾルを 2, 10, 50 mg/m³ の濃度で、6 時間/日、5 日間暴露し、暴露 0 日、3 日及び 16 日後に解剖した。50 mg/m³ 暴露群で肺重量の増加がみられた。肺の炎症に伴って、BAL 中の総細胞数、好中球数、総蛋白量、酵素活性及び炎症マーカーの発現の上昇みられた。全ての TiO₂ 暴露群で、気管支における 5-ブロモ-2'-デオキシウリジンの取り込みによる細胞複製は増加していた (Ma-Hock *et al.* 2009a)。

Kobayashi らは、同工場で、同製造法で作られ、同じ結晶構造の TiO₂ を用いて、粒径の相違と凝集状態の影響に着目した 2 つの実験を行った。まず、雄 SD ラットにいずれも anatase 型の ultrafine TiO₂ (4.9 nm)、semifine TiO₂ (23.4 nm) もしくは fine TiO₂ (154.2 nm) をそれぞれ 5 mg/kg の用量で、気管内投与し、1, 3, 7, 28 日後に BAL 検査と病理組織学的検査を行った。肺の炎症は、投与 7 日後までは、小さい粒径がより強かったが、その後は、肺の炎症は回復傾向を示し、差はなくなった。また、上記の ultrafine TiO₂ (anatase 型、4.9 nm) について、懸濁液を調整することで、分散後の濃度を、2, 3.4, 13 mg/mL の TiO₂ 懸濁液を作成し、同様の実験を行ったところ、肺の炎症はみられたが、凝集状態の違いにより差はみられなかった (Kobayashi *et al.* 2009)。

Rossi らは、BALB/c マウスに TiO₂ (ニードル型 rutile、10 X 40 nm、SiO₂ コーティング) のエアロゾルを 10 mg/m³ の濃度で、2 時間、2 時間/日で 4 日連続、2 時間/日で 4 日連続かつ 4 週間、それぞれ全身吸入暴露した。BAL 中の TNF- α と CXCL1 の上昇と

肺の炎症が見られ、ほとんどの TiO₂ は、肺胞マクロファージ内に存在した。同様の実験で、粗 TiO₂ (rutile 型、4 μ m)、TiO₂ (rutile: anatase=9:1、30 nm)、TiO₂ (anatase 型、25 nm)、SiO₂ (amorphous 型、10 nm) の暴露では、肺の炎症等の反応は起こらなかった (Rossi *et al.* 2010)。

Xu らは、ラットの肺に肺内噴射によるイニシエーション-プロモーション法 (IPS) により TiO₂ の発がん性を検討した。雌 c-Ha-ras トランスジェニックラットにジイソプロパノールニトロソアミン (DHPN) を飲水で投与し、その後 TiO₂ (rutile 型、直径 20 nm、コーティングなし) を IPS にて暴露した。DHPN 誘発の肺胞細胞過形成・肺腺腫の多重性が顕著に増加した。TiO₂ の凝集体はもっぱら肺胞マクロファージ内に局在し、直径 107.4 nm だった。また、同時に、肺腺腫の多重性と重量が増加した。そこで、野生型ラットに 9 日間に 5 回 IPS にて TiO₂ を暴露したところ、肺での、8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシン濃度、SOD 活性、マクロファージ炎症性タンパク質 1 α (MIP-1 α) 発現が顕著に増加した。MIP-1 α は、TiO₂ を取り込んだ肺胞マクロファージの細胞質及び TiO₂ を処理したラットの *in vitro* 肺胞初期培養細胞の培養液及び TiO₂ を暴露した Hras128 ラットの血清と肺腺腫でも検出された。また、MIP-1 α は、ヒト肺がん細胞株及びラット乳腺腫細胞株の増殖を促進した。これらのことは、TiO₂ を取り込んだ肺胞マクロファージから分泌される MIP-1 α が肺胞・乳腺の細胞増殖を引き起こすことを示しており、著者らは、TiO₂ の発がんプロモーション効果は局所的な肺胞内だけでなく、MIP-1 α が循環系を介して移動の後、離れた乳腺でも作用する可能性があると考えた (Xu *et al.* 2010)。

Hougaard らは、TiO₂ の胎生期暴露と神経行動系への影響を検討した。C57BL/6 の妊娠マウスにポリアルコールコート TiO₂ (rutile 型、21 nm) を 42 mg/m³ のエアロゾルパウダー (1.7 X 10⁶ m/cm³、ピークサイズ: 97 nm) で 1 時間/日で胎生 8-18 日全身吸入暴露した。暴露された親動物は、暴露 5 日後の肺に 38 mg Ti/kg が検出され、暴露 5 及び 26-27 日後の BAL 中の好中球は増加し、肺での炎症が示された。胎生

期に暴露された胎児は、幼若期の神経行動試験で、オープンフィールドで中心部を避ける傾向がみられ、雌は、プレパルス抑制の増強が見られた。しかし、認識機能試験では、影響は見られなかった (Hougaard *et al.* 2010)。

Scuri らは、離乳期 (2 週齢) 及び新生児 (2 日齢) のラットに TiO_2 を 12 mg/m^3 のエアロゾルパウダー (ピークサイズ: 100 nm) で 3 日間 (5.6 時間/日) 全身吸入暴露し、神経発達や気道知覚神経の反応に重要な神経成長因子 (NGF) や脳由来神経栄養因子 (BDNF) などの神経栄養因子が肺で上昇することを見いだした。しかし、成熟動物 (12 週齢) の暴露では同様の変化はみられなかった (Scuri *et al.* 2010)。

D. 考察

ナノマテリアルに関する情報は、生産量や使用量を反映して、フラーレン、カーボンナノチューブ及び酸化チタンに関するものが多数報告されている。このため、本研究では、それらの物質について、暴露情報として、職業暴露情報に焦点を当てて、暴露及び吸入暴露を介した毒性影響に関する公開情報を収集し、整理を行った。

暴露に関しては、最近、労働現場のアセスメントのために、生産や使用過程で放出されるナノマテリアルについて、検出、測定、分析などの方法が検討されている。測定の際は、粒子濃度、粒子数など複数の指標について計測を行い、バックグラウンドレベルを考慮して、検出されたものが予想されたナノマテリアルかあるいは副産物かなどを含め、凝集状態などを TEM 等で形態的に確認する作業が必要である。Methner らは、米国の国立労働安全衛生研究所 (NIOSH) が提唱している方法での 12 箇所のナノマテリアルを取り扱う工場や研究所での現地調査結果を報告している。MWCNT を取り扱う研究所で、換気装置を作動させない環境でのフード内での MWCNT の重量測定作業や超音波処理作業の際のエアロゾル濃度の測定を行い、CPC での $10\text{-}1000 \text{ nm}$ 粒子濃度や OPC での $300\text{-}500 \text{ nm}$ 及び $500\text{-}1000 \text{ nm}$ の濃度上昇と、TEM での MWCNT の存在を確認した (Methner *et al.* 2010)。これに関連して、Johnson らは、

C_{60} と MWCNT について、詳細な条件で超音波によるナノマテリアルの水への溶解作業の際の換気装置ないフード内のエアゾロへの MWCNT の移行を粒子濃度測定と TEM 解析で示しており、作業現場でのナノマテリアルの超音波による溶解反応の際の注意を喚起している (Johnson *et al.* 2010)。

吸入暴露を介した毒性影響に関しては、近年、*in vivo* 試験の結果が蓄積されつつある。これらの研究では、気道内投与や咽頭吸引試験に加え、エアロゾルへの鼻部/全身暴露の結果が公表されてきている。フラーレンに関しては、投与/暴露後、一過性の炎症反応が見られてものの、肺の病理組織への報告はなかった。カーボンナノチューブに関する試験では、投与/暴露後、比較的初期から、肺に肉芽腫性変化や繊維性変化がみられた。酸化チタンに関しては、多くの試験で、肺の炎症、好中球の浸潤、貪食マクロファージの蓄積がみられた。最近の研究では、従来に比べて長期 (90 日間) のカーボンナノチューブの吸入暴露試験結果や、投与部位 (肺) 以外での液性因子を介した免疫系や他の臓器への影響や発がん性のメカニズムに関する研究が報告されてきている。このため、今後、発がん性、発生や神経への影響なども含めナノマテリアルについて、総合的な毒性メカニズムの解明を意図した試験・研究が必要である。

Takag らは、 p53 ヘテロ欠損 ($\text{p53}^{+/-}$) マウスに MWCNT を単回腹腔内投与し中皮腫が起こることを示した (Takagi *et al.* 2008)。遺伝子組み換えを行っていない野生型 F344 ラットに MWCNT を単回陰嚢腔内投与した試験においても、腹腔内に中皮腫 (Takaya *et al.* 2010) が観察された (Sakamoto *et al.* 2009)。また、Poland らは、長さの異なる 4 種類の MWCNT を単回腹腔内投与し 7 日後の中皮細胞の増殖性を検討し、長いタイプの 2 種類について腹腔側に CNT を取り込んだ群でのみ肉芽が形成されることを見いだした (Poland *et al.* 2008)。今回、2 つのグループにより吸入暴露による MWCNT の胸膜への到達が示された。今後、吸入暴露による、カーボンナノチューブの中皮腫誘発作用を含めた慢性的な影響を検討することが必要である。

E. 結論

暴露情報及び吸入暴露を介した毒性影響に関する公開情報を収集し、整理した。その結果、暴露に関しては、測定法の検討が進み、いくつかの労働現場の測定結果が得られたが、その数は限られていた。一方、毒性影響に関しては、最近の研究では、従来に比べて長期（90日間）のカーボンナノチューブの吸入暴露試験結果や、投与部位（肺）以外での液性因子を介した免疫系や他の臓器への影響や発がん性のメカニズムに関する研究が報告されてきている。ナノマテリアルの吸入毒性には、粒子の形状や大きさ、分散状態等が重要な役割を果たしている。粒子の詳細な測定を含む本格的な暴露調査及び毒性メカニズム解明を意図した試験・研究が必要である。また、発がん性を含めた慢性的な影響を検討することも重要である。

参考論文

- Aiso S, Yamazaki K, Umeda Y, Asakura M, Takaya M, Toya T, Koda S, Nagano K, Arito H, Fukushima S (2010). Pulmonary Toxicity of Intratracheally Instilled Multiwall Carbon Nanotubes in Male Fischer 344 Rats. *Ind Health*.
- Chou CC, Hsiao HY, Hong QS, Chen CH, Peng YW, Chen HW, Yang PC (2008). Single-walled carbon nanotubes can induce pulmonary injury in mouse model. *Nano Lett*. **8**, 437-445.
- Crouzier D, Follot S, Gentilhomme E, Flahaut E, Arnaud R, Dabouis V, Castellarin C, Debouzy JC (2010). Carbon nanotubes induce inflammation but decrease the production of reactive oxygen species in lung. *Toxicology*. **272**, 39-45.
- Elgrabli D, Floriani M, Abella-Gallart S, Meunier L, Gamez C, Delalain P, Rogerieux F, Boczkowski J, Lacroix G (2008). Biodistribution and clearance of instilled carbon nanotubes in rat lung. *Part Fibre Toxicol*. **5**, 20.
- Ellinger-Ziegelbauer H, Pauluhn J (2009). Pulmonary toxicity of multi-walled carbon nanotubes (Baytubes) relative to alpha-quartz following a single 6h inhalation exposure of rats and a 3 months post-exposure period. *Toxicology*. **266**, 16-29.
- Han SG, Andrews R, Gairola CG (2010). Acute pulmonary response of mice to multi-wall carbon nanotubes. *Inhal Toxicol*. **22**, 340-347.
- Hougaard KS, Jackson P, Jensen KA, Sloth JJ, Loschner K, Larsen EH, Birkedal RK, Vibenholt A, Boisen AM, Wallin H, Vogel U (2010). Effects of prenatal exposure to surface-coated nanosized titanium dioxide (UV-Titan). A study in mice. *Part Fibre Toxicol*. **7**, 16.
- Huang CH, Tai CY, Huang CY, Tsai CJ, Chen CW, Chang CP, Shih TS (2010). Measurements of respirable dust and nanoparticle concentrations in a titanium dioxide pigment production factory. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*. **45**, 1227-1233.
- Johnson DR, Methner MM, Kennedy AJ, Steevens JA (2010). Potential for occupational exposure to engineered carbon-based nanomaterials in environmental laboratory studies. *Environ Health Perspect*. **118**, 49-54.
- Kim JE, Lim HT, Minai-Tehrani A, Kwon JT, Shin JY, Woo CG, Choi M, Baek J, Jeong DH, Ha YC, Chae CH, Song KS, Ahn KH, Lee JH, Sung HJ, Yu IJ, Beck GR, Jr., Cho MH (2010). Toxicity and clearance of intratracheally administered multiwalled carbon nanotubes from murine lung. *J Toxicol Environ Health A*. **73**, 1530-1543.
- Kobayashi N, Naya M, Ema M, Endoh S, Maru J, Mizuno K, Nakanishi J (2010). Biological response and morphological assessment of individually dispersed multi-wall carbon nanotubes in the lung after intratracheal instillation in rats. *Toxicology*. **276**, 143-153.
- Kobayashi N, Naya M, Endoh S, Maru J, Yamamoto K, Nakanishi J (2009). Comparative pulmonary toxicity study of nano-TiO₂ particles of different sizes and agglomerations in rats: different short-

- and long-term post-instillation results. *Toxicology*. **264**, 110-118.
- Lee JH, Lee SB, Bae GN, Jeon KS, Yoon JU, Ji JH, Sung JH, Lee BG, Yang JS, Kim HY, Kang CS , Yu IJ (2010). Exposure assessment of carbon nanotube manufacturing workplaces. *Inhal Toxicol*. **22**, 369-381.
- Ma-Hock L, Burkhardt S, Strauss V, Gamer AO, Wiench K, van Ravenzwaay B , Landsiedel R (2009a). Development of a short-term inhalation test in the rat using nano-titanium dioxide as a model substance. *Inhal Toxicol*. **21**, 102-118.
- Ma-Hock L, Treumann S, Strauss V, Brill S, Luiz F, Mertler M, Wiench K, Gamer AO, van Ravenzwaay B , Landsiedel R (2009b). Inhalation toxicity of multiwall carbon nanotubes in rats exposed for 3 months. *Toxicol Sci*. **112**, 468-481.
- Mercer RR, Hubbs AF, Scabilloni JF, Wang L, Battelli LA, Schwegler-Berry D, Castranova V , Porter DW (2010). Distribution and persistence of pleural penetrations by multi-walled carbon nanotubes. *Part Fibre Toxicol*. **7**, 28.
- Methner M, Hodson L, Dames A , Geraci C (2010). Nanoparticle Emission Assessment Technique (NEAT) for the identification and measurement of potential inhalation exposure to engineered nanomaterials--Part B: Results from 12 field studies. *J Occup Environ Hyg*. **7**, 163-176.
- Mitchell LA, Lauer FT, Burchiel SW , McDonald JD (2009). Mechanisms for how inhaled multiwalled carbon nanotubes suppress systemic immune function in mice. *Nat Nanotechnol*. **4**, 451-456.
- Morimoto Y, Hirohashi M, Ogami A, Oyabu T, Myojo T, Nishi K, Kadoya C, Todoroki M, Yamamoto M, Murakami M, Shimada M, Wang WN, Yamamoto K, Fujita K, Endoh S, Uchida K, Shinohara N, Nakanishi J , Tanaka I (2010). Inflammogenic effect of well-characterized fullerenes in inhalation and intratracheal instillation studies. *Part Fibre Toxicol*. **7**, 4.
- Naota M, Shimada A, Morita T, Inoue K , Takano H (2009). Translocation pathway of the intratracheally instilled C60 fullerene from the lung into the blood circulation in the mouse: possible association of diffusion and caveolae-mediated pinocytosis. *Toxicol Pathol*. **37**, 456-462.
- Park EJ, Cho WS, Jeong J, Yi J, Choi K , Park K (2009). Pro-inflammatory and potential allergic responses resulting from B cell activation in mice treated with multi-walled carbon nanotubes by intratracheal instillation. *Toxicology*. **259**, 113-121.
- Pauluhn J (2010). Subchronic 13-week inhalation exposure of rats to multiwalled carbon nanotubes: toxic effects are determined by density of agglomerate structures, not fibrillar structures. *Toxicol Sci*. **113**, 226-242.
- Poland CA, Duffin R, Kinloch I, Maynard A, Wallace WA, Seaton A, Stone V, Brown S, Macnee W , Donaldson K (2008). Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. *Nat Nanotechnol*. **3**, 423-428.
- Porter DW, Hubbs AF, Mercer RR, Wu N, Wolfarth MG, Sriram K, Leonard S, Battelli L, Schwegler-Berry D, Friend S, Andrew M, Chen BT, Tsuruoka S, Endo M , Castranova V (2010). Mouse pulmonary dose- and time course-responses induced by exposure to multi-walled carbon nanotubes. *Toxicology*. **269**, 136-147.
- Rossi EM, Pylkkanen L, Koivisto AJ, Vippola M, Jensen KA, Miettinen M, Sirola K, Nykasenoja H, Karisola P, Stjernvall T, Vanhala E, Kiilunen M, Pasanen P, Mäkinen M, Hameri K, Joutsensaari J, Tuomi T, Jokiniemi J, Wolff H, Savolainen K, Matikainen S , Alenius H (2010). Airway exposure to silica-coated TiO₂ nanoparticles induces pulmonary neutrophilia in mice. *Toxicol Sci*. **113**, 422-433.
- Ryman-Rasmussen JP, Cesta MF, Brody AR, Shipley-Phillips JK, Everitt JI, Tewksbury EW,

Moss OR, Wong BA, Dodd DE, Andersen ME , Bonner JC (2009). Inhaled carbon nanotubes reach the subpleural tissue in mice. *Nat Nanotechnol.* **4**, 747-751.

Sakamoto Y, Nakae D, Fukumori N, Tayama K, Maekawa A, Imai K, Hirose A, Nishimura T, Ohashi N , Ogata A (2009). Induction of mesothelioma by a single intrascrotal administration of multi-wall carbon nanotube in intact male Fischer 344 rats. *J Toxicol Sci.* **34**, 65-76.

Scuri M, Chen BT, Castranova V, Reynolds JS, Johnson VJ, Samsell L, Walton C , Piedimonte G (2010). Effects of titanium dioxide nanoparticle exposure on neuroimmune responses in rat airways. *J Toxicol Environ Health A.* **73**, 1353-1369.

Takagi A, Hirose A, Nishimura T, Fukumori N, Ogata A, Ohashi N, Kitajima S , Kanno J (2008). Induction of mesothelioma in p53+/- mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube. *J Toxicol Sci.* **33**, 105-116.

Takaya M, Serita F, Ono-Ogasawara M, Shinohara Y, Saito H , Koda S (2010). [Airborne particles in a multi-wall carbon nanotube production plant: observation of particle emission and personal exposure 1: Measurement in the packing process]. *Sangyo Eiseigaku Zasshi.* **52**, 182-188.

Teeguarden JG, Webb-Robertson BJ, Waters K, Murray A, Kisin E, Varnum SM, Jacobs J, Pounds JG, Zanger R , Shvedova A (2010). Comparative Proteomics and Pulmonary Toxicity of Instilled Single Walled Carbon Nanotubes, Crocidolite Asbestos and Ultrafine Carbon Black in Mice. *Toxicol Sci.*

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.

F. 健康危惧情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍 なし

2) 雑誌 なし

2. 学会発表

山本雅也、化審法ガイドラインの主な変更点とその背景、第20回生殖・発生毒性学東京セミナー（2011年3月、東京）

H. 知的財産所有権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

