

201133008B

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～23 年度

総合研究報告書

研究代表者 広瀬 明彦

国立医薬品食品衛生研究所

平成 24 年 (2012 年) 3 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～23年度 総合研究報告書
研究代表者 広瀬 明彦

平成24年（2012年）3月

目 次

I. 総合研究報告書	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、菅野 純、津田 洋幸、西村 哲治、本間 正充、樋野 興夫、 佐藤 薫、奥 直人、最上 知子、宮澤 薫一	2
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	17
III. 研究成果の刊行物・別冊	21

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

I. 総合研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

総合研究報告書（平成21年度～平成23年度）

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（H21-化学-一般-008）

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高まっていることを受け、ナノマテリアル曝露による重要な健康上の懸念材料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 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。

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、皮膚感作性試験、遺伝毒性試験を行うと共に、近年報告されているナノマテリアルの胎児移行を念頭に発生毒性に関する検討、慢性影響が懸念されるカーボンナノチューブ(CNT)等の繊維状粒子のマクロファージや神経系細胞を用いた試験系、リポソームを用いた膜透過性試験法に関する検討を行った。

その結果、慢性影響研究では、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、腫瘍マーカーであるメソセリンを検出するマウスELISA系の開発とその有効性を検証した。また、中皮腫誘発能の繊維長依存性を検討するために、焼結型のフラーレン(C60)ナノウイスカ(FNW)を作成し、単回腹腔内投与による一年間の慢性試験を行った。一方、C60の腹腔内投与による病理学的腎障害については、メチルセルロースとの複合作用によるものである可能性が示された。既報の単層CNT(SWCNT)による動脈硬化促進作用はMWCNTにおいては再現されず、MWCNTと酸化亜鉛による明確な肺発がんプロモーション作用も認められなかったが、*in vitro* 検証実験ではMWCNTとマクロファージの培養上清に肺胞上皮系細胞の増殖活性のあることを確認した。一方、アナターゼ型の酸化チタンの肺胞マクロファージを介する炎症作用はルチル型より弱いことが示された。

基礎的有害性情報の収集に関しては、OECDのスponsorシッププログラムに対して、2種のMWCNT(Mistui及びNikkiso)、1種のSWCNTおよびC60について、OECDテストガイドラインに基づく皮膚刺激性試験と皮膚感作性試験を行い、すべての試験で陰性の結果を得た。発生毒性に関しては妊娠マウスへのMWCNTの単回腹腔内投与および単回気管内投与によって催奇性を示すことを明らかにしたが、妊娠マウス及びラットへの単回静脈内投与において外表奇形は認められなかった。体内動態解析手法向上に関する研究では、C60検出感度の向上と、二酸化C60の測定法を確立した。この手法を用いたC60の体内動態解析では、腎臓と脳での減少の速度が顕著であることを明らかにした。*In vitro* 遺伝毒性試験においてC60は陰性結果を示したが、比較的外径の大きいMWCNTで染色体倍数性の誘発能のあることが観察された。*In vivo* 遺伝毒性試験ではC60およびMWCNTともに陰性の結果であった。また、CNT懸濁液の超音波処理上清には、溶出金属による細胞障害性のあること、MWCNT曝露マクロファージではNLRP3の活性化を介した細胞内炎症性サイトカインIL-18の産生を亢進することが示された。一方、カルセイン封入リポソームを用いた膜透過性試験により、CNT曝露により物理的に細胞膜障害を測定できる可能性が示された。

慢性研究では繊維の長さ依存する中皮腫誘発性の検証を行えたが、その他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。*in vitro* 研究では、MWCNTに含まれている触媒金属による影響の違いが認められたが、粒子サイズに依存して染色体異常や細胞障害性、サイトカイン放出を伴う炎症性などの反応性に違いが認められることも明らかとなった。これら反応が慢性化することが*in vivo* 慢性影響の発現に重要であることが示唆された。

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 津田特任教授研究室 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 先端材料プロセスユニット フラーレン工学グループ グループリーダー

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
高橋 祐次 国立医薬品食品衛生研究所毒性部 主任研究官
酒々井 眞澄 名古屋市立大学大学院医学研究科 分子毒性学分野 教授
二口 充 名古屋市立大学大学院医学研究科 分子毒性学分野 准教授
深町 勝巳 名古屋市立大学大学院医学研究科 分子毒性学分野 助教
徐 結荷 名古屋市立大学大学院医学研究科 分子毒性学分野 研究員

David B. Alexander

名古屋市立大学大学院医学研究科 分子毒性学分野 研究員・非常勤講師

小縣 昭夫 東京都健康安全研究センター環境保健部 部長
坂本 義光 東京都健康安全研究センター 環境保健部 主任

前野 智和 東京都健康安全研究センター 環境保健部 主任
藤谷 知子 東京都健康安全研究センター 環境保健部 主任
中江 大 東京都健康安全研究センター 医薬品部長
杉本 直樹 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 室長
久保田領志 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 研究官
小林 憲弘 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 研究員
清水久美子 国立医薬品食品衛生研究所生活衛生化学部 非常勤職員
堀端 克良 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部
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 機能生化学部 主任研究官
加藤 良栄 独立行政法人物質・材料研究機構先端材料プロセスユニット フラーレン工学グループ NIMS 研究員
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 主任研究員
松本 真理子 国立医薬品食品衛生研究所 総合評価研究室 研究員
加藤 日奈 国立医薬品食品衛生研究所 総合評価研究室 研究員

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。本件に関しては、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OECDにおいて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(スポンサーシッププログラム)が進められている。

我々は、既に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、カーボンナノチューブ(CNT)やフラーレン(C60)、酸化チタン(TiO₂)体内動態解析法や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、多層CNT(MWCNT)が繊維状粒子の吸入影響として懸念される中皮腫形成のポテンシャルを持つことと、体内で再分散した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、国内外では短期的な影響を調べた報告例は増えてきているが、慢性的影響を直接検討した報告はまだ少ない。

本研究ではこれまでの基盤的研究成果を用いて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有害性影響の検索を行う。さらに、短期的試験法やスクリーニング系への適用を目的として、適切なエンドポイントを評価するための基礎的な研究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と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や基礎的な有害性情報(体内動態を含む)の収集を目的として以下の項目について研究を行った。使用したCNTは、MWCNTとしては、MWNT-7(MWCNT(M)、長さ1-9 μ m 74.3%、>10 μ m 25%、径50-80nm 97.2%)、

N社(MWCNT(N)、長さ1-9 μ m 79.1%、>10 μ m 21%、径50-80nm 94.8%)、W社(2種;MWCNT(WL)、長さ0.5-10 μ m、径85-200nm)及びMWCNT(WS)(長さ0.5-2 μ m、径40-70nm)及びT社(CNT(T)、長さ10-100 μ m、径20-100nm)を、SWCNTとしてはN社のSWCNT(N)を用いた。

慢性影響評価のための検討:

MWCNT(M)による中皮腫誘発能の用量反応性を明らかにするため、MWCNTを0.3、0.03または0.003mg/animalの用量でそれぞれ単回腹腔内投与した雄p53(+/-)マウス(一群20匹)の1年間発がん性試験を実施した。繊維状物質のaspect ratioの差が悪性中皮腫誘発へ及ぼす影響を明らかにすることを目的に、純粋な炭素からなり、長さの異なる非晶質炭素フラーレンナノウィスカー(FNW-long(FNW-L)及びFNW-short(FNW-S))を雄p53(+/-)マウス(一群20匹)に単回腹腔内投与し、1年間の発がん性試験を実施した。投与用量は線維数として各群とも 3×10^7 本/animalとし、陽性対照群にはMWCNTを用いた(菅野)。このFNWは純粋に炭素のみからなる物質であるため、触媒金属を含むカーボンナノチューブとは異なり、カーボンナノファイバーの生体影響評価を行うためのモデル物質として適している。FNWは、C60の良溶媒飽和溶液と貧溶媒とを用いた液-液界面析出法(LLIP法)によって合成し、さらに難分解性とするため、真空高温熱処理によりFNWを非晶質炭素から構成されるナノファイバーとして上記の実験に供した。また、さらなるFNWの難分解性付与のための基礎実験として、ラマンレーザー光源(波長532nm)を用いてC60分子の光重合実験を行った。C60の化学結合の変化に敏感なAg(2)ピークのラマンシフトを指標として、重合が完了するのに必要なエネルギー量を求めた。(宮澤)。

ヒト中皮腫マーカーとしてERC/Mesothelin分子に着目し、ヒト、ラットでERC ELISA系の開発を進めている。ERCタンパク質は種間の相同性が低く、ラットELISAはラットのみ、ヒトELISAはヒトのみにしか適用されない。そこで、マウスELISA測定キットの開

発と実用化と MWCNT(M)腹腔内投与による中皮腫担癌ラットの血液測定を行った(樋野)。F344 DuCrIj 12 週齢雄ラットに、MWCNT(M)を陰嚢腔または腹腔内に単回投与し、52 週間を目処に中皮腫の発現を観察した。血清中のメソテリン濃度測定は、ELISA 法により行った。病理組織学的観察は、常法により H&E 染色及びメソテリン免疫染色を施し行った。また、2%CMC に懸濁した 5 種の MWCNT を、1 mg/kg 体重の用量で F344 ラット(雄、10 週齢)の腹腔内に単回投与し、中皮腫誘発性における物理化学的性状の影響を検討した(西村)。

長期間の体内滞留性に関する影響に関しては、多層 CNT(MWCNT)を肺サーファクタント脂質成分(ホスファチジルコリン/ホスファチジルグリセロール=2:1)を用いて分散し、動脈硬化モデルであるアポ E K0 マウス(高脂肪・高コレステロール食負荷)に気管内投与(375 μ g/25 μ L)を 4 回行い、8 週間後に大動脈の動脈硬化病変形成への影響を調べた(最上)。

フラーレン(C60)による腎障害誘発能を明らかにするため、3mg/animal の用量にて単回腹腔内投与した C57BL/6Cr マウス(一群 20 匹)の 1 年間慢性毒性試験を実施し、その腎障害誘発能について検討した。

発がんプロモーション作用に関しては、①雌ヒトプロト型 c-Ha-ras 遺伝子トランスジェニックラット(SD 系統由来、6週齢、乳腺発がん高感受性、肺発がん感受性は野生型と同じ)を用いた。肺発がん物質 DHPN の2週後より、nZnO(d=35nm)を 250 および 500 μ g/ml の濃度にて2週に1回の割合で 16 週まで気管内噴霧投与し、肺腫瘍性病変を観察した。②ナノ酸化亜鉛 nZnO およびアナターゼ型ナノ酸化チタン:anTiO₂(比較対照はルチル型ナノ酸化チタン:rnTiO₂)を 500 μ g/ml の濃度を2日に1回の割合で合計8回、肺内に噴霧投与した。14 日後に終了し肺病変とマクロファージの状態について光顕、電顕観察、生化学的解析を行った。③ラット肺初代培養マクロファージ培養液に最終濃度が 50 μ g/ml となるように nZnO および naTiO₂ を加え、24 時間後に培養

上清のヒト肺線維芽細胞、ヒト肺腺癌細胞、およびヒト中皮腫細胞の増殖に対する影響検索した。また nZnO を貪食したマクロファージ RNA のアレイ解析を行った。④nZnO 500 μ g/ml を4週間の8回投与しその後無処置とし、直後、2週後、4週後、8週、10 週、12 週、16 週後に屠殺し、肺線維化と TBEH の可逆性を観察した(津田)。

基礎的有害性情報の収集:

OECD のスポンサーシッププログラム対応として、2 種の MWCNT(M: Mitsui 及び N: Nikkiso)、1 種の SWCNT(N) および C60 について、OECD テストガイドラインに基づく皮膚刺激性試験と皮膚感作性試験を行った。さらに、近年のナノマテリアルの胎児移行や生殖発生過程への影響を示唆する知見受け、雌マウスの妊娠9日に、2%CMC に懸濁した MWCNT 溶液を、腹腔内に 0、2、3、4、5mg/kg の割合で、また、気管内に 0、3、4、5mg/kg の割合で、1群 10 ~15 匹に投与し、体重測定、一般症状の観察を行い、妊娠 18 日に帝王切開により胎児を摘出、雌雄の判別、体重測定後、外表異常、骨格異常の有無を調べた。さらに、妊娠 7、8、9、および 10 日のラットあるいはマウスに、0.5(ラット)あるいは 0.3(マウス)mg/kg bw の用量で血清に懸濁した MWCNT を静脈内投与し、妊娠 20 日のラットおよび妊娠 17 日のマウスを帝王切開して病理組織学的に MWCNT の組織への沈着を確認すると共に、胎仔への影響について検討した(西村、広瀬)。

体内動態解析手法の向上に関しては、C₆₀/リポソーム溶液を、連日 4 回、マウスに尾静脈投与し、投与 1 日後、7 日後、14 日後、28 日後に、肝臓、腎臓、脾臓、肺、脳及び血液を採取した。生体試料全体を凍結乾燥し、粉碎・均一化した後、0.01M ドデシル硫酸ナトリウム、酢酸を添加し、十分に混和した。遮光して室温で 5 時間振とうしてトルエン抽出した後、遠心によりトルエン層を分取し、測定溶液とした。液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析計(LC-MS/MS)を用い、大気圧化学イオン化法のネガティブイオンモードで定量分

析を行った。水酸化フラーレンの分析法の開発としては、液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析計(LC-MS/MS)を用いた電子イオン化法(ESI)のネガティブイオンモードでの定性定量を行った(西村)。

遺伝毒性試験については C60 及び 4 種類の CNT を用いた *in vitro* 染色体異常試験と C60 については光毒性試験と Bhas42 細胞を用いた *in vitro* トランスフォーメーション試験を行った。ラットを用いた *in vivo* 試験としては、C60 の腹腔内投与、MWCNT(M)の経気道投与による pig-A 遺伝子突然変異試験と、MWCNT(M)単回気管内投与によるトランスジェニックラット(gpt delta)を用いた肺の遺伝子突然変異誘発性試験と末梢血の pig-A 遺伝子突然変異試験を行った。(本間)。

カーボンナノチューブ(CNT)の神経幹細胞増殖に対する影響、ミクログリア細胞毒性について検討した。この際、CNT を超音波処理した上清について検討した。上清に含まれる金属を元素分析で同定し、作用との関連について検討した。ミクログリア細胞毒性については CNT 自身の影響を示唆するデータが得られたので、超音波処理上清から 0.22 μm フィルター濾過有り、なしの 2 標本を作成し細胞毒性の違いについて検討した。また、これらの 2 標本にミクログリアを暴露した際の NO 産生についても確認した。SWCNT(N)、MWCNT(N)、MWCNT(WL)、MWCNT(WS)、MWCNT(M)の 5 種の CNT について検討した(佐藤)。

異物の排除において重要な役割を担っているマクロファージ細胞を用いて CNT の細胞毒性の検討を行った。マウスマクロファージ細胞株である J774A.1 細胞および RAW264 細胞を実験に用いた。細胞増殖阻害試験は細胞を CNT 存在下で培養し、WST-8 アッセイを用いて生細胞数を定量した。炎症性サイトカイン発現への影響を調べるために、J774A.1 細胞に CNT を暴露し、TRIzol LS 試薬を用いて全 RNA を抽出し、T-Primed First-Strand Kit を用いて cDNA を作製した。得られた cDNA 溶液にマウス TNF- α または IFN- γ に対するプライマーおよび SYBR Premix Ex Taq を加えてリアルタイム PCR 反

応を行い(TP-800)、CNT 暴露による炎症性サイトカイン発現への影響を調べた。過酸化水素存在下での細胞増殖試験には RAW264 細胞を用い、種々の濃度の過酸化水素水溶液存在化での増殖を評価した。さらに CNT の生体膜障害性に着目した研究を行った。卵黄ホスファチジルコリンで構成されたカルセイン封入リポソームを調製し、CNT 存在下でインキュベートした際のカルセインのリポソームからの放出を測定した(奥)。

MWCNT や SWCNT、C60 を肺サーファクタント脂質成分(ホスファチジルコリン/ホスファチジルグリセロール=2:1)を用いて分散し、マクロファージに分化したヒト THP-1 細胞の培地に添加し、培地への IL-1 β 分泌を Milliplex により測定した。IL-1 β や caspase-1 の切断活性化はウェスタンブロットにより解析し、阻害剤や siRNA ノックダウンにより、MWCNT シグナルの伝達経路と関与因子を同定した(最上)。

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 Dossier 作成計画書の作成を通して国際貢献を行った(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、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

慢性影響評価のための検討：

雄 p53 (+/-) マウスに MWCNT を単回腹腔内投与した 1 年間発がん性試験の病理組織学的検査の結果、0.3mg/animal の用量で 19/20、0.03mg/animal の用量で 17/20、0.003mg/animal の用量で 5/20 に中皮腫が認められ、最低用量の 0.003mg/kg 群から用量に依存して中皮腫が発生した。なお、中皮腫誘発の潜伏期間が用量に依存しなかった。

FNW の 1 年間の発癌性試験を終了した。FNW-L 及び、FNW-S 群とも対照群と比較して、体重及び

生存率に有意な差は認められなかった。陽性対照のMWCNT群では投与後200日までに殆どの動物が中皮腫と思われる腫瘍を誘発した。なお、対照群を含むFNW-L及び、FNW-S群に腹腔内腫瘍が少数例認められており、今後、病理組織学的検査を行う。

メソセリン解析のために、新たにマウスELISA系の開発(マウスN-ERC)し、その実用化をマウス膀胱癌モデルで検討した。ラット膀胱癌モデルと同様に、初期病変から、血中のERC/Mesothelin量が増加することが判明した。マウスELISA測定キットの開発と実用化(販売の開始)に成功した。

MWCNTのラット腹膜中皮腫誘発性と血清N-ERC/メソセリン濃度の変動解析では、中皮腫の発現は、MWCNT-陰嚢群では0.3mg群から、MWCNT-腹腔群では0.1mg群から認められ、用量に伴って増加した。中皮腫の進展の程度は、腹腔群が陰嚢群に比べて強く現れた。N-ERC/メソセリン濃度は、MWCNT-陰嚢腔及び腹腔群ともに0.1mg群から用量に比例して増加し、腹腔群では陰嚢群に比べ高値を示した。MWCNT両群における血清ERC/メソセリン濃度は中皮過形成の発生に伴って増加し、中皮腫の発生と進展に伴いさらに増加した。MWCNTの中皮腫誘発性における物理化学的性状に依存した影響の解析では、MWCNT(WL)では26週目より43週までに全例、MWCNT(M)では投与後32-50週の死亡例(4/12)と瀕死例(7/12)及びMWCNT(N)では投与後39-53週の死亡例(5/10)と瀕死例(2/10)を解剖した。MWCNT(WS)及びMWCNT(T)では、全例が55週まで生存した。MWCNT(M)、MWCNT(N)及びMWCNT(WL)では、死亡例及び瀕死例を含む全例で、中皮腫に特徴的な腹腔内腫瘍結節形成と出血性腹水貯留を認めた。MWCNT(WS)及びMWCNT(T)では、全例で腫瘍結節及び出血性腹水を認めなかった。

アポEKOマウス(高脂肪・高コレステロール食負荷)においては、大動脈壁や大動脈弁への脂質蓄積が著しく進展し、MWCNT(MWCNT-7)気管内

投与による動脈効果病変面積に対する影響は認められず、SWCNTでの動脈硬化進展の報告は再現されなかった。大動脈内腔に接着する細胞での炎症性シグナルNF- κ Bや接着分子VCAM-1の発現を解析したが、MWCNTによる影響は認められなかった。しかしながら、血中の抑制性サイトカインIL-10はMWCNTにより有意に低下し、炎症性サイトカインIL-1 β は上昇傾向が認められた。

溶媒中からMCを除いたC60腹腔内投与後1年間観察実験の結果、肉眼的及び病理組織学的に腎障害は認められなかった。

酸化亜鉛の発がん性の解析では、①16週試験で、肺胞上皮過形成と腺腫を合わせた腫瘍性病変の平均発生個数に群間の有意差はなかった。DHPNの投与に関係なく巣状の間質性肺炎と終末細気管支-肺胞移行部の終末細気管支上皮の巣状過形成増殖(TTBEH)がDHPN投与群と比較して有意に増加した($p < 0.01$)。マクロファージの細胞質には、nZnO粒子は全く観察されず胞体内に泡沫状の小体が多数観察された。また乳腺腫瘍の発生にはnZnO投与は影響しなかった。②8日試験ではリンパ球主体の軽度の炎症細胞浸潤巣と多数の肺胞マクロファージが散見された。16週の試験と同じようにマクロファージの細胞質には、亜鉛粒子は全く観察されず胞体内に泡沫状の小体が多数観察されたが、組織をすり潰した肺で亜鉛元素は少量検出された($p < 0.01$)。③培養上清のヒト肺線維芽細胞(CCD34)の細胞増殖率は対照の122%まで増大したが、ヒト肺がん細胞(A549)およびヒト中皮腫細胞(Meso1)には影響しなかった。培養上清中マイクロアレイ解析では、Interleukin 6(IL-6)、colony stimulating factor 3(CSF3)、IGF 5発現増加がみられた。④TBEH増殖と線維化を伴う巣状の間質性肺炎は可逆性病変であることが分かった。

また、アナターゼ型二酸化チタニウム(anTiO₂)に対する解析では、16週試験では肺胞内マクロファージの数はrnTiO₂より少なかった(対ルチル比77%)。8日試験では、肺組織のMip1 α 肺組織に

における MIP1 α の蛋白発現量は対照に比べ rnTiO_2 4.84 倍、 anTiO_2 1.34 倍と増加していたが、ルチル型よりアナターゼ型は低値 ($p < 0.001$) であった。ラジカル産生の指標の 8-OHdG 値はルチル型より低値傾向 (対ルチル比 64%) であった。

基礎的有害性情報の収集:

OECD のスポンサーシッププログラム対応として行った 2 種の MWCNT (M&N) と 1 種の SWCNT (N) および C60 についての皮膚刺激性試験と皮膚感作性試験ではいずれも刺激性および感作性を有しないことを確認した。

マウスを用いた MWCNT の催奇形性試験において、MWCNT を腹腔内投与した全ての群において、四肢減形成、口蓋裂の外表奇形及び、脊椎・肋骨の癒合などの骨格奇形が用量相関的に発現した。また、MWCNT を気管内投与した場合には 4-5mg/kg の投与群で、腹腔内投与と同様の四肢減形成、脊椎・肋骨の癒合などの奇形が見られた。しかし、3mg/kg 投与群では奇形児の発現はなく、この量を気管内投与における最大無作用量とした。

静脈内投与による催奇性の検討では、母動物の病理組織学的検査において、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、および脳において MWCNT の沈着が確認され、その沈着量は心臓>肺>>肝臓>腎臓>脾臓の順であった。肺においては炎症関連所見(好中球浸潤および肉芽腫)がみられた。しかし、胎仔の検査では、外表観察の結果、いずれの胎仔においても奇形はみられなかった。

体内動態解析手法の向上に関しては、C60 の分析手法として前処理法等の改良を行うことにより、感度を 100~200 倍まで大幅に向上できることを確認した。C60 の感度は $0.1 \mu\text{g/L}$ となった。この手法を用いて C60 を反復尾静脈投与した実験では、肺、脾臓、肝臓、脳及び腎臓から検出され、湿重量当たり肺、脾臓、肝臓、腎臓、脳の順に高い濃度で検出された。血液からは、投与後 1 日目から未検出であった。脾臓を除くすべての臓器において、経時的な濃度の減少傾向が認められた。特に、腎臓と脳においては、C60 濃度

の急激な減少が認められた。

また、C60 の代謝物として生体内に存在する可能性がある水酸化フラーレン $\text{C60}(\text{OH})_2$ を対象に、LC-MS/MS を用いた分析法の開発を試みた。プローブに ESI を使用し、LC においては F5C6 系カラムを用い、移動相としてトルエンとメタノールのアイソクラティック法で分離することで、ピーク形状、分離状況、検出感度について良好な感度が得られた。 $\text{C60}(\text{OH})_2$ の検液中の定量下限値は $1 \mu\text{g/L}$ であった。

遺伝毒性試験では、*in vitro* 試験において、C60 は染色体異常試験、形質転換試験、光毒性試験のいずれでも陰性であった。4 種類の MWCNT のうち、比較的外径の大きい (60nm 以上) MWCNT の 2 種類で染色体倍数性の誘発が観察された。一方 *in vivo* 試験としては、C60 の腹腔内投与、MWCNT (M) の経気道投与による pig-A 遺伝子突然変異試験と、MWCNT (M) 単回気管内投与によるトランスジェニックラット (gpt delta) を用いた肺の遺伝子突然変異誘発性試験と末梢血の pig-A 遺伝子突然変異試験のいずれでも遺伝毒性は認められなかった。

神経幹細胞増殖抑制作用、ミクログリア細胞毒性に関して MWCNT (N)、SWCNT (N) の超音波処理上を用いて検討した。これらの CNT 超音波処理上清には金属イオンが溶出しており、このうち、Mn, Rb, Tl, Fe が神経幹細胞増殖抑制に、Mn, Fe がミクログリア細胞毒性に関与している可能性が示唆された。特に、Mn, Fe の作用には活性酸素の関与も示唆された。しかし、金属溶出量は測定毎に値が変動する結果も得られた。複数メーカーの CNT について同様の検討を行ったところ、メーカーによって溶出金属の種類と量が大きく異なることが明らかとなった。また、金属溶出量や種類とミクログリア細胞毒性が必ずしも相関していないことも明らかとなった。位相差顕微鏡像でも、ミクログリアが CNT を取り込もうとしている様子が観察された。以上の結果は、金属による作用以外に、CNT 自体も直接的にミクログリアの細胞毒性に関与している可能性を示唆している。CNT 自体が

ミクログリアに NO 産生を促して死に至らしめる可能性についても検討したが、CNT は NO 産生を誘発しなかった。CNT の直接的な作用に CNT の形状が関与しているかどうかを確認するため、CNT 超音波処理上清を 0.22 μm フィルターで処理したところ、ミクログリア細胞毒性は消失した。

マウスマクロファージ由来細胞株 J774A.1 細胞に対する CNT の細胞毒性作用について検討を行った結果、SWCNT (N)、MWCNT (N)ともに、高濃度で強い細胞毒性を示し、48 時間の暴露によってほぼすべての細胞が死滅した。CNT 暴露によるマクロファージが産生する TNF- α および IFN- γ の発現への影響について、リアルタイム PCR 法により調べた結果、SWCNT (N) の暴露 24 時間後において TNF- α の発現はほとんど変化しなかったが、IFN- γ の発現は対照群に比べ 20%程度となった。また 30nc 暴露については TNF- α の発現が若干減少し、IFN- γ は対照群の 10%にまで発現低下した。次に活性酸素と CNT の関連を調べた。まず過酸化水素存在下における RAW264 細胞の増殖について検討を行った結果、過酸化水素 10 μM 添加では、20%程度の細胞傷害が確認され、30 μM 以上の添加ではほとんど全ての細胞が死滅した。酸化ストレス惹起時の CNT によるマクロファージ増殖への影響を調べるため、1 μM および 10 μM の過酸化水素存在下での CNT の RAW264 細胞増殖に対する作用について検討した。10 $\mu\text{g/mL}$ 以上の CNT 暴露時に細胞増殖阻害作用が確認されたが、10 $\mu\text{g/mL}$ 未満ではその作用は認められず、0.1 および 0.01 $\mu\text{g/mL}$ 暴露時には増殖促進効果が確認された。

また CNT の直接的な生体膜作用を検討するために、MWCNT (WL) によるリポソーム膜透過性亢進作用について検討した。リポソームからのカルセイン放出試験の結果、MWCNT (WL) の量及び暴露時間の延長に伴うリポソームからのカルセイン放出が確認でき、100 $\mu\text{g/mL}$ での暴露では、対象として用いたフラーレン C₆₀ と比較して有意な放

出が確認された。

一方、MWCNT (M) は THP-1 細胞に貪食されると著しい IL-1 β 産生促進効果を示すことを見いだした。MWCNT の効果は形状や長さにより異なり、フラーレンの効果は無かった。siRNA ノックダウンと阻害剤への応答から、MWCNT が貪食されると NLR pyrin domain containing 3 (NLRP3) を含むインフラマソームが活性化され、caspase-1 が自己活性化して前駆体を切断することにより、IL-1 β を産生する機序を明らかにした。

国際動向調査としては、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 (DDP) 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を通しての国際動向情報収集と国際貢献を行った。

D. 考察

雄 p53 (+/-) マウスに MWCNT を単回腹腔内投与した結果、用量に依存した中皮腫の発症が確認され、過去の多量暴露時の報告と合わせ、MWCNT がアスベストと同様の発がん性を示す可能性が更に示唆された。中皮腫発生までの潜伏期が用量非依存的であることと最低用量群に見られた中皮過形成病変は発がん機序として Frustrated phagocytosis を支持した。また、この中皮腫誘発性に関しては、我々の開発したメソセリンを検出する ELISA 系がマウスでも有用であることが確認された。さらに、MWCNT 繊維サイズの違いは、中皮腫誘発性に差異を引き起こすことから中皮腫誘発性の重要な因子のひとつと考えられた。FNW は形状がカーボンナノチューブに似ている、100%炭素であり遷移金属を含まない、及び、今回長短の二種類の FNW が用意されたことから、長さの違いのみによる中皮腫誘発能の比較が可能となり、アスベスト様繊維状炭素化合物の発がんメカニズムの解釈

を容易にすることが期待された。1年間の実験を終了し、FNWは長短共に中皮腫誘発能は低い結果を得た。最終結論は病理組織学的検査を待って判断する予定である。

フラレンに関してはこれまでの実験でマウス単回腹腔内投与の結果、MCを溶媒に用いた場合はフラレン投与により肉眼的に腎の退色を伴った地図状の萎縮、組織学的に糸球体が比較的保持されたままでの尿細管～集合管の高度の萎縮が巣状乃至腎全体に認められた。しかし、溶媒中のMCを除いた今回のフラレン腹腔内投与試験の結果、1年の観察中に肉眼的及び病理組織学的に腎障害は認められず、フラレン単独では毒性は発揮せず、MCとの共存時にその腎障害性を高度に増強するものと結論された。

23年度の基礎的有害性情報の収集の中で、新たに判明した腹腔内投与及び気管内投与による催奇形性が、中皮腫と同様のアスベスト様の物性や形状に依存しているかどうかについては不明である。そもそも、アスベストばく露による催奇形性を調べた研究報告もなく、アスベストそのものに催奇形性があるのかどうかについても情報が無い。SWCNT、MWCNTの28日間反復投与毒性の結果では、経口投与可能な最高投与量においても特段の毒性影響は観察されておらず、経口投与による一般毒性は比較的低いと考えられる。しかし、近年SWCNTおよび酸化/水酸化したMWCNTを妊娠マウスへ静脈内や経口投与することにより、胚致死や催奇形性を示唆する報告も。他方、ナノ粒子の腹腔内や静脈投与だけでなく吸入ばく露や皮下投与によっても胎盤を通過して胎児に移行することが近年報告されている。今回観察された催奇形性がMWCNTの胎児移行によるものであるとすれば、中皮腫を起こした形状のものよりは小さく、体内吸収されやすい、より微少の粒子によるものであることが想定されが、ばく露局所での生体反応により誘発されたタンパクや低分子などの生体反応産物による二次的な影響である可能性も否定できない。実際に、妊娠ラットおよび妊娠マ

ウスへのMWCNT静脈内投与による催奇形性実験では胎仔の外表観察の結果では、いずれの胎仔においても奇形は認められず、暴露した後に血流に乗ったMWCNTが生殖・発生毒性を引き起こす可能性は低いと考えられた。本格的なメカニズム解明のための研究が今後必要になると考えられた。

気管投与SWCNTによる動脈硬化進展の報告はMWCNTでは再現されなかった。しかしながら血中の炎症性サイトカインIL-1 β の上昇傾向からin vitroでの検証を行い、MWCNTがマクロファージに貪食されるとIL-1 β 産生を促進することを見出した。IL-1 β は免疫・炎症を制御する重要な因子である。本研究ではNLRP3を含むインフラマソームがMWCNTにより活性化されてIL-1 β 産生を促進する機序を明らかにした。最近、NLRP3は内外の危険因子を認識して炎症を誘導し、様々な病態進展に関わることが明らかにされている。MWCNTは分解されず組織に滞り、IL-1 β 産生による炎症が長期に持続する可能性がある。炎症反応が遷延化した「慢性炎症」は動脈硬化やガンなど多様な疾患の要因として脚光を浴びており、MWCNTのこれら病態との関わりが注目される。

nZnOは気管内噴霧投与によって、肺発がん促進作用はみられず、間質性肺炎とTBEHが発生することが明らかとなった。nZnOに吸入による発がん性の報告動物、ヒトともに報告は見られ無ことからこの発がん二段階試験法の妥当性が示された。TBEHの発生は塩化亜鉛でも発生し、亜鉛自体の週末細気管支への特異的毒作用に起因すると考えられた。本法によって発がんには直接関与しない間質性肺炎と肺線維症のリスク評価も可能であることが実証された。

気管内に噴霧されたnZnOは、肺胞上皮細胞内には全く観察されなかった。nZnOは細胞質内で分解されて亜鉛イオンとして流出した可能性がある。肺胞巣状線維化は、マクロファージからCXCL5などケモカインを分泌し、線維芽細胞の増殖を促進することが示された。TBEHと同様にこの巣状線維化も可逆性であった。今後、亜鉛の投与とTBE、

巢状線維化発生の機序については毒性学上解明されることが望まれる。

光触媒活性がルチル型二酸化チタニウム (rnTiO₂) よりも強いアナターゼ型二酸化チタニウム (anTiO₂) は生物毒性がルチル型より顕著である可能性が危惧されているが、Mipl α 発現、8-OHdG 値もルチル型より低かった。ヒト肺線維芽細胞 (CCD3)、ヒト肺がん細胞 (A549) に対する細胞増殖活性においてもルチル型より低値であった。これらの結果より、少なくとも強い光の当たらない条件下では生物・細胞毒性はアナターゼ型より弱いものと考えられた。

基礎的有害性情報の収集として OECD のスポンサーシッププログラムに対しては、当初の予定通り CNT および C60 の刺激性試験及び感作性試験を行い、第 9 回の OECD ナノ作業グループ会合において、Dossier 作成計画書の作成として成果を提出することができた。体内動態解析法では、C60 に対する検出感度の向上に成功し、信頼性の向上した精度で C60 の体内動態を明らかに出来るようになるとともに、想定される水酸化代謝物も測定可能となった。

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が、今回試験した MWCNT においても活性酸素で誘発されるような *in vitro* での染色体の構造異常誘発は認められなかった。

また、今回実施したサイズの異なる 4 種類の MWCNT において、太い MWCNT である 0312TH と、0601250-01k が倍数性細胞を誘発し、細い MWCNT である 12127PE と 04519DC では倍数性細胞を誘発しなかった。浅倉らはロット番号が異なるが、今回我々が試験に用いた Mitsui 製の MWCNT (外径: 88 \pm 5 nm、長さ: 5.0 \pm 4.5 \cdot m) を用いて染色体異常試験を実施し、CHL/IU 細胞で構造異常は誘発されないが、倍数性細胞を誘発することを報告している。我々が実施した MWCNT で倍数性細胞を誘発した 2 つの MWCNT はどちらも太く、顕微鏡レベルでチューブ形状として観察された MWCNT であり、MWCNT の外径と倍数性細胞の誘発性に関連性のあ

ることが示唆された。

染色体の数的異常は発がん性誘発の原因の一つと考えられている。MWCNT と同様の針状結晶を示し、ヒト肺において中皮腫を誘発するアスベストも染色体の倍数性細胞を誘発する。したがって、MWCNT のこの異常誘発作用は、発がん性との関連性が疑われるが、我々が実施した Bhas42 細胞を用いる形質転換試験では、いずれの MWCNT も形質転換を誘発しなかった。倍数性細胞または染色体の数的異常を誘発するためには、細胞分裂の過程を経る必要がある。Bhas42 細胞の増殖期に処理するイニシエーション試験において、染色体異常試験と同程度ないしやや強い細胞毒性作用を示していることから、試験した MWCNT は Bhas42 細胞においても CHL/IU 細胞と同様の作用を示すと考えられるが、今回の我々の結果では、MWCNT による倍数性細胞の誘発は *in vitro* 発がん性には関与していないと考えられる。

MWCNT の *in vivo* 遺伝毒性に関しては Kato らが行った *gpt-delta* トランスジェニックマウスの報告がある。MWCNT 単回投与や 2 回投与では肺での遺伝毒性は認められないが、4 回の連続投与で有意に遺伝毒性を認める結果が報告された。これらの報告では肺における酸化的 DNA 損傷や過酸化脂質に由来する DNA 付加体の上昇も報告されており、前述のように、MWCNT 投与による酸化的な事象により遺伝毒性を示すのではないかと考えられる。しかしながら、今回我々が試験した MWCNT の *in vivo* 遺伝毒性試験では遺伝毒性は認められなかった。我々は、肺での遺伝毒性を MWCNT 気管内単回投与で評価しており、Kato らとは使用した動物種は異なるものの、単回投与では遺伝毒性は認められないという一致した結果となった。その一方で、我々は直接 MWCNT が暴露されない血液細胞での遺伝毒性試験である *Pig-a* 遺伝子突然変異試験を併せて行った。*Pig-a* 遺伝子突然変異試験では、骨髄の造血幹細胞に生じた突然変異が検出される試験系である。例えば、MWCNT により炎症反応が過剰に発生し、それに伴う酸化的な事象に

由来して遺伝毒性が検出されるならば、*Pig-a* 遺伝子突然変異試験でも何らかの遺伝毒性が検出されるのではないかと予測されたが、結果は陰性であった。その理由として、今回の試験では致死量に近い量を投与しているため、投与量の問題というよりも、投与回数に由来するのではないかと考えられる。すなわち、Kato らの報告では、単回投与よりも、複数回投与することでより過剰な炎症反応が慢性的に生じ、それに伴って遺伝毒性が検出されている一方で今回のように単回投与では遺伝毒性を發揮するほど強い炎症反応が起きていないのではないかと、という可能性が指摘できる。

CNT 超音波処理上清に神経幹細胞増殖抑制作用、ミクログリア細胞毒性を見いだした。これらの作用に、CNT から溶出した金属が関与していることを明らかとした。しかし、金属溶出量や種類が測定毎に変動したことから、金属が CNT に不均一に含有されている可能性がある。一方、金属以外に CNT 自体がミクログリア細胞毒性を持つ可能性も示唆された。CNT 超音波処理上清を 0.22 μm フィルターで濾過すると細胞毒性は消失した。これは、CNT 自体のミクログリア毒性は 0.22 μm 以上の大きさに凝集したものに由来することを示している。さらに、この凝集体をミクログリアが取り込み、死に至る、という新しいパスウェイを示唆している。金属溶出量や CNT 自体作用はメーカーごとに大きく異なることも明らかとなった。

CNT 暴露により、マウスマクロファージ株化細胞の増殖が濃度依存的に抑制され、その作用は CNT の沈殿を除去した浮遊微粒子画分においても同様に確認された。すなわち高濃度 CNT は細胞に対し急性毒性を示すことが明らかとなり、その本体は遠心処理によっても沈殿しない微細となった CNT にあることが示唆された。一方、低濃度 MWCNT (WL) 暴露により RAW264 細胞の増殖が促進された。このような作用は、1 から 3 μM の低濃度過酸化水素添加によっても観察されたことから、低濃度 CNT 暴露による細胞障害に活性酸素が関与

する可能性が考えられた。免疫機能への影響に関しては、IFN- γ の発現が CNT 暴露により、著しく低下することが明らかとなり、CNT 暴露によりマクロファージ細胞を介した免疫機構への影響が示唆された。これらのことから、高濃度 CNT は直接的に細胞毒性を誘発し、低濃度の暴露では活性酸素の産生を介することが示唆された。さらに細胞障害機構の解析から、高濃度 CNT は直接物理的に細胞膜を障害し、細胞毒性を引き起こす可能性が示された。CNT の浮遊微粒子に細胞毒性が見られること、フラーレンではリポソーム膜透過性変化を示さないことから、針状の CNT 形状の重要性が同時に示唆された。CNT 低濃度暴露時にマクロファージ細胞で見られる変化に関しても、細胞膜あるいはエンドサイトシス後のオルガネラ膜への CNT の直接的作用が酸化ストレス等の引き金になっている可能性も考えられる。さらに本研究で明らかとした CNT によるカルセイン封入リポソームを用いた膜透過性変化は、定量的かつ簡便に測定できるため、CNT の生物活性評価法として有用である可能性が示された。

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、皮膚感作性試験、遺伝毒性試験を行うと共に、慢性影響が懸念される CNT 等の繊維状粒子のマクロファージや神経系細胞用いた試験系に及ぼす影響について検討を行った。

慢性研究では繊維の長さに依存する中皮腫誘発性の検証を行えたが、その他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。*in vitro* 研究では、MWCNT に含まれている触媒金属による影響の違いが認められたが、粒子サイズに依存して染色体異常や細胞障害性、サイトカイン放出を伴う炎症性などの反応性に違いが認められることも

明らかとなった。これら反応が慢性化することが in vivo 慢性影響の発現に重要であることが示唆された。

F. 健康危機情報

妊娠マウスを用いたMWCNTの単回腹腔内投与および単回気管内投与により、催奇形性が確認されたため、厚生労働省健康危機管理調整官宛に健康危険情報通報(グレードB:情報提供、経過注視)を行った(平成23年12月)。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Fujitani T, Ohya K, Hirose A, Nishimura T, Nakae D*, Ogata A: Teratogenicity of multi-wall carbon nanotube (MWCNT) in ICR mice, *J. Toxicol. Sci.* 37, 81-89 (2012).
- Yamaguchi A, Fujitani T, Ohya K, Nakae D, Hirose A, Nishimura T, Ogata A. , Effects of sustained stimulation with multi-wall carbon nanotubes on immune and inflammatory responses in mice. *J. Toxicol. Sci.* 37, 177-189 (2012).
- Horibata, K., Ukai, A., Koyama, N., Takagi, A., Kanno, J., Kimoto, T., Miura, D., Hirose, A., and Honma, M. Fullerene (C60) is negative in the in vitro p53 gene mutation assay. *Genes and Environment* 33, 27-31 (2011)
- Wako K, Kotani Y, Hirose A, Doi T, Hamada S. (2010) Effects of preparation methods for multi-wall carbon nanotube (MWCNT) suspensions on MWCNT induced rat pulmonary toxicity. *J Toxicol Sci.* 2010;35(4):437-46.
- 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.
- Tsuda, H. Risk Assessment Studies of Nanomaterials in Japan and Other Countries. *Asian Pacific J Cancer Prev*,10, DIMS 30 th Anniverssary Supplement. 11-12, 2010.
- Xu J., Sagawa Y., Futakuchi M., Fukamachi K., Alexander DB., Furukawa F., Ikarashi Y, Uchino T., Nishimura T., Morita A., Suzui M., Tsuda H. Lack of promoting effect of titanium dioxide particles on ultraviolet B-initiated skin carcinogenesis in rats.

Food Chem Toxicol. 2011

Jun;49(6):1298-302. Epub 2011 Mar 23.

- 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.

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.

- Kubota, R., Tahara, M., Shimizu, K., Sugimoto, N., Hirose, A., Nishimura, T.:Time-dependent variation in the biodistribution of C60 in rats determined by liquid chromatography-tandem mass spectrometry., *Toxicol. Lett.*, 206, 172-177 (2011)

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ーレンの分析法の開発, (2009) 国立衛研報, 第 127号, 65-68.

- 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.

- K. Miyazawa, R. Kato, S. Nudejima, K. Ide, S. Hasegawa, H. Yamaguchi and K. Tokumitsu, "Characterization of the ultrasonically treated multiwalled carbon nanotubes for safety evaluation", *Trans. Mat. Res. Soc. Jpn.*, 2011, 36[3], 355-358.

Yumeno Akasaka and Kun'ichi Miyazawa, "Long-term growth investigation of C60 fullerene nanowhiskers", *Trans. Mat. Res. Soc. Jpn.*, 2011, 36[3], 345-348.

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, 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、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 (NanOEH2009), 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
- 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
- Jun Kanno, Atsuya Takagi, Tetsuji Nishimura, Akihiko Hirose, Nanomaterial Toxicology - Importance of Chronic Toxicity Assessment, Attendance at 5th International Conference on Nanotechnology - Occupational and Environmental Health, (2011.8.10) (Boston, USA)
- 菅野 純、高木篤也、西村哲治、広瀬明彦、Carcinogenicity and Chronic Toxicity of Nanomaterials、第 70 回日本癌学会学術総会、2011.10.4、名古屋
- 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ン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ン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 NanOEH p100 (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物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)
- 最上(西巻)知子、崔 紅艶、岩崎 香里、奥平 桂一郎、内藤 幹彦、鈴木 和博、広瀬 明彦 多層カーボンナノチューブは NLRP3 活性化を介

してIL-1 β 産生を促進する 第38回日本トキシコロジー学会学術年会(2011.7)(横浜)

最上(西巻)知子, 崔紅艶, 岩崎香里, 奥平桂一郎, 内藤幹彦, 鈴木和博, 広瀬明彦 多層カーボンナノチューブによるIL-1 β 産生促進とその機構 フォーラム2011 衛生薬学・環境トキシコロジー (2011.10)(金沢)

Nudejima S, Miyazawa K, Okuda-Shimazaki J and Taniguchi A. Phagocytosis of FNWs by PMA-treated THP-1 cells, Carbon 2009, June 2009, Biarritz.

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ー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ィスカーの生分解性評価、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ィスカーの生分解の研究、日本物理学会 第65回年次大会、2010年3月、岡山。

出願番号:特願 2010-58903

- 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:櫛島真一、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

- 発明の名称:“フラーレン細線及びフラーレン結晶の光重合体の製造方法
発明者:加藤良栄、宮澤薫一
出願日:平成23年11月15日
出願番号:特願 2011-249493、

2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

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
発明者:津田洋幸、二口 充、徐 結荷
特許出願人:公立大学法人名古屋市立大学
出願日:平成21年3月24日
出願番号:特願 2009-071951
- 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」
発明者:津田洋幸、二口 充、徐 結荷
特許出願人:津田洋幸
出願日:平成21年9月25日
出願番号:PCT/JP2009/004848
- 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」
発明者 津田洋幸、二口 充、徐 結荷
特許出願人:公立大学法人名古屋市立大学
出願日:平成22年3月26日

Ⅱ. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者名	論文タイトル	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
菅野純、広瀬明彦	ナノマテリアルの有害性評価とカーボンナノチューブの生体影響	亙理文夫(監修)	「ナノ材料のリスク評価と安全性対策」	フロンティア出版	東京	2010	11-21

雑誌

著者名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Fujitani, T., Ohyama, K., Hirose, A., Nishimura, T., Nakae, D., Ogata, A	Teratogenicity of multi-wall carbon nanotube(MWCN) in ICR mice	J. Toxicol. Sci.	Vol.37, No.1	81-89	2012
Yamaguchi, A., Fujitani, T., Ohyama, K., Nakae, D., Hirose, A., Nishimura, T., Ogata, A.	Effects of sustained stimulation with multi-wall carbon nanotubes on immune and inflammatory responses in mice	J. Toxicol. Sci.	Vol.37, No.1	177-189	2012
Ryoei Kato and Kun'ichi Miyazawa2011.10	Raman laser polymerization of C60 nanowhiskers	Journal of Nanotechnology	2012	(6 Pages)	2012
Sagawa, Y., Futakuchi, M., Xu, J., Fukamachi, K., Sakai, Y., Ikarashi, Y., Nishimura, T., Suzui, M., Tsuda, H., Morita, A.	Lack of promoting effect of titanium dioxide particles on chemically-induced skin carcinogenesis in rats and mice.	J Toxicol Sci	37	317-327	2012
Kubota, R., Tahara, M., Shimizu, K., Sugimoto, N., Hirose, A., Nishimura, T.	Time-dependent variation in the biodistribution of C60 in rats determined by liquid chromatography–tandem mass spectrometry	Toxicology Letters	206	172-177	2011
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研究の重要性	薬学雑誌	131	195-201	2011
Horibata, K, Ukai A, Koyama N, Takagi A, Kanno J, Kimoto T, Miura D, Hirose A, Honma M	Fullerene (C60) is negative in the in vivo pig-A gene mutation assay	Genes and Environment	33	27-31	2011
Xu, J., Sagawa, Y., Futakuchi, M., Fukamachi, K., Alexander, D. B., Furukawa, F., Ikarashi, Y., Uchino, T., Nishimura, T., Morita, A., Suzui, M., Tsuda, H.	Lack of promoting effect of titanium dioxide particles on ultraviolet B-initiated skin carcinogenesis in rats.	Food Chem Toxicol	49	1298-1302	2011
Zhang D., Kobayashi T., Kojima T., Kanenishi K., Hagiwara Y., Abe M., Okura H., Hamano Y., Sun G, Maeda	Deficiency of the Erc/mesothelin gene ameliorates renal carcinogenesis in Tsc2 knockout mice.	Cancer Science	102	720-727	2011