

201236005B

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

カーボンナノマテリアルによる肺障害と発がん作用の中期評価法と
その作用の分子機序解析法の開発に関する研究

平成22年度～24年度 総合研究報告書

研究代表者 津田 洋幸

平成25年(2013年)5月

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

カーボンナノ材料による肺障害と
発がん作用の中期評価法とその作用の分子
機序解析法の開発に関する研究
(H22-化学-一般-005)

平成 22 年度～24 年度 総合研究報告書
研究代表者 津田 洋幸

平成 25 年 (2013 年) 5 月

目 次

I. 総合研究報告書	1
カーボンナノマテリアルによる肺障害と発がん作用の中期評価法とその作用の分子 機序解析法の開発に関する研究 津田 洋幸、五十嵐 良明、今泉 祐治、酒々井 眞澄、二口 充	2
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	27
III. 研究成果の刊行物・別刷	33

平成22年度～24年度厚生労働科学研究費補助金

(化学物質リスク研究事業)

カーボンナノマテリアルによる肺障害と
発がん作用の中期評価法とその作用の
分子機序解析法の開発に関する研究

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

研究課題：カーボンナノマテリアルによる肺障害と発がん作用の中期評価法とその作用の
分子機序解析法の開発に関する研究

研究代表者：津田 洋幸 名古屋市立大学 津田特任教授研究室 特任教授
研究分担者：五十嵐 良明 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 部長
研究分担者：今泉 祐治 名古屋市立大学大学院薬学研究科 細胞分子薬効解析学分野教授
研究分担者：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
研究分担者：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
研究協力者：澤田 英士 名古屋市立大学大学院薬学研究科 細胞分子薬効解析学分野
研究協力者：大羽 輝弥 名古屋市立大学大学院薬学研究科 細胞分子薬効解析学分野
研究協力者：鈴木 良明 名古屋市立大学大学院薬学研究科 細胞分子薬効解析学分野
研究協力者：山村 寿男 名古屋市立大学大学院薬学研究科 細胞分子薬効解析学分野
研究協力者：大矢 進 名古屋市立大学大学院薬学研究科 細胞分子薬効解析学分野
研究協力者：深町 勝巳 名古屋市立大学大学院医学研究科 分子毒性学分野 助教
研究協力者：飯郷 正明 名古屋市立大学大学院医学研究科 分子毒性学分野 研究員
研究協力者：吉本 恵理 名古屋市立大学大学院医学研究科 分子毒性学分野 技術職員
研究協力者：徐 結 荀 名古屋市立大学津田特任教授研究室 研究員
研究協力者：David B. Alexander 名古屋市立大学津田特任教授研究室 研究員

研究要旨

単層/多層カーボンナノチューブ (S/MWCNT)、フラーレン (C60) 等の炭素ナノマテリアルについて、長期全身曝露試験に代る中・短期の有害作用検出システムの確立を目的として、ラットを用い全身吸入曝露の代替法として当該研究班で開発した経気管内噴霧 (Transtracheal intra-pulmonary spraying, TIPS) 投与方法を用いて、毒性、発がん性の探索とその機序に基づく短・中期 *in vivo-in vitro* 評価モデルの構築を行った。

1) 発がん2段階モデルによるプロモーション作用の検索：MNCNT-Mには明らかな肺腺がんプロモーション作用は見出されなかった。C60では2回の試験で弱いプロモーション作用のあることが示された。両者について方法の妥当性の確認のため、それ自体の作用について確認する必要がある。2) ラットへの短期(9~14日)投与試験による体内分布/毒性/炎症/免疫反応/

増殖性病変の解析：MWCNT-M、MWCNT-N は crocidolite（青アスベスト）と同様に TIPS 投与後に迅速に胸腔内に移行し、中皮の過形成増殖を誘発していた。この所見から肺胞から胸腔に移動して中皮腫を発生させる可能性が示唆された。3）篩板（ふるい）によって分画した MWCNT-N を TIPS 投与した場合、平均長が 2.6 mm 以上の MWCNT は炎症を含む肺障害性より明瞭であった。MWCNT は 52 週経過後に肺胞内肉芽の中や肺胞壁に沈着し、肺胞上皮の過形成性増殖をみたが腫瘍性増殖には至らなかった。65 週以後の長期実験において少数ではあるが自然発生の稀な縦隔、胸腔の肉腫、中皮腫の発生がみられた。このことは、短期の TIPS 投与によって発がん標的臓器は胸膜中皮である可能性が高いことを示唆するものである。アレイ解析では、MWCNT の平均長に関わり無く Cs3、IL6、Cxcl2、Ccl4 などの因子が誘導されて培養上清中に放出され、ヒト肺がん細胞株の増殖を促進した。4）MWCNT-N 曝露後に単離した気管支上皮繊毛細胞では繊毛運動の異常が見られた。MWCNT-N の繊毛への貯留が繊毛運動を含む細胞機能障害さらには細胞障害を引き起こす可能性がある。5）多種のカーボンナノマテリアル中に残存する金属はその種類や製造元によって異なるが、とくに Fe が多く存在した。アルミニウム、バナジウム、モリブデン等も比較的高濃度に検出された。しかし、これら金属の生理食塩水等中への溶出はごくわずかであった。単球由来細胞の皮膚感作性物質に対する抗原提示能は、これら金属塩及び酸化物共存下で変化は認められなかった。以上のことから、MWCNT の免疫反応に、残存する金属の関与は少ないと考えられた。

以上から、TIPS 投与法を用いて、カーボンナノマテリアルの有害作用とくに発がん性について、マクロファージの関与を明らかにした。また、発がん標的は肺胞上皮に加え、胸膜中皮も考慮に入れる必要が充分あることがわかった。さらに通常の 2 年吸入曝露試験に替わる評価法として 40 週以内の発がんプロモーション試験法、有害作用・発がん性機序の解析法として 2 週以内の *in vivo* 試験、およびマクロファージの関与を解析する *in vitro* 試験法を組み合わせた方法が実地に有用であることを明らかにした。

A. 研究目的

ナノサイズの二酸化チタニウム (nTiO₂)、カーボンブラック (nCB)、酸化亜鉛 (nZnO)、銀等のナノマテリアルは広く流通しており、製造者、消費者が曝露されているが、健康影響評価に資するリスク評価データは充分とは限らない。さらに、新規に開発されつつあるフラーレン (C₆₀)、炭素ナノチューブ (CNT) 等の

炭素ナノマテリアルには、有害作用についての知見は極めて乏しく、とくに呼吸器における毒性と発がん性の評価は未だ得られていない。その理由は、主な曝露経路を経る吸入毒性試験には、高価な専用設備と長期試験の実施には莫大な費用が要求され、そのためにこれを補完する中・短期の毒性・発がん性の評価法の開発は必須である。

本研究では、炭素系ナノマテリアルを被検物質として、ラットを用いてこれらの短期有害作用（急性、亜急性毒性、免疫毒性）および慢性毒性・発がん性をより短期（20～40週程度）に明らかにし、その機序（mechanism of action, MOA）を重視した一連の評価システムの開発を行った。被検物質は単層カーボンナノチューブ（SWCNT; N社）及び製造会社の異なる各種多層カーボンナノチューブ（MWCNT）、フラーレン（C60）を用いた。MWCNTでは篩板濾過による大きさの差異についても検討した。

方法は、ラットを用いて、1) TIPS投与方法による20～40週の中期肺毒性・発がんプロモーション作用検出系の開発、2) 炎症、増殖病変、免疫毒性および気道上皮への直接障害作用等の解析のための9～14日間の短期試験、3) 初代培養肺胞・気管支上皮、肺胞マクロファージ、不死化単球細胞および不死化がん細胞等に被検物質を曝露させた場合のサイトカイン産生と免疫反応の解析、増殖反応の把握によるMOAの解明を行った。また被検物質のCNTに含まれる夾雑金属類の量、サイズ、形状の影響にも充分注意を払って実施した。

B. 研究方法

1. 発がん2段階モデルによるプロモーション作用の検討

10週齢雌雄SDまたはF344系ラットに肺発がん物質であるN-bis(2-hydroxypropyl)

nitrosamine (DHPN)を0.2%の用量で最初の2週間飲水投与し、その2週後よりインフルレン浅麻酔下で250及び500 μ g/ml (=250および500ppm)を基準濃度としてポリマーPF68懸濁分散して、1回あたり0.5mlを2週に1回肺TIPS投与し、40週後（18回投与後）に屠殺剖検した。投与試料とその媒体の種類および陽性（発がん性）対照群は以下に記す。

1) 投与試料：

(1) MWCNT-M (M社)「あり姿（製造梱包されたものを篩等で大きさ・形による分画処理を行わない状態）」で1%氷砂糖溶液懸濁

(2) MWCNT-N (N社) (コポリマーPF68懸濁分散) は篩板 (篩目直径25 μ m) による原体 (Whole, W)、濾過分画 (Flow through, FT)、残存分画 (Remaining, R) の3分画に分けた。MWCNTを0.5%PF68含有生理食塩水に懸濁させ、ポリトロンにてホモジナイズ後、直径25mmの孔からなる篩板 (ふるい) にて、FT、R、W分画とした。各分画の電子顕微鏡をプリントアウトし、300～500本のMWCNT線維を画像上でマップメーターにてなぞってMWCNTの長さを測り、平均長を算出した。

(3) C60 (F社) (1%氷砂糖溶液懸濁)

(4) 発がん性プロモーション作用：陽性対照としてマウスとラットの腹腔内投与で中皮腫を発生させるMWCNT-M (あり姿)、ラット肺に発がん性のあるカーボンブラック (CB) (D社、IARC Group 2B)、およびcrocidolite (UICC Grade Asbestos、

IARC Group 1) を適宜用いた。いずれの懸濁液もオートクレーブ滅菌後の被検物質を加えて投与 20 分前まで超音波処理を行い、可能な限り分散状態を維持した。肺および全身臓器への分布と、肺・甲状腺については DHPN 誘発肺胞上皮過形成、腺腫、がんの発生頻度・個数の定量解析を行い、プロモーション作用の検索を行った。さらに明らかな発がんプロモーション作用の見られなかった MWCNT については篩板分画の長期投与実験も実施した (津田、酒々井、二口)。

2. 短期投与による毒性/炎症/免疫反応/増殖性病変の解析

1) 「あり姿 (製造梱包されたものを篩等で大きさ・形による分画処理を行わない状態)」の SWCNT-N、MWCNT-M および MWCNT-N について、0.1% Tween 含有生食またはコポリマー PF68 に分散して、二段階発がん試験法と同じ方法で投与した。

(1) 肺と胸腔の炎症の観察：10 週齢の雌 SD または F344 ラットに 9 日間に合計 5 回 TIPS 投与し、最終投与から 6 時間後および一部は 30 日後に、イソフルレン麻酔下で開腹後、DMEM 細胞培養液を経横隔膜にて注入して胸腔洗浄液を吸引採取した。血球計算機を用いて洗浄液中の細胞数を測定した後に遠沈し、得られた細胞ペレットを 4% パラフォルム固定後、パラフィンブロックとした。肺も 4% パラフォルム固定後、光顕および電顕標本を作成し、炎症反応の程度および被検物質が

マクロファージに取り込まれているか病理学的に検討した。さらに被検物質の肺、肝、腎、脾、脳、リンパ節および全身臓器への移動について詳細に観察した。洗浄液ブロックと肺は病理標本の走査型 (SEM)、および戻し電顕エポソ包埋標本にて透過型 (TEM) 電子顕微鏡標本をつくり、凝集体の観察と元素同定を行った。また、肺の一部は -80° にて保存した (津田、酒々井)。

(2) 異物を貪食したマクロファージのタイプの同定：肺組織標本を用い、CD68 (マクロファージのマーカー)、CD163、CD204 (いずれも腫瘍発生促進作用に関与する M2 型マーカー) の免疫染色を行い、どのタイプのマクロファージがどの割合で誘導されているのか検索した。さらに、crocidolite を貪食したマクロファージが分泌する IL1 β および MIP1 α の免疫染色とサイトカインの分泌について、TIPS 投与後 30 日経過の状態を観察した (二口)。

(3) 肺凍結試料の炎症性サイトカインと増殖因子の同定：凍結標本による mRNA マイクロアレイおよびサイトカインアレイによる解析を行い、病理標本では偏光顕微鏡による被検物質の局在、免疫染色による増殖因子の局在の同定・解析、電顕にて被検物質の同定を行った (津田、酒々井、二口)。

2) 篩板分画によるサイズの異なる MWCNT の肺障害性と発がん性の検証：PF68 懸濁 MWCNT (N 社) について、篩板濾過前原体 (Whole, W)、篩板濾過 (Flow

through,FT)、濾過残存 (Remaining,R) の各分画をそれぞれ単独で投与した。10週齢雄 F344 ラットに各分画を2週間に8回 (計 1.0mg) TIPS 投与した。最終投与6時間後に動物を安楽死させ肺を摘出して解析を行った。肺から total RNA およびタンパクを抽出し、マイクロアレイ解析で発現が増加した遺伝子の mRNA およびタンパク発現を検証した。また各 HE スライドを IPAP イメージングシステムにて取り込み炎症細胞浸潤の面積を計算した。炎症面積 (mm²) をスライド上の肺組織全体の面積 (mm²) で割ることにより平均炎症面積 (%) を算出した。MWCNT は偏光顕微鏡にて局在を確認した。また、同様処置後、52週および104週まで観察する長期試験群を設け観察した。(酒々井、津田)

3) MWCNT を貪食したマクロファージのタイプの同定：肺組織標本を用い、CD68(マクロファージ共通マーカー)、CD163、CD204 (発がん促進に関与する M2 型マーカー) の免疫染色によって、誘導されたマクロファージのタイプを解析した。さらに、CRO を貪食したマクロファージが分泌することが知られているサイトカインである IL1 β および MIP1 α が TIPS 投与後 30 日経過しても維持されるか免疫染色にて解析した (二口)。

4) *In vivo* でのカーボンナノチューブ噴霧による気道上皮組織機能への影響及び細胞障害性の評価では、気道内へチューブを挿入し「あり姿」の MWCNT-N を

TIPS 投与し、7日後に気道上皮組織を摘出し非固定のままチャンバー内でカーボンナノチューブの貯留を観察する。他のナノマテリアル (球形マイクロスフェアなど) を噴霧・吸引した場合の貯留を定量的に比較する方法を開発し、気道での異物クリアランス評価法としての確立を目指した。

In vivo でのカーボンナノチューブ TIPS 投与による気道上皮組織機能への影響と細胞障害性の評価：上記の TIPS 投与方法で MWCNT-N を投与し、7日後に気道上皮組織を摘出し未固定のままチャンバー内でカーボンナノチューブの貯留を観察した。他のナノマテリアル (球形マイクロスフェアなど) を TIPS 投与・吸引した場合の貯留を定量的に比較する方法を開発し、気道での異物クリアランス評価法としての確立を目指した (今泉)。

3. *in vitro* 系による貪食マクロファージを介する炎症と培養液の不死化細胞に対する増殖活性、気管上皮の障害、および免疫担当細胞反応の解析

1) マクロファージの活性の解析：正常 F344 雄ラットにチオグリコレート (6% 溶液 0.5ml/rat) を4日間に3回 TIPS 投与して肺胞マクロファージを誘導した後にイソフルレン麻酔下に肺を取り出し、細切してマクロファージを濾過採取し、一定数を RPMI 1640 (10% FBS) 培地に移し、その培養液中に「あり姿」の MWCNT-M (津田)、篩板分画した MWCNT-N (酒々井)

を 10ppm の濃度で加えてマクロファージに曝露し、24 時間後に培養上清を採取して、ヒト肺がん細胞株 A549、ヒト中皮細胞株培養液に加えて 24 時間後に増殖に及ぼす影響を MTT アッセイにて検討した。さらに、培養肺マクロファージから total RNA を抽出し、マイクロアレイ解析 (東レ, Rat Oligo 20k) にて各分画に特異的に発現誘導される遺伝子 (群) を網羅的に解析した (酒々井)。発現が増加した遺伝子について mRNA およびタンパク発現を RT-PCR 法およびウエスタンブロット法にて解析した。また、上記の実験において、ラットの胸膜中皮の過形成増殖を見たことから、MWCNT-M、N を TIPS 投与したラット胸水を採取して、ヒト不死化中皮細胞、悪性中皮腫細胞に対する増殖活性を検討した (津田、酒々井)。

2) MWCNT-N の TIPS 投与による初代培養マウス気道上皮繊毛細胞における繊毛運動評価、細胞内 Ca^{2+} 濃度測定、イオンチャンネル機能の解析：

マウス気道上皮組織から、コラゲナーゼ処理により細胞を単離し初代培養を行った。細胞は各種の上皮細胞が混ざっている状態で培養された。顕微鏡下、繊毛運動の見られる繊毛細胞にパッチクランプ法を適用し、膜電流を解析した。また細胞内 Ca^{2+} 濃度を Ca^{2+} 蛍光色素 fura2 あるいは fluo3 を用いることにより、膜電位を電位感受性蛍光色素 DiBAC₄(3)により、それぞれ測定した。繊毛運動は高速デジタルビデオカメラを用いて画像として取

り込み、繊毛運動を定量的に解析した。「あり姿」の MWCNT-N 懸濁液を初代培養繊毛細胞へ適用し、画像解析を行った (今泉)。

3) 免疫能、夾雑金属、粒度分布の測定および細胞表面抗原の解析：

「あり姿」の多層カーボンナノチューブ (MWCNT) は、MWCNT-M、MWCNT-N、MWCNT-S を用いた。金属酸化物として、酸化鉄懸濁液 (Fe_2O_3)、酸化アルミニウム懸濁液は、 Al_2O_3 -X (45 nm) 及び Al_2O_3 -A (10~20 nm) を用いた。金属塩は、 $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ 、 VCl_3 、 $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ 、 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 、 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 及び $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ を用いた。細胞は、ヒト単球由来細胞株 THP-1 細胞 (ATCC) を用い、10% 牛胎児血清 (FBS)、1% antibiotic-antimycotic 溶液 (Invitrogen 社) 及び 0.055 mmol/ml 2-mercaptoethanol を含有する RPMI-1640 培地 (FBS-RPMI) にて培養した。

(1) 細胞表面抗原の解析：前年度同様に、h-CLAT法を参考に若干変更して試験した。THP-1 細胞浮遊液及び試験物質を 24 穴プレートに各穴に入れ 24 時間培養後、2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB) を加えて更に 24 時間培養した。細胞を BSA-PBS で洗浄後、0.01 % globlins-PBS 溶液でブロッキング処理した。次に FITC 標識抗 CD86 抗体、FITC 標識抗 CD54 抗体または FITC 標識マウス IgG1 でそれぞれ染色し、BSA-PBS に再懸濁後、PI 溶液を加えた。フローサイトメーターを用いて細胞生存率 (%) を求め、10000 個の生細胞について CD54 及び CD86 抗原の平均蛍光強度

(mean fluorescence intensity, MFI) を測定し、試験溶液で処理した時のコントロールに対する相対蛍光強度 (%) を求めた。金属塩については、主として塩化物を増強効果の有無を確認するために用いた。

(2) 夾雑金属の定量分析：分散型蛍光 X 線分析装置を用いて、試料約 0.01～0.02g に種々の分解溶液(硝酸または硝酸とフッ化水素酸混液等) 5ml を加えて高温高圧下でマイクロウェーブ処理した。分解液を水で希釈したものを試験溶液とした。これを He モードの ICP-MS に導入し、Al, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, As, Se, Rb, Mo, Cd, Sn, Sb, Cs, Ba, W, Tl, Pb それぞれの質量数に相当するイオンカウントを測定し、検量線から試料溶液の金属を定量した。また、試料を各種媒体(酸、生理食塩水、細胞培養液)に浸漬して一定時間放置後、溶出金属を定量した。

(3) 粒度分布の測定：金属酸化物ナノ粒子の懸濁液を、各溶媒(水、生理食塩水等)で 0.1%程度に希釈し後、動的光散乱法を原理としたゼータサイザーナノ(nano-ZS, Malvern 社)により粒度分布を測定した(五十嵐)。

4. データのヒトへの外挿とリスク評価

以上の実験より、SWCNT、MWCNT、フラーレンについて、陽性対照の CB (肺発がん)、MNCNT-M(中皮腫発がん)およびアスベスト(肺腺がんと中皮腫発がん)

と比較することによって、毒性および発がんプロモーション作用の機序に關与する因子をそれぞれの被検物質について解析し、最終的には動物より得られたデータからヒトリスクへの外挿を試みた(津田)。

倫理面への配慮

本研究における倫理面への配慮については、各班員は動物実験及び所属施設において、我が国の「動物の保護及び管理に関する法律(昭和 48 年 10 月 1 日、法律第 105)」並びに「実験動物の飼育及び保管等に関する基準(昭和 53 年 3 月 27 日、総理府告示第 6 号)に準拠するとともに、当該規程に基づく各施設の動物実験倫理委員会の審査を経て研究を実施する。ヒト材料を用いる実験は実施しなかった。

C. 研究結果

1. 発がん 2 段階モデルによるプロモーション作用および長期投与の影響

1) 「あり姿」MWCNT-M：前回氷砂糖溶液(財化学物質評価研究機構提供)に懸濁して DHPN 投与後に 125, 250, 500ppm を 40 週投与した実験では明らかなプロモーション作用はなかった。予備試験において、この懸濁液では分散状態は良いが単独で肺毒性(炎症像)が観察されたことから、この実験では、分散性に優れかつ肺胞上皮に対する毒性(起炎症作用)の少ない PF-68 コポリマーを用いて再実験した。その結果、肺胞上皮過形成の発生に弱いプロモーション作用が見られたが肺胞上皮腺腫・腺が

ん発生における明らかなプロモーション作用は無かった（津田、二口）。

2) 分画 MWCNT-N：篩板濾過（FT）、濾過残存（R）、篩板濾過前原体（W）の各分画の平均長は、FTは 2.6 ± 1.6 mm、Wは 4.2 ± 2.9 mmであり（ $P<0.001$ ）、Rは塊状で測定不能であった。FTおよびWの平均長別本数の分布はFTが急峻な立ち上がりを持つ正規分布、Wは比較的なだらかなカーブを描く正規分布であった。まず検体投与のみの実験を全経過 52 週と 104 週の実験を開始した。9月に屠殺した。曝露後 52 週群では、長期試験の肺組織では、肺胞間質でのMWCNTの沈着、マクロファージがMWCNTを貪食した像を認めた。肺胞壁の線維化、肺胞上皮細胞の過形成、限局的な横隔膜中皮細胞の増生を認めた。増生した組織中にMWCNT 繊維の沈着を認めた。3 分画での炎症面積（FT: $46\pm 11\%$ 、R: $39\pm 17\%$ 、W: $52\pm 12\%$ ）は溶媒対象群（ $3.0\pm 1.4\%$ ）と比較して有意に増加していた（ $P<0.05$ ）。3 分画での線維化の数（9～11 個/mm²）は溶媒対象群（0.1 個/mm²）と比較して有意に増加した。分画間での差はなかった。臓側胸膜上の中皮細胞の増生病変の数は溶媒対象（ 0.02 ± 0.05 個/cm）と比較して3 分画共に（FT: 0.47 ± 0.32 個/cm、R: 0.28 ± 0.22 個/cm、W: 0.23 ± 0.16 個/cm）有意に増加していた（ $P<0.05$ ）。炎症細胞浸潤は80～100%の頻度で誘発された。これらの分画間の有意差はなかった。104 週投与群では、経過観察中であるが、死

亡例において65週で腺がん（原発不明）、66週で縦隔悪性組織球腫、78週で胸腔肉腫（中皮腫疑い）の発生がみられた（酒々井）。

3) C60：DHPN投与後に250と500ppmで1回/週で24週まで投与し、40週にて終了した。肺胞過形成の標本単位面積あたりの発生個数は、雄で溶媒対照群 6.9 ± 2.7 個、250ppm 7.8 ± 1.7 個、500ppm 9.6 ± 2.8 個、雌で溶媒対照群 8.4 ± 3.0 個、250ppm 10.2 ± 4.9 個、500ppm 12.3 ± 3.4 個であり濃度依存性の促進作用が観察された（二口）。CBでは対照群との差異は見られなかった。

2.短期（9～14日）投与による毒性/炎症/免疫反応/増殖性病変の解析

1) 「あり姿」MWCNT-M、MWCNT-Nによる肺と胸腔内炎症および多臓器への移動:

「あり姿」のMWCNT-M、MWCNT-N、crocidoliteについて、250ppm（1%Tween含有生食）懸濁液を9日間に5回TIPS投与し、肺、胸腔と全身臓器の分布を観察した。肺胞内ではMWCNTを貪食したマクロファージ、好中球、リンパ球が混在する線維化炎症巣が散在性に発生した。胸膜洗浄液の炎症細胞数（マクロファージ、好中球、リンパ球）は、対照群で $7.35/10^4$ mlに対して、MWCNT-Nは11.20、MWCNT-Mは13.95、crocidoliteは12.13で有意に増加し（ $p<0.05\sim 0.001$ ）、成分はマクロファージが最も多かった。胸腔生食洗浄液ペレットと各臓器の標本の偏光顕微鏡とSEM観察では、胸腔洗浄液ペレット標本では

MWCNT はマクロファージ内に散見され、また縦隔リンパ節、肝、腎、脳にも少数観察された。これらの物質は全身にも少数見られ、とくに縦隔リンパ節に多く検出されることから、肺胞からリンパ流を介して縦隔に入ったと考えられた。

注目すべきは、臓（肺）側胸膜中皮細胞の過形成増殖巣が発生し、中皮 8 個以上からなる過形成巣数の PCNA 値が 9~10 倍 ($p<0.001$) に増加した。さらに、胸腔浸出液の上清にはヒト不死化中皮細胞の増殖活性 (1.2~1.4 倍) が見出された

(Xu, et al., *Cancer Science*, vol.103, p2045, 2012)。なお、SWCNT-N は細く、偏光活性が無いために偏光顕微鏡では局在の正確な特定が困難であったが、Cytoviva 社の暗視野顕微鏡による観察で捕捉することが可能であることが判ったので、その導入による確認が今後の課題である (津田)。

2) 篩板分画による MWCNT の肺障害性、サイトカインのアレイ解析：3 分画共に炎症細胞浸潤、異物肉芽腫を惹起した。FT 分画での炎症面積 ($57\pm 9\%$) は溶媒対象群 ($29\pm 18\%$) および他の 2 分画 (R: $36\pm 13\%$ 、W: $37\pm 10\%$) と比較して有意に増加していた ($P<0.05$)。臓側胸膜上の中皮細胞の増生病変の数は 3 分画で溶媒対象と比較して増加傾向にあったが有意差は認めなかった。また、横隔膜における中皮細胞は限局性に重層状に増生していた。

3 分画での炎症面積 (FT: $46\pm 11\%$ 、R: 39

$\pm 17\%$ 、W: $52\pm 12\%$) は溶媒対象群 ($3.0\pm 1.4\%$) と比較して有意に増加していた ($P<0.05$)。3 分画での線維化の数 ($9\sim 11$ 個/ mm^2) は溶媒対象群 (0.1 個/ mm^2) と比較して有意に増加したが、各分画間の差はなかった。臓側胸膜上の中皮細胞の増生病変の数は溶媒対象 (0.02 ± 0.05 個/ cm) と比較して 3 分画共に (FT: 0.47 ± 0.32 個/ cm 、R: 0.28 ± 0.22 個/ cm 、W: 0.23 ± 0.16 個/ cm) であり対照より有意に増加していた ($P<0.05$) が分画間の差異はなかった。

サイトカインタンパク発現プロファイル検討において、培養肺マクロファージに各分画を曝露した後、total RNA をサンプルとしたマイクロアレイ解析ではサイトカイン遺伝子 Csf3 (9 倍)、IL6 (11 倍)、Cxcl2 (7 倍)、Ccl4 (6 倍) の発現が上昇していた。次に RT-PCR アッセイにて mRNA 発現レベルを検討した結果、Csf3 で 19 倍、IL6 で 6 倍、Cxcl2 で 3 倍、Ccl4 で 3 倍の有意な発現上昇がみられた ($P<0.05$)。

Pathway 解析にて 4 遺伝子共にマクロファージに関連したものであることを確認した。短期試験および長期試験での複数個体の肺組織からタンパクを抽出し、ウエスタンブロット法にてタンパク発現レベルを検討した。短期試験では Csf3 および IL6 の FT および W 分画での発現レベルが上昇していた。Csf3 および IL6 の R 分画では長期試験での発現レベルは短期試験の発現レベルより上昇傾向にあった。一方、短期試験および長期試験において Cxcl2 および Ccl4 では 3 分画共に発現レベルが

高い傾向にあった。(酒々井)。

3) MWCNT および C60 および CB を貪食したマクロファージのタイプの同定：

(1) TIPS 投与直後：肺組織では、肺野に観察された CD68 陽性マクロファージの数(個/cm²)は、VEH 群、SWCNT-N 群、MWCNT-N 群、MWCNT-M 群および CRO 群では、それぞれ平均 45 個、253 個、272 個、316 個および 266 個であり溶媒対照群に比べ有意に増加していた。CD204/CD163 陽性マクロファージの数は対照群、SWCNT-N 群、MWCNT-N 群、MWCNT-M 群および CRO 群では、それぞれ平均 47 個、86 個、94 個、98 個および 96 個で、肺野に誘導されたマクロファージのうち CD204 陽性となるのは 23-49%であった。また CD163 陽性となったマクロファージの数は少なく、いずれの群でも 5%以下であった。IL-1 β 陽性マクロファージの数は CRO 群では 79 個/cm² 観察され、そのうち 30%が IL-1 β を分泌していることが明らかとなった。この他の噴霧群では、1.6~7.3 個と IL1 β を分泌するマクロファージはほとんど観察されなかった。

(2) TIPS 投与後 30 日：炎症の程度：SWCNT-N および MWCNT-N では軽度の異物反応が遷延していたが、他の検体群では貪食マクロファージが散見されたのみで炎症性変化はほとんど観察されなかった。CD68 陽性マクロファージの数は対照群、SWCNT-N 群、MWCNT-N 群、MWCNT-M 群および CRO 群では、それぞれ 68 個、153 個、155 個、129 個および 96 個

で、TIPS 直後のマクロファージの数を 100%とすると、噴霧後 30 日経過時点で観察されたマクロファージの数は 36%-60%と、有意に減少した。CD204/CD163 陽性マクロファージの数：VEH 群と同じ程度であった。IL1 β 陽性マクロファージの数：いずれの噴霧群でもほとんど観察されなかった。以上から、腫瘍促進作用が知られる CD204 陽性マクロファージは、噴霧直後にいずれの噴霧群でも多数誘導されたが、30 日経過するとその数は対照群と同じ程度にまで減少した。(二口)。

4) 初代培養マウス気道上皮繊毛細胞における繊毛運動評価

マウス呼吸器系器官(気管・気管支)より酵素処理によって急性単離した上皮繊毛細胞から膜電流を測定したところ、ATP 感受性 K⁺ (KATP)チャネル開口薬の diazoxide で活性化され、阻害薬の glibenclamid で抑制される電流成分の存在が明らかとなった。繊毛細胞だけを微小吸引ピペットで 30 個ほど採取し、主に K⁺ チャネルに関して網羅的に RT-PCR 解析したところ、上記電流成分に対応した Kir6.2 チャネルと修飾分子である SUR2.1 の発現が見出された(今泉)。

3. *in vitro* 系による貪食マクロファージを介する炎症と培養液の不死化細胞に対する増殖活性、ならびに気管上皮の障害、免疫担当細胞反応の解析

1) MWCNT-M、MWCNT-N、C60 の 5 回/9 日の TIPS 投与によるサイトカインアレイ解析：*In vivo* にて観察されたラットの胸

膜中皮の過形成増殖の機序解析のために、正常ラット初代マクロファージを肺より集めて培養液に移して、「あり姿」MWCNT-M、MWCNT-N および crocidolite を投与した培養液上清、およびこれらの物質を投与したラットの胸水上清のヒト不死化中皮細胞、悪性中皮腫細胞に対する増殖活性は、*in vitro* と *in vivo* の両系においていずれの物質にも対照の 1.3~1.4 倍に増加した (津田)。

C60 を貪食した初代培養マクロファージから回収した培養上清は、ヒト中皮細胞株 Meso1 の増殖促進作用を示さなかったが、ヒト肺癌培養細胞株 A549 の細胞増殖促進作用が観察された。また、この培養上清には Endothelin-1(ET-1)が含まれていることが明らかとなった。一方、CB を貪食したマクロファージから回収した培養上清には、A549 および Meso1 を用いた検索でも細胞増殖促進作用がみられなかった。また、肺発がん二段階中期検索法でも発がんプロモーション作用も検出されなかった (二口)。

2) W、FT、R 分画の細胞増殖活性：各分画を貪食させたマクロファージの培養上清はト肺癌細胞株 A549 に対して 18~20%有意に増加した ($P<0.01$) が分画間での有意差はなかった。マクロファージに 10ppm 濃度の W、FT、R 分画を 24 時間曝露し、RNA サンプルを用いたマイクロアレイ解析では、増殖系遺伝子群では Csf3 (コロニー増殖因子) が 9 倍、サイトカイン系遺伝子群では IL6 (インタ

ーロイキン) が 11 倍でありそれぞれ最も発現が高かった。マクロファージ系遺伝子群では、Cxcl2 (Mip2) が 7 倍および Ccl4 (Mip1beta) の発現が 6 倍に上昇していた。RT-PCR アッセイでは、上記 4 遺伝子の mRNA 発現はいずれの分画でもコントロールに比べて Csf3 が 19 倍、IL6 が 6 倍、Cxcl2 が 3 倍、Ccl4 が 3 倍と有意に増加していた ($P<0.05$) (ただし分画間での有意差なし)。タンパク発現についてもタンパク発現については各分画の発現量はコントロールに比べて増加傾向を示した (酒々井)。

3) 気管支上皮細胞の膜電位と細胞内 Ca^{2+} 濃度および繊毛運動に及ぼす影響：急性単離した繊毛細胞をパッチクランプ法による電位固定下、パッチピペットから Ca^{2+} 感受性蛍光色素 fluo3 を細胞内へ導入し、細胞内 Ca^{2+} 濃度を測定した。その結果、

(1) 膜電位と細胞内 Ca^{2+} 濃度および繊毛運動の関係を明らかにするために、急性単離した繊毛細胞をパッチクランプ法による電位固定下、パッチピペットから Ca^{2+} 感受性蛍光色素 fluo3 を細胞内へ導入し、細胞内 Ca^{2+} 濃度を測定した。その結果、膜電位を-過分極させることにより、細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇し、この上昇は外液中の Ca^{2+} 除去により消失することを発見した。さらに膜電位固定化下での過分極時に繊毛運動が増強されることを高速画像解析により明らかにした。

(2) K_{ATP} チャンネル開口薬の diazoxide

の適用により繊毛細胞に過分極が生じ、細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇すること、また繊毛運動も増大することを見出した。これらは glubenclamid により抑制された。

(3) 単離繊毛細胞にカーボンナノチューブの懸濁液を灌流したところ、細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇した。また一定時間洗浄後にも、ナノチューブの繊毛への貯留が認められた。一方、直径 1 ミクロン程度の蛍光球形ビーズを同様に適用したところ、顕著な Ca^{2+} 濃度変化はなく、また洗浄後の繊毛中への貯留は認められなかった。

(4) 繊毛細胞培養液中にカーボンナノチューブ懸濁液を加えて数日間培養したところ、vehicle のみを加えた群に比べ、半日後には有意に繊毛運動を停止している繊毛細胞の割合が増加した。また 18 時間後にはカーボンナノチューブ適用群において、繊毛細胞の割合が有意に減少した。

(Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics, 2013, in press) (今泉)。

4) 免疫能、夾雑金属、粒度分布の測定および細胞表面抗原の解析

(1) 金属分析：「あり姿」MWCNT-M に細胞培養液を加え 30 分間超音波洗浄器で処理して懸濁後、24 時間静置した。フィルターろ過し、マイクロウェーブ分解したものについて ICP-MS を用いて定量した。MWCNT を添加しない培養液についても同様に操作し、これと比較して増加が認められるものを MWCNT からの

溶出金属とした。培養液の濃度変化が認められた金属は V、Mo、Mn で、うち Mo の増加が最も大きかった。MWCNT-M から V が溶出し、10 mg 当たり約 0.03 μg であった。MWCNT-SD2 は Mn と Mo の溶出が認められ、Mn は 0.01~0.03 μg 、Mo は 2~5 μg と計算された。MWCNT 中に比較的多く定量された Fe と Al については、培養液の値と MWCNT 抽出液との値の間に変化はなかった。MWCNT に残存するとされた金属は酸化物であると仮定し、以下細胞に与える影響を金属酸化物で試験した。比較的大量に含まれる Fe と Al について試験した。酸化鉄については昨年度実施したため、2 種の酸化アルミニウム (Al_2O_3) を検討した。 Al_2O_3 -6 (一次粒子径 45 nm) の水希釈時の平均粒子径は 154 nm (PdI 0.145) であった。血清中でも粒子径はほとんど変化ないが、培地中では著しく凝集した。 Al_2O_3 -7 (一次粒子径は 10~20 nm) も同様の平均粒子径を示した。培地中では分布幅が広がり平均粒子径も大きくなるが (502 nm、PdI 0.454)、 Al_2O_3 -6 ほどではなかった。

(2) 細胞表面抗原発現に及ぼす影響：THP-1 細胞に上記試験で得られた細胞毒性のない濃度で各金属酸化物を添加して 24 時間培養後、DNFB が最終濃度 3.5 または 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるよう加え、更に 24 時間培養した。金属及び DNFB を加えず培養した時 (コントロール) の細胞表面抗原 CD54 及び CD86 の発現量を 100 としたときの相対率 (%) を求めた。金属酸化物ナ

ノ粒子 Al_2O_3 で処理しても CD86 及び CD54 の発現量は増加せず、DNCB によるこれらの表面抗原の発現率の増加に対しても影響なかった。次に、各金属塩で細胞を前処理した後、DNCB を適用した。 FeCl_2 、 FeCl_3 、 AlCl_3 、 VCl_3 及び Na_2MoO_4 は DNCB の反応を増強することはなかった (図 2)。

各種 MWCNT 抽出物について同様に前処理の効果を調べた。CD54 の発現率には影響なかった。CD86 の発現率がコントロールの 150%を超えるものがあるが、DNCB による発現率が MWCNT 抽出物によって増強されるようなことはなかった。また、ケモカイン産生に及ぼす影響では、金属塩の感作誘導反応の増強効果を試験した培養上清について、ケモカイン及びサイトカイン濃度を測定した。コントロールと比べて明確な増加が認められたものは IL-8 であった。IL-8 産生量を指標として、 FeCl_2 、 FeCl_3 または MnCl_2 の前処理による効果について調べたが、一部を除き増強はなかった (五十嵐)。

D. 考察

この研究の難しいところは、被検物質として扱う炭素ナノマテリアルの生体作用を明らかにしつつ評価法の開発を同時に行うことにある。そのために、以下の基本的枠組みを設けて有害作用を観察しつつ効率よく評価系の開発を行った。ラットへの投与は検体を肺内に効率よく送達できる TIPS 法を用いた。

1. 発がん 2 段階モデルによるプロモーション作用の検討

2. ラットへの短期 (9~14 日) 投与を行った場合の肺、気管上皮組織における毒性/炎症/免疫反応/増殖性病変の解析

3. *in vitro* 系による初代培養マクロファージに検体を貪食させた場合の炎症ならびに気管上皮、免疫担当細胞反応の解析

MWCNT-M は分散液中あるいはリンパ節、胸腔内等では異物として認識されてマクロファージに貪食される。これを光学顕微鏡と電子顕微鏡で観察すると、様々な大きさと形態の凝集塊を呈していた。このような形態や大きさの違いが、肺の炎症やマクロファージの動員、他臓器への移動のメカニズムに関与するかを明らかにするには、生体影響を明らかにする上で重要なポイントになる。その目的で、あり姿 (製造されたままで凝集体を形成) と濾過による大きさまたは線維の長さの違いの影響を把握することが必要となった。

1) 「あり姿」の MWCNT-M と MWCNT-N

(1) あり姿 MWCNT-M: 氷砂糖溶液 (財化学物質評価研究機構提供) に懸濁して DHPN 投与後に 125, 250, 500ppm を 40 週投与した実験を 2 回実施したが、肺胞上皮由来の発がんには明らかなプロモーション作用を結論づける結果は見られなかった。今後の研究で確認する必要がある。

(2) 1% Tween 含有生食または氷砂糖溶液に懸濁した被検体 250ppm 懸濁液を 8 日間に 5 回 TIPS 投与し、胸腔と全身臓器の分布を観察したところ、胸膜洗浄液ではい

ずれの検体も主としてマクロファージに貪食された状態で観察された。胸膜洗浄液以外では縦隔リンパ節、肝、腎、脳に少量見出されたことから、リンパ、血液を介して肺から全身に移動することが明らかとなった。また臓（肺）側胸膜中皮細胞の増殖巣が発生したことは、MWCNT の腹腔内投与による中皮腫の発生の機序の一端を担うものと考えられた。また、アスベスト吸入による悪性中皮腫の発生における初期変化とも考えられる。したがってMWCNTの発がん標的は肺胞上皮よりはむしろ胸膜中皮である可能性が考えられる（津田）。

（3）濾過分画は、篩目 25 μ m の篩板を用いて篩板濾過前（W）、篩板濾過分画（FT）、濾過されない残存分画（R）に分画した。*in vitro* 系ではすべての分画（平均長が 2.6~4.2 mm）でコロニー刺激因子（Csf3）の mRNA 発現がみられた。貪食肺マクロファージは Csf3, IL6, Cxcl2, Ccl4 などの因子を放出しヒト肺がん細胞株の増殖を促進したと考えられる。*in vivo* では MWCNT（W）の曝露により沈着部位の肺胞上皮の増殖は排出されない限り持続的に存在し、52 週を経た時点でも観察され、上記 4 遺伝子のタンパク発現が維持される。CNT の肺投与による特に、2 週目より誘発された Cxcl2 と Ccl4 遺伝子のタンパク発現は 52 週後でも維持されており、これら 2 つの遺伝子は MWCNT の曝露マーカーになり得る。DNPN による肺胞上皮発がんイニシエー

ション処置を行わない実験で死亡例において 65 週で腺がん（原発不明）、66 週で縦隔悪性組織球腫、78 週で胸腔肉腫（中皮腫疑い）の発生がみられたことは、とくに後 2 者には自然発生が稀であることを勘案すると MWCNT には縦隔組織と胸膜中皮に弱い発がん作用がある可能性がある（酒々井）。

2) C60 の吸入曝露による肺発がん性は未知であるが、CB は、IARC では雌ラットの肺に発がん性が認められ Group 2B に分類されている。本研究では *in vivo* 短期試験および *in vitro* アッセイ系において、C60 の肺胞上皮の増殖促進作用が示された。一方、CB においては、肺胞上皮の増殖促進作用がみられず、肺発がん促進作用も検出されなかった。肺発がん性が検出できなかったのか追究する必要がある。IARC 2B の根拠となった実験では雌ラットの実験なので感受性の差異によるのかもしれない。（二口）。

3) MWCNT に含まれる Fe は生体内で Fenton 反応によって水酸化ラジカルを発生して DNA 障害をもたらし、発がんへの関与が疑われている。カーボンマテリアルの製造には触媒金属を用いることが知られているが、Fe は多くの MWCNT に検出されると同時に Fe 意外の種々の金属も検出された。しかし溶出試験の結果からは、これらの金属が生体に吸収されたとしても遊離量はごくわずかと考えられた。これら金属イオン及び酸化物共存下で細胞の皮膚感作性物質に対する抗原提示能は変

化せず、免疫増強作用はないと思われた（五十嵐）。

4) 繊毛細胞は電位依存性の Na^+ や Ca^{2+} チャンネル発現がない典型的な非興奮性細胞であり、過分極誘発性 Ca^{2+} 濃度上昇は、電位非依存性・非選択性陽イオンチャンネルを介する流入と考えられた。繊毛細胞には K_{ATP} チャンネルが機能発現していることを初めて明らかにした。 K_{ATP} チャンネル開口薬投与は過分極を引き起こし Ca^{2+} 流入増大を介して繊毛運動増強を生じさせたことから、 K_{ATP} チャンネル開口薬を気道閉塞性疾患（喘息や COPD）の治療薬や去痰薬として用いる可能性を示唆する結果を得たと考える。また繊毛運動に対するカーボンナノチューブの影響に関する評価系として、*in vitro* 系の確立に成功しつつある。高速画像解析法による繊毛運動解析や細胞内 Ca^{2+} 濃度測定などにより、今後、さらに定量性の高い評価系の確立を目指すことができよう（今泉）。

E. 結論

多種のナノマテリアルの短期、長期の有害作用の検出システムの開発と標準化モデルの確立を目的として、以下の枠組みを設けて研究を実施した。

1) 発がん2段階モデルによるプロモーション作用の検索：MWCNT-M について肺腺がんプロモーション作用は見出されなかった。

2) ラットへの短期（9～14日）投与試験による体内分布/毒性/炎症/免疫反応/増

殖性病変の解析：MWCNT-M、MWCNT-N は crocidolite（青アスベスト）と同様には短期 TIPS 投与試験において迅速に胸腔内に移行し、臓側中皮の過形成増殖を誘発していたこと、この所見はこれらの吸入によって肺内から胸膜腔へ移動することが明らかになった。今後再度の確認が必要である。

3) 篩板（ふるい）によって MWCNT-N を分画し、ラットへ TIPS 投与した場合、分画に関わり無く平均長が 2.6 mm 以上のものには炎症を含む肺障害性がある。さらに平均長に関わり無く Csf3、IL6、Cxcl2、Ccl4 などの因子が誘導されてヒト肺がん細胞株の増殖を促進した。しかし、長期試験では 52 週経過後には肺胞上皮の過形成性増殖を来しているが腫瘍の発生には至らなかった。104 週の長期実験は経過中であるが 65 週以後に少数ではあるが自然発生の稀な縦隔、胸腔の肉腫、中皮腫の発生がみられた。従って、発がん標的臓器は肺胞上皮に対しては弱く、むしろ胸膜中皮を標的とする可能性が高い。

4) C60 による肺発がんメカニズムには ET-1 を介して惹起されることが明らかとなった。さらに C60 の TIPS 投与により、雄、雌ともに肺発がん促進作用が示唆された。

5) 多種のカーボンナノマテリアル中に残存する金属では Fe が多く存在した。Fe 以外にはアルミニウム、バナジウム、モリブデン等が検出された。しかし、これら金属の生理食塩水等中への溶出はごくわずか

であった。単球由来細胞の皮膚感作性物質に対する抗原提示能は、これら金属塩及び酸化物共存下で変化は認められなかった。以上のことから、MWCNTの免疫反応に、残存する金属の関与は少ないと考えられた。

6) カーボンナノマテリアルによる繊毛細胞機能への影響や繊毛細胞障害性を検討する上で、繊毛運動の制御機構について、十分な知見を得ることがまず必要であった。ATP依存性K⁺チャンネル開口薬により過分極を介して細胞内Ca²⁺濃度が上昇し、繊毛運動が活性化されたことから、異物排泄の新たな機序が明らかとなった。本成果は繊毛細胞での繊毛運動の新たな調節機構を明らかにするとともに、ナノマテリアル吸入による繊毛細胞障害評価系の確立に向けて確実な一步を刻むものとなった。

以上から、TIPS投与方法を用いて、カーボンナノマテリアルの有害作用とくに発がん性について、マクロファージの関与を明らかにした。また、発がん標的は肺胞上皮に加え、胸膜中皮も考慮に入れる必要が充分あることがわかった。さらに通常の2年吸入曝露試験に替わる評価法として40週以内の発がんプロモーション試験法、有害作用・発がん性機序の解析法として2週以内の*in vivo*試験、およびマクロファージの関与を解析する*in vitro*試験法を組み合わせた方法が実地に有用であることを明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Todo, H., Kimura, E., Yasuno, H., Tokudome, Y., Hashimoto, F., Ikarashi, Y., Sugibayashi, K. Permeation pathway of macromolecules and nanospheres through skin. *Biol. Pharm. Bull.*, 33, 1394-1399 (2010)
- 2) Uchino, T., Ikarashi, Y., Nishimura, T.: Effects of coating materials and size of titanium dioxide particles on their cytotoxicity and penetration into the cellular membrane. *J. Toxicol. Sci.*, 36, 95-100 (2011)
- 3) Naoi, K., Sunagawa, N., Morioka, T., Nakashima, M., Ishihara, M., Fukamachi, K., Itoh, Y., Tsuda, H., Yoshimi, N., Suzui, M. Enhancement of tongue carcinogenesis in Hras128 transgenic rats treated with 4-nitroquinoline 1-oxide. *Oncol Rep*; 23: 337-344, 2010.
- 4) Masuda, M., Wakasaki, T., Suzui, M., Toh, S., Joe, A.K., Weinstein, I.B. Stat3 orchestrates tumor development and progression: the Achilles' heel of head and neck cancers? *Curr Cancer Drug Targets*; 10: 117-126, 2010.
- 5) Ishihara, M., Iihara, H., Okayasu, S., Yasuda, K., Matsuura, K., Suzui, M., Itoh, Y. Pharmaceutical interventions facilitate premedication and prevent opioid-induced constipation and emesis in cancer patients.