

201329005A

厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク研究事業

ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法に関する研究
- 全身暴露吸入による肺を主標的とした毒性評価研究 -
(23-化学 - 一般 - 005)

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 今井田 克己

平成26(2014)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

ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法に関する研究

- 全身暴露吸入による肺を主標的とした毒性評価研究 -

(23-化学 - 一般 - 005)

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 今井田 克己

平成26(2014)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

ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法に関する研究

- 全身暴露吸入による肺を主標的とした毒性評価研究 -

(23-化学 - 一般 - 005)

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 今井田 克己

平成26(2014)年3月

研究報告書目次

目 次

I. 総括研究報告書

ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法に関する研究

- 全身暴露吸入による肺を主標的とした毒性評価研究 -

今井田 克己 1

II. 分担研究報告書

1. ナノマテリアル吸入暴露による肺の病理組織学的評価（慢性及び腫瘍性病変）

今井田 克己 15

2. ナノマテリアルの全身暴露吸入方法に関する研究

小川 幸男 33

3. ナノマテリアル吸入暴露による体内動態に関する研究

高橋 祐次 45

4. DNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現変動解析

高木 篤也 57

5. 強制経気道投与方法を用いた粒子状物質の呼吸器への生体影響に関する研究

相磯 成敏 67

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 87

IV. 研究成果の刊行物・別刷 88

V. 班会議資料（2012年10月5日開催）

I . 総括研究報告書

平成25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
総括研究報告書

ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法に関する研究
- 全身暴露吸入による肺を主標的とした毒性評価研究 -

研究代表者 今井田 克己
香川大学医学部医学科腫瘍病理学 教授

研究要旨

先行研究において、厚労省の「ナノマテリアルの安全性対策に関する検討会」の方針に従い、高生産量ナノマテリアルのうち、特に、腹腔内投与によって中皮腫発がん性が示された多層カーボンナノチューブ (Multi wall carbon nanotubes (MWCNT)) を対象として、経気道暴露時の生体影響について検討してきた。具体的には、MWCNTの懸濁液の気管内投与を実施し、標的臓器である肺等への影響について多くの成果を得た。並行して、国立衛研・環境保全型動物飼育棟内に人体の暴露様式に即した全身暴露吸入試験装置の設置を行った。ナノマテリアル (NM) の有害性は暴露経路により大きく変わることが既に示されている。人においては、全身暴露による吸入毒性が最も重要であるが、実際にはその検討が最も進んでいない。その最大の理由は、粒子状物質を定量的に吸入暴露させることが設備的にも技術的にも難しい上に、NMが凝集体を作り易く分散性の確保の面で更なる工夫を要する点にある。

本研究では、NMのヒト健康影響の評価手法に関する研究として、MWCNT の全身暴露吸入による肺を主標的とした毒性評価を行う。ヒトが吸入暴露を受ける低濃度域を想定した全身吸入暴露毒性と気管内投与による長期・発がん性試験を三か年計画で実施する。本研究班では針状タイプのMWCNT (MWNT-7、三井物産 (現 現保土ヶ谷化学(株))) を共通の研究対象とした。各研究班を、次の5つの分担研究によって構成し研究を開始した。ナノマテリアルの全身暴露吸入方法に関する研究 (小川)、ナノマテリアル吸入暴露による体内動態に関する研究 (高橋)、DNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現変動解析 (高木)、強制経気道投与方法を用いた粒子状物質の呼吸器への生体影響に関する研究 (相磯)、ナノマテリアル吸入暴露による肺の病理組織学的評価 (慢性及び腫瘍性病変) (今井田) である。

粒子状物質の吸入において、粒径分布は呼吸器系の部位への沈着量を決める重要ファクターである。NMの全身暴露吸入実験において問題となるのが、その凝集性である。ヒトが現実的に暴露される環境下では、凝集体は鼻腔、気管等の上部呼吸器系で先に捕捉され、肺に到達するのは高度に分散されたものであることが想定される。また、検体に用いたMWCNTには製造過程で共有結合により分岐あるいは凝集状態を示す成分が含まれている。MWCNTの吸入試験に際しては、この凝集成分が気道上部に捕捉されるため単離繊維の吸入を阻害する可能性がある。ヒトに比較して細い気道径を有するマウスを用いた動物実験では、この影響が大きいことが推察されるため、実験動物を使用してヒトへの外挿性の高いデータを得るために、平成23年度の研究の中で、MWCNTを高度に分散させる方法として、Taquann法を開発した。H24年度は、Taquann法による分散処理を行ったMWCNT (T-CNT) を、より効果的に全身吸入暴露させるべく、曝露方法の改良にも取り組んだ。さらに、高度に分散処理を施したことで、T-CNTに含まれる繊維数を計測することが可能となり、その繊維数を計測した結果 T-CNT 10ug、1ug、0.1ugに含まれる繊維数は、それぞれ、 2.3×10^7 本、 4.0×10^6 本、 3.2×10^5 本であった。

このように、MWCNT原末から凝集体を除去し、分散性に優れた検体の調製方法 (Taquann法) が開発されたため、H24年度は、Taquann法の検体 (T-CNT) を全身吸入暴露に適用する方法に取り組んだ。全身曝露方法の一つとして米国 National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) が考案した音響式ダスト発生装置の基本概念を導入した全身暴露吸入装置を用いた検討では、音響エネルギーによる挙動がMWCNT-Bulkとは異なり、ダスト発生量も少なく十分な濃度調節ができなかった。T-CNTによる精度の高い暴露にはダスト発生装置

の改造が必要となり、金属製のカートリッジに充填し、圧縮空気を吹き込んでカートリッジ内の検体を気相に分散させる方法を考案し、カートリッジ直噴式ダスト発生装置の開発に至った。実際に暴露したチャンバー内のエアロゾルの形態観察では、単離している繊維が多く観察され、良好な分散状態であることが確認され、よりヒトの暴露環境に近い実験を行うことが可能となった。本年度は、p53+/-マウスを用い、1日2時間、週1回、5週間実施の反復全身暴露吸入実験を、対照群、低用量群、高用量群の3群で実験を開始することができ、いずれも順調に継続している。

気管内投与実験では、多層カーボンナノチューブ原末 (MWCNT-Bulk) および T-CNTの気管内投与による影響の違いを検討することもできた。MWCNT-Bulkの気管内投与では、肺胞内にMWCNTを貪食した肺胞マクロファージが主体となり肉芽腫性変化及び軽度な線維化病変を形成していたのに対し、T-CNTの気管内投与では、肺胞内で好中球、マクロファージ、形質細胞が混在する局所的な炎症性変化が認められた。また、T-CNTを貪食した肺胞マクロファージの集簇はある程度認められたものの、これまでに先行研究などで経験しているようなMWCNT貪食肺胞マクロファージによる微小肉芽腫や線維化病変の形成を特徴とする生体反応ではなかった。T-CNTをマウスに単回気管内投与して、投与後3ヶ月まで経過観察をおこなって得た試料を、遠隔臓器への移行に焦点を絞った精査を行った結果、マウスの全身諸臓器にT-CNTの存在が確認された。脳、腎臓及び肝臓ではマクロファージに貪食されずに血流中に入ったT-CNTが検出され、脾臓や肝臓で確認されたT-CNTには脾臓や肝臓の貪食細胞でトラップされている可能性が考えられた。今後、マクロファージに貪食されていないT-CNTが直接血流に入るか否かについても検証する必要がある。また、T-CNTを気管内投与後3日に採材した肺サンプルを透過型電子顕微鏡で検索した結果、通常の光学顕微鏡や偏光装置を利用した検索では検出が困難なサイズのT-CNTを肺胞マクロファージが貪食していることが確認され、MWCNTによる生体影響の検索には電子顕微鏡の利用も有用であることが示された。

気管内投与による1年間での長期毒性を評価する実験を3つ行うことができたが、いずれの実験においても、MWCNTに関連した腫瘍発生は認められなかった。今後も、病理組織学的な検討を継続し、長期毒性についての詳細な評価を行う予定である。また、MWCNT-Bulkを単回吸入暴露（4時間全身暴露）後、1、3、及び7日目の肺を対象とした定量的なマイクロアレイ解析 (Percellome法) を行なった結果では、免疫応答に関連する遺伝子の発現増加、及びCircadian rhythmに関係する遺伝子発現の変化が観察され、本年度ではより詳細な検討を行った結果、免疫応答、及び細胞死・アポトーシスに関連する遺伝子の発現増加が暴露1及び3日後に認められ、7日目に脂質代謝関連遺伝子発現が増加することが示された。

こうした各分担研究の結果から、ナノマテリアルの吸入毒性試験の技術基盤が確立し、人体の暴露様式に即した条件下での生体影響に関する情報が得られると考えられる。また、吸入毒性試験を実施する際の課題である至適条件の決定を迅速に行う総合的手順が整うことから、ナノマテリアルの吸入毒性評価の迅速化・効率化に貢献することが期待される。

この結果、用量作用関係の詳細な検討が可能となり、ナノマテリアルの安全性確保の観点から閾値を設定することが可能であるか否かの総合的なリスク評価、また、そのリスクを最小化するための実質安全レベルの試算などを可能とする情報が得られると期待される。

総じて、本研究成果は、ナノマテリアルによる人の健康障害を防止するためのリスク評価の基盤となる科学的な裏づけデータを得る手法として利用され、国内外の行政施策への貢献を通して国民の健康維持に大きく貢献することが期待される。

今後も、各分担研究同士が、さらなる連携を行い、針状MWCNTによる肺への、腫瘍性病変を含めた有害性評価を行っていく予定である。

以上、5つの分担研究により、ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法に関する研究として、MWCNTの全身暴露吸入による肺を主標的とした毒性評価を行うために重要な研究基盤構築を行うことができ、多数の研究成果を得ることができた。今後も継続して、詳細な検討を継続し、MWCNTの全身暴露吸入による肺を主標的とした毒性評価を行う予定である。

A. 研究目的

ナノマテリアル（NM）は極めて微細であることから、組成が同じものでも新たな物性が発揮される特徴がある。その為、毒性学的にも元のバルク形状のものの毒性情報があつたとしても、新規のものとして取り扱う必要があるとの認識が支配的である。本研究の目的は、肺に焦点を絞り、工業的NMの吸入暴露の人への外挿性の高い有害性情報を獲得する方法を迅速に確立することにある。

そもそも、粒子状物質の有害性に関する情報は極めて少ない。その理由は、吸入暴露を実施できる施設がごく限られることにある。NMは、凝集体を作りやすい傾向があり、その吸入暴露においては分散性を確保するために、更に高度な運用技術が必要とされ、国際的にも信頼できる吸入暴露実験を行える研究施設は少ない。しかしながら、NM開発で世界をリードする日本において、複数種のMWCNTに代表されるNMの製品化が急速に進んでおり、これらの安全性確認の方策の早期確立が必要である。過去のアスベストやトトロトの事例が示す様に、物理化学的安定性が高い成分からなる粒子状物質は急性毒性が弱いことから、その慢性毒性が見過ごされる傾向にある。NMも炭素など安定性が高い成分で出来ている場合は、発がん性を含む慢性毒性を見極める必要がある。以上より、実験動物の個体を用いた全身暴露による吸入毒性試験の実施が必須であり、また、初期病像に加え、慢性影響を十分に観察する必要がある。

平成 23 年度の本研究開始時の段階では、先行研究で、NIOSHが考案した音響式ダスト発生装置による分散方式がカーボンナノチューブの吸入暴露に最適であるとの判断の下に導入した施設（スピーカーからの音響エネルギー（定在波）を用いて、MWCNTを分散させるもの）を全身曝露方法の一つとして用い、検体に適合した制御パラメータ（送風量、送風圧、音響音圧・

周波数）の最適化を行えば、早急に暴露実験を開始できるところにあつた。平成 23 年度では、音響式ダスト発生装置の最適化も実現でき、平成 24 年度の研究では、高度に分散処理した MWCNT に対応した全身曝露装置（カートリッジ直噴式ダスト発生装置）の開発も行った。

本研究では、全身吸入曝露装置の制御パラメータ最適化や様々な曝露手法を確立し、次いでその曝露装置を用いて MWCNT を曝露したマウスの肺及び全身への蓄積性、肺の病理組織学的解析、肺の組織反応のDNAマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現変動解析を行う。この研究は、人体の曝露様式に即した全身曝露吸入試験の確立から、毒性発現メカニズムを含めた有害性情報の獲得までを総合的に手がけるものとして世界的に例が無く、詳細な検討を行うことが本研究の目的である。

B. 研究方法

先行研究[H20-化学一般-006]の成果を踏まえ、日本での使用量が最も多く、また、その形状からアスベストと同様の毒性が懸念される多層カーボンナノチューブ（MWCNT）を被験物質として研究を行なう。本研究を遂行する香川大学、国立医薬品食品衛生研究所及び中央労働災害防止協会日本バイオアッセイ研究センターは、ナノマテリアルを用いた動物実験を実施した実績を有している。本研究では雄性マウスを使用して MWCNT の生体影響を調べる。国立医薬品食品衛生研究所では既に設置済みの全身吸入曝露施設の、検体に応じた運用条件の確立に注力し、全身曝露吸入試験を実施する。香川大学と中央労働災害防止協会日本バイオアッセイ研究センターでは、気管内投与法により生体影響を評価する。これらと並行して、気管内曝露及び吸入曝露による肺の急性及び慢性反応について、病理組織学的評価（光顕、電顕、免疫染色、他）を行ない腫瘍性病変及び非腫瘍性病変の誘発に関わる背景、経過、要因を経時的に用量相関性を以って解析する。

B-I ナノマテリアルの全身暴露吸入方法に関する研究

ナノマテリアルの有害性は暴露経路により大きく変わることが既に示されている。人においては、全身暴露による吸入毒性が最も重要であることは関係者の一致した見解であるが、実際にはその検討が最も進んでいない。その最大の理由は、粒子状物質を定量的に吸入暴露させることが設備的にも技術的にも難しい上に、ナノマテリアルが凝集体を作り易く分散性の確保の面で更なる工夫を要する点にある。先行研究結果の判断の下、H23年度は、人体の暴露様式に即した全身暴露吸入を実現できる装置として、米国NIOSHが考案した「音響式ダスト発生装置」を導入し、独自の暴露チャンバーを組み合わせ、1群最大16匹、3群の実験を可能とした施設を国立医薬品食品衛生研究所 環境保全型動物飼育棟内（26号館）に設置した。H23年度は運用上の課題であるMWCNTの特性に合わせた暴露制御パラメータ（送风量・圧、音響音圧・周波数）の最適化に取り組み、MWCNT原末を検体して、4時間の暴露時間、目標相対濃度を200,000cpmと設定した条件において、平均質量濃度が約0.3mg/m³が得られた。

H24年度に開発されたMWCNT原末を高度に分散処理する独自の方法（Taquann法）で処理したTaquann法処理MWCNT（T-CNT）を気相に分散させ、動物に暴露する方法の開発にも取り組み、新たな暴露装置として、カートリッジ直噴式ダスト発生装置を開発し、全身暴露の方法としては、「音響式ダスト発生装置」より優れていることがわかり、その後の暴露実験として、この方法を用いることとした。H25年度は、p53+/-マウスを用い、1日2時間、週1回、5週間実施の反復全身暴露吸入実験を、対照群、低用量群、高用量群の3群で実験を開始することができ、いずれも順調に継続している。

B-II ナノマテリアル吸入暴露による体内動態に関する研究

「ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法に関する研究 - 全身暴露吸入によ

る肺を主標的とした毒性評価研究 -」では、肺に焦点を絞り、工業的ナノマテリアルの吸入暴露の人への外挿性の高い有害性情報を獲得する方法を迅速に確立することを目的としている。そのために、人体の暴露様式に即した全身暴露吸入試験装置を用いてナノマテリアルの全身暴露吸入試験を実施し、用量作用関係を含む有害性情報の取得、及びその詳細な病態解析を進めている。本分担研究では、生体影響の用量作用関係を明らかにするための情報として、ナノマテリアル吸入暴露による体内動態に関する研究を行うため、吸入させる検体の分散方法の開発に取り組んだ。粒子状物質の吸入において、粒径分布は呼吸器系の部位への沈着量を決める重要ファクターである。微細な粒子は肺胞まで到達するが、大きな粒子は気道の上層部で効果的に除去される。一方、ナノマテリアルの全身暴露吸入実験において問題となるのが、検体の凝集である。人が現実的に暴露される環境下では、凝集体は先に落下し、肺に到達するのは高度に分散されたものであることが想定される。また、検体に用いたMWCNTには製造過程で共有結合により分岐あるいは凝集状態を示す成分が含まれている。MWCNTの吸入試験に際しては、この凝集成分が気道上部に捕捉されるため単離繊維の吸入を阻害する可能性がある。ヒトに比較して細い気道径を有するマウスを用いた動物実験では、この影響が大きいことが推察されるため、実験動物を使用してヒトへの外挿性の高いデータを得るためには、凝集成分を除去した上で分散性に優れた検体を使用する必要がある。以上の点から、凝集成分による影響が少なく、実際にヒトに吸入されることが想定される単離繊維成分のみからなる分散性の高い検体を得る処理法が必要となった。H23年度からH24年度にかけてMWCNTを高度に分散する方法（Taquann法）を独自に開発し（特許出願済）、T-CNTを全身暴露実験に使用するための量産体制を整えることができた。T-CNTは分散性が高く、暴露装置の改良も必要となり、カートリッジ直噴式ダスト発生装置の開発および暴露環境の設定も終えることができ、H25年度は、p53+/-マウスを用いた反復全身暴露吸入実験を開始することができ、現在も順調に

継続している。

B-III DNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現変動解析

本分担研究では、ナノマテリアルの生体障害作用を分子レベルで明らかにするため、雄C57BL/6マウスにナノマテリアルとしてMWCNTを単回吸入暴露（4時間全身暴露）後、1、3、及び7日目の肺を対象とした定量的なマイクロアレイ解析（PerceLLome法）を行なった。暴露装置には米国NIOSHが開発した音響式ダスト発生装置を基に毒性部が国立衛研内に設置した施設を用いた。得られたマイクロアレイデータを基に前年度に引き続いて詳細な解析を行った。

B-IV 強制経気道投与方法を用いた粒子状物質の呼吸器への生体影響に関する研究

市販のMWCNT-Bulkには、単繊維に分散したナノサイズのものから大きな凝集塊まで様々なサイズのものが含まれるが、ヒトの肺胞まで到達するMWCNTは空気力学的質量中位径（mass median aerodynamic diameter, MMAD）にして1 μ m以下のサイズの単繊維のものが主体になると考えられる。このため、ヒトが呼吸によって吸い込んだMWCNT-Bulkが肺胞まで到達する量（重量）は、これまでの研究報告で研究対象とされてきた用量よりも低い濃度域にあることが想定される。MWCNT-Bulkの毒性について、ヒトへの外挿並びにリスク評価を行うためには、MWCNT-Bulkの分散性の確保された検体を用いた低濃度域での毒性発現のプロファイルを明確にする必要がある。本研究班では国衛研の研究チームによってMWCNT-Bulkから単繊維に分散した繊維を効率的に取り出す方法（Taquan法処理）の開発に成功している。H23年度の分担研究として市販のMWNT-7（（株）保土谷化学工業）をTaquan法処理した単繊維状に分散したMWCNT（T-CNT）を検体としてマウスへの単回気管内投与による亜急性試験を実施し、採取した気管支肺胞洗浄液の検査データの収集までを終え、病理組織学的検査データの収集をH24年度の分担研究に引き継いだ。

H24年度は、「厚生労働科学研究費補助金申請書」の分担研究概要に掲げた、分散性

を高めたMWCNTを単回投与した気管内暴露における急性反応について、病理組織学的評価を行うことを目的として、まず、H23年度から継続しているT-CNTの単回気管内投による亜急性試験の病死組織検査結果を確定した上で、本年度の研究計画を策定した。

H25年度は分散性を高めたTaquan法処理MWCNT（T-CNT）をマウスに単回気管内投与して、投与後3ヶ月まで経過観察をおこなって得た試料を、遠隔臓器への移行に焦点を絞った精査を行った。

B-V ナノマテリアル吸入暴露による肺の病理組織学的評価（慢性及び腫瘍性病変）

本分担研究においては、全身吸入暴露試験におけるMWCNTの肺内分布、肺病変の発現程度を比較検討するため、MWCNTの気管内投与による肺病変の検討を行う。平成23年度は、吸入したMWCNTの分布を確認するため、肺組織内での局在の同定の予備試験およびMWCNTの光学的特性の研究を行った。T-CNTを用いた単回気管内投与による予備実験を実施した。平成24年度は、マウスおよびラットへのMWCNTの気管内投与による長期実験を3つ計画し、いずれの実験も開始することができ、H25年度で全てを終了することができた。

マウスへの気管内投与手技については、平成23年度では、様々な週齢のマウスを用いて行い、使用する器具についても工夫し、12週齢のC57BLマウスへの気管内投与を動物愛護を配慮した上で、確実に行うことができるようになった。マウスへの気管内投与について予備試験を複数回行い、平成24年度に開始した気管内投与による長期毒性試験へと引き継ぐことができた。マウス用ゾンデだけでなく、マウス用気管挿管器具（光ファイバー付き喉頭鏡）を併用することで、気管や口腔内を損傷せずに、確実な投与を行うことが出来るようになり、超低用量のT-CNT投与が可能になった。長期試験として、（i）T-CNT（10 μ g/mouse）の単回気管内投与によるマウスを用いた長期毒性試験、（ii）超低濃度T-CNTの単回気管内投与によるマウスを用い

た長期毒性試験、(iii) T-CNT (60 μg/rat) の単回気管内投与によるラットを用いた長期毒性試験の3つの実験を行い、実験終了後、病理組織学的に長期毒性影響の検討を行った。

C. 研究結果

C-I ナノマテリアルの全身暴露吸入方法に関する研究

先行研究において、腹腔内投与によって中皮腫発がん性が示されたMWCNTを対象として、MWCNTの懸濁液の気管内投与を実施し、標的臓器である肺等への影響について多くの成果を得た。並行して、国立医薬品食品衛生研究所・環境保全型動物飼育棟内に、人体の暴露様式に即した全身暴露吸入試験装置の設置を行った。この装置は、米国NIOSHが考案した音響式ダスト発生装置を複製許可と共に導入し柴田科学で新たに設計したものである。これに独自に開発した暴露チャンバーを組み合わせ、1群最大16匹、3群の実験を可能とした。H23年度は、三井物産のMWNT-7の原末(MWCNT-Bulk)を検体として、暴露制御パラメータ(送風量・圧、音響音圧・周波数)の最適化を行い、実際にマウスに暴露を行い、DNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現変動解析に供した。並行して、MWCNT原末から凝集体を除去し、分散性に優れた検体の調製方法(Taquann法)が開発されたため、H24年度は、Taquann法の検体(T-CNT)を全身吸入暴露に適用する方法に取り組んだ。音響式ダスト発生装置を用いた検討では、音響エネルギーによる挙動がMWCNT-Bulkとは異なり、ダスト発生量も少なく十分な濃度調節ができなかった。T-CNTによる精度の高い暴露にはダスト発生装置の改造が必要となり、金属製のカートリッジに充填し、圧縮空気を吹き込んでカートリッジ内の検体を気相に分散させる方法を考案し、カートリッジ直噴式ダスト発生装置の開発に至った。実際に暴露したチャンバー内のエアロゾルの形態観察では、単離している繊維が多く観察され、良好な分散状態であることが確認された。H25年度は、p53+/-マウスを用い、1日2時間、週1回、5週間実施の反復全身暴露吸入実験を、対照群、低用量群、高用量群の3群で開始した。凝縮粒子計数装置(CPC)

による2時間の相対濃度の平均値は、低用量群; $8.2 \pm 2.7 \times 10^5$ 個/L/min、高用量群; $19.2 \pm 4.0 \times 10^5$ 個/L/minであった。質量濃度は、低用量群 1.19 ± 0.16 mg/m³、高用量群 2.52 ± 0.35 mg/m³であった。相対濃度と質量濃度には相関性が認められた。暴露チャンバー内のエアロゾル化したT-CNT繊維の長さの平均値は 7.3 ± 4.9 μm (Max. 33.0 μm)であり、U-CNT繊維の平均値、長さの分布と同様であった。質量濃度変換係数(K値)もほぼ一定であることからT-CNTの気相での分散状態、その粒度分布は一定の状態であり、かつ原体の特性が保たれていることが示唆された。一方で、今後は暴露作業を自動化する課題が残されており、この対策を進める。新たに開発したダスト発生装置は、Taquann法処理検体に適したダスト発生方法であるため、これらを組み合わせることで、MWCNTのみならずナノマテリアル全般の全身暴露吸入による生体影響を調べる有効な手段となることが期待される。

C-II ナノマテリアル吸入暴露による体内動態に関する研究

MWCNTの凝集はファンデルワールス力によるものであるが、凝集体が含まれないことが分散性を確保するためには重要であると考えられる。また、Taquann法の改良を行い、全身暴露吸入実験に供することのできる量を確保する体制を整えた。分散性を高める工程、及び、ろ過効率を高めることで、1回あたりの収率向上に寄与した。

T-CNTに含まれる繊維数を計測したところ、T-CNT 10ug、1ug、0.1ugに含まれる繊維数は、それぞれ、 2.3×10^7 本、 4.0×10^6 本、 3.2×10^5 本であった。繊維長のヒストグラムからは、その分布に大きな変化は認められず、また、50%累積比率に相当する繊維の長さは、10 ug; 6.4 μm、1 ug; 7.2 μm、0.1 ug; 6.4 μmであったことから、本研究で用いた方法は、繊維の分布を偏り無く把握できていると考えられた。

H24年度の分担研究では、Taquann法の改良を行い、全身暴露吸入実験が可能となるT-CNTの量産体制を確立することができ、H25年度から開始したp53+/-マウスを用いたT-CNTの全身暴露実験(カートリッジ直噴式ダスト発生装置により1群48匹、2用

量で1日2時間、週1回、5週間の反復全身暴露吸入実験)を行うために必要なT-CNT約300mgを供給することができた。5週間の吸入の後、経時的に肺をサンプリングし、肺内に沈着したMWCNTの繊維数の計測と病理組織学的観察を実施した。吸入終了直後の高用量群の肺に沈着したMWCNT繊維数は 1.3×10^7 本/動物(n=1)であり、質量に換算すると4.4μg/動物であった。繊維の長さの平均値は 8.0 ± 5.0 μm、最大の長さは33.1μmであった。この値は暴露チャンバー内のT-CNTエアロゾルの値(平均値:7.3±4.9μm、最大33.0μm)と同様であり、エアロゾル化した繊維はその長さに関わらず、マウスの肺にまで到達したと考えられた。組織学的に、凝集体・凝固体は観察されず、単離繊維が気管支上皮の粘液層に小集合としてトラップされている像、及び単離繊維が肺胞内にまで到達している像が観察された。好中球浸潤像は弱く、肺胞内のMWCNTはもっぱらマクロファージに貪食されて存在していた。吸入終了後13週目の肺には凝集体・凝固体及び異物肉芽腫を認めず、肺胞洞(肺胞管)から肺胞内にMWCNTを貪食したマクロファージを認め、分葉核球の軽度の浸潤と胚胞壁の軽度の肥厚を時に伴っていた。また、壁側胸膜面(横隔膜面)には、MWCNTを貪食したマクロファージを伴う円形細胞小集簇を認め、そこを被覆する中皮の立方上皮化を時に認めた。この胸膜病変は先に報告した腹腔内投与実験において中皮腫初期病変と考えられた像と類似していた。今後、更に経時的な組織沈着量の推移と肺病変との関係を明らかにする計画である。

C-III DNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現変動解析

H23年度においてマイクロアレイデータを解析した結果、免疫応答に関連する遺伝子の発現増加、及びCircadian rhythmに関連する遺伝子発現の変化が観察されたが、この解析は有意差の認められたコピー数の低い遺伝子を含む全遺伝子を対象に解析しており、また、対照群で変動している遺伝子も全て含まれていたことから、一部で偶発的変動をとらえた可能性があると思われた。そこで、H24年度はPercollome

法で用いたspike factorから想定されるデータの信頼性の高い0.5copy/cell以上の遺伝子を対象に解析を進めた。その結果、有意に($p < 0.05$)増加した遺伝子数はMWCNT暴露1日目で977遺伝子、3日目で754遺伝子、7日目で37遺伝子であった。一方、有意に($p < 0.05$)減少した遺伝子は、MWCNT暴露1日目で51遺伝子、3日目で2遺伝子、7日目で92遺伝子であった。詳細な検討を行った結果、免疫応答、及び細胞死・アポトーシスに関係する遺伝子の発現増加が暴露1及び3日後に認められ、7日目に脂質代謝関連遺伝子発現が増加することが示された。H25年度は、引き続きIngenuity Pathway Analysisを用いたパスウェー解析を実施した。

MWCNT曝露1日後に増加した遺伝子を解析した結果、既知のパスウェーとして、leukocyte extravasation signaling、integrin signaling、paxillin signaling、cdc42 signaling、ephrin receptor signaling等がFisher's extract testで有意に抽出された。これらは白血球血管外遊走、細胞移動、接着に關与するものでH24年度に抽出された免疫応答に關与するシグナルと關連すると考えられた。さらにMWCNT曝露3日後に増加した遺伝子を解析した結果、既知のパスウェーとして、caveolar-mediated endocytosis(カベオラを介したエンドサイトーシス) signaling、eif2 signaling、integrin signalingがFisher's extract testで有意に抽出された。このことから曝露3日後の肺においてマクロファージによる異物取り込みが促進されていることが示唆された。一方、7日目の増加遺伝子、1、3、7日目の減少遺伝子ではパスウェー解析で特定の系は抽出されなかった。今後も、解析を続け、新たな関連遺伝子の検索を行って行く予定である。

C-IV 強制経気道投与方法を用いた粒子状物質の呼吸器への生体影響に関する研究

市販の多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の分散性を高めたTaquann法処理MWCNT(T-CNT)をマウスに単回気管内投与して、投与後3ヶ月まで経過観察をおこなって得た試料を、遠隔臓器への移行に焦点を絞った精査を行った。本研究で、マウ

スの気管内に投与された T-CNT は、気管内投与後 1 日ないし 7 日の早い時期から遠隔臓器の中に存在し、投与後の観察期間の経過とともに遠隔臓器での T-CNT の数も増加することが確認された。脳、腎臓及で確認された T-CNT はいずれも単繊維の状態で炎症などの組織反応を伴わないものであり、おそらく血流に乗って全身を巡っているものの一部が、今回、確認されたものと思われる。これに対して肺関連リンパ節と脾臓では複数の T-CNT が沈着したスポットとして認められることが多く、恐らくマクロファージが積極的に T-CNT を貪食した結果、マクロファージの細胞質中に T-CNT が集積された状態を観察したものと思われる。また、肝臓では脳や腎臓よりも T-CNT が多く認められた。このことは、肝臓の類洞壁に存在するクッパー細胞が関与している可能性が考えられた。

肺関連リンパ節への T-CNT の移行は、投与部位である肺から T-CNT 貪食マクロファージが移行した可能性が考えられる。一方、脾臓での T-CNT の沈着を考えると、マクロファージに貪食されない T-CNT が血流に乗って全身を循環し、その途上で脾臓に定着している貪食細胞に捕食された可能性も考えられた。今回、マウスに T-CNT を気管内投与後 1 日と 3 日に肺を採材して、透過型電子顕微鏡による詳細な検索を行ったが、肺の組織中に T-CNT が直接侵入した証拠を確認することができなかった。今後、マクロファージに貪食されていない T-CNT が直接血流に入るか否かを検証する必要がある。また、透過型電子顕微鏡による検索で、肺胞内のマクロファージの細胞質中に通常の光学顕微鏡や偏光装置を用いた観察で検出が困難なサイズの T-CNT の存在が確認された。このことは、MWCNT の生体影響評価には電子顕微鏡レベルの観察が有用であると考えられた。

C-V ナノマテリアル吸入暴露による肺の病理組織学的評価（慢性及び腫瘍性病変）

3つの長期実験のうち、① T-CNT (10 μ g/mouse) の単回気管内投与によるマウスを用いた長期毒性試験では、実験開始後36週目から終了まで、control 群と比べて T-CNT 投与群が有意に体重増加

抑制が見られ、実験終了時の肝臓、腎臓の相対臓器重量が有意差に増加していたが、病理組織学的評価においては、群間で有意な所見は見られなかった。なお、T-CNT 投与群のうち 1 匹の肺内に 1 本の T-CNT が見られたが、その周囲では反応性病変は認められず、T-CNT に関連した腫瘍性病変は見られなかった。② 超低濃度 T-CNT の単回気管内投与によるマウスを用いた長期毒性試験では実験終了まで、いずれの群間においても有意な体重差は見られず、臓器重量については絶対重量、相対重量いずれも control 群と比べて有意差は見られなかった。病理組織学的評価においては、最高用量である Group 3 (10 μ g/mouse) のうち、2 匹の肺内で 2 本の T-CNT が認められ、その他の群では認められず、いずれの群においても T-CNT に関連した腫瘍性病変は見られなかった。③ T-CNT (60 μ g/rat) の単回気管内投与によるラットを用いた長期毒性試験では、実験終了まで群間での有意な体重増加抑制は見られなかった。臓器重量は T-CNT 投与群で腎臓の相対重量が control 群に比べて有意に減少していたが、病理組織学的評価においては、群間で有意差は見られなかった。なお、いずれの群においても肺内では比較的強い炎症像が見られていたが、病理組織所見においても群間で有意差は見られず、実験に用いた F344 ラットは気管内投与にて肺に炎症を励起しやすい特徴をもっている系統であるためと考えられた。今後も各分担研究とさらなる連携を行い、針状 MWCNT による肺組織への、腫瘍性病変を含めた有害性評価を継続していく予定である。

D. 結論

H25 本年度は、昨年度までの研究成果で得られたデータを基盤として、各分担研究者が総合的な評価を行うために必要な検討を行った。それぞれの研究が目標とする検討を行う上で必要な準備を H23 年度、H24 年度の研究で終えることができた。本年度までの最終目標の達成に向けて、長期実験を含めた検討を順調に継続することができた。

具体的には、H23年度からH24年度にかけてMWCNTを高度に分散する方法(Taquann法)を独自に開発し(特許出願済)、さらにT-CNTを全身暴露実験に使用するための量産体制を整えることができた。T-CNTは分散性が高く、MWCNTの特性に合わせた全身暴露吸入装置の新たな開発が必要となったが、分担研究者のそれぞれの協力の下、カートリッジ直噴式ダスト発生装置の開発が行われ、高度な分散処理を行ったMWCNTの全身暴露が可能となった。H25年度は、p53+/-マウスを用いた反復全身暴露吸入実験を開始することができ、現在も順調に継続している。

アスベストに関する知見からも推測されるように、生体内に取り込まれた難分解性粒子は、急性毒性を示さないものの生体内で長期間留まり、重篤な慢性毒性を引き起こす可能性が懸念される。難分解性のナノマテリアルにおいても、慢性毒性を見落とさないことが重要であるほか、粒子がごく微細であることから、元のバルク形状での毒性とは異なった生体影響を示す可能性があり、その健康被害を未然防止するためには生体影響と暴露量の定量的な把握と毒性発現メカニズムに関する情報を得ることが必要である。

全身暴露実験として、H25年度は、p53+/-マウスを用い、1日2時間、週1回、5週間実施の反復全身暴露吸入実験を、対照群、低用量群、高用量群の3群で開始した。凝縮粒子計数装置(CPC)による2時間の相対濃度と質量濃度には相関性が認められた。暴露チャンバー内のエアロゾル化したT-CNT繊維の長さの平均値は $7.3 \pm 4.9 \mu\text{m}$ (Max. $33.0 \mu\text{m}$)であり、U-CNT繊維の平均値、長さの分布と同様であった。質量濃度変換係数(K値)もほぼ一定であることからT-CNTの気相での分散状態、その粒度分布は一定の状態であり、かつ原体の特性が保たれていることが示唆された。新たに開発したダスト発生装置は、Taquann法処理検体に適したダスト発生方法であるため、これらを組み合わせることで、MWCNTのみならずナノマテリアル全般の全身暴露吸入による生体影響を調べる有効な手段となることも期待される。

マイクロアレイを用いた検討として、MWCNT曝露1日後に増加した遺伝子を解析した結果、既知のパスウェイとして、leukocyte extravasation signaling、integrin signaling、paxillin signaling、cdc42 signaling、ephrin receptor signaling等がFisher's extract testで有意に抽出された。これらは白血球血管外遊走、細胞移動、接着に関与するものでH24年度に抽出された免疫応答に関与するシグナルと関連すると考えられた。さらにMWCNT曝露3日後に増加した遺伝子を解析した結果、既知のパスウェイとして、caveolar-mediated endocytosis(カベオラを介したエンドサイトーシス) signaling、eif2 signaling、integrin signalingがFisher's extract testで有意に抽出された。このことから曝露3日後の肺においてマクロファージによる異物取り込みが促進されていることが示唆された。本法は肺における種々の生体反応を鋭敏に検出可能であり、ナノマテリアルの生体障害作用を分子レベルで明らかにしていく予定である。

気管内投与実験として、分散性を高めたTaquann法処理MWCNT(T-CNT)をマウスに単回気管内投与して、投与後3ヶ月まで経過観察をおこなって得た試料を、遠隔臓器への移行に焦点を絞った精査を行った。本研究で、マウスの気管内に投与されたT-CNTは、気管内投与後1日ないし7日の早い時期から遠隔臓器の中に存在し、投与後の観察期間の経過とともに遠隔臓器でのT-CNTの数も増加することが確認された。脳、腎臓及び確認されたT-CNTはいずれも単繊維の状態で炎症などの組織反応を伴わないものであり、おそらく血流に乗って全身を巡っているものの一部が、今回、確認されたものと思われる。これに対して肺関連リンパ節と脾臓では複数のT-CNTが沈着したスポットとして認められることが多く、恐らくマクロファージが積極的にT-CNTを貪食した結果、マクロファージの細胞質中にT-CNTが集積された状態を観察したものと思われる。また、肝臓では脳や腎臓よりもT-CNTが多く認められた。このことは、肝臓の類洞壁に存在するクッパー細胞が関与している可能性が考えられた。今後、マクロファージに貪食されていないT-CNTが直接血流に入るか否かを検証する必要がある。また、透過型電子顕微鏡によ

る検索で、肺胞内のマクロファージの細胞質中に通常の光学顕微鏡や偏光装置を用いた観察で検出が困難なサイズの T-CNT の存在が確認された。このことは、MWCNT の生体影響評価には電子顕微鏡レベルの観察が有用であると考えられた。

気管内投与による 3 つの長期実験のうち、① T-CNT (10 μ g/mouse) の単回気管内投与によるマウスを用いた長期毒性試験では、T-CNT 投与群のうち 1 匹の肺内に T-CNT が見られたが、その周囲では反応性病変は認められず、T-CNT に関連した腫瘍性病変は見られなかった。

② 超低濃度 T-CNT の単回気管内投与によるマウスを用いた長期毒性試験では、病理組織学的評価においては、最高用量である Group 3 (10 μ g/mouse) のうち、2 匹の肺内で T-CNT が認められ、その他の群では認められず、いずれの群においても T-CNT に関連した腫瘍性病変は見られなかった。③ T-CNT (60 μ g/rat) の単回気管内投与によるラットを用いた長期毒性試験では、いずれの群においても肺内では比較的強い炎症像が見られていたが、病理組織所見においても群間で有意差は見られず、実験に用いた F344 ラットは気管内投与にて肺に炎症を励起しやすい特徴をもっているためと考えられた。今後も各分担研究とさらなる連携を行い、針状 MWCNT による肺組織への、腫瘍性病変を含めた有害性評価を継続していく予定である。

こうした各分担研究の結果から、ナノマテリアルの吸入毒性試験の技術基盤が確立し、人体の暴露様式に即した条件下での生体影響に関する情報が得られると考えられる。また、吸入毒性試験を実施する際の課題である至適条件の決定を迅速に行う総合的手順が整うことから、ナノマテリアルの吸入毒性評価の迅速化・効率化に貢献することが期待される。

この結果、用量作用関係の詳細な検討が可能となり、ナノマテリアルの安全性確保の観点から閾値を設定することが可能であるか否かの総合的なリスク評価、また、そのリスクを最小化するための実質安全レベルの試算などを可能とする情報が得られると期待される。

本研究成果は、ナノマテリアルによる人

の健康障害を防止するためのリスク評価の基盤となる科学的な裏づけデータを得る手法として利用され、国内外の行政施策への貢献を通して国民の健康維持に大きく貢献することが期待される。

今後も、各分担研究同士が、さらなる連携を行い、針状 MWCNT による肺への腫瘍性病変を含めた有害性評価を行っていく予定である。

E. 健康危機情報
なし

F. 研究発表

1. 論文発表

Kishi S, Yokohira M, Yamakawa K, Saoo K, Imaida K. Importance of the progesterone receptor (PR) and the epidermal growth factor receptor (EGFR), but not the estrogen receptor (ER), for chemically induced lung carcinogenesis in female A/J mice. *Oncol. Lett.*, 2013. in press.

Yokohira M, Kishi S, Yamakawa K, Nakano Y, Ninomiya F, Kinouchi S, Tanizawa J, Saoo K, Imaida K. Napsin A is possibly useful marker to predict the tumorigenic potential of lung bronchiolo-alveolar hyperplasia in F344 rats. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 2013. in press.

Ninomiya F, Yokohira M, Kishi S, Nakano Y, Yamakawa K, Inoue T, Kuno T, Imaida K. Gender-dependent effects of gonadectomy on lung carcinogenesis by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in female and male A/J mice. *Oncol Rep* 30: 2632-2638, 2013

鈴木 貴子、船本 康申、三谷 由香利、鬼松 幸子、山川 けいこ、今井田 克己、大森 正樹、竿尾 光祐、Ultrafast-Papanicolaou 染色による圧挫細胞診が有効であった膠肉腫の 1 例、日本臨床細胞学会雑誌、52(4):341~345

Yokohira M, Nakano Y, Yamakawa K,

Kishi S, Ninomiya F, Saoo K, Imaida K. Strain differences in pleural mesothelial cell reactions induced by potassium octatitanate fibers (TISMO) infused directly into the thoracic cavity. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 65(6):925-932, 2013.

Taquahashi Y, Ogawa Y, Takagi A, Tsuji M, Morita K, Kanno J. Improved dispersion method of multi-wall carbon nanotube for inhalation toxicity studies of experimental animals. *J Toxicol Sci.* 2013;38(4):619-28.

Taquahashi Y, Ogawa Y, Takagi A, Tsuji M, Morita K, Kanno J. An Improved dispersion method of multi-wall carbon nanotube for inhalation toxicity studies of experimental animals. *J Toxicol Sci.* 2013;38(4):619-28.

Yuhji Taquahashi, Yukio Ogawa, Atsuya Takagi, Masaki Tsuji, Koichi Morita, Jun Kanno. , An Improved Dispersion Method of Multi-wall Carbon Nanotube for Inhalation Toxicity Studies of Experimental Animals, *The Journal of Toxicological Sciences* Submitted May 5, 2013; Accepted June 9, 2013

Takagi A, Hirose A, Futakuchi M, Tsuda H, Kanno J., Dose-dependent mesothelioma induction by intraperitoneal administration of multi-wall carbon nanotubes in p53 heterozygous mice, *Cancer Sci.* 103,1440-4, 2012.

Hirose A, Takagi A, Nishimura T, Tsuda H, Sakamoto Y, Ogata A, Nakae D, Hino O, Kanno J., [Importance of researches on chronic effects by manufactured nanomaterials]., *Yakugaku Zasshi.* 2011 Feb;131(2):195-201. Review.

Japanese.

Umeda, Y., Matsumoto, M., Aiso, S., Nisgizawa, T., Nagano, k., Arito, H., and Fukushima, S.: Inhalation carcinogenicity and toxicity of 1,2-dichloropropane in rats, *Inhalation Toxicology*, 2010, 22: 1116-1126.

Nagano, K., Gotoh, K., Kasai, T., Aiso, S., Nishizawa, T., Ohnishi, M., Ikawa, N., Eitaki, Y., Yamada, K., Arito, H. and Fukushima, S.: Two- and 13-week Inhalation Toxicities of Indium-Tin Oxide and Indium Oxide in Rats, *Journal of Occupational Health*, 2011, 53: 51-63.

Aiso, S., Kubota, H., Umeda, Y., Kasai, T., Takaya, M., Yamazaki, K., Nagano, K., Sasaki, T., Koda, S. and Fukushima, S.: Translocation of Intratracheally Instilled Multi-wall Carbon Nanotubes to Lung-Associated Lymph Nodes in Rats, *Industrial Health*, 2011, 49: 215-220.

Kano, H., Suzuki, M., Senoh, H., Yamazaki, K., Aiso, S., Matsumoto, M., Nagano, k., and Fukushima, S.: 2,4-Dichloro-1-nitrobenzene exert carcinogenicities in both rats and mice by two years feeding, *arch Toxicol*, 2012, 86: 1763-1772.

Umeda, Y., Kasai, T., Saito, M., Kondo, H., Toya, T., aiso, S., Okuda, H., Nishizawa, T., and Fukushima, S.: Two-week Toxicity of Multi-walled Carbon nanotubes by wholebody Inhalation Exposure in Rats, *J Toxicol Pathol* 2013, 26:

131-140.

Saito, A., Sasaki, T., Kasai, T., Katagiri, T., Nishizawa, T., Noguchi, T., Aiso, S., Nagano, K., and Fukushima, S., : hepatotumorigenicity of ethyl tertiary-butyl ether with 2-year inhalation exposure in f344 rats, Arch Toxicol (2013)87: 905-914.

2. 学会発表

横平政直、山川けいこ、中野裕子、沼野琢旬、岸宗佑、二宮芙美子、竿尾光祐、今井田克己、F344 ラット、DHPN 誘発肺腫瘍および quartz 誘発肺炎炎症性病変における SP A, B, C, D の免疫組織学的検討、第 72 回日本癌学会学術総会、2013. 10

山川けいこ、二宮芙美子、岸宗佑、中野裕子、横平政直、竿尾光祐、今井田克己、マウスおよびラット肺発がんモデルにおける adipophilin の発現に関する検討、第 72 回日本癌学会学術総会、2013. 10

岸宗佑、横平政直、中野裕子、山川けいこ、二宮芙美子、竿尾光祐、今井田克己、The relationship between lung carcinogenesis and hepatic CYP induction by combined treatments of DHPN and DMBA in F344 female rats、第 72 回日本癌学会学術総会、2013. 10

中野裕子、横平政直、二宮芙美子、山川けいこ、岸宗佑、橋本希、塩岡忠夫、竿尾光祐、今井田克己、テストステロンの雌性 A/J マウス NNK 誘発肺腫瘍への影響、第 72 回日本癌学会学術総会、2013. 10

横平政直、中野裕子、山川けいこ、岸宗佑、二宮芙美子、竿尾光祐、今井田克己、針状粒子 TISMO の胸腔内投与による胸膜中皮細胞の反応性変化についてのマウス系統差、第 29 回

日本毒性病理学会総会および学術集会、2013. 01

横平政直、橋本希、中野裕子、山川けいこ、岸宗佑、二宮芙美子、井上達史、竿尾光祐、今井田克己、胸腔内投与による針状微粒子 TISMO の影響、第 28 回日本毒性病理学会総会および学術集会、2012. 02

横平政直、橋本希、山川けいこ、中野裕子、二宮芙美子、岸宗佑、井上達史、竿尾光祐、今井田克己、The promotion effects of lung tumor by left pulmonary ligation in A/J mice、第 70 回日本癌学会総会、2011. 10

高橋祐次、小川幸男、高木篤也、相磯成敏、今井田克己、菅野純、音響式ダスト発生装置を用いた多層カーボンナノチューブの全身暴露吸入と肺内負荷量の測定、第 39 回日本毒性学会学術年会、仙台国際センター、2012. 7

Yuhji Taquahashil, Yukio Ogawa, Atsuya Takagi, Shigetoshi Aiso, Katsumi Imaida, Jun Kanno, Whole Body Inhalation Exposure of Multi-Walled Carbon Nanotube by Using an Acoustical Dust Generator and Measurements of Its Body Burden in Lung, The 6th International Congress of Asian Society of Toxicology, July 17-20, 2012

Taquahashi Y, Ogawa Y, Takagi A, Tsuji M, Hirose A, Kanno J, Highly-Dispersed, Aggregate/Agglomerate-Eliminated Multi-Wall Carbon Nanotube Shows Increase In Mesotheliomagenic Potency Per Unit Weight In p53 Heterozygous Mice Intraperitoneal Injection Model. The

XIII International Congress of Toxicology (2013. 7, Seoul)

Taquahashi Y, Ogawa Y, Takagi A, Tsuji M, Kanno J, An Improved Dispersion Method of MWCNT for Whole Body Inhalation Exposure System 6th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health (2013. 10, Nagoya)

高橋祐次、高木篤也、辻 昌貴、菅野 純、凝集体を除去し分散性を高めた多層カーボンナノチューブは p53+/-マウス腹腔内投与モデルにおいて単位重量当りの中皮腫誘発能が増加する、第 40 回日本毒性学会学術年会 一般口演 (2013. 6. 18)

菅野 純、高橋祐次、ナノマテリアルの高分散小型全身暴露吸入システムの開発、第 40 回日本毒性学会学術年会 シンポジウム (2013. 6. 17)

Taquahashi Y, Ogawa Y, Takagi A, Tsuji M, Hirose A, Kanno J, Highly-Dispersed, Aggregate/Agglomerate-Eliminated Multi-Wall Carbon Nanotube Shows Increase In Mesotheliomagenic Potency Per Unit Weight In p53 Heterozygous Mice Intraperitoneal Injection Model. The XIII International Congress of Toxicology (2013. 7. 3 Seoul)

Taquahashi Y, Ogawa Y, Takagi A, Tsuji M, Morita K, Kanno J. An Improved Dispersion Method of MWCNT for Whole Body Inhalation Exposure System, 6th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health (2013. 10. 29, Nagoya)

Jun Kanno, Yuhji Taquahashi, Atsuya Takagi, Masaki Tsuji, Koichi Morita, Yukio Ogawa, The 6th International Symposium on Nanotechnology,

Occupational and Environmental Health (NanOE6、2013. 10. 28-31、名古屋国際会議場)

Lecture from Organizer 1 Nanotoxicology-its chronic aspects

Yuhji Taquahashi, Yukio Ogawa, Atsuya Takagi, Masaki Tsuji, Koichi Morita, Jun Kanno, The 6th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health (NanOE6、2013. 10. 28-31、名古屋国際会議場)
An Improved Dispersion Method of MWCNT for Whole Body Inhalation Exposure System

Koichi Yamada, Akihiko Iwasa, Tomoyuki Kondo, Mie Kurosawa, Rieko Arakaki, Akiko Yamada, Yasusei Kudo, Yuhji Taquahashi, Atsuya Takagi, Jun Kanno, Naozumi Ishimaru, The 6th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health (NanOE6、2013. 10. 28-31、名古屋国際会議場)
In vivo effect of multi-wall carbon nanotubes on immune system

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、口演

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), Oral

高信健司、相磯成敏、梅田ゆみ、妹尾英樹、片桐卓、長野嘉介、福島昭治：気管内投与による多層カーボンナノチューブの脳内移行：2011 年、第 27 回日本毒

性病理学会、P-103

妹尾英樹、高信健司、梅田ゆみ、片桐卓、相磯成敏、長野嘉介、福島昭治：1-ブromo-3-クロロプロパンの13週間吸入曝露によるラットとマウスの鼻腔病変：2011年、第27回日本毒性病理学会、P-014

相磯成敏、福島昭治：多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の肺を中心とする有害性：2011年、第26回発癌病理研究会、演題11

相磯成敏、笠井辰也、齋藤美佐江、戸谷忠雄、西沢共司、有藤平八郎、長野嘉介、福島昭治：多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の全身吸入曝露(2)ラットを用いた単回吸入曝露実験、2011年、第84回日本産業衛生学会、P-1-107

妹尾秀樹、梅田ゆみ、高信健司、山崎一法、戸谷忠雄、鈴木正明、加納浩和、相磯成敏、福島昭治：多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の気管内投与後28日のラット肺における間質と中皮細胞の超微細形態学的変化、2012年、第85回日本産業衛生学会

梅田ゆみ、笠井辰也、相磯成敏、福島昭治：多層カーボンナノチューブ(MWCNT)

の13週間吸入曝露で誘発されたラットの呼吸器毒性、第27回発癌病理研究会(2012. 8. 28)

相磯成敏、齋藤美佐江、酒井俊男：電子顕微鏡の毒性病理学への応用に向けた取り組み：2013年、第45回日本臨床分子形態学会

3. 書籍
横平政直，今井田克己．疾患モデルの作製と利用ーがん．第4章 呼吸器系，第1項 肺，373-382，(株)エル・アイ・シー，2012
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
特許出願：柴田眞利、菅野純、生田達也、鶴田祐吾、小川幸男、高橋祐次、「吸入曝露試験装置」、特願2012-148848(2012.7.2)
- 特許出願：菅野純、高橋祐次、「分散性ナノマテリアルの調製方法」、特願2012-158343(2012.7.17)
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

別添 4

II. 分担研究報告書