

成、例えばタンパク成分が金属ナノ粒子の凝集性に影響することがわかった。

白金ナノ粒子の場合、ナノシリカと異なり、培地中で長時間放置しても粒度分布の形状にほとんど変化はなかった(図 3)。PtNP-1 には単分散している粒子と凝集体の 2 つのピークが認められた。長時間静置したことによって新たな凝集が起こったのではなく、入手した懸濁液にもともと凝集体が安定して存在した可能性がある。いずれにしろ、細胞培養を想定した試験条件で一定量のナノサイズの粒子があることから、以下の *in vitro* 細胞試験はナノサイズの粒子の影響を評価していると考えた。しかし媒体中でイオンとして溶解して存在している可能性もあり、今後検討する必要がある。

シリカや酸化チタンなどのナノマテリアル/微小粒子状物質は Macrophage などの NLRP3 (Nod-Like Receptor family, Pyrin domain containing 3) Inflammasome を活性化し、それに引き続いて Caspase-1 の活性化および Interleukin-1 β の分泌亢進を引き起こすことが知られている。最近、NLRP3 Inflammasome の活性化において細胞内 Ca²⁺の動員が重要な役割を担っていることが明らかにされた。また、Macrophage の Liposome/Crystal 刺激によって TRPM2 を介した活性酸素種依存的な Ca²⁺流入が生じること、TRPM2 を欠乏させた Macrophage では NLRP3 Inflammasome の活性化と Interleukin-1 β の分泌が大幅に低下することも報告されている。そこで、水系白金ナノ分散液による細胞毒性発現に Inflammasome の活性化が関与する可能性を明らかにする目的で、PMA 処理によって Macrophage に分化させた THP-1 細胞を用いて検討を行ったところ、細胞内 Ca²⁺濃度の増加や Caspase 1 および Caspase 3 活性の上昇は観察されなかった。したがって、PtNP-2 による細胞死は、少なくとも今回の実験条件下では Pyroptosis によるものではないと考えられる。

本研究で使用した水系白金ナノ分散液は、保

護剤を使用することなくナノ分散化された懸濁液である。粒子表面に保護剤が存在しないために高い触媒活性が期待されているが、本研究の結果から、ナノ粒子表面を保護剤ポリアクリル酸でコートした白金ナノコロイドに比べて細胞毒性が高いことが明らかになった。この細胞致死毒性発現機構を明らかにする目的で、被験物質曝露後の細胞内活性酸素種の濃度を測定した結果、SiO₂-50 nm 曝露による活性酸素種の産生は認められなかったのに対し、水系白金ナノ分散液 PtNP-2 の場合には、曝露 10 分後から Total ROS レベルならびに Superoxide レベルの顕著な上昇が認められ、ラジカルスカベンジャーとして知られる N-Acetylcysteine 前処理によってこれらの上昇の少なくとも一部は抑制された。さらに、PtNP-2 曝露後に細胞内グルタチオン量の低下も観察されたことから、PMA 処理 THP-1 細胞における水系白金ナノ分散液の細胞毒性発現には活性酸素種の産生による酸化的な傷害が関与しているものと推察される。

E. 結論

ナノシリカおよび白金ナノ粒子は細胞培養試験を想定した懸濁条件下でも、100 nm 未満の粒子径のものが一定量存在した。よってこれらの粒子の *in vitro* 細胞毒性試験はナノサイズでの影響評価をしていると思われた。媒体中でイオンとして溶解している可能性もあり、これについては今後検討する。

細胞毒性に関する検討では、粒子表面に保護剤が存在しない水系白金ナノ粒子は白金ナノコロイドに比べて細胞毒性が高く、24 時間曝露後の LC₅₀ 値は約 30 μ g/mL であった。さらに、曝露後に活性酸素種産生の亢進および細胞内グルタチオン濃度の減少が認められたことから、水系白金ナノ粒子の細胞毒性発現機構として活性酸素種の関与が示唆された。

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

なし

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

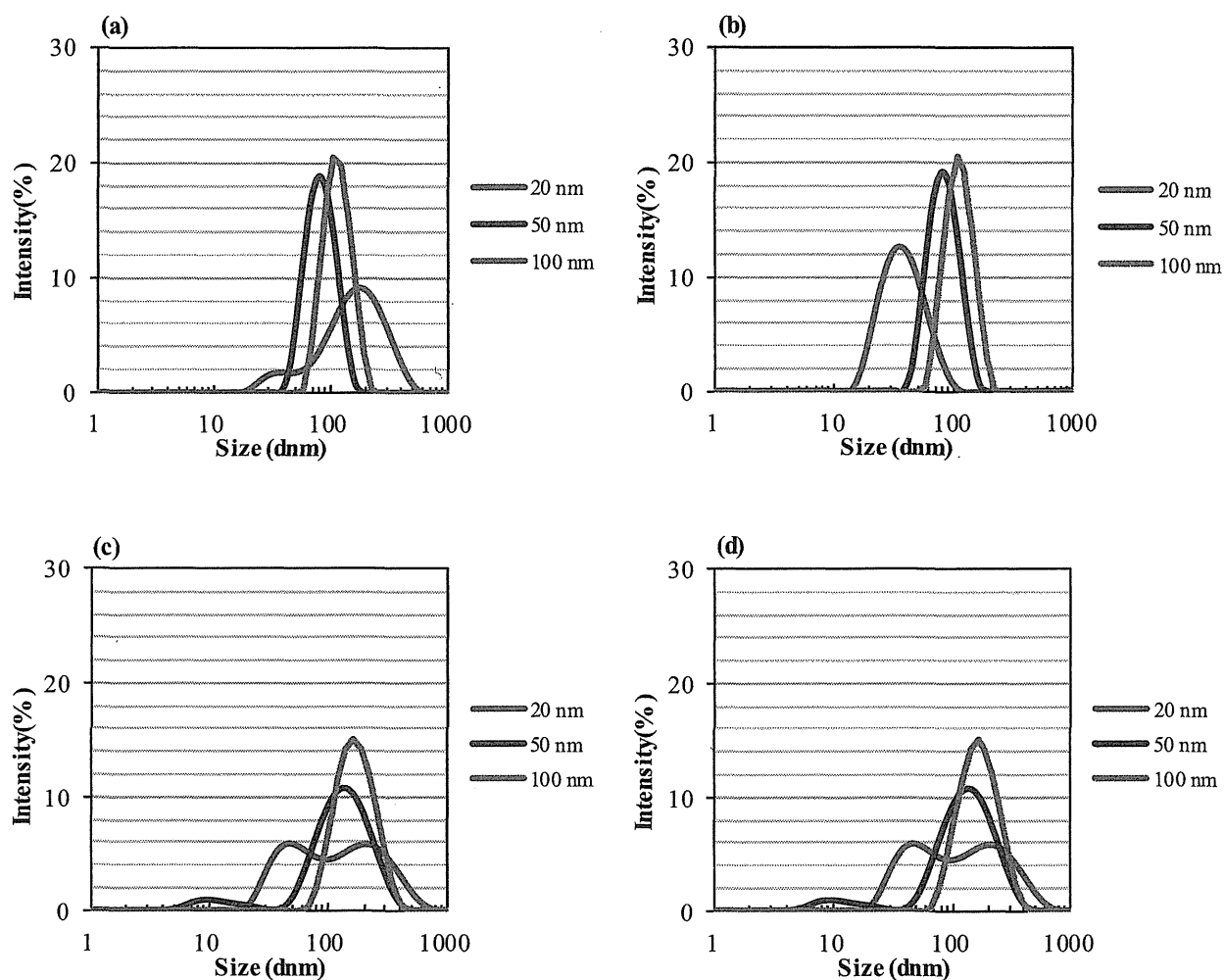


図1. ナノシリカ懸濁液 (100 µg/ml) の粒度分布

- (a) 原液を水で希釈
- (b) 原液をリン酸緩衝液 (PBS) で希釈
- (c) 原液を一旦PBSで10 mg/mlに希釈後、さらにRPMI1640培地で希釈
- (d) 原液を一旦PBSで10 mg/mlに希釈後、さらに10%ウシ胎児血清 (FBS) 含有RPMI1640培地で希釈

表1. 各種媒体に分散したナノシリカの平均粒子径 (nm)

Solvent	SiO ₂ -20 nm		SiO ₂ -50 nm		SiO ₂ -100 nm	
	0 hr	24 hr	0 hr	24 hr	0 hr	24 hr
H ₂ O	136	NT	78	NT	109	NT
PBS	38	NT	78	NT	107	NT
RPMI1640 medium	81	75	85	78	140	126
10%FBS-RPMI1640 medium	77	138	98	96	129	121

NT = not tested, PBS = phosphate buffer solution, FBS = fetal bovine serum.

各ナノシリカ懸濁液を各媒体に100 µg/mlの濃度になるよう希釈し、5分間超音波処理した後、すぐに粒度分布を測定した (0 hr)。これらの希釈懸濁液は37°Cインキュベータ中に24時間静置した後、軽く振りまぜて、再度粒度分布を測定した (24 hr)。

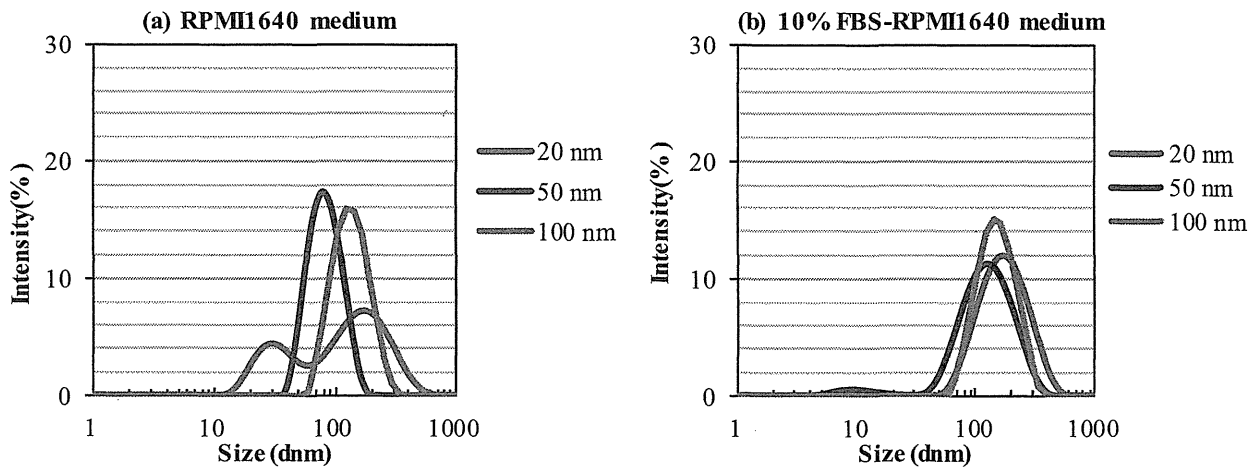


図2. 各種細胞培養液に懸濁し37°Cで24時間静置後のナノシリカの粒度分布

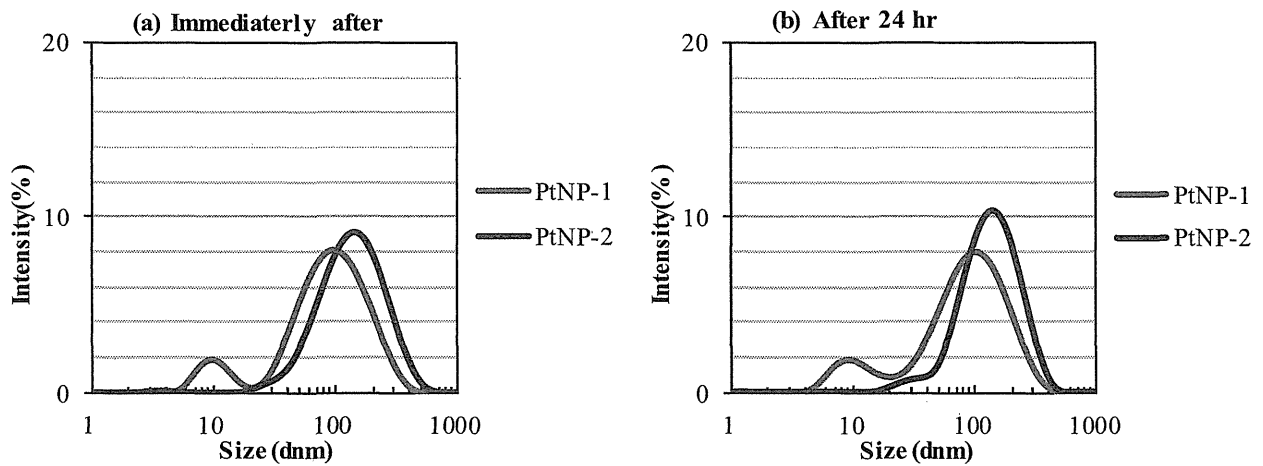


図3. 細胞培養液に懸濁した白金ナノ粒子の粒度分布の経時変化

各粒子懸濁液 (PtNP-1およびPtNP-2) を10%FBS-RPMI1640 mediumで100 $\mu\text{g/ml}$ に希釈し、5分間超音波処理した後、すぐに粒度分布を測定した(a)。これらの希釈懸濁液は、37°Cインキュベータ中に24時間静置した後、軽く振りまぜ、再度粒度分布を測定した(b)。

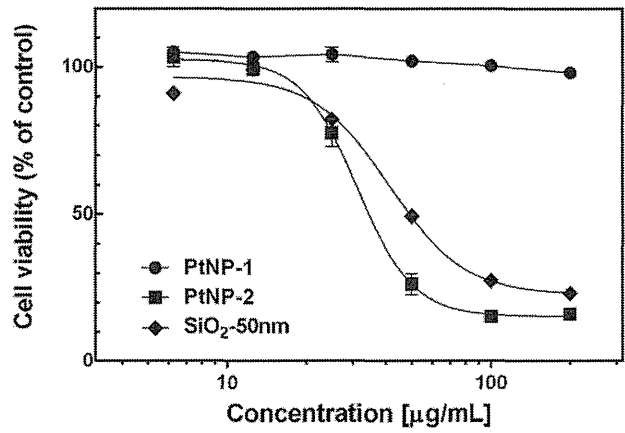


図 4. ナノ白金及びナノシリカ曝露 24 時間後の PMA 処理 THP-1 細胞の生存率

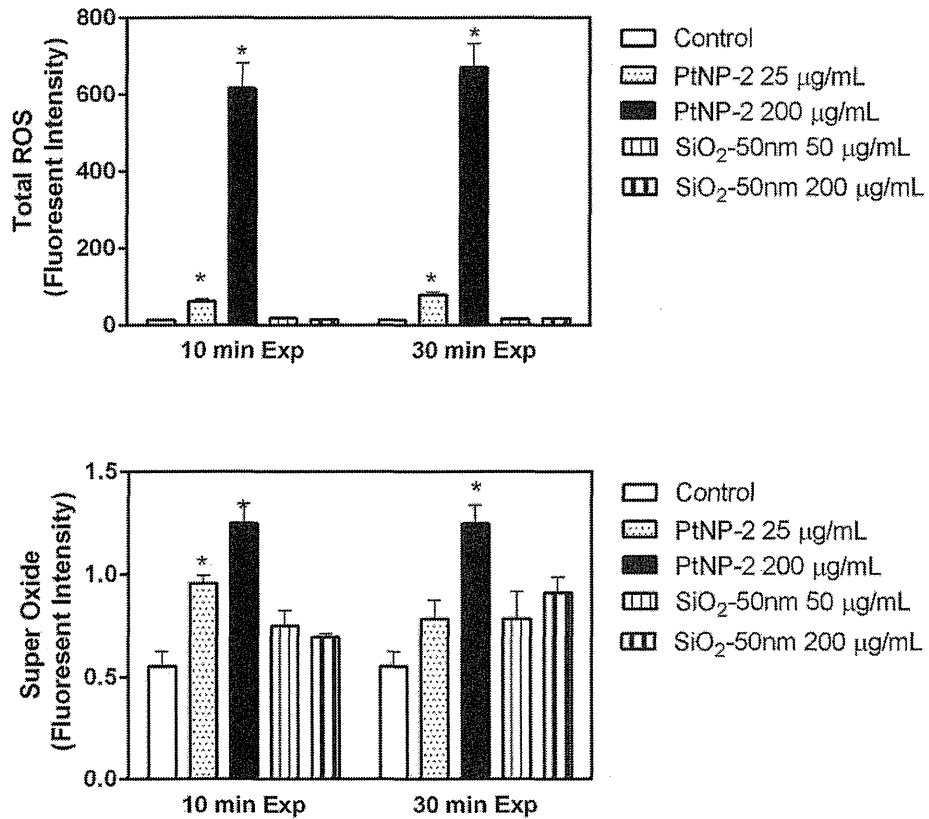


図 5. ナノ白金及びナノシリカ曝露による PMA 処理 THP-1 細胞内活性酸素種の産生
* $p < 0.05$ 対照群との有意差

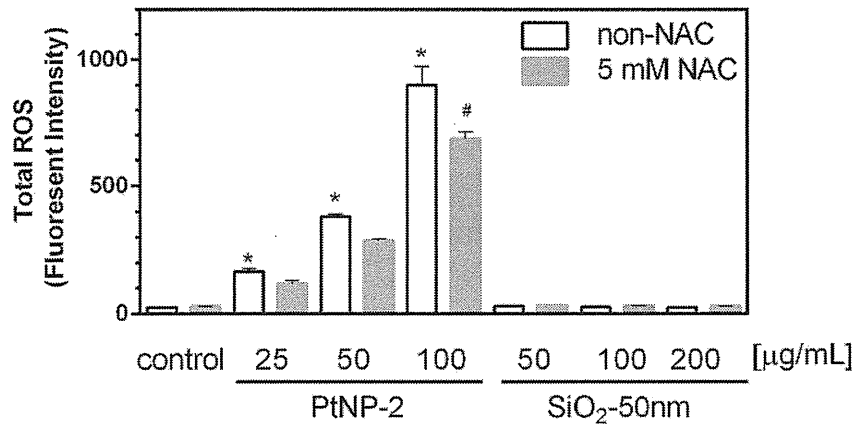


図 6.
ナノ白金及びナノシリカ曝露による PMA 処理 THP-1 細胞内活性酸素種の産生に対する N-acetylcysteine の影響

* $p < 0.05$ 対照群との有意差

$p < 0.05$ NAC 非処理群との有意差

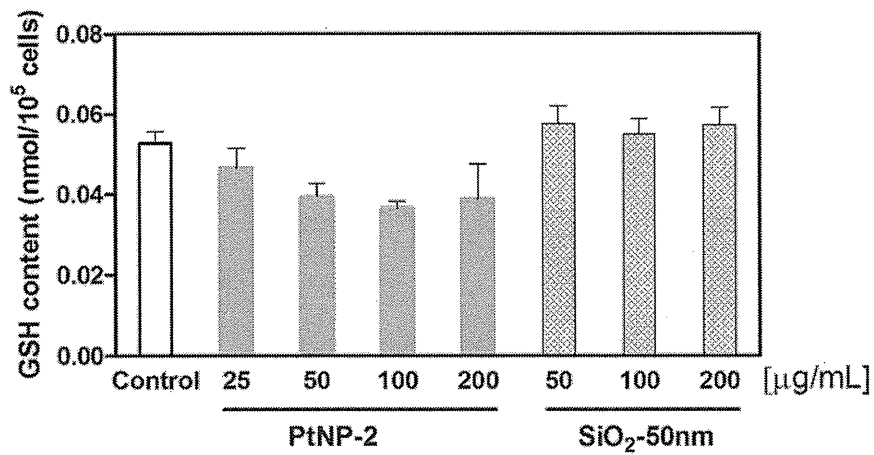


図 7.
ナノ白金及びナノシリカ曝露後の PMA 処理 THP-1 細胞内グルタチオン濃度

研究課題名:カーボンおよび金属ナノマテリアルによる肺および全身臓器障害と発がん作用の機序解析と
それに基づく中期検索法の開発に関する研究

分担研究課題名:ナノマテリアル曝露による炎症誘発で生じるがん原性物質の探索

分担研究者:大島 寛史 静岡県立大学大学院 薬食生命科学総合学府

食品栄養環境科学研究院 教授

研究協力者:伴野 勸 静岡県立大学大学院 薬食生命科学総合学府

食品栄養環境科学研究院 客員共同研究員

研究要旨

ナノマテリアル(NM)への曝露によって生じる健康影響、特に長期毒性と発がん性、を評価することを目的に、今年度は、多層炭素ナノチューブ(MWCNT)を経気管肺内噴霧投与したラット肺内において生成する種々のアルデヒドを含む活性カルボニル化合物(RCs)について網羅的解析を行った。MWCNT(VGCF、VGCF-X)を14日間、経気管肺内噴霧投与されたラットおよび対照群としての vehicle 群のラット肺(各 n=10)から、RCsを抽出し分析したところ、vehicle 群と比較して、MWCNT 投与群では、多くの RCs、特に毒性の強い acrolein、glyoxal、crotonaldehyde、2-hexenal や 4-hydroxyhexenal などが有意に増加していることが認められた。これらの RCs は、活性酸素による不飽和脂肪酸の過酸化により生成することから、肺内で酸化ストレスが亢進していることを示している。

A. 研究目的

ナノマテリアル(NM)への曝露によって生じる健康影響、特に長期毒性と発がん性、を評価することを目的に、今年度、本研究では、多層炭素ナノチューブ(MWCNT)を経気管肺内噴霧投与したラット肺内において生成する種々のアルデヒドを含む活性カルボニル化合物(RCs)について網羅的解析を行った。RCsは、酸化ストレス下において、活性酸素(ROS)による脂質過酸化により生成し、核酸やタンパク質と反応して突然変異や機能傷害を誘導する。

B. 研究方法

ラット肺中の RCs は、当研究室において開発した LC/ESI-MS/MS を用いる RCs の網羅的解

析法により分析を行った。MWCNT(VGCF、VGCF-X)を14日間、経気管肺内噴霧投与されたラットおよび対照群としての vehicle 群のラット肺(各 n=10)をホモジナイズ後、クロロホルム:メタノール(2:1)混液によりアルデヒドやケトンなどのカルボニル化合物(RCs)を含む画分を抽出した。次にこの RCs 画分中の RCs をカルボニル基と特異的に反応する dansyl hydrazine (DH) と反応させ、RCs-DH 誘導体を作製した。この DH 誘導体を LC/ESI-MS/MS で分析すると、誘導体に特徴的なフラグメントイオン (m/z 236.1) が生じるので、これを SRM(selected reaction monitoring) で検出する。この方法により、未知の RCs を含めて、分子量約 700 までの RCs の存在、濃度、極性などの情報が得られる。

(倫理面への配慮)

動物実験は、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管理に関する法律(昭和53年3月27日、総理府告示第6号)」に基づく動物実験倫理委員会の審査を経た上で実施した。

C. 研究結果

MWCNT (VGCF、VGCF-X) を14日間、経気管肺内噴霧投与されたラットおよび対照群としての vehicle 群のラットの肺試料(各 n=10)を用いて、RCs の存在を網羅的に解析した。その結果、vehicle 群、VGCF 群、VGCF-X 群の肺から、既知および未知の RCs を含めて、それぞれ、175、169、149 の DH 誘導体由来のピークが確認された。また、vehicle 群と比較して、VGCF および VGCF-X 投与群では、それぞれ115 および 82 個のピーク面積の増加が観察された。これらの結果より、対照群と比べて、VGCF および VGCF-X 投与群の肺では、多くの RCs 化合物の生成が増大していることが明らかになった。これら増加していた RCs の中でも、特に、毒性の強いことで知られている acrolein、glyoxal、crotonaldehyde、2-hexenal や 4-hydroxyhexenal など脂質過酸化由来のアルデヒド化合物が有意に増加(1.3~2.1倍)していることを確認した。これらのアルデヒド化合物は、核酸やタンパク質との反応性が高く、付加体を形成して、突然変異やタンパク質の機能障害を引き起こすことから、酸化ストレスに関連した発がんあるいは疾病の発症において重要な役割を果たしているものと考えられる。また、脂質過酸化は、活性酸素種により誘導されることから、ラット肺内で、活性酸素種の生成増加が誘発されていることを示している。

D. 考察

MWCNT (VGCF、VGCF-X) を経気管肺内噴

霧により投与したラット肺では、毒性の強いことで知られている acrolein、glyoxal、crotonaldehyde、2-hexenal や 4-hydroxyhexenal などのアルデヒド類が、対照群に比べて、著しく増加していることが明らかになった。これらのアルデヒド類は、活性酸素による不飽和脂肪酸の過酸化により生成することから、肺内で酸化ストレスが亢進していることを示している。今後、MWCNT 投与による酸化ストレス亢進の機構、RCs の生成に関して発がん性が知られている青石綿曝露との比較や炎症や発がん性との関連などについて検討していく必要がある。

E. 結論

NM への曝露によって生じる健康影響、特に長期毒性と発がん性、を評価することを目的に、今年度、MWCNT を経気管肺内噴霧投与したラットの肺内において生成する種々の RCs を網羅的に解析した。vehicle 群と比較して、MWCNT 投与群では、多くの RCs、特に毒性の強い acrolein、glyoxal、crotonaldehyde、2-hexenal や 4-hydroxyhexenal などが有意に増加していることが認められた。これらの RCs は、活性酸素による不飽和脂肪酸の過酸化により生成することから、肺内で酸化ストレスが亢進していることを示している。

F. 健康危機情報

F. 研究発表

1. 論文発表

Miyoshi N, Iuliano L, Tomono S, Ohshima H
Implications of cholesterol autoxidation products in the pathogenesis of inflammatory diseases. *Biochem Biophys Res Commun.* 446:702-708. 2014

2. 学会発表

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

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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)
分担研究報告書

研究課題名:カーボンおよび金属ナノマテリアルによる肺および全身臓器障害と発がん作用の機序解析と
それに基づく中期検索法の開発に関する研究

分担研究課題名:呼吸器系細胞における細胞障害評価系の確立

分担研究者 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 准教授
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 助教
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
山田 茜 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

研究要旨 カーボンナノマテリアルの呼吸器に対する毒性・発ガン機構解明にあたり、被検物暴露のごく初期における直接的な気道上皮繊毛細胞における細胞障害性とその機構の解明を目指した。気道繊毛細胞は異物の口腔側への輸送を直接的に担っているため、細胞障害による繊毛運動機能低下は、異物排泄機能低下に直結する。マウス気道上皮組織からを単離した初代培養繊毛細胞を用いて、細胞内 Ca^{2+} 濃度と膜電位および繊毛運動の関係について明らかにした。また *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初代培養繊毛細胞へのカーボンナノチューブ懸濁液適用による細胞障害性を明らかにした。本結果は、気道内へ取り込まれたカーボンナノチューブが気道上皮繊毛細胞の繊毛に付着し、繊毛細胞の機能低下・細胞障害を引き起こすため、排泄されることなく貯留し、他の上皮細胞への障害性を発揮することを示唆している。

A. 研究目的

分担研究課題名:呼吸器系細胞における細胞障害評価系の確立
各種ナノマテリアル、特にカーボンナノチューブの呼吸器に対する毒性・発ガン機構を解明するにあたり、被検物暴露のごく初期における直接的な呼吸器細胞障害を生化学的・生理学的・薬理学的手法を駆使して解析することを目的とした。特に異物の口腔側への輸送を直接的に担っている気道上皮繊毛細胞に対する細胞障害性の評価系を確立する。

B. 研究方法

B-1 [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、イオンチャネル機能解析] 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、膜電位は電位感受性蛍光色素 *DiBAC₄(3)* を用いることにより、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で画像として取り込み、繊毛運動を定量的に解析した。カーボンナノチューブ懸濁液を初代培養繊毛細胞へ適用し、画像解析を行った。

B-2. [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] 気道内へ2種類のカーボンナノチューブ (MWCNT-L・MWCNT-S) を別々のラットにそれぞれ1、4、7日目に噴霧した。最後の投与から24時間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。

(倫理面への配慮)

実験動物に関する名古屋市立大学の実験倫理指針に従って実験を行った。

C. 研究結果

① 繊毛細胞培養液中に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、12時間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、また12時間後にはMWCNT-LもしくはMWCNT-L適用群において、繊毛細胞の割合が有意に減少した

② ラットの気管よりカーボンナノチューブを暴露し、その肺と気管を摘出してパラフィン包埋切片を作成した。免疫組織染色を行ったところ、MWCNT-L群において繊毛細胞に明らかな損傷が見られた。びらんが形成され、扁平上皮細胞の異性化も見られた。また杯細胞の増加が見られたが、杯細胞の損傷は見られなかった。

③ MWCNT-L群では病変部においては凝集が見られたが、正常な部位では見られず、MWCNT-Sに関しても粘膜において同様な障害が見られた。

④ 気管の横断面での全体の長さに対する病変部の長さの割合について検討したところ、MWCNT-L群とMWCNT-S群ではvehicle群と比べて有意にその割合が増加した。

⑤ 粘膜下の細胞核を染めるDAPI染色と気管表面の繊毛特異的な抗体を用いた免疫染色の蛍光の比をMWCNT-L群とMWCNT-S群について調べ

たところ、vehicle群と比べてMWCNT-L群では有意に減少したが、MWCNT-Sでは減少傾向にとどまった。

⑦ 肺において、MWCNTが凝集している部分のまわりにマクロファージや線維化細胞からなる肉芽形成が見られた。この病変の数はMWCNT-L群、MWCNT-S群でvehicle群と比べて有意に増加した。さらにMWCNT-S群はMWCNT-L群と比べて有意に病変部の数が増加していた。

D. 考察

気管の上皮の繊毛細胞は吸入された粒子などに対する第一の防御機構であり、繊毛の動きによって咽頭側へと移行する。病変部における繊毛細胞の損傷は粘液繊毛保護作用を損ない、粒子や微生物が肺に沈着し、炎症を引き起こす。これらの変化は慢性的な損傷や細胞の再生につながり、気管、気管支、肺での発癌性を高める。今回、*in vivo* 実験でMWCNTによって気道の繊毛上皮細胞の損傷と欠損、さらに杯細胞増加が認められ、気道上皮組織にリモデリングの生じることを初めて示した。*In vitro* においてMWCNTによって繊毛細胞の機能が損なわれたが、これは気道クリアランスを低下させている可能性がある。クリアランスの低下によってMWCNTの貯留時間が長くなり、さらに毒性の持続時間も長くなり、リモデリングが促進されると推測される。またMWCNTが他の組織、特に胸膜腔に広がるリスクも高くなる。MWCNT-LとMWCNT-Sでは肺への損傷の程度が異なる。肺の肉芽形成の増加といった炎症性の変化は、MWCNT-S投与群の方がより高かった。MWCNTの毒性は臓器親和性の影響を受け、大きさや形状にも因っていると考えられる。これらの相違の機構を検証するためにさらなる実験が必要である。

E. 結論

MWCNT-L、MWCNT-Sによる繊毛細胞機能への影響や繊毛細胞障害性さらに上皮組織リモデリングについて今回、新しい知見を得た。繊毛細胞機能への影響や障害性については詳しい機序を今

後検討する必要がある。さらに MWCNT は気道クリアランスへの影響も考えられ、その影響を評価するための系として、今後 *in vivo* での気道クリアランスの評価系の構築も必要である。

2. 実用新案登録

3. その他

F. 健康危機情報

G. 研究発表

1. 論文発表

① Enhancement of Ca^{2+} Influx and Ciliary Beating by Membrane Hyperpolarization due to ATP-Sensitive K^{+} Channel Opening in Mouse Airway Epithelial Cells

Teruya Ohba, Eiji Sawada, Yoshiaki Suzuki, Hisao Yamamura, Susumu Ohya, Hiroyuki Tsuda, and Yuji Imaizumi. *J Pharmacol Exp Ther* 347:145–153, 2013

② MWCNT causes extensive damage to the ciliated epithelium of the trachea of rodents

Teruya Ohba, Jiegou Xu, David Bedell Alexander, Akane Yamada, Jun Kanno, Akihiko Hirose, Hiroyuki Tsuda, Yuji Imaizumi. *J Toxicological Science in press*, 2014

2. 学会発表

大羽輝弥、澤田英志、鈴木良明、山村寿男、大矢進、今泉裕治「気道上皮細胞での K_{ATP} チャネル開口薬による繊毛運動活性化機構」

大羽輝弥、澤田英志、鈴木良明、山村寿男、大矢進、今泉裕治「 K_{ATP} チャネル活性化による繊毛運動活性化機構の解明」第 124 回日本薬理学会近畿部会. 2013 年 11 月 1 日 (京都)

大羽輝弥、澤田英志、鈴木良明、山村寿男、大矢進、今泉裕治「蛍光ビーズを用いた気道クリアランス評価系の開発」第 87 回日本薬理学会年会. 2014 年 3 月 21 日 (仙台)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

研究課題名:カーボンおよび金属ナノマテリアルによる肺および全身臓器障害と発がん作用の機序解析とそれに基づく中期検索法の開発に関する研究

分担研究課題名:発がんに関与する肺マクロファージの *in vitro* および *in vivo* 作用機序解析

分担研究者 酒々井眞澄 名古屋市立大学大学院医学研究科 分子医学講座 分子毒性学分野 教授

研究協力者 二口 充 名古屋市立大学大学院医学研究科 分子医学講座 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 分子医学講座 分子毒性学分野 講師

吉本恵理 名古屋市立大学大学院医学研究科 分子医学講座 分子毒性学分野 技術職員

研究要旨

本分担研究の目的は多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の肺障害性についてヒトへ外挿可能な作用機序解析モデル構築である。前年度までの研究では MWCNT の肺内投与は肺実質に炎症を惹起し、この変化は 1 年経過した後も持続することがわかった。また、炎症組織では特定のサイトカイン発現が増加していることが確認された。本研究では日機装社製多層 MWCNT-N を被検物質として経気管的肺内スプレー法を用いて 2 年経過での中皮腫発がんを検証した。雄 F344 ラットに MWCNT-N (FT 分画平均長 2.6 μm 、W 分画平均長 4.2 μm 、R 分画平均長 >2.6 μm) を 2 週間で計 8 回 (total amount 1.0 mg) 肺内スプレーし 96 週目までの間に死亡あるいは瀕死解剖された個体および 109 週目に剖検された個体について中皮腫発生を調べた。65 週目に 1 個体に縦隔原発の中皮腫が発生し、以降剖検までに 11 個体に中皮腫が発生した。計 12 個体中 10 個体が縦隔あるいは心外膜原発であり、2 個体が精巣原発と考えられた。胸腔での中皮腫発がんまでの平均経過は 94 週であった。無処置群および vehicle control 群には腫瘍は認めなかった。組織学的検索の結果、気管内にスプレーされた MWCNT-N は上縦隔リンパ節、肥厚した横隔膜中皮などに存在した。本実験条件下では、MWCNT-N は心外膜・縦隔中皮を標的とし中皮腫発がんに至ったと考えられる。

A. 研究目的

本研究の目的は多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の肺障害性についてヒトへ外挿可能な作用機序解析モデル構築である。前年度までの研究では MWCNT の肺内投与は肺実質に炎症を惹起し、この変化は 1 年経過した後も持続することがわかった。また、炎症組織では特定のサイトカイン発現が増加していることが確認された。このような背景にもとづき、

本研究では MWCNT-N のラット肺内曝露に伴う発がん性との関連を胸膜および肺組織像、炎症性サイトカイン発現などに着目して解析を進めた。形状を考慮すると MWCNT は肺障害を引き起こす可能性があるが、肺内投与に伴う長期経過後の中皮腫発がんに関わるエビデンスはない。よって、分画化した MWCNT-N を被検物質としコポリマー含有生理食塩水 (PF68) に分散させて投与した。

B. 研究方法

ラットにMWCNT-Nを経気管的肺内スプレー法により投与する実験システムを用いて2年経過での中皮腫発がんを検証した。雄F344ラット(5群を設定、各群15匹)にMWCNT-N(FT分画平均長2.6 μ m、W分画平均長4.2 μ m、R分画平均長>2.6 μ m)を2週間で計8回(total amount 1.0 mg)を肺内スプレーし96週目までの間に死亡あるいは瀕死解剖された個体および109週目に剖検された個体について胸膜肥厚、炎症像、中皮腫発生を調べた。また、腫瘍組織よりタンパクを抽出し前年度にマイクロアレイ解析にて発現増加の認められたサイトカイン(Csf3, IL6, Cxcl2, Ccl4)の発現を解析した。

(倫理面への配慮)

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「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)を遵守し、名古屋市立大学医学部実験動物教育センターでの動物の愛護と使用のガイドラインに則り、動物運営委員会の承認を経て行った。

C. 研究結果

65週目に1個体に縦隔原発の中皮腫が発生し、以降剖検までに11個体に中皮腫が発生した。計12個体中10個体が縦隔(mediastinum)あるいは心外膜原発(pericardium)であり、2個体が精巣原発(tunica vaginalis)と考えられた。組織学的には上皮型および肉腫型であった。胸腔での中皮腫発がんまでの平均経過は94週であった。無処置群およびvehicle control群(コポリマー(PF68)含有生理食塩水)には腫瘍は認めなかった。組織学的検索の結果、気管内にスプレーされたMWCNT-Nは上縦隔リンパ節、肥厚した横隔膜中皮などに存在した。肺実質での肉芽組腫、focal fibrosis、肺胞上皮過形成を認めた。剖検時に得られた中皮腫組織より抽出したタンパクをウエスタンブロット法にて解析した結果、Csf3, IL6,

Cxcl2, Ccl4の発現が対照群と比べて増加していた。

D. 考察

本研究では途中死亡および剖検時まで生き残った個体数に対する縦隔あるいは心外膜原発の中皮腫の発生頻度は25%であった。精巣原発の中皮腫の発生頻度は5%であった。Onoderaらの報告によると本研究で用いた同系統ラット120から131週までの自然経過で肺腺がんの発生頻度は2%、縦隔原発線維肉腫の発生頻度は2%、腹膜中皮腫の発生頻度は2~4%としている。よって、本研究での縦隔あるいは心外膜原発中皮腫の発生頻度は自然発症腫瘍の6~12倍であった。投与したMWCNT-Nの平均粒子径は2.6 μ m以上である。肺内スプレー法で投与されたCNT粒子は気管から肺実質に至り何らかの経路で(マクロファージの取り込み、リンパ流への拡散など)縦隔あるいは心外膜に到達した可能性がある。中皮腫の発生には1年以上の時間経過が必要であることがわかった。2年経過時でも肺実質の炎症像や肺胞上皮過形成がみられるため、炎症が長期経過後に肺発がん性に与える影響を検証する必要がある。

E. 結論

本実験条件下では、CNT粒子が気管あるいは肺内から胸腔に移動し胸膜や縦隔中皮を標的に中皮腫発がんに至ったと考えられる。平均粒子径2.6 μ m以上のCNTについて肺内到達後に1年以上経過した場合に中皮腫発がん性を考慮する必要がある。

F. 健康危機情報

該当なし。

F. 研究発表

1. 論文発表

Sakai Y, Fukamachi K, Futakuchi M, Miyoshi I, Tsuda H, Suzui M, Hayashi H. A novel transgenic mouse model carrying human tribbles related protein

3 (TRB3) gene and its site specific phenotype. Biol Pharm Bull, in press.

Nunamo T, Xu J, Futakuchi M, Alexander DB, Furukawa F, Kanno J, Hirose A, Tsuda H, Suzui M. Comparative study of toxic effects of anatase and rutile type nanosized titanium dioxide particles in vivo and in vitro. Asian Pac J Cancer Prev, 15: 929-935, 2014.

Xu J, Futakuchi M, Alexander DB, Fukamachi K, Numano T, Suzui M, Shimizu H, Omori T, Kanno J, Hirose A, Tsuda H. Nanosized zinc oxide particles do not promote DHPN-induced lung carcinogenesis but cause reversible epithelial hyperplasia of terminal bronchioles. Arch Toxicol, 88: 65-75, 2014.

Suzui M, Morioka T, Yoshimi N. Colon preneoplastic lesions in animal models. J Toxicol Pathol, 26: 335-341, 2013.

Sakai Y, Fukamachi K, Futakuchi M, Hayashi H, Suzui M. Promotive effects of cell proliferation and chromosomal instability induced tribbles-related protein 3 in mouse mammary tumor cells. Oncol Rep, 30: 64-70, 2013.

Fukamachi K, Tanaka H, Sakai Y, Alexander DB, Futakuchi M, Tsuda H, Suzui M. A novel reporter rat strain that express LacZ upon Cre-mediated recombination. Genesis, 51: 268-274, 2013.

Yabushita S, Fukamachi K, Tanaka H, Fukuda T, Sumida K, Deguchi Y, Mikata K, Nishioka K, Kawamura S, Uwagawa S, Suzui M, Alexander DB, Tsuda H. Metabolomic and transcriptomic profiling of human K-ras oncogene transgenic rats with pancreatic ductal adenocarcinomas. Carcinogenesis, 34: 1251-1259, 2013.

Yabushita S, Fukamachi K, Kikuchi F, Ozaki M, Miyata K, Sukata T, Deguchi Y, Tanaka H, Kakehashi A, Kawamura S, Uwagawa S, Wanibuchi H, Suzui M, Alexander DB, Tsuda H. Twenty-one proteins up-regulated in human H-ras oncogene transgenic rat pancreas cancers are up-regulated in human pancreas cancer. Pancreas, 42: 1034-1039, 2013.

Masuda M, Toh S, Wakasaki T, Suzui M, Joe AK. Somatic evolution of head and neck cancer-biological robustness and latent vulnerability. Mol Oncol, 7: 14-28, 2013.

2. 学会発表

津田洋幸、徐結苟、David B. Alexander、飯郷正明、徳山猛、宇佐美郁治、林嘉光、小栗鉄也、高橋智、酒々井眞澄、広瀬明彦、菅野純。アスベスト曝露及び悪性中皮腫の血清診断マーカーとしてサイトカイン Mip1 α (CCL3) の有用性。第20回日本がん予防学会；東京：2013年7月5日

M. Suzui, S. Ikenaga, Y. Isoda, T. Numano, K. Fukamachi, M. Futakuchi, H. Tsuda. Inflammation profile and gene expression status induced by intratracheal instillation of the multiwall carbon nanotube into rat lung. The XIII International Congress of Toxicology 2013; Seoul: July 3, 2013.

津田洋幸、徐結苟、酒々井眞澄、二口充、深町勝巳、菅野純、広瀬明彦。多層カーボンナノチューブとアスベストの経気管肺内噴霧投与による胸膜中皮の増殖。第40回日本毒性学会学術年会；幕張：2013年6月17日

二口充、徐結苟、深町勝巳、津田洋幸、酒々井眞澄。ナノ材料の噴霧暴露後、長期間経過して発生するリスクの背景となる肺組織の検索。第40回

日本毒性学会学術年会；幕張： 2013年6月18日

酒々井眞澄、沼野琢旬、深町勝巳、二口充、津田洋幸. 多層カーボンナノチューブのラット肺ばく露に伴う炎症プロファイルと遺伝子発現特性. 第40回日本毒性学会学術年会；幕張： 2013年6月18日

深町勝巳、大嶋浩、二口充、津田洋幸、酒々井眞澄. 血清診断が可能なラット肺がんモデル. 第40回日本毒性学会学術年会；幕張： 2013年6月18日

M. Suzui, T. Numano, M. Futakuchi, K. Fukamachi. Evaluation of carcinogenic effect of multiwall carbon nanotubes on the rat lung at 2 and 52 weeks after pulmonary instillation. American Association for Cancer Research Annual Meeting 2013; Washington DC: April 9, 2013.

T. Numano, J. Xu, M. Futakuchi, K. Fukamachi, F. Furukawa, M. Suzui, H. Tsuda. Effect of anatase type nanosized titanium dioxide particles on the rat lung and cultured macrophage. American Association for Cancer Research Annual Meeting 2013; Washington DC: April 9, 2013.

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

研究課題名:カーボンおよび金属ナノマテリアルによる肺および全身臓器障害と発がん作用の機序解析と
それに基づく中期検索法の開発に関する研究

分担研究課題名:カーボンおよび金属ナノマテリアルによる肺および全身臓器障害と発がん作用の機序解析と
それに基づく中期検索法の開発に関する研究

研究分担者 津田 洋幸 名古屋市立大学津田特任教授研究室 特任教授

研究協力者 飯郷 正明 名古屋市立大学大学院医学研究科 研究員

徐 結苟 名古屋市立大学大学院医学研究科 研究員

David B. Alexander 名古屋市立大学大学院医学研究科 研究員

研究要旨

MWCNT について、長期試験に代替可能な、①短期 *in vitro* 試験並びにラットを用いた
② *in vivo* 系における解析、および、③発癌プロモーションモデルにおける多臓器の障
害と腫瘍病変発生のモデルの実用性について検証した。今年度は、線維の太さと長径の
異なる MWCNT-L (長径=8 μ m, 太さ直径=150nm, 針状) と MWCNT-S (長径=3 μ m, 太さ=15nm,
綿菓子状) について検証した。その結果、① 両物質ともラットの肺胞 M ϕ 培養液中に検
体を加え飼食させた培養上清は、ヒト中皮腫細胞、ヒト肺がん細胞等に対する毒性はある
が増殖刺激作用は無かった。③ 予め肺発がん物質を 2 週間飲水投与後、第 5 週より両物
質 250mg/ml を気管内噴霧 (TIPS) 投与し (第 5～第 24 週、週 1 回、計 20 週)、最終投
与 3 日後に屠殺した。MWCNT-L と MWCNT-S は肺実質と胸膜の炎症と線維化を発生させたが
(MWCNT-L>MWCNT-S)、両物質ともラット肺発がんプロモーション作用はなかった。しか
し、胸腔において MWCNT-L は臓側、壁側中皮細胞の増殖を誘発した。MWCNT-L は肺から胸
腔、全身臓器に移動したが、極めて少量で局所の炎症は殆どなかった。以上の結果と酒々
井班員の同様法での中皮腫発生の結果を併せると、①短期 *in vitro* 試験および、③ 週の肺
発癌プロモーションモデルが有効であると結論された。

A. 研究目的

ナノマテリアル (NM: 短径 100nm 以下の粒子・
線維) には二酸化チタニウム (nTiO₂) 等の金属
粒子、フラーレン、フラーレンウィスカー、単層
/多層炭素ナノチューブ (SWCNT/MWCNT) 等がある。
とくに炭素ナノマテリアル (CNM) は、生体内で
分解されることは無く細胞・組織に沈着するた
めに、従来の化学発癌の概念 (自体が直接または代

謝変換されて結果 DNA 障害を起こす物質に変換さ
れる、または代謝の過程で ROS を産生する等) で
は、毒性・発癌性を評価できない。これまでの研
究より、MWCNT は肺内に噴霧 (TIPS) 投与すると
胸腔、脾、リンパ節、肝、腎、脳等へ移行するこ
と、更に我々は MWCNT-7 (凝集体長径 50～120nm)
は胸腔内投与で顕著な炎症と臓側中皮増殖を誘
発することを報告した (Cancer Science, 2012)。

本研究では製造設計によって線維の太さと長径の異なる MWCNT (MWCNT-L、MWCNT-S) について、TIPS 投与によって肺胞と胸膜中皮における毒性、炎症誘発、細胞増殖刺激の有無と程度、その機序について解析し、その手法が長期試験に代替可能な、①短期 *in vitro* 試験並びにラットを用いた② *in vivo* 系における解析、および、③発癌プロモーションモデルにおける多臓器の障害と腫瘍病変発生を検証して、一連の評価モデルの整合性の検証を行った。

B. 研究方法

材料：MWCNT-L (製造時長径=8 μ m, 太さ直径=150nm) と MWCNT-S (同長径=3 μ m, 太さ=15nm) (S社製) を用いた。検体は 0.5% Pluronic F68 (PF68) に分散懸濁して、投与直前に超音波による再分散をおこなった。投与試料の走査電顕像による観察では、溶媒中のサイズ (長径) は MWCNT-L は不規則な針状・棒状の線維が不定形の凝集塊づくり、その平均長径は 7.33 \pm 3.69 μ m であった。MWCNT-S は屈曲した線維が綿菓子状に絡まった凝集塊を形成し、それらは大小不同で一部ではシート状を成し大きさの計測は出来なかった。

これらについて、今までの以下の試験系に基づき、長期吸入試験に代替可能な試験法の確立を試みてきた。その概要は、①ラットの肺胞マクロファージ (M ϕ) 一次培養液 (PAM) に検体 CNM を加えた上清の主要臓器由来細胞の増殖誘発と原因サイトカインの把握と暴露マーカーの選別、②ラットへの TIPS 投与における MWCNT による肺および胸腔洗浄液 (PCL) 中の MWCNT の証明とマクロファージと炎症細胞の種類、胸膜の炎症と線維化、中皮細胞増殖誘発を明らかにした。PCL は深麻酔下にて腹腔より横隔膜経由で胸腔に RPMI1640 培養液を注入して 3 分以内に注射筒にて採取して、円沈後沈査したペレットはパラフィン包埋して病理学的検査、上清は蛋白アレイ解析を行なった。検体の観察は偏光顕微鏡さらに MWCNT-S はとくに CytoVita HRA による観察を行なった。更に発がん作用に関しては、③ 予め肺発

がん物質 N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN) を飲水投与後、被検物質を TIPS 投与し、肺、胸膜中皮の増殖性変化を観察した。本研究ではまた、提案プロトコールの②と同様に PCL を採取して炎症細胞と検体の解析も行なった。また、この試験では敢えて②を省略して③における検体みの 20 週投与群における肺、胸膜中皮、及全身臓器の変化について検索した。④ 以上を集約して、一連の *in vitro-in vivo* 中期発癌検索系の確立を試みている (26~27)。

(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) を遵守するとともに、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た上で研究を実施する。ヒト組織から得た材料を用いる実験は実施しない。

C. 研究結果

① ラットの肺胞 PAM 培養液に検体を加えた上清のヒト中皮腫細胞 (TCC-MES01) ヒト肺がん細胞 (A549) およびヒト肺線維芽細胞 (CCD34) に対する影響：MWCNT-L、MWCNT-S とも増殖刺激作用は見られず、MWCNT-S により顕著な細胞毒性 (viability の低下) がみられた。

③ 予め肺発がん物質の

N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN) を 2 週間 0.2% 飲水投与 (第 1~第 2 週) 後、2 週を経て、被検物質 250mg/ml を TIPS 投与し (第 5~第 24 週、週 1 回、計 20 週)、最終投与 3 日後に屠殺した。MWCNT-L と MWCNT-S の肺組織における M ϕ と肺胞壁肥厚を主体とする炎症肉芽の数は DHPN 投与に関係なく MWCNT-L のほうが有意に多かった。肺胞上皮の過形成、過形成+腺腫+腺がんの肺切片の数 (/cm²) は DHPN \rightarrow PF68 群 (PF68) と比較して有意差はなく、肺発がんプロモーション

作用は無いと判断された。胸膜組織の肥厚は PF68 と較べて壁側、臓側とも MWCNT-L 群により著明であり、MWCNT-L の胸膜中皮細胞の PCNA ラベリング値も同様に壁側、臓側とも MWCNT-L のほうに PF68 群より有意の増加（約 10 倍）を示した。MWCNT-L は胸腔内 PCL と胸壁組織中に沈着して観察された。一方、MWCNT-L のほうは CytoViva HRA による観察で僅かに検出されたのみであった。PCL では、細胞成分は Mφ、好中球、好酸球およびリンパ球が主体であり、Mφ の胞体中には MWCNT-L が検出されたが MWCNT-S は見出すことは出来なかった。総白血球数、そのうちの CD68 陽性 Mφ 数は MWCNT-S より MWCNT-L に多く（約 1.3～1.5 倍）みられた。また PCL 液層成分中の炎症関連サイトカインアレイ解析では MWCNT-L において PF68 群と比較して IP-10 (7.4 倍)、RANTES (1.8 倍)、IL-2 (11.8 倍)、IL-18 (1.6 倍) であって有意の差異（増加）であった。MWCNT-S ではこれらは増加しているものの MWCNT-L よりは低値であって有意では無かった。また MWCNT-L の肺、胸膜以外では縦隔リンパ節には大量に、顎下リンパ節、腸間膜リンパ節、肝類洞、腎系球血管、脾臓（洞内）には少量検出された。これらの臓器に MWCNT-S は見いだされなかった。

D. 考察

ラットの肺胞 PAM に検体を加えた上清のヒト中皮腫細胞 (TCC-MES01) ヒト肺がん細胞 (A549) およびヒト肺線維芽細胞 (CCD34) に対しては、MWCNT-L、MWCNT-S とも毒性が観察され、cytotoxic なサイトカインが分泌されたものと考えられた。その理由には PCL に検出された IP-10、RANTES、IL-2、IL-18 等が関与している可能性があるが、今後検討してゆく課題と考える。

DHPN 投与による肺発がんイニシエーション処置後、被検物質を投与するプロモーション作用の検出モデルでは、今までに二酸化チタニウム

(IARC 発がん分類 Group 2) でその妥当性が証明されているが、本実験では、肺胞上皮の過形成、

過形成+腺腫+腺がん合計数の肺切片の数 (/cm²) は (DHPN→) PF68 群と比較して有意差はなく、MWCNT-L と MWCNT-S には肺発がんプロモーション作用は無いことが示された。

一方、胸膜組織の肥厚は PF68 と較べて壁側、臓側とも MWCNT-L においてより著明であり、MWCNT-L の胸膜中皮 PCNA ラベリング値も同様に壁側、臓側とも MWCNT-L のほうに PF68 群より有意の増加を示した（壁側、臓側とも約 10 倍）。このことは、検体の局在と相関して、壁組織中に沈着した MWCNT-L が胸膜炎を惹起したことによるものと考えられた。これらの変化は MWCNT-L と MWCNT-S ともに組織、細胞内とくに Mφ 内に異物として長く留まって持続的な炎症反応を起こしたものと考えられる。このことは②の短期試験「必ずしも実施しなくても良い可能性をします。

PCL 検査では、細胞成分は Mφ、好中球、好酸球およびリンパ球が主体であり、Mφ の胞体中には MWCNT-L が検出されたが、MWCNT-S は CytoViva HRA にて主として Mφ 内にかろうじて少数見出されたのみであった。総白血球数、そのうちの CD68 陽性 Mφ 数は MWCNT-L に多く（約 1.3～1.5 倍）みられた。また PCL 液層成分の炎症関連サイトカインアレイ解析では MWCNT-L において PF68 群と比較して IP-10 (7.4 倍)、RANTES (1.8 倍)、IL-2 (11.8 倍)、IL-18 (1.6 倍) であって有意の増加であった。MWCNT-S ではこれらは増加しているものの MWCNT-L よりは低値であって PF68 と比較して有意では無かったことは MWCNT-L により強い炎症誘導作用が有ると解釈された。

また肺、胸膜以外では MWCNT-L が縦隔リンパ節には大量に、顎下リンパ節、腸間膜リンパ節、肝類洞、腎系球血管、脾臓（洞内）には少量検出されたが、肺、胸膜のような顕著な炎症反応を誘発するには至らなかった。このことは今年度の提案のひとつである臓器発がんプロモーションモデルは現状では実際的ではないと考えられた。

E. 結論

・ 肺内に投与した MWCNT-L と MWCNT-S にはとも

にラット肺発がんプロモーション作用はなかった。一方、凝集体平均径 $2.6\ \mu\text{m}$ 以上で針状・棒状の MWCNT は高い確率で壁側または臓側胸膜に中皮腫を発生させる。

- MWCNT-L と MWCNT-S は肺実質と胸膜の炎症と線維化をおこす。その作用は MWCNT-L のほうが MWCNT-S より顕著である。
- MWCNT-L は肺から胸腔、全身臓器に移動するが、炎症や障害作用は観察されなかった。移動経路はリンパ流と血流の両方が考えられる
- 以上の結果は、肺、胸膜に対する作用は、④ 短期 *in vitro* 試験および、⑤ 週の 24 週の発癌プロモーションモデルで実施可能である。
- MWCNT-S は走査電顕では観察出来ない。CytoViva HRA による散乱光による観察で一部の観察は可能であるがその生体内把握は容易ではない。

F. 健康危機情報

特に無し。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yabushita S., Fukamachi K., Tanaka H., Fukuda T., Sumida K., Deguchi Y., Mikata K., Nishioka K., Kawamura S., Uwagawa S., Suzui M., Alexander DB., and Tsuda H. Metabolomic and transcriptomic profiling of human *K-ras* oncogene transgenic rats with pancreatic ductal adenocarcinomas. *Carcinogenesis*. 34:1251-1259, 2013
2. Yabushita S., Fukamachi K., Kikuchi F., Ozaki M., Miyata K., Sukata T., Deguchi Y., Tanaka H., Kakehashi A., Kawamura S., Uwagawa S., Wanibuchi H., Suzui M., Alexander DB., and Tsuda H. Twenty-One Proteins Up-Regulated in Human H-ras Oncogene Transgenic Rat Pancreas Cancers are Up-Regulated in Human Pancreas Cancer. *Pancreas*. 42:1034-1039, 2013
3. Xu J., Futakuchi M., Alexander D.B., Fukamachi K., Numano T., Suzui M., Shimizu H., Omori T., Kanno J., Hirose A., Tsuda H. : Nanosized zinc oxide particles do not promote DHPN-induced lung carcinogenesis but cause reversible epithelial

hyperplasia of terminal bronchioles. *Arch Toxicol.*, 2013 Jul 6. [Epub ahead of print]

<http://link.springer.com/article/10.1007/s00204-013-1086-5#page-1>

4. Numano T., Xu J., Futakuchi M., Fukamachi K., Alexander D.B., Shimizu H., Furukawa F., Kanno J., Hirose A., Tsuda H., Suzui M., : Comparative study of the toxic effects of anatase and rutile type nanosized titanium dioxide particles in vivo and in vitro. *APJCP* ,15:929-935, 2014.

2. 学会発表

国内学会

1. 津田洋幸, 徐結苟, 酒々井眞澄, 二口充, 深町勝巳, 菅野純, 広瀬明彦 (2013). 多層カーボンナノチューブとアスベストの経気管内噴霧投与による胸膜中皮の増殖. 第 40 回日本毒性学会学術年会 千葉, 6 月 17 日-19 日.
2. 二口充, 徐結苟, 深町勝巳, 津田洋幸, 酒々井眞澄 (2013). ナノ材料の噴霧曝露後、長期間経過して発生するリスクの背景となる肺組織の検索. 第 40 回日本毒性学会学術年会 千葉, 6 月 17 日-19 日.
3. 酒々井眞澄, 沼野琢旬, 深町勝巳, 二口充, 津田洋幸 (2013). 多層カーボンナノチューブのラット肺ばく露に伴う炎症プロファイルと遺伝子発現特性. 第 40 回日本毒性学会学術年会 千葉, 6 月 17 日-19 日.
4. 深町勝巳, 大嶋浩, 二口充, 津田洋幸, 酒々井眞澄 (2013). 血清診断が可能なラット肺がんモデル. 第 40 回日本毒性学会学術年会 千葉, 6 月 17 日-19 日.
5. 柴田耕治, 辻厚至, 佐賀恒夫, 深町勝巳, 二口充, 津田洋幸, and 酒々井眞澄 (2013). ラット膵管がんモデルに対する小動物用 PET/CT による *in vivo* イメージング. 第 28 回発癌病理研究会 沖縄, 8 月 26 日-28 日.