

初発時期よりも早期であった。本研究で投与した繊維数は、T-CNT は約 3×10^7 本/動物、Crocidolite は約 9×10^7 本/動物であり、繊維数は Crocidolite が約 3 倍程度多い。重量ベース、繊維数ベースにおいても MWCNT は Crocidolite よりも中皮腫誘発能が高いと考えられた。その理由として、MWCNT は、frustrated phagocytosis を引き起こす長さの繊維が多く含まれることが考えられた。表面活性の差の可能性については、さらなる検討が必要であると考えられた。

A. 研究目的

本研究では、高生産量ナノマテリアルに対する安全性評価手法の開発検討を優先して行い、ナノマテリアルによる生体影響評価のための、特に慢性影響・遅発影響を適切に検出する評価手法の開発を目標としている。

平成 18~20 年度の厚生労働科学研究「ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法の開発のための有害性評価及び体内動態評価に関する基盤研究」の分担研究課題「高生産量ナノマテリアルの有害性評価指標の開発に関する研究」では、過去にアスベスト代替繊維の発癌性評価に用いられた腹腔内投与試験系と、Agnes Kane らの p53+/-マウスにおけるアスベスト中皮腫発癌の知見¹⁾を基盤に、MWCNT が雄性 p53 +/-マウス腹腔内投与により $3 \mu\text{g}$ /動物から $3,000 \mu\text{g}$ /動物の範囲で、用量依存的に中皮腫を誘発することを示した^{2,3)}。

その際、初発までの潜伏期間に用量依存性が認められないこと、及び、中皮腫前駆病変と考えられる異型中皮過形成巣の誘発には散在性の MWCNT 単離繊維を貪食したマクロファージを伴う非肉芽腫性の局所慢性炎症が重要であり、凝集した MWCNT 繊維塊を取り囲む類上皮細胞肉芽腫及びその線維化痕はそれに寄与しないことが示唆された。尚、これらの実験では MWCNT 原末を一般的な分散方法で調製しており、投与検体には凝集体を含んでいた。ここでの経験、及び気管内投与文献の知見から、MWCNT の生体影響を正しく評価するためには、凝集

体を含まない、より高度に分散された検体を使用することが重要であることが再認識された。

そこで、本研究では実験動物による MWCNT の生体影響の評価・予測の人への外挿を高める為に、MWCNT の原末に含まれる凝集体を高率に除去し単離繊維を高度に分散する方法 (Taquann 法、特許出願済) を開発し、動物実験用の検体として使用している⁴⁾。

H24 年度には、Taquann 法処理した MWCNT を p53+/-マウス腹腔内投与モデルに適用し、経時的に採血を行い、血清 Meshothelin 測定を試料に供すると共に、中皮腫発癌までを経時的に組織観察し、既に実施した実験 (MWCNT 原末を一般的分散法により投与) の組織変化との比較を行った。その結果、中皮腫誘発は、初発までの潜伏期間、初期病理組織像を含め、先行研究の実験結果と良く一致した。一方、検体の重量ベースで、Taquann 処理検体の $10 \mu\text{g}$ /動物の発癌性が従来法による検体の大凡 $200 \mu\text{g}$ /動物に相当することが判明した。これは、Taquann 処理検体が殆ど凝集体を含まず単離 MWCNT 繊維が重量当たり 20 倍含まれていることと良く一致していた。

H25 年度は、MWCNT がアスベストと同様の機序で野生型マウスにおいても中皮腫を誘発するか否かを確認する目的で実験を行った。H24 年度の実験と同様に、T-CNT $10 \mu\text{g}$ /動物を野生型マウスに単回腹腔内投与し、その後 1 年 6 箇月の観察を行う計画で実験を開始した。

B. 研究方法

B-1. 検体

1) MWCNT

MWCNTは三井物産のMWNT-7を使用した。

繊維径 70-170 nm (平均 100 nm) ^{a)}

長さ 1-19 μm (> 5 μm 27.5%) ^{a)}

繊維数 3.55×10^{11} 本/g ^{a)}

製品形状 繭状凝集体及び単離繊維

化学組成 炭素純度 99.5%以上

鉄：3500 ppm (0.35%) ^{a)}

硫黄：470 ppm ^{a)}

塩素：20 ppm ^{a)}

フッ素：<5 ppm ^{a)}

臭素：<40 ppm ^{a)}

^{a)}東京都健康安全研究センターの測定データ ^{2,3)}

MWNT-7の原末はTaquann法⁴⁾を適用して使用した。以下、T-CNTと記載する。

Taquann法は、走査型電子顕微鏡 (SEM) の試料作製方法である「臨界点乾燥」の概念と、液相での分散と濾過を組み合わせた技術であり、濾液の分散媒を除去する際に表面張力を生じないため、分散質の分散性が確保される事を利用したものである。具体的には、MWCNT原末を三級ブタノール (TB、融点；25.69℃、関東化学株式会社 特級) に分散、懸濁させて、凍結融解による分散促進を一回行った後、金属製フィルター (セイシン企業、目開き 25 μm) でろ過し大型の凝集体を除くとともに、分散を図り、ろ液を直ちに液体窒素で凍結・固化させる。固相状態のろ液を溶媒回収型真空ポンプ (Vacuubrand、MD4CNT+AK+EK) により減圧し、液相を介さずに昇華させ、TBを分離除去することで、分散性の保たれた乾燥状態のMWCNTを得る。

T-CNTには、 3×10^6 本/ μg の繊維数が含まれる⁴⁾。

2) Crocidolite (陽性対照)

Crocidolite (UICC-grade) は国立医薬品食品衛生研究所で保管している検体を使用した²⁾。Crocidoliteには 2.93×10^9 本/mgの繊維数が含まれる^{2,5)}。

3) 溶媒

溶媒は0.1% Tween80 (「日局」ポリソルベート 80 (HX)、日油株式会社) を含む生理食塩液 (大塚製薬工場) を用いた。

4) 検体の調製方法

T-CNTとCrocidoliteはガラスバイアル内で生理食塩液と混合、オートクレーブで滅菌処理した後に Tween80 を添加し、超音波浴槽 (SU-3TH、出力 40W、発振周波数 34kHz、柴田科学) で超音波を5分間照射し、懸濁液とした。

B-2. 使用動物、飼育管理

1) 使用動物

先行研究では、C57BL/6N CrSlc (日本エスエルシー株式会社) をバックグラウンド (40代以上) とする p53+/-マウス (自家繁殖) を使用して研究を進めてきたため、本研究では、C57BL/6N CrSlc の野生型雄性マウスを使用した。合計 260 匹の 6 週齢マウスを 1 週間の期間を空けて 130 匹ずつ 2 回に分けて購入し、6 週間の馴化期間を設け 12 週齢で実験に供した。

2) 飼育管理

ポリカーボネイト製のケージに紙製の床敷を使用し、1 ケージ当り 10 匹のマウスを収容した。ケージラックはケミカルセーフティ対応のケージ個別換気式飼育装置 (VIC システム、ダイダン株式会社) を使用した。飼育条件は、温度； $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度； $55 \pm 5\%$ 、換気回数；約 20 回/h、照明時間；8 時～20 時点灯 (照明明暗サイクル

12 時間) とし、固型飼料 CRF-1 (オリエンタル酵母工業株式会社) を付属の給餌器を使用して自由摂取させ、飲水は市水をフィルター濾過し自動給水装置により自由摂取させた。

個体識別は、耳介にハサミで切り込みを入れる方法で行った。

全ての動物について、一般状態観察を 2 日毎、体重測定を 4 週間毎に実施した。一般状態の悪化が認められた動物は直ちに解剖に供した。

B-3 群構成、投与 (表 1)

1) 群構成

動物は媒体対照群 80 匹、T-CNT 100 匹、Crocidolite 投与群 80 匹に設定した。最初に購入した 130 匹の動物を A グループ、2 回目に購入した 130 匹を B グループのサブグループとし、それぞれのサブグループ毎に、投与前日の体重を指標にして群わけを行った。投与前日の体重の平均は、A グループ 27.2 ± 1.6 g、B グループ 26.2 ± 1.5 g であり、グループ間に差は認められなかった。

2) 投与

投与量は 0.5 mL/動物とした。媒体対照群には溶媒のみ、T-CNT 群には $10 \mu\text{g}$ /動物、Crocidolite 群には $30 \mu\text{g}$ /動物を単回腹腔内投与した。T-CNT 群では、動物 1 匹当たりに投与した繊維数は、約 3×10^7 本である。Crocidolite 群では、動物 1 匹当たりに投与した繊維数は約 9×10^7 本である。

B-4 解剖及び病理組織標本

1) 解剖及びサンプリング

投与後 20 週毎に 10~20 匹の動物を定期解剖に供し、観察期間 1 年 6 カ月 (80 週) の計画とした。

動物は吸入麻酔器 (TK-7、バイオマシナリー) を用いイソフルラン (イソフル、DS ファーマアニマルヘルス) 麻酔下で眼窩より採血し、腋下動脈を切断して放血による安楽死後に剖検を行った。血液は、室温で約 30 分静置後、 4°C 、 $2,500 \times \text{g}$ で血清を分離し -80°C で保存した。肝、腎 (左右)、脾、心は固定前重量を測定した。全ての臓器は

10% 中性緩衝ホルマリンで固定した。横隔膜は胸郭下口に付着させた状態で固定した。腹壁はろ紙に伸展させ、ゴム板に虫ピンで固定した後に固定液に浸漬した。

2) 病理組織標本

固定後に臓器を切り出しし、常法に従って脱水、パラフィン包埋し、薄切して H&E 染色標本を作製した。

組織中の MWCNT の観察は、偏光フィルターを装着した通常の光学顕微鏡観察及び、高分解能暗視野コンデンサを用いた散乱光によるナノ粒子の検出システム (High Resolution Adapter (HRA)、CytoViva[®]) を使用した。

倫理面への配慮

本実験は動物愛護に関する法律、基準、指針を遵守し国立医薬品食品衛生研究所・動物実験委員会の承認のもとに人道的実施された。ナノマテリアルの実験に際しては、当研究所の専用特殊実験施設内で、その運用規則に従い実施しており、暴露・漏洩を防止する対策については万全を期して実験を行った。

C. 研究結果

本年度、投与後 20 週及び 40 週の定期解剖を実施した。現在、投与後 50 週を経過し観察を継続中である。

C-1 体重推移 (表 2、図 1)

投与開始時の平均体重は媒体対照群 26.8 ± 1.6 g、T-CNT 群 26.8 ± 1.8 g、Crocidolite 群 26.5 ± 1.6 g であった。

T-CNT 群では、投与 16~32 週、44 週に有意な体重増加抑制が認められた。

Crocidolite 群では、投与後 4~32 週、40~44 週に有意な体重増加抑制が認められた。

C-2 臓器重量

1) 投与後 20 週の定期解剖 (表 3-1)

各群 19 匹の解剖を行った。

T-CNT 群の腎、脾の絶対重量の有意な増加、心、腎及び脾の相対重量の有意増加が認められた。

Crocitolite 群では、脾の絶対重量の有意な増加、心、腎及び脾の相対重量の有意増加が認められた。

2) 投与後 40 週の定期解剖 (表 3-2)

各群 10 匹の解剖を行った。

T-CNT 群では、臓器絶対重量及び相対重量に媒体対照群との間に差は認められなかった。

Crocitolite 群では、肝の相対重量に有意な増加が認められた。

C-3 剖検所見

1) 定期解剖

(1) 投与後 20 週 (表 4-1、図 2-1)

媒体対照群では、全ての動物に異常は認められなかった。

T-CNT 群では、腎、脾の被膜 (漿膜) のびまん性網状肥厚が 10/19 例、肝の辺縁鈍化が 16/19 例に認められた。

Crocitolite 群では、全ての動物に異常は認められなかった。

(2) 投与後 40 週 (表 4-2、図 2-2)

媒体対照群では、全ての動物に異常は認められなかった。

T-CNT 群では、腎、脾の被膜 (漿膜) のびまん性網状肥厚が 10/10 例、肝の辺縁鈍化が 9/10 例に認められた。

Crocitolite 群では、全ての動物に異常は認められなかった。

2) 途中死亡例と切迫殺例 (投与後 50 週まで)

(1) 媒体対照群 (表 5)

2 例の死亡が認められ、3 例を切迫殺

に供した。死亡例はファイティングによる外傷 1 例、尿の排泄障害とそれに伴う水腎症が疑われる腎腫大を認めたもの 1 例であった。切迫殺例は、肺水腫とそれに伴う心拡張 (肺性心) が 1 例、尿の排泄障害とそれに伴う水腎症が疑われる腎腫大を認めたもの 1 例、斜頸と体重減少を認めたもの 1 例であった。

(2) T-CNT 群 (表 5、図 3)

3 例の死亡が認められ、8 例を切迫殺に供した。死亡例は、肺水腫とそれに伴う肺性心が 1 例、尿の排泄障害とそれに伴う水腎症が疑われる腎腫大 1 例、自己融解が強く死因を同定できなかったもの 1 例であった。切迫殺例では、5 例に中皮腫を認め、初発例の解剖は投与後 204 日であった。一般状態観察において腹部膨満を認め、解剖では血性腹水の貯留、胃大弯部に壁外発育型の中皮腫、横隔膜、腹壁内側、盲腸漿膜面に微細白色顆粒状の中皮腫を認めた。その他、尿の排泄障害とそれに伴う水腎症が疑われる腎腫大 1 例、胸腺腫 1 例、胸腺の黄緑色、腎及び脾の漿膜面のびまん性網状肥厚、肝の辺縁鈍化認めたもの 1 例であった。

(3) Crocitolite 群 (表 5)

2 例の死亡が認められ、5 例を切迫殺に供した。死亡例は腎と腹壁の癒着を認めたもの 1 例、自己融解が強く死因を同定できなかったもの 1 例であった。切迫殺例では、ファイティングによる外傷 1 例、嚢胞腎 2 例、脾及び鼠径リンパ節腫大と精嚢硬化を認めたもの 1 例、肺水腫とそれに伴う肺性心を認めたもの 1 例であった。

C-4 病理組織検査

T-CNT 群で認められた辺縁が鈍を呈した肝臓では、漿膜が線維化し肥厚している像が観察された (図 2-2)。現在、詳細な評価を進めている。

C-5 Kaplan-Meier 法による中皮腫による死亡率

投与後 50 週目までを観察期間として、中皮腫による死亡率について、Kaplan-Meier 法により計算した結果を図 4 に示した。p53+/-マウスの結果と比較するため、H24 年度に実施した p53+/-マウスに T-CNT 10 μ g/動物を単回腹腔内投与した実験結果を同グラフにプロットした。p53+/-マウスでは中皮腫発癌による死亡の初発時期は 134 日、野生型マウスでの初発時期は 204 日であった。

D. 考察

本分担研究では、MWCNT がアスベストと同様の機序で野生型マウスにおいても中皮腫を誘発するか否かを確認する目的で実験を行った。T-CNT 10 μ g/動物を単回腹腔内投与し、野生型マウスにおいても p53+/-マウスと同様に中皮腫が誘発されることが明らかとなった。病理組織の詳細な評価については現在実施中である。中皮腫が誘発されて切迫殺を実施した例では、一般状態観察において腹部膨満を認め、解剖では血性腹水の貯留、胃大弯部に壁外発育型の中皮腫、横隔膜、腹壁内側、盲腸漿膜面に微細白色顆粒状の中皮腫を認めた。これらの所見は、p53+/-マウスで中皮腫が誘発され切迫殺した所見と同様であった。

野生型マウスに比較して、p53+/-マウスはアスベスト腹腔内投与による中皮腫発癌に高い感受性を示すことが報告されている¹⁾。p53+/-マウスでは、200 μ g の Crocidolite を週 1 回、12 週間の腹腔内投与により約 30 週後に中皮腫が誘発される

が、野生型マウスでは 60 週を超えた時期に観察されている。

先行研究では、このモデルを適用し、MWCNT が 3~3,000 μ g/動物の範囲で用量依存的に中皮腫を誘発することを示した^{2, 3)}。その際、初発時期に用量依存性の早期化が認められないこと、及び、中皮腫の誘発には散在性の MWCNT 単離繊維を食食したマクロファージを伴う非肉芽腫性の局所慢性炎症が重要であり、他方、凝集した MWCNT 繊維塊を取り囲む類上皮細胞肉芽腫及びその線維化癒痕形成は中皮腫発癌に寄与しないことが示唆された。

H24 年度の分担研究では、検体の重量ベースで、Taquann 処理検体の 10 μ g/動物の発癌性が従来法による検体の大凡 200 μ g/動物に相当することが判明した。これは、T-CNT が殆ど凝集体を含まず単離 MWCNT 繊維が重量当たり 20 倍含まれていることと良く一致していた。この結果は、繊維一本が中皮腫を誘発する確率が等しいこと、散在性の繊維を食食したマクロファージによる所謂 frustrated phagocytosis に相当すると考えられる非肉芽腫性の局所性遷延性慢性炎症巣が重要であるという仮説を支持するものであった。

T-CNT 10 μ g/動物を p53+/-マウスに単回腹腔内投与した実験では中皮腫発癌の初発時期は 134 日、野生型マウスに投与した場合の初発時期は 204 日であった。何れも、文献で報告されている Crocidolite の初発時期よりも早期である。本研究においても、50 週を経過した時点で Crocidolite 群には中皮腫が観察されていない。

T-CNTには、約 3×10^6 本/ μ gの繊維が含まれ⁴⁾、Crocidoliteには 2.93×10^9 本/mgの繊維が含まれる^{2, 5)}。本実験で投与した繊維数は、T-CNTで約 3×10^7 本/動物、Crocidoliteでは約 9×10^7 本/動物であり、繊維数は Crocidoliteが約3倍程度多い。本研究結果

からは、重量ベース、繊維数ベースにおいてもMWCNTはCrocidoliteよりも中皮腫誘発能が高いと考えられる。その理由の一つとして、繊維長の分布が異なっていることが考えられる。T-CNTの繊維長分布は、5 μ m以下が32~40%、5 μ mを超える繊維が60~64%である。本研究で使用したCrocidoliteの繊維長は測定していないが、5 μ m以下が72.5~98.9%、5 μ mを超える繊維が1.1~27.4%という報告がある^{6,7)}。MWCNTは、frustrated phagocytosisを引き起こす長さの繊維が多く含まれるため、中皮腫発癌をCrocidoliteより早期に誘発する可能性がある。

E. 結論

本分担研究では、MWCNTが野生型マウスにおいても中皮腫を誘発することを明らかにした。MWCNTは重量ベース、繊維数ベースにおいてもCrocidoliteよりも中皮腫誘発能が高いと考えられ、その機序としてfrustrated phagocytosisを引き起こす長さの繊維が多く含まれることが原因である可能性がある。MWCNTの表面特性による差については、さらなる検討が必要である。

F. 参考文献

1. Vaslet CA, Messier NJ, Kane AB. Accelerated progression of asbestos-induced mesotheliomas in heterozygous p53^{+/-} mice. *Toxicol Sci.* 2002 Aug;68(2):331-8.
2. Takagi A, Hirose A, Nishimura T, Fukumori N, Ogata A, Ohashi N, Kitajima S, Kanno J., Induction of mesothelioma in p53^{+/-} mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube., *J Toxicol Sci.* 2008 Feb;33(1):105-16.

3. 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.* Aug;103(8):1440-4, 2012

4. 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.

5. Moalli PA, MacDonald JL, Goodglick LA, Kane AB. Acute injury and regeneration of the mesothelium in response to asbestos fibers. *Am J Pathol.* 1987Sep;128(3):426-45.

6. Langer AM, Mackler AD, Pooley FD. Electron microscopical investigation of asbestos fibers. *Environ Health Perspect.* 1974 Dec;9:63-80.

7. Moalli PA, MacDonald JL, Goodglick LA, Kane AB. Acute injury and regeneration of the mesothelium in response to asbestos fibers. *Am J Pathol.* 1987 Sep;128(3):426-45.

G. 研究発表

1. 論文発表

Numano, T., Xu, J., Futakuchi, M., Fukamachi, K., Alexander, D.B., Furukawa, F., Kanno, J., Hirose, A., Tsuda, H., Suzui, M. (2014), 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(2):929-35

Xu J, Futakuchi M, Alexander DB, Fukamachi K, Numano T, Suzui M, Shimizu H, Omori T, Kanno J, Hirose A, Tsuda H (2013) Nanosized zinc oxide particles do not promote DHPN-induced lung carcinogenesis but cause reversible epithelial hyperplasia of terminal bronchioles. Arch Toxicol. 2014 Jan;88(1):65-75

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. 2013 J Toxicol Sci. 38(4):619-28.

2. 学会発表

Jun Kanno, An Improved Dispersion Method (Taquann Method) of Multiwall Carbon Nanotube for a Whole-Body Inhalation Exposure System, . the 53rd Annual Meeting of the Society of Toxicology (2014.3.26) Phoenix, USA, poster

菅野 純、炎症と癌 - 異物発癌としての中皮腫繊維発癌からの考察 -、平成 25 年度「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ、(2014.2.17)、大津、基調講演

高橋 祐次、小川 幸男、高木 篤也、辻 昌貴、森田 紘一、菅野 純、多層カーボンナノチューブの p53+/-マウス全身暴露吸入実験、平成 25 年度「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ、2014 年 2 月 18 日、大津、ポスター

菅野 純、高橋祐次、多層カーボンナノチューブの中皮腫発がん性をモデル標的としたナノマテリアル高度分散全身吸入

Taquann システムによるマウス吸入毒性病変評価、第 30 回日本毒性病理学会総会および学術集会、(2014.1.31)、徳島、シンポジウム

Jun Kanno, Nanotoxicology-its chronic aspects, 6th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health (NanOE2013) , (2013.10.29), Nagoya, Japan, lecture from organizer

Yuhji Taquahashi, Yukio Ogawa, Atsuya Takagi, Masaaki Tsuji, Koichi Morita, Jun Kanno, An Improved Dispersion Method of MWCNT for Whole Body Inhalation Exposure System, 6th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health (NanOE2013) , (2013.10.28), Nagoya

菅野 純、ナノマテリアル安全性評価の進捗ー発がん性に関わる知見を中心にー、第 20 回がん予防学会、(2013.7.5)、東京、シンポジウム

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、(2013.6.17)、千葉、シンポジウム

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

表1 群構成

Group	Dose ($\mu\text{g}/\text{animal}$)	Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Volume (mL/animal)	scheduled sacrifice	Number of animals
Vehicle Control	0	0	0.5	20W(140D)	80
				40W(280D)	
				60W(420D)	
				80W(560D)	
T-CNT	10	20	0.5	20W(140D)	100
				40W(280D)	
				60W(420D)	
				80W(560D)	
Crocidolite (Positive control)	30	60	0.5	20W(140D)	80
				40W(280D)	
				60W(420D)	
				80W(560D)	

表2 体重推移

Weeks		0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48
Control	mean	26.8	30.4	32.4	33.7	35.4	36.1	38.4	39.1	39.6	39.7	39.8	41.8	42.3
	SD	1.6	2.7	3.1	3.6	3.8	4.1	4.3	4.5	4.8	5.3	4.9	5.7	6.3
	N	80	80	80	80	80	79	60	60	60	59	57	47	47
T-CNT	mean	26.8	29.9	31.9	33.1	34.1	34.7	36.3	37.2	37.6	38.3	38.5	39.6	40.2
	SD	1.8	2.1	2.4	2.7	3.1	3.3	3.6	4.2	4.7	5.0	4.8	5.2	5.3
	N	100	99	98	98	96	96	77	77	76	76	74	62	61
					*	*	**	*	*				*	
Crocidolite	mean	26.5	29.5	31.3	32.6	33.7	34.4	35.9	36.9	37.2	37.9	37.9	39.1	40.1
	SD	1.6	1.9	2.1	2.5	3.0	3.2	3.7	4.1	4.3	4.6	4.8	5.3	5.7
	N	80	80	80	79	79	79	59	57	55	55	54	44	44
			*	**	*	**	**	***	**	**		*	*	

*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$, ***; $p < 0.001$ v.s. Control Student's t-test

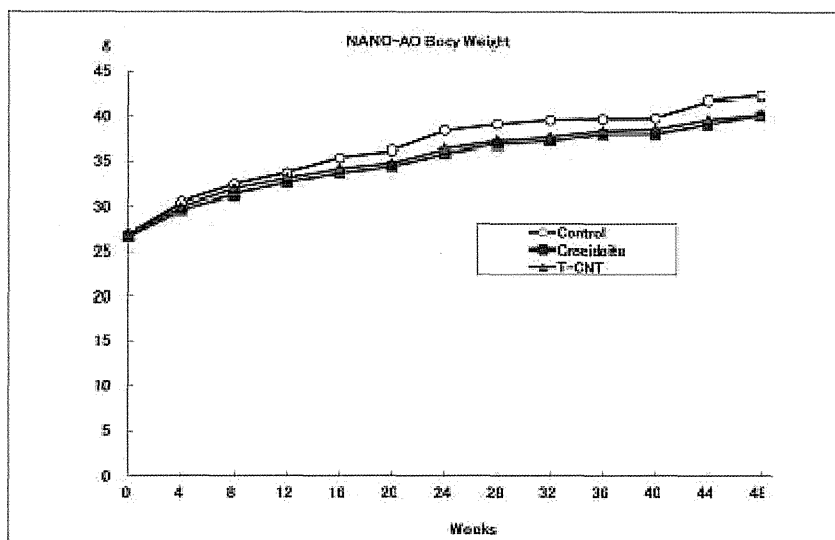


図 1 体重推移グラフ

表 3-1 投与後 20 週の定期解剖における臓器重量

		Absolute Organ weight					Relative Organ Weight					
Group	BW	Heart	Liver	KidneyR	KidneyL	Spleen	Heart	Liver	KidneyR	KidneyL	Spleen	
Control	mean	34.7	0.15	1.74	0.20	0.20	0.086	0.43	5.02	0.59	0.57	0.250
	SD	4.6	0.03	0.34	0.02	0.03	0.018	0.08	0.65	0.08	0.08	0.055
	N	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19
T-CNT	mean	33.3	0.17	1.76	0.23	0.22	0.126	0.50	5.30	0.68	0.66	0.380
	SD	2.9	0.02	0.16	0.03	0.02	0.023	0.08	0.46	0.08	0.06	0.079
	N	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19
				**	*	***	*		**	**	***	
Crocidolite	mean	33.6	0.17	1.82	0.22	0.21	0.123	0.50	5.46	0.66	0.64	0.377
	SD	3.0	0.03	0.15	0.03	0.03	0.038	0.09	0.71	0.09	0.09	0.156
	N	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19
						***	*		*	*	**	

*, p<0.05, **, p<0.01, ***, p<0.001 v.s. Control Student's t-test

表 3-2 投与後 40 週の定期解剖における臓器重量

		Absolute Organ weight					Relative Organ Weight					
Group	BW	Heart	Liver	KidneyR	KidneyL	Spleen	Heart	Liver	KidneyR	KidneyL	Spleen	
Control	mean	37.0	0.19	1.91	0.24	0.25	0.118	0.51	5.20	0.64	0.67	0.320
	SD	2.7	0.03	0.11	0.04	0.04	0.044	0.10	0.53	0.12	0.10	0.117
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
T-CNT	mean	36.9	0.17	1.88	0.24	0.23	0.112	0.48	5.13	0.66	0.63	0.310
	SD	5.2	0.01	0.20	0.02	0.02	0.009	0.08	0.45	0.08	0.08	0.053
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Crocidolite	mean	37.3	0.19	1.71	0.24	0.23	0.098	0.51	4.61	0.65	0.63	0.268
	SD	4.0	0.03	0.27	0.04	0.02	0.017	0.11	0.56	0.11	0.09	0.061
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
									*			

*, p<0.05, **, p<0.01, ***, p<0.001 v.s. Control Student's t-test

表 4-1 投与後 20 週の定期解剖所見

20W				
Group	Scheduled sacrifice	Number of animals examined	Number of incidence	Gross pathological findings
Vehicle Control	20W(140D)	19	19	Not remarkable
T-CNT	20W(140D)	19	16 10	Liver; dull, marginal Spleen; thickened serous surface, reticular appearance, diffuse
Crocidolite (Positive control)	20W(140D)	19	19	Not remarkable

表 4-2 投与後 40 週の定期解剖所見

40W				
Group	Scheduled sacrifice	Number of animals examined	Number of incidence	Gross pathological findings
Vehicle Control	40W(280D)	10	10	Not remarkable
T-CNT	40W(280D)	10	9 10	Liver; dull, marginal Spleen; thickened serous surface, reticular appearance, diffuse
Crocidolite (Positive control)	40W(280D)	10	10	Not remarkable

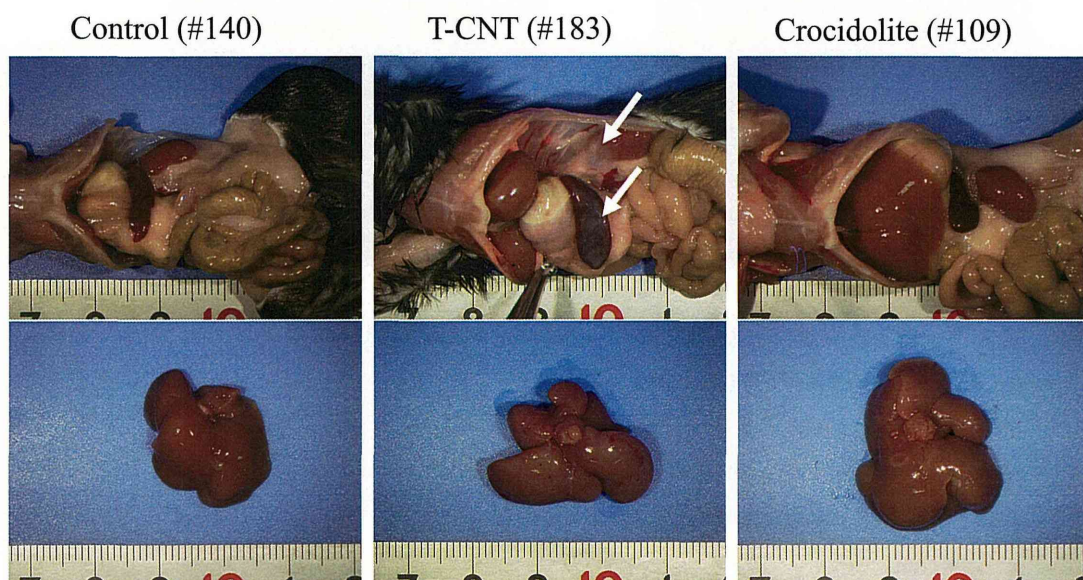


図2-1 投与後 20 週の定期解剖所見

T-CNT 投与群では、腎、脾の漿膜面のびまん性網状肥厚、肝の辺縁鈍化が認められた(矢印)。

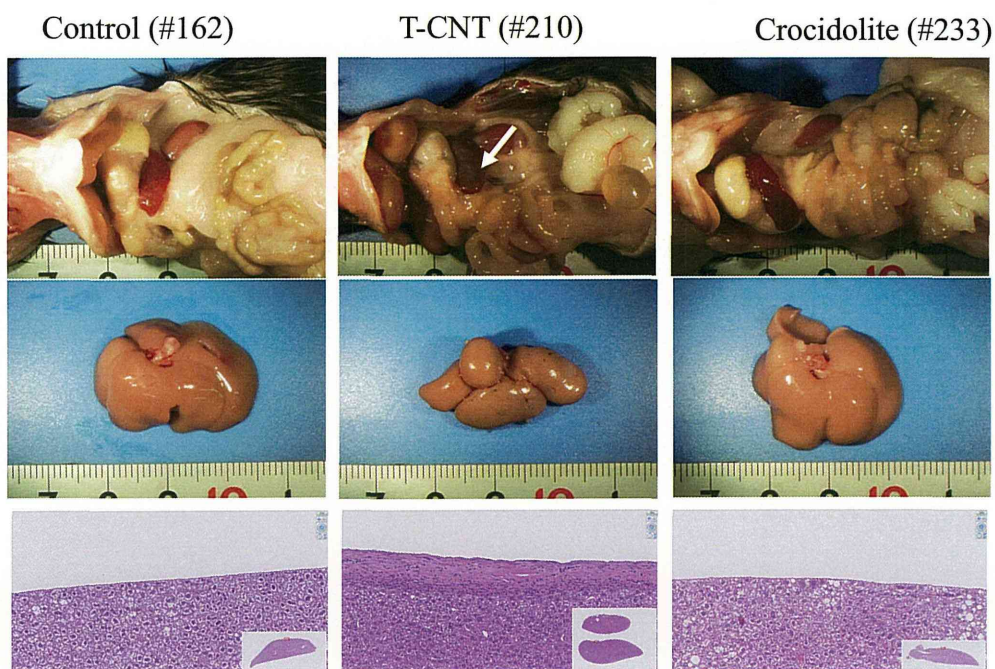


図2-2 投与後 40 週の定期解剖所見

T-CNT 投与群では、腎、脾の漿膜面のびまん性網状肥厚、肝の辺縁鈍化が認められた(矢印)。肝の病理組織では、漿膜が線維化して肥厚している像が観察された。

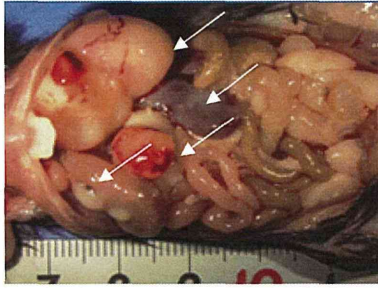


図3 T-CNT投与群で中皮腫が認められた例の肉眼所見(投与後204日)

胃大弯部:壁外発育型の中皮腫(12.3×15.8×9.8mm)

肝・横隔膜の癒着、中皮腫

腎・脾:被膜(漿膜)のびまん性網状肥厚

横隔膜、腹壁内側、盲腸漿膜面:微細白色顆粒状の中皮腫

血性腹水:7mL

表 5 死亡例または切迫殺例の所見

Group	ID	Status	Days after administration*	symptoms/autopsy findings
Control	1	Found dead	136(19)	Traumatic injury by fighting (Loss of external generative organ)
	17	Found dead	237(34)	Kidney; enlargement Bladder; urinary retention
	145	Moribund sacrifice	255(36)	Lung; edema Heart; dilatation(cor pulmonale)
	157	Moribund sacrifice	266(38)	Kidney; enlargement Bladder; urinary retention
	22	Moribund sacrifice	339(48)	Emaciation Wryneck
T-CNT	52	Found dead	40(6)	Lung; edema Heart; dilatation(cor pulmonale)
	80	Found dead	91(13)	Kidney; enlargement Bladder; urinary retention
	74	Moribund sacrifice	97(14)	Kidney; enlargement Bladder; urinary retention
	85	Moribund sacrifice	204(29)	Abdominal distension Mesothelioma Hemorrhagic ascites
	62	Moribund sacrifice	251(36)	Abdominal distension Mesothelioma Hemorrhagic ascites
	214	Moribund sacrifice	253(36)	Thymus; yellowish green Liver; dull, marginal Spleen; thickened serous surface, reticular appearance, diffuse
	174	Found dead	284(41)	Unknown (autolysis)
	207	Moribund sacrifice	302(43)	Abdominal distension Mesothelioma Hemorrhagic ascites
	42	Moribund sacrifice	307(44)	Abdominal distension Mesothelioma Hemorrhagic ascites
	50	Moribund sacrifice	337(48)	Exophthalmos(left) Decreased body weight Thymoma
Crocidolite	208	Moribund sacrifice	343(49)	Abdominal distension Mesothelioma Hemorrhagic ascites
	128	Found dead	58(8)	Adhesion (spleen, abdominal wall)
	103	Moribund sacrifice	135(19)	Traumatic injury by fighting (Loss of external generative organ)
	251	Moribund sacrifice	170(24)	Kidney; polycystic kidney
	116	Found dead	180(26)	Unknown (autolysis)
	115	Moribund sacrifice	197(28)	Spleen; enlargement Inguinal lymph node; enlargement Seminal vesicle; sclerosis
	256	Moribund sacrifice	198(28)	Kidney; polycystic kidney Bladder; urinary retention
	117	Moribund sacrifice	252(36)	Lung; edema Heart; dilatation(cor pulmonale) Pleural cavity; pleural effusion

* Numbers shown in parentheses described in weeks after administration

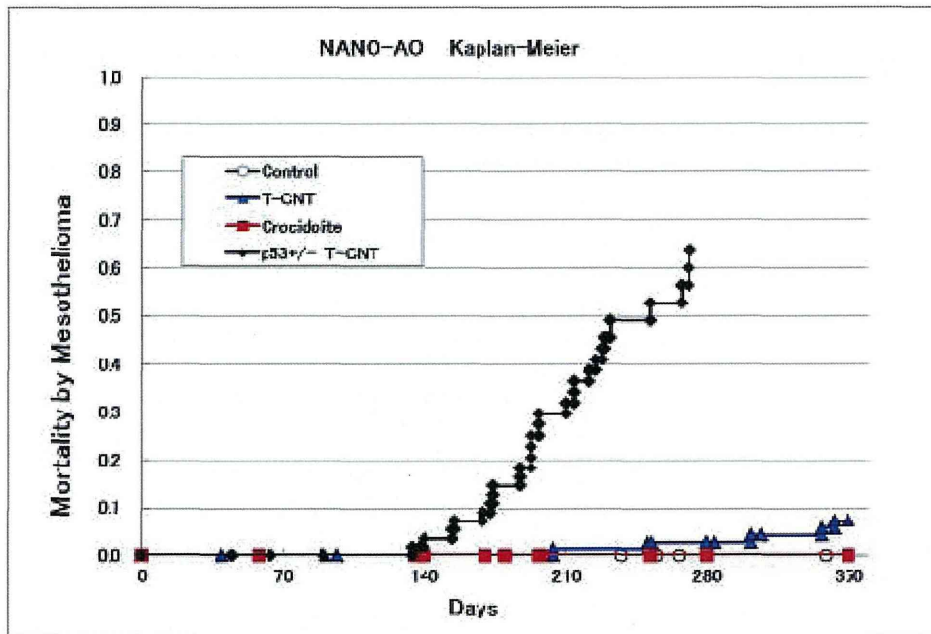


図4 Kaplan-Meierによる中皮腫による死亡率

中皮腫による死亡率と投与量の間を Kaplan-Meier 法により比較した。野生型マウスで実施した本年度の実験結果(途中経過)を青の曲線(マーカーは三角)、H24 年度に実施した p53^{+/-}マウスの実験結果を黒の曲線(マーカーは菱形)で示した。両実験共に Taquann 法処理検体を 10 μ g/動物の用量で単回腹腔内投与した。

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：ナノマテリアル曝露による生体毒性の慢性移行及び遅発性に関わる評価
手法の開発研究

分担研究課題名：ナノマテリアルの発がん性評価手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 特任教授
研究協力者：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
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 講師
沼野 琢 名古屋市立大学大学院医学研究科 分子毒性学分野 大学院生
徐 結苟 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

研究要旨

目的と方法：ナノサイズ二酸化チタニウム (TiO₂) のうち、光触媒活性の強い特性を利用して屋外建造物等の被覆塗料等に用いられているアナターゼ型の (anTiO₂) の毒性と発がん性関連作用について、光触媒活性が低く化粧品等に多く使われているルチル型 (ruTiO₂) と対比しつつ *in vivo* と *in vitro* の系において比較検討した。

方法：我々が開発した経気管肺内噴霧法を用い、①アナターゼ型（非コーティング、直径 25nm）およびルチル型（非コーティング、直径 20nm）の雌ラットへの短期投与（500ppm, 14 日間に計 8 回）による肺組織における肺胞上皮・間質細胞に対する毒性とその機序の比較、②*in vitro* における初代培養（正常ラットの肺より得た）肺胞マクロファージ (Mφ) を介する肺がん細胞株、間質細胞株に対する毒性と増殖作用、および UVB 照射下における両粒子の直接の細胞毒性の比較も行なった。結果：アナターゼ二酸化チタニウム (anTiO₂) をラットに 2 週投与した実験では肺組織における Mip1α の蛋白発現、8-OHdG 値はルチル型より低値であった。*In vitro* における Mφ からの Mip1α 発現はルチル型二酸化チタニウム (anTiO₂) より低値またはその傾向が示された。さらにヒト肺線維芽細胞 (CCD34)、ヒト肺がん細胞 (A549) に対する細胞増殖活性においてもアナターゼ型はルチル型より低値であった。*in vitro* における紫外線 (UVB) 照射下においてもアナターゼ型とルチル型の細胞毒性に明らかな差異は無かった。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、細胞増殖作用は anTiO₂ はる TiO₂ よりつよいという所見は得られなかった。

A. 研究目的

二酸化チタニウム (TiO₂) 粒子は塗料・化

粧品の材料として広く利用されている。しかし、WHO 国際がん研究機関 (IARC) は、TiO₂粒子をラットに吸入曝露した場合に肺発がん性を示す (動物において発がん性を示す十分な証拠がある) ことから Group2B (ヒトに対して発がんの可能性はある) と分類している。鉱物として製錬された TiO₂粒子は製造過程で熱処理によりアナターゼ型、ルチル型およびブルカイト型に分けられている。このうち、アナターゼ型 (anTiO₂) は主として外壁塗料に、ルチル型 (ruTiO₂) は化粧品等に用いられている。これまでに我々は、ruTiO₂にはラットにおいて肺発がんプロモーション作用がみられ、その機序には ruTiO₂を貪食した Mφ の産生するラジカルによる細胞障害、および分泌される炎症性タンパク (Mip1 α) の細胞増殖誘導作用が関与する事を明らかにしてきた。一方、アナターゼ型はその強い光触媒活性を利用して外壁塗装用等に大量に生産されているが、UV 照射下でヒト皮膚線維芽細胞およびヒト肺がん細胞に対してルチル型の 100 倍以上の細胞毒性を有するという報告がある (Wu, J., *et al.*, *Toxicol Lett*, 191, 2009)。anTiO₂はその光触媒活性を利用して、塗料用として大量に生産されているが、毒性学的影響についての知見は乏しく、光・UV 照射下でのリスク知見は乏しい。本研究ではアナターゼ型の毒性について、*in vivo* および *in vitro* の実験系においてルチル型との比較しつつ検討した。

B. 研究方法

試料の anTiO₂ と ruTiO₂ は日本化粧品工業会より提供された (広瀬明彦主任研究者経由)。

① 14 日間投与による肺発がん機序の検索

SD ラットを用い、anTiO₂ および ruTiO₂ を 500μg/ml の濃度にて 0.05% Tween20 含有生理食塩水に懸濁して 2 日に 1 回の割合で合計 8 回肺内噴霧投与した。14 日目の最終投与の 6 時間後に屠殺剖検した。対照群は 0.05% Tween20 含有生理食塩水のみを投与した。右肺はパラホルムアルデヒド固定後、肺胞 Mφ による貪食の状態、炎症の程度ならびにパラフィンブロックからの戻しエポン再包埋電顕試料による観察を行った。左肺は凍結し、肺組織における Mip1 α mRNA 発現 (RT-PCR 法)、タンパク発現 (ELISA 法) および 8-OHdG 量 (ELISA 法) にて測定した。

② *in vitro* 系における細胞毒性、発がんメカニズムの検索

1) ラットの肺内に気管よりチオグリコレートを噴霧投与して肺胞 Mφ を誘導し、肺組織より初代培養 Mφ を採取分離し、この培養液に最終濃度が 10μg/ml となるように anTiO₂ および ruTiO₂ を加え、24 時間後に培養上清を回収した。この培養上清によるヒト肺腺癌細胞 (A549) およびヒト肺線維芽細胞 (CCD34) の細胞増殖に対する影響を Cell Counting Kit-8 を用いて測定した。

2) 上記の anTiO₂ および ruTiO₂ を貪食した Mφ と培養上清における Mip1α の mRNA を RT-PCR 法、とタンパク量を ELISA 法にて測定した。

3) UVB による光触媒活性による直接の毒性発現の解析のために、UVB 照射下で A549 に対する細胞毒性を比較検討した。UVB の照射には Transilluminator (Vilber Lourmat, France) を用い、照射波長は 312nm (270nm~330nm)、照射エネルギーは 1000 mW/cm² とし、培養細胞が死滅しない UVB 照射時間を設定して、照射下におけるルチル型とアナターゼ型の細胞

毒性の発現と程度を比較した。

(倫理面への配慮)

動物の飼育は、名古屋市立大学大学院医学研究科 実験動物教育センターで行った。実験計画書は、動物の愛護と使用のガイドラインに則り、名古屋市立大学大学院医学研究科 動物運営委員会の承認を経て行った(H22-M19)。

C. 研究結果

① 14日間投与による肺毒性・肺発がん機序の検索

病理組織学的にはMφ主体の炎症細胞浸潤が見られた。誘導された肺胞内Mφの数はルチル型のほうにより多かった(対ルチル比77%)。Mφの細胞質内には貪食されたanTiO₂およびruTiO₂の凝集体が多数みられ、これらにはX線解析でタニウム元素が検出された。肺組織におけるMip1αのmRNA発現量は生食対照群を1とするとルチルは5.35、アナターゼ2.79であった(対ルチル比77%、 $p<0.001$)。さらに、MIP1αのタンパク発現量は対照に比べルチル4.84倍、アナターゼ1.34倍であったが、ルチル型よりアナターゼ型は有意の低値(対ルチル比27%、 $p<0.001$)となった。我々が見出した曝露指標である血清Mip1α値

(Xu et al., Carcinogenesis, 31, 927, 2010)は対照群と較べてルチルで1.45倍

($p<0.05$)、アナターゼで1.21倍(有意差なし)であった。血清の8-OHdG値は、対照群(0.05% Tween20 含有生理食塩水)と較べてルチルで2.13倍($p<0.05$)、アナターゼでは1.36倍であったが、対ルチル比では64%であり有意差はなかった。

② *in vitro* 発がん・毒性比較とそのメカニズムの検索

1) ヒト肺がん細胞およびヒト肺線維芽細胞増殖促進作用(肺胞上皮および間質に対する毒性と増殖作用の観察) :

ラットの肺から採取した初代培養Mφの培養皿中にanTiO₂またはruTiO₂を加えてMφに貪食させ、その培養上清を取り出して肺がん細胞(A549)とヒト肺線維芽細胞(CCD34)に対する毒性と細胞増殖促進作用を検討した。その結果、ルチル型はA549細胞増殖を115%に増加させたが、アナターゼ型には両作用は観察されなかった。

2) 貪食MφにおけるMip1α発現量 :

上記の*In vitro*でのanTiO₂またはruTiO₂貪食MφにおけるMip1α mRNA発現量(RT-PCR)の対照比はルチル15.26倍、アナターゼ11.96倍であったが、両者の差はなかった。Mip1αの蛋白発現では対照比はルチル2.70倍、アナターゼ1.51倍でありアナターゼでルチル型より有意の低値(対ルチル比56%、 $p<0.001$)であった。培養上清のMip1αのタンパク発現では対照比はルチル2.70倍、アナターゼ1.51倍であり、ルチル型より有意の低値(対ルチル比56%、 $p<0.001$)であった。

3) UVB照射下における細胞毒性の比較 :

UVB照射エネルギー1000 mW/cm²、照射波長312nmの条件下にて、照射時間0秒、30秒、1分、2分、5分および10分において、観察対象のA549細胞の死滅しない照射時間は2分以内であることを見出した。この条件において、A549細胞培養液中にアナターゼとルチル型を0(対照)~10ppmの用量で加えた場合のviabilityを観察したところ、総ての用量で両者の差は無かった。以上から、紫外線照射下において、A549細胞に対する毒作用はア

アナターゼとルチル型は同等であると考えられた。

D. 考察

我々の開発したナノ粒子吸入曝露短・中期毒性・発がん性リスク評価法、① 14 日間投与による肺毒性・肺発がん機序の検索および、② *in vitro* 発がん・毒性比較とそのメカニズムの検索において、すでにラットにおいて肺発がん性の明らかにされている (WHO/IARC Group2B) ruTiO_2 (無コーティング) について M ϕ の分泌する Mip1 α を介するが発がん促進作用を見出した (Xu et al., *Carcinogenesis*, 31, 927, 2010)。また、 ruTiO_2 を障害された皮膚に塗布して場合には障害作用は見られなかった (Xu et al., *Food Chem Toxicol.*

49:1298-302, 2011 および Sagawa et al., *J Toxicol Sciences*, 37, 317, 2012)。

以上の知見に基づき、光触媒活性による生物毒性が強力である可能性が危惧されている anTiO_2 について、①②の方法にて毒性と発がんに関与する細胞増殖誘発作用について ruTiO_2 との比較対照実験を実施した。

本研究では、① 2 週投与実験では肺組織における Mip1 α の蛋白発現はアナターゼ型のほうが低く ($p < 0.001$)、8-OHdG 値もアナターゼ型が低値傾向であった。*In vitro* おける M ϕ からの Mip1 α 発現においてもアナターゼ型のほうが低値 ($p < 0.001$) であった。さらに② ヒト肺がん細胞 (A549) とヒト肺線維芽細胞 (CCD34) に対する細胞増殖活性においてもアナターゼ型が低値であった。UVB 照射下においては、肺がん A549 細胞に対する毒作用はアナターゼとルチル型に差異はないことも明らかとなった。以上から、*in vivo* においてのみならず、*in*

vitro における紫外線 (UVB) 照射下においても、アナターゼ型がルチル型より細胞毒性において顕著であることは無かった。今後発がん性については、代替法としての中期の発がんプロモーション試験、さらには吸入慢性毒性実験がに実施が望ましい。

E. 結論

以下のことが明らかとなった。

アナターゼ二酸化チタニウム (anTiO_2) を

雌 SD ラットに 2 週投与した実験では肺組織における Mip1 α の蛋白発現、8-OHdG 値はルチル型より低値であった。*In vitro* おける M ϕ からの Mip1 α 発現はルチル型二酸化チタニウム (anTiO_2) より低値またはその傾向が示された。さらにヒト肺線維芽細胞 (CCD34)、ヒト肺がん細胞 (A549) に対する細胞増殖活性においてもアナターゼ型はルチル型より低値であった。さらに *in vitro* における紫外線 (UVB) 照射下においてもアナターゼ型とルチル型の細胞毒性に明らかな差異は無かった。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、細胞増殖作用は anTiO_2 はる TiO_2 よりつよいと言う所見は得られなかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ohba T., Sagawa E., Suzuki Y., Yamamura H., Ohya S., Tsuda H., and Imaizumi Y. Enhancement of Ca^{2+} Influx and Ciliary Beating by Membrane

- Hyperpolarization due to ATP-Sensitive K⁺ Channel Opening in Mouse Airway Epithelial Cells. *J Pharmacol Exp Ther* 347:145-153, 2013.
2. 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.*, 88: 65-75, 2014
 3. 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*, *Asian Pacific J Cancet Prev*, 15(2): 929-935, 2014
2. 学会発表
1. 二口充、徐結苟、深町勝巳、津田洋幸、酒々井眞澄 (2013)。ナノ材料の吸入曝露後、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29回日本毒性病理学会 筑波, 1月31日-2月1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. Numano, T., Xu, J., Futakuchi, M., Fukamachi, K., Furukawa, F., Tsuda, H., and Suzui, M. (2013). Effect of anatase type nanosized titanium dioxide particles on the rat lung and cultured macrophage 2013 American Assoc.Cancer Res.
 4. Suzui, M., Ikenaga, S., Isoda, Y., Numano, T., Fukamachi, K., Futakuchi, M., and Tsuda, H. (2013). 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, Korea, June 30. - July 34.
 5. Numano, T., Ikenaga, S., Isoda, Y., Fukamachi, K., Futakuchi, M., and Suzui, M. (2013). Inflammation profile and gene expression status induced by intratracheal instillation of the multiwall carbon nanotube. 72nd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association Yokohama, Oct. 3. - Oct. 5.
 6. CCL3 as a serum biomarker bfor asbestos exposure and possible biomarker for malignant mesothelioma, Xu, J., Alexander, DB., Iigo, M., Takahashi, S., Yokoyama, T., Kato, M., Usami, I., Tokuyama, T., Tsutsumi, M., Tamura, M., Oguri, T., Niimi, A., Hayasho, Y., Yokoyama, Y., Tonegawa, K., Fukamachi, K., Futakuchi, M., Suzui, M., Kamijima, M., Hirose, A., Kanno, J., and Tsuda, H.(2013)The 72th Annual Meeting of the Japanese Meeting of Cancer Association, Yokohama
 7. Xu, J., Futakuchi, M., Alexander, DB., Fukamachi, K., Suzui, M., Kanno, J., Hirose, A. and Tsuda, H. *Dissolution of*

- nano-ZnO is responsible for reversible epithelial hyperplasia of terminal bronchioles.* (P-02-41). The 6th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health, October 28-31, 2013, Nagoya, Japan.
8. Xu, J., Alexander, DB., Futakuchi, M., Numano, T., Fukamachi, K., Suzui, M. and Tsuda, H. *Size- and shape-dependent pleural translocation, deposition and fibrogenesis by MWCNT dosed to the rat lung.* (WS2-2). The 30th Annual Meeting of the Japanese Society of Toxicologic Pathology, January 30-31, 2014, Tokushima, Japan.
9. Tsuda, H., Xu, J., Alexander, D.B., Tokuyama, T., Usami, I., Hayashi, Y., Oguri, T., Takahashi, S. and Suzui, M. *CCL3 as a serum biomarker for asbestos exposure and malignant mesothelioma.* (WS1-4). The 30th Annual Meeting of the Japanese Society of Toxicologic Pathology, January 30-31, 2014, Tokushima, Japan.
10. Xu, J., Alexander, DB., Kanno, J., Hirose, A. and Tsuda, H. *Size- and shape-dependent toxicokinetics and fibrogenesis of MWCNT.* OECD Expert Meeting on Toxicokinetics of Nanomaterials, February 25-28, 2014, Seoul, Republic of Korea.
- H. 知的財産所有権の出願・登録状況**
(予定も含む)
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
該当なし
 3. その他
該当なし