

201428019B

厚生労働科学研究費補助金研究報告書

化学物質リスク研究事業

ナノマテリアル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

平成 24 年度～26 年度

総合研究報告書

研究代表者 広瀬 明彦

国立医薬品食品衛生研究所

平成 27 年 (2015 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（H24-化学-指定-009）

平成24年度～26年度 総合研究報告書

研究代表者 広瀬 明彦

平成27年（2015年）3月

目 次

I. 総合研究報告書	1
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 広瀬 明彦、菅野 純、津田 洋幸、小林 憲弘、本間 正充、最上 知子、 渡辺 渡、石丸 直澄、宮澤 薫一	2
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	25
III. 研究成果の刊行物・別冊	31

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

I. 総合研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

総合研究報告書（平成24年度～平成26年度）

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

(H24-化学-指定-009)

研究代表者： 広瀬 明彦 国立医薬品食品衛生研究所 総合評価研究室長

研究要旨

近年、新たな物理化学的特性を持つ新素材であるナノマテリアルの曝露により懸念される健康影響については、国際的に先導されてきた研究支援のもとに有害性情報の収集が行われているが、未だ適切な健康リスク評価手法開発に資する基盤的知見は十分に集積したとは言えない。しかし、欧州では既に化学物質や食品添加物の登録システム等で規制化の方向にあり、科学的議論の成熟が待たれるところである。これまで、我々はナノマテリアル曝露による最も懸念すべき有害影響とは体内残留性に基づいた慢性影響であるとの認識に則り研究を進め、アスベスト様形状の多層型カーボンナノチューブ(MWCNT)の中皮腫誘発性を明らかにしてきた。他方、最近の知見では、ナノマテリアルは免疫機能や胎児にも影響を与えているとの報告も増えてきている。本研究では、(ⅱ)急性毒性試験では捉えられない慢性および遅発的影響に対する評価手法確立に資する知見を取得することを目的とし、①発がん性を含む慢性影響、②免疫システムへの影響、③次世代への影響に焦点を当てた研究体制を取ってきた。①慢性影響評価検討では、MWCNT 繊維状粒子による中皮腫誘発は、単分散された繊維状粒子が催腫瘍性に重要であることを確認すると共に、腹腔内投与および気管内投与のいずれでも線維の長さが腫瘍形成に大きく影響していることが明らかとなった。中皮腫の基本的な発症メカニズムは p53+/-マウスと野生型マウスに違いが無いことが示唆されたが、線維化誘発に差がある可能性が考えられた。遺伝毒性においても径が太く長いタイプの CNT にのみ染色体倍数細胞の誘発が観察され、アスベスト様メカニズムとの類似性を確認した。酸化チタンによるプロモーション作用には、光触媒反応と関係する粒子の表面構造と細胞毒性に相関性は認められなかった。一方、酸化亜鉛には発がんプロモーション作用は無く、生体内でイオン化した亜鉛により毒性影響が引き起こされたことを示した。②免疫システムに対する検討では、マウスに CNT を腹腔内投与後の長期観察において、末梢免疫細胞の M1 マクロファージ細胞の増加と T 細胞の Th17 への分化亢進による慢性的な免疫システムへの影響を確認すると共に、自己免疫疾患モデル動物の病態を悪化させる可能性が示唆された。感染性免疫モデルでは、MWNT 曝露による RSV 感染性肺炎の増悪化し、その作用の持続化を示唆する結果が得られた。THP-1 マクロファージを用いた系では MWCNT 等の NLRP3 による認識とサイトカイン等の活性化には、繊維の形状と長さやリソソームへの影響が重要な役割を持つ可能性が示された。③次世代への影響については、MWCNT 腹腔内投与による催奇性はアスベストによるものも含めて、長いタイプの繊維状粒子に依存することが示されたが、この繊維状粒子による催奇性は単回尾静脈内投与や器官形成期を通じた反復気管内投与では誘発されず、単回気管内(および腹腔内)投与でのみ奇形が誘発することが示された。今後は、これらの *in vivo* 系および *in vitro* 系で得られた知見を活用しながら、曝露・観察期間に依存した影響も考慮しつつ、既存ガイドライン試験法の改良や新たなスクリーニング手法開発に向けたより技術的な基盤情報を取得するために、分子生物学的解析技術を用いた病理解析やトリガーとなる分子機構などの毒性発現メカニズムに関するさらなる知見の集積が必要であると考えられた。

研究分担者

菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所
毒性部、部長

津田 洋幸 名古屋市立大学、特任教授

小林 憲弘 国立医薬品食品衛生研究所
生活衛生化学部、第3室長

本間 正充 国立医薬品食品衛生研究所
変異遺伝部、部長

宮澤 薫一 (独)物質・材料研究機構先端の
共通技術部門先端材料プロセ
スユニット・フラーレン工学グル
ープ、グループリーダー

最上 知子 国立医薬品食品衛生研究所
生化学部、部長

渡辺 渡 九州保健福祉大学大学院・医
療薬学研究科・微生物学、教
授

石丸 直澄 徳島大学大学院医歯薬学研究
部・口腔分子病態学分野、教
授

研究協力者

高木 篤也 国立医薬品食品衛生研究所
毒性部 室長

高橋 祐次 国立医薬品食品衛生研究所
毒性部 主任研究官

酒々井 眞澄 名古屋市立大学大学院医学研
究科 分子毒性学分野 教授

二口 充 名古屋市立大学大学院医学研
究科 分子毒性学分野 准教

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 琢旬 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

William T. Alexander 名古屋市立大学津田
特任教授研究室研究員

久保田領志 国立医薬品食品衛生研究所 生
活衛生化学部 主任研究官

安井 学 国立医薬品食品衛生研究所変
異遺伝部 主任研究官

西村 哲治 帝京平成大学薬学部薬学科
教授

堀端 克良 国立医薬品食品衛生研究所変
異遺伝部 主任研究官

濱田 修一 株式会社LSIメディエンス 技
術・学術顧問

高沢 博修 株式会社LSIメディエンス 主任
研究員

中川 宗洋 株式会社LSIメディエンス 主任
研究員

若原 孝次 (独)物質・材料研究機構 先端
材料プロセスユニット フラー
レン工学グループ 主幹研究員

平田 千佳 (独)物質・材料研究機構 先端
材料プロセスユニット フラー
レン工学グループ 研究業務員

今野 俊生 (独)物質・材料研究機構 先端
材料プロセスユニット フラー
レン工学グループ 研究業務員

鹿野 亮祐 (独)物質・材料研究機構 先端
材料プロセスユニット フラー
レン工学グループ 研究業務員

曾我 慶介 国立医薬品食品衛生研究所
生化学部 研究員

吉田 裕樹 九州保健福祉大学薬学部

講師
 明石 敏 九州保健福祉大学薬学部
 教授
 新垣理恵子 徳島大学大学院医歯薬学研究
 部・口腔分子病態学分野、准教
 授
 山田 耕一 徳島大学大学院医歯薬学研究
 部・口腔分子病態学、大学院生
 小縣 昭夫 東京都健康安全研究センター
 薬事環境科学部主任研究員
 坂本 義光 東京都健康安全研究センター
 薬事環境科学部主任
 山本 行男 東京都健康安全研究センター
 薬事環境科学部主任
 藤谷 知子 東京都健康安全研究センター
 薬事環境科学部主任
 北條 幹 東京都健康安全研究センター
 薬事環境科学部主任
 猪又 明子 東京都健康安全研究センター
 薬事環境科学部科長
 中江 大 東京都健康安全研究センター
 薬事環境科学部長
 平田 睦子 国立医薬品食品衛生研究所
 総合評価研究室 主任研究員
 小野 敦 国立医薬品食品衛生研究所
 総合評価研究室 主任研究員
 高橋 美加 国立医薬品食品衛生研究所
 総合評価研究室 研究員
 松本 真理子 国立医薬品食品衛生研究所
 総合評価研究室 研究員
 加藤 日奈 国立医薬品食品衛生研究所
 総合評価研究室 研究員
 川村 智子 国立医薬品食品衛生研究所
 総合評価研究室 研究員
 小林 克己 国立医薬品食品衛生研究所
 総合評価研究室 研究員

江馬 眞 国立医薬品食品衛生研究所
 客員研究員

A. 研究目的

近年、一般消費者向けにも使用されている新素材としての産業用ナノマテリアルは、期待されている物理化学特性が新たなものであるが故に、ヒト健康に未知の影響もたらす可能性が指摘されているが、適切な健康リスク評価を行えるほどの知見は未だ十分に集積したとは言えない。本問題に関しては、2004 年頃から国内外共に注目が高まり、国際機関としても OECD が産業用ナノマテリアルの作業グループを 2006 年に設置し、スポンサーシッププログラムにおいて有害性情報の収集が行なわれている。しかし、欧州では既に化学物質や食品添加物の登録システム等においては、規制化の方向にあり、これらの本格的な施行の前に科学的議論の成熟が待たれるところである。一方、我々は研究開始当初よりナノマテリアルの体内残留性に基ついた慢性影響が最も懸念すべき健康影響であるとの認識に則り研究を進めてきた。特にアスベスト様形状を持つ多層型カーボンナノチューブ (MWCNT) については中皮腫を誘発するポテンシャルを持つことを明らかにしてきた。また、一旦体内に入ったナノマテリアルは全身に再分布することや、発がんプロモーション作用を考慮に入れた毒性評価法が重要であることも指摘してきた。さらに、我々は MWCNT 投与により催奇形性ポテンシャルがあることを平成 23 年度までの研究で明らかにしている。他方、最近の知見としては、ナノマテリアルはアレルギー反応などの免疫機能を修飾するという報告も増えてきているところである。本研究では、初期的なスクリーニング評価などの(Ⅱ)急性毒性試験では捉えら

れない慢性および遅発的影響に焦点を当てて研究を進める。本研究では *in vitro* 系などのスクリーニング評価系を確立するための基となる知見の収集として、まず *in vivo* 系での適切な条件で毒性を再現できる系の確立を目指しており、慢性影響として繊維状粒子の径の太さや長さ依存した中皮腫および変異原性誘発能、様々な免疫反応における炎症初期反応のマクロファージの反応性やケモカインの重要性について検討する。また、次世代への影響として MWCNT による催奇形性を引き起こす条件の検討を行うことを目的とする。

B. 研究方法

①慢性影響評価のための検討：MWCNT を高度に分散する検体調製方法 (Taquann 法、特許出願中) を独自に開発し、吸入曝露実験へ適用に加えて、腹腔内投与による解析への適用を検討した。Taquann 法処理した $10\mu\text{g}/\text{animal}$ (3×10^7 本) の MWCNT (T-CNT) を p53^{+/+}-マウスおよび野生型マウス (C57BL/6NcrSlc) の腹腔内に単回投与し長期観察を行った。溶媒対照として 0.1% Tween80 を含む生理食塩液、陽性対照として Crocidolite (UICC-grade) $30\mu\text{g}/\text{animal}$ (9×10^7 本) を投与した。投与後 20 週、40 週、60 週及び 80 週の定期解剖を実施した。また、腹腔内投与時の生体反応が分散状態に依存することを明らかにすることと、中皮腫発癌過程と血中 Mesothelin 値 (順天堂樋野興夫教授開発 ELISA 法による) の関係を検討した。(菅野)

7 種の (MWCNT (M 社、MWNT-7 (M: 長さ $5\text{-}20\mu\text{m}$ 、54.4%; 測定値)、N 社 (N: 長さ $5\text{-}20\mu\text{m}$ 47%; 測定値)、W 社、2 種 (WL: 長さ $5\text{-}20\mu\text{m}$ 55%、WS: 長さ $0.5\text{-}2\mu\text{m}$ 、企業デ

ータ)、S 社、2 種 (SD-1: 長さ $5\text{-}20\mu\text{m}$ 38.2%; 測定値、SD-2: 長さ $3\mu\text{m}$ 、企業データ) 及び T 社 (T: 長さ 数 $10\text{-}数 100\mu\text{m}$ 、企業データ)) について、F344 ラットを用い、2% CMC に懸濁した各 MWCNT を、 $1\text{mg}/\text{kg}$ 体重の用量で腹腔内単回投与し、投与後 52 週を目処に飼育した。

経気管反復投与による MWCNT のラット呼吸器系への影響を観察した。MWNT-7 をシヨ糖及び Tween80 と自動乳鉢を用いて混和し、懸濁液を作製 (懸濁液中 MWNT-7 のサイズ、長さ: $<1\text{-}4\mu\text{m}$ 95.8%、 $>5\mu\text{m}$ 4.2%) し 0.01 、 0.05 及び $0.25\text{ mg}/\text{kg}$ 体重の用量で 1 回/4 週間、計 12 回、44 週間に亘って経気管噴霧投与した。この経気管投与試料の中皮腫誘発性を確かめる目的で $0.25\text{mg}/\text{kg}$ の用量で、腹腔内単回投与実験を並行して行った。さらに $0.25\text{mg}/\text{kg}$ 気管内及び腹腔内投与群については活性酸素捕捉作用のある phenyl *N*-*tert*-butyl nitron (PBN) を 0.065% の濃度で投与開始時より飲水投与し、MWCNT の酸化ストレスによる毒性・発がん性発現に対する影響を調べた。動物は、いずれも実験開始後 104 週間を目処に飼育し、終了時生存例について、病理組織学的な検索を行った。(広瀬)

MWCNT による遺伝毒性の検討として、サイズの異なる 2 種類の MWCNT (SD-1 および SD-2) の染色体異常誘発作用を検討した。また、MWCNT の倍数体誘発性メカニズムを明らかにするためライブセルイメージングによる観察を行った。MWCNT による *in vivo* 遺伝毒性を検討するため、標的組織である肺での小核試験法の開発を試みた。(本間)

また、サイズと関連性をより詳細に検討する材料として長いタイプのナノウイスキー (NW)

の作成を目的に、NWの成長制御法と真空熱処理による構造解析を進め、800℃から900℃の間での真空熱処理したC₆₀ナノウィスカーの構造評価(透過電子顕微鏡、ラマン分光)と分離精製の研究を進めた。C₆₀ナノウィスカー(C₆₀NW)の合成において、C₆₀NWの長さを変化させる技術の開発に取り組んだ。また、C₆₀-C₇₀2成分NWにおけるC₆₀母相中へのC₇₀の固溶限を決定し、さらに、C₆₀-C₇₀2成分NWのヤング率を透過電子顕微鏡により調べた。(宮澤)

ナノマテリアルによる発がんメカニズムに関して、経気管肺内噴霧法を用い、ナノサイズの酸化亜鉛(nZnO)およびアナターゼ型二酸化チタンについて、肺発がん処置後に250, 500ppm生食懸濁、0.5mL/ラット、2週に1回、計7回)の16週のプロモーション検索を行った。nZnOに関しては、短期投与による肺毒性と発がんプロモーション機序の解析を行った。また、初代培養肺胞マクロファージを用いた毒性とプロモーション作用機序解析を行った。(津田)

②免疫システムに対する検討: カーボンナノチューブの投与による免疫システムへの影響を長期観察することにより、ナノマテリアルの免疫制御システム全体に対する効果を評価した。まず、24から25年度にかけて正常C57BL/6(B6)マウスの腹腔内にMWCNTを投与し、投与後15ヶ月まで末梢血を採取し、単核球の解析及び血清中のサイトカインなどを検討した。26年度にはB6マウスへのMWCNTの腹腔内投与による影響を18ヶ月まで検討するとともに、関節リウマチあるいはSLEのモデルであるMRL/lprマウスへのMWCNTの腹腔内投与による免疫系への影響を検討した。(石丸)

感染性免疫系への影響に関する研究に関

しては、3種類(MWNT-7;M社, SD-1およびSD-2;S社)の多層型カーボンナノチューブ(MWCNT)について、respiratory syncytial virus (RSV)感染マウスモデルを用いて肺炎マーカーを指標に影響評価を行った。MWNT-7については、Taquann法処理で高度に分散したものについても検討を行った。0.02% Tween20-PBSに懸濁した各MWCNTをBALB/cマウスに経鼻投与し、5日後にRSV A2株 5 x 10⁵ PFUを経鼻感染させた。感染1, 5日後の肺胞洗浄液中の各種サイトカイン/ケモカインレベルを測定した。MWNT-7を複数回曝露(感染5, 3, 1日前)後、RSVをマウスに感染させた。感染5, 14日後の肺組織について、病理組織標本作製した。特に、感染5日後の標本は、抗RSV抗体を用いて免疫染色も実施した。(渡辺)

in vitro 試験件による検討では、MWCNTはSD-1およびSD-2、MWCNT-7、非晶質カーボンナノファイバー(CNF-L(長さ7.6±4.5µm, 径586nm)およびCNF-S(長さ1.8±0.8µm, 径365nm))を用い、THP-1マクロファージに6時間曝露し、培地への炎症性サイトカインの放出を測定した。マクロファージによる貪食はFACSを用いて検討した。(最上)

③次世代への影響: ナノマテリアルの催奇形性に関する検討において、MWCNT以外の物質として、フラーレン(C60)、カーボンブラック(平均粒子径24µm)、酸化チタン(ルチル型およびアナターゼ型)を用いて、4mg/kg体重の妊娠9日目の単回腹腔内投与し、妊娠18日に胎仔の外表奇形と骨格奇形を検査した。また、MWCNT(N社製)についても単回腹腔内投与して、外表奇形と骨格奇形を検査した。また、アスベスト(クロソライト、クリソタイルおよびアモサイト)を用いた腹腔内投与でも検

討を行った。(広瀬)

一方、MWCNTの催奇性を含む生殖・発生の評価に関しては、妊娠動物を用いた毒性試験を行い、生殖・発生毒性が発現する条件(動物種(マウス、ラット)、投与経路(尾静脈内投与、気管内投与)、投与日(妊娠 7~10 日)、および懸濁液の調製媒体)について検索した。さらに、反復気管内投与による妊娠マウス催奇形性試験を実施し、器官形成期を通じた曝露による用量-反応関係を検討した。(小林)

6種のMWCNT(M社、MWNT-7(M:長さ 5-20 μ m、54.4%;測定値)、N社(N:長さ 5-20 μ m 47%;測定値)、W社、2種(WL:長さ 0.5-10 μ m、WS:長さ 0.5-2 μ m、企業データ)、S社(SD-1:長さ 5-20 μ m 38.2%;測定値)及びT社(T:長さ 数10-数100 μ m、企業データ)について、前回Mで胎仔毒性(早期死胚)げ顕著に認められた投与量である4 mg/kg 体重を妊娠9日に単回腹腔内投与して胎仔毒性の違いを比較した。

<倫理面への配慮>

実験動物を用いる実験では、「動物の愛護及び管理に関する法律」等の精神に則り、該当研究所でそれぞれ定められている実験動物取り扱いに関する倫理規定等の規則に準拠した対応がとられている。

C. 研究結果

①慢性影響評価のための検討: 高度に分散処理(Taquann法)したMWCNT(T-CNT)をp53+/-マウス単回腹腔内に投与した実験に於いて、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、今までの我々の実験結果と良く一致した。その際、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。Mesothelin値は投与初期に一過性に上昇した後、中皮腫発生個体に於いて高値を示すことが観測された。

野生型マウスを使用して同様の実験を行った結果、T-CNT投与204日後に血性腹水を伴う中皮腫の初発例が認められ、100週までの観察期間中に17/100例観察された。陽性対照としたCrocitoliteでは同期間中に中皮腫は観察されなかった。T-CNT投与群では肉眼的に腎、脾の被膜(漿膜)のびまん性網状肥厚がみられた。肝では被膜肥厚に起因すると考えられる辺縁鈍化が認められた。肝の辺縁鈍化は投与後20週、40週、60週及び80週の定期解剖検査において、それぞれ16/19例、9/10例、10/10例、9/10例を認め、切迫と殺及び死亡例では全例(45例)に認めた。病理組織検査において、辺縁が鈍を呈した肝では、漿膜がびまん性に20~100 μ m程度の線維性肥厚を示していた。Crocitoliteではこれらの変化を認めず、また、p53+/-マウスにおいてもこれらの変化を認めなかった。

7種のMWCNTによる腹腔内投与による解析では、投与後52週目までには、M、N、WL及びSD-1では、死亡例及び瀕死例を含む全例で中皮腫に特徴的な腹腔内腫瘍結節と出血性腹水貯留を認めたが、WS、T及びSD-2では認められなかった。

MWNT-7を44週間反復(12回)気管内投与した実験では、投与期間中には投与と関連した異常は認められなかった。最終投与終了後52週目のMWCNTの肺内沈着量は、高用量群で顕著に多く、呼吸細気管支、肺胞管及び肺胞における、末梢性の増殖性病変が認められた。腹腔内投与では中皮腫誘発性が0.25mg/kg単回投与で認められたが、経気管

投与では肺実質及び胸膜における腫瘍の発現は認められなかった。また肺実質の増殖性病変や腹膜中皮腫発現への PBN による抑制作用は明らかでなかった。

2 種類の MWCNT の染色体異常試験の結果、SD-2 は染色体の構造異常および倍数性細胞ともに誘発しなかったが、SD-1 は構造異常を誘発しないものの、用量依存的に倍数性細胞を誘発した。径が太く繊維長が長いタイプの MWCNT にのみ染色体倍数細胞の誘発が引き起こされた。その数体誘発性メカニズムの解明のためのライブセルイメージングによる観察では、MWCNT はサイトキネシス障害により結果的に二核細胞を形成させることが示された。ラットにプレオマイシンを気管内投与し、72 時間後に肺を摘出し AT-II 細胞とクララ細胞を分離し、小核の観察を行ったところ、陰性対照の約 10 倍の小核の誘発が観察された。以上のことから肺での小核試験法の確立に成功した。

また、長さの異なるナノウイスキー (NW) の作成を目的とした、NW の成長制御法と真空熱処理によるラマン分光測定解析では、800°C の熱処理では C₆₀ の残存が認められたが、900°C の熱処理では C₆₀ の消失が確認され、フラーレンナノウイスキーは非晶質カーボンナノファイバーに変化することが判明した。また、C₆₀ と C₇₀ から成る 2 成分 (フラーレン) ナノウイスキーを合成し、組成に依存して長さが増えることを見出した。液-液界面析出法による合成において、反応体積の関数として、C₆₀NW の長さを約 5µm から約 15µm の範囲で制御することに成功した。また、C₆₀-C₇₀ 2 成分 NW における C₆₀ 母相中への C₇₀ の固溶限を 12.4 mass% と決定した。さらに、C₆₀-C₇₀ 2 成分 NW のヤング率が、C₇₀ の添加により

90GPa 程度にまで高くなることを透過電子顕微鏡実験で見出した。

C₆₀NW の長さコントロールを、手振り混合を加えた強制混合液-液界面析出法によって行い、C₆₀NW の長さや直径が溶液体積の関数となることを見出した。また、単位体積あたりの C₆₀NW の生成数が、溶液体積の平方根に逆比例して変化することを見出し、この現象が液-液界面における不均一核発生により支配されていることを示した。

ナノマテリアルに関する発がんメカニズムに関する検討として、nZnO は発がんイニシエータの投与に関わらず、可逆性の末細気管支上皮の巣状過形成増殖と線維化を見たが、発がんプロモーション作用はなかった。肺胞マクロファージには亜鉛粒子は見いだされなかったことから、これらの毒作用はイオン化亜鉛によると考えられた。酸化チタンのアナターゼ型 (d=25 nm) とルチル型 (d=20 nm) に比較において、マクロファージ誘導能、8OHdG、mRNA と Mip1a 蛋白の発現、肺癌細胞増殖因子誘導能はアナターゼ型の方が強力ではないことが分かった。UVB 照射による細胞毒性作用は両者に差異はなかった。

②免疫システムに対する検討: MWCNT 曝露による末梢血単核球を用いたフローサイトメトリー解析では、投与後 7ヶ月までの解析において、末梢での T 細胞分化 (CD4、CD8) に影響が確認された。MWCNT 曝露によって末梢での単球系 (CD11b) 細胞は曝露経過時間によって動態に違いがあった。また、15ヶ月間の長期観察を行った結果、マクロファージ系の細胞の増加が認められ、T 細胞の Th17 への分化が亢進することが判明した。投与 18ヶ月後には、肝臓の表面に泡沫細胞などの炎症性細

胞浸潤を伴う肝臓のグローブ様の形態変化が見られた。さらに、脾臓での M1 マクロファージの割合が投与群で優位に増加していることが分かった。

関節リウマチモデルである MRL/lpr マウスへの腹腔内投与では、投与5ヶ月にて腹腔滲出細胞の増加、M2 マクロファージへの分化促進とともに、肝表面での炎症性病変に加え、肺での脈管あるいは気管支周囲の間質における炎症性病変の増悪が観察された、また、血清リウマチ因子は投与後 3 ヶ月にて、高濃度の MWCNT 投与(10 µg)群で有意に高値を示した。

感染性免疫系に関しては、3 種類の MWCNT について、RS ウイルス感染マウスモデルによる炎症増悪化作用を評価した結果、MWNT-7(0.01 mg/mL)投与マウスの BALF 中では、RSV 感染時に肺炎増悪化のマーカーである IFN-γ とケモカイン RANTES のレベルが対照群と比較して 40~50%程度、有意に上昇していた。SD-1 投与マウスでは RANTES の有意な上昇は認められたが、SD-2 投与マウスでは影響が見られなかった。MWNT-7 投与マウスの BALF では IFN-γ や RANTES 以外にも MIP-1α など RSV 感染時に有意に変動する指標を見出した。Taquann 法処理 MWNT-7 を用いた肺の病理組織学的な検討では、従来型の分散法と違いが、単回曝露では分からなかった。しかし、Taquann サンプルを複数回曝露することにより、感染5日後の RS ウイルス肺炎の増悪化が用量に依存して認められ、非感染マウスではそのような影響は見られなかった。抗 RS ウイルス抗体を利用した免疫染色により、MWNT-7 粒子の周囲ではウイルス抗原の発現が少なかった。さらに感染

1 日後の肺胞洗浄液中の MIP-1α レベルの低下が顕著であった。一方、感染 14 日後の回復期における比較検討では、非曝露群では炎症が終息しているのに対して、曝露群では MWNT-7 の凝集塊とリンパ球の浸潤が見られた。

in vitro 試験系による THP-1 マクロファージを用いた検討結果として、多層カーボンナノチューブ MWCNT-SD-1 および SD-2, 非晶質カーボンナノファイバー CNF-L および CNF-S はマクロファージに曝露すると IL-18 の産生を促進し、その効果は針状の形状と長さに強く依存した。NLRP3 を siRNA でノックダウンすると、MWCNT-SD-1 ならびに CNF-L による IL-18 は抑制された。MWCNT-SD1 は IL-1α および IL-6 の産生も誘導すること、またこの応答についても NLRP3 インフラマソームを介することを明らかにした。また MWCNT-SD1 はマクロファージにより貪食され細胞内部構造を変化させ、側方散乱光(SSC)が増加することを FACS を用いて示した(25 年度)。MWCNT による IL-1β 産生は、リソソーム酸性化を阻害、あるいはリソソーム酵素 cathepsin B を阻害すると低下し、また MWCNT-SD1 曝露により細胞内リソソームが減少したことから、リソソームが重要な役割を持つことが示された。

③次世代への影響： ナノマテリアルの催奇形性に関する検討において、MWCNT 以外の物質として、フラーレン、カーボンブラック、酸化チタン(ルチル型およびアナターゼ型)を用いた結果では、外表奇形および骨格奇形は認められなかった。すでに奇形発生が報告されている MWCNT と製造元の異なる MWCNT (N 社)は、4-8mg/kg 体重で外表奇形と骨格奇形の発生が認められた。、アスベスト(クロ

シドライト、クリソタイルおよびアモサイト)を、MWCNTと同様の条件で(2% CMA-Na 懸濁、妊娠 9 日、4mg/kg 体重、腹腔内)マウスに投与したところ、外表奇形・骨格奇形ともに有意な発現は見られなかったが、40mg/kg 投与で奇形誘発を認めた。

投与可能な最大量のMWCNTを妊娠ラットおよび妊娠マウス尾静脈内投与した実験で、妊娠 7-10 日のどの時点の投与でも、催奇形性を引き起こさないことが分かった。一方、妊娠マウスへの単回気管内投与は、血清およびCMC-Naにおいて懸濁媒体に依存せず 3-5 mg/kg のいずれの用量で胎児の奇形がみられた。反復気管内投与による器官形成期を通じた曝露試験では、4 mg/kg/day までの用量では明確な催奇形性はみられなかった。

6種のMWCNTの胎仔毒性の比較では、MWCNT-NがMWCNT-Mと同等の効果を示したが、MWCNT-WS, MWCNT-WL, MWCNT-SD-1 および MWCNT-T は 4 mg/kg 体重の単回腹腔内投与では胎仔毒性はなかった。6種のMWCNTのうち、胎仔毒性が示されたMWCNT-M およびMWCNT-Nを投与された母体で、脾臓の腫大が顕著であった。また、この2種のMWCNTを投与された母体で、投与2時間後のインターロイキン-6 (IL-6)および単球走化性因子(MCP-1)の血中濃度が有意に上昇していた。

D. 考察

高度に分散処理(Taquann法)したMWCNT(10µg/animal)を単回腹腔内に投与することにより、Taquann処理検体が殆ど凝集体を含まず単離MWCNT繊維が重量当たりで、分散処理する前の検体に比べて20倍

濃縮されていることを示唆した。この結果は、投与前の分散処理に関わらず、体内投与後に単離状態にある繊維一本が中皮腫を誘発する確率が等しいこと、散在性の繊維を貪食したマクロファージによる所謂 frustrated phagocytosis で引き起こされるとされてい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。また、同じ用量の Taquann 処理 MWCNT を野生型にマウスに投与することでも中皮腫の誘発を確認することができ、基本的な発症メカニズムは p53^{+/+}-マウスと野生型マウスに違いが無いことが示唆された。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た。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 の表面や端部の特性がこの差に関与するか否かについてはさらなる検討が必要である。

漿膜のび漫性の線維性肥厚に起因する肝の辺縁鈍化は p53^{+/+}-マウスでは認められなかったことから、p53^{+/+}-マウスと野生型マウスでは線維化誘発に差がある可能性が考えられた。今後は、発症までの期間や感受性に及ぼす p53 遺伝子の関わりを解析することで、定量的評価に関連づける基礎的知見を収集できると考えられる。

様々なMWCNTによる腹膜中皮腫誘発性を解析することにより、一定の繊維サイズと組織内における分散性が、中皮腫の発生に大きく関連していると考えられた。繊維長が短く、凝集性があり微細粒子状を呈するMWCNT線維では、中皮細胞への影響はほとんどないか、極軽度であった。繊維サイズの違いは、中皮

組織における存在状態の違いに反映され、さらに腹膜における中皮細胞の反応性の違いをもたらすものと考えられた。投与後 50 週令前後の血清タンパク質の発現差異解析を行った結果から、繊維長の長いタイプの MWCNT において情報伝達・接着性・炎症に関連する成分の変動がより大きいことを確認しており、中皮腫に対する特異性および感受性の高いマーカーの開発が期待される。MWCNT の経気管内投与実験では、高用量群で肺実質の増殖性病変の発現が認められた。肺実質内に残存・沈着している MWCNT 繊維による直接刺激、または除去されにくい MWCNT による持続性の炎症反応の影響が考えられる。腹腔内投与では中皮腫誘発性を認めたが、気管内投与では腫瘍の発現が見られなかった。本実験で呼吸系上皮および体腔膜中皮の反応が弱かったことは、試料とした MWCNT のサイズが短かったことと、用量が低かったことを反映していたものと考えられる。このことは、MWCNT による中皮腫の発現に一定の長さ (5-20 μm) の繊維が果たす役割が大きいとするこれまでのデータをサポートするものであり、また、呼吸器系上皮に対しても同様である可能性が示唆された。したがって、MWCNT の気道曝露による慢性影響を明らかにするためには、長い繊維を含む MWCNT 試料を呼吸器系・体腔に長期間曝露させる実験が必要である。PBN 併用は肺実質病変及び腹膜中皮腫の発現に影響を及ぼさなかった。MWCNT によるラット発がんにおいては、酸化ストレスとそれによるシグナル異常の関与が限定的でありそれ以外の要因が介在する可能性が示唆された。

MWCNT に遺伝毒性に対する検討では、これまで実施した合計 6 種類の MWCNT の染色体異常試験の結果から、70 nm 以上の外径で、1 μm 以上の長さをもつ MWCNT が倍数性細胞を誘発し、その誘発頻度は外径と、長さに依存することが明らかとなった。光学顕微鏡や走査型電子顕微鏡の観察結果から、これら倍数性を誘発する MWCNT はチューブ状の構造を維持したまま細胞と接触していた。これらのことは MWCNT がアスベストと類似した遺伝毒性メカニズムを有することを示唆した。MWCNT の *in vivo* における遺伝毒性誘発性を検討するため、ナノ物質の標的組織の一つである肺での小核試験法の確立を試みた。ラットを用いたブレオマイシンの気管内投与の試験では、肺での AT-II 細胞、クララ細胞において、顕著な小核の誘発が観察された。また、本方法はこれまで必要性が報告されている細胞培養が不要であるため、極めて簡便である。MWCNT 等のナノ物質の曝露による肺での遺伝毒性評価に期待できる。

発がんプロモーションの検討の結果、nZnO は肺毒性があるが発がん作用は無く、従来の報告と一致した結果であり、提案の発がん二段階試験法の妥当性が確認された。病理学的解析の結果からは、酸化亜鉛の生物を介するイオン化が関わっているものと考えられた。アナターゼ二酸化チタンは、特に高度を調整しない実験条件下では生物・細胞毒性はルチル型より弱いものと考えられたが、UVB 照射による細胞毒性作用解析でも両者に差異はなく、生体系に取り込まれた二酸化チタンでは、表面構造に基づく光反応性にそれほど大きな差異は示されないものと推定された。

免疫制御システムへの影響検討では、今回

は腹腔内への投与であり、従来の吸引による肺胞マクロファージと MWCNT との免疫システムへの影響と異なる可能性があるが、投与後 18ヶ月までの長期間観察において末梢免疫細胞の MWCNT 曝露による影響を経時的に観察することによって、ナノマテリアルに対する免疫システム全体への慢性的な影響を評価することが可能と考えられた。特に、長期間の M1 マクロファージの細胞の増加と、T 細胞の Th17 への分化亢進は慢性的な免疫システムに影響をもたらしている可能性を示唆した。さらに、自己免疫疾患モデルへの MWCNT 曝露によって、病態を悪化させる可能性が示された。

感染性免疫モデル系への検討では、BALF 中の肺炎マーカーの変動から、3 種類の MWCNT の中では MWNT-7 で RSV による肺炎の増悪化を示唆する結果が得られた。この影響は、Taquan 処理 MWCNT を用いた場合でも観察された。MWNT-7 を複数回曝露することにより、肺胞中隔の肥厚が認められた。これらの肺炎の増悪化現象は、感染 14 日後の回復期においても確認され、このマテリアルの影響が一過性でないことが判明した。また炎症の程度が強い局所ではウイルス抗原が少なく MWNT-7 粒子の凝集などが確認された。これは感染初期の免疫担当細胞の集積によるものと考えられる。この様な強い炎症誘導が生じ、結果として影響の持続化に繋がったと考えられる。さらに、MIP-1 α 産生量の低下などマクロファージ類の感染応答の不具合も示され、この分子を指標に標的細胞としての免疫機能への影響評価が可能と思われる。

一方、THP-1 マクロファージを用いた検討では、多層カーボンナノチューブ MWCNT な

らびに非晶質カーボンナノファイバー CNF は、針状の形状と長さに依存した IL-18 産生促進活性を示した。またそのシグナルの認識と伝達には Nod 様受容体 NLRP3 を含むインフラソームが関与することが示された。炎症病態の鍵分子 NLRP3 は、IL-1 α および IL-6 の産生誘導にも関与することが示された。また、遷移金属を含まない高温焼成フラーレンナノワイカー (=非晶質カーボンナノファイバー) を用いた実験で、NLRP3 による認識と活性化は金属不純物ではなく、カーボンナノ繊維の針状の形状と長さに依存することを明らかにした。また MWCNT はマクロファージに貪食され、細胞内構造を大きく変化させることを明らかにした。MWCNT による IL-1 β 産生はリソソーム酵素 cathepsin B 活性ならびに活性化に必要なリソソーム酸性化を阻害すると低下し、MWCNT 曝露によりリソソームが減少したことから、リソソーム崩壊とリソソーム酵素放出が NLRP3 活性化に重要な役割を持つ可能性が示された。

ナノマテリアルの催奇形性に関する検討において、MWCNT 以外の物質では今回の投与条件では催奇形性はみとめられなかったが、M 社製以外の MWCNT (N社製) でも用量依存的に相関性に外表奇形・骨格奇形が見られた。観察された奇形の型は、H23 年度に報告した M社製の MWCNT での奇形と同様のものであった。同様の形状をもつアスベストによる催奇形性はこれまで報告されておらず、今回 WMCNT の 10 倍量の曝露で奇形が確認され、催奇形性でも形状が重要な因子であることが示唆された。

また、単回気管内投与試験では奇形が認められたにもかかわらず、致死量に近い投与用

量を投与した単回尾静脈内投与試験ではラット・マウスともに奇形が認められなかったことから、MWCNT そのものが催奇形性のポテンシャルを持つのか、曝露経路による沈着部位の違いによる人為的な影響がみられたのかについて、更なる検証が必要と考えられる。MWCNT の単回気管内投与においては 3 mg/kg 以上の用量で胎児の奇形がみられた、反復気管内投与においては胎児の奇形発現は明確ではなかったが、2 mg/kg/day 以上の用量において、母動物の体重増加抑制と胎児の体重の低下がみられた。これらはいずれも毒性学的に意義のある変化であることから、MWCNT の気管内投与による無毒性量 (NOAEL) は、反復投与試験の結果から 1 mg/kg/day であり、最小毒性量 (LOAEL) は、2 mg/kg/day であると評価できる。ただし、現時点では胎児の内臓および骨格検査を行っていないため、今後はこれらの検査を行った上で MWCNT の生殖・発生毒性に関する NOAEL あるいは LOAEL を判断する必要がある。

6種のサイズの異なる MWCNT による胎仔毒性の比較では、MWCNT-WS(長さ 0.5-2 μ m)、-WL(長さ 0.5-10 μ m)、-SD-1(長さ 1-4; 61.8%)、-T(長さ数 10-数 100 μ m)では胎仔毒性が見られず、-M(長さ 1-4; 42.2%、5-20; 54.4%)および-N(長さ 1-4; 51%、5-20; 47%)で胎仔毒性が顕著であったことから、2 μ m以上 20 μ m程度までの長さの MWCNT が胎仔毒性に関わっているらしいことが示された。また、母体の脾臓の腫大や血中サイトカインの変動から、胎仔毒性は、MWCNT による母体の炎症性反応が関係していると推測された。

今後は、これらの *in vivo* 系および *in vitro* 系で得られた知見を活用しながら、曝露・観察

期間に依存した影響も考慮しつつ、既存ガイドライン試験法の改良や新たなスクリーニング手法開発に向けたより技術的な基盤情報を取得するために、分子生物学的解析技術を用いた病理解析やトリガーとなる分子機構などの毒性発現メカニズムに関するさらなる知見の集積が必要であると考えられた。

E. 結論

(Ⅱ)急性毒性試験では捉えられない慢性および遅発的影響に対する評価手法確立に資する知見を取得することを目的とした研究において、慢性影響評価検討では、MWCNT 繊維状粒子による中皮腫誘発は、単分散された繊維状粒子が催腫瘍性に重要であることを確認すると共に、腹腔内投与および気管内投与のいずれにおいても線維の長さが腫瘍形成に大きく影響していることが明らかとなった。中皮腫の基本的な発症メカニズムは p53^{+/-}マウスと野生型マウスに違いが無いことが示唆されたが、線維化誘発に差がある可能性が考えられた。遺伝毒性においても、径が太く、長いタイプの CNT にのみ染色体倍数細胞の誘発が観察され、アスベスト様メカニズムとの類似性を確認した。酸化チタンによるプロモーション作用には、光触媒反応と関係する粒子の表面構造と細胞毒性に相関性は認められなかった。一方、酸化亜鉛には発がんプロモーション作用は無く、生体内でのイオン化亜鉛による毒性影響が重要であること示唆された。

免疫システムに対する検討では、マウスに CNT を腹腔内投与後の長期観察において、末梢免疫細胞の M1 マクロファージ細胞の増加と、T細胞の Th17 への分化亢進による慢性的な免疫システムへの影響を確認すると共に、自己免疫疾患モデル動物の病態を悪化させ

る可能性が示された。感染性免疫モデルでは、MWCNT 暴露による RSV 感染性肺炎の増悪化が確認され、この作用には持続性があることを示唆する結果が得られた。THP-1 マクロファージを用いた系では MWCNT などの NLRP3 による認識とサイトカイン等の活性化には、繊維の形状と長さやリソソームへの影響が重要な役割を持つ可能性が示された。

次世代への影響について、MWCNT 腹腔内投与による催奇性は、アスベストによるものも含めて、長いタイプの繊維状粒子に依存することが示されたが、この繊維状粒子による催奇性は単回尾静脈内投与や器官形成期を通じた反復気管内投与では誘発されず、単回気管内(および腹腔内)投与でのみ奇形が誘発することが示された。

F. 健康危機情報

該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

Hashiguchi, S., Yoshida, H., Akashi, T., Komemoto, K., Ueda, T., Ikarashi, Y., Miyauchi, A., Konno, K., Yamanaka, S., Hirose, A., Kurokawa, M., Watanabe, W. Titanium dioxide nanoparticles exacerbate pneumonia in respiratory syncytial virus (RSV)-infected mice. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* (2015) 39, 879-886.

Miyazawa K. Synthesis of fullerene nanowhiskers using the liquid-liquid interfacial precipitation method and their mechanical, electrical and superconducting properties. *Sci.*

Technol. Adv. Mater.,16: 013502. (2015)

Konno T, Wakahara T, Miyazawa K, Synthesis and structural analysis of C₆₀-C₇₀ two-component fullerene nanowhiskers, *J. Cryst. Growth*, 416: 41-46. (2015)

宮澤薫一. 液-液界面析出法(LLIP 法)によるフラーレンのナノウィスカー・ナノチューブ・ナノシートの合成. *Journal of the Society of Inorganic Materials, Japan* 22: 92-98. (2015)

Xu J, Alexander DB, Futakuchi M, Numano T, Fukamachi K, Suzui M, Omori T, Kanno J, Hirose A, Tsuda H. Size- and shape-dependent pleural translocation, deposition, fibrogenesis, and mesothelial proliferation by multiwalled carbon nanotubes. *Cancer Sci.* 105:763-9. (2014)

Cui H, Wu W, Okuhira K, Miyazawa K, Hattori T, Sai K, Naito M, Suzuki K, Nishimura T, Sakamoto Y, Ogata A, Maeno T, Inomata A, Nakae D, Hirose A, Nishimaki-Mogami T. High-temperature calcined fullerene nanowhiskers as well as long needle-like multi-wall carbon nanotubes have abilities to induce NLRP3-mediated IL-1beta secretion. *Biochem Biophys Res Commun*, 452 : 593-599. (2014)

Miyazawa K, Hirata C, Wakahara T. Influence of the solution volume on the growth of C₆₀ nanowhiskers. *J. Crystal Growth*, 405: 68-72. (2014)

Fujitani T, Hojo M, Inomata A, Ogata A, Hirose A, Nishimura T, Nakae D. Teratogenicity of asbestos in mice. *J*

- Toxicol Sci. 39: 363-370. (2014)
- Numano T1, Xu J, Futakuchi M, Fukamachi K, 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(2):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)
- 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.* 38(4):619-28. (2013)
- K. Miyazawa, C. Hirata, R. Kano, T. Wakahara, H. Takeya, T. Yamaguchi, Y. Takano, J. Tang, Y. Lin and M. Tachibana, "Structural characterization of the C₆₀ nanowhiskers heat-treated at high temperatures for potential superconductor application", *Trans. Mat. Res. Soc. Japan*, Vol.38, No.4 1-4.(2013 December)
- 広瀬明彦, ナノマテリアルリスク評価ガイドランスの国際的傾向, *薬学雑誌*, 133(2), 175-80(2013)
- Shimizu K, Kubota R, Kobayashi N, Tahara M, Sugimoto N, Nishimura T, Ikarashi Y: Cytotoxic Effects of Hydroxylated Fullerenes in Three Types of Liver Cells. *Materials*, 6(7), 2713-2722 (2013).
- 小林憲弘: ナノマテリアルの曝露による次世代への影響について考える. *ファルマシア*, 48(12), 1191-1191 (2012).
- Matsumoto, M., Serizawa, H., Sunaga, M., Kato, H., Takahashi, M., Hirata-Koizumi, M., Ono, A., Kamata, E., Hirose, A., No toxicological effects on acute and repeated oral gavage doses of single-wall or multi-wall carbon nanotube in rats. *J Toxicol Sci.* 37, 463-474. (2012)
- Takahashi, M., Kato, H., Doi, Y., Hagiwara, A., Hirata-Koizumi, M., Ono, A., Kubota, R., Nishimura, T., Hirose, A., Sub-acute oral toxicity study with fullerene C60 in rats. *J Toxicol Sci.* 37, 353-361. (2012)
- Fujitani T, Ohyama K, Hirose A, Nishimura T, Nakae D*, Ogata A: Teratogenicity of multi-wall carbon nanotube (MWCNT) in ICR mice, *J. Toxicol. Sci.* 37, 81-89 (2012).
- 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(8):1440-4.(2012)

- Xu J, Futakuchi M, Shimizu H, Alexander DB, Yanagihara K, Fukamachi K, Suzui M, Kanno J, Hirose A, Ogata A, Sakamoto Y, Nakae D, Omori T, Tsuda H. Multi-walled carbon nanotubes translocate into the pleural cavity and induce visceral mesothelial proliferation in rats. *Cancer Sci.* 103(12):2045-50. (2012)
- 宮澤薫一, “液-液界面析出法によるフラーレンナノファイバーの合成と成長機構”, ナノファイバー学会誌, 3: 13-17. (2012)
2. 学会発表
- Jun Kanno, “Taquann” Dispersion Method with Direct Injection Whole-Body Inhalation System for Engineered Nano Materials Toxicity Studies, the 54th Annual Meeting of the Society of Toxicology (2015.3.25) San Diego, USA, poster
- Yuhji Taquahashi, Atsuya Takagi, Masaki Tsuji, Koichi Morita, Yukio Ogawa, Jun Kanno, “Taquann” whole body inhalation system for small scale in vivo, toxicity studies to speed up categorization, OECD Nano Categorisation WS (2014.9, Washington D.C)
- Seiko Hashiguchi, Hiroki Yoshida, Toshi Akashi, Akihiko Hirose, Masahiko Kurokawa, Wataru Watanabe, Effects of titanium dioxide nanoparticles on the pneumonia in respiratory syncytial virus-infected mice. *EUROTOX2014* (2014.9, Edinburgh)
- 菅野 純、高橋祐次、高木篤也、広瀬明彦、Toxicological considerations for particulate matter as foreignbody carcinogen. 第73回日本癌学会学術集会(2014.9) 横浜、シンポジウム
- 米本敬司、紺野克彦、広瀬明彦、黒川昌彦、渡辺 渡 多層型カーボンナノチューブ曝露のRSウイルス肺炎への影響、第62回日本ウイルス学会学術集会、2014.11.11, 横浜
- 上田智之、橋口誠子、吉田裕樹、明石 敏、米本敬司、紺野克彦、広瀬明彦、黒川昌彦、渡辺 渡 二酸化チタンナノ粒子曝露のRSウイルス肺炎への影響、第62回日本ウイルス学会学術集会、2014.11.11, 横浜
- 橋口誠子、吉田裕樹、明石 敏、広瀬明彦、黒川昌彦、渡辺 渡 二酸化チタンナノ粒子の曝露はRSウイルス感染病態を悪化させる 日本薬学会第135年会、2015.3.27, 神戸
- 菅野 純、吸入全身暴露を基軸としたナノ材料の毒性評価体系の構築とMWCNTからの知見、日本学術会議トキシコロジー分科会主催シンポジウム、2014年9月、東京
- 菅野 純、高橋 祐次、森田 絃一、辻 昌貴、高木 篤也、小川 幸男、広瀬明彦、ナノマテリアルの有害性評価・特に慢性毒性について、フォーラム2014: 衛生薬学・環境トキシコロジー、2014年9月、つくば
- Yuhji Taquahashi, Atsuya Takagi, Masaki Tsuji, Koichi Morita, Yukio Ogawa, Jun Kanno, Nanotoxicology - its chronic aspects: Taquann-Direct Injection whole body inhalation system. 国際材料研究学会連合・アジア

- 国際会議 2014(IUMRS-ICA2014)
(2014.8)福岡、シンポジウム
- Jun Kanno, Assessment of chronic inhalation toxicity: “Taquann” system for nanomaterials, The Third Workshop on the Risk Management of Engineered Nanomaterials (2014,8,Tsukuba)
- 菅野 純, 高橋 祐次, 高木 篤也, 広瀬 明彦, 今井田 克己, 津田 洋幸, ナノマテリアルの吸入毒性評価の迅速化と効率化に向けて, 第 41 回 日本毒性学会学術年会, 2014 年 7 月, 神戸, シンポジウム
- 高橋 祐次, 小川 幸男, 高木 篤也, 辻 昌貴, 森田 紘一, 岸 宗佑, 今井田 克己, 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による肺及び胸膜病変, 第 41 回 日本毒性学会学術年会, 2014 年 7 月, 神戸, 一般口演
- Jun Kanno, Yuhji Taquahashi, Atsuya Takagi, Masaki Tsuji, Koichi Morita, Yukio, Ogawa, Mesotheliomagenesis of micrometer-sized MWCNT: findings from intraperitoneal injection and whole body inhalation studies of highly dispersed “Taquann” treated MWCNT, NanoTOX2014, (2014,4,Antalya)
- 坂本義光, 小縣昭夫, 北条 幹, 山本行男, 広瀬明彦, 井上義之, 橋爪直樹, 猪又明子, 中江 大, “ラットにおいて多層カーボンナノチューブの経気管噴霧反復投与が及ぼす影響” 第 41 回日本毒性学会学術年会 2014 年7月, 神戸
- Arakaki R, Ushio A, Yamada K, Kurosawa M, Saito S, Kondo T, Tsunematsu T, Yamada A, Kudo Y, Ishimaru N: Influence of multi-wall carbon nanotubes on immune system in normal mice and MRL/lpr mice. 第 43 回日本免疫学会総会 第 43 巻:44 2014.12 京都
- M. Honma: Trend and Progress of OECD Genotoxicity Testing Guidelines, 2014 National Workshop on Non-clinical Safety Evaluation and Quality Management 2014 年 11 月 上海・中国
- 藤谷知子, 安藤 弘, 久保喜一, 猪又明子, 中江 大, 小縣昭夫, 小林憲弘, 田中亮太, 竹原広, 納屋聖人, 久保田領志, 五十嵐良明, 広瀬明彦, 西村哲治: アスベスト繊維の: マウス反復気管内投与における多層カーボンナノチューブの催奇形性、の評価. 第 41 回日本毒性学会学術年会; 神戸, (2014.7.2 兵庫県神戸市).
- Norihiro Kobayashi, Reiji Kubota, Ryota Tanaka, Hiroshi Takehara, Masato Naya, Yoshiaki Ikarashi, Akihiko Hirose: Evaluation of teratogenicity of multi-wall carbon nanotubes in pregnant mice after repeated intratracheal instillation. 54th Annual Meeting of the Society of Toxicology (SOT 2015) (2015.3.26 San Diego, CA, USA).
- 宮澤薫一, 平田千佳, 若原孝次: C₆₀ ナノウィスカーの成長に及ぼす溶液体積の影響, 日本物理学会 2014 年秋季大会; 名古屋, 2014.
- Miyazawa K, Hirata C, Wakahara T. Controlled growth of C₆₀ fullerene nanowhiskers. 3rd MOVE Symposium,