

201329021A

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 25 年度

総括・分担研究報告書

研究代表者 広瀬 明彦

国立医薬品食品衛生研究所

平成 26 年 (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25年度 総括・分担研究報告書
研究代表者 広瀬 明彦

平成26年(2014年)3月

目 次

| | |
|--|-----|
| I. 総括研究報告書 | 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 | 2 |
| II. 研究分担報告書 | 17 |
| 1. ナノマテリアルの慢性暴露による有害性評価指標の開発に関する研究 菅野 純 | 18 |
| 2. 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 津田 洋幸 | 33 |
| 3. ナノマテリアルの体内動態及び発生毒性評価手法に関する研究 小林 憲弘 | 39 |
| 4. カーボンナノチューブの遺伝毒性評価に関する研究 本間 正充 | 60 |
| 5. ナノマテリアルの細胞内異物処理メカニズムに関する研究 最上 知子 | 68 |
| 6. ナノマテリアルの感染性免疫系への影響に関する研究 渡辺 渡 | 72 |
| 7. ナノマテリアルの免疫制御システムへの影響評価研究 石丸 直澄 | 76 |
| 8. 炭素系ナノマテリアルの生体影響試験における物性測定に関する研究 宮澤 薫一 | 96 |
| 9. ナノマテリアルの慢性影響および生殖発生毒性評価系に関する研究 広瀬 明彦 | 100 |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表 | 109 |
| IV. 研究成果の刊行物・別冊 | 113 |

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)

I. 総括研究報告書

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

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

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、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。しかしながら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が十分に集積したとは言えない。特に、最も懸念すべきである、ナノマテリアルの体内残留性に基づいた慢性影響や遅発毒性、さらには免疫機能や胎児への影響についての研究は、それほど多くは報告されていない。本研究では、(Ⅱ)急性毒性試験等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次世代への発達に関する影響に焦点を当てた研究体制を取っている。25 年度は①慢性影響評価のための検討として、高度分散処理(Taquann 法)した MWCNT を野生型マウスに単回腹腔内投与し、p53+/-マウスと同様の中皮腫誘発性を確認した。また MWCNT による 52 週間経気管反復投与(1 回/4 週間)においても、腹腔内投与よりも頻度は低いものの中皮腫誘発性を有することが確認されたが、今回の試験で投与試料として調整した MWCNT のサイズが短くなっていた可能性がある。MWCNT に関する発がんメカニズムに関しては、サイトキネシス障害による二核細胞化の引き金であることを確認した。ナノサイズ酸化チタンにおけるラット肺胞上皮・間質細胞に対する毒性比較検討では、光活性の強いアナターゼ型の方が、ルチル型より Mip-1 α 発現量、8-OHdG の増加率および初代マクロファージ培養上清の A549 肺がん細胞の増殖活性が弱いことが示され、毒性の強さと表面構造との間にそれほどの関連性が示されなかった。②免疫システムに対する検討としては、野生型マウスへの MWCNT の単回曝露長期(18 ヶ月)観察実験結果より末梢免疫細胞の M1 マクロファージ分化への促進が確認された。また、自己免疫疾患モデルを用いた実験では血清中のリウマチ因子の有意な低下が見られ、自己抗体産生に影響がある可能性が示された。感染免疫系への影響として、MWCNT をマウスに曝露した後の RS ウィルス感染性に及ぼす影響を検討した結果、通常分散および Taquann 法処理した MWCNT -7 において、肺洗浄液中のケモカイン上昇と肺炎の増悪化が促進することが示唆された。さらに THP-1 マクロファージを用いた *in vitro* 解析により、繊維長の長い MWCNT や焼結型のカーボンウィスカーが、IL-18 と同様に、NLRP3 依存的に IL-6 および IL-1 α 分泌を促進することが示された。③次世代への影響としては、MWCNT-7 の 2 度の単回気管内投与試験(3 mg/kg)で催奇性の再現性が得られたが、胎盤における MWCNT の沈着は確認できなかった。一方反復気管内投与試験では、高用量群(2mg/kg/回:合計 8 mg/kg)でも催奇形性が認められず、一度の大量投与に起因して奇形が発現する可能性が推定された。さらに、アスベストの大量(40mg/kg)腹腔内投与でも催奇形性作用のあることが確認され、奇形発現要因の要因として繊維長や繊維本数との関連も示唆された。今後は、これまでの長期投与や長期観察期間で得られた知見、免疫学的影響等について、分子メカニズム的な解析を進めると共に、催奇性についても用量反応性や影響発現のメカニズム解析を行い、リスク評価に資する基盤情報を取得することを目指す。

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・材料研究機構先端的
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
代謝生化学部 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 徳島大学大学院ヘルスバイオサ
イエンス研究部・医療創生科学
部門・分子口腔医学講座・口腔
分子病態学 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 結荷 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

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

吉田 裕樹 九州保健福祉大学薬学部
講師

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

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。本問題は、2004年頃から国内外共に注目が高まり、国際機関として OECD が2006年から産業用ナノマテリアルの作業グループを設置し、加盟国のスポンサーシッププログラムによる有害性情報の収集が行なわれている。現在は Phase I までに得られた情報を整理し初期的な評価行われており、Phase II に向けた更なる知見収集の必要と共に議論が行われているところである。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

等では、規制化の方向にあり、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2004年当初より体内残留性に基づ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た。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としての(Ⅲ)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。

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。H25年度は Taquann 法処理した10 μ g/animalのMWCNTを野生型マウスの腹腔内に単回投与する実験を行った。(菅野)

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を分散液(20倍量のショ糖とTween 80で順次らい解した後、イオン交換水で0.25%に調整)に懸濁し、0.01、0.05及び0.25 mg/kg体重の用量

で1回/4週間、計12回、経気管噴霧投与した。動物は、投与後52週間を目処に飼育し、終了時生存例について、病理学的な検索を行った。また、中皮腫誘発における血清タンパクのプロテオーム解析において、F344ラットの腹腔内に2種類のMWCNT(S社製SD-1: L=8 μ m、 ϕ =150nm; SD-2: L=3 μ m、 ϕ =10-15nm)を単回投与後、50週間後の血清を二次元電気泳動による発現差異解析およびLC/MS/MSによる有意変動タンパク質の同定を行った。(広瀬)

MWCNTによる遺伝毒性の解析
MWCNT-7を0.5%MC+1.0%Tween 80+超音波で分散させた後、染色体および動原体を蛍光タンパク質で染色した可視化細胞(MDA-435細胞)に適用し、ライブセルイメージングによる経時観察を行った。(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ィスカー(NW)の作成を目的に、NWの成長制御法に関する構造解析を進めており、H25年度は、フラーレンの飽和トルエン溶液とイソプロピルアルコールを用いる液-液界面析出法(LLIP法)によって、5~23質量%C70の仕込み組成を持つC60-C702成分ナノウィスカー(C60-C70NW)を合成し、それらの長さや直径、ヤング率の測定を行った。(宮澤)

光触媒活性がルチル型酸化チタン(ruTiO₂)より強いとされているアナターゼ型酸化チタン(anTiO₂)に対して、ラットへの肺内短期投与による肺胞上皮・間質細胞に対する毒性とその機序の比較、および*in vitro*における初代培養肺胞マクロファージ(M ϕ)を介する肺がん細胞株に対する毒性と増殖誘導作用、およびUVB照射下における直接の細胞

毒性の比較を行なった。(津田)

②免疫システムに対する検討: MWCNTの長期暴露による免疫システムへの影響を検討するために、8週齢の雌C57BL/6(B6)マウスにMWCNTを0、1、10 μ g匹を腹腔内に投与し、18ヶ月後の変化を免疫学的手法にて検討した。さらに、自己免疫疾患モデルであるMRL/lprマウスと対照としてMRL+/+マウスへMWCNTを0、1、10 μ g匹を腹腔内に投与し、6ヶ月後の変化を免疫学的手法(種々の細胞表面あるいは細胞内マーカー)にて検討した。(石丸)

感染性免疫系への影響に関する研究に関しては、3種のMWCNT(MWNT-7及びSD-1、SD-2)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の比較評価を行った。MWCNTは0.02% Tween20-PBSに懸濁し、感染前BALB/cマウス(♀、6W)に経鼻投与し、その後RSV A2株5 \times 10⁵ PFUを経鼻感染させ、5日後に、肺胞洗浄液中のカモカイン解析や肺組織の病理検査等を行った。(渡辺)

*in vitro*試験件による検討では、大きさ・形状の異なるMWCNT(SD-1、SD-2、MWCNT-7)および高温焼結フラーレンナノウィスカー(HTCFNW)をTHP-1マクロファージに暴露し、細胞への取り込みをフローサイトメトリーで側方散乱光SSCの測定により評価した。また、炎症性サイトカインIL-6およびIL-1 α 分泌への影響を調べるとともに、自然免疫受容体NLRP3の関与をsiRNAノックダウンにより解析した。(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、24年度実施したマウス単回気管内投与試験の外表検査にお

いて胎児の奇形がみられたことから、奇形がみられた胎児の骨格検査と、これらの胎仔を出産した母動物の胎盤および肺の病理組織学的検査を行った。また、再現性を確認するため各群の動物数を 10 匹に増やしたマウス単回気管内投与試験を実施した。さらに、単回投与における妊娠 9 日以外の MWCNT 曝露によっても発生毒性が発現するかどうかを確認するため、器官形成期（妊娠 6～17 日）を通じた反復気管内投与試験を実施した。（小林）

また、MWCNT による催奇形性の形状による類似性としてアスベストによる腹腔内投与による催奇形性試験を行った。UICC のアスベスト（クロシドライト、クリンタイトおよびアモサイト）を 2%カルボキシメチルセルロースナトリウムで懸濁後、妊娠 9 日のマウスに 4mg あるいは 40mg/kg 体重を腹腔内投与し、胎仔の外表奇形と骨格奇形を検査した。（広瀬）

<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 を野生型マウスに単回腹腔内投与（10 μ g/動物）を行った結果、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。一方、50 週を経過した時点で陽性対照のクロシドライト群には中皮腫が観察されていない。中皮腫が誘発されて

切迫殺を実施した例では、p53+/-マウスで中皮腫が誘発され切迫殺した所見と同様に血性腹水の貯留、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。

最終投与終了後 52 週目の MWCNT の肺内沈着量は、0.25mg/kg 群で顕著に多かった。また肺の呼吸細気管支、肺胞管及び肺胞における、末梢性の増殖性病変が 0.25mg/kg 群で有意に認められた。中皮組織の組織学的変化では、0.05 及び 0.25 mg/kg 群で腹腔内中皮腫各 1 例が、また 0.25 mg/kg 群に心嚢膜中皮腫が 1 例、臓側胸膜中皮細胞の肥大及び過形成が夫々 1 例ずつ観察された。また、2 種類の MWCNT を腹腔内投与後 52 週の血清プロテオーム解析では、951 検出スポット中、対照群に比べて 2 倍以上且つ有意に変動したタンパクは、SD-1 投与群で 20 スポットと SD-2 投与群で 9 スポットであった。そのうち SD-1 で変動した酵素ではタンパク質分解の調節作用、酸化酵素、ヘムタンパク質の結合調節作用、リポタンパク質の運搬作用を持つタンパク質が同定された。

MDA-435 細胞を用いた MWCNT の細胞分裂への影響を観察した結果、約 20 μ m の長い MWCNT が関与する細胞分裂は、約 3 時間を必要とした。MWCNT 繊維が長いと、anaphase で 2 つの娘細胞の間でブリッジ構造を形成し、収縮環内に取り残され、その後、2 細胞の境界線が消失することで、結果として二核細胞が形成されることが示された。

C60-C702 成分 ナノウイスキー（C60-C70NW）の合成検討において、直線形状で成長軸方向に沿って一様な直径を持つ C60-C70NW が合成された。C70 含量の増加とともに C60-C70NW の直径が増加するの

対して、長さは C60-10mass%C70NW で最小となった。また、C70 を添加することにより、600～1100 nm の範囲の直径において、C60-C70NW のヤング率が著しく増加することがわかった。

アナターゼ型酸化チタン(anTiO₂)を投与したラット肺胞内では、anTiO₂ およびルチル型酸化チタン(ruTiO₂) 貪食 Mφ の数、Mip1α 発現および 8-OHdG の増加は ruTiO₂>anTiO₂であった。in vitro初代培養 Mφ に両者を曝露した培養上清の A549 肺がん細胞の増殖活性は、ruTiO₂>anTiO₂であった。Mφ と培養上清中タンパク量は ruTiO₂>anTiO₂ であった。UVB 照射下での ruTiO₂ 及び anTiO₂ 両粒子の A549 に対する毒性に明瞭な差はなかった。

②免疫システムに対する検討: B6 マウスへの MWCNT の腹腔内投与後 18ヶ月では、腸間膜リンパ節の細胞数が減少し、脾臓における M1 マクロファージの割合が増加していることが判明した。自己免疫疾患モデルである MRL/lpr マウスへの MWCNT の腹腔内投与にて、末梢の T 細胞、B 細胞、マクロファージ及び樹状細胞の分画に大きな影響はみられなかったが、投与後、1、2 ヶ月で血清中のリウマチ因子の有意な低下が見られた。

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、SD-1曝露(0.25 mg/kg)マウスのBALF中では、肺炎増悪化のマーカであるRANTESと MIP-1αのレベルが対照と比較して20～30%程度上昇し、間質性肺炎の若干の増悪化が確認できた。MWNT-7では、複数回の曝露に

より低用量(0.025 mg/kg/day)で有意な MIP-1αの減少が、高用量(0.25 mg/kg/day)では有意な上昇が認められた。病理組織像では高用量で顕著な炎症性細胞の浸潤が確認された。また、Taquannで高度分散化処理したMWNT-7を単回曝露で同様に評価したが、通常分散処理したサンプルとの差別化はできなかった。

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、フローサイトメトリーによる側方散乱光解析では MWCNT-M、-SD1、HTCFNW-L、および-Sは THP-1 マクロファージに曝露するとフローサイトメトリーで側方散乱光 SSC が有意に増加し、細胞への取りこみが示唆された。MWCNT-M、-SD1、HTCFNW-Lは IL-6 および IL-1α分泌を促進し、これらの炎症性サイトカイン産生は、IL-1βの場合と同様に NLRP3 のノックダウンにより抑制されることが示された。

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-7の単回気管内投与試験では、2 回の試験で再現性が得られ、血清および CMC-Na を溶媒として MWCNT を 3 mg/kg 以上の用量で妊娠 9 日の ICR マウスに気管内投与した結果、生存胎児重量および胎児の外表および骨格形成に影響を及ぼすことが分かった。しかし、胎盤における MWCNT の沈着は確認できなかった。一方、反復気管内投与においては、反復気管内投与試験においては、単回気管内投与試験においてマウス胎児の奇形がみられた MWCNT の用量 (3 mg/kg) よりも高用量 (合計で最大 8 mg/kg) を投与しても、外表検査までの結果からは MWCNT の催奇形性は認められなかった。

MWCNT との催奇形性における類似性を検討するためにアスベスト類クロシドライト、クリソタイルおよびアモサイト)の 4mg/kg 体重の腹腔内投与では、外表奇形の発現頻度は、対照群と有意差はなかった。しかし、投与量を 40mg/kg 体重にすると、クロシドライト投与群で着床数中の生存胎仔の割合の低、クリソタイル投与群およびアモサイト投与群で早期死胚を有する母体の頻度が有意に増加した。また、アモサイト投与群で外表奇形および骨格奇形が、クロシドライト投与群およびクリソタイル投与群でも脊柱の癒合を主とする骨格奇形が有意に発現した。

D. 考察

H24 年度は、高度に分散処理 (Taquann 法)した MWCNT (10 μ g/animal)を単回腹腔内に投与することにより、単離 MWCNT 繊維が重量当たりで、分散処理する前の 20 倍濃縮されていることを示唆した。今年度は、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、中皮腫の発生を確認することができ、基本的な発症メカニズムは p53 \pm マウスと野生型マウスに違いの無いことを示唆した。一方、陽性対照クロシドライトでは 50 週までに中皮腫の発生は、認められていない。本研究で投与した繊維数は、総 CNT 本数は約 3×10^7 本/動物、クロシドライトは約 9×10^7 本/動物であり、MWCNT は重量においても、繊維数においてもクロシドライトよりも中皮腫誘発能が高いと考えられた。MWCNT は、frustrated phagocytosis を引き起こす長い繊維が多く含まれていることが考えられたが、

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。

MWCNT の経気管反復投与実験において、腹腔内投与よりも頻度は低いが気管投与でも中皮腫誘発性を有することが確認された。しかし、今回、経気管投与用に調製した分散液中の MWCNT-7 繊維サイズの分布は、繊維長が 1-4 μ m 以下が 95.8%、5 μ m 以上が 4.2%と既報の腹腔内投与に用いた MWCNT より繊維長の短いものであったことから。今回の試験で呼吸器系上皮及び体腔膜上皮の反応が想定される反応より、弱かった理由としては、投与試料として調整した MWCNT のサイズが短くなっていた可能性がある。

中皮腫誘発性に関する血清中蛋白の発現差異解析から、長さおよび径の相対的に大きな構造をもつ WWCNT が、小さな構造を持つ MWCNTD-2 投与に比較して、血清中のタンパク質の発現変動に与える影響が大きかった。このことは、MWCNT のラット投与後 50 週前後で、結節や中皮腫などの病理変化が全身性の病態変化を引き起こした結果と考えられる。しかし今回同定されたタンパク質と中皮腫発症との関連性については今後の課題である。

MWCNT の細胞分裂に及ぼす影響を染色体可視化した細胞にて検討した結果、比較的長い MWCNT (約 20 μ m 以上) は、細胞分裂時にサイトキネシスを抑制し、二核細胞を形成させ、その毒性作用機序は青石綿のそれと類似していることが示された。

C60-C702 成分ナノウイスカーの作成検討では C70 の添加量が増加すると、C70 はフラレン分子の脱溶媒和反応を促進すると共に C70 分子による固溶硬化を誘発する効果も求

められ、より強固なナノウィスカーの作成が期待できると考えられた。

アナターゼ二酸化チタンは、特に光度度を調整しない実験条件下では組織・細胞毒性、細胞増殖作用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、昨年度報告した MWCNT 暴露の初期の変化では T 細胞分化やサイトカイン産生に影響が見られたが、今年度得られた長期暴露実験の結果より、末梢免疫細胞への影響は M1 マクロファージ分化への促進が確認された。また、自己免疫疾患モデルへの MWCNT の暴露では自己抗体産生に影響がある可能性が示され、このことは免疫制御システム全体への影響を評価する上で重要な所見であると考えられた。

感染免疫系への影響として MWNT-7 および SD-1 をマウスに曝露した後の感染性に及ぼす影響を検討する実験では、MIP-1 α など BALF 中の肺炎マーカーの変動を肺の病理組織学的な検証から、炎症細胞の浸潤など増悪化を確認し、これらのケモカインが重要な影響指標と考えられた。MWNT-7 の複数回曝露では、このマーカーが二相性の変動を示し、*in vitro* 培養マクロファージ細胞などを利用して生理的な意義や増悪化への寄与などを検証する必要がある。今後、Taquann サンプルの複数回曝露による感染影響も検討する必要があると考えられた。

THP-1 マクロファージを用いた *in vitro* 試験検討結果において、MWCNT は大きさと形状により細胞への取りこみが異なること、

HTCFNW は長さに関わらず細胞に取り込まれるが、IL-1 β 産生促進には大きさが関係することを見いだした。これらのナノファイバー類は炎症性サイトカイン IL-1 α および IL-6 の産生も Nod 様受容体 NLRP3 依存的に増強しており、炎症性の遷延化との関わりが推定される。

ナノマテリアルの催奇形性に関する検討において、MWCNT の単回気管内投与試験では、母動物の体重低下、肺の炎症、および血液中の細胞組成の変化がみられているものの、MWCNT の胎盤への沈着は確認されなかったことから、胎児における奇形発現は、MWCNT の気管内投与による母動物の肺の炎症等による二次的な影響による可能性が示唆された。また、単回気管内投与と反復気管内投与で催奇形性に違いがみられた原因としては、1 回に投与する MWCNT の用量の差が考えられる。繰り返し少量の MWCNT を投与し、結果として大量に体内に蓄積するよりも、一度に大量の MWCNT を投与する方が、投与に伴う肺の炎症反応が大きく、それに起因して胎児の奇形が発現することが考えられた。

さらに、MWCNT 類似物質として試験した 3 種のアスベスト(クロシドライト、クリソタイルおよびアモサイト)の 40mg/kg 体重の腹腔内投与でも、H23 年に報告した M 社製 MWCNT-7 や H24 年に報告した N 社製 MWCNT を投与した実験と同様の奇形が認められた、その発現用量は MWCNT に比べると、はるかに高用量によるものであったが、アスベストにも催奇形性作用のあることが確認されると共に、M 社製 MWCNT や N 社製 MWCNT との発現する奇形の類似性を考えると、奇形発現要因の一つには繊維本数や繊維長との関連も示唆された。今後は、繊維長や分散性の異なる

CNT においても検討を加えていく必要があると考えられた。

最終年度は、これらの知見を元に、*in vitro* 系も活用しながら、分子生物学的解析技術を用いて詳細な病理解析や曝露・観察期間の及ぼす影響を検討しつつ、トリガーとなる分子機構や、毒性発現メカニズムに関する知見を収集し、将来的な試験法改正やスクリーニング手法開発に向けての基盤情報を取得することを目的とする。

E. 結論

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て、発がん性を含む慢性影響、免疫システムへの影響、次世代への発達に関する影響に焦点を当てた研究体制を取っている。25 年度は、慢性影響として、野生型マウスへの MWCNT 単回腹腔内投与において、p53^{+/+}マウスと同様の中皮腫誘発性を確認し、MWCNT による 52 週間経気管反復投与でも、頻度は低いが中皮腫誘発性を有することが確認された。MWCNT の発がんメカニズムに関しては、サイトキネシス障害による二核細胞化の引き金であることを確認した。光活性の異なる粒子形状をもつナノサイズ酸化チタンにおけるラット肺胞上皮・間質細胞に対する増殖活性等の比較検討では、その強さと表面構造との間にそれほどの関連性が示されなかった。免疫システムに対する検討としては、単回曝露長期観察により M1 マクロファージ分化への促進と、自己免疫疾患モデルを用いた実験により、自己抗体産生に影響がある可能性が示された。RS ウィルス感染性に及ぼす MWCNT 曝露の影響については、通常分散および Taquan 法処理した MWCNT -7 において、肺洗浄液

中のケモカイン上昇と肺炎の増悪化が示唆された。*in vitro* 解析では、NLRP3 依存的な IL-6 および IL-1 α 分泌の促進が、繊維長の長いカーボンウィスカーで引き起こされることが示された。③次世代への影響としては、MWCNT-7 の単回気管内投与試験)において催奇性の再現性が得られたが、反復気管内投与試験では催奇性は認められず、一度の大量投与に起因した奇形誘発性が推定された。さらに、アスベストの大量腹腔内投与においても催奇形性作用のあることが確認され、奇形発現要因として、繊維長や繊維本数との関連も示唆された。

F. 健康危機情報

該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

Numano T, 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)
- Ohba T., Sagawa E., Suzuki Y., Yamamura H., Ohya S., Tsuda H., and Imaizumi Y. Enhancement of Ca²⁺ 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.
- Kumiko Shimizu, Reiji Kubota, Norihiro Kobayashi, Maiko Tahara, Naoki Sugimoto, Tetsuji Nishimura, Yoshiaki Ikarashi: Cytotoxic Effects of Hydroxylated Fullerenes in Three Types of Liver Cells. *Materials*, 6(7), 2713–2722 (2013).
- Stefan Pfuhler, Rosalie Elespuru, Marilyn Aardema, Shareen H. Doak, E. Maria Donner, Masamitsu Honma, Micheline Kirsch-Volders, Robert Landsiedel, Mugimane Manjanatha, Tim Singer, James H. Kim, Genotoxicity of Nanomaterials: Refining Strategies and Tests for Hazard Identification. *Environment Mol. Mutagen.* 54, 229-239 (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*, 38[4]:517-520. (2013)
- 広瀬明彦, ナノマテリアルの健康影響評価指針の国際動向, *薬学雑誌*, 133 (2), 175-180. (2013)
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), Lecture from organizer (2013.10, Nagoya)
- 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, Nagoya)
- 菅野 純、ナノマテリアル安全性評価の進捗—発がん性に関わる知見を中心に—、第20回 がん予防学会、2013年7月、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曝露吸入システムの開発、第40回 日本毒性学会学術年会、2013年6月、千葉、シンポジウム
- 二口充, 徐結荷, 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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) CCL3 as a serum biomarker bfor asbestos exposure and possible biomarker for malignant mesothelioma, The 72th Annual Meeting of the Japanese Meeting of Cancer Association, Yokohama
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 小林憲弘, 沼野琢旬, 中島弘尚, 河部真弓, 久保田領志, 広瀬明彦: 妊娠マウスを用いた気管内投与による多層カーボンナノチューブの生殖・発生毒性の評価, 第40回日本毒性学会学術年会 (2013. 6.17 千葉県千葉市).
- Norihiro Kobayashi, Takamasa Numano, Reiji Kubota, Yoshiaki Ikarashi, Akihiko Hirose: Developmental toxicity assessment of multi-wall carbon nanotubes in pregnant mice after intratracheal instillation. 53rd Annual Meeting of the Society of Toxicology (SOT 2014) (2014.3.24 Phoenix, AZ, USA).
- Nishimaki-Mogami, T., Cui, H., Wu, W., Okuhira, K., Naito, M., Nishimura, T., Sakamoto, Y., Ogata, A., Maeno, T., Inomata, A., Nakae, D., Miyazawa, K., Hirose, A. High-temperature calcined fullerene nanowhiskers and multi-wall carbon nanotubes have abilities to induce IL-1beta secretion through NLRP3-dependent mechanism, depending on their lengths. EUROTOX 2013 (9.3) (Interlaken, Switzerland)
- 橋口誠子、吉田裕樹、徳田健治、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によるRSウイルス感染免疫への影響、第61回日本ウイルス学会学術集会、2013.11.10, 大阪、ポスター P1-032
- 橋口誠子、吉田裕樹、徳田健治、紺野克彦、明石 敏、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によるRSウイルス感染免疫への影響、日本薬学会第134年会、2014.2.28, 熊本、ポスター 28pmS-064
- Yamada K, Iwasa A, Kondo T, Kurosawa M, Arakaki R, Yamada A, Kudo Y, Taquahashi Y, Takagi A, Kanno J, Ishimaru N: In vivo effect of multi-wall

- carbon nanotubes on immune system.
6th International Symposium on
Nanotechnology, Occupational and
Environmental Health. Nov. 2013
Nagoya
今野俊生, 若原孝次, 宮澤薫一, “C60-C70
成分ナノウイスカーの合成”, ナノファイバー
学会第4回年次大会講演予稿集, P.26,
2013年7月5日, つくば
- D. Matsuura, C. Hirata, T. Konno,
T. Wakahara, K. Miyazawa, T. Kizuka,
“In Situ Transmission Electron
Microscopy of Bending Process of
C60/C70 Nanowhiskers”, Abstracts of
APPC12, The 12th Asia Pacific Physics
Conference, pp. 865-865, 2013年7月
14-19日, 千葉
- T. Konno, T. Wakahara and K. Miyazawa,
"Synthesis and Structural Analyses of
C60-C70 Two-Component Fullerene
Nanowhiskers", Abstracts of 23rd
Annual Meeting of MRS-Japan 2013,
P.J-O9-006, Dec. 9-11, 2013, Yokohama
Port Opening Plaza, Yokohama
- Kun'ichi Miyazawa, Chika Hirata, Toshio
Konno, Takatsugu Wakahara, Ryosuke
Kano, Masaru Tachibana, "Synthesis of
C60-C70 two-component fullerene
nanowhiskers by LLIP method",
nanoeh6abs program, P.28-28, 6th
International Symposium on
Nanotechnology, Occupational and
Environmental Health, Nagoya
Congress Center, October 28 - 31, 2013,
Nagoya
今野俊生, 若原孝次, 宮澤薫一, “C60-C70
成分ナノウイスカーの合成と構造解析”, 日
本物理学会講演概要集, 第68巻第2号第
4分冊, P.740, 2013年秋季大会, 2013年
9月25日~9月28日, 徳島
松浦大輔, 今野俊生, 若原孝次, 宮澤 薫一,
木塚徳志, “C60/C70 合金ナノウイスカーの
ヤング率の組成依存性”, 2014年春期講演
大会(第154回)日本金属学会講演大会概
要集, P.22, 2014年3月21日~23日, 東
京
Akihiko Hirose, Norihiro Kobayashi,
Tomoko Fujitani, Yoshimitsu Sakamoto,
Yasuo Yoshioka, Yasuo Tsutsumi,
Hiroyuki Tsuda, Jun Kanno :
Nanotoxicity and nano safety science in
various exposure scenarios.
(Symposium invited) EUROTOX2013
(2013.9, Switzerland, Interlaken)
Akihiko Hirose, Norihiro Kobayashi,
Mayumi Kawabe*1, Hironao
Nakashima*1, Takamasa Numano*1*2,
Reiji Kubota, Yoshiaki Ikarashi:
Developmental toxicity by
intratracheal instillation of multi-wall
carbon nanotubes in pregnant mice.
6th International Symposium
Nanotechnology, Occupational and
Environmental Health (2013.10,
Nagoya)
坂本義光, 小縣昭夫, 湯澤勝弘、久保喜一、
安藤弘、長澤明道、高橋博、矢野範男、西
村哲治, 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30回 日本毒性病理学
会 2014. 1. 徳島

坂本義光, 小縣昭夫, 猪又明子, 西村哲治,
広瀬明彦, 中江 大“繊維長の異なる多層カーボンナノチューブによるラット中皮腫誘発性の検討”第 40 回日本毒性学会 2013.6, 幕張

藤谷知子, 安藤弘, 久保喜一, 猪又明子, 小縣昭夫, 広瀬明彦, 西村哲治, 中江大: マウスにおけるナノマテリアルの催奇形性に関する研究。第 40 回日本毒性学会学術年会、2013, 6,17-19, 幕張

山本行男, 坂本義光, 大貫文, 猪又明子, 小縣昭夫, 広瀬明彦, 中江大: 多層カーボンナノチューブ (MWCNT) 投与による中皮腫誘発ラットにおけるプロテオーム解析 (第三報): 形状の異なる MWCNT 投与ラットにおける血清タンパク質の発現変動。第 86 回日本生化学会大会、2013, 9,11-13, 横浜

Sakamoto Y, Ogata A, Nishimura T, Hirose A, Nakae D. Induction of mesothelioma by an intraperitoneal administration of 7 different manufactured multi-wall carbon nanotubes. 72 th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association ; Yokohama, 2013,10

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得 (出願中)
(該当なし)
2. 実用新案登録
(該当なし)
3. その他
(該当なし)

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)

Ⅱ. 分担研究報告書

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）
分担研究報告書

研究課題: 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）

分担研究課題名：ナノマテリアルの慢性影響指標の開発に関する研究

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
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
研究協力者： 高橋 祐次 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 主任研究官

研究要旨

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。先行研究において、多層カーボンナノチューブ（MWCNT）をアスベスト中皮腫発癌に高い感受性を示す p53+/-マウス腹腔内投与モデルに適用して評価し、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。その際、中皮腫の誘発には散在性の MWCNT 孤立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、他方、凝集した MWCNT 繊維塊を取り囲む類上皮細胞肉芽種及びその線維化瘢痕形成は中皮腫発癌に寄与しないことが示唆された。ナノマテリアル検体の分散状況が毒性強度、性質に大きく寄与することが判明したことから、我々は MWCNT を例に、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、研究を進めた。H24 年度は、Taquann 法処理検体を用い、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 値の関係を明らかにすることを兼ね、10 μ g/動物の Taquann 法処理 MWCNT（T-CNT）を p53+/-マウス腹腔内に単回投与する実験を行った。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、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、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、散在した繊維を貪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。

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の実験を行った。その結果、T-CNT 10 μ g/動物の単回腹腔内投与により、野生型マウスにおいても中皮腫が誘発されることを確認した。p53+/-マウスに単回腹腔内投与した実験の中皮腫発癌の初発時期は 134 日、野生型マウスでの初発時期は 204 日であった。何れも、文献で報告されている Crocidolite の