

201424009A

厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク研究事業

ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法に関する総合研究
- 全身暴露吸入による毒性評価研究 -
(26-化学 - 一般 - 003)

平成27年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 今井田 克己

平成28(2016)年3月

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法に関する総合研究

- 全身暴露吸入による毒性評価研究 -

(26-化学 - 一般 - 003)

平成27年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 今井田 克己

平成28(2016)年3月

厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク研究事業

ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法に関する総合研究

- 全身暴露吸入による毒性評価研究 -

(26-化学 - 一般 - 003)

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 今井田 克己

平成28(2016)年3月

研究報告書目次

目 次

I. 総括研究報告書

ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法に関する総合研究

- 全身暴露吸入による毒性評価研究 -

今井田 克己 1

II. 分担研究報告書

1. ナノマテリアル吸入暴露による病理組織学的評価 (免疫組織学)

今井田 克己 11

2. ナノマテリアル吸入暴露実験及び組織負荷量の研究

高橋 祐次 21

3. 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 39

4. 多層カーボンナノチューブの吸入暴露で誘発された肺毒性のメカニズム研究

相磯 成敏 57

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 81

IV. 研究成果の刊行物・別刷 82

I. 総括研究報告書

平成27年度厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業
総括研究報告書

ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法に関する総合研究
-全身暴露吸入による毒性評価研究 -

研究代表者 今井田 克己

香川大学医学部医学科腫瘍病理学 教授

研究要旨

本研究の目的は、ナノマテリアルの毒性評価を人の現実的な暴露経路である全身暴露吸入試験法を用いて実施すること、及び、吸入により惹起される病変の詳細分析により評価基準を策定することにある。ナノマテリアルは多くの産業に貢献する革新的な基盤技術としてその応用が急速進展する中、製造者及び製品利用者の健康被害防止のために並行して進められるべき有害性評価は十分ではない。ナノカーボン技術で先駆的役割を果たしている日本において、国際競争力を保持しつつナノマテリアルの継続的な進展のためにも、基礎的定量的な毒性評価の確立が急がれる。従来、粉体の吸入暴露実験には、検体毎に粉塵発生装置の開発が必要であり、時間と費用を要することから、多種に及ぶナノマテリアルの評価に気管内投与等の簡便法が多く用いられてきた。しかし、人が吸入することが想定されるナノマテリアルの分散状態と異なること、そのために惹起される肺病変の質が異なるとの指摘があった。すなわち、ナノマテリアルは容易に凝集体を形成し、原体を投与すると凝集体による毒性病変が誘発され、ナノ粒子の毒性を必ずしも反映しないことが指摘されてきた。本研究班では、先行研究 [H20-化学一般-006] において中皮腫発癌性を明らかにした MWCNT を事例対象として、高度分散法(Taquann 法)及び、それをエアロゾル化する Taquann 直噴全身吸入装置を独自開発した。Taquann 法処理を行った MWCNT (T-CNT)を吸入暴露したマウスの肺では、凝集体/凝固体を含む原末(U-CNT)とは異なり、肉芽種性病変を欠き、単繊維による均一で広範囲な病変が誘発され、その一部は胸腔に達し壁側胸膜面に中皮腫発癌を示唆する顕微鏡的病変を誘発することを確認した。本手法は種々のナノマテリアル検体に適用可能な汎用性を備え、かつ、少ない検体量で吸入試験の実施が可能である。本研究はこの新システムによる吸入試験を用いる点を特徴としている。具体的には、ナノマテリアルの中で産業応用が進んでいる各種 MWCNT、酸化チタン、ナノセルロースについて、マウス(野生型、p53+/-、MRL/lp)及びラットを使用して吸入試験を行い、体内動態、病理組織学的評価(光顕、電顕、免疫染色)、免疫系機能評価等を計画的経時解析により、組織病変の同定、急性から慢性への経時変化、及びそれらに先行する機能的変化の検出を試みる。初年度から現在までに、マウスを用いた MWCNT (MWNT-7、三井物産)の吸入試験を実施し、T-CNTとU-CNT吸入暴露による肺組織負荷量の測定と比較、p53+/-マウスの肺の病理組織評価、野生型マウスの免疫系の影響評価を行った。並行して、ラットを用いた MWCNT 原末の吸入試験による肺病理組織評価を実施した。T-CNTとU-CNTの吸入暴露における肺組織負荷量の比較実験成績から、吸入暴露試験においても、検体の分散状態、凝集体・凝固体の有無が、少なくとも肺負荷量に影響を与えることを示した。ヒトに比較して細い気道径を有するマウスを用いた動物実験では、凝集体・凝固体によるこの様な影響が大きいことが推察されるため、実験動物を使用してヒトへの外挿性の高いデータを得るためには、凝集成分を除去した上で分散性に優れた検体を使用する必要がある。肺の病理組織像で

は、MWCNT はマクロファージに取り込まれた状態、あるいは繊維単独で沈着しているが、MWCNT を取り込んだマクロファージの周辺に炎症性の変化をもたらすと考えられた。細気管支や肺胞表面で幼若上皮細胞の増生、器質化による MWCNT の埋め込み、II 型肺胞上皮細胞の増生が認められ、肺胞構造の再構築過程での肺がん発生が示唆された。この結果は、免疫制御システムへ影響評価において、M1 マクロファージへの分化偏向が認められ iNOS の発現が上昇していることから、持続的な炎症が生じている可能性が示唆されたことから支持される。本研究は、人で想定される暴露経路に即した毒性情報を得ることで、毒性未知の新規ナノマテリアルの吸入毒性評価を遺漏なく、迅速且つ比較的安価に実施することが可能となることが期待される。

研究体制

研究代表者

今井田克己 香川大学医学部医学科 病態病理 生態防御医学講座 腫瘍病理学 実験病理学 教授

研究分担者

相磯 成敏 中央労働災害防止協会・日本バイオアッセイ研究センター・病理検査部 部長

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

高橋 祐次 国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・毒性部 室長

A. 研究目的

本研究の目的は、工業的に大量生産されるナノマテリアル（以下、ナノマテリアル）の毒性評価を、人で想定される現実的な暴露経路である全身暴露吸入毒性試験法（以下、吸入試験）を用いて実施すること、及び、吸入により惹起される病変の詳細分析により評価基準を策定することにある。

ナノマテリアルは多くの産業に貢献する革新的な基盤技術として注目されており、製品開発への応用が急速に進展している。一方で、製造者及び製品利用者の健康被害防止のために並行して進められるべき有害

性評価はそれに比較すると十分ではない。

ナノカーボン技術で先駆的役割を果たしている日本において、国際競争力を保持しつつナノマテリアルの継続的な進展のためにも、人へ外挿性の高い基礎的定量的な毒性評価の確立が急がれる。

ナノマテリアルに限らず、従来、粉体の吸入暴露実験は、検体毎に粉塵発生装置の開発と工夫が必要であり、時間と費用を要することから大規模な実験施設に限られてきた。そのため、多種に及ぶナノマテリアルの評価に気管内投与等の簡便法が多く用いられてきた。しかし、人が吸入することが想定されるナノマテリアルの分散状態と異なること、そのために惹起される肺病変の質が異なるとの指摘があった。すなわち、ナノマテリアルは容易に凝集体を形成し、ナノマテリアル原体を投与すると凝集体による毒性病変が誘発され、個々のナノ粒子の毒性を必ずしも反映しないことが指摘されてきた。

そこで、本研究班では、先行研究 [H23-化学一般-005] において凝集体/凝固体を除去し高度に分散した乾燥検体を得る方法 (Taquann 法) 及び、それをエアロゾル化するカートリッジ直噴式ダスト発生装置 (Taquann 直噴全身吸入装置) を独自に開発し、国立医薬品食品衛生研究所 環境保全型動物飼育棟内 (26 号館) に設置した。この際に事例対象とした検体は、先行研究

[H20-化学-一般-006] において中皮腫発癌性の検討に用いた多層カーボンナノチューブ (MWCNT) であるが、本システムは原理的に他のナノマテリアルに適応可能な汎用性も備え、かつ、少ない検体量で吸入試験の実施が可能である。本研究では、ナノマテリアルの中で産業応用が進んでいる各種 MWCNT、酸化チタン、ナノセルロースについて、マウス (野生型、p53+/-、MRL/lp) を用いて評価を行う計画である。

本研究の特色は、独自開発のシステムによる吸入試験を用い、組織負荷量、病理組織学的評価 (光顕、電顕、免疫染色)、免疫系機能評価にわたり、計画的経時解析により、腫瘍性及び非腫瘍性の組織病変の同定、それらの形成に関連する病態の急性から慢性への経時変化、及びそれらに先行する機能的変化の検出を試みる点である。

初年度から現在までに、マウスを用いた Taquan 法処理 MWCNT (MWNT-7、三井物産) の吸入試験を実施し、T-CNT と U-CNT 吸入暴露による肺組織負荷量の測定と比較、p53+/-マウスの肺の病理組織評価、野生型マウスの免疫系の影響評価を行った。並行して、ラットを用いた MWCNT 原末の吸入試験による病理組織評価を実施した。

B. 研究方法

B-1. マウス全身暴露吸入試験と組織負荷量の測定

マウスの吸入試験では Taquann 直噴全身吸入装置を用い、対照群、低用量群 (1mg/m³)、高用量群 (2mg/m³) の構成で 1 日 2 時間、合計 10 時間の吸入試験を実施した。

Taquann 法処理を行った検体を Taquann 直噴全身吸入装置によりマウス (系統; C57BL/6NcrSlc、野生型、p53+/-) に対照群、低用量群 (1mg/m³)、高用量群 (2mg/m³) の構成で 1 日 2 時間、合計 10 時間の吸入試験を実施した。長期観察と計画的定期解剖を行い

各研究分担者に生体試料を供給した (高橋)。

並行して MWCNT の原末 (U-CNT) と、Taquann 法により凝集体・凝固体を除去し高分散状態とした検体 (T-CNT) を、マウスに質量濃度を約 2mg/m³ の同等の条件で全身暴露吸入し、肺に沈着した繊維の量と長さを経時的に測定し比較した。(高橋)。

B-2. ナノマテリアル吸入暴露による病理組織学的評価 (マウス)

ナノマテリアルを吸入させたマウスの肺上皮の変化や増殖性病変を International Harmonization of Nomenclature and Diagnostic Criteria (INHAND) に従った病理組織学的評価を行った。

病理組織学的評価は HE 染色標本を作成し、通常の光学顕微鏡を用いて行った。極小の針状構造物である T-CNT は通常の光学顕微鏡では観察しにくく、その存在が捉えにくいため、偏光顕微鏡による観察も合わせて行った。さらに、SP-C、CC10、CD68、CD3、calretinin による免疫組織化学染色を行い、HE 染色標本の組織構築と免疫組織学的特性について比較検討し、増殖性の腫瘍性病変の発生母地の評価、組織球系細胞の浸潤様態を評価した (今井田)。

B-3. ナノマテリアル吸入暴露による病理組織学的評価研究 (ラット)

MWCNT の肺発がん機序についてより詳細な検討を進めるため、ラットの吸入試験を、OECD 化学物質テストガイドライン 451 (がん原生試験) に GLP 対応した試験実績がある日本バイオアッセイ研究センター (JBRC) にて実施し、肺発がん MOA を解明する一端として、昨年度の吸入暴露実験を実施し、採材して保存した肺のサンプルに対して詳細な病理組織学的検査を実施し、気道や肺胞の上皮

に生じる組織反応と肺胞壁を經由する MWNT-7 の体内移行の実態を調べた。

吸入暴露実験は、雄性 F344/DuCrIj ラットを使用し、乾式篩分け分級機構を組み込んだ大規模吸入施設で、JBRC による発がん性試験と同じ 0、0.2、2 mg/m³ の濃度で 1 日 6 時間の暴露を実施した。暴露期間は最長で 4 週 (6 時間/日、5 日/週) とした。また実験開始から 3 ヶ月で屠殺する回復群を併設した。

保存した肺のサンプルに対して詳細な病理組織学的検査を実施し、気道や肺胞の上皮に生じる組織反応と肺胞壁を經由する MWNT-7 の体内移行の実態を調べた。具体的には、定法に従ってパラフィン包埋により肺の HE 標本、免疫組織化学染色 (CD-68、RM-4、SP-C、CC-10、Vimentin)、超微細形態学的検索を実施した。MWNT-7 の光学顕微鏡観察においては偏光装置を利用した。(相磯)。

B-4. ナノマテリアルの免疫制御システムへの影響評価研究

マウスを用い、ナノマテリアルを吸入後の各種免疫担当細胞の分画の変化を経時的に観察するとともに、吸入後長期間での免疫システムへの影響を多角的なアプローチにより解析した。具体的には、対照群、低用量群 (1 mg/m³)、高用量群 (2 mg/m³) の構成で 1 日 2 時間、合計 10 時間の吸入試験を実施した野生型 C57BL/6 マウスを対象に、経時的なフローサイトメリー解析、病理組織解析、蛍光色素標識抗体による共焦点顕微鏡解析及び定量化 RT-PCR 法による解析を実施した。組織のサンプリングは吸入暴露後 6 箇月及び 12 箇月に実施した。

フローサイトメリー解析では、頸部リンパ節、脾臓、肺胞洗浄液から採取した単核球を対象に、CD4、CD8、CD19、CD11b、CD11c、F4/80、CD206、CD44、CD62L に対する抗体にて染色しそれらの発現を解析した。病理組

織解析では、パラフィン包埋標本の HE 標本を観察した。共焦点顕微鏡解析では、肺組織の凍結切片を作成し、F4/80、CD206 に対する抗体染色及び DAPI にて核染色を行い、解析した。定量化 RT-PCR 法解析では、肺、脾臓から抽出した mRNA を対象とし、F4/80、MCP-1、CCR2、iNOS、CD206、Arginase-1 及び β -actin の発現を調べた。

倫理面への配慮

本研究における動物実験の使用は、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、動物の愛護及び管理に関する法律 (昭和 48 年法律第 105 号、平成 17 年法律第 68 号一部改正)、実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準 (平成 18 年環境省告示第 88 号)、厚生労働省の所轄する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針 (平成 18 年 6 月 1 日付厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知)、動物実験の適正な実施に向けたガイドライン (平成 19 年 6 月 1 日日本学術会議)、遺伝子組換え生物等の使用等の規則による生物多様性の確保に関する法律 (平成 15 年法律第 97 号) 及び所属の研究機関が定める規定 (香川大学では香川大学動物実験委員会が定める香川大学動物実験規則 (平成 19 年 2 月 1 日)、国立医薬品食品衛生研究所では国立医薬品食品衛生研究所動物実験委員会が定める国立医薬品食品衛生研究所・動物実験の適正な実施に関する規程 (平成 19 年 4 月 1 日)、日本バイオアッセイ研究センターでは日本バイオアッセイ研究センターの動物実験委員会が定める動物実験等に関する規定 (平成 24 年 4 月 25 日)、徳島大学では徳島大学動物実験管理規則 (平成 24 年 3 月 21 日)) を遵守した。動物実験については、動物愛護に関する法律、基準、指針及び所属研究機関が定める動物実験に関する規定、指針を遵守した。

C. 研究結果

C-1. 全身暴露吸入試験と組織負荷量の測定

U-CNTとT-CNTを質量濃度が約2mg/m³の同等の条件で暴露を行ったがMWCNTの肺負荷量の平均値は、T-CNT群ではDay0、Day7及び13Wにおいてそれぞれ、8.2 µg/動物、4.4 µg/動物、1.4 µg/動物であるのに対し、U-CNT群では4.3 µg/動物、1.6 µg/動物、1.2 µg/動物と、肺に到達する量がU-CNT吸入では半減していた。これに呼応し、鼻腔粘膜に実体顕微鏡で観察可能な黒色の凝集体・凝固体の沈着がU-CNT吸入マウスに多く観察された。肺内の繊維長の平均はU-CNT、T-CNT共に約7 µm、最大約40 µmで差はなかった。肺負荷量が半減した原因の一つとして、U-CNTでは鼻腔内に多く補足された可能性が考えられた。

C-2. ナノマテリアル吸入暴露による病理組織学的評価(マウス)

免疫染色による評価では、CD68、CC10、sSP-Cの抗体を用いた評価のほか、CD3によるリンパ球の評価、ならびにcalretininによる中皮細胞の特定を試みた。26週後並びに52週後の肺では carcinoma in adenoma が認められ、adenoma 成分ではSP-C抗体が強陽性を示す一方で、carcinoma 成分ではSPC抗体は弱陽性であった。なお、CC10は、adenoma成分、carcinoma成分のいずれにおいても陰性であった。また、52週後の動物では、胸壁の壁側胸膜にリンパ球の集簇像や中皮細胞の増殖像を認めたが、限局的なものであった。

C-3. ナノマテリアル吸入暴露による病理組織学的評価研究(ラット)

肺内に吸引されたMWNT-7に対する異物処理機構として細気管支や肺胞表面で幼若上皮細胞の増生と器質化組織中への

MWNT-7の埋め込み、これに伴う増生したII型肺胞上皮細胞からI型肺胞上皮細胞への変化、毛細血管の新生など肺のガス交換機能の確保を目的とした肺胞構造の再構築が示唆された。一般に考えられている肺胞壁を経由するMWNT-7の体内移行が行われている証拠は認められず、肺内に吸引されたMWNT-7の処理機構として新たな仮説を提案した。MWNT-7による肺発がんには、異物処理機構での2型肺胞上皮細胞の増生との係わりが疑われた。

C-4. ナノマテリアルの免疫制御システムへの影響評価研究

MWCNTを吸入後1箇月では、気管支あるいは肺胞腔内にマクロファージの集簇が見られ、肺組織でのF4/80遺伝子の発現の亢進が確認されたが、M1及びM2への分化を示す遺伝子の発現に偏りはなかった。

肺胞マクロファージはF4/80⁺CD11b^{low}を示すことが知られ、加齢的に減少する一方で、T-CNT暴露によってその分画は増加することが判明し、さらに、F4/80⁺CD11b^{high}を示す異常なマクロファージが増加することも明らかになった。加えて、M1及びM2マクロファージ分化パターンをCD192およびCD206を用いて検討すると、脾臓やリンパ節でのM1/M2パターンと異なり、肺胞内ではCD206⁺CD192^{low}を示すマクロファージ分画が多く存在し、T-CNT暴露後12ヶ月で、CD206⁺マクロファージは減少していることがわかった。

6箇月後では、肺胞マクロファージの細胞数は減少し、生存するマクロファージはM1マクロファージへの分化偏向が認められiNOSの発現が上昇していることから、持続的な炎症が生じている可能性が示唆された。さらに、マクロファージ関連遺伝子の発現はT-CNT暴露後12ヶ月で肺組織とともに脾臓でも変化していた。したがって、T-CNTの吸入暴露後の晩発性の影響が肺胞マクロファージの分

化とともに、全身のマクロファージを主体とした免疫システムに影響を及ぼす可能性が示された。

D. 考察

以上のように、初年度から2年目となるH27年度は、マウスを用いた Taquan 法処理 MWCNT (MWNT-7、三井物産)の吸入試験を実施し、T-CNT と U-CNT の肺組織負荷量の比較、p53+/-マウスの肺の病理組織評価、野生型マウスの免疫系の影響評価を行い、並行して、ラットを用いた MWCNT 原末の吸入試験と病理組織評価を実施した。

T-CNTとU-CNTの吸入暴露における肺組織負荷量の比較実験成績から、吸入暴露試験においても、検体の分散状態、凝集体・凝固体の有無が、少なくとも肺負荷量に影響を与えることを示した。ヒトに比較して細い気道径を有するマウスを用いた動物実験では、凝集体・凝固体によるこのような影響が大きいことが推察されるため、実験動物を使用してヒトへの外挿性の高いデータを得るためには、凝集成分を除去した上で分散性に優れた検体を使用する必要がある。

肺の病理組織像では、MWCNTはマクロファージに取り込まれた状態、あるいは繊維単独で沈着しているが、MWCNTを取り込んだマクロファージの周辺に炎症性の変化をもたらすと考えられた。細気管支や肺胞表面で幼若上皮細胞の増生、器質化によるMWCNTの埋め込み、II型肺胞上皮細胞の増生が認められ、肺胞構造の再構築過程での肺がん発生が示唆された。この結果は、免疫制御システムへ影響評価において、M1マクロファージへの分化偏向が認められiNOSの発現が上昇していることから、持続的な炎症が生じている可能性が示唆されたことから支持される。

以上、独自開発のシステムによる吸入試験を用い、組織負荷量、病理組織学的評価(光顕、電顕、免疫染色)、免疫系機能評価と多岐

に亘る評価により、ナノマテリアル暴露による生体影響の基礎的かつ定量的な情報が得られた。

E. 結論

分散性の高いナノマテリアルを吸入させた結果、異物肉芽腫は形成しないが、生体内に長期間留まり持続性の炎症反応を引き起こす可能性を示した。マクロファージが重要な役割を担っており、慢性炎症によって誘発される増殖性の腫瘍性病変の評価をより長期に亘って実施する必要がある。

本研究が使用する Taquan 法と Taquann 直噴式システムは、ナノマテリアルの吸入試験における課題を克服した吸入試験方法である。分散性の高いナノマテリアルを用意し、人体にとって重要であると想定される暴露様式に即した全身暴露吸入を実施することで、事前に毒性情報の存在しない新規のナノマテリアルについての、遺漏のない吸入毒性評価が可能になると期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

Yokohira M, Hashimoto N, Nakagawa T, Nakano Y, Yamakawa K, Kishi S, Kanie S, Ninomiya F, Saoo K, Imaida K. Long-term chronic toxicity and mesothelial cell reactions induced by potassium octatitanate fibers(TISMO) in the left thoracic cavity in A/J female mice. *Int. J. Toxicol.*, 34(4):325-35, 2015.

Yamakawa K, Yokohira M, Nakano Y, Kishi S, Kanie S, Imaida K. Activation of MEK1/2-ERK1/2 signaling during NNK-induced lung carcinogenesis in female A/J mice. *Cancer Med.*, 2016 in press.

Nakano Y, Yokohira M, Hashimoto N, Yamakawa K, Kishi S, Ninomiya F, Kanie S, Saoo K, Imaida K. Rat strain differences in levels and effects of chronic inflammation due to intratracheal instillation of quartz on lung tumorigenesis induced by DHPN. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 66(8):391-401, 2014.

Yokohira M, Yamakawa K, Nakano Y, Numano T, Furukawa F, Kishi S, Ninomiya F, Kanie S, Hitotsumachi H, Saoo K, Imaida K. Immunohistochemical characteristics of surfactant proteins-A, -B, -C and -D in inflammatory and tumorigenic lung lesions of F344 rats. *J. Toxicol. Pathol.*, 27(3-4):175-182, 2014.

Yokohira M, Kishi S, Yamakawa K, Nakano Y, Ninomiya F, Kinouch S, Tanizawa J, Saoo K, Imaida K. Napsin A is possibly useful marker to predict the tumorigenic potential of lung bronchiolo-alveolar hyperplasia in F344 rats. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 66:117-123, 2014

Tatsuya Kasai, Yumi Umeda, Makoto Ohnishi, Hitomi Kondo, Tetsuya Takeuchi, Shigetoshi Aiso, Tomoshi Nishizawa, Michiharu Matsumoto, and Shoji Fukushima. Thirteen-week study of fiber-like multi-walled carbon nanotubes with whole-body inhalation exposure in rats. *Nanotoxicology*, Vol.9, 413-422(2015)

高信健司、相磯成敏、梅田ゆみ、妹尾英樹、齋藤美佐江、片桐卓、伊川直樹、峰多加志、武信、晴佐久満、松本道治、福島昭治。F344/DuCrjCrljラットの自然発生腫瘍。産業衛生学雑誌, Vol.57, 85-96(2015)

Shigetoshi Aiso, Makoto Take, Tatsuya Kasai, Hideki Senoh, Yumi Umeda, Michiharu Matsumoto and Shoji Fukushima. Inhalation Carcinogenicity of Dichloromethane in Rats and Mice. *Inhalation Toxicology*. Vol.26, 435-451(2014)

Hideki Senoh, Taku Katagiri, Kenji Takanobu, Yumi Umeda, Shigetoshi Aiso and Shoji Fukushima. Spontaneous Harderian Gland Adenocarcinoma in a Female F344 Rats: A Case Report. *J. Toxicologic Pathology*. Vol.27, 139-142(2014)

Qi G, Kudo Y, Tang B, Liu T, Jin S, Liu J, Zuo X, Mi S, Shao W, Ma X, Tsunematsu T, Ishimaru N, Zeng S, Tatsuka M, Shimamoto F. PARP6 acts as a tumor suppressor via downregulating Survivin expression in colorectal cancer. *Oncotarget*. 2016 doi: 10.18632/oncotarget.7712. [Epub ahead of print]

Yamada A, Arakaki R, Tsunematsu T, Kudo Y, Ishimaru N. Role of regulatory T cell in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2016 22(7):2195-2205

Saito M, Arakaki R, Yamada A, Tsunematsu T, Kudo Y, Ishimaru N. Molecular mechanisms of nickel allergy. *Int J Mol Sci*. 2016 17(2): e202

Kondo T, Tsunematsu T, Yamada A, Arakaki R, Saito M, Otsuka K, Kujiraoka S, Ushio A, Kurosawa M, Kudo Y, Ishimaru N. Acceleration of tumor growth due to dysfunction in M₁ macrophages and enhanced angiogenesis in an animal model of autoimmune disease. *Lab Invest* 2016 96(4):468-480

Tsunematsu T, Arakaki R, Yamada A, Ishimaru N, Kudo Y. The non-canonical role of Aurora-A in DNA replication. *Front Oncol* 2015 96(4):468-480

Yamada A, Ushio A, Arakaki R, Tsunematsu T, Kudo Y, Hayashi Y, Ishimaru N. Impaired Expansion of Regulatory T Cells in A Neonatal Thymectomy-Induced Autoimmune Mouse Model. *Am J Pathol* 2015 185(11):2886-2897

Yamano T, Nedjic J, Hinteberger M, Koser S, Pinto S, Gerdes N, Lutgens E, Ishimaru N, Busslinger M, Brors B, Kyewski B, Klein L. Intrathymic B cell licensing for Aire expression and T cell tolerance induction. *Immunity* 2015 42(6):1048-61.

Sano T, Iwashita M, Nagayasu S, Yamashita A, Shinjo T, Hashikata A, Asano T, Kushiyama A, Ishimaru N, Takahama Y, Nishimura F. Protection from diet-induced obesity and insulin resistance in mice lacking CCL19-CCR7 signaling. *Obesity* 2015 23(7):1460-71.

Shikama Y, Kudo Y, Ishimaru N, Funaki M. Possible involvement of palmitate in pathogenesis of periodontitis. *J Cell Physiol*. 2015 230: 2981-8

Islam MN, Itoh S, Yanagita T, Sumiyoshi K, Hayano S, Kuremoto KI, Kurosaka H, Honjo T, Kawanabe N, Kamioka H, Sakai T, Ishimaru N, Taniuchi I, Yamashiro T. Runx/Cbfb signaling regulates postnatal development of granular convoluted tubule in the mouse submandibular gland. *Dev Dyn*. 2015 244(3):488-496.

Iwasa A, Arakaki R, Honma N, Ushio A,

Yamada A, Kondo T, Kurosawa E, Kujiraoka S, Tsunematsu T, Kudo Y, Tanaka E, Yoshimura N, Harada N, Hayashi Y, Ishimaru N. Aromatase controls Sjögren's syndrome-like lesions through monocyte chemotactic protein-1 in target organ and adipose tissue-associated macrophages. *Am J Pathol*. 2015 185(1):151-161.

2. 学会発表

Keiko Yamakawa, Masanao Yokohira, Yuko Narusawa, Shohei Kanie, Shota Yoshida, Kousuke Saoo, Katsumi Imaida. Activation of ERK1/2 on DHPN-induced lung carcinogenesis in F344 rats. 32th Annual Meeting of Japanese Society of Toxicologic Pathology. Jan.28, 2016, Takamatsu

The expression of S100A4 in the DHPN-induced lung tumors of rats. Yuko Narusawa, Masanao Yokohira, Keiko Yamakawa, Shohei Kanie, Shota Yoshida, Kousuke Saoo, Katsumi Imaida, 32th Annual Meeting of Japanese Society of Toxicologic Pathology. Jan.28, 2016, Takamatsu.

山川けいこ、鈴木智、成澤裕子、蟹江尚平、横平政直、竿尾光祐、今井田克己、雌性A/JマウスNNK誘発肺腫瘍におけるテストステロンとPTENの関係、第74回日本癌学会学術集会、2015.9

成澤裕子、横平政直、山川けいこ、岸宗佑、蟹江尚平、塩岡忠夫、竿尾光祐、今井田克己、NNK誘発マウス肺腫瘍におけるCD44v6の発現に関する検討、第74回日本癌学会学術集会、2015.9

齋藤美佐江; 酒井俊男; 笠井辰也; 梅田ゆみ; 相磯成敏; 福島昭治、ラット気道上皮に認められた多層カーボンナノチューブに対する異物反応、第47回日本臨床分子形態学会学術集会、長崎大学医学部、2015.9

相磯成敏、高信健司、片桐卓、妹尾英樹、梅田ゆみ、福島昭治、多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の4週間吸入暴露によりラットの肺に沈着したMWCNT処理に係わる病理組織学的変化、第32回日本毒性病理学会学術集会、かがわ国際会議場、2016.1

新垣理恵子、常松貴明、山本安希子、工藤保誠、菅野純、石丸直澄 自己免疫疾患モデルマウスを利用した多層化カーボンナノチューブの免疫システムへの影響 第104回日本病理学会総会 2015.4.30(名古屋)

牛尾綾、新垣理恵子、近藤智之、鯨岡聡子、常松貴明、山田安希子、工藤保誠、石丸直澄 Analysis of macrophages in the pathogenesis of a murine for Sjögren's syndrome第104回日本病理学会総会 2015.5.1(名古屋)

近藤智之、常松貴明、鯨岡聡子、牛尾綾、山田安希子、新垣理恵子、工藤保誠、石丸直澄 自己免疫疾患モデルを用いた腫瘍増殖制御機構の解明 第104回日本病理学会総会 2015.5.2(名古屋)

石丸直澄 シェーグレン症候群疾患モデルを用いた病態機序に関する多角的研究 第24回日本シェーグレン症候群学会総会 シェーグレン症候群学会賞受賞講演 2015.9.18 東京

Ishimaru N. Molecular Pathogenesis of Sjögren's Syndrome. 7th Meeting of Asian

Society of Oral and Maxillofacial Pathology Oct 17, 2015, Taipei

Ishimaru N. Molecular Pathogenesis of Autoimmunity~Sjögren's Syndrome~ Academy of Immunology and Microbiology Series Seminar Special Symposium Oct 28, 2015, Pohang, Korea

Kurosawa M, Yamada A, Arakaki R, Saito M, Tsunematsu T, Kudo Y, Ishimaru N. Migratory activity of memory T cells in aly/aly mice. 第44回日本免疫学会学術集会 2015.12.18(札幌)

Arakaki R, Kurosawa M, Otsuka K, Yamada A, Saito M, Tsunematsu T, Kudo Y, Ishimaru N. Analysis of function of macrophages in murine models of Sjögren's syndrome. 第44回日本免疫学会学術集会 2015.12.19(札幌)

Saito M, Arakaki R, Otsuka K, Yamada K, Kudo Y, Ishimaru N. Biological effect of multi-walled carbon nanotubes on immune system. 第44回日本免疫学会学術集会 2015.12.18(札幌)

Jun Kanno, Important attributes of nanomaterials in predicting their long-term effects: In vivo studies, 7th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health (NanOEH 2015), (2015.10.21), South Africa, Symposium

Yuhji Taquahashi, Yukio Ogawa, Koichi Morita, Masaki Tsuji, Atsuya Takagi and Jun Kanno, Lung burden and length distributions of MWCNT

following 5 times of 2 hours inhalation exposure to p53+/- mice and a 52 weeks post-exposure period, 7th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health (NanOEH 2015), (2015.10.21)South Africa, Oral

菅野 純、高橋祐次、高木篤也、小川幸男、広瀬明彦、石丸 直澄、今井田克己、Taquann 直噴全身暴露吸入法によるナノマテリアル有害性評価(2015.6.29)、第 42 回日本毒性学会学術年会、金沢、シンポジウム

Hiroyuki Tsuda, Jiegou Xu, 2, David B. Alexander, William T. Alexander, Takamasa Numano, Masumi Suzui, Jun Kanno, Akihiko Hirose, Involvement of macrophage in inducing proliferative and neoplastic lesion development of the pleura of rats intrapulmonary treated with multi-walled carbon nanotubes, The 7th International Congress of Asian Society of Toxicology (ASIATOX 2015) (2015.6) Jeju, Korea, Oral

Yuhji Taquahashi, Atsuya Takagi, Masaki Tsuji, Koichi Morita, Yukio Ogawa, Jun Kanno, Development of High Dispersion-Small Scale Whole Body Inhalation System for Nanomaterials (Taquann System): Application to Multi-wall Carbon Nanotube, The 7th International Congress of Asian Society of Toxicology (ASIATOX 2015) (2015.6) Jeju, Korea, Oral

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

特許出願:柴田眞利、菅野純、生田達也、鶴田祐吾、小川幸男、高橋祐次、「吸入曝露試験装置」、特願 2012-148848(2012.7. 2)
特許出願:菅野純、高橋祐次、「高分散性ナノマテリアルの調製方法」、特願 2012-158343(2012.7.17)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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)

Ⅱ. 分担研究報告書

平成27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
ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法に関する総合研究
- 全身暴露吸入による毒性評価研究 -
分担研究報告

分担研究課題

「ナノマテリアル吸入暴露による病理組織学的評価（免疫組織化学）」

研究分担者 今井田 克己 香川大学医学部医学科腫瘍病理学 教授

研究協力者 横平 政直 香川大学医学部医学科腫瘍病理学
山川 けいこ 香川大学医学部医学科腫瘍病理学
成澤 裕子 香川大学医学部医学科腫瘍病理学

研究要旨

本研究では、「ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法に関する総合研究」として、全身暴露吸入による肺を主標的とした毒性評価を行っている。前年度まで行っていた「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-全身暴露吸入による肺を主標的とした毒性評価研究-」を継続し、ヒトが吸入暴露を受ける低濃度域を想定した全身吸入暴露毒性と気管内投与による長期・発がん性試験について3か年計画で実施している。前年度までの研究により、針状の multi wall carbon nanotubes (MWCNT) (MWNT-7、三井物産)を分散処理 (Taquann法処理) する方法を確立することができた。Taquann 法処理により分散処理した MWCNT (T-CNT) を研究対象とし、雄性 C57BL/6 マウスおよび p53+/- knock out C57BL/6 マウスを用いた動物実験を行った。本分担研究においては、全身吸入暴露試験におけるMWCNTの肺内分布の病理組織学的解析、およびMWCNTの気管内投与による肺病変の発現程度や病理組織学的な検討を行っている。

マウスへの全身暴露投与方法については、前年度までの研究により、研究分担者である国立医薬品食品衛生研究所で確実にを行うことができるようになっており、超低用量の T-CNT 投与も可能となった。前年度に行った全身暴露投与による予備実験で得られた肺組織を用いて、免疫組織化学的な評価も加え、検討を進めている。

平成26年度以降は、国立医薬品食品衛生研究所での全身暴露投与による長期実験を行ってきた。分担研究としては、全身曝露長期実験終了後の肺について病理組織学的検討を行っている。これまでに得られた肺組織を用いて、免疫染色を含めた病理組織学的検索を行っている。

雄性 C57BL/6 マウスおよび p53+/- knock out C57BL/6 マウスに、2mg/m³ T-CNT の全身暴露投与を行い、13週、26週、39週そして52週後に摘出した肺を用いて、病理組織学的検討を行った。免疫染色による評価では、CD68、clara cell 10 (CC10)、surfactant protein C (SP-C) の抗体を用いた評価のほか、CD3およびCD45によるリンパ球の評価を試みた。26週後並びに52週後の肺では carcinoma in adenoma が認められ、この肺の腫瘍性病変ではSP-Cが陽性を示す一方で、CC-10も一部で弱陽性像を示した。また、CD68陽性マクロファージに相当する細胞が、腫瘍結節の周囲に認められた。肺の胸膜直下の肺実質から、胸腔内にかけてリンパ球の強い集簇像が認められ、免疫染色でこれらのリンパ球はCD3陽性のリンパ球と、CD45陽性のリンパ球が混在して認められた。また、52週後の動物では、胸壁の壁側胸膜にリンパ球の集簇像や上皮細胞の増殖像を認めたが、限局的なものであった。

今回の予備実験のより、腫瘍の組織学的評価および免疫染色の有用性が確認できた。今後、研究分担者と連携し、針状 MWCNT による肺組織への有害性に関する評価を引き続き継続する予定である。

A. 研究目的

粒子状物質のヒトへの暴露は吸入による経気道経路が主な暴露経路である。粒子の形状、長さ、太さ、粒子表面の物理化学的性状、金属不純物等がその毒性発現に関与するとされている。さらに、単粒子/繊維に分散したものと大きな凝集塊を形成したものでは、肺への到達深度が異なり、その毒性発現も異なる。多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の呼吸器毒性についても、暴露されるカーボンナノチューブ (CNT) のサイズや凝集程度によって異なると予想される。製品として販売されている MWCNT 原末には、単繊維に分散したものから大きな凝集塊まで様々なサイズのものが含まれており、先行研究の「平成20-22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、ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法に関する研究 (福島班)」では、MWCNT 原末の気管内投与によるラットへの毒性影響を調べて、一定の成果を得た。ヒトが吸入暴露した際には、大きな凝集塊は上部気道で捕捉されて除去されるため、肺には分散した MWCNT が到達するという低濃度域での暴露が予想される。平成23-25年度今井田班における研究 (高橋研究員ら) において、MWCNT-Bulk を臨界点乾燥により分散処理し、単繊維に分散した繊維を効率的に取り出す方法 (Taquan 法処理) の開発に成功した。これにより、Taquan 法処理-MWCNT (T-CNT) を用いた全身曝露吸入実験を現在進行中である。ヒトが吸入暴露した場合のモデルとして国立医薬品食品衛生研究所での分担研究として行われている全身吸入暴露試験により得られた肺組織の病理組織学的な評価を当分担研究で担当している。

B. 研究方法

T-CNT の全身曝露投与試験 (2mg/m³) 5 回曝露投与後のマウス肺の経時的評価

研究分担者である国立医薬品食品衛生研究所毒性部で行われた、p53+/- knock out C57BL/6マウスへの T-CNT 全身曝露実験で得られた肺組織の病理組織学的な評価を行った。

2mg/m³ T-CNT の全身曝露投与を1回/週で行い、5回投与後、13週目、26週目、39週目そして52週目に剖検を行った。倫理面への配慮として、過度の疼痛を与えることなく麻酔下に解剖を行い、病理組織学的な評価を行った。

病理組織学的評価は HE 染色標本を作成し、通常の光学顕微鏡を用いて行った。極小の針状構造物である T-CNT は通常の光学顕微鏡では観察しにくく、その存在がと捉えにくいため、偏光顕微鏡 (オリンパス BX53-33p-DPH2, DP21, U-POT) による観察も合わせて行った。

さらに、surfactant protein C (SP-C), clara cell 10 (CC10), CD68, CD3, calretinin による免疫染色を行い、HE 染色標本の組織構築と免疫組織学的特性について比較検討した。免疫染色では、ベンタナ HX システムディスカバリーを用いた。抗原賦活は、全ての抗体において 100°C の熱処理を 30 分間で行った。Buffer は RiboCC Buffer を用いた。一次抗体の反応条件は以下のとおりである。CC-10 (JBC1868954, Millopor) : 2000 倍希釈、室温 12 時間。SP-C (sc-13979, santa cruz biotechnology) : 50 倍希釈、37°C 1 時間。CD68 (ab125212, abcam) : 200 倍希釈、室温 12 時間。二次抗体反応条件はいずれも 30 分で行った。その後、LSAB 法を行い、発色は DAB マップキットを用いた。

病理組織学的評価は HE 染色標本を作成し、通常の光学顕微鏡と偏光顕微鏡 (オリンパス BX53-33p-DPH2, DP21, U-POT) による観察を合わせて行った。

C. 研究結果

T-CNT の全身曝露投与試験 (2mg/m³) 5回曝露投与後52週後の肺組織評価

T-CNT 全身曝露後の52週のマウスの壁側胸膜側に、リンパ球浸潤を伴う小肉芽様病変が認められた (図1, 2)。同部位の中心部には、偏光で白色に輝く針状物質が確認され、投与した T-CNT の周囲に発生した病変と考えられた (図3)。

また、肺の胸膜直下の肺実質から、胸腔内にかけてリンパ球の強い集簇像が認められ (図4)、免疫染色でこれらの

リンパ球はCD3陽性のリンパ球（図5）と、CD45陽性のリンパ球（図6）が混在して認められ、悪性リンパ腫などで認められるリンパ球のmonoclonarityは認めなかった。また、CD68陽性を示すマクロファージや組織球が混在していることも確認された（図7）。

T-CNT全身暴露後52週の肺では、carcinoma in adenoma が認められた（図8）。この肺の腫瘍性病変ではSP-Cが陽性を示す一方で（図9）、CC-10も一部で弱陽性像を示した（図10）。CD68陽性マクロファージに相当する細胞が、腫瘍結節の周囲に認められた（図11）。これらの変化は昨年度報告した暴露後26週後に認めたものと同様の変化であり、この動物種に自然発生する病変であると考えられた。

D. 結論

本分担研究では、先行研究で全身暴露投与条件およびその方法を確立することができ、長期毒性試験へと引き継ぐことができた。

本年は、全身暴露後、13週、26週、39週後の肺組織評価の検討に続き、暴露後52週での評価を行った。

13週、26週そして39週後の変化と同様に、暴露後52週後の肺組織内にも、T-CNTは通常の光学顕微鏡で観察が可能であった。さらに偏光顕微鏡を併用することでより詳細な観察が可能となった。さらに、腫瘍発生については、今回用いたp53+/- knock out C57BL/6マウスは、非処置群でも肺腫瘍発生が見られており、この腫瘍発生の原因がT-CNTによるものかについては、現在のところ不明である。今回52週後の観察で、わずかながら壁側胸膜の肥厚を認めたが、いずれも限局的な変化であった。

今後の実験では、T-CNTが肺発癌に与える影響およびpromotion作用の有無など、総合的な影響評価が重要と考えている。

以上より、全身暴露投与により、13週後、26週後だけでなく52週後でも肺内にMWCNTが残存することが示された。52週後のマウスでは増殖胸膜の限局的な肥

厚を認めたが、中皮腫の発生は確認できなかった。今回の実験ではMWCNTと腫瘍発生の因果関係までは明らかにすることはできなかったが、今後、各分担研究の継続により、MWCNTの呼吸器系への毒性評価を行っていく予定である。

呼吸器系へのMWCNTの毒性評価には、気管内投与による検討ではなく、ヒトへの暴露条件に類似した全身暴露による検討がより重要と考えられる。今後も研究分担者との連携により、針状MWCNTによる肺組織への有害性評価を行う予定である。

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

論文発表

Yokohira M, Hashimoto N, Nakagawa T, Nakano Y, Yamakawa K, Kishi S, Kanie S, Ninomiya F, Saoo K, Imaida K. Long-term chronic toxicity and mesothelial cell reactions induced by potassium octatitanate fibers (TISMO) in the left thoracic cavity in A/J female mice. *Int. J. Toxicol.*, 34(4):325-35, 2015.

Yamakawa K, Yokohira M, Nakano Y, Kishi S, Kanie S, Imaida K. Activation of MEK1/2-ERK1/2 signaling during NNK-induced lung carcinogenesis in female A/J mice. *Cancer Med.*, 2016 in press.

Nakano Y, Yokohira M, Hashimoto N, Yamakawa K, Kishi S, Ninomiya F, Kanie S, Saoo K, Imaida K. Rat strain differences in levels and effects of chronic inflammation due to intratracheal instillation of quartz on lung tumorigenesis induced by DHPN. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 66(8):391-401, 2014.

Yokohira M, Yamakawa K, Nakano Y, Numano T, Furukawa F, Kishi S, Ninomiya F, Kanie

S, Hitotsumachi H, Saoo K, Imaida K. Immunohistochemical characteristics of surfactant proteins-A, -B, -C and -D in inflammatory and tumorigenic lung lesions of F344 rats. J. Toxicol. Pathol., 27(3-4):175-182, 2014.

Yokohira M, Kishi S, Yamakawa K, Nakano Y, Ninomiya F, Kinouch S, Tanizawa J, Saoo K, Imaida K. Napsin A is possibly useful marker to predict the tumorigenic potential of lung bronchiolo-alveolar hyperplasia in F344 rats. Exp. Toxicol. Pathol., 66:117-123, 2014

2. 学会発表

Keiko Yamakawa, Masanao Yokohira, Yuko Narusawa, Shohei Kanie, Shota Yoshida, Kousuke Saoo, Katsumi Imaida. Activation of ERK1/2 on DHPN-induced lung carcinogenesis in F344 rats. 32th Annual Meeting of Japanese Society of Toxicologic Pathology. Jan. 28, 2016, Takamatsu

The expression of S100A4 in the DHPN-induced lung tumors of rats. Yuko

Narusawa, Masanao Yokohira, Keiko Yamakawa, Shohei Kanie, Shota Yoshida, Kousuke Saoo, Katsumi Imaida, 32th Annual Meeting of Japanese Society of Toxicologic Pathology. Jan. 28, 2016, Takamatsu.

山川けいこ、鈴木智、成澤裕子、蟹江尚平、横平政直、竿尾光祐、今井田克己、雌性A/JマウスNNK誘発肺腫瘍におけるテストステロンとPTENの関係、第74回日本癌学会学術集会、2015.9

成澤裕子、横平政直、山川けいこ、岸宗佑、蟹江尚平、塩岡忠夫、竿尾光祐、今井田克己、NNK誘発マウス肺腫瘍におけるCD44v6の発現に関する検討、第74回日本癌学会学術集会、2015.9

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

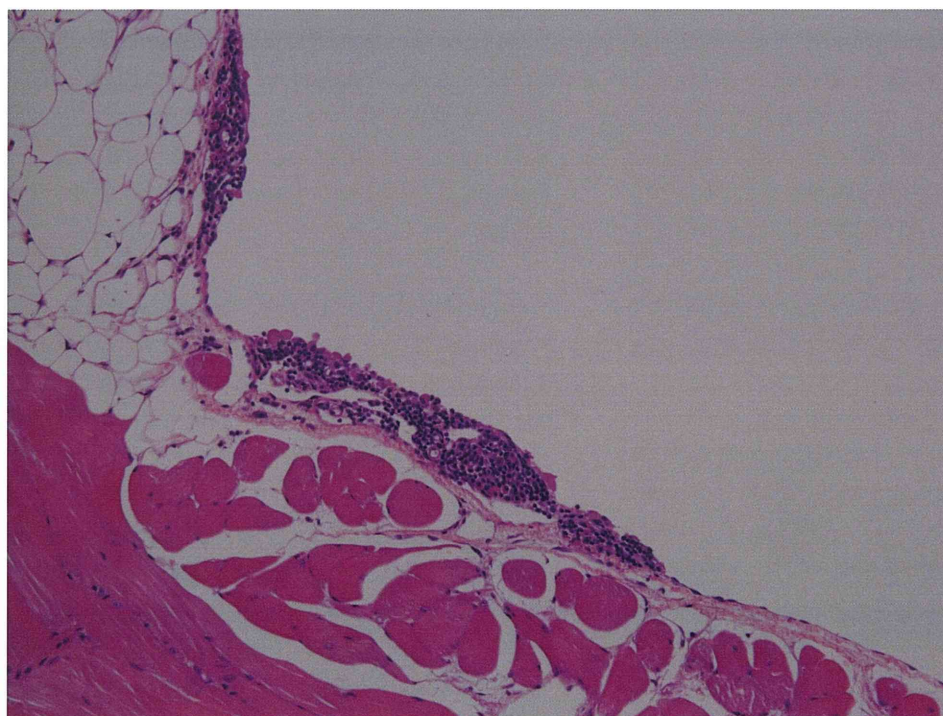


図 1