

201524021A

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慢性及び遅発毒性 評価手法の開発に関する研究

平成 27 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 28 年 (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

ナノマテリアル曝露による慢性及び遅発毒性
評価手法の開発に関する研究
(H27-化学-指定-004)

平成27年度 総括・分担研究報告書
研究代表者 広瀬 明彦

平成28年(2016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慢性及び遅発毒性評価手法の開発に関する研究 広瀬 明彦	2
II. 研究分担報告書	11
1. ナノマテリアルの慢性影響指標の開発に関する研究 菅野 純	12
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	32
3. ナノマテリアルの発生毒性評価手法に関する研究 小林 憲弘	37
4. ナノマテリアルの遺伝毒性評価に関する研究 —マウスを用いる肺小核試験の基礎検討試験— 本間 正充	50
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	58
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	62
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	87
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	92
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	101

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)

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慢性及び遅発毒性評価手法の開発に関する研究

研究代表者： 広瀬 明彦 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部長

研究要旨

本研究は、これまでの研究で多層ナノチューブ(MWCNT)や酸化チタンを中心にして確立してきた慢性影響研究や新規に開発した高度分散手法(Taquann 法)を基にして、H29年度までにさらに他のナノマテリアル(チタン酸カリウムや二層ナノチューブ)を用いて発癌性や免疫影響、発生影響に関するメカニズム解析や分散手法である Taquann 法の適用拡大研究を行うことにより、評価系の開発のために基礎的条件を確立することを目指している。27年度は、多層ナノチューブを用いたメカニズム解析とチタン酸カリウムを比較対象とした実験を中心に行った。慢性影響評価研究において、チタン酸カリウムの吸入暴露試験系の確立と経気管肺内噴霧法の検証、MWCNT の中皮腫誘発性におけるサイトカイン分析と *in vivo* 変異原試験法の開発を行った。免疫系への影響評価研究では、慢性影響における TLR シグナル系への影響やチタン酸カリウムによる感染性への影響、NLRP3 インフラマソームを介するマクロファージに対する影響を検討した。発生影響に関しては、反復投与による発生異常の詳細評価と MWCNT 投与猷体の加熱処理による影響を検討した。その結果、慢性影響に関する研究に関して、チタン酸カリウムに Taquann 法を適用して安定した暴露濃条件を確立し、マウスを用いた単回吸入暴露でチタン酸カリウムが肺胞レベルまで到達することを確認した。また、チタン酸カリウムのラットへの経気管肺内噴霧研究では炎症性サイトカインレベルはいずれも酸化チタンよりも高いことが示された。一方、MWCNT 腹腔内投与のメカニズム解析ではサイトカインを介した持続的な反応が起こっていることが示された。また、*in vivo* 肺小核試験法の確立を目指した基礎検討で小核細胞の検出に成功したが、安定的に観察数を確保するための検討が必要となった。免疫影響に対する検討では、MWCNT は Zynosan 依存性の TLR シグナルを増強することが示され、自己免疫疾患モデルでは、慢性的な腹膜炎の状態が継続していることが示された。感染性への影響に関しては、チタン酸カリウムは、MWNT-7 より増悪化の程度は弱いことが示された。一方、*in vitro* 評価系の検討では、繊維長の異なる4種 MWCNT について、いずれも NLRP3 インフラマソームを介する IL-1 β 産生促進能示すことが確認された。発生影響に関する検討では、マウスの器官形成期の反復投与によって、外表異常は認められないものの 1 mg/kg の濃度でも骨化遅延などの発生異常を示すことが明らかとなった。一方、MWCNT の気管内投与による催奇性については、MWCNT を加熱処理(250°C2 時間)することでその作用が弱まることが今回新たに示され、発生毒性誘発メカニズム解析にとって、重要な知見であると考えられた。慢性影響と免疫系への影響については、チタン酸カリウムへの適用による知見が集積しつつあるが、MWCNT の加熱処理による発生異常のメカニズムを次年度にむけて優先的に解析することが必要であることが判明した。

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 第三室長

本間 正充 国立医薬品食品衛生研究所
変異遺伝部 部長

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 教授

石丸 直澄 徳島大学大学院医歯薬学研究部
教授

吉田 裕樹 九州保健福祉大学大学院 医療薬
学研究科 講師

明石 敏 九州保健福祉大学大学院 医療薬
学研究科 教授

新垣理恵子 徳島大学大学院 医歯薬学研究部
助教

斎藤 雅子 徳島大学大学院 医歯薬学研究
部 助教

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

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 室長

徐 結苟 名古屋市立大学大学 特任教授

David B. Alexander 名古屋市立大学大学 特任
教授

沼野 琢旬 名古屋市立大学 津田特任教授研
究室研究員

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

Mohamed Ahmed Mahmoud Abd El-gied 名
古屋市立大学大学院医学研究科
大学院生

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

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 東京農業大学応用生物科学部食
品安全健康学科 教授

平田 睦子 国立医薬品食品衛生研究所 安
全性予測評価部 研究員

小野 敦 国立医薬品食品衛生研究所 安
全性予測評価部 室長

高橋 美加 国立医薬品食品衛生研究所 安
全性予測評価部 研究員

松本 真理子 国立医薬品食品衛生研究所 安全
性予測評価部 研究員

加藤 日奈 国立医薬品食品衛生研究所 安全
性予測評価部 研究員

川村 智子 国立医薬品食品衛生研究所 安全
性予測評価部 研究員

松島 裕子 国立医薬品食品衛生研究所 安全
性予測評価部 研究員

山口 治子 国立医薬品食品衛生研究所 安全
性予測評価部 研究員

五十嵐智女 国立医薬品食品衛生研究所 安全
性予測評価部 研究員

小林 克己 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部 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、新素材として一般消費者向けにも使用されている産業用ナノマテリアルについては、物理化学特性が従来の粒子とは異なることから、未知のヒト健康影響がもたらされる可能性と共に、既存の毒性試験法がその評価に適切かどうかについて問題視されている。これまで、およそ 10 年近くにわたり OECD や各国がこの問題に取り組んできており、ナノマテリアルの特性に配慮した毒性試験用サンプル分散法や、試験ガイドラインの改訂の必要性が示されつつあるものの、ナノマテリアル特有の多様な物理特性に応じた体系的な評価アプローチが見いだせずにいる状況である。特に、*in vitro* 試験系を中心とした研究では、製品毎に多様性のある表面活性の違いが試験結果の解釈を困難にしており、10 年前の問題点は未だに問題点のまま根本的な解決策は見いだせていない。一方で、欧州では科学的議論の成熟を待たず、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、産業的には一刻も早くこれらの課題解決が望まれるところである。申請者らは 2004 年当初より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、*in vivo* 試験研究を中心に進めており、形状的にアスベストに類似した多層型カーボンナノチューブ (MWCNT) が中皮腫誘発性を持つことを明らかにしてきた。さらにこれまでの研究で、これまでの *in vivo* 影響を解析することにより、効率的な *in vitro* 試験系の改良や評価に有効なマーカー探索のための知見が集積しつつあり、未知の物質の評価手法の確立には、

in vivo から *in vitro* 系への研究展開が重要であることを示している。また、申請者らは高度な分散手 (Taquann 法) を開発してきており、吸入試験へ適用のみならず、定量的な毒性評価研究への応用が期待されている。これまでは MWCNT を中心とした応用を検討してきているが、評価手法の確立のためにはより広範な物理化学的な特性への適用が必要であると考えられた。そこで、本研究では、これまでに確立してきた慢性影響や免疫影響、発生影響について、*in vitro* 試験系の開発に必要なメカニズムを進めると共に、分子成分や形状の異なった検体を用いた研究を行うことで、より一般化したナノマテリアルに対する Taquann 法の応用可能性を検証することを目的とする。

B. 研究方法

本研究は、これまでの研究で *in vivo* 影響が比較的明確化している発がん性を含む慢性影響と、今後その影響への関心が高くなると考えられている免疫影響および発生影響に関する評価法を解析する研究体制を構築している。これまでに研究対象としてきた多層ナノチューブ (MWCNT) や酸化チタンに加えてチタン酸カリウムや二層ナノチューブを用いて発癌性や免疫影響、発生影響に関するメカニズム解析や分散手法である Taquann 法の適用拡大研究を行うことにより、評価系の開発のために基礎的条件を確立することを目指している。H27 年度は、まず検証対象とするナノマテリアルとして、MWCNT と同様の形状を持つチタン酸カリウムを加えて検証を開始した。**慢性影響評価手法検討**：チタン酸カリウムを対象とし、Taquann 法によるチタン酸カリウムのための分散条件の調整、エアロゾル化の際の機器パラメータ決定、及び、肺沈着量測定のためのチタン酸カリウムの肺組織からの回収の方法の

最適化を実施した。また、C57BL/6マウスに2mg/m³を目標濃度として2時間/日の全身曝露吸入を実施し曝露肺の病理組織学的評価および肺負荷量の測定を実施した（菅野）。また、MWCNTをF344ラットに経気管単回噴霧投与し、投与後終生飼育実験を行い、投与後長期間に亘って体内に滞留するMWCNTの呼吸器系及び体腔中皮への影響を検討した。またMWCNT腹腔内投与による中皮腫誘発のメカニズム解析の一環として、投与後一定期間後の腹腔内洗浄液のサイトカイン濃度を測定した（広瀬）。経気管肺内噴霧投与方法においては、Taquann法にて分散した線維状のチタン酸カリウム(K₂O・8TiO₂)長さ10-20μm、直径0.3-0.6μm)は、エアロゾル分散後にtert-ブチルアルコールに溶解後氷結させ、使用直前にアルコールを揮発させ生食に250と500μg/mLに懸濁し、0.5mLを2週間に8回投与した（1および2mg/ラット）。屠殺後、左肺は凍結保存、右肺は病理標本とし炎症像とマクロファージにおけるサイトカインCCL2、CCL3、CCL4、CCL5、CXCL2を解析した（津田）。遺伝毒性評価において、*in vivo*肺小核試験法を確立するための予備検討として、11週齢の雄性C57BL/6NcrSlc（SPF）マウスに、ブレオマイシンまたは、EMSを投与し、投与後72時間後に、肺組織から肺細胞を調整し、48時間培養後、小核を観察した。（本間）。

免疫影響評価法検討：本研究では、多層化カーボンナノチューブ（MWCNT）の長期における免疫システム全体への慢性的な影響を観察することによって、ナノマテリアルの免疫制御システムへの影響を評価した。平成27年度は正常マウス及び自己免疫疾患モデルマウスを用いて、MWCNT腹腔内投与による免疫システム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、高度分散化 MWNT-7（Taquann サンプル）とチタン酸カリウム（TISMO）について、respiratory syncytial virus（RSV）感染マウスモデルを用いて感染病態を指

標に影響評価を行った。サンプルを複数回曝露（感染5,3,1日前）後、RSVをマウスに感染させた。感染1,5日後の肺病理組織標本を作製した。また、肺胞洗浄液（BALF）中のサイトカインレベルをELISAで測定した。マクロファージ様RAW264.7細胞をMWNT-7と共に培養し、RSV感染後の培養上清中のTNF-αレベルをELISAで測定した（渡辺）。

*in vitro*試験件による検討では、各種ナノチューブ類によるインフラマソーム活性化を検討した。MWCNT類をTHP-1マクロファージに曝露し、培地に放出されるIL-1βをMilliplex法により測定した。NLRP3の関与はsiRNAノックダウンにより、caspase-1ならびにcathepsin Bの関与は特異的阻害剤を用いて解析した（最上）。

③発生影響評価法検討：MWCNTのマウス反復気管内投与試験で得られた胎児（同腹児の約半数）について、内臓異常の有無を確認した。また、内臓検査用を除いた残りの同腹児について、骨格異常および変異の有無、骨化状態を検査した。（小林）また、妊娠9日目のマウスに非加熱処理のMWNT-7と250°C2時間加熱処理したMWNT-7を2%CMC-Na水溶液に懸濁して、4mg/kgの用量で単回気管内投与を行った。（広瀬）

<倫理面への配慮>

本研究では、人を対象とした研究、人の遺伝子解析、疫学研究は行っていない。動物試験を実施した研究は、試験実施機関による動物実験に関する倫理委員会の承認を得るなど、実験動物に対する動物愛護の配慮の上で実施した

C. 研究結果

慢性影響評価手法検討：チタン酸カリウムはTaquann法処理とTaquann直噴全身吸入装置Ver2.5により高度に分散したエアロゾル化

が、MWCNT で設定した方法で実現され、エアロゾルの繊維長の平均値、最大値は原末と同様の値であることを確認した。エアロゾルの分散状態は現状のパラメータのまま問題なく達成されたが、直噴操作の間隔を短間隔で直噴操作を行うことで濃度を安定化させることができた。この条件でマウスに 2 時間全身暴露吸入し、肺病理組織標本を観察し、チタン酸カリウムを MWCNT と同様に、肺胞レベルまで到達することを確認した。チタン酸カリウムの経気管肺内噴霧法を用いた研究では、肺組織の CCL2、CCL3、CCL4、CCL5、CXCL2 の mRNA 発現量は、対照群より有意の高値を示した。チタン酸カリウムの CCL2、CCL3、CCL4、CXCL2 増加量は酸化チタンよりも有意の高値を示し、線維型の炎症誘導能が高いことが示された。

また、MWCNT の発がんメカニズム研究としては、MWCNT 腹腔内投与後 8、16、24、32 週目の腹腔内洗浄液のサイトカイン濃度を測定した結果、IL-6 は経時的に減少したが、IL-8 および MCP-1 は観察期間を通じて有意に高値を示した。さらに 3 種の MWCNT による単回経気管噴霧投与による終生飼育実験は進行中であるが、各 MWCNT 群で胸腔内及び腹腔内に単発的な腫瘍結節の発現を肉眼的に確認した。

一方、ナノマテリアルに対する *in vivo* 遺伝毒性評価の検討としてマウスに対する *in vivo* 肺小核試験法の確立を目指した基礎検討では、陽性物質による小核細胞の観察が可能な条件設定に成功したが、計測細胞数が少なく、安定的に肺小核試験を実施のための更なる検討が必要となった。

免疫影響評価法検討: 正常 C57BL/6 マウスへの MWCNT とともに TLR のリガンドである Zynosan を投与することにより、MWCNT に暴露された腹腔 M2

マクロファージの TRL シグナルを検討したところ、MWCNT は TLR シグナルを増強する可能性が示された。一方で、MRL/lpr マウスの自己免疫病変への MWCNT 投与による影響は、PEC 中の細胞分画では B6 マウスでの実験と同様に M2 マクロファージに細胞数が増加することに加えて、B 細胞数も増加していた。自己免疫病変を反映する自己抗体 RF の産生に関しては、昨年度の結果と同様に MWCNT 投与によりその抗体価は有意に上昇していた。

感染性への影響に関して MWNT-7 曝露マウスの感染1日後の肺組織においては、0.025 mg/kg から著しい単核球の浸潤が認められた。この際、BALF 中の有意な IL-6 および TNF- α レベルの上昇も認められた。さらに、MWNT-7 処理により RSV 感染 RAW264.7 細胞からの顕著な TNF- α 産生の増強も確認された。一方、TISMO 曝露マウスにおいて、感染5日後の BALF 中の CCL5 レベルの上昇や肺組織への軽度な単核球の浸潤や細胞壁肥厚が認められた。なお、非感染マウスではこのような現象は見られなかった。

NLRP3 インフラマソームは慢性炎症病態への関与が明らかにされている。長さや径の異なる MWCNT をマクロファージに暴露し、NLRP3 インフラマソームを介する炎症性サイトカイン IL-1 β 産生促進能を評価した。MWCNT-WL、-WS、-T および -SD1 はいずれも強力に IL-1 β 産生を促進すること、これらの MWCNT による IL-1 β 産生には、NLRP3 と caspase-1 を含むインフラマソーム、ならびにリソソーム酵素 cathepsin B が関与することを siRNA あるいは阻害剤を用いて明らかにした。

発生影響評価法検討: MWCNT のマウス反復気管内投与試験で得られた胎児の内臓検査では、4 mg/kg/day (反復投与) および 4 mg/kg (単回投与) で内臓異常を伴う胎児の発生率ならびに腎盂拡張および左臍動脈遺残の発生率が有意な高値を示した。骨格検査では、4 mg/kg/day (反復投与) および 4 mg/kg (単回

投与)で骨格異常を伴う胎児の発生率が有意な高値を示した。また、骨化遅延を伴う胎児の発生率は、2 mg/kg/day 以上の投与で有意な高値を示した。上後頭骨の二分骨化および胸骨分節の二分骨化の発生率の高値については、1 および 2 mg/kg 投与においても認められた。

MWCNT の加熱処理の有無にかかわらず、気管内投与後 2 時間後には、母動物の体温の有意な低下が認められたが、白血球数等への影響は認められなかった。胎児への影響については、以前の報告と同様に 4mg/kg の非加熱処理 MWCNT-7 の気管内投与により妊娠 18 日目の胎児の体重減少、外表異常および骨格異常の増加が観察された。しかし、加熱処理した MWCNT-7 を 4mg/kg 投与した時の胎児体重は、対照群に比べて減少傾向はあるものの有意な変化では無かった。一方、外表異常と骨格異常は、ほぼ対照群と同レベルとなっていた

D. 考察

慢性影響に関する研究に関して、チタン酸カリウムを用いた吸入実験系の開発検討では、Taquann 法を適用し暴露濃度を安定化させることに成功した。この暴露条件でマウスへのエアロゾル単回暴露を行った結果、チタン酸カリウムが MWCNT と同様に肺胞レベルまで到達することを確認すると共に肺沈着量の測定法の確立も成功し、チタン酸カリウムの吸入毒性系を確立することができた。線維形のチタン酸カリウムは検索した炎症性サイトカインの誘導能は球形状の酸化チタンよりも顕著であり、今後アスベストやカーボンナノチューブと同様な長期試験が必要であると考えられた。

腹腔内投与におけるサイトカインの解析では、投与後短期間に増加するもの長期間にわたって持続するものが認められ、急性炎症反応と別にサイトカインを介した持続的な反応が起こって

いることが明らかになった。今後、中皮腫発症とこれらの物質の関係性を継時的に記載する必要があることが示された。単回気管内投与試験後の終生観察試験は、まだ最終観察は終了していないので、結論は下せないが、腹腔内投与のように高頻度で中皮腫が発生する様な状況でないことが示された。今後、肉眼的に観察された胸腔及び腹腔内病変の性状及び自然発生による腫瘍性/非腫瘍性病変の発現への影響について、病理組織学的観察が必要である。

in vivo 肺小核試験法の基礎検討では、ブレオマイシン及び EMS 投与群では肺小核誘発の有意な増加が確認されたが、評価対象肺細胞が少ないことは安定的に肺小核試験を実施する際の支障となる可能性があり、その要因として動物種、投与条件(回数、細胞回収までの期間)、細胞培養条件(期間等)等が影響していることが考えられ、これらについてさらに検討が必要と考えられた。

免疫系への影響の検討では、正常マウスへの MWCNT 及び Zymosan 投与による検討より腹腔内では MWCNT の暴露で M2 マクロファージが活性化することが判明し、その活性化シグナルは TLR との協調作用がある可能性が示された。自己免疫疾患モデル MRL/lpr マウスへの MWCNT を腹腔内に投与することにより、慢性的な腹膜炎の状態が継続していることが判明した。今後、B 細胞系及び抗体産生への影響を検討する必要があると考えられた。一方で、MWCNT-7 曝露による肺炎の増悪化現象は、感染直後からマクロファージ等に影響している可能性が高いことが判明した。そして、in vitro 培養マクロファージ細胞でも、この現象を支持する結果が確認できた。さらに、ウイルス感染によりマクロファージの MWCNT-7 貪食亢進も示唆されている。一方、TISMO でも MWCNT-7 よりは炎症の程度が弱い、RSV 肺炎の増悪化現象が認められており、今後、感染初期の影響等も検討

して標的細胞を絞り込む必要がある。

多様な長さや径の各種 MWCNT は、いずれも NLRP3 インフラマソーム活性化を介して IL-1 β 産生を促進すること、またリソソーム酵素 cathepsin B が関与することを明らかにした。MWCNT によるリソソームの破壊が NLRP3 活性化を招いたことが推定される。NLRP3 は内外の因子により活性化され、様々な慢性疾患に関わることが明らかにされていることから、多様な MWCNT による炎症病態誘導の可能性が示唆される。

発生影響に関する検討では、内臓検査でみられた腎盂拡張は対照群においても観察された異常所見であるが、被験物質投与の影響により、その発生率が増加したものと考えられる。また、骨格検査では、肋骨の欠損および癒合、胸椎弓の癒合ならびに腰椎弓の癒合の発生率が有意な高値を示し、被験物質投与の影響と考えられた。さらに、被験物質投与により骨化遅延が発生したと考えられる。これらの変化は、いずれも被験物質投与に起因した胎児体重の低値に伴う発育遅延を反映したものと考えられる。これまでの研究における器官形成期の反復投与によつては 4 mg/kg 以上の投与でも外形異常は認められていなかったが、今年度、骨格検査を追加することにより、1 mg/kg の濃度でも骨化遅延を示すことが明らかとなった。

MWCNT を妊娠動物に腹腔内投与したときは、母動物に体温低下が認められたが、気管内投与では白血球数に有意な変化は認められなかった。これは、気管内投与による炎症性安全性予測評価部性の変化は白血球数に影響するほど強いものではないことを示している。しかし、MWCNT-7 の気管内投与でも催奇性は観察されているので、そのメカニズムは白血球数の変化を引き起こす炎症性反応との関連性が少ないものと考えられた。

一方、今回、MWCNT-7 を投与前に加熱処理 (250 $^{\circ}$ C、2 時間) するとその催奇形性能が減弱することが示された。これは、加熱処理により引き起こされた何らかの MWCNT の変化が、催奇形性に関連していることを示唆した。しかし、顕微鏡レベルでは形状等にそれほど大きな違いは認められなかったが、僅かに細かい粒子が少なくなっているように感じられた。今後より詳細な分析を検討する必要があると考えられた。

E. 結論

27 年度は、多層ナノチューブを用いたメカニズム解析とチタン酸カリウムを比較対象とした実験を中心に行った。慢性影響評価研究において、チタン酸カリウムの吸入暴露試験系の確立と経気管肺内噴霧法の検証、MWCNT の中皮腫誘発性におけるサイトカイン分析と *in vivo* 変異原試験法の開発を行った。免疫系への影響評価研究では、慢性影響における TLR シグナル系への影響やチタン酸カリウムによる感染性への影響、NLRP3 インフラマソームを介するマクロファージに対する影響を検討した。発生影響に関しては、反復投与による発生異常の詳細評価と MWCNT 投与動物の加熱処理による影響を検討した。その結果、慢性影響に関する研究に関して、チタン酸カリウムに Taquann 法を適用して安定した暴露濃条件を確立し、マウスを用いた単回吸入暴露でチタン酸カリウムが肺胞レベルまで到達することを確認した。また、チタン酸カリウムのラットへの経気管肺内噴霧研究では炎症性サイトカインレベルはいずれも酸化チタンよりも高いことが示された。一方、MWCNT 腹腔内投与のメカニズム解析ではサイトカインを介した持続的な反応が起こっていることが示された。また、*in vivo* 肺小核試験法の確立を目指した基礎検討で小核細胞の検出に成功したが、安定的に観察数を確保す

るための検討が必要となった。免疫影響に対する検討では、MWCNTはZynosan依存性のTLRシグナルを増強することが示され、自己免疫疾患モデルでは、慢性的な腹膜炎の状態が継続していることが示された。感染性への影響に関しては、チタン酸カリウムは、MWNT-7より増悪化の程度は弱いことが示された。一方、*in vitro* 評価系の検討では、繊維長の異なる4種MWCNTについて、いずれもNLRP3インフラマソームを介するIL-1 β 産生促進能を示すことが確認された。発生影響に関する検討では、マウスの器官形成期の反復投与によって、外表異常は認められないものの1 mg/kgの濃度でも骨化遅延などの発生異常を示すことが明らかとなった。一方、MWCNTの気管内投与による催奇性については、MWCNTを加熱処理(250°C2時間)することでその作用が弱まることが今回新たに示され、発生毒性誘発メカニズム解析にとって、重要な知見であると考えられた。慢性影響と免疫系への影響については、チタン酸カリウムへの適用による知見が集積ししつつあるが、MWCNTの加熱処理による発生異常のメカニズムを次年度にむけて優先的に解析することが必要であることが判明した。

F. 健康危機情報

該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

Xu J, Alexander DB, Iigo M, Hamano H, Takahashi S, Yokoyama T, Kato M, Usami I, Tokuyama T, Tsutsumi M, Tamura M, Oguri T, Niimi A, Hayashi Y, Yokoyama Y, Tonegawa K, Fukamachi K, Futakuchi M, Sakai Y, Suzui M, Kamijima M, Hisanaga N, Omori T, Nakae D, Hirose A, Kanno J,

Tsuda H. (2015) Chemokine (C-C motif) ligand 3 detection in the serum of persons exposed to asbestos: A patient-based study. *Cancer Sci.*;106(7):825-32.

Yasui M, Kamoshita N, Nishimura T, Honma M; Mechanism of induction of binucleated cells by multiwalled carbon nanotubes as revealed by live-cell imaging analysis. *Genes and Environment* 37, 6 (2015).

Fujitani T, Inomata A, Ogata A, Sakamoto Y, Hirose A, Nishimura T, Ikeda R and Nakae D. Comparison of fetal toxicity of various multi-wall carbon nanotubes in mice. *Toxicology Reports*, (2015) 2, 1404-1408.

2. 学会発表

Hirose A, Taquahashi Y, Takagi A, Ogawa Y, Kanno J. Characterization of mesothelioma induction by i.p injection of the MWCNT dispersed with the Taquann method. *International Congress on Safety of Engineered Nanoparticles and Nanotechnologies (SENN2015)*. (2015.4, ヘルシンキ, フィンランド)

Hirose A, Sakamoto Y, Ogata A, Yuzawa K, Kubo, Ando H, Nagasawa A, Nishimura T, Inomata A, and Nakae D. Chronic toxicity by repeated intratracheal administration of MWCNT in rat. *The 7th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health*. (2015.10. リンポポ州, 南アフリカ)

Kobayashi N, Kubota R, Tanaka R, Takehara H, Naya M, Ikarashi Y, Hirose A: 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).
- 津田 洋幸, 徐 結苟, 酒々井 真澄, 二口 充, 深町 勝巳, 広瀬 明彦, 菅野 純 (2015) 多種のカーボンナノチューブの短・中期安全性評価手法の提案. 第42回日本毒性学会学術年会 (2015.7 金沢).
- 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材料有害性評価(2015.6.29)、第42回日本毒性学会学術年会、金沢、シンポジウム
- 藤谷 知子, 猪又 明子, 小縣 昭夫, 安藤 弘, 久保 喜一, 中江 大, 広瀬 明彦, 西村 哲治, 池田 玲子 (2015) マウスにおける多層カーボンナノチューブの胎仔毒性の製品間差. 第42回日本毒性学会学術年会 (2015.7 金沢).
- 小林 憲弘, 田中 翔, 竹原 広, 納屋 聖人, 久保田 領志, 五十嵐 良明, 広瀬 明彦 (2015) マウス単回・反復気管内投与による多層カーボンナノチューブの催奇形性の評価. 第42回日本毒性学会学術年会 (2015.7 金沢).
- 坂本 義光, 小縣 昭夫, 北條 幹, 湯沢 勝廣, 安藤 弘, 久保 喜一, 長澤 明道, 高橋 博, 広瀬 明彦, 井上 義之, 橋爪 直樹, 猪又 明子, 中江 大 (2015) 多層カーボンナノチューブによるラット中皮及び肺増殖性病変誘発に対する phenyl N-tert-butyl nitron (PBN)の影響. 第42回日本毒性学会学術年会 (2015.7 金沢).
- 坂本 義光, 広瀬 明彦, 中江 大 (2015) 多層カーボンナノチューブによるラット中皮及び肺増殖性病変誘発に対する phenyl N-tert-butyl nitron (PBN)の影響. 第74回日本癌学会学術総会 (2015.10 名古屋).
- Jun Kanno, Important attributes of nanomaterials in predicting their long-term effects: In vivo studies, 7th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health (NanOEI 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 (NanOEI 2015), (2015.10.21), South Africa, Oral
- 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, Symposium
- 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, Symposium
- 酒々井真澄、沼野琢旬、深町勝巳。二口充、津田洋幸 (2015) 多層カーボンナノチューブの腫瘍発生プロファイル; 第31回日本毒性病理学会総会 東京 1月29日-30日
- 津田洋幸、徐結旬、Alexander D.B.,酒々井真澄、二口充、深町勝巳、広瀬明彦、菅野純 (2015) 多層カーボンナノチューブの発がん標的性組織; 第14回分子予防環境医学研究会大会 大阪, 2月13日-2月14日.
- 松本晴年、深町勝巳、二口充、津田洋幸、酒々井真澄 (2016) 多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の肺障害性と遺伝子発現への影響; 第32回日本毒性病理学会総会 高松 1月28日-29日
- Honma M : Trend and Progress of OECD Genotoxicity Testing Guidelines. 39th Annual Meeting of Environmental Mutagen Society in India 2015年5月 インパール・インド
- 本間正充 : OECD テストガイドラインの変更点. JEMS・MMS 研究会 第66回定例会 2015年6月 那須
- 橋口誠子、吉田裕樹、明石 敏、宮内亜宜、杉田千泰、黒川昌彦、渡辺 渡 二酸化チタンナノ粒子のRSウイルス感染への影響、第63回日本ウイルス学会学術集会、2015.11.20, 福岡、ポスターP1-G-091
- 橋口誠子、吉田裕樹、明石 敏、宮内亜宜、黒原俊典、坂田健太郎、重黒木公也、広瀬明彦、杉田千泰、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32回日本薬学会九州支部会、2015.11.29, 延岡、口頭 2B-04
- Seiko Hashiguchi, Hiroki Yoshida, Toshi Akashi, Akihiko Hirose, Masahiko Kurokawa, Wataru Watanabe. : Effects of multi-walled carbon nanotubes on the pneumonia in respiratory syncytial virus-infected mice EUROTOX2015, (2015.9.14) (Port, Portugal), poster P08-20
- 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)
- 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)
- Saito M, Arakakai 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)
- 小林憲弘、田中翔、竹原広、納屋聖人、久保田領志、五十嵐良明、広瀬明彦 : マウス単回・反復気管内投与による多層カーボンナノチューブの催奇形性の評価. 第42回日本毒性学会学術年会 (2015.6.30 石川県金沢市).
- Norihiro Kobayashi, Sho Tanaka, Makoto Ema, Yoshiaki Ikarashi, Akihiko Hirose: Evaluation of developmental toxicity of multi-wall carbon nanotubes in pregnant mice after repeated intratracheal instillation. Society for Risk Analysis 2015 Annual Meeting (2015.12.7 Arlington, VA, USA).
- 坂本義光、北條 幹、広瀬明彦、猪又明子、中江 大 (2016) 多層カーボンナノチューブを経気管反復投与したラットに見られた肺過形成病変に関する病理組織学的解析、

第 32 回日本毒性病理学会学術年会 (2016
年 1 月 香川県高松市)

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 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)

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）

分担研究報告書

研究課題：ナノマテリアル曝露による慢性及び遅発毒性評価手法の開発に関する研究
(H27-化学-指定-004)

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 室長

研究要旨

工業的に大量生産されるナノマテリアルの産業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の防止のための規制決定及び、業界における安全面からの国際競争力の保持の観点から、基礎的定量的な毒性情報を得る評価法の確立が急がれる。多層カーボンナノチューブ（MWCNT）の中皮腫誘発のポテンシャルに限っては、その粒子のサイズと形状が類似するアスベスト及び人工的繊維状代替物の発がん性評価に用いられた腹腔内投与試験系による比較的短期の試験により発がん性のハザード評価が可能であった。しかしながら、新規ナノマテリアルについては、たとえ原材料の毒性情報があったとしても、そのナノサイズによる毒性を評価し得る情報は一般的には存在せず、従って、ハザード評価や毒性発現メカニズムの想定は困難である。このような状況に於いては、毒性未知の物質を取り扱う基本的な戦略を適用する事で、見落としのない毒性評価を実施する必要がある。具体的には、ヒトで想定される暴露経路に即した動物実験によりハザード同定、メカニズム同定、及び用量作用情報の取得を行い、そこからヒトに対する毒性の推定と用量相関性の推定を行う必要がある。

当研究部では、上記の毒性試験を実施する際のナノマテリアル特有の問題点を解決する目的で、今までの諸研究からその物性や毒性の情報が利用可能な MWCNT をモデル物質として、高度分散法（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を独自開発した（Taquann 直噴全身吸入装置）。本装

置により、より一般的なナノマテリアルの高分散検体を比較的容易（従来の粉体吸入試験法の適用に比較して）に、マウス（ラットも原理的に可能である）に全身暴露吸入する目途が立った。

本研究では、サイズ、形状、組成が多彩で、異なった物理化学的特性を有する未検討の各種ナノマテリアル検体へ、Taquann 法及び直噴全身吸入装置を適用する際の具体的な微調整法を確立し、吸入毒性が評価可能であることを示すことを目的とする。本年度は、チタン酸カリウムを対象とし、① Taquann 法によるチタン酸カリウムのための①分散条件の調整、②エアロゾル化の際の機器パラメータ決定、及び、③肺沈着量測定のためのチタン酸カリウムの肺組織からの回収の方法の最適化を実施した。

チタン酸カリウムの繊維長及び繊維径の平均値は、それぞれ $4.5 \pm 3.9 \mu\text{m}$ （最大長 $27.9 \mu\text{m}$ ）、 $283 \pm 171 \text{ nm}$ 、（最大径 $1,743 \text{ nm}$ ）、単位重量当たりの繊維数は、 1.2×10^6 本/ μg であった。①については、チタン酸カリウムは Taquann 法処理と Taquann 直噴全身吸入装置 Ver2.5 により高度に分散したエアロゾル化が、MWCNT で設定した方法を全く変更することなく実現され、エアロゾルの繊維長の平均値、最大値は原本と同様の値であった。②については、エアロゾルの分散状態は現状のパラメータのまま問題なく達成されたが、直噴操作の間隔を MWCNT と同じに設定した場合、エアロゾルの濃度変動は MWCNT に比較して大きく、安定性が劣っていた。この原因として、チタン酸カリウムは MWCNT に比較して太く短い形状で比重が大きいことから沈降速度が高いことが原因と考えられた。対処法として、より短間隔で直噴操作を行うことで解決することとした。③については、上記②の条件でマウスに 2 時間全身暴露吸入し、肺病理組織標本を観察し、チタン酸カリウムを MWCNT と同様に、肺胞レベルまで到達すること、よって、吸入毒性を正しく評価できる条件が設定出来たことを確認した。同時に、肺沈着量の測定方法も確立した。以上より、本年度研究の成果として、次年度以降に本検体の吸入毒性評価を行うための条件設定を完了した。

A. 研究目的

工業的に大量生産されるナノマテリアルの産業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の防止のための規制決定及び、業界における安全

面からの国際競争力の保持の観点から、基礎的定量的な毒性情報を得る評価法の確立が急がれる。多層カーボンナノチューブ（MWCNT）の中皮腫誘発のポテンシャルに限っては、その粒子サイズか

ら予測される毒性発現メカニズムにより、アスベスト及び人工的繊維状代替物の発がん性評価に用いられた腹腔内投与試験系によるハザード評価が可能であった¹⁻³⁾。しかしながら、新規ナノマテリアルの多くについては事前に毒性情報は存在せず、毒性発現メカニズムの予測も困難である。このような状況に対しては、ヒトの暴露経路に即た動物実験によりハザード及びメカニズム同定、用量作用関係を明らかにし、ヒトに対する毒性の推定と用量相関性の推定を行う手法が有効である。ヒトがナノマテリアルに暴露される際の重要な侵入経路はそのエアロゾルの吸入である。従来、粉体の吸入暴露実験施設では、検体の特性に応じてエアロゾルを発生させる装置を新たに開発するか、大幅に改造する必要がある、時間と費用を要することが知られている。加えて、ナノマテリアルは容易に凝集する性質を有することから、ヒトが吸入可能な分散状態のエアロゾルの吸入である。従来、粉体の吸入暴露実験施設では、検体の特性に応じてエアロゾルを発生させる装置を新たに開発するか、大幅に改造する必要がある、時間と費用を要することが知られている。加えて、ナノマテリアルは容易に凝集する性質を有することから、ヒトが吸入可能な分散状態のエアロゾル化には、更なる技術開発や工夫が必要となることが多い。当研究部では、MWCNTをモデル物質と

しながら、汎用性が高いシステムを目指して、高度分散法（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を独自開発した（Taquann直噴全身吸入装置）⁴⁾。本装置により多層カーボンナノチューブMWNT-7の場合、凝集体・凝固体をほぼ除去した高分散検体をマウスに全身暴露吸入することが可能となった。

このシステムの汎用性を確認するためにより広範な物理化学的特性を示すナノマテリアルへの適用を検討するため、本研究では、本年度はチタン酸カリウムを対象に研究を進めた。

チタン酸カリウムは $K_2O \cdot 8TiO_2$ 、または $K_2O \cdot 6TiO_2$ で示される化合物でアスベスト代替繊維としてプラスチック等の補強材、自動車用ブレーキの摩擦調整剤、精密フィルターなどに産業応用されている。チタン酸カリウムはラット腹腔内投与実験により、中皮腫発癌を誘発することが報告されている⁵⁾。

B. 研究方法

B-1. チタン酸カリウムの繊維長、繊維径及び単位重量当たりの繊維数の測定

チタン酸カリウム（ $K_2O \cdot 8TiO_2$ ）（TISMO、大塚化学（株）、研究代表者より供与）は、高アスペクト比の繊維状粒子からなり、繊維長と繊維径は以下の方法で測定した。

ナノマテリアルの分散媒として汎用されるピロリン酸四ナトリウム溶液

(0.01molar Na₄P₂O₇, Sympatec GmbH) に100μg/mLの濃度でガラスバイアル中に、超音波 (SU-3TH、出力40W、発振周波数34kHz、柴田科学) を20秒間照射し、懸濁液とした。その1μLをアルミナフィルター (Anodisc、孔径0.02 μm、φ12mm、ワットマン) に滴下し、乾燥後に真鍮製SEM観察台 (S-GA、φ15×5 mm、日新EM) にカーボンシール (φ12 mm、日新EM) で固定した。オスミウムコーター (HPC-1 SW型、真空デバイス) により5秒間コーティングを行い、走査型顕微鏡 (VE-9800、KEYENCE) で2,500倍、加速電圧2~2.8 kVの条件下でフィルターの直径に沿って観察し画像を記録し、ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) を用いて約300粒子の繊維長と繊維径を求めた。

単位重量当たりのチタン酸カリウム繊維の本数 (C_t) は、懸濁液の調製量 (100 μL、V)、1 μLの懸濁液をフィルターに滴下して展開した面積 (S_t)、計測した繊維数 (C)、繊維数を計測した視野の面積 (S_c) を基に以下の式により計算した。

$$C_t = C \times \frac{S_t}{S_c} \times V$$

1 視野の面積は、1,818 μm²

(49.23×36.92 μm) である。なお、視野の辺縁に存在し、全長が確認できない繊維については計測対象から除外した。

B-2. 吸入暴露実験用の検体調製法の検討

チタン酸カリウムをエアロゾル化する

ため、当研究部にて開発した Taquann 法¹⁾の適用条件を検討した Taquann 法は、「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、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。

具体的には検体を三級ブタノール (TB、融点；25.69℃、関東化学株式会社 特級) に混合して、懸濁液を調製し、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検体を得られる。

チタン酸カリウムでは、ガラス製ボトルで200 mgの検体を500 mLのTBと混合後、超音波浴槽 (SU-3TH、出力40W、発振周波数34kHz、柴田科学) により超音波を1分間照射して懸濁液とし、金属製フィルターでろ過後、ろ液を直ちに液体窒素で凍結・固化させた。固相状態のろ液を溶媒回収型真空ポンプ (Vacubrand、MD4C NT+AK+EK) により減圧してTBを昇華させて除去し乾燥検体を得た。

B-3. エアロゾル化の検討

(1) ダスト発生装置

Taquann 処理検体のエアロゾル化には、既設の Taquann 直噴全身吸入装置