

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。H28年度は、昨年度に引き続き MWCNT と同様の形状を持つチタン酸カリウムを加えた研究を進めると共に、MWCNT 投与検体の熱処理や taquann 処理が、生殖発生毒性と発がん性に及ぼす影響の解析にとりかかった。

慢性影響評価研究において、チタン酸カリウムの 5 日間吸入曝露試験を行い、曝露時と同様の長さの繊維粒子が肺へ沈着していることを確認した。また、二層カーボンナノチューブの Taquann 法により 100-300nm 束状になった繊維ではあるが分散は可能であった。チタン酸カリウムの経気管肺内噴霧投与実験ではチタン酸カリウムによる中皮細胞の増殖を確認した。3 種の MWCNT の F344 ラットへの気管内単回噴霧投与(0.5mg/kg)の終生飼育実験では、どの MWCNT も肺には腫瘍あるいは中皮腫を誘発しないが、SD-1 および MWNT-7 投与群では、体腔での中皮腫誘発の可能性を示した。MWNT-7 のラット腹腔内投与により誘発される腹膜中皮腫の観察において、32 週間にわたって腹腔内の炎症反応やサイトカインの分泌が持続することと、16 週から 24 週間にかけて間質で線維化が進行することが確認できた。前処理として MWNT-7 を熱処理あるいは Taquann 処理を施し F344 雄性ラットに腹腔内単回投与した実験では、途中経過として処理にかかわらず高用量群で中皮腫によると思われる死亡が 27 週後から認められた。マウスに対する *in vivo* 肺小核試験法の確立に成功し、MWCNT はマウス肺小核試験で陽性と判定できた。

免疫影響に対する検討では、MWCNT 腹腔内投与後 1 年で観察される肝臓の分葉状変化はチタン酸カリウム投与では観察されなかった。腹腔マクロファージへの影響ではチタン酸カリウム投与群では M1 マクロファージへの分化、T-CNT 投与群では M2 マクロファージへの分化が亢進しており、両者で異なった影響を示すことが示唆された。感染性への影響に関してはチタン酸カリウム曝露マウスでは、感染 1 日後から肺胞洗浄液中の炎症性メディエーターの上昇や病理的な炎症形成の亢進も確認されたが、MWNT-7 に比べて線維化の程度は低く回復遅延も見られなかった。*in vitro* 試験系による検討では、4 種の MWCNT が IL-1 β 産生促進と同様に NLRP3 インフラマソーム活性化を介したマクロファージからの TNF α 産生を促進することを明らかにした。

発生影響に関する検討では、4 種類の MWCNT 懸濁液(未処理、熱処理、Taquann 処理、Taquann+熱処理)で発生毒性を検討したところ、昨年度観察された加熱処理による奇形性能の減弱作用は再現されなかったが、今年度の研究では、特に熱処理した MWCNT 群で胎児に発育抑制や受胎率低下傾向が認められ、投与検体の調製方法によって影響に差が現れることを示唆した。

H28年度に開催されたナノマテリアルの毒性評価手法に関する OECD や EU の活動における調査では、様々なナノマテリアル製品の評価に必要なグルーピング評価やリードアクロス評価手法を適用するために、*in vivo* 試験結果と代替試験法との関連づけを行うためのパラメータの同定が必要であることが指摘されていた。

研究分担者

菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所 客員
研究員
独立行政法人労働者健康安全機構
日本バイオアッセイ研究センター
所長

高橋 祐次 国立医薬品食品衛生研究所 毒
性部 室長

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 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 安全
性予測評価部 主任研究官

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

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

徐 結苟 名古屋市立大学大学 特任教授・安
徽省医科大学免疫学教室教授

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

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

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

Ahmed Maher Mahmoud El-Gazzar 名古屋
市立大学大学院医学研究科研究
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L S I メディエンス 技
術・学術顧問

高沢 博修 株式会社L S I メディエンス 主任
研究員

中川 宗洋 株式会社L S I メディエンス 主任
研究員

明石 敏 九州保健福祉大学薬学部 教授

吉田 裕樹 九州保健福祉大学薬学部 講師

宮内 亜宜 九州保健福祉大学薬学部 助教

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

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

坂本 義光 東京都健康安全研究センター
薬事環境科学部

山本 行男 東京都健康安全研究センター
薬事環境科学部

長谷川悠子 東京都健康安全研究センター
薬事環境科学部

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
教授

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、*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たが、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。また、投与検体を熱処理することによりその作用の強さが顕著に変化した催奇形性能への影響を検証するために、様々な前処理による催奇形性および発がん性への影響を検討した。

B. 研究方法

H28年度は、昨年度に引き続きMWCNTと同様

の形状を持つチタン酸カリウムを加えた研究を進めると共に、熱処理や Taquann 処理が、生殖発生毒性と発がん性に及ぼす影響の解析に取り掛かった。

慢性影響評価手法検討:

チタン酸カリウムの吸入曝露実験

C57BL/6NcrSLC 雄性マウス 12 週齢を使用し、対照群、および、チタン酸カリウム曝露群の 2 群構成で実験を行った。Taquann 法処理したチタン酸カリウムを Taquann 全身曝露吸入装置 Ver2.5 により、1 日 2 時間の吸入曝露を 5 日間連続で行い、合計 10 時間の曝露を行った。チタン酸カリウムの曝露濃度は、2 mg/m³ の MWNT-7 と繊維数を合わせた 5 mg/m³ を目標濃度とした。

二層カーボンナノチューブ(DWCNT)のエアロゾル化の検討

繊維長が極めて均一となる製法を用いた DWCNT の全身曝露吸入実験の準備として、Taquann 法による高分散化処理と Taquann 全身曝露吸入装置によるエアロゾル化の検討を行った。本年度は繊維長 15 μm の検体について検討を行った。(菅野、高橋)

チタン酸カリウムの経気管肺内噴霧投与方法の検討

F344 雄ラットを用い、無コーティング粒子状二酸化チタン直径 6nm アナターゼ型 TiO₂ (anTiO₂) と平均直径 15μm ルチル型 TiO₂ (ruTiO₂)、および、長さ 6.0 μm、直径 305 nm 線維状チタン酸カリウム(K₂O・8TiO₂) (POT) の肺と胸膜における炎症と障害作用を比較検討した。これらは Taquann 処理後、PF68 分散液に懸濁し、1 回/2 日の合計8回経気管肺内噴霧投与した。投与後の胸腔洗浄液における ALP、LDH の解析を行った。また胸腔細胞ペレットの病理検査、左肺の病理標本、右肺の細気管支肺胞洗浄液のサイトカイン種の mRNA 及び ELISA 解析に用いた(津田)。

MWCNT の気管内投与による発がん性の検討

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った(広瀬)。

MWCNT の腹腔内投与の経時変化の解析

MWNT-7 を 2%CMC 溶液に懸濁分散させ、1mg/kg 体重の用量で F344 雄性ラット(8週齢)の腹腔内に単回投与した。8・16・24・32 週間目後に病理学的検索と、腹腔洗浄液の各種液性因子の濃度測定を行った(広瀬)。

投与分散方法の違いによる発がん性の検討

MWNT-7 を熱処理あるいは Taquann 処理を施し、0.1%Tween80 に懸濁分散させ、1mg/kg 体重(高濃度)0と0.05mg/kg 体重(低濃度)で F344 雄性ラットに腹腔内単回投与し慢性観察試験を開始した。途中死亡例および瀕死屠殺例については、病理組織学的解析を行った(広瀬)。

肺小核試験法の検討

ナノマテリアルに対する in vivo 遺伝毒性評価手法開発研究の検討として、11 週齢の雄性 C57BL/6NCrSlc (SPF) マウスに、Taquann 法処理した検体(T-CNT)を 2 時間/日、5 日間連続の全身吸入暴露を行った。その後、動物をと殺し、肺組織から肺細胞を調整し、48 時間培養後、小核試験用のスライド標本作製し、染色後小核を観察した(本間)。

免疫影響評価法検討:

免疫システム全体への慢性的な影響

Taquann 処理した MWNT-7(T-CNT)及びチタン酸カリウムを雌 C57BL/6 マウスに腹腔内投与 12 ヶ月後の腹腔内浸出液、腸間膜リンパ節および脾臓における各免疫細胞分画についてフローサイトメーターにて解析した。さらに、血清イムノグロブリン分画を ELISA にて定量化した。(石丸)。

感染性免疫系への影響

Taquann 処理した度分散化 MWNT-7 とチタン酸カリウム($K_2O \cdot 8TiO_2$)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、感染 1,5 日後の肺病理組織および肺胞洗浄液(BALF)中のサイトカインレベルを測定した(渡辺)。

in vitro 試験系による検討

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-1 β 、TNF α 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、cathepsin B 阻害剤を用いて解析した(最上)。

発生影響評価法検討:

投与分散方法の違いによる発生毒性の検討

昨年度までの研究で、MWCNT 投与に用いる懸濁液の調製方法によって、形状や凝集状態が異なり、発生毒性も異なることが示唆されていたので、同一試料(MWNT-7)から調製方法の異なる 4 種類の MWCNT 懸濁液(未処理、熱処理、Taquann 処理および Taquann+熱処理)を調製し、これらを妊娠マウスに反復気管内投与して、試料の違いによる影響の差異について調べた。上記 4 種類の方法で調製した MWCNT 懸濁液および媒体(1%-CMS-Na 含有 PBS)を、いずれも 4 mg/kg の用量で ICR マウスに妊娠 6, 9, 12, 15 日に合計 4 回(合計 16 mg/kg)、イソフルラン麻酔下で気管内投与した。各投与群とも、妊娠 17 日に母動物および胎児の検査を行った。(小林、広瀬)

国際動向調査:

H28 年度に開催されたナノマテリアル毒性評価手法に関する OECD や EU の活動においてガイドンスやドキュメント、評価手法などの発案等に係る専門家会議などの国際動向を調査した。(広瀬、菅野、高橋)

<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では、各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:

チタン酸カリウムの吸入曝露実験

5 日間反復全身曝露吸入実験の平均質量濃度は $4.1 \pm 0.8 \text{ mg/m}^3$ 、平均 CPC カウントは $7,575 \pm 883/\text{cm}^3$ であった。直噴操作間隔を 4 分間にすることで濃度安定性が得られた。肺沈着量は $15.0 \mu\text{g}/\text{動物}$ であり、繊維数に換算すると 18.0×10^6 本/動物であった。肺に沈着した繊維長の平均値は $4.2 \pm 3.5 \mu\text{m}$ 、最長は $36.8 \mu\text{m}$ であった。

DWCNT のエアロゾル化の検討

Taquann 直噴全身吸入装置 Ver2.0 により DWCNT のエアロゾル発生は可能であった。エアロゾル化した DWCNT の形状を走査型電子顕微鏡で観察したところ、単離した繊維状のエアロゾルが観察されたが、 $100 \sim 300 \text{ nm}$ 程度の繊維径であることから、 100 本程度の DWCNT 単繊維が束状になったエアロゾルと考えられた。

チタン酸カリウムの経気管肺内噴霧投与方法の検討

肺胞上皮の PCNA ラベル率はアナターゼ型二酸化チタンとチタン酸カリウムにおいて 6h より 4w において対照群より有意の増加を示した。病理標本における肺胞の炎症の状態は、高用量群において無処置と生食対照群より明らかな炎症細胞浸潤の増強が見られた。投与後 6h で Mφ と好中球が主であったが、4w では線維化肉芽に Mφ、好中球、に加えリンパ球を主とする炎症細胞時計痔の繊維化が見られた。肺組織における CCL 種の mRNA 解析では、チタン酸カリウムが 6h と 4w において増加傾向を示した。BALF の解析では 4w において ALP 活性はチタン酸カリウムにおいて、LDH はアナターゼ型二酸化チタンとチタン酸カリウムに

増加した。胸腔細胞ペレットの解析では 4w と 6h において Mφ の胞体内に偏光レンズで把握されるすべての検体が見られた。

MWCNT の気管内投与による発がん性の検討

3 種の MWCNT の F344 ラットへの気管内単回噴霧投与 (0.5 mg/kg) の終生飼育実験 (投与後 156 週迄) においては、どの MWCNT も肺には腫瘍あるいは中皮腫を誘発しないが、SD-1 および MWNT-7 投与群では、体腔での中皮腫誘発の可能性を示した。

MWCNT の腹腔内投与の経時変化の解析

MWNT-7 の腹腔内投与により誘発されるラット腹膜中皮腫の経時的な観察において、少なくとも 32 週間にわたって腹腔内の炎症反応が持続し、腹膜周囲で CINC-1 や MCP-1 等の分泌が亢進することが示された。病理組織学的には、投与 8 週後より、観察期間を通して肉芽腫形成、中皮下組織の肥厚、肥満細胞および好酸球の集簇が腹膜全般に認められた。16 週から 24 週後にかけて、腹膜表層の組織球の集簇は減少し、間質で線維化が進行した。

投与分散方法の違いによる発がん性の検討

MWNT-7 を熱処理あるいは Taquann 処理を施し F344 雄性ラットに腹腔内単回投与し前処理が MWCNT の腹腔内投与発がん性に与える影響を検討した実験において、投与後 44 週が経過し、低濃度群および対照群を除く各処理を施した MWCNT 投与群で、中皮腫によると思われる死亡が 27 週後から認められた。

肺小核試験法の検討

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、CNT 暴露群は対照群と比較して、小核をもつ細胞の有意で明らかな高値が認められた。陽性対照 (EMS) においても小核をもつ細胞の有意な高値がみられた。CNT 暴露群の小核誘発頻度は EMS 投与群と比較して約 2.6 倍の高値を示した。以上の結果から、MWCNT は in vivo-in vitro 法を用いた本試験条件下でマウス肺小核試験で陽性と判定された。

免疫影響評価法検討:

免疫システム全体への慢性的な影響

T-CNT 及びチタン酸カリウムの腹腔内投与後 1 年での腹腔内所見として、投与では、T-CNT 投与で観察される肝臓の分葉状変化はチタン酸カリウム投与では観察されなかった。T-CNT 及びチタン酸カリウムの腹腔内投与で、それぞれ M1、M2 マクロファージ分化に大きな相違があった。さらに、T-CNT 及びチタン酸カリウムの腹腔内投与で、腸間膜あるいは脾臓への炎症の波及が確認された。加えて、T-CNT 及びチタン酸カリウムの腹腔内投与後 1 年で、Th1 型の免疫反応あるいは抗体産生が亢進する可能性が示された。

感染性免疫系への影響

MWNT-7 曝露マウスの感染 1 日後の肺免疫組織像では、抗 CCL 抗体 3 陽性細胞数の増加が認められたが、MWNT-7 貪食細胞とは異なっていた。感染 14 日後の肺組織をマッソン染色法で解析したところ、肺胞壁の一部線維化が見られ、肺炎回復期での遅延が確認された。一方、チタン酸カリウム曝露マウスでは、感染 1 日後の肺胞洗浄液中の炎症性メディエーターの上昇が認められ、貪食細胞周囲での炎症形成の亢進も確認されたが、線維化の程度は低く、明確な回復遅延は見られなかった。

in vitro 試験系による検討

長さや径の異なる各種多層カーボンナノチューブ MWCNT-WL、-WS、-T および SD1 をマクロファージに曝露し、昨年度報告の IL-1 β 産生促進と同様に、いずれの MWCNT も強力に TNF α 分泌も促進することを見いだした。TNF α 分泌についても IL-1 β 産生の場合と同様に、NLRP3 と caspase-1、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:

投与分散方法の違いによる発生毒性の検討

本試験条件下では、MWCNT のいずれの調製方

法(未処理、熱処理、Taquann 処理および Taquann+熱処理)においても、その 4 mg/kg 反復投与(妊娠期間を通じて 16 mg/kg)によって、母動物に対する体重増加抑制または摂餌量減少が認められた。また、熱処理あるいは Taquann+熱処理された MWCNT の投与によって、胎児に発育抑制が認められた。本試験で認められた母動物および胎児に対する影響は、特に熱処理された MWCNT の投与によって顕著に認められた。さらに、熱処理された MWCNT の投与によって、受胎率が低値傾向を示し、妊娠早期(着床または胚の発生)に何らかの影響を及ぼす可能性が示唆された。なお、外表検査において、MWCNT の催奇形性は判断できなかった

国際動向調査

OECD WPMN Expert Meeting on Grouping and Read-Across for the Hazard Assessment of Manufactured Nanomaterials(H28年4月、ブリュッセル)は、OECDのWPMNプログラムの一環としてナノマテリアルの有害性評価における、グループ評価とリーアクロス手法の適用を検討するために開催されることとなった専門家会合。当該会議には、当研究班で様々なMWCNTを用いて、腹腔内投与などやin vitro実験を行ってカテゴリー評価を行った研究成果を紹介した。本会議の主要なアウトプットは、ナノマテリアルの有害性評価におけるデータギャップを埋めるためには、グルーピングとリーアクロス手法は必要であり適切なツールであることであった。Joint scientific conference of ProSafe & OECD(H28年11-12月、パリ)は、OECD主催でオランダのインフラ・環境省が調整し、EU H2020プロジェクト ProSafe がホストした会議であると同時に EUNANoREG の最終会議でもあった。会議の結果は、ナノ物質の影響とリスクをどのように試験・評価するかについて、政策立案者、規制当局、産業界に ProSafe プロジェクトから勧告するために基礎となる。ヒト健康に関する in vivo データの評価に関しては、現存の吸入試験は、ナノマテリアルの評

価に適用できるが、可能であれば肺負荷量を計測し、グルーピングのパラメータとして検討する他に代替試験法の開発に重要な因子となることが確認された。New tools and approaches for nanomaterial safety assessment(H29年2月, マラガ)は、EUのFP7プロジェクトで行われたナノマテリアルの安全性にかかわる5つのプロジェクトNANOSOLUTIONS、GUIDEnano、SUN、NanoMILE、eNanoMapperが共同での今後の研究プログラムの可能性に関する議論を促進するためにこれまでのプロジェクト成果を発表していた。

D. 考察

慢性影響に関する研究に関しては、昨年度の研究において、チタン酸カリウムは、MWNT-7に比較して太く短く比重が大きいことから沈降速度が高く、同条件ではエアロゾル濃度を安定的に維持することが困難であることが判明した。本年度はより短間隔で直噴操作を行うプロトコルに変更し安定した濃度が得られた。チタン酸カリウムの肺沈着量の繊維数は 2 mg/m^3 のMWNT-7とほぼ同様な値であり、MWNT-7と同程度の繊維数を負荷するという目的は達成されたものと評価される。DWCNTのエアロゾル化は可能であったが、エアロゾルの粒子の中には束状のDWCNTが含まれており、触媒として用いられている鉄を塩酸により除去する、または、より強力な超音波処理の実施など、分散化処理に更なる検討が必要であることが判明した。

チタン酸カリウムの経気管肺内噴霧投与方法の検討において、すべての検体は肺から胸腔への移動し、M ϕ の数は、肺から胸腔の炎症象はアナターゼ型二酸化チタニウムとチタン酸カリウムにより顕著で、中皮細胞増殖もチタン酸カリウムにより顕著にみられた。以上からチタン酸カリウムには発癌性の可能性について、さらに長期の検索を進めている。

3種のMWCNTの気管内単回噴霧投与の終生飼育実験から、今回の条件下においては、MWCNTは呼吸器系の腫瘍あるいは中皮腫を誘

発しないが、SD-1およびMWNT-7投与群では、体腔での中皮腫誘発の可能性を示した。日機装のMWCNTの単回気管内投与により、体腔内に中皮腫を有意に発現した報告を再現していると考えられる。

MWCNTの腹腔単回投与後では経時観察から、長期間わたって炎症反応が持続することが示された。一方投与16から24週後の時期は、障害修復に関連した反応が減弱し、中皮細胞の増殖が開始するため、この時期が中皮腫発症に関連した質的变化が起こる時期と推察される。

熱処理MWCNTの腹膜中皮腫誘発性については実験が継続中であるが、催奇形性とは異なり、熱処理によりMWCNTの毒性が顕著に変化することは無いと考えられる。投与104週後まで実験を継続し、生存率および生存曲線の解析あるいは病理組織学的解析から、熱処理およびTaquan処理の影響を分析する予定である。

in vivo肺小核試験法の確立を目指した基礎検討では、肺細胞の分離が重要であることが推定され、予備実験として、分離酵素として、トリプシン、コラゲナーゼ、エラスターゼの3種類の酵素を使用し肺細胞を分離し、細胞培養後に作製した標本の状態を比較した。その結果、作製した標本の状態はトリプシン、エラスターゼ、コラゲナーゼの順に良好であった。これらの結果から、本実験ではトリプシンを使用した。

免疫系への慢性影響について、チタン酸カリウムとMWCNTを比較すると、MWCNTの線維化を伴う腹膜炎の誘導能は高く、両者で腹腔内のマクロファージ分化が異なり、慢性炎症への機転も異なっていることが判明した。ナノマテリアルの種類によって免疫システムへの影響は異なっており、T-CNTの暴露は炎症の遷延化につながる可能性が高いことが示唆された。

感染性免疫への影響について、チタン酸カリウムはその特徴的な針状の構造から、MWNT-7と同様な作用が予想され、実際に感染初期から炎症性のメ

ディエーターの上昇が確認されたが、回復期への作用は MWNT-7 より軽度であり、肺組織での蓄積性などが低いことが強く示唆された。

発生影響に関する検討では、昨年度観察された加熱処理により催奇形性能が減弱する影響は再現されなかったが、今年度の研究で母動物および胎児への影響は、投与した MWCNT の調製方法によって有意な差がみられた。MWCNT のサイズ分布や分散状態によって発生毒性に差がみられることが示唆されたが、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ており、今後は、各 MWCNT 懸濁液の特性についてさらに詳細に検討する必要があると考えられる。

また、今回、外表検査に MWCNT の催奇形性は確認できなかったが、過去に実施した試験では、未処理 MWCNT の 4 mg/kg 投与で内臓異常および骨格異常を伴う胎児の発生率が有意な高値を示しており、当該試験の内臓および骨格検査においても同様の変化が生じる可能性が考えられたことから、今後は内臓および骨格検査を行い、内臓および骨格への影響を確認する必要があると考えられる。

国際動向調査では、様々なナノマテリアル製品を現実的に評価するために、グルーピング評価やリードアクロス評価手法を使う必要があることは、基本的な認識として定着していることが示された。さらに、現実的な評価のために in vitro や短期の試験系が必要であるが(長期間の)in vivo 試験結果との間をつなぐパラメータの同定には至っていないのも現状であることが認識されている。OECD_WPMN では、炎症反応などを標的とした AOP(毒性発現経路)の開発プロジェクトが開始されているが、ナノマテリアルによって引き起こされる慢性影響のメカニズム解析を行うことが、今後の効果的な評価系の確立にもっとも重要なことであると再認識できた。

E. 結論

H28 年度は、昨年度に引き続き MWCNT と同

様の形状を持つチタン酸カリウムを加えた研究を進めると共に、MWCNT 投与検体の熱処理や taquann 処理が、生殖発生毒性と発がん性に及ぼす影響の解析にとりかかった。

慢性影響評価研究において、チタン酸カリウムの 5 日間吸入曝露試験を行い、曝露時と同様の長さの繊維粒子が肺へ沈着していることを確認した。また、二層カーボンナノチューブの Taquann 法により 100-300nm 束状になった繊維ではあるが分散は可能であった。チタン酸カリウムの経気管肺内噴霧投与実験ではチタン酸カリウムによる中皮細胞の増殖を確認した。3 種の MWCNT の F344 ラットへの気管内単回噴霧投与(0.5mg/kg)の終生飼育実験においては、どの MWCNT も肺には腫瘍あるいは中皮腫を誘発しないが、SD-1 および MWNT-7 投与群では、体腔での中皮腫誘発の可能性を示した。MWNT-7 のラット腹腔内投与により誘発される腹膜中皮腫の観察において、32 週間にわたって腹腔内の炎症反応やサイトカインの分泌が持続することと、16 週から 24 週間にかけて間質で線維化が進行することが確認できた。前処理として MWNT-7 を熱処理あるいは Taquann 処理を施し F344 雄性ラットに腹腔内単回投与した実験では、途中経過として処理にかかわらず高用量群で中皮腫によると思われる死亡が 27 週後から認められた。マウスに対する in vivo 肺小核試験法の確立に成功し、MWCNT はマウス肺小核試験で陽性と判定できた。

免疫影響に対する検討では、MWCNT 腹腔内投与後 1 年で観察される肝臓の分葉状変化はチタン酸カリウム投与では観察されなかった。腹腔マクロファージへの影響ではチタン酸カリウム投与群では M1 マクロファージへの分化、T-CNT 投与群では M2 マクロファージへの分化が亢進しており、両者で異なった影響を示すことが示唆された。感染性への影響に関してはチタン酸カリウム曝露マウスでは、感染 1 日後から肺胞洗浄液中の炎症性メディエーターの上昇や病理的な炎症形成の亢進も確認されたが、

MWNT-7 に比べて線維化の程度は低く回復遅延も見られなかった。*in vitro* 試験系による検討では、4 種の MWCNT が IL-1 β 産生促進と同様に NLRP3 インフラマソーム活性化を介したマクロファージからの TNF α 産生を促進することを明らかにした。

発生影響に関する検討では、4 種類の MWCNT 懸濁液 (未処理、熱処理、Taquan 処理および Taquan+熱処理) に対する発生毒性の差異を検討したところ、昨年度観察された加熱処理による奇形性能の減弱作用は再現されなかったが、今年度の研究では、特に熱処理した MWCNT 群で胎児に発育抑制や受胎率低下傾向が認められ、投与検体の調製方法によって影響に差が現れることを示唆した。

H28 年度に開催されたナノマテリアルの毒性評価手法に関する OECD や EU の活動における調査では、様々なナノマテリアル製品の評価に必要なグルーピング評価やリードアクロス評価手法を適用するために、*in vivo* 試験結果と代替試験法との関連づけを行うためのパラメータの同定が必要であることが指摘されていた。

F. 健康危機情報

該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- 菅野 純、ナノマテリアル毒性のとらえ方とその難しさ、医学のあゆみ、259 巻 3 号、217-222、2016
- 高橋祐次、高分散型小型全身曝露吸入システムによるマウス吸入毒性-ヒトの現実的な曝露シナリオに基づいた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、医学のあゆみ、259 巻 3 号、234-240、2016
- 津田洋幸 カーボンナノチューブの肺と胸膜中皮に対する毒性と発がん性の簡易評価法、医学のあゆみ、vol.259 No. 3、223-227、2016

石丸直澄 ナノマテリアルと免疫システム 医学のあゆみ 259:241—246, 2016

Suzui M, Futakuchi M, Fukamachi K, Numano T, Abd Elgied M, Takahashi S, Ohnishi M, Omori T, Tsuruoka S, Hirose A, Kanno J, Sakamoto Y, Alexander DB, Xu J, Tsuda H. Multiwalled carbon nanotubes intratracheally instilled into the rat lung induce development of pleural malignant mesothelioma and lung tumors. *Cancer Sci*, doi: 10.1111/cas. 12954, 2016.

Horibata K, Ukai A, Ogata A, Nakae D, Ando H, Kubo Y, Nagasawa A, Yuzawa K, Honma M. Absence of *in vivo* mutagenicity of multi-walled carbon nanotubes in single intratracheal instillation study using F344 gpt delta rats. *Genes Environ.* 39:4 doi: 10.1186/s41021-016-0065-5. eCollection, 2017

Shigemoto-Mogami Y, Hoshikawa K, Hirose A, Sato K., Phagocytosis-dependent and independent mechanisms underlie the microglial cell damage caused by carbon nanotube agglomerates. *J Toxicol Sci.* 41, 501-509. 2016.

2. 学会発表

Akihiko Hirose, Yoshimitsu Sakamoto, Tomoko Nishimaki-Mogami, Yuhji Taquahashi, Takashi Yamada, Tetsuji Nishimura, Akiko Inomata, Dai Nakae, Hiroyuki Tsuda and Jun. Analysis of size-dependent carcinogenic potential of multiwalled carbon nanotubes. *Global Cancer: Occurrence, Cause, and Avenues to Prevention. IARC 50th Anniversary Conference (2016.6), Lyon, Poster.*

新垣理恵子、山本安希子、常松貴明、工藤保誠、菅野純、石丸直澄: 全身吸入曝露による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 105 回日本病理学会総会 2016 年 5 月 仙

台

石丸直澄、山田耕一、斉藤雅子、新垣理恵子、高橋祐次、菅野純: ナノマテリアルの免疫制御システムへの影響 第 43 回日本毒性学会シンポジウム(ナノマテリアルの実用化に呼応した有害性評価の進捗) 2016 年 6 月 名古屋

北條幹、坂本義光、山本行男、長谷川悠子、多田幸恵、久保喜一、長澤明道、海鋒藤文、高橋博、湯澤勝廣、安藤弘、田中和良、矢野範男、藤谷知子、小縣昭夫、猪又明子、広瀬明彦、中江大: MWCNT によるラット中皮腫誘発過程の経時的解析. 第 43 回日本毒性学会学術年会(2016 年 6 月 29 日~7 月 1 日)名古屋市

坂本義光、広瀬明彦、中江大: 多層カーボンナノチューブ(MWCNT)を経気管反復投与したラットに見られた肺胞過形成病変に関する病理組織学的解析. 第 75 回日本癌学会学術総会(2016 年 10 月 6 日~8 日)横浜市

高橋祐次、小川幸男、高木篤也、辻 昌貴、森田 紘一、今井田 克己、菅野 純、MWCNT のマウス全身暴露吸入における原末と高分散処理検体(Taquann 法)の肺沈着量の比較、第 34 回日本毒性学会、名古屋、(2016.7.1)、一般演題(口演)

Jun Kanno, Nanomaterials safety: Predicting their long-term effects by in vivo studies., The 14th International Nanotech Symposium & Nano-Convergence Expo (NANO KOREA 2016) (2016.7.14), Korea, 基調講演

相磯成敏、梅田ゆみ、笠井辰也、妹尾英樹、高信健司、斎藤美佐江、福島昭治、菅野純、MWNT-7 吸入暴露で誘発されたラット肺病変の経時的解析、第 31 回発癌病理研究会(2016.8.23)、長野、口演

Kanno J, Taquahashi Y, Introduction to Nanomaterials safety: Predicting the chronic effects. XIV International Congress

of Toxicology (ICT2016)Merida-Mexico, (2016.10.3), Symposium

Taquahashi, Atsuya Takagi, Yukio Ogawa, Koichi Morita, Masaki Tsuji, Katsumi Imaida, Jun Kanno, Level of dispersion of MWCNT aerosol affects the lung burden and lung lesion in whole body inhalation study, XIV International Congress of Toxicology Merida-Mexico, (2016.10.5), Oral Hirose A, Cui H, Ema M, Kanno J, Tsuda H, Nishimaki-Mogami T, Comparison with the NLRP3 inflammasome activations in THP-1 cells by various nanomaterial. XIV International Congress of Toxicology, Merida, Mexico, (2016.10), Poster.

Tsuda H, Alexander DB, Alexander WT, AbdElgied M, ELGazzar A, Xu J, Numano T, Suzui M, Futakuchi M, Fukamachi K, Hirose A, Kanno J, Development of a Mechanism Based Short-term Assay Protocol to Test Carcinogenicity of Multiple Wall Carbon Nanotubes (MWCNTs) in the Rat. XIV International Congress of Toxicology, Merida, Mexico, Oct. 2-6, 2016.

Jun Kanno, Yuhji Taquahashi¹, Atsuya Takagi¹, Masaki Tsuji¹, Koichi Morita¹, Yukio Ogawa, Shigetoshi Aiso, Yumi Umeda, Tatsuya Kasai, Hideki Senoh, Kenji Takanobu, Misae Saito, Shoji Fukushima, Nanomaterials safety: Predicting their long-term effects by in vivo studies., Inhalation Toxicity Test Advisory Council, Korea Occupational Safety and Health Agency (KOSHA). Seoul, Korea, Invited

Tsuda H, Xu J, Alexander DB, Alexander WT, Mohamed Abd El-gied, Suzui M, Futakuchi M, Fukamachi K, Numano T, Takahashi S, Ohnishi M, Hirose A, Kanno J, Development of a series of assay model of

toxicity and carcinogenicity of carbon nanotubes. 2016 Korean Association for Laboratory Animal Science, 慶州, Korea, Aug. 24-26, 2016

加藤雄大、橋口誠子、権藤喜貴、宮内亜宜、明石敏、吉田裕樹、杉田千泰、黒川昌彦、渡辺 渡
チタン酸カリウム曝露の RSV 肺炎への影響 第 64 回日本ウイルス学会総会、P2-091 札幌コンベンションセンター 2016 年 10 月 24 日

権藤喜貴、橋口誠子、加藤雄大、宮内亜宜、明石敏、吉田裕樹、杉田千泰、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 RSV 感染初期応答への影響 第 64 回日本ウイルス学会総会、P2-092 札幌コンベンションセンター 2016 年 10 月 24 日

新垣理恵子、山田耕一、牛尾綾、黒澤実愛、大塚邦紘、齋藤雅子、常松貴明、工藤保誠、石丸直澄: Immunological and toxicological effect of multi-wall carbon nanotubes by whole body inhalation exposure in B6 mice. 第 45 回日本免疫学会総会学術集会、2016 年 12 月 沖繩

齋藤雅子、大塚邦紘、新垣理恵子、山田耕一、石丸直澄: Toxicological effect of peritoneal exposure to multi-walled carbon nanotubes on immune system. 第 45 回日本免疫学会総会学術集会、2016 年 12 月 沖繩

Kobayashi N, Tanaka S, Ikarashi Y, Hirose A., Developmental toxicity assessment of various sizes of multiwall carbon nanotubes in mice after repeated intratracheal instillation to initiate grouping and read across. Society of Risk Analysis 2016 Annual Meeting. San Diego, U.S.A., Dec 11-15, 2016.

北條幹、坂本義光、山本行男、長谷川悠子、多田幸恵、湯澤勝廣、広瀬明彦、猪又明子、中江大: 多層カーボンナノチューブによるラット中皮腫誘発過程の経時的観察. 第 33 回日本毒性病理

学会学術集会(2017 年 1 月 26 日~27 日)堺市
坂本 義光, 北條 幹, 広瀬 明彦, 猪又 明子, 中江 大: ラットにおける多層カーボンナノチューブ (CNT) の発がん性と phenyl N -tert-butyl nitro (PBN) 併用が及ぼす影響. 第 33 回日本毒性病理学会学術集会(2017 年 1 月 26 日~27 日)堺市

寺田央子、加藤雄大、橋口誠子、権藤喜貴、広瀬明彦、宮内亜宜、明石 敏、吉田裕樹、杉田千泰、黒川昌彦、渡辺 渡
チタン酸カリウム曝露の RSV 肺炎への影響 日本薬学会第 137 年会、27PB-am155、2017 年 3 月、仙台国際センター

渡辺 渡、権藤喜貴、橋口誠子、加藤雄大、広瀬明彦、宮内亜宜、明石 敏、吉田裕樹、杉田千泰、黒川昌彦
多層型カーボンナノチューブ曝露による RSV 感染初期応答への影響 日本薬学会第 137 年会、27PB-am154、2017 年 3 月、仙台国際センター

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

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、登録番号: 第 6051427 号(2016.12.9)

2. 実用新案登録 (該当なし)

3. その他

ISO TC 229/SC /WG 3

Nanotechnologies- Aerosol generation for NOAA (nano-objects and their aggregates and agglomerates) air exposure studies. 6.5 Liquid Phase Filtration/Dispersion – Critical Point Drying (Tertiary Butyl Alcohol Sublimation) and Direct Injection System for whole body inhalation studies