

平成29年度厚生労働行政推進調査事業費補助金
(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

本研究では、これまでにカーボンナノチューブを中心に確立してきた慢性影響や免疫影響、発生影響について、試験系の開発に必要なメカニズム研究を進めると共に、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分散処理技術としての Taquann 法の応用可能性を検証すること、投与検体の前処理等による分散性の違いが有害性反応に及ぼす影響を検討することを目的としている。H29 年度は、慢性影響に関する研究に関して、Taquann 法で分散したチタン酸カリウムと繊維長の異なる 3 種類(平均 1、7、15 μm)の二層ナノチューブ(DWCNT)の長期試験を開始すると共に、MWNT-7 の前処理の違いによる腹腔内投与慢性実験、MWNT-7 による *in vivo* 肺小核試験の確認試験を行った。免疫影響に関する研究に関しては、チタン酸カリウムと 3 種類の DWCNT におけるリンパ球表面マーカーの慢性影響と感染性への影響の比較を行った。発生毒性に関する検討では、気管内投与懸濁液に対する MWCNT の前処理が発生毒性に及ぼす影響を検討した。また、ナノマテリアルの毒性評価手法に関する OECD の動向調査を行った。

慢性影響評価研究において、3 種類 DWCNT 1、7、15 μm の単回吸入曝露試験を行い、それぞれ 0.49、0.51 及び 0.57 mg/m^3 の濃度で吸入させ、15 μm の曝露肺では DWCNT がマクロファージに貪食された繊維を観察できた。チタン酸カリウムおよび DWCNT の経気管肺内噴霧投与方法の検討では、チタン酸カリウムの 52 週投与群で胸膜中皮の過形成が観察された。3 種の DWCNT については 1 匹あたりの 21×10^{12} 本/ラットの投与量で慢性試験を開始した。ラットに分散処理の方法を変えた(原末、熱処理、Taquann 処理、および両者の組み合わせ)MWNT-7 を腹腔投与した検討では、中皮腫の発症時期や重篤度について分散処理の違いによる差異は認められなかった。前年度までに確立したマウスに対する *in vivo* 肺小核試験法(Taquann 法処理による直噴全身曝露吸入システム、2 時間/日、5 日間連続の全身吸入曝露)において、MWCNT は陽性を示すことが確認できた。免疫影響に対する検討では、クロドロン酸リポソームの処理によりマクロファージが機能不全の状態での MWCNT 曝露はマクロファージを起点とした生体防御反応に大きな影響を及ぼす可能性が示された。MRL/lpr マウス(自己免疫疾患モデル)への MWNT とチタン酸カリウム投与の比較では腹腔内滲出細胞中のマクロファージの細胞数、フェノタイプが大きく異なっていた。DWCNT は MWCNT に比較して腹腔内での曝露反応は低いものと考えられ、DWCNT の処理反応にはスカベンジャー受容体が発現していることが示された。DWCNTs 曝露により、RSV 感染 5 日後のマウスでは肺胞壁の腫張やリンパ球の浸潤など肺炎は MWNT-7 と同様に増悪化し、最も

短い DWCNT-1(1 μm)でその効果が高く MWNT-7 と同等かやや強かった。in vitro 試験系による検討では、4種の MWCNT による TNF α 産生の促進は、IL-1 β のオートクラインによる機構が示された。3種の DWCNT(1, 7.5, 15 μm)は NLRP3 を介して IL-1 β 産生を促進したが、TNF α 分泌はむしろ低下させた。発生影響に関する検討では、MWCNT 投与群で、妊娠 15 日目の胎児毒性として、胎児重量の減少が認められ、対照群に比べ熱処理群、原末群、Taquann 処理群の順に減少量が多かった。反復気管内投与による母動物および胎児への影響でも、分散液の調製方法(分散状態)によって差が見られることが、内臓・骨格検査からも確認された。また、今回検査した項目のうち骨化遅延が最も鋭敏な指標であると考えられた。国際動向調査では、OECD 吸入試験法のガイドライン TG412 と TG413 がナノマテリアル評価に適応した改定が承認され、さらにナノマテリアル作業会合では EU が行っている OECD テストガイドラインの改訂や新規の作成作業を促進するプロジェクト活動を受けて 7 つの新規プロジェクトが提案された。

ナノマテリアルの評価手法としての吸入曝露および気管内投与手法、in vitro 評価系において、MWCNT、チタン酸カリウムや二層ナノチューブに Taquann 法を用いて、各種エンドポイントの評価が可能であることを示すことができた。今後は、本研究で確立した in vivo 試験法等を生かして、より短期の吸入曝露や気管内曝露試験法、in vitro 評価系試験法から慢性影響を評価できることを示すデータを積み上げて OECD 等に提案できるような実証研究を行っていくことが必要であると考えられた。

研究分担者

菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所 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 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 生化
学部 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

北條 幹 東京都健康安全研究センター
薬事環境科学部 主任研究員

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
医学研究科博士課程院生

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

濱田 修一 株式会社LSIメディエンス

高沢 博修 株式会社LSIメディエンス
 中川 宗洋 株式会社LSIメディエンス
 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 准教授
 牛尾 綾 徳島大学大学院医歯薬学研究部 助教
 大塚 邦紘 徳島大学大学院医歯薬学研究部
 大学院生
 坂本 義光 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
 村上 詩歩 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
 前野 愛 東京都健康安全研究センター
 薬事環境科学部

清水 本武 東京都健康安全研究センター
 薬事環境科学部
 大貫 文 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
 鈴木 俊也 東京都健康安全研究センター
 薬事環境科学部 研究科長
 猪又 明子 東京都健康安全研究センター
 薬事環境科学部 参事研究員
 中江 大 東京農業大学 応用生物科学部
 教授
 山口 治子 国立医薬品食品衛生研究所 安
 全性予測評価部 研究助手
 牛田 和夫 国立医薬品食品衛生研究所 安
 全性予測評価部 研究員
 鈴木 洋 国立医薬品食品衛生研究所 安
 全性予測評価部 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。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

H29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と二層カーボンナノチューブ(DWCNT)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を行った。

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

二層カーボンナノチューブ(DWCNT)の吸入曝露

前年度に確立した吸入曝露手法により繊維長が均一となる製法で作成したDWCNT(岡山大学 林靖彦先生が開発)の繊維長が3種類の1 μm 、7 μm 及び15 μm のナノチューブについてTaquann全身曝露吸入装置によるマウスに2時間の単回吸入ばく露を実施した。(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・アナターゼ型二酸化チタン(球状・直径 6nm) (an)とコーティング・ルチル型二酸化チタン(長球形・直径 10-20 μm) (ru)、およびチタン酸カリウム($\text{K}_2\text{O} \cdot 8\text{TiO}_2$) (線維状・平均長 6.0 μm 、直径 305 nm) (POT)の TIPS 投与肺と胸膜における炎症と障害作用の慢性試験を行っている。また、3種類のDWCNTは(1.5、7.0、15 μm)をPOTと同じ方法にて、1匹あたりの投与量は 21×10^{12} 本/ラットにて投与した群についても、慢性試験を行っている。(津田)。

投与分散方法の違いによる発がん性の検討

MWCNTの気管内投与によるラット腹膜中皮腫の誘発能が、試料の前処理によって影響を受けるかどうかを調べるため、MWNT-7の原末、250 $^{\circ}\text{C} \cdot 2$ 時間の熱処理あるいはTaquann処理を施した試料を組み合わせた処理を施したMWNT-7を、1

mg/kg体重でF344ラットに腹腔単回投与し、途中死亡例・瀕死例について剖検し中皮腫の有無を評価した。(北条、広瀬)。

肺小核試験法の検討

11週齢の雄性C57BL/6NCrSlc(SPF)マウスを用いた。各群5匹とし、陰性対照群、陽性対照群(EMS)およびCNT曝露群の合計15匹を使用した。Taquann法処理により凝集体・凝固体を除去した高分散検体(T-CNT)を直噴全身曝露吸入システムより、2時間/日、5日間連続の全身吸入曝露を行った。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を作製し、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

H29年度はナノマテリアル曝露に伴う免疫制御システムへの影響を検討するために、3つの実験を実施した。まず、正常B6マウスを用いて、クロドロン酸リポソーム投与とT-CNT及びTiの曝露を組み合わせ、生体内でマクロファージが機能不全に陥った状態での免疫系への変化を検討した。次に、自己免疫疾患モデルであるMRL/lprマウスを用い、T-CNTとTi腹腔内投与による両者の比較検討を実施した。最後に、繊維長の異なる2層化カーボンナノチューブを正常B6マウスに腹腔内投与することによる免疫反応を検討した。腹腔内臓器を中心に病理組織学的解析、腹腔滲出液細胞を用いたフローサイトメーター解析、腹腔洗浄液を用いたマルチプレックス解析、各種サイトカインなどのmRNA発現を定量RT-PCR法にて検討した。(石丸)。

感染性免疫系への影響

3種類の長さの異なる二層カーボンナノチューブDWCNT-1(1 μm)、DWCNT-7(7 μm)、DWCNT-15(15 μm)とMWNT-7(Taquannサンプル)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 および 5 日後において、肺胞洗浄液 (BALF) と肺病理組織標本を作製した。BALF 中のサイトカイン等は ELISA にて、また BALF への浸出細胞は塗抹標本を作製して解析した。(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。各種 MWCNT・DWCNT 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、IL-1 受容体と NF κ B の関与は阻害剤により解析した(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

MWCNT の気管内投与によるマウス発生毒性が、試料の前処理によって影響を受けるかどうかを調べるため、MWNT-7 の原末、250°C・2 時間の熱処理あるいは Taquann 処理を施した試料を、ICR 系の妊娠マウスに 4 mg/kg 体重で 3 回気管内投与し(妊娠 6, 9, 12 日目)、妊娠 15 日目に剖検し、胎児検査を行うとともに、母体の肺毒性を評価した。

また、上記と同様に調製方法の異なる 4 種類の MWNT-7 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も調べた。昨年度に実施した外表検査までの結果においては、MWCNT の催奇形性は判断できなかったが、今年度は、上記の試験で得られた試料を用いて母動物の肺の病理検査および胎児の内臓および骨格検査を行い、内臓および骨格への影響について確認した。(小林、北條、広瀬)

国際動向調査:

H29 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 の工業用ナノマテリアル作業グループ会合や、専門家によるメール会議やドラフ

トのコメント対応をとおして OECD や EU 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:

DWCNT の吸入曝露実験

2 時間の単回全身曝露吸入実験の平均質量濃度は、1 μ m DWCNT、7 μ m DWCNT、15 μ m DWCNT 曝露群それぞれについて 0.49 mg/m³、0.51 mg/m³ 及び 0.57 mg/m³ であり、エアロゾル粒子数の平均値は、76/mL、83/mL、145/mL であった。マウスの吸入曝露肺では、15 μ m DWCNT の検体において数は少ないものマクロファージに貪食された繊維が観察されたが、1 及び 7 μ m の検体においては光学顕微鏡で検出が困難であった。

チタン酸カリウムのおよび DWCNT の経気管肺内噴霧投与方法の検討

チタン酸カリウムの 52 週投与群では、肺 M ϕ 数は減衰するものの溶媒軍より高値あった。一方、PLF のタンパク量、臓側胸膜中皮の PCNA は 3w (投与終了 1w) より有意に増加し、胸膜中皮の過形成が観察された。3 種の DWCNT については (1.5、7.0、15 μ m) は POT と同じプロトコルにて、各群 14 ~ 16 匹として 1 匹あたりの投与量は 21 \times 10¹² 本/ラットとなるように調整して投与を開始した。

投与分散方法の違いによる発がん性の検討

原末、熱処理、Taquann 処理あるいは両者を組み合わせた処理を施した MWNT-7 をラットに腹腔投与した実験では、投与後 59 週までに全投与群で 100% 発症し、発症時期や重篤度について群間で差異は認められなかった。

肺小核試験法の基礎的検討

MWCNT 曝露群は陰性対照群と比較して、小核をもつ細胞の有意で明らかな高値が認められた(3.3 倍)。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(2.1 倍)。従って、MWCNT 曝露群の小核誘発頻度は EMS 投与群と比較しても約 1.6 倍の高値を示した。

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

クロドロン酸リポソームの処理によりマクロファージが低下している状況でのナノマテリアル曝露が免疫系にどのような影響を及ぼすのかを検討したところ、T-CNT 投与群でマクロファージからの TNF- α が産生されている可能性がある。クロドロン酸投与によって、抑制性サイトカインが産生される可能性が示唆された。また、MRL/lpr マウスへの T-CNT あるいは Ti の腹腔内投与での比較では、PEC 中のマクロファージの細胞数、フェノタイプが大きく異なっていた。血清中のサイトカイン・ケモカインの分泌濃度は Ti 投与によって MIG の分泌が亢進していた。また、正常 B6 マウスへの長さの異なる 2 層化 CNT 投与では、DWCNT の曝露によって、スカベンジャー受容体を介した生体反応が作動する可能性が示された。

感染性免疫系への影響

DWCNTs 曝露により、RSV 感染 5 日後のマウスでは肺胞壁の腫張やリンパ球の浸潤など肺炎は MWNT-7 と同様に増悪化し、最も短い DWCNT-1(1 μm)でその効果が高く MWNT-7 と同等かやや強かった。DWNTs 曝露ではウイルス感染初期から炎症の誘導が見られ、DWCNT-1 高用量(0.125 mg/kg)曝露では肺胞マクロファージなどでの貪食の頻度が高く、TNF- α の産生抑制も認められた。さらに感染の有無に関わらず肉芽の形成も見られた。

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、-SD1、およびチタン酸カリウム曝露によるマクロファージからの TNF α 産生促進は、IL-1 受容体アンタゴニストならびに IKK-2 阻害剤によりほぼ完全に抑制され、IL-18 のオートクラインによる TNF α 産生の機構が示された。二層カーボンナノチューブ DWCNT (1, 7.5, 15 μm) は NLRP3 を介して IL-18 産生を促進したが、TNF α 分泌はむしろ低下させた。

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

MWCNT 投与群で、妊娠 15 日目の胎児毒性として、胎児重量の減少が認められた。対照群に比べ熱処理群、原末群、Taquann 処理群の順に減少量が多かった。組織学的に、全投与群で母体の肺実質で炎症性反応が見られたが、熱処理群では肉芽腫を伴う比較的強い応答であった。肺胞洗浄液中の好中球数は熱処理群で最も多く、LDH 活性および総タンパク質量は全投与群で増加したが Taquann 処理群の増加程度は比較的弱かった。肺組織におけるサイトカイン・ケモカインの遺伝子発現は全投与群で増強し、特に熱処理群で顕著であった。

また、妊娠マウスへの MWCNT 反復気管内投与では、4 mg/kg 反復投与によって、胎児に腎盂拡張、肋骨の癒合、胸椎弓の癒合および腰椎弓の癒合等の異常所見の発生率が増加した。異常所見の発生頻度については、MWCNT の処理方法により異なり、Taquann 処理群は未処理 MWCNT 投与群よりも軽度であり、熱処理群および Taquann 処理+熱処理群は未処理 MWCNT 投与群よりも若干強い影響がみられた。また、骨化遅延部位の発生頻度についても、同様に、Taquann 処理群は熱処理群および Taquann 処理+熱処理群よりも軽度であった。

国際動向調査

H29 年 4 月に開催された OECD WNT テストガイ

ドライン・プログラムのナショナル・コーディネーター作業部会では、ナノマテリアル評価に適応させるために吸入試験法のガイドライン TG412 と TG413 (28 日間と 90 日間の吸入毒性試験)の改定が了承された。H29 年 5 月に開催された第 17 回 OECD ナノマテリアル作業会合では、日本は BIAC と共同で、ナノマテリアルの短期間曝露による *in vivo* 試験 (短期吸入曝露と、気管内投与) の評価手法に関する有効性を検討するプロジェクトを提案したが、H30 年 2 月に開催された第 18 回 OECD ナノマテリアル作業会合では、現在改定が進められている吸入試験法のガイダンス (GD39) の改定作業とのタイミングから延期することとなった。一方この作業会合では、EU が行っている OECD ガイドラインの改訂や新規ガイドラインの作成作業を促進するプロジェクト活動を受けて6つの新規プロジェクトが提案された。

D. 考察

慢性影響に関する研究に関しては、今年度行った DWCNT の吸入曝露実験において、Taquann 全身曝露吸入装置は 1 mg 未満の検体量であってもエアロゾル化が可能であり、少量・新規のナノマテリアル評価に有用であると考えられた。チタン酸カリウムの気管内投与について発がん性が示されれば、前癌病変の把握とリスク評価において金属針状結晶物質の有害性の程度についての理解を深めることができる。DWCNT の気管内投与において DWCNT の長さとう有害性作用との相関が明らかになる。特に発がん性については長さが 0.7 μm の MWCNT の腹腔内投与では発がん性はみられなかった報告(Muller, 2009)を鑑み、肺内投与においても同様の結果になるか 104 週の結果が待たれる。肺小核試験による遺伝毒性の検討では、昨年確立した *in situ* 肺小核試験において、CNT 曝露群において高い小核の誘発性を観察したことから、本年度は動物数を増やして確認試験を行った。その結果、昨年度と同様に高い小核の誘発性を観察

し、その頻度は昨年度と同様であり、定性、定量的にも再現性が認められた。これらの結果から、CNT は全身曝露で肺に小核を誘発すると結論づけられた。

免疫系への検討では、マクロファージが機能不全の状態でのナノマテリアルの曝露はマクロファージを起点とした生体防御反応に大きな影響を及ぼす可能性が示された。疫状態が偏ったモデル(自己免疫疾患モデル)へのナノマテリアルの曝露では、カーボンナノチューブとチタン酸カリウムといった材料の性質、形状の違いでその免疫反応が大きく異なることがわかった。2 層化カーボンナノチューブは MWCNT に比較して腹腔内での曝露反応は低いものと考えられ、DWCNT の処理反応にはスカベンジャー受容体が関与していることが示された。ナノマテリアルの生体内での曝露はその性状、形態によってマクロファージを主体とした自然免疫反応が大きく影響を受けることが示された。感染性免疫への影響について、DCWNTs 曝露による肺炎の増悪化は、MWNT-7 と同様に感染直後から肺胞マクロファージ等に貪食され、炎症形成を亢進することが示唆された。一方で、DWCNT-1 では高用量でサイトカイン産生抑制など免疫応答への作用が MWNT-7 と異なることが示され、また肉芽形成など病態に関しても、回復期での炎症遅延などが示唆された。今後もサイトカイン産生への影響の相違や回復期への影響等を MWNT-7 と比較検討する必要がある。

In vitro 系での検討で、MWCNT 類やチタン酸カリウムは NLRP3 活性化に応じて caspase-1 が直接切断産生する IL-1 β のみならず、そのオートクライン作用により重要な炎症性サイトカイン TNF α の産生促進効果を示し、炎症性サイトカインカスケードを開始することが示唆された。二層ナノチューブ DWCNT は長さに応じて NLRP3 依存の IL-1 β 産生を促すものの、TNF α 産生を欠く点で多層ナノチューブとの差異が認められた。

発生影響に関する検討では、熱処理や Taquann 処理等の投与前の処理によって

MWCNT の発生毒性が変化することが明らかとなった。反復気管内投与による母動物および胎児への影響も、分散液の調製方法(分散状態)によって差が見られることが、内臓・骨格検査からも確認された。熱処理によって分散性が向上したことにより、胎児への影響が増大したものと考えられる。また、今回検査した項目のうち、骨格異常(骨化遅延)において有意差がみられる項目が最も多かったことから、発生毒性の中では骨格異常(骨化遅延)が最も鋭敏な指標であると考えられた。これらの気管内投与による発生毒性は、母体の肺の細胞障害や炎症に起因する二次的作用であるものと示唆された。一方、ラット腹膜中皮腫は、前処理による影響は受けなかった。発生毒性が急性炎症に、中皮腫が慢性炎症にそれぞれ関連していると考えられるため、今回の結果は、この炎症反応の種類の差異を反映しているのかもしれない。あるいは腹腔投与実験の投与用量が中皮腫誘発には過剰量であり、前処理による影響を受けづらかった可能性もある。

国際動向調査で得られた情報からは、ナノマテリアルの評価手法の国際的な標準化を目指して、OECD テストガイドラインやガイダンスの改定活動が本格化してきており、EU を中心に様々なプロジェクトが立ち上がりつつある。本研究班で検討している慢性影響評価に関する成果についても、OECD のガイダンス等に取り入れられるように、本研究で確立した吸入試験法や気管内投与手法を生かして、より短期の吸入曝露や気管内曝露試験法、*in vitro* 評価系試験法から慢性影響を評価できることを示すデータを積み上げて OECD 等に提案できるような実証研究を行っていくことが必要であると考えられた。

E. 結論

H29 年度は、慢性影響に関する研究に関して、Taquann 法で分散したチタン酸カリウムと繊維長の異なる 3 種類(平均 1、7、15 μm)の二層ナノチューブ(DWCNT)の長期試験を開始すると共に、

MWNT-7 の前処理の違いによる腹腔内投与慢性実験、MWNT-7 による *in vivo* 肺小核試験の確認試験を行った。免疫影響に関する研究に関しては、チタン酸カリウムと 3 種類の DWCNT におけるリンパ球表面マーカーの慢性影響と感染性への影響の比較を行った。発生毒性に関する検討では、気管内投与懸濁液に対する MWCNT の前処理が発生毒性に及ぼす影響を検討した。また、ナノマテリアルの毒性評価手法に関する OECD の動向調査を行った。

慢性影響評価研究において、3 種類 DWCNT 1、7、15 μm の単回吸入曝露試験を行い、それぞれ 0.49、0.51 及び 0.57 mg/m^3 の濃度で吸入させ、15 μm の曝露肺では DWCNT がマクロファージに貪食された繊維を観察できた。チタン酸カリウムのおよび DWCNT の経気管肺内噴霧投与方法の検討では、チタン酸カリウムの 52 週投与群で胸膜中皮の過形成が観察された。3 種の DWCNT については 1 匹あたりの 21×10^{12} 本/ラットの投与量で慢性試験を開始した。ラットに分散処理の方法を変えた(原末、熱処理、Taquann 処理、および両者の組み合わせ)MWNT-7 を腹腔投与した検討では、中皮腫の発症時期や重篤度について分散処理の違いによる差異は認められなかった。前年度までに確立したマウスに対する *in vivo* 肺小核試験法(Taquann 法処理による直噴全身曝露吸入システム、2 時間/日、5 日間連続の全身吸入曝露)において、MWCNT は陽性を示すことが確認できた。免疫影響に対する検討では、クロドロン酸リポソームの処理によりマクロファージが機能不全の状態での MWCNT 曝露はマクロファージを起点とした生体防御反応に大きな影響を及ぼす可能性が示された。MRL/lpr マウス(自己免疫疾患モデル)への MWNT とチタン酸カリウム投与の比較では腹腔内滲出細胞中のマクロファージの細胞数、フェノタイプが大きく異なっていた。DWCNT は MWCNT に比較して腹腔内での曝露反応は低いものと考えられ、DWCNT の処理反応にはスカベンジャー受

容体が関与していることが示された。DWCNTs 曝露により、RSV 感染 5 日後のマウスでは肺胞壁の腫脹やリンパ球の浸潤など肺炎は MWNT-7 と同様に増悪化し、最も短い DWCNT-1(1 μ m) でその効果が高く MWNT-7 と同等かやや強かった。in vitro 試験系による検討では、4 種の MWCNT による TNF α 産生を促進は、IL-1 β のオートクラインによる機構が示された。3 種の DWCNT(1, 7.5, 15 μ m) は NLRP3 を介して IL-1 β 産生を促進したが、TNF α 分泌はむしろ低下させた。発生影響に関する検討では、MWCNT 投与群で、妊娠 15 日目の胎児毒性として、胎児重量の減少が認められ、対照群に比べ熱処理群、原末群、Taquan 処理群の順に減少量が多かった。反復気管内投与による母動物および胎児への影響でも、分散液の調製方法(分散状態)によって差が見られることが、内臓・骨格検査からも確認された。また、今回検査した項目のうち骨格異常(骨化遅延)が最も鋭敏な指標であると考えられた。国際動向調査では、OECD 吸入試験法のガイドライン TG412 と TG413 がナノマテリアル評価に適応して改定が承認され、さらに WPMN では EU が行っている OECD ガイドラインの改訂や新規ガイドラインの作成作業を促進するプロジェクト活動を受けて6つの新規プロジェクトが提案された。

F. 健康危機情報

該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

Abdelgied M., El-Gazzar A., Alexander D., Alexander W., Numano T., Iigou M., Naiki-Ito A., Takase H., Abdou K. A., Hirose A., Taquahashi Y., Kanno J., Tsuda H., Takahashi S. Potassium octatitanate fibers induce persistent lung and pleural injury and are possibly carcinogenic in male Fischer 344 rats. *Cancer Sci.*, 2018 May 17.

doi: 10.1111/ cas.13643.

Norihiro Kobayashi, Hiroto Izumi, Yasuo Morimoto: A review of toxicity studies of carbon nanotubes. *Journal of Occupational Health*, 59(5), 394–407 (2017).

2. 学会発表

Akihiko Hirose. International trends and necessity of chronic studies on risk assessment of nanomaterials. 第 34 回日本毒性病理学会総会、1 月 25-26 日、沖縄

Yuhji Taquahashi, Koichi Morita, Masaki Tsuji, Yoko Hirabayashi, Akihiko Hirose and Jun Kanno, A short-term whole-body inhalation study of potassium titanate whisker in mice with an improved dispersion and inhalation system, The 57th Society of Toxicology, Henry B. Gonzalez Convention Center, San Antonio, Texas, USA, 12 March, 2018,. Poster

津田洋幸、徐結荀、William Alexander, David Alexander, Mohamed Abdelgied, Ahmed Elgazzar, 沼野琢旬、酒々井真澄、二口充、深町勝美、広瀬明彦、菅野純 気管内噴霧投与法による各種の MWCNT の毒性と発がん性試験結果の比較、第 44 回日本毒性学会学術年会、7 月 10-12 日、横浜

Mohamed Abdelgied, Ahmed Elgazzar, David Alexander, William Alexander, Takamasa Numano, Satoru Takahashi, Hirotsugu Takase, Akihiro Hirose, Yuhji Taquahashi, Jun Kanno, Hiroyuki Tsuda Potassium octatitanate($K_2O \cdot 8TiO_2$) fiber is a potent inducer of lung and pleural injury – A comparative study to titanium dioxide nano particles. 第 44 回日本毒性学会学術年会、7 月 10-12 日、横浜

Ahmed M. El-Gazzar¹, Mohamed Abdelgied, David B. Alexander, William T. Alexander, Takamasa Numano, Masaaki Iigo, Aya Naiki, Hirotsugu Takase, Akihiko Hirose, Yuhji Taquahashi, Jun Kannno, Satoru Takahashi, Ashraf Mohamed Nazem,

- Osama Saeid Elokke and Hiroyuki Tsuda. Comparative Pulmonary toxicity of DWCNT and MWCNT-7 in Rats 第 34 回日本毒性病理学会総会、1 月 25-26 日、沖縄
- Mohamed Abdelgied, Ahmed M. El-Gazzar, David B. Alexander, William T. Alexander, Takamasa Numano, Masaaki Iigo, Aya Naiki, Hirotugu Takase, Khaled Abbas Abdou, Akihiko Hirose, Yuhji Taquahashi, Jun Kannno, Satoru Takahashi and Hiroyuki Tsuda. Potassium octatitanate fiber ($K_2O \cdot 8TiO_2$) fiber is a potent inducer of lung and pleural injury in male Fischer 344 rats: A comparative study of titanium dioxide nano particles 第 34 回日本毒性病理学会総会、1 月 25-26 日、沖縄
- Norihiro Kobayashi, Ryota Tanaka, Yoshiaki Ikarashi, Akihiko Hirose: Developmental toxicity assessment of four different preparations of multi-wall carbon nanotubes in mice after repeated intratracheal instillation. 57th Annual Meeting of the Society of Toxicology (SOT 2018) (2018.3.14 San Antonio, TX, USA).
- Takasawa H, Hamada S, Taquahashi Y, Horibata K, Nakagawa M, Honma M, In vivo genotoxicity assessment of multi-wall carbon nanotubes using in vivo / in vitro lung micronucleus assay in mice, The Environmental Mutagenesis and Genomics Society 48th Annual Meeting, North Carolina (2017.9)
- 高沢博修, 志賀野美幸, 高橋祐次, 田中亜矢子, 中館記代子, 堀端克良, 安永勝昭, 中川宗洋, 濱田修一, 本間正充, In vivo-in vitro マウス肺小核試験を用いたカーボンナノチューブの in vivo 遺伝毒性評価, 日本環境変異原学会 第 46 回大会, 東京 (2017.11)
- 堀端克良, 鶴飼明子, 小縣昭夫, 中江大, 安藤弘, 久保喜一, 長澤明道, 湯澤勝廣, 本間正充, F344 gpt delta rats を用いた多層カーボンナノチューブ単回気管内投与による in vivo 遺伝毒性評価, 日本環境変異原学会 第 46 回大会, 東京 (2017.11)
- Seiko Hashiguchi, Toshi Akashi, Akihiko Hirose, Aki Miyauchi, Hiroki Yoshida, Masahiko Kurokawa, Wataru Watanabe. Effects of potassium titanate on the pneumonia in respiratory syncytial virus-infected mice. EuroTox 2017, P-05-03-09 Slovak National Theatre, Bratislava, 20170912
- Wataru Watanabe, Seiko Hashiguchi, Toshi Akashi, Akihiko Hirose, Hiroki Yoshida, Aki Miyauchi, Chihiro Sugita, Masahiko Kurokawa. Effects of multi-walled carbon nanotubes on primary immunity responding to respiratory syncytial virus infection in mice. EuroTox 2017, P-05-03-10 Slovak National Theatre, Bratislava, 20170912
- 新垣理恵子, 山田耕一, 齋藤雅子, 大塚邦紘, 山田安希子, 常松貴明, 工藤保誠, 菅野純, 石丸直澄, 多層化カーボンナノチューブ長期曝露による免疫システムへの慢性毒性 第 106 回日本病理学会総会 2018 年 4 月 28 日 東京
- 坂本義光, 広瀬明彦, 中江 大: 多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の経気管投与ラットに見られた肺胞過形成病変の免疫組織学的性状, 第 76 回日本癌学会学術総会, 横浜(2017 年 9 月 28 日~30 日)
- 北條幹, 坂本義光, 山本行男, 村上詩歩, 長谷川悠子, 前野愛, 五十嵐海, 湯澤勝廣, 生嶋清美, 多田幸恵, 清水本武, 長澤明道, 久保喜一, 安藤弘, 海鉦藤文, 田中和良, 矢野範男, 鈴木俊也, 猪又明子, 守安貴子, 広瀬明彦, 中江大: ラットにおける多層カーボンナノチューブおよびクリソタイル誘発中皮腫の病理学的性状の比較, 第 34 回日本毒性病理学会学術集会, 那覇 (2018 年 1 月 25 日~26 日)
- 坂本義光, 北條幹, 鈴木俊也, 猪又明子, 広瀬明彦, 中江大: 多層カーボンナノチューブの経気管反復投与によりラット肺に誘発された増殖性病変の免疫組織学的解析, 第 34 回日本毒性病理学会学術集会, 那覇(2018 年 1 月 25 日~26 日)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

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