

平成30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

平成30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)  
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影響の効率的評価手法開発に関する研究

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、未だにナノマテリアル曝露による最も懸念されている体内蓄積に伴う慢性影響を検討した研究がない上に、定量的にリスク評価のために必要な慢性吸入曝露は多層カーボンナノチューブ(MWNT-7)による報告のみである現状を鑑み、2年間の慢性吸入試験と同レベルの評価が可能な代替慢性試験法の開発を行うことを目的としている。また、これまでに他のナノマテリアルで検討してきた遺伝毒性や免疫影響に関する指標について、今回開発する慢性試験プロトコルへの適用性を検証すると共に、本研究班の研究成果をもって本代替法の有用性を国際的に発信していくことを目的としている。

慢性影響に関する研究に関して、2年間の慢性吸入毒性試験と同レベルの肺内負荷量を達成するために短期間曝露の慢性観察試験のプロトコルを確立するための予備検討を行った。MWCNT曝露後の肺内負荷量の測定法(SEM法と大西法)のバリデーションに着手した気管内投与による体内残留率を測定した結果、既報(Kasai et al., Particle Fibre Tox 2016)の2年間の吸入曝露試験と肺内負荷量に関して同等性を維持するために、ラットを用いた気管内投与では2年間の曝露期間において4週間に1回の間隔で約100 µg/ratを間欠投与するプロトコルが妥当であると考えられた。マウス吸入曝露実験ではTaquann全身曝露吸入装置(ver.3.0)を用いた単回曝露(6時間)を実施し、大西法により肺内負荷量測定を行った。その結果、曝露終了直後の高用量曝露群(5.1 mg/m<sup>3</sup>)では6 µg/mouse、低用量群(2.7 mg/m<sup>3</sup>)では4 µg/mouseであった。慢性試験は気管内投与と全身曝露吸入による試験を開始した。一方、短期間気管内噴霧+慢性観察(2週8回投与、TIPS法)によるチタン酸カリウム(POT)、アナターゼ型二酸化チタニウム(TiO<sub>2</sub>)の炎症、発がん性をMWNT-7と比較した研究では、104週で肺胞上皮過形成・腺腫・腺がんの合計および胸膜中皮過形成と悪性中皮腫の合計頻度においてPOT(0.25と0.5mg合計)とMWCNT-7に有意の増加が見られた。POT群の悪性中皮腫率(4/33例)は統計的に有意ではないが、日本バイオアッセイ研究センターの対照群の背景頻度より約140倍高値であった。

慢性影響指標に関する研究では、マウスでの気管内投与による*in vivo*肺小核試験遺伝毒性試験の予備試験を行い、単回気管内投与による今回の予備試験条件下では、肺小核試験陰性であることを明らかにした。免疫ネットワークへの影響については、二層ナノチューブでの腹腔内投与による慢性影響において、腹腔内のマクロファージの活性化や機能に違いがある可能性が示された。一方、感染性に対する影響としては、MWNT-7の単回吸入曝露により、マウス肺全葉へのMWNT-7の到達を確認し、複数回の経鼻投与で得られた肺炎増悪化は認められなかったが、肺の

線維化に関する指標(TGF- $\beta$ )の上昇を見出した。*In vitro*メカニズム解析研究において、様々なナノマテリアルにより惹起されるNLRP3インフラマソームを介する炎症応答は、ナノマテリアルの物性の違いにより化合物Xによる抑制効果が異なることを見いだした。海外動向調査としては、OECDナノマテリアルの作業グループにおいてEUから昨年度に引き続き7つの新規プロジェクトが提案されていた。また、本会議では我が国からの報告として、本研究班で検討している間欠型の慢性曝露試験法の検証研究に関して、研究の背景や将来的な目標、研究計画等について紹介を行い、従来の慢性吸入曝露試験との相同性に関する比較研究の重要性を示した。

通常の慢性吸入試験と同レベルの評価が可能な代替試験の開発に向けて、間欠的な短期的吸入曝露あるいは気管内投与による曝露手法を用いた慢性影響評価手法との比較検証を行うための基礎的な条件を設定し、H30年度内に慢性研究をスタートさせることができた。また、この試験系を用いることにより、より適切な慢性影響指標を同定したり測定したりするための基盤的な条件を整えることができたと考えられる。

### 研究分担者

高橋 祐次 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 第三室長  
 津田 洋幸 名古屋市立大学 津田特任教授研究室 特任教授  
 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  
 菅野 純 (独)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  
 渡辺 渡 九州保健福祉大学大学院・保健科学研究科・微生物学 教授  
 石丸 直澄 徳島大学大学院医歯薬学研究部 教授  
 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  
 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  
 北條 幹 東京都健康安全研究センター・薬事環境科学部生体影響研究科・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  
 横田 理 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 主任研究官

大西 誠 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 試験管理部分析室 技術専門役  
 後藤 裕子 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 試験管理部 主任研究員  
 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  
 本間 正充 国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部 部長  
 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  
 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  
前野 愛 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  
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  
守安 貴子 東京都健康安全研究センター  
薬事環境科学部 部長  
中江 大 東京農業大学 応用生物科学部  
教授  
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

## A. 研究目的

新素材としての産業用ナノマテリアルについては、新しい物性に伴う未知のヒト健康影響の懸念に対して適正な安全性評価手法の確立が急務となっているが、これまで 10 年近くにわたり OECD や各国が各種研究を精力的に行ってきたにもかかわらず、未だにナノマテリアル曝露による最も懸念されている体内蓄積に伴う慢性影響を検討した研究はほとんど行われてきていない。特に近年では、動物試験を用いない *in vitro* 試験系を中心とした評価法の確立が重要視されているが、肝心の *in vivo* 影響の評価や AOP が確立していなければ、信頼性の高い *n vitro* 試験系の開発は不可能である。我々は、先行する研究において当初より慢性影響を中心とした *in vivo* 試験研究を進めてきており、発がん性を主とした慢性影響の評価法を検討してきた。一方、定量的な慢性吸入曝露によるリスク評価には、多層カーボンナノチューブ (MWNT-7) で報告されたように 2 年間の慢性吸入試験を行うことが必須であるが、現実的にあらゆるナノマテリアルで慢性吸入試験を行うことはできない。その為、慢性影響を評価でき効率的評価手法の確立は急務である。そこで、先行研究で開発してきたナノマテリアル分散法および気管内投法を用いて、先ず通常の 2 年間吸入曝露試験法を代替できる試験法として、短期間曝露と慢性

観察による慢性影響評価法を確立することを本研究班の目的とした。現時点で吸入曝露によるナノマテリアルの慢性試験データが利用出来る MWCNT を中心として吸入曝露法と気管内曝露法の比較研究を行う。

## B. 研究方法

本研究班は、吸入曝露法と気管内曝露法の比較研究をとおして慢性吸入曝露試験の代替性を模索する研究と、慢性影響評価に必要な AOP に基づいた短期間曝露による慢性影響指標に関する研究、及び国際動向収集と共に研究班の成果を OECD 等に提案していくことを目指す研究とで構成する。

### 慢性吸入曝露試験の代替手法検討:

まず、MWNT-7を用いた2年間の慢性吸入毒性試験における体内負荷量と同レベルの肺内負荷量を気管内投与法あるいは短期間吸入曝露法で達成するために、肺内負荷量の定量法のバリデーションと、単回曝露に消失速度の測定を行った。CNTの肺負荷量の解析法のバリデーションとしては、曝露肺をアルカリ溶解し遠心分離により回収したサンプルを、走査電顕にて繊維数を基盤として測定する方法 (SEM法) と、Benzo[ghi]peryleneをマーカーとして定量する方法 (大西法) が Taquann 法処理した MWNT-7 を用いた場合の比較可能性についてバリ

レーションに着手した。MWNT-7 のTaquann法処理には先行試験(Kasai et al. Particle Fibre Tox 2016)と同じ53  $\mu\text{m}$ メッシュを用いて濾過したものを使用した。肺サンプルは、国立衛研に新たに設置したTaquann全身曝露吸入装置(ver.3.0)を用い、マウスに目標濃度6  $\text{mg}/\text{m}^3$ の単回曝露試験(6時間)を実施したものをを用いた(菅野)。

2年間の気管内投与試験に用いるMWCNT分散液の調製方法について、MWNT-7 原末とTaquann 処理 MWNT-7 の 2 種類を用いて、CMC-Na, Tween80, PluronicF-68等への分散状態を検討し、一部についてDLSにより二次粒子径の測定を行った(小林)。気管内投与後の肺内残存量の解析としては、F344雄性ラットにMWCNT 原末懸濁液を125  $\mu\text{g}/\text{回}$ の用量でスプレー式ゾンデまたは経ロゾンデを用いて単回あるいは4週間おきに3回投与した。また、Taquann処理MWCNTを、25あるいは100  $\mu\text{g}/\text{ラット}$ の用量で経ロゾンデにより単回投与し、1週後・4週後に肺のMWCNTの含有量を(大西法)により測定した(北條、広瀬)。

2年間の長期曝露試験としては、Taquann全身曝露吸入装置(ver.3.0)を用い、53  $\mu\text{m}$ メッシュ濾過したMWNT-7を検体として、対照群、低用量(目標濃度 3  $\text{mg}/\text{m}^3$ )、高用量(目標濃度 6  $\text{mg}/\text{m}^3$ )の3群(50匹/群)を設定し4週毎の曝露試験を開始した。エアロゾルの特性の情報として、質量濃度、エアロゾル粒子数(CPC)、空気力学的質量中央値(MMAD)の測定を行った。(高橋)。

一方、短期間気管内噴霧+慢性観察(2週8回投与、TIPS法)によるチタン酸カリウム(POT)、アナターゼ型二酸化チタニウム( $\text{TiO}_2$ )の炎症、発がん性をMWNT-7と比較した。また、二層ナノチューブ(DWCNT)(15, 7, 1  $\mu\text{m}$ )について、長さの差異と炎症反応の程度について比較する慢性研究を継続中である(津田)。

#### 慢性影響指標に関する研究:

発がん性の指標となる遺伝毒性試験について、先行研究で確立した吸入曝露による*in vivo*肺小核

試験法のマウス(C57BLとICRの2系統)への気管投与での適用性を検証するために、2系統のマウスに単回期間内投与を行い、肺小核誘発率を解析した(堀端)。

免疫系への吸入曝露による慢性影響については、短期間曝露による慢性影響評価プロトコルに準じてその影響を解析する予定であるが、のTaquann法による吸入曝露のサンプルが得られていないため、H31年度は、比較対象のためにチタン酸カリウムとDWCNTを単回腹腔内投与したPECにおけるROS関連遺伝子の変動を網羅的に解析した(石丸)。感染性への影響については、これまでMWNT-7の複数回での経鼻投与で認められたRSV肺炎増悪化が、Taquann法による吸入曝露でも再現できるか確認する必要があるため、上記の単回曝露試験に合わせて、感染実験を行った。方法としては、BALB/cマウスに対して、MWNT-7を0, 3 および6  $\text{mg}/\text{m}^3$ , 6時間吸入曝露を行い、3日後にRSV感染させて、感染5日後の肺胞洗浄液(BALF)や肺病理解析を行った(渡辺)。一方、炎症反応の最初反応であるマクロファージへの影響に関しては、ナノマテリアルの物性によるインフラマソーム活性化機序の違いを、抑制薬物を用いて検討した。THP-1マクロファージにMWCNT-7、各種酸化チタンを曝露し、インフラマソーム依存的なIL-1 $\beta$ 分泌をNLRP3ノックダウン細胞との比較により評価し、MWCNT-SD1による活性化の抑制薬物の影響を解析した(最上)。

#### 国際動向に関する研究:

H30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、OECDテストガイドライン会議での情報収集を行った。(小林、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:

Taquann 法処理 MWNT-7 の肺内負荷量を測定に関して、大西法では0.2~2.0 µg/mLの範囲内で、定量が可能であることが示された。Taquann 全身曝露吸入装置(ver.3.0)は安定した運用を達成することができた。チャンバー内に投入した検体量のエアロゾル効率率は約 70%であった。質量濃度は、目標濃度3および6 mg/m<sup>3</sup>に対して、実測値は2.7および5.1 mg/m<sup>3</sup>であった。CPC カウントはカートリッジから噴射直後に速やかに上昇し、次のカートリッジを噴射する4分後までの間に徐々に低下する鋸歯状を示し0から6時間の平均値に対して、約20%~200%の範囲で変動した。MMADは400~500 nmであった。この曝露条件の下で、肺負荷量予測のため、マウスへの単回曝露肺の肺負荷量測定を大西法にて曝露終了直後と7日後に実施し、高用量曝露群ではそれぞれ約6 µg/マウスおよび約3 µg/マウス、低用量群ではそれぞれ約4 µg/マウスおよび約2 µg/マウスの結果が得られた。同条件にて、マウスを用い、対照群、低用量群、高用量群で2年間の吸入曝露実験を開始した。

気管内投与法の試料調製の検討では、CMC-Na に分散させた MWCNT について T-MWCT-7 の方が、原末と比べて粒径が小さいが凝集しやすい傾向が見られた。また、Tween より PluronicF-68 のほうがより安定した分散状態を維持できることがわかった。MWCNT 原末を 125 µg を単回投与した肺負荷量は、1 日後までにスプレー式ゾンデで 60.7 µg、経口ゾンデで 73.8 µg にそれぞれ減少したが、その後はほとんど変化しなかった。反復投与では、3回投与の翌日に 161.5 µg であり、その 8 週後も同程度であった。T-MWCT-7 の 100 µg 投与群では 1 週後の肺負荷量は 30.4µg までに減少していることが確認できた。

TIPS 法によるチタン酸カリウムと酸化チタンの比較では、肺では 6h ではすべての群に Mφを含む肺胞内炎症がみられ、4w では持続する異物炎症に加え POT 群に肺胞上皮と胸膜中皮の PCNA ラベル値、肺組織の CCL 種の高値がみられた。PLF 上清には *in vitro* でのヒト肺がんと悪性中皮腫細胞に対する増殖刺激、BALF には細胞障害に起因する ALP と LDH の高値が見られた。また PLF 細胞ペレットには全ての投与群で投与検体が観察された。104 週では、肺胞上皮過形成・腺腫・腺がんの合計および胸膜中皮過形成と悪性中皮腫の合計頻度において POT (0.25 と 0.5mg 合計) と MWCNT-7 に有意の増加が見られた。悪性中皮腫は POT 群に計 4/33 例(12%)発生し、日本バイオアッセイ研究センターの対照群 historical incidence より 140 倍の高値であった。

長さの異なる DWCNT は POT の場合と同じプロトコルにて、各群 14~16 匹として 1 匹あたりの2週における全投与量は 22x10<sup>12</sup>本/ラットとなるように調整して投与し、慢性試験を継続している。陽性対照として MWCNT-7 を 1mg/ラット(15micro-m の DWCNT の投与量 1mg/ラットに合わせた)対照群は無処置と PF68 含有生理食塩水のみを投与した群とした。

#### 慢性影響指標に関する研究:

遺伝毒性指標としての *in vivo* 肺小核試験法において、全身吸入曝露下の試験条件に合わせる為 MWNT-7 単回気管内投与後 5 日目に肺組織を採取し肺胞由来 AT-II 細胞および細気管支由来 Clara 細胞を得て、*ex vivo* 培養法を応用した肺小核試験の標本を作成した。陰性対照、陽性対象および MWNT-7 を C57BL と ICR の 2 系統で各群 3 匹を設定した。その結果、両系統とも単回気管内投与下では肺小核陰性となることを示した。また、*ex vivo* 培養法を応用したマウス肺小核試験において、C57BL マウスと比べて ICR マウスでは、観察対象細胞が多く得られ、標本の状態がやや良好であったことから今回の予備試験条件下で作製された標

本の状態には系統差があることを示した。

繊維長の異なるDWCNTの腹腔内投与によって、PECの細胞数に変化は認められなかったが、スカベンジャー受容体のひとつであるCD36の発現が7 $\mu$ mのDWCNT投与で上昇していた。T-MWNT-7あるいはチタン酸カリウムの腹腔内投与によるPECにおけるROS関連遺伝子の発現にそれぞれのマテリアルで違いが見られ、ナノマテリアルの性質によってROSを介した好中球やマクロファージの活性化機構の違いが示された。今後、短期間吸入曝露による慢性影響に関して検討を計画している。単回吸入曝露試験に合わせたRSV感染実験については、感染5日後の肺胞洗浄液中のIFN- $\gamma$ やRANTESレベルの上昇は認められなかったが、TGF- $\beta$ レベルは曝露量依存的に有意に上昇した。一方、病理組織学的な検討では、RSV感染による肺炎の明確な増悪化は認められなかったが、感染の有無に関わらず全葉において曝露量に依存してMWNT-7の結晶が確認された。MWCNT-7によるマクロファージでのインフラマソーム活性化・IL-1 $\beta$ 分泌を抑制する化合物X(論文公表時まで非公表の予定)を見いだしているが、各種酸化チタン類によるインフラマソーム活性化への影響を比較したところ、ナノマテリアルの物性の違いにより薬物Xによる抑制効果に差異があることを見出した。

#### 国際動向に関する研究:

H31年の2月に開催された、OECDナノマテリアル作業会合では、EUから昨年度に引き続き7つの新規プロジェクトが提案された。このうち、5つの提案については本会議中あるいは、会議の書面手続きで承認される方向となり、OECDテストガイドラインの作業グループでの議論へ進む方向性が決まった。また、本作業グループ会議においては、本研究班で計画している間欠型の慢性曝露試験法の検証研究に関して、研究の背景や将来的な目標、研究計画等について紹介する機会が得られ、会議中に発表を行った。

#### D. 考察

慢性影響評価手法検討に関する研究に関してH30年度は、MWNT-7によるTaquann全身曝露吸入装置(ver.3.0)吸入曝露および、Taquann処理した分散液の気管内投与による肺内残留率を調査した。分散状態の安定性と媒体自体の毒性情報の豊富さから、気管内投与に用いるT-MWNT-7はTweenn80に分散させることが適切と考えられた。肺負荷量の測定結果から、慢性の連続吸入試験の肺内負荷量と同レベルにすることができる短期間曝露の慢性観察試験のプロトコルとして、2年間にわたる間欠的吸入曝露および気管内投与の投与量の目安を設定することが可能となった。図1に示す様に、MWNT-7の2年間の吸入曝露試験(Kasai et al. 2016)で想定される肺内負荷量(最終的には高用量群で2000  $\mu$ g/rat)と同様の肺内の蓄積量を維持するためには、管内投与法により2年間に4週間に1回の間隔で約100  $\mu$ g/ratを投与(図1中のPlanned Study)すれば良いという見込みが立った。低用量群はその4分の1の用量を設定し、H30年12月に第一回目の投与を開始した。一方、Taquann全身曝露吸入装置(ver.3.0)については、国衛研の移転に伴い設備を新しくし、H30年度の後半に安定して稼働する状況となった。マウス単回曝露による肺内残留量を大西法にて測定した結果、高用量群(実測値5.1 mg /m<sup>3</sup>)の曝露終了直後の値は約6  $\mu$ g/マウスであり、当初想定していた負荷量の約50%であった。予測値は25  $\mu$ mメッシュで濾過した検体のSEM法による測定結果から推定した値であるため、その影響が考えられる。現在、同曝露条件にて2年間の吸入実験を進めているが、SEM法による肺負荷量測定結果とも照らし合わせた上で目標とする負荷量が得られる曝露条件への変更も考慮する。

一方、先行研究から引き続き行っている気管内投与法のプロトコルとしてのTIP法については、MWNT-7以外のチタン酸カリウムや二層ナノチュ

ープでも慢性試験を行ってきている。胸腔洗浄液 (PLF) における Mφ の分泌する CCL 種によると考えられる肺がん細胞と中皮腫細胞に対する増殖活性の観察等から、肺と胸膜組織への遷延性の炎症は TiO<sub>2</sub> より繊維性の POT でより強く誘導されることは胸膜中皮において発がんに関連する病変とすると考えられた。長さの異なる DWCNT については、今までの報告で 0.7micro-m の MWCNT の腹腔内投与では発がん性はみられなかったこと (Muller, 2009) から、長さで投与された本数と発がんの関係が明らかとなると考えられ、104 週の結果が待たれる。

最終的には、本研究で開始する 2 年間の間欠吸入曝露および気管内投与によるプロトコルを用いた試験や TIPS 法による慢性試験の結果と、通常の 2 年間の慢性吸入試験結果との比較を行うことにより、より慢性吸入試験結果を再現できる短期間曝露の慢性試験の設定基準を提案できると考えている。

慢性影響指標に関する研究では、*in vivo* 遺伝毒性試験として、現状での *ex vivo* を応用した肺小核試験では、単回投与下で陰性であったが、今回初めて 2 系統のマウスを用いたことで、得られる肺細胞数がマウス系統により違いが見られることを明らかにした。これを踏まえ、本試験ではマウス系統に十分留意した上で実施することが必要である。免疫ネットワークへの影響については、二層ナノチューブでの腹腔内投与による慢性影響において、腹腔内のマクロファージの活性化や機能に違いがある可能性が示され、今年度の開発した間欠吸入内曝露における免疫担当細胞への慢性影響についても、腹腔内投与法との免疫影響の差異を解析する予定である。一方、感染性に対する影響としては、これまで RSV 感染マウスでは、MWNT-7 の複数回経鼻投与により炎症サイトカインの産生亢進および肺炎増悪化の結果を得ているが、MWNT-7 は凝集し、その影響は偏在による可能性が高かった。今回の吸入曝露法の導入により、均一ではないが全肺葉において MWNT-7 の結晶が観察された。感染への

影響は明確ではなかったが、曝露量や曝露スケジュール・回数を検討することで影響評価の質が向上すると考えられる。さらに、肺の線維化に関する指標 (TGF-β) の上昇を見出しており、感染回復期への作用などの慢性的な影響評価への応用が期待できる。

*In vitro* メカニズム解析研究において、MWCNT-7 曝露によるマクロファージの IL-18 産生を顕著に抑制する化合物 X を見いだしているが、様々な大きさや形状の酸化チタンナノマテリアルによる IL-18 産生の抑制は顕著ではないことが判明し、様々なナノマテリアルにより惹起される NLRP3 インフラマソーム活性化の機構には、ナノマテリアルの物性の違いによる差異があることが示唆された。引き続き多様な MWCNT について、化合物 X の効果を調べメカニズムの解析を進め、慢性影響の *in vitro* 評価につなげることを目指している。

国際動向としては、昨年度より、EU を中心にナノマテリアルの評価手法の国際的な標準化を目指した 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いる。本研究班で検討している慢性影響評価に関する評価法についても、将来的に OECD のガイダンス等に取り入れられるようにするためには、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重要であると考えられた。

## E. 結論

慢性影響に関する研究に関して、2 年間の慢性吸入毒性試験と同レベルの肺内負荷量を達成するために短期間曝露の慢性観察試験のプロトコルを確立するための予備検討を行った。MWCNT 曝露後の肺内負荷量の測定法について、電顕を使った手法と Benzo[ghi]perylene をマーカーとして定量する方法 (大西法) のバリデーションに着手した。気管内投与による体内残留率を測定した結果、既報



の2年間の吸入曝露試験と肺内負荷量に関して同等性を維持するために、ラットを用いた気管内投与では2年間の曝露期間において4週間に1回の間隔で約100 µg/ratを間欠投与するプロトコルが妥当であると考えられた。マウス吸入曝露実験ではTaquann 全身曝露吸入装置(ver.3.0)を用いた単回曝露(6時間)を実施し、大西法により肺内負荷量測定を行った。その結果、曝露終了直後の高用量曝露群(5.1 mg/m<sup>3</sup>)では6 µg/マウス、低用量群(2.7 mg/m<sup>3</sup>)では4 µg/マウスであった。慢性試験は気管内投与と全身曝露吸入による試験を開始した。

ナノマテリアルの経気管肺内噴霧投与(TIPS法)では、104週で肺胞上皮過形成・腺腫・腺がんの合計および胸膜中皮過形成と悪性中皮腫の合計頻度においてPOT(0.25と0.5mg合計)とMWCNT-7に有意の増加が見られた。POT群の悪性中皮腫率(4/33例)は統計的に有意ではないが、日本バイオアッセイ研究センターの対照群の背景頻度より約140倍高値であった。

慢性影響指標に関する研究では、2系統のマウスを用いた気管内投与による*in vivo*肺小核試験遺伝毒性試験を行った結果、肺小核陰性であった。また、マウス個体から分離・回収できる肺細胞数や観察標本の状態に系統差があることを明らかにした。免疫ネットワークへの影響については、二層ナノチューブでの腹腔内投与による慢性影響において、腹腔内のマクロファージの活性化や機能に違いがある可能性が示されると共に、上記の間欠吸入内曝露における免疫担当細胞への慢性影響についても解析を予定している。一方、感染性に対する影響としては、MWNT-7の単回吸入曝露により、マウス肺全葉へのMWNT-7の到達を確認し、複数回の経鼻投与で得られた肺炎増悪化は認められなかったが、肺の線維化に関する指標(TGF-β)の上昇を見出した。*In vitro*メカニズム解析研究において、様々なナノマテリアルにより惹起されるNLRP3インフラマソームを介する炎症応答は、ナノマテリアルの

物性の違いにより化合物Xによる抑制効果が異なることを見いだした。

海外動向としては、OECD ナノマテリアルの作業グループにおいてEUから昨年度に引き続き7つの新規プロジェクトが提案されていた。また、本会議では我が国からの報告として、本研究班で検討している間欠型の慢性曝露試験法の検証研究に関して、研究の背景や将来的な目標、研究計画等について紹介を行い、従来の慢性吸入曝露試験との相同性に関する比較研究の重要性を示した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- Abdelgied M, El-Gazzar AM, Alexander DB, Alexander WT, Numano T, Iigou M, Naiki-Ito A, Takase H, Abdou KA, 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;109(7):2164-2177. 2018
- Liao D, Wang Q, He J, Alexander DB, Abdelgied M, El-Gazzar AM, Futakuchi M, Suzui M, Kanno J, Hirose A, Xu J, Tsuda H. Persistent Pleural Lesions and Inflammation by Pulmonary Exposure of Multiwalled Carbon Nanotubes. *Chem Res Toxicol.* 2018;31(10):1025-1031. 2018.
- Sakamoto Y, Hojo M, Kosugi Y, Watanabe K, Hirose A, Inomata A, Suzuki T, Nakae D. Comparative study for carcinogenicity of 7 different multi-wall carbon nanotubes with different physicochemical characteristics by a single intraperitoneal injection in male Fischer 344 rats. *J Toxicol Sci.* 2018;43(10):587-600. 2018.
- Otsuka K, Yamada K, Taquahashi Y, Arakaki R, Ushio A, Saito M, Yamada A, Tsunematsu T, Kudo Y, Kanno J, Ishimaru N. Long-term polarization of alveolar

macrophages to a profibrotic phenotype after inhalation exposure to multi-wall carbon nanotubes. *PLoS One* 13(10): e0205702, 2018

- Elgazzar AM., Abdelgied M., Alexander D., Alexaander W., Numano T., Iigo M., Naiki A., Takahashi S., Takase H., Hirose A., Kanno J., Elokke OM., Nasem AM., Tsuda H. Comparative pulmonary toxicity of a DWCNT and MWCNT-7 in rats, *Arch. Toxicol.*, 93:49–59.2019 (Online: Oct. 10, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00204-018-2336-3>)
- Chikura S, Kimoto T, Itoh S, Sanada H, Muto S, Horibata K. Standard protocol for the total red blood cell Pig-a assay used in the interlaboratory trial organized by the Mammalian Mutagenicity Study Group of the Japanese Environmental Mutagen Society. *Genes Environ*, 41:5. 2019

## 2. 学会発表

大西 誠、笠井辰也、山本正弘、鈴木正明、東久保一朗、菅野 純. マーカー法を用いた生体試料中のカーボンブラックの微量定量法の開発. 第91回日本産業衛生学会学術年会 2018.5.17 (熊本)

三角恭平、大西 誠、山本正弘、平井繁行、菊地芳典、後藤裕子、武田知起、笠井辰也、鈴木正明、菅野 純 Comparison of Floating Coefficient for Carbon Blacks using N-SHOt Cyclone. 第45回日本毒性学会学術年会 2018.7.18(大阪)

高橋祐次、相磯成敏、大西 誠、石丸直澄、菅野 純、マクロファージの機能に着目したナノマテリアルのマウス吸入ばく露による慢性影響評価、第45回日本毒性学会学術年会、シンポジウム、2018.7.18(大阪)

高橋祐次、トキシコロジスト・ブラッシュアップセミナー: 肺・呼吸器の毒性変化を考えるナノマテリアルの毒性: 肺毒性を中心として、第19回日本毒性学会生涯教育講習会、2018.7.17(大阪)

Jun Kanno, Chuen-Jinn Tsai, Improvement of

Inhalation Toxicity Testing for Nanomaterials and Compliance Monitoring for Ambient PM. Xth International Aerosol Conference (IAC 2018), Plenary Session 4, 2018.9.6. (St. Louis)

Abdelgied M., Elgazzar AM., Alexander D., Alexander W., Numano T., Iigo M., Naiki-Ito A., Abdelhamed M., Takase H., Hirose A., Taquahashi Y., Kanno J., Takahashi S., Tsuda H. Potassium octatitanate fibers are possibly carcinogenic in male Fisher 344 rats. 54th congress of the European societies of toxicology (EUROTOX2018) (September 2018 Brussels, Belgium)

Hirose A., Hojo M., Kobayashi N., Impact of sample preparation of MWCNT for developmental toxicity by intratracheal instillation. The 10th Congress of Toxicology in Developing Countries (CTDC2018) (April 2018 Belgrade, Serbia)

Hojo M, Kobayashi N, Hasegawa Y, Sakamoto Y, Murakami S, Yamamoto Y, Tada Y, Maeno A, Kubo Y, Ando H, Shimizu M, Taquahashi Y, Suzuki T, Nakae D, Hirose A: Relationship between developmental toxicity of multi-wall carbon nanotubes (MWCNT) and lung inflammation in pregnant mice after repeated intratracheal instillation. 54th congress of the European societies of toxicology (EUROTOX2018) (September 2018 Brussels, Belgium)

Watanabe W, Akashi T, Hirose A, Miyauchi A, Yoshida H, Kurokawa M. Effects of double-walled carbon nanotubes on the pneumonia in respiratory syncytial virus-infected mice. 54th Congress of the European Societies of Toxicology, (September 2018 Brussels, Belgium)

渡辺 渡、明石 敏、宮内亜宜、吉田裕樹、黒川昌彦 二層カーボンナノチューブ曝露のRSウイルス肺炎への影響 第66回日本ウイルス学会総会(2018年10月京都)

坂本義光, 北條幹, 鈴木俊也, 猪又明子, 守安貴子, 広瀬明彦, 中江大: 多層カーボンナノチューブ(MWCNT)を単回経気管噴霧投与した後終生飼育したラットの肺および中皮組織における増殖性病変の発生. 第45回日本毒性学会学術年会(2018年7月大阪)

坂本義光, 多田幸恵, 北條幹, 前野愛, 鈴木俊也, 猪又明子, 守安貴子, 中江大: ラットにおいてDHPNで誘発されたメソテリン陽性肺増殖性病変の病理組織化学的性状. 第35回日本毒性病理学会学術集会(2019年1月東京)

津田洋幸, 徐結苟, Alexander WT., Alexander DB., Abdelgied M., Elgazzar A., 沼野琢旬, 広瀬明彦, 菅野純. ナノマテリアルの気管支内投与による毒性と発がん性の簡易検出システムの開発 第45回日本毒性学会学術年会 大阪 2018年7月

津田洋幸, 徐結苟, Alexander WT., Alexander DB., Abdelgied M., Elgazzar A., 沼野琢旬, 広瀬明彦, 菅野純. ナノマテリアル特にカーボンナノチューブによる肺・胸膜中皮障害と発がん性の経気管肺内噴霧投与(TIPS)試験法の開発 第45回日本毒性学会学術年会(2018年7月大阪)

北條幹, 小林憲弘, 長谷川悠子, 安藤弘, 久保喜一, 海鉦藤文, 田中和良, 五十嵐海, 村上詩歩, 多田幸恵, 生嶋清美, 湯澤勝廣, 坂本義光, 前野愛, 鈴木俊也, 猪又明子, 守安貴子, 高橋祐次, 広瀬明彦, 中江大: 多層カーボンナノチューブのマウス気管内投与による発生毒性と肺の炎症との関連性. 第45回日本毒性学会学術年会(2018年7月大阪)

堀端克良: Pig-a / PIG-A 遺伝子変異試験によるヒトを含めた *in vivo* 遺伝毒性モニタリング. 平成30年度日本環境変異原学会公開シンポジウム(2018年6月東京)

堀端克良: Pig-a アッセイの標準化に関する研究: パリテーション研究の推進とヒトへの適用. 日本環境変異原学会第47回大会(2018年11月京都)

## G. 知的財産権の取得状況

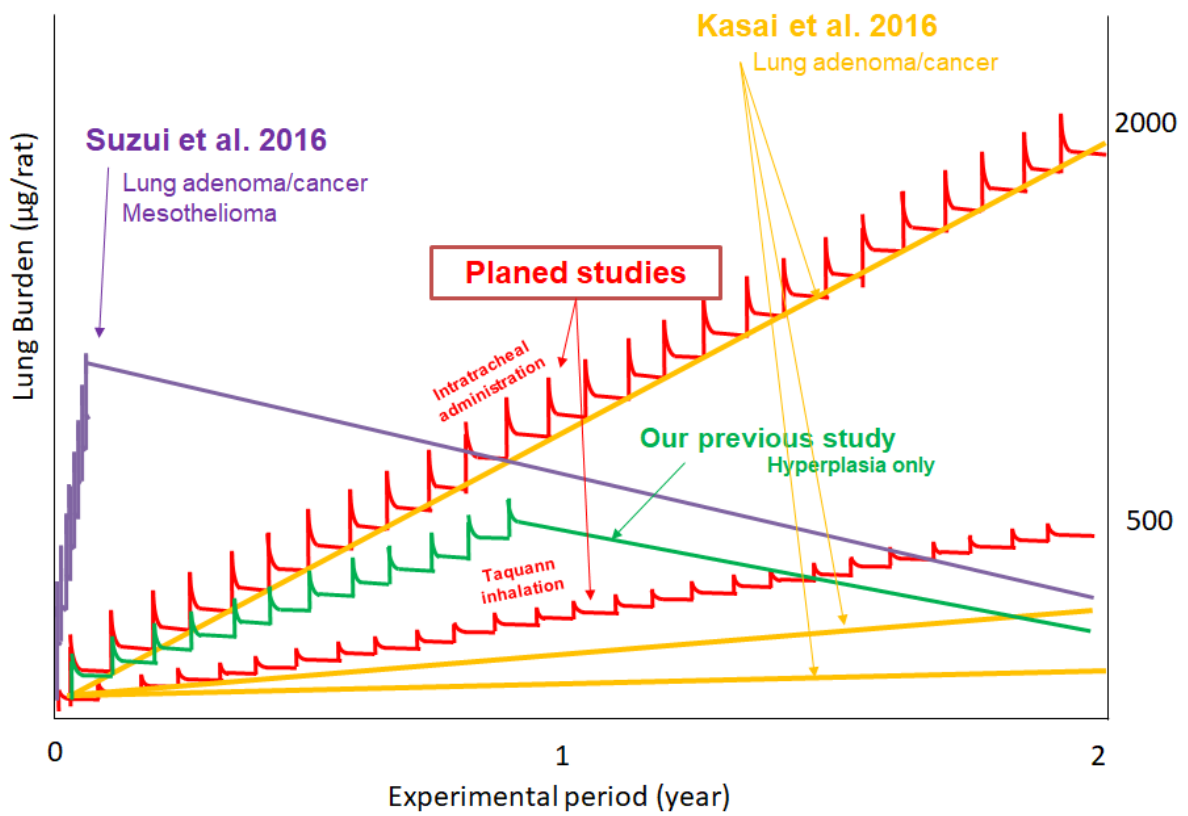
### 1. 特許取得(出願中)

特許出願; 柴田眞利, 菅野 純, 生田達也, 鶴田祐吾, 高橋祐次: 吸入曝露試験用カートリッジ、試験物質供給装置及び吸入曝露試験装置 特願 2018-81836、2018.4.20

特許出願; 柴田眞利, 菅野 純, 生田達也, 鶴田祐吾, 高橋祐次: 試験物質供給装置及び吸入曝露試験装置 特願 2018-81837、2018.4.20

### 2. 実用新案登録 (該当なし)

### 3. その他 (該当なし)



☒ 1. Comparison of cumulative MWCNT lung burden among studies