

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

分担研究課題名:慢性影響を考慮した気管内投与法の確立に関する研究及び短期曝露試験系の総合評価に関する研究

研究分担者: 小林 憲弘 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生科学部 室長
研究分担者: 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
研究協力者: 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

研究要旨

ナノマテリアルの呼吸器毒性の評価として気管内投与法は有力であるが、投与用量や、投与媒体および分散状態がその評価に大きな影響を及ぼすことが示唆されている。

今年度は、1%CMC-Na 含有 PBS に分散させたこれら試料の分散状態を比較するためのひとつの指標として動的光散乱法 (DLS) による二次粒子径の分析を試みた。DLS によるサンプルの観察は、今年度より本研究班で実施するラット気管内投与実験で用いる試料の状態を把握するためにも重要である。

これまでの研究において、未処理、熱処理、Taquann 処理および Taquann 処理後熱処理、という各試料の投与により異なるレベルの肺炎症が引き起こされたため、投与後の MWCNT の肺負荷量を確認する必要がある。今年度は未処理、熱処理、Taquann 処理の 3 種類のサンプルをマウスに単回気管内投与し、肉眼的に観察した後、肺負荷量測定用試料としてサンプリングした。さらに、ラット気管内投与で用いる Taquann 処理 MWCNT の懸濁媒体を選択するために、情報収集を行うとともに、Tween80 と PF68 を用いた場合の分散状態を肉眼的に観察した。

その結果、DLS の測定により、未処理 MWCNT および熱処理 MWCNT の試料では、測定上限 (16 μm) までピークが見られたのに対し、Taquann 処理 MWCNT の試料では粒径の大きいピークは見られず 1 nm 付近にピークが見られる等の顕著な差が認められた。マウスへの気管内単回投与を行った肺の肉眼観察では、熱処理、未処理、Taquann 処理の順に影響が強いように見えた。特に、Taquann 処理の MWCNT 沈着量が顕著に少なく見えたが、MWCNT 肺負荷量を分析してからの判断となる。今後、DLS による分析結果とも合わせ、昨年度まで実施したマウス発生毒性試験の結果を総合的に解釈する。また、MWCNT の Pluronic F-68 と Tween80 への分散状態を比較すると Pluronic F-68 の方の安定性が高かったが、今回のラット投与試験は気管内投与を 2 年間続ける初めての試みであるため、再現性良く、効率よく十分に分散でき、かつ、媒体単独の影響を低くすることを重視し、Tween80 (ポリソルベート 80 を懸濁媒体として使用することにした。

一方、国際動向調査及び短期曝露に関する評価文書作成に関して、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おり、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 からさらに7つの新規プロジェクトが提案された。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。

A. 研究目的

ナノマテリアルの呼吸器毒性の評価として気管内投与法は有力であるが、投与用量や、投与媒体および分散状態がその評価に大きな影響を及ぼすことが示唆されている。本研究班においても、分散媒体として Tween80、BSA、CMC-Na など、種々の媒体が使用されてきたが、実験目的を損なわないよう選択することが肝要である。

近年、我々は MWCNT の気管内投与によるマウス発生毒性・催奇形性を調査しているが、MWCNT に種々の前処理を施すことで、母体の肺炎症ひいては胎児におよぼす影響が変化することがわかってきた。MWNT-7 を 4.0 mg/mL の濃度で 1%CMC-Na 含有 PBS に懸濁させると、未処理の MWCNT に比べて、200°C・2 時間の熱処理を加えた MWCNT は分散しやすく、一方、Taquann 処理された MWCNT は分散しづらかった。Taquann 処理された MWCNT にさらに熱処理を加えると、再度媒体へ分散しやすくなった。前処理によるサイズ分布の違い、夾雑物の除去、表面構造への影響、また、分散状態の差異等の変化が、母体の肺炎症の程度に影響を与えた可能性があるが、試料のキャラクタリゼーションが不十分であった。

そこで、今年度は、1%CMC-Na 含有 PBS に分散させたこれら試料の分散状態を比較するためのひとつの指標として動的光散乱法 (DLS) による二次粒子径の分析を試みた。動的光散乱法 (Dynamic Light Scattering: DLS) は、溶液中のナノメートルオーダーの微粒子を計測する、かつ ISO にも記載 (ISO 22412:2017) された実用的かつ簡便な手法であり、溶液中におけるナノ粒子の「運動

速度」を計測し、そのデータから各種の数値計算 (吸収率、粘度等のパラメータを考慮) を利用して「大きさ=径」に換算する。DLS によるサンプルの観察は、今年度より本研究班で実施するラット気管内投与実験で用いる試料の状態を把握するためにも重要である。

一方、上記の通り、昨年度までの実験において、未処理、熱処理、Taquann 処理および Taquann 処理後熱処理、という各試料の投与により異なるレベルの母体毒性すなわち肺炎症が引き起こされたため、投与後の MWCNT の肺負荷量を確認する必要がある。今年度は未処理、熱処理、Taquann 処理の 3 種類のサンプルをマウスに単回気管内投与し、肉眼的に観察した後、肺負荷量測定用試料としてサンプリングした。

さらに、ラット気管内投与で用いる Taquann 処理 MWCNT の懸濁媒体を選択するために、情報収集を行うとともに、Tween80 と PF68 を用いた場合の分散状態を肉眼的に観察した。

ナノマテリアルの毒性評価手法の海外動向については、昨年度の OECD のナノマテリアル作業グループにおいて、EU が提案してきた 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のその後の動向や、わが国が提案している in vivo 短期間曝露試験の有用性検証の為の評価文書の作成プロジェクトに関してその後の情報収集等を行うことを目的とした。

B. 研究方法

i) MWCNT 分散液の調製及び DLS の測定

未処理および熱処理 MWCNT 試料を MWCNT

濃度 4 mg/mL となるように 1%CMC-Na 含有 PBS 溶液で 30~60 分間、超音波処理をして分散液を調製し、調製当日にゼータサイザーナノ (Malvern 社) を用いて DLS モードで粒径分布を測定した。また、別日に Taquann 処理 MWCNT 試料についても同様の方法により分散液調製および DLS 測定を行った。

測定に当たっては、PBS で 10 倍希釈 (0.4 mg/mL) し、超音波処理で再分散させてからすぐに測定した。各試料は 3 回測定し (Taquann 処理試料は 1 回)、1 回の測定につき、120 秒の安定後に 3 回のレコードを取った。

ii) マウス単回投与後の肺負荷量測定

ICR 系雄性マウスを 9 匹ずつ 3 群に分け、未処理群、熱処理群および Taquann 処理群とした。i) で調製した 3 種類の投与試料を投与直前に、再度、超音波浴槽で 30 分間、分散させた。22G のシリンジを加工した投与器具を用いて、0.04 mL/mouse (およそ 4 mg/kg 体重) の用量で気管内に単回投与した。また、投与試料を 2 μ L スライドグラスに滴下し、顕微鏡下で観察した。

投与 1、3 および 9 日後にそれぞれ 3 匹ずつ剖検し、肺を摘出し肉眼観察した。その後、全葉を 10% 中性緩衝ホルマリン溶液で固定し、肺負荷量測定用の試料として保管した。

iii) Taquann 処理 MWCNT の懸濁媒体の検討

Taquann 処理 (53 μ m シーブ) された MWNT-7 を、ガラスバイアルにおよそ 2.0 mg ずつ分取し、それぞれが 0.4 mg/mL の濃度になるように懸濁した。懸濁媒体は、Tween80 (ポ

リソルベート 80 (日油 ; 三局適合) あるいは Pluronic F-68 (Gibco) をそれぞれ終濃度 0.1% あるいは 0.5% に生理食塩水で希釈したものとした。

懸濁試料は超音波浴槽で 15 分以上よく分散させた後に静置した。分散直後、1、2、5 および 24 時間後に肉眼的に観察した。また、分散直後の試料については 2 μ L スライドグラスに滴下し、顕微鏡下で観察した。

iv) 国際動向調査

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や研究提案等を行った。

C. 研究結果

i) MWCNT 分散液の調製及び DLS の測定

未処理および熱処理 MWCNT 分散液試料については、3 回の DLS 測定および各測定内での 3 回のレコードの粒径分布にバラツキがあるものの、主要ピークの直径は概ね 1500~2000 nm の範囲にあった (図 1)。

ただし、分布内に 2 つのピークトップが見られる場合もあり、例えば未処理 MWCNT 試料分散液の 1 回目の測定における 2 回目のレコードの粒径分布は、863 nm と 3256 nm の 2 つのピークトップが見られた。

一方、Taquann 処理 MWCNT 分散液試料については、3 回のレコードの粒径分布はいずれも約 1 nm と、未処理および熱処理 MWCNT 試料の分布よりも小さい結果が得られた (図 2)。

ii) マウス単回投与後の肺負荷量測定

投与前に、未処理、熱処理あるいは Taquann 処理を施した 3 種類の試料を超音波浴槽で再分散させたところ、未処理 MWCNT に比べ熱処理 MWCNT は速やかに分散し、一方、Taquann 処理 MWCNT は、30 分以上処理しても、部分的に凝集していることが肉眼的に認められた (図 3)。これは発生毒性試験を実施した時の状態を再現していた。投与試料の顕微鏡観察においては、Taquann 処理 MWCNT には凝集体がやや少ないように見えた (図 4)。

投与後の肺の肉眼観察では、単回投与であるために多少の葉間の偏りが認められた。また、肺門付近で MWCNT の沈着が最も多く認められた。Taquann 処理 MWCNT 投与群では、MWCNT の沈着量が少なかった。一方、熱処理 MWCNT 群の投与 3 日後の 2 例では全葉がやや暗赤色が強く、含気の悪い状態とみられる肺が観察され、投与による強い反応が起きているように思われた (図 5 ; 矢印)。

肺負荷量測定は次年度以降実施する予定である。

iii) Taquann 処理 MWCNT の懸濁媒体の検討

Tween80 あるいは Pluronic F-68 に懸濁させた試料を比較すると、肉眼的および顕微鏡下では、分散直後には同程度の分散状態に見えた。ところが、その後 1 時間静置すると、Tween80 に懸濁した試料には沈殿が見られ、その後、24 時間まで沈殿が増え、上清がクリアになっていた。0.1% と 0.5% の間に顕著な差は見られなかった (図 6)。一方、Pluronic F-68 に懸濁した試料には、5 時間後までは沈殿が見られなかった。24 時間後にもある程度の分散状態が維持され、

沈殿量は限定的であった。0.1% と 0.5% に差は見られなかった (図 7)。

以上から、投与直後の分散状態に大きな違いが無いものの、Pluronic F-68 は Tween80 に比べて明らかに MWCNT の分散状態が安定していることがわかった。

iv) 国際動向調査

H30 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作業部会では、昨年度の 2 月に OECD ナノマテリアル作業会合で EU 等が提案したプロジェクトについて、次年度の 4 月に開催される WNT 会議に向けて正式なプロジェクトとして承認されるように一年かけて準備に入ることが紹介された。

さらに、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 からさらに、以下の 7 つの新規プロジェクトが提案された。

- 経口摂取したナノマテリアルの腸管での消失を測定するために統合化された *in Vitro* アプローチ
- 生態影響試験における生体サンプル中のナノマテリアル濃度を測定するためのガイドライン
- 環境媒体中のナノマテリアルの溶解性を測定するために標準法 (ダイナミック Method)
- 産業用ナノマテリアルの生体濃縮評価の為の段階的試験ストラテジーの開発
- 酸化的ダメージを含む遺伝毒性を試験するための酵素結合 *in vitro* コメットアッセイ: ナノマテリアルと他の化学物質への適用
- OECD テストガイドライン 474 (哺乳類赤

血球小核試験)のナノマテリアルへの適用に関するガイダンス文書

- ナノマテリアルの環境毒性を評価するための OECD テストガイドライン 201, 202 and 203 の適用

このうち、生体濃縮性評価とコメットアッセイに関する案件は、課題等を再整理して、次回以降の提案に承認が持ち越されたが、それら以外の5つの提案についてはこの会議で承認されるか、会議の書面による修正手続きで承認される方向となった。

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。発表に供した発表スライドのうち、研究班の背景や計画についての概要を示したスライドの一部を図8-図10に示した。

図8では本研究班の背景と目的について説明しており、現時点で定量的なリスク評価に必要な慢性吸入曝露試験は WMNT-7 を使った試験のみであるが、その他の MWCNT の定量的なリスク評価を行うために、すべての MWCNT で完成の連続吸入試験を行うのは非現実的であること。この課題解決のためには、連続的な慢性曝露法や間欠的な曝露手法の比較と共に、吸入曝露法と気管内曝露法の比較検討に基づいて、将来的には、代替的な試験法の開発がひつようなこと。定量的なリスク評価手法に対応するために新たな修正係数や用量反応関数などを導き出して、NOAEL や TDI を導出する手法の開発に結びつけることが将来的な目であることを示した。図9では、研究班の計画として、①2年間のラットを用いた間欠型の慢

性気管内投与曝露試験、②2年間のマスをを用いた、間欠型の吸入曝露 (Taquann 法) 試験および③単期間 (2weeks) 気管内投与による慢性観察試験における、発がん性のプロファイルや肺内負荷量との関係を調査することを示した。図10では、発がん性の強さが生涯期間の肺負荷量に依存する仮定した場合を想定した場合に、肺負荷量の経時変化について、過去の慢性吸入試験や短期間気管内投与試験と間欠曝露法を比較した図を示し、発がん性の種類や強さを比較して、将来的な短期間曝露法による慢性吸入試験法の代替案を提案していくためのストラテジーを示した。

D. 考察

i) MWCNT 分散液の調製及び DLS の測定

DLS により測定した未処理および熱処理 MWCNT 分散液試料の主要ピークの粒径は 1500~2000 nm 程度、Taquann 処理 MWCNT 試料分散液の主要ピークの粒径は 1 nm 程度であった (表1)。

未処理および熱処理 MWCNT 分散液試料では、ピークの分布の裾が測定上限 (16 μm) まで広がっていたが、Taquann 処理試料では粒径の大きいピークは見られなかった

このことから、DLS により得られた測定結果 (主要ピーク) は、分散した MWCNT あるいはその凝集体ではなく、光頭の画像でもみられる MWCNT 周辺の細かい粒子に相当しているのではないかと考えられる。

DLS により MWCNT 分散液試料の分散状態の特徴を定量的に明らかにすることは限界があるものの、分散液中での MWCNT の状態をある程度表すことができるのではないかと考えられる。

ii) マウス単回投与後の肺負荷量測定

昨年度までの母体マウス気管内反復投与の結果は、熱処理、未処理、Taquann 処理の順に肺の炎症が強かった。今回は、一回当たりの MWCNT 負荷量を明らかにするために、単回投与を実施したところ、肉眼観察のレベルではあるが、反復投与と同様に、熱処理、未処理、Taquann 処理の順に肺組織への影響が強いように見えた。

次年度以降、これらの肺における MWCNT 負荷量を測定する予定である。肺炎症のレベルの違いは、前述のように MWCNT の前処理による何らかの性質の違いに起因するのか、それとも、単に肺負荷量に対応したものであったのかを明らかにする必要がある。Taquann 試料は従来、吸入試験用に開発された、凝集体を除去する処理であるが、溶液への懸濁後も凝集体が少ないとされている。そのため、投与後に肺に広く均一に分布した可能性はあるが、それを考慮しても、肉眼観察においては、Taquann 処理 MWCNT 投与群での MWCNT の沈着量が他の 2 群に比べて明らかに少ないように見えた (図 5)。Taquann 処理 MWCNT は Tween80 等の界面活性剤を用いた場合とは異なり、CMC-Na 含有 PBS とのなじみが悪く、分散に時間がかかり、図 3 のように、投与前のサンプルでも大きな凝集塊が生じてしまうことがわかってきた。したがって、投与試料に分散している MWCNT の量が少なく、結果的に、実際の投与量すなわち肺負荷量が低下してしまった可能性がある。このことは、DLS 測定で大きい波長のピークが見られなかったことと対応しているのかもしれない。この点については、肺負荷量の分析結果が出てか

ら再度議論する必要がある。

ところで、Taquann 試料が CMC-Na 含有 PBS に分散しづらい原因は Taquann 処理に用いる tert-ブチルアルコールのごくわずかな残留によるものと推測している。Taquann 処理 MWCNT にさらに熱処理を加えた場合には、CMC-Na 含有 PBS にも比較的容易に分散したためである。tert-ブチルアルコールの融点は 25.7℃、沸点は 82.4℃であり、投与試料のオートクレーブや乾熱滅菌で揮発するはずである。

iii) Taquann 処理 MWCNT の懸濁媒体の検討

今年度より北條が実施しているラット気管内反復投与試験には、大きな凝集体を含まない試料が適すると考えられたため Taquann 処理 MWCNT を使うこととした。懸濁媒体については過去の報告や今回の観察結果をもとに検討した。

これまでのマウス発生毒性の試験から、MWCNT の CMC-Na 含有水溶液への分散には Taquann 処理試料に限らず、時間と技術を要することがわかった。再現性良く速やかに分散させるには Tween 等の界面活性剤が適していると考えられた。また、我々が実施した過去のラットやマウスの気管内投与試験で、CMC-Na 含有懸濁媒体の単独投与で、泡沫化マクロファージが目立つことがあった。

一方、Tween 等の界面活性剤でも多少の炎症反応が起こることは報告されている。医薬品添加剤として利用されている種々の界面活性剤の中で、Tween80 (ポリソルベート 80) の用途は広く¹⁾、慢性毒性試験の情報も多い。また、過去の Taquann 処理 MWCNT の腹腔投与試験や(菅野;平成 26 年度報告)、

1年間4週に1度の頻度で行った原末MWCNTの気管内反復投与でも（北條；平成29年度報告）、Tween80を使用した実績がある。以上のことから、Tween80を利用するのが妥当である。

今回、津田らが用いているPluronic F-68について、Tween80と分散状態を比較した結果、明らかにPluronic F-68の安定性が高いことが確認された。しかしながら、ラット気管内投与試験において、Tween20、kolliphor P188（Pluronic F-68の代替品）およびBSA等の懸濁用の媒体を投与し比較した実験では、kolliphor P188が有意に強い炎症反応を起こすことが示されており²⁾、また、長期間の気管内反復投与の実績は無い。今回の実験からは、Tween80についても分散直後に関してはPluronic F-68と遜色のない分散状態であったことから、投与直前まで超音波浴槽で十分に分散させることを前提に、Tween80を使用することも可能と判断した。

iv) 国際動向調査

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、化学物質評価のためにOECD加盟国で相互に受け入れ可能な試験法ガイドライン等を審議しているOECDのテストガイドライン等の策定を審議している作業グループであるナショナルコーディネータ（WNT）会議において承認を受ける必要がある。

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、本研究で確立している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重要であると考えられた。

E. 結論

DLSの測定により、未処理MWCNTおよび熱処理MWCNTの試料では、測定上限（16 μm）までピークが見られたのに対し、Taquann処理MWCNTの試料では粒径の大きいピークは見られず1 nm付近にピークが見られる等の顕著な差が認められた。DLSによりMWCNT分散液の分散状態の特徴を明らかにすることには限界があるが、未処理と熱処理の差異を検出することを目指し、分析濃度等の再分析を予定している。

マウスへの気管内単回投与を行った肺の肉眼観察では、熱処理、未処理、Taquann処理の順に影響が強いように見えた。特に、Taquann処理のMWCNT沈着量が顕著に少なく見えたが、MWCNT肺負荷量を分析してからの判断となる。今後、DLSによる分析結果とも合わせ、昨年度まで実施したマウス発生毒性試験の結果を総合的に解釈する。

MWCNTのPluronic F-68とTween80への分散状態を比較するとPluronic F-68の方の安定性が高かったが、今回のラット投与試験は気管内投与を2年間続ける初めての試みであるため、再現性良く、効率よく十分に分散でき、かつ、媒体単独の影響を低くすることを重視し、Tween80（ポリソルベート80）を懸濁媒体として使用することにした。

一方、国際動向調査及び短期曝露に関する評価文書作成に関して、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おり、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 からさらに 7 つの新規プロジェクトが提案された。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. 参考文献等

- 1) 医薬品分野における界面活性剤；山内仁史，杉江修一，オレオサイエンス，2002，vol.2 (11).p697-704.
- 2) ラットにおける各種媒体の単回気管内投与による胸腔洗浄液，肺胞洗浄液及び病理組織学的検索の比較；森岡舞，宇田一成，今井則夫，藤原あかり，沼野琢旬，阿部真弓，米良幸典，2018，第45回日本毒性学会学術集会.

G. 研究発表

(論文発表)

Abdelgied M, El-Gazzar AM, Alexander DB, Alexander WT, Numano T, Iigo 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. Cancer Sci.*

109(7):2164-2177. 2018

El-Gazzar AM, Abdelgied M, Alexander DB, Alexander WT, Numano T, Iigo M, Naiki A, Takahashi S, Takase H, Hirose A, Kannno J, Elokke OS, Nazem AM, Tsuda H. Comparative pulmonary toxicity of a DWCNT and MWCNT-7 in rats. *Arch Toxicol.* 93:49-59. 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.* 15:31(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.* 43(10):587-600. 2018.

(学会発表)

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)
- Taquahashi Y, Yokota S, Morita K, Tsuji M, Hirabayashi Y, Hirose A, Kanno J. Development of Whole Body Inhalation System for Well-Dispersed Nanomaterials Toxicity Testing Taquann Direct-Injection Whole Body Inhalation System. *58th Annual Meeting of the Society of Toxicology*; (March 11-14, 2019, Baltimore)
- 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, 管野純. 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, 管野純. 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)

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)

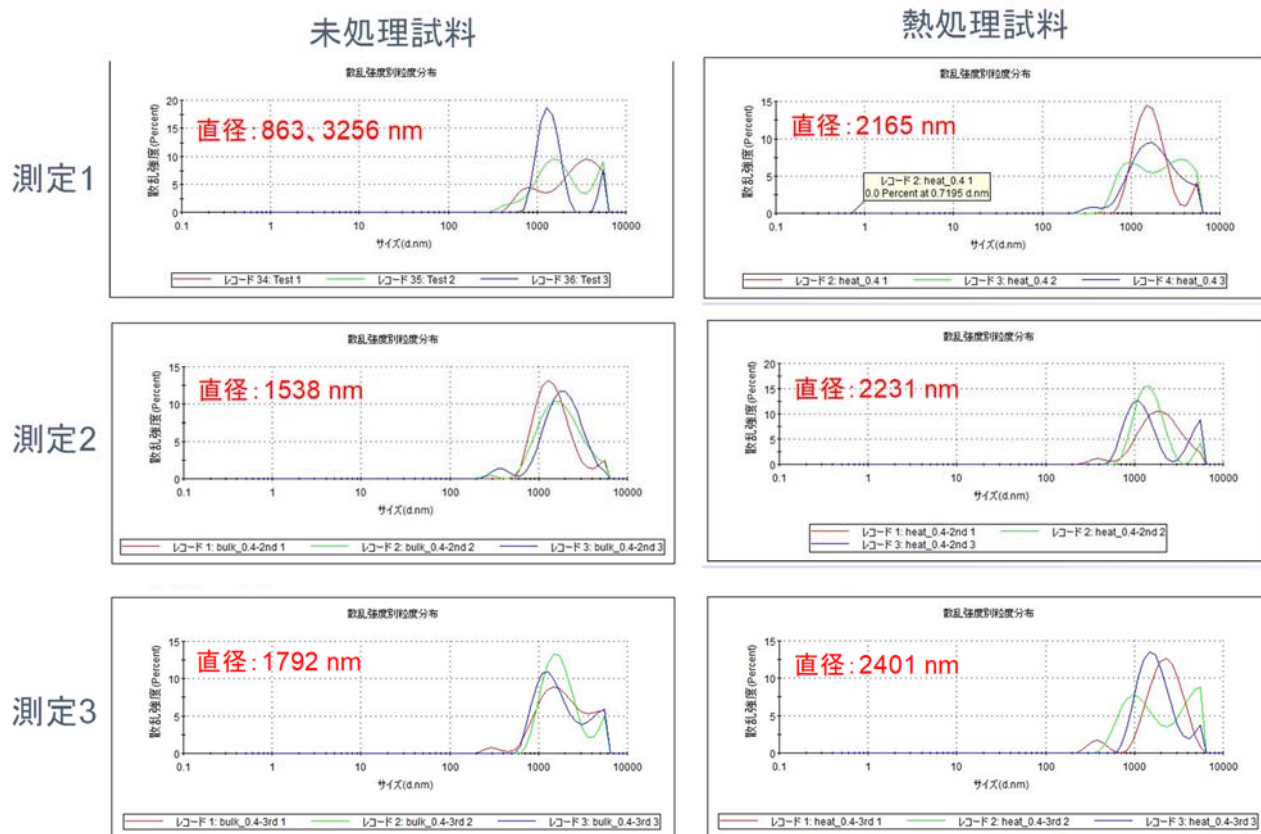


図 1：未処理および熱処理 MWCNT 分散液試料の DLS による粒径分布測定結果

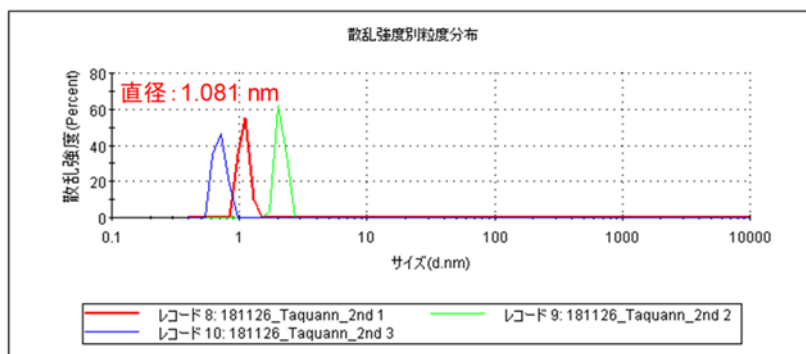
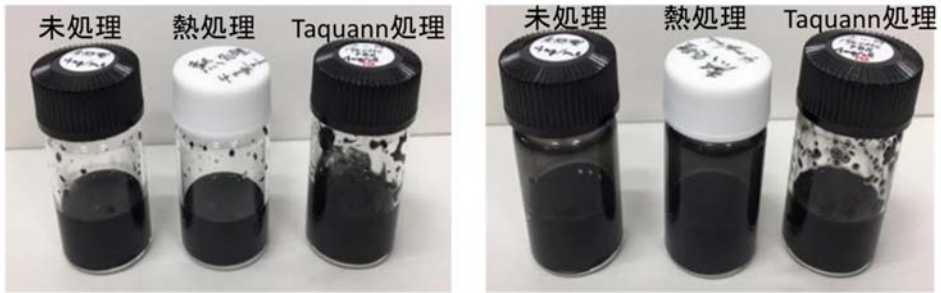


図 2：Taquann 処理 MWCNT 分散液試料の DLS による粒径分布測定結果

表 1：各試料の主要ピークの直径

	未処理	熱処理	Taquann 処理
直径 (nm)	1538	2231	1.081



超音波浴槽で分散した直後の試料。

軽く手で攪拌し、ガラス壁への濡れ性を観察した写真。Taquann処理MWCNTの懸濁液は壁からはじかれ、比較的大きな凝集体が見られる。

図3：マウス投与試験に用いた試料の肉眼観察



図4：マウス投与試験に用いた試料の光学顕微鏡観察（スケールバー；20 μm）

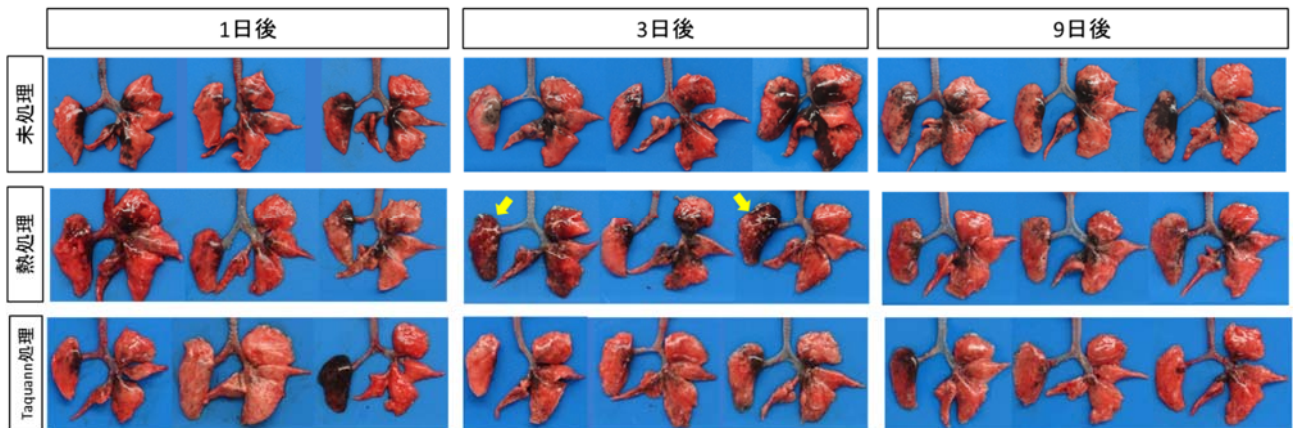


図5：気管内投与後のマウス肺の肉眼観察（矢印：特に強い反応が認められた箇所）

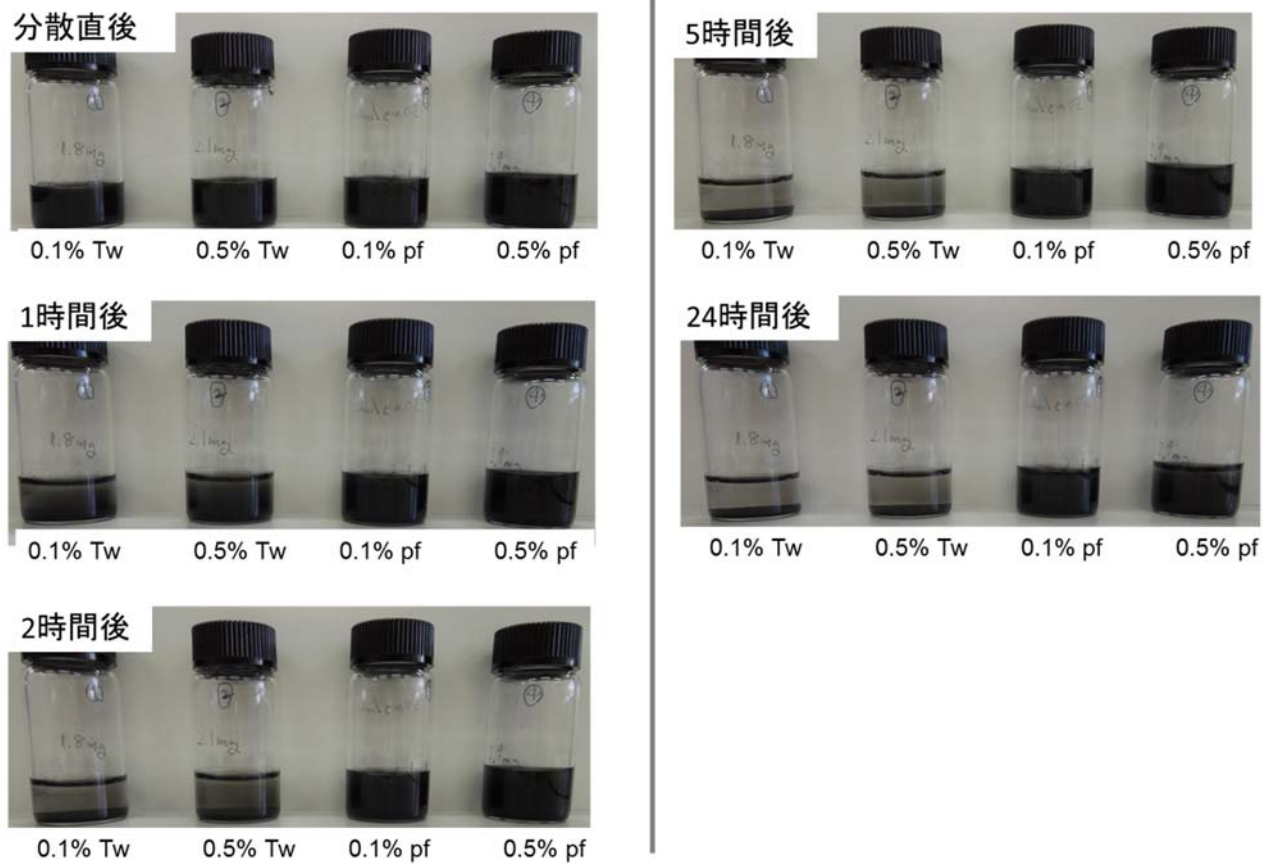


図 6: ラット投与試験用の Taquann 処理 MWCNT の分散状態の観察 Tw: Tween80、pf: Pluronic F-68

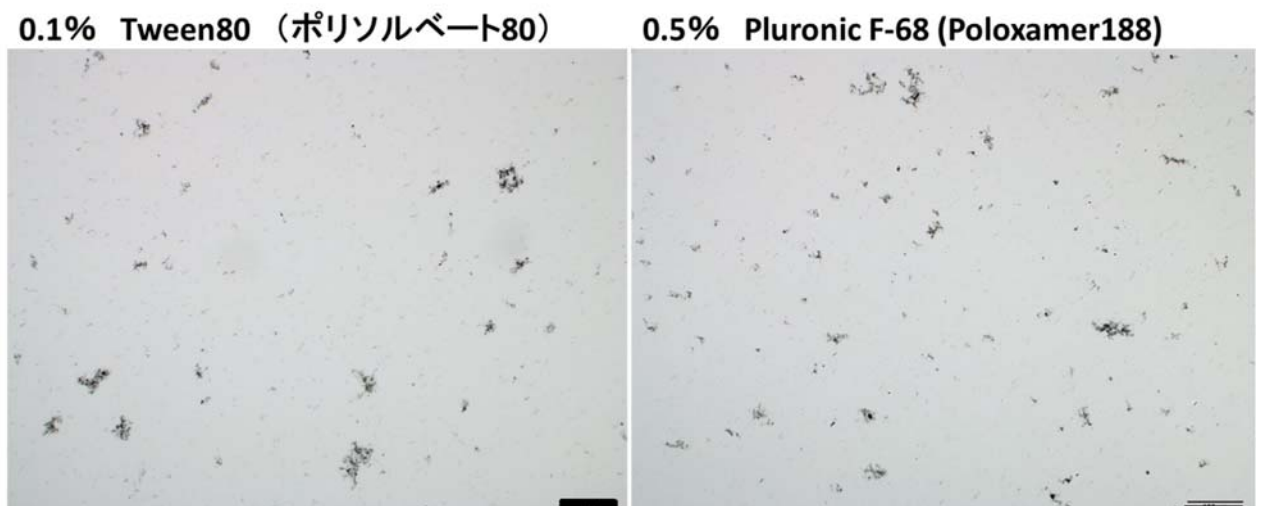


図 7: ラット投与試験用の Taquann 処理 MWCNT の分散状態の観察 (光学顕微鏡) スケールバー: 100 μ m

Objectives

- Available toxicity data of chronic exposure is only for WMNT-7 study
- How to quantitatively assess the carcinogenic potency of other MWCNTS ?

Comparison with exposure protocols for developing new methods

- ◆ continuous exposure vs. intermittent exposure
- ◆ inhalation vs. intratracheal instillation
- ◆ consideration of effect/endpoint specificity
 - Adenoma, Carcinoma
 - Mesothelioma
 - Pulmonary fibrosis

In future,

- Convert from intermittent exp. NOAEL to chronic NOAEL
 - $(\text{NOAEL chronic}) (\text{mg}/\text{m}^3) = f (\text{NOAEL intermittent}) (\text{mg}/\text{kg})$
- Derivation TDI from intermittent exp. NOAEL
 - $(\text{TDI chronic}) (\text{mg}/\text{m}^3) = f (\text{NOAEL intermittent}) / \text{UF}$
- Development of predictive short term methods for chronic toxicity

図 8 : 本研究班の目的

Study Design of Japan's Current Research Project

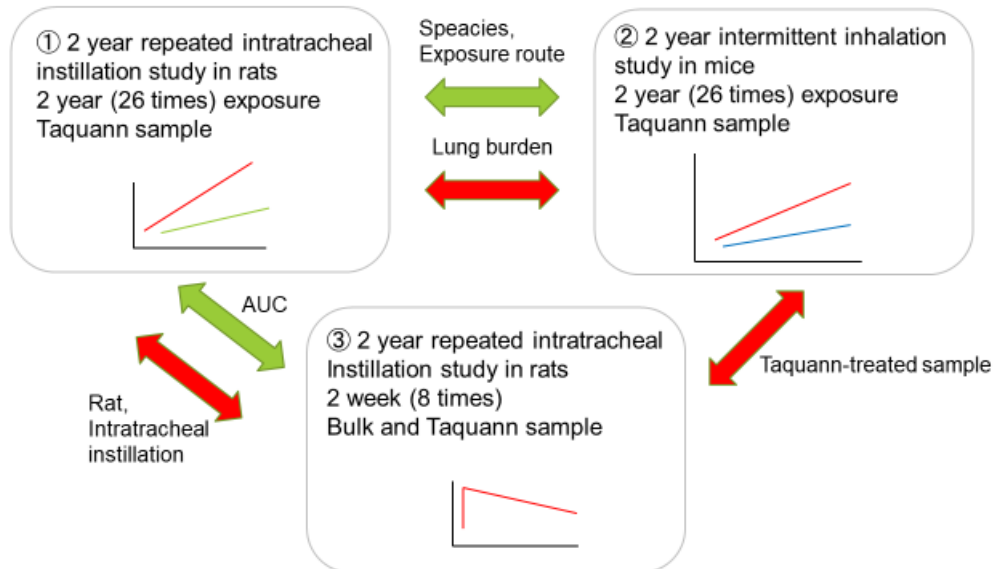


図 9 本研究班における慢性試験計画

Development of Alternative Evaluation Method of Inhalation Study

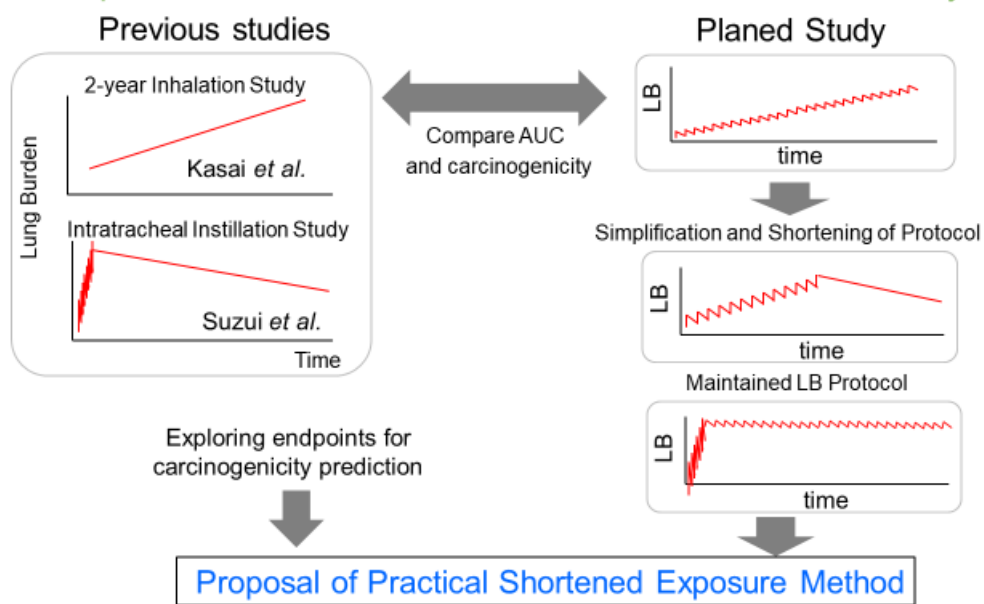


図 10. より短期間の曝露による慢性影響評価試験を提案するための戦略