

令和元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り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慢性実験が殆どない上に、定量的リスク評価に必要な慢性吸入曝露は多層カーボンナノチューブ(MWCNT)のうちの 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も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試験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し、2 年間の MWNT-7 間欠曝露試験(4 週毎に 1 回曝露)を開始した。Taquann 全身曝露吸入装置を用いた吸入曝露実験については、現在まで 12 ヶ月の中間定期解剖を終えた。気管内投与については、1 年間の反復曝露により肉芽腫性炎症や II 型肺胞上皮細胞の反応性過形成が広範囲に認められ、投与群の 2 例で細気管支肺胞上皮過形成が認められた。現時点で曝露後 1 年を経過しており肺負荷量は現在分析中である。短期間気管内噴霧(2 週 8 回投与) + 慢性観察(TIPS)法によるチタン酸カリウムの曝露(104 週後)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有意な増加が見られた。長さの異なる二層ナノチューブ曝露による慢性影響は現在解析中である。慢性影響指標に関する研究では、遺伝毒性指標としてマウスでの *in vivo* 肺小核試験遺伝毒性試験における陽性対照の適用性および採材時期の最適化を検証し、*in vivo-in vitro*法を用いる肺小核試験において最終投与 24 時間後の採材が最適であることが示された。免疫ネットワークへの影響では、MWCNT-7 の吸入曝露の慢性影響として肺胞マクロファージの分化、成熟が大きく変化することが示された。一方、感染性に対する影響としては、Taquann 法による MWNT-7 の複数回の吸入曝露後の RSV 感染マウスへの影響を検討した。前年度実施の単回曝露では見出せなかった肺炎マーカー CCL5 の有意な上昇が認められた。また、カーボン貪食マクロファージの集束など特徴的な肺病変が観察された。*In vitro*メカニズム解析研究では、様々なナノマテリアルによる NLRP3 インフラマソームを介する炎症応答が、酸化チタンや MWCNT 等の物性の違いにより薬物 X による抑制効果が異なることを見いだした。海外動向調査では、本研究班で検証している短期曝露による慢性観察試験法の有用性の周知を目的として、OECD のナノマテリアル作業グループ(WPMN)において、慢性吸入曝露ガイドライン試験との相同性に関する比較研究として紹介を行った。また、OECD では新規の先端材料(Advanced Materials)に関するリスク評価の問題も WPMN で取り扱う方針となった。今後もナノ材料のリスク評価法などのバリデーション試験に関する情報収集を継続する予定である。

以上、今年度の成果としては、間欠曝露型の吸入及び気管内投与の慢性実験について、ほぼ順調に一年を経過しようとしていることであるとともに、チタン酸カリウムや二層ナノチューブの慢性影響の確認と免疫系における慢性マーカーの確認や感染性への吸入曝露の影響とマクロファージ細胞を用いた慢性影響のメカニズム解析を行う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
科学研究所・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

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、既に 10 年以上にわたり 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慢性実験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 *in 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、慢性影響を効率的に評価できる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 年間の連続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の目的とした。

理想的な代替試験法としては、短期の曝露での連続吸入曝露試験法と同等性の結果を得ることができることでえあると考えられる。しかし、短期曝露の試験と 2 年間連続曝露の試験の NOAEL を単純に比較することでは、試験条件の違いがあまりにも大きいので、数字上の相関性を示すのみで、リスク評価への有用性を示すには限界があると考えた。そこで、本研究では、まずは 2 年間の間欠吸入曝露と、2 年間の連続吸入曝露ではどのくらい異なるのかを調べて、連続曝露と間隔を開けた曝露との同等性について検討することとした。つまり、一日あたりの投与量、あるいは総投与量、あるいは肺内の負荷量のいずれが発がん性の強さと相関するかについて調べることを目的としています。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。

本研究における試験条件の違いと毒性の違いを検証した結果を用いて、間欠吸入曝露の回数をどのくらい短くすれば、2 年間の間欠気管内投与と比較できるかの検証を継続研究で行うことにより、将来的に短期吸入曝露の試験と 2 年間連続吸入曝露の試験の定量的な同等性を明らかにすることができると考えている。

また、将来的なスクリーニング試験法や *in*

in vitro 試験法を開発する為には、AOP(Adverse Effect Pathway)の確立(同定)が必要であり、慢性曝露による Adverse Effect に至る生体反応のキーとなる影響指標を endpoint として試験系を開発しておけば、短期曝露による慢性影響を評価するために有用な試験法の開発に寄与できると考えられるため、発がん性や炎症反応に関連する遺伝毒性や免疫毒性指標に関する研究も同時に行うことを目的とする。

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体制で構成している。

慢性吸入曝露試験の代替手法検討:

H30年度に、MWNT-7を用いた慢性試験における体内負荷量を測定するため手法として、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デーションを行っており(菅野)、必要に応じて両手法使い分けて肺負荷量を測定した。

H30年度の予備試験の結果を参考にして、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、53 μ mメッシュ濾過したMWNT-7の2年間吸入曝露実験を開始した。C57BL/6NcrSLC雄性マウスを使用し、12週齢時に吸入曝露を実施した。曝露は4週間に一回の頻度で実施し、一日当たりの曝露時間は6時間とした。群構成は、対照群、低濃度群(目標濃度2 mg/m³)、高濃度群(目標濃度6

mg/m³)の3群構成とした。エアロゾルの特性は、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。本年度はH30年度に実施した6か月中間定期解剖の肺組織の病理検査及び本年度実施した12か月中間定期解剖のBALF解析を行った(肺組織標本は作製中)(高橋)。

ラット気管内投与試験にはTaquann処理(53 μ mメッシュ)したMWNT-7を用いた。200°Cで2時間処理したMWCNTに、0.1% Tween80含有生理食塩水を加え超音波浴槽で30分以上分散させた。低用量の試料は0.125mg/mL、高用量の試料は0.5mg/mLの濃度にそれぞれ調製した。投与試料のキャラクタリゼーションとして、DLSにより二次粒径分布を、SEM法により繊維長の分布を解析した(小林、北條)。

2年間のラット反復投与試験は、経口ゾンデあるいはスプレーゾンデにより、4週間に1度、実施した。F344雄性ラットにMWCNT懸濁液を、低用量群には、0.125mg/kg/回、高用量群及び高用量スプレー群には 0.5mg/kg/回の用量で投与した。経過観察として、投与開始から半年経過後と1年経過後に、各群5匹ずつを病理組織学のおよび生化学的に評価した。また、肺のMWCNTの含有量を大西法により測定した(北條、広瀬)。

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の炎症、発がん性をMWNT-7と比較した。また、長さの異なる二層ナノチューブ(DWCNT)(15, 7, 1 μ m)について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 22×10^{12} 本/ラットとなるように調整して、投与終了後6時間、4、52、104週後に屠殺し、慢性影響の比較を行っている(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、先行研究で実施した気管内投与下における *in vivo* 肺小核試験の陰性結果の妥当性を検証するために、*in vivo-in vitro*法を用いた肺小核試験法における陽性対照の適切性と採材時期の検証を行った。陽性対照として Ethyl methanesulfonate (EMS, 25 mg/kg および 50 mg/kg の用量を設定) を各群3匹の8週齢雄性 C57BL/6NCrSlc マウスに2日連続腹腔内投与し、他の *in vivo* 遺伝毒性試験法等で推奨されている採材時期を参照し、陽性対照の最終投与3時間後、24時間後または5日後にそれぞれ肺組織を採材し、肺由来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 *in vivo-in vitro*法を用いた小核試験法を実施した(堀端)。

免疫系への吸入曝露による慢性影響については、MWNT-7の2年間の吸入曝露実験の6ヵ月曝露の定期解剖から得られたサンプルを用いて肺を中心とした免疫細胞分画あるいは各種遺伝子発現に関して検討を加えた(石丸)。感染性への影響評価については、MWNT-7の Taquann法による複数回(3回)の吸入曝露マウスに対してRSV感染実験を行った。方法としては、BALB/cマウスに対して、RSV感染の7、5および3日前にMWNT-7を0、3 および6 mg/m³、6時間吸入曝露を実施した。続いてRSVを経鼻感染させ、5日後の肺胞洗浄液(BALF)中のサイトカイン・ケモカイン定量や肺病理組織学的な解析を行った(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応答の違いを、薬物による抑制の差異に着目して検討した。THP-1マクロファージに各種MWNT類を曝露し、NLRP3インフラマソーム依存的なIL-1β分

泌への薬物Xの影響を解析した(最上)。

国際動向に関する研究:

OECDのナノマテリアル作業グループにおいて、慢性吸入試験法の代替法としての *in vivo* 短期間曝露試験の開発の有用性について発表すると共に、本研究班の成果の学会発表や気管内投与法の有用性の海外発信を行った(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:

2年間の MWNT-7 吸入曝露実験では、Taquann法処理に目開き 53 μm の金属製フィルターを用いて、C57BL/6NcrSLC 雄性マウスに、対照群、低濃度群、高濃度群の3群構成で4週毎に6時間/日の吸入曝露を行い12ヵ月までの曝露を行った。曝露装置は、Taquann直噴全身吸入装置 ver.3.0 を使用した。曝露13回の平均質量濃度は低濃度群、高濃度群それぞれ 2.6±0.1 mg/m³、5.0±0.2 mg/m³、MMAD は 400~500nm と考えられた。曝露開始後6及び12ヵ月の定期解剖を行った。吸入曝露肺の肉眼所見では僅かに灰色を呈していた。BALF採取後の吸入曝露露肺の病理組織は現在作成中である。6ヵ月の定期解剖時の肺病理組織検査の結果を得た。肺内に吸入された T-CNT7#53 のほとんどは、終末気管支内および肺胞管への移行部(中間帯)に存在しており、この領域

の既存の線維成分が反応性に増殖していたが、その程度は対照群(図1)に比して軽微であった(図2)。大部分の T-CNT7#53 は大小の凝集体を形成し、大型の凝集体は複数のマクロファージに取り囲まれて存在していた。小型の凝集体は単一のマクロファージに貪食されており、そのうち、やや大型の凝集体については多核化したマクロファージが貪食する像も認められた。これら貪食マクロファージが終末細気管支に近い肺胞内に集簇する像(以下、肺胞内集簇巣)を認めた(図3)。末梢の肺胞領域には少数ながら、単一乃至少数の T-CNT#53 線維を貪食したマクロファージが散在する像を認めた(BALF 後の検体の為、定量性は保証されない所見であると考え)。また、T-CNT7#53 線維が貪食されずに肺を構成する細胞に刺さった像、肺胞壁に付着したような像も観察された(電子顕微鏡による確認予定)。6 カ月解剖における肺負荷量は、低濃度群、高濃度群それぞれ $6.4 \pm 1.1 \mu\text{g}/\text{動物}$ (N=3)、 $15.2 \pm 1.0 \mu\text{g}/\text{動物}$ (N=3)であった。

2 年間のラット反復投与試験に用いた MWCNT 試料の二次粒子径は平均 720.2 nm であり、繊維の長さの平均値は $6.03 \pm 3.86 \mu\text{m}$ であった。肺重量、BALF 中の総細胞数・好中球数・リンパ球数および BALF 中の総タンパク質は、投与群で有意に増加し、用量依存的な増加、さらに経時的な増加が認められた。組織学的には、半年経過後、1 年経過後のいずれについても、MWCNT 繊維の沈着や MWCNT を貪食したマクロファージの凝集が肺実質全体にびまん性に認められ、MWCNT の沈着部位に関連して、II 型肺胞上皮細胞の反応性過形成が認められた。反応性過形成は、投与用量に依存して増加したが、経時的な増加は低用量群のみで見られた。肺腫瘍は認められ

ておらず、細気管支肺胞上皮過形成が投与群の 2 例に観察された。胸腔内に中皮腫は観察されなかったが、横隔膜などの中皮組織における炎症反応が半年経過後から観察され、特に、1 年経過後には多くの個体で認められ、胸腔内への繊維の移行が示唆された。1 年経過後の肺負荷量は、低用量群、高用量群および高用量スプレー群で、それぞれ 244 ± 33 、 1364 ± 270 および $1436 \pm 100 \mu\text{g}/\text{Lung}$ であった。

TIPS 法による POT と酸化チタンの比較では、2 週投与+4 週観察群において、投与肺と胸膜における炎症と障害作用は球状 TiO₂ より POT により顕著な傾向が見られた。52 週では POT (0.5mg) と MWCNT-7 における肺組織と胸腔洗浄液における炎症像、M ϕ 増加、肺胞上皮、胸膜中皮の 8-OHdG 値、PCNA 値、CCL2 レベルの有意の増加が見られた。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 群で有意の増加が見られた。長さの異なる DWCNT 曝露による慢性影響は現在解析中である。陽性対照の MWCNT-7 では 104 週に達する前にすべてのラットは胸膜悪性中皮腫悪性中皮腫で死亡している。

慢性影響指標に関する研究:

遺伝毒性指標としての *in vivo-in vitro* 法を用いた肺小核試験法において、最終投与3時間後に肺を採取した EMS 投与群は陰性対照群と比較して有意な小核誘発率の増加は認められなかった。最終投与24 時間後に肺を採取した EMS 投与群は 25 mg/kg 投与群および 50 mg/kg 投与群ともに陰性対照群と比較して十分に有意

な小核誘発率の増加が認められた。最終投与5日後に肺を採取したEMS投与群は25 mg/kg投与群においてのみ陰性対照群と比較してわずかに有意な小核誘発率の増加が認められた。以上のことから、陽性対照であるEMS最終投与24時間後での採材においてのみ明瞭な陽性となることを明らかにした。

MWCNT-7の全身吸入曝露後(6ヶ月および12ヶ月)での肺胞洗浄液(BALF)細胞における免疫細胞分画に関して、フローサイトメーターにて解析したところ、MWCNT-7曝露によって正常マクロファージ分画の割合は大きく減少するとともに、未熟あるいは異常マクロファージ分画の割合が増加することが判明した。また、BALF細胞あるいは肺組織における線維化関連遺伝子の一つであるMMP12 mRNA発現が対照群に比較して有意に上昇していた。さらに、肺組織でのIL-6などの炎症性サイトカインの発現がMWCNT-7曝露によって高まっていたことから、慢性炎症が長期に渡って継続していることが明らかになった。複数回のMWNT-7吸入曝露試験に合わせてRSV感染実験を実施した。感染5日後のBALF中の肺炎指標であるCCL5レベルは前年度実施の単回曝露と異なり、複数回曝露により有意に上昇した。一方、カーボン貪食マクロファージの集束など特徴的な病変は見れたが、病理組織学的なスコアリングでは増悪化の程度は明確でなかった。肺の線維化に関する指標TGF- β は有意に上昇したが、感染の有無に関わらない現象であることが明らかとなった。マクロファージにおいてMWCNTによるNLRP3インフラマソーム活性化・IL-1

β 分泌を抑制する薬物X(論文公表時まで非公表の予定)を見いだしているが、各種酸化チタンナノマテリアルに加えてMWCNT類によるインフラマソーム活性化への影響を調べたところ、薬物Xによる抑制効果には、ナノマテリアルの物性により差異があることを見出した。そこで各種ナノマテリアルについて、認識受容体の役割を解析中である。

国際動向に関する研究：

気管内投与手法の利便性の周知を目的として、国内外の研究者と共同で単行本の執筆を行った。さらに、第19回OECDナノマテリアルの作業グループ(WPMN)において、本研究班で検討している短期間吸入(および気管内投与)曝露による慢性影響試験プロトコルの慢性吸入曝露試験との相同性に関する比較研究を紹介した。また、OECDでは新規の先端材料(Advanced Materials)に関するリスク評価の問題もWPMNで取り扱う方針となった。今後もナノ材料のリスク評価法などのバリデーション試験に関する情報収集を継続する予定である。

D. 考察

慢性影響評価手法検討に関する研究に関しては、まず、昨年度末から開始したMWNT-7によるマウスTaquann全身吸入およびTaquann処理MWNT-7のラット気管内投与の2つの反復曝露試験を継続してきた。得られたデータを基に、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コロールとして、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。

Taquann 全身曝露吸入装置 (ver.3.0) を用いた吸入曝露実験については、移転の伴い設備を新しくしたところであるが、曝露条件を確立し、2年間の曝露実験を開始した。現在まで6ヵ月の定期解剖を終え、3月には1年目の定期解剖を実施する計画である。エアロゾル特性の測定において、安定した質量濃度が得られているが、エアロゾル粒子数を測定するCPC並びにMMAD測定においては値のバラツキが大きい。これに対応するため、CPCに関しては、希釈装置の改良を行っている。MMADに関しては、測定装置(MOUDI、カノマックス)内でのサンプルの再飛散が多いが、 σ_g が比較的小さな値に着目すると、400~500nmの範囲と考えられた。6ヵ月の中間定期解剖のBALF採取後の曝露肺の病理組織標本では、明確な線維性肉芽腫形成は認められず、肺胞構造の改変所見も明らかでなかった。肉眼的、或いは、弱拡大顕微鏡観察においてT-CNT#53線維の凝集体が黒色班として観察されなかったことから、肺内には高分散状態で吸入されたことがうかがわれた。このような高分散状態である検体の場合には、肉芽腫の誘発能が低いことが考えられた。肺負荷量に関しては、6ヵ月の時点の成績から2年後の肺負荷量は低濃度群、高濃度群それぞれ24 $\mu\text{g}/\text{動物}$ 、56 $\mu\text{g}/\text{動物}$ と予測されることから、当初の目標値を達成できる見込みである。

ラットの気管内投与については、反復曝露によって、MWCNTが肺実質にびまん性に沈着し、既報の長期試験の結果と同様に、肉芽腫性炎症やII型肺胞上皮の反応性過形成を引き起こし、投与用量と回数に応じた毒性の強さを示すことが確

認された。少数例の経過観察ではあるが、細気管支肺胞上皮過形成や中皮細胞の過形成が認められており、継続した曝露により腫瘍性病変が誘発されることが期待される。また、4週間に1度の投与によりMWCNTが肺内に予想通り蓄積されており、最終的にはラット2年間の吸入試験(Kasai et al. 2016)と同等以上に蓄積することが見込まれ、発がん性と肺負荷量の関係を議論できると考えている。なお、高用量群および高用量スプレー群では、低用量群に比べると肺負荷量のバラツキが大きく、負荷が重い場合にクリアランスの個体差が生じやすいことが示唆された。

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、慢性実験の結果POTは、その炎症や傷害性について、MWCNT-7よりは良いものの球状TiO₂よりも顕著であり、は、作用や催腫瘍性が明らかとなり、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、有意の催腫瘍性のあることが示された。また、長さの異なるDWCNTについて、これまでの報告で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)から、1.5、7.0、15 μm のDWCNTについてTIPS投与を行った。現在解析中の発がんについて病理学的結果が待たれる。

慢性影響指標に関する研究では、遺伝毒性を検出する*in vivo in vitro*法を用いた肺小核試験における適切な採材時期は最終投与24時間後であることが明らかになった。先行して実施したCNT全身吸入曝露試験では、陽性対照群はEMSを5

日連続腹腔内投与（25 及び 50mg/kg）、CNT 全身吸入曝露群は 5 日連続曝露であり、両群ともに最終曝露 5 日後に採材している。結果は両群ともに陽性であった。他方、昨年度実施した CNT 気管内投与下における *in vivo-in vitro* 法を用いた肺小核試験の予備試験では、CNT 気管内投与群および陽性対照群においても小核誘発の有意な増加は認められなかった。この際の陽性対照群は EMS 単回腹腔内投与（25 及び 50mg/kg）、CNT 気管内投与群は単回投与であり、先行して実施した全身吸入曝露試験条件に倣い投与 5 日後に肺を採材している。これらの結果と今回の結果を踏まえ、CNT 気管内投与群では投与後も CNT が気管内・肺内に残存するため、採材までの期間、気管・肺は CNT に曝露され続けていると考えられる一方で、陽性対照群は単回投与であることに加えて採材時期が不適切であったため、陰性結果の原因となった可能性が考えられる。

免疫ネットワークへの影響については、MWCNT-7 の全身吸入曝露による慢性影響として、肺胞マクロファージの分化、成熟が大きく変化することが明らかになり、胞免疫の機能不全に関与する可能性が示唆された。また、曝露経路によるマクロファージの動態の違いについても検討を進めている。一方、感染性に対する影響としては、前年度実施した Taqaan 法による単回の吸入曝露での RSV 感染影響が弱かったので、複数回の吸入曝露で検証した。肺炎マーカー CCL5 の有意な上昇が認められたが、やはり肺炎増悪度は低かった。一方で食食マクロファージの集束など特徴的な病変が認められ、現

在所得中の MWNT-7 の肺負荷量データと併せて、マクロファージを中心に CCL5 などの感染影響指標としての有用性を検討していく。さらに肺の線維化指標 TGF- β も有意に上昇しており、今後 RSV 感染からの回復期・慢性期における繊維化などの評価により、影響指標としての可能性を探る予定である。

In vivo 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、酸化チタンや MWCNT 等の物性の違いにより薬物 X による抑制効果が異なることを見いだした。引き続き物性の違いによるマクロファージによる認識・取り込み過程の差異に着目してメカニズムを解明し、慢性影響の *in vitro* 予測につながる細胞応答・分子マーカーを同定することを目指している。

OECD のナノマテリアル作業グループにおいて提案していた短期間 *in vivo* 曝露試験の有用性検証プロジェクトは、製品開発時のスクリーニングやカテゴリー評価等への補助ツールとしての適用の可能性はあるものの、現在のレギュラトリーにおける審査等の評価項目として採用できるほどのレベルではないというのが OECD 加盟国の判断であり、短期 *in vivo* 試験法という概念だけでは、プロジェクト案を推し進めるのは困難であると考えられた。そこで、より慢性毒性試験の影響を正確に代替できる手法開発として、本研究班の研究成果は有用な候補であると考えている。本研究の最終的な成果も加えて、OECD に慢性毒性試験をより効率的に評価する手法として将来提案することを目指す予定である。

以上、今年度の成果としては、間欠曝露型の吸入及び気管内投与の慢性実験について、ほぼ順調に一年を経過し、2年目に入ったところである。チタン酸カリウムや二層ナノチューブの慢性影響の確認と免疫系における慢性マーカーの確認や感染性への吸入曝露の影響とマクロファージ(*in vitro*)を用いた慢性影響のメカニズム解析を行うことができたと考えられる。

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し、2年間の間欠曝露試験（4週毎に1回曝露）を開始した。Taquann 全身曝露吸入装置（ver.3.0）を用いた吸入曝露実験については、現在まで6及び12ヵ月の定期解剖を終えた。エアロゾル特性の測定において、安定した質量濃度が得られている。6ヵ月のBALF採取後の曝露肺では、曝露肺に明確な線維性肉芽腫形成は認められず、肺胞構造の改変所見も明らかでなかったことから、高分散状態である検体の場合には、肉芽腫の誘発能が低いことが考えられた。ラット気管内投与については、1年経過時点において、慢性炎症とII型肺胞上皮細胞の反応性過形成が広範囲に引き起こされ、少数例で細気管支肺胞上皮過形成が認められた。肺内のMWCNT量は、すでに、2年経過後に肺腫瘍の発症が期待されるレベルまで達していた。TIPS法によるPOTと酸化チタンの比較では、2週投与+4週観察群において、投与肺と胸膜における炎症と障害作用は球状TiO₂よりPOTにより顕著な傾向が見られた。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とMWCNT-7群で有意の増加が見られた。長さの異なるDWCNT曝露による慢性影響については、観察期間が終了し、結果の解析中である。

慢性影響指標に関する研究では、全身吸入曝露および気管内投与を実施した先行試験結果を踏まえて、肺小核試験の陽性対照を用いた試験法の適切性を検証した。その結果、肺小核試験の最適な条件を明らかにし、これにより先行試験結果の妥当性を明らかにすることができた。免疫ネットワークへの影響については、MWCNT-7の全身吸入曝露の慢性影響として、肺胞マクロファージの分化、成熟が大きく変化することが示された。一方、感染性に対する影響としては、Taquann法によるMWCNT-7の複数回の吸入曝露により、急性期での影響度は高くないが肺炎マーカーCCL5の有意な上昇や肺組織での貪食マクロファージの集束などが認められた。*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、酸化チタン・MWCNT等の物性の違いにより薬物Xによる抑制効果が異なることを見いだした。

海外動向調査では、本研究班で検証している短期曝露による慢性観察試験法の有用性の周知を目的としてOECDのナノマテリアル作業グループ(WPMN)において、慢性吸入曝露ガイドライン試験との相同性に関する比較研究として紹介を行った。また、OECDでは新規の先端材料(Advanced Materials)に関す

るリスク評価の問題も WPMN で取り扱う方針となった。今後もナノ材料のリスク評価法などのバリデーション試験に関する情報収集を継続する予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Landsiedel R., Gamo M. Hirose A. The Role of *In vivo* Screening Studies in Assessing Manufactured Nanomaterials, *In vivo* Inhalation Toxicity Screening Methods for Manufactured Nanomaterials, Takebayashi T., Landsiedel R., Gamo M. eds, In Current Topics in Environmental Health and Preventive Medicine, Springer (Springer Nature Singapore Pte Ltd), pp1-21, 2019, DOI:10.1007/978-981-13-8433-2
- Tsuda, H., Alexander D. Development of intratracheal intrapulmonary of spraing (TIPS) administration as a feasible assay method for testing the toxicity and carcinogenic potential of multiwall carbon nanotubes, *In vivo* Inhalation Toxicity Screening Methods for Manufactured Nanomaterials, Takebayashi T., Landsiedel R., Gamo M. eds, In Current Topics in Environmental Health and Preventive Medicine, Springer (Springer Nature Singapore Pte Ltd), pp145-163, 2019, DOI:10.1007/978-981-13-8433-2
- Kobayashi K, Kuze J, Abe S, Takehara S, Minegishi G, Igarashi K, Kitajima S, Kanno J, Yamamoto T, Oshimura M, Kazuki Y.: CYP3A4 Induction in the Liver and Intestine of Pregnane X Receptor/CYP3A-Humanized Mice: Approaches by Mass Spectrometry Imaging and Portal Blood Analysis. *Mol Pharmacol*, 96(5): 600-608, 2019.
- Ono R, Yasuhiko Y, Aisaki KI, Kitajima S, Kanno J, Hirabayashi Y. Exosome-mediated horizontal gene transfer occurs in double-strand break repair during genome editing. *Commun Biol*. 2:57, 2019. doi:10.1038/s42003-019-0300-2.
- Abdelgied M., Elgazzar AM., Alexander TW., Numano T., Iigou M., Naiki-Ito A., Takase H., Hirose A., Taquahashi Y., Kanno J., Abdelhamid, M., Khaled AA., Takahashi S., Alexander BD, Tsuda H. Carcinogenic effect of potassium octatitnate (POT) fibers in the lung and pleura of male Fischer 344 rats after intrapulmonary administration, *Particle and Fibre Toxicology* <https://doi.org/10.1186/s12989-019-0316-2> 16:34, 2019.
- Numano T., Higuchi H., Alexander D., Alexander W., Abdelgied M., Elgazzar AM., Saleh D, Takase H., Hirose A, Naiki-Ito A., Suzuki S., Takahashi S., Tsuda H. MWCNT-7 administered to the lung by intratracheal instillation induces development of pleural mesothelioma in F344 rats, *Cancer Sci.*, 110 (8): 2485-2492, 2019
- Fukamachi, K., Hagiwara Y., Futakuchi M., Alexander DB., Tsuda H., Suzui M. Evaluation of a biomarker for the diagnosis of pancreas cancer using animal model. *J Toxicol. Pathol.*, 32(3):135-141, 2019
- Abdelgied M., Elgazzar AM., Alexander D., Alexander W., Numano T., Iigo M., Naiki-Ito A., Takase H., Abdou KB., Hirose A., Taquahashi Y., Kanno J., Abdelhamid M., Tsuda H., Takahashi S. Pulmonary and pleural toxicity of potassium octatitanate fibers, rutile titanium dioxide nanoparticles, and MWCNT-7 in male Fischer 344 rats, *Arch. Toxicol.*, 93(4): 909-920, 2019
- Miyuchi A, Watanabe W, Akashi, T., Hashiguchi, S., Yoshida, H., Sugita, C., Kurokawa, M. Effect of inactivated *Streptococcus pneumoniae* as non-pathogenic particles on the severity of pneumonia caused by respiratory syncytial virus infection in mice. *Toxicol. Rep.* (2019) 6, 514-520. DOI:10.1016/j.toxrep.2019.05.004.
- Shemansky JM, McDaniel LP, Klimas C, Dertinger SD, Dobrovolsky VN, Kimoto T, Horibata K, Polli JE, Heflich RH: Pig-a gene mutation database. *Environ Mol Mutagen.* 60(8):759-762. (2019)
- Horibata K, Sekimoto M, Sugiyama KI: Comprehensive framework between environment and genomic stability: the open symposium of the Japanese Environmental Mutagen Society (JEMS) in 2019. *Genes Environ.* 41:17.(2019)
- Kirkland D, Uno Y, Luijten M, Beevers C, van Benthem J, Burlinson B, Dertinger S, Douglas GR, Hamada S, Horibata K, Lovell DP, Manjanatha M, Martus HJ, Mei N, Morita T, Ohyama W, Williams A: *In vivo* genotoxicity testing strategies: Report from the 7th International workshop on genotoxicity testing (IWGT). *Mutat Res.*

847:403035. (2019)

2. 学会発表

- J. Kanno, Y. Taquahashi, A. Hirose., Improved aerosol generation method and newly designed whole body rodent inhalation apparatus for the testing of nanomaterials. EUROTOX 2019(55th Congress of the European Societies of Toxicology) (2019.9.10), Helsinki, Finland, Poster
- R. Ono, Y. Yasuhiko, K. Aisaki, S. Kitajima, J. Kanno, Y. Hirabayashi., Exosome-mediated horizontal gene transfer: a possible new risk for genome editing. EUROTOX 2019(55th Congress of the European Societies of Toxicology) (2019.9.9), Helsinki, Finland, Poster
- Jun Kanno, Analysis of the effect of epigenetic modification on gene expression by the newly designed repeated dose study - progress report of the Percellome Project. Gordon Research Conference: Cellular and Molecular Mechanisms of Toxicity (2019.8.11-16), Proctor Academy, NH, USA, Poster
- Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Kentaro Tanemura., The Concept of "Signal Toxicity" for the Mechanistic Analysis of So-Called Low Dose Effect and Delayed Effect after Perinatal Exposure. 第15回国際毒性学会(ICT XV) (2019.7.17), Hawaii, USA, Poster
- Yuhji Taquahashi, Satoshi Yokota, Koichi Morita, Masaki Tsuji, Akihiko Hirose, Jun Kanno., Improved Aerosol Generation Method and Newly Designed Whole Body Rodent Inhalation Apparatus for the Testing of Nanomaterials in Human-Relevant Exposure Scenario. 第15回国際毒性学会(ICT XV) (2019.7.16), Hawaii, USA, Poster
- Yayoi Natsume-Kitatani, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Samik Ghosh, Hiroaki Kitano, Kenji Mizuguchi, Jun Kanno., Cross Talks among PPAR α , SREBP, and ER Signaling Pathways in the Side Effect of Valproic Acid. 第15回国際毒性学会(ICT XV) (2019.7.16), Hawaii, USA, Poster
- 菅野純, 幹細胞分化から見る子どもの毒性学: シグナル毒性としての中枢神経影響の評価の現状 「シグナル毒性」の概念と子どもの毒性学. 第46回日本毒性学会学術年会, (2019.6.28), 徳島, シンポジウム, 口演
- 種村健太郎, 北嶋聡, 菅野純, 幹細胞分化から見る子どもの毒性学: シグナル毒性としての中枢神経影響の評価の現状 低用量化学物質の周産期ばく露による情動認知行動毒性～子どもの毒性学に向けた評価系開発の現在～. 第46回日本毒性学会学術年会, (2019.6.28), 徳島, シンポジウム, 口演
- 菅野純, 北嶋聡, 相崎健一, 小野竜一, エピジェネティクス解析と人工知能による毒性オミクスの展開 Percellome トキシコゲノミクスのエピジェネティクス基盤 - 「新型」反復曝露試験の解析-. 第46回日本毒性学会学術年会, (2019.6.28), 徳島, シンポジウム, 口演
- 夏目やよい, 相崎健一, 北嶋聡, Samik GOSH, 北野宏明, 水口賢司, 菅野純, エピジェネティクス解析と人工知能による毒性オミクスの展開 Garuda プラットフォームによる多角的毒性予測. 第46回日本毒性学会学術年会, (2019.6.28), 徳島, シンポジウム, 口演
- 小野竜一, 相崎健一, 北嶋聡, 菅野純, 毒性エピゲノミクスの新潮流 Percellome プロジェクトから見えてきたエピジェネティクス影響. 第46回日本毒性学会学術年会, (2019.6.27), 徳島, シンポジウム, 口演
- 菅野純, 梅田ゆみ, 鈴木正明, 武田知起, 後藤裕子, 山野荘太郎, 平井繁行, 竹内哲也, 高橋祐次, ノンカーボン素材ナノマテリアルの有害性評価の現状と課題 架橋型アクリル酸系水溶性ポリマーの肺毒性. 第46回日本毒性学会学術年会, (2019.6.26), 徳島, シンポジウム, 口演
- 梅田ゆみ, 笠井辰也, 山野荘太郎, 平井繁行, 竹内哲也, 大西誠, 相磯成敏, 菅野純, ノンカーボン素材ナノマテリアルの有害性評価の現状と課題 ナノ酸化チタンの肺毒性. 第46回日本毒性学会学術年会, (2019.6.26), 徳島, シンポジウム, 口演
- 種村健太郎, 北嶋聡, 菅野純, 日本中毒学会合同シンポジウム: 海産毒 リビジテッド発生期マウスへの神経シグナル異常による成熟後の神経行動毒性発現～海産毒による異常誘発モデルとしての検討～. 第46回日本毒性学会学術年会, (2019.6.26), 徳島, シンポジウム, 口演
- 大西誠, 後藤裕子, 笠井辰也, 山本正弘, 鈴木正明, 武田知起, 東久保一郎, 菅野純, フィルター捕集したカーボンブラックのHPLCを用いた微量定量法の開発. 第92回日本産業衛生学会, (2019.5.23), 名古屋, 口演
- 加納浩和, 笠井辰也, 齋藤新, 平井繁行, 鈴木正明, 梅田ゆみ, 妹尾英樹, 大西誠, 竹内哲也, 三角恭平, 福島昭治, 菅野純, メタクリル酸ブチルのラット及びマウスへの吸

- 入ばく露による発がん性及び慢性毒性. 第 92 回日本産業衛生学会, (2019.5.23), 名古屋, ポスター
- Jun Kanno, “Nanomaterial Inhalation toxicity”. The 3rd EU-Asia Dialogue on Nanosafety: Occupational Exposures to Manufactured Nanomaterials (MN) and Waste Disposal, (2019.3.18), Bangkok, Thailand, Invited, Keynote
- Masatoshi Hagiwara, Jun Kanno, Dana C. Dolinoy, Cheryl Lyn Walker, Society of Toxicology and Japanese Society of Toxicology Symposium: Epigenetic Modification of Chronic Pathology and Toxicology Lecturers. Society of Toxicology (SOT) 58th Annual Meeting (SOT2019) and ToxExpo, (2019.3.12), Baltimore, USA, Symposium
- Y. Taquahashi, S. Yokota, K. Morita, M. Tsuji, Y. Hirabayashi, A. Hirose, and J. Kanno, Development of Whole Body Inhalation System for Well-Dispersed Nanomaterials Toxicity Testing (Taquann Direct-Injection Whole Body Inhalation System). Society of Toxicology (SOT) 58th Annual Meeting (SOT2019) and ToxExpo, (2019.3.12), Baltimore, USA, Poster
- R. Ono, K. Tano, S. Yasuda, K. Aisaki, Y. Sato, S. Kitajima, J. Kanno, and Y. Hirabayashi, Evaluation of Possible Risk in Genome Editing for Human Gene Therapy. Society of Toxicology (SOT) 58th Annual Meeting (SOT2019) and ToxExpo, (2019.3.13), Baltimore, USA, Poster
- 高橋祐次、新素材の毒性評価-工業的ナノマテリアルの高分散性小規模全身ばく露吸入装置の開発-, JST-CRDS 2019 年度 科学技術未来戦略 WS、2019.12.3 (東京)
- 前野 愛、坂本 義光、北條 幹、湯澤 勝廣、長谷川 悠子、長澤 明道、久保 喜一、安藤 弘、海鋒 藤文、田中 和良、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) のラット気管内投与試験の生体内分布と呼吸器毒性における投与器具の比較. 第 46 回日本毒性学会学術年会 2019.6.27 (徳島)
- Hoji M, Maeno A, Sakamoto Y, Onuki A, Hasegawa Y, Yuzawa K, Kubo Y, Nagasawa A, Ohnishi M, Goto Y, Suzuki T, Inomata A, Moriyasu T, Hirose A, Nakae D. Clearance of multi-walled carbon nanotubes in rat lungs after intratracheal instillation: a comparison of different instillation devices. 55th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2019) 2019.9.10 (Helsinki, Finland)
- 坂本義光、広瀬明彦、中江大 Time course of histopathology and the status of involved humoral factors during the carcinogenesis of MWCNT in rats.第 78 回日本癌学会学術総会 2019.9.28(京都)
- 北條 幹、坂本 義光、山本 行男、前野 愛、多田 幸恵、長谷川 悠子、湯澤 勝廣、長澤 明道、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. MWCNT 誘発性のラット腹膜中皮腫発症過程における炎症および免疫関連因子に着目した病理組織学的解析. 第 36 回日本毒性病理学会学術集会. 2020.2.14(東京)
- 坂本 義光、北條 幹、前野 愛、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を反復気管内投与したラットにおける肺神経内分泌細胞 (PNEC) の増生. 第 36 回日本毒性病理学会学術集会 2020.2.14(東京)
- 前野 愛、坂本 義光、北條 幹、湯澤 勝廣、長谷川 悠子、長澤 明道、大貫 文、鈴木 俊也、猪又 明子、守安 貴子、後藤 裕子、大西 誠、小林 憲弘、広瀬 明彦、中江 大. 異なる投与器具を用いた多層カーボンナノチューブ (MWCNT) のラット気管内投与試験における肺毒性と肺負荷量の比較. 第 36 回日本毒性病理学会学術集会 2020.2.14 (東京)
- Tsuda H., Demonstration of the carcinogenicity of a flexible tangled multi-walled carbon nanotube in the rat lung, AACR サテライトミーティング-Environmental Carcinogenesis: Potential Pathway to Cancer Prevention, Charlotte(USA)2019 年 6 月
- Horibata K, Takasawa H, Taquahashi Y, Yokota S, Hamada S, Honma M: *In vivo* genotoxicity assessment of multi-wall carbon nanotubes using lung micronucleus assay. The Joint Meeting of The 6th Asian Congress on Environmental Mutagens (ACEM) and the 48th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (JEMS). Tokyo (2019.11)
- 新垣理恵子、牛尾綾、大塚邦紘、工藤保誠、石丸直澄: 多層化カーボンナノチューブ吸入曝露初期の肺胞マクロファージの動態 第 108 回日本病理学会学術集会 (2019 年 4 月 東京)
- Mami Sato, Rieko Arakakai, Aya Ushio, Yasusei Kudo, Naozumi Ishimaru. Effect of multi-wall carbon nanotube exposure on

pulmonary immune cells at the early stage.
第48回日本免疫学会学術集会(2019年12月)

Watanabe W, Akashi T, Hirose A, Miyauchi A, Yoshida H, Kurokawa M. Effects of double-walled carbon nanotubes on the early phase of respiratory syncytial virus infection in mice. 55th Congress of the European Societies of Toxicology, (September 2019 Helsinki, Finland)

Nishimaki-Mogami T, Cui H, Soga K, Adachi R, Tamehiro N, Hachisuka A, Kondo K, Hirose A: Discovery of an inhibitor of multiwall carbon nanotubes-stimulated IL-1 β secretion via inflammasome activation (EUROTOX 2019) (September 2019 Helsinki, Finland)

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、
2019.4.20

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、2019.4.20

2. 実用新案登録 (該当なし)

3. その他 (該当なし)