

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)
分担研究報告書

研究課題: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
(H30-化学-指定-004)

分担研究課題名:慢性影響を考慮した肺負荷量に基準を置く全身曝露吸入法の確立に関する研究

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

研究協力者: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

研究協力者:北條 幹 東京都健康安全研究センター
薬事環境科学部生体影響研究科・主任研究員

研究協力者:横田 理 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 主任研究官

研究協力者:栞形 麻樹子 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 室長

研究協力者:高橋 祐次 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 室長

研究要旨

工業的に大量生産されるナノマテリアルの産業応用が急速進展する中、製造者及び製品利用者の健康被害の防止のための規制決定、及び、業界における安全面からの国際競争力の保持の観点から、基礎的定量的な毒性情報を得る評価法の確立が急がれる。毒性未知の物質を取り扱う基本的な戦略は、ヒトで想定される曝露経路に即した動物実験によりハザードを同定し、メカニズムを同定し、用量作用関係の情報を取得し、そこからヒトに対する毒性の推定と用量相関性の推定を行うことであるが、ナノマテリアルに関して最も重要な曝露経路である吸入曝露に関しては、動物実験を遂行する際の技術的障壁が高く、実施例は数少ない。

本分担研究では、OECD TG451 により実施された MWNT-7 の先行試験(Particle Fibre Tox 2016, 13:53)との比較、および、本事業において並行して実施される気管内投与実験との比較を目的とした 2 年間の吸入曝露実験を実施中である。曝露時間は 6 時間/回、過剰な肺負荷量を避けるために 4 週毎の間欠全身曝露吸入を継続している。今年度、本分担研究において、曝露開始後 6 ヶ月及び 12 ヶ月に中間定期解剖を行い、6 ヶ月のサンプルについては、肺負荷量の測定、BALF(肺胞洗浄液)を採取後の肺の病理組織学的評価を行った。12 ヶ月のサンプルについては、BALF から得られた細胞の観察を実施した(病理標本作成中)。

6 ヶ月までに 7 回の曝露を行った。曝露濃度は、低濃度群(L 群); $2.6 \pm 0.1 \text{ mg/m}^3$ 、

高濃度群（H 群）； $5.0 \pm 0.2 \text{ mg/m}^3$ であった。肺負荷量は各群 3 例を用い Benzo[ghi]perylene をマーカーとした測定法（大西法）にて評価した結果、L 群： $6.4 \pm 1.1 \text{ }\mu\text{g/動物}$ 、H 群； $15.2 \pm 1.0 \text{ }\mu\text{g/動物}$ であり、濃度依存的な増加が認められた。BALF を採取した後の肺について Hematoxylin Eosin (HE)染色及び Masson Trichrome (MT)染色標本を作製し病理組織学的検査を行った。肺内に吸入されたほとんどの MWNT-7 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線維化の程度は弱かった。大部分の MWNT-7 は集簇したマクロファージに囲まれていたが、マクロファージに貪食されている像、MWNT-7 が肺を構成する細胞に刺さった像も観察された。MWNT-7 の量は低濃度群よりも高濃度群の方が多く、肺負荷量を反映した結果であった。HE 標本における低倍率観察では、肺胞内に多核細胞を伴う異物肉芽腫様の結節性細胞集塊が認められたが、明瞭な類上皮化も認められず、MT 染色では線維成分は確認されず肺胞壁の変化に乏しく、貪食マクロファージの肺胞内集簇像であった。L 群と H 群の病変の量的な程度に差は認められるが、質的には肺負荷量の差（2 倍）ほどの差はなかった。結論として、曝露後 6 ヶ月では、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。BALF から得られた細胞数は、対照群に比較して L 群及び H 群では、細胞数は増加しており、MWNT-7 を貪食した大型の細胞が観察された。

A. 研究目的

工業的に大量生産されるナノマテリアルの産業応用が急速進展する中、製造者及び製品利用者の健康被害の防止のための規制決定及び、業界における安全面からの国際競争力の保持の観点から、基礎的定量的な毒性情報を得る評価法の確立が急がれる。毒性未知の物質を取り扱う基本的な戦略は、ヒトで想定される暴露経路に即した動物実験によりハザードを同定し、メカニズムを同定し、用量作用関係を情報の取得し、そこからヒトに対する毒性の推定と用量相関性の推定を行うことであるが、ナノマテリアルに関して最も重要な暴露経路である吸入曝露に関しては、動物実験を遂行する際の技術的障壁が高く、実施例は数少ない。

本分担研究では、既に報告のある OECD TG451 により実施された MWNT-7 の長期吸入発がん性試験試験（Particle Fibre Tox 2016, 13:53）、および、本事業において並行して実施される

気管内投与実験との、試験プロトコールの違いによる肺病理及び発がん性の差の比較を目的とした 2 年間の吸入曝露実験を実施中である。曝露時間は 6 時間/回、過剰な肺負荷量を避けるために 4 週毎の間欠全身曝露吸入を継続中である。今年度は、曝露開始後 6 ヶ月及び 12 ヶ月に中間定期解剖を行い、肺負荷量の測定、BALF（肺胞洗浄液）を採取後の肺の病理組織学的評価を行った。

B. 研究方法

本分担研究では、主として肺の病理組織学的な検討を実施した。以下に検体、曝露方法、使用動物の概要を記載する（詳細は研究分担者 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部室長 高橋祐次の項を参照）。

B-1. 検体

検体は多層カーボンナノチューブの一つである MWNT-7（三井、lot No.: 060125-01k）を使用した。以下の各測定値は先に共同研究を行った東京都健康安全研究センターによる測

定値である。

繊維径 70-170 nm (平均 100 nm)
長さ 1-19 μm (> 5 μm 27.5%)
繊維数 3.55×10^{11} 本/g
形状 繭状凝集体を含む単離繊維
化学組成 炭素純度 99.5%以上
鉄: 3,500 ppm
硫黄: 470 ppm
塩素: 20 ppm
フッ素: <5 ppm
臭素: <40 ppm

検体は高分散性の乾燥検体とするため、tert-ブチルアルコール(特級、関東化学株式会社)に懸濁、53 μm の金属シーブ(特注品、セイシン企業)でろ過、凍結乾燥によって乾燥検体を得る Taquann 法処理を行った。

以下、Taquann 処理 MWNT-7 を、T-CNT7#53 と記載する。

B-2. マウス全身曝露吸入実験

1) 動物

C57BL/6NcrSLC(日本エスエルシー株式会社)雄性マウスを 10 週齢で購入し 2 週間の馴化期間を経たのち 12 週齢にて使用した。

2) 群構成

対照群(C 群、清浄空気のみ)、低濃度群(L 群、目標濃度 3 mg/m^3)、高濃度群(H 群、目標濃度 6 mg/m^3)の 3 群構成とした。各群 50 匹のマウスを使用し、1 日 6 時間(10:00~16:00)の全身曝露吸入を 4 週毎に行った。曝露チャンバーに収容可能な動物数が 25 匹であるため、二つのサブグループに分けて曝露を行った。

3) 吸入曝露実験装置

T-CNT7#53 のエアロゾル化は、既設

の Taquann 直噴全身吸入装置 Ver3.0 を使用した(共同開発 柴田科学株式会社、特許申請中)。

B-3. 解剖

BALF 及び肺組織のサンプリングのため、6 ヶ月後、12 ヶ月後に中間定期解剖を行った。6 ヶ月の中間定期解剖では、肺負荷量測定用の動物を各群 3 匹、免疫機能解析用の動物として 6 匹使用した。12 ヶ月の定型解剖では、肺負荷量測定用の動物を 3 匹、免疫機能解析用の動物を 6 匹、病理組織用の動物を 3 匹用いた。

マウスは吸入麻酔器(TK-7、バイオマシナリー)を用い 3.5~4%イソフルラン(DS ファーマ アニマルヘルス)による深麻酔下で、眼窩より採血を行い、その後、腋窩動脈を切断して放血致死後に解剖した。被毛に付着している T-CNT7#53 が組織に混入することを防止するため、開胸前に剥皮して除去した状態にしてサンプリングを行った。

肺負荷量測定用の動物は、開胸して肺を取り出し、肺門部で気管を除去して湿重量測定後に-80°Cで凍結保存した。

免疫機能解析用の動物は、開胸後に留置針を気管に挿入し生理食塩水または細胞保存液(MACS® Tissue Storage Solution, MACS)を 1 mL 注入して BALF を採取した。この作業を 2 回行い、約 2 mL の BALF を回収した。BALF を回収した肺は、遺伝子発現解析用に副葉を採取して RNALater®に保存した。その後、4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液(和光純薬工業、組織固定用、用時調製)を約 1.5 mL 注入し、同組成の固定液に浸漬固定した。

病理標本用の動物は、気道内の T-CNT7#53 の人為的移動を避けるため、気管からの固定液の注入は行わず、点滴回路を用いた灌流装置により灌流固定した。具体的には、

開胸前に喉頭部を絹糸で結紮して開胸時の肺の虚脱を防止した後、開胸し、右心室に翼状針(21G、SV-21CLK-2、テルモ株式会社)を刺入して生理食塩水(大塚生食注、大塚製薬工場)を約 40cm 水柱の静水圧により注入し、右心耳を切開して血液を除去した。その後、右心室から翼状針を引き抜いて左心室に刺入して血液を除去した後、回路を切り替えて 4% パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液(和光純薬工業、組織固定用、用時調製)を同静水圧にて約 3 分灌流して固定後、同組成固定液に浸漬固定を行った。流量は点滴調節器により適宜調節した。

倫理面への配慮

本実験は動物愛護に関する法律、基準、指針を遵守し国立医薬品食品衛生研究所・動物実験委員会の承認のもとに人道的実施された。ナノマテリアルの実験に際しては、当研究所の専用実験施設内で、その運用規則に従い実施しており、暴露・漏洩を防止する対策については万全を期して実験を行った。

B-4. 肺負荷量測定

1) 肺サンプルからのT-CNT7#53の抽出

肺の溶解液は 5w/v% 水酸化カリウム(富士フイルム和光純薬、試薬特級)に、0.1w/v% SDS(富士フイルム和光純薬、試薬特級) 0.1 w/v% EDTA・2Na(同仁化学研究所、試験研究用)、2w/v% アスコルビン酸ナトリウム(富士フイルム和光純薬、試薬特級)を加えた組成である。各試薬は MilliQ 水に混和後、80°Cに加熱して完全に溶解した。EDTA・2Na は生体由来の金属イオン除去、アスコルビン酸ナトリウムは水酸化鉄(II)が酸化により不溶性の水酸化鉄(III)に変化してすることを防止する目的で添加した。

肺サンプル(気管及び左右主気管支を除く全肺約200 mg)をマイクロチューブ(Protein LoBind、2 mL、エッペンドルフ)に入れ、加温した肺溶解液を1.8 mL添加した。可能な限り肺内の空気を除去するため、デシケーター内で脱気を行った後、窒素ガス雰囲気中でマイクロチューブを密栓した。マイクロチューブを50°Cに設定したインキュベーター内で24時間静置して肺を溶解した。目視観察により肺溶解液が澄明であることを確認後、高速微量冷却遠心機(MX-205、TOMY)で25°C、20,000×g、60分の条件で遠心分離を行い、沈渣を回収した。沈渣に1.5 mLの70%エタノール(富士フイルム和光純薬)を添加し、ボルテックスを用いて溶解して再び20,000×g、25°C、60分の条件で遠心分離して沈渣を回収した。

2) T-CNT7#53の測定

肺から抽出したT-CNT7#53の定量は、Benzo[ghi]perylene (BgP)をマーカーとして用いるマーカー法(大西法)を用いた。

(1) 装置、器具及び試薬

- ① 高速液体クロマトグラフ(HPLC、Acquity UPLC、ウォータース)
- ② 電子天秤(AE163、日本シイベルワーグナー)
- ③ 振とう機(TS-100、サーマル化学産業株式会社)
- ④ 遠心分離機(Microfuge® 22R Centrifuge、ベックマンコールター)
- ⑤ 超音波分散機(VP-30S、タイテック)

(2) 試薬

- ① アセトニトリル(HPLC 用、富士フイルム和光純薬)

②メタノール(HPLC 用、富士フィルム和光純薬)

③Benzo[ghi]perylene(BgP、試薬特級、富士フィルム和光純薬)

④TWEEN 80(富士フィルム和光純薬)

(3)測定条件

HPLC:ウォーターズ Acquity UPLC

カラム:Acquity BEH C18(ウォーターズ)

カラム粒径、長さ × 内径:1.7 μm、100 mm × 2.1 mmφ

カラム温度: 40°C

検出器:蛍光検出器(励起波長: 294 nm、蛍光波長: 410 nm)

試料注入量: 5 μL

移動相組成: アセトニトリル : メタノール : 蒸留水 =75 : 20 : 5

移動相流量: 0.5 mL/min

(4)検量線原液の調製

①T-CNT7#53を約5 mgを10 mL容のフタ無しガラス試験管に精密に秤量し、0.1% Tween水溶液(Tw-sol)を2 mL加えてタッチミキサーで分散させ、100 mL容のフタ・メモリ付のPPチューブへ移し、この操作を4回繰り返す、最後にTw-solで100 mLにメスアップした。その溶液を超音波分散機により1分間、超音波分散した。(以下用いる周波数と強度は20 kHz、300 W、T-CNT7#53各原液:50 μg/mL)

②検量線溶液 C5 の調製

(3)①項で調製したT-CNT7#53の各原液0.2 mLを15 mL容のフタ・メモリ付のPPチューブに採取し、Tw-solにより10 mLにメスアップし、1分間超音波分散した。(検量線溶液 C5:1 μg/mL)

③検量線溶液 (C1~C5)の調製

(3)①項で調製した検量線溶液 C5 を採取し、2 mL 容の遠心分離用チューブに入れ、さらにTw-solをそれぞれの量を添加して検量線溶液(C1~C5)を作成した。

④マーカー溶液の調製

200 mL 容のメスフラスコにBenzo[ghi]perylene(BgP)マーカー約1 mgを秤量し、アセトニトリルを加え十分に溶解し、アセトニトリルでメスアップしてBgPマーカー原液(5.0 μg/mL)とした(冷暗所に保存)。その溶液0.8 mLにアセトニトリル2 mL加え混合攪拌した溶液2.5 mLをTw-sol 50 mLに加えて混合攪拌し、マーカー溶液とした。

(5)試料の前処理とHPLCによる測定

検量線溶液 C5 及び肺から抽出したT-CNT7#53を懸濁調製した各溶液1 mLを12,000 rpmで10分間遠心分離した。その上清を除去し、TW-mixtureを1 mL加え、12000 rpmで10分間遠心分離した。再度、上清を除去し、それぞれに濃塩酸0.2 mLを加えてタッチミキサーで10秒間攪拌し、12,000 rpmで10分間遠心分離し、上澄み液を除去し濃硫酸0.2 mLを加え、残渣を分解し、タッチミキサーで10秒間攪拌した。その後、Benzo[ghi]perylene(BgP)マーカー溶液1 mLをそれぞれに添加し、10秒間超音波分散し、振とう機で15分間攪拌させた後、0.4 μmのフィルター(ワットマン:GE Healthcare UK Ltd)を用いて、ろ過したフィルター上のT-CNT7#53をポンチ(φ8 mm)でくり抜き、PP試験管に入れ、アセトニトリル1 mLを加え、タッチミキサーで10秒間攪拌・抽出し、その溶液をHPLCで測定した。

(6) 肺内の T-CNT7#53 の沈着量の計算

T-CNT7#53 の検量線で設定された濃度と面積値から、最小自乗法により検量線の傾きと切片より直線回帰式を求めた。肺及び縦隔の HPLC で測定した面積値を直線回帰式に代入し、T-CNT7#53 の測定値を求め、希釈倍率を乗じることにより、T-CNT7#53 の個体当りの肺沈着量(単位: μg)を求めた。

B-5. 病理組織学的評価

パラホルムアルデヒド浸漬した肺サンプルは一晩冷蔵庫内で固定後、固定液を 50mM glycine/PBS にて洗浄・除去した。常法に従ってパラフィン包埋ブロックとし 4 μm の組織切片を作製した。組織切片は、Hematoxylin Eosin 染色 (HE、ティッシュ・テック ヘマトキシリン 3G、ティッシュ・テック エオジン、サクラファインテックジャパン) 及び Masson Trichrome 染色 (MT、武藤化学株式会社) を行い、病理組織学的評価を行った。

B-6. BALF 細胞の染色

回収した BALF は、スライドガラス (Matsunami) をセットした Shandon™ EZ single cytofunnel (A78710003, Thermo Fisher Scientific) に 150 μL 分注し、Cytospin 3 (Thermo Fisher Scientific) を用いて、700 rpm、5 分間の遠心を行い、細胞塗抹標本作製した。冷風乾燥、メタノール(試薬特級、富士フィルム和光純薬株式会社) で 1 分間固定した後、pH6.4 リン酸緩衝液(武藤化学株式会社) にて洗浄した。3%メイグリユンワルド染色液(富士フィルム和光純薬株式会社) にて 45 分間染色し、pH6.4 リン酸緩衝液で洗浄した。その後、5%ギムザ染色液(富士フィルム和光純薬株式会社) にて 45 分間染色し、pH6.4 リン酸緩衝液で洗浄し、乾燥、封入を行った。

C. 研究結果

C-1. マウスの肺病理組織検査

マーカー法(大西法)によって測定した肺負荷量平均値は L 群、H 群それぞれ、 $6.4 \pm 1.1 \mu\text{g}/\text{動物}$ 、 $15.2 \pm 1.0 \mu\text{g}/\text{動物}$ であり、ほぼ濃度依存的に肺負荷量の増加が認められた(表1)。肺重量は用量依存的に増加し、L 群、H 群は対照群に対して有意であった(N=3、t-検定)。

C-2. 肺の病理組織学的評価

曝露 6 ヶ月における BALF を採取した肺について観察を行った(曝露後 12 ヶ月の肺については、病理組織標本作製中)。

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)。本曝露条件下では、肉眼的、或いは光学顕微鏡弱拡大像において T-CNT7#53 の線維が明らかに凝集して

黒色班として観察されることはなかった。光学顕微鏡観察における T-CNT7#53 の沈着の程度は低濃度群よりも高濃度群の方が明瞭に多く、肺負荷量を反映した結果であった。上述の、貪食マクロファージの終末細気管支近傍の肺胞内集簇像(図 3)は、MT 染色では線維成分の増加、及び、隣接する肺胞構造の改変は確認されず、類上皮化所見も明瞭でないことから、現段階では貪食マクロファージの肺胞内集簇像と判断した(図 3D)。L 群と H 群の肺沈着量には肺負荷量の差である 2 倍に合致する差は認められるが、病理学的な病変の質には線維化の程度を含めて、大きな差はなかった(図 4)。結論として、曝露後 6 ヶ月では、曝露肺には、異物に対する肺胞内の貪食マクロファージによる限局的な反応が主体であり、終末細気管支付近の軽微なびまん性の線維増生は認めるものの、異物反応としての明確な限局性の組織反応を伴う変化、及び線維性肉芽腫形成は認められなかった。

尚、12 ヶ月の中間定期解剖で得られた BALF から得られた細胞の観察を行った結果、細胞数は L 群、H 群で増加しており、T-CNT7#53 を貪食した大型の細胞が観察された。

D. 考察

本分担研究では Taquann 全身曝露吸入装置 Ver.3.0 を使用し T-CNT7#53 の 2 年間の間欠吸入曝露実験において、マウスに 6 時間/日、4 週毎の吸入曝露を行い、6 ヶ月並びに 12 ヶ月の中間定期解剖において得られたサンプルを用いて、肺負荷量の測定、曝露肺の病理組織学的評価、BALF から得られた細胞の観察を行った。

本分担研究では、6 ヶ月の時点において 42 時間(6 時間×7 回)の曝露を完了しており、平均曝露濃度は L 群、H 群それぞれ 2.6 mg/m³、

5.0 mg/m³であった。肺負荷量平均値は L 群、H 群それぞれ、6.4±1.1 µg/動物、15.2±1.0 µg/動物であった。

肺負荷量が曝露濃度と曝露時間の積に比例すると仮定すると(肺負荷量=曝露濃度×曝露時間×k)、L 群では k=0.059、H 群では k=0.072 と計算される。2 年間の曝露では合計 26 回の曝露回数、全体で 156 時間の曝露を行う事となり、6 ヶ月の時点の成績から予測される 2 年後の肺負荷量は L 群、H 群それぞれ 23.9µg/動物、56µg/動物となる。

6 ヶ月の時点における肺の病理組織学的評価は BALF を採取した後の肺であるため、本来の病理組織像を必ずしも反映しているとは限らないが、洗浄により変化しない器質的変化である、明確な肺胞構造の改変や線維性肉芽腫形成は認められなかった。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。今後、12 ヶ月の病理標本を観察し、慢性影響を更に明らかにする計画である。

E. 結論

Taquann 全身曝露吸入装置 Ver.3.0 を用いての T-CNT7#53 の 2 年間の間欠吸入曝露実験を実施中であり、6 ヶ月並びに 12 ヶ月の中間定期解剖において得られた肺における T-CNT7#53 の肺負荷量の測定、曝露肺の病理組織学的評価(6 ヶ月)、BALF から得られた細胞の観察(12 ヶ月)を行った。その結果、肺負荷量平均値は L 群、H 群それぞれ、6.4 ±1.1 µg/動物、15.2 ±1.0 µg/動物であった。肺内に吸入されたほとんどの T-CNT7#53 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。肺胞内集簇巣が認められたが線維成分の増加、及び隣接する肺胞構造に大きな変化は確認されず、貪食マクロファージの集簇巣であった。結論として、曝露後6ヵ月では、曝露肺に明確な線維性肉芽腫の形成は認められなかった。

謝辞:

本研究の遂行にあたり、技術的支援をしていただいた、辻昌貴氏、森田紘一氏、相田麻子氏、相原妃佐子に深く感謝する。

F. 参考文献

Kasai T, Umeda Y, Ohnishi M, Mine T, Kondo H, Takeuchi T, Matsumoto M, Fukushima S. Lung carcinogenicity of inhaled multi-walled carbon nanotube in rats. *Part Fibre Toxicol.* 2016 Oct 13;13(1):53.

G. 研究発表

1. 論文発表

Ono R, Yasuhiko Y, Aisaki K, Kitajima S, Kanno J, Yoko H.: Exosome-mediated horizontal gene transfer occurs in double-strand break repair during genome editing. *Commun Biol* 2, Article number: 57, 2019.

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

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, 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.* 2019 Feb 13.

Abdelgied M, El-Gazzar AM, Alexander WT, Numano T, Iigou M, Naiki-Ito A, Takase H, Hirose A, Taquahashi Y, Kanno J, Abdelhamid M, Abdou KA, Takahashi S, Alexander DB, Tsuda H. Carcinogenic effect of potassium octatitanate (POT) fibers in the lung and pleura of male Fischer 344 rats after intrapulmonary administration. *Part Fibre Toxicol.* 2019 Sep 2;16(1):34.

Rusyn I, Belpoggi F, Camacho L, Käfferlein HU, Cattley R, Estill CF, Kanno J, Le Curieux F, Mráz J, Roberts GK, Stubbings WA, Umemura T, Vlaanderen J, Bouvard V, Grosse Y, Benbrahim-Tallaa L, Girschik J, El Ghissassi F, Rowan EG, Chung F, Li M, Schubauer-Berigan MK, Guyton KZ. (Collaborator). Carcinogenicity of some industrial chemical intermediates and solvents. *Lancet Oncol.* 2020, 21:25-26.

Matsumoto M, Kasai T, Saito A, Takanobu K, Senoh H, Umeda Y, Kanno J. Carcinogenicity of butyl 2,3-epoxypropyl ether in rats and mice by whole body inhalation for two years. *J Toxicol Sci.* 2020;45(1):1-14.

Samet JM, Chiu WA, Cogliano V, Jinot J, Kriebel D, Lunn RM, Beland FA, Bero L, Browne P, Fritschi L, Kanno J, Lachenmeier DW, Lan Q, Lasfargues G, Curieux FL, Peters S, Shubat P, Sone H, White MC, Williamson J, Yakubovskaya M, Siemiatycki J, White PA, Guyton KZ,

- Schubauer-Berigan MK, Hall AL, Grosse Y, Bouvard V, Benbrahim-Tallaa L, Ghissassi FE, Lauby-Secretan B, Armstrong B, Saracci R, Zavadil J, Straif K, Wild CP. The IARC Monographs: Updated procedures for modern and transparent evidence synthesis in cancer hazard identification. *J Natl Cancer Inst.* 2020 Jan 1;112(1):30-37.
- Marques MM, Berrington de Gonzalez A, Beland FA, Browne P, Demers PA, Lachenmeier DW, Bahadori T, Barupal DK, Belpoggi F, Comba P, Dai M, Daniels RD, Ferreccio C, Grigoriev OA, Hong YC, Hoover RN, Kanno J, Kogevinas M, Lasfargues G, Malekzadeh R, Masten S, Newton R, Norat T, Pappas JJ, Queiroz Moreira C, Rodríguez T, Rodríguez-Guzmán J, Sewram V, Zeise L, Benbrahim-Tallaa L, Bouvard V, Cree IA, El Ghissassi F, Girschik J, Grosse Y, Hall AL, Turner MC, Straif K, Korenjak M, McCormack V, Müller K, Schüz J, Zavadil J, Schubauer-Berigan MK, Guyton KZ. (Collaborators). Advisory Group recommendations on priorities for the IARC Monographs. *Lancet Oncol.* 2019, 20:763-764.
2. 学会発表
- 小野 竜一, 相崎 健一, 北嶋聡, 菅野 純、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(2019.6.26.)
- 菅野 純、北嶋聡, 相崎 健一, 小野 竜一、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.)
- 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、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.)
- 種村 健太郎, 北嶋聡, 菅野 純、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.)
- 種村健太郎、北嶋聡、菅野純「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(2019.6.26-28)徳島市
- Yayoi Natsume-Kitatani, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Samik Ghosh, Hiroaki Kitano, Kenji Mizuguchi, Jun Kanno. Cross Talks among PPARα, SREBP, and ER Signaling Pathways in the Side Effect of Valproic Acid、IUTOX 15th International Congress of Toxicology (ICT 2019) (2019.7.16.)
- 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.、IUTOX 15th International Congress of Toxicology (ICT 2019)] (2019.7.17.)
- Yuhji Taquahashi, Satoshi Yokota, Koichi Morita, Masaki Tsuji, Akihiko Hirose and Jun Kanno, Improved aerosol generation method and newly designed whole body rodent inhalation apparatus for the testing of nanomaterials in human-relevant exposure scenario, 15th IUTOX International Congress of Toxicology (ICTXV), Hawaii Convention Center, Honolulu, Hawaii, USA, July 16, 2019, Poster
- 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.

菅野 純, 吸入による肺毒性の評価手法とツールについて. 化学物質の安全管理に関するシンポジウム, (2019.11.28), 東京, シンポジウム, 講演

Yuhji Taquahashi, Satoshi Yokota, Koichi Morita, Masaki Tsuji, Makiko Kuwagata, Akihiko Hirose and Jun Kanno, A long-term whole-body inhalation study of multi-walled carbon nanotube in mice with an improved dispersion and inhalation system, the 59th Annual Meeting of the Society of Toxicology, at the Anaheim Convention Center, Anaheim, California, USA, March 17, 2020, Abstract Number/Poster Board number: 2104/ P452, Poster (Cancelled due to COVID-19)

J. Kanno, K. Aisaki, R. Ono, S. Kitajima. Comprehensive Histone, DNA Methylation, and mRNA Expression Analysis of Murine Liver Repeated Exposure to Chemicals: Percellome Project Update. Society of

Toxicology (SOT) 59th Annual Meeting (SOT2020), Anaheim, USA, ePoster.

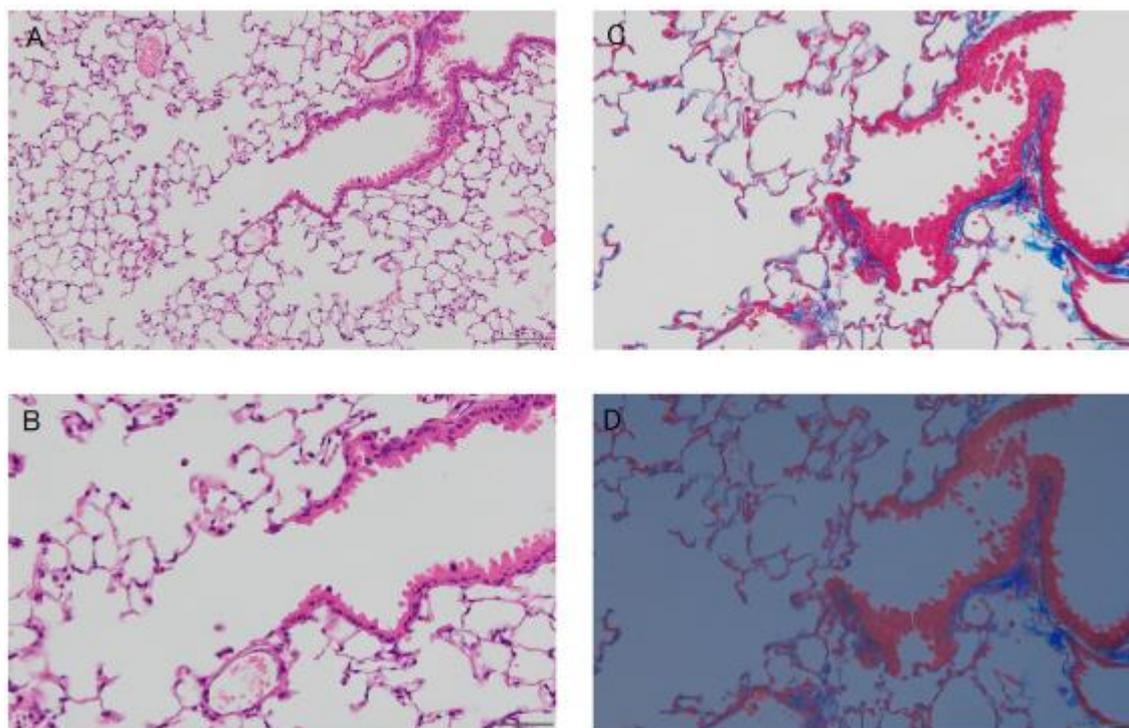
H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

表1 曝露6ヵ月の肺負荷量

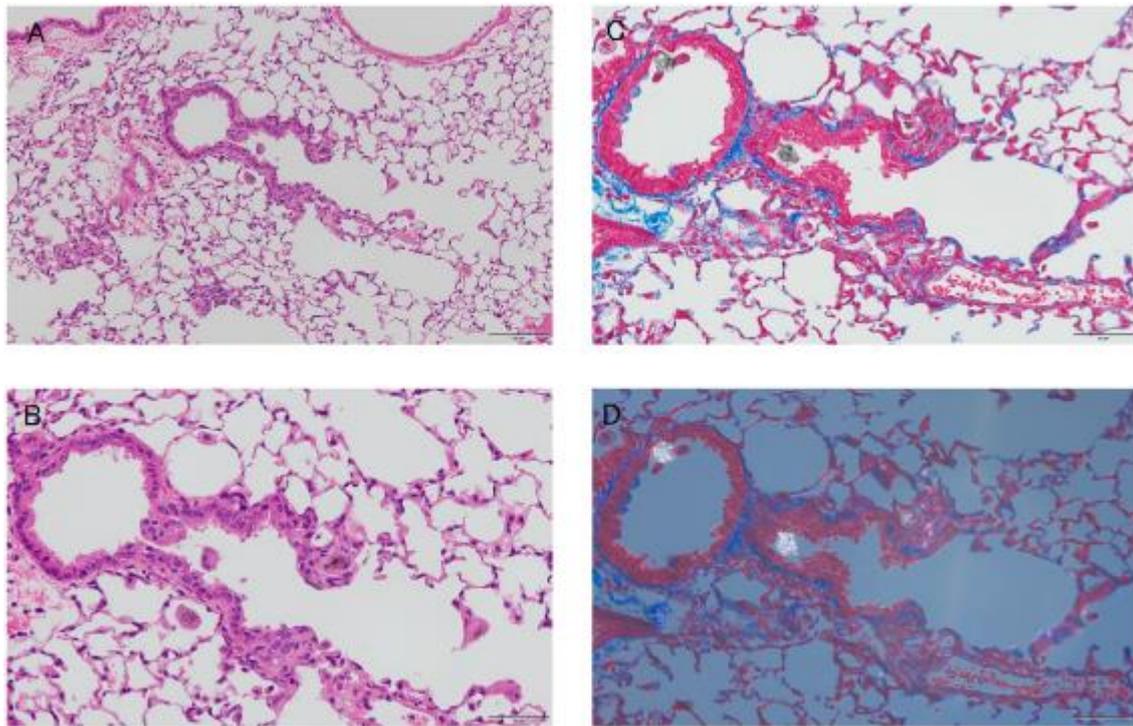
Group	Concentration (mg/m ³)	Lung weight (mg)	Lung Burden (μg/lung)
Control	0.0 ± 0.0	161.6 ± 5.4	0.0 ± 0.0
Low Concentration	2.6 ± 0.1	178.4 ± 9.2	6.4 ± 1.1
High Concentration	5.0 ± 0.2	206.5 ± 15.1	15.2 ± 1.0

図1 曝露6ヵ月の肺病理組織像 対照群



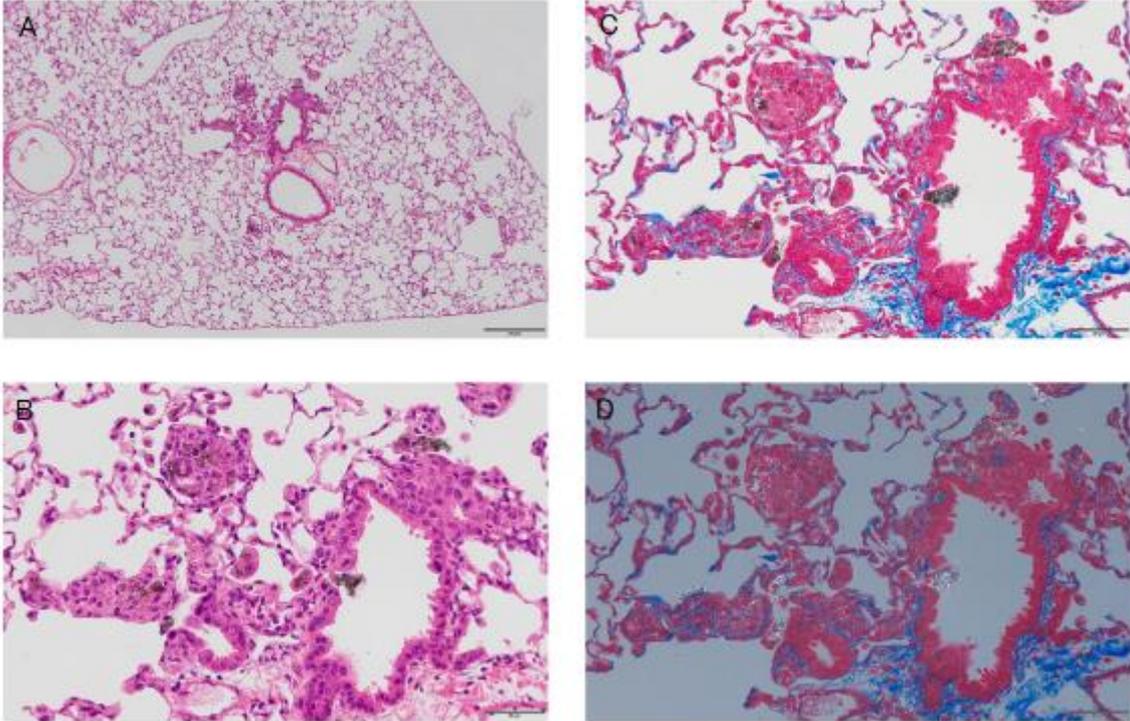
A:HE 染色(スケールバー:200μm)、B:HE 染色(スケールバー:50μm)、C:MT 染色(スケールバー:50μm)、D:C の組織像の偏光観察。

図2 曝露6ヵ月の肺病理組織像 低濃度群



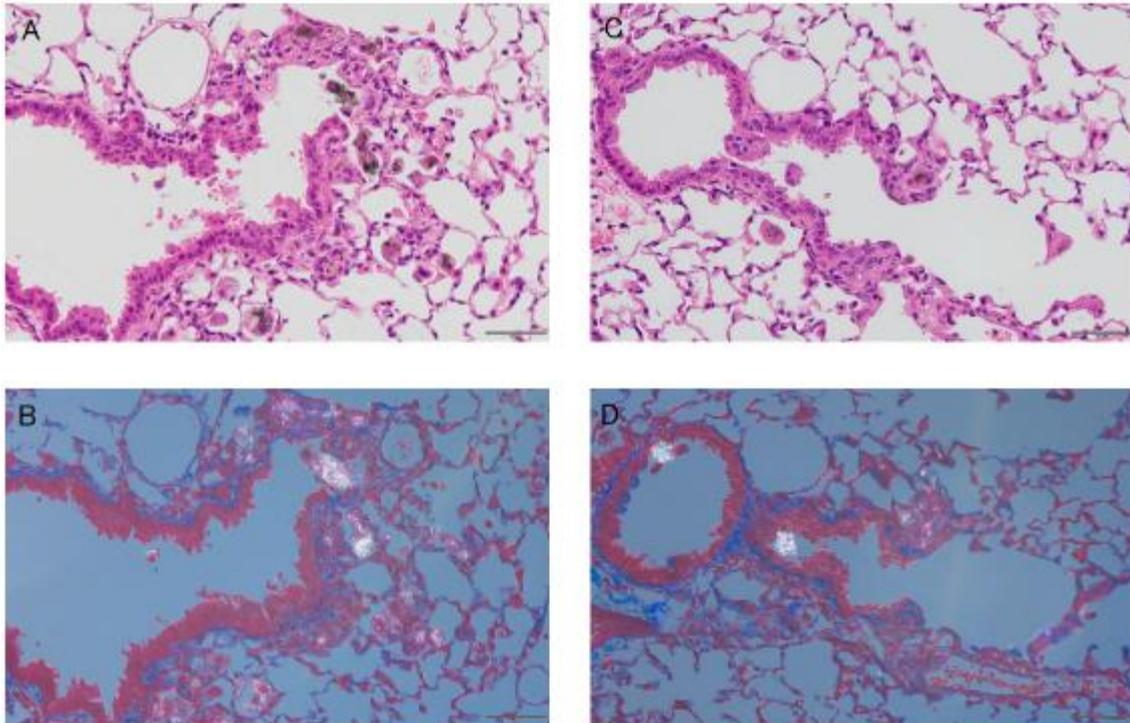
A: HE 染色(スケールバー:200 μ m)、B: HE 染色(スケールバー:50 μ m)、C: MT 染色(スケールバー:50 μ m)、D: C の組織像の偏光観察。肺内に吸入されたほとんどの MWNT-7 は、終末気管支内および肺胞管への移行部に存在しており、この領域の既存の線維成分が反応性に増殖していたが線維化の程度は弱かった。大部分の MWNT-7 は集簇したマクロファージに囲まれていたが、マクロファージに貪食されている像、MWNT-7 が肺を構成する細胞に刺さった像も観察された。

図3 曝露6ヵ月の肺病理組織像 高濃度群



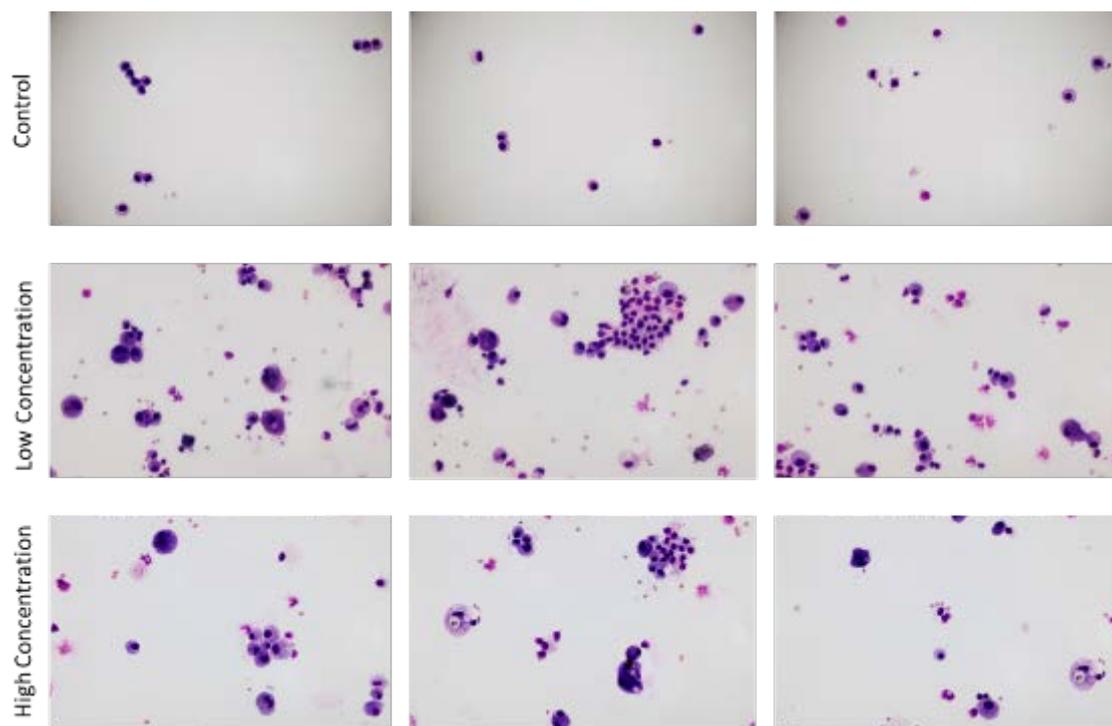
A: HE 染色(スケールバー:200 μ m)、B: HE 染色(スケールバー:50 μ m)、C: MT 染色(スケールバー:50 μ m)、D: C の組織像の偏光観察。MWNT-7 の量は低濃度群よりも高濃度群の方が多く、肺負荷量を反映した結果であった。HE 標本における観察では、貪食マクロファージが終末細気管支に近い肺胞内に集簇する像(肺胞内集簇巣)を認めた(B)。MT 染色では肺胞内集簇巣内に線維性分は確認されず、近接する肺胞組織の改編も明らかではなかったことから、線維性肉芽腫形成とは判定せず貪食マクロファージの集簇像と考えた(D)。

図4 曝露6ヵ月の肺病理組織像 低濃度群と高濃度群の比較



A: 低濃度群 HE染色、B: 低濃度群 MT染色の偏光観察像、C: 高濃度群 HE染色、D: 高濃度群 MT染色の偏光観察像(スケールバーは何れも50 μ m)。L群とH群の肺沈着量には肺負荷量の差である2倍に合致する差は認められるが、病理学的な病変の質には線維化の程度を含めて、それほど大きな差はなかった。

図 5. 曝露 12 ヶ月の BALF から得られた細胞の比較



上段: 対照群、中段: 低濃度群、下段: 高濃度群。BALF から得られた細胞数は、対照群に比較して L 群及び H 群では、細胞数は増加しており、T-CNT7#53 を貪食した大型の細胞が観察された。