

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

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

(H27-化学-指定-004)

平成 28 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 広瀬 明彦

平成 29 年 (2017 年) 3 月

平成28年度 厚生労働行政推進調査事業費補助金研究報告書

目 次

I. 総括研究報告書	1
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 広瀬 明彦	2
II. 研究分担報告書	14
1. ナノマテリアルの慢性影響指標の開発に関する研究 菅野 純、高橋 祐次	15
2. ナノマテリアルの発がん性評価手法の開発に関する研究 津田 洋幸	32
3. ナノマテリアルの発生毒性評価手法に関する研究 小林 憲弘	37
4. ナノマテリアルの遺伝毒性評価に関する研究 —マウスを用いる肺小核試験の基礎検討試験— 本間 正充	46
5. ナノマテリアルの細胞内異物処理メカニズムに関する研究 最上 知子	54
6. ナノマテリアルの感染性免疫系への影響に関する研究 渡辺 渡	58
7. ナノマテリアルの免疫制御システムへの影響評価研究 石丸 直澄	63
8. ナノマテリアルの慢性影響評価系に関する研究および国際動向調査 広瀬 明彦	81
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	92

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

本研究は、これまでの研究で多層ナノチューブ(MWCNT)や酸化チタンを中心にして確立してきた慢性影響研究や新規に開発した高度分散手法(Taquann 法)を基にして、H29年度までにさらに他のナノマテリアル(チタン酸カリウムや二層ナノチューブ)を用いて発癌性や免疫影響、発生影響に関するメカニズム解析や分散手法である Taquann 法の適用拡大研究を行うことにより、評価系の開発のために基礎的条件を確立することを目指している。H28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を加えた研究を進めると共に、MWCNT 投与検体の熱処理や taquann 処理が、生殖発生毒性と発がん性に及ぼす影響の解析にとりかかった。

慢性影響評価研究において、チタン酸カリウムの 5 日間吸入曝露試験を行い、曝露時と同様の長さの繊維粒子が肺へ沈着していることを確認した。また、二層カーボンナノチューブの Taquann 法により 100-300nm 束状になった繊維ではあるが分散は可能であった。チタン酸カリウムの経気管肺内噴霧投与実験ではチタン酸カリウムによる中皮細胞の増殖を確認した。3 種の MWCNT の F344 ラットへの気管内単回噴霧投与(0.5mg/kg)の終生飼育実験では、どの MWCNT も肺には腫瘍あるいは中皮腫を誘発しないが、SD-1 および MWNT-7 投与群では、体腔での中皮腫誘発の可能性を示した。MWNT-7 のラット腹腔内投与により誘発される腹膜中皮腫の観察において、32 週間にわたって腹腔内の炎症反応やサイトカインの分泌が持続することと、16 週から 24 週間にかけて間質で線維化が進行することが確認できた。前処理として MWNT-7 を熱処理あるいは Taquann 処理を施し F344 雄性ラットに腹腔内単回投与した実験では、途中経過として処理にかかわらず高用量群で中皮腫によると思われる死亡が 27 週後から認められた。マウスに対する *in vivo* 肺小核試験法の確立に成功し、MWCNT はマウス肺小核試験で陽性と判定できた。

免疫影響に対する検討では、MWCNT 腹腔内投与後 1 年で観察される肝臓の分葉状変化はチタン酸カリウム投与では観察されなかった。腹腔マクロファージへの影響ではチタン酸カリウム投与群では M1 マクロファージへの分化、T-CNT 投与群では M2 マクロファージへの分化が亢進しており、両者で異なった影響を示すことが示唆された。感染性への影響に関してはチタン酸カリウム曝露マウスでは、感染 1 日後から肺胞洗浄液中の炎症性メディエーターの上昇や病理的な炎症形成の亢進も確認されたが、MWNT-7 に比べて線維化の程度は低く回復遅延も見られなかった。*in vitro* 試験系による検討では、4 種の MWCNT が IL-1 β 産生促進と同様に NLRP3 インフラマソーム活性化を介したマクロファージからの TNF α 産生を促進することを明らかにした。

発生影響に関する検討では、4 種類の MWCNT 懸濁液(未処理、熱処理、Taquann 処理、Taquann+熱処理)で発生毒性を検討したところ、昨年度観察された加熱処理による奇形性能の減弱作用は再現されなかったが、今年度の研究では、特に熱処理した MWCNT 群で胎児に発育抑制や受胎率低下傾向が認められ、投与検体の調製方法によって影響に差が現れることを示唆した。

H28 年度に開催されたナノマテリアルの毒性評価手法に関する OECD や EU の活動における調査では、様々なナノマテリアル製品の評価に必要なグルーピング評価やリードアクロス評価手法を適用するために、*in vivo* 試験結果と代替試験法との関連づけを行うためのパラメータの同定が必要であることが指摘されていた。

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 安全
性予測評価部 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

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

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

Mohamed Ahmed Mahmoud Abd El-gied 名古
屋市立大学大学院医学研究科 大学
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 主任研究官

濱田 修一 株式会社L S I メディエンス 技
術・学術顧問

高沢 博修 株式会社L S I メディエンス 主任
研究員

中川 宗洋 株式会社L S I メディエンス 主任
研究員

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
助教

斎藤 雅子 徳島大学大学院 医歯薬学研究部
助教

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

坂本 義光 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

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

猪又 明子 東京都健康安全研究センター
薬事環境科学部 科長

中江 大 東京農業大学応用生物科学部
教授

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。特に、*in vitro* 試験系を中心とした研究では、製品毎に多様性のある表面活性の違いが試験結果の解釈を困難にしており、10年前の問題点は未だに問題点のまま根本的な解決策は見いだせていない。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づ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

H28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に取り掛かった。

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

C57BL/6NcrSLC 雄性マウス 12 週齢を使用し、対照群、および、チタン酸カリウム曝露群の 2 群構成で実験を行った。Taquann 法処理したチタン酸カリウムを Taquann 全身曝露吸入装置 Ver2.5 により、1 日 2 時間の吸入曝露を 5 日間連続で行い、合計 10 時間の曝露を行った。チタン酸カリウムの曝露濃度は、 2 mg/m^3 の MWNT-7 と繊維数を合わせた 5 mg/m^3 を目標濃度とした。

二層カーボンナノチューブ(DWCNT)のエアロゾル化の検討

繊維長が極めて均一となる製法を用いた DWCNT の全身曝露吸入実験の準備として、Taquann 法による高分散化処理と Taquann 全身曝露吸入装置によるエアロゾル化の検討を行った。本年度は繊維長 $15 \mu\text{m}$ の検体について検討を行った。(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、無コーティング粒子状二酸化チタン直径 6 nm アナターゼ型 TiO_2 (anTiO_2) と平均直径 $15 \mu\text{m}$ ルチル型 TiO_2 (ruTiO_2)、および、長さ $6.0 \mu\text{m}$ 、直径 305 nm 線維状チタン酸カリウム($\text{K}_2\text{O} \cdot 8\text{TiO}_2$) (POT) の肺と胸膜における炎症と障害作用を比較検討した。これらは Taquann 処理後、PF68 分散液に懸濁し、1 回/2 日の合計 8 回経気管肺内噴霧投与した。投与後の胸腔洗浄液における ALP、LDH の解析を行った。また胸腔細胞ペレットの病理検査、左肺の病理標本、右肺の細気管支肺胞洗浄液のサイトカイン種の mRNA 及び ELISA 解析に用いた(津田)。

MWCNT の気管内投与による発がん性の検討

MWCNT を F344 ラットに経気管単回噴霧投与し、投与後終生飼育実験を行った(広瀬)。

MWCNT の腹腔内投与の経時変化の解析

MWNT-7 を 2%CMC 溶液に懸濁分散させ、1mg/kg 体重の用量で F344 雄性ラット(8週齢)の腹腔内に単回投与した。8・16・24・32 週間後に病理学的検索と、腹腔洗浄液の各種液性因子の濃度測定を行った(広瀬)。

投与分散方法の違いによる発がん性の検討

MWNT-7 を熱処理あるいは Taquann 処理を施し、0.1%Tween80 に懸濁分散させ、1mg/kg 体重(高濃度)0と0.05mg/kg 体重(低濃度)で F344 雄性ラットに腹腔内単回投与し慢性観察試験を開始した。途中死亡例および瀕死屠殺例については、病理組織学的解析を行った(広瀬)。

肺小核試験法の検討

ナノマテリアルに対する in vivo 遺伝毒性評価手法開発研究の検討として、11 週齢の雄性 C57BL/6NCrSlc (SPF) マウスに、Taquann 法処理した検体(T-CNT)を 2 時間/日、5 日間連続の全身吸入暴露を行った。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

Taquann 処理した MWNT-7(T-CNT)及びチタン酸カリウムを雌 C57BL/6 マウスに腹腔内投与 12 ヶ月後の腹腔内浸出液、腸間膜リンパ節および脾臓における各免疫細胞分画についてフローサイトメーターにて解析した。さらに、血清イムノグロブリン分画を ELISA にて定量化した。(石丸)。

感染性免疫系への影響

Taquann 処理した度分散化 MWNT-7 とチタン酸カリウム($K_2O \cdot 8TiO_2$)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、感染 1,5 日後の肺病理組織および肺胞洗浄液(BALF)中のサイトカインレベルを測定した(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。MWCNT 類を 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、caspase-1、cathepsin B 阻害剤を用いて解析した(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

昨年度までの研究で、MWCNT 投与に用いる懸濁液の調製方法によって、形状や凝集状態が異なり、発生毒性も異なることが示唆されていたので、同一試料(MWNT-7)から調製方法の異なる 4 種類の MWCNT 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調べた。上記 4 種類の方法で調製した MWCNT 懸濁液および媒体(1%-CMS-Na 含有 PBS)を、いずれも 4 mg/kg の用量で ICR マウスに妊娠 6, 9, 12, 15 日に合計 4 回(合計 16 mg/kg)、イソフルラン麻酔下で気管内投与した。各投与群とも、妊娠 17 日に母動物および胎児の検査を行った。(小林、広瀬)

国際動向調査:

H28 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 や EU の活動においてガイドンスやドキュメント、評価手法などの発案等に係る専門家会議など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:

チタン酸カリウムの吸入曝露実験

5 日間反復全身曝露吸入実験の平均質量濃度は $4.1 \pm 0.8 \text{ mg/m}^3$ 、平均 CPC カウントは $7,575 \pm 883/\text{cm}^3$ であった。直噴操作間隔を 4 分間にすることで濃度安定性が得られた。肺沈着量は $15.0 \mu\text{g}/\text{動物}$ であり、繊維数に換算すると 18.0×10^6 本/動物であった。肺に沈着した繊維長の平均値は $4.2 \pm 3.5 \mu\text{m}$ 、最長は $36.8 \mu\text{m}$ であった。

DWCNT のエアロゾル化の検討

Taquann 直噴全身吸入装置 Ver2.0 により DWCNT のエアロゾル発生は可能であった。エアロゾル化した DWCNT の形状を走査型電子顕微鏡で観察したところ、単離した繊維状のエアロゾルが観察されたが、 $100 \sim 300 \text{ nm}$ 程度の繊維径であることから、 100 本程度の DWCNT 単繊維が束状になったエアロゾルと考えられた。

チタン酸カリウムの経気管肺内噴霧投与方法の検討

肺胞上皮の PCNA ラベル率はアナターゼ型二酸化チタンとチタン酸カリウムにおいて 6h より 4w において対照群より有意の増加を示した。病理標本における肺胞の炎症の状態は、高用量群において無処置と生食対照群より明らかな炎症細胞浸潤の増強が見られた。投与後 6h で Mφ と好中球が主であったが、4w では線維化肉芽に Mφ、好中球、に加えリンパ球を主とする炎症細胞時計痔の繊維化が見られた。肺組織における CCL 種の mRNA 解析では、チタン酸カリウムが 6h と 4w において増加傾向を示した。BALF の解析では 4w において ALP 活性はチタン酸カリウムにおいて、LDH はアナターゼ型二酸化チタンとチタン酸カリウムに

増加した。胸腔細胞ペレットの解析では 4w と 6h において Mφ の胞体内に偏光レンズで把握されるすべての検体が見られた。

MWCNT の気管内投与による発がん性の検討

3 種の MWCNT の F344 ラットへの気管内単回噴霧投与 (0.5 mg/kg) の終生飼育実験 (投与後 156 週迄) においては、どの MWCNT も肺には腫瘍あるいは中皮腫を誘発しないが、SD-1 および MWNT-7 投与群では、体腔での中皮腫誘発の可能性を示した。

MWCNT の腹腔内投与の経時変化の解析

MWNT-7 の腹腔内投与により誘発されるラット腹膜中皮腫の経時的な観察において、少なくとも 32 週間にわたって腹腔内の炎症反応が持続し、腹膜周囲で CINC-1 や MCP-1 等の分泌が亢進することが示された。病理組織学的には、投与 8 週後より、観察期間を通して肉芽腫形成、中皮下組織の肥厚、肥満細胞および好酸球の集簇が腹膜全般に認められた。16 週から 24 週後にかけて、腹膜表層の組織球の集簇は減少し、間質で線維化が進行した。

投与分散方法の違いによる発がん性の検討

MWNT-7 を熱処理あるいは Taquann 処理を施し F344 雄性ラットに腹腔内単回投与し前処理が MWCNT の腹腔内投与発がん性に与える影響を検討した実験において、投与後 44 週が経過し、低濃度群および対照群を除く各処理を施した MWCNT 投与群で、中皮腫によると思われる死亡が 27 週後から認められた。

肺小核試験法の検討

マウスに対する in vivo 肺小核試験法の確立を目指した基礎検討では、CNT 暴露群は対照群と比較して、小核をもつ細胞の有意で明らかな高値が認められた。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。CNT 暴露群の小核誘発頻度は EMS 投与群と比較して約 2.6 倍の高値を示した。以上の結果から、MWCNT は in vivo-in vitro 法を用いた本試験条件下でマウス肺小核試験で陽性と判定された。

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

T-CNT 及びチタン酸カリウムの腹腔内投与後 1 年での腹腔内所見として、投与では、T-CNT 投与で観察される肝臓の分葉状変化はチタン酸カリウム投与では観察されなかった。T-CNT 及びチタン酸カリウムの腹腔内投与で、それぞれ M1、M2 マクロファージ分化に大きな相違があった。さらに、T-CNT 及びチタン酸カリウムの腹腔内投与で、腸間膜あるいは脾臓への炎症の波及が確認された。加えて、T-CNT 及びチタン酸カリウムの腹腔内投与後 1 年で、Th1 型の免疫反応あるいは抗体産生が亢進する可能性が示された。

感染性免疫系への影響

MWNT-7 曝露マウスの感染 1 日後の肺免疫組織像では、抗 CCL 抗体 3 陽性細胞数の増加が認められたが、MWNT-7 貪食細胞とは異なっていた。感染 14 日後の肺組織をマッソン染色法で解析したところ、肺胞壁の一部線維化が見られ、肺炎回復期での遅延が確認された。一方、チタン酸カリウム曝露マウスでは、感染 1 日後の肺胞洗浄液中の炎症性メディエーターの上昇が認められ、貪食細胞周囲での炎症形成の亢進も確認されたが、線維化の程度は低く、明確な回復遅延は見られなかった。

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 および-SD1 をマクロファージに曝露し、昨年度報告の IL-1 β 産生促進と同様に、いずれの MWCNT も強力に TNF α 分泌も促進することを見いだした。TNF α 分泌についても IL-1 β 産生の場合と同様に、NLRP3 と caspase-1、ならびにリソソーム酵素 cathepsin B が関与することを siRNA あるいは阻害剤を用いて明らかにした。

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

本試験条件下では、MWCNT のいずれの調製方

法(未処理、熱処理、Taquann 処理および Taquann+熱処理)においても、その 4 mg/kg 反復投与(妊娠期間を通じて 16 mg/kg)によって、母動物に対する体重増加抑制または摂餌量減少が認められた。また、熱処理あるいは Taquann+熱処理された MWCNT の投与によって、胎児に発育抑制が認められた。本試験で認められた母動物および胎児に対する影響は、特に熱処理された MWCNT の投与によって顕著に認められた。さらに、熱処理された MWCNT の投与によって、受胎率が低値傾向を示し、妊娠早期(着床または胚の発生)に何らかの影響を及ぼす可能性が示唆された。なお、外表検査において、MWCNT の催奇形性は判断できなかった

国際動向調査

OECD WPMN Expert Meeting on Grouping and Read-Across for the Hazard Assessment of Manufactured Nanomaterials(H28年4月、ブリュッセル)は、OECD の WPMN プログラムの一環としてナノマテリアルの有害性評価における、グループ評価とリーアクロス手法の適用を検討するために開催されることとなった専門家会合。当該会議には、当研究班で様々な MWCNT を用いて、腹腔内投与などや in vitro 実験を行ってカテゴリー評価を行った研究成果を紹介した。本会議の主要なアウトプットは、ナノマテリアルの有害性評価におけるデータギャップを埋めるためには、グルーピングとリーアクロス手法は必要であり適切なツールであることであった。Joint scientific conference of ProSafe & OECD(H28年11-12月、パリ)は、OECD 主催でオランダのインフラ・環境省が調整し、EU H2020 プロジェクト ProSafe がホストした会議であると同時に EUNANoREG の最終会議でもあった。会議の結果は、ナノ物質の影響とリスクをどのように試験・評価するかについて、政策立案者、規制当局、産業界に ProSafe プロジェクトから勧告するために基礎となる。ヒト健康に関する in vivo データの評価に関しては、現存の吸入試験は、ナノマテリアルの評

価に適用できるが、可能であれば肺負荷量を計測し、グルーピングのパラメータとして検討する他に代替試験法の開発に重要な因子となることが確認された。New tools and approaches for nanomaterial safety assessment(H29年2月, マラガ)は、EUのFP7プロジェクトで行われたナノマテリアルの安全性にかかわる5つのプロジェクトNANOSOLUTIONS、GUIDEnano、SUN、NanoMILE、eNanoMapperが共同での今後の研究プログラムの可能性に関する議論を促進するためにこれまでのプロジェクト成果を発表していた。

D. 考察

慢性影響に関する研究に関しては、昨年度の研究において、チタン酸カリウムは、MWNT-7に比較して太く短く比重が大きいことから沈降速度が高く、同条件ではエアロゾル濃度を安定的に維持することが困難であることが判明した。本年度はより短間隔で直噴操作を行うプロトコルに変更し安定した濃度が得られた。チタン酸カリウムの肺沈着量の繊維数は 2 mg/m^3 のMWNT-7とほぼ同様な値であり、MWNT-7と同程度の繊維数を負荷するという目的は達成されたものと評価される。DWCNTのエアロゾル化は可能であったが、エアロゾルの粒子の中には束状のDWCNTが含まれており、触媒として用いられている鉄を塩酸により除去する、または、より強力な超音波処理の実施など、分散化処理に更なる検討が必要であることが判明した。

チタン酸カリウムの経気管肺内噴霧投与方法の検討において、すべての検体は肺から胸腔への移動し、Mφの数は、肺から胸腔の炎症象はアナターゼ型二酸化チタニウムとチタン酸カリウムにより顕著で、中皮細胞増殖もチタン酸カリウムにより顕著にみられた。以上からチタン酸カリウムには発癌性の可能性について、さらに長期の検索を進めている。

3種のMWCNTの気管内単回噴霧投与の終生飼育実験から、今回の条件下においては、MWCNTは呼吸器系の腫瘍あるいは中皮腫を誘

発しないが、SD-1およびMWNT-7投与群では、体腔での中皮腫誘発の可能性を示した。日機装のMWCNTの単回気管内投与により、体腔内に中皮腫を有意に発現した報告を再現していると考えられる。

MWCNTの腹腔単回投与後では経時観察から、長期間わたって炎症反応が持続することが示された。一方投与16から24週後の時期は、障害修復に関連した反応が減弱し、中皮細胞の増殖が開始するため、この時期が中皮腫発症に関連した質的变化が起こる時期と推察される。

熱処理MWCNTの腹膜中皮腫誘発性については実験が継続中であるが、催奇形性とは異なり、熱処理によりMWCNTの毒性が顕著に変化することは無いと考えられる。投与104週後まで実験を継続し、生存率および生存曲線の解析あるいは病理組織学的解析から、熱処理およびTaquan処理の影響を分析する予定である。

in vivo肺小核試験法の確立を目指した基礎検討では、肺細胞の分離が重要であることが推定され、予備実験として、分離酵素として、トリプシン、コラゲナーゼ、エラスターゼの3種類の酵素を使用して肺細胞を分離し、細胞培養後に作製した標本の状態を比較した。その結果、作製した標本の状態はトリプシン、エラスターゼ、コラゲナーゼの順に良好であった。これらの結果から、本実験ではトリプシンを使用した。

免疫系への慢性影響について、チタン酸カリウムとMWCNTを比較すると、MWCNTの線維化を伴う腹膜炎の誘導能は高く、両者で腹腔内のマクロファージ分化が異なり、慢性炎症への機転も異なっていることが判明した。ナノマテリアルの種類によって免疫システムへの影響は異なっており、T-CNTの暴露は炎症の遷延化につながる可能性が高いことが示唆された。

感染性免疫への影響について、チタン酸カリウムはその特徴的な針状の構造から、MWNT-7と同様な作用が予想され、実際に感染初期から炎症性のメ

ディエーターの上昇が確認されたが、回復期への作用は MWNT-7 より軽度であり、肺組織での蓄積性などが低いことが強く示唆された。

発生影響に関する検討では、昨年度観察された加熱処理により催奇形性能が減弱する影響は再現されなかったが、今年度の研究で母動物および胎児への影響は、投与した MWCNT の調製方法によって有意な差がみられた。MWCNT のサイズ分布や分散状態によって発生毒性に差がみられることが示唆されたが、これは、加熱処理により引き起こされた何らかの MWCNT の変化が、催奇形性に関連していることを示唆しており、今後は、各 MWCNT 懸濁液の特性についてさらに詳細に検討する必要があると考えられる。

また、今回、外表検査に MWCNT の催奇形性は確認できなかったが、過去に実施した試験では、未処理 MWCNT の 4 mg/kg 投与で内臓異常および骨格異常を伴う胎児の発生率が有意な高値を示しており、当該試験の内臓および骨格検査においても同様の変化が生じる可能性が考えられたことから、今後は内臓および骨格検査を行い、内臓および骨格への影響を確認する必要があると考えられる。

国際動向調査では、様々なナノマテリアル製品を現実的に評価するために、グルーピング評価やリードアクロス評価手法を使う必要があることは、基本的な認識として定着していることが示された。さらに、現実的な評価のために in vitro や短期の試験系が必要であるが(長期間の)in vivo 試験結果との間をつなぐパラメータの同定には至っていないのも現状であることが認識されている。OECD_WPMN では、炎症反応などを標的とした AOP(毒性発現経路)の開発プロジェクトが開始されているが、ナノマテリアルによって引き起こされる慢性影響のメカニズム解析を行うことが、今後の効果的な評価系の確立にもっとも重要なことであると再認識できた。

E. 結論

H28 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を加えた研究を進めると共に、MWCNT 投与検体の熱処理や taquann 処理が、生殖発生毒性と発がん性に及ぼす影響の解析にとりかかった。

慢性影響評価研究において、チタン酸カリウムの 5 日間吸入曝露試験を行い、曝露時と同様の長さの繊維粒子が肺へ沈着していることを確認した。また、二層カーボンナノチューブの Taquann 法により 100-300nm 束状になった繊維ではあるが分散は可能であった。チタン酸カリウムの経気管肺内噴霧投与実験ではチタン酸カリウムによる中皮細胞の増殖を確認した。3 種の MWCNT の F344 ラットへの気管内単回噴霧投与(0.5mg/kg)の終生飼育実験においては、どの MWCNT も肺には腫瘍あるいは中皮腫を誘発しないが、SD-1 および MWNT-7 投与群では、体腔での中皮腫誘発の可能性を示した。MWNT-7 のラット腹腔内投与により誘発される腹膜中皮腫の観察において、32 週間にわたって腹腔内の炎症反応やサイトカインの分泌が持続することと、16 週から 24 週間にかけて間質で線維化が進行することが確認できた。前処理として MWNT-7 を熱処理あるいは Taquann 処理を施し F344 雄性ラットに腹腔内単回投与した実験では、途中経過として処理にかかわらず高用量群で中皮腫によると思われる死亡が 27 週後から認められた。マウスに対する in vivo 肺小核試験法の確立に成功し、MWCNT はマウス肺小核試験で陽性と判定できた。

免疫影響に対する検討では、MWCNT 腹腔内投与後 1 年で観察される肝臓の分葉状変化はチタン酸カリウム投与では観察されなかった。腹腔マクロファージへの影響ではチタン酸カリウム投与群では M1 マクロファージへの分化、T-CNT 投与群では M2 マクロファージへの分化が亢進しており、両者で異なった影響を示すことが示唆された。感染性への影響に関してはチタン酸カリウム曝露マウスでは、感染 1 日後から肺胞洗浄液中の炎症性メディエーターの上昇や病理的な炎症形成の亢進も確認されたが、

MWNT-7 に比べて線維化の程度は低く回復遅延も見られなかった。*in vitro* 試験系による検討では、4 種の MWCNT が IL-1 β 産生促進と同様に NLRP3 インフラマソーム活性化を介したマクロファージからの TNF α 産生を促進することを明らかにした。

発生影響に関する検討では、4 種類の MWCNT 懸濁液(未処理、熱処理、Taquan 処理および Taquan+熱処理)に対する発生毒性の差異を検討したところ、昨年度観察された加熱処理による奇形性能の減弱作用は再現されなかったが、今年度の研究では、特に熱処理した MWCNT 群で胎児に発育抑制や受胎率低下傾向が認められ、投与検体の調製方法によって影響に差が現れることを示唆した。

H28 年度に開催されたナノマテリアルの毒性評価手法に関する OECD や EU の活動における調査では、様々なナノマテリアル製品の評価に必要なグルーピング評価やリードアクロス評価手法を適用するために、*in vivo* 試験結果と代替試験法との関連づけを行うためのパラメータの同定が必要であることが指摘されていた。

F. 健康危機情報

該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- 菅野 純、ナノマテリアル毒性のとらえ方とその難しさ、医学のあゆみ、259 巻 3 号、217-222、2016
- 高橋祐次、高分散型小型全身曝露吸入システムによるマウス吸入毒性-ヒトの現実的な曝露シナリオに基づいたナノマテリアルの吸入毒性評価の迅速化と効率化に向けて、医学のあゆみ、259 巻 3 号、234-240、2016
- 津田洋幸 カーボンナノチューブの肺と胸膜中皮に対する毒性と発がん性の簡易評価法、医学のあゆみ、vol.259 No. 3、223-227、2016

石丸直澄 ナノマテリアルと免疫システム 医学のあゆみ 259:241—246, 2016

Suzui M, Futakuchi M, Fukamachi K, Numano T, Abd Elgied M, Takahashi S, Ohnishi M, Omori T, Tsuruoka S, Hirose A, Kanno J, Sakamoto Y, Alexander DB, Xu J, Tsuda H. Multiwalled carbon nanotubes intratracheally instilled into the rat lung induce development of pleural malignant mesothelioma and lung tumors. *Cancer Sci*, doi: 10.1111/cas. 12954, 2016.

Horibata K, Ukai A, Ogata A, Nakae D, Ando H, Kubo Y, Nagasawa A, Yuzawa K, Honma M. Absence of *in vivo* mutagenicity of multi-walled carbon nanotubes in single intratracheal instillation study using F344 gpt delta rats. *Genes Environ.* 39:4 doi: 10.1186/s41021-016-0065-5. eCollection, 2017

Shigemoto-Mogami Y, Hoshikawa K, Hirose A, Sato K., Phagocytosis-dependent and independent mechanisms underlie the microglial cell damage caused by carbon nanotube agglomerates. *J Toxicol Sci.* 41, 501-509. 2016.

2. 学会発表

Akihiko Hirose, Yoshimitsu Sakamoto, Tomoko Nishimaki-Mogami, Yuhji Taquahashi, Takashi Yamada, Tetsuji Nishimura, Akiko Inomata, Dai Nakae, Hiroyuki Tsuda and Jun. Analysis of size-dependent carcinogenic potential of multiwalled carbon nanotubes. *Global Cancer: Occurrence, Cause, and Avenues to Prevention. IARC 50th Anniversary Conference (2016.6), Lyon, Poster.*

新垣理恵子、山本安希子、常松貴明、工藤保誠、菅野純、石丸直澄: 全身吸入曝露による多層化カーボンナノチューブの免疫システムへの影響 第 105 回日本病理学会総会 2016 年 5 月 仙

台

石丸直澄、山田耕一、斉藤雅子、新垣理恵子、高橋祐次、菅野純: ナノマテリアルの免疫制御システムへの影響 第43回日本毒性学会シンポジウム(ナノマテリアルの実用化に呼応した有害性評価の進捗) 2016年6月 名古屋

北條幹、坂本義光、山本行男、長谷川悠子、多田幸恵、久保喜一、長澤明道、海鋒藤文、高橋博、湯澤勝廣、安藤弘、田中和良、矢野範男、藤谷知子、小縣昭夫、猪又明子、広瀬明彦、中江大: MWCNTによるラット中皮腫誘発過程の経時的解析. 第43回日本毒性学会学術年会(2016年6月29日~7月1日)名古屋市

坂本義光、広瀬明彦、中江大: 多層カーボンナノチューブ(MWCNT)を経気管反復投与したラットに見られた肺胞過形成病変に関する病理組織学的解析. 第75回日本癌学会学術総会(2016年10月6日~8日)横浜市

高橋祐次、小川幸男、高木篤也、辻 昌貴、森田紘一、今井田 克己、菅野 純、MWCNTのマウス全身暴露吸入における原末と高分散処理検体(Taquann法)の肺沈着量の比較、第34回日本毒性学会、名古屋、(2016.7.1)、一般演題(口演)

Jun Kanno, Nanomaterials safety: Predicting their long-term effects by in vivo studies., The 14th International Nanotech Symposium & Nano-Convergence Expo (NANO KOREA 2016) (2016.7.14), Korea, 基調講演

相磯成敏、梅田ゆみ、笠井辰也、妹尾英樹、高信健司、斎藤美佐江、福島昭治、菅野純、MWNT-7吸入暴露で誘発されたラット肺病変の経時的解析、第31回発癌病理研究会(2016.8.23)、長野、口演

Kanno J, Taquahashi Y, Introduction to Nanomaterials safety: Predicting the chronic effects. XIV International Congress

of Toxicology (ICT2016)Merida-Mexico, (2016.10.3), Symposium

Taquahashi, Atsuya Takagi, Yukio Ogawa, Koichi Morita, Masaki Tsuji, Katsumi Imaida, Jun Kanno, Level of dispersion of MWCNT aerosol affects the lung burden and lung lesion in whole body inhalation study, XIV International Congress of Toxicology Merida-Mexico, (2016.10.5), Oral Hirose A, Cui H, Ema M, Kanno J, Tsuda H, Nishimaki-Mogami T, Comparison with the NLRP3 inflammasome activations in THP-1 cells by various nanomaterial. XIV International Congress of Toxicology, Merida, Mexico, (2016.10), Poster.

Tsuda H, Alexander DB, Alexander WT, AbdElgied M, ELGazzar A, Xu J, Numano T, Suzui M, Futakuchi M, Fukamachi K, Hirose A, Kanno J, Development of a Mechanism Based Short-term Assay Protocol to Test Carcinogenicity of Multiple Wall Carbon Nanotubes (MWCNTs) in the Rat. XIV International Congress of Toxicology, Merida, Mexico, Oct. 2-6, 2016.

Jun Kanno, Yuhji Taquahashi¹, Atsuya Takagi¹, Masaki Tsuji¹, Koichi Morita¹, Yukio Ogawa, Shigetoshi Aiso, Yumi Umeda, Tatsuya Kasai, Hideki Senoh, Kenji Takanobu, Misae Saito, Shoji Fukushima, Nanomaterials safety: Predicting their long-term effects by in vivo studies., Inhalation Toxicity Test Advisory Council, Korea Occupational Safety and Health Agency (KOSHA). Seoul, Korea, Invited

Tsuda H, Xu J, Alexander DB, Alexander WT, Mohamed Abd El-gied, Suzui M, Futakuchi M, Fukamachi K, Numano T, Takahashi S, Ohnishi M, Hirose A, Kanno J, Development of a series of assay model of

toxicity and carcinogenicity of carbon nanotubes. 2016 Korean Association for Laboratory Animal Science, 慶州, Korea, Aug. 24-26, 2016

加藤雄大、橋口誠子、権藤喜貴、宮内亜宜、明石敏、吉田裕樹、杉田千泰、黒川昌彦、渡辺 渡
チタン酸カリウム曝露の RSV 肺炎への影響 第 64 回日本ウイルス学会総会、P2-091 札幌コンベンションセンター 2016 年 10 月 24 日

権藤喜貴、橋口誠子、加藤雄大、宮内亜宜、明石敏、吉田裕樹、杉田千泰、黒川昌彦、渡辺 渡
多層型カーボンナノチューブ曝露による RSV 感染初期応答への影響 第 64 回日本ウイルス学会総会、P2-092 札幌コンベンションセンター 2016 年 10 月 24 日

新垣理恵子、山田耕一、牛尾綾、黒澤実愛、大塚邦紘、齋藤雅子、常松貴明、工藤保誠、石丸直澄: Immunological and toxicological effect of multi-wall carbon nanotubes by whole body inhalation exposure in B6 mice. 第 45 回日本免疫学会総会学術集会、2016 年 12 月 沖繩

齋藤雅子、大塚邦紘、新垣理恵子、山田耕一、石丸直澄: Toxicological effect of peritoneal exposure to multi-walled carbon nanotubes on immune system. 第 45 回日本免疫学会総会学術集会、2016 年 12 月 沖繩

Kobayashi N, Tanaka S, Ikarashi Y, Hirose A., Developmental toxicity assessment of various sizes of multiwall carbon nanotubes in mice after repeated intratracheal instillation to initiate grouping and read across. Society of Risk Analysis 2016 Annual Meeting. San Diego, U.S.A., Dec 11-15, 2016.

北條幹、坂本義光、山本行男、長谷川悠子、多田幸恵、湯澤勝廣、広瀬明彦、猪又明子、中江大: 多層カーボンナノチューブによるラット中皮腫誘発過程の経時的観察. 第 33 回日本毒性病理

学会学術集会(2017 年 1 月 26 日~27 日)堺市
坂本 義光, 北條 幹, 広瀬 明彦, 猪又 明子, 中江 大: ラットにおける多層カーボンナノチューブ (CNT) の発がん性と phenyl N -tert-butyl nitron (PBN) 併用が及ぼす影響. 第 33 回日本毒性病理学会学術集会(2017 年 1 月 26 日~27 日)堺市

寺田央子、加藤雄大、橋口誠子、権藤喜貴、広瀬明彦、宮内亜宜、明石 敏、吉田裕樹、杉田千泰、黒川昌彦、渡辺 渡 チタン酸カリウム曝露の RSV 肺炎への影響 日本薬学会第 137 年会、27PB-am155、 2017 年 3 月、仙台国際センター

渡辺 渡、権藤喜貴、橋口誠子、加藤雄大、広瀬明彦、宮内亜宜、明石 敏、吉田裕樹、杉田千泰、黒川昌彦 多層型カーボンナノチューブ曝露による RSV 感染初期応答への影響 日本薬学会第 137 年会、27PB-am154、 2017 年 3 月、仙台国際センター

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

菅野純、高橋祐次、「高分散性ナノマテリアルの調製方法」、特願 2012-158343、登録番号: 第 6051427 号(2016.12.9)

2. 実用新案登録 (該当なし)

3. その他

ISO TC 229/SC /WG 3

Nanotechnologies- Aerosol generation for NOAA (nano-objects and their aggregates and agglomerates) air exposure studies. 6.5 Liquid Phase Filtration/Dispersion – Critical Point Drying (Tertiary Butyl Alcohol Sublimation) and Direct Injection System for whole body inhalation studies

平成 28 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及び遅発毒性評価手法の開発に関する研究
(H27-化学-指定-004)

分担研究課題名：ナノマテリアルの慢性影響指標の開発に関する研究

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

研究分担者： 高橋 祐次 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 室長

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

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。多層カーボンナノチューブ（MWCNT）の中皮腫誘発のポテンシャルに限っては、その粒子のサイズと形状が類似するアスベスト及び人工的繊維状代替物の発がん性評価に用いられた腹腔内投与試験系による比較的短期の試験により発がん性のハザード評価が可能であった。しかしながら、新規ナノマテリアルについては、たとえ原材料の毒性情報があったとしても、そのナノサイズによる毒性を評価し得る情報は一般的には存在せず、従って、ハザード評価や毒性発現メカニズムの想定は困難である。このような状況に於いては、毒性未知の物質を取り扱う基本的な戦略を適用する事で、見落としのない毒性評価を実施する必要がある。具体的には、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同定、メカニズム同定、及び用量作用情報の取得を行い、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必要がある。

研究分担者らは、上記の毒性試験を実施する際のナノマテリアル特有の問題点を解決する目的で、今までの諸研究からその物性や毒性の情報が利用可能な MWNT-7 (Mitsui) をモデル物質として、高度分散法（Taquann 法）及び、それをエアロゾル化するカートリッジ直噴式ダスト発生装置を独自開発した（Taquann 直噴全身吸入装置）。本装置により、より一般的なナノマテリアルの高分散検体を比較的容易（従来の粉体吸入試験法の適用に比較して）に、マウス（ラットも原理的に可能である）に全身暴露吸入する目途が立った。

本研究では、サイズ、形状、組成が多彩で、異なった物理化学的特性を有する未検討の各種ナノマテリアル検体へ Taquann 法及び直噴全身吸入装置を

適用する際の具体的な微調整法を確立し、吸入毒性が評価可能であることを示すことを目的とする。本年度は、①マウスを用いたチタン酸カリウムの 5 日間反復全身曝露吸入実験、②Taquann 法による二層カーボンナノチューブ (DWCNT、岡山大学 林靖彦先生からの寄贈) のエアロゾル化の検討を行った。

昨年度の研究において、チタン酸カリウムは、MWNT-7 の条件で分散には問題はなかったが、MWNT-7 に比較して太く短く比重が大きいことから沈降速度が高く、同条件ではエアロゾル濃度を安定的に維持することが困難であることが判明した。本年度はより短間隔で直噴操作を行うプロトコルに変更し安定した濃度が得られた。5 日間反復全身曝露吸入実験を実施し、平均質量濃度は 4.1 mg/m^3 、平均 CPC カウントは $7,575/\text{cm}^3$ 、マウスの肺負荷量 (右肺) の平均値は $10.0 \mu\text{g}$ であった。DWCNT については、繊維長 $15 \mu\text{m}$ の検体についてエアロゾル化の検討を行い、Taquann 直噴全身吸入装置によりエアロゾル化が可能であったが、エアロゾルの粒子の中には束状の DWCNT が含まれており、分散化処理に更なる検討が必要であることが判明した。

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。多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の中皮腫誘発のポテンシャルに限っては、その粒子サイズから予測される毒性発現メカニズムにより、アスベスト及び人工的繊維状代替物の発がん性評価に用いられた腹腔内投与試験系によるハザード評価が可能であった¹⁻³⁾。しかしながら、新規ナノマテリアルの多くについては事前に毒性情報は存在せず、毒性発現メカニズムの予測も困難である。このような状況に対しては、ヒトの暴露経路に即した動物実験によりハザード及びメカニズム同定、用量作用関係を明らかにし、ヒトに対する毒性の推定と用量相関性の推定を行う手法

が有効である。ヒトがナノマテリアルに暴露される際の重要な侵入経路はそのエアロゾルの吸入である。従来、粉体の吸入曝露実験施設では、検体の特性に応じてエアロゾルを発生させる装置を新たに開発するか、大幅に改造する必要がある、時間と費用を要することが知られている。加えて、ナノマテリアルは容易に凝集する性質を有することから、ヒトが吸入可能な分散状態のエアロゾル化には、更なる技術開発や工夫が必要となることが多い。

研究分担者らは、MWCNT をモデル物質としながら、汎用性が高いシステムを目指して、高度分散法 (Taquann 法) 及び、それをエアロゾル化するカートリッジ直噴式ダスト発生装置を独自開発した (Taquann 直噴全身吸入装置)⁴⁾。本装置により多層カーボンナノチューブ MWNT-7 の場合、凝集体・凝固体をほぼ除去した高分散検体をマウスに全身曝露吸入することが可能となった。この

システムの汎用性を確認するためにより広範な物理化学的特性を示すナノマテリアルへの適用を検討するため、本分担研究では、チタン酸カリウム及び二層カーボンナノチューブ（DWCNT）を対象に研究を進めている。

チタン酸カリウムは $K_2O \cdot 8TiO_2$ 、または $K_2O \cdot 6TiO_2$ で示される化合物でアスベスト代替繊維としてプラスチック等の補強材、自動車用ブレーキの摩擦調整剤、精密フィルターなどに産業応用されている。チタン酸カリウムはラット腹腔内投与実験により、中皮腫発癌を誘発することが報告されている⁵⁾。本研究では $K_2O \cdot 8TiO_2$ を検体として使用した。

DWCNT は岡山大学 林靖彦教授が開発したものを用いた。これは繊維長が極めて均一となる製法を用いたものである。

B. 研究方法

B-1. チタン酸カリウムのマウスを用いた5日間反復全身曝露吸入実験

(1) 動物

C57BL/6NcrSLC（日本エスエルシー株式会社）雄性マウス12週齢を使用した。このマウスは当研究部において、MWCNTを含めてナノマテリアルの吸入曝露実験に使用した実績がある。個体識別は耳パンチにより行った。

(2) 飼育条件

ポリカーボネイト製のケージに紙製の床敷を使用し、1ケージ当り4匹のマウスを収容した。ケージラックはケミカルセーフティ対応のケ

ージ個別換気式飼育装置（商品名：VIC システム、ダイダン株式会社）を使用した。飼育条件は、温度； $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度； $55 \pm 5\%$ 、換気回数；約20回/h、照明時間；8時～20時点灯（照明明暗サイクル12時間）とし、固型飼料CRF-1（オリエンタル酵母工業株式会社）を自由摂取させ、飲水は市水をフィルター濾過し自動給水装置により自由摂取させた。

(3) 群構成

対照群、および、チタン酸カリウム曝露群（目標濃度 5 mg/m^3 ）の2群構成とした。各群16匹のマウスを使用し、1日2時間（10:00～12:00）の吸入曝露を5日間連続で行い、合計10時間の曝露を行った。チタン酸カリウムの曝露濃度は、これまで実験を行ってきた 2 mg/m^3 の MWNT-7 と繊維数を合わせた濃度とした。Taquann 法処理した MWNT-7 の繊維数は、 3.0×10^6 本/ μg 、チタン酸カリウムは 1.2×10^6 本/ μg であり、単位重量当りの本数は MWNT-7 が 2.5 倍多いことから、本研究では、その 2.5 倍となる 5 mg/m^3 を目標濃度とした。

(4) チタン酸カリウムの高分散化処理

チタン酸カリウム ($K_2O \cdot 8TiO_2$)（大塚化学（株）より供与）は、高アスペクト比の繊維状粒子である。凝集体・凝固体を含まない高度に分散した検体を得るため、先行研究で開発した Taquann 法処理¹⁾を行った（特許取得済み）。具体的には検体を第三級ブチルアルコール（TB、融点； 25.69°C 、関東化学株式会社 特

級)に混合して、懸濁液を調製し、金属製フィルター(セイシン企業、目開き25 μm)でろ過し大型の凝集体を除くとともに、分散を図り、ろ液を直ちに液体窒素で凍結・固化させる。固相状態のろ液を溶媒回収型真空ポンプにより減圧し、液相を介さずに昇華させ、TBを分離除去することで、分散性の保たれた乾燥状態の検体を得られる。チタン酸カリウムは、超音波処理によって良好な懸濁液が得られるため、ろ過工程を省いた。ガラス製ボトルを用いて25 mgの検体を500 mLのTBと混合後、超音波浴槽(SU-3TH、出力40W、発振周波数34kHz、柴田科学)により超音波を5分間照射して懸濁液とし、後述する金属製カートリッジに分注し、直ちに液体窒素で凍結・固化させた。固相状態のろ液を溶媒回収型真空ポンプ(Vacuubrand、MD4CNT+AK+EK)により減圧してTBを昇華させて除去し乾燥検体を得た。

(5) ダスト発生装置

Taquann処理検体のエアロゾル化には、既設のTaquann直噴全身吸入装置Ver2.5を使用した(共同開発柴田科学株式会社)⁴⁾(図1)。

この装置は、検体を充填する金属製カートリッジ、圧縮空気をカートリッジに噴射する噴射装置、及び、噴射した検体を気相に分散させるサブチャンバーから構成される。カートリッジ(容量:23.5 mL、内寸:直径22 mm 高さ65 mm)はステンレス製で、円筒状胴体、4つの噴出

孔を有するキャップ部及び台座部から構成される。台座の中心には圧縮空気を注入するオリフィスと内容の流出を防ぐチェックバルブが装着されている。

カートリッジへの検体の充填は、Taquann分散処理を施した検体を所定の濃度でTBに再懸濁し、各カートリッジに懸濁液10 mLを分注して液体窒素で固化させた後、デシケーターに格納して溶媒回収型ポンプでTBを昇華除去することで達成した。本研究では、0.05 mg/mLの濃度に再懸濁し、0.5 mg/カートリッジを用意した。

噴射装置は、サブチャンバー(容量:32 L)に接続されている。噴射に伴う圧力上昇を減じるため、サブチャンバーから上方に煙突状のダクトを設け、その上部にはポリエチレン製の袋で覆ったULPAフィルターを接続した。“煙突”上部から加湿したキャリアエアを一定の流量で送り込み、噴射された検体は煙突内に逆流した検体を含め、サブチャンバー内で効果的に分散された後、希釈されつつ接続パイプを通して暴露チャンバーに導く構造とした。

噴射装置からカートリッジへの圧縮空気の供給圧力は0.4 Mpa、噴射時間は0.2秒、1カートリッジ当たり5回の噴射を行った。暴露チャンバーの総換気流量は約13 L/min(基礎換気流量;10 L/min、エアロゾルモニター用サンプリング(CPC);1.5 L/min、質量濃度測定;1.5 L/min)と設定した。

目標濃度に速やかに到達させるため、暴露開始時に2本を1分間隔で噴射した。その後は濃度を監視しつつ4分間隔で噴射し、設定濃度を維持した。2時間の吸入曝露実験において、合計32本のカートリッジを使用した。

(6) 暴露チャンバー

動物を収容し検体を暴露する暴露チャンバーは、先行研究において独自に開発したものをを使用した。(共同開発 柴田科学株式会社)。動物は、チャンバーの蓋から吊りしたステンレス金網製のケージに個別に収容する。マウスは最大16匹収容が可能である。暴露チャンバーはアクリル製のアウトターチャンバーと柔軟な導電性樹脂で作製したインナーチャンバーの2重構造となっている。インナーチャンバーは、直径550 mm、高さ550 mm、気積105.5 Lである。検体が触れるインナーチャンバーは交換可能であり、検体の変更に容易に対応できるシステムとなっている(特許取得済)。

(7) 暴露チャンバー内のエアロゾル濃度測定

暴露チャンバー内のチタン酸カリウムの濃度のモニタリングは、相対濃度(CPM; count per minutes)と質量濃度(mg/m^3)測定を並行して行った。

相対濃度測定は、対応濃度 3×10^5 個/mL、2.5 nmの粒径が測定可能な凝縮粒子計数装置(Condensation

Particle Counter ; CPC、CPC3776、サンプリング流量: 1.5 L/min、TSI、MN、USA)を用いた。この情報はリアルタイムに得られることからエアロゾルの濃度コントロールに使用した。

質量濃度測定は、ローポリウムサンプラー(080050-155、 $\phi 55$ mmろ紙ホルダー、柴田科学)にフッ素樹脂処理ガラス繊維フィルター(Model T60A20、 $\phi 55$ mm、捕集効率(DOP 0.3 μm): 96.4%、東京ダイレック)を装着し、サンプリングポンプ(Asbestos sampling pump AIP-105、柴田科学)に接続して1.5 L/minの流量で暴露時間の2時間を通してエアロゾルを吸引しフィルターに検体を捕集した。ろ過捕集後のフィルターの重量から予め秤量したフィルターの重量を差し引いた値を検体の重量とし、吸引空気量 $1.5 \text{ L}/\text{min} \times 120 \text{ min} = 180 \text{ L}$ から 1 m^3 当りの質量濃度を算出した。フィルターの秤量にはマイクロ天秤(XP26V、METTLER TOLEDO)を使用した。

暴露チャンバー内の温度、湿度を暴露時間の2時間を通してモニタリングした。

(8) 解剖

5日間の反復吸入曝露終了後、各群3匹のマウスを解剖した。これらのマウスの右肺は肺に沈着したチタン酸カリウムの測定用とし、左肺は病理組織評価用とした。

マウスは吸入曝露終了直後にペントバルビタールナトリウム(ソム

ノペンチル；共立製薬株式会社）を腹腔内投与し、麻酔下で腋窩動脈より放血致死後に解剖した。肺は気道内のチタン酸カリウム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、開胸前に気管を喉頭軟骨部で結紮して肺の虚脱を防止し、腹大動脈及び腹大静脈を切断して解放後、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（流量は点滴調節器により適宜調節）により注入し血液を除去した。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、右肺を切り出し重量測定し凍結保存した。左肺は、同組成固定液に浸漬固定を行った。

(9) 肺沈着量測定

右肺をアルカリ溶解し、チタン酸カリウムを遠心分離により回収して肺沈着量の測定を行った。肺溶解液は5w/v%水酸化カリウム（和光純薬工業株式会社、試薬特級）に、0.1w/v% SDS（和光純薬工業株式会社、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（和光純薬工業株式会社、試薬特級）を加えた組成である。各試薬はMilliQ水に混合後、80℃で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。

マウス右肺（100～150 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。可能な限り酸素を除去するため、デシケーター内で肺の脱気を行った後、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80℃に設定したインキュベーター内で48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℃、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（和光純薬工業）を添加し、ボルテックスを用いて溶解して再び20,000×g、25℃、60分の条件で遠心分離して沈渣を回収した。マイクロチューブをインキュベーター内で50℃の条件で加熱しエタノールを除去後、0.1w/v% TritonX（ICN）100 μL又は50μLに沈渣を分散しチタン酸カリウム懸濁液とした。

アルミナフィルター（Anodisc、孔径0.02 μm、φ12mm、ワットマン）をロート型ガラス濾過器（51G-1、三商）に載せ、ピペッティングにより十分に分散させたMWCNT懸濁液1 μLをアルミナフィルター上に滴下し吸引濾過した。フィルターを室

温で乾燥し、真鍮製SEM観察台（S-GA、φ15×5 mm、日新EM）にカーボンシール（φ12 mm、日新EM）で固定した。オスミウムコーター（HPC-1 SW型、真空デバイス）により5秒間処理を行い走査型顕微鏡（VE-9800、KEYENCE）で2,500倍、加速電圧2～2.8 kVの条件で観察した。観察はフィルターの直径に沿って行った。MWCNTの繊維長と数の計測をImageJ（<http://rsbweb.nih.gov/ij/>）を用いて行った。

肺に含まれるMWCNT繊維の本数（ C_t ）は、MWCNT懸濁液の調製量（100 μ L、 V ）、1 μ LのMWCNT懸濁液がフィルターに展開した面積（ S_t ）、計測した繊維数（ C ）、繊維数を計測した視野の面積（ S_c ）を基に以下の式で計算した。

$$C_t = C \times \frac{S_t}{S_c} \times V$$

計測した1視野当たりの面積は、1,818 μ m²（49.23×36.92 μ m）、1サンプル当たり500本以上の繊維数又は30以上の視野を観察した。なお、視野の辺縁に存在し、全長が確認できない繊維については計測対象から除外した。

並行して、無処置の肺にSDSに懸濁した1及び10 μ gチタン酸カリウムを添加した検体を用意して同様に計測を行い、チタン酸カリウムの回収率を求めた。

B-2. DWCNTの分散化処理とエアロゾル化の検討

本研究に用いたDWCNTの性状は以下の通りである。本検体は、シリコン基板（20 mm×20 mm）の上に垂直に一定の長さでDWCNTが合成されている。

- Length : 5、10、15 μ m
- Diameter : 1～3 nm
- Density : N/A
- Purity : >99wt% as CNTs
- Impurity: Iron
- Surface Morphology: High crystalline
- Substrate: Si with iron coating

本年度入手したサンプルは、5、10、及び15 μ mの長さのDWCNTが乗った20 mm×20 mmの基板、各1枚ずつである。そのため、TB懸濁液は先行研究で用いた条件（40W×15分の超音波処理）で作成した。15 μ mの検体についてのみ、Taquann直噴全身吸入装置Ver2.0を使用してエアロゾル化の検討を行った。

シリコン基板表面からDWCNTを剥離回収する方法として、剃刀を用いてそぎ取る方法を用いた。15 μ mの検体については、得られた検体量は610 μ gであった。この検体を30 mLのTBと混合し、超音波洗浄器（SU-3TH、出力40W、発振周波数34kHz、柴田科学株式会社）にて15分間の分散処理を行った。検体量が限られていることから、ろ過過程を省き、懸濁液を金属製カートリッジに10 mLの容量で分注した。エアロゾルの測定項目はCPCによる相対

濃度測定とエアロゾルの捕集による形状確認とした。

暴露チャンバー内のエアロゾル化した粒子の形状を把握するため、サンプリングポンプ（Asbestos sampling pump AIP-105、柴田科学）で3 L/minの流量で5分間吸引し、エアロゾルを酸化アルミニウム製のフィルター（Anodisc 25、φ21 mm、孔径0.1 μm、ワットマン）に吸着させた。フィルターホルダーはステンレス製のオープンフェイス型（柴田科学特注品）を用いた。フィルターにオスミウムコーター（HPC-1SW、真空デバイス）で5秒間の処理を行って走査型電子顕微鏡（VE-9800、キーエンス）で観察した。

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、当研究所の専用特殊実験施設内で、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。

C. 研究結果

C-1. チタン酸カリウムのマウスを用いた5日間反復全身曝露吸入実験

(1) チタン酸カリウムの吸入曝露実験
チタン酸カリウムの5日間反復全身曝露吸入実験の平均質量濃度は $4.1 \pm 0.8 \text{ mg/m}^3$ 、平均CPCカウントは $7,575 \pm 883/\text{cm}^3$ であった（表1）。直噴操作間隔を4分間にすることで、濃

度安定性が得られた（図2）。

(2) マウスの肺負荷量（右肺）

3匹のマウスから得られた右肺の平均肺沈着量は $10.0 \mu\text{g}$ であった。肺の湿重量から動物一匹当たりの沈着量に換算すると、 $15.0 \mu\text{g}/\text{動物}$ であり、繊維数に換算すると 18.0×10^6 本/動物であった。

肺に沈着した繊維長の平均値は $4.2 \pm 3.5 \mu\text{m}$ （ $N=1,563$ ）、最長は $36.8 \mu\text{m}$ であった（図3）。

C-2. DWCNTの分散化処理とエアロゾル化の検討

(1) TBへの分散化処理

DWCNTは20mm×20mmのシリコン基板表面に付着した状態で供給された（図4）。本研究で検討した条件において、DWCNTの懸濁液は微細な凝集体が目視できる状態であり、懸濁液が均一に黒色となる良好な懸濁液を得ることができなかった（図5）。懸濁液中のDWCNTを走査型顕微鏡で観察したところ、繊維が束となった状態の粒子が観察された（図6）。一部の繊維がほぐれている状態の像も観察されたが、複数の繊維が束になった状態であり、一次粒子まで分離はされていないものと考えられた。

(2) エアロゾル化の検討

Taquann直噴全身吸入装置 Ver2.0によりDWCNTのエアロゾル発生は可能であった。200 μg/カートリッジを3本噴射することによって、CPCのカウントは最大 $215/\text{cm}^3$ の値が得られた（図7）。

エアロゾル化したDWCNTの形状を

走査型電子顕微鏡で観察したところ、単離した繊維状のエアロゾルが観察されたが、100～300 nm 程度の繊維径であることから、100 本程度の DWCNT 単繊維が束状になったエアロゾルと考えられた (図 8)。

D. 考察

本年度は、マウスを用いたチタン酸カリウムの全身曝露吸入実験と、DWCNT の全身曝露吸入実験の準備として Taquann 法による DWCNT の分散処理とエアロゾル化の検討を実施した。

チタン酸カリウムは繊維状であり、本研究で使用した検体は、昨年度の研究結果により、繊維長及び繊維径の平均値は、それぞれ $4.5 \pm 3.9 \mu\text{m}$ (最大長 $27.9 \mu\text{m}$)、 $283 \pm 171 \text{ nm}$ 、(最大径 $1,743 \text{ nm}$)、単位重量当たりの繊維数は、 1.2×10^6 本/ μg である。これらの値はこれまで研究分担者らが吸入曝露の検討を行ってきた MWCNT (MWNT-7、平均長約 $8 \mu\text{m}$ 、平均径約 100 nm 、 3×10^6 本/ μg) に比較すると、太く短い形状であり、単位重量当たりの繊維数は少ない。また、比重が大きく (MWNT-7 ; $1.9\text{-}2.1^{6)}$ 、チタン酸カリウム ; $3.3\sim 3.5^{7)}$ 、沈降が速いことがエアロゾル濃度を不安定にする原因と考えられた。そのため、本年度は 4 分間隔と MWNT-7 より短い間隔で検体を噴射することでこれを解決した。しかしながら、現在保有しているカートリッジ数では 2 用量の曝露に対応できなかったため、チタン酸カリウム曝露群は 16 匹×1 用量のみとした。

チャンバー内の濃度は前年度の検討結果に比較して安定したが、日間変動は大きく、また、質量濃度に関しては $3.0\sim 4.9 \text{ mg/m}^3$ と目標濃度の 5 mg/m^3 を下回った。CPC カ

ウントに関しては $6,355\sim 8,523/\text{cm}^3$ の範囲で変動があった。現在のところ、この変動原因については不明である。

3 匹のマウスから得られた右肺の平均肺沈着量は $10.0 \mu\text{g}$ であった。これまでの検討結果及び本研究で並行して測定した無処置群の結果から、右肺の湿重量は全肺の約 67% を占める。この値から動物一匹当たりの沈着量に換算すると、 $15.0 \mu\text{g}$ /動物であり、繊維数に換算すると 18.0×10^6 本/動物であった。研究分担者らは Taquann 法処理した MWNT-7 を 2.3 mg/m^3 、CPC カウント $2,519/\text{cm}^3$ の条件でマウスに 5 日間曝露した際の肺負荷量は $8.2 \mu\text{g}$ /動物、繊維数としては 24.6×10^6 本/動物であることを報告している⁸⁾。本研究結果で得られたチタン酸カリウムの肺沈着量の繊維数は MWNT-7 とほぼ同様な値であり、MWNT-7 と同程度の繊維数を負荷するという目的は達成されたものと評価される。

肺に沈着した繊維長の平均値は $4.2 \pm 3.5 \mu\text{m}$ 、最長は $36.8 \mu\text{m}$ であり、原末と同様の繊維長分布であると考えられた。

今後は、このマウスの長期観察を行い、慢性影響を調べる計画である。

DWCNT については、繊維長 $15 \mu\text{m}$ の検体についてエアロゾル化の検討を行い、Taquann 直噴全身吸入装置 Ver2.0 によりエアロゾル化が可能であったが、エアロゾルの粒子の中には 100 本程度の単繊維が束状となった粒子が含まれていたため、これをさらに分散する処理方法の検討が必要である。本年度は、検体量が微量であったため、分散処理の十分な検討が行えなかった。今後の対応とし

では、①触媒として用いられている鉄を塩酸により除去、②より強力な超音波処理の実施、が考えられる。来年度は量産化により動物実験に十分な量の DWCNT の入手が可能となる計画であるため、上記の条件検討を行い、マウスを用いた全身曝露吸入実験を実施する計画である。

E. 結論

チタン酸カリウムについては、Taquann 法及び直噴全身吸入装置を適用する際の具体的な微調整法を確立し、吸入毒性が評価可能であることを示した。今後、このマウスの長期間観察を行い、慢性影響を調べる計画である。DWCNT については、十分な検体が入手でき次第、吸入曝露実験方法の検討を行う。一方で、Taquann 直噴全身吸入装置は、1mg に満たない検体量であってもエアロゾル化が可能であり、本システムは少量新規の検体について効率的な有害性評価が可能であることが示された。

謝辞：

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

F. 参考文献

1. Takagi A, Hirose A, Nishimura T, Fukumori N, Ogata A, Ohashi N, Kitajima S, Kanno J., Induction of mesothelioma in p53[±] mouse by intraperitoneal application of

multi-wall carbon nanotube., J Toxicol Sci. 2008 Feb;33(1):105-16.

2. Takagi A, Hirose A, Futakuchi M, Tsuda H, Kanno J, Dose-dependent mesothelioma induction by intraperitoneal administration of multi-wall carbon nanotubes in p53 heterozygous mice. Cancer Sci. Aug;103(8):1440-4, 2012

3. Sakamoto Y, Dai N, Hagiwara Y, Satoh K, Ohashi N, Fukamachi K, Tsuda H, Hirose A, Nishimura T, Hino O, Ogata A. Serum level of expressed in renal carcinoma (ERC)/mesothelin in rats with mesothelial proliferative lesions induced by multi-wall carbon nanotube (MWCNT). J Toxicol Sci. 2010 Apr;35(2):265-70.

4. Taquahashi Y, Ogawa Y, Takagi A, Tsuji M, Morita K, Kanno J. Improved dispersion method of multi-wall carbon nanotube for inhalation toxicity studies of experimental animals. J Toxicol Sci. 2013;38(4):619-28.

5. Adachi S, Kawamura K, Takemoto K. A trial on the quantitative risk assessment of man-made mineral fibers by the rat intraperitoneal administration assay using the JFM standard fibrous samples. Ind Health. 2001 Apr;39(2):168-74.

6. 経済産業省、ナノマテリアル情報提供シート、平成 24 年 3 月時点、http://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/files/nanomaterial/120331CNT_5.pdf

7. 大塚化学株式会社
<https://www.otsukac.co.jp/products/chemical/tismo/>

8. Taquahashi Y, Takagi A, Ogawa Y, Morita K, Tsuji M, Imaida K, Jun Kanno, A comparison

of lung burden between pristine and highly-dispersed, aggregate/agglomerate-eliminated MWCNT (Taquann method) in whole body inhalation exposure to mice. J Toxicol Sci. (2016);41 Supplement, S201.

G. 研究発表

1. 論文発表

菅野 純、ナノマテリアル毒性のとりえ方とその難しさ、医学のあゆみ、259 巻 3 号、217-222、2016
高橋祐次、高分散型小型全身曝露吸入システムによるマウス吸入毒性-ヒトの現実的な曝露シナリオに基づいたナノマテリアルの吸入毒性評価の迅速化と効率化に向けて-、医学のあゆみ、259 巻 3 号、234-240、2016

2. 学会発表

高橋祐次、小川幸男、高木篤也、辻昌貴、森田 紘一、今井田 克己、菅野 純、MWCNT のマウス全身曝露吸入における原末と高分散処理検体 (Taquann 法) の肺沈着量の比較、第 34 回日本毒性学会、名古屋、(2016.7.1)、一般演題(口演)
相磯成敏、梅田ゆみ、笠井辰也、妹尾英樹、高信健司、斎藤美佐江、福島昭治、菅野純、MWNT-7 吸入曝露で誘発されたラット肺病変の経時的解析、第 31 回発癌病理研究会(2016.8.23)、長野、口演

Jun Kanno, Nanomaterials safety: Predicting their long-term effects by in vivo studies., The 14th International Nanotech Symposium

& Nano-Convergence Expo (NANO KOREA 2016) (2016.7.14), Korea, 基調講演

Kanno J, Taquahashi Y, Introduction to Nanomaterials safety: Predicting the chronic effects. XIV International Congress of Toxicology (ICT2016) Merida-Mexico, (2016.10.3), Symposium

Yuhji Taquahashi, Atsuya Takagi, Yukio Ogawa, Koichi Morita, Masaki Tsuji, Katsumi Imaida, Jun Kanno, Level of dispersion of MWCNT aerosol affects the lung burden and lung lesion in whole body inhalation study, XIV International Congress of Toxicology Merida-Mexico, (2016.10.5), Oral

Jun Kanno, Yuhji Taquahashi, Atsuya Takagi, Masaki Tsuji, Koichi Morita, Yukio Ogawa, Shigetoshi Aiso, Yumi Umeda, Tatsuya Kasai, Hideki Senoh, Kenji Takanobu, Misae Saito, Shoji Fukushima, Nanomaterials safety: Predicting their long-term effects by in vivo studies., Inhalation Toxicity Test Advisory Council, Korea Occupational Safety and Health Agency (KOSHA). Seoul, Korea, Invited

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

菅野純、高橋祐次、「高分散性ナノマ

「テリアル調製方法」、特願
2012-158343、登録番号：第 6051427
号(2016.12.9)

2. 実用新案登録
なし

3. その他

ISO TC 229/SC /WG 3

Nanotechnologies- Aerosol generation

for NOAA (nano-objects and their
aggregates and agglomerates) air
exposure studies. 6.5 Liquid Phase
Filtration/Dispersion – Critical Point
Drying (Tertiary Butyl Alcohol
Sublimation) and Direct Injection
System for whole body inhalation
studies

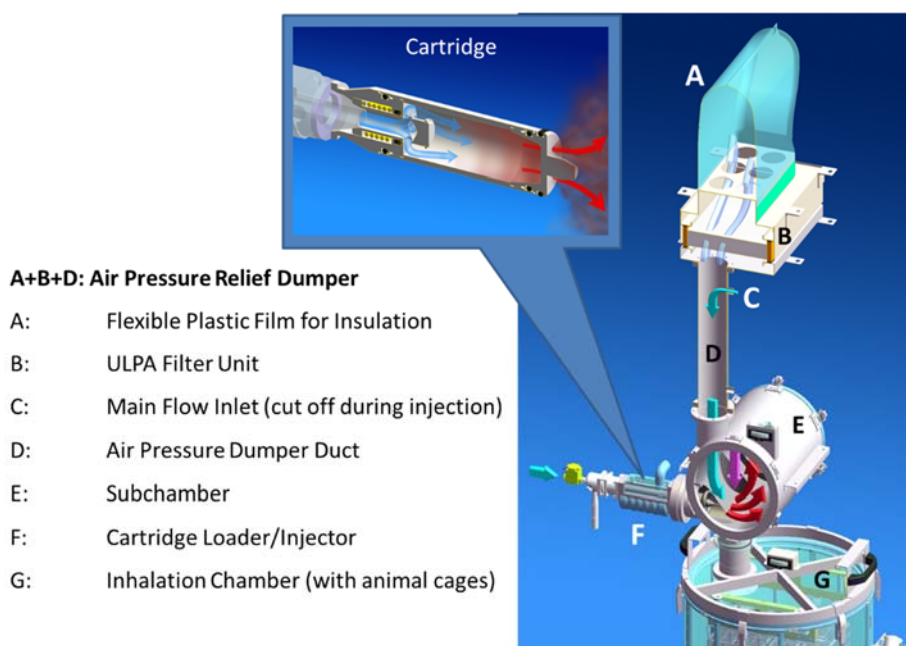


図1 Taquann Direct-Injection Whole Body Inhalation System version 2.5

チタン酸カリウムのアεροゾル化には、既設の Taquann 直噴全身吸入装置 Ver2.5を使用した(共同開発 柴田科学株式会社)

表1. チタン酸カリウムの吸入曝露実験におけるチャンバー内のエアロゾル濃度

	1st	2nd	3rd	4th	5th	Average	SD
Mass Concentration (mg/m ³)	3.0	3.8	3.8	4.9	4.9	4.1	0.8
CPC Average(0-120min, #/cm ³)	8,523	7,048	8,232	6,355	7,718	7575	883
Max.	12,876	9,906	11,292	8,828	10,920		

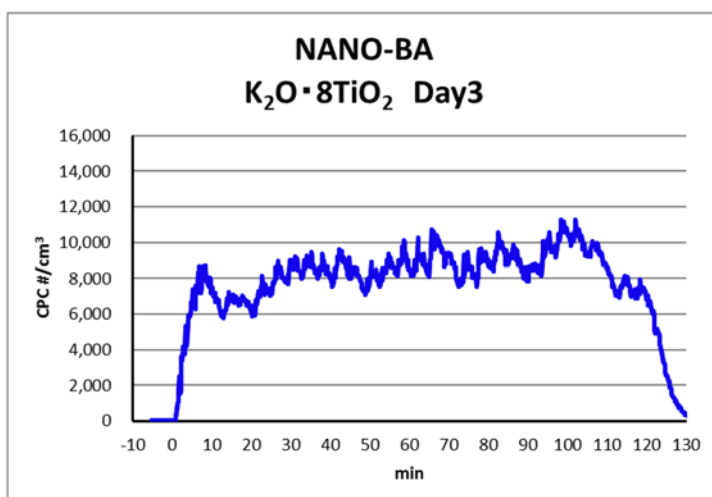
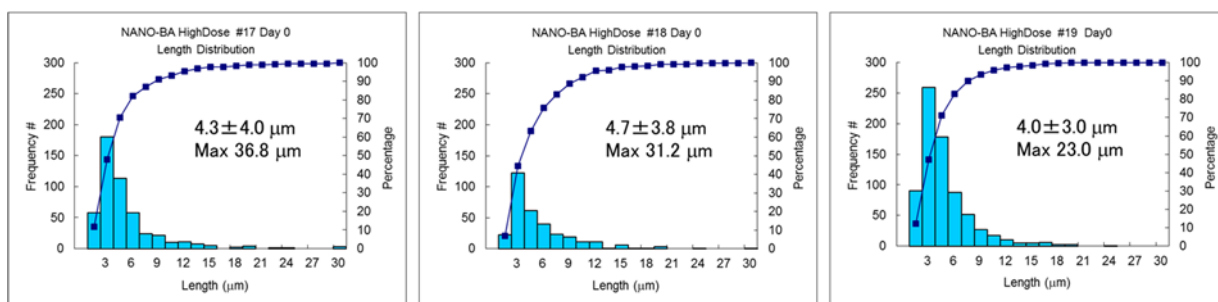


図2 チタン酸カリウムのチャンバー内CPCカウント推移

チタン酸カリウムのカートリッジからの直噴操作間隔を4分間にする事で、濃度安定性が得られた。



Lung Burden (Right) 9.8 μg
 Lung weight (Right) 152 mg
 Lung Burden (total, calculated) 14.7 μg
 N=498

Lung Burden (Right) 6.6 μg
 Lung weight (Right) 103 mg
 Lung Burden (total, calculated) 9.9 μg
 N= 323

Lung Burden (Right) 13.6 μg
 Lung weight (Right) 100 mg
 Lung Burden (total, calculated) 20.5 μg
 N=742

Mean Lung Burden (Right) 10.0 μg
Mean Lung Burden (total, calculated) 15.0 μg
Number of Fibers (total, calculated) 24.6 x 10⁶

図3 チタン酸カリウムの肺負荷量

3匹のマウスから得られた右肺の平均肺沈着量は10.0 μgであった。肺の湿重量から動物一匹当たりの沈着量に換算すると、15.0 μg/動物であり、繊維数に換算すると18.0 × 10⁶本/動物であった。

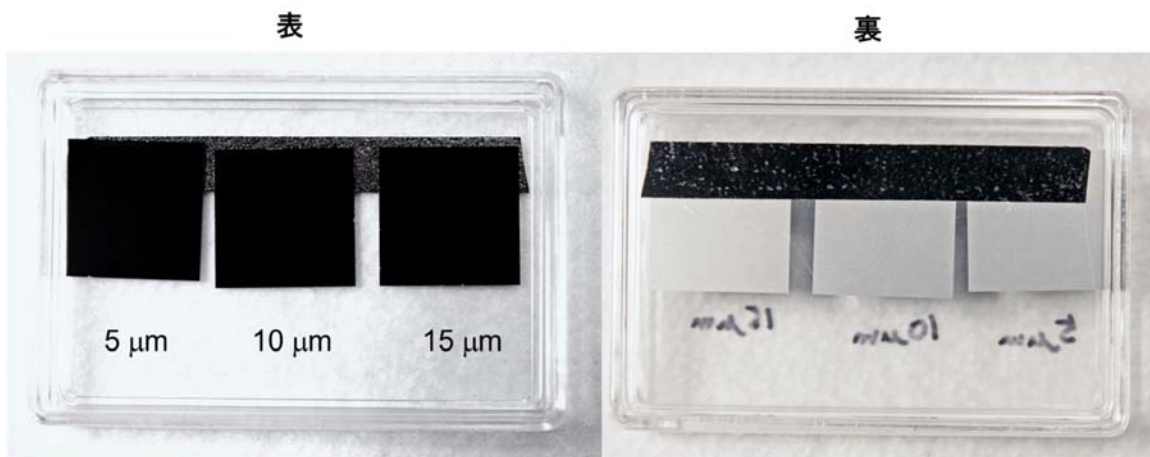


図4 DWCNT サンプルの外観



図5. DWCNT の懸濁液の外観

DWCNT を第三級ブチルアルコールに混合し、超音波洗浄器(SU-3TH、出力 40W、発信周波数 34kHz、柴田科学株式会社)に 15 分静置して分散させた。本条件では、良好な懸濁状態が得られなかった。

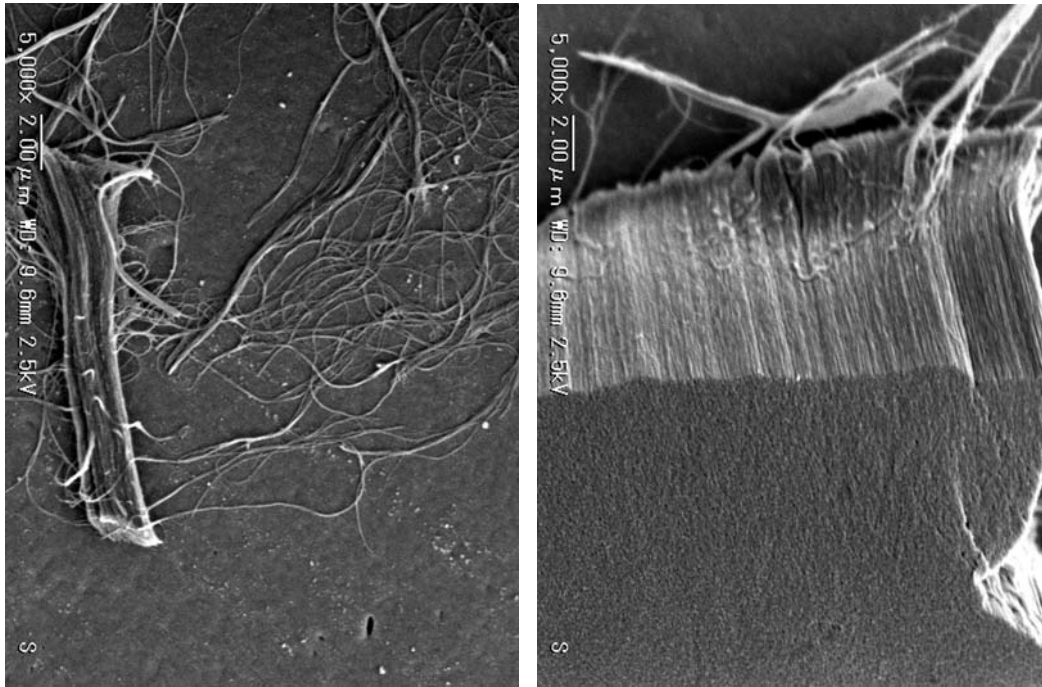
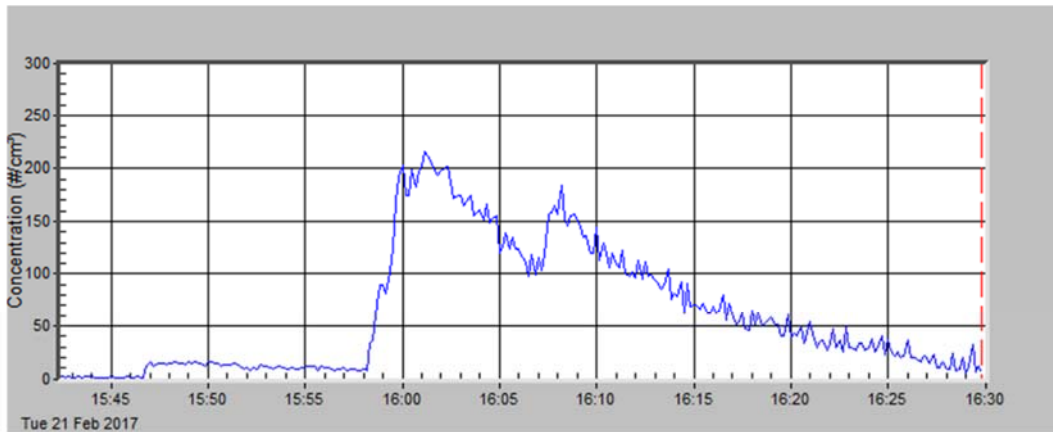


図 6. 懸濁液中の DWCNT の走査型電子顕微鏡像

懸濁液中の DWCNT を走査型顕微鏡で観察したところ、繊維が束となった状態の粒子が観察された。一部の繊維がほぐれている状態も観察されたが、複数の繊維が束になった状態であり、一次粒子まで分離はされていないものと考えられた。



CPC TSI Model 3778
 sampling: 1.5LPM
 Dilution: off
 CPC count Max: 215 /cm³

図 7. 暴露チャンバー内の DWCNT (15μm) CPC データ

Taquann 直噴全身吸入装置 Ver2.0 により DWCNT のエアロゾル発生は可能であった。200 μg/カートリッジを 3 本噴射することによって、CPC のカウントは最大 215/cm³ の値が得られた。

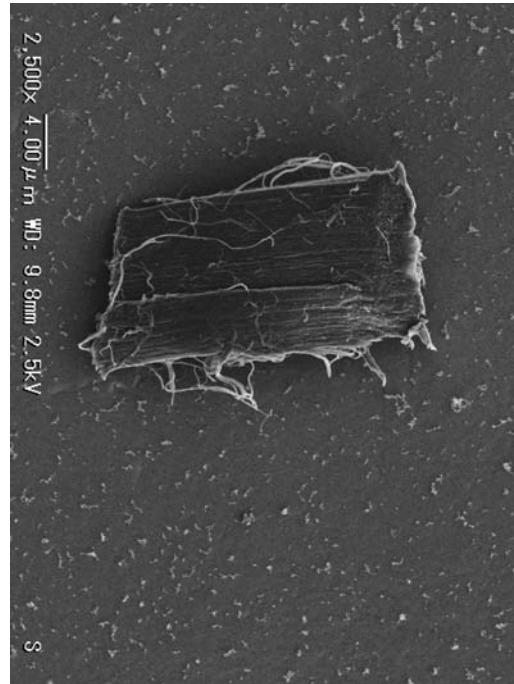


図 8.DWCNT のエアロゾルの形状

エアロゾル化したDWCNTの形状を走査型電子顕微鏡で観察したところ、単離した繊維状のエアロゾルが観察されたが、100～300 nm程度の繊維径であることから、100本程度のDWCNT単繊維が束状になった粒子と考えられた。

平成28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

分担研究課題名：ナノマテリアルの発がん性評価手法の開発に関する研究

研究分担者：津田 洋幸 名古屋市立大学特任教授

研究協力者：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

研究要旨

目的:我々が開発したナノマテリアルの経気管肺内噴霧投与(TIPS法)による簡易 *in vivo* 毒性評価法を用いて、1) 無コーティング・アナターゼ型二酸化チタニウム(球状・直径6nm)(an)とコーティング・ルチル型二酸化チタニウム(長球形・直径10-20 μ m)(ru)、およびチタン酸カリウム($K_2O \cdot 8TiO_2$)(線維状・平均長6.0 μ m、直径305nm)(POT)の肺と胸膜における炎症と障害作用、細胞増殖刺激作用の解析を行った。方法: F344系雌ラットを用い検体を500 μ g/mL濃度にて0.5%PF68分散剤添加生食(PF68 saline)に懸濁して、15日間に8回投与し(計1mg/ラット)、最終投与6時間および4週後に屠殺した。投与物質は予めTaquann法にてエアロゾル分散後にtert-ブチルアルコール(TBA)に溶解し氷結保存した。これを使用直前に凍結乾燥させてPF68 salineに懸濁して使用した。麻酔下に脱血致死させて、胸腔洗浄液(PLF)と細胞ペレットを採取し、右肺より肺胞洗浄液(BALF)、および肺組織を採取して、炎症サイトカイン値、炎症の状態、肺胞上皮と臓側胸膜中皮の増殖について解析した。左肺は凍結保存しCCL種についてRT-PCRとELISA解析をした。対照は無処置およびPF68 saline群とした。結果:肺では6hではすべての群にM ϕ 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。以上から、POTでは肺胞と胸腔炎症、肺胞細胞と胸膜中皮増殖刺激がより強く持続することが判った。結論: an、ruおよびPOTは肺胞に多数のM ϕ を見る異物炎症を誘導し、POTでは4wでも粒子TiO₂よりも顕著であったことから、POTについて発がん性を視野に入れた長期実験が必要である。

A. 研究目的

二酸化チタニウム (TiO₂) 粒子は塗料・化粧品の材料として広く利用されている。WHO 国際がん研究機関 (IARC) は、ナノサイズを含む TiO₂ 粒子をラットに吸入曝露した場合に肺発がん性を示すことから Group 2B (動物において発がん性を示す十分な証拠がある) と評価している。鉱物として製錬された TiO₂ 粒子は製造過程で熱処理によりアナターゼ型、ルチル型およびブルカイト型に分けられている。このうち、光触媒活性の強いアナターゼ型 (an) は主として外壁塗料や白色色素として、ルチル型 (ru) は化粧品等に用いられている。我々はこれまでに、ラットにおいて非コーティング ru には肺発がんプロモーション作用がみられ、その機序には ru を貪食した Mφ の産生するラジカルおよび分泌される炎症性タンパク (CCL3) による細胞増殖誘導作用が関与する事を明らかにしてきた (Xu, Carcinogenesis, 2010)。一方、an の有害性影響について、光・UV 照射下での知見は乏しい。このために皮膚塗布と肺内 TIPS 投与にて実施してきた有害性研究においては、an (非コーティング、直径 25nm) ru (非コーティング、直径 20nm) について明らかな差異は観察されなかった (Numano, Asian Pacific J Cancer Prevention, 2014)。最近の研究において、繊維状のカーボンナノチューブにはアスベストと似た発がん性を示すものがあることが分かってきた (Kasai, Particle and Fibre Tox, 2015; Suzui, Cancer Sci, 2014)。その機序について、繊維状の形状が発がんに関与するかについては未だ明らかではない。

本研究では、プラスチック等の補強材、自動車用ブレーキの摩擦調整剤、精密フィルターなどに広く用いられている線維状の TiO₂ であるチタン酸カリウム

(K₂O・8TiO₂) (POT) について、球状で直径 6nm のアナターゼ型 TiO₂ (AMT-100) (an) および直径 10-20μm 類球形ルチル型 TiO₂ (ru) との肺と胸腔における障害作用について比較検討し、炎症反応の状態と持続性を明らかにし、長期試験における発がんリスクの可能性を検討した。

B. 研究方法

3種の TiO₂ は日本化粧品工業会より提供された (広瀬明彦主任研究者より提供)。10 週齢 F344 雄ラットを用い、500μg/ml の濃度は無コーティングの an (直径 6nm、AMT-100)、ru (直径 10-20μm) および POT (当研究室による計測にて平均長 6.0 μm、直径 305 nm) について、Taquan 法にてエアロソル分散後 t-ブチルアルコールに溶解氷結し (高橋祐次博士、Taquahashi, J Toxicol Sci., 2013)、使用直前に凍結乾燥させて粉体とした生食中に 0.05% non-ionic, biocompatible amphiphilic block copolymers (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (PF68) を加えた分散媒体に懸濁して 0.5mL (125μg/ラット) を 15 日間に合計 8 回肺内噴霧 (TIPS) 投与した (計 1 mg/ラット)。最終投与の 6 時間後 (6h) および 4 週間後 (4w) に以下の検索を行った (各群 8 匹)。イソフルラン麻酔下に大動脈より採血によって致死させた後に開腹し、腹膜経由で胸腔中に 10ml の RPMI 1640 培養液を注入洗浄後に取り出し、胸腔洗浄液 (PLF) を得た。左肺は経気管的に採取した気管支

肺胞洗浄液 (BALF) について炎症性細胞とくに Mφ の検体貪食の状態と組織障害マーカー (ALP、LDH) の解析を行った。さらに左肺の一部は4%パラホルムアルデヒド注入による固定をして病理標本とした。BALF を採取しない右肺は凍結保存し CCL 種の RT-PCR および ELISA 解析に用いた。

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。

(倫理面への配慮)

動物の飼育は、名古屋市立大学大学院医学研究科 実験動物教育センターで行った。実験計画書は、動物の愛護と使用のガイドラインに則り、名古屋市立大学大学院医学研究科 動物運営委員会の承認を経て行った。

C. 研究結果

1) 組織標本による肺胞上皮と臓側胸膜中皮の増殖の解析：無処置と生食対照群より明らかな炎症細胞浸潤の増強が見られた。6h では肺胞中に検体貪食 Mφ と好中球が主として見られたが、4w では線維化肉芽が多く散見され、肉芽中には検体を貪食した Mφ および好中球、リンパ球を主とする炎症細胞が見られた。肺胞上皮と臓側胸膜中皮の PCNA ラベル率は POT において PF68 生食対照群 (以下対照群) より増加した。

2) 凍結肺における炎症性 CCL サイトカイン種の解析：肺組織における CCL 種の RT-PCR 解析では、POT が 6h と 4w において有意の増加を示した。

3) BALF の解析：4w において ALP 活性は対照より増加し、さらに POT においてより高値であった。LDH では an と POT

において増加した。LDH 活性も an と POT において増加した。

4) PLF と PLF 細胞ペレットの解析：胸腔洗浄液より得た Mφ の初代培養のコンディショナル培養液において、ヒト中皮腫細胞 (Met5A) に対する増殖活性には有意の増加が見られた。PLF 細胞ペレットでは 6h において Mφ と好中球が大多数を占め、4w でリンパ球の割合が増加した。また 6h と 4w のいずれにも偏光顕微鏡で視認される投与検体が検出された。

D. 考察

すでにラットにおいて吸入暴露試験法によって肺発がん性が明らかにされている無コーティング ru (WHO/IARC Group 2B) について、我々の開発したナノ粒子の TIPS 投与による短期毒性リスク評価法を用いて、Mφ の分泌する CCL3 を介する発がん促進作用を見出した (Xu et al., *Carcinogenesis*, 2010)。また、ru を表皮剥離した皮膚に塗布しても障害作用は見られなかった (Xu et al., *Food Chem Toxicol*, 2011 および Sagawa et al., *J Toxicol Sciences*, 2012)。さらに、直径 25nm の an と直径 20nm の ru についても同様の *in vitro* および *in vivo* 試験で比較したが差異はなかった (Numano *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014)。

以上の知見に基づき、光触媒活性がより顕著で、生物毒性がより強力である小さいサイズの 6nm の an と、長球形の ru、および線維状で Mφ に対するストレスがより顕著と考えられている POT を肺内に投与して 2 週後の急性毒性、4 週を経た亜急性毒性について検討した。その結果、検体の肺から胸腔への移動は 6h でも検出

され、炎症は 6h と 4 wとも POT にやや強く、肺胞内における CD68 染色で認識される Mφ の数は、POT で有意の増加をみた。また 6w でも炎症の程度は持続して観察された。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繊維性の POT でより強く誘導されることから、この実験モデルの処置後に長期観察して発がんリスクの有無について検証する必要があると考えられた。

E. 結論

すべての検体において肺から胸腔への移動がみられ、Mφ の数は、肺から胸腔の炎症象は POT により顕著で、さらに肺がん細胞、中皮腫細胞の増殖活性は POT に強く見られた。以上から POT は発癌性について検索を進める必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

津田洋幸 カーボンナノチューブの肺と胸膜中皮に対する毒性と発がん性の簡易評価法, 医学のあゆみ, vol.259 No. 3, 223-227, 2016

Suzui M, Futakuchi M, Fukamachi K, Numano T, Abd Elgied M, Takahashi S, Ohnishi M, Omori T, Tsuruoka S, Hirose A, Kanno J, Sakamoto Y, Alexander DB, Xu J, Tsuda H. Multiwalled carbon nanotubes intratracheally instilled into the rat lung induce development of pleural malignant

mesothelioma and lung tumors. *Cancer Sci*, doi:10.1111/cas. 12954, 2016.

2. 学会発表

津田洋幸、徐結荀、William Alexander, David Alexander, Mohamed AbdelGied, 沼野琢旬、酒々井真澄、二口充、深町勝美、広瀬昭彦、菅野純 機序に基づくナノマテリアルの発がん性評価法の開発, 第43回日本毒性学会学術年会、6月29日、名古屋

(国際学会)

Tsuda H, Xu J, Alexander DB, Alexander WT, Mohamed Abd El-gied, Suzui M, Futakuchi M, Fukamachi K, Numano T, Takahashi S, Ohnishi M, Hirose A, Kanno J, Development of a series of assay model of toxicity and carcinogenicity of carbon nanotubes. 2016 Korean Association for Laboratory Animal Science, 慶州, Korea, Aug. 24-26, 2016

Tsuda H, Alexander DB, Alexander WT, AbdElgied M, ELGazzar A, Xu J, Numano T, Suzui M, Futakuchi M, Fukamachi K, Hirose A, Kanno J, Development of a Mechanism Based Short-term Assay Protocol to Test Carcinogenicity of Multiple Wall Carbon Nanotubes (MWNCTs) in the Rat. XIV International Congress of Toxicology, Merida, Mexico, Oct. 2-6, 2016.

H. 知的財産所有権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

平成 28 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

研究課題名：ナノマテリアル暴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

分担研究課題名：ナノマテリアルの発生毒性評価手法に関する研究

研究分担者：小林 憲弘 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 第三室 室長
研究協力者：広瀬 明彦 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部 部長
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
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

ナノマテリアル暴露によるヒトへの健康影響を総合的に評価するためには、発がん性等の慢性毒性に加えて、生殖・発生毒性等の遅発毒性影響を評価する必要がある。

我々はこれまで、妊娠マウスおよびラットを用いて、MWCNT (MWNT-7) の発生毒性を評価してきた。これまでの試験では、マウスに投与した MWCNT は、全て同じ被験物質を同じ超音波処理方法によって調製した。しかし、同一の被験物質であっても、投与に用いる懸濁液の調製方法によって、形状や凝集状態が異なることから、それに伴い発生毒性も異なることが考えられる。

そこで今年度は、同一試料から調製方法の異なる 4 種類の MWCNT 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考察することとした。

その結果，本試験条件下では，MWCNT のいずれの調製方法（未処理，熱処理，Taquann 処理および Taquann+熱処理）においても，その 4 mg/kg 反復投与（妊娠期間を通じて 16 mg/kg）によって，母動物に対する体重増加抑制または摂餌量減少が認められた。また，熱処理あるいは Taquann+熱処理された MWCNT の投与によって，胎児に発育抑制が認められた。本試験で認められた母動物および胎児に対する影響は，特に熱処理された MWCNT の投与によって顕著に認められた。さらに，熱処理された MWCNT の投与によって，受胎率が低値傾向を示し，妊娠早期（着床または胚の発生）に何らかの影響を及ぼす可能性が示唆された。

なお，本試験の外表検査までの結果において，MWCNT の催奇形性は判断できなかったが，過去実施の試験では，未処理 MWCNT の 4 mg/kg 投与で内臓異常および骨格異常を伴う胎児の発生率が有意な高値を示しており，当該試験の内臓および骨格検査においても同様の変化が生じる可能性が考えられたことから，今後は内臓および骨格検査を行い，内臓および骨格への影響を確認する必要があると考えられる。

A. 研究目的

ナノマテリアル曝露によるヒトへの健康影響を総合的に評価するためには、発がん性等の慢性毒性に加えて、生殖・発生毒性等の遅発毒性影響を評価する必要がある。

ナノマテリアル曝露による生殖・発生毒性に関しては、現段階で利用可能な情報は多くはないが、以下のような研究結果が報告されている。二酸化チタン (TiO₂) ナノ粒子については、妊娠マウスへの皮下投与により、曝露後に胎児に移行して発達・機能障害を引き起こしたとの報告がある(Takeda et al., 2009; Shimizu et al., 2009)。また、カーボンナノチューブについては、単層カーボンナノチューブ (SWCNT)、多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の妊娠マウスへの腹腔内・気管内投与により胎児の奇形がみられたとの報告 (Pietrojusti et al., 2011; Fujitani et al., 2012)や、SWCNT のマウス単回経口投与により、吸収胚の有意な増加および胎仔の骨格異常がみられたとの報告 (Philbrook et al., 2011)がある。一方、MWCNT を妊娠ラットに反復経口投与しても生殖・発生毒性はみられなかったとの報告もある (Lim et al., 2011)。しかし、これらの試験結果をヒトに外挿し、ヒト健康リスク評価を行うだけの十分なデータは得られていないため、より詳細な検討が必要である。

我々はこれまで、妊娠マウスおよびラットを用いて、MWCNT (MWNT-7) の発生毒性を評価してきた。これまでの結果では、妊娠 9 日のマウスに 3 mg/kg 以上の MWCNT を単回気管内投与した場合、胎児の奇形がみられたが、妊娠 6~15 日のマウスに MWCNT を合計 16 mg/kg (4 mg/kg×4 回) 反復気管内投与しても、胎児の奇形はみられなかったことから、感受性の強い時

期に曝露を受けると低用量でも胎児への影響が発現すると考えられる (ただし、胎児の体重増加抑制は 2 mg/kg 以上でみられた)。

以上のことから、ナノマテリアルの発生毒性を、安全側に立って評価するためには、感受性の強い時期を探った上で試験を行う必要があると考えられる。

一方、これらの試験において、マウスに投与した MWCNT は、全て同じ被験物質を同じ超音波処理方法によって調製している。同一の被験物質であっても、投与に用いる懸濁液の調製方法によって、形状や凝集状態が異なることから、それに伴い発生毒性も異なることが考えられる。

そこで今年度は、同一試料から調製方法の異なる 4 種類の MWCNT 懸濁液を調製し、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考察することとした。

B. 研究方法

1. 被験物質懸濁液の調製

マウス反復気管内投与の被験物質として、MWNT-7 (ナノカーボンテクノロジーズ、現在は保土谷工業から提供) を用いた。

これまでの検討によって、MWNT-7 はマウス・ラット血清および 1~2% CMC-Na PBS 溶液中によく分散し、これらの媒体を用いた試験間で、胎児への影響に有意な差がみられなかった。今回は、生体由来試料ではないため用時調製を必要としない CMC-Na(1%) PBS 溶液を用いて MWCNT 懸濁液を調製した。

本研究では、MWCNT の調製方法によって発生毒性に違いが見られるかどうかを評価するために、以下に示す種々の方法で MWCNT 懸濁液を調製した。

①未処理 MWCNT (陽性対照)

MWCNT 原末 16 mg を 4 mL の 1%-CMC (カルボキシメチルセルロース) -Na 含有 PBS (リン酸緩衝液) に添加し、超音波バスを用いて 30 分~1 時間程度分散処理を行って懸濁液を調製した。

②熱処理 MWCNT

MWCNT 原末を 250°C で 2 時間加熱してから、上記①と同様の分散処理により懸濁液を調製した。

③Taquann 処理 MWCNT

MWCNT を Taquann 処理により高度に分散させた後、上記①と同様の分散処理により懸濁液を調製した。

④Taquann 処理+熱処理 MWCNT

MWCNT を上記③の Taquann 処理により高度に分散させた後、さらに上記②の熱処理を行い、上記①と同様の分散処理により懸濁液を調製した。

2. マウス反復気管内投与試験

マウス反復気管内投与試験のプロトコルを図 1 に示す。

上記 4 種類の方法で調製した MWCNT 懸濁液および媒体 (1%-CMS-Na 含有 PBS) を、いずれも 4 mg/kg の用量で ICR マウスに妊娠 6, 9, 12, 15 日に合計 4 回 (合計 16 mg/kg), イソフルラン麻酔下で気管内投与した (胎児の器官形成期を通じた投与を行った)。

3. 母動物の観察

各投与群とも、解剖日まで 1 日 1 回、一般状態の観察および体重測定を行った。ま

た、妊娠 0, 3, 6, 9, 12, 15 および 17 日に給餌器を含めた餌重量を測定し、測定日間の餌重量の差から、平均 1 日摂餌量を算出した。

妊娠 17 日にイソフルラン麻酔下で腹大動脈切断により放血安楽死させた後、病理学的検査として、器官・組織の肉眼的観察 (剖検) を行った。剖検では、動物の体表、自然開孔部等を観察し、腹腔、胸腔、骨盤腔および頭蓋腔内の器官・組織をはじめとする全身諸器官・組織を検査した。全ての肉眼的異常について、部位、大きさ、色調等を記録した。

また、全生存例について、肺および子宮重量 (子宮内容物を含む) を測定し、解剖日の体重を基に相対重量を算出した。

妊娠 17 日に、全生存例について子宮内検査を行った。卵巣および子宮内を検査し、妊娠黄体数、着床数、生存胎児数および死亡胚・胎児数 (早期死亡胚: 脱落膜腫, 後期死亡胚: 胎盤および羊膜形成のある形態不明瞭な死亡胚, 死亡胎児: 浸軟胎児も含む) を記録し、着床率、胎児生存率および死亡胚・胎児率を算出した。生存胎児の胎盤については、異常の有無を肉眼的に観察した後、重量を測定し、母動物ごとの雌雄別平均胎盤重量を算出した。測定後の胎盤は、10 vol% 中性緩衝ホルマリン液で固定し、保管した。

4. 胎児の観察

妊娠 17 日の帝王切開で得られた生存胎児全例について、母動物ごとに性比を算出した。また、個体別に体重を測定し、母動物ごとの雌雄別平均胎児重量を算出した。また、全例について外表検査を行い、母動物ごとに外表異常発生率を算出した。

なお、安楽死後の胎児は、内蔵および骨格検査が可能のように、各固定液で固定した。各群の検査動物数（親）は11～16匹とした。

3. データ処理

磁気データは、コンピュータ・システム [安全性試験システム (LATOX-F/V5)] を用いて記録し、処理した。胎児に関する成績（性比、胎児体重、胎盤重量および外表異常発生率）については、1母体当たりの平均を1標本として集計した。各測定値および集計値の平均±標準偏差を算出した。なお、不妊動物から得られたすべてのデータは、集計から除外した。

4. 統計解析

体重、体重増加量、摂餌量、器官重量（絶対および相対重量）、妊娠黄体数、着床数、生存胎児数、死亡胚・胎児数（着床痕数）、胎児体重ならびに胎盤重量については、最初に Bartlett の等分散検定 (Snedecor & Cochran., 2012) を5%の両側有意水準で実施した。ここで等分散（非有意）の場合には Dunnett の多重比較検定 (Yoshida, 1988) を行い、不等分散（有意）の場合には Steel の検定 (Steel, 1959) を行った。いずれも陰性対照群と各投与群間の有意性を、両側5%および1%の有意水準で判定した。

着床率、胎児生存率、死亡胚・胎児率、性比および外表異常発生率については、Steel の検定を行い、陰性対照群と各投与群間の有意性を、両側5%および1%の有意水準で判定した。

受胎率については、 χ^2 検定を行い、陰性対照群と各投与群間の有意性を、両側5%および1%の有意水準で判定した。

一般状態所見および剖検所見については、有意差検定を行わなかった。

C. 研究結果

1 母動物の検査結果

1.1 一般状態

媒体投与群で妊娠12日の投与後に1例、熱処理 MWCNT 投与群で妊娠15日の投与後に1例が死亡した。

妊娠期間を通じて、いずれの投与群も一般状態に異常は認められなかった。

1.2 体重

母動物の体重推移を図2に示す。

熱処理 MWCNT 投与群で妊娠8～17日の体重が、Taquann+熱処理 MWCNT 投与群で妊娠7日の体重が媒体投与群と比べて統計学的に有意な低値を示した。また、熱処理 MWCNT 投与群で妊娠6～16および0～17日の体重増加量が、MWCNT 原末投与群で妊娠6～16日の体重増加量が有意な低値を示した。

1.3 摂餌量

全ての MWCNT 投与群で、妊娠6～12日の平均1日摂餌量が媒体投与群と比べて統計学的に有意な低値を示した。また、熱処理 MWCNT 投与群では、妊娠12～17日の平均1日摂餌量が有意な低値を示した。

1.4 器官重量

すべての MWCNT 投与群で、肺の絶対および相対重量が陰性対照群と比べて統計学的に有意な高値を示した。また、熱処理 MWCNT 投与群および未処理 MWCNT 投与群で、妊娠子宮の絶対および相対重量が有

意な低値を示した。

1.5 受胎能

交尾成立した雌のうち、媒体投与群、熱処理 MWCNT 投与群、Taquann 処理 MWCNT 投与群、Taquann+熱処理 MWCNT 投与群および未処理 MWCNT 投与群で、それぞれ 2/15, 8/19, 3/15, 2/15 および 2/15 例に不妊が認められ、受胎率はそれぞれ 86.7, 57.9, 80.0, 86.7 および 86.7% であった。各 MWCNT 投与群の受胎率に陰性対照群との間で統計学的な有意差は認められなかったが、熱処理 MWCNT 投与群で受胎率の低値傾向が認められた。

2 胎児の検査結果

2.1 帝王切開

熱処理 MWCNT 投与群では、媒体投与群と比べて統計学的な有意差は認められないものの、早期死亡胚率の上昇に伴う死亡胚・胎児率の高値傾向および胎児生存率の低値傾向が認められた。なお、死亡胚・胎児率の高値傾向は Taquann+熱処理 MWCNT 投与群においても認められたが、その変化は熱処理 MWCNT 群に比べて僅かであった。

胎盤観察では、いずれの動物にも異常所見は認められなかった。妊娠黄体数、着床数、生存胎児数、死亡胚・胎児数、着床率および胎盤重量に、各 MWCNT 投与群と陰性対照群との間に統計学的な有意差は認められなかった。

熱処理 MWCNT 投与群、Taquann+熱処理 MWCNT 投与群および未処理 MWCNT 投与群で、雌雄の胎児体重が媒体投与群と比べて統計学的に有意な低値を示した。

性比に、各 MWCNT 投与群と陰性対照群との間に統計学的な有意差は認められな

かった。

2.2 外表検査

外表異常を伴う胎児の発生率ならびに各異常の発現率に、各 MWCNT 投与群と媒体投与群との間に統計学的な有意差は認められなかった。

外表異常を伴う胎児は、熱処理 MWCNT および未処理 MWCNT 投与群で、それぞれ 2 (2.5%) および 1 (0.6%) 例であった。所見としては、熱処理 MWCNT 投与群で屈曲尾および短尾が各 1 例、未処理 MWCNT 投与群で無尾および鎖肛が同一の 1 例に認められた。

D. 考察

1 母動物への影響

妊娠 12 日の投与後に陰性対照群の 1 例、妊娠 15 日の投与後に熱処理 MWCNT 投与群の 1 例が死亡した。死亡動物では肺の赤色斑点または赤色化が認められ、投与時に呼吸障害が発生した可能性が疑われたが、死因は不明であった。

熱処理 MWCNT 投与群では、妊娠 8~17 日の体重ならびに妊娠 6~16 および 0~17 日の体重増加量が低値を示した。なお、妊娠 0~17 日の体重増加量は、妊娠子宮重量を差し引いた体重補正值においても低値を示した。また、同群では妊娠 6~17 日の平均 1 日摂餌量が低値を示していることから、被験物質投与による摂餌量減少を伴った体重増加抑制が示唆された。平均 1 日摂餌量の低値は、他の MWCNT 投与群でも妊娠 6~12 日に認められ、Taquann+熱処理 MWCNT 投与群では妊娠 7 日の体重が低値、陽性対照群では妊娠 6~16 日の体重増加量が低値を示したことから、その影響は熱処

理 MWCNT 投与群に比べて弱いものの、いずれも被験物質投与による影響と考えられた。

熱処理および未処理 MWCNT 投与群で認められた妊娠子宮重量の有意な低値は、これらの投与群の胎児体重が有意な低値を示していることを反映した変化と考えられた。また、熱処理 MWCNT および Taquann+熱処理 MWCNT 投与群では、有意差はないものの陰性対照群に比べて早期死亡胚率が高値傾向を示し、加えて熱処理 MWCNT 投与群では受胎率が他の投与群に比べて明らかな低値傾向を示した。早期死亡胚率の高値傾向は、受精卵の着床後、妊娠状態を維持できずに発生が止まった（胚が吸収された）母動物の増加を示しており、Taquann 処理のみの MWCNT 投与では同様の変化はみられないことから、熱処理された MWCNT が母動物に何らかの影響を及ぼした可能性が考えられた。また、受胎率の低値傾向がみられたが、マウスの場合、受精卵の着床は受精後 6 日目とされており、当該試験では着床予定日である妊娠 6 日に初回投与を行っていることから、熱処理された MWCNT が直接的または間接的に着床を阻害した可能性も考えられたが、その機序は不明であった。

一般状態、妊娠黄体数、着床数、生存胎児数、死亡胚・胎児数、着床率、胎盤重量および胎盤観察において、被験物質投与に関連した変化は認められなかった。

2 胎児への影響

熱処理 MWCNT、Taquann+熱処理 MWCNT および未処理 MWCNT 投与群の雌雄の胎児体重が有意な低値を示した。熱処理 MWCNT および Taquann+熱処理 MWCNT

投与群では死亡胚・胎児率の高値傾向または生存胎児率の低値傾向が認められていることから、被験物質投与による胎児の発育抑制が示唆された。

外表検査では、熱処理 MWCNT 投与群で屈曲尾および短尾、未処理 MWCNT 投与群で無尾および鎖肛が認められた。MWCNT を用いた過去実施の催奇形性試験または既存の報告 (Fujitani et al., 2012) において、短尾または曲尾等の尾の変化が認められており、当該試験での尾の変化も同様または同時期の発生過程における変化と考えられた。ただし、いずれも単発性の発生であり、同様の変化が過去実施の試験の媒体対照群でもみられていることから、被験物質投与と関連のない変化の可能性も考えられた。

過去実施の試験では、未処理 MWCNT の 4 mg/kg 投与で内臓異常および骨格異常を伴う胎児の発生率が有意な高値を示しており、当該試験の内臓および骨格検査においても同様の変化が生じる可能性が考えられたことから、今後は内臓および骨格検査を行い、内臓および骨格への影響を確認する必要があると考えられる。

E. 結論

今回の検討によって、本試験条件下では、MWCNT のいずれの調製方法（未処理、熱処理、Taquann 処理および Taquann+熱処理）においても、その 4 mg/kg 反復投与（妊娠期間を通じて 16 mg/kg）によって、母動物に対する体重増加抑制または摂餌量減少が認められた。また、熱処理あるいは Taquann+熱処理された MWCNT の投与によって、胎児に発育抑制が認められた。本試験で認められた母動物および胎児に対する影響は、特に熱処理された MWCNT の

投与によって顕著に認められた。さらに、熱処理された MWCNT の投与によって、受胎率が低値傾向を示し、妊娠早期（着床または胚の発生）に何らかの影響を及ぼす可能性が示唆された。

なお、本試験の外表検査までの結果において、MWCNT の催奇形性は判断できなかったが、過去実施の試験では、未処理 MWCNT の 4 mg/kg 投与で内臓異常および骨格異常を伴う胎児の発生率が有意な高値を示しており、当該試験の内臓および骨格検査においても同様の変化が生じる可能性が考えられたことから、今後は内臓および骨格検査を行い、内臓および骨格への影響を確認する必要があると考えられる。

F. 引用文献

- Fujitani T, Ohyama K, Hirose A, Nishimura T, Nakae D, Ogata A: Teratogenicity of multi-wall carbon nanotube (MWCNT) in ICR mice. *The Journal of Toxicological Sciences*, **37**, 81–89 (2012).
- Lim J, Kim S, Shin I, Park N, Moon C, Kang S, Kim S, Park S, Kim J: Maternal exposure to multi-wall carbon nanotubes does not induce embryo-fetal developmental toxicity in rats. *Birth Defects Research (Part B)*, **92**, 69–76 (2011).
- Philbrook NA, Walker VK, Afrooz ARMN, Saleh NB, Winn LM: Investigating the effects of functionalized carbon nanotubes on reproduction and development in *Drosophila melanogaster* and CD-1 mice. *Reproductive Toxicology*, **32**, 442–448 (2011).
- Pietroiusti A, Massimiani M, Fenoglio I, Colonna M, Valentini F, Palleschi G, Camaioni A, Magrini A, Siracusa G, Bergamaschi A, Sgambato A, Campagnolo L: Low doses of pristine and oxidized single-wall carbon nanotubes affect mammalian embryonic development. *ACS NANO*, **5**, 4624–4633 (2011).
- Shimizu M, Tainaka H, Oba T, Mizuo K, Umezawa M, Takeda K: Maternal exposure to nanoparticulate titanium dioxide during the prenatal period alters gene expression related to brain development in the mouse. *Particle and Fibre Toxicology*, **6**: 20 (2009).
- Snedecor GW, Cochran WG: *Statistical Methods*. 8th ed. Iowa State University Press; 1989.
- Steel RGD. A multiple comparison rank sum test: Treatments versus control. *Biometric* 1959; **15**: 560-72.
- Takeda K, Suzuki K, Ishihara A, Kubo-Irie M, Fujimoto R, Tabata M, Oshio S, Nihei Y, Ihara T, Sugamata M: Nanoparticle transferred from pregnant mice to their offspring can damage the genital and cranial nerve systems. *Journal of Health Science*, **55**, 95–102 (2009).
- Yoshida M: Exact probabilities associated with Tukey's and Dunnett's multiple comparisons procedures in imbalanced one-way ANOVA *J Japanese Soc Comp Statist* 1988; **1**: 111-22.
- 小林憲弘：ナノマテリアルの体内動態及び発生毒性評価手法に関する研究。平成 25 年度厚生労働科学研究補助金（化学物質リスク研究事業）「ナノマテリアル曝露による生体毒性の慢性移行及び遅発性に関わる評価手法の開発研究」分担研究報告書，2014。

小林憲弘：ナノマテリアルの体内動態及び発生毒性評価手法に関する研究。平成26年度厚生労働科学研究補助金（化学物質リスク研究事業）「ナノマテリアル曝露による生体毒性の慢性移行及び遅発性に関わる評価手法の開発研究」分担研究報告書，2015。

無し

3. その他

無し

小林憲弘：ナノマテリアルの体内動態及び発生毒性評価手法に関する研究。平成27年度厚生労働科学研究補助金（化学物質リスク研究事業）「ナノマテリアル曝露による生体毒性の慢性移行及び遅発性に関わる評価手法の開発研究」分担研究報告書，2016。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

Norihiro Kobayashi, Sho Tanaka, Yoshiaki Ikarashi, Akihiko Hirose: Developmental toxicity assessment of various sizes of multi-wall carbon nanotubes in mice after repeated intratracheal instillation to initiate grouping and read across. Society for Risk Analysis 2016 Annual Meeting (2016.12.12 San Diego, CA, USA).

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

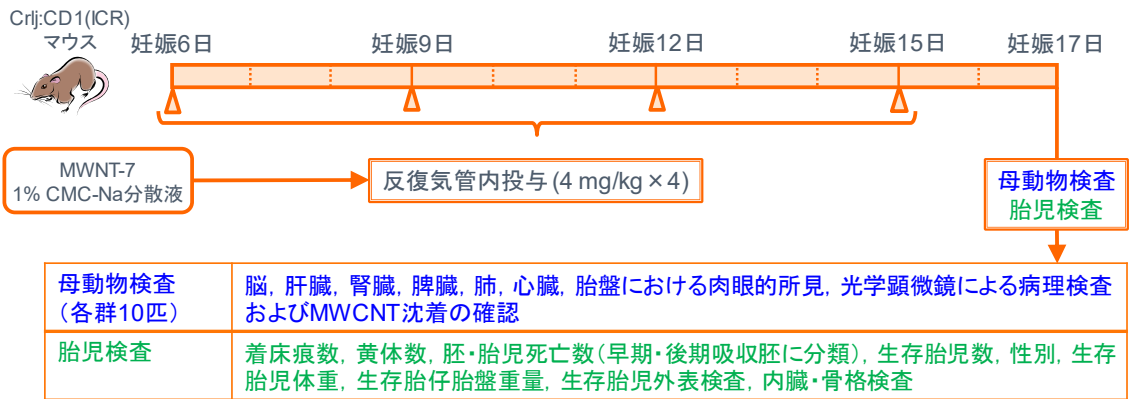


図1. 試験プロトコル

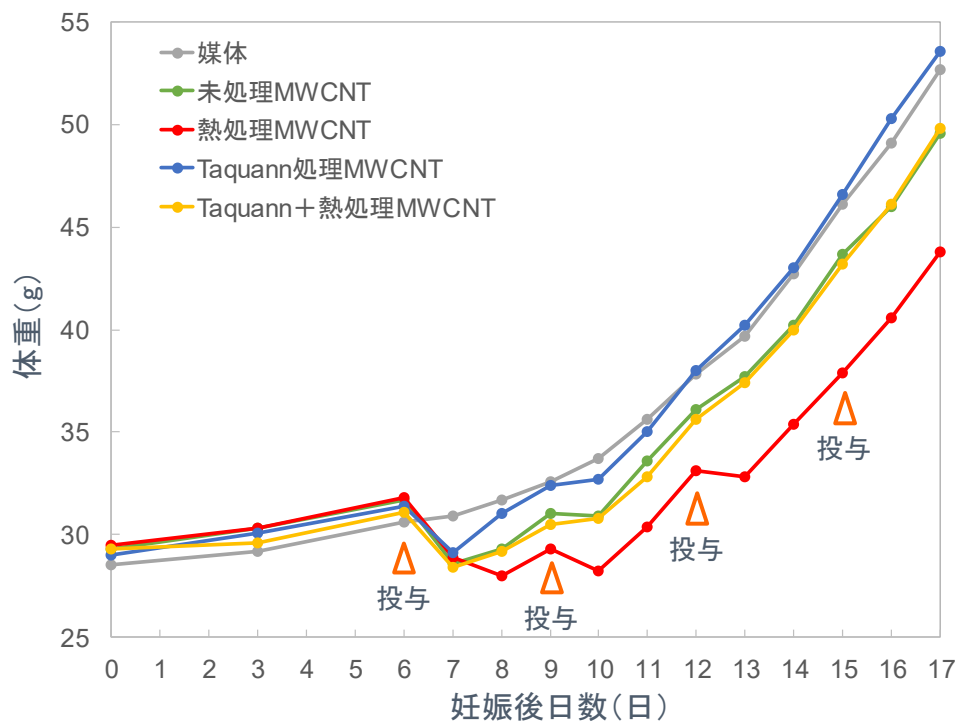


図2. 母動物の体重推移

平成28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及び遅発毒性評価法の開発に関する研究

分担研究課題：ナノマテリアルの遺伝毒性評価に関する研究
—マウスを用いる肺小核試験の基礎検討試験—

研究分担者：	本間 正充	国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部 部長
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
研究協力者：	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
研究協力者：	濱田 修一	株式会社L S I メディエンス
研究協力者：	高沢 博修	株式会社L S I メディエンス
研究協力者：	中川 宗洋	株式会社L S I メディエンス

研究要旨

ナノ物質の中でも、カーボンナノチューブ（CNT）はその物理化学的性状がアスベストに類似しているため、吸入による肺組織での発がん性が懸念されている。本研究では、*in vivo*でのナノ遺伝毒性の評価法を開発するため、マウス肺を用いる小核試験法の確立を試みている。雄性 C57BL/6NcrSlc マウス（投与／暴露開始時 12 週齢）に CNT を目標質量濃度 2.0 mg/m³ の濃度で 2 時間／日、5 日間全身暴露した（5 回の平均質量濃度は 2.8 mg/m³）。対照群には空気を同様に暴露した。また、陽性対照物質として ethyl methanesulfonate (EMS) の 25 mg/kg を 5 日間腹腔内投与した。最終暴露／投与後 5 日目に肺細胞を採取し、37°C、5% CO₂ 下で 48 時間培養し、小核をもつ細胞の誘発率を調べた。その結果、CNT 暴露群及び EMS 投与群では、それぞれ対照群及び媒体対照群と比較して小核誘発の有意な増加が認められ、CNT 暴露群では陽性対照物質として使用した EMS 投与群と比較しても小核を有する細胞の出現頻度は 2 倍以上の高値を示した。以上の結果から、CNT は *in vivo-in vitro* 法を用いた本試験条件下でマウス肺小核試験で陽性と判定された。

キーワード：ナノマテリアル、小核試験、遺伝毒性、発がん性

A. 研究目的

ナノ技術が向上し、様々なナノマテリアルが開発されているが、その中のカーボン

ナノチューブ（CNT）は電子的、化学的にユニークであることから、様々な分野で様々な用途に用いられている。例えば、プ

ラスの電荷を持つ CNT はマイナスの電荷を持つ DNA と結合しやすいという性質を応用し、CNT が DNA のセンサーに応用されているが、これは、CNT が DNA と作用し、遺伝的変異を誘発する可能性を示唆している。

また、CNT が酸化ストレスや炎症、線維症、肉芽腫の発生を促進し、線維症は CNT が肺のマクロファージに結合することで細胞間の構造を変化させることが原因と考えられている。その他、CNT は青石綿と同様に p53 ヘテロ欠損マウス腹腔内投与モデルにおいて中皮腫を生じさせることが明らかになっている。このように CNT は、酸化ストレスや炎症反応により間接的に発がん性に関与し、また、DNA や分裂装置と直接結合することで発がん性を示すと考えられている。

CNT の遺伝毒性に関しては、Kato らが野生型 ICR マウスに MWCNT (幅 70-110nm、長さ 1-4 μ m) を気管内注入し、肺組織のコメットアッセイ、酸化的 DNA 付加体の定量、そして一酸化窒素合成酵素の免疫組織化学的解析を行ったところ、すべて陽性の結果が得られた。よって MWCNT の遺伝毒性は、過剰な炎症反応による酸化的ストレスが主な原因であるとされている。

しかしながら、他の遺伝毒性エンドポイントでの CNT の評価はほとんど検討されておらず、上記で観察された遺伝毒性と発がん性との関係は不明である。これは、ナノ物質の標的臓器である肺での遺伝毒性試験マーカーがほとんど開発されてこなかったことが原因である。

本研究では、CNT の *in vivo* 遺伝毒性評価のために、マウスを用いる肺小核試験系の開発を試みている。本試験系の特徴は *in vivo* で暴露したマウスの肺を摘出後、肺細胞を培養する *in vivo-in vitro* 法であり、*in vitro* で細胞分裂惹させることにより、小核

を含む分裂細胞を効率よく得ることができる。昨年度、モデル化合物として、ブレオマイシンと EMS を用いた試験を行い、両者とも媒体対照 (生理食塩液) 群と比較して、肺小核誘発の有意な増加が認められたことから、本年度は実際に CNT をマウスに全身暴露させる予備試験を行い、CNT の肺小核誘発性を検討した。

B. 研究方法

(1) 被検物質

CNT 検体は MWNT-7 (三井物産、Lot No. 060125-01k) を用いた。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) を得、被検物質とした。Ethyl methanesulfonate (EMS, Sigma-Aldrich Corporation, lot#: BCBN1209V) を陽性対照に使用した。

*Taquahashi Y, Ogawa Y, Takagi A, Tsuji M, Morita K, Kanno J. Improved dispersion method of multi-wall carbon nanotube for inhalation toxicity studies of experimental animals. J Toxicol Sci. 2013;38(4):619-28.

(2) 動物

日本エスエルシー株式会社より 11 週齢の雄性 C57BL/6NCrSlc (SPF) マウスを購入して試験に用いた。尚、陰性対照群の試験は株式会社 L S I メディエンス (LSIM)、CNT の試験は国立医薬品食品衛生研究所 (NIHS) で毒性部 (暴露) と、LSIM (小核試験) が行った。LSIM では各実験当り 6 匹、計 18 匹を使用した。NIHS では肺細胞採取用に 6 匹を使用した。検疫期間は動物入荷後 5 日間とし、動物入荷時及び検疫終了時に体重を測定した。1 日 1 回一般状態を観察し、検疫期間中には馴化も行った。いずれの動物でも一般状態の異常が認められず、自然な体重増加が認められたことを確認して実験に使用した。

(3) 投与

① CNT : Taquann 直噴全身曝露吸入システム (ver.2.0、柴田科学株式会社) を用い、2 時間/日、5 日間連続の全身吸入曝露を行った。対照群には HEPA フィルターを通した空気を同様に曝露した。曝露チャンバー内の MWCNT エアロゾル濃度のモニタリングは、相対濃度測定 (CPM; count per minutes) と質量濃度測定 (mg/m^3) を並行して行った。相対濃度測定は、凝縮粒子計数装置 (Condensation Particle Counter ; CPC、CPC3776、サンプリング流量 : 1.5 L/min、TSI、東京ダイレック株式会社) を用いた。CPC の前段には希釈装置 (Dilution controller、柴田科学) を接続し、サンプルを 15 倍希釈して測定した。質量濃度測定は、ローボリウムサンプラー (080050-155、 $\phi 55$ mm ろ紙ホルダー、柴田科学) にフッ素樹脂処理ガラス繊維フィルター (Model T60A20、 $\phi 55$ mm、捕集効率 (DOP 0.3 μm) : 96.4%、東京ダイレック株式会社) を装着し、サンプリングポンプ (Asbestos sampling pump AIP-105、柴田科学株式会社) に接続して 1.5 L/min の流量で曝露時間の 2 時間を通してエアロゾルを吸引しフィルターに検体を捕集した。ろ過捕集後のフィルターの重量から予め秤量したフィルターの重量を差し引いた値を検体の重量とし、吸引空気量 $1.5 \text{ L}/\text{min} \times 120 \text{ min} = 180 \text{ L}$ から 1 m^3 当りの質量濃度を算出した。フィルターの秤量にはマイクロ天秤 (XP26V、METTLER TOLEDO) を使用した。5 回の質量濃度の平均は $2.8 \text{ mg}/\text{m}^3$ 、相対濃度は $1,773/\text{cm}^3$ であった (Table 1)。

② EMS : 生理食塩液で調整した EMS を腹腔内投与した。予備実験では初回投与時に $50 \text{ mg}/\text{kg}$ とし、2 回目投与以降は 6.25 、 12.5 及び $25 \text{ mg}/\text{kg}$ とした。予備再実験以降は $25 \text{ mg}/\text{kg}$ とした。

(4) 細胞分離および培養

投与後、72 時間後に Lindberg らの方法を参考に下記の方法で Clara 細胞及び AT-II 細胞を分離、識別した。

- i. マウスをチオペンタールナトリウム (ラボナール、田辺三菱製薬株式会社) 麻酔下で開腹し、腹大動脈を切断・放血して安楽死させた。
- ii. PBS(-)溶液で、気管・肺内を満たした後、0.25% トリプシン溶液で置換した。
- iii. 両肺を 50 mL 遠沈管に入れて、 37°C 温浴中で 30 分間処理した後、気管及び目視できる気管支を除去して肺組織を細切した。
- iv. 肺組織を 50 mL のディスポ遠沈管に回収し、牛胎仔血清 (FBS) と $250 \mu\text{g}/\text{mL}$ DNase を含む液を加えて、 37°C 温浴中で 10 分間処理した。
- v. ガーゼでろ過した後、 $1500\times\text{g}$ 、10 分間遠心分離して肺細胞 (沈渣) を回収した。
- vi. Percoll の密度勾配 (密度 1.089 と 1.040) により遠心分離 ($2000\times\text{g}$ 、25 分間、 20°C) して、回収した細胞集団を Waymouth 培地で 37°C 、48 時間培養した。
- vii. 培養後、3% 酢酸添加エタノール固定液で細胞を回収し、スライドガラスに滴下してスライド標本作製した。

(ア) 標本作製 (標本染色) 及び標本観察

- i. 上記で作製したスライド標本を DAPI 染色液 ($10 \mu\text{g}/\text{mL}$) で染色して、蛍光顕微鏡下 (U 励起) で観察した。
- ii. 肺細胞 2000 個/匹を数え、小核をもつ細胞の割合を算出した。
- iii. 円形から楕円形の比較的大きな細胞を測定対象細胞とした。

(6) 統計学的解析、試験結果の評価

肺細胞における小核誘発頻度について、媒体対照群と CNT 曝露群あるいは媒体対

照群と EMS 投与群との間で、Kastenbaum と Bowman の方法により有意差検定を行った。媒体対照群と比較して、陽性対照物質 (EMS) により小核をもつ肺細胞が増加することにより、試験法は適切であったと判断し、CNT 暴露群の小核誘発頻度が対照群と比較して有意に増加した場合を陽性と判定した。

C. 研究結果および考察

(1) 肺小核の出現頻度

本実験における小核をもつ肺細胞の出現頻度の結果を Table 2 に、顕微鏡写真を Fig. 1 に示す。

NIHS 及び LSIM で採取された標本について、形態学的に AT-II あるいは Clara 細胞と思われる評価対象肺細胞は、いずれの観察対象標本でも 2000 個/匹を測定可能であった。

NIHS の実験では、CNT 暴露群において対照群と比較して、小核をもつ細胞の有意で明らかな高値が認められた。LSIM の実験でも、陽性対照として使用した EMS 群において媒体対照群と比較して、小核をもつ細胞の有意な高値がみられた。また、CNT 暴露群の小核誘発頻度は EMS 投与群と比較して約 2.6 倍の高値を示し、媒体対照を投与した腹腔内投与群と比較して吸入暴露群の対照群は小核をもつ肺細胞の出現頻度がやや高い傾向がみられた。

(2) 特記事項

予備実験において、EMS の 50 mg/kg を腹腔内投与した結果、初回投与翌日に投与した 3 匹全例の死亡を発見した。そのため、媒体 (生理食塩液) を投与した群を使用して用量設定試験を実施した結果、25 mg/kg 以下の用量では死亡及び重篤な毒性症状は認められなかった。

これらの結果に基づいて、EMS の 25

mg/kg の用量を使用して予備再実験を実施した。予備再実験では、エラスターゼを用いて肺細胞を分離後、35 あるいは 60 mm ディッシュで細胞培養したが、細胞回収率が悪く、良好な状態での肺細胞標本は作製できなかった。そのため、標本観察は行わず、ラボテックチャンバー (8 wells) を用いて細胞を培養後、細胞を回収せずに固定する方法を事前検討として実施した。

予備再実験において細胞回収率が悪かった原因として、エラスターゼの効果が期待ほどではなかったことが考えられたため、事前検討ではトリプシン、コラゲナーゼ、エラスターゼの 3 種類の酵素を使用して肺細胞を分離し、細胞培養後に作製した標本の状態を比較した。その結果、作製した標本の状態はトリプシン、エラスターゼ、コラゲナーゼの順に良好であった。これらの結果から、本実験ではトリプシンを使用して肺細胞を分離した。

なお、本試験ではいずれの実験においても細胞培養前に細胞生存率は測定せず、AT-II 及び Clara 細胞の識別も行わなかった。

D. 結論

カーボンナノチューブ (CNT) による *in vivo* における遺伝毒性を評価するために、マウスを用いる肺小核試験を用いて予備検討を実施した。

雄性 C57BL/6NcrSlc マウス (投与/暴露開始時 12 週齢) に CNT を目標質量濃度 2.0 mg/m³ の濃度で 2 時間/日、5 日間全身暴露した。対照群には空気を同様に暴露した (5 回の平均質量濃度は 2.8 mg/m³)。また、陽性対照物質として ethyl methanesulfonate (EMS) の 25 mg/kg を 5 日間腹腔内投与した。対照群には媒体の生理食塩液を同様に投与した。最終暴露/投与後 5 日目に肺細胞を採取し、37°C、5% CO₂ 下で 48 時間培養した。培養後、細胞を固定してスライド

標本を作製し、小核をもつ細胞の誘発率を調べた。

その結果、CNT 暴露群及び EMS 投与群では、それぞれ対照群及び媒体対照群と比較して小核誘発の有意な増加が認められ、CNT 暴露群では陽性対照物質として使用した EMS 投与群と比較しても小核を有する細胞の出現頻度は 2 倍以上の高値を示した。

以上の結果から、CNT は *in vivo-in vitro* 法を用いた本試験条件下でマウス肺小核試験で陽性と判定された。

E. 健康危機情報

特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

Horibata K, Ukai A, Ogata A, Nakae D, Ando H, Kubo Y, Nagasawa A, Yuzawa K, Honma M. Absence of *in vivo* mutagenicity of multi-walled carbon nanotubes in single intratracheal instillation study using F344 gpt delta rats. *Genes Environ.* 2017, 39:4 doi: 10.1186/s41021-016-0065-5

2. 学会発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

なし

Table 1: CNT 全身暴露吸入の質量濃度及び相対濃度

	1st	2nd	3rd	4th	5th	Average	SD
MWNT-7 Mass Concentration (mg/m³)	2.7	2.6	2.6	3.1	2.9	2.8	0.21
CPC Average(0-120min, #/cm³)	1,521	2,189	2,016	1,562	1,577	1773	308
Max.	2,007	3,056	2,750	2,219	2,067		

Table2: 小核試験結果

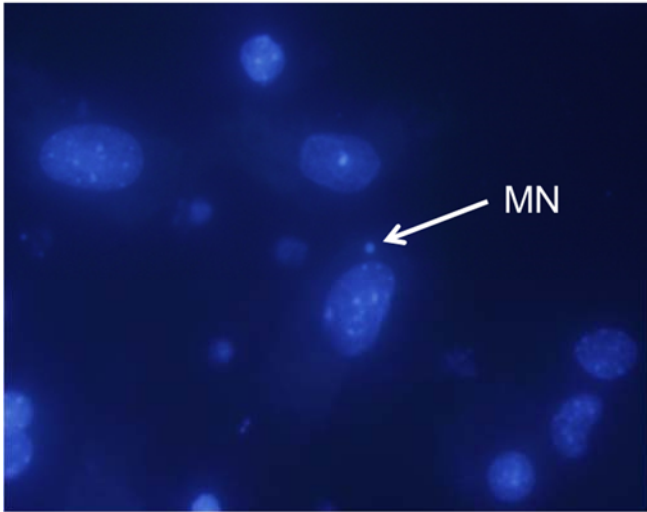
Treatment group	Dose Level Route Frequency	Animal number	Number of cells scored	Number of micronucleated (MN) cells	Incidence of MN cells (%)
Air	0 mg/m ³	10101	2000	6	0.30
	Inhalation ^{a)}	10102	2000	4	0.20
	5 days ^{b)}	10103	2000	7	0.35
Total / Mean ± S.D.			6000	17	0.283 ± 0.076
CNT	2.0 mg/m ³	10201	2000	42	2.10
	Inhalation ^{a)}	10202	2000	21	1.05
	5 days ^{b)}	10203	2000	26	1.30
Total / Mean ± S.D.			6000	89 ^{##}	1.483 ± 0.548
Physiological saline	0 mg/kg	39001	2000	2	0.10
	ip.	39002	2000	3	0.15
	5 days	39003	2000	4	0.20
Total / Mean ± S.D.			6000	9	0.150 ± 0.050
EMS	25 mg/kg	39004	2000	11	0.55
	ip.	39005	2000	9	0.45
	5 days	39006	2000	14	0.70
Total / Mean ± S.D.			6000	34 ^{##}	0.567 ± 0.126

CNT: Carbon nanotubes, EMS: Ethyl methanesulfonate

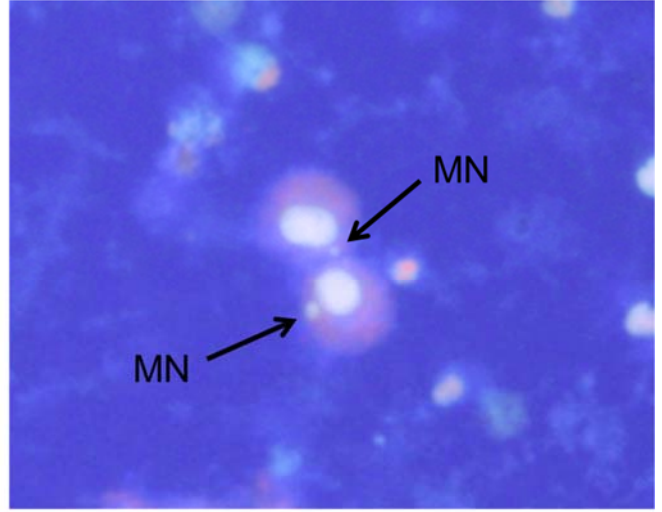
^{a)} Whole body inhalation

^{b)} For 2 h/day for 5 consecutive days

^{##} p<0.01 (Kastenbaum and Bowman's method)



Stained with DAPI alone (EMS, 25 mg/kg/day for 5 days)



Stained with AO-DAPI mixture (CNT, 2.0 mg/m³/day for 5 days)

Fig. 1 Microscopic observation in the mouse lung micronucleus assay

平成 28 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

分担研究課題名：ナノマテリアルの細胞内異物処理メカニズムに関する研究

分担研究者：最上 知子 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部 主任研究官

研究要旨

多層カーボンナノチューブ（MWCNT）の毒性と慢性炎症との関連が注目されている。今年度は、長さや径の異なる各種 MWCNT について、マクロファージからの炎症性サイトカイン TNF α 産生誘導能について検討を行った。MWCNT-WL、-WS、-T および-SD1 はいずれも強力に TNF α 産生を促進した。いずれの MWCNT の場合にも、TNF α 分泌促進には貪食過程が必要とされ、NLRP3 ノックダウンと caspase-1 阻害が顕著な抑制効果を示すこと、リソソーム酵素 cathepsin B 阻害剤は部分的抑制効果を示すことが判明した。したがって各種 MWCNT による TNF α 産生も、NLRP3 インフラマソームを介する応答であることが明らかになった。

A. 研究目的

産業用ナノマテリアルとして用いられる多層カーボンナノチューブ（MWCNT）は、アスベストと似た形状を持ち、ヒトへの健康影響が懸念されている。暴露され体内に入ったナノマテリアルは、マクロファージ等の貪食系細胞が異物として処理にあたる。炎症は免疫応答を誘導して病原体などの異物を排除する生体防御反応である。本研究ではナノマテリアルの貪食系細胞内での挙動を追跡し、インフラマソーム活性化を介した炎症の慢性化機構を明らかにし、慢性影響の評価につなげることを目的とする。

これまでの研究において、長さや径の異なるさまざまな針状の多層カーボンナノチューブについて、マクロファージに暴露すると、炎症性サイトカイン IL-1 β を強力に産生すること、その過程には NLR pyrin domain containing 3 (NLRP3) インフラマソームが関与することを明らかにしている。NLRP3 は様々な慢性炎症疾患に関与することが最近明らかにされており、また IL-1 β は免

疫細胞の活性化や炎症応答の誘導などの多彩な役割を有している。MWCNT が排除されずに細胞組織に滞れば、炎症が慢性化することが懸念される。

今年度は長さや径が様々な MWCNT を対象に、炎症性サイトカイン TNF α 産生促進能とインフラマソームの役割を解析した。

B. 研究方法

1. 実験材料および試薬

本研究では以下の多層カーボンナノチューブ（MWCNT）を使用した。MWCNT-WL（長さ 0.5-10 μ m、径 85-200 nm）ならびに MWCNT-WS（長さ 0.5-2 μ m、径 40-70 nm）は和光純薬工業（株）より、MWCNT-T（長さ数 10-数 100 μ m、径 70-150 nm）は戸田工業（株）より入手した。MWCNT-SD1（平均長 4.51 μ m、径 150 nm）は昭和電工より提供された。

サイトカイン測定にはミリポア社の MILLIPLEX™ MAP アッセイキットを用いた。

Stealth™ Select RNAi (NLRP3) および Stealth RNAi negative control は Invitrogen 社から購入した。

2. MWCNT の分散

MWCNT-SD1、-WL、-WS、および-T は 0.5% Tween 20 を含む PBS に 5 mg/mL の濃度で懸濁し、1~5 分間バス型超音波発生装置での処理、ピペッティング、25G シリンジを通過し分散した。

3. 細胞からの TNF α 分泌測定

ヒト単球由来 THP-1 細胞は 24well プレートに播種し、0.3 μ M PMA と 10% FCS を含む RPM1 培地中で 72 時間培養してマクロファージ様に分化し、さらに PMA を除いた培地中で 24 時間培養したのちに、分散 MWCNT あるいは対照となる溶剤を培地に添加し 6 時間培養した。最終 Tween 濃度は 0.002% とした。培養上清を回収後、MILLIPLEX™ MAP アッセイを用いてサイトカイン濃度の測定を行った。

C. 研究結果

1. 各種 MWCNT による TNF α 産生

THP-1 マクロファージを MWCNT-WL、-WS、-T および-SD1 を 3、6、10 μ g/mL の濃度で処理すると、TNF α 産生促進が認められ、MWCNT-SD1 が最も顕著な効果を示した。10 μ g/mL の濃度では、MWCNT-T、MWCNT-WL、MWCNT-WS の順で効果は減弱したが、6 μ g/mL では MWCNT-T、-WL、-WS に大きな違いは認められなかった。

マクロファージを cytochalasin D (0.2 μ M) で前処理すると、MWCNT-WL、-WS、-T および-SD1 (10 μ g/mL) による TNF α 産生はほぼ完全に消失し、各 MWCNT による TNF α 産生には貪食過程が必要であることが判明した。

2. NLRP3 インフラマソームの関与

これまで MWCNT-M、-SD1、HTCFNW-L、MWCNT-WL、WS、T など各種針状カーボンナ

ノマテリアルによる IL-1 β 産生には、NLRP3 インフラマソームが関与することを明らかにしている。MWCNT-WL、-WS および-T による TNF α 産生への NLRP3 の関与を、特異的 siRNA による NLRP3 ノックダウンにより解析した。NLRP3 siRNA 処理により細胞内の NLRP3 mRNA は 80% 低下し、MWCNT-SD-1 (10 μ g/mL) および-WL による TNF α 分泌は 90%、MWCNT-WS および-T による TNF α 分泌はほぼ完全に阻害され、NLRP3 の関与が示された。また、さらにインフラマソームを構成する caspase-1 の特異的阻害剤 z-YVAD-FMK (10 μ M) で細胞を前処理したところ、MWCNT-SD-1、-WS および-T (10 μ g/mL) による TNF α 分泌はそれぞれ 90%、100%、100% 阻害された。MWCNT-WL による TNF α のみ阻害は 70% に留まった。

リソソーム酵素である cathepsin B の阻害剤 CA-074Me (10 μ M) 処理により、MWCNT-SD-1、-WL、-WS および-T (10 μ g/mL) による TNF α 分泌はそれぞれ 70%、70%、65%、65% 阻害された。

D. 考察

昨年度は多様な長さや径を有する様々な MWCNT について、IL-1 β 産生能を明らかにし、インフラマソーム活性化の関与と機序を解析した。今年度は、これらの MWCNT が代表的な炎症性サイトカインである TNF α 産生に及ぼす影響とその機序について検討を加えた。

各種 MWCNT をマクロファージに曝露すると、TNF α 産生が顕著に促進されること、さらにこの応答には、IL-1 β の場合と同様に、貪食ならびに NLRP3 インフラマソーム、caspase-1 活性、リソソーム酵素 cathepsin B の関与が明らかになった。

IL-1 β の場合は、インフラマソームがシグナルを受けると caspase-1 が自己切断され、活性型の caspase-1 が IL-1 β 前駆体を切断して産生されることが知られている。またアスベスト様の針状化合物は細胞に貪食されるとエンドソーム・リソソーム膜を破壊し、リソソーム酵素カテプシン B の

漏出が NLRP3 インフラマソーム活性化を導く可能性が示唆されている。

一方、TNF α は転写・翻訳産物がそのまま細胞外に分泌され、LPS などの TLR4 リガンドが TNF α 遺伝子転写を誘導し分泌促進をもたらす機構が知られている。しかしながら本研究の結果は、各種 MWCNT による TNF α 分泌促進作用には IL-1 β 産生のためのプロセスとマシナリー、すなわち貪食・リソソーム破壊・NLRP3 インフラマソームが関わることを示している。分泌された IL-1 β は IL-1 受容体を介して TNF α 産生を促進することが可能であることから、MWCNT 刺激により分泌された IL-1 β が TNF α 分泌を促進するオートライン機構の可能性が推定される。

E. 結論

様々な長さ・径をもつ MWCNT がマクロファージからの TNF α 産生を促進し、その応答は NLRP3 インフラマソーム活性化を介することを明らかにした。

F. 研究発表

該当なし

表1. 各種MWCNTによるTNF α 産生

		MWCNT-SD1	MWCNT-WL	MWCNT-WS	MWCNT-T
Length		Ave: 4.51 μm	0.5-10 μm	0.5-2 μm	数10~数100 μm
Diameter		(150 nm)	85-200 nm	40-70 nm	20-100 nm
TNF α secretion		++++	++	++	+++
Phagocytosis	Cytochalasin D (Inhibitor)	Inhibition	85% Inhibition	Inhibition	Inhibition
Lysosomal cathepsin B	CA-074Me (Inhibitor)	70% Inhibition	70% Inhibition	65% Inhibition	65% Inhibition
Inflammasomes					
NLRP3	siRNA knockdown	90% Inhibition	90% Inhibition	Inhibition	Inhibition
caspase-1	zVAD-fmk (Inhibitor)	90% Inhibition	70% Inhibition	Inhibition	Inhibition

平成 28 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

分担研究課題名：ナノマテリアルの感染性免疫系への影響に関する研究

研究分担者： 渡辺 渡 九州保健福祉大学薬学部 教授

研究協力者： 明石 敏 九州保健福祉大学薬学部 教授

研究協力者： 吉田裕樹 九州保健福祉大学薬学部 講師

研究協力者： 宮内亜宜 九州保健福祉大学薬学部 助教

研究要旨

高度分散化 MWNT-7 (Taquann サンプル) およびチタン酸カリウム ($K_2O \cdot 8TiO_2$) 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。両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。MWNT-7 曝露マウスの感染 1 日後の肺免疫組織像では、抗 CCL 抗体 3 陽性細胞数の増加が認められたが、MWNT-7 貪食細胞とは異なっていた。感染14日後の肺組織をマッソンT染色法で解析したところ、肺胞壁の一部線維化が見られ、肺炎回復期での遅延が確認された。MWNT-7 は感染直後からマクロファージ等に影響して間接的にウイルス感染に応答した炎症形成を亢進することが示唆された。また、病態に関しても、回復期での炎症継続や肺線維化など MWNT-7 の作用が持続的であることが判明した。一方、チタン酸カリウム曝露マウスでは、感染 1 日後の肺胞洗浄液中の TNF- α など炎症性メディエーターの上昇が認められ、貪食細胞周囲での炎症形成の亢進も確認された。しかし、感染 14 日後での線維化の程度は低く、MWNT-7 の様な明確な回復遅延は見られなかった。

A. 研究目的

多層型カーボンナノチューブ (MWCNT) は、その物理的特性から IC 基盤の材料などに汎用されている。その一方でマウス腹腔内投与により中皮腫

を誘導するなど、アスベスト様の生物災害を引き起こす危険性が多方面から指摘されている。チタン酸カリウム ($K_2O \cdot 8TiO_2$) もプラスチックの補強材や精密フィルターなど工業製品に多

用されているが、やはりアスベストに似た針状の構造が健康被害を引き起こす可能性が指摘されている。

本研究では、これらナノマテリアルの免疫系への影響、その中でも感染性免疫系への影響をrespiratory syncytial virus (RSV) 感染マウスモデルを用いて評価を行ってきている。そして、前年度までにMWNT-7の感染初期からの免疫担当細胞への影響と肺炎増悪化やチタン酸カリウムの肺炎増悪化について報告した。

今年度は、MWNT-7のRSウイルスの初期感染病態への影響を免疫染色法で確認すると共に、チタン酸カリウムも含めて肺炎回復期への影響をマッソントリクロム染色法で詳細に検討した。

B. 方法

RSV マウス感染実験

高度分散化 MWNT-7 (Taquann サンプル) とチタン酸カリウム ($K_2O \cdot 8TiO_2$) を実験に用いた。これらの試料について、秤量後に超音波破砕機や 27G シリンジを用いて懸濁しながら段階的に希釈し、最終的に 0.02% Tween 20 -phosphate buffered saline (PBS) に均一懸濁・希釈した。ウイルス感染 5、3、1 日前に試料を 100 μ L ずつ 0.025~0.25 mg/kg になるように BALB/c マウス (雌性、6 週齢) に麻酔下 (ketamine 40 μ g/g, xylazine 6 μ g/g、筋注) で経鼻投与した。なお、対照には 0.02% Tween 20-PBS を投与した。曝露後、

RSV A2 株 5×10^5 PFU を麻酔下で経鼻感染させた。RSV 感染 1 および 5 日後に麻酔下でマウス気道にカテーテル経由で冷 PBS 0.8 mL を注入し、肺胞洗浄液 (BALF) を取得した。BALF は使用時まで -80°C に保管した。肺は中性ホルマリンを気道より注入し、結索後に摘出しホルマリン固定を行った。

BALF 中のサイトカイン・ケモカインの定量

CCL3 (MIP-1 α) の定量は R&D Systems 社製の Quantikine ELISA キットシリーズを用いた。サイトカインの定量は、Ready-Set-Go ELISA キット (eBioscience 製) を用いた。なお添付のプロトコルに準じて実験を実施した。

肺組織の病理組織学的解析

標本作成は (有) ヴィペック社に委託し、評価は HE 染色下で実施した。さらにマッソントリクロム染色は常法どおりに行った。

免疫染色法

肺組織切片について、常法により脱パラフィンやアンマスキング等を実施後、抗 CCL3 抗体 (10 μ g/mL) を用いて免疫染色した。なお検出はベクスタチン ABC 検出キットを利用し、対比染色はヘマトキシリン染色を用いた。

(倫理面への配慮)

動物実験は九州保健福祉大学動物実験に関する規則に従って、安全面および倫理面に配慮して適正に実施した。

C. 研究結果

(1) MWNT-7 の評価結果

免疫染色による感染1日後の肺病理組織評価

RSV感染初期におけるMWNT-7の影響を見るために、感染1日後に摘出した固定肺の免疫染色を行った。非感染マウスの肺組織では、MWNT-7の曝露の有無に関わらず抗CCL3抗体陽性細胞は全く認められなかった。感染対照（非処置）では肺胞壁の肥厚と共に、CCL3発現細胞が散見された。そしてMWNT-7 0.25 mg/kg曝露マウスでは、全体的に肺胞壁が肥厚しており、CCL3発現細胞も多数認められた。しかし、MWNT-7を貪食した細胞ではCCL3の発現は見られなかった。

マッソントリクロム染色による感染14日後の肺病理組織評価

感染14日後の対照マウスでは、リンパ系細胞の浸潤などはほぼ収束しており、肺胞壁の肥厚もほとんど見られなかった。一方、MWNT-7曝露マウスでは一部で肺胞壁の軽度の肥厚と共に、線維化が確認された。また、部分的ではあるがMWNT-7を貪食したマクロファージも認められた。

(2) チタン酸カリウムの評価結果

感染初期応答への影響

RSウイルス感染1後のBALF中の炎症性のマーカーを検討した。チタン酸カリ

ウム曝露群（0.025および0.25 mg/kg）では、TNF- α 、IL-6およびCCL3の有意な上昇が認められた。また、非感染マウスではチタン酸カリウム曝露に関わらず何れも検出限界以下であった。

マッソントリクロム染色による感染14日後の肺病理組織評価

RSウイルス感染マウスでは、チタン酸カリウム 0.025 mg/kg曝露により、部分的ではあるが肺胞壁の肥厚の程度が亢進し、浸潤細胞数も増加していたが、MWNT-7曝露時のような線維化などは確認できなかった。

D. 考察

前年度報告したように、本モデルではRSウイルス感染1日後から肺の炎症惹起が認められた。MWNT-7曝露により炎症マーカーの1つであるBALF中のケモカインCCL3レベルが有意に上昇していたため、その質的な相違を見るために抗CCL3抗体を用いた免疫染色で検証した。その結果、MWNT-7によるCCL3発現細胞数の上昇が確認された。しかし、MWNT-7を貪食した細胞の周囲では、炎症は亢進しているものの、CCL3発現細胞は認められなかった。これは、MWNT-7を貪食した細胞では感染直後から強い炎症誘導の応答が生じた可能性が高いためと思われる。今後より細かく時間的な経緯を調べる必要がある。一方、回復期への影響については、肺の線維化やMWNT-7貪食細胞の検出

など、影響が持続することが示唆され、より長期に亘った影響評価を実施していきたい。

チタン酸カリウムはその特徴的な針状の構造から、MWNT-7と同様な作用が予想され、実際に感染初期から炎症性のメディエーターの上昇が確認された。しかしながら、回復期への作用はMWNT-7より軽度であり、肺組織での蓄積性などが低いことが強く示唆された。今後、感染初期からの炎症形成の相違などをMWNT-7と比較検討していく。

E. 結論

1. MWNT-7曝露マウスでは、免疫染色によりRSウイルス感染直後から強い炎症誘導が生じている可能性が示唆された。
2. マッソントリクロム染色法でMWNT-7曝露により肺炎回復期での持続的な作用と肺の線維化などが確認された。
3. チタン酸カリウムは感染初期から影響するが、MWNT-7よりは肺炎増悪化の程度が低かった。

F.健康危険情報

なし

G. 研究発表

1.論文発表

Yoshida H, Tshako R, Atsumi T, Narumi K, Watanabe W, Sugita C, Kurokawa M. Naringenin interferes with the anti-diabetic actions of

pioglitazone via pharmacodynamic interactions, *J Nat Med*, 71 (2017) 442-448.

Hagiwara A, Hidaka M, Takeda S, Yoshida H, Kai H, Sugita C, Watanabe W, Kurokawa M. Anti-Allergic Action of Aqueous Extract of *Moringa oleifera* Lam. Leaves in Mice, *Eur J Med Plants*, 16 (2016) 1-10.

2. 学会発表

加藤雄大、橋口誠子、榎藤喜貴、宮内亜宜、明石 敏、吉田裕樹、杉田千泰、黒川昌彦、渡辺 渡 チタン酸カリウム曝露のRSV肺炎への影響 第64回日本ウイルス学会総会、P2-091 札幌コンベンションセンター 2016年10月24日

榎藤喜貴、橋口誠子、加藤雄大、宮内亜宜、明石 敏、吉田裕樹、杉田千泰、黒川昌彦、渡辺 渡 多層型カーボンナノチューブ曝露によるRSV感染初期応答への影響 第64回日本ウイルス学会総会、P2-092 札幌コンベンションセンター 2016年10月24日

寺田央子、加藤雄大、橋口誠子、榎藤喜貴、広瀬明彦、宮内亜宜、明石 敏、吉田裕樹、杉田千泰、黒川昌彦、渡辺 渡 チタン酸カリウム曝露のRSV肺炎への影響 日本薬学会第137年会、27PB-am155、2017年3月、仙台国際センター

渡辺 渡、榎藤喜貴、橋口誠子、加藤雄大、広瀬明彦、宮内亜宜、明石 敏、吉田裕樹、杉田千泰、黒川昌彦 多層型カーボ

ンナノチューブ曝露によるRSV感染初期
応答への影響 日本薬学会第137年会、
27PB-am154、2017年3月、仙台国際
センター

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

H. 知的財産所有権の出願・登録状況
(予定も含む)

平成 28 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

分担研究課題名：ナノマテリアルの免疫制御システムへの影響評価研究

研究分担者：石丸 直澄 徳島大学大学院医歯薬学研究部 教授
研究協力者：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：高橋 祐次 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部室長
研究協力者：新垣理恵子 徳島大学大学院医歯薬学研究部 助教
研究協力者：斎藤 雅子 徳島大学大学院医歯薬学研究部 助教

研究要旨

ナノマテリアルの免疫システムへの慢性的な影響に関しては詳しく知られていない。本研究では、Taquann 処理されたナノマテリアルの長期における免疫システム全体への慢性的な影響を観察することによって、ナノマテリアルの免疫制御システムへの影響を評価した。前年度までに、正常マウスあるいは自己免疫疾患モデルマウス（MRL/lpr）への Taquann 処理された多層化カーボンナノチューブ（T-CNT）の腹腔内投与によって、線維化を伴う慢性腹膜炎が誘導された。今年度は、T-CNT に加えチタン酸カリウムの腹腔内投与による免疫系への影響を検討した。腹腔投与 1 年後では、T-CNT 投与群で誘導された腹膜炎は、チタン酸カリウム投与群では誘導されなかった。また、T-CNT 投与群に比較して、チタン酸カリウム投与群では M1 型のマクロファージ分化が亢進していた。さらに、MWCNT 投与群では血清 IgM の濃度が対照群より上昇していた。IgG2a に関してはチタン酸カリウム、MWCNT いずれの投与においても濃度が上昇していた。以上のことから、チタン酸カリウムと MWCNT を比較すると、MWCNT の線維化を伴う腹膜炎の誘導能は高く、両者で腹腔内のマクロファージ分化が異なり、慢性炎症への機転も異なっていることが判明した。

A. 研究目的

ナノマテリアルの曝露による免疫系

への影響に関しては、カーボンナノチューブの吸引による肺胞マクロファージ

の活性化を検討した研究がよく知られている。さらに、カーボンナノチューブの吸入暴露により、T細胞のマイトージェンに対する反応性が低下し、NK活性に関してもカーボンナノチューブ暴露により抑制されることが報告されている。これまでに報告されてきた*in vivo*の研究は暴露後数週間での解析がほとんどで、ナノマテリアルの暴露から慢性的な免疫システムへの詳細な影響に関しては不明のままである。本研究では、ナノマテリアルの投与による免疫システムへの影響を長期間観察することにより、ナノマテリアルの免疫制御システム全体に対する効果を評価することを目的としている。

平成27年度までに正常C57BL/6マウスへの Taquann 処理された MWCNT (T-CNT) の腹腔内投与により、M2マクロファージの集簇が亢進すること、MRL/lprマウスへのT-CNT腹腔内投与により線維化を伴う慢性腹膜炎の病態が亢進することが判明した。平成28年度は、T-CNTに加えて、チタン酸カリウムの腹腔内投与による免疫システムの影響に関して比較検討することによって、ナノマテリアルの暴露と免疫システムとの関係性を明らかにすることを目的とした。

B. 方法

マウス

8週齢の雌 C57BL/6 (B6) マウス (各群

10匹) に腹腔内に T-CNT、チタン酸カリウムを投与後、1年にて解析した。マウスを用いた動物実験に関しては、実験動物に関する取り扱いについて使用する動物の苦痛の軽減や安楽死の方法などを中心として徳島大学実験動物委員会において定められている倫理面に配慮した実験動物運営規定に基づき、厳格な審査を経た上で実施されている。また、ナノマテリアルの暴露・漏洩を防止する対策については万全を期して実施している。

MWCNT、チタン酸カリウム

多層化カーボンナノチューブは MWCNT-7 (保土ヶ谷化学) を用い、国立食品衛生研究所・高橋主任研究官により Taquann 処理された MWCNT (T-CNT) を供与された。Taquann 処理されたチタン酸カリウムについても国立食品衛生研究所・高橋主任研究官より供与された。溶媒として 0.1% Tween80 / 生理食塩水が用いられ、1 μ g および 10 μ g の MWCNT が腹腔内に注射された。

フローサイトメトリー解析

ナノマテリアル投与マウスの脾臓、腸間膜リンパ節、腹腔内滲出細胞から単核球を採取し、蛍光色素標識された各種リンパ球表面マーカー (Ly5.2、CD4、CD8、CD19、CD11b、CD11c、F4/80、CD206、CD44、CD62L) に対する抗体にて染色後、解析装置 (FACSCant BD Biosciences)

にてそれらの発現を経時的に検討した。

免疫細胞の採取

腹腔滲出細胞の解析マウスの腹腔内を5mlのPBSで洗浄し、採取した滲出細胞を用いて、フローサイトメトリー解析を行った。腸間膜リンパ節は、ホモジナイズ後、洗浄、ろ過によってリンパ節細胞を採取した。脾臓に関しては、ホモジナイズ、ろ過、洗浄後、塩化アンモニウム水溶液（0.83%）にて溶血、洗浄、ろ過によって脾細胞を採取した。

ELISA 法

血清を用いて、IgG1、IgG2b、IgMをELISA法にて定量化した。各イムノグロブリンサブセットの検出には、HRP標識された二次抗体を用い、通法に従って定量化した。

C. 研究結果

B6マウスへのT-CNT及びチタン酸カリウム腹腔投与

8週齢メスB6マウスにT-CNT（10 μ g）あるいはチタン酸カリウム（10 μ g）を腹腔内投与した。対照群（溶媒のみ）を含め各群10匹ずつとした。投与後、12ヶ月にて屠殺、解析を行った。投与後3ヶ月ごとの体重変化を検討したところ、各群で有意な変化は観察されなかった（図1A）。投与後12ヶ月での各群の体重（図1B）、脾重量（図1C）、肝重量（図1D）に各群で有意な差は見られなかった（図

1B, C, D）。

T-CNT及びチタン酸カリウム腹腔投与による腹腔内所見

T-CNT及びチタン酸カリウムの腹腔内投与後12ヶ月における腹腔内臓器の外表所見では、T-CNT投与群での肝臓の分葉状変化、脾臓表面、肝臓表面、腹膜の白濁化が観察されたが、対照群、チタン酸カリウム投与群では変化は認められなかった（図2）。

腹腔滲出細胞（PEC）、腸間膜リンパ節、脾臓における細胞数の変化

PEC中の全細胞数は対照群に比較して、チタン酸カリウム投与群、T-CNT投与群にて有意に増加していた（図3A）。腸間膜リンパ節における細胞数は、チタン酸カリウム投与群、T-CNT投与群にて有意に減少していた（図3B）。脾臓においては、T-CNT投与群にて有意に増加していた（図3C）。

PEC中の免疫細胞分画

PEC中のLy5.2⁺CD11b⁺F4/80⁺マクロファージにおけるCD11c（M1マーカー）/CD206（M2マーカー）分画を検討した（図4A）。マクロファージ全体の細胞数は対照群に比較して、チタン酸カリウム投与群、T-CNT投与群両者とも有意に増加していた（図4B）。CD11c⁺CD206⁺分画もチタン酸カリウム投与群、T-CNT投与群両者とも有意に増加していた（図

4C)。CD11c⁺CD206⁻M1マクロファージはチタン酸カリウム投与群で有意に増加しているのに対し、T-CNT投与群では有意に減少していた（図4D）。CD11c⁻CD206⁺M2マクロファージは、T-CNT投与群では有意に増加していた（図4E）。

PEC中のT細胞及びB細胞に関して検討すると、CD4⁺T細胞における活性化マーカー（CD44/CD62L）では、チタン酸カリウム投与群、T-CNT投与群ともにCD44^{low}CD62L⁺のナイーブ型T細胞の割合が減少し、CD44^{high}CD62L⁻のメモリー型T細胞の割合が増加していた（図5A）。CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞、CD19⁺B細胞数は各群で有意な変化は認められなかった（図5B, C, D）。

腸間膜リンパ節（mLN）の免疫細胞分画

腸間膜リンパ節細胞中のLy5.2⁺CD11b⁺F4/80⁺マクロファージにおけるCD11c（M1マーカー）/CD206（M2マーカー）分画を検討した（図6A）。マクロファージ数は、チタン酸カリウム投与群、T-CNT投与群で有意な変化はなかった（図6B）。CD11c⁺CD206⁺分画もチタン酸カリウム投与群、T-CNT投与群両者とも有意な変化は認められなかった（図6C）。M1マクロファージは、T-CNT投与群で有意に減少していた（図6D）。さらに、M2マクロファージの細胞数では、T-CNT投与群で有意に増加していた（図6E）。

腸間膜リンパ節細胞におけるT細胞、B細胞分画について検討した（図7A）。CD4⁺T細胞の活性化状態は、チタン酸カリウム投与群、T-CNT投与群で大きな変化はなかった（図7A）。CD4⁺T細胞数は、チタン酸カリウム投与群、T-CNT投与群で有意に減少していた（図7B）。CD8⁺T細胞に関して変化はなかった（図7C）。CD19⁺B細胞数はT-CNT投与群で有意に減少していた（図7D）。

脾臓における免疫細胞分画

脾細胞中のLy5.2⁺CD11b⁺F4/80⁺マクロファージにおけるCD11c（M1マーカー）/CD206（M2マーカー）分画を検討した（図8A）。マクロファージ細胞数はT-CNT投与群で有意に増加していた（図8B）。CD11c⁺CD206⁺分画に変化は見られなかった（図8C）。M1マクロファージは、T-CNT投与群で有意に増加していた（図8D）。M2マクロファージに関してはそれぞれの投与によって変化は観察されなかった（図8E）。

脾臓におけるT細胞、B細胞分画について検討した（図9A）。CD4⁺T細胞の活性化状態は、T-CNT投与群で大きくメモリー型にシフトしていた（図9A）。CD4⁺T細胞数では、変化は見られなかったが（図9B）、CD8⁺T細胞数はチタン酸カリウム投与群で、有意に増加していた（図9C）。一方、CD19⁺B細胞に関して変化は観察されなかった（図9D）。

血清イムノグロブリンの変化

チタン酸カリウムおよびT-CNT腹腔内投与による液性免疫への影響を検討するために、ELISAにて、血清中の各種イムノグロブリン分画を検討した。IgMに関しては、対照群に比較して、T-CNT投与群で有意にその濃度が上昇していた（図10A）。IgG1では、チタン酸カリウム投与群、T-CNT投与群で変化は見られなかった（図10B）。IgG2aでは、チタン酸カリウム投与群、T-CNT投与群ともに有意に上昇していた（図10C）。

D. 考察

昨年度までの研究で、正常 B6 マウスへの MWCNT 腹腔内投与による長期暴露によって、腹膜および腹腔臓器表層部に反応性の変化が観察され、慢性の腹膜炎が持続することが明らかにされた。また、MRL/lpr マウスへの MWCNT の腹腔内投与により、強い腹膜炎が惹起され、全身の自己免疫性病変は増悪することが判明した（平成 26 年度）。さらに、B6 マウスへの MWCNT 及び Zymosan 投与では、投与後 3 日の初期の段階では、Zymosan による PEC 中の各免疫細胞の増加に加えて MWCNT により、その影響は増強されることが判明し、経時的に観察すると、投与後 60 日では各免疫細胞が減少する一方で、M2 マクロファージの細胞数が MWCNT のみあるいは MXCNT+Zymosan 投与群で増加するこ

とが明らかになった。したがって、PEC 中では MWCNT の暴露で M2 マクロファージが活性化することが判明し、その活性化シグナルは TLR との協調作用がある可能性が示された（平成 27 年度）。

今年度は、T-CNT に加えて Taquann 処理済みのチタン酸カリウムの腹腔内投与実験を実施し、MWCNT とチタン酸カリウムの免疫系への影響を比較検討した。これまで T-CNT の腹腔内投与で観察されていた肝臓の分葉状変化や腹膜の白濁化は、投与後 1 年にてチタン酸カリウム投与群では観察されなかった。このことは、T-CNT の物性の特徴、慢性炎症の持続性、免疫システムへの影響の違いなどが要因と考えられる。腹腔マクロファージへの影響では、T-CNT、チタン酸カリウム投与群ともに、細胞数は増加していたが、チタン酸カリウム投与群では M1 マクロファージへの分化、T-CNT 投与群では M2 マクロファージへの分化が亢進していた。

腸間膜リンパ節の解析では、T-CNT 投与群の M2 マクロファージへの分化促進が観察され、T-CNT、チタン酸カリウム投与群ともに CD4⁺T 細胞数の減少が見られた。また、T-CNT 投与群で CD19⁺B 細胞数も減少していた。脾臓での変化は、T-CNT 投与群で M1 マクロファージ数が増加し、チタン酸カリウム投与群で CD8⁺T 細胞数が増加していた。このことは、腹腔内へのナノマテリアル投与によって、腸間膜リンパ節への炎症の波及、

獲得免疫系への影響が考えられた。

炎症の遷延化の指標として、ナノマテリアル暴露による抗体産生への影響が挙げられる。T-CNT 投与群では IgM、IgG2a の濃度が高くなっていた。また、チタン酸カリウム投与群で IgG2a の濃度が高くなっていた。T-CNT の暴露では腹膜での炎症の慢性化が持続することと関連がある可能性が考えられた。IgG2a 分画は Th1 型の免疫反応と関係していることが知られているので、T-CNT の暴露は Th1 型の炎症反応を誘導している可能性が考えられた。

T-CNT の長期暴露によって腹膜炎の遷延化が観察され、チタン酸カリウム暴露と異なった影響が存在することが明らかとなった。今後、T-CNT の暴露と慢性炎症、線維化などの機転に焦点を当てて、さらなる検討が必要である。

E. 結論

4. B6マウスへのT-CNT及びチタン酸カリウムの腹腔内投与後1年での腹腔内所見として、投与では、T-CNT投与で観察される肝臓の分葉状変化はチタン酸カリウム投与では観察されなかった。
5. B6マウスへのT-CNT及びチタン酸カリウムの腹腔内投与で、それぞれM1、M2マクロファージ分化に大きな相違があった。
6. B6マウスへのT-CNT及びチタン酸カリウムの腹腔内投与で、腸間膜あるい

は脾臓への炎症の影響が確認された。

7. B6マウスへのT-CNT及びチタン酸カリウムの腹腔内投与後1年で、Th1型の免疫反応あるいは抗体産生が亢進する可能性が示された。
8. ナノマテリアルの種類によって免疫システムへの影響は異なっており、T-CNTの暴露は炎症の遷延化につながる可能性が高いことが示唆された。

F.健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Saito M, Otsuka K, Ushio A, Yamada A, Arakakai R, Kudo Y, Ishimaru N. Unique phenotypes and functions of follicular helper T cells and regulatory T cells in Sjögren's syndrome. *Curr Rheumatol Rev*, in press 2017
- (2) Ushio A, Arakaki R, Yamada A, Saito M, Tsunematsu T, Kudo Y, Ishimaru N. Crucial roles of macrophages in the pathogenesis of autoimmune disease. *World J Immunol* 7:1-8, 2017 2017
- (3) Izawa T, Arakaki R, Mori H, Tsunematsu T, Kudo Y, Tanaka E, Ishimaru N. The nuclear receptor AhR controls bone homeostasis by regulating osteoclast differentiation via the RANK/c-Fos signaling axis. *J Immunol* 197:4639-4650. 2016

- (4) 石丸直澄 ナノマテリアルと免疫システム *医学のあゆみ* 259:241-246, 2016
- (5) Kudo Y, Yada H, Fujiwara N, Tada Y, Tsunematsu T, Miyake Y, Ishimaru N. Oral environment and cancer. *Genes Environ.* 38:13, 2016
- (6) Tsunematsu T, Fujiwara N, Yoshida M, Takayama Y, Kujiraoka S, Qi G, Kitagawa M, Kondo T, Yamada A, Arakaki R, Miyauchi M, Ogawa I, Abiko Y, Nikawa H, Murakami S, Takata T, Ishimaru N, Kudo Y. Human odontogenic epithelial cells derived from epithelial rests Malassez possess stem cell properties. *Lab Invest.* 96:1063-1075, 2016
- (7) Kondo T, Tsunematsu T, Yamada A, Arakaki R, Saito M, Otsuka K, Kujiraoka S, Ushio A, Kurosawa M, Kudo Y, Ishimaru N. Acceleration of tumor growth due to dysfunction in M1 macrophages and enhanced angiogenesis in an animal model of autoimmune disease. *Lab Invest* 96:468-480, 2016
- (8) Qi G, Kudo Y, Tang B, Liu T, Jin S, Liu J, Zuo X, Mi S, Shao W, Ma X, Tsunematsu T, Ishimaru N, Zeng S, Tatsuka M, Shimamoto F. PARP6 acts as a tumor suppressor via downregulating Survivin expression in colorectal cancer. *Oncotarget* 7:18812-18824. 2016
2. 学会発表
- (1) 新垣理恵子、山田耕一、牛尾綾、黒澤実愛、大塚邦紘、齋藤雅子、常松貴明、工藤保誠、石丸直澄：Immunological and toxicological effect of multi-wall carbon nanotubes by whole body inhalation exposure in B6 mice. 第45回日本免疫学会総会学術集会、2016年12月 沖縄
- (2) 齋藤雅子、大塚邦紘、新垣理恵子、山田耕一、石丸直澄：Toxicological effect of peritoneal exposure to multi-walled carbon nanotubes on immune system. 第45回日本免疫学会総会学術集会、2016年12月 沖縄
- (3) 石丸直澄、山田耕一、齋藤雅子、新垣理恵子、高橋祐次、菅野純：ナノマテリアルの免疫制御システムへの影響 第43回日本毒性学会シンポジウム（ナノマテリアルの実用化に呼応した有害性評価の進捗） 2016年6月 名古屋
- (4) 新垣理恵子、山本安希子、常松貴明、工藤保誠、菅野純、石丸直澄：全身吸入曝露による多層化カーボンナノチューブの免疫システムへの影響 第105回日本病理学会総会 2016年5月 仙台

H. 知的財産所有権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図1

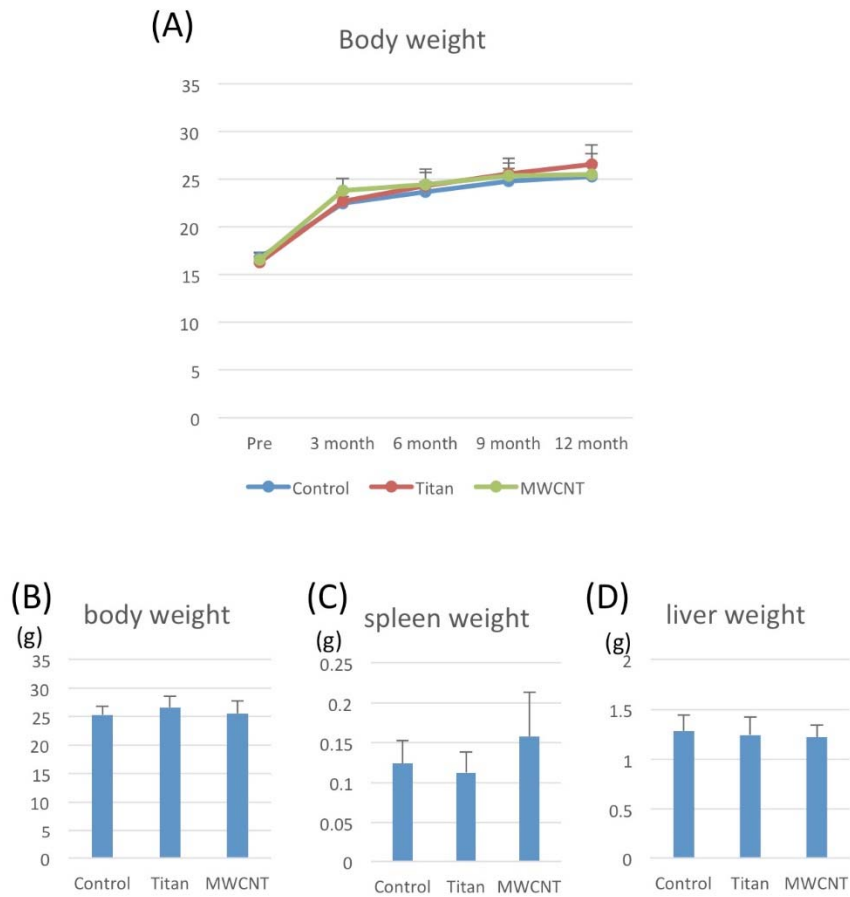


図1.T-CNT及びTiO₂投与による体重、脾重量、肝重量の変化
(A)体重の経時的変化 (B)投与後12ヶ月での体重 (C)脾重量 (D)肝重量
データ=平均値±SD (各群N=8-10)

図2

Peritoneal finding of TiO_2 and MWCNT-injected mice

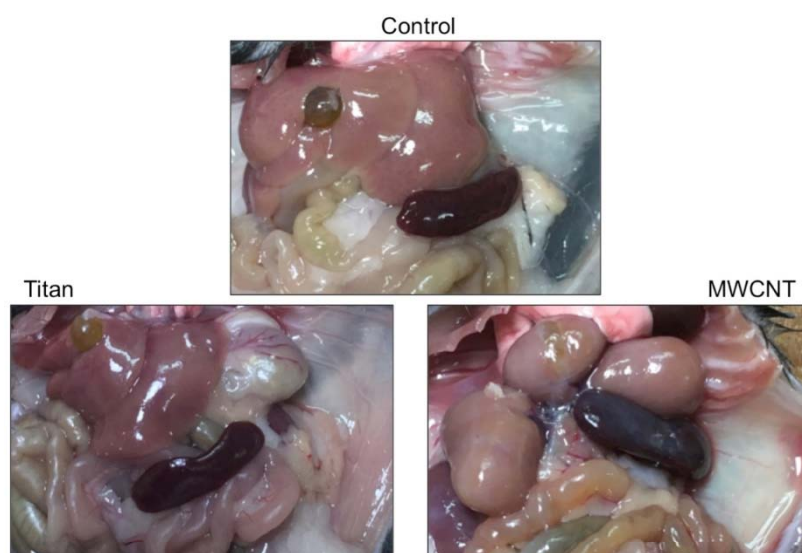


図2. TiO_2 (Titan)、T-CNT (MWCNT)腹腔内投与後の腹腔内の所見

図3

Total cell number of PECs, mLN, and spleen

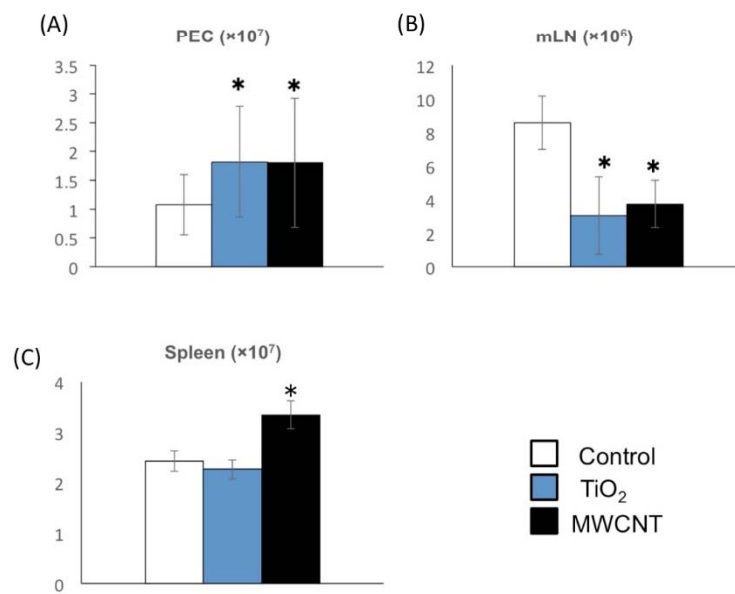
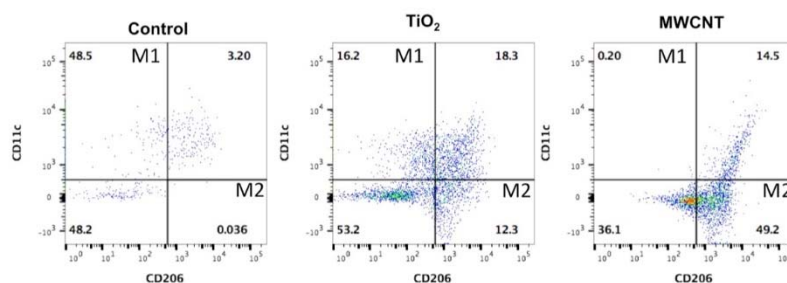


図3. 腹腔滲出細胞、腸間膜リンパ節、脾臓における細胞数データ=平均値 \pm SD (各群N=8-10)

図4

(A) Analysis of macrophage in PECs

Ly5.2⁺CD11b⁺F4/80⁺-gated



Cell number of macrophages in PECs

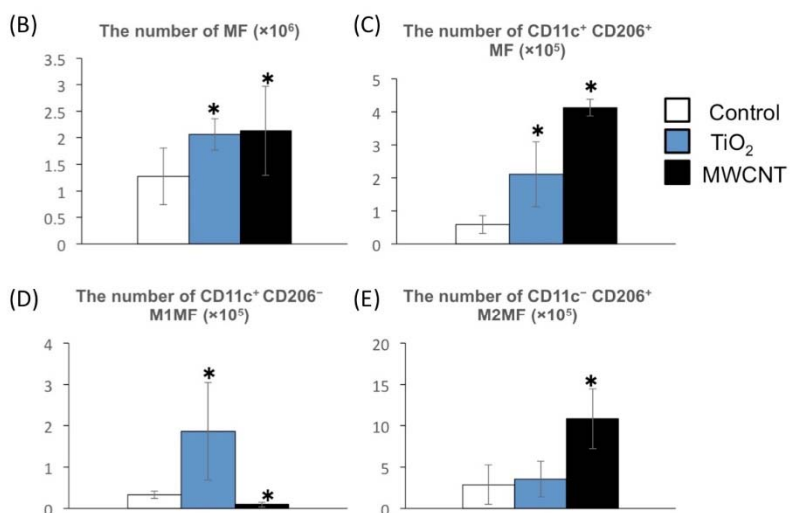
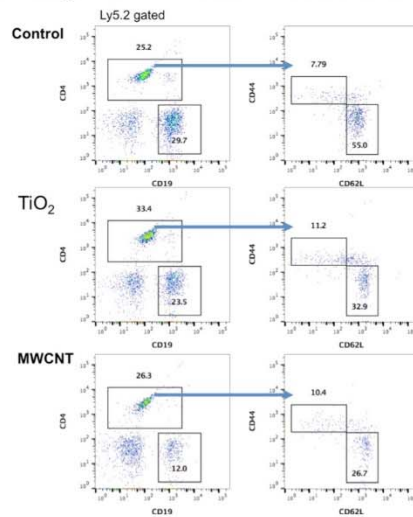


図4. PEC中のマクロファージ分画

- (A) Ly5.2⁺CD11b⁺F4/80⁺マクロファージのCD11c/CD206分画
 - (B) Ly5.2⁺CD11b⁺F4/80⁺マクロファージの細胞数
 - (C) CD11c⁺CD206⁺マクロファージの細胞数
 - (D) CD11c⁺CD206⁻ (M1)マクロファージの細胞数
 - (E) CD11c⁻CD206⁺ (M2)マクロファージの細胞数
- データ=平均値±SD (各群N=8-10) *p < 0.05

図5

(A) Analysis of T and B cells in PECs



Number of T and B cells in PECs

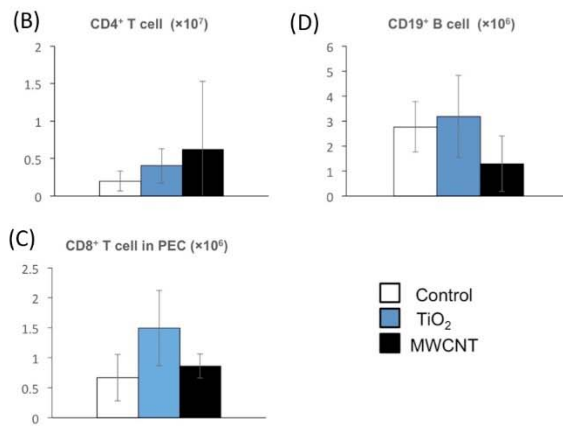


図5. PEC中のT細胞、B細胞分画

(A) Ly5.2⁺CD4/CD19分画及びCD4⁺CD44/CD62L分画

(B) CD4⁺T細胞数

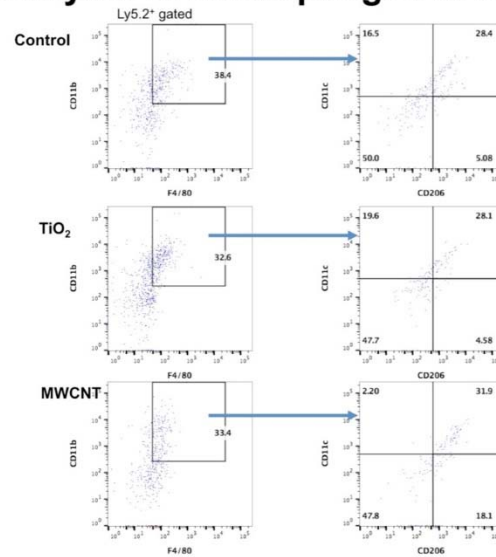
(C) CD8⁺T細胞数

(D) CD19⁺B細胞数

データ=平均値±SD (各群N=8-10)

図6

(A) Analysis of macrophages in mLN



Cell number of macrophages in mLN

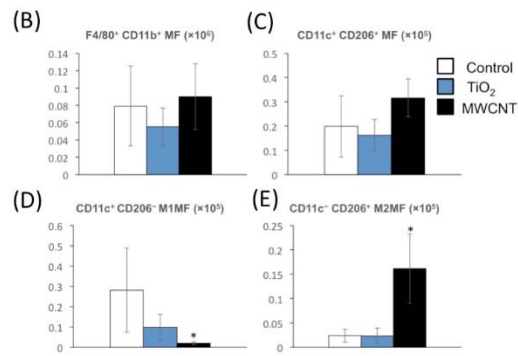


図6. 腸間膜リンパ節におけるマクロファージ分画
 (A) Ly5.2⁺CD11b⁺F4/80⁺マクロファージのCD11c/CD206分画
 (B) Ly5.2⁺CD11b⁺F4/80⁺マクロファージの細胞数
 (C) CD11c⁺CD206⁺マクロファージの細胞数
 (D) CD11c⁺CD206⁻ (M1)マクロファージの細胞数
 (E) CD11c⁻CD206⁺ (M2)マクロファージの細胞数
 データ=平均値±SD (各群N=8-10) *p < 0.05

図7

(A) Analysis of T and B cells in mLN

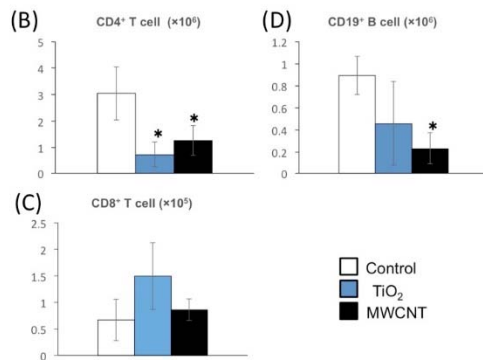
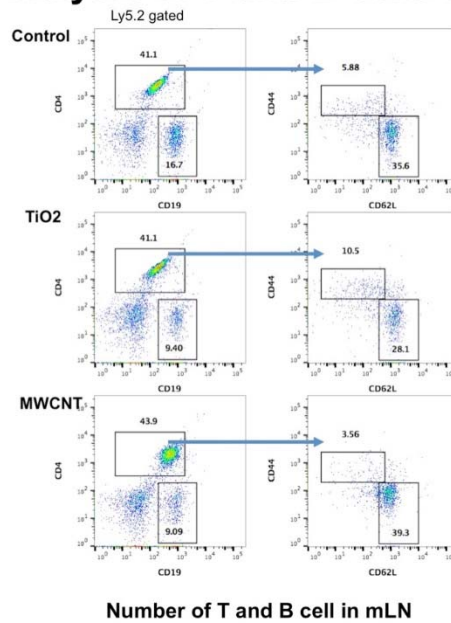
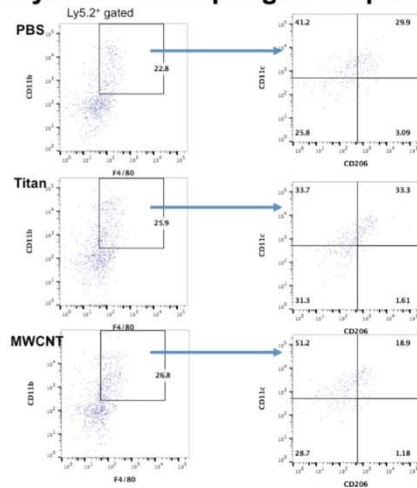


図7. 腸間膜リンパ節のT細胞、B細胞分画
 (A) Ly5.2⁺CD4/CD19分画及びCD4⁺CD44/CD62L分画
 (B) CD4⁺T細胞数
 (C) CD8⁺T細胞数
 (D) CD19⁺B細胞数
 データ=平均値±SD (各群N=8-10)

(A) Analysis of macrophages in spleen



Cell number of macrophages in spleen

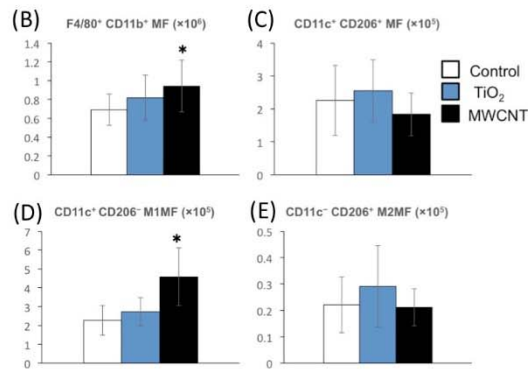
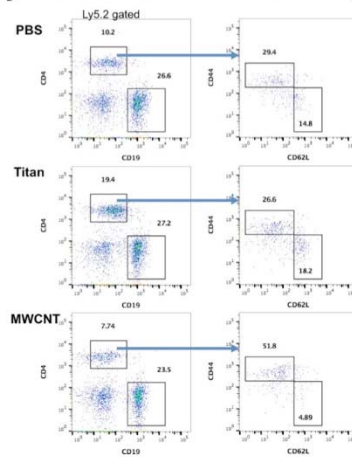


図8. 脾臓におけるマクロファージ分画
 (A) Ly5.2⁺CD11b⁺F4/80⁺マクロファージのCD11c/CD206分画
 (B) Ly5.2⁺CD11b⁺F4/80⁺マクロファージの細胞数
 (C) CD11c⁺CD206⁺マクロファージの細胞数
 (D) CD11c⁺CD206⁻ (M1)マクロファージの細胞数
 (E) CD11c⁻CD206⁺ (M2)マクロファージの細胞数
 データ=平均値±SD (各群N=8-10) *p < 0.05

(A)

Analysis of T and B cells in spleen



Number of T and B cells in spleen

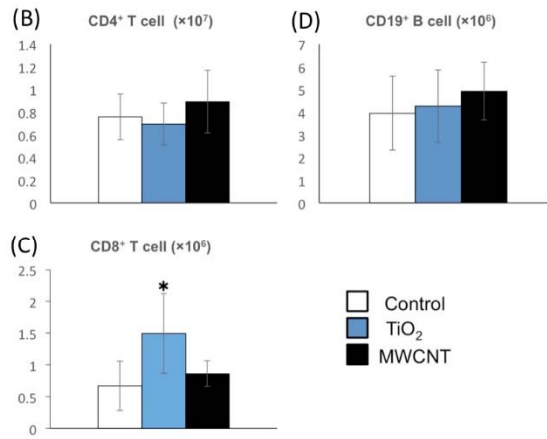


図6. 脾臓におけるT細胞、B細胞分画
 (A) Ly5.2⁺CD4/CD19分画及びCD4⁺CD44/CD62L分画
 (B) CD4⁺T細胞数
 (C) CD8⁺T細胞数
 (D) CD19⁺B細胞数
 データ=平均値±SD (各群N=8-10)

図10

TiO₂及びMWCNT腹腔投与1年後の血清中のIgM、IgG2a、IgG1濃度の比較

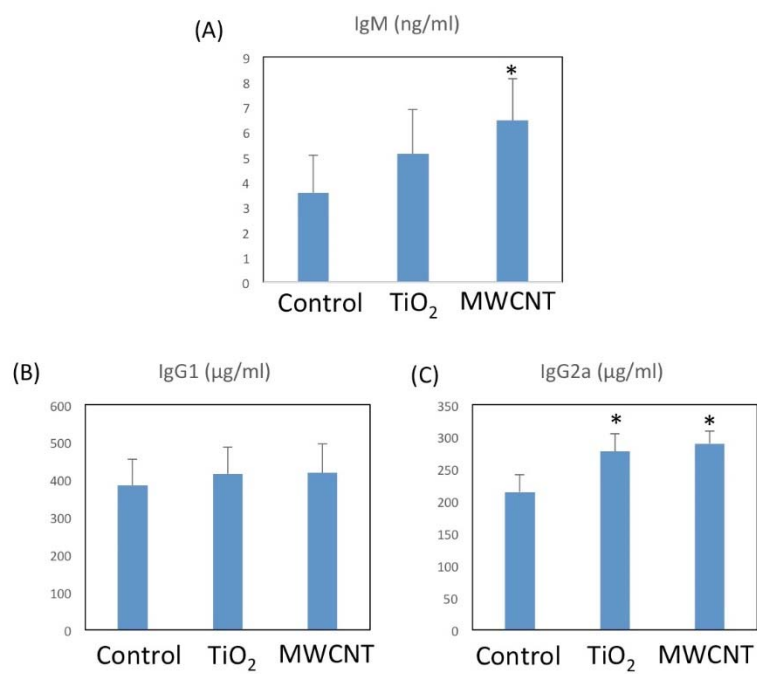


図10. 血清中のイムノグロブリンCD4⁺T細胞数

(A) IgM濃度

(B) IgG1濃度

(C) IgG2a濃度

データ=平均値±SD (各群N=8-10)

平成 28 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

分担研究課題名: ナノマテリアルの慢性影響評価系に関する研究および国際動向調査

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 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
坂本 義光 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
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
猪又 明子 東京都健康安全研究センター 薬事環境科学部 科長
中江 大 東京農業大学 応用生物科学部 教授
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

研究要旨

本研究では、ナノマテリアル曝露による生体毒性の慢性及び遅発毒性に関わる研究の一環として、多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の腹腔内投与および気管内投与による発がん性と、催奇形性について解析を行っている。MWCNT-7の腹腔内投与により誘発されるラット腹膜中皮腫の経時的な観察において、少なくとも32週間にわたって腹腔内の炎症反応が持続し、腹膜周囲でCINC-1やMCP-1等の分泌が亢進することが示された。病理組織学的には、投与8週後より、観察期間を通して肉芽腫形成、中皮下組織の肥厚、肥満細胞および好酸球の集簇が腹膜全般に認められた。16週から24週後にかけて、腹膜表層の組織球の集簇は減少し、間質で線維化が進行した。また、3種のMWCNTの単回噴霧投与終生飼育実験(投与後156週迄)を行った結果、SD-1およびMWNT-7投与群で中皮腫が胸腔内あるいは腹腔内で有意ではないが単発的に認められた。投与検体の前処理がMWCNTの腹腔内投与発がん性に与える影響を検討した実験において、投与後44週が経過し、低濃度群および対照群を除く各MWCNT投与群で、中皮腫によると思われる死亡が27週後から認められた。中皮腫による死亡数の中間評価では、熱処理でその誘発能が減弱した催奇形性とは異なり、熱処理によりMWCNTの発がん性が顕著に変化する可能性は少ないことが考えられる。また、OECDやEUの活動において規制当局、産業界に提言するナノマテリアルの評価に必要な評価手法に関して、H28年度に行われた専門家会議などの国際動向を調査した。

A. 研究目的

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、我々は体内残留性に基づ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。本研究では、MWCNT によるラット中皮腫誘発の経過とそのメカニズム解析と気管内投与による発がん誘発能について解析を行っている。

B. 研究方法

MWCNT によるラット中皮腫誘発過程の経時的観察

MWCNT の腹腔内投与により誘発されるラット腹膜中皮腫について、その発現前から発現までの病理組織学および免疫学的性状を経時的に解析した。MWNT-7 を 2%CMC 溶液に懸濁分散させ、1mg/kg 体重の用量で F344 雄性ラット (8 週齢) の腹腔内に単回投与した。8・16・24・32 週間目後に各々 10 匹から 15 匹を解剖し、病理学的検索と、腹腔洗浄液の各種液性因子 (IL-1 β ・4・6・10・12、TNF- α 、IFN- γ 、CINC-1、MCP-1/CCL-2、CTGF、メソテリン) の濃度測定を行った。

ラットにおける多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の経気管噴霧単回投与および投与後終生飼育実験

MWCNT を経気管単回投与後、終生飼育実験を行うことで、長期間に亘って体内に滞留する MWCNT の呼吸器系及び体腔中皮への影響、また加齢に伴って発現する腫瘍性及び非腫瘍性病変発現に対する影響について

観察した。3 種の MWCNT {MWNT-7 : 平均長、5.48 μ m、径、66.8nm ; SD-1 : 平均長、4.51 μ m、径、177nm ; SD-2 : 長さ 3 μ m、径 10-15nm (提供企業データ)} をそれぞれ 2%CMC 溶液に懸濁分散させ、0.5mg/kg 体重の用量で F344 雄性ラット (10 週齢) 各群 15 匹に、経気管肺内噴霧法 (TIPS) により単回投与した。動物はいずれも投与後終生飼育し、途中死亡例および瀕死屠殺例について、病理組織学的解析を行った。

投与検体の前処理が MWCNT の発がん性に与える影響

熱処理 (250 $^{\circ}$ C、2 時間) が、MWCNT のマウス催奇形性の結果に影響を与えることが示されたため、熱処理 MWCNT を用い、ラット腹膜中皮腫の誘発性を検討することとした。また、熱処理は懸濁媒への分散性に影響することが疑われたため、Taquann 処理 MWCNT についても検討した。MWNT-7 に対し、熱処理あるいは Taquann 処理を施し、0.1%Tween80 に懸濁分散させ、以下の用量で 7 群 (①から⑦) の F344 雄性ラット (10 週齢) 各群 20 匹に、腹腔単回投与し、途中死亡例および瀕死屠殺例について、病理組織学的解析を行った : ①Taquann 処理 CNT、1mg/kg 体重 (高濃度)、②Taquann 処理 CNT、0.05mg/kg 体重 (低濃度)、③熱処理後-Taquann 処理 CNT、1mg/kg 体重 (高濃度)、④熱処理後-Taquann 処理 CNT、0.05mg/kg 体重 (低濃度)、⑤未処理 CNT、1mg/kg 体重、⑥熱処理 CNT、1mg/kg 体重、⑦対照。

国際動向調査

H28 年 4 月に EU のホスト (ブリュッセル) で開催された「産業用ナノマテリアルの有害性評価におけるグループ及びカテゴリー評価に関する OECD 専門家会合 (The OECD

Working Party on Manufactured Nanomaterials (WPMN) Expert Meeting on Grouping and Read-Across for the Hazard Assessment of Manufactured Nanomaterials)」と H28 年 11-12 月に OECD 本部の会議センター(パリ)開催された「ProSafe と OECD の合同科学会議(Joint scientific conference of ProSafe & OECD)」,および H29 年 2 月に EU の FP7 プロジェクトで開催(マラガ)された「ナノ材料安全性評価における新規ツールとアプローチ会議 (New tools and approaches for nanomaterial safety assessment)」の調査を行った。

<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、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

MWCNT によるラット中皮腫誘発過程の経時的観察

病理組織学的に、肉芽腫形成、中皮下組織の肥厚、肥満細胞および好酸球の集簇が投与 8 週間より、観察期間を通して腹膜全般に認められた。一方、腹膜表層の組織球の集簇は 16 週から 24 週にかけて減少し(表 1)、間質では線維化が進行した。投与後 16 週に中皮細胞の過形成が初めて観察され、32 週にはほとんどの個体に中皮腫が認められた(表 2)。腫瘍は、結節状あるいは肥厚した被膜状に腹膜全般にびまん性に広

がっていた。腫瘍組織は、長円形あるいは維芽細胞様の細胞が多く、免疫組織化学的に E-Cadherin は最表層の細胞を除き陰性であり、Desmin がびまん性に陽性であることなど、間葉系の性質が強い傾向を示した。投与 32 週後は、24 週後に比べ、細胞形態および組織像が比較的多様で、周辺組織への浸潤等悪性度が高かった(図 1)

また、腹腔洗浄液中の各種分子のうち、CINC-1、MCP-1/CCL-2、CTGF、メソテリン濃度は、各時期とも投与群が対照群より有意に高値であるが、経時的な傾向や組織変化との関連は明らかでなかった(図 2)。

ラットにおける多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の経気管噴霧単回投与および投与後終生飼育実験

投与後 156 週で実験を終了した。対照群を含む全個体について、途中死亡あるいは瀕死の動物の剖検を実施した。投与後 104 週までの体重及び生存率には、対照群と各投与群間で顕著な差はなかった。

解剖時の肉眼的観察および組織所見から、いずれの MWCNT を投与した群においても、縦隔リンパ節および肺表面に MWCNT の沈着が認められ、単回投与によって摂取された MWCNT が非常に長い期間、体内に滞留し続けることがわかった。

組織学的に、胸腔内あるいは腹腔内で中皮腫が SD-1 および MWNT-7 投与群のみで見られたが、いずれも単発的な発現であった(有意差なし)(表 3)。肺の増殖性病変および腫瘍性病変の発現率についても投与との関連は認められなかった。また、全群に共通した変化として、単核細胞白血病、精巢間細胞腫、下垂体腫瘍および皮下線維腫

などが認められた(表3)。これらの腫瘍の発生率について投与による影響を疑わせるものはなかった。

投与検体の前処理が MWCNT の発がん性に与える影響

投与後 44 週を経過し、低濃度群および対照群を除く各 MWCNT 投与群で、中皮腫によると思われる死亡が 27 週後から認められた。各群 20 匹中の解剖例数は以下の通りである。

①Taquann 処理 CNT、1mg/kg 体重(高濃度): 18/20、②Taquann 処理 CNT、0.05mg/kg 体重(低濃度): 0/20、③熱処理後-Taquann 処理 CNT、1mg/kg 体重(高濃度): 9/20、④熱処理後-Taquann 処理 CNT、0.05mg/kg 体重(低濃度): 0/20、⑤未処理 CNT、1mg/kg 体重: 10/20、⑥熱処理 CNT、1mg/kg 体重: 14/20、⑦対照: 0/20。

⑤群と⑥群の早期死亡の各 1 例ずつを除き、肉眼所見から、すべての個体で中皮腫の発現が認められた

国際動向調査

OECD WPMN Expert Meeting on Grouping and Read-Across for the Hazard Assessment of Manufactured Nanomaterials は、OECD の WPMN プログラムの一環としてナノマテリアルの有害性評価における、グループ評価とリーアクロス手法の適用を検討するために開催されることとなった専門家会合の 1 つで OECD の 22 の代表団体から 69 名の専門家が出席して行われた。当該会議には、当研究班で様々な MWCNT を用いて、腹腔内投与などや *in vitro* 実験を行ってカテゴリー評価を

行った研究成果を紹介した。本会議の主要なアウトプットは、ナノマテリアルの有害性評価におけるデータギャップを埋めるためには、グルーピングとリーアクロス手法は必要であり適切なツールであることであった。しかしナノマテリアルの特性に応じて各種のパラメータのリストを適合させる必要と指針の作成が必要である。そのために、まず OECD の一般の化学物質に対応したグルーピングガイダンスのナノマテリアルに関する章を改定することが合意された。また、今後テストガイドラインやガイダンス改定により信頼性のあるデータを取得し、グルーピングやリーアクロスに関連したパラメータの同定を進めるべきであることが示された。

Joint scientific conference of ProSafe & OECD は、OECD 主催でオランダのインフラ・環境省が調整し、EU H2020 プロジェクト ProSafe がホストした会議であると同時に EUNANoREG の最終会議でもあった。会議の結果は、ナノ物質の影響とリスクをどのように試験・評価するかについて、政策立案者、規制当局、産業界に ProSafe プロジェクトから勧告するために基礎となる。また、OECD 試験ガイドラインプログラムにも提供される。会議は物化性状の同定評価、暴露評価、環境動態・代謝、ヒト健康および環境影響とそれらの評価戦略と幅広い分野で議論が行われた。ヒト健康に関する *in vivo* データの評価に関しては、現存の吸入試験は、ナノマテリアルの評価に適用できるが、可能であれば肺負荷量を計測し、グルーピングのパラメータとして検討する他に代替試験法の開発に重要な因子となるかもしれない。吸入試験結果、*in vitro* 試験

結果、短期吸入試験結果などをリンクできるベンチマーク基準の開発が必要であること、*in vitro* 関係では、試験法の標準化の必要性に加えて、経口暴露毒性評価、免疫毒性評価、線維化のための *in vitro* 評価系が現状で不足していることなどが、結論として採用された。

New tools and approaches for nanomaterial safety assessment は、EU の FP7 プロジェクトで行われたナノマテリアルの安全性にかかわる 5 つのプロジェクト NANOSOLUTIONS、GUIDEnano、SUN、NanoMILE、eNanoMapper が共同で開催した会議である。ナノマテリアルの安全性分野の今後の研究プログラムの可能性に関する議論を促進するためにプロジェクト成果を発表することを目的としている。会議のトピックスとしては、ナノ対応製品のライフサイクルに沿ったハザード評価と暴露評価、リスクアセスメントと管理、ナノ安全評価におけるシステム生物学のアプローチ、ナノマテリアルの特徴とグルーピング、ナノセーフティインフラ、セーフバイデザイン（設計による安全性）と広範囲であった。しかし、詳細な解析やモデリングは、溶解性が高いことから培養細胞を用いた試験において短期に強い反応が出やすい酸化金属系のナノマテリアルに偏っているという指摘がなされるなど、更なるデータの集積が必要であるという報告が多かった。

D. 考察

MWCNT の腹腔単回投与後の経時観察から、少なくとも 32 週間にわたって炎症反応が持続し、腹膜周囲で CINC-1 や MCP-1 等の分泌が亢進することが示された。投与 16 から 24

週後の時期は、障害修復に関連した反応が減弱し、中皮細胞の増殖が開始するため、中皮腫発症に関連した質的変化が起こる時期と推察される。本実験で見られた中皮腫の初期像として長円形から類円形の細胞が、肥厚した中皮下組織と境界不明瞭に、被膜状に増生しているのが特徴的であった。

気管内単回噴霧投与の終生飼育実験から、今回の条件下においては、MWCNT は呼吸器系の腫瘍あるいは中皮腫を誘発せず、その他臓器の自然発生性の腫瘍の発現率にも影響を与えなかった。しかしながら、SD-1 および MWNT-7 投与群でのみ、体腔での中皮腫が数例認められており、長期間体内に滞留した MWCNT の中皮組織に対する影響の可能性も考えられる。今回とは別の日機装の MWCNT の単回気管内投与により、体腔内に中皮腫を有意に誘発した報告を再現していると考えられる。

熱処理 MWCNT の腹膜中皮腫誘発性については実験が継続中であるが、催奇形性とは異なり、熱処理により MWCNT の毒性が顕著に変化することは無いと考えられる。投与 104 週まで実験を継続し、生存率および生存曲線の解析あるいは病理組織学的解析から、熱処理および Taquann 処理の影響を分析する予定である。

国際動向調査の結果、様々なナノマテリアル製品を現実的に評価するためには、グルーピングなリードアクロス評価手法を使う必要があることは、基本的な認識として定着していることが示された。さらに、現実的な評価のために *in vitro* や短期の試験系が必要であるが（長期間の）*in vivo* 試験結果との間をつなぐパラメータの同定には至っていないのも現状であることが認識されている。OECD_WPMN では、炎症反

応などを標的とした AOP(毒性発現経路)の開発プロジェクトが開始されているが、ナノマテリアルによって引き起こされる慢性影響のメカニズム解析を行うことが、今後評価系の確立にもっとも上葉なことであると再認識できた。

E. 結論

MWCNT-7 の腹腔内投与により誘発されるラット腹膜中皮腫の経時的な観察において、少なくとも 32 週間にわたって腹腔内の炎症反応が持続し、腹膜周囲で CINC-1 や MCP-1 等の分泌が亢進することが示された。病理組織学的には、投与 8 週後より、観察期間を通して肉芽腫形成、中皮下組織の肥厚、肥満細胞および好酸球の集簇が腹膜全般に認められた。16 週から 24 週後にかけて、腹膜表層の組織球の集簇は減少し、間質で線維化が進行した。

また、3 種の MWCNT の単回噴霧投与終生飼育実験(投与後 156 週迄)を行った結果、SD-1 および MWNT-7 投与群で中皮腫が胸腔内あるいは腹腔内で有意ではないが単発的に認められた。

投与検体の前処理が MWCNT の腹腔内投与発がん性に与える影響を検討した実験において、投与後 44 週が経過し、低濃度群および対照群を除く各 MWCNT 投与群で、中皮腫によると思われる死亡が 27 週後から認められた。中皮腫による死亡数の中間評価では、熱処理でその誘発能が減弱した催奇形性とは異なり、熱処理により MWCNT の発がん性が顕著に変化する可能性は少ないことが考えられる。

また、OECD や EU の活動において規制当局、産業界に提言するナノマテリアルの評価に必要な評価手法に関して、H28 年度に

行われた専門家会議などの国際動向を調査した。

F. 健康危機情報

該当無し

G. 研究発表

(論文発表)

Suzui M, Futakuchi M, Fukamachi K, Numano T, Abdelgied M, Takahashi S, Ohnishi M, Omori T, Tsuruoka S, Hirose A, Kanno J, Sakamoto Y, Alexander DB, Alexander WT, Jiegou X, Tsuda H., Multiwalled carbon nanotubes intratracheally instilled into the rat lung induce development of pleural malignant mesothelioma and lung tumors. *Cancer Sci.* 107, 924-935. 2016.

Shigemoto-Mogami Y, Hoshikawa K, Hirose A, Sato K., Phagocytosis-dependent and independent mechanisms underlie the microglial cell damage caused by carbon nanotube agglomerates. *J Toxicol Sci.* 41, 501-509. 2016.

(学会発表)

Akihiko Hirose, Yoshimitsu Sakamoto, Tomoko Nishimaki-Mogami, Yuhji Taquahashi, Takashi Yamada, Tetsuji Nishimura, Akiko Inomata, Dai Nakae, Hiroyuki Tsuda and Jun. Analysis of size-dependent carcinogenic potential of multiwalled carbon nanotubes. *Global Cancer: Occurrence, Cause, and Avenues to Prevention. IARC 50th Anniversary Conference (2016.6), Lyon, Poster.*

Hirose A, Cui H, Ema M, Kanno J, Tsuda

- H, Nishimaki-Mogami T,
Comparison with the NLRP3
inflammasome activations in THP-1
cells by various nanomaterial. 第 14 回
国際毒性学会 (ICT2016), (2016.10),
Merida, Mexico, Poster.
- 北條幹、坂本義光、山本行男、長谷川悠子、
多田幸恵、久保喜一、長澤明道、海鉦藤文、
高橋博、湯澤勝廣、安藤弘、田中和良、矢
野範男、藤谷知子、小縣昭夫、猪又明子、
広瀬明彦、中江大:MWCNT によるラット中
皮腫誘発過程の経時的解析. 第 43 回日本
毒性学会学術年会(2016 年 6 月 29 日~7
月 1 日)名古屋市
- Tsuda H, Xu J, Alexander DB, Alexander
WT, Mohamed Abd El-gied, Suzui M,
Futakuchi M, Fukamachi K, Numano
T, Takahashi S, Ohnishi M, Hirose A,
Kanno J, Development of a series of
assay model of toxicity and
carcinogenicity of carbon nanotubes.
2016 Korean Association for Laboratory
Animal Science, 慶州, Korea, Aug.
24-26,2016
- Tsuda H, Alexander DB, Alexander WT,
AbdElgied M, ELGazzar A, Xu J,
Numano T, Suzui M, Futakuchi M,
Fukamachi K, Hirose A, Kanno J,
Development of a Mechanism Based
Short-term Assay Protocol to Test
Carcinogenicity of Multiple Wall
Carbon Nanotubes (MWNCTs) in the
Rat. XIV International Congress of
Toxicology, Merida, Mexico, Oct. 2-6,
2016
- Kobayashi N, Tanaka S, Ikarashi Y,
Hirose A., Developmental toxicity
assessment of various sizes of
multiwall carbon nanotubes in mice
after repeated intratracheal
instillation to initiate grouping and
read across. Society of Risk Analysis
2016 Annual Meeting. San Diego,
U.S.A., Dec 11-15, 2016.
- 坂本義光、広瀬明彦、中江大:多層カーボン
ナノチューブ(MWCNT)を経気管反復投与
したラットに見られた肺胞過形成病変に関
する病理組織学的解析. 第 75 回日本癌学
会学術総会(2016 年 10 月 6 日~8 日)横浜
市
- 北條幹、坂本義光、山本行男、長谷川悠子、
多田幸恵、湯澤勝廣、広瀬明彦、猪又明
子、中江 大:多層カーボンナノチューブ
によるラット中皮腫誘発過程の経時的観察.
第 33 回日本毒性病理学会学術集会(2017
年 1 月 26 日~27 日)堺市
- 坂本 義光、北條 幹、広瀬 明彦、猪又 明
子、中江 大:ラットにおける多層カーボン
ナノチューブ(CNT) の発がん性と phenyl
N -tert-butyl nitron (PBN) 併用が及ぼ
す影響. 第 33 回日本毒性病理学会学術
集会(2017 年 1 月 26 日~27 日)堺市
- 寺田央子、加藤雄大、橋口誠子、権藤喜貴、
広瀬明彦、宮内亜宜、明石 敏、吉田裕樹、
杉田千泰、黒川昌彦、渡辺 渡 チタン酸
カリウム曝露の RSV 肺炎への影響 日本
薬学会第 137 年会、27PB-am155、
2017 年 3 月、仙台国際センター
- 渡辺 渡、権藤喜貴、橋口誠子、加藤雄大、
広瀬明彦、宮内亜宜、明石 敏、吉田裕樹、
杉田千泰、黒川昌彦 多層型カーボンナノ
チューブ曝露による RSV 感染初期応答へ
の影響 日本薬学会第 137 年会、
27PB-am154、 2017 年 3 月、仙台国際
センター
- 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)

表 1. 腹膜における組織球/マクロファージを含む炎症巣の程度

炎症の程度	8週後 (7)	16週後 (11)	24週後 (14)	32週後 (13)
-	0	0	1	3
+	1	0	6	10
++	2	8	3	0
+++	4	3	0	0

カッコ内は観察例数，脾臓周囲の間膜の標本観察による評価

-: 病変無しあるいはほとんど無し, +: 軽度, ++: 中程度, +++: 多数の炎症巣が散見される

表 2. 増殖性病変の発現頻度

(観察例数)		8週後 (7)	16週後 (11)	24週後 (14)	32週後 (13)
増殖性なし	-	7	5	4	0
過形成	+	0	4	5	3
	++	0	2	1	0
	+++	0	0	1	0
中皮腫	+	0	0	2	3
	++	0	0	0	2
	+++	0	0	1	5

表 3. 経気管噴霧単回投与および投与後終生飼育実験における組織所見
(腫瘍性病変および肺における過形成)

Body systems	Neoplasms	Control (Vehicle)	SD2	SD1	MWNT-7
		14 ^{a)}	15	15	17
Central nervous system					
Brain	Meningiosarcoma	0	0	1(7)	0
Hemato/lymphopoietic tissue					
Systemic	Leukemia	7(50)	7(45)	6(40)	10(59)
Respiratory system					
Lung	Bronchiol-alveolar adenoma	1(5)	1(7)	1(7)	1(6)
	Bronchiol-alveolar carcinoma	1(5)	0	0	0
	Bronchiol-alveolar hyperplasia	1(5)	1(7)	1(7)	0
Stomach	Leiomyosarcoma	0	1(7)	0	0
Pancreas	Achinar cell adenoma	0	0	0	2(12)
	Achinar cell carcinoma	0	1(7)	0	0
Endocrine system					
Pituitary gland.	Pars dtalis adenoma	3 (21)	4(27)	1(7)	1(2)
	Pars intermedia adenoma	0	0	0	0
Thyroid gland	C-cell adenoma	5(36)	3(20)	3(20)	3(18)
Aderenal gland	Pheocromoacytoma	1(5)	2(13)	0	1(6)
	Pheocromoacytoma, malignant	0	0	0	1(6)
Pancreas islet cell	Islet cell adenoma	6(43)	5(33)	2(13)	5(29)
	Islet cell carcinoma	0	1(7)	0	0
Reproductive system					
Testis	Interstitial cell tumor	12(86)	11(73)	11(73)	14(82)
Prostate	Adenoma	1(5)	0	0	0
Prepeutial gland	Acina cell adenoma	1(5)	2(10)	0	0
Pleural cavity	Mesothelioma	0	0	1(7)	0
	Hemangiosarcoma	0	1(7)	0	0
	Osteosarcoma	0	0	1(7)	0
Peritoneal cavity	Mesothelioma	0	0	2(13)	1(5)
	Cordoma	0	0	1(7)	1(6)
	Lipoma	0	0	1(7)	0
Skin	Squamous cell carcinoma	0	0	1(7)	0
Subcutis/mammary gland	Fibroma	3(21)	5(33)	1(7)	5(29)
	Fibrosarcoma	1(5)	0	0	0
	Fibroadenoma	0	0	2(13)	0
Zymbal's gland	Adenoma	0	0	0	0

a) Number of rats observed, b) Number of rat with tumor, c) Incidence of tumor (%).

* p<0.05. Control vs 0.25mg/kg group. M; malignant tumor

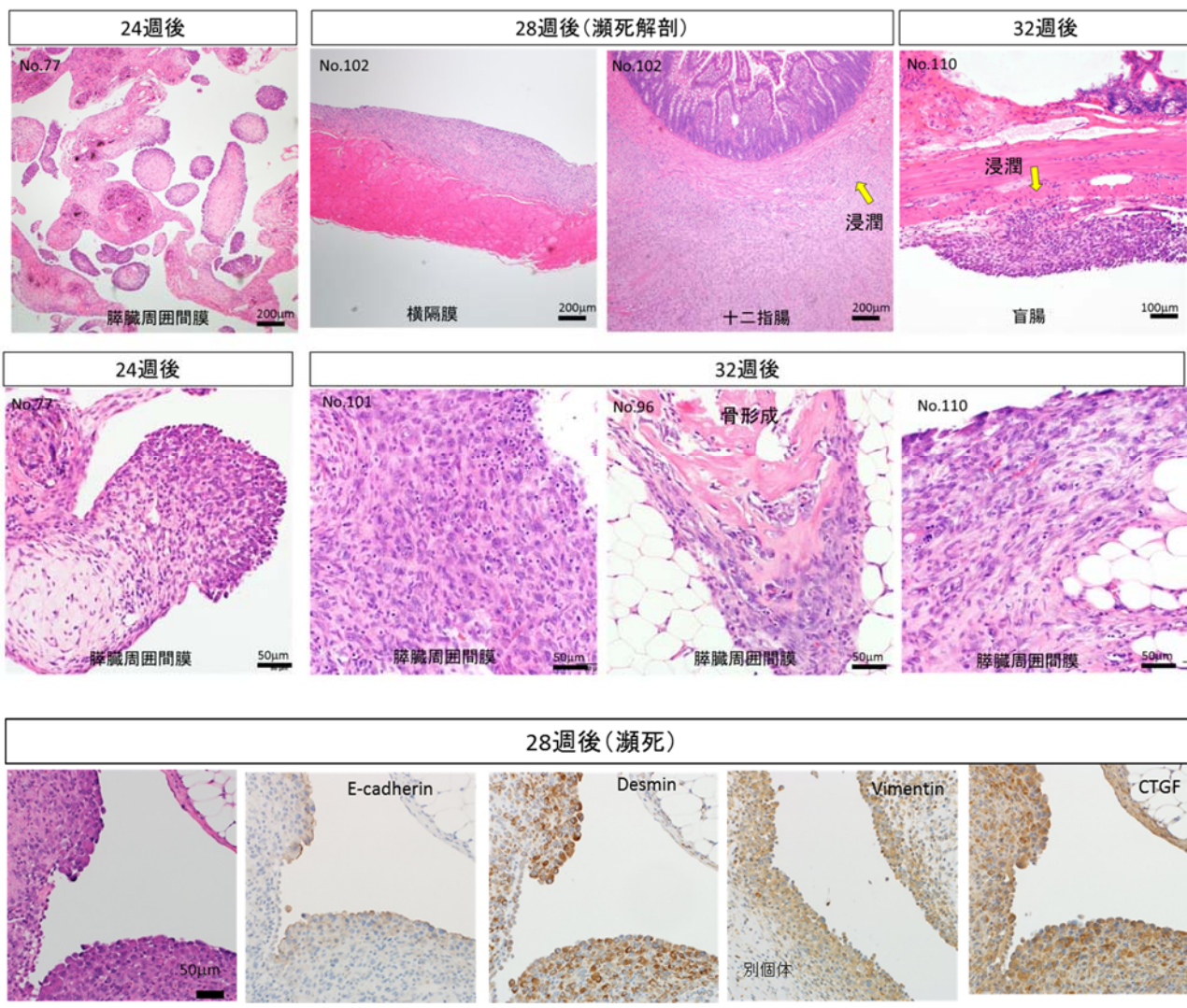


図1 腹膜中皮腫の典型的な組織像（H&E）および免疫組織染色

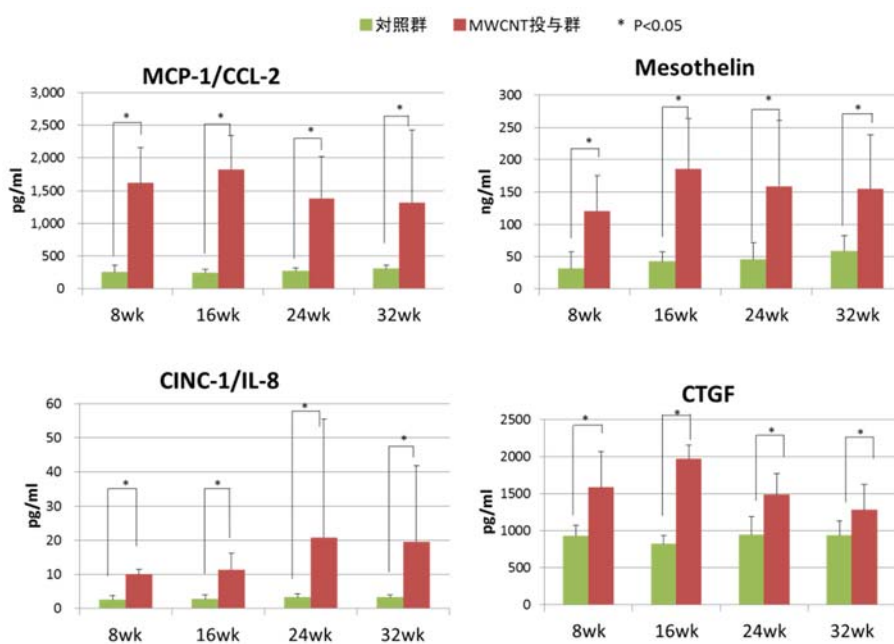


図2 腹腔洗浄液中の液性因子

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
菅野 純	ナノマテリアル毒性のとらえ方とその難しさ	医学のあゆみ	259(3)	217-222	2016
高橋祐次	高分散型小型全身曝露吸入システムによるマウス吸入毒性-ヒトの現実的な曝露シナリオに基づいたナノマテリアルの吸入毒性評価の迅速化と効率化に向けて-	医学のあゆみ	259(3)	234-240	2016
津田洋幸	カーボンナノチューブの肺と胸膜中皮に対する毒性と発がん性の簡易評価法	医学のあゆみ	259(3)	223-227	2016
石丸直澄	ナノマテリアルと免疫システム	医学のあゆみ	259	241-246	2016
Suzui M, Futakuchi M, Fukamachi K, Numano T, Abd Elgied M, Takahashi S, Ohnishi M, Omori T, Tsuruoka S, Hirose A, Kanno J, Sakamoto Y, Alexander DB, Xu J, Tsuda H.	Multiwalled carbon nanotubes intratracheally instilled into the rat lung induce development of pleural malignant mesothelioma and lung tumors.	Cancer Sci		doi: 10.1111/ cas. 12954	2016
Horibata K, Ukai A, Ogata A, Nakae D, Ando H, Kubo Y, Nagasawa A,	Absence of in vivo mutagenicity of multi-walled carbon nanotubes in single intratracheal instillation study using F344 gpt delta rats.	Genes Environ.	39:4	doi: 10.1186/ s41021-0 16-0065-	2017

別添5

Yuzawa K, Honma M.				5. eCollection	
Shigemoto-Mogami Y, Hoshikawa K, Hirose A, Sato K.	Phagocytosis-dependent and independent mechanisms underlie the microglial cell damage caused by carbon nanotube agglomerates.	J Toxicol Sci.	41	501-509	2016