

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27年度～29年度 総合研究報告書

研究代表者 広瀬 明彦

平成30年(2018年)3月

## 目 次

I. 総合研究報告書	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、菅野 純、高橋 祐次、津田 洋幸、小林 憲弘、本間 正充、最上 知子、渡辺 渡、石丸 直澄、北條 幹	2
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	16

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

I . 総合研究報告書

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)  
総合研究報告書(平成27年度～平成29年度)

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、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的とした。

検討材料としては、毒性が明らかとなっている多層ナノチューブ(MWCNT)に加えて、同様の形状で化学組成の異なるチタン酸カリウムと繊維形状の異なる二層ナノチューブを用いた。毒性エンドポイントとしては、これまでの研究で *in vivo* 影響が比較的明確化している発がん性を含む慢性影響、免疫系への影響、次世代への発達に関する影響を評価した。慢性影響検討では、taquann 法で分散した吸入および気管内噴霧試験と遺伝毒性評価法を、免疫影響については免疫系異常動物モデルや感染性免疫評価動物モデルを用いた分子生物学的解析を、次世代への影響については、催奇形性に関与する因子の解析を中心に行った。

慢性影響に関する研究として、Taquann 法を適用してチタン酸カリウム及び繊維長が異なる 3 種類の二層ナノチューブを実際にマウスに単回及び反復吸入曝露し経時的な曝露肺のサンプリングにより、肺への影響と肺内負荷量測定を行った。いずれの検体も曝露初期には急性炎症像は認められず、チタン酸カリウムについては、曝露後 26 週の肺において増殖性の病変は認められたが肉芽腫及び線維化は認められなかった。経気管肺内噴霧法を用いた研究では、現在、チタン酸カリウムの長期観察実験を実施中である。分散性の異なる MWNT-7 は腹腔投与による MWNT-7 の中皮腫発症能には影響しないことがわかり、母体への急性的な影響と慢性影響とは作用が異なることが示唆された。遺伝毒性評価に関しては、*in situ* 肺小核試験法を確立し、Taquann 法処理した MWNT-7 を全身暴露させ、小核試験を実施した結果、高い頻度で小核の誘発を観察した。免疫システムへの影響に関して、MWCNT は腹腔内でのマクロファージの分化異常を介して、全身の免疫制御システムあるいは抗体産生機構に影響を及ぼす可能性が示された。チタン酸カリウム投与後のマクロファージ活性化を MWCNT 投与と比較すると、マクロファージの集簇が有意に低いことが判明した。感染性への影響に関して、チタン酸カリウムは MWNT-7 よりは炎症の程度は弱いですが、同様に感染初期からの RSV 肺炎の増悪化を示すことを確認し、二層カーボンナノチューブの肺炎の増悪化効果も認めた。Invitro 系では各種多層カーボンナノチューブ、チタン酸カリウム、二層ナノチューブは、いずれもマクロファージに NLRP3 インフラマソームを介した IL-1 $\beta$  分泌を促進することを明らかにした。多層ナノチューブでは

NLRP3 を介した TNF  $\alpha$  分泌も促進され、分泌された IL-1  $\beta$  のオートクラインによる機構が判明した。発  
生影響に関する検討では、気管内投与における MWNT-7 の分散性の違いは、妊娠マウスの呼吸器  
に異なった影響を与え、それが胎児の発育不良に関係することを示した。ナノマテリアルの毒性評価手  
法に関する国際動向調査では、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ことが指摘されていたが、同時に、慢性影響の in vivo 試験データが現時  
点で不足していることも浮き彫りとなった。さらに、最近の OECD の動向からは、ナノマテリアルの評価  
手法の国際的な標準化を目指して、OECD テストガイドラインやガイダンスの改定活動が本格化してきて  
おり、EU を中心に様々なプロジェクトが立ち上がりつつある。

以上のことより、ナノマテリアルの評価手法としての吸入曝露および気管内投与手法、in vitro 評価  
系において、MWCNT、チタン酸カリウムや二層ナノチューブに Taquann 法が有効であることを示す  
ことができた。しかし、現実に規制当局でのリスク評価で使用されるのは吸入曝露手法であるが、全  
てのナノマテリアルで慢性吸入曝露試験を行うのは不可能である。今後は、本研究班で検討している慢性  
影響評価に関する成果についても、OECD のガイダンス等に取り入れられるように、本研究で確立した  
吸入試験法や気管内投与手法を生かして、より短期の吸入曝露や気管内曝露試験法、in vitro 評価  
系試験法から慢性影響を評価できることを示すデータを積み上げて OECD 等に提案できるような実証  
研究を行っていくことが必要であると考えられた。

## 研究分担者

菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所  
安全性予測評価部 客員研究員  
高橋 祐次 国立医薬品食品衛生研究所  
毒性部 第三室長  
津田 洋幸 名古屋市立大学 津田特任教授  
研究室 特任教授  
小林 憲弘 国立医薬品食品衛生研究所  
生活衛生化学部 第三室長  
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  
生化学部 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・微生物学 教授  
石丸 直澄 徳島大学大学院医歯薬学研究部  
教授  
北條 幹 東京都健康安全研究センター  
薬事環境科学部 主任研究員

## A. 研究目的

およそ 10 年近くにわたり OECD 等が取り組  
んできているものの、ナノマテリアルに適した体  
系的な評価アプローチが未だ見いだせない状  
況である。我々は、本問題に関する研究開始  
当初より体内残留性に伴う慢性影響が最も懸  
念すべき健康影響であるとの認識に則り、in  
vivo 試験研究を進めてきており、アスベストに  
形状が類似した多層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 in vivo 影  
響を解析することこそが in vitro 試験系開発に  
有用な知見の集積に必要であることを示しつ  
つある。そこで、本研究では in vivo 研究にお  
いて MWCNT を用いて得られた知見を基にナノマ  
テリアルの体系的な評価手法の確立を目指し、  
同様の形状を持ちながら化学組成の全く異  
なるチタン酸カリウムと繊維形状の異なる二層  
ナノチューブについて、高分散手法 (taquann 法)  
を適用しつつ、検討材料として選択することに

より、国際的に信頼性が高い安全性評価指針策定や試験法ガイドラインの改訂などに必要な科学的なエビデンスの集積を目的とする。

## B. 研究方法

本研究では、これまでの研究で *in vivo* 影響が比較的明確化している発がん性を含む慢性影響と、今後その影響への関心が高くなると考えられている免疫影響および発生影響に関する評価法を解析する研究体制を構築している。これまでに研究対象としてきた多層ナノチューブ (MWCNT) や酸化チタンに加えて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っている。また、H27 年度に、MWNT-7 の投与液の分散性の違いが催奇形性の強さに影響を及ぼしていたことが示唆されたため、その再現性と検証のための実験を開始した。

**慢性影響評価手法検討:** チタン酸カリウム及び繊維長が揃った3種類の二層ナノチューブ (DWCNT) に Taquann 法を適用して高分散化処理を行い、カートリッジ直噴式全身暴露吸入装置により C57BL/6 マウスに2時間/日の単回または5日間反復吸入曝露を行い肺沈着量及び肺病変について調べた。チタン酸カリウムは MWCNT に比較して比重が大きくエアロゾルの沈降が速い性質を有するため、吸入曝露実験プロトコルの検討を行った。DWCNT は岡山大学工学部の林靖彦先生が考案した製造法により合成された、繊維長が1  $\mu\text{m}$ 、7  $\mu\text{m}$  及び15  $\mu\text{m}$  の3種類について検討した。これらは高純度・高結晶の CNT で繊維径は1~3nm である。検体は、触媒となる鉄をコーティングしたシリコン基板 (20 mm $\times$ 20 mm) に高密度 ( $2.8 \times 10^{10}$  本/mm<sup>2</sup>) に垂直方向にブラシ状に合成されている。実験に先立ち、シリコン基板からの剥離方法と

分散方法を検討し、マウスに単回吸入曝露を行った。(高橋、菅野)。気管肺内噴霧投与方法においては、Taquann 法にて分散した線維状のチタン酸カリウムと対象検体として二酸化チタン (anatase 型および rutile 型) を用いて、生食に250と500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  に懸濁し、0.5mL を2週間に8回投与した (1および2mg/ラット)、最終投与の6時間後と4週後に、急性/亜急性毒性を解析した。また、慢性毒性・発がん性併合実験も進行中である (津田)。MWCNT 腹腔内投与による中皮腫誘発のメカニズム解析の一環として投与後8・16・24・32週間後に腹腔内洗浄液のサイトカイン・ケモカイン等の液性因子の経時変化を観察し、中皮腫発症の初期に発現変動するタンパク質の探索を行った。また、H27年度に熱処理 (250 $^{\circ}\text{C}$ , 2時間) が、MWCNT の催奇形性の結果に影響を与えることが予備的に示されたため、熱処理および Taquann 処理による懸濁液の分散性の違いが、ラット腹腔中皮腫の誘発性 (10週齢の F344 雄ラット、20匹/群) に影響を及ぼすかについて検討した。(北條)。遺伝毒性評価においては、マウスに Taquann 法処理した MWNT-7 を20  $\text{mg}/\text{m}^3$  で、1日2時間、5日間全身曝露させ、肺細胞を分離、培養し、肺での小核誘発性を検討した。(本間)。

**免疫影響評価法検討:** 免疫システムへの影響評価に関しては Taquann 処理を施した多層化カーボンナノチューブ (MWCNT) またはチタン酸カリウムを腹腔内に投与することによって誘導される慢性腹膜炎の病態におけるマクロファージを中心と免疫制御システムの解析についてマウスを用いて実施した。二層ナノチューブの腹腔内に投与実験実施した (石丸)。感染性免疫系への影響に関する研究に関しては、Taquann 処理 MWNT-7 とチタン酸カリウムについて、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後、RSV をマウスに感染させ、1,5 および 14 日後の肺病理組織と肺胞洗浄液中のサイトカインを解析した。また、二層カーボンナノチューブは、3 種類の長さの異なったサンプル (DWCNT-1, 1  $\mu\text{m}$ ; -7, 7 $\mu\text{m}$ ; -15, 15  $\mu\text{m}$ ) をそれぞれ同様に複数回曝露して評価を行った (渡辺)。*in vitro* 試験件による検討では、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 $\beta$ 、TNF $\alpha$  を Milliplex 法により測定した (最上)。

③発生影響評価法検討: 同一の多層カーボンナノチューブ (MWCNT) であっても、実験動物への投与時の性状によって影響に差がみられるかどうかを明らかにするため、4 種類の異なる処理をした MWCNT を妊娠 CrIj:CD1(ICR)マウスに妊娠 6, 9, 12, 15 日にそれぞれ 4 mg/kg の用量で反復気管内投与し、妊娠 17 日に帝王切開して母動物への影響及び胎児の発生毒性について評価した。投与した MWCNT は、①原末、②250 $^{\circ}\text{C}$ で 2 時間熱処理したもの (熱処理 MWCNT)、③Taquann 処理により高度に分散化したもの (Taquann 処理 MWCNT)、④Taquann 処理後に②の方法で熱処理したもの (Taquann+熱処理 MWCNT) である。(小林) また、①、②、③について、妊娠 6、9、12 日の 3 回投与し、妊娠 15 日に母体を解剖し、母体の肺の障害性や炎症反応について生化学的・分子生物学的に評価した (北條)。

#### 国際動向調査:

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ダ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は、試験実施機関による動物実験に関する倫理委員会の承認を得るなど、実験動物に対する動物愛護の配慮の上で実施した

### C. 研究結果

#### 慢性影響評価手法検討:

チタン酸カリウムの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 nm、(最大径 1,743 nm)、単位重量当たりの繊維数は、1.2 x 10<sup>6</sup> 本/ $\mu\text{g}$  であった。チタン酸カリウムは比重が大きく (MWNT-7; 1.9-2.1、チタン酸カリウム; 3.3~3.5) 沈降が速いため、噴射間隔を短くする曝露プロトコールにより安定したエアロゾル濃度が得られた。その結果、質量濃度 4.1 mg/m<sup>3</sup>、CPC カウント 7575/cm<sup>3</sup> の条件で 2 時間/日、連続 5 日間の反復曝露を行った。エアロゾル化の効率は 30% であり、MWCNT と同じであった。曝露終了直後の肺負荷量は 15.0  $\mu\text{g}$ /動物であり、繊維数に換算すると 18.0 $\times$ 10<sup>6</sup> 本/動物であった (肺沈着量の繊維数は MWNT-7 と同様の値)。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。曝露 26 週後の曝露肺では一部の個体に細気管支から肺胞周囲に増殖性の病変が観察されたが、肉芽腫及び線維化は観察されなかった。

DWCNT については、まずシリコン基板からの剥離と分散方法について検討した。シリコン基板を 10% 塩酸に浸漬して鉄を溶解後、超純水に浸漬して塩酸を除去

し tert-ブチルアルコールで脱水した。その後、tert-ブチルアルコールを所定量入れたバイアルにシリコン基板を浸漬して低出力の超音波洗浄器(SU-3TH、出力 40W、発信周波数 34kHz、柴田科学株式会社)にて超音波を照射してシリコン基板から DWCNT を剥離し、懸濁液を得た。

分散処理のため、高出力の超音波破碎装置 (サンプル密閉式超音波破碎装置 BIORUPTOR®UCD-250HSA、コスモ・バイオ株式会社) にて懸濁液に 160W×90 秒の処理を行った。これを Taquann 直噴式全身曝露装置に使用するカートリッジに充填し、tert-ブチルアルコールを凍結後、溶媒回収型真空ポンプにて tert-ブチルアルコールを昇華回収し乾燥検体を得た。この方法によりカートリッジ 1 本につきシリコン基板 3 枚分の DWCNT を充填した。カートリッジ 1 本あたりに充填した繊維数は、何れも  $33 \times 10^{12}$  本であるが、重量は 1  $\mu\text{m}$ 、7  $\mu\text{m}$ 、15  $\mu\text{m}$  それぞれ 51  $\mu\text{g}$ 、360  $\mu\text{g}$  及び 765  $\mu\text{g}$  であった。

以上の処理を行った DWCNT を用いて、マウスに 2 時間の単回全身吸入ばく露を実施した。質量濃度は、1  $\mu\text{m}$ : 0.49  $\text{mg}/\text{m}^3$ 、7  $\mu\text{m}$ : 0.51  $\text{mg}/\text{m}^3$ 、15  $\mu\text{m}$ : 0.57  $\text{mg}/\text{m}^3$  であった。CPC によるエアロゾル粒子数の 2 時間の平均値は、1  $\mu\text{m}$ : 76 /mL、7  $\mu\text{m}$ : 83 /mL、15  $\mu\text{m}$ : 145/mL であった。エアロゾル化の効率は 1  $\mu\text{m}$  DWCNT では 68%、7  $\mu\text{m}$  DWCNT では 10%、15  $\mu\text{m}$  DWCNT では 5.3% であり繊維長が長いほど低下した。エアロゾルの形態観察において、原末のサイズよりも長い繊維が観察された。マウスの吸入曝露肺では、15  $\mu\text{m}$  DWCNT の検体において数は少ないものマクロファージに貪食された繊維が観察されたが、1 及び 7  $\mu\text{m}$  の検体においては

光学顕微鏡で検出が困難であった。

チタン酸カリウムの経気管肺内噴霧法を用いた研究では、2 週と 6 週の動物において、H&E 標本の解析で、肺組織中のマクロファージ数は、チタン酸カリウムが最も高値であった。肺組織中の 4 w の anatase 二酸化チタンとチタン酸カリウムは約 1/6 ~ 1/8 に減少したがチタン酸カリウムが一番多く残存した。胸腔内 (縦隔) における残存はチタン酸カリウムが最も多かった。104 週までの慢性毒性・発がん性併合実験は 52 週中間屠殺を行い経過中である。MWCNT の発がんメカニズム研究としては、腹腔洗浄液中の各種分子のうち、CINC-1、CCL-2、CTGF およびメソテリン濃度は、投与後、一貫して有意に高値であったのに対し、投与 32 週後のプロテオーム解析で見つかった Apolipoprotein A-VI は投与群で低値であり、かつ、経時的に減少していた。また、当懸濁液の分散性による中皮腫誘発性の検討実験においては、投与後 63 週以内に高用量の全例の解剖が終わり、Taquann 処理あるいは熱処理された MWCNT は、いずれも未処理と同程度の誘発能であった。一方、in vivo 遺伝毒性評価として、新たに開発した in situ 肺小核試験法において、MWNT-7 はマウスの肺に有意に小核を誘発した。この結果は再現性を認めた。

**免疫影響評価法検討:** 正常 C57BL/6 マウスへの MWCNT の腹腔内投与により、腹腔内の M2 マクロファージの細胞数が増加し、線維化を伴う慢性腹膜炎が観察された。腹腔内マクロファージの IL-5、MMP12 あるいは MMP9 の発現が MWCNT 投与で亢進していた。また、MWCNT 投与によって IgM、IgG2a、IgA 分画のイムノグロブリン濃度が上昇していた。また、チタン酸カリウム投与と MWCNT 投与を比較すると、腹腔

内のマクロファージの集簇数はチタン酸カリウム投与群で有意に減少していた。二層化カーボンナノチューブの腹腔内投与では、繊維長の違いによってマクロファージのスカベンジャー受容体を介した反応に違いが見られた。感染性への検討では、MWNT-7 曝露マウスの感染1日後の肺組織において CCL3 の発現上昇が認められたが、発現細胞と MWNT-7 貪食細胞は異なっていた。感染14日後では、MWNT-7 曝露マウスは肺炎回復の遅延が認められ、マッソントリクロム染色により繊維化の亢進も確認された。一方、チタン酸カリウム曝露マウスにおいて、感染1日後の BALF 中の炎症性サイトカインの上昇が認められ、貪食細胞周囲での炎症形成の亢進も確認された。二層カーボンナノチューブでは、3種類とも肺炎への影響が見られたが、特に最も短い DWCNT-1 曝露の増悪化効果が明確であった。各種多層カーボンナノチューブ MWCNT-WL、-WS、-T、-SD1、および長さの異なる二層カーボンナノチューブ DWCNT(1, 7.5, 15  $\mu$ m)、チタン酸カリウムをマクロファージに暴露し、いずれも NLRP3 を介した IL-1 $\beta$  産生を促進し、caspase-1、ならびにリソソーム酵素 cathepsin B が関与すること、二層ナノチューブは長さに大きく依存することが判明した。多層ナノチューブとチタン酸カリウムは TNF $\alpha$  分泌も NLRP3 を介して強力に促進し、分泌された IL-1 $\beta$  のオートクラインによる TNF $\alpha$  産生促進機構を明らかにした。

**発生影響評価法検討：**4種類の異なる処理をした MWCNT を妊娠マウスに投与した結果、母動物の体重推移は、熱処理 MWCNT 投与群で媒体投与群と比べて有意な低値がみられ、未処理 MWCNT 投与群と Taquann+熱処理 MWCNT 投与群で低値傾向であった。胎児への影響は、対照群と比較して死亡胎児数の増加と生存胎児数の減少が、熱処理 MWCNT 投与群の

みでみられた。また、生存胎児体重の減少が、MWCNT 原末、熱処理 MWCNT、Taquann+熱処理 MWCNT 投与群でみられた。さらに、胎児の外表異常(曲尾&短尾)が、熱処理 MWCNT 投与群で2例(3.8%)みられ、熱処理 MWCNT 投与群において胎児への影響が最も大きい結果となった。内臓および骨格所見の発生頻度についても同様であり、Taquann 処理群は未処理 MWCNT 投与群よりも軽度であり、熱処理群および Taquann 処理+熱処理群は未処理 MWCNT 投与群よりも若干強い影響がみられた。3回の反復投与後に15日目に解剖された妊娠マウスの肺の毒性の強さは、胎仔や胎盤に及ぼす影響の強さとおおむね合致していた。

**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)では、OECD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、当研究班でのこれまでの研究成果を紹介した。Joint scientific conference of ProSafe & OECD (H28年11-12月、パリ)では、欧州におけるナノマテリアル関係のプロジェクト成果をレギュレーションに用いるためのデスカッションが行われた。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ことなどが確認された。H29年4月に開催された OECD WNT テストガイドライン・プログラムのナショナル・コーディネーター作業部会では、ナノマテ

リアル評価に適応させるために吸入試験法のガイドライン TG412 と TG413 (28 日間と 90 日間の吸入毒性試験) の改定が了承された。H29 年 5 月に開催された第 17 回 OECD ナノマテリアル作業会合では、日本は BIAC と共同で、ナノマテリアルの短期間曝露による in vivo 試験 (短期吸入曝露と、気管内投与) の評価手法に関する有効性を検討するプロジェクトを提案したが、H30 年 2 月に開催された第 18 回 OECD ナノマテリアル作業会合では、現在改定が進められている吸入試験法のガイドライン (GD39) の改定作業とのタイミングから延期することとなった。一方この作業会合では、EU が行っている OECD ガイドラインの改訂や新規ガイドラインの作成作業を促進するプロジェクト活動を受けて 7 つの新規プロジェクトが提案された。

#### **D. 考察**

慢性影響に関する研究に関して、MWCNT とは性質が大きく異なるチタン酸カリウムと DWCNT について Taquann 法を適用し全身曝露吸入実験を実施した。

チタン酸カリウムは比重が大きいことからカートリッジからの打ち込み間隔を MWCNT の半分の 4 分にする事で安定した曝露濃度で実験が実施可能であった。一方で、現在保有しているカートリッジ数では 16 匹×1 用量のみの群構成であり、そのため観察期間も 26 週までとなった。肺病変では一部の個体で増殖性の病変が観察されたが、慢性影響の詳細な検討には、動物数を増やしてより長期間の観察が必要である。

DWCNT のマウス全身曝露吸入実験を実施した。暴露チャンバー内に打ち込んだ DWCNT の検体量は長さが 1  $\mu\text{m}$ 、7  $\mu\text{m}$ 、

15  $\mu\text{m}$  のものに対してそれぞれ 0.9 mg、6.1 mg 及び 13 mg であるのに対し、エアロゾルの質量濃度はそれぞれ、0.49 mg/m<sup>3</sup>、0.51 mg/m<sup>3</sup>、0.57 mg/m<sup>3</sup>であった。2 時間の曝露時間の総換気量は 1.2 m<sup>3</sup>であるため、計算上、1  $\mu\text{m}$  の検体では 68%、7  $\mu\text{m}$  の検体では 10%、15  $\mu\text{m}$  の検体では 5.3% がエアロゾル化したことになり、エアロゾル化の効率は繊維長が長いほど低下した。また、エアロゾルの形態観察では、原末のサイズよりも長い繊維が多数確認された。これは、DWCNT が長軸方向にそって自動的に配列し、相互結合する性質によるものと考えられた。現在、DWCNT はシリコン基盤から一部を引き出すと相互に結合 (ファンデルワールス力によるとされる) して長繊維化することが知られており、この性質を利用して数十メートルの長繊維が製造されている。カートリッジの噴射口から圧縮空気によって放出される際に同様の現象が生じて長線維化していることが想定される。そのため、長い繊維であるほど相互に結合する確率が高くなるため長線維化する傾向が強まり、エアロゾル化の効率が低下した可能性がある。また、本実験では質量濃度ではなく繊維数を一定にする曝露条件を設定したため、カートリッジ 1 本当りに充填する DWCNT の重量は長繊維であるほど多かったことも原因の一つとして考えられた。DWCNT を曝露した肺では、数は少ないものの細気管支から肺胞周囲にマクロファージが貪食した DWCNT が観察された。DWCNT を貪食したマクロファージは胞体が細長く進展している様子が観察された。この現象は、先行研究において MWCNT を曝露した肺でも観察されている。一方、急性炎症と考えられる反応は

認められなかった。1及び7 µm DWCNTを曝露した肺では、DWCNTを検出できなかった。その理由として、単回の曝露であるため吸入された検体が少ないことと、繊維長が短く、観察が困難であることが考えられた。DWCNTの供給量に制限があったことから単回の吸入曝露となったが、1mg未満の検体量であってもエアロゾル化が可能であることがカートリッジ直噴式ダスト発生装置（Taquann直噴全身吸入装置）の利点である。

経気管肺内噴霧研究において、検索した範囲の炎症/毒性指標では anatase TiO<sub>2</sub> と KT に強く発現していた。4週時点でも両者の作用はより強く残存した。チタン酸カリウムの縦隔への残存は MWCNT-N における中皮発がん性と縦隔への集積との関連において注意深く観察する必要がある。MWCNTの単回腹腔投与は、少なくとも32週間にわたる慢性炎症を引き起こすが、早期から持続して機能すると思われる具体的な因子を複数特定することができた。また、腹腔洗浄液中で早期から投与群で低値を示し、中皮腫発症まで次第に減少し、瀕死動物では血清でも有意な低値を示す Apolipoprotein A-VI を発見した。また投与懸濁液の分散性の違いは誘発能に影響せず、H27年度の催奇形性とは異なる結果であった。このことは、急性炎症（による催奇形性や胎児の発育不良）と慢性炎症という作用の違いに起因すると思われる。今回、in situ 肺小核試験法において、MWNT-7はマウスの肺に有意に小核を誘発することを明らかにした。本誘発機構が、染色体の構造異常に由来するか、数的異常に由来するかを検討する必要がある。

免疫系への影響の検討では、正常マウスへのMWCNTの腹腔内投与により、腹腔内でのマクロファージの分化異常を介して、全身の免疫制御システムあるいは抗体産生機構に

影響を及ぼす可能性が示された。チタン酸カリウム投与の免疫系への影響はMWCNTに比較して低い可能性が示された。二層化カーボンナノチューブはMWCNTに比較して腹腔内での曝露反応は低いものと考えられ、DWCNTの処理反応にはスカベンジャー受容体が関与していることが示された。

RSV感染に対するMWNT-7曝露による肺炎の増悪化機序は、感染直後から間接的に炎症形成を亢進することと、回復期でも炎症継続や肺線維化などの影響が持続的であることが判明した。一方、チタン酸カリウムでもMWNT-7よりは炎症の程度が弱い、同様に感染初期からのRSV肺炎の増悪化現象が認められた。しかし、回復期への影響は明確でなかった。二層カーボンナノチューブでは、最も短いDWCNT-1などで感染初期から肺胞マクロファージ等での貪食が見られ、感染進行と共に肺胞壁の肥厚や肺胞内への単核球の浸潤増加が認められた。

In vitro系での検討で、MWCNT類やチタン酸カリウムはNLRP3活性化に応じてcaspase-1が直接切断産生するIL-1βのみならず、そのオートクライン作用により重要な炎症性サイトカインTNFαの産生促進効果を示し、炎症性サイトカインカスケードを開始することが示唆された。二層ナノチューブDWCNTは長さに応じてNLRP3依存のIL-1β産生を促すものの、TNFα産生を欠く点で多層ナノチューブとの差異が認められた。

発生影響に関する検討では、MWCNTの処理方法に起因する実験動物への投与時の分散状態が、内臓、骨格異常を含む胎児への発生毒性に影響を及ぼすことが示唆された。また、母体の体重の抑制や肺の炎症反応の強さが発生毒性の強さと相関しており、MWCNTの気管内投与による発生毒性は肺炎によることが示された。

また、今回検査した項目のうち、骨格異常（骨化遅延）において有意差がみられる項目が最も多かったことから、発生毒性の中では骨格異常（骨化遅延）が最も鋭敏な指標であると考えられた。

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のあることは、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。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。さらに、最近の OECD の動向からは、ナノマテリアルの評価手法の国際的な標準化を目指して、OECD テストガイドラインやガイダンスの改定活動が本格化してきており、EU を中心に様々なプロジェクトが立ち上がりつつある。

以上のことより、ナノマテリアルの評価手法としての吸入曝露および気管内投与手法、*in vitro* 評価系において、MWCNT、チタン酸カリウムや二層ナノチューブに Taquann 法が有効であることを示すことができた。しかし、現実に規制当局でのリスク評価で使用されるのは吸入曝露手法であるが、全てのナノマテリアルで慢性吸入曝露試験を行うのは不可能である。今後は、本研究班で検討している慢性影響評価に関する成果についても、OECD のガイダンス等に取り入れられるように、本研究で確立した吸入試験法や気管内投与手法を生かして、より短期の吸入曝露や気管内曝露試験法、*in vitro* 評価系試験法から

慢性影響を評価できることを示すデータを積み上げて OECD 等に提案できるよう実証研究を行っていくことが必要であると考えられた。

## E. 結論

慢性影響に関する研究に関して、Taquann 法とカートリッジ直噴全身曝露吸入装置を用い、MWCNT とは性質が異なるチタン酸カリウムと DWCNT を実際にマウスに吸入曝露することが可能であった。チタン酸カリウムでは 16 匹のマウスに  $4.1 \text{ mg/m}^3$ 、2 時間/日×5 日間（合計 10 時間）の全身曝露吸入実験を行い、使用した検体量は 80 mg である。一方、 $1 \mu\text{m}$  DWCNT では、計算上 25 mg の検体が入手できれば、マウス 16 匹に  $2.5 \text{ mg/m}^3$  の質量濃度で 2 時間/日×5 日間（合計 10 時間）の全身曝露吸入実験が可能である。この曝露条件は、MWCNT の先行研究において何らかの生体影響を検出することが可能であった条件である。本試験方法は少量・新規のナノマテリアル評価に有用であると考えられる。

経気管肺内噴霧法を用いた研究では、現在、チタン酸カリウムの長期観察実験を実施中である。MWNT-7 の分散性の違いは、発生毒性の場合と異なり、中皮腫発症能には影響を与えず、一定量の繊維が腹腔内に長期間滞留すれば毒性が生じることが分かった。遺伝毒性評価に関しては、新たに開発した *in situ* 肺小核試験法を用いて、Taquann 法処理した MWNT-7 を全身曝露したマウスで有意に肺小核が誘発することを明らかにした。

免疫システムへの影響に関して、MWCNT は腹腔内でのマクロファージの分化異常を介して、全身の免疫制御システムあるいは抗体産生機構に影響を及ぼす

可能性が示された。チタン酸カリウムの免疫系への影響は WWCNT より低い可能性がある。感染性への影響に関して、MWNT-7 の RSV 感染による肺炎増悪化の効果は持続的であり、チタン酸カリウムは MWNT-7 よりは炎症の程度は弱い、同様に感染初期からの RSV 肺炎の増悪化を示すことを確認した。二層カーボンナノチューブの肺炎増悪化の効果も認められた。各種カーボンナノチューブ、チタン酸カリウム、二層ナノチューブは、いずれもマクロファージに NLRP3 インフラマソームを介した IL-1 $\beta$  産生を促進した。多層ナノチューブは NLRP3 を介した TNF $\alpha$  分泌も強力に促進し、IL-1 $\beta$  の受容体を介するオートクラインによる機構が判明した。

発生影響に関する検討では、MWCNT の Taquann 処理を含めた投与時の分散状態の違いが、母体の肺の炎症の程度に影響を与え、その結果、発生毒性の強さが変化することが分かった。

ナノマテリアルの毒性評価手法に関する国際動向調査では、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。しかし、慢性影響の in vivo 試験データが不足していることも浮き彫りとなった。

ナノマテリアルの評価手法としての吸入曝露および気管内投与手法、in vitro 評価系において、MWCNT、チタン酸カリウムや二層ナノチューブに Taquann 法が有効であることを示すことができた。今後は、本研究で確立した in vivo 試験法等を生かして、より短期の吸入曝露や気管内曝露試験法、in vitro 評価系試験法から慢性影響を評価できることを示すデータを積み上げて OECD 等に提案できるような実証

研究を行っていくことが必要であると考えられた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Alexander D., Iigo M., Abdelgied M., Ozeki K., Tanida S., Joh T., Takahashi S., Tsuda H. Bovine lactoferrin and Crohn's disease: a case study, *Biochemistry and Cell Biology*, 95(1): 133-141, 2017.

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

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arbon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 巻 3 号、223-227、2016

石丸直澄 ナノマテリアルと免疫システム〜カーボンナノチューブに対する免疫反応と炎症病態 *医学のあゆみ* 259 巻 3 号、241-246、2016

森本泰夫, 小林憲弘: 国際がん研究機関 (IARC) におけるカーボンナノチューブを含む幾つかの繊維状物質の発がん性評価. *日本衛生学雑誌*, 71(3), 252-259, 2016.

Kobayashi N, Izumi H, Morimoto Y: A review of toxicity studies of carbon nanotubes. *Journal of Occupational Health*, 59(5), 394-407 (2017).

Hashiguchi, S., Yoshida, H., Akashi, T., Komemoto, K., Ueda, T., Ikarashi, Y., Miyauchi, A., Konno, K., Yamanaka, S., Hirose, A., Kurokawa, M., Watanabe, W. Titanium dioxide nanoparticles

- exacerbate pneumonia in respiratory syncytial virus (RSV)-infected mice. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* (2015) 39, 879-886. Doi:10.1016/j.etap.2015.02.017
- Abdelgied M., El-Gazzar A., Alexander D., Alexander W., Numano T., Iigou M., Naiki-Ito A., Takase H., Abdou K. A., Hirose A., Taquahashi Y., Kanno J., Tsuda H., Takahashi S. Potassium octatitanate fibers induce persistent lung and pleural injury and are possibly carcinogenic in male Fischer 344 rats. *Cancer Sci.*, 2018 May 17. doi: 10.1111/cas.13643.
- Norihiro Kobayashi, Hiroto Izumi, Yasuo Morimoto: A review of toxicity studies of carbon nanotubes. *Journal of Occupational Health*, 59(5), 394-407 (2017).
2. 学会発表
- Akihiko Hirose. International trends and necessity of chronic studies on risk assessment of nanomaterials. 第34回日本毒性病理学会総会、1月25-26日、沖縄
- Yuhji Taquahashi, Koichi Morita, Masaki Tsuji, Yoko Hirabayashi, Akihiko Hirose and Jun Kanno, A short-term whole-body inhalation study of potassium titanate whisker in mice with an improved dispersion and inhalation system, The 57th Society of Toxicology, Henry B. Gonzalez Convention Center, San Antonio, Texas, USA, 12 March, 2018,. Abstract Number/Poster Board number: 1185/P236
- 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 50<sup>th</sup> 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.
- 坂本義光, 小縣昭夫, 北條 幹, 湯澤勝広, 久保喜一, 安藤 弘, 長澤明道, 高橋 博, 広瀬明彦, 井上義之, 橋爪直樹, 猪又明子, 中江 大(2015). 多層カーボンナノチューブによるラット中皮及び肺増殖性病変誘発に対する phenyl N-tert-butyl nitrone (PBN)の影響, 第42回日本毒性学会学術集会(2015.6.29-7.1)石川
- 坂本義光, 北條 幹, 広瀬明彦, 猪又明子, 中江 大(2016)多層カーボンナノチューブを経気管反復投与したラットに見られた肺過形成病変に関する病理組織学的解析. 第32回日本毒性病理学会学術集会(2016.1.28-29, 高松)
- 坂本義光, 広瀬明彦, 中江 大(2015). 多層カーボンナノチューブによるラット中皮及び肺増殖性病変誘発に対する phenyl N-tert-butyl nitrone (PBN)の影響, 第74回日本癌学会学術総会(2015.10.8-10, 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, 海鉾藤文, 高橋博, 湯澤勝広, 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(2016)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(2016.6.29-7.1, 名古屋)
- 坂本義光, 広瀬明彦, 中江 大(2016)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(2016.10.6-8, 横浜)
- 北條幹, 坂本義光, 山本行男, 長谷川悠子, 多田幸恵, 湯澤勝広, 広瀬明彦, 猪又明子, 中江大(2017), 多層カーボンナノチューブによるラット中皮腫発生過程の経時的観察, 第33回日本毒性病理学会学術集会(2017.1.26-27, 堺市)
- 坂本義光, 北條 幹, 広瀬明彦, 猪又明子, 中江 大(2017)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 nitrone (PBN)併用が及ぼす影響, 第33回日本毒性病理学会学術集会(2017.1.26-27, 堺市)
- 坂本義光, 広瀬明彦, 中江 大(2017)多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の経気管投与ラットに見られた肺胞過形成病変の免疫組織学的性状, 第76回日本癌学会学術総会(2017.9.28~30, 横浜)
- 北條幹, 坂本義光, 山本行男, 長谷川悠子, 村上詩歩, 前野愛, 広瀬明彦, 中江大(2018).ラットにおける多層カーボンナノチューブおよびクリソタイル誘発中皮腫の病理学的性状の比較, 第34回日本毒性病理学会学術集会(2018.1.25-26, 那覇市)
- 坂本義光, 北條幹, 鈴木俊也, 猪又明子, 広瀬明彦, 中江大(2018). 多層カーボンナノチューブの経気管反復投与によりラット肺に誘発された増殖性病変の免疫組織学的解

- 析, 第 34 回日本毒性病理学会学術集会 (2018.1.25-26, 那覇市) 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 43 回日本毒性学会学術年会 (2016.7.1)、名古屋 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
- 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. 第 14 回国際毒性学会 (ICT2016) (2016.10), Merida, Mexico, Symposium
- 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, 第 14 回国際毒性学会 (ICT2016), (2016.10), Merida, Mexico, Oral.
- Jun Kanno, Yuhji Taquahashi<sup>1</sup>, Atsuya Takagi<sup>1</sup>, Masaki Tsuji<sup>1</sup>, Koichi Morita<sup>1</sup>, 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
- Jun Kanno, Occupational and Public Importance of Inhalation Toxicity Studies for the Hazard and Dose response Characterization of Chemicals and Particulate Matters Including Nanomaterials, The 32nd Annual Meeting of KSOT/KEMS (2016.11.4), Seoul, Korea, Invited
- Jun Kanno, Carbon nanotubes: Predicting their long-term effects by in vivo studies based on the knowledge of asbestos toxicity. The 8th Princess Chulabhorn International Science Congress (PC VIII) (2016.11.15), Bangkok, Thailand, Invited.
- 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、広瀬明彦、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
- 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
- 津田洋幸、徐結荀、William Alexander, David Alexander, Mohamed Abdelgied, Ahmed Elgazzar, 沼野琢旬、酒々井真澄、二口充、深町勝美、広瀬明彦、菅野純 気管内噴霧投与方法による各種の MWCNT の毒性と発がん性試験結果の比較、第 44 回日本毒性学会学術年会、2017 年 7 月 10-12 日、横浜
- Mohamed Abdelgied, Ahmed Elgazzar, David Alexander, William Alexander, Takamasa Numano, Satoru Takahashi, Hirotsugu Takase, Akihiro Hirose, Yuhji Taquahashi, Jun Kanno, Hiroyuki Tsuda Potassium octatitanate( $K_2O \cdot 8TiO_2$ ) fiber is a potent inducer of lung and pleural injury – A comparative study to titanium dioxide nano particles. 第 44 回日本毒性学会学術年会、2017 年 7 月 10-12 日、横浜
- Ahmed M. El-Gazzar<sup>1</sup>, Mohamed Abdelgied, David B. Alexander, William T. Alexander, Takamasa Numano, Masaaki Iigo, Aya Naiki, Hirotsugu Takase, Akihiko Hirose, Yuhji Taquahashi, Jun Kannno, Satoru Takahashi, Ashraf Mohamed Nazem, Osama Saeid Elokke and Hiroyuki Tsuda Comparative Pulmonary toxicity of DWCNT and MWCNT-7 in Rats 第 34 回日本毒性病理

- 学会総会、2018年1月25-26日、沖縄  
Mohamed Abdelgied, Ahmed M. El-Gazzar, David B. Alexander, William T. Alexander, Takamasa Numano, Masaaki Iigo, Aya Naiki, Hirosugu Takase, Khaled Abbas Abdou, Akihiko Hirose, Yuhji Taquahashi, Jun Kannno, Satoru Takahashi and Hiroyuki Tsuda Potassium octatitanate fiber ( $K_2O \cdot 8TiO_2$ ) fiber is a potent inducer of lung and pleural injury in male Fischer 344 rats: A comparative study of titanium dioxide nano particles 第34回日本毒性病理学会総会、2018年1月25-26日、沖縄
- Takasawa H, Hamada S, Taquahashi Y, Horibata K, Nakagawa M, Honma M, In vivo genotoxicity assessment of multi-wall carbon nanotubes using in vivo / in vitro lung micronucleus assay in mice, The Environmental Mutagenesis and Genomics Society 48th Annual Meeting, North Carolina, USA, Sept. 10-13, 2017.
- 高沢博修、志賀野美幸、高橋祐次、田中亜矢子、中館記代子、堀端克良、安永勝昭、中川宗洋、濱田修一、本間正充: In vivo-in vitro マウス肺小核試験法を用いたカーボンナノチューブの in vivo 遺伝毒性評価。第46回日本環境変異原学会(2017年11月6日~7日)東京
- 堀端克良、鶴飼明子、小縣昭夫、中江大、安藤弘、久保喜一、長澤明道、湯澤勝廣、本間正充、F344 gpt delta rats を用いた多層カーボンナノチューブ単回気管内投与による in vivo 遺伝毒性評価、第46回日本環境変異原学会(2017年11月6日~7日)東京
- Norihiro Kobayashi, Ryota Tanaka, Yoshiaki Ikarashi, Akihiko Hirose: Developmental toxicity assessment of four different preparations of multi-wall carbon nanotubes in mice after repeated intratracheal instillation. 57th Annual Meeting of the Society of Toxicology (SOT 2018) (2018.3.14 San Antonio, TX, USA).
- 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
- 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
- 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
- 新垣理恵子、山田耕一、齋藤雅子、大塚邦紘、山田安希子、常松貴明、工藤保誠、菅野純、石丸直澄、多層化カーボンナノチューブ長期暴露による免疫システムへの慢性毒性 第106回日本病理学会総会 2018年4月28日 東京
- 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
- 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 2016年10月、札幌コンベンションセンター
- 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 2016年10月、札幌コンベンションセンター
- 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
- Seiko Hashiguchi, Toshi Akashi, Akihiko Hirose, Aki Miyauchi, Hiroki Yoshida, Masahiko Kurokawa, Wataru Watanabe Effects of potassium titanate on the pneumonia in respiratory syncytial virus-infected mice. 53<sup>rd</sup> Congress of the European Societies of Toxicology. P-05-03-09 (2017.09.12) Slovak National Theatre, Bratislava, Slovak
- Wataru Watanabe, Seiko Hashiguchi, Toshi Akashi, Akihiko Hirose, Hiroki Yoshida, Aki Miyauchi, Chihiro Sugita, Masahiko Kurokawa Effects of multi-walled carbon nanotubes on

primary immunity responding to respiratory syncytial virus infection in mice. 53<sup>rd</sup> Congress of the European Societies of Toxicology. P-05-03-10 (2017.09.12) Slovak National Theatre, Bratislava, Slovak

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), SanDiego

Norihiro Kobayashi, Ryota Tanaka,

Yoshiaki Ikarashi, Akihiko Hirose:

Developmental toxicity assessment of four different preparations of multi-wall carbon nanotubes in mice after repeated intratracheal instillation. 57th Annual Meeting of the Society of Toxicology (2018.3), San Antonio

## G. 知的財産権の取得状況

### 1. 特許取得（出願中）

柴田眞利、菅野純、生田達也、鶴田祐吾、小川幸男、高橋祐次、「吸入曝露試験装置」、登録番号:第 5899592 号 (2016.3.18)

菅野純、高橋祐次、「高分散性ナノマテリアルの調製方法」、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（該当なし）

### 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
Xu J., Alexander DB., Iigo M., Hamano H., Takahashi S., Yokoyama T., Kato M., Usami I., Tokuyama T., Tsutsumi M., Tamura M., Oguri T., Niimi A., Hayashi Y., Yokoyama Y., Tonegawa K., Fukamachi K., Futakuchi M., Sakai Y., Suzui M., Kamijima M., Hisanaga N., Omori T., Hirose A., Kanno J., Nakae D., and Tsuda H.	Chemokine (C-C motif) ligand 3 detection in the serum of persons exposed to asbestos: A patient-based study.	Cancer Sci.,	106(7)	825-832	2015
Yasui M, Kamoshita N, Nishimura T, Honma M	Mechanism of induction of binucleated cells by multiwalled carbon nanotubes as revealed by live-cell imaging analysis.	Genes and Environment	37(6)		2015
Fujitani T, Inomata A, Ogata A, Sakamoto Y, Hirose A, Nishimura T, Ikeda R and Nakae D	Comparison of fetal toxicity of various multi-wall carbon nanotubes in mice	Toxicology Reports	2	1404-1408	2015

## 別添5

Hashiguchi, S., Yoshida, H., Akashi, T., Komemoto, K., Ueda, T., Ikarashi, Y., Miyachi, A., Konno, K., Yamanaka, S., Hirose, A., Kurokawa, M., Watanabe, W.	Titanium dioxide nanoparticles exacerbate pneumonia in respiratory syncytial virus (RSV)-infected mice.	Environ. Toxicol. Pharmacol	39	879-886	2015
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	107	924-935	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/s 41021-016 -0065-5. eCollectio n	2017
Shigemoto-Moga mi 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

別添5

<p>Abdelgied M., El-Gazzar A., Alexander D., Alexander W., Numano T., Iigou M., Naiki-Ito A., Takase H., Abdou K. A., Hirose A., Taquahashi Y., Kanno J., Tsuda H., Takahashi S.</p>	<p>Potassium octatitanate fibers induce persistent lung and pleural injury and are possibly carcinogenic in male Fischer 344 rats.</p>	<p>Cancer Science</p>		<p>in press</p>	<p>2018</p>
<p>Norihiro Kobayashi, Hiroto Izumi, Yasuo Morimoto</p>	<p>A review of toxicity studies of carbon nanotubes.</p>	<p>ournal of Occupatio nal Health</p>	<p>59(5)</p>	<p>394-407</p>	<p>2017</p>