

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影響の効率的評価手法開発に関する研究

(H30-化学-指定-004)

平成 30 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 広瀬 明彦

平成31年(2019年)3月

## 平成 30 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影響の効率的評価手法開発に関する研究<br>広瀬 明彦.....                      | 2   |
| II. 研究分担報告書.....  | 13  |
| 1. 慢性影響を考慮した肺負荷量に基準を置く全身曝露吸入法の確立に関する研究<br>菅野 純.....                 | 14  |
| 2. ナノマテリアルの吸入曝露手法の開発に関する研究<br>高橋 祐次.....                            | 30  |
| 3. 短期曝露試験系の総合評価に関する研究および短期曝露試験系の総合評価<br>に関する研究<br>小林 憲弘、広瀬 明彦 ..... | 40  |
| 4. 慢性影響を考慮した気管内投与法の確立に関する研究<br>北條 幹 .....                           | 57  |
| 5. ナノマテリアルの気管内投与曝露評価手法の開発に関する研究<br>津田 洋幸.....                       | 79  |
| 6. ナノマテリアル曝露による <i>in vivo</i> 遺伝毒性評価系の確立に関する研究<br>堀端 克良.....       | 84  |
| 7. ナノマテリアルの免疫系への慢性影響に関する研究<br>石丸 直澄.....                            | 92  |
| 8. ナノマテリアル曝露による感染性免疫系への影響の効率的な評価系の確立に<br>関する研究<br>渡辺 渡 .....        | 108 |
| 9. 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<br>最上 知子.....                         | 112 |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表.....  | 117 |

平成30年度厚生労働行政推進調査事業費補助金  
(化学物質リスク研究事業)

I . 総括研究報告書

平成30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)  
総括研究報告書

研究課題名: ナノマテリアル曝露による慢性影響の効率的評価手法開発に関する研究

研究代表者: 広瀬 明彦 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部長

### 研究要旨

本研究は、未だにナノマテリアル曝露による最も懸念されている体内蓄積に伴う慢性影響を検討した研究がない上に、定量的にリスク評価のために必要な慢性吸入曝露は多層カーボンナノチューブ(MWNT-7)による報告のみである現状を鑑み、2年間の慢性吸入試験と同レベルの評価が可能な代替慢性試験法の開発を行うことを目的としている。また、これまでに他のナノマテリアルで検討してきた遺伝毒性や免疫影響に関する指標について、今回開発する慢性試験プロトコルへの適用性を検証すると共に、本研究班の研究成果をもって本代替法の有用性を国際的に発信していくことを目的としている。

慢性影響に関する研究に関して、2年間の慢性吸入毒性試験と同レベルの肺内負荷量を達成するために短期間曝露の慢性観察試験のプロトコルを確立するための予備検討を行った。MWCNT曝露後の肺内負荷量の測定法(SEM法と大西法)のバリデーションに着手した気管内投与による体内残留率を測定した結果、既報(Kasai et al., Particle Fibre Tox 2016)の2年間の吸入曝露試験と肺内負荷量に関して同等性を維持するために、ラットを用いた気管内投与では2年間の曝露期間において4週間に1回の間隔で約100 µg/ratを間欠投与するプロトコルが妥当であると考えられた。マウス吸入曝露実験ではTaquann全身曝露吸入装置(ver.3.0)を用いた単回曝露(6時間)を実施し、大西法により肺内負荷量測定を行った。その結果、曝露終了直後の高用量曝露群(5.1 mg/m<sup>3</sup>)では6 µg/mouse、低用量群(2.7 mg/m<sup>3</sup>)では4 µg/mouseであった。慢性試験は気管内投与と全身曝露吸入による試験を開始した。一方、短期間気管内噴霧+慢性観察(2週8回投与、TIPS法)によるチタン酸カリウム(POT)、アナターゼ型二酸化チタニウム(TiO<sub>2</sub>)の炎症、発がん性をMWNT-7と比較した研究では、104週で肺胞上皮過形成・腺腫・腺がんの合計および胸膜中皮過形成と悪性中皮腫の合計頻度においてPOT(0.25と0.5mg合計)とMWCNT-7に有意の増加が見られた。POT群の悪性中皮腫率(4/33例)は統計的に有意ではないが、日本バイオアッセイ研究センターの対照群の背景頻度より約140倍高値であった。

慢性影響指標に関する研究では、マウスでの気管内投与による*in vivo*肺小核試験遺伝毒性試験の予備試験を行い、単回気管内投与による今回の予備試験条件下では、肺小核試験陰性であることを明らかにした。免疫ネットワークへの影響については、二層ナノチューブでの腹腔内投与による慢性影響において、腹腔内のマクロファージの活性化や機能に違いがある可能性が示された。一方、感染性に対する影響としては、MWNT-7の単回吸入曝露により、マウス肺全葉へのMWNT-7の到達を確認し、複数回の経鼻投与で得られた肺炎増悪化は認められなかったが、肺の

線維化に関する指標(TGF- $\beta$ )の上昇を見出した。*In vitro*メカニズム解析研究において、様々なナノマテリアルにより惹起されるNLRP3インフラマソームを介する炎症応答は、ナノマテリアルの物性の違いにより化合物Xによる抑制効果が異なることを見いだした。海外動向調査としては、OECDナノマテリアルの作業グループにおいてEUから昨年度に引き続き7つの新規プロジェクトが提案されていた。また、本会議では我が国からの報告として、本研究班で検討している間欠型の慢性曝露試験法の検証研究に関して、研究の背景や将来的な目標、研究計画等について紹介を行い、従来の慢性吸入曝露試験との相同性に関する比較研究の重要性を示した。

通常の慢性吸入試験と同レベルの評価が可能な代替試験の開発に向けて、間欠的な短期的吸入曝露あるいは気管内投与による曝露手法を用いた慢性影響評価手法との比較検証を行うための基礎的な条件を設定し、H30年度内に慢性研究をスタートさせることができた。また、この試験系を用いることにより、より適切な慢性影響指標を同定したり測定したりするための基盤的な条件を整えることができたと考えられる。

### 研究分担者

高橋 祐次 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 第三室長  
 津田 洋幸 名古屋市立大学 津田特任教授研究室 特任教授  
 堀端 克良 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 主任研究官  
 菅野 純 (独)労働者健康安全機構 日本バイオアッセイ研究センター 所長  
 渡辺 渡 九州保健福祉大学大学院・保健科学研究科・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  
 最上 知子 国立医薬品食品衛生研究所 生化学部 主任研究官  
 小林 憲弘 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 第三室長  
 北條 幹 東京都健康安全研究センター・薬事環境科学部生体影響研究科・主任研究員

### 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  
 横田 理 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 主任研究官

大西 誠 独立行政法人労働者健康安全機構 日本バイオアッセイ研究センター 試験管理部分析室 技術専門役  
 後藤 裕子 独立行政法人労働者健康安全機構 日本バイオアッセイ研究センター 試験管理部 主任研究員  
 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  
 本間 正充 国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部 部長  
 濱田 修一 株式会社LSIメディエンス  
 高沢 博修 株式会社LSIメディエンス  
 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

准教授  
牛尾 綾 徳島大学大学院医歯薬学研究部  
助教  
大塚 邦紘 徳島大学大学院医歯薬学研究部  
大学院生  
坂本 義光 東京都健康安全研究センター  
薬事環境科学部  
前野 愛 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  
大貫 文 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

鈴木 俊也 東京都健康安全研究センター  
薬事環境科学部 研究科長  
猪又 明子 東京都健康安全研究センター  
薬事環境科学部 参事研究員  
守安 貴子 東京都健康安全研究センター  
薬事環境科学部 部長  
中江 大 東京農業大学 応用生物科学部  
教授  
牛田 和夫 国立医薬品食品衛生研究所 安  
全性予測評価部 研究員

## A. 研究目的

新素材としての産業用ナノマテリアルについては、新しい物性に伴う未知のヒト健康影響の懸念に対して適正な安全性評価手法の確立が急務となっているが、これまで 10 年近くにわたり OECD や各国が各種研究を精力的に行ってきたにもかかわらず、未だにナノマテリアル曝露による最も懸念されている体内蓄積に伴う慢性影響を検討した研究はほとんど行われてきていない。特に近年では、動物試験を用いない *in vitro* 試験系を中心とした評価法の確立が重要視されているが、肝心の *in vivo* 影響の評価や AOP が確立していなければ、信頼性の高い *n vitro* 試験系の開発は不可能である。我々は、先行する研究において当初より慢性影響を中心とした *in vivo* 試験研究を進めてきており、発がん性を主とした慢性影響の評価法を検討してきた。一方、定量的な慢性吸入曝露によるリスク評価には、多層カーボンナノチューブ (MWNT-7) で報告されたように 2 年間の慢性吸入試験を行うことが必須であるが、現実的にあらゆるナノマテリアルで慢性吸入試験を行うことはできない。その為、慢性影響を評価でき効率的評価手法の確立は急務である。そこで、先行研究で開発してきたナノマテリアル分散法および気管内投法を用いて、先ず通常の 2 年間吸入曝露試験法を代替できる試験法として、短期間曝露と慢性

観察による慢性影響評価法を確立することを本研究班の目的とした。現時点で吸入曝露によるナノマテリアルの慢性試験データが利用出来る MWNT を中心として吸入曝露法と気管内曝露法の比較研究を行う。

## B. 研究方法

本研究班は、吸入曝露法と気管内曝露法の比較研究をとおして慢性吸入曝露試験の代替性を模索する研究と、慢性影響評価に必要な AOP に基づいた短期間曝露による慢性影響指標に関する研究、及び国際動向収集と共に研究班の成果を OECD 等に提案していくことを目指す研究とで構成する。

### 慢性吸入曝露試験の代替手法検討:

まず、MWNT-7 を用いた 2 年間の慢性吸入毒性試験における体内負荷量と同レベルの肺内負荷量を気管内投与法あるいは短期間吸入曝露法で達成するために、肺内負荷量の定量法のバリデーションと、単回曝露に消失速度の測定を行った。CNT の肺負荷量の解析法のバリデーションとしては、曝露肺をアルカリ溶解し遠心分離により回収したサンプルを、走査電顕にて繊維数を基盤として測定する方法 (SEM 法) と、Benzo[ghi]perylene をマーカーとして定量する方法 (大西法) が Taquann 法処理した MWNT-7 を用いた場合の比較可能性についてバリ

レーションに着手した。MWNT-7 の Taquann 法処理には先行試験 (Kasai et al. Particle Fibre Tox 2016) と同じ 53  $\mu\text{m}$  メッシュを用いて濾過したものを使用した。肺サンプルは、国立衛研に新たに設置した Taquann 全身曝露吸入装置 (ver.3.0) を用い、マウスに目標濃度 6  $\text{mg}/\text{m}^3$  の単回曝露試験 (6 時間) を実施したものをを用いた (菅野)。

2 年間の気管内投与試験に用いる MWCNT 分散液の調製方法について、MWNT-7 原末と Taquann 処理 MWNT-7 の 2 種類を用いて、CMC-Na, Tween80, PluronicF-68 等への分散状態を検討し、一部について DLS により二次粒子径の測定を行った (小林)。気管内投与後の肺内残存量の解析としては、F344 雄性ラットに MWCNT 原末懸濁液を 125  $\mu\text{g}/\text{回}$  の用量でスプレー式ゾンデまたは経ロゾンデを用いて単回あるいは 4 週間おきに 3 回投与した。また、Taquann 処理 MWCNT を、25 あるいは 100  $\mu\text{g}/\text{ラット}$  の用量で経ロゾンデにより単回投与し、1 週後・4 週後に肺の MWCNT の含有量を (大西法) により測定した (北條、広瀬)。

2 年間の長期曝露試験としては、Taquann 全身曝露吸入装置 (ver.3.0) を用い、53  $\mu\text{m}$  メッシュ濾過した MWNT-7 を検体として、対照群、低用量 (目標濃度 3  $\text{mg}/\text{m}^3$ )、高用量 (目標濃度 6  $\text{mg}/\text{m}^3$ ) の 3 群 (50 匹/群) を設定し 4 週毎の曝露試験を開始した。エアロゾルの特性の情報として、質量濃度、エアロゾル粒子数 (CPC)、空気力学的質量中央値 (MMAD) の測定を行った。(高橋)。

一方、短期間気管内噴霧 + 慢性観察 (2 週 8 回投与、TIPS 法) によるチタン酸カリウム (POT)、アナターゼ型二酸化チタニウム ( $\text{TiO}_2$ ) の炎症、発がん性を MWNT-7 と比較した。また、二層ナノチューブ (DWCNT) (15, 7, 1  $\mu\text{m}$ ) について、長さの差異と炎症反応の程度について比較する慢性研究を継続中である (津田)。

#### 慢性影響指標に関する研究:

発がん性の指標となる遺伝毒性試験について、先行研究で確立した吸入曝露による *in vivo* 肺小核

試験法のマウス (C57BL と ICR の 2 系統) への気管投与での適用性を検証するために、2 系統のマウスに単回期間内投与を行い、肺小核誘発率を解析した (堀端)。

免疫系への吸入曝露による慢性影響については、短期間曝露による慢性影響評価プロトコルに準じてその影響を解析する予定であるが、の Taquann 法による吸入曝露のサンプルが得られていないため、H31 年度は、比較対象のためにチタン酸カリウムと DWCNT を単回腹腔内投与した PEC における ROS 関連遺伝子の変動を網羅的に解析した (石丸)。感染性への影響については、これまで MWNT-7 の複数回での経鼻投与で認められた RSV 肺炎増悪化が、Taquann 法による吸入曝露でも再現できるか確認する必要があるため、上記の単回曝露試験に合わせて、感染実験を行った。方法としては、BALB/c マウスに対して、MWNT-7 を 0, 3 および 6  $\text{mg}/\text{m}^3$ , 6 時間吸入曝露を行い、3 日後に RSV 感染させて、感染 5 日後の肺胞洗浄液 (BALF) や肺病理解析を行った (渡辺)。一方、炎症反応の最初反応であるマクロファージへの影響に関しては、ナノマテリアルの物性によるインフラマソーム活性化機序の違いを、抑制薬物を用いて検討した。THP-1 マクロファージに MWCNT-7、各種酸化チタンを曝露し、インフラマソーム依存的な IL-1 $\beta$  分泌を NLRP3 ノックダウン細胞との比較により評価し、MWCNT-SD1 による活性化の抑制薬物の影響を解析した (最上)。

#### 国際動向に関する研究:

H30 年度に開催されたナノマテリアル毒性評価手法に関する OECD の工業用ナノマテリアル作業グループ会合や、OECD テストガイドライン会議での情報収集を行った。(小林、広瀬)。

#### <倫理面への配慮>

本研究では、人を対象とした研究、人の遺伝子解析、疫学研究は行っていない。動物試験を実施した研究は、試験実施機関による動物実験に

関する倫理委員会の承認を得るなど、実験動物に対する動物愛護の配慮の上で実施した。

## C. 研究結果

### 慢性影響評価手法検討:

Taquann 法処理 MWNT-7 の肺内負荷量を測定に関して、大西法では0.2~2.0 µg/mLの範囲内で、定量が可能であることが示された。Taquann 全身曝露吸入装置(ver.3.0)は安定した運用を達成することができた。チャンバー内に投入した検体量のエアロゾル効率率は約 70%であった。質量濃度は、目標濃度3および6 mg/m<sup>3</sup>に対して、実測値は2.7および5.1 mg/m<sup>3</sup>であった。CPC カウントはカートリッジから噴射直後に速やかに上昇し、次のカートリッジを噴射する4分後までの間に徐々に低下する鋸歯状を示し0から6時間の平均値に対して、約20%~200%の範囲で変動した。MMADは400~500 nmであった。この曝露条件の下で、肺負荷量予測のため、マウスへの単回曝露肺の肺負荷量測定を大西法にて曝露終了直後と7日後に実施し、高用量曝露群ではそれぞれ約6 µg/マウスおよび約3 µg/マウス、低用量群ではそれぞれ約4 µg/マウスおよび約2 µg/マウスの結果が得られた。同条件にて、マウスを用い、対照群、低用量群、高用量群で2年間の吸入曝露実験を開始した。

気管内投与法の試料調製の検討では、CMC-Na に分散させた MWCNT について T-MWCT-7 の方が、原末と比べて粒径が小さいが凝集しやすい傾向が見られた。また、Tween より PluronicF-68 のほうがより安定した分散状態を維持できることがわかった。MWCNT 原末を 125 µg を単回投与した肺負荷量は、1 日後までにスプレー式ゾンデで 60.7 µg、経口ゾンデで 73.8 µg にそれぞれ減少したが、その後はほとんど変化しなかった。反復投与では、3回投与の翌日に 161.5 µg であり、その 8 週後も同程度であった。T-MWCT-7 の 100 µg 投与群では 1 週後の肺負荷量は 30.4µg までに減少していることが確認できた。

TIPS 法によるチタン酸カリウムと酸化チタンの比較では、肺では 6h ではすべての群に Mφ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。104 週では、肺胞上皮過形成・腺腫・腺がんの合計および胸膜中皮過形成と悪性中皮腫の合計頻度において POT (0.25 と 0.5mg 合計) と MWCNT-7 に有意の増加が見られた。悪性中皮腫は POT 群に計 4/33 例(12%)発生し、日本バイオアッセイ研究センターの対照群 historical incidence より 140 倍の高値であった。

長さの異なる DWCNT は POT の場合と同じプロトコルにて、各群 14~16 匹として 1 匹あたりの2週における全投与量は 22x10<sup>12</sup>本/ラットとなるように調整して投与し、慢性試験を継続している。陽性対照として MWCNT-7 を 1mg/ラット(15micro-m の DWCNT の投与量 1mg/ラットに合わせた)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。

### 慢性影響指標に関する研究:

遺伝毒性指標としての *in vivo* 肺小核試験法において、全身吸入曝露下の試験条件に合わせる為 MWNT-7 単回気管内投与後 5 日目に肺組織を採取し肺胞由来 AT-II 細胞および細気管支由来 Clara 細胞を得て、*ex vivo* 培養法を応用した肺小核試験の標本を作成した。陰性対照、陽性対象および MWNT-7 を C57BL と ICR の 2 系統で各群 3 匹を設定した。その結果、両系統とも単回気管内投与下では肺小核陰性となることを示した。また、*ex vivo* 培養法を応用したマウス肺小核試験において、C57BL マウスと比べて ICR マウスでは、観察対象細胞が多く得られ、標本の状態がやや良好であったことから今回の予備試験条件下で作製された標

本の状態には系統差があることを示した。

繊維長の異なるDWCNTの腹腔内投与によって、PECの細胞数に変化は認められなかったが、スカベンジャー受容体のひとつであるCD36の発現が7 $\mu$ mのDWCNT投与で上昇していた。T-MWNT-7あるいはチタン酸カリウムの腹腔内投与によるPECにおけるROS関連遺伝子の発現にそれぞれのマテリアルで違いが見られ、ナノマテリアルの性質によってROSを介した好中球やマクロファージの活性化機構の違いが示された。今後、短期間吸入曝露による慢性影響に関して検討を計画している。単回吸入曝露試験に合わせたRSV感染実験については、感染5日後の肺胞洗浄液中のIFN- $\gamma$ やRANTESレベルの上昇は認められなかったが、TGF- $\beta$ レベルは曝露量依存的に有意に上昇した。一方、病理組織学的な検討では、RSV感染による肺炎の明確な増悪化は認められなかったが、感染の有無に関わらず全葉において曝露量に依存してMWNT-7の結晶が確認された。MWCNT-7によるマクロファージでのインフラマソーム活性化・IL-1 $\beta$ 分泌を抑制する化合物X(論文公表時まで非公表の予定)を見いだしているが、各種酸化チタン類によるインフラマソーム活性化への影響を比較したところ、ナノマテリアルの物性の違いにより薬物Xによる抑制効果に差異があることを見出した。

#### 国際動向に関する研究:

H31年の2月に開催された、OECDナノマテリアル作業会合では、EUから昨年度に引き続き7つの新規プロジェクトが提案された。このうち、5つの提案については本会議中あるいは、会議の書面手続きで承認される方向となり、OECDテストガイドラインの作業グループでの議論へ進む方向性が決まった。また、本作業グループ会議においては、本研究班で計画している間欠型の慢性曝露試験法の検証研究に関して、研究の背景や将来的な目標、研究計画等について紹介する機会が得られ、会議中に発表を行った。

#### D. 考察

慢性影響評価手法検討に関する研究に関してH30年度は、MWNT-7によるTaquann全身曝露吸入装置(ver.3.0)吸入曝露および、Taquann処理した分散液の気管内投与による肺内残留率を調査した。分散状態の安定性と媒体自体の毒性情報の豊富さから、気管内投与に用いるT-MWNT-7はTweenn80に分散させることが適切と考えられた。肺負荷量の測定結果から、慢性の連続吸入試験の肺内負荷量と同レベルにすることができる短期間曝露の慢性観察試験のプロトコルとして、2年間にわたる間欠的吸入曝露および気管内投与の投与量の目安を設定することが可能となった。図1に示す様に、MWNT-7の2年間の吸入曝露試験(Kasai et al. 2016)で想定される肺内負荷量(最終的には高用量群で2000  $\mu$ g/rat)と同様の肺内の蓄積量を維持するためには、管内投与法により2年間に4週間に1回の間隔で約100  $\mu$ g/ratを投与(図1中のPlanned Study)すれば良いという見込みが立った。低用量群はその4分の1の用量を設定し、H30年12月に第一回目の投与を開始した。一方、Taquann全身曝露吸入装置(ver.3.0)については、国衛研の移転に伴い設備を新しくし、H30年度の後半に安定して稼働する状況となった。マウス単回曝露による肺内残留量を大西法にて測定した結果、高用量群(実測値5.1 mg /m<sup>3</sup>)の曝露終了直後の値は約6  $\mu$ g/マウスであり、当初想定していた負荷量の約50%であった。予測値は25  $\mu$ mメッシュで濾過した検体のSEM法による測定結果から推定した値であるため、その影響が考えられる。現在、同曝露条件にて2年間の吸入実験を進めているが、SEM法による肺負荷量測定結果とも照らし合わせた上で目標とする負荷量が得られる曝露条件への変更も考慮する。

一方、先行研究から引き続き行っている気管内投与法のプロトコルとしてのTIP法については、MWNT-7以外のチタン酸カリウムや二層ナノチュ

ープでも慢性試験を行ってきている。胸腔洗浄液 (PLF) における M $\phi$  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 TiO<sub>2</sub> より繊維性の POT でより強く誘導されることは胸膜中皮において発がんに関連する病変とすると考えられた。長さの異なる DWCNT については、今までの報告で 0.7 $\mu$ m の MWCNT の腹腔内投与では発がん性はみられなかったこと (Muller, 2009) から、長さで投与された本数と発がんの関係が明らかとなると考えられ、104 週の結果が待たれる。

最終的には、本研究で開始する 2 年間の間欠吸入曝露および気管内投与によるプロトコルを用いた試験や TIPS 法による慢性試験の結果と、通常の 2 年間の慢性吸入試験結果との比較を行うことにより、より慢性吸入試験結果を再現できる短期間曝露の慢性試験の設定基準を提案できると考えている。

慢性影響指標に関する研究では、*in vivo* 遺伝毒性試験として、現状での *ex vivo* を応用した肺小核試験では、単回投与下で陰性であったが、今回初めて 2 系統のマウスを用いたことで、得られる肺細胞数がマウス系統により違いが見られることを明らかにした。これを踏まえ、本試験ではマウス系統に十分留意した上で実施することが必要である。免疫ネットワークへの影響については、二層ナノチューブでの腹腔内投与による慢性影響において、腹腔内のマクロファージの活性化や機能に違いがある可能性が示され、今年度の開発した間欠吸入内曝露における免疫担当細胞への慢性影響についても、腹腔内投与法との免疫影響の差異を解析する予定である。一方、感染性に対する影響としては、これまで RSV 感染マウスでは、MWNT-7 の複数回経鼻投与により炎症サイトカインの産生亢進および肺炎増悪化の結果を得ているが、MWNT-7 は凝集し、その影響は偏在による可能性が高かった。今回の吸入曝露法の導入により、均一ではないが全肺葉において MWNT-7 の結晶が観察された。感染への

影響は明確ではなかったが、曝露量や曝露スケジュール・回数を検討することで影響評価の質が向上すると考えられる。さらに、肺の線維化に関する指標 (TGF- $\beta$ ) の上昇を見出しており、感染回復期への作用などの慢性的な影響評価への応用が期待できる。

*In vitro* メカニズム解析研究において、MWCNT-7 曝露によるマクロファージの IL-18 産生を顕著に抑制する化合物 X を見いだしているが、様々な大きさや形状の酸化チタンナノマテリアルによる IL-18 産生の抑制は顕著ではないことが判明し、様々なナノマテリアルにより惹起される NLRP3 インフラマソーム活性化の機構には、ナノマテリアルの物性の違いによる差異があることが示唆された。引き続き多様な MWCNT について、化合物 X の効果を調べメカニズムの解析を進め、慢性影響の *in vitro* 評価につなげることを目指している。

国際動向としては、昨年度より、EU を中心にナノマテリアルの評価手法の国際的な標準化を目指した OECD テストガイドラインやガイダンスの改定活動が本格化してきている。本研究班で検討している慢性影響評価に関する評価法についても、将来的に OECD のガイダンス等に取り入れられるようにするためには、より短期の吸入曝露や気管内曝露試験法、*in vitro* 評価系試験法から慢性影響を評価できることを示すデータを積み上げて OECD 等に提案できるような実証研究を行っていくことが重要であると考えられた。

## E. 結論

慢性影響に関する研究に関して、2 年間の慢性吸入毒性試験と同レベルの肺内負荷量を達成するために短期間曝露の慢性観察試験のプロトコルを確立するための予備検討を行った。MWCNT 曝露後の肺内負荷量の測定法について、電顕を使った手法と Benzo[ghi]perylene をマーカーとして定量する方法 (大西法) のバリデーションに着手した。気管内投与による体内残留率を測定した結果、既報

の2年間の吸入曝露試験と肺内負荷量に関して同等性を維持するために、ラットを用いた気管内投与では2年間の曝露期間において4週間に1回の間隔で約100 µg/ratを間欠投与するプロトコルが妥当であると考えられた。マウス吸入曝露実験ではTaquann 全身曝露吸入装置(ver.3.0)を用いた単回曝露(6時間)を実施し、大西法により肺内負荷量測定を行った。その結果、曝露終了直後の高用量曝露群(5.1 mg/m<sup>3</sup>)では6 µg/マウス、低用量群(2.7 mg/m<sup>3</sup>)では4 µg/マウスであった。慢性試験は気管内投与と全身曝露吸入による試験を開始した。

ナノマテリアルの経気管肺内噴霧投与(TIPS法)では、104週で肺胞上皮過形成・腺腫・腺がんの合計および胸膜中皮過形成と悪性中皮腫の合計頻度においてPOT(0.25と0.5mg合計)とMWCNT-7に有意の増加が見られた。POT群の悪性中皮腫率(4/33例)は統計的に有意ではないが、日本バイオアッセイ研究センターの対照群の背景頻度より約140倍高値であった。

慢性影響指標に関する研究では、2系統のマウスを用いた気管内投与による*in vivo*肺小核試験遺伝毒性試験を行った結果、肺小核陰性であった。また、マウス個体から分離・回収できる肺細胞数や観察標本の状態に系統差があることを明らかにした。免疫ネットワークへの影響については、二層ナノチューブでの腹腔内投与による慢性影響において、腹腔内のマクロファージの活性化や機能に違いがある可能性が示されると共に、上記の間欠吸入内曝露における免疫担当細胞への慢性影響についても解析を予定している。一方、感染性に対する影響としては、MWNT-7の単回吸入曝露により、マウス肺全葉へのMWNT-7の到達を確認し、複数回の経鼻投与で得られた肺炎増悪化は認められなかったが、肺の線維化に関する指標(TGF-β)の上昇を見出した。*In vitro*メカニズム解析研究において、様々なナノマテリアルにより惹起されるNLRP3インフラマソームを介する炎症応答は、ナノマテリアルの

物性の違いにより化合物Xによる抑制効果が異なることを見いだした。

海外動向としては、OECD ナノマテリアルの作業グループにおいてEUから昨年度に引き続き7つの新規プロジェクトが提案されていた。また、本会議では我が国からの報告として、本研究班で検討している間欠型の慢性曝露試験法の検証研究に関して、研究の背景や将来的な目標、研究計画等について紹介を行い、従来の慢性吸入曝露試験との相同性に関する比較研究の重要性を示した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- Abdelgied M, El-Gazzar AM, Alexander DB, Alexander WT, Numano T, Iigou M, Naiki-Ito A, Takase H, Abdou KA, Hirose A, Taquahashi Y, Kanno J, 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;109(7):2164-2177. 2018
- Liao D, Wang Q, He J, Alexander DB, Abdelgied M, El-Gazzar AM, Futakuchi M, Suzui M, Kanno J, Hirose A, Xu J, Tsuda H. Persistent Pleural Lesions and Inflammation by Pulmonary Exposure of Multiwalled Carbon Nanotubes. *Chem Res Toxicol.* 2018;31(10):1025-1031. 2018.
- Sakamoto Y, Hojo M, Kosugi Y, Watanabe K, Hirose A, Inomata A, Suzuki T, Nakae D. Comparative study for carcinogenicity of 7 different multi-wall carbon nanotubes with different physicochemical characteristics by a single intraperitoneal injection in male Fischer 344 rats. *J Toxicol Sci.* 2018;43(10):587-600. 2018.
- Otsuka K, Yamada K, Taquahashi Y, Arakaki R, Ushio A, Saito M, Yamada A, Tsunematsu T, Kudo Y, Kanno J, Ishimaru N. Long-term polarization of alveolar

macrophages to a profibrotic phenotype after inhalation exposure to multi-wall carbon nanotubes. *PLoS One* 13(10): e0205702, 2018

- Elgazzar AM., Abdelgied M., Alexander D., Alexaander W., Numano T., Iigo M., Naiki A., Takahashi S., Takase H., Hirose A., Kanno J., Elokke OM., Nasem AM., Tsuda H. Comparative pulmonary toxicity of a DWCNT and MWCNT-7 in rats, *Arch. Toxicol.*, 93:49–59.2019 (Online: Oct. 10, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00204-018-2336-3>)
- Chikura S, Kimoto T, Itoh S, Sanada H, Muto S, Horibata K. Standard protocol for the total red blood cell Pig-a assay used in the interlaboratory trial organized by the Mammalian Mutagenicity Study Group of the Japanese Environmental Mutagen Society. *Genes Environ*, 41:5. 2019

## 2. 学会発表

- 大西 誠、笠井辰也、山本正弘、鈴木正明、東久保 一朗、菅野 純. マーカー法を用いた生体試料中のカーボンブラックの微量定量法の開発. 第 91 回日本産業衛生学会学術年会 2018.5.17 (熊本)
- 三角恭平、大西 誠、山本正弘、平井繁行、菊地芳典、後藤裕子、武田知起、笠井辰也、鈴木正明、菅野 純 Comparison of Floating Coefficient for Carbon Blacks using N-SHOt Cyclone. 第 45 回日本毒性学会学術年会 2018.7.18 (大阪)
- 高橋祐次、相磯成敏、大西 誠、石丸直澄、菅野 純、マクロファージの機能に着目したナノマテリアルのマウス吸入ばく露による慢性影響評価、第 45 回日本毒性学会学術年会、シンポジウム、2018.7.18 (大阪)
- 高橋祐次、トキシコロジスト・ブラッシュアップセミナー: 肺・呼吸器の毒性変化を考えるナノマテリアルの毒性: 肺毒性を中心として、第 19 回日本毒性学会生涯教育講習会、2018.7.17 (大阪)
- Jun Kanno, Chuen-Jinn Tsai, Improvement of

Inhalation Toxicity Testing for Nanomaterials and Compliance Monitoring for Ambient PM. Xth International Aerosol Conference (IAC 2018), Plenary Session 4, 2018.9.6. (St. Louis)

- Abdelgied M., Elgazzar AM., Alexander D., Alexander W., Numano T., Iigo M., Naiki-Ito A., Abdelhamed M., Takase H., Hirose A., Taquahashi Y., Kanno J., Takahashi S., Tsuda H. Potassium octatitanate fibers are possibly carcinogenic in male Fisher 344 rats. 54th congress of the European societies of toxicology (EUROTOX2018) (September 2018 Brussels, Belgium)
- Hirose A., Hojo M., Kobayashi N., Impact of sample preparation of MWCNT for developmental toxicity by intratracheal instillation. The 10th Congress of Toxicology in Developing Countries (CTDC2018) (April 2018 Belgrade, Serbia)
- Hojo M, Kobayashi N, Hasegawa Y, Sakamoto Y, Murakami S, Yamamoto Y, Tada Y, Maeno A, Kubo Y, Ando H, Shimizu M, Taquahashi Y, Suzuki T, Nakae D, Hirose A: Relationship between developmental toxicity of multi-wall carbon nanotubes (MWCNT) and lung inflammation in pregnant mice after repeated intratracheal instillation. 54th congress of the European societies of toxicology (EUROTOX2018) (September 2018 Brussels, Belgium)
- Watanabe W, Akashi T, Hirose A, Miyauchi A, Yoshida H, Kurokawa M. Effects of double-walled carbon nanotubes on the pneumonia in respiratory syncytial virus-infected mice. 54th Congress of the European Societies of Toxicology, (September 2018 Brussels, Belgium)
- 渡辺 渡、明石 敏、宮内亜宜、吉田裕樹、黒川昌彦 二層カーボンナノチューブ曝露のRSウイルス肺炎への影響 第 66 回日本ウイルス学会総会 (2018 年 10 月京都)

坂本義光, 北條幹, 鈴木俊也, 猪又明子, 守安貴子, 広瀬明彦, 中江大: 多層カーボンナノチューブ(MWCNT)を単回経気管噴霧投与した後終生飼育したラットの肺および中皮組織における増殖性病変の発生. 第45回日本毒性学会学術年会(2018年7月大阪)

坂本義光, 多田幸恵, 北條幹, 前野愛, 鈴木俊也, 猪又明子, 守安貴子, 中江大: ラットにおいてDHPNで誘発されたメソテリン陽性肺増殖性病変の病理組織化学的性状. 第35回日本毒性病理学会学術集会(2019年1月東京)

津田洋幸, 徐結苟, Alexander WT., Alexander DB., Abdelgied M., Elgazzar A., 沼野琢旬, 広瀬明彦, 菅野純. ナノマテリアルの気管支内投与による毒性と発がん性の簡易検出システムの開発 第45回日本毒性学会学術年会 大阪 2018年7月

津田洋幸, 徐結苟, Alexander WT., Alexander DB., Abdelgied M., Elgazzar A., 沼野琢旬, 広瀬明彦, 菅野純. ナノマテリアル特にカーボンナノチューブによる肺・胸膜中皮障害と発がん性の経気管肺内噴霧投与(TIPS)試験法の開発 第45回日本毒性学会学術年会(2018年7月大阪)

北條幹, 小林憲弘, 長谷川悠子, 安藤弘, 久保喜一, 海鋒藤文, 田中和良, 五十嵐海, 村上詩歩, 多田幸恵, 生嶋清美, 湯澤勝廣, 坂本義光, 前野愛, 鈴木俊也, 猪又明子, 守安貴子, 高橋祐次, 広瀬明彦, 中江大: 多層カーボンナノチューブのマウス気管内投与による発生毒性と肺の炎症との関連性. 第45回日本毒性学会学術年会(2018年7月大阪)

堀端克良: Pig-a / PIG-A 遺伝子変異試験によるヒトを含めた *in vivo* 遺伝毒性モニタリング. 平成30年度日本環境変異原学会公開シンポジウム(2018年6月東京)

堀端克良: Pig-a アッセイの標準化に関する研究: パリテーション研究の推進とヒトへの適用. 日本環境変異原学会第47回大会(2018年11月京都)

## G. 知的財産権の取得状況

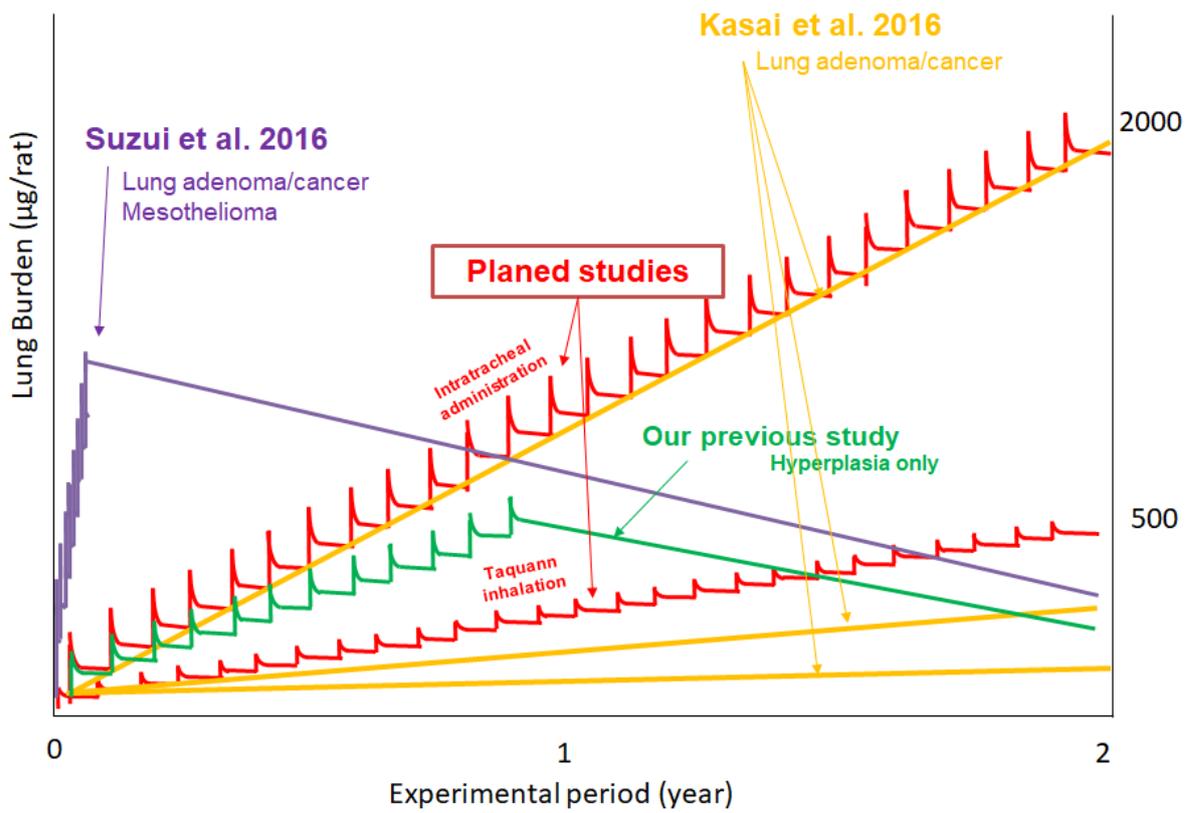
### 1. 特許取得(出願中)

特許出願; 柴田眞利, 菅野 純, 生田達也, 鶴田祐吾, 高橋祐次: 吸入曝露試験用カートリッジ、試験物質供給装置及び吸入曝露試験装置 特願 2018-81836、2018.4.20

特許出願; 柴田眞利, 菅野 純, 生田達也, 鶴田祐吾, 高橋祐次: 試験物質供給装置及び吸入曝露試験装置 特願 2018-81837、2018.4.20

### 2. 実用新案登録 (該当なし)

### 3. その他 (該当なし)



☒ 1. Comparison of cumulative MWCNT lung burden among studies

平成 3 0 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)

Ⅱ. 分担研究報告書

平成 30 年度 厚生労働行政推進調査事業費補助金（化学物質リスク研究事業  
分担研究報告書

研究課題:ナノマテリアル曝露による慢性影響の効率的評価手法開発に関する研究  
(H30-化学-指定-004)

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

研究分担者: 菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所 客員研究員  
独立行政法人労働者健康安全機構  
日本バイオアッセイ研究センター 所長

研究協力者: 大西 誠 独立行政法人労働者健康安全機構  
日本バイオアッセイ研究センター 試験管理部分析室  
技術専門役

研究協力者: 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: 横田 理 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 主任研究官

研究協力者: 高木 篤也 国立医薬品食品衛生研究所 動物管理室長

#### 研究要旨

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

研究分担者らは、吸入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)。そして、本装置が、より一般的なナノマテリアルについても、従来法に比較して容易に、高分散状態でマウス或いはラットを用いた全身曝露吸入試験を実施する目途が立った。

本研究では、OECD TG451 により実施された先行試験 (Particle Fibre Tox 2016, 13:53) との比較、および、本事業において並行して実施される気管内投与実験との比較を目的として、MWNT-7 の 2 年間の間欠全身曝露吸入試験の方法を策定する基盤として、6 時間の

単回曝露による肺負荷量の測定を実施した。測定方法は Benzo[ghi]perylene を用いたマーカー法(大西法)と、走査型顕微鏡を用いて計測する SEM 法にて評価し、両者の比較を兼ねた実験計画とした。先行研究では、Taquann 法に目開き 25  $\mu\text{m}$  の金属製フィルターを用いているが、本事業では、先行試験に合わせて目開き 53  $\mu\text{m}$  の金属製フィルターを用いた(25  $\mu\text{m}$  に比してタンゲル状成分が多いエアロゾルを得る)。動物は C57BL/6NcrSLC 雄性マウスを使用し、12 週齢時に吸入曝露を実施した。群構成は、対照群、低濃度群、高濃度群の 3 群構成とした。曝露装置は、Taquann 直噴全身吸入装置 ver.3.0 を使用した。本装置は、カートリッジ操作が自動化されており、以前のバージョンに比較して操作性に優れ、長時間の曝露が可能となっている。結果として、平均質量濃度は低濃度群  $2.7 \pm 0.2 \text{ mg/m}^3$ 、高濃度群は  $5.1 \pm 0.8 \text{ mg/m}^3$ 、MMAD(高濃度群)は 510 nm( $\sigma_g:8.2$ )であった。マーカー法(大西法)によって測定した肺負荷量は、低濃度群の曝露終了直後(Day 0)が  $3.98 \pm 0.83 \text{ }\mu\text{g/動物}$ 、7日後(Day 7)が  $2.14 \pm 0.83 \text{ }\mu\text{g/動物}$  であった。高濃度群の Day 0 が  $6.19 \pm 0.57 \text{ }\mu\text{g/動物}$ 、Day 7 が  $2.88 \pm 0.23 \text{ }\mu\text{g/動物}$  であった。Day 0 における肺負荷量は、ほぼ濃度依存的であった。

カートリッジ噴射操作の自動化により、6 時間の吸入曝露実験が可能となり、ナノマテリアルの毒性評価の効率化と、OECD ガイドラインに準拠した吸入曝露実験への標準的な適用が期待される。

## A. 研究目的

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

研究分担者らは、吸入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)<sup>1)</sup> 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)。そして、本装置により、一般的なナノマテリアルについても、従来法に比較して容易に、高分散状態の検体として、マウスやラットを用いた全身暴露吸入試験を実施する目的が立った。

本研究では、OECD TG451 により実施された先行試験 (Particle Fibre Tox 2016, 13:53)<sup>2)</sup> との比較を目的として、MWNT-7 の 2 年間の間欠全身暴露吸入の試験の方法を策定する基盤として、6 時間の単回曝露による肺負荷量の測定を実施した。測定方法は Benzo[ghi]perylene (BgP) を用いたマーカー法 (大西法) と走査型顕微鏡を用いて計測する SEM 法にて評価し、両者の比較を兼ねた実験計画とした。

マーカー法は、カーボンナノチューブ

の表面に特異的に結合する BgP を用い、結合した BgP をカーボンナノチューブから脱着して定量することにより間接的にカーボンナノチューブを定量する方法である。短時間で測定が可能であり、ある程度凝集した検体であっても測定が可能であるが、カーボンナノチューブのエアロゾルのサイズに関する情報は得られない。一方、SEM 法は、カーボンナノチューブを走査型電子顕微鏡にて直接観察し、本数を計測することで定量する方法である。測定には相当な時間を要し、凝集体に適用できないことが欠点であるが、カーボンナノチューブのサイズ情報が得られるため、吸入されたカーボンナノチューブのサイズと誘発された肺病変とを関連させることが可能である。本年度の分担研究では、マーカー法による測定を実施した。

曝露装置は、Taquann 直噴全身吸入装置 ver.3.0 を使用した。本装置は、カートリッジ噴射操作が自動化されており、以前のバージョンに比較して操作性に優れ、長時間の曝露が可能となっている。

## B. 研究方法

### B-1. 検体の高分散化処理 (Taquann 法)

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

繊維径 70-170 nm (平均 100 nm)

長さ 1-19  $\mu\text{m}$  (> 5  $\mu\text{m}$  27.5%)

繊維数  $3.55 \times 10^{11}$  本/g

形状 繭状凝集体を含む単離繊維

化学組成 炭素純度 99.5%以上

鉄: 3,500 ppm

硫黄: 470 ppm

塩素: 20 ppm

フッ素: <5 ppm

臭素: <40 ppm

MWCNT 原末をガラス製ビーカー中で TB に懸濁した。氷冷化で TB をシャーベット状にして金属製スパーテルで十分に混合した後、凍結融解による分散促進を一回行った。超音波洗浄器 (SU-3TH、出力 40W、発信周波数 34kHz) に 15 分静置して分散させ、金属製フィルター (セイシン企業、目開き 53  $\mu\text{m}$ ) で濾過し大型の凝集体を除くとともに、分散を図り、濾液を直ちに液体窒素で凍結・固化させ、溶媒回収型真空ポンプにより減圧して TB を昇華させて除去し MWCNT の乾燥検体を得た。

先行研究では、目開き 25  $\mu\text{m}$  の金属製フィルターを用いているが、H30 年度からの事業では、2 年間の長期吸入曝露試験を計画しており、H30 年度では先行試験<sup>2)</sup>に合わせて、目開き 53  $\mu\text{m}$  の金属製フィルターを用いた。以下、目開き 25  $\mu\text{m}$  金属フィルターで Taquann 法処理を行った MWNT-7 を T-CNT7#25、目開き 53  $\mu\text{m}$  金属フィルターで Taquann 法処理を行った MWNT-7 を T-CNT7#53 と記載する (図 1)。尚、T-CNT7#53 は T-CNT7#25 に比してタングル状成分の含量が多い。

### B-2. マウス全身曝露吸入実験

#### 1) 動物

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

なお、本実験では「ナノマテリアル暴露による感染性免疫系への影響の効率的な評価系の確立に関する研究」に供する BALB/cCrSlc 雌性マウスを 4 週齢で導入し、

5週齢で並行して吸入曝露実験を行った。

## 2) 飼育条件

飼育ケージは、ポリカーボネイト製のアウターケージとPET製インナーケージを使用した。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 (RAIR HD SUPER MOUSE 750™ 個別換気式飼育装置 特型)を使用した。飼育条件は、温度;25±1℃、湿度;55±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。

ケージ内の環境を改善する目的で、シェファードシャック (Shepherd Specialty Papers社)をケージ内に設置した。

## 3) 群構成

対照群、T-CNT7#53 低濃度群(目標濃度 3 mg/m<sup>3</sup>)、T-CNT7#53 高濃度群(目標濃度 6 mg/m<sup>3</sup>)の3群構成とした。対照群 6匹、T-CNT7#53 低濃度群 12匹、T-CNT7#53 高濃度群 12匹のマウスを使用し、1日6時間(10:00~16:00)の単回吸入曝露を行った。曝露終了直後(Day 0)、及び1週間後(Day 7)に定期解剖を行い、肺サンプルを採取した(表1)。

## 4) ダスト発生装置

MWCNTのエアロゾル化は、既設のTaquann直噴全身吸入装置Ver3.0を

使用した(共同開発 柴田科学株式会社、特許申請中)(図2)。

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。カートリッジはインナーカートリッジとアウターカートリッジから構成される。検体を収容するインナーカートリッジ(容量:25 mL、内寸:直径20 mm 高さ80 mm)はステンレス製であり、これを樹脂製のアウターカートリッジに収容して使用する。カートリッジのキャップ部には圧縮空気を注入するセンターノズルと、エアロゾル噴出孔が設計されている(図3)。

カートリッジへの検体の充填はT-CNT7#53をTBに0.05 mg/mLの濃度で再度懸濁し、低濃度群では10 mL、高濃度群では20 mLの容量を各カートリッジに分注し、直ちに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真空ポンプで減圧し、TBを昇華除去することで達成した。これにより、T-CNT7#53を低濃度群では0.5 mg/カートリッジ、高濃度群では1 mg/カートリッジ、充填した。

噴射装置は、サブチャンバー(容量:43 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側方に煙突状のダクトを設け、その先端部にはポリエチレン製の袋で覆ったULPAフィルターが接続され、袋を隔てて外気へ圧を逃がす設計となっている。煙突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

チャンバー内で効果的に分散された後、希釈されつつ曝露チャンバーに導く構造となっている。

噴射装置からカートリッジへの圧縮空気の供給圧力は0.48 Mpa、噴射時間は0.2秒、1カートリッジ当たり0.3秒間隔3回の噴射を行った。曝露チャンバーの総換気流量は32.5 L/min(基礎換気流量;29.5 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、曝露開始時に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。6時間の吸入曝露実験において、合計91本のカートリッジを使用した。なお、Ver.2.5までは手動にてカートリッジの交換、噴射を行っていたが、Ver3.0からは完全自動化されている。

曝露チャンバー内の温度、湿度並びに圧力変動を曝露時間の6時間を通してモニタリングした。

#### 5) 曝露チャンバー

動物を収容し検体を曝露する曝露チャンバーは、アクリル製の OUTER チャンバーとPET樹脂で作製した INNER チャンバー(直径660 mm、高さ477 mm)の二重構造となっており、検体が触れる INNER 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(共同開発 柴田科学株式会社、特許所得済)。メインチャンバーの気積は179 Lである。メインチャンバーの上部は円錐状となつて

サブチャンバーに接続されている。動物は、メインチャンバー内に設置した円形一段のステンレス金網製のケージを個別に仕切り収容する。マウスは最大25匹収容が可能である。ケージには給水・給餌装置がないため、6時間曝露時の動物への負荷軽減のため給水用寒天(日本エスエルシー株式会社)をケージ内に留置した。

#### 6) 曝露チャンバー内のエアロゾル濃度測定

曝露チャンバー内のエアロゾル濃度のモニタリングは、相対濃度(CPM; count per minutes)と、質量濃度( $\text{mg}/\text{m}^3$ )測定を並行して行った。

相対濃度測定は、対応濃度 $3 \times 10^5$ 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。

曝露チャンバーとCPCを接続するチューブは、銅管を使用してサンプリング損失を最小限にした。

先行研究において、CPCによるMWCNTの測定において、 $1 \times 10^3$ 個/mL程度の粒子数測定であっても、一時的に低値で推移することが散見されたことから、10倍希釈してCPCによる測定を行った。CPCの測定原理では、理論上、測定セル内で一つの粒子だけを検出する構造となっているが、MWCNTのように繊維径は100 nm程度であるが、繊維長は10  $\mu\text{m}$ を超える

粒子が含まれているため、測定セル内で繊維が重なり、過小評価されると想定される。

質量濃度測定は、ローボリウムサンプラー(080050-155、φ55 mmろ紙ホルダー、柴田科学)にフッ素樹脂バインダーガラス繊維フィルター(Model TX40HI20-WW、φ55mm、捕集効率(DOP 0.3 μm): 99.9%、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の流量で曝露時間の6時間において、0~1hr、2~3hrおよび5~6hrの3回実施した。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 L/min × 60min = 90 Lから1 m<sup>3</sup>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。

#### 7) エアロゾルの粒度分布

エアロゾルの粒度分布は、Micro-Orifice Uniform Deposit Impactors (MOUDI)を用いた Mass Median Aerodynamic Diameter (MMAD)である。10 L/minの流量で曝露チャンバー内のエアロゾルを吸引して MOUDI (Model 125 Nano MOUDI、KANOMAX、分級サイズ; No.1; 10 μm、No.2; 5.6 μm、No.3; 3.2 μm、No.4; 1.8 μm、No.5; 1.0 μm、No.6; 0.56 μm、No.7; 0.32 μm、No.8; 0.1 μm、No.9; 0.10 μm、No.10; 0.056 μm、No.11; 0.032 μm、No.12; 0.018 μm、No.13; 0.01 μm)に導いた。

吸引時間は20分とした。各分級ステ

ージには専用のアルミホイルにシリコンオイルを塗布したものを装着し検体を回収した。尚、シリコンオイル塗布アルミホイルは、使用前に50℃のインキュベーター内で3日以上留置しシリコンオイルに含まれる溶媒を除去した。マイクロ天秤(XP26V、METTLER TOLEDO)を使用してアルミホイルの質量を、MOUDI装着前と、MWCNT回収後に測定し、その差分を検体質量とした。

エアロゾルの粒度分布測定は、測定機器の数が限られることから、高濃度群のみを対象に実施した。

#### 8) 解剖

肺組織のサンプリングのため、曝露終了直後(Day 0)、1週間後(Day 7)に定期解剖を行った。

マウスは吸入麻酔器(TK-7、バイオマシナリー)を用いイソフルラン(DS ファーマアニマルヘルス)麻酔下で、腋窩動脈を切断して放血致死後に解剖した。被毛に付着している可能性のあるMWCNTの混入を考慮し、開胸前に全ての被毛を剥皮により除去した。

#### 倫理面への配慮

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

#### B-3. 肺負荷量測定

##### 1) 肺サンプルからのMWCNTの抽出

肺サンプルを対象にしてMWCNT沈着量を測定した。

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

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

## 2) MWCNTの測定

MWCNTの定量は、Benzo[ghi]perylene (BgP)をマーカーとして用いるマーカー法(大西法)を用いた。

### (1) 装置、器具及び試薬

①高速液体クロマトグラフ(HPLC、Acquity

UPLC、ウォーターズ)

- ②電子天秤(AE163、日本シイベルワーグナー)
- ③振とう機(TS-100、サーマル化学産業株式会社)
- ④遠心分離機(Microfuge® 22R Centrifuge、ベックマンコールター)
- ⑤超音波分散機(VP-30S、タイテック)

### (2) 試薬

- ①アセトニトリル(HPLC用、富士フィルム和光純薬)
- ②メタノール(HPLC用、富士フィルム和光純薬)
- ③Benzo[ghi]perylene(BgP、試薬特級、富士フィルム和光純薬)
- ④TWEEN 80(富士フィルム和光純薬)

### (3) 測定条件

HPLC:ウォーターズ Acquity UPLC

カラム:Acquity BEH C18 (ウォーターズ)

カラム粒径、長さ × 内径:1.7 μm、100 mm × 2.1 mm φ

カラム温度: 40°C

検出器:蛍光検出器(励起波長: 294 nm、蛍光波長: 410 nm)

試料注入量: 5 μL

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

移動相流量: 0.5 mL/min

### (3) 検量線原液の調製

①T-CNT7#53を約5 mgを10 mL容のフタ無しガラス試験管に精密に秤量し、0.1% Tween水溶液(Tw-sol)を2 mL加えてタッチミキサーで分散させ、100 mL容のフタ・メモリ付のPPチューブへ移し、この操作を4回繰

り返し、最後に Tw-sol で 100 mL にメスアップした。その溶液を超音波分散機により 1 分間、超音波分散した。(以下用いる周波数と強度は 20 kHz、300 W、MWCNT 各原液:50 µg/mL)

#### ②検量線溶液 C5 の調製

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

#### ②検量線溶液 (C1~C5)の調製

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

#### ③マーカー溶液の調製

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

#### (4) 試料の前処理と HPLC による測定

検量線溶液 C5 及び肺から抽出した MWCNT を懸濁調製した各溶液 1 mL を 12,000 rpm で 10 分間遠心分離した。その上清を除去し、TW-mixture を 1 mL 加え、12000 rpm で 10 分間遠心分離した。再度、上清を除去し、それぞれに濃塩酸 0.2mL を加えタッチミキサーで 10 秒間攪拌し、12,000 rpm で 10 分間遠心

分離し、上澄み液を除去し濃硫酸 0.2mL を加え、残渣を分解し、タッチミキサーで 10 秒間攪拌した。その後、Benzo[ghi]perylene(BgP)マーカー溶液 1 mL をそれぞれに添加し、10 秒間超音波分散し、振とう機で 15 分間攪拌させた後、0.4 µm のフィルター(ワットマン:GE Healthcare UK Ltd)を用いて、ろ過したフィルター上の MWCNT をポンチ(φ 8 mm)でくり抜き、PP 試験管に入れ、アセトニトリル 1 mL を加え、タッチミキサーで 10 秒間攪拌・抽出し、その溶液を HPLC で測定した。

#### (5) 肺内の MWCNT の沈着量の計算

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

## C. 研究結果

### (1) T-CNT7#53 の吸入曝露実験

T-CNT7#53 低濃度群の全身曝露吸入実験における全体の平均質量濃度は  $2.7 \pm 0.2$  mg/m<sup>3</sup>、高濃度群では  $5.1 \pm 0.8$  mg/m<sup>3</sup> であり、目標濃度に対して低濃度群では 90%、高濃度群では 85% の値であった(図 4D、図 5E)。

CPC の測定において、測定後に希釈流量が設定値と異なった値であることが判明した。CPC カウントの絶対値表記ができないため、波形のみを図 4A 及び図 5A に示した。CPC の値はカートリッジから噴射直後に速やかに上昇し、次のカートリッジを噴射する 4 分後までの間に徐々に低下する鋸歯状を示した。CPC カウントは、低濃度群では 0 から 6 時間の

平均値に対して、25%～209%、高濃度群では26%～200%の範囲で変動した(図4D、図5E)。

MMADは高濃度群のみの測定であるが、510 nm( $\sigma_g$ :8.2)であった(図5D、図5E)。

6時間の吸入曝露実験において使用した総検体量は、低濃度群では46 mg (0.5 mg/cartridge × 91 cartridges)、高濃度群では91 mg (1 mg/cartridge × 91 cartridges)である。6時間の曝露チャンバーの総換気量は11.7 m<sup>3</sup> (32.5 L/min × 360 min)であることから名目上のエアロゾル濃度は低濃度群では3.9 mg/m<sup>3</sup>、高濃度群では7.8 mg/m<sup>3</sup>と計算される。実測値の濃度から、エアロゾル化効率を計算すると低濃度群、高濃度群それぞれ69.9%、66.0%であった。

6時間の曝露時間を通して、曝露チャンバー内の温度は25°C台に維持された。湿度は、約50%～80%の間であった。動物の一般状態に異常は認められなかった。

## (2) マウスの肺病理組織検査

マーカ法(大西法)によって測定した、低濃度群におけるDay 0の肺負荷量平均値は3.98 ± 0.83 μg/動物、Day 7では2.14 ± 0.83 μg/動物であった。高濃度群におけるDay 0の肺負荷量平均値は6.19 ± 0.57 μg/動物、Day 7では2.88 ± 0.23 μg/動物であった。Day 0における肺負荷量は、ほぼ濃度依存的な値であった。

なお、SEM法用にサンプリングした肺については、現在、測定を進めている状況である。

## D. 考察

本分担研究では、T-CNT7#53の2年間の間欠吸入曝露実験に向けて肺負荷量の基礎データを得る事、並びにマーカ法(大西法)

とSEM法でのMWCNT肺負荷量の相違を確認するため、T-CNT7#53のマウスに対する6時間の単回全身曝露吸入を行い、曝露終了直後及び曝露7日目の肺負荷量測定を実施した。

先行研究で独自に開発したカートリッジ直噴式全身曝露装置は、汎用性が高く、少量の検体で全身曝露吸入実験が可能である。これまで、MWCNT、DWCNT、酸化チタン、チタン酸カリウムなど物理化学的性状が異なる検体の吸入曝露実験を実施してきた実績がある。一方、カートリッジの装填、噴射、交換を手動で行っていたため、2時間の曝露実験が限度であった。カートリッジの一連の操作の自動化は技術的に非常に難易度が高く、新たな技術基盤の構築が必要であった。

本事業で使用したTaquann全身曝露吸入装置 ver 3.0は、カートリッジ操作を自動化する技術を導入し、OECDガイドラインで規定されている6時間の曝露実験を可能とした。カートリッジの構造も見直し、安価に製造可能なインナーカートリッジを導入したことで、大量のカートリッジを用意することのできるため、6時間の曝露実験に必要な検体調製が効率よく行えるようになった。また、カートリッジの噴射間隔をこれまでの6～7分間よりも短く設定することが可能となったため、エアロゾル濃度の変動範囲も最小限に抑えられるようになった。

曝露チャンバーは給餌・給水ができないが、動物輸送用の寒天を供給することにより、動物への負担を軽減することが可能であった。しかしながら、チャンバー内の湿度が最大80%程度にまで上昇することから、チャンバーに導入する清浄空気の加湿方法、寒天の供給量を最適化する必要がある。

肺負荷量は、測定の結果、曝露終了直後において低濃度群では約4 μg/動物、高濃度群

では約 6  $\mu\text{g}$ /動物であった。先行研究では Taquann 法処理に 25  $\mu\text{m}$  の金属製フィルターを用いた検体 (T-CNT7#25)、並びに、原末を用い 2.2  $\text{mg}/\text{m}^3$  の質量濃度、2 時間/日  $\times$  5 日間 (合計 10 時間) の吸入曝露実験において、SEM 法による測定により Taquann 処理検体では約 8  $\mu\text{g}$ /動物、原末では約 4  $\mu\text{g}$ /動物という結果が得られている。

検体の調製方法、曝露条件および測定法が異なるため、本研究と直接比較はできないが、肺負荷量が曝露濃度と曝露時間の積に比例すると仮定すると (肺負荷量 = 曝露濃度  $\times$  曝露時間  $\times k$ )、本研究における比例定数は低濃度では 0.25、高濃度では 0.20 と計算される。これは、先行研究において原末を曝露した場合の比例定数 (0.18) よりは大きく、T-CNT7#25 (0.36) よりは小さな値である。比例定数は、検体の微細さ、すなわち金属フィルターのサイズに依存的である可能性が考えられた。実務的な面からは、これまで 5 日間必要であった曝露時間を 1 日で実施する事が可能となるため、毒性評価の効率化が期待される。

## E. 結論

Taquann 全身曝露吸入装置 Ver.3.0 を使用し、T-CNT7#53 をマウスに 6 時間、単回吸入曝露を行い、肺負荷量測定をマーカ法にて実施した。低濃度群における Day 0 の肺負荷量平均値は約 4  $\mu\text{g}$ /動物、高濃度群は約 6  $\mu\text{g}$ /動物であり、肺負荷量は、ほぼ濃度依存的な値であった。カートリッジ操作の自動化により、6 時間の吸入曝露実験が可能となり、ナノマテリアルの毒性評価の効率化と、OECD ガイドラインに準拠した標準的な吸入曝露実験への適用が期待された。

謝辞:

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

## F. 参考文献

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

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Abdelgied M, El-Gazzar AM, Alexander DB, Alexander WT, Numano T, Iigou M, Naiki-Ito A, Takase H, Abdou KA, Hirose A, Taquahashi Y, Kanno J, Abdelhamid M, Tsuda H, Takahashi S. Pulmonary and pleural toxicity of potassium octatitanate fibers, rutile titanium dioxide nanoparticles, and MWCNT-7 in male Fischer 344 rats. *Arch Toxicol.* 2019 Feb 13.

Otsuka K, Yamada K, Taquahashi Y, Arakaki R, Ushio A, Saito M, Yamada A, Tsunematsu T, Kudo Y, Kanno J, Ishimaru N. Long-term polarization of alveolar macrophages to a profibrotic phenotype after inhalation exposure to multi-wall carbon nanotubes. *PLoS One.* 2018 Oct 29;13(10):e0205702.

Abdelgied M, El-Gazzar AM, Alexander DB, Alexander WT, Numano T, Iigou M, Naiki-Ito

A, Takase H, Abdou KA, Hirose A, Taquahashi Y, Kanno J, 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 Jul;109(7):2164-2177.

## 2. 学会発表

高橋祐次、トキシコロジスト・ブラッシュアップセミナー: 肺・呼吸器の毒性変化を考えるナノマテリアルの毒性: 肺毒性を中心として、第19回日本毒性学会生涯教育講習会、2018.7.17 (大阪)

菅野 純、ナノマテリアルの吸入曝露による発がん性研究第45回日本毒性学会学術年会、シンポジウム、2018.7.18(大阪)

高橋祐次、相磯 成敏、大西 誠、石丸 直澄、菅野 純、マクロファージの機能に着目したナノマテリアルのマウス吸入ばく露による慢性影響評価、第45回日本毒性学会学術年会、シンポジウム、2018.7.18(大阪)

Jun Kanno, Chuen-Jinn Tsai, Plenary Session 4: Improvement of Inhalation Toxicity Testing for Nanomaterials and Compliance Monitoring for Ambient PM., Plenary Lectures, Xth International Aerosol Conference (IAC 2018) ,Invited, 2019.9.6, St. Louis.

Yuhji Taquahashi, Satoshi Yokota, Koichi Morita, Masaki Tsuji, Yoko Hirabayashi, Akihiko Hirose and Jun Kanno, Development of Whole Body Inhalation System for Well-Dispersed Nanomaterials Toxicity Testing -Taquann Direct-Injection Whole Body Inhalation System-, Poster, 58th Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2019.3.12., Baltimore

## H. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

特許出願; 柴田眞利、菅野 純、生田達也、鶴田祐吾、高橋祐次: 吸入曝露試験用カートリッジ、試験物質供給装置及び吸入曝露試験装置 特願 2018-81836、2018.4.20

特許出願; 柴田眞利、菅野 純、生田達也、鶴田祐吾、高橋祐次: 試験物質供給装置及び吸入曝露試験装置 特願 2018-81837、2018.4.20

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

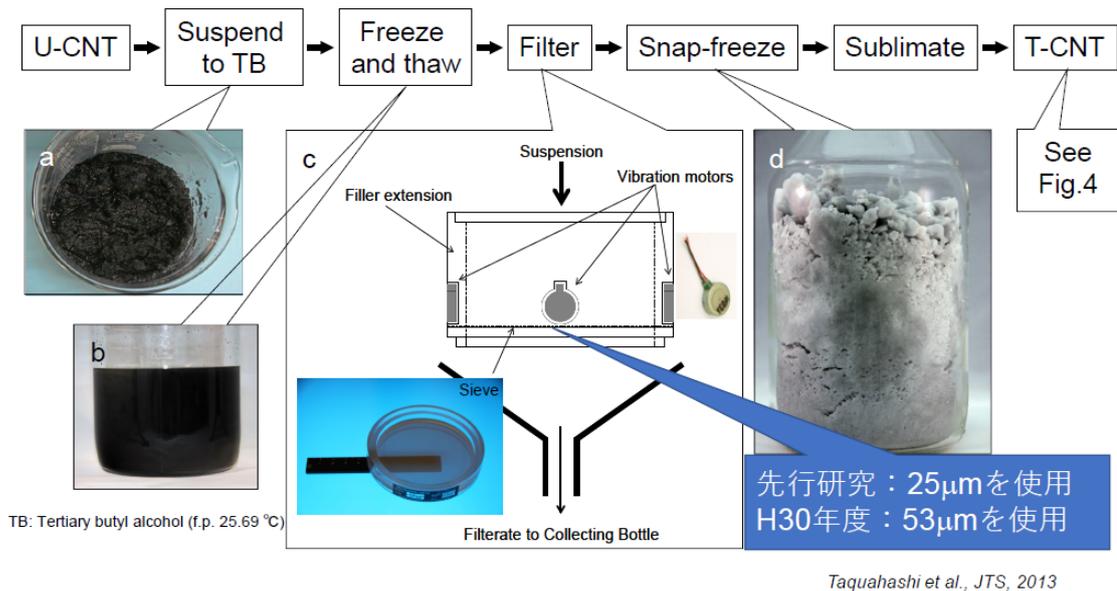


図1 Taquann法の概要

Taquann法はこれまで目開き25 $\mu$ mの金属製フィルターを用いているが、H30年度からの事業では、2年間の長期吸入曝露試験を計画しており、先行試験(Particle Fibre Tox 2016)で用いられたものと同じ目開き53 $\mu$ mの金属製フィルターを用いた。

表1 群構成

| Group                                       | N  | Individual number        | Sampling | Mesurement Technique         |
|---|----|--------------------------|----------|------------------------------|
| Control                                     |    |                          |          |                              |
| Clean air                                   | 6  | #1, #2, #3<br>#4, #5, #6 | Day 7    | Ohnishi method<br>SEM method |
| 6 hrs./Day x 1 Day                          |    |                          |          |                              |
| Low Concentration                           |    | #7, #8, #9               | Day 0    | Ohnishi method               |
| T-CNT#53                                    | 12 | #10, #11, #12            | Day 0    | SEM method                   |
| Target Concentratetion: 3 mg/m <sup>3</sup> |    | #13, #14, #15            | Day 7    | Ohnishi method               |
| 6 hrs./Day x 1 Day                          |    | #16, #17, #18            | Day 7    | SEM method                   |
| High Concentration                          |    | #19, #20, #21            | Day 0    | Ohnishi method               |
| T-CNT#53                                    | 12 | #22, #23, #24            | Day 0    | SEM method                   |
| Target Concentratetion: 6 mg/m <sup>3</sup> |    | #25, #26, #27            | Day 7    | Ohnishi method               |
| 6 hrs./Day x 1 Day                          |    | #28, #29, #30            | Day 7    | SEM method                   |

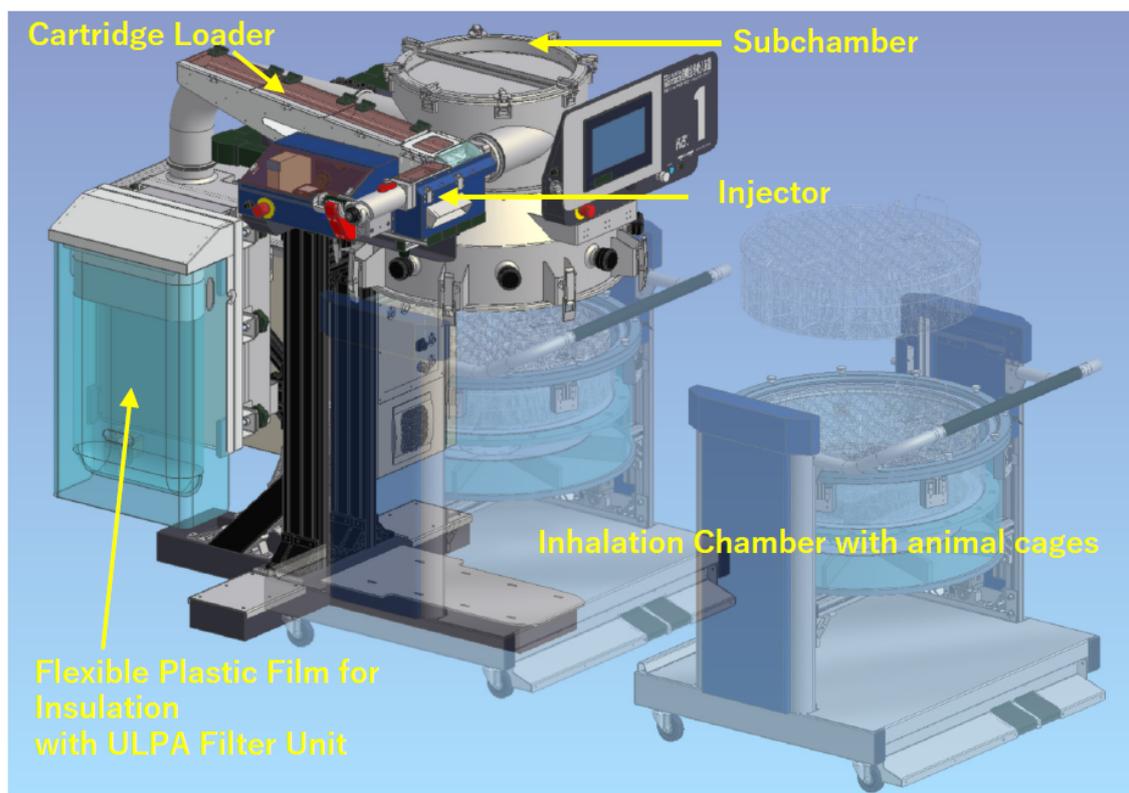


図2 Taquann 直噴全身曝露吸入装置 ver.3.0

マウスの全身曝露吸入実験には既設の Taquann 直噴全身吸入装置 Ver3.0 を使用した (共同開発 柴田科学株式会社)。カートリッジ操作が完全に自動化されている。



図3 カートリッジ

Ver3.0 では二重構造とし、圧縮空気の導入とエアゾルの噴射機構は共にキャップ部分に集約されている。

表 2 マーカー法測定の見量線調製

| 試料名  | C5採取量 (mL) | Tw-sol添加量 (mL) | 濃度 (mL) |
|------|------------|----------------|---------|
| 溶液C1 | 0.1        | 0.9            | 0.2     |
| 溶液C2 | 0.2        | 0.8            | 0.4     |
| 溶液C3 | 0.4        | 0.6            | 0.8     |
| 溶液C4 | 0.6        | 0.4            | 1.2     |
| 溶液C5 | 0.8        | 0.2            | 1.6     |

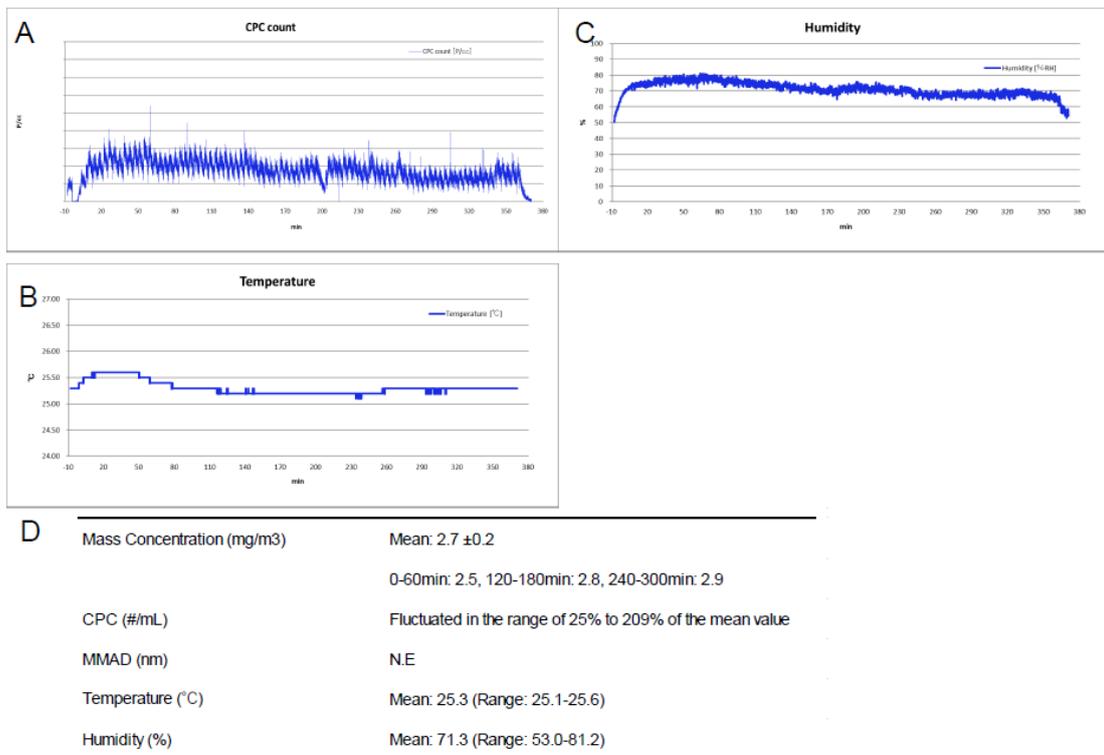


図 4 低濃度群の吸入曝露実験結果

A: CPC波形、B:曝露チャンバー内温度推移、C:曝露チャンバー内湿度推移、D:測定結果のまとめ。T-CNT7#53低濃度群の全身曝露吸入実験における全体の平均質量濃度は $2.7 \pm 0.2 \text{ mg/m}^3$ 、目標濃度に対して90%の値であった(D)。CPCの測定において、測定後に希釈流量が設定値と異なった値であることが判明した。CPCカウントの絶対値表記ができないため、波形のみをAに示した。CPCの値はカートリッジから噴射直後に速やかに上昇し、次のカートリッジを噴射する4分後までの間に徐々に低下する鋸歯状を示した。CPCカウントは、低濃度群では0から6時間の平均値に対して、25%~209%の範囲で変動した(D)。

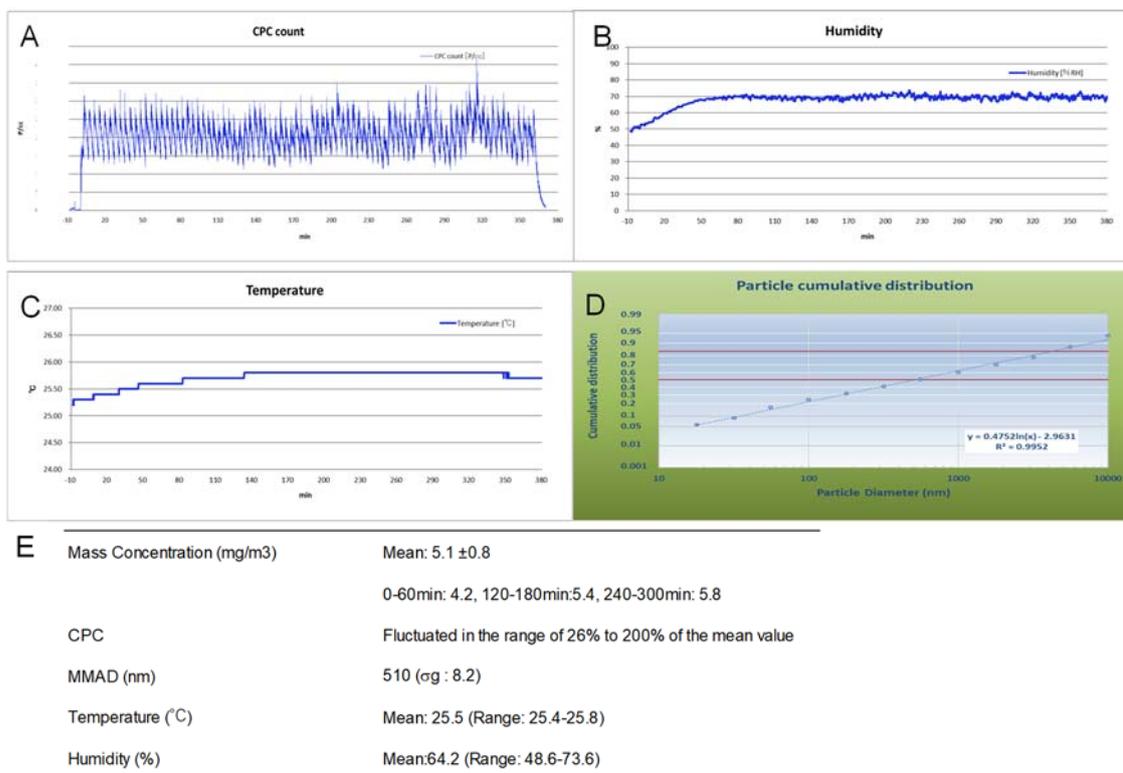


図 5. 高濃度群の吸入曝露実験結果

A: CPC波形、B: 曝露チャンバー内湿度推移、C: 曝露チャンバー内温度推移、D: 測定結果のまとめ。T-CNT7#53高濃度群の全身曝露吸入実験における全体の平均質量濃度は $5.1 \pm 0.8 \text{ mg/m}^3$ であり、目標濃度に対して85%の値であった(E)。

CPCの測定において、測定後に希釈流量が設定値と異なった値であることが判明した。CPCカウントの絶対値表記ができないため、波形のみをAに示した。CPCの値はカートリッジから噴射直後に速やかに上昇し、次のカートリッジを噴射する4分後までの間に徐々に低下する鋸歯状を示した。CPCカウントは、高濃度群では26%～200%の範囲で変動した(E)。MMADは510 nm( $\sigma_g: 8.2$ )であった(D、E)。

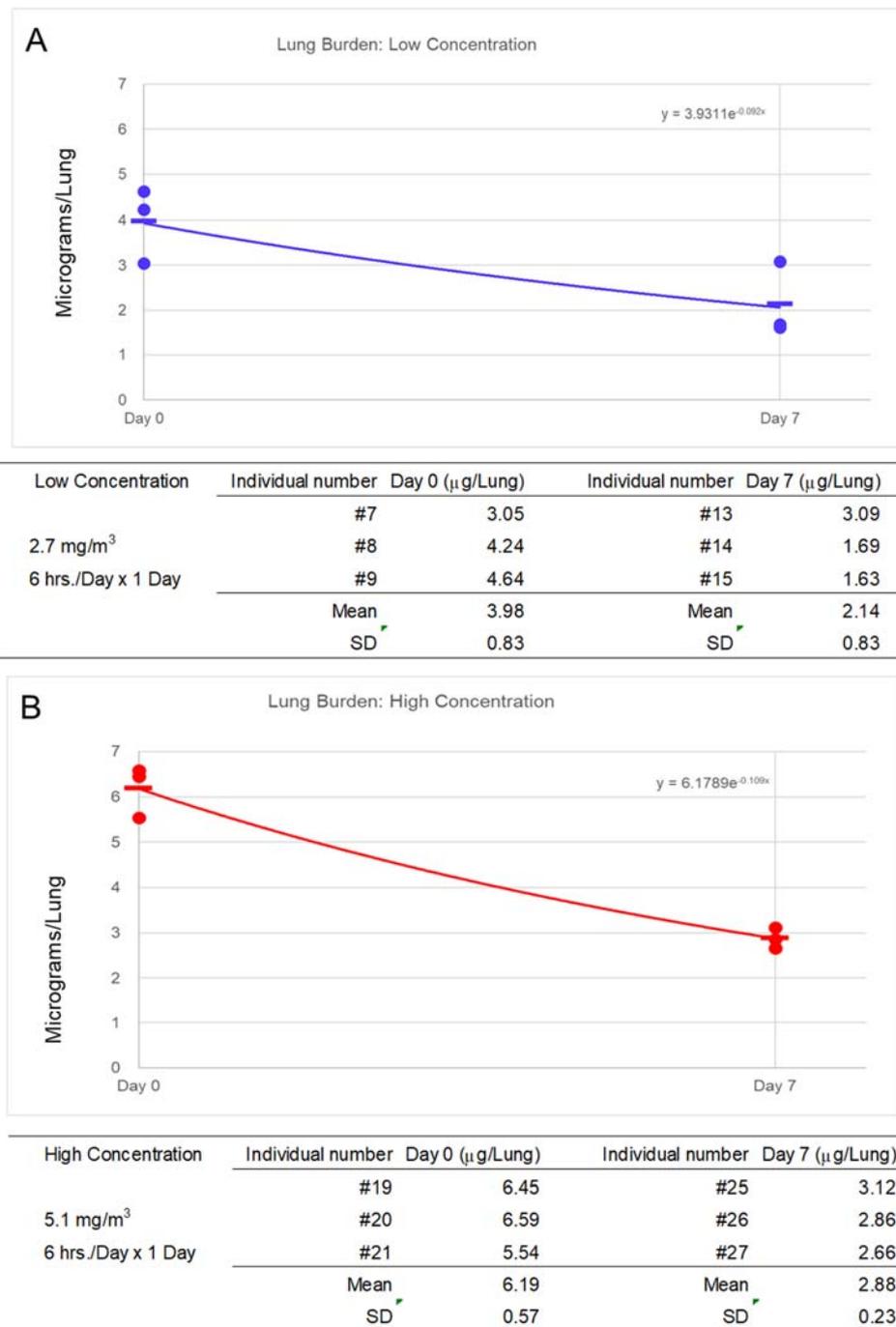


図6 肺負荷量測定結果

A: 低濃度群、B: 高濃度群

マーカー法(大西法)によって測定した、低濃度群における Day 0 の肺負荷量平均値は  $3.98 \pm 0.83 \mu\text{g/動物}$ 、Day 7 では  $2.14 \pm 0.83 \mu\text{g/動物}$  であった。高濃度群における Day 0 の肺負荷量平均値は  $6.19 \pm 0.57 \mu\text{g/動物}$ 、Day 7 では  $2.88 \pm 0.23 \mu\text{g/動物}$  であった。Day 0 における肺負荷量は、ほぼ濃度依存的な値であった。

平成 30 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: ナノマテリアルの吸入曝露手法の開発に関する研究  
(H30-化学-指定-004)

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

研究分担者: 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: 横田 理 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 主任研究官

研究協力者: 高木 篤也 国立医薬品食品衛生研究所 動物管理室長

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

#### 研究要旨

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

研究分担者らは、吸入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)。そして、本装置が、より一般的なナノマテリアルについても、従来法に比較して容易に、高分散状態でマウス或いはラットを用いた全身曝露吸入試験を実施する目途が立った。

本研究では、OECD TG451 により実施された先行試験 (Particle Fibre Tox 2016) および本研究班にて並行して実施される気管内投与実験との比較を目的として、MWNT-7 の 2 年間の間欠全身曝露吸入試験を開始した。Taquann 法処理にはこれまで目開き 25  $\mu\text{m}$  の金属製フィルターを用いているが、本事業では、先行試験に合わせて目開き 53  $\mu\text{m}$  の金属製フィルターを用いた (25  $\mu\text{m}$  に比してタンゲル状成分が多いエアロゾルを得る)。動物は C57BL/6NcrSLC 雄性マウ

スを使用し、12週齢時に吸入曝露を実施した。群構成は、対照群、低濃度群、高濃度群の3群構成とした。曝露装置は、Taquann直噴全身吸入装置 ver.3.0を使用した。本装置は、カートリッジ操作が自動化されており、以前のバージョンに比較して操作性に優れ、長時間の曝露が可能となっている。吸入曝露実験の結果、平均質量濃度は低濃度群  $2.7 \pm 0.1 \text{ mg/m}^3$ 、高濃度群は  $5.1 \pm 0.2 \text{ mg/m}^3$ 、MMAD の平均値は低濃度群、高濃度群それぞれ 439 nm( $\sigma$ : 7.8-8.1)、572 nm( $\sigma$ : 6.4-9.3)、であった。カートリッジ噴射操作の自動化により、6時間の吸入曝露実験が可能となり、ナノマテリアルの毒性評価の効率化と、OECD ガイドラインに準拠した吸入曝露実験への標準的な適用が期待される。

## A. 研究目的

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

研究分担者らは、吸入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)<sup>1)</sup>。そして、本装置により、一般的なナノマテリアルについても、従来法に比較して容易に、高分散

状態の検体として、マウスやラットを用いた全身暴露吸入試験を実施する目途が立った。

本研究では、OECD TG451 により実施された先行試験 (Particle Fibre Tox 2016, 13:53)<sup>2)</sup>、並びに気管内投与実験との比較を目的として、MWNT-7 の 2 年間の間欠全身暴露吸入の試験を開始した。

曝露装置は、Taquann 直噴全身吸入装置 ver.3.0 を使用した。本装置は、カートリッジ噴射操作が自動化されており、以前のバージョンに比較して操作性に優れ、長時間の曝露が可能となっている。

## D. 研究方法

### B-1. 検体の高分散化処理 (Taquann 法)

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

繊維径 70-170 nm (平均 100 nm)  
長さ 1-19  $\mu\text{m}$  (> 5  $\mu\text{m}$  27.5%)  
繊維数  $3.55 \times 10^{11}$  本/g  
形状 繭状凝集体を含む単離繊維  
化学組成 炭素純度 99.5% 以上  
鉄: 3,500 ppm  
硫黄: 470 ppm

塩素:20 ppm  
フッ素: <5 ppm  
臭素: <40 ppm

MWCNT原末をガラス製ビーカー中でTBに懸濁した。氷冷化でTBをシャーベット状にして金属製スパーテルで十分に混合した後、凍結融解による分散促進を一回行った。超音波洗浄器(SU-3TH、出力40W、発信周波数34kHz)に15分静置して分散させ、金属製フィルター(セイシン企業、目開き53 μm)で濾過し大型の凝集体を除くとともに、分散を図り、濾液を直ちに液体窒素で凍結・固化させ、溶媒回収型真空ポンプにより減圧してTBを昇華させて除去しMWCNTの乾燥検体を得た。

Taquann法はこれまで目開き25 μmの金属製フィルターを用いてきたが、本事業では先行研究と同じ目開き53 μmの金属製フィルターを用いた。以下、目開き25 μm 金属フィルターでTaquann法処理を行ったMWNT-7をT-CNT7#25、目開き53 μm 金属フィルターでTaquann法処理を行ったMWNT-7をT-CNT7#53と記載する(図1)。尚、目開き25 μmの金属製フィルターでは検体の回収率は約10%であるが目開き53 μmの金属製フィルターでは約80%の回収率である。T-CNT7#53はT-CNT7#25に比してタンゲル状成分の含量が多い。

## **B-2. マウス全身曝露吸入実験**

### **1) 動物**

C57BL/6NcrSLC(日本エスエルシー株式会社)雄性マウスを10週齢で購入し2週間の

馴化期間を経たのち12週齢にて使用した。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**

飼育ケージは、ポリカーボネイト製のアウトターケージとPET製インナーケージを使用した。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(RAIR HD SUPER MOUSE 750™ 個別換気式飼育装置 特型)を使用した。飼育条件は、温度;25±1℃、湿度;55±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。

体重測定を週1回実施した。

ケージ内の環境を改善する目的で、シェファードシャック(Shepherd Specialty Papers社)をケージ内に設置した。

### **3) 群構成**

対照群、T-CNT7#53 低濃度群(目標濃度3 mg/m<sup>3</sup>)、T-CNT7#53 高濃度群(目標濃度6 mg/m<sup>3</sup>)の3群構成とした。各群50匹のマウスを使用し、1日6時間(10:00~16:00)の吸入曝露を4週間毎に実施した。(表1)。曝露チャンバーはマウスを25匹収容するデザインであるため、各群を二つのサブグループに分けて曝露を実施した。

#### 4)ダスト発生装置

MWCNTのエアロゾル化は、既設のTaquann直噴全身吸入装置Ver3.0を使用した。

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。カートリッジはインナーカートリッジとアウターカートリッジから構成される。検体を収容するインナーカートリッジ(容量:25 mL、内寸:直径20 mm 高さ80 mm)はステンレス製であり、これを樹脂製のアウターカートリッジに収容して使用する。カートリッジのキャップ部には圧縮空気を注入するセンターノズルと、エアロゾル噴出孔が設計されている。

カートリッジへの検体の充填はT-CNT7#53をTBに0.05 mg/mLの濃度で再度懸濁し、低濃度群では10 mL、高濃度群では20 mLの容量を各カートリッジに分注し、直ちに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真空ポンプで減圧し、TBを昇華除去することで達成した。これにより、T-CNT7#53を低濃度群では0.5 mg/カートリッジ、高濃度群では1 mg/カートリッジ、充填した。

噴射装置は、サブチャンバー(容量:43 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側方に煙突状のダクトを設け、その先端部にはポリエチレン製の袋で覆ったULPAフィルターが接続され、袋を隔てて外気へ圧を逃がす設計となっている。

煙突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、希釈されつつ曝露チャンバーに導く構造となっている。

噴射装置からカートリッジへの圧縮空気の供給圧力は0.48 Mpa、噴射時間は0.2秒、1カートリッジ当たり0.3秒間隔3回の噴射を行った。曝露チャンバーの総換気流量は32.5 L/min(基礎換気流量;29.5 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、曝露開始時に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。6時間の吸入曝露実験において、合計91本のカートリッジを使用した。なお、Ver.2.5までは手動にてカートリッジの交換、噴射を行っていたが、Ver3.0からは完全自動化されている。

曝露チャンバー内の温度、湿度並びに圧力変動を曝露時間の6時間を通してモニタリングした。

#### 5)暴露チャンバー

動物を収容し検体を曝露する曝露チャンバーは、アクリル製のアウターチャンバーとPET樹脂で作製したインナーチャンバー(直径660 mm、高さ477 mm)の二重構造となっており、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(共同開発 柴

田科学株式会社、特許所得済)。メインチャンバーの気積は179 Lである。メインチャンバーの上部は円錐状となってサブチャンバーに接続されている。動物は、メインチャンバー内に設置した円形一段のステンレス金網製のケージを個別に仕切り収容する。ケージには給水・給餌装置がないため、6時間曝露時の動物への負荷軽減のため給水用寒天(日本エスエルシー株式会社)をケージ内に留置した。

#### 6) 曝露チャンバー内のエアロゾル濃度測定

曝露チャンバー内のエアロゾル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<sup>3</sup>)測定を並行して行った。

相対濃度測定は、対応濃度 $3 \times 10^5$ 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。

曝露チャンバーとCPCを接続するチューブは、銅管を使用してサンプリング損失を最小限にした。

先行研究において、CPCによるMWCNTの測定において、 $1 \times 10^3$ 個/mL程度の粒子数測定であっても、一時的に低値で推移することが散見されたことから、10倍希釈してCPCによる測定を行った。CPCの測定原理では、理論上、測定セル内で一つの粒子だけを検出する構造となっているが、

MWCNTのように繊維径は100 nm程度であるが、繊維長は10 μmを超える粒子が含まれているため、測定セル内で繊維が重なり、過小評価されると想定される。

質量濃度測定は、ローボリウムサンプラー(080050-155、φ55 mmろ紙ホルダー、柴田科学)にフッ素樹脂バインダーガラス繊維フィルター(Model TX40HI20-WW、φ55mm、捕集効率(DOP 0.3 μm): 99.9%、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の流量で曝露時間の6時間において、0~1hr、2~3hrおよび5~6hrの3回実施した。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 L/min × 60min = 90 Lから1 m<sup>3</sup>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。

#### 7) エアロゾルの粒度分布

エアロゾルの粒度分布は、Micro-Orifice Uniform Deposit Impactors (MOUDI)を用いた Mass Median Aerodynamic Diameter (MMAD)である。10 L/minの流量で曝露チャンバー内のエアロゾルを吸引して MOUDI (Model 125 Nano MOUDI、KANOMAX、分級サイズ; No.1; 10 μm、No.2; 5.6 μm、No.3; 3.2 μm、No.4; 1.8 μm、No.5; 1.0 μm、No.6; 0.56 μm、No.7; 0.32 μm、No.8; 0.1 μm、No.9; 0.10 μm、No.10;

0.056  $\mu\text{m}$ 、No.11； 0.032  $\mu\text{m}$ 、No.12；  
0.018  $\mu\text{m}$ 、No.13； 0.01  $\mu\text{m}$ )に導いた。

吸引時間は 20 分とした。各分級ステージには専用のアルミホイルにシリコンオイルを塗布したものを装着し検体を回収した。尚、シリコンオイル塗布アルミホイルは、使用前に 50°C のインキュベーター内で 3 日以上留置しシリコンオイルに含まれる溶媒を除去した。マイクロ天秤 (XP26V、METTLER TOLEDO) を使用してアルミホイルの質量を、MOUDI 装着前と、MWCNT 回収後に測定し、その差分を検体質量とした。

エアロゾルの粒度分布測定は、測定機器の数が限られることから、低濃度群と高濃度群を交互に実施した。

#### 倫理面への配慮

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

#### E. 研究結果

##### (1) T-CNT7#53 の吸入曝露実験

T-CNT7#53 低濃度群の全身曝露吸入実験における全体の平均質量濃度は  $2.7 \pm 0.1 \text{ mg/m}^3$ 、高濃度群では  $5.1 \pm 0.2 \text{ mg/m}^3$  であり、目標濃度に対して低濃度群では 90%、高濃度群では 85% の値であった (図 2E、図 3E)。

CPC の測定において、測定後に希釈流量が設定値と異なった値であることが判明した。CPC カウントの絶対値表記ができないため、

波形のみを図 2A 及び図 3A に示した。CPC の値はカートリッジから噴射直後に速やかに上昇し、次のカートリッジを噴射する 4 分後までの間に徐々に低下する鋸歯状を示した。CPC カウントは、低濃度群では 0 から 6 時間の平均値に対して、21% ~ 216%、高濃度群では 46% ~ 182% の範囲で変動した (図 2E、図 3E)。

MMAD は低濃度群において平均 439 nm ( $\sigma$ : 7.8-8.1)、高濃度群において平均 572 nm ( $\sigma$ : 6.4-9.3)、であった (図 2D、2E、図 3D、2E)。

6 時間の吸入曝露実験において使用した総検体量と 6 時間の曝露チャンバーの総換気量 ( $11.7 \text{ m}^3$ ) と実測値の濃度から、エアロゾル化効率を計算すると低濃度群、高濃度群の平均値はそれぞれ  $71.1 \pm 3.0\%$ 、 $66.7 \pm 2.8\%$  であった (図 2E、図 3E)。

6 時間の曝露時間を通して、曝露チャンバー内の温度は 25°C 台に維持された。湿度は、約 50% ~ 80% の間であった。動物の一般状態に異常は認められず、体重推移は対照群、低濃度群、高濃度群に差は認められなかった (図 4)

#### D. 考察

本分担研究では、MWCNT の慢性影響を気管内投与試験と全身曝露吸入試験との比較を行うため T-CNT7#53 の 2 年間の間欠吸入曝露実験を開始した。

先行研究で独自に開発したカートリッジ直噴式全身曝露装置は、汎用性が高く、少量の検体で全身曝露吸入実験が可能である。これまで、MWCNT、DWCNT、酸化チタン、チタン酸カリウムなど物理化学的性状が異なる検体の吸入曝露実験を実施してきた実績がある。一方、カートリッジの装填、噴射、交換を手動

で行っていたため、2 時間の曝露実験が限度であった。カートリッジの一連の操作の自動化は技術的に非常に難易度が高く、新たな技術基盤の構築が必要であった。

本事業で使用した Taquann 全身曝露吸入装置 ver 3.0 は、カートリッジ操作を自動化する技術を導入し、OECD ガイドラインで規定されている6時間の曝露実験を可能とした。カートリッジの構造も見直し、安価に製造可能なインナーカートリッジを導入したことで、大量のカートリッジを用意することのできるため、6 時間の曝露実験に必要な検体調製が効率よく行えるようになった。また、カートリッジの噴射間隔をこれまでの 6~7 分間よりも短く設定することが可能となったため、エアロゾル濃度の変動範囲も最小限に抑えられるようになった。

曝露チャンバーは給餌・給水ができないが、動物輸送用の寒天を供給することにより、動物への負担を軽減することが可能であった。しかしながら、チャンバー内の湿度が最大 80%程度にまで上昇することから、チャンバーに導入する清浄空気加湿方法、寒天の供給量を最適化する必要がある。

今後、4 週毎の曝露実験を進め、曝露開始 6 カ月後に最初の定期解剖を実施する計画である。

## E. 結論

Taquann 全身曝露吸入装置 Ver.3.0 を使用し、T-CNT7#53 をマウスに 6 時間の全身曝露吸入を行った。カートリッジ操作の自動化により、6 時間の吸入曝露実験が可能となり、ナノマテリアルの毒性評価の効率化と、OECD ガイドラインに準拠した標準的な吸入曝露実験への適用が期待された。

謝辞:

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

## F. 参考文献

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

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Abdelgied M, El-Gazzar AM, Alexander DB, Alexander WT, Numano T, Iigou M, Naiki-Ito A, Takase H, Abdou KA, Hirose A, Taquahashi Y, Kanno J, Abdelhamid M, Tsuda H, Takahashi S. Pulmonary and pleural toxicity of potassium octatitanate fibers, rutile titanium dioxide nanoparticles, and MWCNT-7 in male Fischer 344 rats. *Arch Toxicol.* 2019 Feb 13.

Otsuka K, Yamada K, Taquahashi Y, Arakaki R, Ushio A, Saito M, Yamada A, Tsunematsu T, Kudo Y, Kanno J, Ishimaru N. Long-term polarization of alveolar macrophages to a profibrotic phenotype after inhalation exposure to multi-wall carbon nanotubes. *PLoS One.* 2018 Oct 29;13(10):e0205702.

Abdelgied M, El-Gazzar AM, Alexander DB, Alexander WT, Numano T, Iigou M, Naiki-Ito A, Takase H, Abdou KA, Hirose A, Taquahashi Y, Kanno J, 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 Jul;109(7):2164-2177.

## 2. 学会発表

高橋祐次、トキシコロジスト・ブラッシュアップセミナー:肺・呼吸器の毒性変化を考えるナノマテリアルの毒性:肺毒性を中心として、第19回日本毒性学会生涯教育講習会、2018.7.17(大阪)

菅野 純、ナノマテリアルの吸入曝露による発がん性研究第45回日本毒性学会学術年会、シンポジウム、2018.7.18(大阪)

高橋祐次、相磯 成敏、大西 誠、石丸 直澄、菅野 純、マクロファージの機能に着目したナノマテリアルのマウス吸入ばく露による慢性影響評価、第45回日本毒性学会学術年会、シンポジウム、2018.7.18(大阪)

Jun Kanno, Chuen-Jinn Tsai, Plenary Session 4: Improvement of Inhalation Toxicity Testing for Nanomaterials and Compliance Monitoring for Ambient PM., Plenary Lectures, Xth International Aerosol Conference (IAC 2018) ,Invited, 2019.9.6,St. Louis.

Yuhji Taquahashi, Satoshi Yokota, Koichi Morita, Masaki Tsuji, Yoko Hirabayashi, Akihiko Hirose and Jun Kanno, Development of Whole Body Inhalation System for Well-Dispersed Nanomaterials Toxicity Testing -Taquann Direct-Injection Whole Body Inhalation System-, Poster, 58th Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2019.3.12., Baltimore

## H. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

特許出願;柴田眞利、菅野 純、生田達也、鶴田祐吾、高橋祐次:吸入曝露試験用カートリッジ、試験物質供給装置及び吸入曝露試験装置 特願 2018-81836、2018.4.20

特許出願;柴田眞利、菅野 純、生田達也、鶴田祐吾、高橋祐次:試験物質供給装置及び吸入曝露試験装置 特願 2018-81837、2018.4.20

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

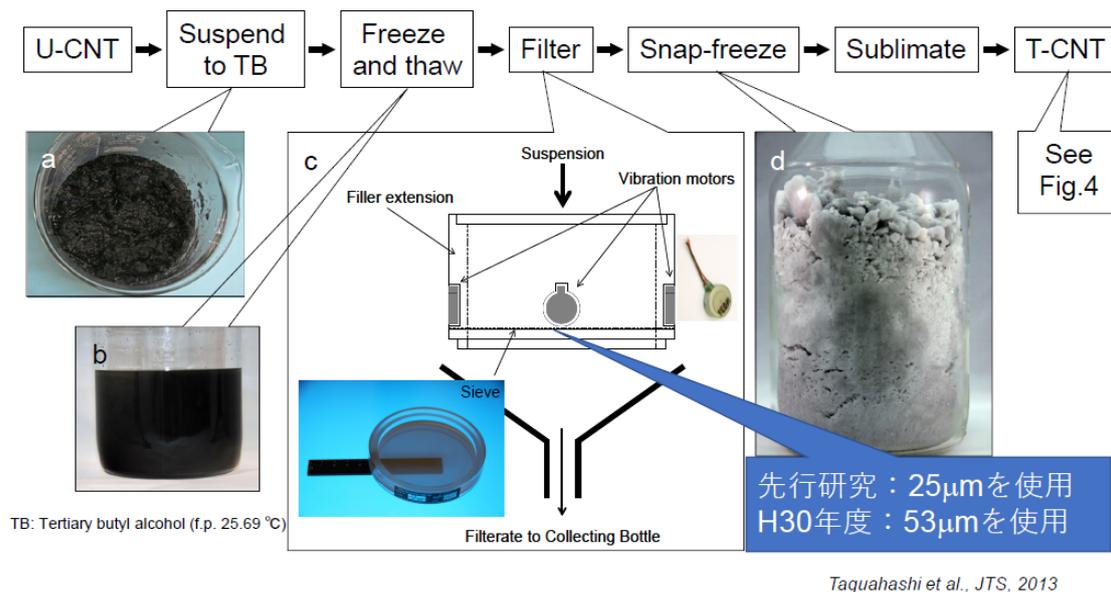


図1 Taquann法の概要

Taquann法はこれまで目開き 25 μm の金属製フィルターを用いているが、H30年度からの事業では、先行試験(Particle Fibre Tox 2016)で用いられたものと同じ目開き 53 μm の金属製フィルターを用いた。

表1 群構成

| Group   | Examinations                                      | Necropsy after inhalation exposure |                                |     |     |
|---|---|------------------------------------|--------------------------------|-----|-----|
|   |   | N                                  | 6M                             | 12M | 24M |
| Control<br>0 mg/m <sup>3</sup><br>6hr/D/4W×26times  | ・ Lung Burden                                     | 9                                  | 3                              | 3   | 3   |
|   | ・ Histopathology(perfusion)                       | 23                                 | 3                              | 3   | 17  |
|   | ・ Immune function                                 |                                    |                                |     |     |
|   | BALF  | 18                                 | 6                              | 6   | 6   |
|   | Pulmonary interstitium mRNA<br>Spleen, Lymph node |                                    |                                |     |     |
|   | Subtotal  | 50                                 | Consist of two sub-groups, A&B |     |     |
| MWNT-7 #53um Low Concentration<br>Target Concentration: 3 mg/m <sup>3</sup><br>6hr/D/4W×26times | ・ Lung Burden                                     | 9                                  | 3                              | 3   | 3   |
|   | ・ Histopathology(perfusion)                       | 23                                 | 3                              | 3   | 17  |
|   | ・ Immune function                                 |                                    |                                |     |     |
|   | BALF  | 18                                 | 6                              | 6   | 6   |
|   | Pulmonary interstitium mRNA<br>Spleen, Lymph node |                                    |                                |     |     |
|   | Subtotal  | 50                                 | Consist of two sub-groups, A&B |     |     |
| MWNT-7 #53um H<br>Target Concentration: 6mg/m <sup>3</sup><br>6hr/D/4W×26times                  | ・ Lung Burden                                     | 9                                  | 3                              | 3   | 3   |
|   | ・ Histopathology(perfusion)                       | 23                                 | 3                              | 3   | 17  |
|   | ・ Immune function                                 |                                    |                                |     |     |
|   | BALF  | 18                                 | 6                              | 6   | 6   |
|   | Pulmonary interstitium mRNA<br>Spleen, Lymph node |                                    |                                |     |     |
|   | Subtotal  | 50                                 | Consist of two sub-groups, A&B |     |     |
| Total number of animals   |   | 150                                |                                |     |     |

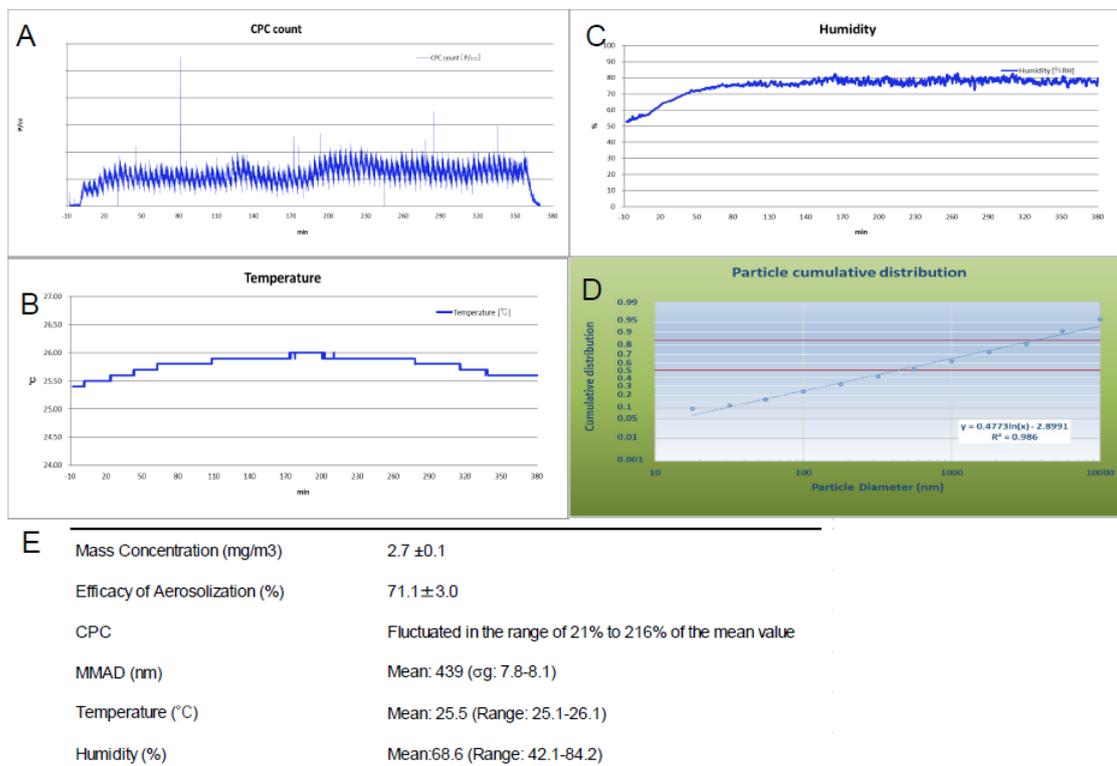
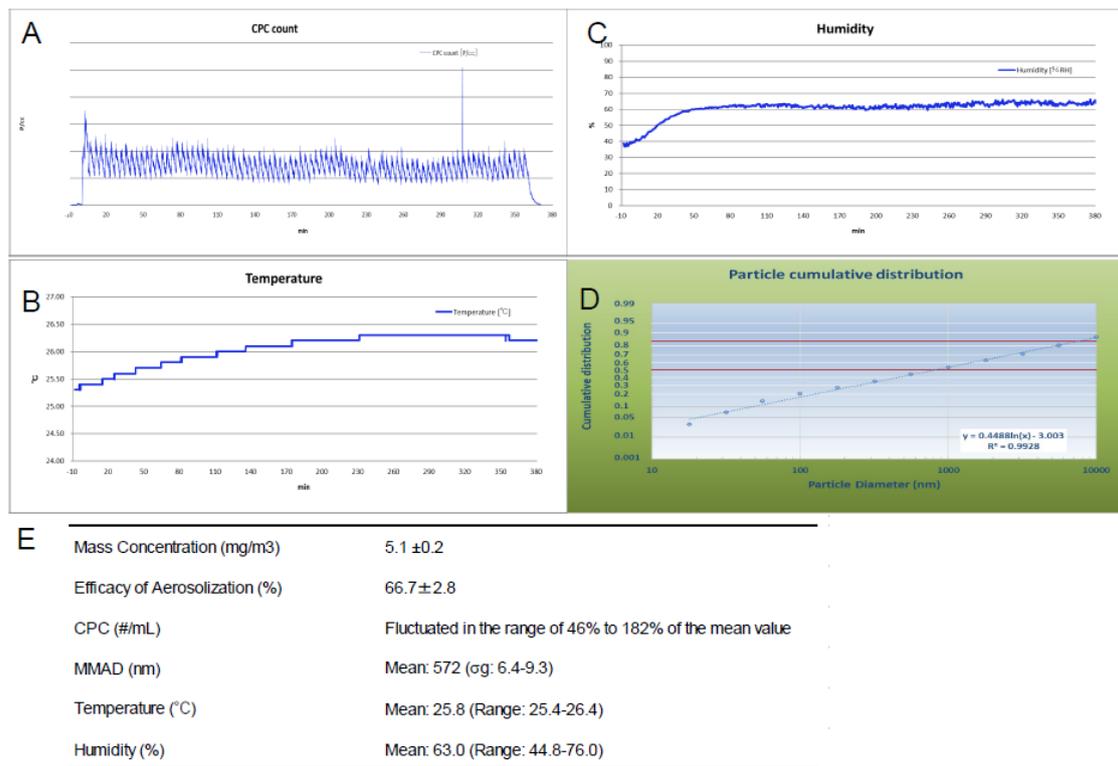


図 2 低濃度群の吸入曝露実験結果

A: CPC波形、B: 曝露チャンバー内温度推移、C: 曝露チャンバー内湿度推移、D: MMAD、E: 測定結果のまとめ。T-CNT7#53低濃度群の全身曝露吸入実験における全体の平均質量濃度は  $2.7 \pm 0.1 \text{ mg/m}^3$ 、目標濃度に対して90%の値であった(E)。CPCの測定において、測定後に希釈流量が設定値と異なった値であることが判明した。CPCカウントの絶対値表記ができないため、波形のみをAに示した。CPCの値はカートリッジから噴射直後に速やかに上昇し、次のカートリッジを噴射する4分後までの間に徐々に低下する鋸歯状を示した。CPCカウントは、低濃度群では0から6時間の平均値に対して、21%～216%の範囲で変動した(E)。MMADは平均439 nm( $\sigma_g$ : 7.8-8.1)であった(D、E)。



### 図 3. 高濃度群の吸入曝露実験結果

A: CPC波形、B: 曝露チャンバー内温度推移、C: 曝露チャンバー内湿度推移、D: MMAD、E: 測定結果のまとめ。T-CNT7#53高濃度群の全身曝露吸入実験における全体の平均質量濃度は  $5.1 \pm 0.2 \text{ mg/m}^3$  であり、目標濃度に対して85%の値であった(E)。

CPCの測定において、測定後に希釈流量が設定値と異なった値であることが判明した。CPCカウントの絶対値表記ができないため、波形のみをAに示した。CPCの値はカートリッジから噴射直後に速やかに上昇し、次のカートリッジを噴射する4分後までの間に徐々に低下する鋸歯状を示した。CPCカウントは、高濃度群では46%～182%の範囲で変動した(E)。MMADは572 nm(σg: 6.4-9.3)であった(D、E)。

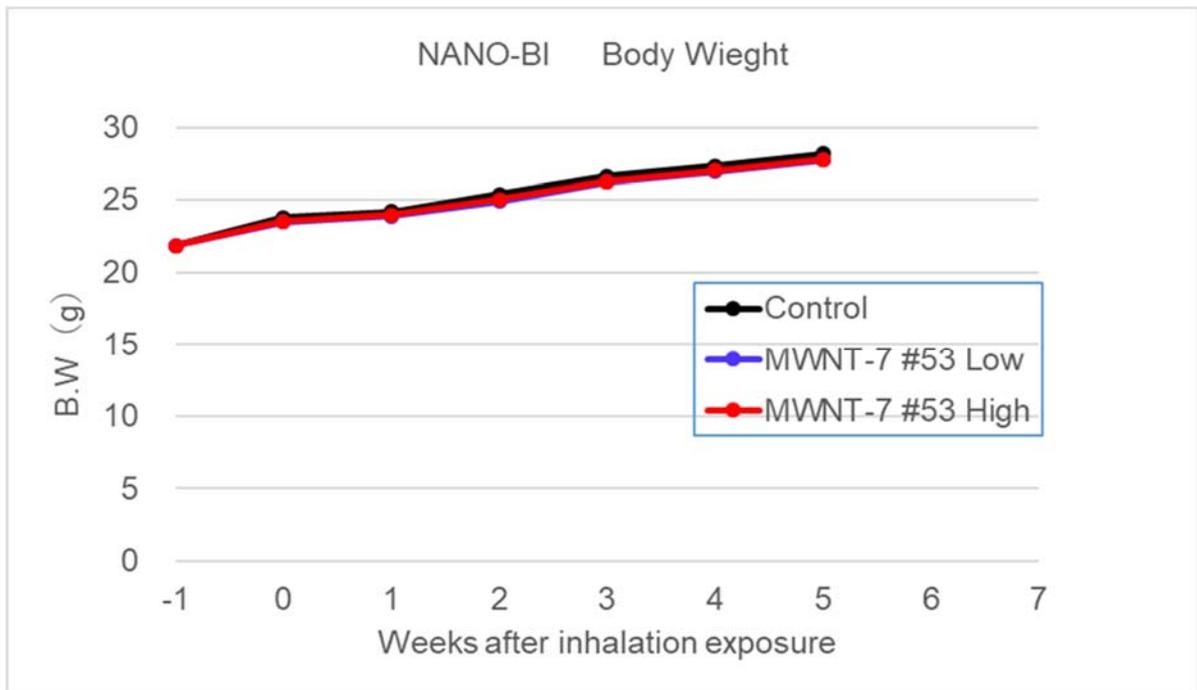


図 4. 体重推移

動物の一般状態に異常は認められず、体重推移は対照群、低濃度群、高濃度群に差は認められなかった。

研究課題名:ナノマテリアル曝露による慢性影響の効率的評価手法開発に関する研究

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

研究分担者: 小林 憲弘 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生科学部 室長  
研究分担者: 広瀬 明彦 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部長  
研究協力者: 北條 幹 東京都健康安全研究センター 薬事環境科学部 主任研究員

### 研究要旨

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

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

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

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

一方、国際動向調査及び短期曝露に関する評価文書作成に関して、昨年度より EU を中心にナノマテリアルの評価手法の国際的な標準化を目指した OECD テストガイドラインやガイダンスの改定活動が本格化してきており、H31 年の 2 月に開催された OECD ナノ

マテリアル作業会合では、EU からさらに7つの新規プロジェクトが提案された。また、本会議では我が国からの報告として、本研究班で検討している間欠型の慢性曝露試験法の検証研究に関して、研究の背景や将来的な目標、研究計画等について紹介を行い、従来の慢性吸入曝露試験との相同性に関する比較研究の重要性を示した。

## A. 研究目的

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

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

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

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

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

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

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

## B. 研究方法

### i) MWCNT 分散液の調製及び DLS の測定

未処理および熱処理 MWCNT 試料を MWCNT

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

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

#### ii) マウス単回投与後の肺負荷量測定

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

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

#### iii) Taquann 処理 MWCNT の懸濁媒体の検討

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

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

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

#### iv) 国際動向調査

H30 年度に開催されたナノマテリアル毒性評価手法に関する OECD の工業用ナノマテリアル作業グループ会合や、OECD テストガイドライン会議での情報収集や研究提案等を行った。

### **C. 研究結果**

#### i) MWCNT 分散液の調製及び DLS の測定

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

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

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

#### ii) マウス単回投与後の肺負荷量測定

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

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

肺負荷量測定は次年度以降実施する予定である。

#### iii) Taquann 処理 MWCNT の懸濁媒体の検討

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

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

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

#### iv) 国際動向調査

H30 年 4 月に開催された OECD WNT テストガイドライン・プログラムのナショナルコーディネータ作業部会では、昨年度の 2 月に OECD ナノマテリアル作業会合で EU 等が提案したプロジェクトについて、次年度の 4 月に開催される WNT 会議に向けて正式なプロジェクトとして承認されるように一年かけて準備に入ることが紹介された。

さらに、H31 年の 2 月に開催された、OECD ナノマテリアル作業会合では、EU からさらに、以下の 7 つの新規プロジェクトが提案された。

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

血球小核試験)のナノマテリアルへの適用に関するガイダンス文書

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

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

また、本作業グループ会議においては、本研究班で計画している間欠型の慢性曝露試験法の検証研究に関して、研究の背景や将来的な目標、研究計画等について紹介する機会が得られ、会議中に発表を行った。発表に供した発表スライドのうち、研究班の背景や計画についての概要を示したスライドの一部を図8-図10に示した。

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

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

#### D. 考察

##### i) MWCNT 分散液の調製及び DLS の測定

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

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

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

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

## ii) マウス単回投与後の肺負荷量測定

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

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

ら再度議論する必要がある。

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

## iii) Taquann 処理 MWCNT の懸濁媒体の検討

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

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

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

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

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

#### iv) 国際動向調査

昨年度より、EUを中心にナノマテリアルの評価手法の国際的な標準化を目指して、OECDテストガイドラインやガイダンスの改定活動が本格化してきており、化学物質評価のためにOECD加盟国で相互に受け入れ可能な試験法ガイドライン等を審議しているOECDのテストガイドライン等の策定を審議している作業グループであるナショナルコーディネータ（WNT）会議において承認を受ける必要がある。

本研究班で検討している慢性影響評価に関する評価法についても、将来的にOECDのガイダンス等に取り入れられるようにする

ためには、本研究で確立している吸入試験法や気管内投与手法を生かして、より短期の吸入曝露や気管内曝露試験法、in vitro評価系試験法から慢性影響を評価できることを示すデータを積み上げてOECD等に提案できるような実証研究を行っていくことが重要であると考えられた。

#### E. 結論

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

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

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

一方、国際動向調査及び短期曝露に関する評価文書作成に関して、昨年度より EU を中心にナノマテリアルの評価手法の国際的な標準化を目指した OECD テストガイドラインやガイダンスの改定活動が本格化してきており、H31 年の 2 月に開催された OECD ナノマテリアル作業会合では、EU からさらに 7 つの新規プロジェクトが提案された。また、本会議では我が国からの報告として、本研究班で検討している間欠型の慢性曝露試験法の検証研究に関して、研究の背景や将来的な目標、研究計画等について紹介を行い、従来の慢性吸入曝露試験との相同性に関する比較研究の重要性を示した。

#### F. 参考文献等

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

#### G. 研究発表

(論文発表)

Abdelgied M, El-Gazzar AM, Alexander DB, Alexander WT, Numano T, Iigo M, Naiki-Ito A, Takase H, Abdou KA, Hirose A, Taquahashi Y, Kanno J, Tsuda H, Takahashi S. Potassium octatitanate fibers induce persistent lung and pleural injury and are possibly carcinogenic in male Fischer 344 rats. *Cancer Sci. Cancer Sci.*

109(7):2164-2177. 2018

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

Liao D, Wang Q, He J, Alexander DB, Abdelgied M, El-Gazzar AM, Futakuchi M, Suzui M, Kanno J, Hirose A, Xu J, Tsuda H. Persistent Pleural Lesions and Inflammation by Pulmonary Exposure of Multiwalled Carbon Nanotubes. *Chem Res Toxicol.* 15:31(10):1025-1031. 2018.

Sakamoto Y, Hojo M, Kosugi Y, Watanabe K, Hirose A, Inomata A, Suzuki T, Nakae D. Comparative study for carcinogenicity of 7 different multi-wall carbon nanotubes with different physicochemical characteristics by a single intraperitoneal injection in male Fischer 344 rats. *J Toxicol Sci.* 43(10):587-600. 2018.

(学会発表)

Abdelgied M., Elgazzar AM., Alexander D., Alexander W., Numano T., Iigo M., Naiki-Ito A., Abdelhamed M., Takase H., Hirose A., Taquahashi Y., Kanno J., Takahashi S., Tsuda H. Potassium octatitanate fibers are possibly carcinogenic in male Fisher

- 344 rats. *54th congress of the European societies of toxicology (EUROTOX2018)* (September 2018 Brussels, Belgium)
- Hirose A., Hojo M., Kobayashi N., Impact of sample preparation of MWCNT for developmental toxicity by intratracheal instillation. *The 10th Congress of Toxicology in Developing Countries (CTDC2018)* (April 2018 Belgrade, Serbia)
- Hojo M, Kobayashi N, Hasegawa Y, Sakamoto Y, Murakami S, Yamamoto Y, Tada Y, Maeno A, Kubo Y, Ando H, Shimizu M, Taquahashi Y, Suzuki T, Nakae D, Hirose A: Relationship between developmental toxicity of multi-wall carbon nanotubes (MWCNT) and lung inflammation in pregnant mice after repeated intratracheal instillation. *54th congress of the European societies of toxicology (EUROTOX2018)* (September 2018 Brussels, Belgium)
- Watanabe W, Akashi T, Hirose A, Miyauchi A, Yoshida H, Kurokawa M. Effects of double-walled carbon nanotubes on the pneumonia in respiratory syncytial virus-infected mice. *54th Congress of the European Societies of Toxicology*; (September 2018 Brussels, Belgium)
- Taquahashi Y, Yokota S, Morita K, Tsuji M, Hirabayashi Y, Hirose A, Kanno J. Development of Whole Body Inhalation System for Well-Dispersed Nanomaterials Toxicity Testing Taquann Direct-Injection Whole Body Inhalation System. *58th Annual Meeting of the Society of Toxicology*; (March 11-14, 2019, Baltimore)
- 坂本義光, 北條幹, 鈴木俊也, 猪又明子, 守安貴子, 広瀬明彦, 中江大: 多層カーボンナノチューブ(MWCNT)を単回経気管噴霧投与した後終生飼育したラットの肺および中皮組織における増殖性病変の発生. 第45回日本毒性学会学術年会 (2018年7月大阪)
- 坂本義光, 多田幸恵, 北條幹, 前野愛, 鈴木俊也, 猪又明子, 守安貴子, 中江大: ラットにおいてDHPNで誘発されたメソテリン陽性肺増殖性病変の病理組織化学的性状. 第35回日本毒性病理学会学術集会 (2019年1月東京)
- 津田洋幸, 徐結苟, Alexander WT., Alexander DB., Abdelgied M., Elgazzar A., 沼野琢旬, 広瀬明彦, 管野純. ナノマテリアルの気管支内投与による毒性と発がん性の簡易検出システムの開発 第45回日本毒性学会学術年会 大阪2018年7月
- 津田洋幸, 徐結苟, Alexander WT., Alexander DB., Abdelgied M., Elgazzar A., 沼野琢旬, 広瀬明彦, 管野純. ナノマテリアル特にカーボンナノチューブによる肺・胸膜中皮障害と発がん性の経気管肺内噴霧投与 (TIPS) 試験法の開発 第45回日本毒性学会学術年会 (2018年7月大阪)
- 北條幹, 小林憲弘, 長谷川悠子, 安藤弘, 久保喜一, 海鉦藤文, 田中和良, 五十

嵐海, 村上詩歩, 多田幸恵, 生嶋清美,  
湯澤勝廣, 坂本義光, 前野愛, 鈴木俊  
也, 猪又明子, 守安貴子, 高橋祐次,  
広瀬明彦, 中江大: 多層カーボンナノ  
チューブのマウス気管内投与による発  
生毒性と肺の炎症との関連性. 第 45 回  
日本毒性学会学術年会 (2018 年 7 月大

阪)

**H. 知的財産権の出願・登録状況** (予定を含  
む)

1. 特許取得 (該当なし)
2. 実用新案登録 (該当なし)
3. その他 (該当なし)

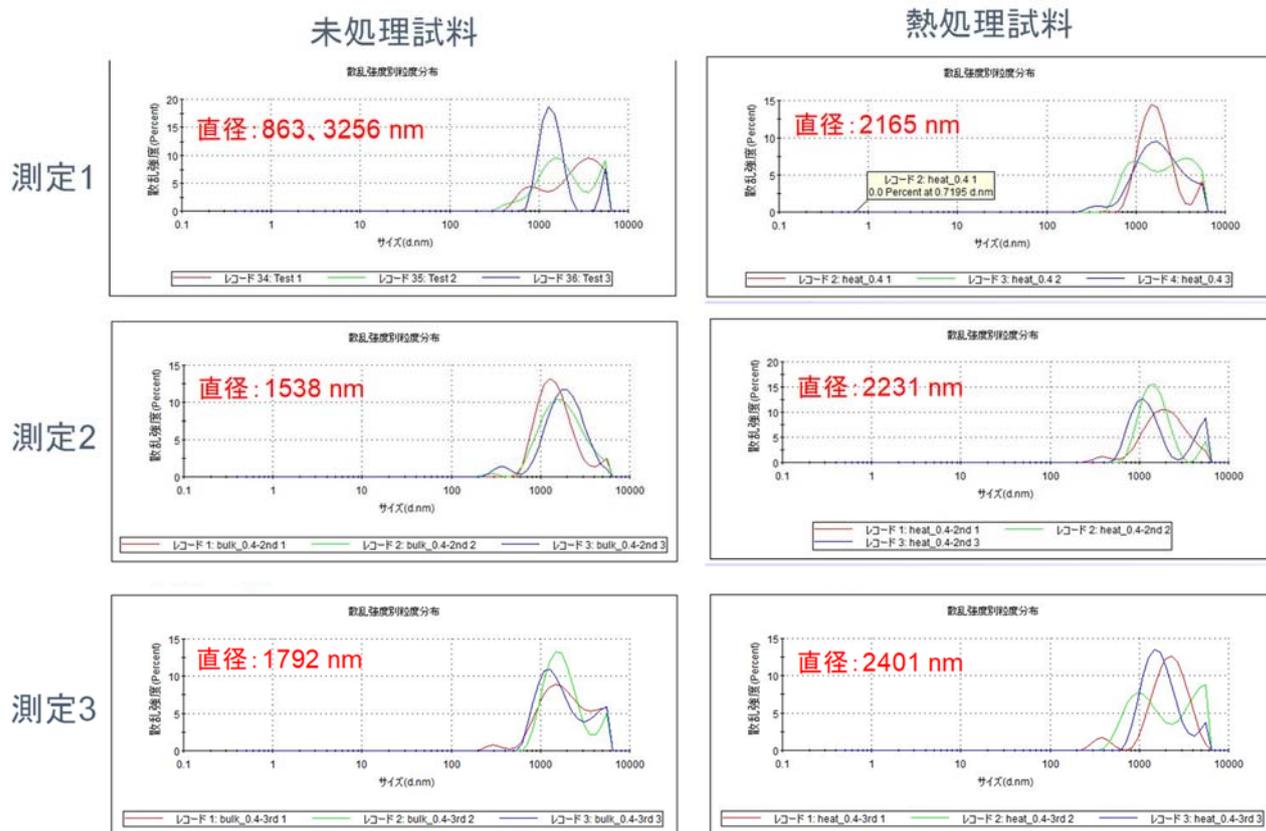


図 1：未処理および熱処理 MWCNT 分散液試料の DLS による粒径分布測定結果

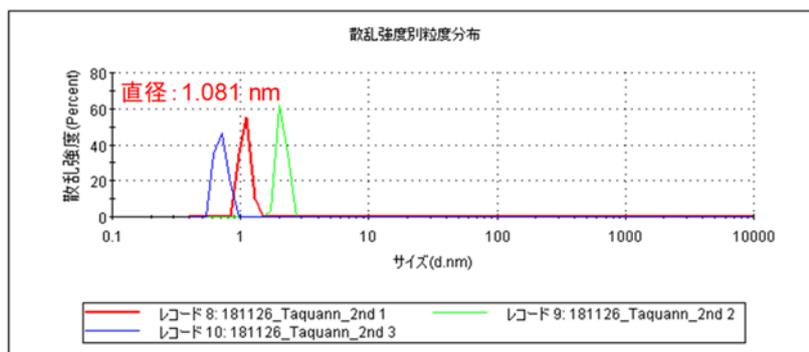


図 2：Taquann 処理 MWCNT 分散液試料の DLS による粒径分布測定結果

表 1：各試料の主要ピークの直径

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



超音波浴槽で分散した直後の試料。

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

図3：マウス投与試験に用いた試料の肉眼観察

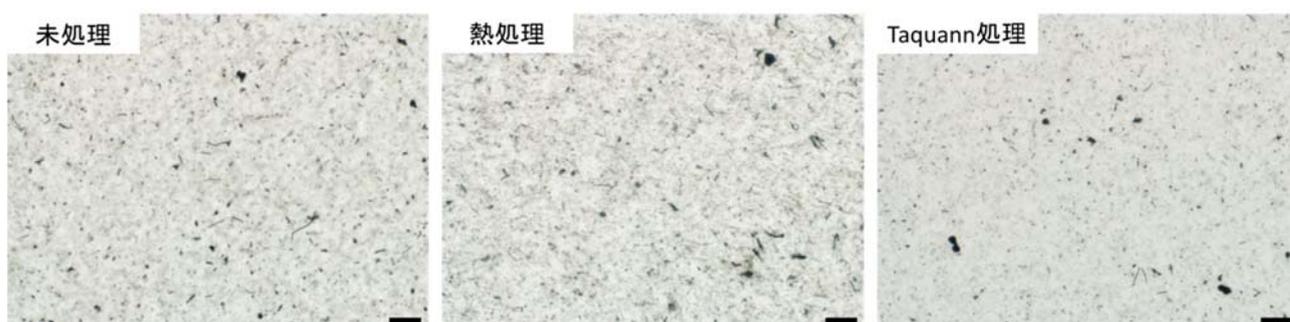


図4：マウス投与試験に用いた試料の光学顕微鏡観察（スケールバー；20 μm）

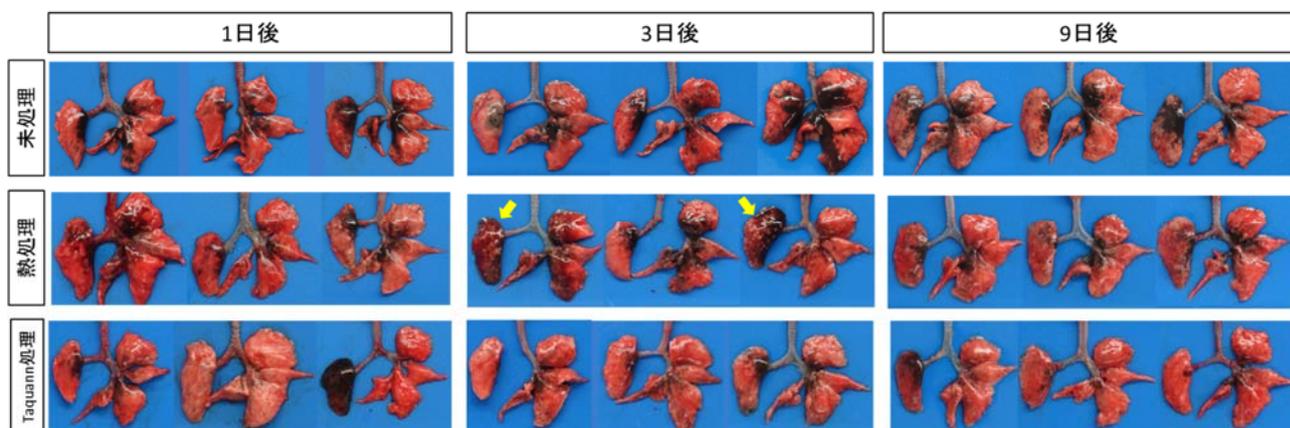


図5：気管内投与後のマウス肺の肉眼観察（矢印：特に強い反応が認められた箇所）

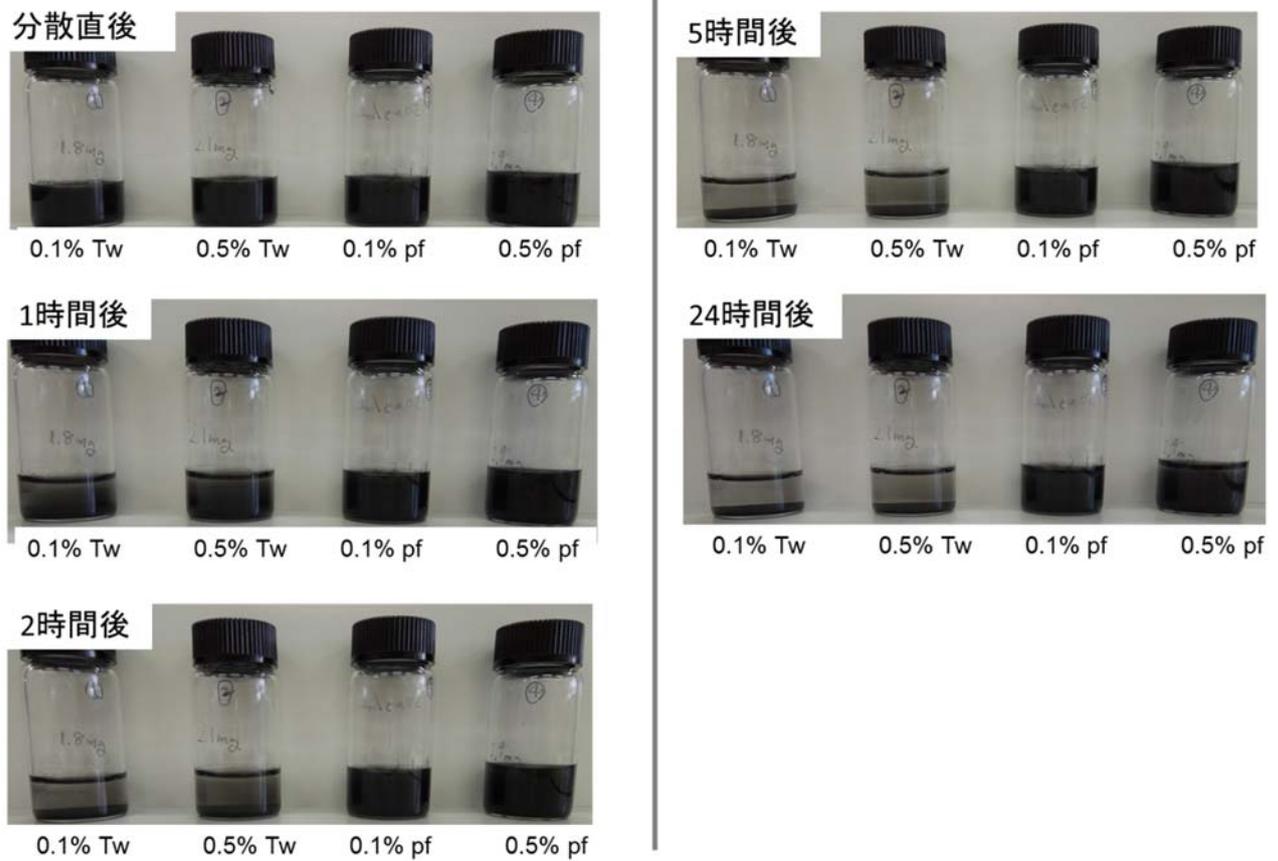


図 6: ラット投与試験用の Taquann 処理 MWCNT の分散状態の観察 Tw:Tween80、pf: Pluronic F-68

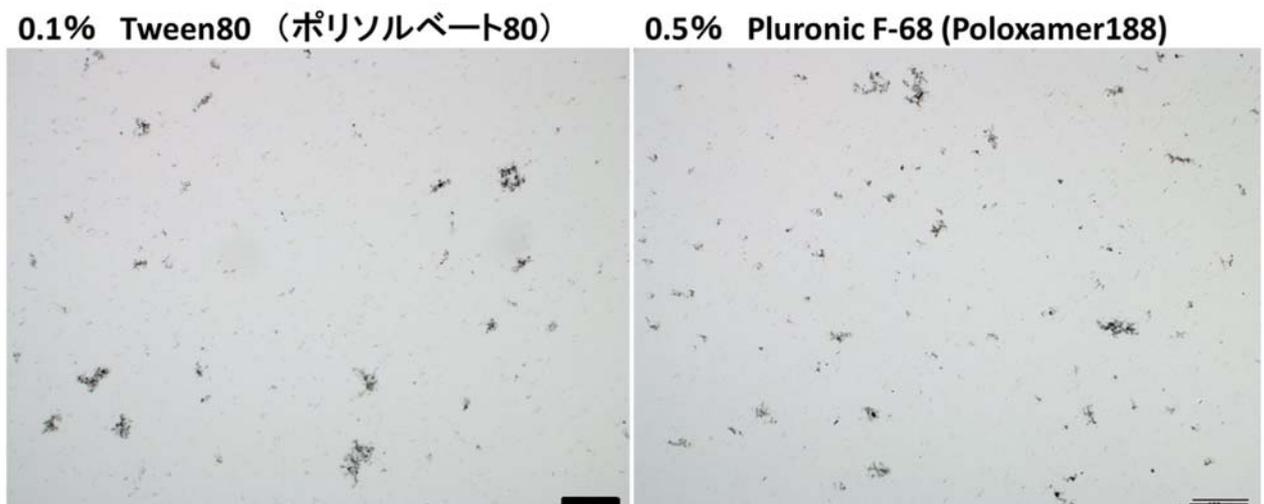


図 7: ラット投与試験用の Taquann 処理 MWCNT の分散状態の観察 (光学顕微鏡) スケールバー: 100 $\mu$ m

## Objectives

- Available toxicity data of chronic exposure is only for WMNT-7 study

How to quantitatively assess the carcinogenic potency of other MWCNTS ?

### Comparison with exposure protocols for developing new methods

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

#### In future,

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

図 8 : 本研究班の目的

## Study Design of Japan's Current Research Project

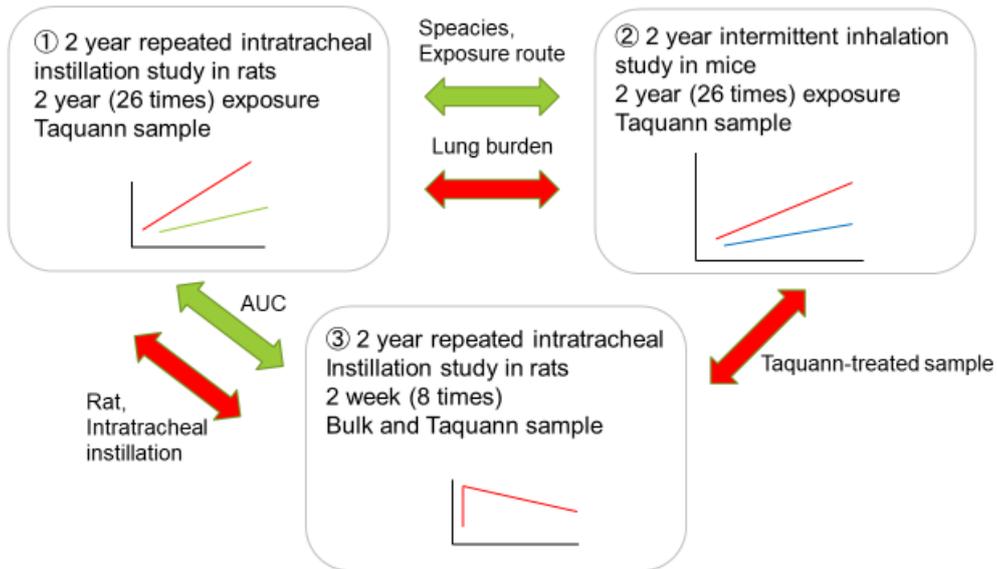


図 9 本研究班における慢性試験計画

## Development of Alternative Evaluation Method of Inhalation Study

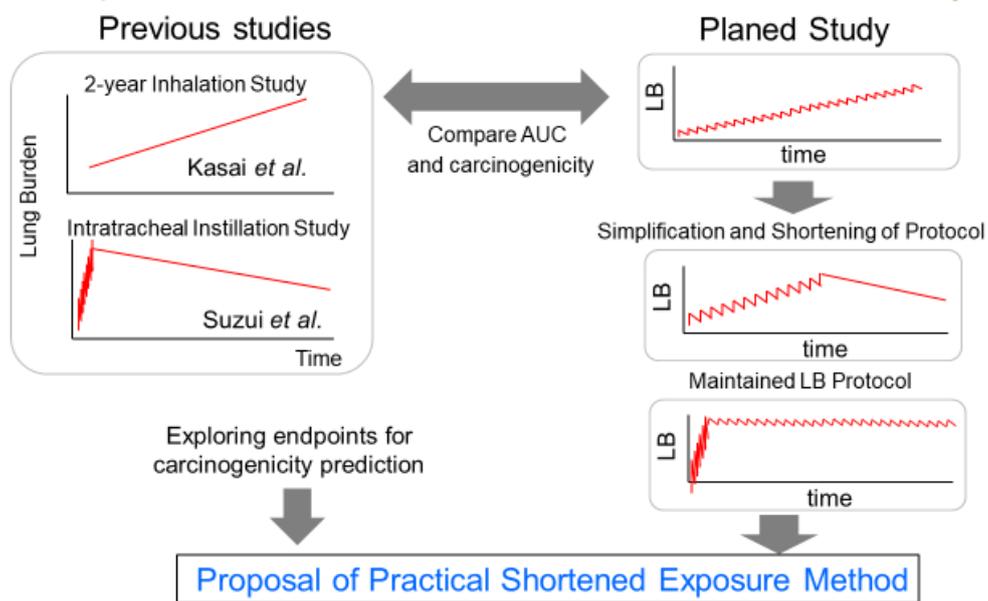


図 10. より短期間の曝露による慢性影響評価試験を提案するための戦略

研究課題名:ナノマテリアル曝露による慢性影響の効率的評価手法開発に関する研究

分担研究課題名:慢性影響を考慮した気管内投与法の確立に関する研究

|        |        |                 |           |       |
|--------|--------|-----------------|-----------|-------|
| 研究分担者: | 北條 幹   | 東京都健康安全研究センター   | 薬事環境科学部   | 主任研究員 |
| 研究分担者: | 小林 憲弘  | 国立医薬品食品衛生研究所    | 生活衛生科学部   | 室長    |
| 研究分担者: | 広瀬 明彦  | 国立医薬品食品衛生研究所    | 安全性予測評価部長 |       |
| 研究分担者: | 高橋 祐次  | 国立医薬品食品衛生研究所    | 毒性部       | 室長    |
| 研究分担者: | 菅野 純   | 日本バイオアッセイ研究センター |           | 所長    |
| 研究協力者: | 坂本 義光  | 東京都健康安全研究センター   | 薬事環境科学部   |       |
| 研究協力者: | 前野 愛   | 東京都健康安全研究センター   | 薬事環境科学部   |       |
| 研究協力者: | 大貫 文   | 東京都健康安全研究センター   | 薬事環境科学部   | 主任研究員 |
| 研究協力者: | 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   |       |
| 研究協力者: | 鈴木 俊也  | 東京都健康安全研究センター   | 薬事環境科学部   | 研究科長  |
| 研究協力者: | 猪又 明子  | 東京都健康安全研究センター   | 薬事環境科学部   | 参事研究員 |
| 研究協力者: | 守安 貴子  | 東京都健康安全研究センター   | 薬事環境科学部   | 部長    |
| 研究協力者: | 横田 理   | 国立医薬品食品衛生研究所    | 毒性部       |       |
| 研究協力者: | 大西 誠   | 日本バイオアッセイ研究センター | 試験管理部     | 技術専門役 |
| 研究協力者: | 後藤 裕子  | 日本バイオアッセイ研究センター | 試験管理部     | 主任研究員 |
| 研究協力者: | 中江 大   | 東京農業大学          | 応用生物科学部   | 教授    |
| 研究協力者: | 牛田 和夫  | 国立医薬品食品衛生研究所    | 安全性予測評価部  | 研究員   |

#### 研究要旨

ナノマテリアルの呼吸器系を介した慢性影響に関するデータの蓄積は不十分であり、MWCNT の慢性吸入試験については Kasai ら<sup>1)</sup> の報告のみである。本研究では、2 年間の吸入試験と同レベルの評価が可能なラットによる代替慢性試験法を開発することを目的とした。2 年間にわたって 4 週間毎に 1 回の計 26 回、反復気管内投与を行い、Kasai らの結果と同程度の肺負荷量を与えて発がん性を評価するという試験系を計画している。

今年度は、2 年間の反復気管内投与試験の投与条件を決めるため、MWNT-7 を被験物質とし、F344 雄性ラットを用いて予備検討を実施した。まず、経口ゾンデとスプレー式ゾンデを用いて 2 日毎に 1 回の計 8 回の短期反復投与試験を実施し、炎症反応や MWCNT 繊維の分布を観察した。病理組織学的解析から、両投与器具の間に顕著な違いは認められなかったため、毒性試験で広く利用されている経口ゾンデを使うこととした。次に、投与後の MWCNT の肺負荷量を経時的に観察した。125  $\mu\text{g}/\text{rat}$  (0.50 mg/kg 体重) の投与条件下では投与翌日に約 50% まで減少し、少なくとも 16 週後まではその量が維持されることが分かった。また、4 週間ごとに合計 3 回の反復投与を実施して負荷量を測定した場合、単回投与の結果から予測される蓄積量とおおむね一致していることが確認できた。さらに、2 年間の反復投与試験においては凝集体の少ない試料が適すると考えられたため、Taquann 処理 MWCNT を投与して肺負荷量を測定した。投与 4 週後の負荷量は、

100 µg/rat (0.71 mg/kg 体重) の投与条件では投与時の 31.7%に、25 µg/rat (0.18 mg/kg 体重) の条件では 20.0%に、それぞれ減少しており、原末の MWCNT よりもクリアランスが高いことが示唆された。

上記の予備検討から、2年間の反復投与試験の1回ごとの投与用量は、低用量群で 0.125 mg/kg 体重に、高用量群で 0.50 mg/kg 体重に設定した。2年後の MWCNT の肺内蓄積量は、低用量群で 240 µg/lung、高用量群で 1440 µg/lung と試算しており、Kasai ら<sup>1)</sup>の報告における中濃度群および高濃度群の負荷量と同レベルの肺負荷量になることが期待される。

2年間の反復投与試験は現在進行中である。

## A. 研究目的

ナノマテリアルの健康影響については、その特有の物理特性のために *in vitro* 試験等の簡便な評価手法が確立しておらず、*in vivo* 試験を元にした毒性の評価手法の検討が依然として重要である。MWCNT はアスベストに類似する性質を持つため、慢性毒性として肺がんや胸膜中皮腫などの呼吸器系への影響が懸念されている。ナノマテリアルの毒性評価方法としては、欧米ではヒトへの曝露形態に近い吸入試験が推奨されているが、慢性吸入試験の実施には多大なコストがかかる。過去には、MWNT-7 の2年間の全身吸入曝露試験が実施され、肺の腺腫および腺がんが発症することが Kasai らにより報告されたが<sup>1)</sup>、上市される多数のナノマテリアルに慢性吸入試験を課すことは事実上不可能である。そこで、慢性影響を評価できる効率的な評価手法が求められている。

気管内投与法を用いた慢性試験は有力な代替手法の候補の一つであるが、報告例は少ない。Suzui らは2週間で8回の MWCNT (Nikkiso) の投与を行い、その後、2年間の観察により、肺がんに加えて胸腔内中皮腫が発症することを報告した<sup>2)</sup>。MWCNT の肺負荷量に注目すると、吸入試験と気管内投与試験のどちらも最大で 1000 µg/lung を超えているが<sup>1),2)</sup>、吸入試験では、2年間にわたり次第に肺内に MWCNT が蓄積し、AUC

(Area Under the Curve) は右肩上がりの形状になるのに対し<sup>1)</sup>、Suzui らの気管内投与試験では、肺負荷量が実験開始直後に最大となり、次第に減少するという右肩下がりの AUC の形状となっていた (図 1)<sup>2)</sup>。ヒトのアスベスト中皮腫の発症メカニズムからラットの胸膜中皮腫の発症にも長い時間を要すると考えられるため、両実験における胸腔内中皮腫の発症の有無は AUC の形状の違いに起因すると推測されている<sup>3)</sup>。

そこで、本研究では、2年間の慢性吸入試験と同レベルの評価が可能な代替慢性試験法を開発することを目的とした (図 1)。4週間に1度の間隔で MWNT-7 の気管内投与を実施し、右肩上がりの形状の AUC を描きながら最終的に Kasai らの結果と同程度の肺負荷量を達成できるように投与量を設定する。この試験で得られる結果を、Kasai らの吸入試験<sup>1)</sup>と Suzui らの気管内投与試験<sup>2)</sup>の結果と比較することで、肺負荷量に着目した MWCNT の発がん性評価の重要性を示すことができ、また、気管内投与試験の有用性が再認識されることが期待される (図 1)。

今年度は、2年間の反復投与試験の一回当たりの投与量を決定するため、単回投与後の減衰量を把握することを目的とした。カーボンナノチューブの肺負荷量の減衰については、これまでにいくつかの報告があるが<sup>4)-9)</sup>、曝露方法、投与量および MWCNT

の測定方法が異なっているため、結果は論文により大きく異なる。例えば4週間後の残存量は20から80%までの幅を持つ(図2)。今回、我々は、KasaiらとSuzuiらが用いた手法<sup>9),10)</sup>によって肺内MWCNT量を測定した。また、気管内投与に使用する器具についてスプレー式ゾンデと経ロゾンデの2種類を用いた場合の毒性の違いと肺負荷量についても同時に検討した。

## B. 研究方法

### i) 反復気管内投与試験における2種の投与器具の比較

16週齢のF344雄性ラットを10匹ずつ3群に分け、対照群、スプレー式ゾンデ群、経ロゾンデ群とした(図3)。MWCNTは、MWNT-7(三井)を用い、0.3 mg/mLの濃度で0.1%Tween80含有生理食塩水に懸濁し、超音波浴槽で30分以上分散させた。経ロゾンデ(夏目製作所)あるいはスプレー式ゾンデ(PennCentury)を用い、62.5 µg/0.25 mL/rat/回の用量で、1日おきに8回投与した。投与量の合計は1匹あたり500 µgとなる。また、対照群には、分散媒体のみをスプレー式ゾンデで投与した。

最終投与翌日に全動物を剖検し、胸郭ごと胸腔内臓器をダビッドソン液で固定し、気管、肺および全身のリンパ節を病理組織学的に検索した(図3)。肺実質の病理所見は、左葉(4か所)、右前葉、右中葉、右後葉(3か所)および副葉(2か所)の各切片において、病変分布(局所性+〜び慢性+++)、肺胞上皮の増生(+〜+++)、肉芽腫の個数、炎症細胞浸潤(+〜+++))について評価した。一方、気管の病理所見は、上部(3か所)および下部(縦隔リンパ節の付近を

3か所)の各切片において、粘膜上皮粘膜の菲薄化(+〜+++)、粘膜上皮の重層化(+〜+++)、粘膜内炎症細胞浸潤(+〜+++)、肉芽腫の個数、扁平上皮化生(+〜+++))について評価した。それぞれ、+を1点、++を3点、+++を5点としてスコア化し、肉芽腫の個数はそのままの数値を加算した。さらに、各葉における肉芽腫の大きささと数をImageJにより計測し、両群で比較した。解析には経ロゾンデ群5匹およびスプレー式ゾンデ群4匹のそれぞれにおいて、全葉にわたる10枚の組織切片を用いた。

### ii) MWCNTの肺負荷量の経時変化

10週齢のF344雄性ラットを3群に分け、スプレー式ゾンデ群(単回投与)24匹、経ロゾンデ群(単回投与)24匹、経ロゾンデ反復投与群15匹とした(図4)。MWNT-7を0.5 mg/mLの濃度で0.5%PuronicF含有生理食塩水に懸濁し、超音波浴槽で30分以上分散させた。経ロゾンデあるいはスプレー式ゾンデを用いて、125 µg/0.25 mL/rat/回(およそ0.50 mg/kg体重)の用量で気管内投与した。経ロゾンデ反復投与群については、初回投与の4週間および8週間後に上記用量で投与を繰り返した。

単回投与実験の各群においては、投与1日後、4週間、8週間、12週間および16週後に、各群それぞれ3匹ずつ剖検し、MWCNTの肺負荷量測定に供した。スプレー式ゾンデ群のみ、投与直後の3個体についても測定を行った。経ロゾンデ反復投与群については、2回目の投与1日後、3回目の投与1日後および3回目の投与8週後に剖検し、肺負荷量測定を測定した(図4)。

MWCNTの測定は、Ohnishiらの蛍光マーカ

一を用いて検出する手法（大西法）に従った<sup>9),10)</sup>。肺の全ての葉を10%中性緩衝ホルマリン溶液で固定し、肺組織をアルカリ溶液で溶解した。十分に分散させた後、一部を2 mL チューブに移し、残存する肺組織を酸で溶解した後、MWCNT にベンゾ-ジ-ペリレン (B[ghi]P) を吸着させた。フィルターでMWCNT を捕捉してから、アセトニトリル溶液にB[ghi]P を脱着させ、HPLC の分析に供した。

また、投与1日後、8週後および16週後には、各群それぞれ肺負荷量測定とは別の3匹を剖検し、呼吸器系の組織を10%中性緩衝ホルマリン溶液で固定し、病理組織学的に解析した。

#### iii) Taquann 処理 MWCNT の肺負荷量

7週齢のF344雄性ラットを、低用量群10匹と高用量群10匹の2群に分けた(図5)。53 μm 径のシーブを用いて Taquann 処理<sup>11)</sup>を施した MWNT-7 に、夾雑物を除去するため200°C・2時間の熱処理を加えた後、0.18 mg/mL あるいは0.71 mg/mL の濃度で0.1% Tween80 含有生理食塩水に懸濁し、超音波浴槽で30分以上分散させた。投与には経口ゾンデを用い、低用量群は25 μg/0.14 mL/rat の用量で(およそ0.18 mg/kg 体重)、一方、高用量群は100 μg/0.14 mL/rat の用量で(およそ0.71 mg/kg 体重)、それぞれ単回の気管内投与を行った。

投与1週後および4週後にそれぞれ5匹ずつ剖検し、大西法により肺負荷量を測定した(図5)。

#### <倫理面への配慮>

本研究では、人を対象とした研究、人の遺伝子解析および疫学研究は行っていない。

動物飼育及び動物実験は東京都健康安全研究センター動物実験実施規程に基づいて、動物実験委員会の事前審査および承認を受け、その管理のもと実施された。

## C. 研究結果

### i) 反復気管内投与試験における2種の投与器具の比較

光学顕微鏡観察において、MWCNT の繊維は、肺門付近から臓側胸膜までほぼび漫性に存在したが、壁側胸膜には認められなかった。繊維は多くの場合、マクロファージに貪食された状態や肉芽組織内に凝集した状態で観察されるが、比較的微細な繊維束が炎症細胞を伴わずに肺胞壁に認められることもあった。リンパ組織への移行については、縦隔リンパ節に多く(図6)、他のリンパ節にはほとんど認められなかった。これらについて投与器具の違いによる顕著な差異は見られなかった。

肺ではMWCNT の沈着に関連した炎症反応が認められ、肺胞内にはMWCNT を貪食したマクロファージが多数認められ、好中球、好酸球およびリンパ球の間質への浸潤も見られた(図7)。また、終末気管支から肺胞管領域を中心に、軽度の肺胞上皮細胞の増生や間質の肥厚が見られ、肉芽腫の形成が認められた(図8)。これらの炎症反応は、いずれの器具を用いた場合にも、同程度に認められ(図9)、左葉の尾側や右後葉でやや強い傾向があった(図10)。各葉における肉芽腫の大きさと数を測定した結果、肉芽腫の数は両群間で有意差が認められなかったが、個々の肉芽腫の面積は、スプレー式ゾンデ群において経口ゾンデ群に比べて有意に大きいことが分かった(図11)。

一方、気管の所見については両群間で顕著な差異があった。挿管された投与器具の先端部の到達部位に相当する気管分岐部の5 mmほど上部では、剖検時に、スプレー式ゾンデ群には肉眼的にMWCNTの沈着を反映した約3 mm<sup>2</sup>程度の黒色斑を認めた。組織学的には、粘膜下にMWCNTを内包する大型の肉芽腫が存在し、一部では気管粘膜上皮の扁平上皮化生が見られた(図12)。経口ゾンデ群にもMWCNTの沈着と炎症細胞の浸潤はわずかにみられるが、スプレー式ゾンデ群に比べると低レベルであった(図12)。

#### ii) MWCNTの肺負荷量の経時変化

スプレー式ゾンデ群と経口ゾンデ群の動物の肺を肉眼観察すると、いずれも、MWCNTは肺実質内では深部まで分散しているが(図13)、葉間の偏りあるいは個体差が多少認められた。また、投与1日後から投与16週間まで時間が経過しても肺内の沈着量に顕著な減少は見られなかった。

また、i)の結果と同様に、スプレー式ゾンデ群では、気管分岐部のやや上部にMWCNTの沈着が、投与直後から投与16週間まで観察された(図14)。肉眼的な観察から、気管へのMWCNT沈着は気管の腹側および左側に多かったが(図15)、肺の左葉あるいは右葉への沈着の偏りとの関連性は見られなかった。

組織学的には、投与1日後には、肺実質内でび慢性にMWCNTの沈着と炎症反応を認めた(図16)。MWCNT線維は肺胞内に遊離した状態あるいはマクロファージに貪食された状態で観察され、臓側胸膜まで達していた。炎症反応の主体はマクロファージであるが、好酸球および好中球も見られた。8

週間には、好酸球や好中球の浸潤は目立たず、繊維を貪食したマクロファージの集合が肺胞内に多数観察された。16週間には、MWCNTを内包する肉芽腫が観察された(図16)。これらの組織所見について、経口ゾンデ群とスプレー式ゾンデ群の間に差異は見られなかった。

125 µg/ratの用量でスプレー式ゾンデにより単回投与した直後、1日後、4週間、8週間、12週間および16週間の肺負荷量の平均値は、それぞれ132.5、60.7、58.4、64.6、37.5 および79.7 µg/lungであった(図17・緑色)。一方、経口ゾンデで単回投与した1日後、4週間、8週間、12週間および16週間の平均値は、73.8、68.6、35.5、35.6 および47.3 µg/lungであった(図17・青色；投与直後のデータ無し)。各時期の測定値は、個体差が大きく、両群間で差異は認められなかった。

反復投与群では、単回投与に比べて強い炎症反応が観察された(図18)。肺負荷量は、2回目の投与1日後、3回目投与1日後および3回目の投与8週間について3回測定し、それぞれ115.5、161.5 および154.5 µg/lungであった(図19)。

#### iii) Taquann処理MWCNTの肺負荷量

Taquann処理MWCNTを低用量(25 µg/rat)で単回投与した後の肺負荷量は、投与1週後に10.1 µg/lung、4週後に5.0 µg/lungであり、投与1週後に半量以下まで減衰した後、さらに3週間でクリアランスが進行することがわかった(図21・水色)。一方、高用量(100 µg/rat)ではそれぞれ30.4 および31.7 µg/lungであり、投与1週間以内に減衰して以降、肺内のMWCNT量は維持さ

れた (図 21・橙色)。

#### D. 考察

##### i) 反復気管内投与試験における 2 種の投与器具の比較

気管内投与試験において、経口ゾンデとスプレー式ゾンデの両者を比較すると、スプレー式ゾンデのほうが、経口ゾンデよりも被験物質が肺の深部まで到達しやすく、葉の偏りも少ないことが示されている<sup>12)13)</sup>。しかし、今回、短期間の 8 回の反復投与の条件下においては、両者に顕著な違いは見られなかった。複数回の投与により差異が見えづらくなった可能性が考えられる。葉の偏りについては、左右ともに尾側(後方)にやや反応が強く、動物の尾を下に傾けて固定して投与していることによると思われるが、どちらの器具を用いた場合にも、同じ傾向であった。

今回、スプレー式ゾンデを用いた場合に、肺実質における肉芽腫の大きさがやや大きなることがわかった。スプレー式ゾンデにより MWCNT 繊維が加圧されて肺内の細胞に接触し、また、投与された瞬間に広く肺内に分布することが推測されるが、今回の観察結果はこれらに起因しているのかもしれない。また、ゾンデ先端部分が位置する気管の上皮に肉芽腫ができることが示された。これは、経口ゾンデでは MWCNT が直線状に噴出されるのに対し、スプレー式ゾンデでは先端部から霧状に広がるためと思われる。今回、短期間に比較的高用量で反復投与したことが原因か、個体によっては巨大な肉芽腫が形成されていた。

前述のように、スプレー式ゾンデのほうが肺内に広く均一に分布し、優れた手法で

あることを示す報告もあるが<sup>14)</sup>、今回、8 回の反復投与においては結果に顕著な違いが見られなかった。経口ゾンデを用いた場合に懸念される肺葉や肺実質内の偏りについては、本研究が 26 回におよぶ長期の反復投与試験であることを考えれば、無視できるものと思われる。実際、両者を比較し、ナノ物質の肺内分布や肺泡洗浄液の生化学分析結果に差が無かったという情報もある<sup>14, 15)</sup>。また、気管内投与を吸入試験の代替手法として提案する場合に投与器具の入手のしやすさは重要な点であると考えられる。

以上を踏まえ、本研究の 2 年間の反復投与試験においては、原則的には経口ゾンデを用いて、気管内投与を実施することとした。しかし、気管内投与試験により MWCNT の発がん性を報告している Suzui らのグループがスプレー式ゾンデを使用していることから<sup>2)</sup>、比較のためにスプレー式ゾンデを用いた群を設けることにした(後述)。

##### ii) MWCNT の肺負荷量の経時変化

125  $\mu\text{g}$  を単回投与し、定期的に剖検して肺内負荷量を測定した結果、個体差が大きいものの、1 日後に投与した量のおよそ半量まで減少したが、その後、4 週後、8 週後および 16 週後の結果は同程度で、経時変化はあまり見られないことが分かった。組織学的には MWCNT の存在形態や炎症像は時期によって変化しているものの、この条件下では、肺外へのクリアランスはあまり進行しなかったことが分かる。

一方で、投与翌日に大きく負荷量が減少したのは、おそらく気道粘膜上皮の「繊毛エレベーター運動」による排出が原因と考えられる。気道から排出された MWCNT は消

化器系へ移行することが推測されるが、消化管内の MWCNT 量の分析が、今後必要である。

MWCNT の肺内の減衰量を測定した過去の報告とは諸条件が異なるため単純に比較できないが、投与 90 日後までの観察において、直線的に次第に減少するものもあれば、今回の我々の結果と同様の減衰曲線を描くものもある (図 2)<sup>6)9)</sup>。例えば、Shinohara らは<sup>6)</sup>、ラットに経口ゾンデにより 220  $\mu\text{g}$  を単回投与し、投与直後 (1 日後) に 60% 程度まで減衰し、その後は 1 年間ほとんど MWCNT 量が増加しないという結果であり (図 2)、今回の我々の結果と似ている。MWCNT 繊維はその強固で長い形態のために、マクロファージが貪食と破裂を繰り返して肺胞内に維持される、またはリンパ管等にトラップされて肺組織内に維持される、あるいは、肉芽組織によって肺実質に維持される等の挙動が提唱されている<sup>16)</sup>。

本研究の長期反復試験においては、このように MWCNT が肺内に維持され、慢性的な炎症反応が引き起こされることを期待し、毎回の投与で一定量を残留させ、2 年間で 1500  $\mu\text{g}/\text{lung}$  程度まで負荷を増加させることを目指している。今回、125  $\mu\text{g}$  を 2 回および 3 回の反復投与した場合には、1 回あたりの投与で 125  $\mu\text{g}$  が 62.5  $\mu\text{g}$  まで半減することを仮定した場合に予測される数値 (図 20・赤色の破線) と同程度であった。このことから、4 週間に 1 度の反復投与によって次第に肺内蓄積量が増加することが期待される (図 21)。

#### iii) Taquann 処理 MWCNT の肺負荷量

本研究で実施する反復投与試験は、Kasai

らの吸入試験にできるだけ近い条件にするため、Taquann 処理 MWCNT を使用することにした。吸入試験では粒径の大きなものは鼻腔で捕捉されることが指摘されているため、鼻腔を経由しない気管内投与の系では、凝集体の少ない MWCNT を用いるほうが適切である。

今回、低用量 (25  $\mu\text{g}/\text{rat}$ ) と高用量 (100  $\mu\text{g}/\text{rat}$ ) の 2 つの条件で投与を実施した結果、どちらも、一週間後にはすでに半量を下回っており、ii) で原末の MWCNT を用いた場合と同様に、投与後早い段階でクリアランスが起こることが分かった。

ii) の実験に近い用量の高用量群 (100  $\mu\text{g}/\text{rat}$ ) においては、1 週後と 4 週後の負荷量がほぼ同じであったため、原末と同様に一定量の蓄積が見込まれることが分かった。ただし、Taquann 処理 MWCNT が原末よりもクリアランスが高いことが示唆された。体重および週齢が異なるが、体重当たりの投与量に換算すると、ii) の原末 MWCNT が 0.50 mg/kg 体重なのに対し、Taquann 処理 MWCNT (高用量群) では 0.71 mg/kg 体重となるため Taquann 処理 MWCNT の実験のほうが負荷は高かったことになる。しかし、4 週後の残存割合を比較すると、原末 MWCNT の 59% に比べて Taquann 処理 MWCNT は 31.7% と大幅に低かった (表 1)。これは Taquann 処理 MWCNT が凝集体の含有が少ないためと推測される。

また、高用量群と低用量群を比較すると、クリアランスの違いが認められた。4 週後の残存割合は、高用量 (100  $\mu\text{g}/\text{rat}$ ) の場合が 31.7%、低用量 (25  $\mu\text{g}/\text{rat}$ ) の場合が 20.0% であった。今回、公比 5 で 2 用量を検討したが、低用量ではクリアランスが

良いことから、2年間の反復投与試験を実施した場合の最終的な負荷量は、高用量の5分の1よりもさらに低くなることが予測される。

## E. 結論

今年度は、2年間の長期反復投与試験の投与条件を決めるために、投与器具による毒性の差異、原末および Taquann 処理 MWCNT の肺負荷量の経時変化を検討した。

まず、経口ゾンデとスプレー式ゾンデを用いた場合に炎症反応や MWCNT のクリアランスに顕著な違いは無いため、基本的には入手しやすい経口ゾンデを用いるが、スプレー式ゾンデ投与群を1群設けることとする。次に、MWCNT の肺負荷量は、125 µg/rat (0.50 mg/kg 体重) の投与条件において投与翌日に半量程度になり、その後は長期間減少しないことが分かった。また、4週間おきに反復投与を実施した場合、単回投与の結果から予測される量で蓄積することが確認できた。さらに、Taquann 処理 MWCNT の肺負荷量を測定したところ、原末よりもクリアランスが高いことが示唆され、その4週後の残存割合は、100 µg/rat の投与条件 (0.71 mg/kg 体重) では 31.7%、25 µg/rat の投与条件 (0.18 mg/kg 体重) では 20.0% であった。

上記を踏まえ、2年間の反復投与試験の実験条件は以下の通りとした (表 2)。F344 雄性ラットに対して、Taquann 処理 MWNT-7 を 1 mL/kg/回の投与量で、4週間に1度、合計 26 回投与する。対照群、低用量群、高用量群、高用量群 (スプレー式ゾンデ使用群) および無処置群の 5 群を設ける。投与用量は、低用量群を 0.125 mg/kg 体重に、

高用量群を 0.50 mg/kg 体重に設定する (初回投与で、9 週齢の約 200 g のラットにそれぞれ、25 および 100 µg/rat の量で投与することに相当)。一定数を途中解剖し、発がん性評価を各群 30 匹で行うことのできるように動物数を設定する (表 2)。

上記の用量で2年間投与を実施し、投与した量のうち低用量で 20% まで、高用量で 30% まで 4 週間で減衰すると仮定し、肺負荷量を試算すると、2年後の蓄積量の予測は、低用量で 240 µg/lung、高用量で 1440 µg/lung となる (図 22)。肺内蓄積量が増すにつれて、また、加齢によって、クリアランスが低下する可能性はあるが、Kasai ら<sup>1)</sup>の中濃度群および高濃度群の負荷量 (それぞれ 150 および 1800 µg/lung) に近いものになると期待される (図 22)。

現在、全 26 回の投与のうち 4 回まで実施済みである。

## F. 参考文献等

- 1) Lung carcinogenicity of inhaled multi-walled carbon nanotube in rats. Kasai T, Umeda Y, Ohnishi M, Mine T, Kondo H, Takeuchi T, Matsumoto M, Fukushima S. Part Fibre Toxicol. 2016 Oct;13(1):53.
- 2) Multiwalled carbon nanotubes intratracheally instilled into the rat lung induce development of pleural malignant mesothelioma and lung tumors. 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. Cancer Sci. 2016

Jul;107(7):924-35.

- 3) Carcinogenicity of multi-walled carbon nanotubes: challenging issue on hazard assessment. Fukushima S, Kasai T, Umeda Y, Ohnishi M, Sasaki T, Matsumoto. *J Occup Health*. 2018 Jan 25;60(1):10-30.
- 4) General procedures for safety tests on carbon nanomaterials. Chapter.V. Endo S, Maru J. 2017. Procedures for sample preparation, characterization, in vitro cell-based assays, and animal tests on carbon nanomaterials. AIST.
- 5) Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes. Muller J, Huaux F, Moreau N, Misson P, Heilier JF, Delos M, Arras M, Fonseca A, Nagy JB, Lison D. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005 Sep 15;207(3):221-31.
- 6) Long-term retention of pristine multi-walled carbon nanotubes in rat lungs after intratracheal instillation. Shinohara N, Nakazato T, Ohkawa K, Tamura M, Kobayashi N, Morimoto Y, Oyabu T, Myojo T, Shimada M, Yamamoto K, Tao H, Ema M, Naya M, Nakanishi J. *J Appl Toxicol*. 2016 Apr;36(4):501-9.
- 7) Biodistribution and clearance of instilled carbon nanotubes in rat lung. Elgrabli D, Floriani M, Abella-Gallart S, Meunier L, Gamez C, Delalain P, Rogerieux F, Boczkowski J, Lacroix G. *Part Fibre Toxicol*. 2008 Dec 9;5:20.
- 8) Translocation and fate of multi-walled carbon nanotubes in vivo. Deng X, Jia G, Wang H, Sun H, Wang X, Yang S, Wang T, Liu Y.
- 9) Novel method using hybrid markers:

- development of an approach for pulmonary measurement of multi-walled carbon nanotubes. Ohnishi M, Yajima H, Kasai T, Umeda Y, Yamamoto M, Yamamoto S, Okuda H, Suzuki M, Nishizawa T, Fukushima S. *J Occup Med Toxicol*. 2013 Oct 25;8(1):30.
- 10) Improved method for measurement of multi-walled carbon nanotubes in rat lung. Ohnishi M, Suzuki M, Yamamoto M, Kasai T, Kano H, Senoh H, Higashikubo I, Araki A, Fukushima S. *J Occup Med Toxicol*. 2016 Sep 15;11:44.
  - 11) Improved dispersion method of multi-wall carbon nanotube for inhalation toxicity studies of experimental animals. Taquahashi Y, Ogawa Y, Takagi A, Tsuji M, Morita K, Kanno J. *J Toxicol Sci*. 2013;38(4):619-28.
  - 12) Intratracheal instillation methods and the distribution of administered material in the lung of the rat. Hasegawa-Baba Y, Kubota H, Takata A, Miyagawa M. *J Toxicol Pathol*. 2014 Oct;27(3-4):197-204
  - 13) Significance of Intratracheal Instillation Tests for the Screening of Pulmonary Toxicity of Nanomaterials. Morimoto Y, Izumi H, Yoshiura Y, Fujisawa Y, Fujita K. *J UOEH*. 2017;39(2):123-132.
  - 14) ナノ材料の気管内投与試験の試験標準化に向けた検討～投与器具及び投与液量の影響～小林 俊夫, 大嶋 浩, 坪倉 靖祐, 菊池 純一, 橋爪 直樹, 井上 義之, 中井 誠, 安心院 祥三, 古川 浩太郎, 今田中 伸哉, 坪倉靖祐 (2014).第41 回日本毒性学会学術年会. *J Toxicol Sci*. 39 (Suppl), S266.

15) General procedures for safety tests on carbon nanomaterials. Chapter. VII.

Morimoto Y, Izumi H, Fujita K. 2017. Procedures for sample preparation, characterization, in vitro cell-based assays, and animal tests on carbon nanomaterials. AIST.

16) Asbestos, carbon nanotubes and the pleural mesothelium: a review of the hypothesis regarding the role of long fibre retention in the parietal pleura, inflammation and mesothelioma.

Donaldson K, Murphy FA, Duffin R, Poland CA. Part Fibre Toxicol. 2010 Mar 22;7:5.

#### G. 研究発表

(論文発表)

Sakamoto Y, Hojo M, Kosugi Y, Watanabe K, Hirose A, Inomata A, Suzuki T, Nakae D. Comparative study for carcinogenicity of 7 different multi-wall carbon nanotubes with different physicochemical characteristics by a single intraperitoneal injection in male Fischer 344 rats. J Toxicol Sci. 43(10):587-600. 2018.

(学会発表)

Hirose A., Hojo M., Kobayashi N., Impact of sample preparation of MWCNT for developmental toxicity by intratracheal instillation. The 10th Congress of Toxicology in Developing Countries (CTDC2018) (April 2018 Belgrade, Serbia)

坂本義光,北條幹,鈴木俊也,猪又明子,守安貴子,広瀬明彦,中江大:多層カーボンナノチ

ューブ(MWCNT)を単回経気管噴霧投与した後終生飼育したラットの肺および中皮組織における増殖性病変の発生. 第45回日本毒性学会学術年会(2018年7月大阪)

北條幹,小林憲弘,長谷川悠子,安藤弘,久保喜一,海鉦藤文,田中和良,五十嵐海,村上詩歩,多田幸恵,生嶋清美,湯澤勝廣,坂本義光,前野愛,鈴木俊也,猪又明子,守安貴子,高橋祐次,広瀬明彦,中江大:多層カーボンナノチューブのマウス気管内投与による発生毒性と肺の炎症との関連性. 第45回日本毒性学会学術年会(2018年7月大阪)

Hojo M, Kobayashi N, Hasegawa Y, Sakamoto Y, Murakami S, Yamamoto Y, Tada Y, Maeno A, Kubo Y, Ando H, Shimizu M, Taquahashi Y, Suzuki T, Nakae D, Hirose A: Relationship between developmental toxicity of multi-wall carbon nanotubes (MWCNT) and lung inflammation in pregnant mice after repeated intratracheal instillation. 54th congress of the European societies of toxicology (EUROTOX2018) (September 2018 Brussels, Belgium)

坂本義光,多田幸恵,北條幹,前野愛,鈴木俊也,猪又明子,守安貴子,中江大:ラットにおいてDHPNで誘発されたメソテリン陽性肺増殖性病変の病理組織化学的性状. 第35回日本毒性病理学会学術集会(2019年1月東京)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得 (該当なし)
2. 実用新案登録 (該当なし)
3. その他 (該当なし)

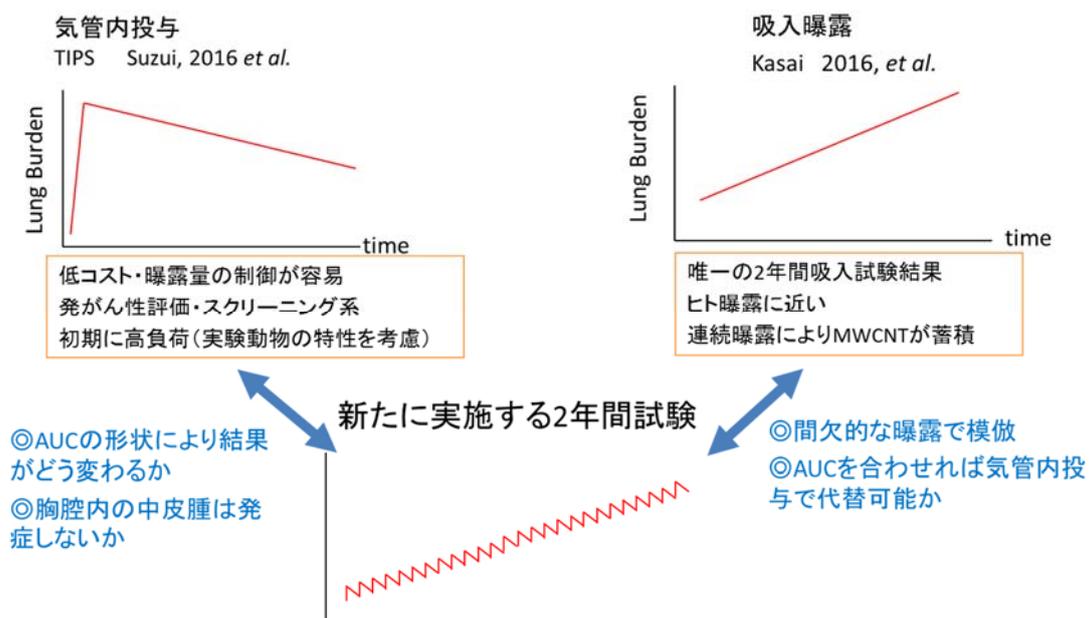


図 1. 既報の MWNT 慢性毒性評価と新規試験の肺負荷量と研究の意義

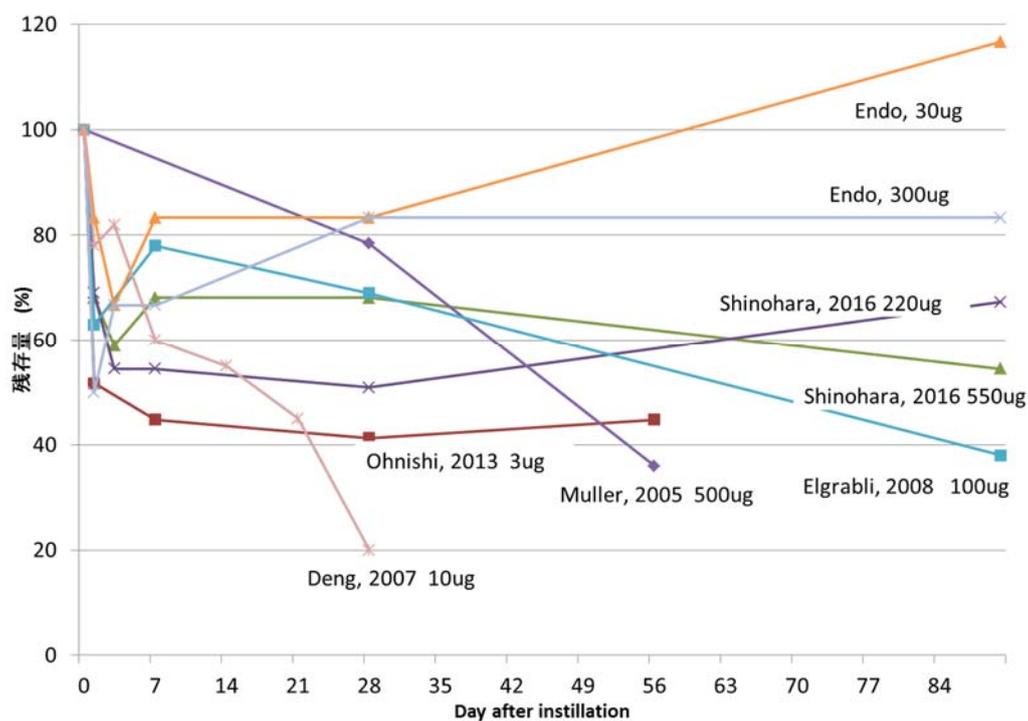


図 2. カーボンナノチューブばく露後の肺負荷量の減衰 (文献 4) -9)

- 動物: F344雄性ラット(16週齢)
- 投与濃度: 0.3 mg/mL
- 投与物質: MWNT-7
- 懸濁媒体: 0.1%Tween80/生理食塩水
- 投与用量: 62.5ug/0.25 ml/rat/回 × 8  
合計 500ug/rat

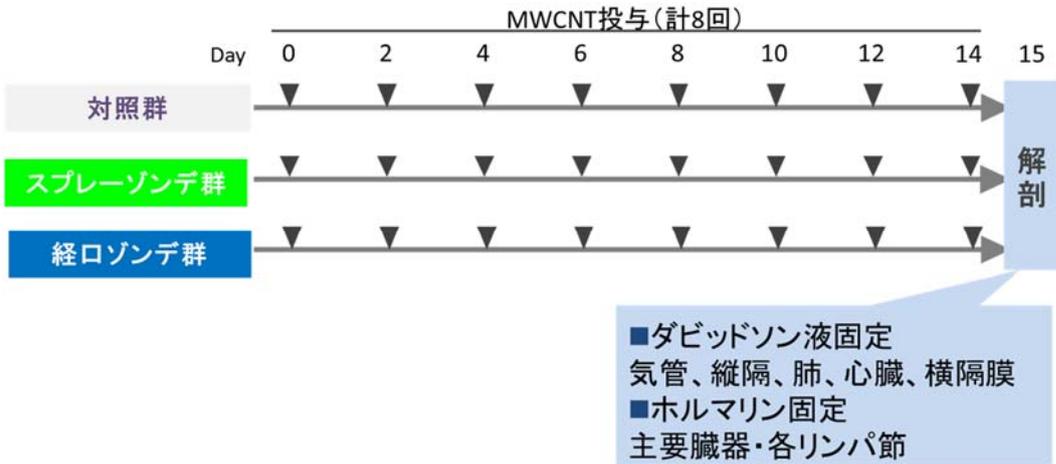


図 3. 反復気管内投与試験における 2 種の投与器具の比較 実験概要

- 動物: F344 ラット ♂ 10-wk old
- 試料: MWNT-7 (原末)
- 投与器具: スプレー式ゾンデ (PennCentury, 1A/1B)、経口ゾンデ (Natsume)
- 投与用量: 125 $\mu$ g/0.25ml/ラット/回  $\approx$  0.50 mg/kgBW
- 投与媒体: 0.5% pF 68 / 生理食塩水
- MWCNT量の測定: 大西法

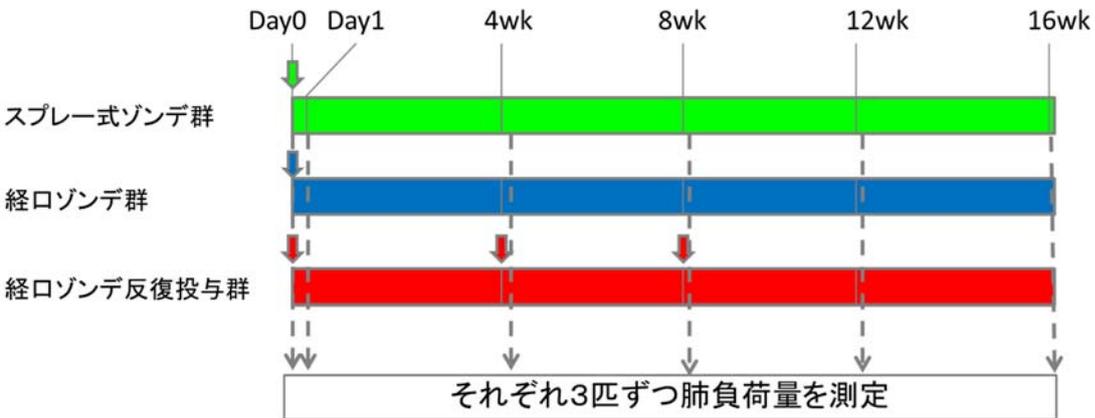


図 4. MWCNT の肺負荷量の経時変化 実験概要



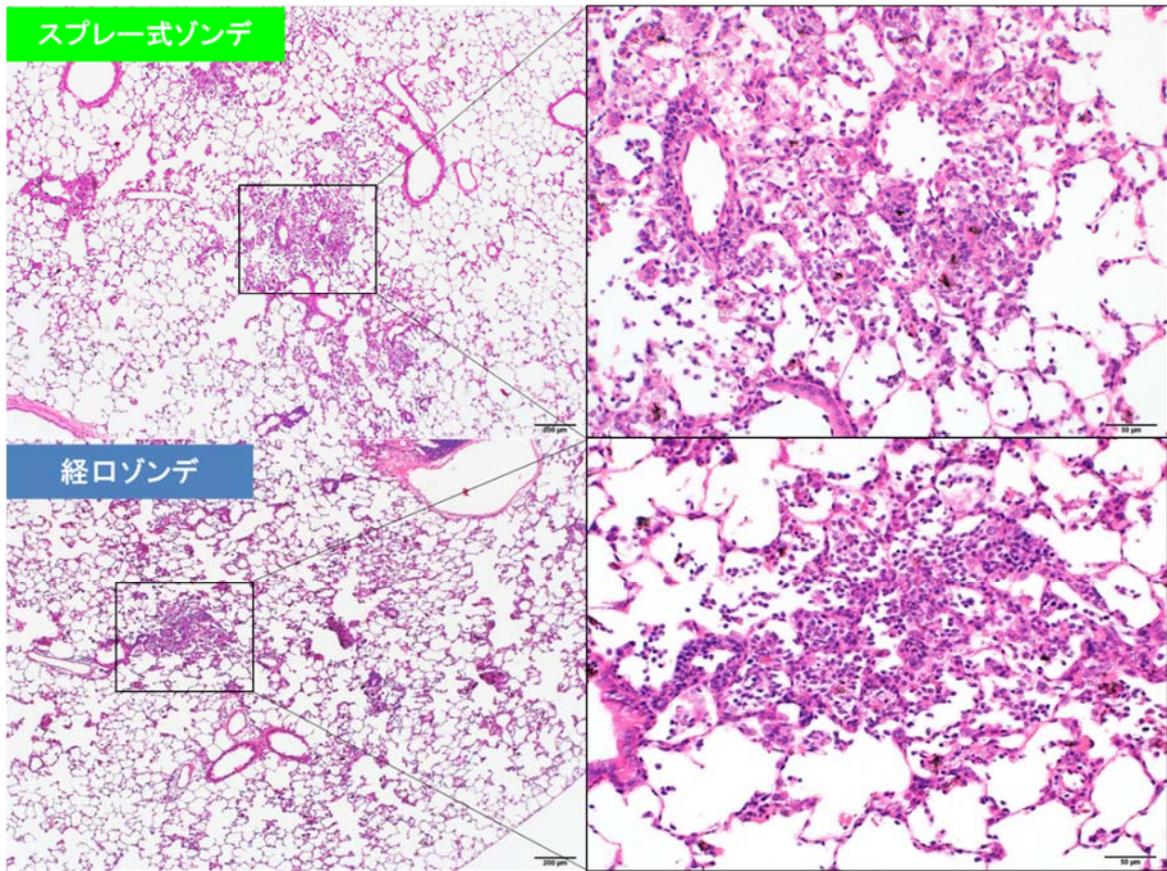


図 7. 反復投与後の肺の病理組織像

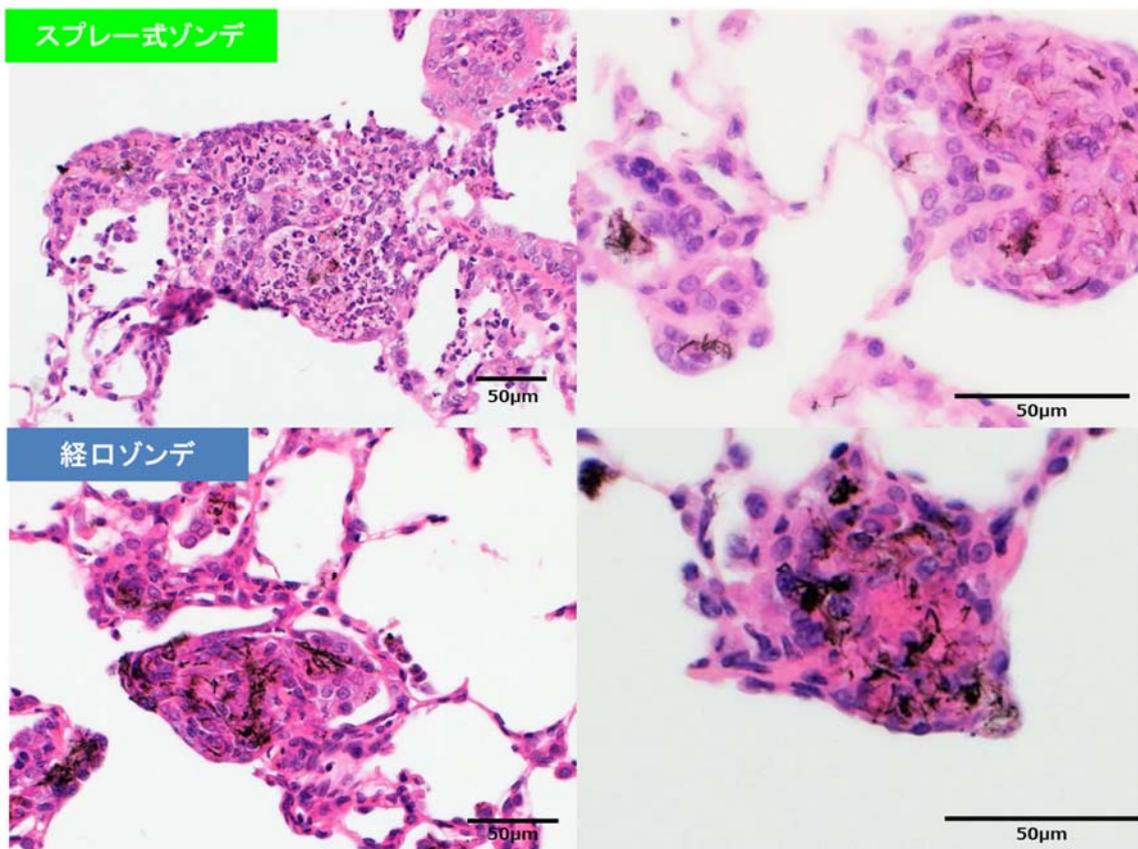


図 8. 反復投与後の肺の病理組織像 (肉芽腫)

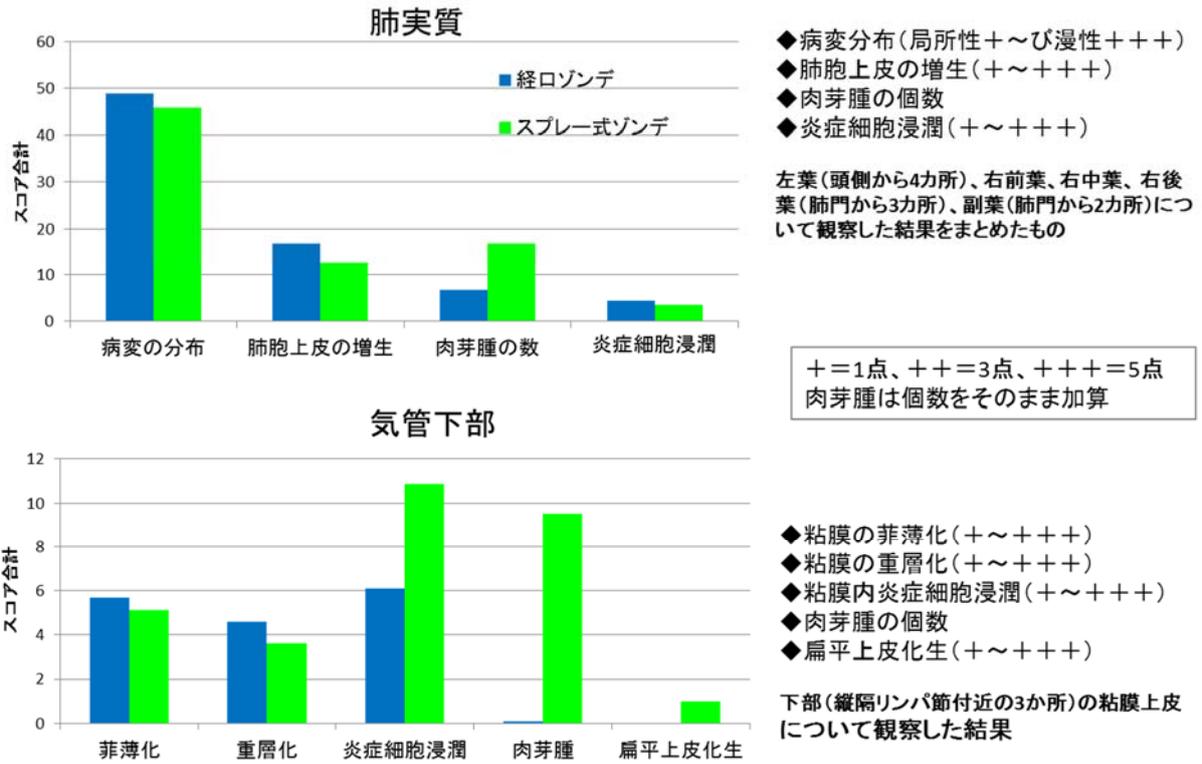


図 9. 反復投与後病理組織学的評価のまとめ

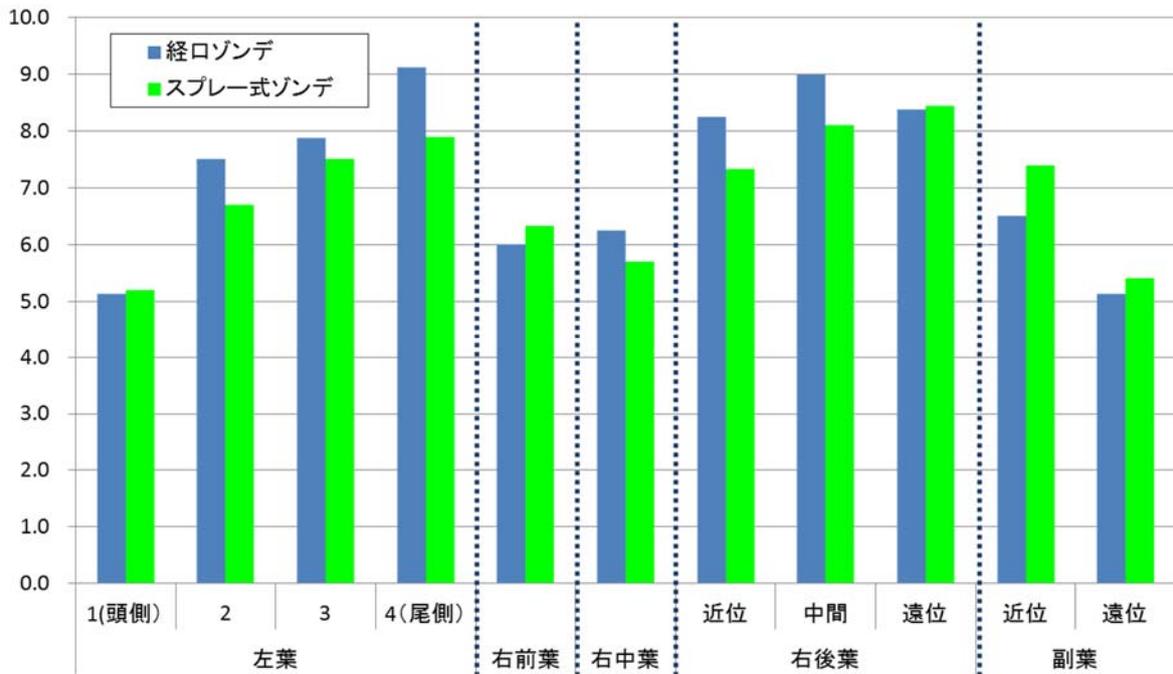


図 10. 反復投与後病理組織学的評価 (肺実質のみ、葉別の結果)

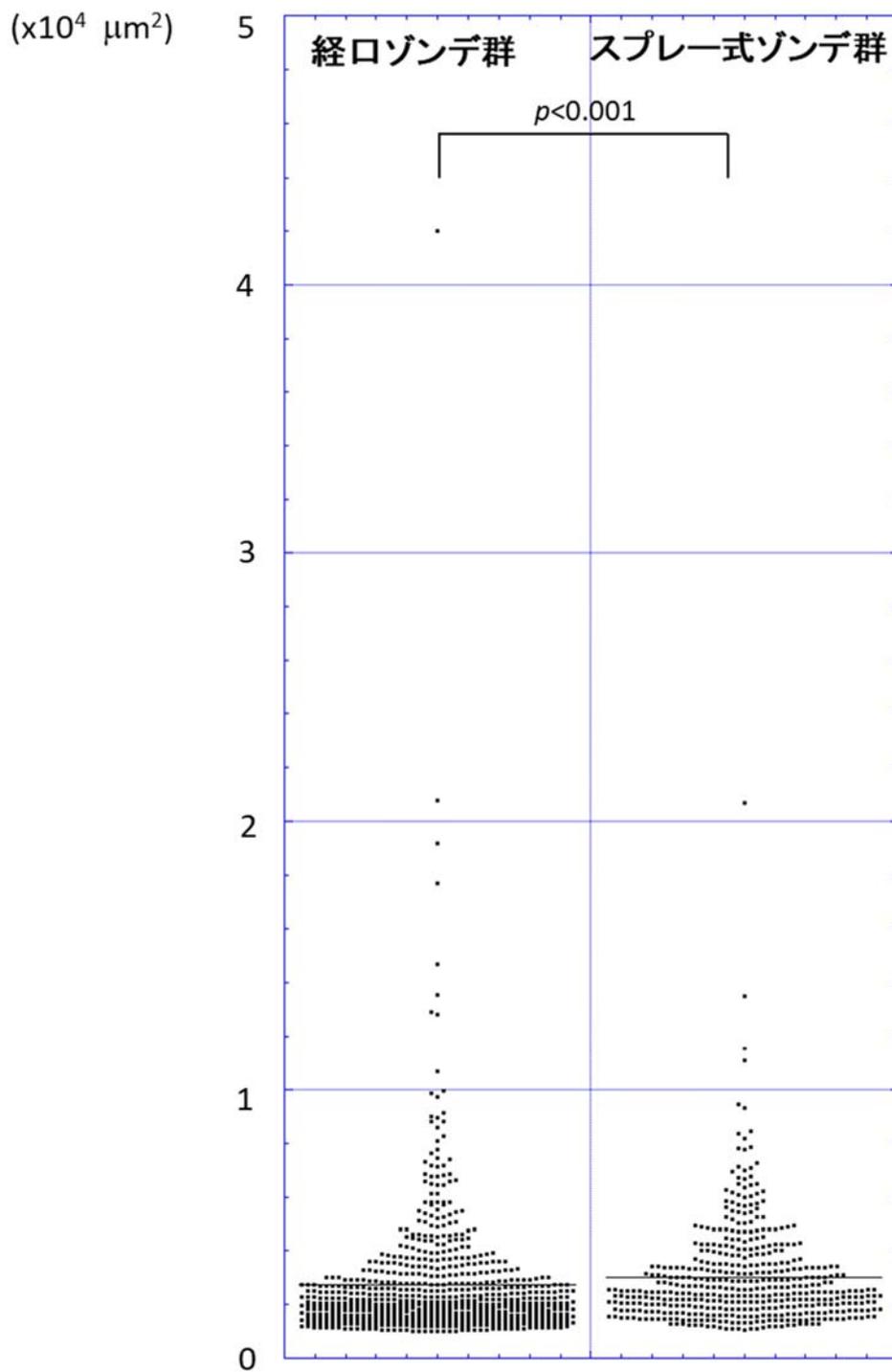


図 11. 反復投与試験における個々の肉芽腫の面積  
 (経口ゾンデ 5 匹およびスプレー式ゾンデ 4 匹、それぞれの全データ)  
 Mann-Whitney U test ( $p < 0.001$ )

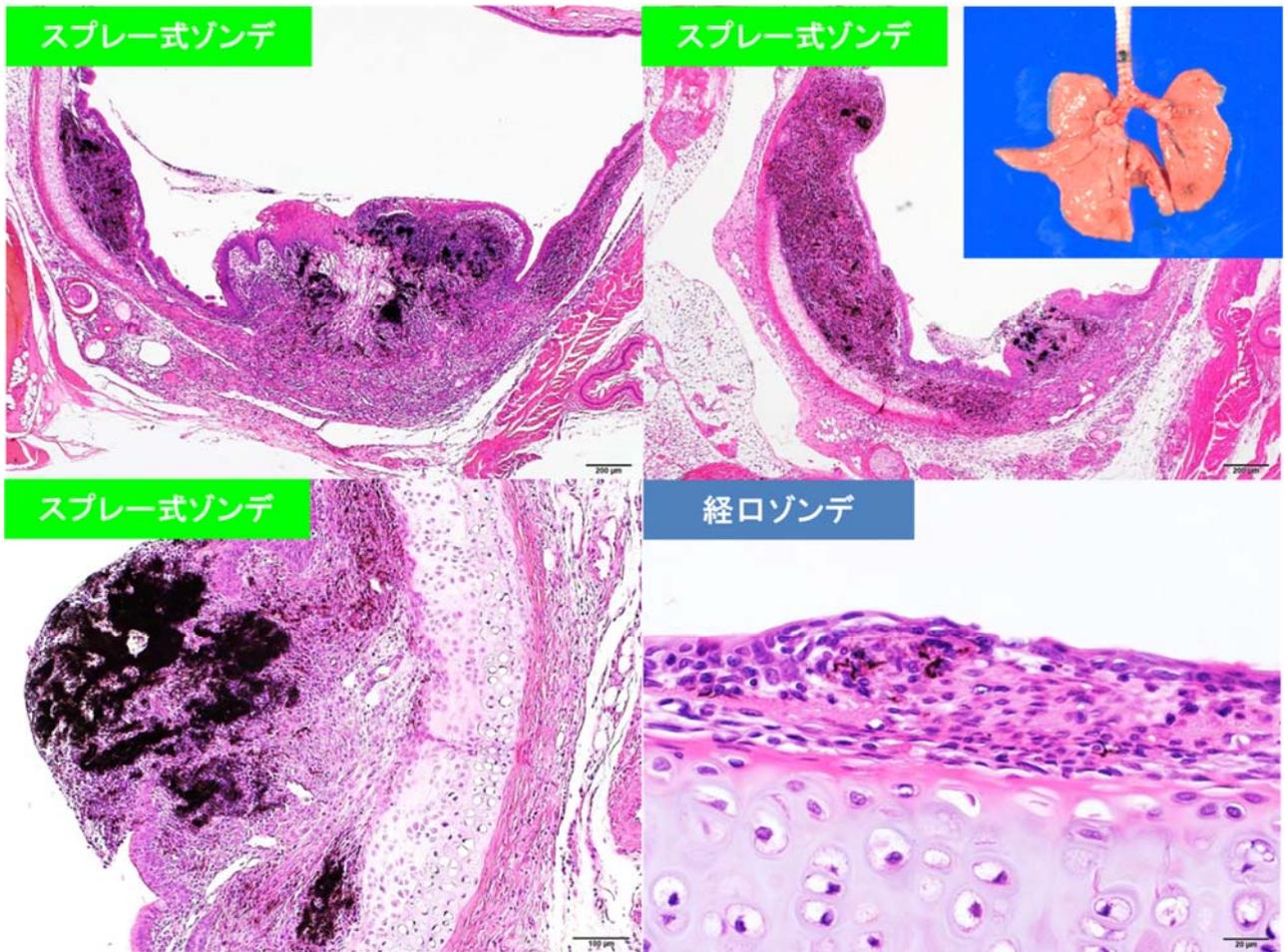


図 12. 気管上皮の大型の肉芽組織

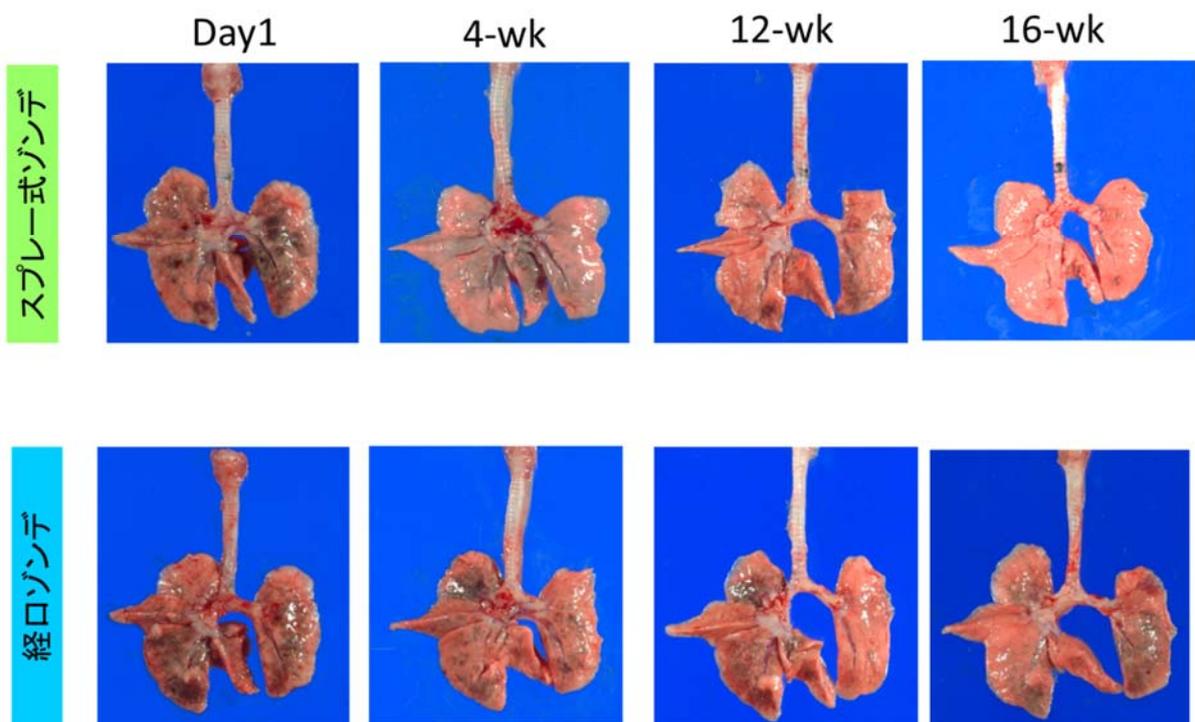


図 13. 単回投与後の肺組織の経時変化 (剖検時肉眼観察)

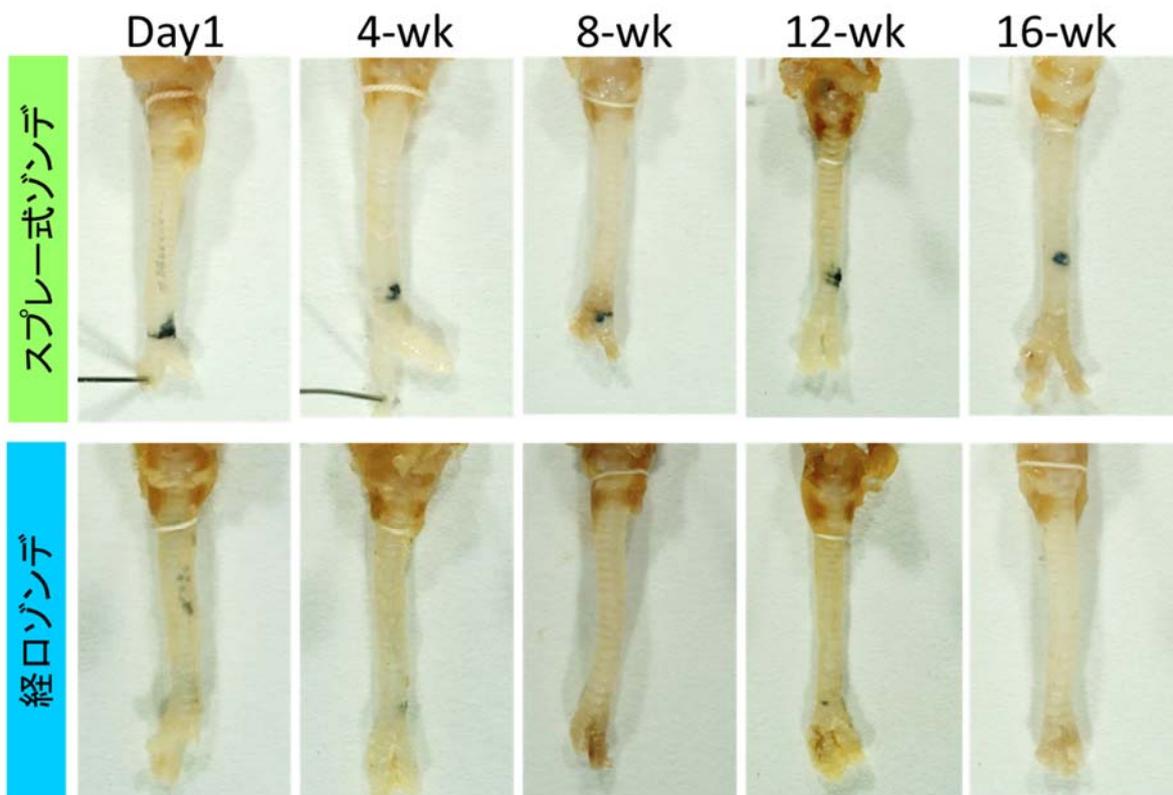


図 14. 単回投与後の気管における MWCNT 沈着 (固定後の肉眼観察)

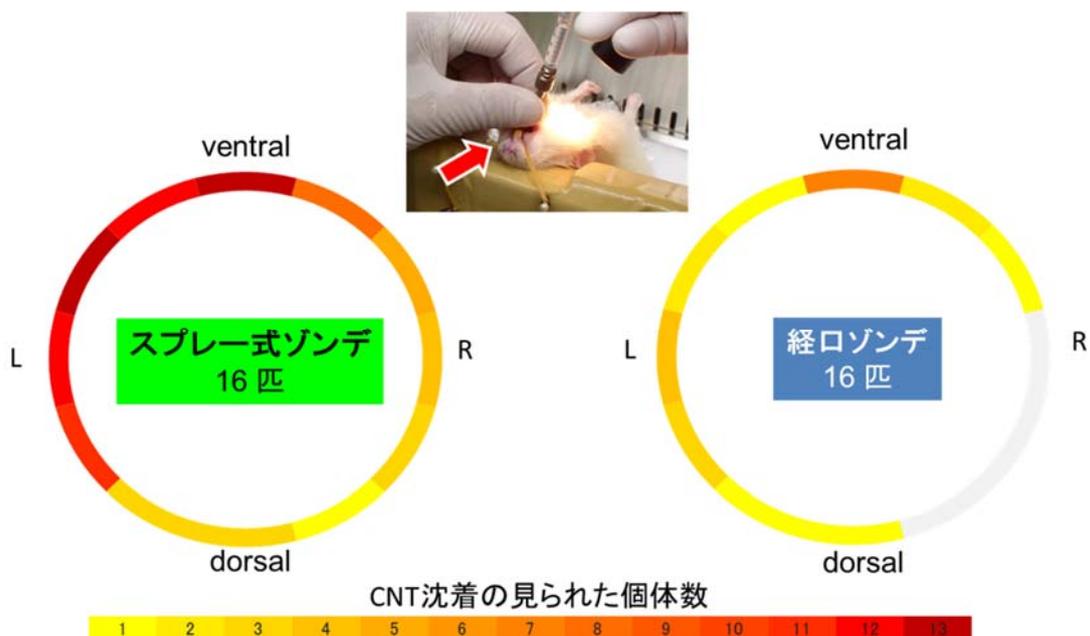


図 15. 気管の MWCNT の沈着部位

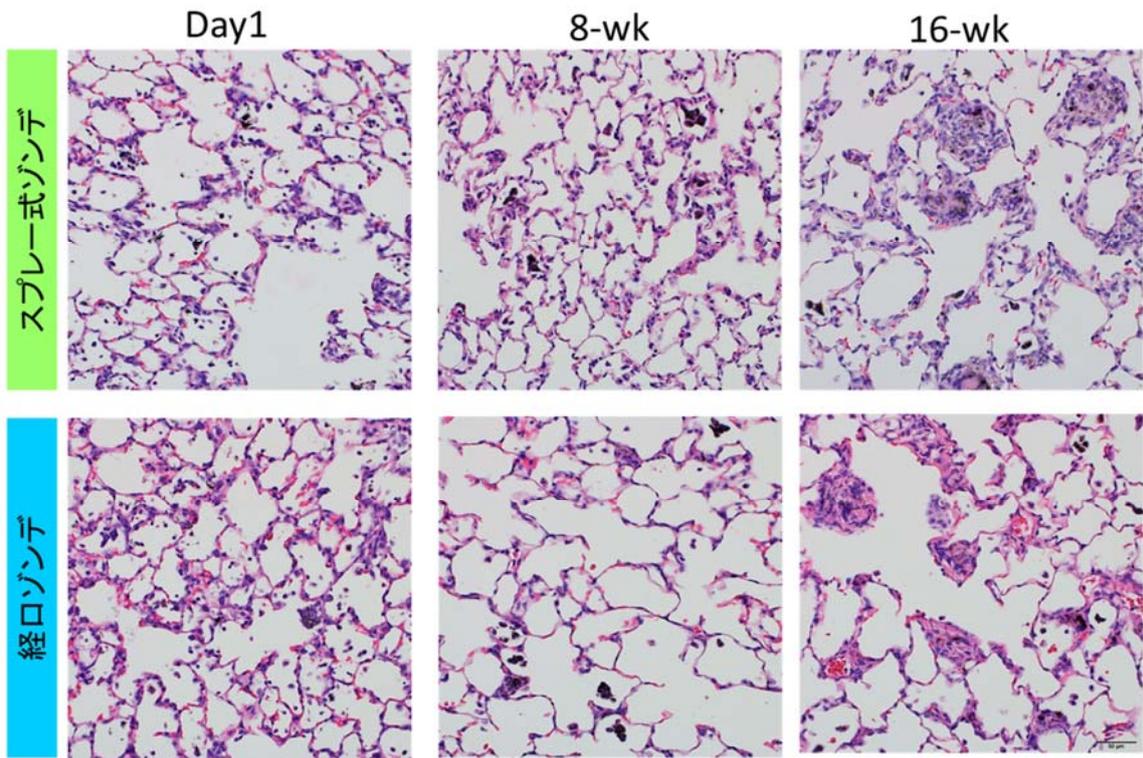


図 16. 単回投与後の肺の病理組織像

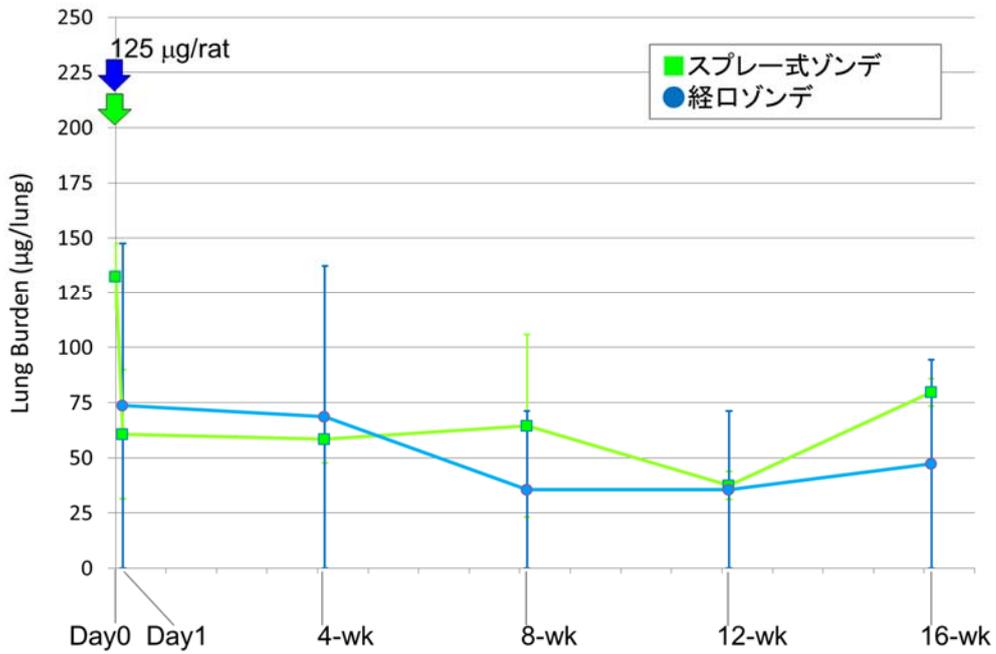


図 17. 単回投与後の肺負荷量の経時変化 (平均値±SD)

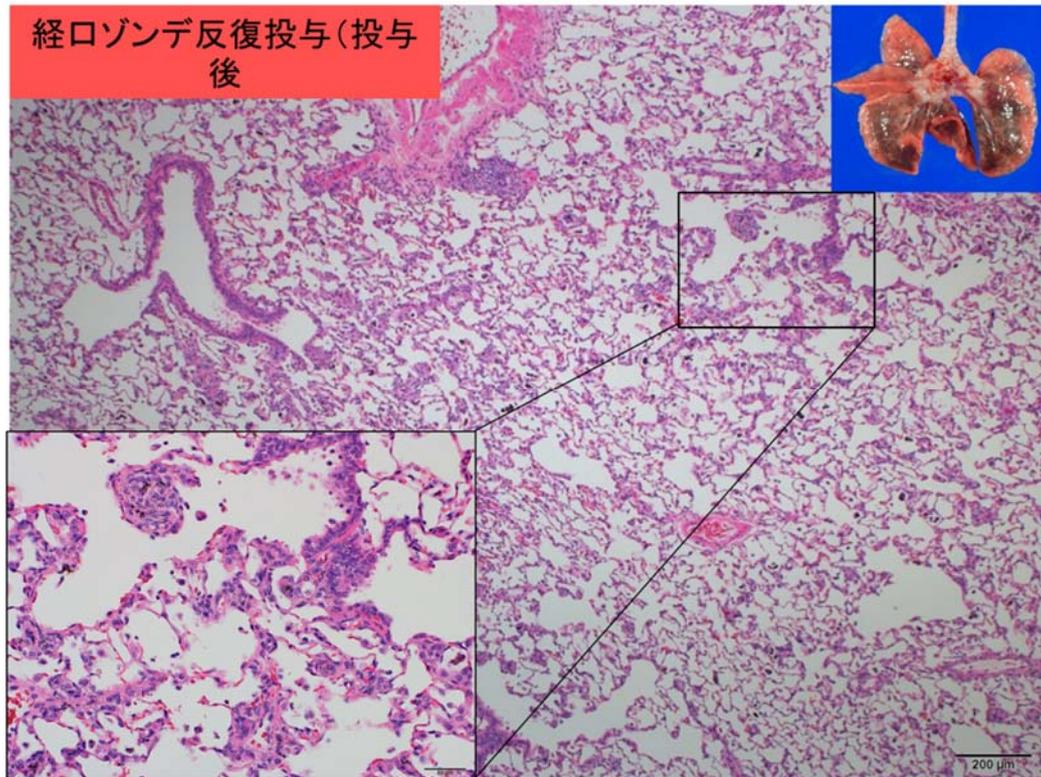


図 18. 3 回の反復投与後（初回投与から 16 週後）の肺の病理組織像

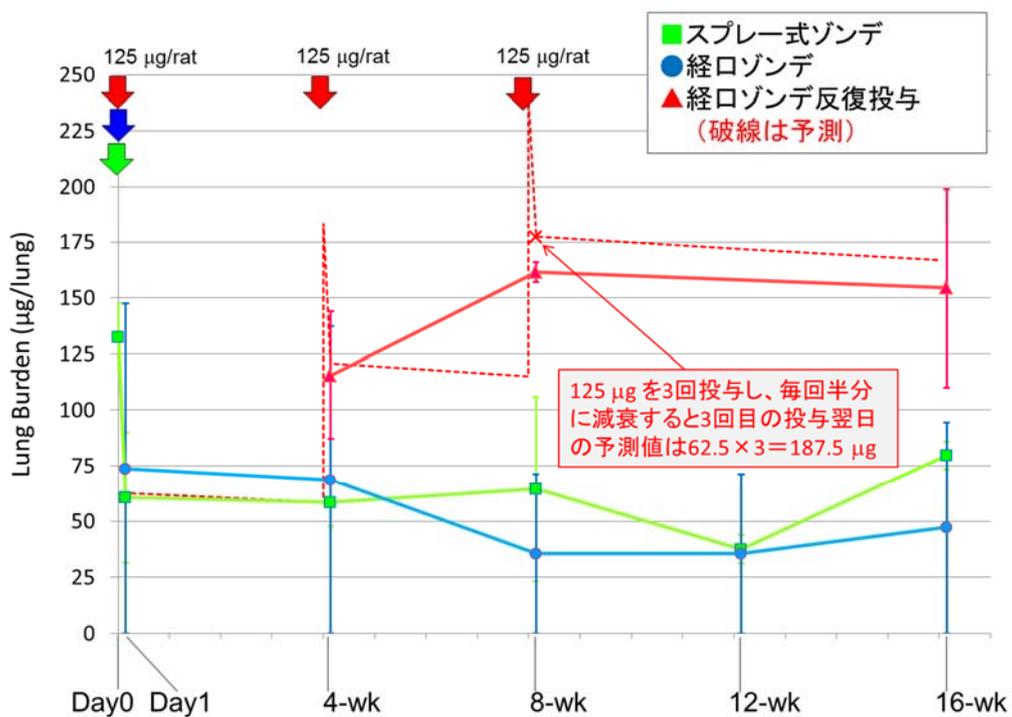


図 19. 反復投与後の肺負荷量の経時変化（平均値±SD）

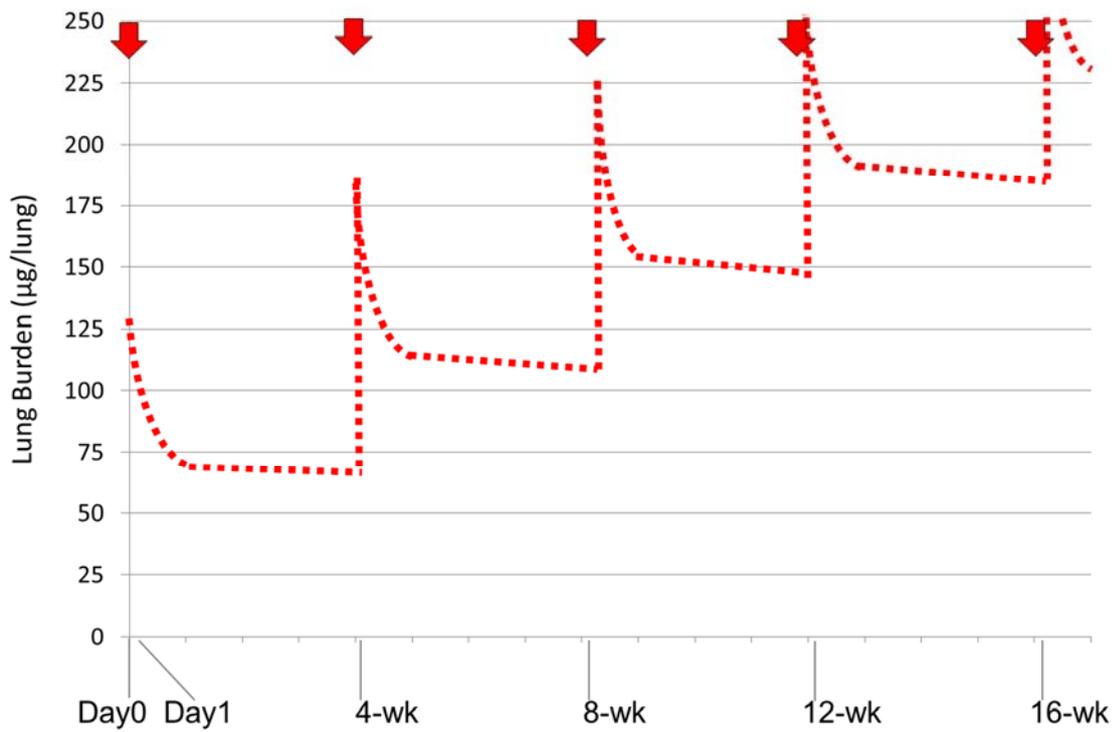


図 20. 反復投与による肺負荷量の増加の予測 (125µg/rat で投与した場合)

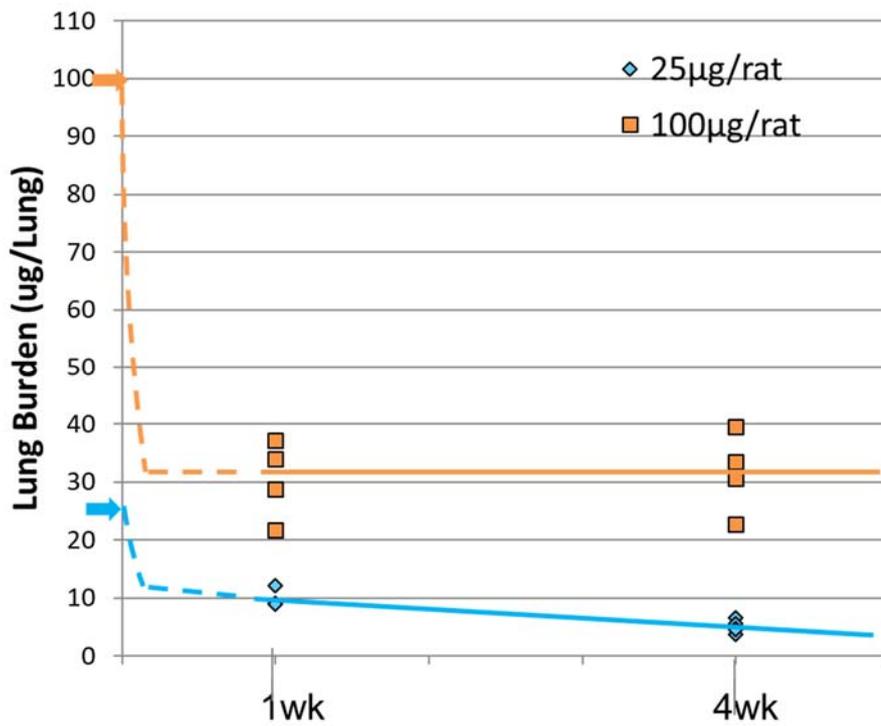


図 21. Taquann 処理 MWCNT の肺負荷量

表 1. 単回投与後の Taquann-MWCNT 残存量 (原末との比較)

| MWCNT             | 器具       | 投与量<br>( $\mu\text{g}/\text{rat}$ ) | 用量<br>( $\text{mg}/\text{kgBW}$ ) | 4週後の残存量<br>( $\mu\text{g}/\text{lung}$ ) | 残存割合<br>(%) |
|-------------------|----------|-------------------------------------|-----------------------------------|--|-------------|
| 原末<br>MWNT-7      | スプレー式ゾンデ | 125                                 | 0.50                              | 60.7                                     | 48.6        |
|                   | 経口ゾンデ    | 125                                 | 0.50                              | 73.8                                     | 59.0        |
| Taquann<br>MWNT-7 | 経口ゾンデ    | 100                                 | 0.71                              | 31.7                                     | 31.7        |
|                   |          | 25                                  | 0.18                              | 5.0                                      | 20.0        |

表 2. 2年間の気管内反復投与試験の実験計画

| 群              | 予測総負荷<br>( $\mu\text{g}/\text{lung}$ ) ※ | 1回あたりの<br>投与用量<br>( $\text{mg}/\text{kg}$ ) | 動物数 |           | 解剖 |    |    |
|----------------|--|---|-----|-----------|----|----|----|
|                |  |   |     |           | 半年 | 1年 | 2年 |
| 対照群            | 0  | 0   | 40  | 病理・BAL・PL | 5  | 5  | 30 |
|                |  |   |     | 肺負荷量      | 0  | 0  | 0  |
| 低用量群           | 240                                      | 0.125                                       | 55  | 病理・BAL・PL | 5  | 5  | 30 |
|                |  |   |     | 肺負荷量      | 5  | 5  | 5  |
| 高用量群           | 1440                                     | 0.50  | 55  | 病理・BAL・PL | 5  | 5  | 30 |
|                |  |   |     | 肺負荷量      | 5  | 5  | 5  |
| 高用量群<br>(スプレー) | 1440                                     | 0.50  | 55  | 病理・BAL・PL | 5  | 5  | 30 |
|                |  |   |     | 肺負荷量      | 5  | 5  | 5  |
| 無処置群           | 0  | -   | 10  | 病理・BAL    | 0  | 0  | 10 |
|                |  |   |     | 肺負荷量      | 0  | 0  | 0  |

※単回投与後4週間で高用量で30%、低用量で20%に減衰した場合の予測

BAL: 肺胞洗浄液、PL: 胸腔洗浄液

平成30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影響の効率的評価手法開発に関する研究

分担研究課題名：ナノマテリアルの気管内投与曝露評価手法の開発に関する研究

研究分担者：津田 洋幸 名古屋市立大学津田特任教授研究室・特任教授

研究協力者：David B. Alexander 名古屋市立大学特任教授

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

沼野 琢旬 名古屋市立大学津田特任教授研究室研究員

#### 研究要旨

目的：申請者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 $\mu$ 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  $\mu$ m、直径 305 nm）（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 $\mu$ 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 1 mg/ラット）、最終投与 6 時間および 4 週間後さらに 52 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 104 週まで無処置観察した。また、長さの異なる二層カーボンナノチューブ（1.5、7.0、15 $\mu$ m の DWCNT）を同じ本数（ $22 \times 10^{12}$  本/ラット）を投与して、長さの差異と炎症反応の程度について比較する研究は投与 4 週屠殺群についてデータを解析中である。

結果：肺では 6h ではすべての群に M $\phi$  を含む肺胞内炎症がみられ、4 w 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。104 週では、肺胞上皮過形成・腺腫・腺がんの合計および胸膜中皮過形成と悪性中皮腫の合計頻度において POT (0.25 と 0.5mg 合計) と MWCNT-7 に有意の増加が見られた。悪性中皮腫は POT 群に計 4/33 例 (12%) 発生し、日本バイオアッセイ研究センターの対照群 historical incidence より 140 倍の高値であった (投稿中)。

**結論:** an, ru および POT は肺胞に多数の Mφ を見る異物炎症を誘導し、POT では 4w でも粒子 TiO<sub>2</sub> よりも顕著であったことから、52 週では胸膜中皮の過形成、104 週では有意に高率に見られ、発がん性が証明された。この結果はこれらの難分解性被検体の長期実験において TIPS 法の実用性を示すものとする (投稿中)。さらに、長さの異なる二層カーボンナノチューブ(1.5、7.0、15micro-m の DWCNT)についても慢性試験を継続中である。

## A. 研究目的

二酸化チタニウム (TiO<sub>2</sub>) 粒子は塗料・化粧品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 TiO<sub>2</sub> 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 TiO<sub>2</sub> 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 を食食した 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 TiO<sub>2</sub> であるチタン酸カリウム (K<sub>2</sub>O・8TiO<sub>2</sub>) (POT) について、球状で直径 6nm のアナターゼ型 TiO<sub>2</sub> (AMT-100) (an) および直径 10-20μm 類球形ルチル型 TiO<sub>2</sub> (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、52, 104 週屠殺を実施した。

さらに、長さの異なる二層カーボンナノチューブ(1.5、7.0、15micro-m の DWCNT)について 22x10<sup>12</sup>本/ラット投与終了 4 週について解析している。

## B. 研究方法

3 種の TiO<sub>2</sub> 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  $\mu\text{m}$ 、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 (125 $\mu\text{g}$ /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 M $\phi$  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。

さらに、長さの異なる DWCNT は (1.5、7.0、15 $\mu\text{m}$ ) は POT の場合と同じプロトコールにて、各群 14~16 匹として 1 匹あたりの 2 週における全投与量は  $22 \times 10^{12}$  本/ラットとなるように調整して投与した。陽性対照として MWCNT-7 を 1mg/ラット (15 $\mu\text{m}$  の DWCNT の投与量 1mg/ラットに合わせた) 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。以上の条件で慢性試験を継続中である。

#### (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 M $\phi$  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 M $\phi$  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 M $\phi$  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 M $\phi$  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。

5) 52 週群では、肺 M $\phi$  数は減衰するものの溶媒群より高値であった。一方、PLF のタンパク量、臓側胸膜中皮の PCNA は 3w (投与終了 1w) より有意に増加した。

6) 104 週では、肺胞上皮過形成・腺腫・腺がんの合計および胸膜中皮過形成と悪性中皮腫の合計頻度において POT (0.25 と 0.5mg 合計) と MWCNT-7 に有意の増加が見られた。悪性中皮腫は POT 群に計 4/33 例 (12.1%)

発生した。統計的有意差ではないが、日本バイオアッセイ研究センターの対照群 historical incidence より 140 倍の高値であり、IARC の Preamble における評価基準位における生物学的有意の発生頻度と考えられた（投稿中）。

#### 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は胸膜中皮において発がんに関連する病変とすると考えられた。

長さの異なる DWCNT については、今までの報告で 0.7micro-m の MWCNT の腹腔内投与では発がん性はみられなかったこと (Muller, 2009) から、二つのことが明らかとなる。一つは長さ、さらに投与された本数と発がんの関係が明らかとなる。104 週の結果が待たれる。

#### 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。POT には胸膜中皮において過形成病変を誘導し、これが発癌性と関連していると考えられる。また、DWCNT について、長さとともに投与本数と炎症、発がんの関係が明らかとなる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Liao D., Wang Q., Alexander D., Abdelgied M., Elgazzar AM., Futakuchi M., Suzui, M., Kannno J., Hirose A., Xu J., Tsuda H. Persistent Pleural Lesions and Inflammation by Pulmonary Exposure of Multiwalled Carbon Nanotubes, Chem. Res. Toxicol., 15:31(10):1025-1031. 2018.
- 2) Elgazzar AM., Abdelgied M., Alexander D., Alexaander W., Numano T., Iigo M., Naiki A., Takahashi S., Takase H., Hirose A., Kanno J., Elokke OM., Nasem AM., Tsuda H. Comparative pulmonary toxicity of a DWCNT and MWCNT-7 in rats, Arch. Toxicol., 93: 43-59, 2019
- 3) Abdelgied M., Elgazzar AM., Alexander

D., Alexander W., Numano T., Iigo M., Naiki-Ito A., Takase H., Abdou KB., Hirose A., Taquahashi Y., Kanno J., Tsuda H. Potassium octatitanate fibers induce persistent lung and pleural injury and are possibly carcinogenic in male Fischer 344 rats, *Cancer Sci.*, 109(7):2164-2177. 2018

- 4) Abdelgied M., Elgazzar AM., Alexander D., Alexander W., Numano T., Iigo M., Naiki-Ito A., Takase H., Abdou KB., Hirose A., Taquahashi Y., Kanno J., Abdelhamid M., Tsuda H., Takahashi S. Pulmonary and pleural toxicity of potassium octatitanate fibers, rutile titanium dioxide nanoparticles, and MWCNT-7 in male Fischer 344 rats, *Arch. Toxicol.*, <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02410-z>, Feb. 2019

## 2. 学会発表

1. 津田洋幸, 徐結苟, Alexander WT., Alexander DB., Abdelgied M., Elgazzar A., 沼野琢旬, 広瀬昭彦, 菅野純 ナノマテリアルの気管支内投与による毒性と発がん性の簡易検出システムの開発 第45回日本毒性学会学術年会 大阪2018年7月
2. 津田洋幸, 徐結苟, Alexander WT., Alexander DB., Abdelgied M., Elgazzar A., 沼野琢旬, 広瀬昭彦, 菅野純 ナノマテリアル特にカーボンナノチューブによる肺・胸膜中皮障害と発がん性の経気管肺内噴霧投与 (TIPS) 試験法の開発 第45回日本毒性学会学術年会 大阪2018年7月
3. Abdelgied M., Elgazzar AM., Alexander D., Alexander W., Numano T., Iigo M.,

Naiki-Ito A., Abdelhamed M., Takase H., Hirose A., Taquahashi Y., Kanno J., Takahashi S., Tsuda H. Potassium octatitanate fibers are possibly carcinogenic in male Fischer 344 rats. 54<sup>th</sup> congress of the European societies of toxicology (EUROTOX2018) Brussels, Belgium, Sept. 2018

## 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30年度厚生労働科学研究費補助金（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影響の効率的評価手法開発に関する研究」

ナノマテリアル曝露による *in vivo* 遺伝毒性評価系の確立に関する研究

|        |       |                         |
|--------|-------|-------------------------|
| 研究分担者： | 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： | 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： | 横田 理  | 国立医薬品食品衛生研究所毒性部 主任研究官   |
| 研究協力者： | 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。我々はこれまでに、マウス肺を標的とする *in vivo-in vitro* 法を用いた小核試験法の確立を試み、それを用いて CNT 全身吸入曝露下での肺遺伝毒性を評価した。その結果、CNT 全身吸入曝露群ではマウス肺小核試験陽性となることを明らかにしている。他方、曝露方法の違いにより CNT 毒性の発現形態が異なる可能性が指摘されている。そこで、今回我々は投与方法による影響を明らかにするため、CNT 気管内投与下における *in vivo-in vitro* 法を用いた肺小核試験の予備試験を実施した。今回の予備試験では、系統差の有無を併せて調べるため、C57BL および ICR の 2 系統のマウスを用いた。各マウスに CNT を 0.1 mg/匹（50  $\mu$ L/匹）の用量で単回気管内投与した。陰性対照群には 0.05% Tween 80 を含む生理食塩液を用いた。陽性対照物質として ethyl methanesulfonate (EMS) (C57BL 25 mg/kg、ICR 50 mg/kg) を単回腹腔内投与した。その結果、両系統のマウスにおいて CNT 及び EMS いずれの投与群においても、陰性対照群と比較して小核誘発の有意な増加は認められなかった。以上の結果から、単回投与を行う今回の予備試験条件下では、両系統のマウスともに肺小核試験陰性と結論した。

キーワード：ナノマテリアル、遺伝毒性、全身吸入曝露、気管内投与

#### A. 研究目的

ナノ技術の向上により、現在では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 $\mu$ 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。

これまで、我々は肺に行けるCNTの*in vivo*遺伝毒性評価のために、マウス肺小核試験系の開発を試みている。この試験系の特徴は*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*で細胞分裂を惹起させることにより、小核を含む分裂細胞を効率よく得ることができる。これまでの研究から、陽性対照を用いた試験によりマウス肺小核試験系の技術基盤を整備し、それを用いてCNT全身吸入暴露によって誘導される遺伝毒性評価を実施した。その結果、CNT全身吸入暴露群ではマウス肺小核試験陽性

となることを明らかにした。他方、CNTの暴露方法の違いにより毒性の発現形態が異なる可能性が指摘されている。そこで、今回我々は投与方法による影響を明らかにするため、CNT気管内投与下における*in vivo-in vitro*法を用いた肺小核予備試験を実施した。

## 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<sup>\*)</sup>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。Ethylmethanesulfonate(EMS, Sigma-Aldrich Corporation, lot#: BCBS6100V)を陽性対照に使用した。また、0.05% Tween 80を含む生理食塩液を気管内投与の陰性対照とした。

\*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、日本チャールス・リバー株式会社より7週齢の雄性Cr1:CD1(ICR)マウスをそれぞれ購入して試験に用いた。両系統とも各群3匹とし、陰性対照群、陽性対照群およびCNT暴露群の合計18匹を使用した。馴化期間は動物入荷後1週間とし、C57BL/6NCrSlc(SPF)マウスは12週齢、Cr1:CD1(ICR)マウスは8週齢の動物を試験に使用した。

### (3) 投与

① CNTおよび陰性対照: CNT 3.4 mgをガラス瓶に秤量し、0.05% Tween 80を含む生理食塩液を1.7 mL加えて超音波処理し、よ

く分散させ、2 µg/µL (2 mg/mL) 投与液を調製した。イソフルラン麻酔下でマウス気管内投与用チューブを気管内に挿入し、1 mL のディスポーザブルシリンジを使用して 50 µL/匹 (0.1 mg/匹) となるように投与液を気管内に噴射投与した。陰性対照群には 0.05% Tween 80 を含む生理食塩液を 50 µL/匹となるように気管内に噴射投与した。なお、CNT の用量設定は Kato らが野生型 ICR マウスに CNT を単回気管内注入し、肺組織のコメットアッセイで陽性結果を示した用量 (0.05-0.2 mg/匹) を参考に設定した。

② EMS：生理食塩液 (日本薬局方、株式会社大塚製薬工場) に溶解して、C57BL/6NCrSlc には 2.5 mg/mL 投与液を調製し、25 mg/kg の投与用量で腹腔内投与した。Cr1:CD1(ICR) マウスには、5 mg/mL 投与液を調製し、50 mg/kg の投与用量で腹腔内投与した。腹腔内投与は、二段針を装着した 1 mL のディスポーザブルシリンジを使用した。

#### (4) 細胞分離培養および標本作製

投与後 5 日目に、Lindberg らの方法を参考に下記の方法で肺細胞 (Clara 細胞及び AT-II 細胞と推定される細胞) を分離した。

- i. マウスを麻酔下で放血して安楽死させた。
- ii. 生理食塩液で気管・肺内を洗浄した後、0.25% トリプシン液で満たした。
- 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. 牛胎仔血清と 250 µg/mL DNaseI を含む液を加えて、37°C 温浴中で 10 分間処理した。
- v. ガーゼとセルストレーナーでろ過した後、1500×g で 10 分間遠心分離して肺細胞 (沈査) を回収した。

vi. Percoll の密度勾配 (密度 : 1.089 及び 1.040 g/cm<sup>3</sup>) により遠心分離 (2000×g、常温、25 分間) 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、酢酸-エタノール (1:3) 固定液で細胞を固定してスライド標本を作製した。

#### (ア) 標本染色および標本観察

- i. 上記で作製したスライド標本をアクリジンオレンジ (AO、500 µg/mL) -4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI、10 µg/mL) 混合液で染色して、蛍光顕微鏡下 (U 励起) で観察した。
- ii. C57BL/6NCrSlc マウスでは 2000 個/匹、Cr1:CD1(ICR) マウスでは 3600~4000 個/匹の肺細胞をそれぞれ数え、小核を有する細胞の誘発率を算出した。

#### (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、各系統における陰性対照群と CNT 投与群、ならびに陰性対照群と 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。

#### (倫理面への配慮)

動物を用いた実験は、所属機関における「動物実験の適正な実施に関する規定」、わが国における「動物の保護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼育及び保管等に関する基準」ならびに厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針に準拠して行った。加えて、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を配慮の上で実施した。

#### C. 研究結果および考察

一般状態及び体重についての結果をエ  
ラー! 参照元が見つかりません。に示した。  
C57BL/6NcrSlc マウスの陰性対照群で 1 例  
及び CNT 群で 1 例が気管内投与直後に死亡  
した。これらは気管内投与により気道が閉  
塞されたことによる死亡と考えられた。陰  
性対照群の 1 死亡例については余剰動物を  
充当したが、CNT 群の 1 死亡例については  
欠損となった。死亡動物以外は、観察期間  
中に異常所見は認められなかった。体重に  
ついては、C57BL/6NcrSlc マウス及び  
Cr1:CD1(ICR)マウスともに投与当日から標  
本作製(細胞回収)当日にかけて、僅かな  
体重変動はみられたが著変は認められな  
かった。

C57BL/6NcrSlc マウスでの小核をもつ肺  
細胞の出現頻度の結果を Table 2 に、  
Cr1:CD1(ICR)マウスでの結果を Table 3 に  
示した。C57BL/6NcrSlc マウスでは、陰性  
対照群の平均値は  $0.067 \pm 0.029\%$ 、CNT 投  
与群及び EMS 投与群ではそれぞれ  $0.100 \pm$   
 $0.000\%$ 及び  $0.100 \pm 0.050\%$ であり、CNT 投  
与群及び EMS 投与群は陰性対照群と比較し  
て有意な小核誘発率の増加は認められな  
かった(Table 2)。また、いずれの個体の値も  
 $0.150\%$ 以下であった。同様に Cr1:CD1(ICR)  
マウスでは、陰性対照群、CNT 投与群及び  
EMS 投与群の平均値はそれぞれ  $0.058 \pm$   
 $0.014\%$ 、 $0.077 \pm 0.023\%$ 及び  $0.092 \pm$   
 $0.014\%$ であり、CNT 投与群及び EMS 投与群  
ともに陰性対照群と比較して有意な小核誘  
発率の増加は認められなかった(Table 3)。  
また、いずれの個体の値も  $0.100\%$ 以下であ  
った。以上の結果から、今回の予備試験条  
件下では CNT 及び EMS ともに肺細胞におい  
て有意な小核誘発は認められず、肺小核試  
験は陰性と判定された。なお、C57BL/6NcrSl  
c マウスでは回収できる肺細胞数が少なく、  
肺細胞の観察数は 2000 個/匹を対象とし  
たが、Cr1:CD1(ICR)マウスではいずれの動物

でも 3500 個/匹を越える細胞を観察するこ  
とができた。これは両系統の標本を比較し  
た場合に Cr1:CD1(ICR)マウスから作製した  
標本の状態がやや良好であったことに起因  
すると考えられた。

#### D. 結論

CNT をマウスに気管内投与して、*in vivo-in vitro* 法による肺における小核誘  
発性を調べるための基礎的検討を実施した。  
また、マウスの本検討における系統差の有  
無を調べるため、C57BL/6NcrSlc マウスと  
Cr1:CD1(ICR) マウスの 2 つの系統を用い  
た。雄性 C57BL/6NcrSlc マウス(投与時 12  
週齢)及び雄性 Cr1:CD1(ICR) マウス(投  
与時 8 週齢)に、CNT を  $0.1 \text{ mg/匹}$  ( $50 \mu\text{L/}$   
 $\text{匹}$ )の用量で 1 回気管内投与した。陰性対  
照群には各系統に Tween 80 を  $0.05\%$ の濃度  
で含む生理食塩液を  $50 \mu\text{L/匹}$ で同様に気管  
内投与した。また、陽性対照物質として EMS  
の  $25 \text{ mg/kg}$  を C57BL/6NcrSlc マウスに 1 回  
腹腔内投与し、Cr1:CD1(ICR)マウスには EMS  
の  $50 \text{ mg/kg}$  を 1 回腹腔内投与した。投与後  
5 日目に肺細胞を採取し、48 時間培養した  
後、細胞を固定して各系統について小核を  
もつ細胞の誘発率を調べた。その結果、両  
系統のマウスにおいて CNT 及び EMS いずれ  
の投与群においても、陰性対照群と比較し  
て小核誘発の有意な増加は認められなかつ  
た。以上の結果から、単回気管内投与を行  
う今回の予備試験条件下では、CNT 及び EMS  
とも両系統のマウスにおいて肺小核試験陰  
性と結論した。なお、作製した肺小核用標  
本は、Cr1:CD1(ICR)マウスから得られたも  
の方が C57BL/6NcrSlc マウスから得られ  
たものと比較して観察対象細胞が多く得ら  
れ、標本の状態がやや良好であった。この  
ことから今回の予備試験条件下で作製され  
た標本の状態には系統差があることが示唆  
された。

## E. 健康危機情報

特になし

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Chikura S, Kimoto T, Itoh S, Sanada H, Muto S, Horibata K: Standard protocol for the total red blood cell *Pig-a* assay used in the interlaboratory trial organized by the Mammalian Mutagenicity Study Group of the Japanese Environmental Mutagen Society. *Genes Environ.* 41:5 (2019)

### 2. 学会発表

堀端克良: *Pig-a*/*PIG-A*遺伝子変異試験によるヒトを含めた*in vivo*遺伝毒性モニタリング. 平成30年度日本環境変異原学会公開シンポジウム. 東京 (2018.6)

堀端克良: *Pig-a*試験. 日本環境変異原学会MMS研究会第72回定例会. 静岡 (2018.6)

堀端克良: *Pig-a*アッセイ. 日本環境変異原学会MMS研究会第73回定例会. 京都 (2018.10)

堀端克良: *Pig-a*アッセイの標準化に関する研究:バリデーション研究の推進とヒトへの適用. 日本環境変異原学会第47回大会. 京都 (2018.11)

## G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

該当なし

**Table 1: 一般状態及び体重**

| Strain        | Treatment group               | Dose level<br>Route<br>Frequency | Animal number       | Initial body weight (g) <sup>a)</sup> |                         | Clinical signs |                            |       |       |       |       |       | Final body weight (g) <sup>b)</sup> |                         |
|---------------|-------------------------------|----------------------------------|---------------------|---------------------------------------|-------------------------|----------------|----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------------------------------|-------------------------|
|               |                               |                                  |                     | Individual                            | Group mean<br>Mean ± SD | Day 1          |                            | Day 2 | Day 3 | Day 4 | Day 5 | Day 6 | Individual                          | Group mean<br>Mean ± SD |
|               |                               |                                  |                     |                                       |                         | Pre-dose       | Post <sup>c)</sup><br>dose |       |       |       |       |       |                                     |                         |
| C57BL/6NgrSlc | Negative control<br>(Vehicle) | 50 µL/head<br>i.t.<br>Once       | 10101               | 27.75                                 | 24.98                   | -              | -                          | -     | -     | -     | -     | -     | 27.30                               | 25.27                   |
|               |                               |                                  | 10102 <sup>d)</sup> | 23.03                                 | ±                       | -              | -                          | -     | -     | -     | -     | -     | 24.36                               | ±                       |
|               |                               |                                  | 10103               | 24.15                                 | 2.47                    | -              | -                          | -     | -     | -     | -     | -     | 24.15                               | 1.76                    |
|               | Test article<br>(CNT)         | 0.1 mg/head<br>i.t.<br>Once      | 10201               | 27.32                                 | 25.59                   | -              | -                          | -     | -     | -     | -     | -     | 26.15                               | 25.37                   |
|               |                               |                                  | 10202               | 23.80                                 | ±                       | -              | -                          | -     | -     | -     | -     | -     | 24.59                               | ±                       |
|               |                               |                                  | 10203               | 25.65                                 | 1.76                    | -              | Died                       | NA    | NA    | NA    | NA    | NA    | NA                                  | 1.10                    |
|               | Positive control<br>(EMS)     | 25 mg/kg<br>i.p.<br>Once         | 10301               | 27.14                                 | 25.60                   | -              | -                          | -     | -     | -     | -     | -     | 27.26                               | 25.56                   |
|               |                               |                                  | 10302               | 25.89                                 | ±                       | -              | -                          | -     | -     | -     | -     | -     | 25.57                               | ±                       |
|               |                               |                                  | 10303               | 23.78                                 | 1.70                    | -              | -                          | -     | -     | -     | -     | -     | 23.84                               | 1.71                    |
| CHCD1(ICR)    | Negative control<br>(Vehicle) | 50 µL/head<br>i.t.<br>Once       | 20101               | 42.11                                 | 38.69                   | -              | -                          | -     | -     | -     | -     | -     | 43.52                               | 40.46                   |
|               |                               |                                  | 20102               | 36.52                                 | ±                       | -              | -                          | -     | -     | -     | -     | -     | 38.97                               | ±                       |
|               |                               |                                  | 20103               | 37.45                                 | 3.00                    | -              | -                          | -     | -     | -     | -     | -     | 38.89                               | 2.65                    |
|               | Test article<br>(CNT)         | 0.1 mg/head<br>i.t.<br>Once      | 20201               | 39.61                                 | 38.76                   | -              | -                          | -     | -     | -     | -     | -     | 40.46                               | 38.98                   |
|               |                               |                                  | 20202               | 38.74                                 | ±                       | -              | -                          | -     | -     | -     | -     | -     | 38.63                               | ±                       |
|               |                               |                                  | 20203               | 37.92                                 | 0.85                    | -              | -                          | -     | -     | -     | -     | -     | 37.86                               | 1.34                    |
|               | Positive control<br>(EMS)     | 50 mg/kg<br>i.p.<br>Once         | 20301               | 35.87                                 | 36.11                   | -              | -                          | -     | -     | -     | -     | -     | 39.65                               | 38.59                   |
|               |                               |                                  | 20302               | 37.03                                 | ±                       | -              | -                          | -     | -     | -     | -     | -     | 38.84                               | ±                       |
|               |                               |                                  | 20303               | 35.43                                 | 0.83                    | -              | -                          | -     | -     | -     | -     | -     | 37.28                               | 1.20                    |

Vehicle: 0.05 w/v% Tween 80 in physiological saline, CNT: Carbon nanotubes, EMS: Ethylmethanesulfonate, NA: Not applicable

<sup>a)</sup> Measured on Day 1

<sup>b)</sup> Measured on Day 6

<sup>c)</sup> Observed intermittently for 1 h

<sup>d)</sup> This animal was replaced with a surplus one since the original one died after dosing. The body weight of the original animal was 24.26 g.

**Table 2: C57BL/6NcrSlc マウスにおける小核試験結果**

| Treatment group | Dose level (mg/head)<br>Route<br>Frequency     | Animal number | Number of cells scored | Number of micronucleated (MN) cells | Incidence of MN cells (%) |
|-----------------|--|---------------|------------------------|-------------------------------------|---------------------------|
| Vehicle         | 0 (50 µL/head)<br>i.t.<br>Once <sup>a)</sup>   | 10101         | 2000                   | 2                                   | 0.100                     |
|                 |  | 10102         | 2000                   | 1                                   | 0.050                     |
|                 |  | 10103         | 2000                   | 1                                   | 0.050                     |
|                 | Total / Mean ± S.D.                            |               | 6000                   | 4                                   | 0.067 ± 0.029             |
| CNT             | 0.1 (50 µL/head)<br>i.t.<br>Once <sup>a)</sup> | 10201         | 2000                   | 2                                   | 0.100                     |
|                 |  | 10202         | 2000                   | 2                                   | 0.100                     |
|                 |  | NA            | -                      | -                                   | -                         |
|                 | Total / Mean ± S.D.                            |               | 4000                   | 4                                   | 0.100 ± 0.000             |
| EMS             | 25 mg/kg<br>i.p.<br>Once <sup>a)</sup>         | 10301         | 2000                   | 1                                   | 0.050                     |
|                 |  | 10302         | 2000                   | 3                                   | 0.150                     |
|                 |  | 10303         | 2000                   | 2                                   | 0.100                     |
|                 | Total / Mean ± S.D.                            |               | 6000                   | 6                                   | 0.100 ± 0.050             |

Vehicle: 0.05 w/v% Tween 80 in physiological saline, CNT: Carbon nanotubes, EMS: Ethyl methanesulfonate

NA: Not applicable

<sup>a)</sup> Single administration 5 days before sampling

**Table 3: Crl:CD1(ICR)マウスにおける小核試験結果**

| Treatment group | Dose Level (mg/head)<br>Route<br>Frequency     | Animal number | Number of cells scored | Number of micronucleated (MN) cells | Incidence of MN cells (%) |
|-----------------|--|---------------|------------------------|-------------------------------------|---------------------------|
| Vehicle         | 0 (50 µL/head)<br>i.t.<br>Once <sup>a)</sup>   | 20101         | 4000                   | 2                                   | 0.050                     |
|                 |  | 20102         | 4000                   | 3                                   | 0.075                     |
|                 |  | 20103         | 4000                   | 2                                   | 0.050                     |
|                 | Total / Mean ± S.D.                            |               | 12000                  | 7                                   | 0.058 ± 0.014             |
| CNT             | 0.1 (50 µL/head)<br>i.t.<br>Once <sup>a)</sup> | 20201         | 4000                   | 3                                   | 0.075                     |
|                 |  | 20202         | 3658                   | 2                                   | 0.055                     |
|                 |  | 20203         | 4000                   | 4                                   | 0.100                     |
|                 | Total / Mean ± S.D.                            |               | 11658                  | 9                                   | 0.077 ± 0.023             |
| EMS             | 50 mg/kg<br>i.p.<br>Once <sup>a)</sup>         | 20301         | 4000                   | 3                                   | 0.075                     |
|                 |  | 20302         | 4000                   | 4                                   | 0.100                     |
|                 |  | 20303         | 4000                   | 4                                   | 0.100                     |
|                 | Total / Mean ± S.D.                            |               | 12000                  | 11                                  | 0.092 ± 0.014             |

Vehicle: 0.05 w/v% Tween 80 in physiological saline, CNT: Carbon nanotubes, EMS: Ethyl methanesulfonate

NA: Not applicable

<sup>a)</sup> Single administration 5 days before sampling

平成 30 年度 厚生労働科学研究費補助金（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影響の効率的評価手法開発に関する研究

分担研究課題名：ナノマテリアルの免疫系への慢性影響に関する研究

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：新垣理恵子 徳島大学大学院医歯薬学研究部 准教授

研究協力者：牛尾 綾 徳島大学大学院医歯薬学研究部 助教

研究協力者：大塚 邦紘 徳島大学大学院医歯薬学研究部 大学院生

### 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、Taquan 処理された形状や性状の異なるナノマテリアルの曝露における免疫制御システムへの影響評価について、*in vivo* での解析を中心に実施した。Taquan 処理された長さの異なる二層化カーボンナノチューブ（T-DWCNT）の腹腔投与による各免疫担当細胞分画の変化を観察するとともに Taquan 処理されたカーボンナノチューブ（T-CNT）およびチタン酸カリウム（Ti）の腹腔内投与によって腹腔滲出細胞における Reactive oxygen species (ROS) 関連遺伝子に関して網羅的に解析した。T-DWCNT の長さによって腹腔内のマクロファージの活性化や機能に違いがある可能性が示された。T-CNT 投与では、Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (Ptgs2)、Myeloperoxidase (Mpo)、IL-19 遺伝子などの発現が上昇していた。また、Ti 投与では Mpo、Albumin、Recombination activating gene 2、Ptgs2 遺伝子などの発現が上昇していた。T-CNT と Ti 投与の比較では Ti 投与によって Flavin containing monooxygenase 2 遺伝子の発現が優位に上昇していた。以上のことから、ナノマテリアルの形状や種類によって腹腔マクロファージの ROS を介した活性化機構が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。ナノマテリアルの暴露による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、ナノマテリアルの暴露による免疫システムへの影響の評価系を確立することならびにナノマテリアル暴露による詳細な免疫反応に関して、マクロファージに焦点を当てて検討を進めた。

今年度は長さの異なるT-DWCNTの腹腔投与による各免疫担当細胞分画の変化を観察するとともに、T-CNTとTiの腹腔内曝露によるPECのROS関連遺伝子の発現に関して検討を加えた。

## B. 方法

### マウス

9週齢の雌 C57BL/6 (B6)マウス（を用い、DWCNT (78本) の1  $\mu\text{m}$  投与群 (6匹)、7  $\mu\text{m}$  投与群 (5匹)、15  $\mu\text{m}$  投与群 (5匹) 及び対照群 (5匹) を準備した。腹腔投与から5週後に屠殺、解析を実施した。また、8週齢の雌 B6 マウス (各群3匹) を用い、T-CNT、Tiをそれぞれ10  $\mu\text{g}$ /マウスで腹腔内投与後、6時間にて解析を実施した。

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、DWCNT、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DWCNT (1  $\mu\text{m}$ 、7  $\mu\text{m}$ 、15  $\mu\text{m}$ )、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 (Ti) 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、いずれも腹腔内に注射された。

### 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。

また、PECの遺伝子発現に関して、マウスの腹腔内を5mlのPBSで洗浄し、採取した滲出細胞からRNA抽出キット

を用いて Total RNA を抽出した。

#### 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、CD19、CD11b、F4/80、CD206、CD192、CD36、CD204、CD4、CD8、CD44、CD25) 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。

#### PCR アレイ

Oxidative Stress RT2 Profiler PCR Array (QIAGEN)を用いて下記の遺伝子発現について解析した。

#### **(1)Antioxidants**

##### **a. Glutathione Peroxidases**

(GPx): Gpx1, Gpx2, Gpx3, Gpx4, Gpx5, Gpx6, Gpx7, Gstk1, Gstp1.

##### **b. Peroxiredoxins**

(TPx): Ehd2, Prdx1, Prdx2, Prdx3, Prdx4, Prdx5, Prdx6 (Aop2)

##### **c. Other Antioxidants**

Alb, Gsr, Sod1, Sod3, Srxn1, Txnrd1, Txnrd2, Txnrd3

#### **(2) Reactive Oxygen Species (ROS)**

##### **Metabolism**

**a. Superoxide Dismutases (SOD):** Sod1, Sod2, Sod3

##### **b. Other Superoxide Metabolism**

**Genes:** Ccs, Cyba, Ncf1, Ncf2, Nos2 (iNOS

), Nox1, Nox4, Noxa1, Noxo1, Recql4, Scd1, Ucp2

##### **c. Other Reactive Oxygen Species (ROS)**

**Metabolism Genes:** Aox1, Fmo2, Il19, Il22

##### **d. Oxidative Stress Responsive**

**Genes:** Als2, Apoe, Cat, Ccl5 (RANTES), Ctsb, Duox1, Epx, Ercc2 (XPD), Ercc6, Fth1, Gclc, Gclm, Gpx1, Gpx2, Gpx3, Gpx4, Gpx5, Gpx6, Gpx7, Gsr, Gss, Hmox1, Hspa1a(hsp70A1), Idh1, Krt1, Mpo, Nqo1, Park7, Prdx1, Prdx2, Prdx6 (Aop2), Prnp, Psmb5, Sod1, Sqstm1, Tpo, Txn1, Txnip, Txnrd1, Txnrd2, Ucp3, Xpa.

#### **(3) Oxygen Transporters**

Atr, Cygb, Dnm2, Fance, Ift172, Mb, Ngb, Slc38a1, Vim.

各群 3 匹の平均値を用いて遺伝子発現の比較を行った。

#### **C. 研究結果**

長さの異なる2層化カーボンナノチューブ (1、7、15 $\mu$ m : 本数 : 78本) を正常雌B6マウス (9週齢) に腹腔内投与し、5週後に解析した (図1A)。腹腔内の肉眼的所見として、15 $\mu$ m投与群の中に肝臓の表面あるいは腹膜表層に黒色の集積物が観察された (図1B)。腹腔内の洗浄液を遠心後、15 $\mu$ m投与群では黒色の沈殿物が肉眼的に観察された (図1C)。さらに、組織学的に検討したところ、腹膜表層部に黒色線維の集積物周囲に多核異物巨細胞の出現を伴う肉芽が確認された (図

1D)。PEC中のF4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>マクロファージは割合、細胞数共に対照群と比較して大きな変化は認められなかった(図2)。また、腹腔内マクロファージのM1(CD192)あるいはM2(CD206)マーカーを検討すると、DWCNT投与群と対照群で有意な変化は見られなかったが、1 $\mu$ m投与群でCD206の発現が高い傾向にあった(図2)。加えて、スカベンジャー受容体に関して検討したところ、7 $\mu$ m投与群でCD36の発現が有意に上昇していた(図2)。

正常B6雌マウス(8週齢)に、T-CNT、Tiおよび生理食塩水(対照群)を腹腔内投与6時間後、屠殺、解析を実施した(図3)。

T-CNT投与群と対照群との比較では、Ptgs2, Mpo, Il19, Ngb, Nqo1, Cygbの遺伝子発現が有意に上昇していた(図3)。また、Ti投与群と対照群との比較では、Mpo, Alb, Rag2, Ptgs2, Ngb, Il22, Cygb, Noxa1, Nqo1の遺伝子発現が有意に上昇していた(図4)。さらに、T-CNT投与群とTi投与群の遺伝子発現を比較すると、Ti投与群で遺伝子発現が強くなっているものが多く、Fmo2, Alb, Rag2, Duox1, Ucp3, Nox1, Recql4, Mpoなどの遺伝子があげられる(図5)。T-CNT投与群で発現上昇していた遺伝子はPtgs2, Il19であった(図5)。

#### D. 考察

本研究では、ナノマテリアルの曝露に

よる免疫担当細胞への影響を検討する上で、腹腔への投与によって、体内の限られた曝露空間のモデルが用いられた。腹腔内滲出細胞としてマクロファージをはじめ好中球やリンパ球なども含まれている。本研究で実施された長さの異なるDWCNTの腹腔内投与では、スカベンジャー受容体のひとつであるCD36の発現が7 $\mu$ mの長径のT-DWCNT投与で上昇していたことから、ナノマテリアルの大きさ、形状によってマクロファージの活性化に大きな違いが生じることが示された。

また、本研究で検討を行ったサンプルは様々な細胞分画を含んでおり、遺伝子の変化がどの細胞分画を反映しているのかは不明であるが、ROS関連遺伝子に関してはマクロファージや好中球などの自然免疫に関与する免疫担当細胞で変動が大きいことがすでに知られているとともに、ナノマテリアルの曝露ではマクロファージや好中球が多く腹腔内に遊走されることが知られているので、今回の実験でも主に腹腔内のマクロファージや好中球における遺伝子変化が反映されているものと推測される。

T-CNT投与群と対照群との比較では、Ptgs2, Mpo, Il19, Ngb, Nqo1, Cygbの遺伝子発現が有意に上昇していたが、Ptgs2はCox2シクロオキシナーゼとして知られており、プロスタグランジンE2の誘導を介して免疫細胞の活性化に作用している。Mpoは主に好中球から分泌され

る酵素で、過酸化水素と塩素イオンから次亜塩素酸を産生することによって異物処理に働くことが知られている。また、IL-19 に関しては、IL-20 受容体と結合することによって、STAT3 のリン酸化を介した転写制御の亢進が報告されている。Ngb は細胞活性化でのシグナル伝達に重要である。Nqo1 は NADPH キノン還元酵素で異物の代謝酵素群の一つである。Cygb は酸素や一酸化窒素などと結合し、カルシウム依存性 NADPH オキシダーゼとして働く。T-CNT の曝露によってマクロファージあるいは好中球のこれらの遺伝子群の発現が上昇することで、生体内での免疫反応のきっかけになる可能性を有している。

Ti 投与では Mpo, Alb, Rag2, Ptgs2, Ngb, Il22, Cygb, Noxa1, Nqo1 などの遺伝子群の発現上昇が確認されたが、T-CNT で共通の遺伝子として、Mpo, Ptgs2, Ngb, Cygb, Nqo1 があげられる。Alb が上昇していることがマクロファージや好中球のエネルギー代謝に影響している可能性が考えられた。Rag2, IL-22, Noxa1 の発現上昇も Ti 曝露による ROS 経路の活性化に重要であると考えられる。

T-CNT と Ti 投与群の比較では Ti 投与群で大幅に遺伝子発現が偏っていたのは Fmo2 と Alb 遺伝子であった。Alb 遺伝子の上昇は T-CNT 曝露よりも Ti 曝露の方がエネルギー代謝に影響を与えている可能性が考えられた。また、Fmo2 はフラビン含有モノオキシゲナーゼで

NADPH 依存的に含窒素、硫黄、リン酸化合物の酸化を触媒することが知られており、細胞のエネルギー代謝に関与している。

今回の実験では腹腔内に限定されたナノマテリアルに対する免疫反応を観察したが、今後は呼吸器でのナノマテリアルの曝露による免疫担当細胞のスカベンジャー受容体あるいは ROS を介した反応を検討する予定である。

## E. 結論

- 1 長さの異なるDWCNTの腹腔内投与によって、長さの違いによってマクロファージにおけるスカベンジャー受容体の発現が異なっていた。
- 2 C-CNTあるいはTiの腹腔内曝露によって免疫担当細胞のROS関連遺伝子の中で共通の遺伝子の変化とともに異なった遺伝子変化が認められた。
- 3 異なったナノマテリアルの曝露によって好中球やマクロファージのROSを介した多様な免疫反応が生じる可能性が示された。
- 4 ナノマテリアルの生体内での曝露はその性状および形状によってマクロファージを主体とした自然免疫反応が大きく影響を受けることが示された。

## F.健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

(1) Nakatomi C, Nakatomi M, Matsubara T, Komori T, Doi-Inoue T, Ishimaru N, Weih F, Iwamoto T, Matsuda M, Kokabu S, Jimi E. Constitutive activation of the alternative NF- $\kappa$ B pathway disturbs endochondral ossification. *Bone*. 2019 Apr;121:29-41 doi: 10.5152/eurjrh.2019.18137.

(2) Ushio A, Arakaki R, Otsuka K, Yamada A, Tsunematsu T, Kudo Y, Aota K, Azuma M, Ishimaru N. CCL22-Producing Resident Macrophages Enhance T Cell response in Sjögren's syndrome. *Front Immunol* 9:2594, 2018 doi: 10.3389/fimmu.2018.02594.

(3) Otsuka K, Yamada K, Taquahashi Y, Arakaki R, Ushio A, Yamada A, Tsunematsu T, Kudo Y, Ishimaru N. Long-term polarization of alveolar macrophages to a profibrotic phenotype after inhalation exposure to multi-wall carbon nanotubes. *PLoS One* 13(10):e0205702, 2018 doi: 10.1371/journal.pone.0205702

(4) Aota K, Yamanoi T, Kani K, Nakashiro KI, Ishimaru N, Azuma M. Inverse correlation between the number of CXCR3+ macrophages and the severity of inflammatory lesion in Sjögren's syndrome salivary glands: A pilot study. *J Oral Pathol Med* 47(7):710-718, 2018 doi: 10.1111/jop.12756

(5) Siriwardena SBSM, Tsunematsu T, Qi G, Ishimaru N, Kudo Y. Invasion-related

factors as potential diagnostic and therapeutic targets in oral squamous cell carcinoma. *Int J Mol Sci* 19(5):E1462, 2018 doi: 10.3390/ijms19051462

(6) Aota K, Kani K, Yamanoi T, Nakashiro KI, Ishimaru N, Azuma M. Distinct Regulation of CXCL10 Production by Cytokines in Human Salivary Gland Ductal and Acinar Cells. *Inflammation*. 2018 Aug;41(4):1172-1181. doi:10.1007/s10753-018-0764-0.

(7) 石丸直澄、林良夫：口唇腺生検病理診断 シェーグレン症候群の診断と治療マニュアル 改訂第3版(2018年) 70-75 ISBN978-4-7878-2369-4

(8) 石丸直澄：膠原病の病理—今日的視点から—唾液腺病変 病理と臨床 36(6), 580-585, 2018

(9) 牛尾綾、大塚邦紘、新垣理恵子、工藤保誠、石丸直澄：シェーグレン症候群研究の最前線 細胞 50(10), 528-531, 2018

(10) 石丸直澄、山田安希子：シェーグレン症候群における制御性 T 細胞 医学のあゆみ Vol.268, No.13 1241-1245, 2019

### 2. 学会発表

(1) Naozumi Ishimaru, Mie Kurosawa, Rieko Arakaki, Aya Ushio, Kunihiro Otsuka, Yasusei Kudo: Contributions of CXCL12 and its receptor to the T cell autoimmune response in a Sjögren's syndrome murine model. 14th International

- Sjogren's Syndrome Symposium,  
Washington DC, April 18-21, 2018
- (2) Aya Ushio, Rieko Arakaki,  
Kunihiro Otsuka, Akiko Yamada,  
Yasusei Kudo, and Naozumi  
Ishimaru: CCL22-producing  
resident macrophages enhance  
autoimmune lesions in a mouse  
model of Sjögren's syndrome. 11th  
International Congress on  
Autoimmunity, Lisbon, May 16-20,  
2018
- (3) Kunihiro Otsuka, Akiko Yamada,  
Masako Saito, Satoko Kujiraoka,  
Aya Ushio, Takaaki Tsunematsu,  
Rieko Arakaki, Yasusei Kudo,  
Hidehiro Kishimoto, Naozumi  
Ishimaru: Analysis of follicular  
helper T cells in a mouse model for  
Sjögren's syndrome. 11th  
International Congress on  
Autoimmunity, Lisbon, May 16-20,  
2018
- (4) Rieko Arakaki, Mie  
Kurosawa, Akiko Yamada, Aya  
Ushio, Satoko Kujiraoka, Kunihiro  
Otsuka, Takaaki Tsunematsu,  
Yasusei Kudo, Jonathan Sprent,  
and Naozumi Ishimaru. NF- $\kappa$ B2  
Controls the Migratory Activity of  
Memory T Cells to the Target  
Tissues in a Mouse Model of  
Sjögren's Syndrome by Regulating  
Expression of CXCR4. 11th  
International Congress on  
Autoimmunity, Lisbon, May 16-20,  
2018
- (5) 石丸直澄: シェーグレン症候群  
における自己反応性獲得機序の  
解明 第107回日本病理学会総会  
札幌 (ロイトン札幌) 2018.6.23
- (6) 新垣理恵子、牛尾綾、大塚邦紘、  
工藤保誠、石丸直澄 全身吸入  
曝露による多層化カーボンナノ  
チューブの肺胞マクロファージ  
への影響 第107回日本病理学  
会総会 札幌 (ロイトン札幌)  
2018.6.23
- (7) 中山慎一郎、新垣理恵子、牛尾  
綾、大塚邦紘、常松貴明、工藤  
保誠、石丸直澄 シェーグレン  
症候群モデルマウス唾液腺にお  
けるIL-33の発現とその役割 第  
107回日本病理学会総会 札幌  
(ロイトン札幌) 2018.6.23
- (8) 牛尾綾、新垣理恵子、大塚邦紘、  
山田安希子、工藤保誠、石丸直  
澄 CCL22産生唾液腺マクロフ  
ァージはシェーグレン症候群の  
病態形成に関与する 第107回  
日本病理学会総会 札幌 (ロイ  
トン札幌) 2018.6.21
- (9) 大塚邦紘、山田安希子、齋藤雅  
子、牛尾綾、常松貴明、工藤保  
誠、新垣理恵子、石丸直澄 シ  
ェーグレン症候群疾患モデルの

- 自己免疫病変における濾胞ヘルパーT細胞の役割 第107回日本病理学会総会 札幌（ロイトン札幌）2018.6.21
- (10) 沼田雪乃、大塚邦紘、山田安希子、牛尾綾、常松貴明、工藤保誠、新垣理恵子、石丸直澄 シェーグレン症候群モデルにおけるNotchシグナルの役割 第107回日本病理学会総会 札幌（ロイトン札幌）2018.6.23
- (11) 常松貴明、工藤保誠、新垣理恵子、大塚邦紘、牛尾綾、山田安希子、小川博久、常山幸一、石丸直澄 DNAライセンス因子CDT1の新規ユビキチン分解制御機構とその意義の解明 第107回日本病理学会総会 札幌（ロイトン札幌）2018.6.23
- (12) 西條早紀、常松貴明、大塚邦紘、牛尾綾、山田安希子、新垣理恵子、工藤保誠、石丸直澄 Emilの過剰発現による人工口腔癌幹細胞の作成 第107回日本病理学会総会 札幌（ロイトン札幌）2018.6.23
- (13) 梅田将旭、常松貴明、大塚邦紘、牛尾綾、山田安希子、新垣理恵子、工藤保誠、石丸直澄 口腔癌におけるPeriostinスプライシングバリエントの同定とその役割 第107回日本病理学会総会 札幌（ロイトン札幌）2018.6.23
- (14) Tsunematsu T, Ishimaru N, Kudo Y: APC/C-Cdh1-mediated degradation of Borealin triggers differentiation of pluripotent stem cells. FASEB meeting "Ubiquitin and Cellular Regulation" Snowmass Village, CO, USA, June 22, 2018
- (15) 大塚邦紘、山田安希子、牛尾綾、木曾田暁、常松貴明、工藤保誠、新垣理恵子、石丸直澄 シェーグレン症候群疾患モデルの自己免疫病変における濾胞ヘルパーT細胞の役割 第17回四国免疫フォーラム 徳島 2018.6.30
- (16) 大塚邦紘、山田安希子、齋藤雅子、牛尾綾、木曾田暁、常松貴明、工藤保誠、新垣理恵子、石丸直澄 シェーグレン症候群疾患モデルの自己免疫病変における濾胞ヘルパーT細胞の役割 分子病理学研究会37はがくれシンポジウム 佐賀 2018.7.7
- (17) 大塚邦紘、山田安希子、牛尾綾、新垣理恵子、齋藤雅子、木曾田暁、常松貴明、工藤保誠、石丸直澄 Ascl2を介した濾胞ヘルパーT細胞分化異常が自己免疫疾患の病態形成に関与する 先端歯学スクール2018 東京 2018.8.23-24
- (18) 大塚邦紘、山田安希子、齋藤雅子、牛尾綾、木曾田暁、常松貴

- 明、工藤保誠、新垣理恵子、石丸直澄 Ascl2を介した濾胞ヘルパーT細胞分化異常が自己免疫疾患の病態形成に関与する 第29回日本臨床口腔病理学会総会 東京 2018.8.25-26
- (19) 大塚邦紘、山田安希子、齋藤雅子、牛尾綾、木曾田暁、常松貴明、工藤保誠、新垣理恵子、石丸直澄 第60回歯科基礎医学会学術大会 福岡 2018.9.5-7
- (20) 大塚邦紘、山田安希子、齋藤雅子、牛尾綾、木曾田暁、常松貴明、工藤保誠、新垣理恵子、石丸直澄 第27回日本シェーグレン症候群学会 小倉 2018.9.14-15
- (21) 牛尾綾、新垣理恵子、大塚邦紘、山田安希子、工藤保誠、石丸直澄 CCL22産生唾液腺マクロファージはシェーグレン症候群の病態形成に関与する 第27回日本シェーグレン症候群学会 小倉 2018.9.14-15
- (22) Kunihiro Otsuka, Akiko Yamada, Aya Ushio, Rieko Arakaki, Takaaki Tsunematsu, Masako Saito, Yasusei Kudo, Naozumi Ishimaru : Impairment of the differentiation into follicular helper T cell through Ascl2 enhances autoimmune lesions in a mouse model for Sjögren's syndrome. 2018 Tokushima Bioscience Retreat 香川 (リゾートホテルオリビアン小豆島) 2018.9.20-22
- (23) Kunihiro Kunihiro, Akiko Yamada, Masako Saito, Aya Ushio, Takaaki Tsunematsu, Rieko Arakaki, Yasusei Kudo, Naozumi Ishimaru: A crucial role of follicular helper T cells in autoimmunity of a mouse model for Sjögren's syndrome. 第47回日本免疫学会学術集会 福岡 2018.12.10-12
- (24) Aya Ushio, Rieko Arakaki, Kunihiro Otsuka, Akiko Yamada, Yasusei Kudo, and Naozumi Ishimaru: CCL22-producing macrophages promote T cell autoimmunity in the target organ of Sjögren's syndrome. 第47回日本免疫学会学術集会 福岡 2018.12.10-12
- (25) Rieko Arakaki, Shinichiro Nakayama, Aya Ushio, Kunihiro Otsuka, Satoshi Kisoda, Takaaki Tsunematsu, Akiko Yamada, Yasusei Kudo, Naozumi Ishimaru: The role of the cleaved form IL-33 in pathogenesis of Sjögren's syndrome (SS). 第47回日本免疫学会学術集会 福岡 2018.12.10-12
- (26) 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

なし

(27) Ushio A, Arakaki R, Yamada A,  
Otsuka K, Kujiraoka S,  
Tsunematsu T, Kudo Y,  
Ishimaru N: A unique  
macrophage subset of the target  
organ in a murine model of  
Sjögren's syndrome 第106回日  
本病理学会総会 2018年4月28日  
東京

(28) Otsuka K, Yamada A, Saito M, Ushio  
A, Kurosawa M, Kujiraoka S,  
Tsunematsu T, Kudo Y, Arakaki R,  
Ishimaru N: Analysis of follicular  
helper T cells in a mouse model for  
Sjögren's syndrome. 第106回日本  
病理学会総会 2018年4月28日  
東京

## 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

図1 長さの異なるDWCNTの腹腔内投与

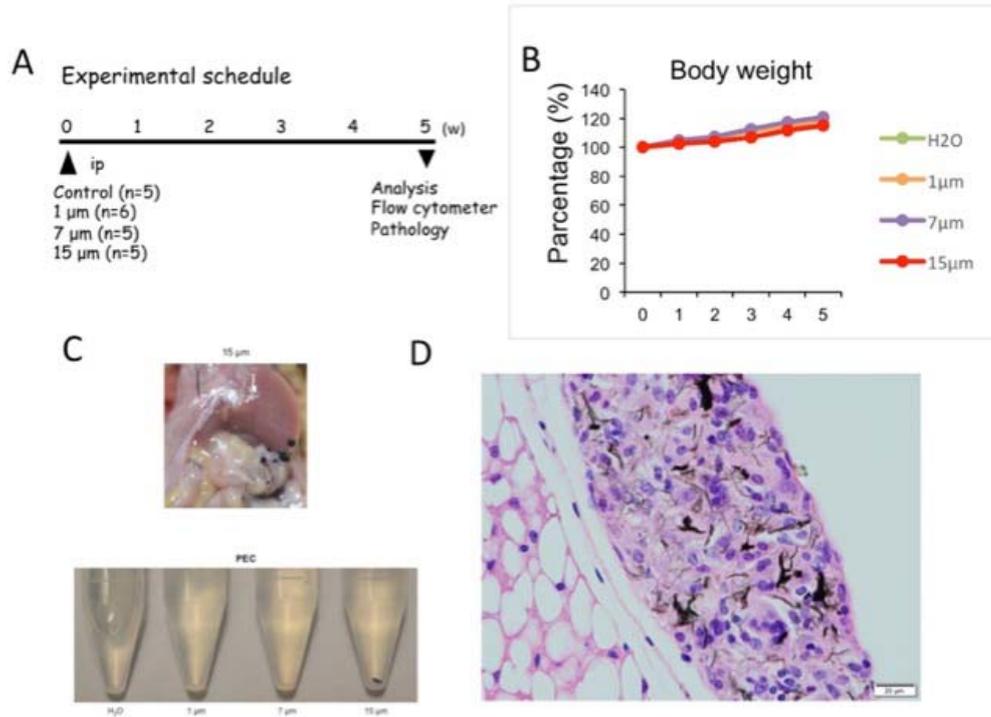
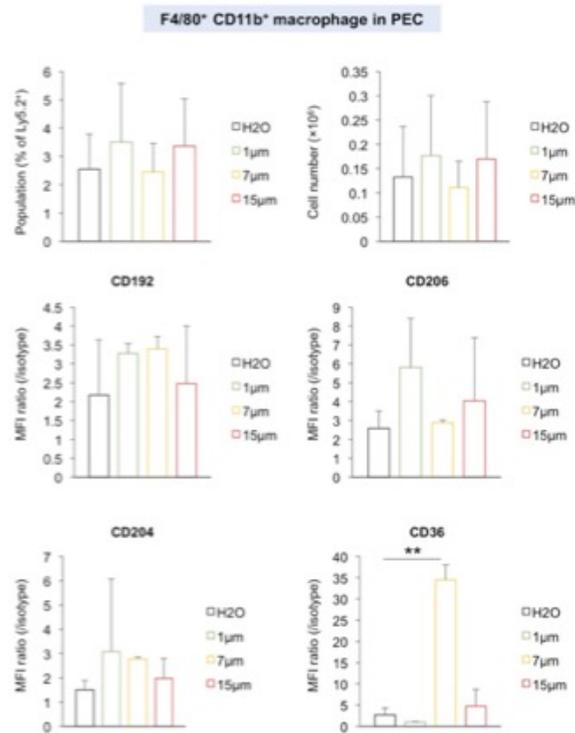


図2 長さの異なるDWCNTの腹腔内投与  
 ～腹腔マクロファージにおけるスカベンジャー受容体の発現～



### 図3 チタン酸カリウム/CNT腹腔内暴露によるPECにおけるROS関連遺伝子の変化

Experimental protocol

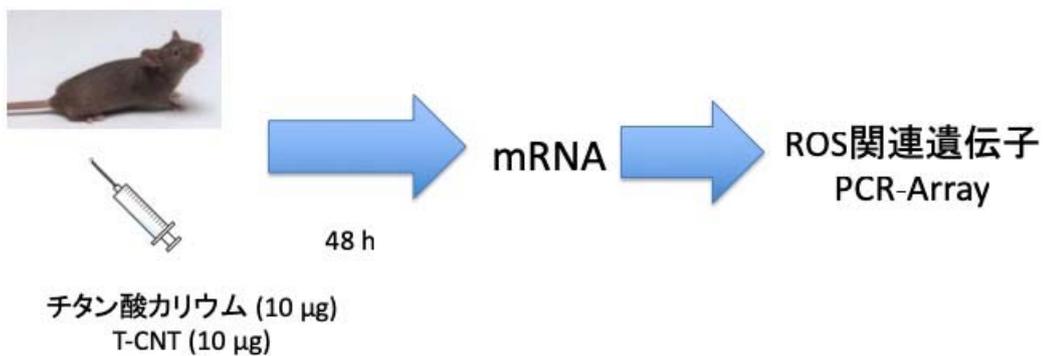
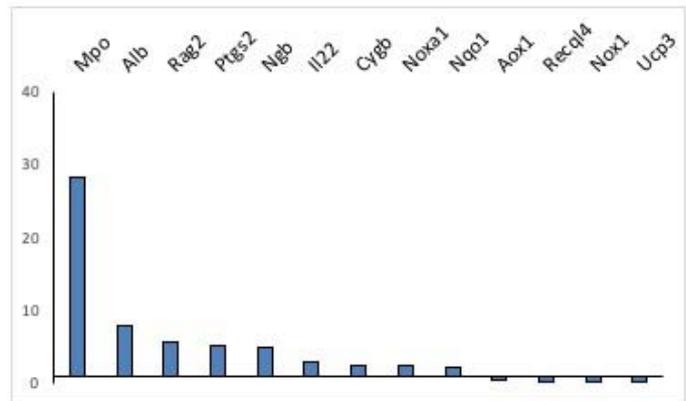
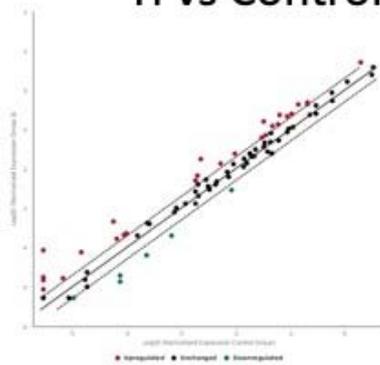


図4

## Ti vs Control



**Alb** Albumin  
**Aox1** Aldehyde oxidase 1  
**Cygb** Cytoglobin  
**Il22** Interleukin 22

**Mpo** Myeloperoxidase  
**Ngb** Neuroglobin  
**Nox1** NADPH oxidase 1  
**Noxa1** NADPH oxidase activator 1

**Nqo1** NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1  
**Ptgs2** Prostaglandin-endoperoxide

**Rag2** recombination activating gene 2  
**Recq4** RecQ protein-like 4  
**Ucp3** Uncoupling protein 3

(mitochondrial, proton carrier)

**アルブミン**  
**アルデヒド酸化酵素**  
**サイトグロビン** 酸素(O<sub>2</sub>)や一酸化窒素 (NO)などと結合

**ミエロペルオキシダーゼ**(好中球に存在する酵素で過酸化水素と塩素イオンから次亜塩素酸を産生する)

**ニューログロビン**(シグナル伝達に関与)  
**NADPHオキシダーゼ**(活性酸素の生成源)

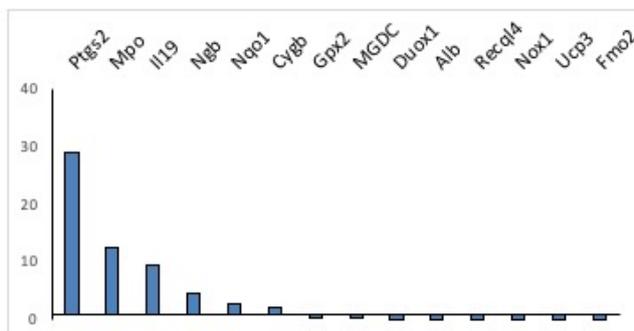
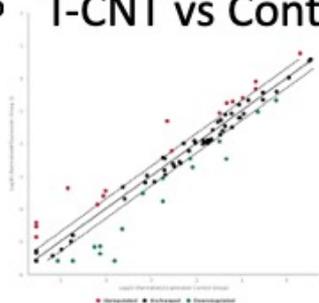
**NAD (P) H キノン還元酵素(NQO1)** . 異物代謝酵素群

**COX2 シクロオキシゲナーゼ**

**Rag-2**  
**DNAの複製・修復に関与するヘリカーゼタンパク**

**ミトコンドリア脱共役蛋白質**

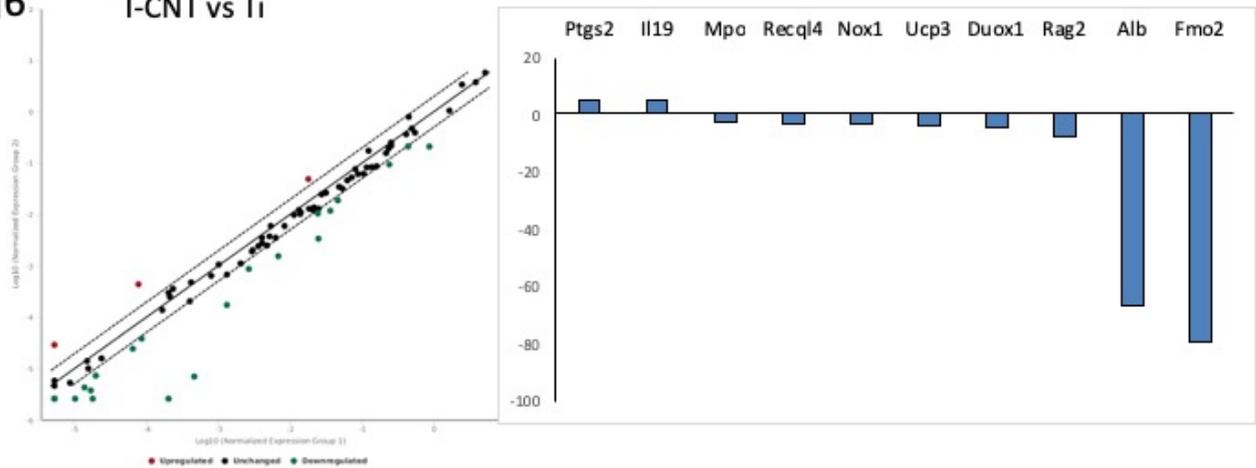
図5 T-CNT vs Control



|        |  |  |
|--------|--|--|
| Alb    | Albumin  | アルブミン  |
| Cygb   | Cytoglobin   | サイトグロビン 酸素(O <sub>2</sub> )や一酸化窒素(NO)などと結合               |
| Duox1  | Dual oxidase 1                                       | カルシウム依存性NADPHオキシダーゼ(甲状腺ホルモンの合成に必要な活性酸素の生成源)              |
| Fmo2   | Flavin containing monooxygenase 2                    | フラビン含有モノオキシゲナーゼ(NADPH依存的に含窒素,硫黄,リン化合物の酸化を触媒する,一原子酸素添加酵素) |
| Gpx2   | Glutathione peroxidase 2                             | グルタチオンペルオキシダーゼ   |
| Il19   | Interleukin 19                                       |  |
| Mpo    | Myeloperoxidase                                      | ミエロペルオキシダーゼ(好中球に存在する酵素で過酸化水素と塩素イオンから次亜塩素酸を産生する)          |
| Ngb    | Neuroglobin  | ニューログロビン(シグナル伝達に関与)                                      |
| Nox1   | NADPH oxidase 1                                      | NADPHオキシダーゼ(活性酸素の生成源)                                    |
| Nqo1   | NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1                     | NAD (P) H キノン還元酵素(NQO1) . 異物代謝酵素群                        |
| Ptgs2  | Prostaglandin-endoperoxide synthase 2                | COX2 シクロオキシゲナーゼ  |
| Recql4 | RecQ protein-like 4                                  | DNAの複製・修復に関与するヘリカーゼタンパク                                  |
| Ucp3   | Uncoupling protein 3 (mitochondrial. proton carrier) | ミトコンドリア脱共役蛋白質  |

図6

T-CNT vs Ti



|        |  |  |
|--------|--|--|
| Alb    | Albumin  | アルブミン  |
| Duox1  | Dual oxidase 1                                       | カルシウム依存性NADPHオキシダーゼ(甲状腺ホルモンの合成に必要な活性酸素の生成源)              |
| Fmo2   | Flavin containing monooxygenase 2                    | フラビン含有モノオキシゲナーゼ(NADPH依存的に含窒素,硫黄,リン化合物の酸化を触媒する,一原子酸素添加酵素) |
| Il19   | Interleukin 19                                       |  |
| Mpo    | Myeloperoxidase                                      | ミエロペルオキシダーゼ(好中球に存在する酵素で過酸化水素と塩素イオンから次亜塩素酸を産生する)          |
| Nox1   | NADPH oxidase 1                                      | NADPHオキシダーゼ(活性酸素の生成源)                                    |
| Ptgs2  | Prostaglandin-endoperoxide synthase 2                | COX2 シクロオキシゲナーゼ  |
| Rag2   | Recombination activating gene 2                      | Rag-2  |
| Recql4 | RecQ protein-like 4                                  | DNAの複製・修復に関与するヘリカーゼタンパク                                  |
| Ucp3   | Uncoupling protein 3 (mitochondrial, proton carrier) | ミトコンドリア脱共役蛋白質  |

平成 30 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影響の効率的評価手法開発に関する  
研究

分担研究課題名：ナノマテリアル曝露による感染性免疫系への影響の効率的な評  
価系の確立に関する研究

研究分担者： 渡辺 渡 九州保健福祉大学保健科学部 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 准教授  
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

ナノマテリアル曝露による感染性免疫系への影響の効率的な評価を検討するた  
め、MWNT-7 の単回の吸入曝露による respiratory syncytial virus (RSV) 感染マウスモ  
デルでの影響評価を、先行研究である MWNT-7 の複数回の経鼻投与試験結果と比較  
した。MWNT-7 を Taquann 法により吸入曝露し 3 日後、RSV をマウスに感染させた。  
MWNT-7 曝露マウスの感染 5 日後では、肺洗浄液中の CCL5 など肺炎マーカーレ  
ベルの上昇は認められなかったが、肺の線維化に関する指標（TGF- $\beta$ ）の有意な上昇  
を見出した。また、肺の病理組織像から、経鼻投与での MWNT-7 の凝集・偏在とは  
異なり、感染の有無にかかわらず全葉で MWNT-7 の結晶を確認した。今後、曝露条  
件や慢性化に関わる感染後の日数などを検討する予定である。

## A. 研究目的

ナノマテリアル曝露による最も懸念されて  
いる体内蓄積に伴う慢性影響については、  
研究がなされておらず、また定量的にリスク  
評価のために必要な慢性吸入曝露は多層カ  
ーボンナノチューブ (MWNT-7) による報告

のみである。そのため、2年間の慢性吸入試  
験と同レベルの評価が可能な代替慢性試験  
法の開発は急務である。

これまで先行研究として、respiratory  
syncytial virus (RSV) 感染マウスモデル  
を用いた MWNT-7 の複数回の経鼻投与

による影響評価を実施し、炎症性マーカーの上昇や肺炎増悪化など感染免疫系への影響明らかにしてきた。そこで本研究では、MWNT-7のTaquann法による吸入曝露システムを利用して、ナノマテリアル曝露の感染性免疫系への影響を効率的に評価する試験法を開発することを目的としている。

今年度は、MWNT-7の単回の吸入曝露によるRSウイルス感染肺炎への増悪化現象などの免疫応答影響について、試験法の効率性などを含めて経鼻投与での結果と比較検討した。

## B. 方法

### MWNT-7 吸入曝露実験

国立衛研に新たに設置した Taquann 全身曝露吸入装置 (ver.3.0) を用い、53 $\mu$ m メッシュ濾過した MWNT-7 を質量濃度 3 および 6 mg/m<sup>3</sup> になるように調整して、BALB/c 雌、4 週齢のマウスに 6 時間吸入させた。2 日後に曝露マウスは SLC (実験動物ブリーダー) に委託して九州保健福祉大学動物実験施設へ移送した。

### RSV マウス感染実験

吸入曝露処置を行ったマウスに RSV A2 株  $5 \times 10^5$  PFU を麻酔下 (ketamine 40  $\mu$ g/g, xylazine 6  $\mu$ g/g、筋注) で経鼻感染させた。RSV 感染 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 $^{\circ}$ C に保管した。BALF 中から取得した細胞につ

いては、塗抹標本を作製し、ライトギムザ染色を実施した。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

CCL5 (RANTES) の定量は R&D Systems 社製の Quantikine ELISA キットを用いた。IFN- $\gamma$  および TGF- $\beta$  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ー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 (株) バイオ病理研究所に委託し、評価は HE およびマッソントリクロム染色下で実施した。

(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) 吸入曝露のマウスへの影響

今回の試験では、初めて①4週齢 (平均体重 14-16 g) と小さなマウスを用いて Taquann 全身曝露吸入装置で 6 時間曝露する、②マウスを航空機利用で国立衛研 (川崎市) から九州保健福祉大学 (延岡市) へ移送する、ことからこれらのマウスへの影響を調べた。吸入曝露前・後で MWNT-7 曝露による体重変化や異常行動などは観察されなかった。また、輸

送前・後では輸送ストレスや摂餌量の減少で、非曝露群および曝露群ともに若干の体重減少は見られたが、感染実験に問題となるような影響は認められなかった。

### (2) BALF中のケモカイン・サイトカインレベルの評価結果

RSV感染による肺炎の代表的なマーカーであるケモカインCCL5のBALF中のレベルは、MWNT-7吸入曝露により若干上昇したが、有意ではなかった。また、同じく肺炎マーカーとして知られているIFN- $\gamma$ の上昇は認められなかった。一方、Pro-fibrogenic factorであるTGF- $\beta$ は、曝露量に依存して有意に増加し、6 mg /m<sup>3</sup> 群では対照群の約2倍に達していた。

### (3)肺の病理組織学評価結果

HE染色プレパラートの検鏡により、マウス肺全葉を検討した。吸入曝露により、RSV感染に関わらず均一ではないが全葉でMWNT-7の結晶が確認された。特に、MWNT-7の凝集塊は殆ど見られず、気道終末部のマクロファージに貪食されている像が散見された。RSV感染マウスでは間質性肺炎が生じていたが、MWNT-7貪食マクロファージ周辺でのリンパ球の浸潤があるものの、曝露による明確な増悪化は見られなかった。さらに、マッソントリクロム染色プレパラートでの検鏡では、線維化などの差異は見いだせなかった。

## D. 考察

今回初めて国立衛研・毒性部との共同で、Taquann 全身曝露吸入装置でのMWNT-7吸入曝露-RSV感染実験を実施したが、問題なく一連の実験をコンプライートできた。吸入曝露によるRSV感染マウスへの影響は、先行研究である複数回(感染1,3および5日前)の経鼻投与実験の結果のような肺炎マーカー上昇および肺炎像の増悪化は観察されなかった。しかし、経鼻投与ではMWNT-7の凝集塊が偏在していたのに対して、MWNT-7の結晶が肺の全葉で凝集なく観察されており、ナノマテリアルの安全性評価の観点からは吸入曝露の優位性が示されたと思われる。今後は曝露回数や吸入曝露量の検討を実施する予定である。

今回の評価から、TGF- $\beta$ を影響指標に加えた。このサイトカインはPro-fibrogenic factorであり、肺の線維化に関わる因子として知られている。BALF中のTGF- $\beta$ レベルはMWNT-7の曝露量に依存して有意に上昇しており、今後、RSV感染後の日数を延長してマッソントリクロム染色観察などで肺炎回復期への影響が明らかになるとと思われる。

## E. 結論

1 Taquann 全身曝露吸入装置を用いたMWNT-7のRSV感染マウスへの影響

評価が可能であった。

2 MWNT-7の単回の吸入曝露での肺炎増悪化は認められなかったが、肺全葉での結晶の分布が観察された。

3 MWNT-7の吸入曝露により、BALF中のTGF- $\beta$ レベルは有意に上昇し、線維化への影響が示唆された。

#### F.健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1.論文発表

Sugita, C., Shin, K., Wakabayashi, H., Tshuhako, R., Yoshida, H., Wanatabe, W., Kurokawa, M. Antiviral activity of hypothiocyanite produced by lactoperoxidase against influenza A and B viruses and mode of its antiviral action Acta Virol. (2018) 62, 401-408. DOI:10.4149/av\_2018\_408.

##### 2. 学会発表

Wataru Watanabe, Toshi Akashi, Akihiko Hirose, Aki Miyauchi, Hiroki Yoshida, Masahiko Kurokawa Effects of double-walled carbon nanotubes on the pneumonia in respiratory syncytial virus-infected mice. 54th Congress of the European Societies of Toxicology, P17-16, The SQUARE - Brussels Meeting Centre, 20180904.

渡辺 渡、明石 敏、宮内亜宜、吉田裕樹、黒川昌彦 二層カーボンナノチューブ曝露のRSウイルス肺炎への影響 第66回日本ウイルス学会総会、P1-P-17 京都テルサ 2018年10月28日

#### 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

研究課題名：ナノマテリアル曝露による慢性影響の効率的評価手法開発に関する研究

分担研究課題名：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 生化学部 主任研究官

## 研究要旨

インフラマソームは慢性炎症との関連が注目されている。これまで各種の多層カーボンナノチューブ（MWCNT）や酸化チタンナノマテリアルがマクロファージの NLRP3 インフラマソームを活性化し、炎症性サイトカインを産生する応答を明らかにしてきた。さらに MWCNT-7 曝露による IL-1 $\beta$  産生を顕著に抑制する化合物 X を見いだしている。本研究では、化合物 X を用いて、各種ナノマテリアルによるインフラマソーム活性化の機構の解明を試みる。ATP 刺激による IL-1 $\beta$  産生は化合物 X により抑制されず、本化合物は MWCNT-7 によるインフラマソーム活性化の過程を抑制する機序が示唆された。様々なサイズや形状の酸化チタンナノマテリアル曝露による IL-1 $\beta$  産生については、より減弱した抑制効果を示したことから、本化合物による抑制には、ナノマテリアルの物性による差異があることが示された。

## A. 研究目的

曝露されたナノマテリアルが体内に入ると、マクロファージ等の食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が、近年の研究から、インフラマソームが内外の危険シグナルによる炎症応答の中核を担い、様々な慢性炎症疾患の進展に大きく関わるということが明らかにされている。

本分担研究者はこれまで、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（MWCNT）やチタン酸カリウム、あるいは粒子状の酸化チタンをマクロファージに曝露すると、NLR pyrin domain containing 3（NLRP3）インフラマソームの活性化を介して炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$  を強力に産生する応答を見いだしている。引き続き、分泌された IL-1 $\beta$  はオートクライン機構により TNF $\alpha$  産生を誘導し、インフラマソーム活性化は炎症応答カスケードの上流に位置づけられることを明らかにしている。

本研究では、MWCNT 曝露による食食系細胞内でのインフラマソーム活性化を抑制する化合物を用い、各種ナノマテリアルの物性の違いによる抑制応答の差異を明らかにし、メカニズム解明により、慢性影響の *in vitro* 評価の基盤とする。

## B. 研究方法

### 1. 実験材料および試薬

本研究では多層カーボンナノチューブ MWCNT-7、チタン酸カリウム（針状、長さ 10-20 $\mu$ m、径 300-600nm）、下記四種の酸化チタンナノマテリアル（表面未処理）を用いた。

酸化チタン A（ルチル、粒子径：15 nm）

酸化チタン B（ルチル、粒子径：35 nm）

酸化チタン C（アナテース、粒子径：6 nm）

酸化チタン F（針状ルチル、平均長さ 1.6 $\mu$ m、径 130nm）

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。

## 2. 各種ナノマテリアルの分散

MWCNT-7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。酸化チタンはPBSに50mg/mLの濃度で懸濁し、3~4分間バス型超音波発生装置で処理、vortex、ピペッティング、25G シリンジ通過により分散した。

## 3. 細胞処理およびIL-1 $\beta$ 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  $\mu$ 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を除いた培地中で候補薬物の存在下・非存在下で24時間培養したのちに、各種ナノマテリアルあるいはATP、対照となる溶剤を無血清培地に添加し6時間培養した。最終Tween濃度は0.001%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. インフラマソーム活性化を抑制する薬物

これまでの研究において、MWCNT-7をTHP-1マクロファージに暴露すると、NLRP3インフラマソームを介するIL-1 $\beta$ 産生が強力に誘導されることを、NLRP3ノックダウンやcaspase-1阻害により明らかにしている。さらにこの応答の抑制作用を示す化合物の探索を行い、10  $\mu$ Mを24時間前処理することにより、IL-1 $\beta$ 分泌が無処理細胞に比較し20%まで顕著に抑制される化合物Xを見いだしている。

細胞外ATPはインフラマソームを直接活性化することが知られている。ATP(3mM)刺激によるIL-1 $\beta$ 分泌については、化合物X処理により促進された。したがって、化合物Xはインフラマソームおよび下流のcaspase-1によるIL-1 $\beta$ プロセッシング機構には影響せず、MWCNT-7によるインフラマソーム活性化過程に影響することが推定される。他化合物の効果を調べると、化合物A処理ではMWCNT-7によるIL-1 $\beta$ 分泌は逆に促進され、他の四種の化合物に

ついて影響は認められなかった。

### 2. 酸化チタンナノマテリアルによるIL-1 $\beta$ 産生への化合物Xの影響

三種類の粒状酸化チタンナノマテリアル(粒径6、15、35 nm)をTHP-1マクロファージに50または100  $\mu$ g/mLの濃度で暴露し、培地へのIL-1 $\beta$ 産生分泌に対する化合物X(10  $\mu$ M)前処理の影響を調べた。MWCNT-7刺激の場合と異なり、化合物Xの抑制効果は、粒子径が6nmと最小のCでは約20%、AおよびBでは約40%であった(表1)。針状の形状を有する酸化チタンFあるいは針状チタン酸カリウムを暴露したところ、酸化チタンFの場合の抑制効果は約30%、針状チタン酸カリウムの場合には約50%であった。

## D. 考察

NLRP3インフラマソーム活性化を介する炎症応答は、様々な慢性炎症疾患の進展に重要な役割を持つことが明らかにされている。これまでの研究により、多様なMWCNTや酸化チタンナノマテリアル、チタン酸カリウムをマクロファージに暴露すると、NLRP3インフラマソームを介するIL-1 $\beta$ 産生が顕著に誘導されることを明らかにしている。特にMWCNT-7は強力なNLRP3インフラマソーム活性化を示すことから、この応答を抑制する化合物の探索を行い、10  $\mu$ Mの濃度でIL-1 $\beta$ 産生を約80%抑制する化合物Xを見いだしている。

化合物Xは、ATP刺激によるIL-1 $\beta$ 産生には影響しないことが判明した。細胞外のATPはP2X受容体刺激を介して細胞からK<sup>+</sup>を流出させ、NLRP3インフラマソームを直接活性化することが知られている。したがって、化合物Xはインフラマソームおよび下流のcaspase-1活性化には影響せず、MWCNT-7暴露によるインフラマソーム活性化のプロセスを抑制する機構が推定される。

引き続き様々な酸化チタンナノマテリアルをマクロファージに暴露し、IL-1 $\beta$ 産生に対する化合物X前処理の影響を調べたところ、いずれの場合も、抑制効果は

MWCNT-7 に比較して顕著ではなかった。特に、最小の酸化チタン粒子 C (粒子径 6nm) の場合には、抑制効果はわずか 20%であった。粒子径が増大すると効果はやや増加する傾向があったが、針状で平均長 1.6 $\mu$ m の酸化チタン F の場合にも抑制効果はわずか 30%であった。したがって、ナノマテリアルの物理化学的な性質が化合物 X の効果に影響している可能性が考えられる。一方、これまでの研究において、食食阻害剤サイトカラシン D による IL-1 $\beta$  産生の抑制効果は、酸化チタンナノマテリアル粒子径や形状により大きく影響されることを見いだしており、化合物 X の作用点は異なることが示唆される (表 1)。次年度においては、様々な大きさの MWCNT について、化合物 X の効果を比較することを予定している。

#### E. 結論

MWCNT-7 暴露によるマクロファージからの IL-1 $\beta$  産生を顕著に抑制する化合物 X を用い、様々な形状や大きさの酸化チタンナノマテリアルへの効果を調べた。ナノマテリアルの物性の違いにより化合物 X による抑制効果が異なることを見いだした。

#### F. 研究発表

該当なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

該当なし

表1 各種酸化チタンナノマテリアル、チタン酸カリウム暴露によるIL-1 $\beta$ 産生に対する cytochalasin Dならびに化合物Xの効果

|                                   | 酸化チタンC<br>6-ANA | 酸化チタンA<br>15-RUT | 酸化チタンB<br>35-RUT | 酸化チタンF<br>針状ルチル | 針状チタン酸<br>カリウム |
|-----------------------------------|-----------------|------------------|------------------|-----------------|----------------|
| Length                            |                 |                  |                  | 1.6 $\mu$ m     | 10-20 $\mu$ m  |
| Diameter                          | 6 nm            | 15 nm            | 35 nm            | 130 nm          | 300-600 nm     |
| IL-1 $\beta$ 産生                   | ++              | ++               | +++(+)           | ++++            | +++            |
| Cytochalasin D<br>(0.2 $\mu$ M)作用 | 促進              | 無影響              | 無影響              | 阻害              | 阻害             |
| 化合物X 抑制<br>効果                     | 20%             | 40%              | 40%              | 30%             | 50%            |



## 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  |
|---|---|--------------------------|--------|-----------|------|
| Abdelgied M, El-Gazzar AM, Alexander DB, Alexander WT, Numano T, Iigou M, Naiki-Ito A, Takase H, Abdou KA, Hirose A, Taquahashi Y, Kanno J, Tsuda H, Takahashi S. | Potassium octatitanate fibers induce persistent lung and pleural injury and are possibly carcinogenic in male Fischer 344 rats.   | <i>Cancer Sci.</i>       | 109(7) | 2164-2177 | 2018 |
| Liao D, Wang Q, He J, Alexander DB, Abdelgied M, El-Gazzar AM, Futakuchi M, Suzui M, Kanno J, Hirose A, Xu J, Tsuda H.  | Persistent Pleural Lesions and Inflammation by Pulmonary Exposure of Multiwalled Carbon Nanotubes.  | <i>Chem Res Toxicol.</i> | 31(10) | 1025-1031 | 2018 |
| Sakamoto Y, Hojo M, Kosugi Y, Watanabe K, Hirose A, Inomata A, Suzuki T, Nakae D  | Comparative study for carcinogenicity of 7 different multi-wall carbon nanotubes with different physicochemical characteristics by a single intraperitoneal injection in male Fischer 344 rats. | <i>J Toxicol Sci.</i>    | 43(10) | 587-600   | 2018 |
| Otsuka K, Yamada K, Taquahashi Y, Arakaki R, Ushio A, Saito M, Yamada A, Tsunematsu T, Kudo Y, Kanno J, Ishimaru N.   | Long-term polarization of alveolar macrophages to a profibrotic phenotype after inhalation exposure to multi-wall carbon nanotubes.   | <i>PLoS One</i>          | 13(10) | e0205702  | 2018 |

別添 5

|  |  |                              |           |              |             |
|--|--|------------------------------|-----------|--------------|-------------|
| <p>Elgazzar AM.,<br/>         Abdelgied M.,<br/>         Alexander D.,<br/>         Alexaander W.,<br/>         Numano T., Iigo M.,<br/>         Naiki A., Takahashi<br/>         S., Takase H., Hirose<br/>         A., Kanno J., Elokke<br/>         OM., Nasem AM.,<br/>         Tsuda H.</p> | <p>Comparative pulmonary<br/>         toxicity of a DWCNT and<br/>         MWCNT-7 in rats</p>   | <p><i>Arch. Toxicol.</i></p> | <p>93</p> | <p>49–59</p> | <p>2019</p> |
| <p>Chikura S, Kimoto T,<br/>         Itoh S, Sanada H, Muto<br/>         S, Horibata K.</p>  | <p>Standard protocol for the total<br/>         red blood cell Pig-a assay used<br/>         in the interlaboratory trial<br/>         organized by the Mammalian<br/>         Mutagenicity Study Group of<br/>         the Japanese Environmental<br/>         Mutagen Society.</p> | <p><i>Genes Environ</i></p>  | <p>41</p> | <p>5</p>     | <p>2019</p> |

機関名 国立医薬品

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 奥田晴宏

次の職員の平成 30 年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 ナノマテリアル曝露による慢性影響の効率的評価手法開発に関する研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) 安全性予測評価部 部長  
(氏名・フリガナ) 広瀬 明彦 (ヒロセ アキヒコ)

4. 倫理審査の状況

|                                     | 該当性の有無                   |                                     | 左記で該当がある場合のみ記入 (※1)      |        |                          |
|-------------------------------------|--------------------------|-------------------------------------|--------------------------|--------|--------------------------|
|                                     | 有                        | 無                                   | 審査済み                     | 審査した機関 | 未審査 (※2)                 |
| ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針               | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |        | <input type="checkbox"/> |
| 遺伝子治療等臨床研究に関する指針                    | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |        | <input type="checkbox"/> |
| 人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)           | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |        | <input type="checkbox"/> |
| 厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針  | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |        | <input type="checkbox"/> |
| その他、該当する倫理指針があれば記入すること<br>(指針の名称: ) | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |        | <input type="checkbox"/> |

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

|             |   |
|-------------|---|
| 研究倫理教育の受講状況 | 受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/> |
|-------------|---|

6. 利益相反の管理

|                          |   |
|--------------------------|---|
| 当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定 | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )  |
| 当研究機関におけるCOI委員会設置の有無     | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: ) |
| 当研究に係るCOIについての報告・審査の有無   | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )  |
| 当研究に係るCOIについての指導・管理の有無   | 有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )  |

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

機関名 国立医薬品

所属研究機関長 職名 所長

氏名 奥田晴宏

次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 ナノマテリアル曝露による慢性影響の効率的評価手法開発に関する研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) 毒性部 第三室 室長  
(氏名・フリガナ) 高橋 祐次 (タカハシ ユウジ)

## 4. 倫理審査の状況

|                                     | 該当性の有無                              |                                     | 左記で該当がある場合のみ記入(※1)                  |              |                          |
|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|--------------|--------------------------|
|                                     | 有                                   | 無                                   | 審査済み                                | 審査した機関       | 未審査(※2)                  |
| ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針               | <input type="checkbox"/>            | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>            |              | <input type="checkbox"/> |
| 遺伝子治療等臨床研究に関する指針                    | <input type="checkbox"/>            | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>            |              | <input type="checkbox"/> |
| 人を対象とする医学系研究に関する倫理指針(※3)            | <input type="checkbox"/>            | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>            |              | <input type="checkbox"/> |
| 厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針  | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>            | <input checked="" type="checkbox"/> | 国立医薬品食品衛生研究所 | <input type="checkbox"/> |
| その他、該当する倫理指針があれば記入すること<br>(指針の名称: ) | <input type="checkbox"/>            | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>            |              | <input type="checkbox"/> |

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他(特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

## 5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

|             |   |
|-------------|---|
| 研究倫理教育の受講状況 | 受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/> |
|-------------|---|

## 6. 利益相反の管理

|                          |   |
|--------------------------|---|
| 当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定 | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )  |
| 当研究機関におけるCOI委員会設置の有無     | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: ) |
| 当研究に係るCOIについての報告・審査の有無   | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )  |
| 当研究に係るCOIについての指導・管理の有無   | 有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )  |

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

平成31年3月28日

機関名 国立医薬品食

所属研究機関長 職名 所長

氏名 奥田晴宏

次の職員の平成 30 年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 ナノマテリアル曝露による慢性影響の効率的評価手法開発に関する研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) 変異遺伝部 主任研究官  
(氏名・フリガナ) 堀端 克良 (ホリバタ カツヨシ)

4. 倫理審査の状況

|                                     | 該当性の有無                              |                                     | 左記で該当がある場合のみ記入 (※1)                 |              |                          |
|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|--------------|--------------------------|
|                                     | 有                                   | 無                                   | 審査済み                                | 審査した機関       | 未審査 (※2)                 |
| ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針               | <input type="checkbox"/>            | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>            |              | <input type="checkbox"/> |
| 遺伝子治療等臨床研究に関する指針                    | <input type="checkbox"/>            | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>            |              | <input type="checkbox"/> |
| 人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)           | <input type="checkbox"/>            | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>            |              | <input type="checkbox"/> |
| 厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針  | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>            | <input checked="" type="checkbox"/> | 国立医薬品食品衛生研究所 | <input type="checkbox"/> |
| その他、該当する倫理指針があれば記入すること<br>(指針の名称: ) | <input type="checkbox"/>            | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>            |              | <input type="checkbox"/> |

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

|             |   |
|-------------|---|
| 研究倫理教育の受講状況 | 受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/> |
|-------------|---|

6. 利益相反の管理

|                          |   |
|--------------------------|---|
| 当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定 | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )  |
| 当研究機関におけるCOI委員会設置の有無     | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: ) |
| 当研究に係るCOIについての報告・審査の有無   | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )  |
| 当研究に係るCOIについての指導・管理の有無   | 有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )  |

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

機関名 国立医薬品

所属研究機関長 職名 所長

氏名 奥田晴宏

次の職員の平成 30 年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 ナノマテリアル曝露による慢性影響の効率的評価手法開発に関する研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) 生化学部 主任研究官  
(氏名・フリガナ) 最上 知子 (モガミ トモコ)

4. 倫理審査の状況

|                                     | 該当性の有無                   |                                     | 左記で該当がある場合のみ記入 (※1)      |        |                          |
|-------------------------------------|--------------------------|-------------------------------------|--------------------------|--------|--------------------------|
|                                     | 有                        | 無                                   | 審査済み                     | 審査した機関 | 未審査 (※2)                 |
| ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針               | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |        | <input type="checkbox"/> |
| 遺伝子治療等臨床研究に関する指針                    | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |        | <input type="checkbox"/> |
| 人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)           | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |        | <input type="checkbox"/> |
| 厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針  | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |        | <input type="checkbox"/> |
| その他、該当する倫理指針があれば記入すること<br>(指針の名称: ) | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |        | <input type="checkbox"/> |

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

|             |   |
|-------------|---|
| 研究倫理教育の受講状況 | 受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/> |
|-------------|---|

6. 利益相反の管理

|                          |   |
|--------------------------|---|
| 当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定 | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )  |
| 当研究機関におけるCOI委員会設置の有無     | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: ) |
| 当研究に係るCOIについての報告・審査の有無   | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )  |
| 当研究に係るCOIについての指導・管理の有無   | 有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )  |

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。

・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

平成31年3月28日

機関名 国立医薬品

所属研究機関長 職名 所長

氏名 奥田晴宏

次の職員の平成 年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業

2. 研究課題名 ナノマテリアル曝露による慢性影響の効率的評価手法開発に関する研究

3. 研究者名 (所属部局・職名) 生活衛生化学部 第三室 室長

(氏名・フリガナ) 小林 憲弘 (コバヤシ ノリヒロ)

#### 4. 倫理審査の状況

|                                     | 該当性の有無                              |                                     | 左記で該当がある場合のみ記入(※1)                  |              |                          |
|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|--------------|--------------------------|
|                                     | 有                                   | 無                                   | 審査済み                                | 審査した機関       | 未審査(※2)                  |
| ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針               | <input type="checkbox"/>            | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>            |              | <input type="checkbox"/> |
| 遺伝子治療等臨床研究に関する指針                    | <input type="checkbox"/>            | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>            |              | <input type="checkbox"/> |
| 人を対象とする医学系研究に関する倫理指針(※3)            | <input type="checkbox"/>            | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>            |              | <input type="checkbox"/> |
| 厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針  | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>            | <input checked="" type="checkbox"/> | 国立医薬品食品衛生研究所 | <input type="checkbox"/> |
| その他、該当する倫理指針があれば記入すること<br>(指針の名称: ) | <input type="checkbox"/>            | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>            |              | <input type="checkbox"/> |

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他(特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

#### 5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

|             |   |
|-------------|---|
| 研究倫理教育の受講状況 | 受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/> |
|-------------|---|

#### 6. 利益相反の管理

|                          |   |
|--------------------------|---|
| 当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定 | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )  |
| 当研究機関におけるCOI委員会設置の有無     | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: ) |
| 当研究に係るCOIについての報告・審査の有無   | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )  |
| 当研究に係るCOIについての指導・管理の有無   | 有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )  |

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

機関名 公立大学法人 名古屋市立大学

所属研究機関長 職名 理事長

氏名 郡 健二郎

次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 ナノマテリアル曝露による慢性影響の効率的評価手法開発に関する研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) 津田特任教授研究室・特任教授  
(氏名・フリガナ) 津田 洋幸 (ツダ ヒロユキ)

4. 倫理審査の状況

|                                     | 該当性の有無                              |                                     | 左記で該当がある場合のみ記入(※1)                  |         |                          |
|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|---------|--------------------------|
|                                     | 有                                   | 無                                   | 審査済み                                | 審査した機関  | 未審査(※2)                  |
| ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針               | <input type="checkbox"/>            | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>            |         | <input type="checkbox"/> |
| 遺伝子治療等臨床研究に関する指針                    | <input type="checkbox"/>            | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>            |         | <input type="checkbox"/> |
| 人を対象とする医学系研究に関する倫理指針(※3)            | <input type="checkbox"/>            | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>            |         | <input type="checkbox"/> |
| 厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針  | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>            | <input checked="" type="checkbox"/> | 名古屋市立大学 | <input type="checkbox"/> |
| その他、該当する倫理指針があれば記入すること<br>(指針の名称: ) | <input type="checkbox"/>            | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>            |         | <input type="checkbox"/> |

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他(特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

|             |   |
|-------------|---|
| 研究倫理教育の受講状況 | 受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/> |
|-------------|---|

6. 利益相反の管理

|                          |   |
|--------------------------|---|
| 当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定 | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )  |
| 当研究機関におけるCOI委員会設置の有無     | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: ) |
| 当研究に係るCOIについての報告・審査の有無   | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )  |
| 当研究に係るCOIについての指導・管理の有無   | 有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )  |

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

機関名 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

所属研究機関長 職名 所長

氏名 菅野 純

次の職員の平成 30 年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 1. 研究事業名 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）
- 2. 研究課題名 ナノマテリアル曝露による慢性影響の効率的評価手法開発に関する研究
- 3. 研究者名 （所属部局・職名）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  
（氏名・フリガナ）菅野 純 （カンノ ジュン）

4. 倫理審査の状況

|                                     | 該当性の有無                   |                                     | 左記で該当がある場合のみ記入（※1）       |        |                          |
|-------------------------------------|--------------------------|-------------------------------------|--------------------------|--------|--------------------------|
|                                     | 有                        | 無                                   | 審査済み                     | 審査した機関 | 未審査（※2）                  |
| ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針               | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |        | <input type="checkbox"/> |
| 遺伝子治療等臨床研究に関する指針                    | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |        | <input type="checkbox"/> |
| 人を対象とする医学系研究に関する倫理指針（※3）            | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |        | <input type="checkbox"/> |
| 厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針  | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |        | <input type="checkbox"/> |
| その他、該当する倫理指針があれば記入すること<br>(指針の名称： ) | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |        | <input type="checkbox"/> |

（※1）当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他（特記事項）

（※2）未審査の場合は、その理由を記載すること。

（※3）廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

|             |   |
|-------------|---|
| 研究倫理教育の受講状況 | 受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/> |
|-------------|---|

6. 利益相反の管理

|                          |   |
|--------------------------|---|
| 当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定 | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )  |
| 当研究機関におけるCOI委員会設置の有無     | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: ) |
| 当研究に係るCOIについての報告・審査の有無   | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )  |
| 当研究に係るCOIについての指導・管理の有無   | 有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )  |

（留意事項） ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

平成31年 3月12日

厚生労働大臣 殿

機関名 徳島大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 野地 澄

次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業

2. 研究課題名 ナノマテリアル曝露による慢性影響の効率的評価手法開発に関する研究

3. 研究者名 (所属部局・職名) 大学院医歯薬学研究部・教授

(氏名・フリガナ) 石丸 直澄・イシマル ナオズミ

4. 倫理審査の状況

|                                     | 該当性の有無                   |                                     | 左記で該当がある場合のみ記入(※1)       |        |                          |
|-------------------------------------|--------------------------|-------------------------------------|--------------------------|--------|--------------------------|
|                                     | 有                        | 無                                   | 審査済み                     | 審査した機関 | 未審査(※2)                  |
| ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針               | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |        | <input type="checkbox"/> |
| 遺伝子治療等臨床研究に関する指針                    | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |        | <input type="checkbox"/> |
| 人を対象とする医学系研究に関する倫理指針(※3)            | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |        | <input type="checkbox"/> |
| 厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針  | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |        | <input type="checkbox"/> |
| その他、該当する倫理指針があれば記入すること<br>(指針の名称: ) | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |        | <input type="checkbox"/> |

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他(特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

|             |   |
|-------------|---|
| 研究倫理教育の受講状況 | 受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/> |
|-------------|---|

6. 利益相反の管理

|                          |   |
|--------------------------|---|
| 当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定 | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )  |
| 当研究機関におけるCOI委員会設置の有無     | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: ) |
| 当研究に係るCOIについての報告・審査の有無   | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )  |
| 当研究に係るCOIについての指導・管理の有無   | 有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )  |

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

平成31年4月3日

厚生労働大臣 殿

機関名 九州保健福祉大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 高崎 眞 印

次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 ナノマテリアル曝露による慢性影響の効率的評価手法開発に関する研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) 九州保健福祉大学大学院 教授  
(氏名・フリガナ) 渡辺 渡 ・ ワタナベ ワタル

4. 倫理審査の状況

|                                     | 該当性の有無                   |                                     | 左記で該当がある場合のみ記入 (※1)      |        |                          |
|-------------------------------------|--------------------------|-------------------------------------|--------------------------|--------|--------------------------|
|                                     | 有                        | 無                                   | 審査済み                     | 審査した機関 | 未審査 (※2)                 |
| ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針               | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |        | <input type="checkbox"/> |
| 遺伝子治療等臨床研究に関する指針                    | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |        | <input type="checkbox"/> |
| 人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)           | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |        | <input type="checkbox"/> |
| 厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針  | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |        | <input type="checkbox"/> |
| その他、該当する倫理指針があれば記入すること<br>(指針の名称: ) | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |        | <input type="checkbox"/> |

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

|             |   |
|-------------|---|
| 研究倫理教育の受講状況 | 受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/> |
|-------------|---|

6. 利益相反の管理

|                          |   |
|--------------------------|---|
| 当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定 | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )  |
| 当研究機関におけるCOI委員会設置の有無     | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: ) |
| 当研究に係るCOIについての報告・審査の有無   | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )  |
| 当研究に係るCOIについての指導・管理の有無   | 有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )  |

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

平成31年4月9日

厚生労働大臣 殿

機関名 東京都健康  
センター

所属研究機関長 職名 所長

氏名 吉田 道彦

次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 ナノマテリアル曝露による慢性影響の効率的評価手法開発に関する研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) 薬事環境科学部 生体影響研究科 主任研究員  
(氏名・フリガナ) 北條 幹 (ホウジョウ モトキ)

4. 倫理審査の状況

|                                     | 該当性の有無                              |                                     | 左記で該当がある場合のみ記入 (※1)                 |                          |                          |
|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                                     | 有                                   | 無                                   | 審査済み                                | 審査した機関                   | 未審査 (※2)                 |
| ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針               | <input type="checkbox"/>            | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>            |                          | <input type="checkbox"/> |
| 遺伝子治療等臨床研究に関する指針                    | <input type="checkbox"/>            | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>            |                          | <input type="checkbox"/> |
| 人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)           | <input type="checkbox"/>            | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>            |                          | <input type="checkbox"/> |
| 厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針  | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>            | <input checked="" type="checkbox"/> | 東京都健康安全研究センター<br>動物実験委員会 | <input type="checkbox"/> |
| その他、該当する倫理指針があれば記入すること<br>(指針の名称: ) | <input type="checkbox"/>            | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>            |                          | <input type="checkbox"/> |

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

|             |   |
|-------------|---|
| 研究倫理教育の受講状況 | 受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/> |
|-------------|---|

6. 利益相反の管理

|                          |   |
|--------------------------|---|
| 当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定 | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )  |
| 当研究機関におけるCOI委員会設置の有無     | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: ) |
| 当研究に係るCOIについての報告・審査の有無   | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )  |
| 当研究に係るCOIについての指導・管理の有無   | 有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )  |

(留意事項) ・該当する口にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。