

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)

令和元年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 広瀬 明彦

令和2年(2020年)3月

令和元年度 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 広瀬 明彦	2
II. 研究分担報告書.....	15
1. ナノマテリアルの吸入曝露手法の開発に関する研究 高橋 祐次	16
2. 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 菅野 純.....	28
3. 短期曝露試験系の総合評価に関する研究 小林 憲弘、広瀬 明彦	43
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 北條 幹、広瀬 明彦.....	48
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 津田 洋幸.....	66
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 堀端 克良	71
7. ナノマテリアルの免疫系への慢性影響に関する研究 石丸 直澄	81
8. 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 渡辺 渡.....	99
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 最上 知子.....	104
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	107

令和元年度厚生労働行政推進調査事業費補助金
(化学物質リスク研究事業)

I. 総括研究報告書

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

研究代表者: 広瀬 明彦 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部長

研究要旨

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

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

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

研究分担者

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

A. 研究目的

新素材としての産業用ナノマテリアルについては、新しい物性に伴う未知のヒト健康影響の懸念に対して適正な安全性評価手法の確立が急務となっているが、既に 10 年以上にわたり OECD や各国が各種研究を精力的に行ってきたにもかかわらず、未だにナノマテリアル曝露による最も懸念されている体内蓄積に伴う慢性影響を検討した慢性実験はほとんど行われてきていない。特に近年では、動物試験を用いない *in vitro* 試験系を中心とした評価法の確立が重要視されているが、肝心の *in vivo* 影響の評価や AOP が確立していなければ、信頼性の高い *in vitro* 試験系の開発は不可能である。我々は、先行する研究において当初より慢性影響を中心とした *in vivo* 試験研究を進めてきており、発がん性を主とした慢性影響の評価法を検討してきた。一方、定量的な慢性吸入曝露によるリスク評価には、多層カーボンナノチューブ (MWNT-7) で報告されたように 2 年

間の慢性吸入試験を行うことが必須であるが、現実的にあらゆるナノマテリアルで慢性吸入試験を行うことはできない。その為、慢性影響を効率的に評価できる評価手法の確立は急務である。そこで、先行研究で開発してきたナノマテリアル分散法および気管内投法を用いて、先ず通常の 2 年間の連続吸入曝露試験法を代替できる試験法として、短期間曝露と慢性観察による慢性影響評価法を確立することを本研究の目的とした。

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

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

また、将来的なスクリーニング試験法や *in*

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

B. 研究方法

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

慢性吸入曝露試験の代替手法検討:

H30年度に、MWNT-7を用いた慢性試験における体内負荷量を測定するため手法として、走査電顕にて繊維数を基盤として測定する方法(SEM法)と、Benzo[ghi]peryleneをマーカーとして定量する方法(大西法)がTaquann法処理したMWNT-7を用いた場合の比較可能性についてバリデーションを行っており(菅野)、必要に応じて両手法使い分けて肺負荷量を測定した。

H30年度の予備試験の結果を参考にして、国立衛研に新たに設置したTaquann全身曝露吸入装置(ver.3.0)を用い、53 μ mメッシュ濾過したMWNT-7の2年間吸入曝露実験を開始した。C57BL/6NcrSLC雄性マウスを使用し、12週齢時に吸入曝露を実施した。曝露は4週間に一回の頻度で実施し、一日当たりの曝露時間は6時間とした。群構成は、対照群、低濃度群(目標濃度2 mg/m³)、高濃度群(目標濃度6

mg/m³)の3群構成とした。エアロゾルの特性は、質量濃度、エアロゾル粒子数(CPC)、空気力学的質量中央値(MMAD)の測定を行った。本年度はH30年度に実施した6か月中間定期解剖の肺組織の病理検査及び本年度実施した12か月中間定期解剖のBALF解析を行った(肺組織標本は作製中)(高橋)。

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

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

一方、短期間気管内噴霧+慢性観察(2週8回投与、TIPS法)によるチタン酸カリウム(POT)、アナターゼ型二酸化チタニウムの炎症、発がん性をMWNT-7と比較した。また、長さの異なる二層ナノチューブ(DWCNT)(15, 7, 1 μ m)についてPOTの場合と同じプロトコルにて、各群14~16匹として1匹あたりの2週における全投与量は 22×10^{12} 本/ラットとなるように調整して、投与終了後6時間、4、52、104週後に屠殺し、慢性影響の比較を行っている(津田)。

慢性影響指標に関する研究:

発がん性の指標となる遺伝毒性試験について、先行研究で実施した気管内投与下における *in vivo* 肺小核試験の陰性結果の妥当性を検証するために、*in vivo-in vitro*法を用いた肺小核試験法における陽性対照の適切性と採材時期の検証を行った。陽性対照として Ethyl methanesulfonate (EMS, 25 mg/kg および 50 mg/kg の用量を設定) を各群3匹の8週齢雄性 C57BL/6NCrSlc マウスに2日連続腹腔内投与し、他の *in vivo* 遺伝毒性試験法等で推奨されている採材時期を参照し、陽性対照の最終投与3時間後、24時間後または5日後にそれぞれ肺組織を採材し、肺由来AT-II細胞および細気管支由来Clara細胞を得て、*ex vivo* 培養法を応用した *in vivo-in vitro*法を用いた小核試験法を実施した(堀端)。

免疫系への吸入曝露による慢性影響については、MWNT-7の2年間の吸入曝露実験の6ヵ月曝露の定期解剖から得られたサンプルを用いて肺を中心とした免疫細胞分画あるいは各種遺伝子発現に関して検討を加えた(石丸)。感染性への影響評価については、MWNT-7の Taquann法による複数回(3回)の吸入曝露マウスに対してRSV感染実験を行った。方法としては、BALB/cマウスに対して、RSV感染の7、5および3日前にMWNT-7を0、3 および6 mg/m³、6時間吸入曝露を実施した。続いてRSVを経鼻感染させ、5日後の肺胞洗浄液(BALF)中のサイトカイン・ケモカイン定量や肺病理組織学的な解析を行った(渡辺)。一方、炎症反応の最初反応であるマクロファージへの影響に関しては、ナノマテリアルの物性によるインフラマソーム活性化応答の違いを、薬物による抑制の差異に着目して検討した。THP-1マクロファージに各種MWNT類を曝露し、NLRP3インフラマソーム依存的なIL-1β分

泌への薬物Xの影響を解析した(最上)。

国際動向に関する研究:

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

<倫理面への配慮>

本研究では、人を対象とした研究、人の遺伝子解析、疫学研究は行っていない。動物試験を実施した研究は、試験実施機関による動物実験に関する倫理委員会の承認を得るなど、実験動物に対する動物愛護の配慮の上で実施した

C. 研究結果

慢性影響評価手法検討:

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

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

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

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

TIPS 法による POT と酸化チタンの比較では、2 週投与+4 週観察群において、投与肺と胸膜における炎症と障害作用は球状 TiO₂ より POT により顕著な傾向が見られた。52 週では POT (0.5mg) と MWCNT-7 における肺組織と胸腔洗浄液における炎症像、M ϕ 増加、肺胞上皮、胸膜中皮の 8-OHdG 値、PCNA 値、CCL2 レベルの有意の増加が見られた。104 週では、肺胞上皮過形成・腺腫・腺がんの合計および胸膜中皮過形成と悪性中皮腫の合計頻度において POT (0.25 と 0.5mg 合計) と MWCNT-7 群で有意の増加が見られた。長さの異なる DWCNT 曝露による慢性影響は現在解析中である。陽性対照の MWCNT-7 では 104 週に達する前にすべてのラットは胸膜悪性中皮腫悪性中皮腫で死亡している。

慢性影響指標に関する研究:

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

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

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

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

国際動向に関する研究：

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

D. 考察

慢性影響評価手法検討に関する研究に関しては、まず、昨年度末から開始したMWNT-7によるマウスTaquann全身吸入およびTaquann処理MWNT-7のラット気管内投与の2つの反復曝露試験を継続してきた。得られたデータを基に、慢性の連続吸入試験の肺内負荷量と同レベルにすることができる短期間曝露の慢性観察試験のプロコロールとして、2年間にわたる間欠的吸入曝露および気管内投与の投与量の目安を設定することが可能となった。

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

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

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

一方、先行研究から引き続き行っている気管内投与法のプロトコルとしてのTIP法について、慢性実験の結果POTは、その炎症や傷害性について、MWCNT-7よりは良いものの球状TiO₂よりも顕著であり、は、作用や催腫瘍性が明らかとなり、肺胞上皮過形成・腺腫・腺がんの合計および胸膜中皮過形成と悪性中皮腫の合計頻度において、有意の催腫瘍性のあることが示された。また、長さの異なるDWCNTについて、これまでの報告で0.7micro-mのMWCNTの腹腔内投与では発がん性はみられなかった報告(Muller, 2009)から、1.5、7.0、15 μm のDWCNTについてTIPS投与を行った。現在解析中の発がんについて病理学的結果が待たれる。

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

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

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

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

In vitro メカニズム解析研究において、様々なナノマテリアルにより惹起される NLRP3 インフラマソームを介する炎症応答は、酸化チタンや MWCNT 等の物性の違いにより薬物 X による抑制効果が異なることを見いだした。引き続き物性の違いによるマクロファージによる認識・取り込み過程の差異に着目してメカニズムを解明し、慢性影響の *in vitro* 予測につながる細胞応答・分子マーカーを同定することを目指している。

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

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

E. 結論

慢性影響に関する研究に関して、2年間の慢性吸入毒性試験と同レベルの肺内負荷量を達成するために短期間曝露の慢性観察試験のプロトコルを確立し、2年間の間欠曝露試験（4週毎に1回曝露）を開始した。Taquan 全身曝露吸入装置（ver.3.0）を用いた吸入曝露実験については、現在まで6及び12ヵ月の定期解剖を終えた。エアロゾル特性の測定において、安定した質量濃度が得られている。6ヵ月のBALF採取後の曝露肺では、曝露肺に明確な線維性肉芽腫形成は認められず、肺胞構造の改変所見も明らかでなかったことから、高分散状態である検体の場合には、肉芽腫の誘発能が低いことが考えられた。ラット気管内投与については、1年経過時点において、慢性炎症とII型肺胞上皮細胞の反応性過形成が広範囲に引き起こされ、少数例で細気管支肺胞上皮過形成が認められた。肺内のMWCNT量は、すでに、2年経過後に肺腫瘍の発症が期待されるレベルまで達していた。TIPS法によるPOTと酸化チタンの比較では、2週投与+4週観察群において、投与肺と胸膜における炎症と障害作用は球状TiO₂よりPOTにより顕著な傾向が見られた。104

週では、肺胞上皮過形成・腺腫・腺がんの合計および胸膜中皮過形成と悪性中皮腫の合計頻度においてPOTとMWCNT-7群で有意の増加が見られた。長さの異なるDWCNT曝露による慢性影響については、観察期間が終了し、結果の解析中である。

慢性影響指標に関する研究では、全身吸入曝露および気管内投与を実施した先行試験結果を踏まえて、肺小核試験の陽性対照を用いた試験法の適切性を検証した。その結果、肺小核試験の最適な条件を明らかにし、これにより先行試験結果の妥当性を明らかにすることができた。免疫ネットワークへの影響については、MWCNT-7の全身吸入曝露の慢性影響として、肺胞マクロファージの分化、成熟が大きく変化することが示された。一方、感染性に対する影響としては、Taquan法によるMWCNT-7の複数回の吸入曝露により、急性期での影響度は高くないが肺炎マーカーCCL5の有意な上昇や肺組織での貪食マクロファージの集束などが認められた。*In vitro*メカニズム解析研究において、様々なナノマテリアルにより惹起されるNLRP3インフラマソームを介する炎症応答は、酸化チタン・MWCNT等の物性の違いにより薬物Xによる抑制効果が異なることを見いだした。

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

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

F. 研究発表

1. 論文発表

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

847:403035. (2019)

2. 学会発表

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

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

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

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

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

G. 知的財産権の取得状況

1. 特許取得 (出願中)

特許出願;柴田眞利、菅野 純、生田達也、
鶴田祐吾、高橋祐次:吸入曝露試験用
カートリッジ、試験物質供給装置及び吸
入曝露試験装置 特願 2018-81836、
2019.4.20

特許出願;柴田眞利、菅野 純、生田達也、
鶴田祐吾、高橋祐次:試験物質供給装
置及び吸入曝露試験装置 特願
2018-81837、2019.4.20

2. 実用新案登録 (該当なし)

3. その他 (該当なし)

令和元年度厚生労働行政推進調査事業費補助金
(化学物質リスク研究事業)

Ⅱ. 分担研究報告書

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

研究課題: ナノマテリアル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: 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、ヒトで想定される曝露経路に即した動物実験によりハザードを同定し、メカニズムを同定し、用量作用関係の情報を取得し、そこからヒトに対する毒性の推定と用量相関性の推定を行うことであるが、ナノマテリアルに関して最も重要な曝露経路である吸入曝露に関しては、動物実験を遂行する際の技術的障壁が高く、実施例は数少ない。

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昨年度開始し、今年度は 12 カ月までの曝露を終了した。Taquann 法処理に目開き 53 μm の金属製フィルターを用いた。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 (C 群)、低濃度群 (L 群)、高濃度群 (H 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、13 回の平

均質量濃度はL群、H群それぞれ $2.6 \pm 0.1 \text{ mg/m}^3$ 、 $5.0 \pm 0.2 \text{ mg/m}^3$ 、MMAD はL群、H群それぞれ $314 \sim 3436 \text{ nm}$ ($\sigma_g 6.0 \sim 21.6$)、 $339 \sim 4788 \text{ nm}$ ($\sigma_g 6.3 \sim 17.7$)であった。約10倍の開きがあったが、大きな値は測定器の不調(バウンディング)と考えられ、Taquann直噴全身吸入装置におけるMWNT-7のMMADは400~500nmと考えられた。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)¹⁾。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)²⁾、並びに気管内投与実験との比較を目的として、MWNT-7の2年間の間欠全身曝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。

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

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

一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 (図 1)。

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 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。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

(1) 2 年間間欠吸入曝露実験

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) 感染性免疫系への影響実験

感染性免疫系に対するナノマテリアルの影響を調べる実験のため、吸入曝露

を行った。動物は、BALB/cCrSlc 雌 (日本 SLC) を 3 週齢で導入に、4 週齢で曝露を行った (詳細は、研究分担者九州保健福祉大学・教授 渡辺 渡の項を参照)。

2) 飼育条件

飼育ケージは、ポリカーボネイト製の OUTER ケージと PET 製 INNER 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 750TM 個別換気式飼育装置 特型) を使用した。飼育条件は、温度; 25 \pm 1 $^{\circ}\text{C}$ 、湿度; 55 \pm 5%、換気回数; 約 20 回/h、照明時間; 8 時 ~ 20 時点灯 (照明明暗サイクル 12 時間) とし、固型飼料 CRF-1 (オリエンタル酵母工業株式会社) を自由摂取させ、飲水は市水をフィルター濾過し自動給水装置により自由摂取させた。

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

(1) 2 年間間欠吸入曝露実験

対照群、T-CNT7#53 低濃度群 (目標濃度 3 mg/m^3)、T-CNT7#53 高濃度群 (目標濃度 6 mg/m^3) の 3 群構成とした。各群 50 匹のマウスを使用し、1 日 6 時間 (10:00 ~ 16:00) の吸入曝露を 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。

(2) 感染性免疫系への影響実験

対照群、T-CNT7#53 低濃度群(目標濃度 3 mg/m³)、T-CNT7#53 高濃度群(目標濃度 6 mg/m³)の3群構成とした。各群 21匹のマウスを使用し、1日6時間(10:00～16:00)の吸入曝露を一日置きに3回に実施した。(表2)。

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(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。

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) 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、アクリル製のアウトターチャンバーと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おり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^3 ）測定を並行して行った。

相対濃度測定は、対応濃度 3×10^5 個/mL、2.5 nmの粒径が測定可能な凝縮粒子計数装置（Condensation Particle Counter; CPC、CPC3776、サンプリング流量：1.5 L/min、TSI、MN、USA）を用いた。この情報はリアルタイムに得られることからエアロゾルの濃度コントロールに使用した。

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、 1×10^3 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、 $\phi 55$ 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、 $\phi 55$ mm、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 $1.5 \text{ L}/\text{min} \times 60 \text{ min} = 90 \text{ L}$ から 1 m^3 当りの質量濃度を算出した。フィルターの秤量にはマイクロ天秤（XP26V、METTLER TOLEDO）を使用した（図3）。

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 (図3)。

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。

C. 研究結果

1) T-CNT7#53 の吸入曝露実験

(1) 2 年間間欠吸入曝露実験

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 2.6 ± 0.1

mg/m^3 、高濃度群では $5.0 \pm 0.2 \text{ mg}/\text{m}^3$ であり、目標濃度に対して低濃度群では 86%、高濃度群では 83% の値であった (表3)。

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 の値は、凡そ質量濃度を反映した値を示したが、CPC の前段に設置した希釈装置を含めて検体の流路に詰まりが発生する場合があり、変動が大きかった。

MMAD は低濃度群において平均 $314 \sim 3,436 \text{ nm}$ (σg : 6.0~21.6)、高濃度群において $339 \sim 4,788 \text{ nm}$ (σg : 6.3~17.7) であり、約 10 倍の開きがあった (表3、図4)。原因は不明であるが、大きな値を示した場合には、MOUD の検体を補足するプレート以外の場所に検体の付着する、いわゆるバウンディングが多く認められた。この場合、 σg も大きな値を示しており、本来の値を反映していないと考えられた。 σg が比較的小さな値を示した場合の MMAD の値から、Taquann 全身曝露吸入装置 ver 3.0 における T-CNT7#53 の値は $400 \sim 500 \text{ nm}$ と考えられた (図5)。

(2) 感染性免疫系への影響実験

平均質量濃度は低濃度群において $2.8 \pm 0.1 \text{ mg}/\text{m}^3$ 、高濃度群では $5.2 \pm 0.1 \text{ mg}/\text{m}^3$ であり、目標濃度に対して低濃度群では 93%、高濃度群では 86% の値であった (表4)。

MMAD は低濃度群において平均 372 nm (σg : 7.0)、高濃度群において 466 nm (σg : 6.7) であった。これらの値は、(1) の 2 年間間欠吸入曝露実験とほぼ同様な値であり、安定した曝露結果が得られた。

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昨年度から継続して実施しており、本年度は 1 年の曝露までを終了した。

本事業で使用した Taquann 全身曝露吸入装置 ver 3.0 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とが特徴である。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。

CPC の値は、凡そ質量濃度を反映した値を示したが、検体の流路に詰まりが発生する場合があります、測定中に大きく値が低下することが散見された。現在、希釈装置の改良を行って対応しているが、CPC の構造に依存したこともあるため、リアルタイムでの粒子数測定には新たな方法を考慮する必要もあるかもしれない。この現象は、本実験よりも高い濃度で実施した酸化チタンではみられないことから、MWCNT のように繊維状のマテリアルであるための現象と考えられる。

MMAD は、計算値に約 10 倍の幅があったが、 σ_g が小さい測定値に注目すると、400nm から 500nm の範囲にあると考えられた。この値は、OECD TG451 により実施された先行試験 (Particle Fibre Tox 2016) における MMAD (1.3~1.4 μm 、 σ_g 2.6~3.0) に比較すると約 1/3 程度であり、より微細なエアロゾルであると考えられる。バウンディングの原因は不明であるが、MOUDI のシール性をできるかぎり維持する以外に対処法が無いのが現状である。バウンディングも酸化チタンではみられないことから、MWCNT のように繊維状のマテリアルを高分散状態で測定した場合の現象であると考えられる。

今後、4 週毎の曝露実験を進め、曝露開始 2 年間の間欠曝露を完遂する計画である。

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 4 週毎に実施した。MMAD は、400nm から 500nm の範囲にあると考えられた。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る。

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.

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

2. 学会発表

Yuhji Taquahashi, Satoshi Yokota, Koichi Morita, Masaki Tsuji, Akihiko Hirose and Jun Kanno, Improved aerosol generation method and newly designed whole body rodent inhalation apparatus for the testing of nanomaterials in human-relevant exposure scenario, 15th IUTOX International Congress of Toxicology (ICTXV), Hawaii Convention Center, Honolulu, Hawaii, USA, July 16, 2019, Poster

高橋祐次、新素材の毒性評価-工業的ナノマテリアルの高分散性小規模全身ばく露吸入装置の開発-、JST-CRDS 2019年度 科学技術未来戦略WS、2019.12.3 (東京)

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

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

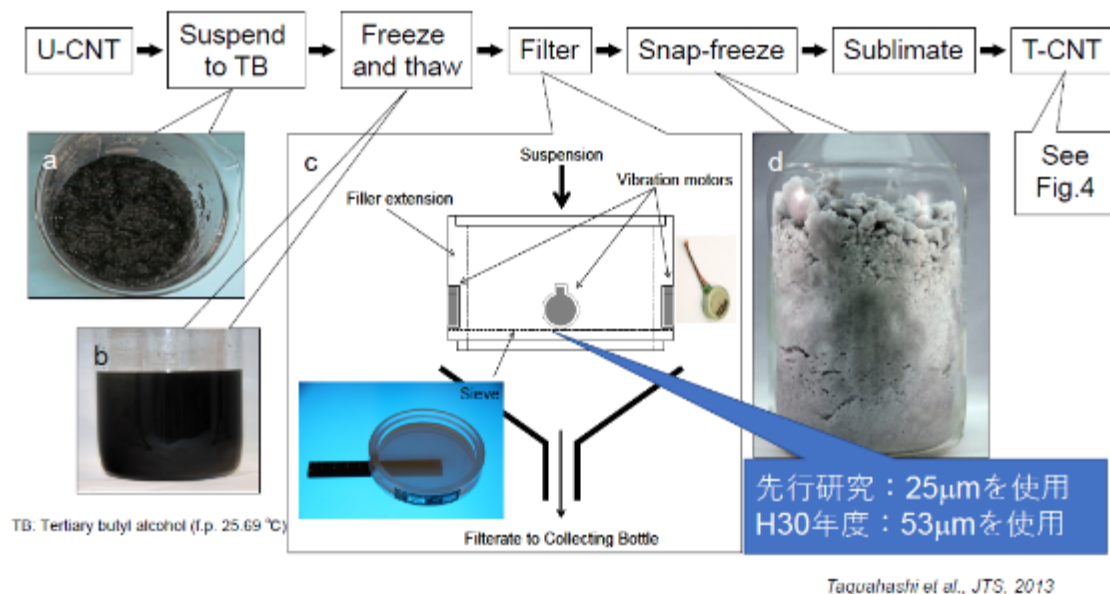


図1 Taquann法の概要

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 2年間間欠吸入曝露実験の群構成

Group	Examinations	Necropsy after inhalation exposure			
		N	6M	12M	24M
Control 0 mg/m ³ 6hr/D/4Wx26times	· Lung Burden	9	3	3	3
	· Histopathology(perfusion)	23	3	3	17
	· Immune function				
	BALF	18	6	6	6
	Pulmonary interstitium mRNA Spleen, Lymph node				
	Subtotal	50	Consist of two sub-groups, A&B		
MWNT-7 #53um Low Concentration Target Concentration: 3 mg/m ³ 6hr/D/4Wx26times	· Lung Burden	9	3	3	3
	· Histopathology(perfusion)	23	3	3	17
	· Immune function				
	BALF	18	6	6	6
	Pulmonary interstitium mRNA Spleen, Lymph node				
	Subtotal	50	Consist of two sub-groups, A&B		
MWNT-7 #53um H Target Concentration: 6mg/m ³ 6hr/D/4Wx26times	· Lung Burden	9	3	3	3
	· Histopathology(perfusion)	23	3	3	17
	· Immune function				
	BALF	18	6	6	6
	Pulmonary interstitium mRNA Spleen, Lymph node				
	Subtotal	50	Consist of two sub-groups, A&B		
Total number of animals		150			

表2 感染性免疫系への影響実験

Group	non-infected	infected
Control	9	12
Low Concentration	9	12
High Concentration	9	12

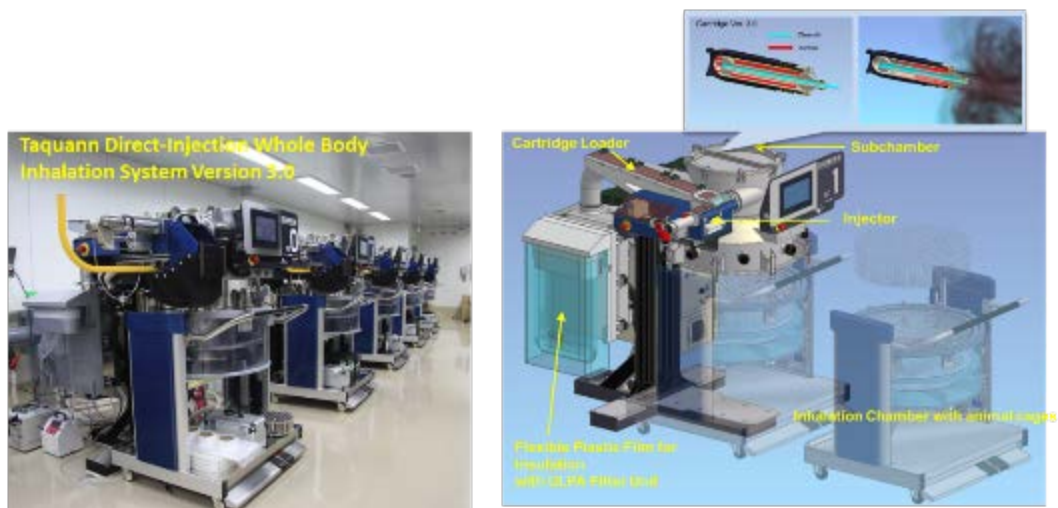


図2 Taquann 直噴全身吸入装置 Ver3.0

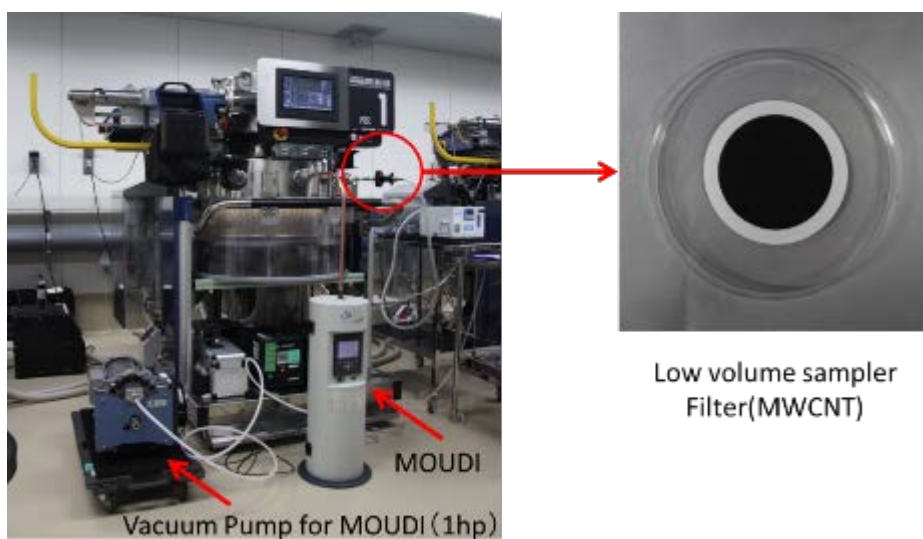


図3 エアロゾルモニタリングの概要

表3 2年間間欠吸入曝露実験のエアロゾル特性の測定結果

NANO-BI	Low Concentration	High Concentration
Mass Concentration(mg/m ³)	2.6±0.1	5.0±0.2
CPC (#/cm ³)	1,963	5,849
MMAD (nm)	314~3,436	339~4,788
σg	6.0~21.6	6.3~17.7

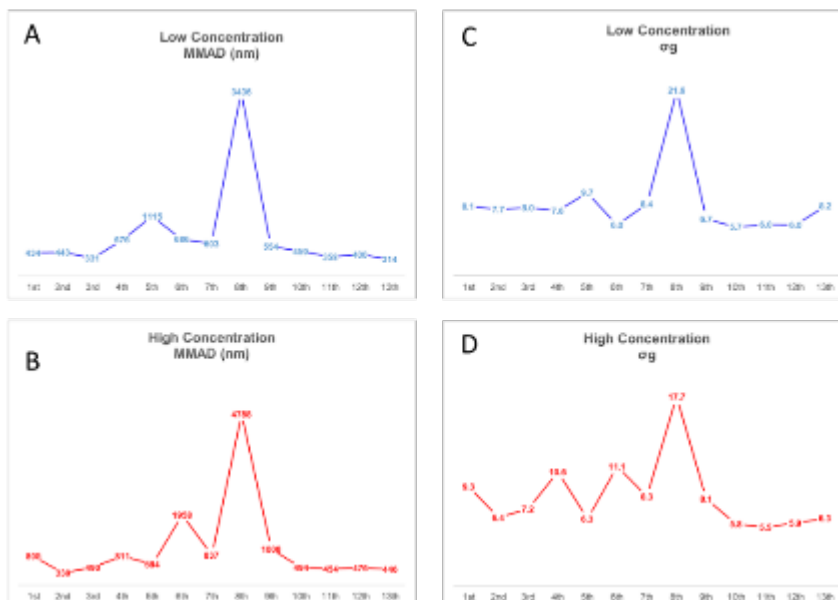
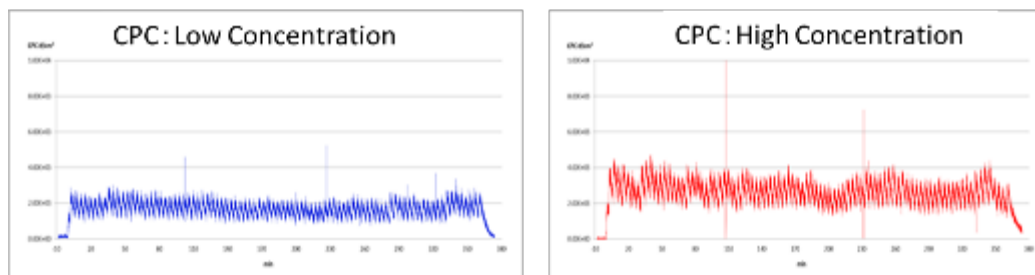


図4. MMAD のバラツキ

A: 低濃度群のMMAD、B:高濃度群もMMAD、C:低濃度群のσg、D:高濃度群のσg。

初回から13回曝露のデータを横並びにプロットしたグラフ。MMADには約10倍の開きがあった。原因は不明であるが、大きな値を示した場合には、MOUDの検体を補足するプレート以外の場所に検体の付着する、いわゆるバウンディングが多く認められた。この場合、σgも大きな値を示しており、本来の値を反映していないと考えられた。

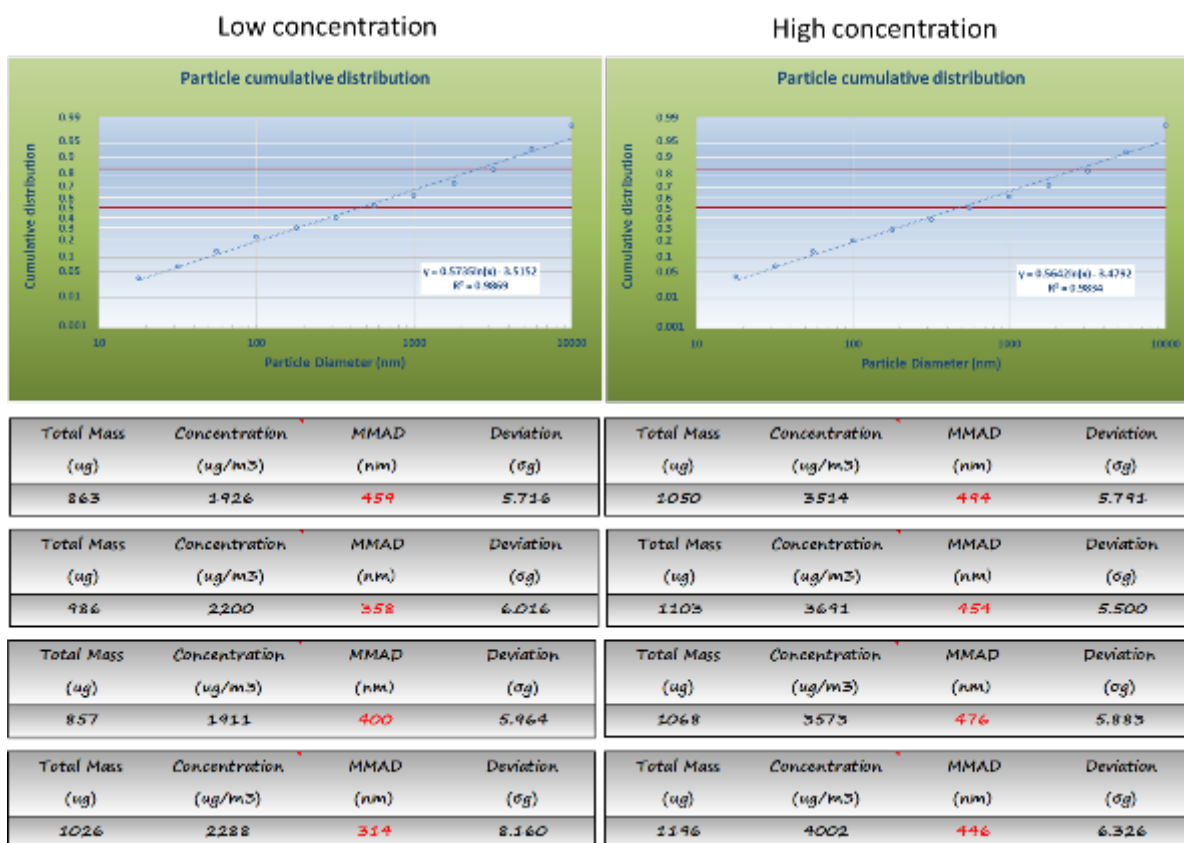


図 5. σg が小さい場合の MMAD のデータ

σgが比較的小さい値を示した場合のMMADの値から、Taquann全身曝露吸入装置ver 3.0におけるT-CNT7#53の値は400~500nmと考えられた。

表4 感染性免疫系への影響実験のエアロゾル特性結果

NANO-BL	Low Concentration	High Concentration
Mass Concentration(mg/m ³)	2.8±0.1	5.2±0.1
CPC (#/cm ³)	3,288	6,067
MMAD (nm)	372	466
σg	7.0	6.7

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

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

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

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

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

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

研究協力者:横田 理 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 主任研究官

研究協力者:栞形 麻樹子 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 室長

研究協力者:高橋 祐次 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 室長

研究要旨

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

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

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

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

A. 研究目的

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

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

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

B. 研究方法

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

B-1. 検体

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

定値である。

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

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

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

B-2. マウス全身曝露吸入実験

1) 動物

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

2) 群構成

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

3) 吸入曝露実験装置

T-CNT7#53 のエアロゾル化は、既設

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

B-3. 解剖

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

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

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

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

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

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

倫理面への配慮

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

B-4. 肺負荷量測定

1) 肺サンプルからのT-CNT7#53の抽出

肺の溶解液は 5w/v% 水酸化カリウム(富士フィルム和光純薬、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) T-CNT7#53の測定

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

(1) 装置、器具及び試薬

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

(2) 試薬

- ① アセトニトリル(HPLC 用、富士フィルム和光純薬)

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:ウオーターズ Acquity UPLC

カラム: Acquity BEH C18 (ウオーターズ)

カラム粒径、長さ × 内径:1.7 μm、100 mm × 2.1 mmφ

カラム温度: 40°C

検出器:蛍光検出器(励起波長: 294 nm、蛍光波長: 410 nm)

試料注入量: 5 μL

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

移動相流量: 0.5 mL/min

(4)検量線原液の調製

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

②検量線溶液 C5 の調製

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

③検量線溶液 (C1~C5)の調製

(3)①項で調製した検量線溶液 C5 を採取し、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。

④マーカ溶液の調製

200 mL 容のメスフラスコに Benzo[ghi]perylene(BgP)マーカ約 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、マーカ溶液とした。

(5)試料の前処理と HPLC による測定

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

(6) 肺内の T-CNT7#53 の沈着量の計算

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

B-5. 病理組織学的評価

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

B-6. BALF 細胞の染色

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

C. 研究結果

C-1. マウスの肺病理組織検査

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

C-2. 肺の病理組織学的評価

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

肺内に吸入された T-CNT7#53 のほとんどは、終末気管支内および肺胞管への移行部(中間帯)に存在しており、この領域の既存の線維成分が反応性に増殖していたが、その程度は対照群(図1)に比して軽微であった(図2)。大部分の T-CNT7#53 は大小の凝集体を形成し、大型の凝集体は複数のマクロファージに取り囲まれて存在していた。小型の凝集体は単一のマクロファージに貪食されており、そのうち、やや大型の凝集体については多核化したマクロファージが貪食する像も認められた。これら貪食マクロファージが終末細気管支に近い肺胞内に集簇する像(以下、肺胞内集簇巣)を認めた(図3)。末梢の肺胞領域には少数ながら、単一乃至少数の T-CNT#53 線維を貪食したマクロファージが散在する像を認めた(BALF 後の検体の為、定量性は保証されない所見であると考え)。また、T-CNT7#53 線維が貪食されずに肺を構成する細胞に刺さった像、肺胞壁に付着したような像も観察された(電子顕微鏡による確認予定)。本曝露条件下では、肉眼的、或いは光学顕微鏡弱拡大像において T-CNT7#53 の線維が明らかに凝集して

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

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

D. 考察

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

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

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

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

6 ヶ月の時点における肺の病理組織学的評価は BALF を採取した後の肺であるため、本来の病理組織像を必ずしも反映しているとは限らないが、洗浄により変化しない器質的変化である、明確な肺胞構造の改変や線維性肉芽腫形成は認められなかった。肉眼的、或いは、弱拡大顕微鏡観察において T-CNT#53 線維の凝集体が黒色班として観察されなかったことから、肺内には高分散状態で吸入されたことがうかがわれた。このような高分散状態である検体の場合には、肉芽腫の誘発能が低いことが考えられた。今後、12 ヶ月の病理標本を観察し、慢性影響を更に明らかにする計画である。

E. 結論

Taquann 全身曝露吸入装置 Ver.3.0 を用いての T-CNT7#53 の 2 年間の間欠吸入曝露実験を実施中であり、6 ヶ月並びに 12 ヶ月の中間定期解剖において得られた肺における T-CNT7#53 の肺負荷量の測定、曝露肺の病理組織学的評価(6 ヶ月)、BALF から得られた細胞の観察(12 ヶ月)を行った。その結果、肺負荷量平均値は L 群、H 群それぞれ、6.4 ±1.1 µg/動物、15.2 ±1.0 µg/動物であった。肺内に吸入されたほとんどの T-CNT7#53 は、終末気

管支内および肺胞管への移行部(中間帯)に存在しており、この領域の既存の線維成分が反応性に増殖していた。肺胞内集簇巣が認められたが線維成分の増加、及び隣接する肺胞構造に大きな変化は確認されず、貪食マクロファージの集簇巣であった。結論として、曝露後6ヵ月では、曝露肺に明確な線維性肉芽腫の形成は認められなかった。

謝辞:

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

F. 参考文献

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

G. 研究発表

1. 論文発表

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

Kobayashi K, Kuze J, Abe S, Takehara S, Minegishi G, Igarashi K, Kitajima S, Kanno J, Yamamoto T, Oshimura M, Kazuki Y.: CYP3A4 Induction in the Liver and Intestine of Pregnane X Receptor/CYP3A-Humanized Mice: Approaches by Mass Spectrometry Imaging and Portal Blood Analysis. *Mol Pharmacol*, 96(5): 600-608, 2019

Abdelgied M, El-Gazzar AM, Alexander DB,

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

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

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

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

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

- Schubauer-Berigan MK, Hall AL, Grosse Y, Bouvard V, Benbrahim-Tallaa L, Ghissassi FE, Lauby-Secretan B, Armstrong B, Saracci R, Zavadil J, Straif K, Wild CP. The IARC Monographs: Updated procedures for modern and transparent evidence synthesis in cancer hazard identification. *J Natl Cancer Inst.* 2020 Jan 1;112(1):30-37.
- Marques MM, Berrington de Gonzalez A, Beland FA, Browne P, Demers PA, Lachenmeier DW, Bahadori T, Barupal DK, Belpoggi F, Comba P, Dai M, Daniels RD, Ferreccio C, Grigoriev OA, Hong YC, Hoover RN, Kanno J, Kogevinas M, Lasfargues G, Malekzadeh R, Masten S, Newton R, Norat T, Pappas JJ, Queiroz Moreira C, Rodríguez T, Rodríguez-Guzmán J, Sewram V, Zeise L, Benbrahim-Tallaa L, Bouvard V, Cree IA, El Ghissassi F, Girschik J, Grosse Y, Hall AL, Turner MC, Straif K, Korenjak M, McCormack V, Müller K, Schüz J, Zavadil J, Schubauer-Berigan MK, Guyton KZ. (Collaborators). Advisory Group recommendations on priorities for the IARC Monographs. *Lancet Oncol.* 2019, 20:763-764.
2. 学会発表
- 小野 竜一, 相崎 健一, 北嶋聡, 菅野 純、Percellome プロジェクトから見えてきたエピジェネティクス影響、第 46 回日本毒性学会学術年会(2019.6.26.)
- 菅野 純、北嶋聡, 相崎 健一, 小野 竜一、Percellome トキシコゲノミクスのエピジェネティクス基盤 —「新型」反復曝露試験の解析—、第 46 回日本毒性学会学術年会(2019.6.28.)
- 夏目 やよい, 相崎 健一, 北嶋聡, Samik GOSH, 北野 宏明, 水口 賢司, 菅野 純、Garuda プラットフォームによる多角的毒性予測、第 46 回日本毒性学会学術年会(2019.6.28.)
- 種村 健太郎, 北嶋聡, 菅野 純、低用量化学物質の周産期ばく露による情動認知行動毒性～子どもの毒性学に向けた評価系開発の現在～、第 46 回日本毒性学会学術年会(2019.6.28.)
- 種村健太郎、北嶋聡、菅野純「発生期マウスへの神経シグナル異常による成熟後の神経行動毒性発現～海産毒による異常誘発モデルとしての検討～」第46回日本毒性学会学術年会(2019.6.26-28)徳島市
- Yayoi Natsume-Kitatani, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Samik Ghosh, Hiroaki Kitano, Kenji Mizuguchi, Jun Kanno. Cross Talks among PPARα, SREBP, and ER Signaling Pathways in the Side Effect of Valproic Acid、IUTOX 15th International Congress of Toxicology (ICT 2019) (2019.7.16.)
- Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Kentaro Tanemura. The Concept of “Signal Toxicity” for the Mechanistic Analysis of So-Called Low Dose Effect and Delayed Effect after Perinatal Exposure.、IUTOX 15th International Congress of Toxicology (ICT 2019)] (2019.7.17.)
- Yuhji Taquahashi, Satoshi Yokota, Koichi Morita, Masaki Tsuji, Akihiko Hirose and Jun Kanno, Improved aerosol generation method and newly designed whole body rodent inhalation apparatus for the testing of nanomaterials in human-relevant exposure scenario, 15th IUTOX International Congress of Toxicology (ICTXV), Hawaii Convention Center, Honolulu, Hawaii, USA, July 16, 2019, Poster
- J. Kanno, Y. Taquahashi, A. Hirose., Improved aerosol generation method and newly designed whole body rodent inhalation

apparatus for the testing of nanomaterials. EUROTOX 2019(55th Congress of the European Societies of Toxicology) (2019.9.10), Helsinki, Finland, Poster.

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

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

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

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

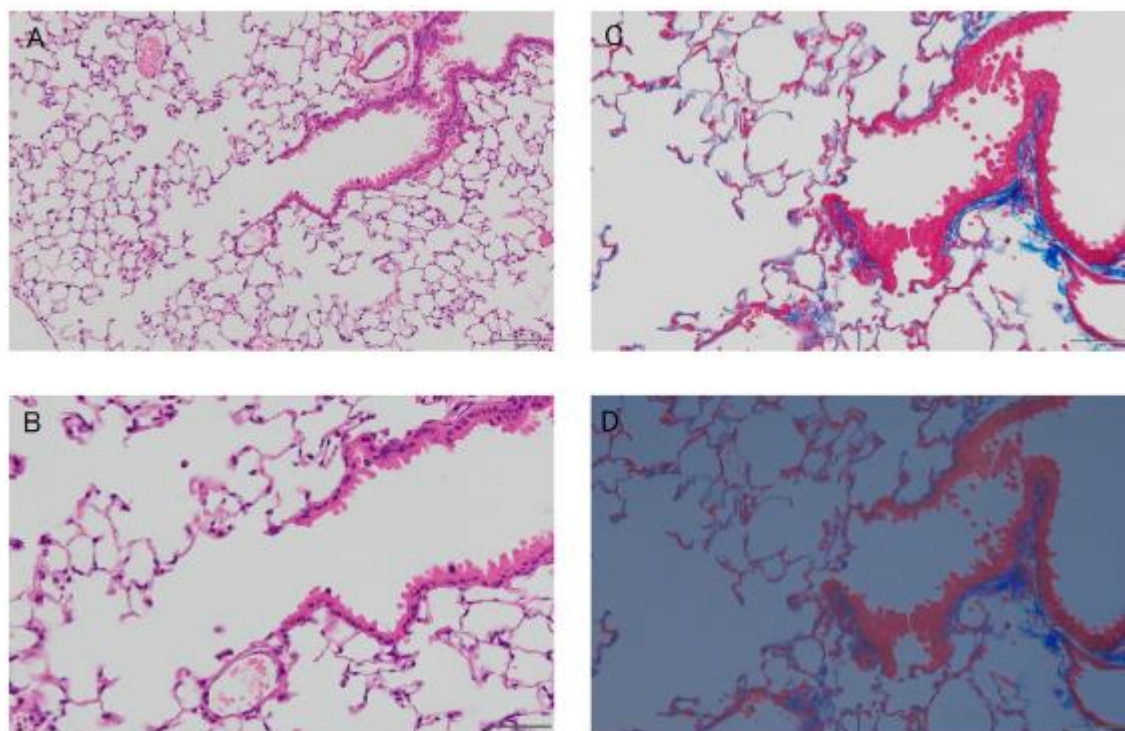
H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

表1 曝露6ヵ月の肺負荷量

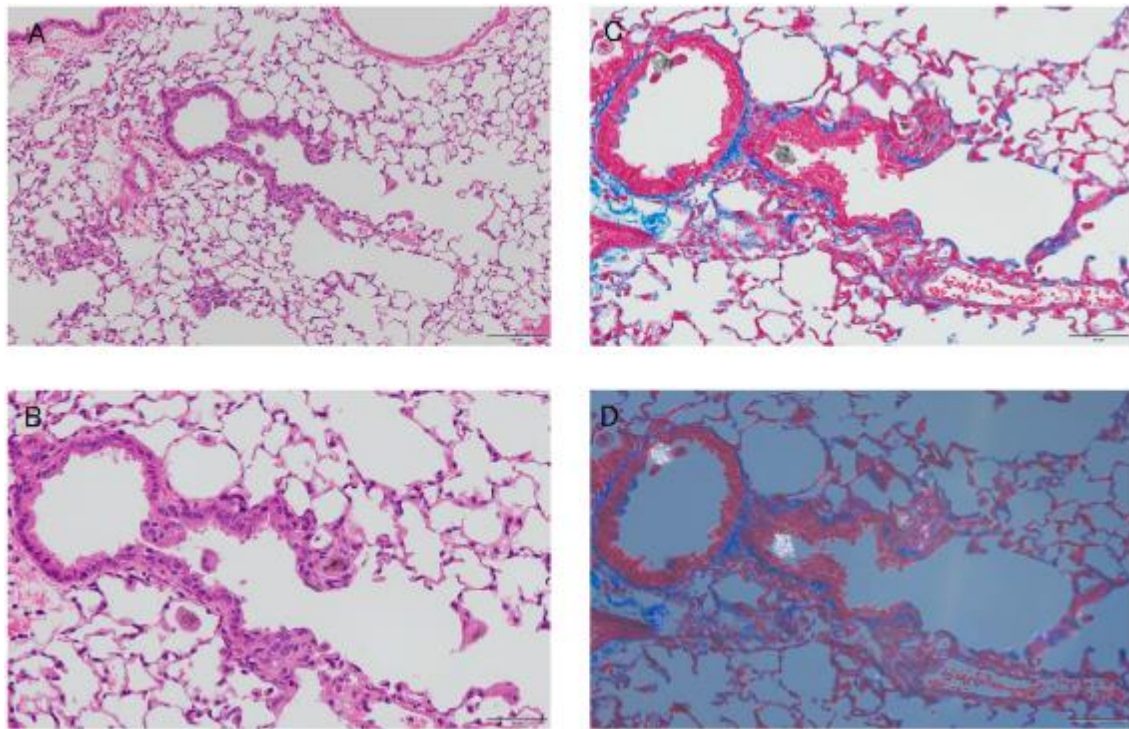
Group	Concentration (mg/m ³)	Lung weight (mg)	Lung Burden (μg/lung)
Control	0.0 ± 0.0	161.6 ± 5.4	0.0 ± 0.0
Low Concentration	2.6 ± 0.1	178.4 ± 9.2	6.4 ± 1.1
High Concentration	5.0 ± 0.2	206.5 ± 15.1	15.2 ± 1.0

図1 曝露6ヵ月の肺病理組織像 対照群



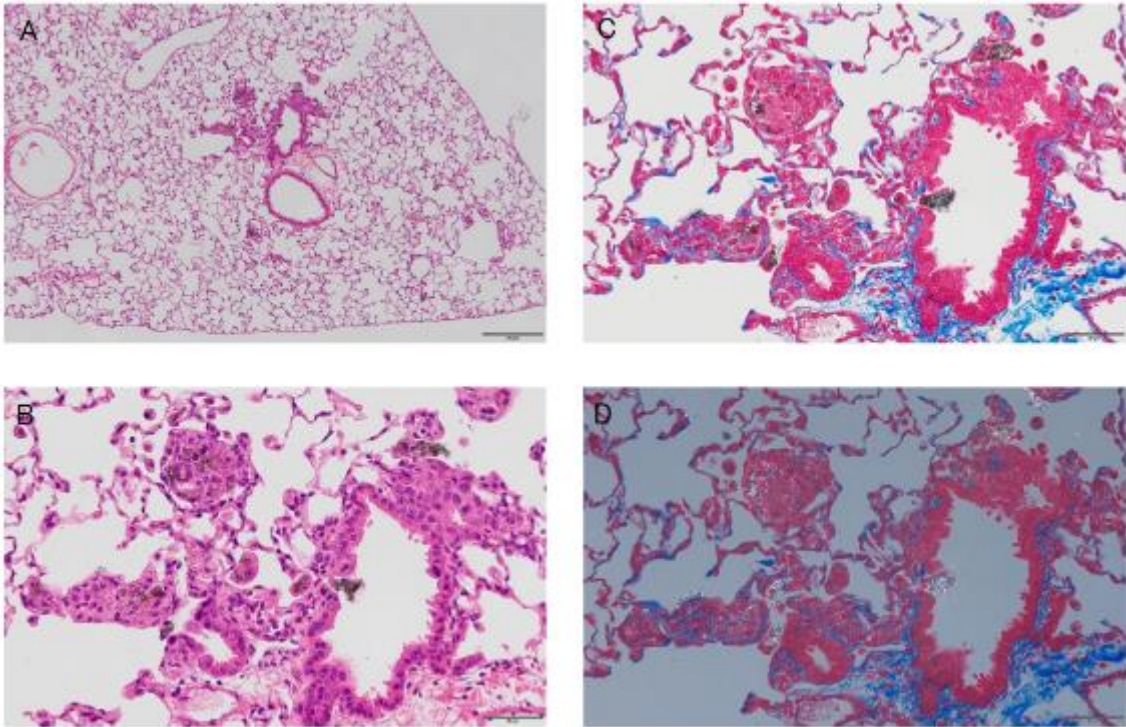
A:HE 染色(スケールバー:200μm)、B:HE 染色(スケールバー:50μm)、C:MT 染色(スケールバー:50μm)、D:C の組織像の偏光観察。

図2 曝露6ヵ月の肺病理組織像 低濃度群



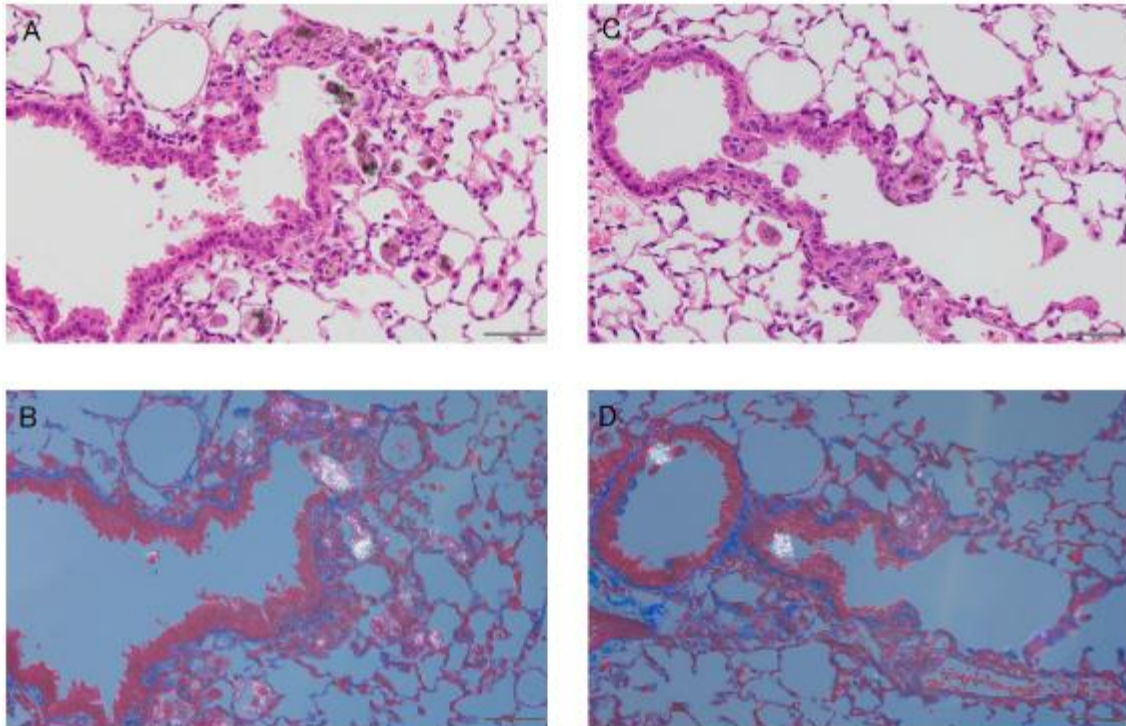
A: HE 染色(スケールバー:200 μ m)、B: HE 染色(スケールバー:50 μ m)、C: MT 染色(スケールバー:50 μ m)、D: C の組織像の偏光観察。肺内に吸入されたほとんどの MWNT-7 は、終末気管支内および肺胞管への移行部に存在しており、この領域の既存の線維成分が反応性に増殖していたが線維化の程度は弱かった。大部分の MWNT-7 は集簇したマクロファージに囲まれていたが、マクロファージに貪食されている像、MWNT-7 が肺を構成する細胞に刺さった像も観察された。

図3 曝露6ヵ月の肺病理組織像 高濃度群



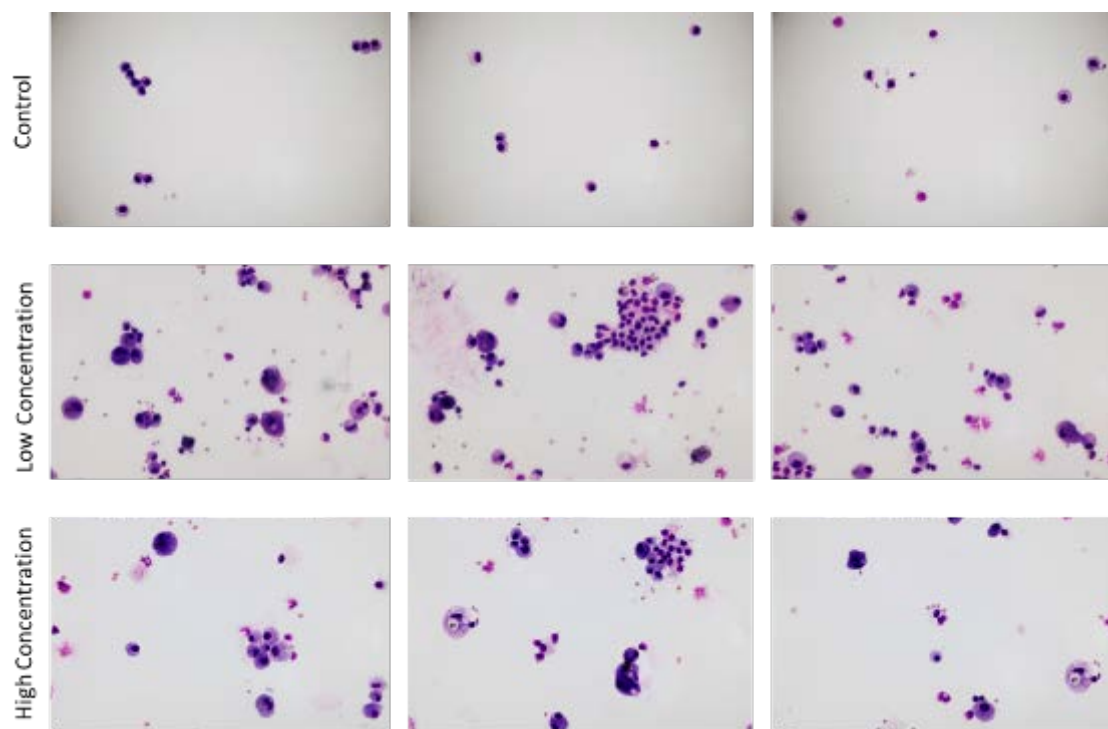
A: HE 染色(スケールバー:200 μ m)、B: HE 染色(スケールバー:50 μ m)、C: MT 染色(スケールバー:50 μ m)、D: C の組織像の偏光観察。MWNT-7 の量は低濃度群よりも高濃度群の方が多く、肺負荷量を反映した結果であった。HE 標本における観察では、貪食マクロファージが終末細気管支に近い肺胞内に集簇する像(肺胞内集簇巣)を認めた(B)。MT 染色では肺胞内集簇巣内に線維性分は確認されず、近接する肺胞組織の改編も明らかではなかったことから、線維性肉芽腫形成とは判定せず貪食マクロファージの集簇像と考えた(D)。

図4 曝露6ヵ月の肺病理組織像 低濃度群と高濃度群の比較



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

図 5. 曝露 12 ヶ月の BALF から得られた細胞の比較



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

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

研究課題名: 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: 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 生活衛生化学部 室長
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
広瀬 明彦 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部 部長

研究要旨

ナノマテリアルの呼吸器毒性の評価として、これまでの研究により、MWCNT (MWNT-7) 分散液の調製方法 (分散状態) によって、毒性試験結果に差が見られる 1)~3) ことから、今年度は、東京都健康安全研究センターにおいて実施する長期の反復気管内投与試験の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) による二次粒子径を分析した。

一方、ナノマテリアルの毒性試験における試料の調製方法とその計測方法の標準化について、OECD のナノマテリアル作業部会 (WPMN) においても議論が続けられている。

WPMN において我が国は、短期間 *in vivo* 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を提案していることから、令和元年 12 月に OECD 会議センターにおいて開催された WPMN に参加して最新の国際動向を収集した。

DLS による MWCNT 分散液試料の測定の結果、1 回目の測定における散乱強度の平均は 720 nm であったが、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は、測定毎に粒径分布が大きくなる側にシフトする傾向が見られた。

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一方で、OECD においては、繊維の粒径分布の測定として DLS は推奨されておらず、粒子としての粒径分布の測定に DLS は有効であるとしている。また、測定にあたって、試料の安定性及び繰り返し測定の再現性が重視されている。本研究における測定は、測定毎に粒径分布の変化が見られたことから、OECD のテストガイドライン案で提案されている条件を満たすものではなかった。今後、粒径分布を測定する上では、より安定的な結果を得るために、測定中に沈殿が生じない媒体及び調製方法を検討する必要があると考えられる。

A. 研究目的

ナノマテリアルの呼吸器毒性の評価として、これまでの研究により、MWCNT (MWNT-7) 分散液の調製方法 (分散状態) によって、毒性試験結果に差が見られる^{1)~3)}ことから、今年度は、東京都健康安全研究センターにおいて実施する長期の反復気管内投与試験の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) による二次粒子径を分析した。動的光散乱法 (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 (図 1)。DLS によるサンプルの観察は、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重要と考えられる。

一方、ナノマテリアルの毒性試験における試料の調製方法とその計測方法の標準化について、OECD のナノマテリアル作業部会 (WPMN) においても議論が続けられている。

WPMN において我が国は、短期間 in vivo 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を提案していることから、令和元年 12 月に OECD 会議センターにおいて開催された WPMN に参加して最新の国際動向を収集した。

B. 研究方法

i) MWCNT 分散液の調製及び DLS の測定

MWCNT 試料を 0.1% Tween 80 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。

測定に当たっては、MWCNT 濃度 0.5mg/mL の試料を PBS で 50 倍希釈 (0.01 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、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) 国際動向の調査

令和元年 12 月 15 日~令和元年 12 月 20 日にかけて OECD 会議センター (パリ、フランス) において開催された工業ナノ用材料の安全性評価に関するワーキンググループの各作業プログラムのロードマップ会議に参加し、ナノマテリアル評価の為のガイドライン作成及び改訂に関する各種プロジェクトの進捗状況について最新動向の情報収集を行った。

C. 研究結果

i) MWCNT 分散液の調製及び DLS の測定

MWCNT 分散液試料の DLS 測定結果を図 2 に示す。1 回目の測定における散乱強度の平均は 720 nm であったが、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は、測定毎に粒径分布が大きくなる側にシフトする傾向が見られた。

ii) 国際動向の調査

令和元年 12 月に開催された WPMN に合わせて、粒径分布測定に関する専門家会合が併せて開催された (WPMN and Joint Expert Group Meetings, Meeting of the JOINT EXPERT GROUP WNT-WPMN on Physical Properties of NMs; WNT Project 1.4 - TG on Particle size distribution)。

この会合の中で、現在 WPMN において作成中である「ナノマテリアルの粒径及び粒径分布のテストガイドライン案」(TEST GUIDELINE ON PARTICLE SIZE AND PARTICLE

SIZE DISTRIBUTION OF MANUFACTURED NANOMATERIALS [DRAFT]) について議論が行われた。

このテストガイドライン案では、ナノマテリアルを「粒子」と「繊維」に分けて、それぞれに対して適切な粒径分布の測定手法とその手順について示している。

直径 1~1000 nm の範囲の「粒子」に関しては、以下の 8 つの計測手法が適用できると記載している。

- 電子顕微鏡 (EM)
- 動的光散乱法 (DLS)
- 遠心液体沈殿法 (CLS)
- 粒子トラッキング分析法 (PTA)
- 微分型電気移動度分級器 (DMAS)
- 原子間力顕微鏡 (AFM)
- 単一粒子誘導結合プラズマ-質量分析法 (sp ICP-MS)
- 小角 X 線散乱法 (SAXS)

一方、「繊維」に関しては、透過型電子顕微鏡 (TEM) と走査型電子顕微鏡 (SEM) のみが、粒径分布を測定できる唯一の方法であると結論している。

また、本研究で用いた DLS の測定およびデータ解析に当たっては、以下の注意点が記載された。

- 測定中に沈殿が生じない調製方法を検討すること
- 少なくとも 2 濃度で 3 試料を測定し、平均値を採用する
- 濃度により測定結果に違いみられた場合、変化が見られなくなるまで希釈して再測定する

- 測定中に沈殿がみられた場合、安定な状態で再測定する

D. 考察

昨年度の研究では、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。

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、光顕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。

一方、OECD においては、繊維の粒径分布の測定として DLS は推奨されておらず、粒子としての粒径分布の測定に DLS は有効であるとしている。また、測定にあたって、試料の安定性及び繰り返し測定の再現性が重視されている。本研究における測定は、測定毎に粒径分布の変化が見られたことから、OECD のテストガイドライン案で提案されている条件を満たすものではなかった。今後、粒径分布を測定する上では、より安定的な結果を得るために、測定中に沈殿が生じない媒体及び調製方法を検討する必要があると考えられる。

E. 結論

ナノマテリアルの粒子径をDLSで測定する場合には、現在、OECDにおいて作成中のガイドライン案に従い、以下の事項に留意して測定を行う必要があると考えられる。

- 測定中に沈殿が生じない調製方法を検討する
- 少なくとも2濃度で3試料を測定し、平均値を採用する
- 濃度により測定結果に違いみられた場合、変化が見られなくなるまで希釈して再測定する
- 測定中に沈殿がみられた場合、安定な状態で再測定する

F. 参考文献等

- 1) 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)
- 2) 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)

- 3) 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)

G. 研究発表

なし

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)

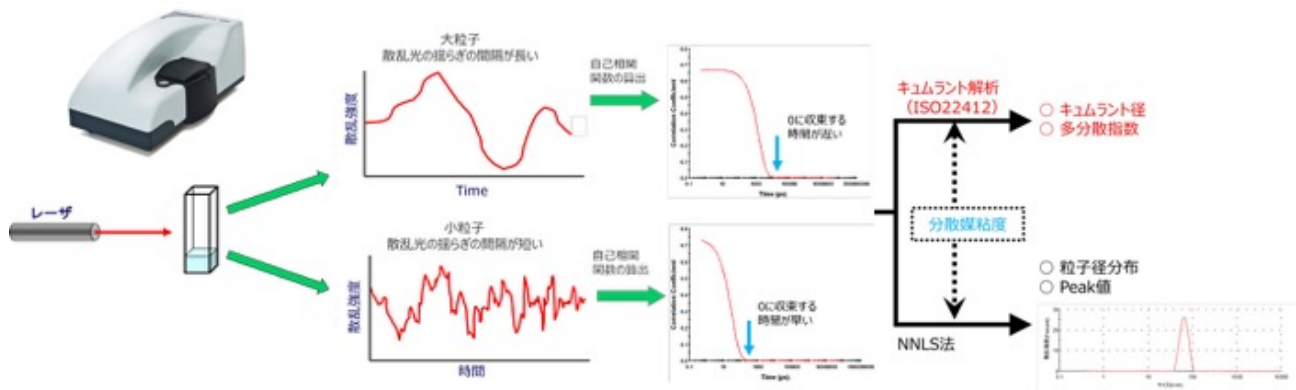


図 1 : 動的光散乱法の原理

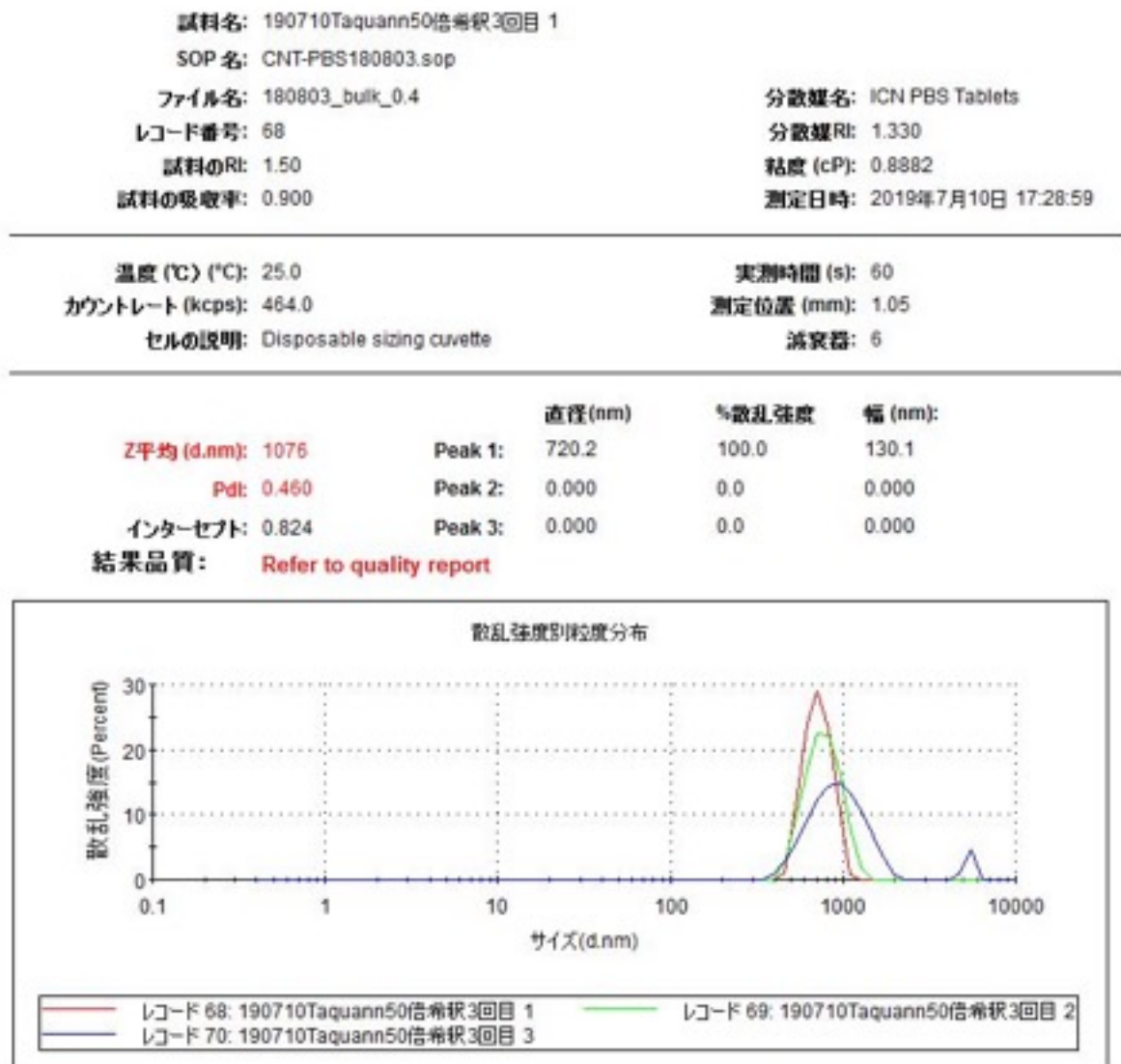


図 2 : DLS の測定結果

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:	広瀬 明彦	国立医薬品食品衛生研究所	安全性予測評価部	部長
研究分担者:	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:	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:	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:	中江 大	東京農業大学	応用生物科学部	教授
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:	山本 行男	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:	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:	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:	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¹⁾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。昨年度末から、2年間にわたり気管内投与を間欠的に行う長期試験(合計26回の投与)を実施中であり、今年度は、実験開始から半年経過後および1年経過後の経過観察について報告する。

F344雄性ラットを、対照群(C群)、低用量群(L群)、高用量群(H群)および高用量スプレー式ゾンデ群(HS群)の4群に分け、動物数はそれぞれ30、55、55および55匹とした。9週齢から、C群には0.1%Tween含有生理食塩水を、L群には0.125 mg/kg体重、H群およびHS群には0.5 mg/kg体重の用量でMWCNT-7を4週間毎に1回、気管内に投与した。投与にはHS群のみスプレー式ゾンデを用い、その他の群は経口ゾンデを用いた。投与開始から半年経過後(7回投与後)と1年経過後(13回投与後)に、病理組織学的検索および気管支肺胞洗浄液分析用に4ないし5匹、肺負荷量測定用に4ないし5匹を、それぞれ剖検した。

肺重量、BALF中の総細胞数・好中球数・リンパ球数およびBALF中の総タンパク質は、C群に比べて、各投与群で有意に増加し、用量依存的な増加、さらに経時的な増加が認められた。これらの評価項目についてH群とHS群を比較すると、1年経過後には、わずかにH群での影響が強かった。組織学的には、半年経過後、1年経過後のいずれについても、MWCNT繊維の沈着やMWCNTを貪食したマクロファージの凝集が肺実質でびまん性

に認められ、MWCNT の沈着部位に関連して、II 型肺胞上皮細胞の反応性過形成が認められた。反応性過形成は、投与用量に依存して増加したが、経時的な増加は L 群のみで見られた。肺腫瘍は認められず、細気管支肺胞上皮過形成が 1 年経過後の L 群と HS 群で 1 例ずつ確認されたのみであった。胸腔内に中皮腫は観察されなかったが、中皮組織の炎症反応が半年経過後から観察され、特に、1 年経過後には多くの個体で横隔膜や心嚢膜における炎症反応が見られ、繊維の胸腔内への移行が示唆された。肺負荷量は、1 年経過時点において L 群で 250 μ g/Lung 程度、H 群および HS 群では 1500 μ g/Lung 程度であった。負荷量としては、すでに、Kasai ら¹⁾ の報告の実験終了時に近い量となり、肺腫瘍の発症が期待されるレベルまで蓄積していることがわかった。

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¹⁾、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。

気管内投与法による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、肺腫瘍に加え胸腔内に中皮腫が発症することを報告した²⁾。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 μ g/Lung を超えているが^{1),2)}、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¹⁾、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 の形状となった (図 1)^{2),3)}。ヒトのアスベスト中皮腫と同様に、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³⁾。なお、2019 年には Nuano らが、反復気管内投与により 1 匹あたり合計 1500 μ g の MWNT-7 を曝露した後に 2 年間経過観察する実験を行った⁴⁾。その結果、5%の動物に肺腫瘍が、95%の動物に胸膜中皮腫が発生し、気管内投与により初期に投与負荷を高くすると胸膜中皮腫が発症することが明確に示された。

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 らの結果と同程度以上の肺負荷量を達成できるように投与量を設定した。この試験で得られる結果を、Kasai らの吸入試験¹⁾ と Suzui ら²⁾ や Numano ら⁴⁾ の気管内投与試験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できる (図 1)。

現在、昨年度の条件検討から設定した実験条件、すなわち、低用量群に 0.125 mg/kg 体重、高用量群に 0.5 mg/kg 体重の用量で 4 週間に 1 度、2 年間で合計 26 回の気管内投与を行う長期試験を実施中である。肺負荷量は、実験終了時に低用量群で 600 $\mu\text{g}/\text{Lung}$ 前後に、高用量では 2400 $\mu\text{g}/\text{Lung}$ 前後になることが予測される (図 2)。

今年度は、実験の経過観察を目的として、投与開始から半年経過後および 1 年経過後に少数例の剖検を行い、慢性毒性と MWCNT の肺負荷量を評価した。

B. 研究方法

i) MWCNT の調製およびキャラクタリゼーション

Taquann 処理 (53 μm メッシュ)⁵⁾した MWNT-7 を 200 $^{\circ}\text{C}$ で 2 時間処理し、0.1% Tween80 (ポリソルベート、日油) 含有生理食塩水を加え超音波浴槽で 30 分以上分散させた。低用量群の試料は 0.125 mg/mL、高用量群の試料は 0.5 mg/mL の濃度にそれぞれ調製した。

投与試料のキャラクタリゼーションとして、0.01 mg/mL の濃度で分散させた試料について、動的光散乱 (DLS) により二次粒径分布を (小林の分担報告参照)、走査電子顕微鏡 (SEM) により繊維長の分布を、それぞれ解析した。

ii) 動物飼育および投与

5 週齢の F344/DuCr1Cr1j の雄性ラットを購入し (日本チャールス・リバー)、コンベンショナル飼育室にて、床敷 (アルファドライプラス、ESP 益新) 入りのプラスチック製ケージに 3 匹ずつ収容し、基礎飼料 CE-2 (日本クレア) と、限外ろ過した水道水を自由摂

取させ、室温 24 \pm 1 $^{\circ}\text{C}$ 、湿度 50 \pm 5%、換気回数毎時 10 回 (HEPA フィルター経由)、12 時間蛍光灯照明の条件下で飼育した。

7 週齢の時点で、対照群 (C 群) 30 匹、低用量群 (L 群) 55 匹、高用量群 (H 群) 55 匹および高用量スプレーゾンデ群 (HS 群) 55 匹の 4 群に分けた (図 3)。1 週間に一度、体重を測定した。

9 週齢から、イソフルラン吸入麻酔下で、C 群、L 群および H 群については経口ゾンデ (夏目製作所) を、HS 群についてはスプレー式ゾンデ (PennCentury) をそれぞれ用いて、1 mL/kg 体重の投与量で 4 週間に 1 度の頻度で反復気管内投与を行った。MWCNT の投与用量は、L 群で 0.125 mg/kg 体重、H 群および HS 群で 0.5 mg/kg 体重となる (図 3)。

iii) 剖検

半年経過後 (7 回投与後)、また、1 年経過後 (13 回投与後) に、各群 5 匹を病理組織観察および気管支肺胞洗浄液 (BALF) 回収用に、別の 5 匹を MWCNT の肺負荷量測定用に、それぞれ解剖した (図 3)。ただし、C 群については肺負荷量測定は行わず、各時期に 5 匹ずつ剖検した。

各群 5 匹については、主要臓器を 10% 中性緩衝ホルマリン溶液で固定した。ただし、肺は右葉については PBS を注入して BALF を回収した後に、左葉については湿重量を測定した後に、それぞれホルマリン溶液を注入して固定した。BALF は遠心分離し、沈殿は白血球数の計数に、上清は総タンパク質量の測定に用いた。

一方、MWCNT 投与群の肺負荷量測定用の 5 匹については、各葉を切り離し、ホルマリン溶液に浸漬してからおよそ 1 か月後に解析

に用いた。

iv) 病理組織学的解析

固定した臓器から、定法により HE 染色標本を作製し、光学顕微鏡による病理組織検索を行った。II 型肺胞上皮細胞の反応性過形成を定量化するため、抗 TTF-1 抗体（アブカム；ab72876）で染色した各群 3 例の左葉の 10 枚の肺胞領域の画像に関して、ImageJ により視野あたり ($23444 \mu\text{m}^2$) の DAB 陽性細胞核を計数した。

v) BALF の分析

BALF の沈殿を 2% の BSA 含有 PBS で再懸濁し、チュルク液で染色後に総細胞数の計測を行った。また、再懸濁液から自動遠心塗抹装置によって塗抹標本を作製し、メイグリュンワルド・ギムザ染色し、白血球を分類・計数し、各種の白血球の個数を算出した。

BALF の上清の総タンパク質量は、2-D Quant Kit (GE ヘルスケア) により測定した。

vi) 肺負荷量の測定

肺内の MWCNT の測定は、Ohnishi らの蛍光マーカーを用いて検出する手法 (大西法) に従った^{6),7)}。肺組織をアルカリ溶液で溶解し、十分に分散させ、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 繊維を捕捉してから、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。

< 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) 投与試料の性状

DLS による二次粒子径は、平均 720.2 nm であった (図 4; 詳細は小林の分担報告書に掲載)。いっぽう、SEM による、繊維長の分布は、2841 本の繊維を観察した結果、平均 $6.03 \pm 3.9 \mu\text{m}$ であった (図 4)。いずれの結果も、既報の同様の実験結果と類似するものであった。

ii) 体重および解剖動物数

実験開始時、平均 206.5 g だった体重は 1 年後には 400 g 前後まで増加した。1 年後の C 群、L 群、H 群および HS 群の平均体重は、それぞれ、 $406.5 \pm 24 \text{ g}$ 、 $398.9 \pm 24 \text{ g}$ 、 $391.0 \pm 22 \text{ g}$ および $391.7 \pm 21 \text{ g}$ であり、C 群に対し、H 群、HS 群の体重は有意に低下していた。

1 年経過時点で、合計 70 例を解剖した (表 1)。半年経過後および 1 年経過後の計画解剖では合計 65 匹を、死亡あるいは人道的エンドポイント (瀕死解剖) により 5 例を途中解剖した。半年後と 1 年後の計画解剖の合計数は 70 例の予定であったが、途中解剖動物で肺負荷量の測定を代用できることから、定期解剖の数は 65 匹に変更した。途中解剖の動物に、肺腫瘍及び中皮腫は認められなかった (表 1)。

iii) BALF の生化学および細胞学的解析

BALF 上清の総タンパク質量は、C 群に対し、各投与群で有意に上昇し、また、半年経過後に比べて 1 年経過後のほうが高値であった (図 5)。

BALF の沈殿の総細胞数や、好中球数・リンパ球数・マクロファージ数等の各分画についても、C 群に対して投与群で有意な増加を認め、用量依存性的および時間依存性的な増加が見られた (図 5)。

iv) 病理組織学的解析

肺の左葉の湿重量は、半年経過後・1 年経過後、どちらについても、C 群に対して有意に増加しており、特に、L 群よりも H 群および HS 群での増加が顕著であった (図 6)。また、投与群に関しては、半年経過後よりも 1 年経過後のほうが重量が大きかった。

肉眼的に、投与群の肺は MWCNT の沈着により黒色を呈し、投与用量と解剖時期に応じて色味は強かった (図 7)。ただし、経口ゾンデを用いた L 群および H 群については、MWCNT の沈着が尾側に偏ることが多く、頭側先端部の沈着が極端に少ない個体も認められた (図 8)。また、群によらず、右葉の中葉では沈着量が比較的少なかった (図 7, 8)。HS 群においては、すべての動物に気管分岐部の付近に複数個の黒色斑が認められた (図 7; 矢印)。これは昨年度報告したように、スプレー式ゾンデの先端が位置する気管粘膜部位で局所的に沈着した MWCNT と考えられる。

組織学的には、1 年経過後までに、肺腫瘍・中皮腫は確認されず、肺実質における非腫瘍性の増殖性病変と中皮組織における炎症反応が主な所見であった (表 2)。

各投与群において、肺実質にびまん性に

MWCNT 繊維を貪食したマクロファージの凝集および線維化を伴う肉芽腫様の炎症反応が認められた (図 9)。また、MWCNT 繊維の沈着に関連した部位に反応性の II 型肺胞上皮細胞の過形成が見られた。抗 TTF-1 抗体による免疫染色により増生の程度を群間および経時的に比較したところ、用量依存性的な陽性核の増加を認めた (図 10)。いっぽう、経時的な増加は L 群のみで認められ、HS 群ではむしろ半年経過後よりも 1 年経過後のほうが有意に陽性核数が少なかった。

細気管支肺胞上皮過形成は、半年経過後には、C 群で自然発生性の 1 例を除き、認められなかったのに対し、1 年経過後には、MWCNT 投与に関連するとみられる過形成が、L 群に 1 例、HS 群に 1 例の合計 2 例認められた (表 2)。組織学的には、HS 群の 1 例は (図 11)、やや細胞の異形性が見られ、周囲への圧排がわずかにみられるものの、肺胞構造をある程度保った状態で間質をほとんど伴わないため、過形成と診断された。増生した細胞の核は TTF-1 陽性であった。

いっぽう、胸腔内の中皮組織の反応は、半年経過時点で観察された (表 2)。H 群に 3 例、HS 群に 2 例、横隔膜の線維化を伴う炎症反応が観察され、1 例については中皮細胞の過形成も認められた (図 12)。1 年経過後には、多くの個体の横隔膜の中皮組織における炎症反応および中皮細胞の肥大や過形成が観察された (表 2、図 13)。また、臓側胸膜 (図 14) と心嚢膜においても炎症反応が見られた (図 15)。

v) MWCNT の肺負荷量

肺内の MWCNT 量は、L 群ではほぼ予想どおりであったのに対し、H 群および HS 群で

は、予測よりもやや蓄積量が多かった (図 16)。H 群と HS 群で顕著な差異はなかった。半年経過後には、L 群、H 群および HS 群で、それぞれ 147 ± 20 、 764 ± 160 および $687 \pm 160 \mu\text{g}/\text{Lung}$ であった。いっぽう、1 年経過後は、L 群、H 群および HS 群で、それぞれ 244 ± 33 、 1364 ± 270 および $1436 \pm 100 \mu\text{g}/\text{Lung}$ であった。

D. 考察

間欠気管内投与で連続吸入曝露に類似した肺負荷を与える実験系の開発という目標について、1 年経過時点の評価では、おおむね予想通りに達成できたと考えられる。まず、MWCNT 投与直後には体重が減少し、次第に回復することを繰り返すものの (データは未掲載)、顕著な体重抑制は起こらず、また、1 年経過時点までに、のべ 2080 匹を超える動物に投与を実施しているが、投与による事故死 (表 1 参照) の確率は極めて低い (0.14%)。また、半年経過後と 1 年経過後を比較すると、各項目で、投与用量と投与回数 (解剖時期) に応じた毒性の増強が認められている。特に、肺負荷量について、予想通り、Kasai ら¹⁾や Suzui ら²⁾の報告と比較可能なレベルに蓄積していることが確認できたことが重要である。1 年経過時点で肺腫瘍は認められないが、これは MWCNT に限らず、粒子状物質・繊維状物質によるラット肺発がんの既報と比較すれば妥当なものと考えられる。

H 群と HS 群の結果を比較すると、いくつかの差異が見られた。まず、肉眼的にはスプレー式ゾンデのほうが均一に MWCNT が沈着しやすいことが明らかだった。昨年度の単回投与や 3 回投与よりも反復回数が多い分、

両器具による差異が顕著になったと考えられる。頭尾軸に沿った負荷の偏りが腫瘍発生率に影響するか、2 年経過後に、注意深く評価する必要がある。スプレー式ゾンデは投与時に気管に MWCNT を含有する巨大な肉芽組織を形成することが分かっており、反復投与による気管の狭窄等の可能性も否定できないため、こちらも 2 年経過後の評価が重要である。また、1 年経過後の 5 匹程度の観察結果では、横隔膜や臓側胸膜における炎症反応は、両群で顕著な違いは見られなかったものの、HS 群で、心嚢膜での反応性が特に強い個体が見られた。経口ゾンデとスプレー式ゾンデで上記のように繊維の沈着様式に違いがあることから、胸腔への繊維の移行についても (ルートは不明だが)、量や部位に差異がある可能性は否定できない。中皮腫の発症の有無を含め、2 年経過後の中皮組織の反応性が両群で異なるかどうかも重要な点である。

また、H 群・HS 群の肺負荷量は、L 群よりも個体間のバラツキが大きく、一回の投与にかかる負荷量が重い場合にはクリアランスの個体差が生じやすいのかもしれない。1 年経過後のいくつかの評価項目で H 群のほうが HS 群よりも影響が強いデータが得られているが、これも、1 年経過後に剖検した 5 匹の肺負荷量のバラツキに起因する可能性もある (ただし、肺負荷量を測定した個体では他の項目を評価できていないため、肺負荷量の大小と毒性との具体的な関係は不明である)。

E. 結論

ラットへの MWNT-7 の 4 週間に 1 度の気管内反復投与実験を実施し、半年および

1年後に経過観察した結果、繊維の沈着に関連した慢性的な炎症反応やII型肺胞上皮細胞の反応性過形成が全個体に観察され、これらの毒性の程度は、用量や投与回数に応じて強くなった。また、1年経過後時点で肺腫瘍は観察されず、2例で細気管支肺胞上皮過形成が認められるのみであった。MWCNTの肺負荷量は、1年経過時点において低用量の投与で250 μ g/Lung程度、高用量の投与で1500 μ g/Lung程度となり、肺腫瘍の発症が期待されるレベルまで沈着していた。なお、1年経過時点で、胸腔内中皮腫は発症していないが、横隔膜の肥厚や中皮細胞の過形成等の組織学的所見から、MWCNT繊維の胸腔内への移行が示唆された。

(謝辞)

本研究の遂行にあたり、技術的な助言をいただいた、津田洋幸先生、沼野琢旬先生、また、技術的支援をしていただいた、生嶋清美氏、長谷川悠子氏、湯澤勝廣氏、長澤明道氏、久保喜一氏、安藤弘氏、田中和良氏、海鉦藤文氏、矢野範男氏に深く感謝する。

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 Oct13;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) MWCNT-7 administered to the lung by intratracheal instillation induces development of pleural mesothelioma in F344 rats. Numano T, Higuchi H, Alexander DB, Alexander WT, Abdelgied M, El-Gazzar AM, Saleh D, Takase H, Hirose A, Naiki-Ito A, Suzuki S, Takahashi S, Tsuda H. *Cancer Sci.* 2019 Aug;110(8):2485-2492.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.

G. 研究発表

(学会発表)

前野 愛、坂本 義光、北條 幹、湯澤 勝廣、長谷川 悠子、長澤 明道、久保 喜一、安藤 弘、海鋒 藤文、田中 和良、鈴木 俊也、猪又 明子、守安 貴子、広瀬 明彦、中江大. 多層カーボンナノチューブ (MWCNT) のラット気管内投与試験の生体内分布と呼吸器毒性における投与器具の比較. 第 46 回日本毒性学会学術年会 2019.6.27 (徳島)

Hojo M, Maeno A, Sakamoto Y, Onuki A, Hasegawa Y, Yuzawa K, Kubo Y, Nagasawa A, Ohnishi M, Goto Y, Suzuki T, Inomata A, Moriyasu T, Hirose A, Nakae D. Clearance of multi-walled carbon nanotubes in rat lungs after intratracheal instillation: a comparison of different instillation devices. 55th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2019) 2019.9.10 (Helsinki, Finland)

坂本義光、広瀬明彦、中江大 Time course of histopathology and the status of involved humoral factors during the carcinogenesis of MWCNT in rats. 第 78 回日本癌学会学術総会 2019.9.28 (京都)

北條 幹、坂本 義光、山本 行男、前野 愛、多田 幸恵、長谷川 悠子、湯澤 勝廣、長澤 明道、田中 和良、矢野 範男、鈴木 俊也、猪又 明子、守安 貴子、広瀬 明彦、中江 大. MWCNT 誘発性のラット腹膜中皮腫発症過程における炎症および免疫関連因子に着目した病理組織学的解析. 第 36 回日本毒性病理学会学術集会. 2020.2.14 (東京)

坂本 義光、北條 幹、前野 愛、鈴木 俊也、猪又 明子、守安 貴子、広瀬 明彦、中江 大. 多層カーボンナノチューブを反復気管内投与したラットにおける肺神経内分泌細胞 (PNEC) の増生. 第 36 回日本毒性病理学会学術集会 2020.2.14 (東京)

前野 愛、坂本 義光、北條 幹、湯澤 勝廣、長谷川 悠子、長澤 明道、大貫 文、鈴木 俊也、猪又 明子、守安 貴子、後藤 裕子、大西 誠、小林 憲弘、広瀬 明彦、中江 大. 異なる投与器具を用いた多層カーボンナノチューブ (MWCNT) のラット気管内投与試験における肺毒性と肺負荷量の比較. 第 36 回日本毒性病理学会学術集会 2020.2.14 (東京)

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)

別添 5

表 1. 実験開始 1 年後までに解剖した動物数

群	動物数	実験開始後 (週)	解剖種別	備考
L 群	1	12	死亡	投与直後に窒息死
H 群	1	16	死亡	投与直後に窒息死
C 群	5	26	計画解剖	
L 群	10	26	計画解剖	
H 群	10	26	計画解剖	
HS 群	9	26	計画解剖	
L 群	1	38	瀕死解剖	骨肉腫、寛骨 (肺・胸腔内転移)
H 群	1	40	死亡	投与直後に窒息死
H 群	1	44	死亡	不明
C 群	5	52	計画解剖	
L 群	8	52	計画解剖	
H 群	8	52	計画解剖	
HS 群	10	52	計画解剖	
合計	70			

表 2. 病理組織検索結果

	半年経過後				1年経過後			
	C群	L群	H群	HS群	C群	L群	H群	HS群
II型肺胞上皮細胞 反応性過形成	0/5	5/5	5/5	5/5	0/5	4/4	4/4	5/5
気管支肺胞上皮過形成								
MWCNT誘発性	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	1/6	0/5	1/5
自然発生性	0/5	1/5	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5
中皮組織の肥厚(炎症)								
臓側胸膜	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	1/4	3/4	2/5
横隔膜	0/5	0/5	3/5	2/5	0/5	4/4	2/4	3/5
心嚢膜	0/5	0/5	1/5	1/5	0/5	3/9	5/9	6/10

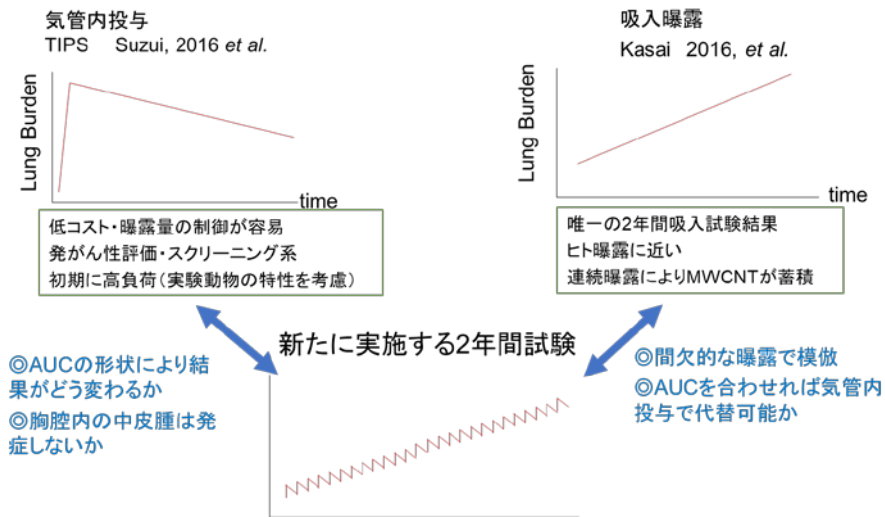


図 1. 既報のMWCNT 慢性毒性評価と本研究の肺負荷量と研究の意義

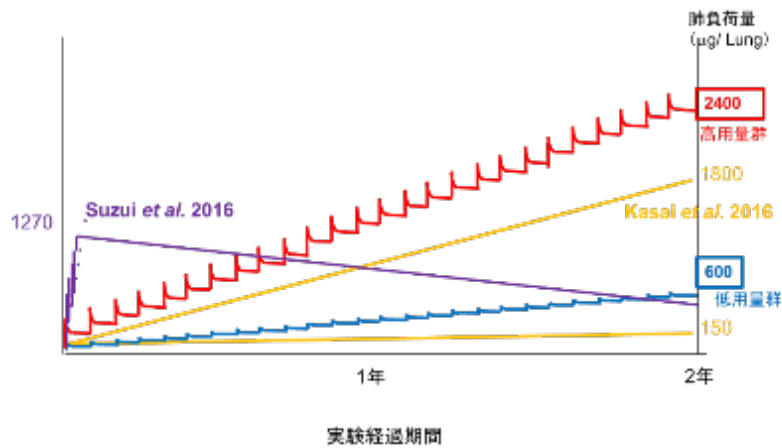


図 2. MWCNT の肺負荷量の経時変化の予測および既報との比較 実験概要

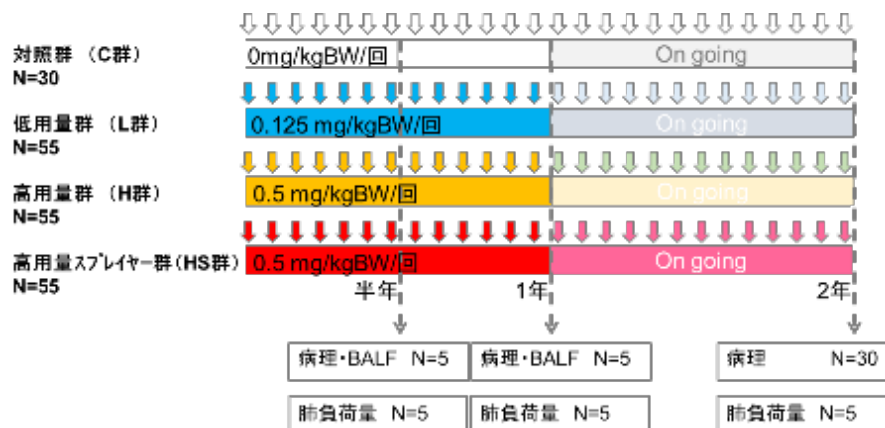


図 3. 実験概要

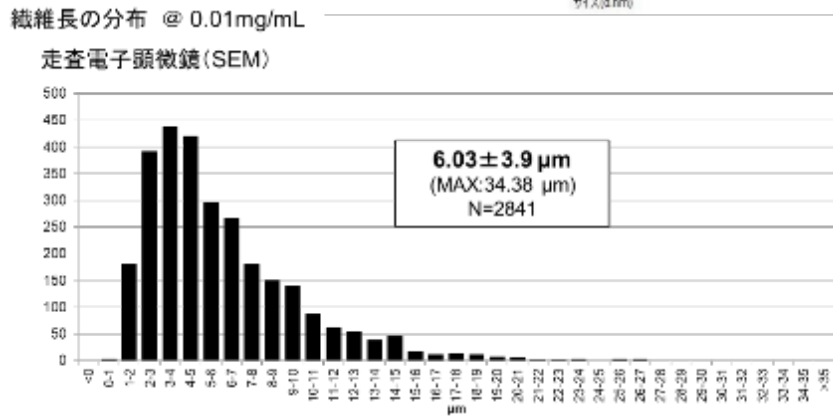
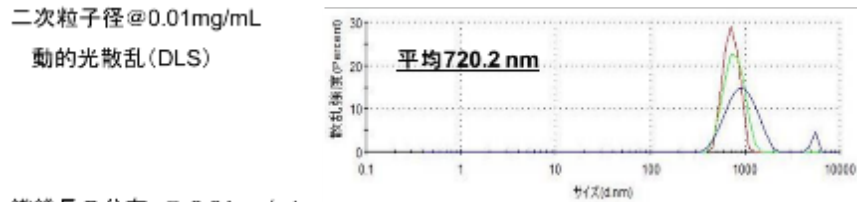


図 4. MWCNT (MWNT-7) 投与試料の性状

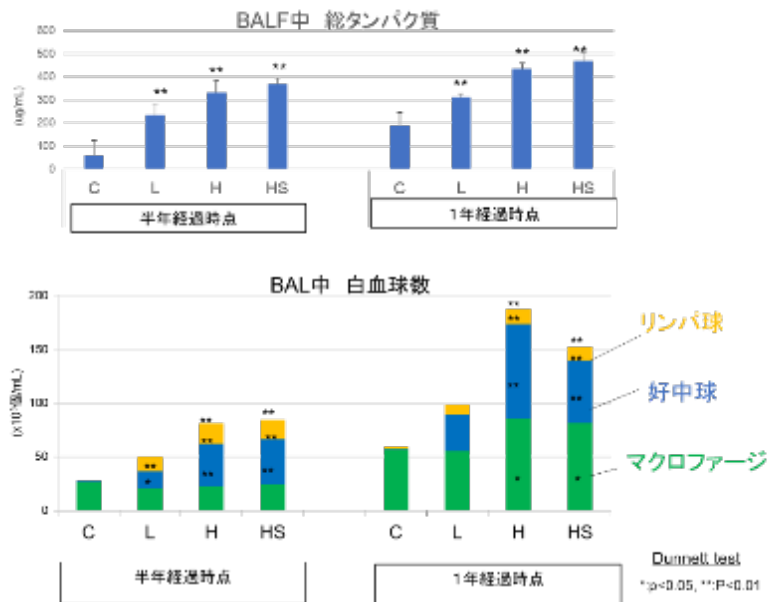


図 5. BALF の生化学的解析および細胞診断 (N=5)

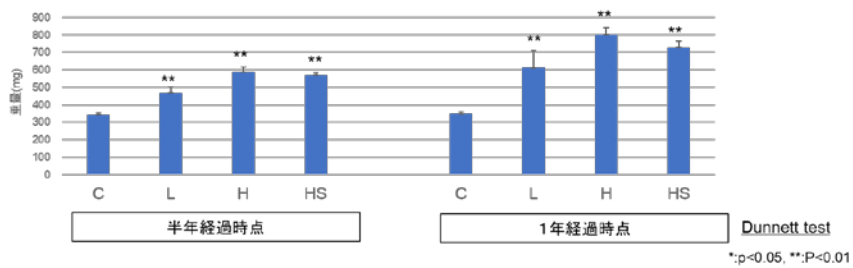


図 6. 肺の湿重量 (左葉) (N=5)



図 7. 肺の肉眼所見

矢印は HS 群の気管にのみ認められた黒色斑

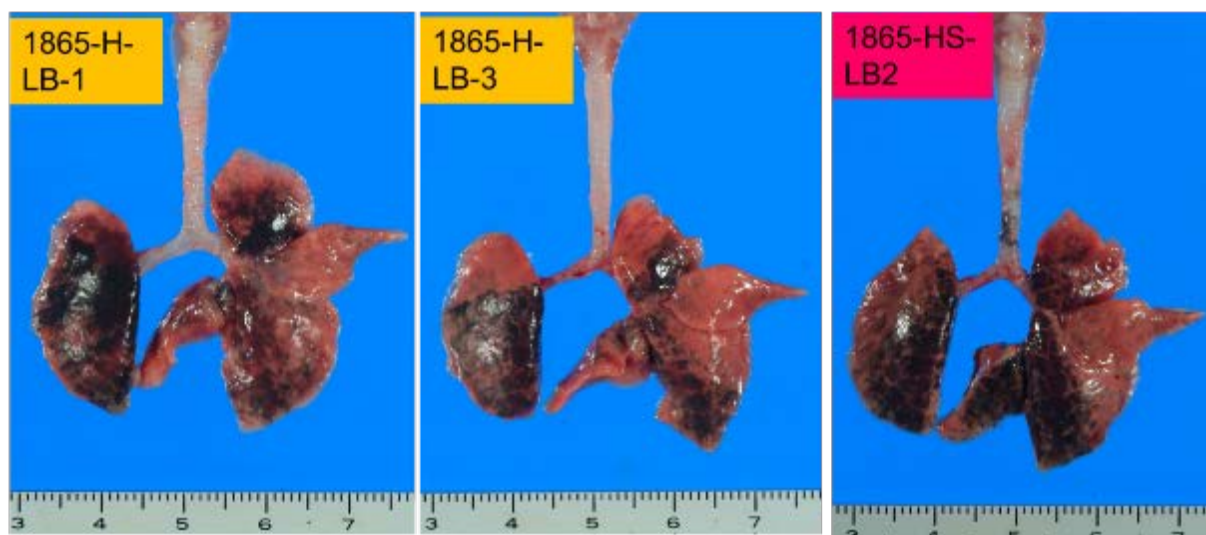


図 8. 経口ゾンデとスプレー式ゾンデの MWCNT の沈着パターンの比較
H 群（経口ゾンデ）では、沈着する領域が尾側に偏る個体が見られた（中央写真）

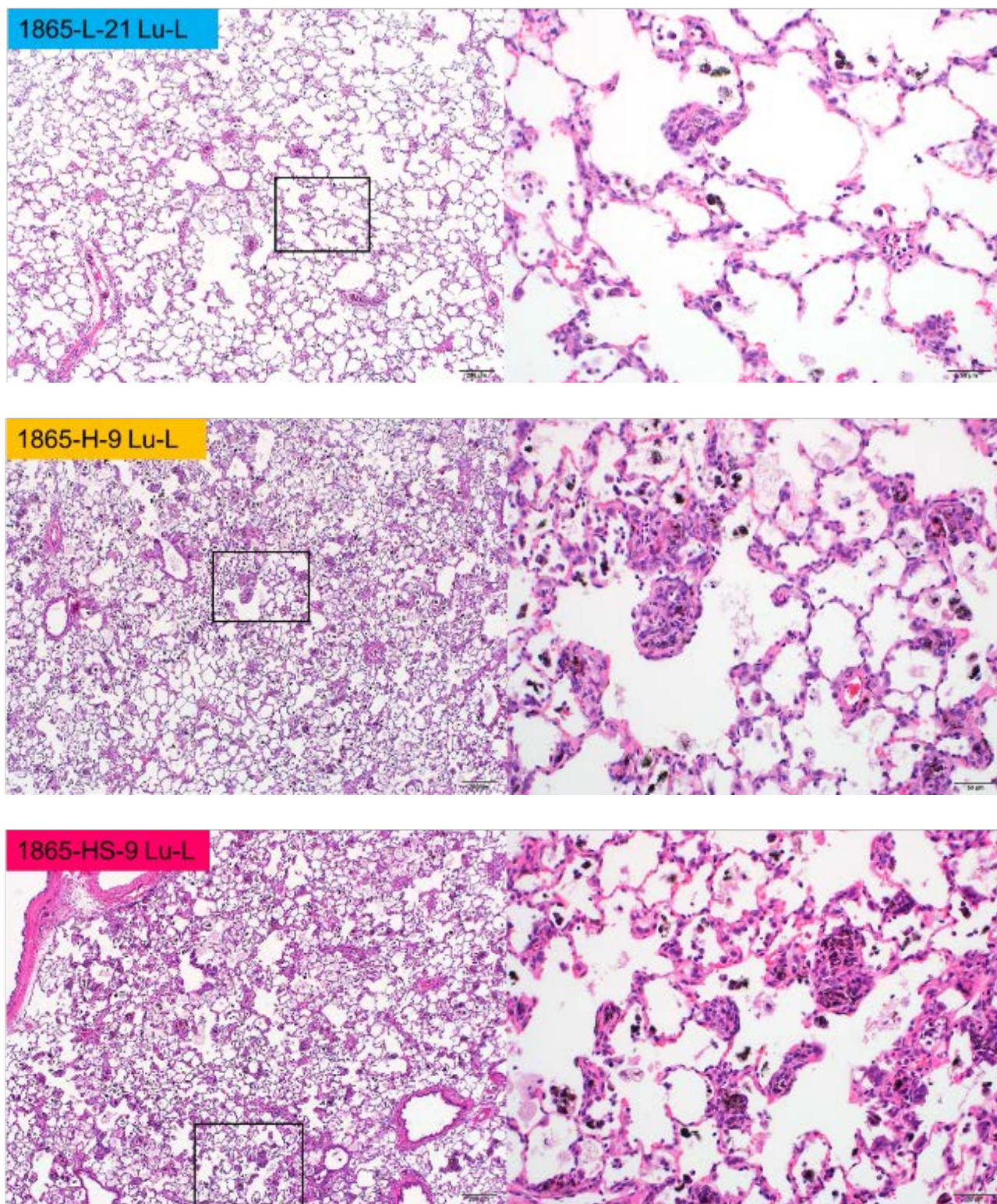


図 9. 肺実質の病理組織像 (HE 染色)
1 年経過時点の代表的な像。上から、L 群、H 群、HS 群

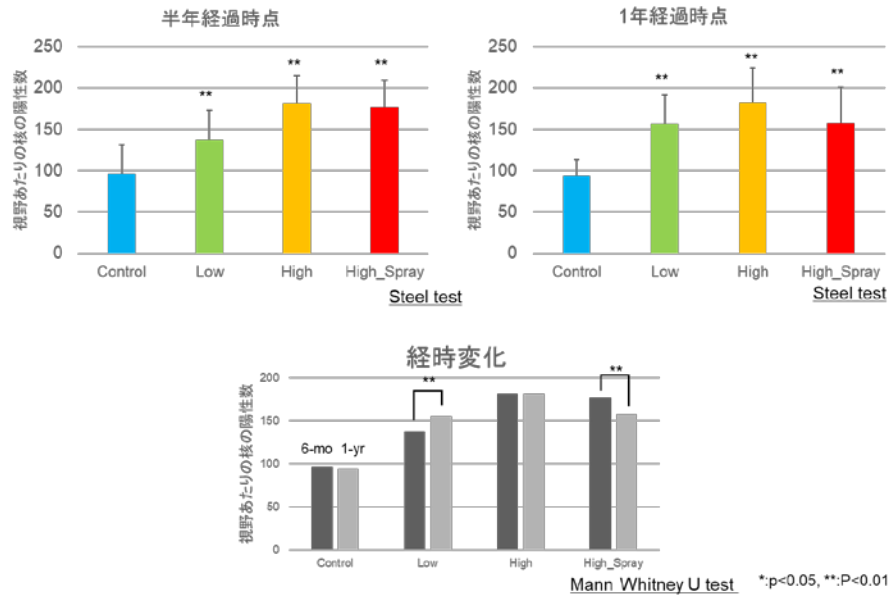


図 10. 抗 TTF-1 抗体の免疫染色による反応性 II 型上皮過形成の定量化

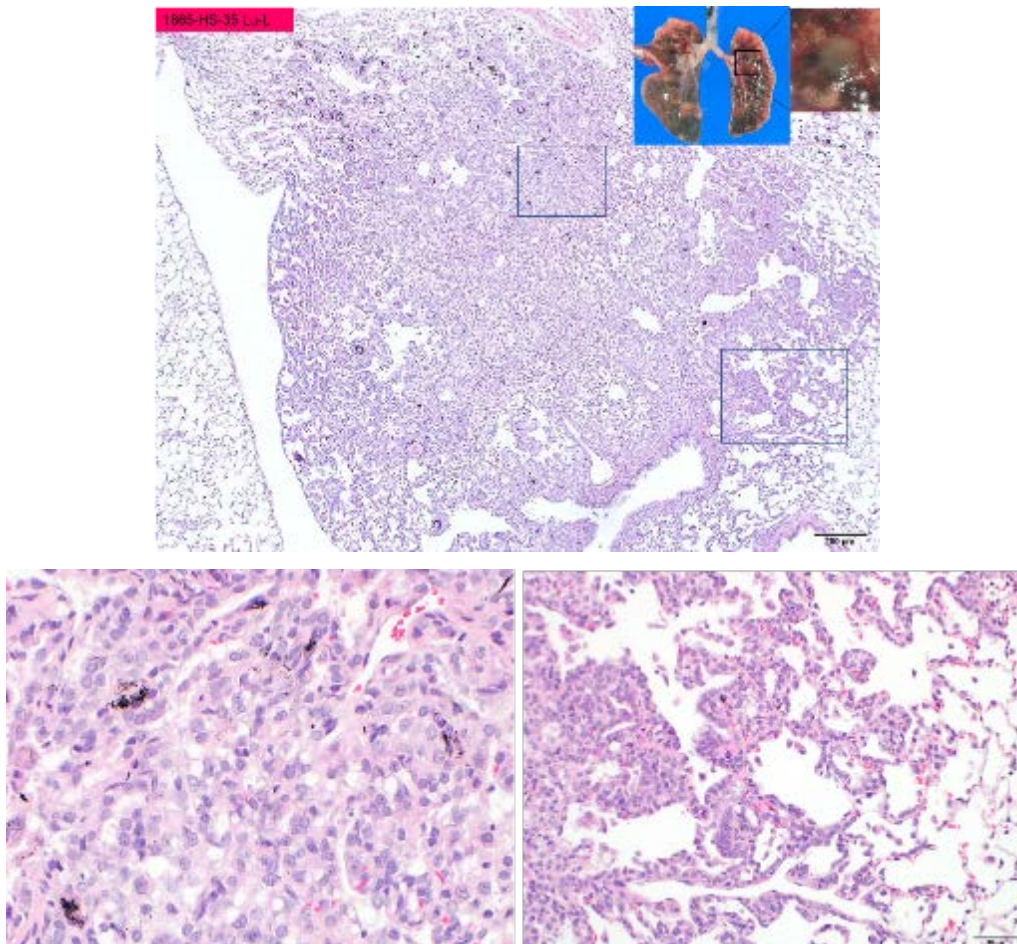


図 11. 気管支肺胞上皮過形成の病理組織像 (HE 染色 ; HS 群)

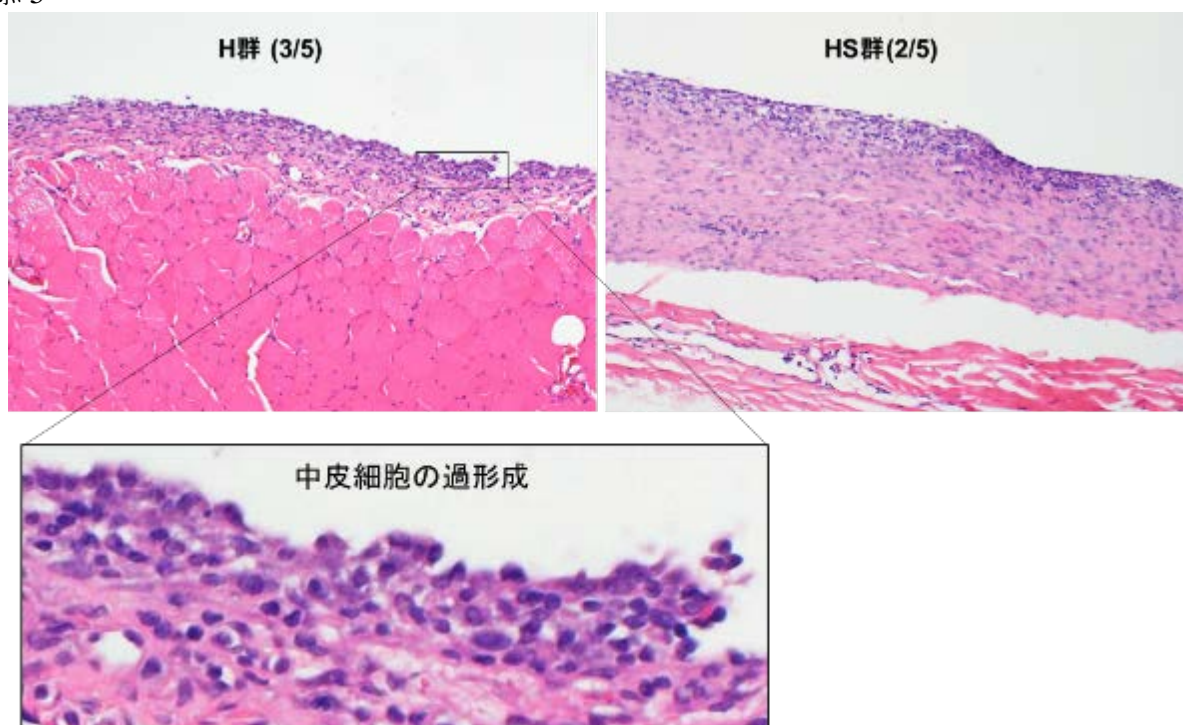


図 12. 横隔膜の炎症像および過形成像 (HE 染色 ; 半年経過後)

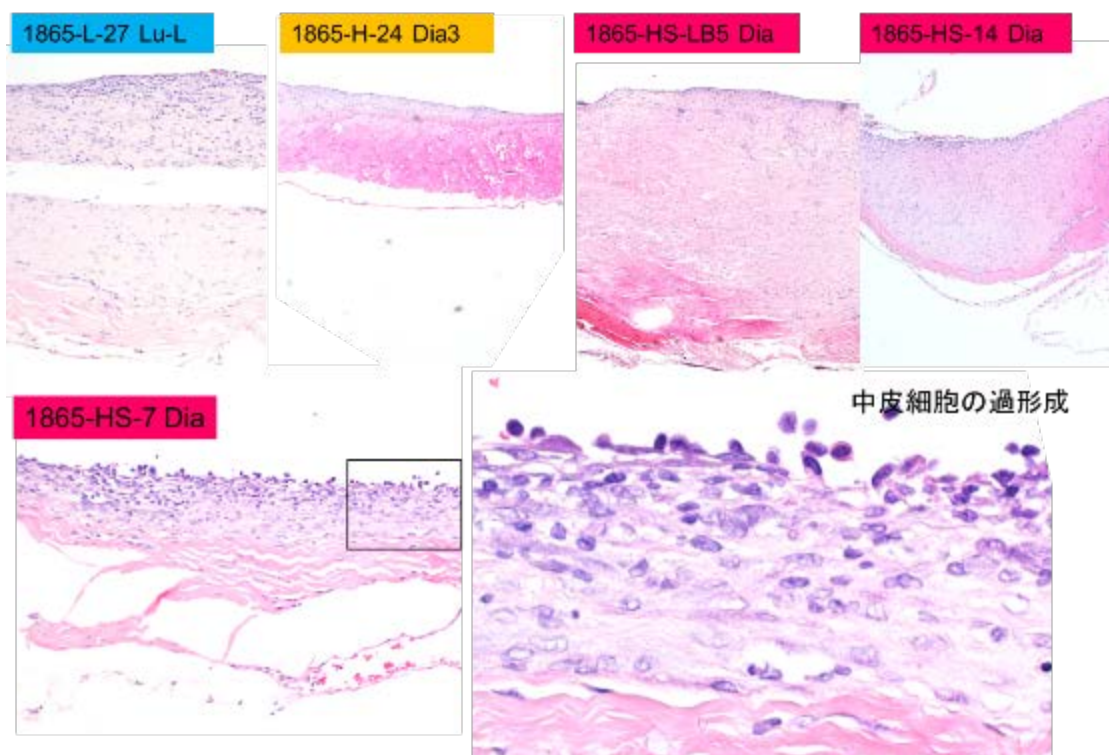


図 13. 横隔膜の炎症像および過形成像 (HE 染色 ; 1 年経過後)

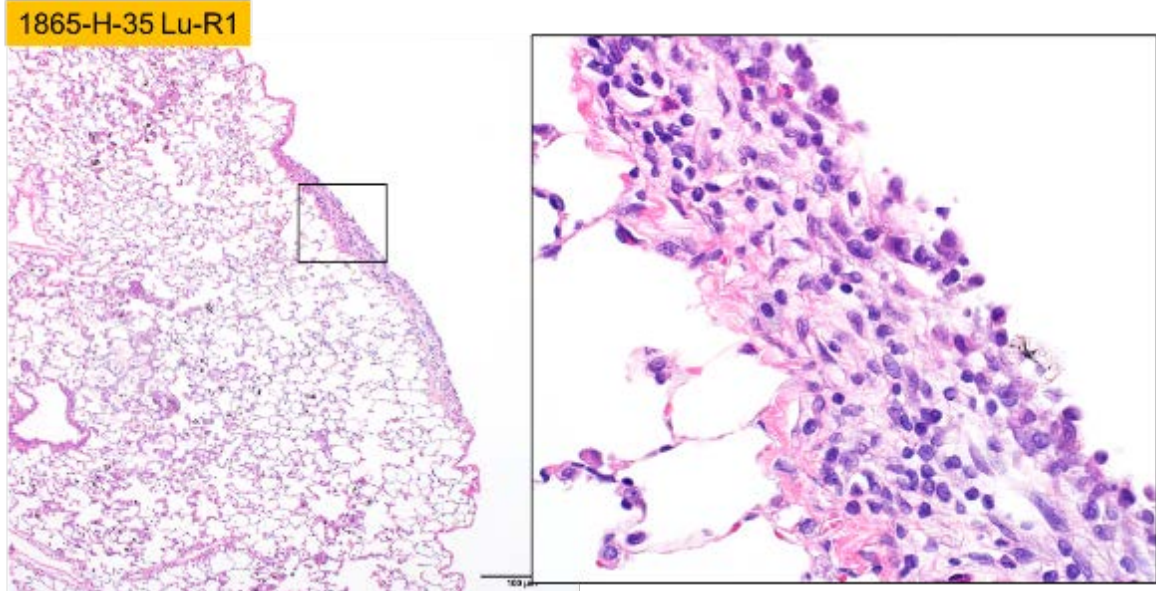


図 14. 臓側胸膜の肥厚 (HE 染色 ; 1 年経過後)

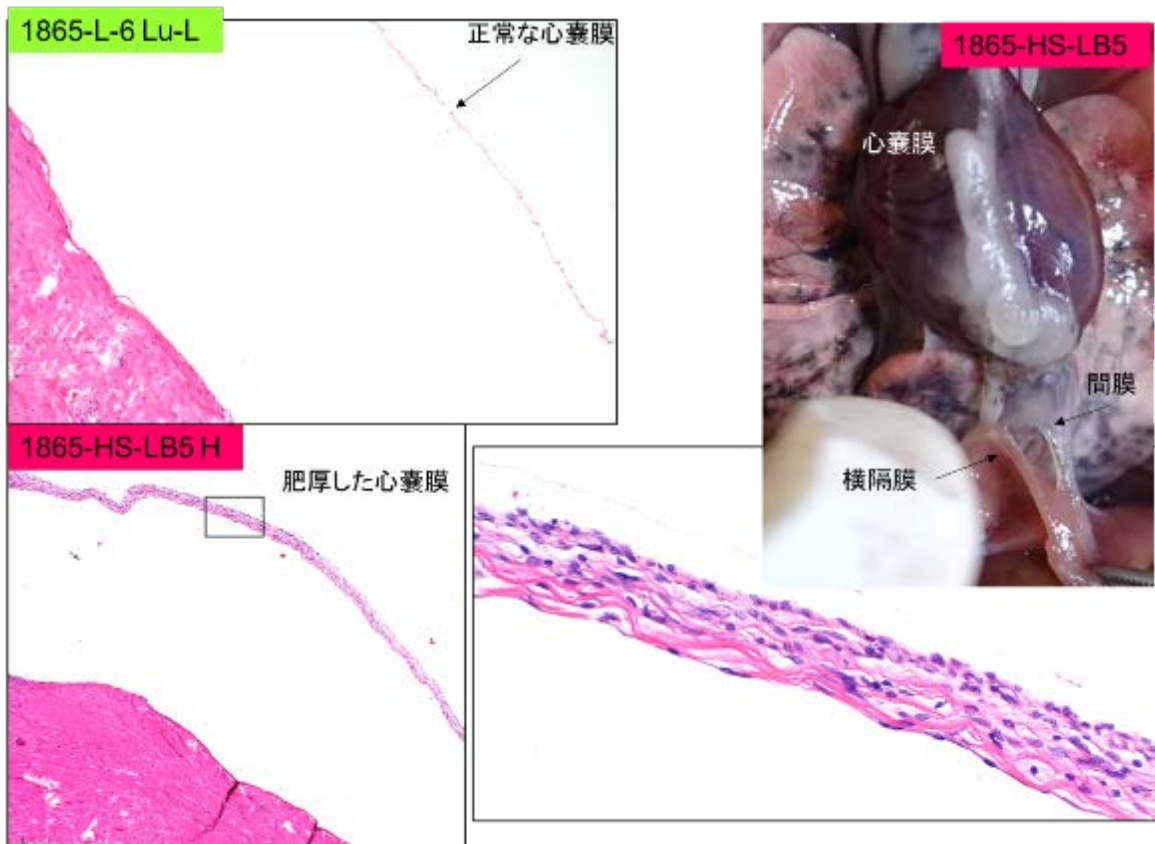


図 15. 心嚢膜の肥厚 (HE 染色 ; 1 年経過後)

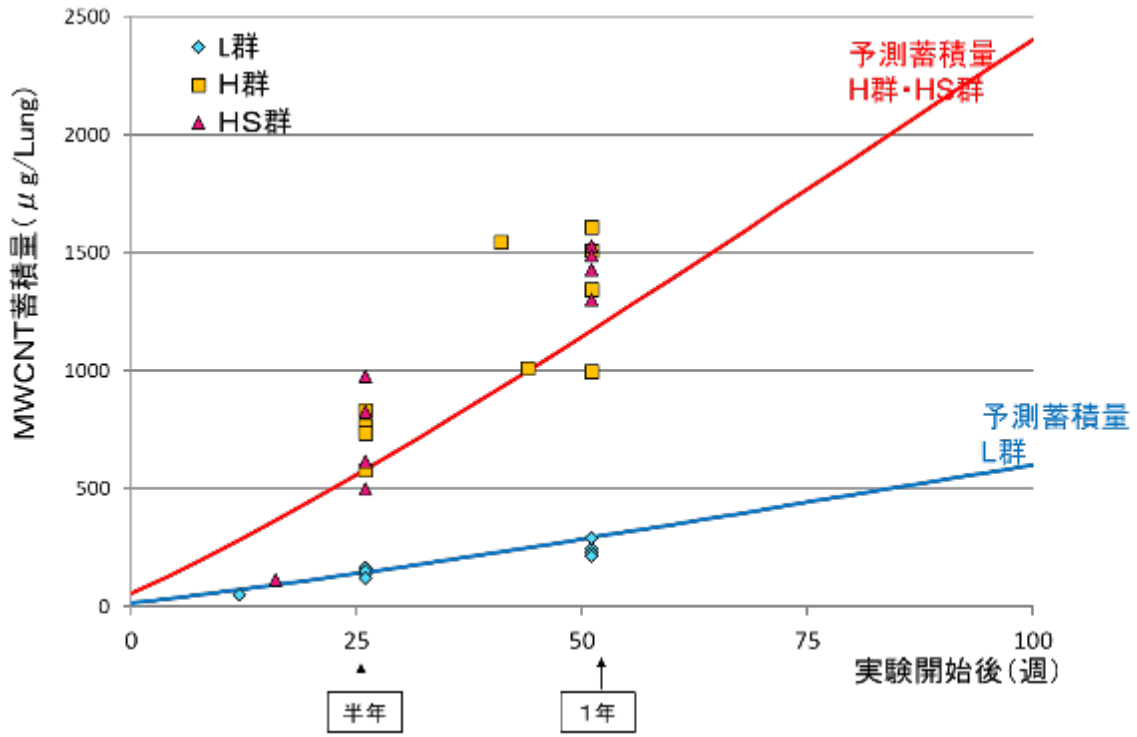


図 16. MWCNT の肺負荷量 (N=5)

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

研究課題名：ナノマテリアル曝露による慢性及び遅発毒性評価手法の開発に関する研究

分担研究課題名：ナノマテリアルの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

研究協力者：William T. Alexander 名古屋市立大学津田特任教授研究室研究員

研究協力者：Dina Mohammed Mourad Saleh 名古屋市立大学大学院医学研究科博士課程院生

研究協力者：Sivagami Gunasekaran 名古屋市立大学大学院医学研究科研究生

研究協力者：Omnia Hosni Mohamed Ahmed 名古屋市立大学津田特任教授研究室研究員

研究協力者：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、以下の物質について肺と胸膜における炎症と障害作用、発がん性を明らかにした。

方法：F344雄ラットを用いて検体を分散剤添加（PF68）生食に懸濁して、15日間に8回経気管肺内（TIPS）投与し（計1mg/ラット）、投与終了後6時間、4、52、104週後に屠殺した。

1）無コーティング・アナターゼ型二酸化チタン（球状・直径6nm）（an）とコーティング・ルチル型二酸化チタン（長球形・直径10-20µm）（ru）、およびチタン酸カリウム（ $K_2O \cdot 8TiO_2$ ）（POT）（線維状・平均長6.0µm、直径305nm）（POT）の肺と胸膜における炎症と障害・細胞増殖刺激作用の解析を行った。2）カーボンナノチューブ（MWCNT）は、その長さで肺・胸膜中皮への障害性・発がん性との相関を明らかにする目的で、長さの異なる2層カーボンナノチューブ（1.5、7.0、15µmのDWCNT）を1匹あたり同じ本数（ 22×10^{12} 本）になる様に調整して投与した。

結果：1）チタン酸カリウム：POTにおいて、52週では胸膜中皮の過形成が見られ、104週では悪性中皮腫は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 の40倍であり生物学的に有意と判断された。2）長さの異なる2層カーボンナノチューブの104週投与終了群について解析中である（病理標本作成中）。

結論：1）POTでは、胸膜中皮の過形成は、52週から発生し104週では生物学的有意の増加となり、POTに初めて発がん性を見出した（Particle and Fibre Toxicol, 2019）。2）1.5、7.0、15µmのDWCNT1.5、7.0、15µmのDWCNTについては解析中である。104週について解析中である（病理標本作成中）。

A. 研究目的

1) 二酸化チタニウム (TiO_2) 粒子は塗料・化粧品の材料として広く利用されている。WHO 国際がん研究機関 (IARC) は、ナノサイズを含む TiO_2 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。我々はいくつかのラットにおいて非コーティング ru には肺発がんプロモーション作用がみられ、その機序には ru を貪食した M ϕ 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) 品研究では、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_2 であるチタン酸カリウム ($\text{K}_2\text{O} \cdot 8\text{TiO}_2$) (POT) について、球状で直径 6nm のアナターゼ型 TiO_2 (AMT-100) (an) および直径 10-20 μm 類球形ルチル型 TiO_2 (ru) との肺と胸腔における障害作用および発がんについて比較検討した。

2) 最近の研究において、多層 (40 層以上) 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いた (Suzui, Cancer Sci, 2014; Kasai, Particle and Fibre Tox, 2015; Numano, 2019)。その機序については、繊維状の形状、壁層数または長さが障害性と発がん性に関与するかについては明らかではない。本研究では長さの異なる薄層 (2 層) カーボンナノチューブ (1.5、7.0、15 μm の DWCNT) を各長さ、 22×10^{12} 本/ラットにて投与終了して、急性炎症像と発がん性について検討した。

B. 研究方法

1) an、ru および POT は広瀬明彦主任研究者より提供された。10 週齢 F344 雄ラットを用い、500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度無コーティングの an (直径 6nm、AMT-100)、ru (直径 10-20 μm) および POT (当研究室による計測にて平均長 6.0 μm 、直径 305 nm) について、Taquan 法にてエアロソル分散後 t-ブチルアルコールに溶解氷結し (高橋祐次博士、Taquahashi, J Toxicol Sci., 2013)、使用直前に凍結乾燥させて粉体として生食中に 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投与液とし、0.5mL/ラット (=125 μg /ラット) を 15 日間に 8 回肺内噴霧 (TIPS) 投与した (合計量 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 ϕ 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 μm) 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 22×10^{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 μm 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。投与終了後 6 時間、 4、52、104 週後に屠殺した

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

1) 酸化チタニウム : (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 : 6h では肺胞中に検体貪食 M ϕ と好中球が 主として見られ、4 w 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 ϕ および好中球と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 4 w に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) 胸腔洗浄液より得た M ϕ 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 有意の増加が見られた。

(5) 52 週群では、肺 M ϕ 数は減衰するもの の溶媒群より高値あった。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 (12.1%) 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おける 生物学的有意の発生頻度と考えられた

(Mohamed et al, Particle and Fibre Toxicol, 2019)。

2) 1.5、7.0、15 μm の DWCNT については解析中である。陽性対照の MWCNT-7 では 104 週に達する前にすべてのラットは 胸膜悪性中皮腫悪性中皮腫で死亡している。

D. 考察

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 M ϕ 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 M ϕ 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と考えられた。事実、この研究におけるTIPS投与後104週観察する実験において発がん性を強く示唆する（がん発生頻度が生物学的に有意）結果が得られた。

また、長さの異なるDWCNTについて、今までの報告で0.7 μmのMWCNTの腹腔内投与では発がん性はみられなかった報告(Muller, 2009)から、1.5、7.0、15 μmのDWCNTについてTIPS投与を行った。発がんについて病理学的結果が待たれる。

E. 結論。

1) 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、さらに投与本数と炎症、発がんの関係が明らかとなる。

2) 1.5、7.0、15 μmのDWCNTについては解析中である。陽性対照のMWCNT-7では104週に達する前にすべてのラットは胸膜悪性中皮腫悪性中皮腫で死亡している。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Abdelgied M., Elgazzar AM., Alexander TW.,

Numano T., Iigou M., Naiki-Ito A., Takase H., Hirose A., Taquahashi Y., Kanno J., Abdelhamid, M., Khaled AA., Takahashi S., Alexander BD, Tsuda H. Carcinogenic effect of potassium octatitrate (POT) fibers in the lung and pleura of male Fischer 344 rats after intrapulmonary administration, *Particle and Fibre Toxicology* <https://doi.org/10.1186/s12989-019-0316-2> 16:34, 2019.

Tsuda, H., Alexander D. Development of intratracheal intrapulmonary of spraying (TIPS) administration as a feasible assay method for testing the toxicity and carcinogenic potential of multiwall carbon nanotubes, In *Vivo Inhalation Toxicity Screening Methods for Manufactured Nanomaterials*, Toru Takebayashi T., Landsiedel R., Gamo M. eds, In *Current Topics in Environmental Health and Preventive Medicine*, Springer (Springer Nature Singapore Pte Ltd), pp145-163, 2019, DOI:10.1007/978-981-13-8433-2

Numano T., Higuchi H., Alexander D., Alexander W., Abdelgied M., Elgazzar AM., Saleh D, Takase H., Hirose A, Naiki-Ito A., Suzuki S., Takahashi S., Tsuda H. MWCNT-7 administered to the lung by intratracheal instillation induces development of pleural mesothelioma in F344 rats, *Cancer Sci.*, 110 (8): 2485-2492, 2019

Fukamachi, K., Hagiwara Y., Futakuchi M., Alexander DB., Tsuda H., Suzui M. Evaluation of a biomarker for the diagnosis of pancreas cancer using animal

model. J Toxicol. Pathol., 32(3):135-141,
2019

Abdelgied M., Elgazzar AM., Alexander D.,
Alexander W., Numano T., Iigo M.,
Naiki-Ito A., Takase H., Abdou KB.,
Hirose A., Taquahashi Y., Kanno J.,
Abdelhamid M., Tsuda H., Takahashi S.
Pulmonary and pleural toxicity of
potassium octatitanate fibers, rutile
titanium dioxide nanoparticles, and
MWCNT-7 in male Fischer 344 rats, Arch.
Toxicol., 93(4): 909-920, 2019

2. 学会発表

Tsuda H., Demonstration of the
carcinogenicity of a flexible tangled
multi-walled carbon nanotube in the rat
lung, AACR サテライトミーティング
-Environmental Carcinogenesis:
Potential Pathway to Cancer Prevention,
Charlotte (USA) 2019年6月

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

令和元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」

分担研究課題名：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 気管内投与下における肺小核試験の予備試験の結果、CNT 気管内投与群および陽性対照群において小核誘発の有意な増加は認められなかった。これらの結果は曝露方法の違いにより CNT 遺伝毒性の発現形態が異なる可能性を示唆する一方で、肺小核試験法の最適な試験条件をより詳細に検討する必要があることを示している。そこで、本研究では他の *in vivo* 遺伝毒性試験法等で推奨されている採材時期を参照し、陽性対照の最終投与 3 時間後、24 時間後または 5 日後に肺組織を採材して *in vivo-in vitro* 法を用いた小核試験法を実施し、肺小核試験法における最適な採材タイミングを検証した。その結果、*in vivo-in vitro* 法を用いた小核試験法では最終投与 24 時間後での採材においてのみ明瞭な陽性となることを明らかにした。

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 *in vivo* 遺伝毒性に関しては、Kato

らが野生型 ICR マウスに MWCNT (幅 70-110nm、長さ 1-4 μ m) を気管内注入し、肺組織のコメットアッセイ、酸化 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、我々は肺における CNT の *in vivo* 遺伝毒性評価のために、*in vivo-in vitro* 法を用いた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* で曝露したマウスの肺を摘出後、*in vitro* で肺細胞を培養する方法であり、培養により細胞分裂を惹起させ、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検討し、それを用いて CNT 全身吸入曝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た。他方、CNT の曝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、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結果、CNT 気管内投与群および陽性対照群において小核誘発の有意な増加は認められなかった。これらの結果は曝露方法の違いにより CNT 遺伝毒性の発現形態が異なる可能性を示唆する一方で、陽性対照群においても陰性となったことか

ら肺小核試験法の最適な試験条件をより詳細に検証する必要があることを示すものである。

広く用いられている *in vivo* 遺伝毒性試験である *in vivo* 骨髄小核試験や *in vivo* コメットアッセイでは、小核の出現と消失の反応速度や DNA 損傷の修復・残存速度が解析されており、*in vivo* 骨髄小核試験では最終投与後 24-48 時間内で、また *in vivo* コメットアッセイでは終投与後 2-6 時間内での組織採材が推奨されている。一方で、*in vivo-in vitro* 法を用いた肺小核試験については、これまでの報告例はほとんど無く、小核の出現と消失の時間経過による影響についての解析はなされていない(表 1)。

そこで、今回我々は陽性対照である Ethyl methanesulfonate (EMS) を用いて、先行試験、*in vivo* 骨髄小核試験および *in vivo* コメットアッセイに倣い、最終投与 3 時間後、24 時間後および 5 日後に肺組織を採材して *in vivo-in vitro* 法を用いた肺小核試験を実施し、本試験法における最適な採材時期を明らかにすることを研究目的とした。

B. 研究方法

(1) 被検物質

Ethyl methanesulfonate (EMS, Sigma-Aldrich Corporation, lot#: BCBZ8402) を陽性対照に使用した。

(2) 動物

日本エスエルシー株式会社より 7 週齢の雄性 C57BL/6NcrSlc (SPF) マウスを購入して試験に用いた。各群 3 匹とし、陰性対照群および中高の EMS 投与群 (25 mg/kg および 50 mg/kg) の 3 処理群を設定し、最終投与後 3 時間、24 時間または 5 日後に肺組織を採材する 3 つの群構成、すなわち全 9 群合計 27 匹を設定した (表 2)。馴化期間は動物入荷後 1 週間とし、8 週齢の動物を試

験に使用した。

(3) 投与

EMS を使用直前に生理食塩液（日本薬局方、株式会社大塚製薬工場）に溶解して、2.5 mg/mL または 5 mg/mL 投与液を調製し、25 mg/kg または 50 mg/kg の投与用量で腹腔内投与した。投与は 1 日 1 回、2 日連続で実施した。

(4) 細胞分離培養および標本作製

投与後それぞれ 3 時間後、24 時間後または 5 日後に、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（図 1）。

- 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. セルストレーナーでろ過した後、300×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/cm³）により遠心分離（250×g、常温、20 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作製した。

(5) 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 DAPI 含有封入剤（Antifade Mounting Medium with DAPI、VECTASHIELD 社）で染色して、蛍光顕微鏡下（U 励起）で観察した。
- ii. 1000 個以上/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各 EMS 投与群との間で Fisher の正確検定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

各群における小核をもつ肺細胞の出現頻度の結果を図 2 および表 3 に示した。最終投与 3 時間後に肺を採取した各群において、陰性対照群の平均値は 1.767 ± 0.115%、EMS 25 mg/kg 投与群の平均値は 1.390 ± 0.182%、EMS 50 mg/kg 投与群の平均値は 1.560 ± 0.342% であり、最終投与 3 時間後に肺を採取した EMS 投与群は陰性対照群と比較して有意な小核誘発率の増加は認められなかった（図 2）。最終投与 24 時間後に肺を採取した各群においては、陰性対照群の平均値は 1.730 ± 0.214%、EMS 25 mg/kg

投与群の平均値は $3.113 \pm 1.451\%$ ($p=0.0007$)、EMS 50 mg/kg 投与群の平均値は $3.017 \pm 0.575\%$ ($p=0.0014$) であり、最終投与 24 時間後に肺を採取した EMS 投与群は 25 mg/kg 投与群および 50 mg/kg 投与群ともに陰性対照群と比較して十分に有意な小核誘発率の増加が認められた (図 2)。最終投与 5 日後に肺を採取した各群においては、陰性対照群の平均値は $1.763 \pm 0.465\%$ 、EMS 25 mg/kg 投与群の平均値は $2.557 \pm 0.902\%$ ($p=0.0436$)、EMS 50 mg/kg 投与群の平均値は $2.053 \pm 0.255\%$ ($p=0.4572$) であり、最終投与 5 日後に肺を採取した EMS 投与群は 25 mg/kg 投与群においてのみ陰性対照群と比較してわずかに有意な小核誘発率の増加が認められた (図 2)。

以上の結果から、*in vivo-in vitro*法を用いた肺小核試験における適切な採材時期は最終投与 24 時間後であることが明らかになった。最終投与 3 時間後の採材では陽性対照最終投与後の肺曝露時間が十分ではなく、*in vivo-in vitro*法を用いた肺小核試験で検出可能な小核誘発に十分な DNA 損傷が誘導されていない可能性が考えられる。また、最終投与 5 日後の採材では、陽性対照曝露後に DNA 損傷が誘導されてはいるが、EMS は速やかに生体内で代謝・排泄され、誘導された DNA 損傷は 5 日の間に修復される、または DNA 損傷細胞が死滅することで、*in vivo-in vitro*法を用いた肺小核試験において検出可能な小核誘発が十分ではない可能性が考えられる。

先行して実施した CNT 全身吸入曝露試験では、陽性対照群は EMS を 5 日連続腹腔内投与 (25 及び 50mg/kg)、CNT 全身吸入曝露群は 5 日連続曝露であり、両群ともに最終曝露 5 日後に採材している。結果は両群ともに陽性であった。他方、昨年度我々が実施した CNT 気管内投与下における *in*

vivo-in vitro 法を用いた肺小核試験の予備試験では、CNT 気管内投与群および陽性対照群においても小核誘発の有意な増加は認められなかった。この際の陽性対照群は EMS 単回腹腔内投与 (25 及び 50mg/kg)、CNT 気管内投与群は単回投与であり、先行して実施した全身吸入曝露試験条件に倣い投与 5 日後に肺を採材している (表 1)。CNT 気管内投与群では投与後も CNT が気管内・肺内に残存するため、採材までの期間、気管・肺は CNT に曝露され続けていると考えられる一方で、陽性対照群は単回投与であることに加えて採材時期が不適切であったため、陰性結果の原因となった可能性が考えられる。

D. 結論

陽性対照である EMS を用いて、*in vivo-in vitro*法を用いた肺小核試験における適切な採材時期を解析した。EMS を 25 mg/kg または 50 mg/kg の投与用量でマウスに腹腔内投与した。投与は 1 日 1 回、2 日連続で実施した。各 *in vivo* 遺伝毒性試験法で推奨される採材時期等を勘案し、最終投与 3 時間後、24 時間後または 5 日後に肺組織を採材して *in vivo-in vitro*法を用いた小核試験により小核誘発率を解析した。その結果、最終投与 3 時間後に肺を採取した EMS 投与群は陰性対照群と比較して有意な小核誘発率の増加は認められなかった。最終投与 24 時間後に肺を採取した EMS 投与群は 25 mg/kg 投与群および 50 mg/kg 投与群ともに陰性対照群と比較して十分に有意な小核誘発率の増加が認められた。最終投与 5 日後に肺を採取した EMS 投与群は 25 mg/kg 投与群においてのみ陰性対照群と比較してわずかに有意な小核誘発率の増加が認められた。以上のことから、*in vivo-in vitro*法を用いた小核試験法では最終曝露 24 時間後での採材が適切であると結論した。

なし

E. 健康危機情報

特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

Shemansky JM, McDaniel LP, Klimas C, Dertinger SD, Dobrovolsky VN, Kimoto T, Horibata K, Polli JE, Heflich RH: Pig-a gene mutation database. *Environ Mol Mutagen.* 60(8):759-762. (2019)

Horibata K, Sekimoto M, Sugiyama KI: Comprehensive framework between environment and genomic stability: the open symposium of the Japanese Environmental Mutagen Society (JEMS) in 2019. *Genes Environ.* 41:17. (2019)

Kirkland D, Uno Y, Luijten M, Beevers C, van Bentem J, Burlinson B, Dertinger S, Douglas GR, Hamada S, Horibata K, Lovell DP, Manjanatha M, Martus HJ, Mei N, Morita T, Ohyama W, Williams A: In vivo genotoxicity testing strategies: Report from the 7th International workshop on genotoxicity testing (IWGT). *Mutat Res.* 847:403035. (2019)

2. 学会発表

Horibata K, Takasawa H, Taquahashi Y, Yokota S, Hamada S, Honma M: In vivo genotoxicity assessment of multi-wall carbon nanotubes using lung micronucleus assay. The Joint Meeting of The 6th Asian Congress on Environmental Mutagens (ACEM) and the 48th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (JEMS). Tokyo (2019.11)

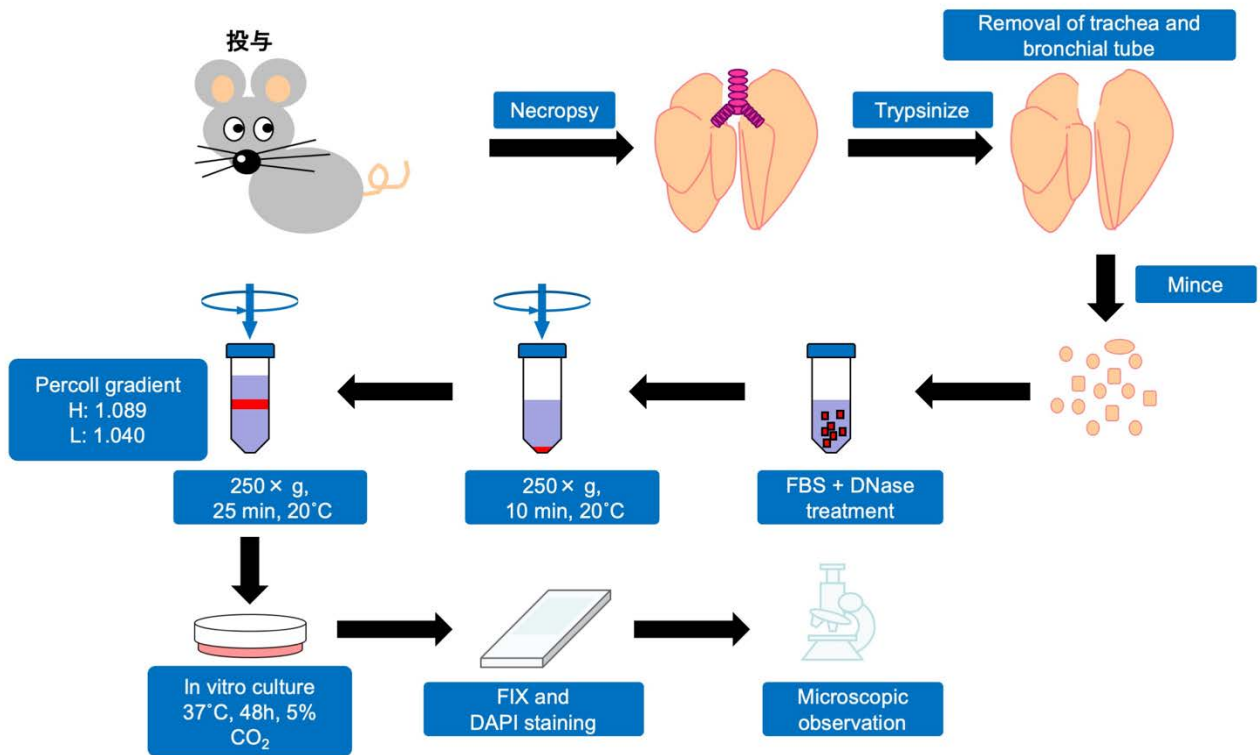
G. 知的所有権の取得状況

表 1: 各 *in vivo* 遺伝毒性試験における試験条件

	<i>in vivo-in vitro</i> 法による肺小核試験の実施例			OECD Tg (<i>in vivo</i> DNA損傷性)	
	全身吸入曝露 (LSIM委託試験)	気管内投与 (LSIM委託試験)	Lindberg, et al. (2010)	<i>in vivo</i> 骨髄小核 (OECD Tg)	<i>in vivo</i> コメット (OECD Tg)
投与回数	5日連続	単回	単回(4h)	単回~2回	>2回
被験物質用量	CNT 2 mg/m ³ を 2時間/日	CNT 0.1 mg/匹 (50 µL/匹)	ethylene oxide 全身吸入曝露	/	/
陽性対照投与経路	腹腔内	腹腔内	/	/	/
陽性対照用量	25 mg/kg 5日連続	25 mg/kg 単回	/	/	/
採材の時期	最終投与後 5日後	最終投与後 5日後	最終投与後 3日後	最終投与後 24-48時間後	最終投与後 2-6時間後

表 2: 群構成

処理群	投与経路/回数	採材時期	動物数
saline	腹腔内 1回/日×2日	最終投与 3時間後	3
EMS 25 mg/kg			3
EMS 50 mg/kg			3
saline		最終投与 24時間後	3
EMS 25 mg/kg			3
EMS 50 mg/kg			3
saline		最終投与 5日後	3
EMS 25 mg/kg			3
EMS 50 mg/kg			3



[Lindberg, et al., *Environ Mol Mutagen*, 51 (2010) 164-172での試験法を改変]

図 1. *in vivo-in vitro* 法を用いた肺小核試験

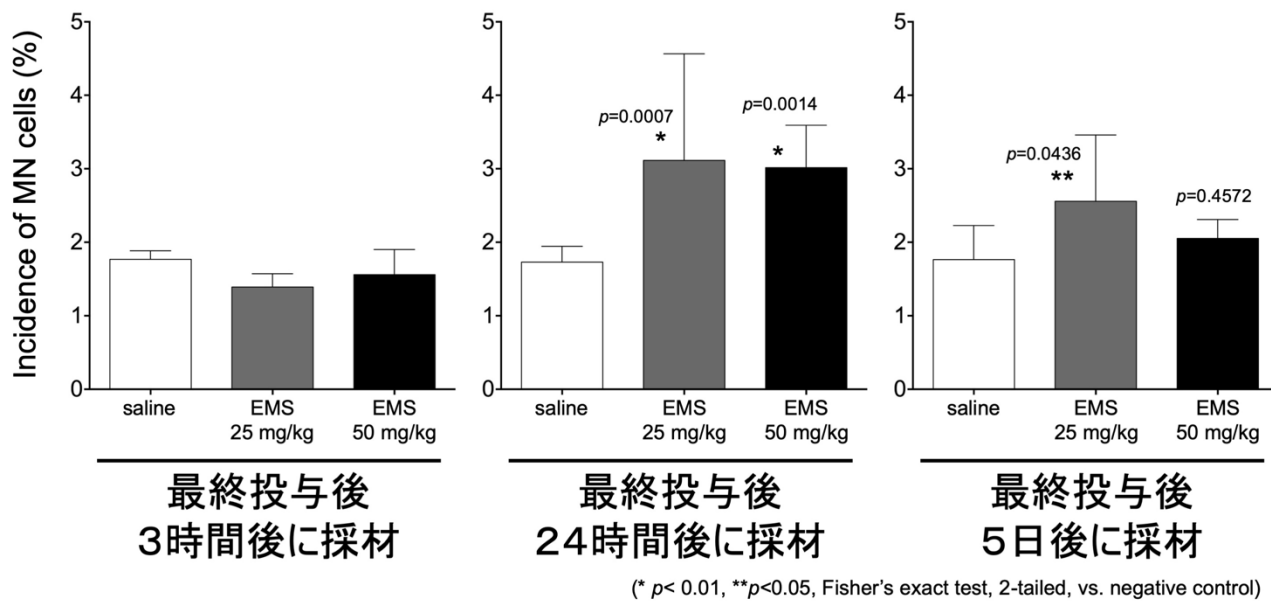


図 2. 各採材時期における *in vivo-in vitro* 法を用いた肺小核試験の小核誘発率

表 3: 各群における小核誘発率

投与群	animal ID	測定細胞数	小核を持つ細胞数	小核誘発率	
2h	saline	LMN 2h 001	1000	17	1.70
		LMN 2h 002	1000	19	1.90
		LMN 2h 003	1002	17	1.70
		Total/ mean \pm SD	3002	53	1.77 \pm 0.12
	EMS 25 mg/kg	LMN 2h 101	1005	15	1.49
		LMN 2h 102	1020	12	1.18
		LMN 2h 103	1002	15	1.50
		Total/ mean \pm SD	3027	42	1.39 \pm 0.18
	EMS 50 mg/kg	LMN 2h 201	1000	12	1.20
		LMN 2h 202	1010	19	1.88
		LMN 2h 203	2000	32	1.60
		Total/ mean \pm SD	4010	63	1.56 \pm 0.34
24h	saline	LMN 24h 001	1000	19	1.90
		LMN 24h 002	1000	18	1.80
		LMN 24h 003	1005	15	1.49
		Total/ mean \pm SD	3005	52	1.73 \pm 0.21
	EMS 25 mg/kg	LMN 24h 101	1002	17	1.70
		LMN 24h 102	1019	31	3.04
		LMN 24h 103	1000	46	4.60
		Total/ mean \pm SD	3021	94	3.11 \pm 1.45
	EMS 50 mg/kg	LMN 24h 201	1000	36	3.60
		LMN 24h 202	2000	60	3.00
		LMN 24h 203	2000	49	2.45
		Total/ mean \pm SD	5000	145	3.02 \pm 0.58
5d	saline	LMN 5d 001	1000	23	2.30
		LMN 5d 002	1001	15	1.50
		LMN 5d 003	1005	15	1.49
		Total/ mean \pm SD	3006	53	1.76 \pm 0.46
	EMS 25 mg/kg	LMN 5d 101	1004	35	3.49
		LMN 5d 102	1006	25	2.49
		LMN 5d 103	1007	17	1.69
		Total/ mean \pm SD	3017	77	2.55 \pm 0.90
	EMS 50 mg/kg	LMN 5d 201	1043	24	2.30
		LMN 5d 202	1004	18	1.79
		LMN 5d 203	1015	21	2.07
		Total/ mean \pm SD	3062	63	2.05 \pm 0.25

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制御システムへの影響評価研究

研究分担者：石丸 直澄 徳島大学大学院医歯薬学研究部 教授

研究協力者：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：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：桑形麻樹子 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 室長

研究協力者：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、ナノマテリアルの長期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。Taquann処理されたMWCNT-7の長期曝露によって常在型の肺胞マクロファージ（CD11b⁻CD11c⁺）は一定の細胞数を保っているものの、未分化な単球細胞あるいは異常マクロファージ分画が増加し、ナノマテリアルの処理にあたっている可能性が考えられた。また、MWCNT-7の長期曝露によって肺胞マクロファージにおけるMMP12 mRNA発現が亢進しており、MMP12がナノマテリアルの曝露のマーカーの一つとして重要であることが分かった。また、MWCNT-7の長期曝露によってIL-6などの炎症性サイトカインの発現亢進、VEGFなどの再生性増殖因子の発現上昇、スカベンジャー受容体の発現変化などを介して慢性の炎症が肺組織で持続している可能性が示された。したがって、ナノマテリアルの長期曝露で肺胞マクロファージの分布、分化あるいは機能に持続的な影響が及ぶことが示された。

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曝露により、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曝露により抑制されることが報告されている。一方で、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。また、一定期間のカーボンナノチューブの暴露後の長期観察により肺の線維化ならびに慢性炎症の持続が確認されているもの、長期間の全身暴露による免疫系システムへの影響を観察した研究はない。本研究では、ナノマテリアルの長期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。

今年度はカーボンナノチューブ (MWCNT-7) 長期暴露による肺の免疫系への影響に関して、暴露6カ月ならびに12カ月後の解析を実施した。

B. 方法

・マウス

12週齢のC57BL/6(雄)を用い、各群6匹ずつで多層化カーボンナノチューブ (MWCNT-7、三井)を全身吸入暴露装置 (Taquann 直噴全身吸入装置、Ver.3.0、国立医薬品食品衛生研究所)により吸入を実施し、4週毎断続的に暴露後、6ヶ月(7回暴露)及び12ヶ月(14回暴露)において適切に屠殺後解析を行った。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国立医薬品食品衛生研究所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-7

国立食品衛生研究所にて Taquann 処理 (53 μ m メッシュ濾過処理) された MWCNT-7 (0, 3.0, 6.0 mg/m³ 6hr/D 4週毎) を用いた。対象群はフィルターを通したキャリアエア吸入とした。

・フローサイトメトリー解析

頸部リンパ節、脾臓は摘出後、保存液に浸漬し、冷蔵保存した。リンパ節に関しては、ガラスホモジナイザー、メッシュフィルターを用い、単核球を採取した。脾臓に関してはホモジナイズ後、0.83%塩化アンモニウム水溶液にて溶血、洗浄、濾過を行った。また、気管支肺胞洗浄液 (Bronchoalveolar lavage fluid: BALF) 中の単核球 (BALF 細胞) を採取するために、気管にサーフロー留置針 (SR-OT1851C, TERUMO) を留置し、1ml のシリンジ (SS-01T 針無しシリンジ, TERUMO) に 1ml の PBS を 2 回流し込み、回収後、洗浄、遠心する。蛍光色素標識 (fluorescein isothiocyanate : FITC, phycoerythrin : PE, Peridinin chlorophyll protein-cyanin 5.5 : PE-Cy5.5, PE-cyanin 7 : PE-Cy7, allophycocyanin : APC, APC-Cy7) された各種リンパ球表面マーカー CD3, CD4, CD8, CD19, CD45.2, CD11b, F4/80, MARCO, CD163 に対する抗体

(eBioscience, San Diego, CA) にて染色、0.9%-PFA-PBS で固定後、解析装置 (FACSCant BD Biosciences) にてそれらの発現を解析した。なお、12 ヶ月暴露群の実験では、BALF 細胞、頸部リンパ節、脾臓を臓器保存液 (MACS Tissue Strage Solution) に冷蔵保存、輸送後 48 時間以内に解析に使用した。

・ 定量化 RT-PCR 法

BALF 細胞および肺組織の一部を RNAi ater に浸漬し、冷蔵保存した。後日、通法に従い、全 RNA を抽出後、逆転写反応により cDNA を得た。下記のプライマーセットを用いて、PCR 反応によって各遺伝子 mRNA を定量化した。転写レベルは 73 00 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)を用いた。IL-6; forward, 5'-GATGG ATGCTACCAAAGTGGAT-3', reverse, 5'-CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGA-3', MARCO; forward, 5'- AGAAAGGGAGACA CTGGAAGC-3', and reverse, 5'-CCTCTG GAGTAACCGAGCAT-3', SRB1; forward, 5'-GGCTGCTGTTTGCTGCG-3', and reverse, 5'-CTGCTTGATGAGGGAGGG-3', Cox 2; forward, 5'- AGGAGACATCCTGATCC TGGT-3', and reverse, 5'-GTTCAGCCTGG CAAGTCTTT -3'; MMP12; forward, 5'-T GGTATTCAAGGAGATGCACATTT-3', reverse, 5'-GGTTTGTGCCTTGAAAACCTTTT AGT-3', β -actin; forward, 5'-GTGGGCCGC TCTAGGCACCA-3', and reverse, 5'-CGG TTGGCCTTAGGGTTCAGGGGG-3'.

C. 研究結果

Taquann処理されたMWCNT-7の長期暴露における肺組織を中心とした免疫システムへの影響を明らかにするために、図1のような実験プロトコールで解析を進めた。各群6匹とし、その中で3匹よりBALF細胞のフローサイトメータ解析、残り3匹のBALF細胞を遺伝子解析(定量RT-PCR)に使用した。肺組織、リンパ節、脾臓に関しては、6匹全てを用いて解析に使用した(図1)。

BALF細胞のフローサイトメータ解析についてのゲーティングはFSC/SSCから生細胞を分離し、シングル細胞のみにゲート後、 $CD3^{-}CD19^{-}7AAD^{-}$ 細胞から $CD11c/CD11b$ にて展開することによって、肺胞マクロファージ(Alveolar macrophage: AM)、好酸球(Eosinophil: Eo)、単球(Monocyte: Mo)に分類した(図2)。また、F4/80と $CD11b$ をマーカーとした分画も検討した(図2)。

6 ヶ月暴露群の解析

6 ヶ月間のMWCNT-7暴露後の、BALF細胞中の肺胞マクロファージ(AM)、単球(Mo)、好酸球(Eo)の割合をフローサイトメータ解析にて検討した。生細胞の割合はMWCNT-7暴露によって増加していた(図1C)。AMの割合はMWCNT-7暴露によって有意に減少していた(図3A, C)。一方で、単球と好酸球の割合は対照群に比較して、MWCNT-7暴露群で有意に低下していた(図3A, C)。また、MWCNT-7暴露

群でCD11b⁻CD11c⁻の未分化な単球分画が多く含まれていることが明らかになった(図3A)。F4/80とCD11bを肺胞マクロファージマーカーとして検討すると、対照群では90%以上がCD11b⁻であるが、MWCNT-7暴露群では、CD11b⁺になっており、より未分化な単球あるいは異常マクロファージ分画が含まれていることが判明した(図3B,C)。

肺胞マクロファージにおけるスカベンジャー受容体の発現とMWCNT-7暴露の関係を検討するために、CD163及びMARCOの細胞表面上の発現をフローサイトメータにて解析すると、MWCNT-7暴露群において、対照群に比較して有意に低下していることが分かった(図4A,B)。

BALF細胞におけるMMP12 mRNA発現をqRT-PCR法にて検討すると、MWCNT-7暴露群では対照群に比較して、有意に増加していた(図5A)。さらに、肺組織でのMMP12 mRNA発現を確認すると、BALF細胞での発現パターンと同様にMWCNT-7暴露群で対照群と比較して有意に増加していた(図5B)。

BALF細胞における酸化ストレス関連遺伝子であるCox2 mRNA、スカベンジャー受容体遺伝子であるSRB1及びMARCO mRNA発現を検討すると、数値にばらつきがあり、有意な変化は認められなかった(図6)。

肺組織における各種遺伝子mRNA発現を検討すると、IL-6 mRNA、SRB1 mRNA、MARCO mRNA発現がMWCNT-7暴露で上

昇することが分かった(図7)。

BALF中のサイトカイン産生について、マルチプレックス法にて検討したところ、検出できた3種のサイトカインの中で、VEGFに関して対照群に比較して高濃度のMWCNT-7暴露群で有意に増加していた(図8)。

MWCNT-7暴露による全身の免疫システムへの影響を確認するために、脾臓および頸部リンパ節について検討すると、脾重量にMWCNT-7暴露の影響はなく、脾臓の細胞数、リンパ節の細胞数も変化は認められなかった(図9)。

さらに、脾臓、リンパ節におけるB細胞、T細胞分画を検討した(図10)。また、T細胞の活性化について、CD4ならびにCD8陽性T細胞におけるCD44あるいはCD62Lの細胞表面の発現を用いて検討した(図10)。脾臓、リンパ節のリンパ球分画(CD45.2⁺)、B細胞分画(CD19⁺)、T細胞分画(CD4⁺ならびにCD8⁺) T細胞の活性化分画(CD4⁺CD44^{high}CD62L⁻ならびにCD8⁺CD44^{high}CD62L⁻)に関して、MWCNT-7の暴露による影響は認められなかった(図11)。

12ヶ月暴露群の解析

BALF細胞の細胞数、細胞の直径を自動細胞計測装置で検討したところ、MWCNT-7の暴露によって対照群と比較して有意に増加していることが分かり(図12A)、細胞の直径は、MWCNT-7の暴露によって対照群と比較して有意に低下し

ていることが明らかになった (図 1 2 B)。

BALF 細胞を用いたフローサイトメータ解析では、MWCNT-7 の暴露によって、対照群に比較して FSC (細胞の大きさ) の蛍光強度がより低い分画に集積していることが明らかとなった (図 1 3 A)。このことは図 1 2 での細胞の直径が MWCNT-7 の暴露によって低下していることと一致している。

CD11b/CD11c 分画の展開では、対照群は大部分が AM 分画であるが、MWCNT-7 の暴露では、AM 分画は極端に減少した (図 1 3 A, C)。Mo 及び Eo は対照群に比較して MWCNT-7 暴露群では有意に増加した (図 1 3 A, C)。6 カ月間の暴露実験でも同様に、MWCNT-7 暴露によって CD11c⁻CD11b⁻ の分画への集積が目立つ (図 1 3 A)。F4/80 及び CD11b をマーカーにすると、MWCNT-7 暴露によって CD11b⁺F4/80⁺ の分画が有意に増加していることが分かる (図 1 3 B, C)。

BALF 細胞数に関して検討すると、BALF 細胞中の生細胞数は MWCNT-7 暴露で有意に増加することが判明した (図 1 4 A)。一方で、AM の割合は MWCNT-7 暴露で極端に低下していたが (図 1 3)、実際の細胞数には変化がなく、Mo の細胞数は MWCNT-7 暴露で有意に増加することが分かった (図 1 4)。また、F4/80⁺ の BALF 細胞数も MWCNT-7 暴露で増加することが明らかになった (図 1 4 B)。

BALF 細胞におけるスカベンジャー受容体の発現についてフローサイトメータ解析にて検討すると、6 カ月暴露実験と同様に、MWCNT-7 暴露によって CD163 の発現が対照群に比較して、有意に低下していた (図 1 5)。

BALF 細胞における MMP12 mRNA 発現を qRT-PCR 法にて定量化すると、MWCNT-7 暴露で対照群に比較して、有意に上昇していた (図 1 6 A)。また、肺組織における MMP12 mRNA 発現に関しても、MWCNT-7 暴露によって対照群に比較して、有意に増加することが分かった (図 1 6)。

BALF 細胞における各種遺伝子 mRNA 発現を qRT-PCR 法にて定量化すると、高濃度 MWCNT-7 暴露群で MARCO mRNA 発現が対照群に比較して高くなっており、IL-6 mRNA 発現は低濃度 MWCNT-7 暴露群で上昇していたが統計学的な有意差は見られなかった (図 1 7 A)。また、肺組織における各種遺伝子 mRNA 発現を qRT-PCR 法にて定量化すると、MARCO および IL-6 mRNA 発現は対照群に比較して有意に高くなっていた (図 1 7 B)。

MWCNT-7 暴露による全身免疫システムへの影響を検討するために、脾臓、頸部リンパ節の細胞数を測定すると、脾細胞およびリンパ節細胞ともに MWCNT-7 暴露によって対照群に比較して、有意な変化は認められなかった (図 1 8)。

D. 考察

今年度の研究では、Taquann 処理された

MWCNT-7 の長期全身暴露による肺胞を中心とした免疫担当細胞の動態を 6 ヶ月間あるいは 12 ヶ月間の曝露群に分けて検討した。6 ヶ月、12 ヶ月曝露の両方で、CD11b/CD11c をマーカーとした肺胞マクロファージの割合は、対照群に比較して極端に減少していた。一方で、12 ヶ月での実際の細胞数を計測したデータからは、曝露によって肺胞マクロファージの細胞数は変化がしないものの、単球の細胞数、CD11b⁻CD11c⁻分画の細胞数が極端に増加していた。このことは

MWCNT-7 の長期暴露によって常在型の肺胞マクロファージ (CD11b⁻CD11c⁺) は一定数を保っているものの、未分化な単球細胞が増加し、ナノマテリアルの処理にあたっている可能性が考えられた。さらに、12 ヶ月曝露群で、MWCNT-7 曝露によって、増加している大多数の単球の大きさが対照群の細胞に比較して有意に小型化していることから、より未分化な単球が MWCNT-7 曝露で増加していることを示唆している。

肺胞マクロファージのスカベンジャー受容体の発現に関しては、6 ヶ月、12 ヶ月で MWCNT-7 曝露によって CD163 の発現低下が見られたことから、ナノマテリアルの長期曝露によって肺胞マクロファージの機能異常が生じていることを示唆している。スカベンジャー受容体遺伝子 mRNA 発現に関しては BALF 細胞全体を用いているので、フローサイトメータ解析のデータとの乖離があった。

以前に実施したカーボンナノチューブの期間限定曝露実験から肺胞マクロファージにおける MMP12 mRNA 発現が重要なマーカーになる可能性が示されていることから (*PLoS One* 13:e0205702, 2018)、今回も BALF 細胞ならびに BALF 細胞採取後の肺組織における MMP12 mRNA 発現を検討したところ、6 ヶ月および 12 ヶ月曝露で MWCNT-7 曝露によって BALF 細胞、肺組織の両方で対照群に比較して有意に MMP12 mRNA 発現が高いことが明らかになった。このことは、以前の結果と同様に MMP12 がカーボンナノチューブ曝露のマーカーの一つとして重要であることを示している。BALF 採取後の肺組織においても MMP12 の発現が高かった点に関しては、肺胞マクロファージが残存している可能性あるいは肺の間質に存在する細胞における発現が考えられる。

MMP12 は Macrophage metalloelastase (MME)あるいは Macrophage elastase とも言われる MMP ファミリーの酵素である。ヒト肺胞マクロファージからクローニングされ (*J Biol Chem* 268:23824-9, 1993)、胎児発生、生殖、組織再生、血液凝固などの生理的現象や癌の浸潤・転移、COPD、静脈瘤、関節リウマチの病態において重要な役割を果たすことが報告されている (*J Clin Invest* 102:1900-10, 1998, *Am J Pathol* 165:1375-83, 2004, *Arthritis Rheum* 50:3112-7, 2004, *Curr Opin Lipidol* 17:705-7, 2006, *Allergol Int* 60:253-8, 2011)。喫煙による肺胞マクロファージの活性化に伴って、

MMP12の発現が上昇することも明らかにされている (*Am J Respir Crit Care Med* 172:1382-92, 2005)。我々の以前の研究においても、カーボンナノチューブの暴露によって肺胞マクロファージにおけるMMP12の発現が亢進していることが分かっており (*PLoS One* 13:e0205702, 2018)、今回の研究においてもMWCNT-7の長期暴露によって有意にMMP12の発現が上昇していたので、ナノマテリアルを処理するためにこの酵素の発現が上昇する可能性と慢性炎症に伴う組織修復のために発現が上がっている可能性が考えられた。

BALF細胞あるいは肺組織における酸化ストレス関連遺伝子の発現解析では、6ヶ月、12ヶ月でIL-6 mRNA発現がMWCNT-7暴露で上がっており、ナノマテリアルの長期曝露によって、慢性炎症が持続している可能性が示された。

BALF中の各種サイトカイン産生に関しては、今回の実験では6ヶ月曝露群で、MWCNT-7の高濃度曝露でVEGFの産生が対照群に比較して有意に上昇していた。このことは肺胞での組織修復の機転を示唆している。他のサイトカインに関しては検出限界以下であったことから、今後のBALF採取法など改善の余地がある。

E. 結論

1. MWCNT-7の長期暴露によって常在型の肺胞マクロファージ (CD11b⁻CD11c⁺) は一定数を保っているものの、未分化な単球細胞が増加し、ナノマテリアルの処理にあたっている可能性が考えら

れた。

2. MWCNT-7の長期暴露によって肺胞マクロファージにおけるMMP12 mRNA発現が亢進しており、MMP12がナノマテリアルの暴露のマーカーの一つとして重要であることが分かった。
3. MWCNT-7の長期暴露によって慢性の炎症が肺組織で持続している可能性が示された。

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、木野倫子氏に深く感謝する。

F.健康危険情報

なし

G. 研究発表

(論文発表)

Yuyama K, Nakamura Y, Yateyama R, Arakaki R, Tsutsui T, Ishimaru N. Study of the pharmacokinetics of eriodictyol-6-C-β-d-glucoside, a flavonoid of rooibos (*Aspalathus linearis*) extract, after its oral administration in mice. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2019, 1137:121881

Miyazaki A, Sugimoto A, Yoshizaki K, Kawarabayashi K, Iwata K, Kurogoushi R, Kitamura T, Otsuka K, Hasegawa T, Akazawa Y, Fukumoto S, Ishimaru N, Iwamoto T. Coordination of WNT

- signaling and ossification during odontogenesis by piezo type mechanosensitive ion channel component 1. *Sci Rep*. 2019, 9(1):14762
- Shikama Y, Kurosawa M, Furukawa M, Ishimaru N, Matsushita K. Involvement of adiponectin in age-related increases in tear production in mice. *Aging*. 2019, 11(19):8329-8346
- Otsuka K, Yamada A, Saito M, Ushio A, Sato M, Kisoda S, Shao W, Tsunematsu T, Kudo Y, Arakaki R, Ishimaru N. Ascl2-Regulated Follicular Helper T Cells promote Autoimmunity in a Murine Model for Sjögren's Syndrome. *Am J Pathol*. 2019, 94(19):30712-6
- Arakaki R, Ushio A, Kisoda S, Sato M, Nakamura Y, Yuyama K, Tateyama R, Morishita S, Monoi N, Kudo Y, Ishimaru N. Novel effects of rooibos extract on tear and saliva secretion mediated by the muscarinic acetylcholine receptor 3 in mice. *J Oral Biosci*. 2019, 61(3):179-182
- Arakaki R, Ushio A, Otsuka K, Kudo Y, Ishimaru N. A novel method for measuring small amounts of saliva in mice. *Oral Sci Int*. 2019, 16(3):178-180
- 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- κ B pathway disturbs endochondral ossification. *Bone*. 2019, 121:29-41
- 牛尾綾、大塚邦紘、新垣理恵子、工藤保誠、石丸直澄 CCL22 と自己免疫疾患臨床免疫・アレルギー科 71 (5) : 1-7, 2019
- 石丸直澄、山田安希子 シェーグレン症候群の病態機序と制御性 T 細胞 医学のあゆみ 268 (13) : 1241-1245, 2019
- 大塚邦紘、石丸直澄 シェーグレン症候群における濾胞ヘルパー T 細胞の役割 臨床免疫・アレルギー科 73: 241-248, 2020 (学会発表)
- 新垣理恵子、牛尾綾、大塚邦紘、工藤保誠、石丸直澄 多層化カーボンナノチューブ吸入暴露初期の肺胞マクロファージの動態 第108回日本病理学会学術集会 (2019年4月、東京)
- 松倉春奈、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疾患モデルにおける肺病変の解析 第108回日本病理学会学術集会 (2019年4月、東京)
- 牛尾綾、新垣理恵子、佐藤真美、工藤保誠、石丸直澄 シェーグレン症候群病態形成における CCL22 産生マクロファージの役割 第108回日本病理学会学術集会 (2019年4月、東京)
- Rieko Arakaki, Mami Sato, Shinichiro Nakayama, Aya Ushio Yasusei Kudo, Naozumi Ishimaru Role of IL-33 and its

receptor in pathogenesis of Sjögren's syndrome 第 48 回日本免疫学会学術集会 (2019 年 12 月、福岡)

Mami Sato, Rieko Arakaki, Aya Ushio, Yasusei Kudo, Naozumi Ishimaru Effect of multi-wall carbon nanotube exposure on pulmonary immune cells at the early stage 第 48 回日本免疫学会学術集会 (2019 年 12 月、福岡)

Aya Ushio, Mami Sato, Rieko Arakaki, Aya Ushio, Yasusei Kudo, Naozumi Ishimaru Analysis of pulmonary lesions in a murine model of Sjögren's syndrome 第 48 回日本免疫学会学術集会 (2019 年 12 月、福岡)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

図1 実験プロトコール

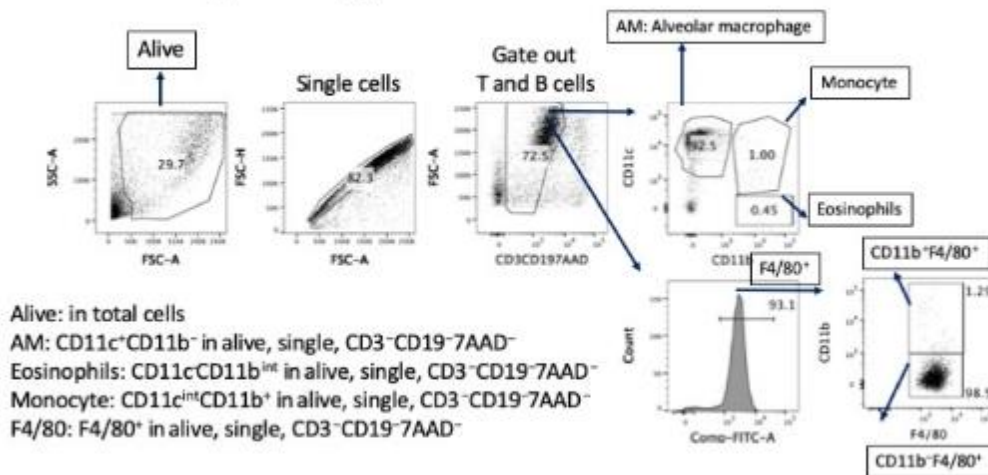
マウス：C57BL/6NcrSLC ♂
 暴露検体：MWNT-7 (Taquann処理/53μmメッシュ濾過)



対照群 (清浄空気)
 T-CNT7 低濃度群 (3 mg/m³)
 T-CNT7 高濃度群 (6 mg/m³)

免疫機能解析 (各群6匹)
 (1) BALF細胞FCM解析
 (2) BALF細胞遺伝子解析 (qRT-PCR)
 (3) BALFサイトカイン (Multiplex)
 (4) 肺組織遺伝子解析 (qRT-PCR)
 (5) 脾臓、リンパ節FCM解析

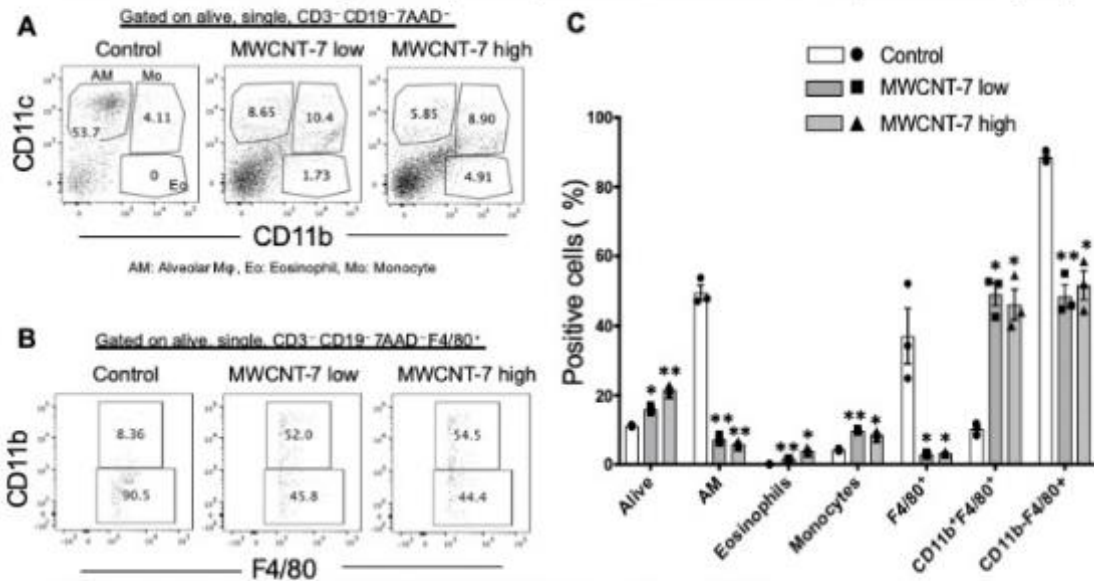
図2 Flow cytometric analysis of BALF cells Gating strategy



(6ヶ月)

図3

Bronchoalveolar lavage fluid (BALF) cells in MWCNT-7-exposed mice (6M)

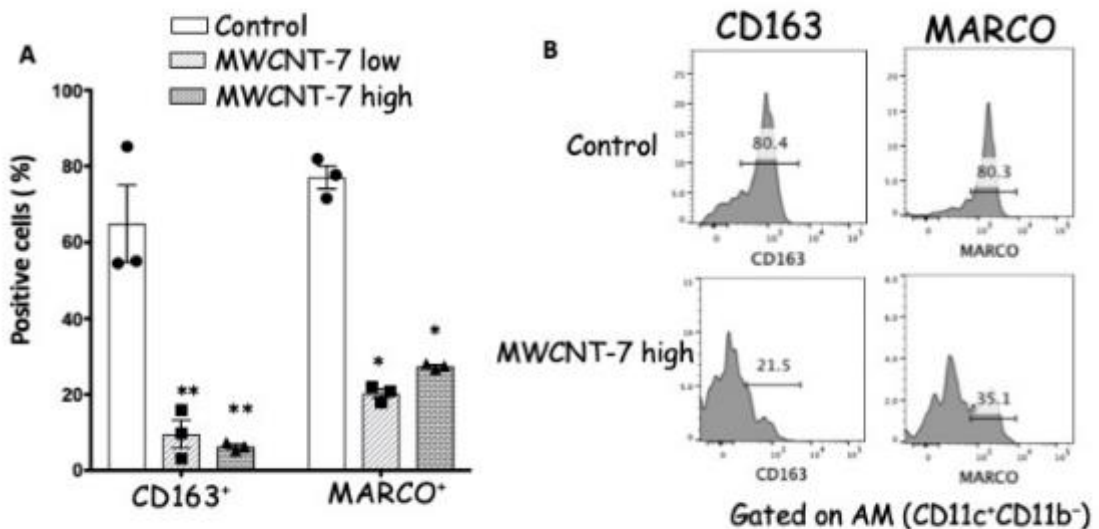


MWCNT-7暴露後6ヶ月でのマウスの気管支肺泡洗浄液細胞分画 (フローサイトメータ解析)

A. 肺胞マクロファージ、好酸球および単球分画: MWCNT-7暴露によってAMは有意に減少し、EoおよびMoは有意に増加した。B. 肺胞マクロファージにおけるCD11b発現分画: MWCNT-7暴露によってCD11b⁺F4/80⁺ AMの有意に増加した。C. BALF細胞中の各分画 *p<0.05, **p<0.005 vs control.

(6ヶ月)

図4 Scavenger receptors on alveolar macrophages of BALF cells in MWCNT-7-exposed mice



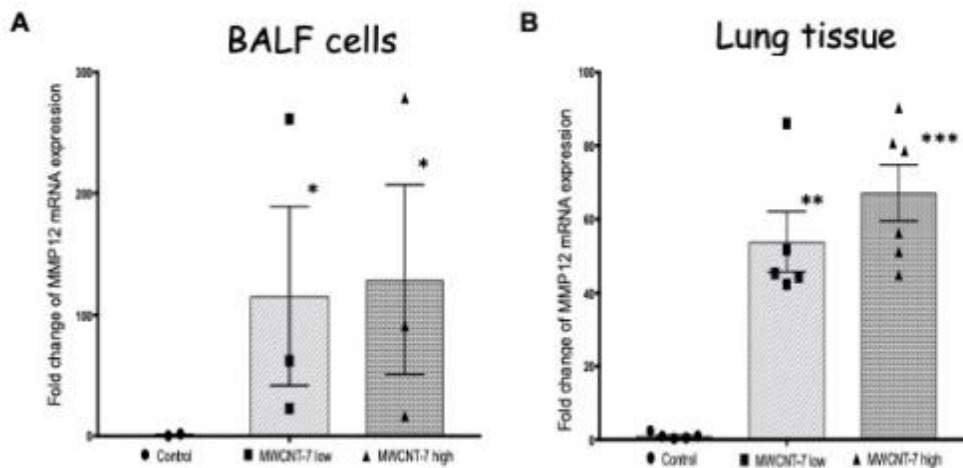
肺胞マクロファージにおけるスカベンジャー受容体の発現 (フローサイトメータ解析)

MWCNT-7暴露によって肺胞マクロファージにおけるスカベンジャー受容体の発現は抑制される。

CD163: receptor for hemoglobin-haptoglobin complex, MARCO: macrophage receptor with collagenous structure

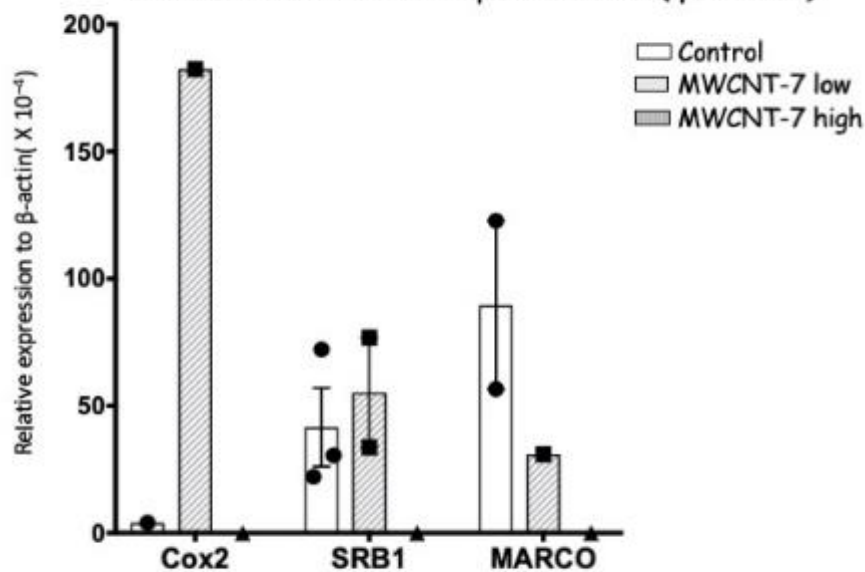
*p<0.05, **p<0.005, vs control

図5 MMP12 mRNA expression of BALF cells and lung tissues in MWCNT-7-exposed mice



MWCNT-7暴露後6ヶ月でのマウスのBALF細胞および肺組織におけるMMP12 mRNA発現 (Quantitative RT-PCR解析)
A. BALF細胞：MWCNT-7暴露によってMMP12 mRNA発現は有意に上昇した。B. 肺組織：MWCNT-7暴露によってMMP12 mRNA発現は有意に上昇した。* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$ vs control.

図6 Cox2, SRB1 and MARCO mRNA expressions of BALF cells in MWCNT-7-exposed mice (qRT-PCR)^(6ヶ月)



酸化ストレスおよびスカベンジャー受容体遺伝子mRNA発現 (q-RT-PCR法)
Cox2 遺伝子は低濃度暴露で増加していた。スカベンジャー遺伝子のmRNA発現は低下。高濃度暴露では検出以下であった。

図7 IL-6, Cox2, SRB1 and MARCO mRNA expression of lung (6ヶ月)
tissues in MWCNT-7-exposed mice (qRT-PCR)

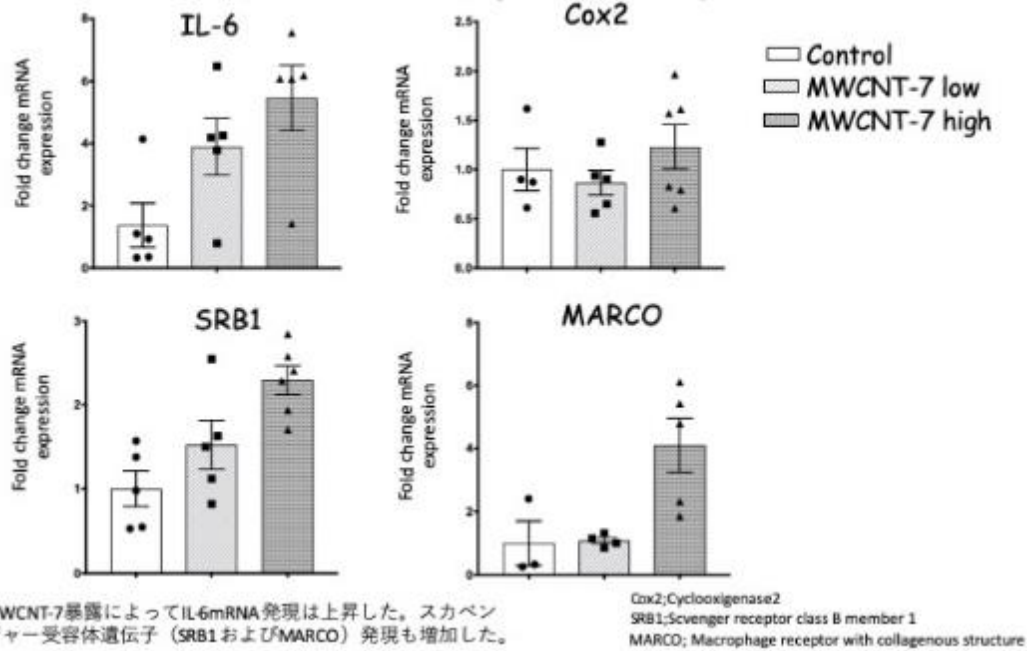
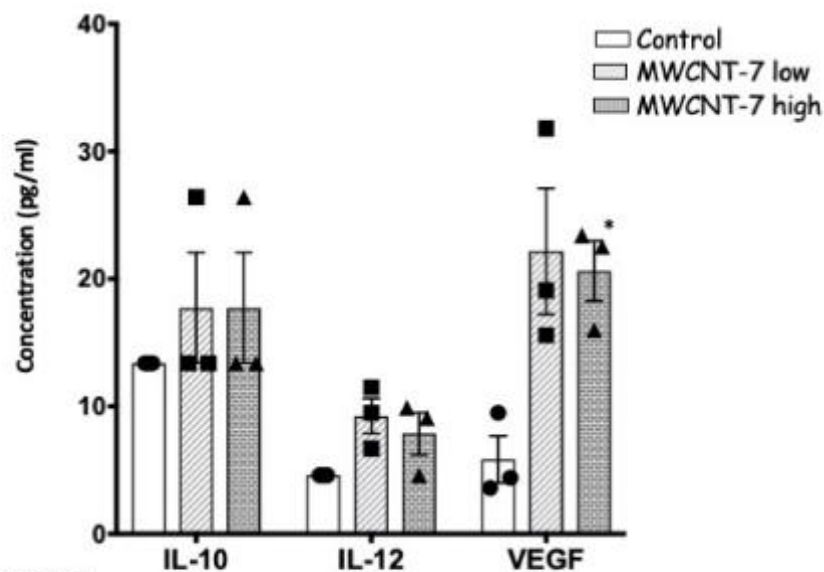


図8

Cytokines in BALF of MWCNT-7-exposed mice

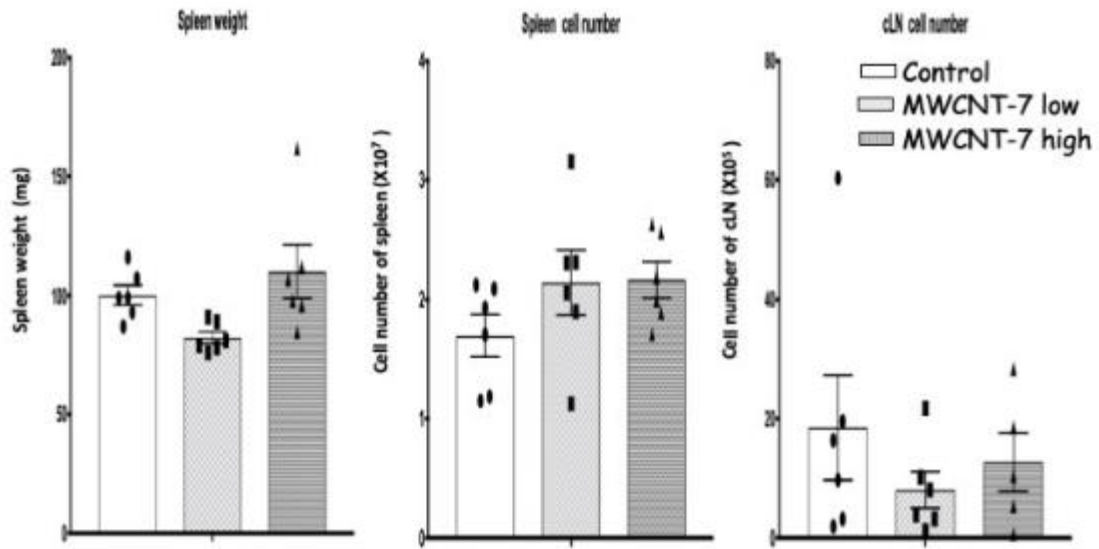
(6ヶ月)



BALF中のサイトカイン定量
BALF中の各種サイトカイン (24種類) を Multiplex解析にて濃度を定量化すると、3種類のサイトカインが検出可能でVEGFはMWCNT-7暴露により増加していた。*p<0.05, vs control

(6ヶ月)

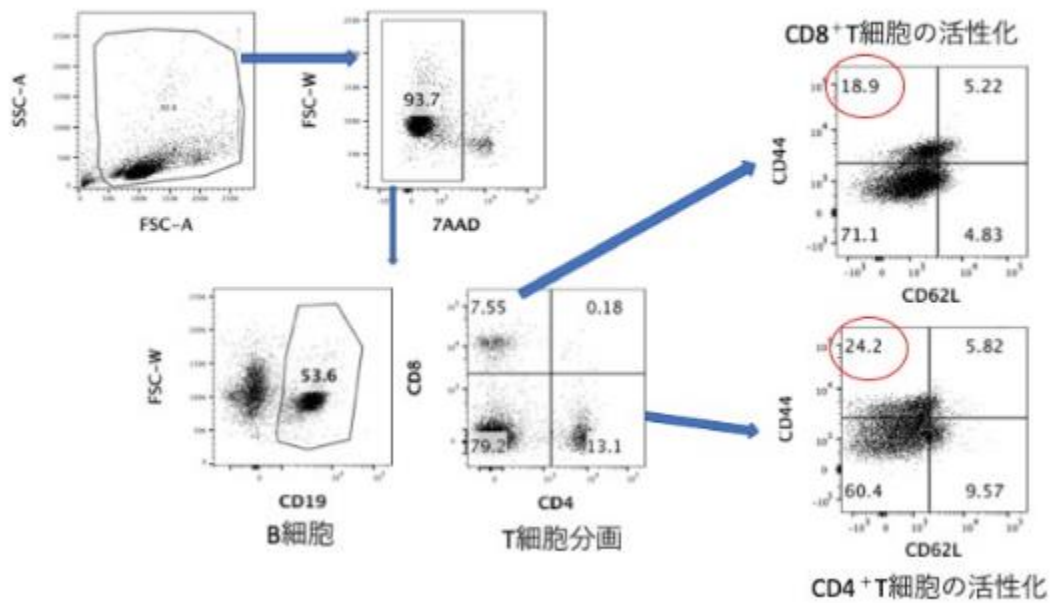
図9 Effect of MWCNT-7 exposure on systemic immune system



脾重量、脾細胞数、頸部リンパ節細胞数ともに、MWCNT-7の暴露で影響は見られない。

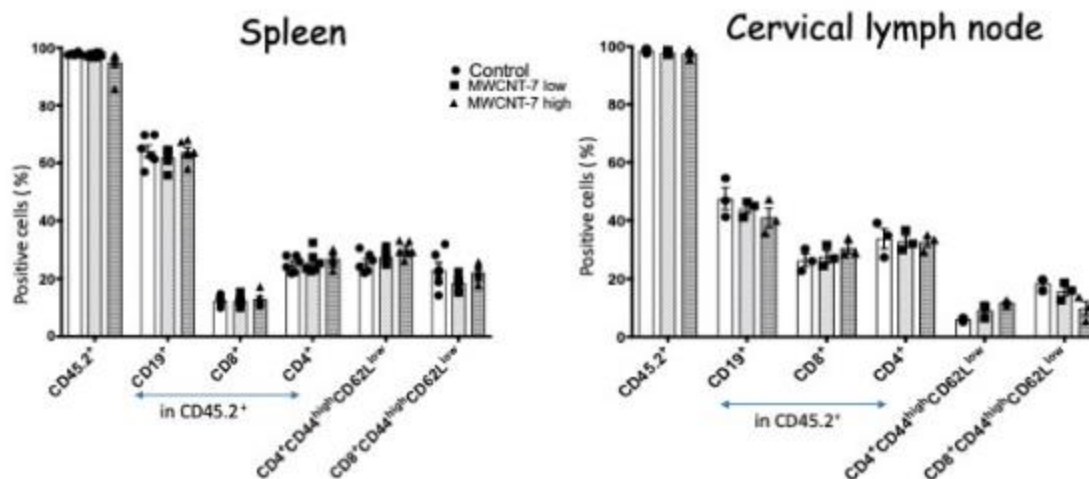
(6ヶ月)

図10 Gating strategy of lymphocytes in spleen and cervical lymph nodes



(6ヶ月)

図11 Effect of MWCNT-7 exposure on T and B cell populations

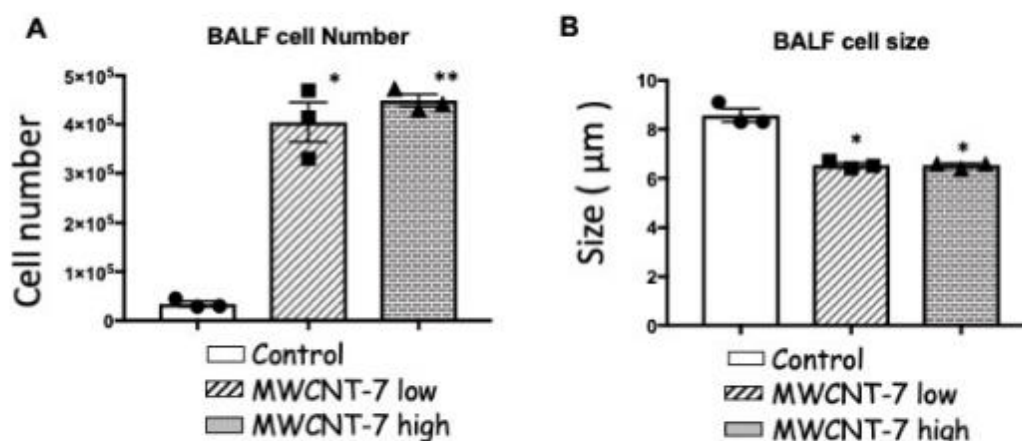


脾臓、頸部リンパ節におけるB細胞およびT細胞分画（フローサイトメータ解析）
MWCNT-7の全身暴露によってT細胞およびB細胞への影響は認められない。
データ = 平均 ± 標準偏差

(12ヶ月)

図12

Effect of MWCNT-7 administration on cell number and size of BALF cells (12m)

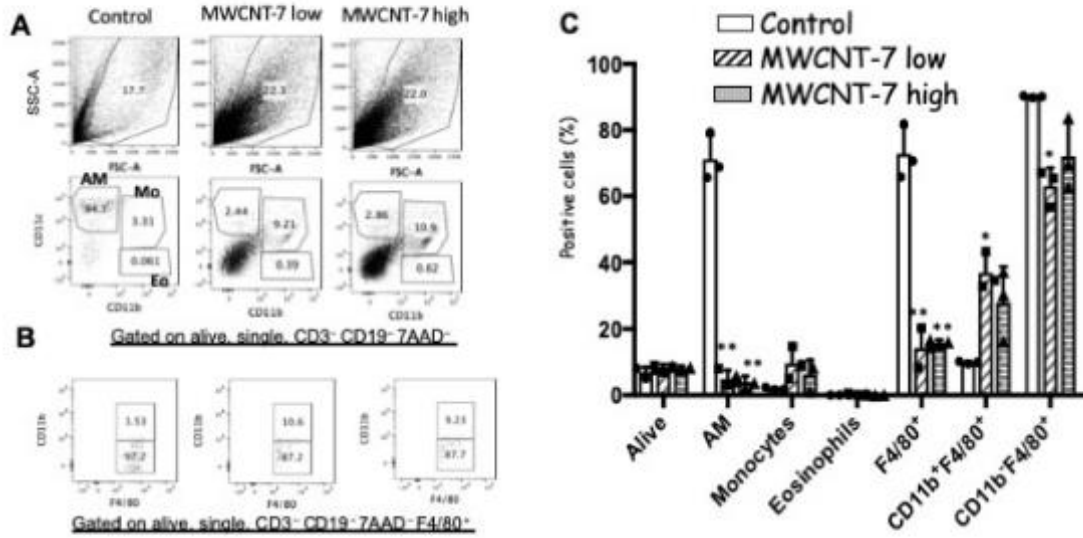


- A. BALF採取後 (1.5mL) の細胞数をカウントした。MWCNT-7暴露でBALF細胞は増加した。データ = 平均 ± 標準偏差 *p < 0.05, **p < 0.0001, vs control
- B. BALF細胞の直径を自動細胞計測装置にて計測した。MWCNT-7暴露でBALF細胞の大きさは小型化した。データ = 平均 ± 標準偏差 *p < 0.05, vs control

(12ヶ月)

図 13

Bronchoalveolar lavage fluid (BALF) cells in MWCNT-7-exposed mice (12m)



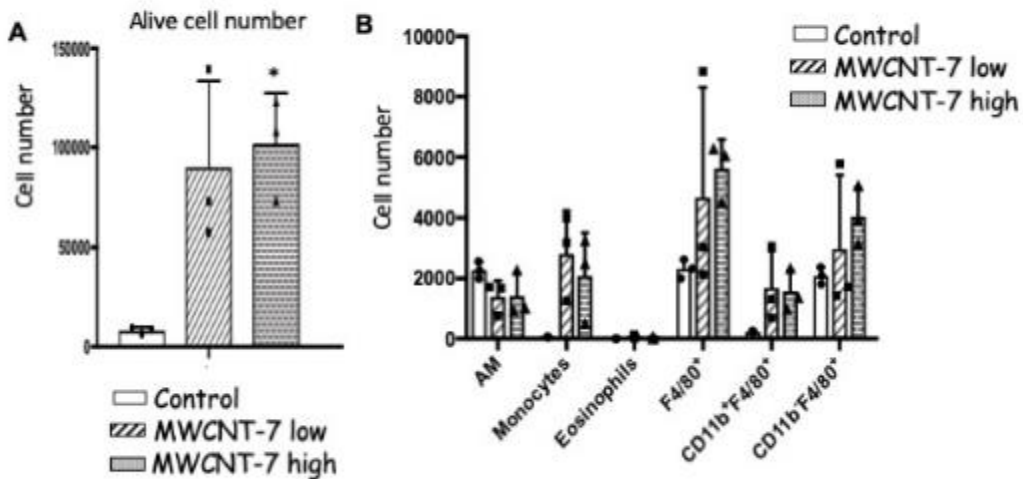
MWCNT-7暴露後12ヶ月でのマウスの気管支肺胞洗浄液細胞分画 (フローサイトメータ解析)

A. 肺胞マクロファージ、好酸球および単球分画: MWCNT-7暴露によってAMは有意に減少し、Moは有意に増加した。B. 肺胞マクロファージにおけるCD11b発現分画: MWCNT-7暴露によってCD11b⁺F4/80⁺ AMの有意に増加した。C. BALF細胞中の各分画 *p<0.05, **p<0.01 vs control.

(12ヶ月)

図 14

Effect of MWCNT-7 exposure on cell numbers of BALF cell subsets (12m)



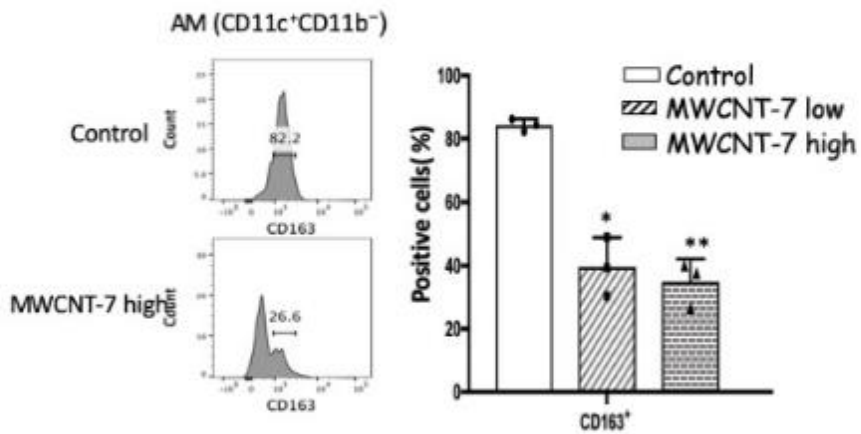
BALF細胞数

A. BALF細胞 (1.5 mL中) の生細胞数 細胞数 = 平均 ± 標準偏差 *p<0.05, vs control

B. BALF細胞中の単球およびマクロファージ分画細胞数 細胞数 = 平均 ± 標準偏差

図15

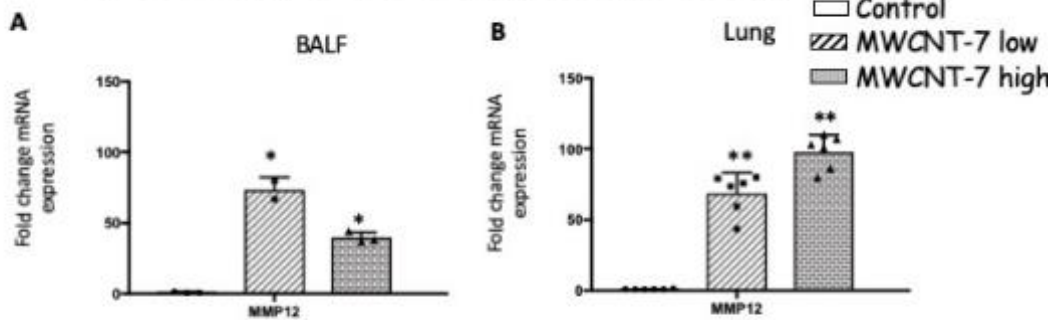
Scavenger receptor CD163 on alveolar macrophages in MWCNT-7-exposure mice (12m)



肺胞マクロファージにおけるスカベンジャー受容体の発現 (フローサイトメータ解析)
 MWCNT-7暴露によって肺胞マクロファージにおけるスカベンジャー受容体の発現は抑制される。
 CD163: receptor for hemoglobin-haptoglobin complex
 *p<0.05, **p<0.01, vs control

図16

MMP12 mRNA expression of BALF cells and lung tissues in MWCNT-7-exposed mice (12m)

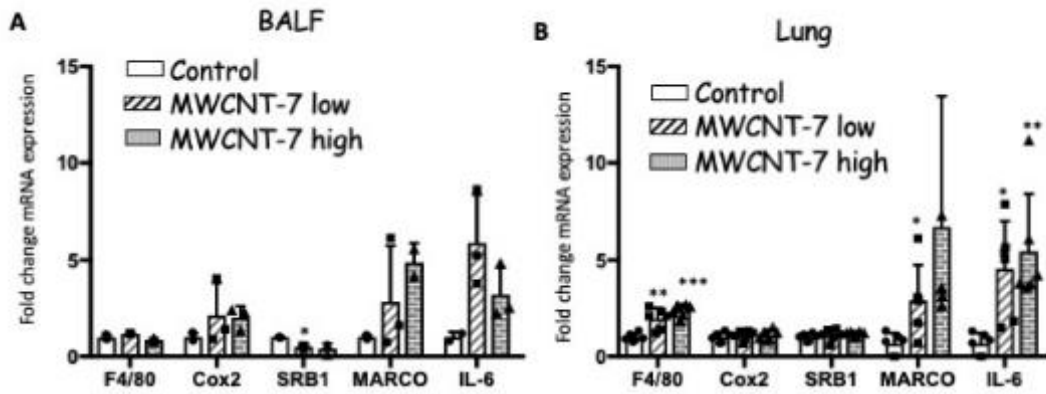


MWCNT-7暴露後6ヶ月でのマウスのBALF細胞および肺組織におけるMMP12 mRNA発現 (Quantitative RT-PCR解析)
 A. BALF細胞: MWCNT-7暴露によってMMP12 mRNA発現は有意に上昇した。B. 肺組織: MWCNT-7暴露によってMMP12 mRNA発現は有意に上昇した。 *p<0.01, **p<0.0001, vs control.

(12ヶ月)

図 17

F4/80, Cox2, SRB1, MARCO and IL-6 expressions of BALF cells and lung tissues in MWCNT-7-exposed mice (12m)



各種遺伝子mRNA発現 (Q-RT-PCR法)

A. BALF細胞、B.肺組織

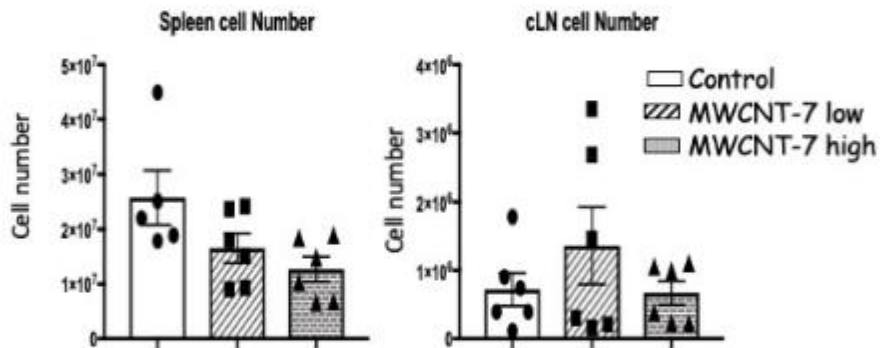
MWCNT-7暴露によってIL-6mRNA発現は上昇した。MARCO発現も増加した。

データ = 平均値 ± 標準偏差 *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.0001

(12ヶ月)

図 18

Number of spleen and cervical lymph node cells in MWCNT-7-exposure mice (12m)



脾臓および頸部リンパ節の細胞数

脾細胞数、頸部リンパ節細胞数ともに、MWCNT-7の暴露で影響は見られない。

データ = 平均値 ± 標準偏差

令和元年度 厚生労働行政推進調査事業費補助金（化学物質リスク研究事業）

分担研究報告書

研究課題名：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 九州保健福祉大学生命医科学部 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 講師

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、前年度実施した MWNT-7 の単回での吸入曝露による respiratory syncytial virus (RSV) 感染マウスモデルでの影響評価に続いて、複数回の吸入曝露試験による評価を実施した。ウイルス感染前 7、5 および 3 日に MWNT-7 を Taquaana 法により吸入曝露し、その後 RSV をマウスに経鼻感染させた。MWNT-7 曝露マウスの感染 5 日後では、肺洗浄液中の CCL5 (RANTES) など肺炎マーカーレベルが有意に上昇したが、肺の病理組織像での明確な肺炎増悪化は認められなかった。一方、単回曝露で見出した肺の線維化に関する指標 (TGF- β) も有意に上昇したが、非感染でも同様の結果が得られた。肺の病理組織像の検討では、胸膜へのカーボンの局在は無く、近傍でのカーボンを貪食したマクロファージやそれらの幅広い集束が認められた。今後、感染後の慢性期での影響や関連因子などについて検討する予定である。

露

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、また定量的なリスク評価のために必要な慢性吸入曝

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。

前年度は、国立衛研毒性部・高橋祐次先生の研究グループでのMWNT-7のTaquaan法による吸入曝露システムを利用して、respiratory syncytial virus (RSV) 感染マウスモデルを用いた単回吸入曝露での感染影響評価を実施した。その結果、吸入曝露による炎症性マーカーの上昇や肺炎増悪化などは明確ではなかったが、線維化に関わる因子 (TGF- β) の上昇を見出した。

今年度は、MWNT-7の複数回 (感染前7,5および3日) 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比較検討した。

B. 方法

MWNT-7 吸入曝露実験

国立衛研において Taquann 全身曝露吸入装置 (ver.3.0) を用い、53 μ m メッシュ濾過した MWNT-7 を質量濃度 3 および 6 mg/m³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。この実験を 1 日おきに 3 回実施した。最終曝露の 2 日後に曝露マウスは、前年度と同様に 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 5×10^5 PFU を麻酔下 (ketamine 40 μ g/g, xylazine 6 μ 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°C に保管した。肺は中性

ホルマリンを気道より注入し、結索後に摘出しホルマリン固定を行った。

肺重量の計測

MWNT-7 の肺負荷量を測定するために、免疫・病理実験とは別にマウスを確保した。体外に残存しているカーボンのコンタミネーションを避けるため、マウス表皮を除去した上で肺を摘出して、ろ紙にて余分な水分を除去後に電子天秤で計量した。

BALF 中のサイトカイン・ケモカインの定量

CCL5 (RANTES) および CCL3 (MIP-1 α) の定量は R&D Systems 社製の Quantikine ELISA キットを用いた。TGF- β 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 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) 吸入曝露による肺重量の変化

今回の試験では、MWNT-7 の吸入曝露による肺負荷量 (蓄積量) を後に測定するため、BALF 取得および病理組織学的実験とは別にマウスを確保した。マウスが 4 週齢と小さいこともあり、非感染マウスは何れ

も0.2 g未満であるのに対して、感染マウスでは約1.5倍以上ありウイルス感染での炎症惹起がはっきり見て取れた。さらに感染の有無にかかわらず、MWNT-7曝露で30～40%程度の重量増加があり、曝露による影響が重量変化からも認められた。

(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、3 mg/m³ 曝露群では約25%有意に上昇したが、6 mg/m³群では頭打ちになっていた。非感染マウスではMWNT-7吸入曝露にかかわらずCCL5レベルは非常に低かった。CCL3レベルは感染マウスではMWNT-7吸入曝露により有意に上昇したが、検出レベルは低いものの非感染マウスでも上昇が認められた。一方、Pro-fibrogenic factorであるTGF-βは、曝露量に依存してウイルス感染マウス群で有意に増加したが、数値のバラツキが大きいもののむしろ非感染マウスでの検出レベルが高かった。

(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。RSV感染により全群で弱い間質性の肺炎が観察され病理スコア化した。複数回にわたるMWNT-7吸入曝露により、RSV感染による肺炎のスコアの明確な上昇（増悪化）は認められなかった。吸入曝露による病理組織学的な特徴と

しては、カーボンを貪食したマクロファージの集束と小肉芽腫様の病変が広く散見された。肺炎像としては、リンパ球の浸潤や肺胞壁の肥厚が特徴的に認められたが、マクロファージの集束との関連は不明であった。また、胸膜へのカーボンの局在は見られなかった。

D. 考察

前回初めて国立衛研・毒性部との共同実験で、Taquann 全身曝露吸入装置でのMWNT-7吸入曝露-RSV感染実験をコンプリートしたが、単回吸入曝露によるRSV感染マウスへの影響は明確でなかった。そのため、今年度は複数回吸入曝露（感染3,5および7日前）により、影響評価を実施した。さらにMWNT-7の肺負荷量も併せて評価することとした。

複数回のMWNT-7吸入曝露による肺負荷量は、ラットではデータが蓄積されているのに対して、マウスではデータがないため、Taquann法の検証の意味もあって毒性部が計測中である。しかし、肺重量の計測結果からも今回の吸入曝露による肺組織への移行に問題はないことが見て取れた。

RSV感染での肺炎マーカーであるケモカインCCL5（RANTES）は、前回実施した単回吸入曝露では上昇していなかったのに対して、複数回の曝露により程度こそ高くないが有意に上昇していることが認められた。病理組織学的に全部の肺葉を検討したが、病理スコアからは肺炎の増悪化は明確にならず、CCL5が感度の良いマー

カーであることが再認識された。一方、単回曝露試験で影響指標の候補として導入した肺の線維化に関わる因子 TGF- β レベルは、複数回の吸入曝露で有意に上昇していた。しかし、前回評価できなかった非感染マウスにおいても上昇し、かつバラツキこそ大きい感染マウスよりその程度が大きいことが判明した。今後、ウイルス感染後の肺炎終息期/慢性期での影響評価、特に繊維化について検証することで影響指標としての価値が判明すると思われる。

今回、マクロファージ炎症性因子 CCL3 (MIP-1 α) の上昇や病理組織像でのマクロファージの集束結果から、改めて MWNT-7 の標的が肺胞マクロファージであることが強く示唆された。しかし、まだ RS ウイルス肺炎の増悪化とマクロファージへの作用との関連が明確になっていない。現在、肺負荷量と影響因子の変動との関連性を評価中である。今後は RSV 感染後の日数を延長する等 *in vivo* 試験と並行して培養マクロファージへの作用など *in vitro* 試験に注力して影響指標の選定を行っていききたい。

E. 結論

1. Taquann 全身曝露吸入装置を用いた MWNT-7 の複数回曝露による RSV 感染マウスへの影響評価において、RSV 感染肺炎マーカー CCL5 の有意な上昇を認めた。
2. 病理組織学的な検討では、MWNT-7 の吸入曝露での肺炎増悪化は明確ではなかつ

たが、マクロファージ集束など特徴的な影響が観察された。

3. BALF 中の TGF- β レベルの上昇は非感染マウスでも顕著であった。
4. MWNT-7 の Taquann 法による肺負荷量を計測すると共に影響因子の変動との関係を検討中である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Miyauchi, A., Watanabe, W., Akashi, T., Hashiguchi, S., Yoshida, H., Sugita, C., Kurokawa, M. Effect of inactivated *Streptococcus pneumoniae* as non-pathogenic particles on the severity of pneumonia caused by respiratory syncytial virus infection in mice. *Toxicol. Rep.* (2019) 6, 514-520.
DOI:10.1016/j.toxrep.2019.05.004..

2. 学会発表

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

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

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

研究課題名：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 β 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。今年度は各種 MWCNT 類による IL-1 β 産生への化合物 X の影響を解析したところ、MWCNT の大きさにより抑制効果が異なることが判明し、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

ナノマテリアルが体内に入ると、マクロファージ等の貪食系細胞が異物として処理にあたる。炎症は免疫応答を誘導して病原体などの異物を排除する生体防御反応であるが、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が、マクロファージの NLR pyrin domain containing 3（NLRP3）インフラマソームを活性化し、炎症性サイトカイン IL-1 β を強力に産生する応答を見いだしている。

本研究では、MWCNT-7 曝露によるマクロファージからの IL-1 β 産生を顕著に抑制する化合物 X について、各種ナノマテリアルの物性の違いによる化合物 X の抑制応答の差異を明らかにする。さらにメカニズム

解明により、慢性影響の *in vitro* 評価の基盤とすることを目的とする。昨年は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の違いを明らかにした。今年度は、各種 MWCNT の物性の違いによる化合物 X の効果を解析する。

B. 研究方法

1. 実験材料および試薬

本研究では下記四種の多層カーボンナノチューブ MWCNT を用いた。

MWCNT-A（長さ：0.5-2 μm 、径：40-70nm）

MWCNT-B（長さ：0.5-10 μm 、径：85-200nm）

MWCNT-C（平均長：4.51 μm 、径：150 nm）

MWCNT-D（長さ：10-100 μm 、径：20-100nm）

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

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

3. 細胞処理および IL-1 β 分泌測定

ヒト単球由来 THP-1 細胞は 24well プレートに播種し、0.3 μ M PMA と 10% FCS を含む RPM1 培地中で 72 時間培養してマクロファージ様に分化し、さらに PMA を除いた培地中で候補薬物の存在下・非存在下で 24 時間培養したのちに、各種 MWCNT 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. 各種 MWCNT による IL-1 β 産生への化合物 X の影響

長さや径の異なる四種類の MWCNT-A, B, C, D を THP-1 マクロファージに 10 μ g/mL の濃度で暴露し、培地への IL-1 β 産生分泌に対する化合物 X (10 μ M) 前処理の影響を調べた。化合物 X の抑制効果は、最小の MWCNT-A (長さ: 0.5-2 μ m、径: 40-70 nm) では約 30%、一方、より長いものを含む MWCNT-B (0.5-10 μ m) および MWCNT-C (平均長 4.51 μ m) ではそれぞれ 76%、75%であった (表 1)。最長の MWCNT-D (10-100 μ m) による IL-1 β 産生は 84%まで抑制された。

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。これまでの研究において、大きさの異なる各種 MWCNT はマクロファージにおいて、NLRP3 インフラマソーム活性化を介する強力な IL-1 β 産生をもたらすことを明らかにしてきた。

今年度は四種の MWCNT について化合物 X による抑制の効果を解析したところ、

MWCNT の長さにより抑制効果が異なることが判明した。MWCNT-A (長さ: 0.5-2 μ m) による IL-1 β 産生は 30%しか抑制されないのに対し、より長いものが含まれる MWCNT-B, C, D による産生は 75-84%とより顕著に抑制され、MWCNT が長いほどより強力な抑制効果が観察された。昨年度検討した粒状の酸化チタンナノマテリアルの場合にも、粒子径が小さいほど抑制が弱い傾向が観察されている。針状であっても酸化チタン F (平均長 1.6 μ m) の場合には抑制効果は 30%であった。したがって、化合物 X が強力な効果を発揮するためには、酸化チタン、MWCNT のいずれの場合にも、2 μ m 以上の長さが必要とされる可能性も考えられる。

昨年度報告したように、化合物 X は、NLRP3 インフラマソームを直接活性化する細胞外 ATP 刺激による IL-1 β 産生には影響しない。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、一定以上の長さの MWCNT 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。そこで MWCNT を認識する受容体の役割の解析を開始しており、インフラマソーム活性化に至るプロセスへの受容体の関与と化合物 X による影響を解析する予定である。

E. 結論

大きさの異なる各種 MWCNT 暴露によるマクロファージからの IL-1 β 産生について、MWCNT の長さにより化合物 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

(学会発表)

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

表1 各種MWCNT暴露によるIL-1 β 産生に対する
化合物Xの抑制効果

	MWCNT-A	MWCNT-B	MWCNT-C	MWCNT-D
Length	0.5-2 μ m	0.5-10 μ m	Ave: 4.51 μ m	数10~ 数100 μ m
Diameter	40-70 nm	85-200 nm	(150 nm)	20-100 nm
化合物X 抑制	30%	76%	75%	84%

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
Landsiedel R., Gamo M. Hirose A.	The Role of <i>In vivo</i> Screening Studies in Assessing Manufactured Nanomaterials	Takebayas hiT., Landsiedel R., Gamo M. eds,	<i>In vivo</i> Inhalation Toxicity Screening Methods for Manufactured Nanomaterials	Springer Singapore		2019	1-21
Tsuda, H., Alexander D	Development of intratracheal intrapulmonary of spraying (TIPS) administration as a feasible assay method for testing the toxicity and carcinogenic potential of multiwall carbon nanotubes	Takebayas hiT., Landsiedel R., Gamo M. eds	<i>In vivo</i> Inhalation Toxicity Screening Methods for Manufactured Nanomaterials	Springer Singapore		2019	145-163

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
Kobayashi K, Kuze J, Abe S, Takehara S, Minegishi G, Igarashi K, Kitajima S, Kanno J, Yamamoto T, Oshimura M, Kazuki Y.:	CYP3A4 Induction in the Liver and Intestine of Pregnane X Receptor/CYP3A-Humanize d Mice: Approaches by Mass Spectrometry Imaging and Portal Blood Analysis.	<i>Mol Pharmacol</i>	96(5)	600-608	2019

別添 5

Ono R, Yasuhiko Y, Aisaki KI, Kitajima S, Kanno J, Hirabayashi Y, Numano T, Iigou M., Naiki-Ito A., Takase H., Hirose A., Taquahashi Y., Kanno J., Hirabayashi Y.	Exosome-mediated horizontal gene transfer occurs in double-strand break repair during genome editing.	<i>Communications Biology</i>	2	Article number: 57	2019
Abdelhamid, M., Khaled AA., Takahashi S., Alexander BD, Tsuda H.	Carcinogenic effect of potassium octatitrate (POT) fibers in the lung and pleura of male Fischer 344 rats after intrapulmonary administration,	<i>Particle and Fibre Toxicology</i>	16	34	2019
Numano T., Higuchi H., Alexander D., Alexander W., Abdelgied M., Elgazzar AM., Saleh D, Takase H., Hirose A, Naiki-Ito A., Suzuki S., Takahashi S., Tsuda H.	MWCNT-7 administered to the lung by intratracheal instillation induces development of pleural mesothelioma in F344 rats,	<i>Cancer Sci</i>	110 (8)	2485-2492	2019
Fukamachi, K., Hagiwara Y., Futakuchi M., Alexander DB., Tsuda H., Suzui M.	Evaluation of a biomarker for the diagnosis of pancreas cancer using animal model.	<i>Toxicol. Pathol</i>	32(3)	135-141	2018
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	<i>Arch. Toxicol.</i>	93	909-920	2019

別添 5

Miyuchi A, Watanabe W, Akashi, T., Hashiguchi, S., Yoshida, H., Sugita, C., Kurokawa, M.	Effect of inactivated Streptococcus pneumoniae as non-pathogenic particles on the severity of pneumonia caused by respiratory syncytial virus infection in mice.	<i>Toxicol. Rep</i>	6	514-520	2019
Shemansky JM, McDaniel LP, Klimas C, Dertinger SD, Dobrovolsky VN, Kimoto T, Horibata K	Polli JE, Heflich RH: Pig-a gene mutation database	<i>Environ Mol Mutagen</i>	60(8)	759-762	2019
Horibata K, Sekimoto M, Sugiyama KI	Comprehensive framework between environment and genomic stability	<i>Genes Environ</i>	41	17	2019
Kirkland D, Uno Y, Luijten M, Beevers C, van Benthem J, Burlinson B, Dertinger S, Douglas GR, Hamada S, Horibata K, Lovell DP, Manjanatha M, Martus HJ, Mei N, Morita T, Ohyama W, Williams A	<i>In vivo</i> genotoxicity testing strategies: Report from the 7th International workshop on genotoxicity testing (IWGT)	<i>Mutat Res</i>	847	403035	2019

令和2年3月27日

厚生労働大臣 殿

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

次の職員の令和元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 (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。

令和2年3月27日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品

所属研究機関長 職名 所長

氏名 奥田 晴彦

次の職員の令和元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 (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。

令和2年3月27日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬

所属研究機関長 職名 所長

氏名 奥田 晴

次の職員の令和元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 (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

令和2年3月27日

機関名 国立医薬品

所属研究機関長 職名 所長

氏名 奥田 晴彦

次の職員の令和元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 (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。

厚生労働大臣 殿

令和2年3月27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

次の職員の令和元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 (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。

厚生労働大臣 殿

令和2年 月 日

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

次の職員の令和元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
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 (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
日本バイオアッセイ研究
所属研究機関長 職名 所長代理
氏名 相磯 成敏

次の職員の令和元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。

- 研究事業名 化学物質リスク研究事業
- 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所長
(氏名・フリガナ) 菅野 純

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"/>	公益財団法人ヒューマンサイエンス振興財団	<input checked="" type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (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。

令和2年 3月13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

次の職員の令和元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対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 (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 九州保健福祉大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 高崎 眞月 印

次の職員の令和元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) 保健科学部 ・ 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 (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。



厚生労働大臣 殿

令和2年4月1日

機関名 東京都健康安全研究センター

所属研究機関長 職名 所長

氏名 吉村 和

次の職員の令和元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

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 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 (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input 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。