

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 2 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 広瀬 明彦

令和 3 年(2021 年)3月

令和 2 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.....	17
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.....	18
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.....	29
3. 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.....	40
4. 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.....	56
5. 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.....	58
6. 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.....	66
7. 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 渡辺 渡.....	84
8. 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.....	89
9. 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.....	92
III. 研究成果の刊行に関する一覧表.....	97

令和2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についてより効率的な定量的リスク評価手法を開発する為に、既に報告されている多層カーボンナノチューブ(MWCNT)のうちのMWNT-7による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検討を行うことを目的としている。また、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、リスク評価に関する国際動向を把握する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 Taquann 全身曝露吸入装置を用いた間欠曝露試験(4週毎に、6時間/回)のプロトコルを確立し、MWNT-7を2年間に渡って吸入曝露する実験を行った。26回の平均質量濃度は低濃度群、高濃度群それぞれ $2.7 \pm 0.1 \text{ mg/m}^3$ 、 $5.2 \pm 0.2 \text{ mg/m}^3$ であった。群間に死亡率の差は認められなかった。肉眼的観察において、肺の外観は曝露濃度依存的に灰白色から灰色を呈して腫大し、肺重量は増加した。低濃度群に2例の肺がんを示唆する病変が観察された。気管内投与については、吸入曝露と同じ間隔でラットにMWNT-7を4週間に1度、2年間にわたり実施した結果、肺負荷量は、低用量群で約 $900 \text{ } \mu\text{g/Lung}$ 、高用量群で約 $3600 \text{ } \mu\text{g/Lung}$ に達し、用量依存的に肺腫瘍および胸膜中皮腫が観察された。短期間気管内噴霧(2週8回投与) + 慢性観察(TIPS)法による長さの異なる2層ナノチューブ(DWCNT)(1.5、7.0 および $15 \mu\text{m}$)の肺発がん実験では $1.5 \sim 15 \mu\text{m}$ のすべて群の合計で発がん性があると考えられた。 $15 \mu\text{m}$ 群では悪性中皮腫が2例見られ、生物学的に有意と考える。慢性影響指標に関する研究では、遺伝毒性指標として採材時期を最適化したマウス *in vivo* 肺小核試験遺伝毒性試験により、MWCNT-7は気管内投与においても全身吸入曝露と同様に肺小核陽性を示すことを明らかにした。免疫ネットワークへの影響では、MWCNT-7の吸入曝露の長期暴露(24ヶ月)後の肺胞マクロファージの割合が高濃度のMWCNT-7曝露で増加すると共に全身のマクロファージ分化にも影響が生じることが示された。加えて、*in vitro* および慢性腹膜炎モデルの系によりMMP-12を介した慢性炎症の機転が示された。一方、感染性に対する影響としては、Taquann法によるMWNT-7の複数回吸入曝露後のRSV感染マウスへの回復期(感染21日後)での影響を検討した結果、RSV感染のみでは肺炎はほぼ終息していたのに対して、MWNT-7曝露マウスではカーボン貪食マクロファージの集束など明確な肺炎像が認められた。特に高用量曝露で顕著であり、肺炎マーカーの上昇をよく反映した結果が得られた。*In vitro* メカニズム研究では、MWCNTによるNLRP3インフラマソームを介する炎症応答へのスカベンジャー受容体MSR1の関与を解析し、特定サイズのMWCNTによるIL-1 β 産生への部分的関与を明らかにした。海外動向調査では、OECD工業用ナノ材料作業部会(WPMN)等の国際会合に参加して、ナノ材料に関する最新の国際動向を調査し、WPMNにおいて先端材料(Advanced materials)を検討対象としているが、Advanced materialsの定義に関する情報が不足している他、有害性、使用実態、曝露に関する情報のデータギャップがナノ材料

よりも大きく、今後も継続的に情報収集を行う必要があると考えられた。

以上、間欠曝露型の吸入及び気管内投与の慢性実験について、曝露実験を終了することができ、2年間の連続吸入曝露と同程度の催腫瘍性を間欠曝露でも得ることができた。しかし、中皮の増殖影響は気管内投与でより強く、肺がんの誘発とは異なるメカニズムが示唆された。また、肺がんの誘発性には繊維の長さがあまり影響しないことも示された。今後は、より短期の間欠投与の試験系を確立すると共に、中皮腫と肺がんを区別してリスク評価する為の指標や曝露手法の開発が必要であることが明らかとなった。

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 第二室長
菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 客員研究員
渡辺 渡 九州保健福祉大学大学院・保健科学研究科・微生物学教授
石丸 直澄 徳島大学大学院医歯薬学研究部 教授
最上 知子 国立医薬品食品衛生研究所 生化学部 主任研究官
小林 憲弘 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 第三室長
北條 幹 東京都健康安全研究センター・薬事環境科学部生体影響研究科・主任研究員

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班の目的とした。

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。現在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 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(T-CNT7#53)の2年間吸入曝露実験を行った。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2mg/m³)、高濃度群(目標濃度6mg/m³)の3群構成とし、各群50匹の動物を実験に供した。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(高橋)。R2年度に2年目の最終定期解剖を実施した。解剖に際して、肺負荷量測定用の肺サンプル、免疫機能解析用のBALFの採取、病理評価のサンプリング、血液検査、血液生化学検査を実施した。病理標本用の動物は、気道内のMWCNT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、常法によりパラフィン包埋切片を作製、HE及び特殊染色により病理組織学的評価を(菅野)。

ラット気管内投与試験にもTaquann処理(53 μ mメッシュ)したMWNT-7(T-CNT7#53)を用いた。200°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。経口ゾンデあるいはスプレー式ゾンデにより、4週間に1度、合計26回の投与を実施した。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。途中解剖及び実験開始104週時点で生存した全個体について、病理組織学的評価した。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、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た(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、小核の出現と消失の時間経過による影響についての先行研究に基づき、*ex vivo*培養法を応用した気管内投与下における*in vivo-in vitro*法を用いた肺小核試験法を実施した。0.1% Tween 80を含む生理食塩液に超音波で分散したMWCNT-7をマウスに100 μ L/匹(0.05 mg/匹)で単回

気管内投与し、48時間後に血液および肺を採材した。また、陽性対照には遺伝毒性物質であるEthyl methanesulfonate(EMS)を200 mg/kgの用量で2日連続腹腔内投与し、最終投与後24時間に採材した。得られた血液検体および肺を用いてそれぞれ幼若赤血球小核試験および肺小核試験によりMWCNT-7の遺伝毒性を評価した(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24ヵ月曝露の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。また、*in vitro*の実験系として、RAW264.7(マウスマクロファージ細胞株)およびNIH3T3細胞(マウス線維芽細胞株)を用いてMWCNT-7曝露による繊維化の機転を探索するとともに、B6マウスあるいはNF- κ B1KOマウスを用いたMWCNT-7誘導性慢性腹膜炎モデルによる線維化に至る慢性炎症の分子機序を検討した(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、回復期である21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、炎症反応の初期応答であるマクロファージでのインフラマソーム活性化を介するIL-1 β 産生については、ナノマテリアルの取込への関与が予想されるスキャベンジャー受容体MSR1の役割を解析し

た。MSR1 特異的 siRNA 処理を行い、ノックダウン効率は mRNA 発現量を測定して判定した。物性の異なる様々な MWCNT 刺激による IL-1 β 産生へのノックダウンの影響を解析した(最上)。

国際動向に関する研究:

OECD の第 20 回 ナノマテリアル作業グループ (WPMN20) や先端材料に関するオンライン会合に参加しリスク評価や、粒子サイズ分布の計測ガイドラインに関する情報収集を行った(小林、広瀬)。

<倫理面への配慮>

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

C. 研究結果

慢性影響評価手法検討:

MWNT-7 吸入曝露実験では、目開き 53 μm の金属製フィルターを用いて Taquann 法処理した MWNT-7 (T-CNT7#53) を、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 2 年間の吸入曝露を行った。T-CNT7#53 低濃度群の全身曝露吸入実験における全体の平均質量濃度は $2.7 \pm 0.1 \text{ mg/m}^3$ 、高濃度群では $5.2 \pm 0.2 \text{ mg/m}^3$ 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。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。

体重は初回曝露後 54 週まで、対照群と

T-CNT7#53 曝露群との間に差はみられなかったが、54 週以降、H 群で体重低下傾向であった。2 年間の曝露期間において、死亡または切迫屠殺に供した動物は、対照群 7/50 匹、L 群 9/50 匹、H 群 13/50 匹であったが、群間に有意差は認められなかった。最終解剖において、肺は曝露濃度依存的に腫大し、色調は肺白色~灰色を呈した。胸腔壁の背側において、ミルキースポットが脊椎骨の両側に (L 群 15/18 例、H 群 15/16 例) 観察された。L 群の 2/18 例において、肺に白色腫瘍が観察された。また、胸水 (L 群 3/18 例、H 群 16 例) が観察された。肺右葉の気管近傍に位置するリンパ節は腫大し、灰色から黒色を呈する様子 (L 群 12/18 例、H 群 9/16 例) が観察された。肺の腫大に伴うと考えられる心肥大 (L 群 4/18 例、H 群 6/16 例) が観察され、対照群にも 1/20 例観察された(表 1)。肺重量および肺負荷量は、曝露濃度依存的に増加した。血液生化学検査において、電解質とヘマトクリットに影響はみられず、T-CNT7#53 曝露群において肝の胆道系酵素である LAP (leucine aminopeptidase)、TCHO、BUN の低下がみられたが、いずれも軽度であった。

2 年間のラット気管内反復投与試験では、実験開始 80 週頃から、高用量群及び高用量スプレー群で、胸腔内中皮腫による瀕死例・死亡例が多数発生した。最終解剖時、高用量群および高用量スプレー群の体重は有意に低下し、肺全葉の重量は、いずれの MWCNT 投与群においても C 群に対して有意に増加した。組織学的には、MWCNT 繊維の沈着や MWCNT を食したマクロファージの凝集が肺実質全体にび慢性に認められ、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。腫瘍性病変として、肺実質では腺腫と腺癌が、胸腔内では中皮腫が観察された(図、表)。腺腫と腺癌の両者を合わせた発生頻度は、高用量群で有意に増加し、胸腔内中皮腫の発生頻度は、高用量群及び高用量スプレー群で有意に増加した(表)。最終解剖時の低用量群、高用量群及び高用量スプレー群の、肺内の MWCNT 量はそれぞれ 920 ± 240 (Mean \pm S.D.) $\mu\text{g/Lung}$ 、 3615 ± 902 $\mu\text{g/Lung}$ 及び 3902 ± 350 $\mu\text{g/Lung}$ であった(図)。

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で死亡している。また、1.5、7.0 および 15 μm 投与群の DWCNT の肺発がん性は 1.5~15 μm の範囲で発がん性があると考えられる。15 μm 群では悪性中皮腫が 2 例見られ、生物学的に有意と考える。また MWCNT-7 の胸膜中皮における強い発がん性が再確認された。

慢性影響指標に関する研究:

遺伝毒性について、幼若赤血球小核試験では、陽性対照である 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が認められたが、MWCNT-7 投与群は有意な小核誘発率の増加は認められなかった。その一方で、*in vivo-in vitro* 法を用いた肺小核試験では、陽性対照である EMS 投与群および MWCNT-7 投与群は共に、陰性対照群と比較して有意な小核誘発率の増加が認められた。これらの結果から、気管内投与された MWCNT-7 は造血系では遺伝毒性を有さないが、直接曝露組織である肺では遺伝毒性を有することが示された。

MWCNT-7 の長期曝露 (24 ヶ月) 後の BALF 細胞の肺胞マクロファージの割合が高濃度の MWCNT-7 曝露で増加するとともに、脾臓あるいはリンパ節でのマクロファージ分化に影響が生じることが判明した。加えて、RAW264.7 細胞および NIH3T3 細胞を用いた実験から、MWCNT-7 曝露によりマクロファージの MMP-12 を介した線維化の機転が働いていることが明らかになった。さらに、B6 マウスへの MWCNT-7 の腹腔内投与による慢性炎症が NF- κ B1KO マウスへの投与で繊維化の抑制が確認されたことから、MWCNT-7 曝露とマクロファージにおける NF- κ B の活性化を介した MMP-12 による慢性炎症の制御機構が明らかにされた。複数回の MWCNT-7 吸入曝露試験に合わせて RSV 感染実験を実施した。感染 21 日後の BALF 中の肺炎指標である CCL5 レベルは検出限界以下であったが、肺の線維化に関する指標 TGF- β は高用量曝露-感染で上昇していた。病理組織学的な検討で

は、RSV 感染のみでは肺炎はほぼ終息していたのに対して、曝露マウスではカーボン貪食マクロファージの集束や肺胞壁・膠原繊維の肥厚など明確な増悪肺炎像が認められ、特に高用量曝露で顕著であった。さらに曝露マウス気道上皮での杯細胞等での粘性多糖の過分泌(PAS 染色陽性)は、RSV 感染で亢進していることも見出した。この様に MWNT-7 吸入曝露により RSV 肺炎は回復期でも継続亢進しており、最盛期(感染 5 日後)で見出した肺炎マーカーの上昇をよく反映した結果が得られた。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 分泌応答におけるスキャベンジャー受容体 MSR1 の役割を解析した。特異的 siRNA 処理により MSR1 発現はほぼ完全に抑制されたが、MWCNT 刺激による IL-1 β 産生は最大でも 30%に止まった。抑制効果は MWCNT のサイズにより異なり、より長い MWCNT では軽度の抑制が認められたが、短いものでは効果は無かった。

国際動向に関する研究:

第 20 回工業用ナノマテリアル業部会(WPMN20)や先端材料に関するオンライン会合に参加し、主として新規の先端材料に関するリスク評価や、粒子サイズ分布の計測ガイドラインに関する情報収集を行った。WPMN では、今後の検討対象に先端材料(Advanced materials)を加えることが決定しており、2021 年 6 月開催予定の WPMN21 で議論するため、WPMN21 での議論に向けた Ad hoc グループが設置された。また、先端材料をテーマとした 3 回のオンライン会合の開催が決定し、2020 年度に 2 回開催された。

。

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、H30 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 つの反復曝露試験について 2 年間の曝露試験を終了した。得られたデータから、慢性の連続吸入試験の肺内負荷量と同レベルにすることが可能であることが示された。

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、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。MMAD は、計算値に約 10 倍の幅があったが、 σ の大きな値を外れ値とし、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 μ m、 σ 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。MWNT-7 の 2 年間の間欠吸入曝露実験において、最終解剖を行ったが、病理組織標本は作製中であるため、最終的な結論には至っていないが、以下の事が示された。Kaplan-Meier 解析では、死因を考慮せずに解析を行った。その結果、Log-rank 検定では、曝露による影響は認められていない。今後の病理組織評価によって死因を分類することができれば、検体による影響を明らかにできる可能性がある。肺の外観は、曝露濃度依存的に灰

白色から灰色を呈して腫大し、肺重量が増加していた。このような外観の変化は 6 ヶ月及び 12 ヶ月の解剖では見られておらず、また病理組織評価においては明確な線維性肉芽腫の形成は認められていない。24 ヶ月では肺組織の弾力性を増しており、検体の肺への沈着に伴い、線維化が亢進していることが推察される。また、肉学所見では中皮腫と考えられる所見は観察されていないが、胸腔の腔壁側にはミルキースポットが観察されており、これが観察された脊椎の両側は、p53⁺/₋マウスを用いた MWCNT 吸入による先行研究において、肉眼では明らかな変化が観察されないが、中皮腫発がんを示唆する顕微鏡的病変が誘発されること確認している部位であるため、今後の病理組織評価が注目される部位である。

ラットの気管内投与については、2 年間にわたる間欠の反復気管内投与により、用量依存的な肺腫瘍および胸腔内中皮腫の増加が認められた。肺腫瘍の発生頻度は、吸入曝露試験 (Kasai *et al.* 2016) と同程度であり、今回の気管内反復投与試験が、代替試験になりうることを示された。しかしながら、予想よりも総肺負荷量が高くなり、Kasai らの結果 (1800 µg/Lung) の 2 倍程度となったため、おそらく胸腔内に移行した MWCNT 繊維の量も増加し、胸膜中皮腫が発症したものと考えられた。TIPS による既報でも、MWNT-7 を合計 1500µg/rat で投与した実験において (Numano *et al.* 2019)、95%の個体に胸膜中皮腫が発生した。MWCNT の発がん性を評価する場合、今回の実験のように吸入曝露を模して肺負荷量を次第に上げる場合、あるいは、負荷量を早期に上げる

場合 (TIPS)、どちらのプロトコルであっても、総負荷量を高くすると、中皮腫による早期死亡が増え、2 年後の肺腫瘍の評価に影響を与えることがわかった。今回の高用量群の投与条件では、肺腫瘍と中皮腫のどちらも発症し、発がん性については概ね TIPS による Suzui *et al.* 2016 の結果と同様であった。肺腫瘍、中皮腫どちらも発症までに長期間を要することから、負荷量の経時的な変化のパターン (AUC 形状) よりも、早期 (おそらく実験開始 1 年以内) の総負荷量が、発がん性の評価には重要であることが示唆された。

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、長さの異なる DWCNT について、これまでの報告で 0.7µm 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、15µm の DWCNT について TIPS 投与を行った。実験した長さの範囲 (1.5 ~ 15µm) で発がん性は認められたが、発がん性あるいはその強度において長さによる明らかな差異はなかった。

慢性影響指標に関する研究では、小核の出現と消失の時間経過による影響を考慮した上で実施した *in vivo-in vitro* 法を用いた肺小核試験では、気管内投与された MWCNT-7 は造血系では遺伝毒性を有さないが、直接曝露組織である肺では遺伝毒性を有することが明らかになった。これらの結果は、以前に我々が実施した MWCNT-7 全身吸入曝露下での *in vivo-in vitro* 法を用いた肺小核試験の結果と同様であったことから、今回の試験条件では全身吸入曝露および気管内投与での MWCNT-7 による遺伝毒性の発現形

態に大きな差異は無いことが示された。今回の結果は、KatoらによるCNT気管内注入下での肺組織コメットアッセイによる遺伝毒性評価結果とも矛盾しておらず、CNTは肺において、DNA損傷性を有すると考えられる。

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、肺免疫の機能不全に関与する可能性が示唆されるとともに、長期(24ヶ月)の曝露では全身のマクロファージ分化にも影響が生じることが示された。加えて、マクロファージ細胞株を用いた *in vitro* の実験系および腹腔内投与による慢性腹膜炎モデルの系により、MWCNT-7曝露によるマクロファージによるMMP-12を介した慢性炎症の機転が示された。一方、感染性に対する影響としては、Taqaan法による吸入曝露後の感染回復期では、肺炎マーカーCCL5は検出限界以下であったが、TGF- β は高用量曝露-感染群では対照より高値を示し、MWNT-7吸入曝露の影響が回復期でも進行しつつあることが示された。病理組織学的検討において、RSV感染対照群での肺炎はほぼ終息していたのに対して、MWNT-7曝露群ではカーボン貪食マクロファージの周囲にリンパ球浸潤も残っており、スカベンジンされなかったリンパ球が、免疫機能低下マクロファージ近傍に残ったと考えられる。さらに曝露群の細気管支において、PAS陽性の粘性多糖分泌細胞が見出され、感染群ではさらに多く存在し、MWNT-7は気道上皮の機能へ影響している可能性も示された。この様に、これまで最盛期で見出したCCL5

等のマーカー変動が回復期の病態を反映しており、MWNT-7の感染応答への影響指標として有用である可能性を示している。

*In vitro*メカニズム解析研究において、様々なMWCNTにより惹起されるNLRP3インフラマソームを介するIL-1 β 産生について、本年度はスカベンジャー受容体MSR1の役割を解析した。siRNAによりほぼ完全なノックダウンが達成されたが、MWCNT刺激下のIL-1 β 産生におよぼす影響は軽度であった。MWCNT物性の違いによる差は認められたが、スタチンの抑制効果における寄与はごくわずかであると推定された。

海外動向調査では、OECDのWPMNにおいて検討対象に先端材料(Advanced materials)を加えることが決定しているが、現場では「advanced materials」の定義に関する情報が不足しており、今後、共有が必要である。また、先端材料の有害性、使用実態、曝露に関する情報のデータギャップがナノ材料よりも大きい等の問題点が指摘されていることから、今後、さらなる議論が必要であり、情報収集を継続する必要があると考えられる。

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)を行った。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し 24 ヶ月の最終期解剖を実施した。群間に死亡率の差は認められなかった。肺の外観は、曝露濃度依存的に灰白色から灰色を呈して腫大し、肺重量が増加した。肉眼的観察において L 群に 2 例に肺がんを示唆する病変が観察された。ラットへ 4 週間に 1 度、合計 26 回の気管内投与を 2 年間実施した結果では、用量依存的に肺腫瘍および胸膜中皮腫が誘発された。Kasai *et al.* 2016 の吸入曝露試験と同様の AUC 形状での反復曝露により、同程度の肺腫瘍が見られたため、代替法として有用と考えられた。TIPS 法による長さの異なる DWCNT 曝露による慢性影響では実験した長さの範囲(1.5~15 μ m)では発がん肺発がんが見られたが長さによる明らかな差異はなかった。

慢性影響指標に関する研究では、小核の出現と時間経過による影響を考慮して、投与から採材までの期間を最適化した上で、*in vivo-in vitro* 法を用いた肺小核試験を実施し、MWCNT-7 気管内投与における遺伝毒性影響を幼若赤血球小核試験および肺細胞を用いた小核試験で評価した。その結果、MWCNT-7 は造血系では遺伝毒性を示さないが、直接曝露組織である肺では小核を誘発し、遺伝毒性を示すことを明らかにした。これらの結果は、MWCNT-7 全身吸入曝露下での結果と矛

盾せず、全身吸入曝露および気管内投与での MWCNT-7 による遺伝毒性の発現形態が同様であることが示された。免疫ネットワークへの影響については、MWCNT-7 の全身吸入曝露の長期曝露(24 ヶ月)後の BALF 細胞の肺胞マクロファージの割合が高濃度の MWCNT-7 曝露で増加するとともに、脾臓あるいはリンパ節など全身のマクロファージ分化にも影響が生じることが示された。加えて、*in vitro* の実験系および腹腔内投与による慢性腹膜炎モデルの系により MWNT-7 曝露によるマクロファージによる MMP-12 を介した慢性炎症の機転が示された。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により、RSV 感染回復期での影響を感染病態変化として確認し、これまで見出した CCL5 等のマーカー変動が MWNT-7 の感染応答への影響指標として有用である可能性を示した。*In vitro* メカニズム解析研究において、MWCNT 刺激による IL-1 β 産生へのスカベンジャー受容体 MSR1 の寄与は MWCNT の物性により異なったが、大きな寄与は無かった。

海外動向調査では、OECD 工業用ナノ材料作業部会(WPMN)等の国際会合に参加して、ナノ材料に関する最新の国際動向を調査し、WPMNにおいて先端材料(Advanced materials)を検討対象としているが、Advanced materials の定義に関する情報が不足している他、有害性、使用実態、曝露に関する情報のデータギャップがナノ材料よりも大きく、今後も継続的に情報収集を行う必要があると考えられた。

以上、間欠曝露型の吸入及び気管内投与の慢性実験について、曝露実験を終

了することができ、2年間の連続吸入曝露と同程度の催腫瘍性を間欠曝露でも得ることができた。しかし、中皮の増殖影響は気管内投与でより強く、肺がんの誘発とは異なるメカニズムが示唆された。また、肺がんの誘発性には繊維の長さがあまり影響しないことも示された。今後は、より短期の間欠投与の試験系を確立すると共に、中皮腫と肺がんを区別してリスク評価する為の指標や曝露手法の開発が必要であることが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Wang Q., Zhao Z., Alexander DB, Zhao D., Jiegou Xu, Tsuda H. Pleural translocation and lesions by pulmonary exposed multi-walled carbon nanotubes, *J. Toxic. Pathol.*, 33(3):145-151, 2020

Saleh D., Alexander TW., Numano T., Ahmed M.H.O., Gunasekaran S., Alexander DB., Abdelgied M., El-gazzar AM., Takase H., Jiegou Xu., Naiki-ito A., Takashi S., Hirose A., Ohnishi M., Kanno J., Tsuda H. Comparative carcinogenicity study of a thick, straight-type and a thin, tangled-type multi-walled by carbon nanotube administered by intra-tracheal instillation in the rat. *Particle and Fibre Toxicology*, 17:48 (2020).

Cui H, Soga K, Tamehiro N, Adachi R, Hachisuka A, Hirose A, Kondo K, Nishimaki-Mogami T., Statins repress needle-like carbon nanotube- or cholesterol crystal-stimulated IL-1 β

production by inhibiting the uptake of crystals by macrophages, *Biochem Pharmacol.*, 188: 114580, 2021.

2. 学会発表

Hirose A, Hojo M, Taquahashi Y, Kanno J, Maeno A, Sakamoto Y, Ohnuki A, Ohnishi M, Goto Y, Nakae D. Development of an intermittent exposure type chronic toxicity assessment method for MWCNT as an alternative to the continuous two-year inhalation protocol. 9th NANO Conference (Online), 2020.11.12-13.

小野竜一、相崎健一、北嶋聡、菅野純、化学物質の反復投与によるゲノムワイドなヒストン修飾の変化. 第47回日本毒性学会学術年会、(2020.6.30)、Web開催、シンポジウム、口演

菅野純、北嶋聡、相崎健一、小野竜一、Percellome Projectにおける精度管理とその解析への影響. 第47回日本毒性学会学術年会、(2020.6.30)、Web開催、シンポジウム、口演

相崎健一、長谷武志、北嶋聡、小野竜一、北野宏明、菅野純、米国毒性学会合同シンポジウム: Current and future application of PERCELLOME database as a part of big data to toxicological research. 第47回日本毒性学会学術年会、(2020.7.1)、Web開催、シンポジウム、口演

菅野純、シグナル毒性の概念とその拡張. 第47回日本毒性学会学術年会、(2020.7.1)、Web開催、ワークショップ、口演

菅野純、職場環境における化学物質の毒性発現機構の多様性と評価・管理の連関性に関する一考察、第 289 回日本産業衛生学会 関東地方会例会 (2020. 8.29)、口演

Yuhji Taquahashi, Satoshi Yokota, Koich Morita, Masaki Tsuji, Kousuke Suga, Makiko Kuwagata, Motoki Hojyo, Akihiko Hirose, and Jun Kanno. Interim report of four-week interval intermittent inhalation study on multi-walled carbon nanotube in mice. 9th NANO Conference (Online), 2020.11.12-13.

種村健太郎、菅野純、低用量化学物質の周産期暴露による情動認知行動影響解と評価系の国際標準化に向けた展開、日本学術会議公開シンポジウム「食の安全と環境ホルモン」(2020.12.5) Web 口演

Saleh D., Alexander TW., T Numano T., Ahmed M.H.O., Gunasekaran S., Alexander DB., Abdelgied M., El-gazzar AM., Takase H., Naiki-ito A., Takashi S., Hirose A., Ohnishi M., Kanno J., Tsuda H. Thin- Tangled Multi Walled Carbon Nano Tubes are carcinogenic to the rat lung after administration by intra-tracheal instillation. Virtual 2021 SOT Annual Meeting & ToxExpo, March, 2021

前野愛、北條幹、坂本義光、生嶋清美、山本行男、湯澤勝廣、長谷川悠子、長澤明道、久保喜一、安藤弘、田中和良、鈴木仁、猪又明子、守安貴子、高橋祐次、横田理、小林憲弘、広瀬明彦、中江大。ラットによる多層カーボンナノチューブ

(MWCNT)の長期気管内反復投与試験:1年経過時点における報告。第47回日本毒性学会 2020.6.29-7.1(オンライン)

Motoki Hojo, Yukio Yamamoto, Yoshimitsu Sakamoto, Aya Ohnuki, Ai Maeno, Takako Moriyasu, Yuhji Taquahashi, Jun Kanno, Akihiko Hirose, Dai Nakae. Declines in serum levels of apolipoproteins during the development of peritoneal mesothelioma by multiwalled carbon nanotube in rats. SOT 2021 第 60 回米国毒性学会 2021.3.12-16 (Online)

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. Environmental Mutagenesis and Genomics Society 51st Virtual Annual Meeting. On Line (2020.9)

堀端克良、曹易懿、山田雅巳、増村健一、能美健彦、本間正充: 高等真核生物での遺伝情報発現に付随する突然変異誘発機構解析系の開発。日本環境変異原学会第 49 回大会。沼津 (2020.11)

新垣理恵子、佐藤真美、木曾田暁、Shao Wenhua、牛尾 綾、常松貴明、工藤保誠、石丸直澄 多層化カーボンナノチューブと酸化チタン吸入暴露による肺胞マクロファージの動態 第 109 回日本病理学会総会 ポスター発表 2020.7.1-31(ウェブ)

石丸直澄 自己免疫疾患モデルを用いた発症機序の解明と治療戦略 東京工業

大学化学生命科学研究所ウェブ講演
会 2021.1.28(ウェブ)

最上(西巻)知子, 崔 紅艷, 曾我慶介, 為
広紀正, 安達玲子, 蜂須賀暁子, 広
瀬明彦, 近藤一成: 多層カーボンナノ
チューブによる IL-1 β 産生を抑制する
化合物の同定. 第 47 回日本毒性学会
学術年会, (2020.6.29), ポスター

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)

表 1. ラット 2 年間反復気管内投与試験における肺腫瘍及び胸腔内中皮腫の発現率

	対照群	低用量群	高用量群	高用量スプレー群
動物数	30	30	30	30
肺腺腫＋肺腺癌	1 (3.3)	4 (13.3)	10** (33.3)	6 (20.0)
肺腺腫	0	1	6	3
肺腺癌	1	3	4	3
胸腔内中皮腫	0 (0)	2 (6.7)	8** (26.7)	10** (33.3)

腫瘍を発症した個体数

カッコ内は割合 (%)

**: $p < 0.01$ Fisherの直接確率検定

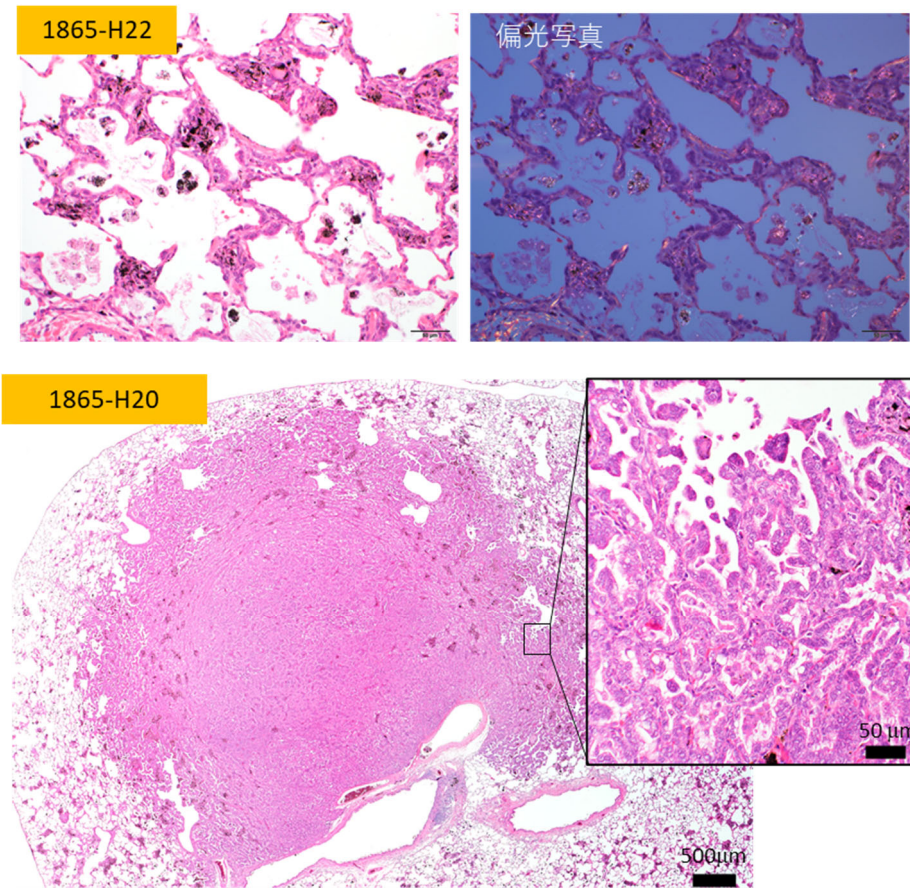


図 1. ラット 2 年間反復気管内投与試験における肺組織の病理像 ※いずれも高用量群
 上：肺胞領域のマクロファージ集簇および肉芽腫性炎症
 下：肺腺癌

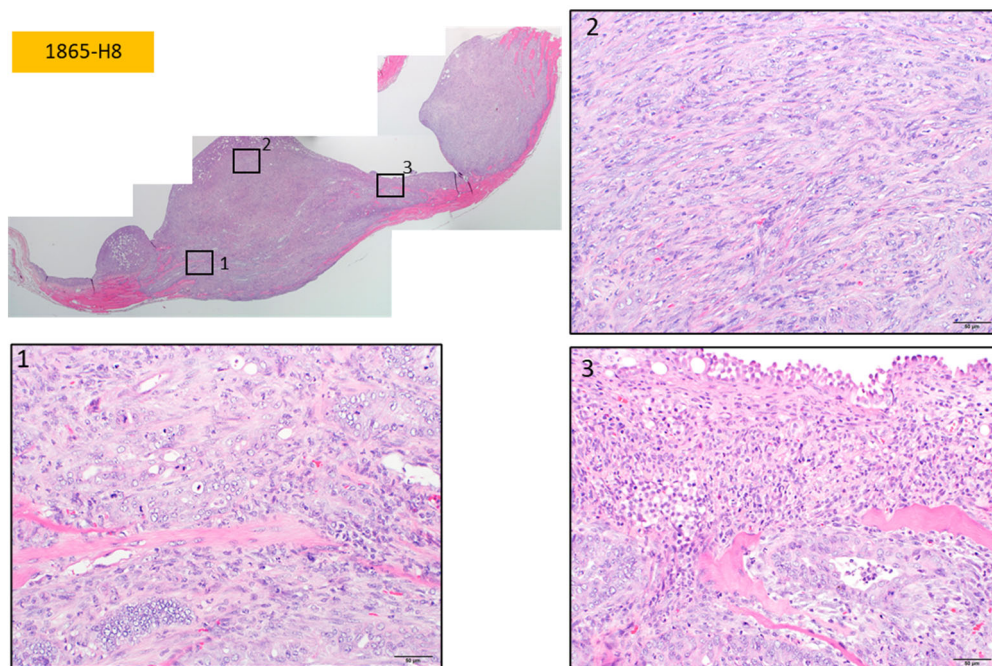


図 2. ラット 2 年間反復気管内投与試験において観察された中皮腫像（横隔膜）高用量群

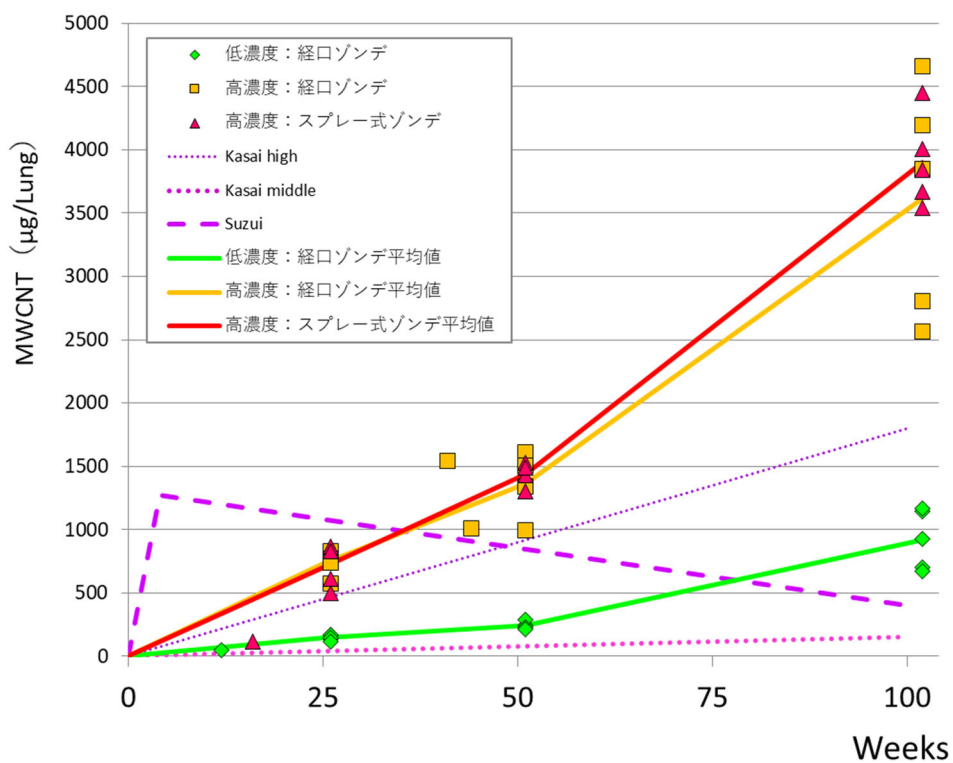


図 3. ラット 2 年間反復気管内投与試験における MWCNT 肺負荷量の推移
※比較のため、Kasai *et al.* 2016 及び Suzui *et al.* 2016 の結果も示す

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)。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実施し、計画通り 24 カ月までの曝露を終了した。

動物は C57BL/6NcrSLC 雄性マウスを使用し、12 週齢時に吸入曝露を開始した。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。その結果、26 回の平均質量濃度は L 群、H 群それぞれ $2.7 \pm 0.1 \text{ mg/m}^3$ 、 $5.2 \pm 0.2 \text{ mg/m}^3$ 、MMAD は測定器の不調 (バウンディング) と考えられる外れ値を除くと 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暴露に関しては、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暴露吸入試験を実施する目途が立った。

本研究では、OECD TG451 により実施された先行試験 (Particle Fibre Tox 2016, 13:53)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 年間の間欠全身暴露吸入の試験を開始した。

曝露装置は、Taquann 直噴全身吸入装置 ver.3.0 を使用した。本装置は、カートリッジ噴射操作が自動化されており、以前のバージョン

に比較して操作性に優れ、長時間の曝露が可能となっている。

B. 研究方法

B-1. 検体の高分散化处理 (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 をシャーベット状にして金属製スパーテルで十分に混合した後、凍結融解による分散促進を一回行った。超音波洗浄器 (SU-3TH、出力 40W、発信周波数 34kHz) に 15 分静置して分散させ、金属製フィルター (セイシン企業、目開き 53 μm) で濾過し大型の凝集体を除くとともに、分散を図り、濾液を直ちに液体窒素で凍結・固化させ、溶媒回収型真空ポンプにより減圧して TB を昇華させて除去し MWCNT の乾燥検体を得た (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。

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INNERカートリッジとOUTERカートリッジから構成される。検体を収容するINNER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ト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チャンバーとPET樹脂で作製したインナーチャンバー(直径660 mm、高さ477 mm)の二重構造となっており、検体が触れるインナーチャンバーは交換可能であり、検体の変更に容易に対応できるシステムとなっている(共同開発 柴田科学株式会社、特許所得済)。メインチャンバーの気積は179 Lである。メインチャンバーの上部は円錐状となってサブチャンバーに接続されている。動物は、メインチャンバー内に設置した円形一段のステンレス金網製のケージを個別に仕切り収容する。ケージには給水・給餌装置がないため、6時間曝露時の動物への負荷軽減のため給水用寒天(日本エスエルシー株式会社)をケージ内に留置した。

6) 曝露チャンバー内のエアロゾル濃度測定

曝露チャンバー内のエアロゾル濃度のモニタリングは、相対濃度 (CPM; count per minutes) と、質量濃度 (mg/m^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: $1.5 \text{ L}/\text{min}$ 、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 $10 \text{ }\mu\text{m}$ を超える粒子が含まれているため、測定セル内で繊維が重なり、過小評価されると想定される。

質量濃度測定は、ローボリウムサンプラー (080050-155、 $\phi 55 \text{ mm}$ 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、 $\phi 55 \text{ mm}$ 、捕集効率 (DOP $0.3 \text{ }\mu\text{m}$): 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 $1.5 \text{ L}/\text{min}$ の流量で曝露時間の6時間において、 $0 \sim 1 \text{ hr}$ 、 $2 \sim 3 \text{ hr}$ および $5 \sim 6 \text{ hr}$ 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。

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。 $10 \text{ L}/\text{min}$ 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; $10 \text{ }\mu\text{m}$ 、No.2; $5.6 \text{ }\mu\text{m}$ 、No.3; $3.2 \text{ }\mu\text{m}$ 、No.4; $1.8 \text{ }\mu\text{m}$ 、No.5; $1.0 \text{ }\mu\text{m}$ 、No.6; $0.56 \text{ }\mu\text{m}$ 、No.7; $0.32 \text{ }\mu\text{m}$ 、No.8; $0.1 \text{ }\mu\text{m}$ 、No.9; $0.10 \text{ }\mu\text{m}$ 、No.10; $0.056 \text{ }\mu\text{m}$ 、No.11; $0.032 \text{ }\mu\text{m}$ 、No.12; $0.018 \text{ }\mu\text{m}$ 、No.13; $0.01 \text{ }\mu\text{m}$) に導いた。

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

T-CNT7#53低濃度群の全身曝露吸入実験における全体の平均質量濃度は $2.7 \pm 0.1 \text{ mg/m}^3$ 、高濃度群では $5.2 \pm 0.2 \text{ mg/m}^3$ 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2)。

MMADは低濃度群において $314 \sim 3,436 \text{ nm}$ (σ_g : $5.3 \sim 21.6$)、高濃度群において $339 \sim 4,788 \text{ nm}$ (σ_g : $4.0 \sim 17.7$)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、 σ_g 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。 σ_g 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4)。

D. 考察

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

入曝露実験を実施し予定通り 2 年間の曝露を終了した。

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。

MMAD は、計算値に約 10 倍の幅があったが、 σ_g の大きな値を外れ値とし、小さい測定値に注目すると 400 nm から 500 nm 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 ($1.3 \sim 1.4 \mu\text{m}$ 、 σ_g $2.6 \sim 3.0$) 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 のシーリング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。

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、 400 nm から 500 nm 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、菅康佑氏、

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

Hojo M, Yamamoto Y, Sakamoto Y, Maeno A, Ohnuki A, Suzuki J, Inomata A, Moriyasu T, Taquahashi Y, Kanno J, Hirose A, Nakae D., Histological sequence of the development of rat mesothelioma by MWCNT, with the involvement of apolipoproteins, *Cancer Sci.* 2021 Mar 4. doi: 10.1111/cas.14873.

Yamamoto E, Taquahashi Y, Kuwagata M, Saito H, Matsushita K, Toyoda T, Sato F, Kitajima S, Ogawa K, Izutsu KI, Saito Y, Hirabayashi Y, Iimura Y, Honma M, Okuda H, Goda Y. Visualizing the spatial localization of ciclesonide and its metabolites in rat lungs after inhalation of 1- μ m aerosol of ciclesonide by desorption electrospray ionization-time of flight mass spectrometry imaging., *Int J Pharm.* 2021 Feb 15;595:120241. doi: 10.1016/j.ijpharm.2021.120241.PMID: 33484917

2. 学会発表

高橋 祐次、種村 健太郎、相崎 健一、北

嶋 聡、急性毒性試験の近代化によるテトロトキシンの中枢影響評価、第 47 回日本毒性学会学術年会(2020.6.29.) Web 開催、シンポジウム、口演

種村健太郎、佐々木貴熙、齊藤洋克、高橋祐次、北嶋聡、菅野純、日本中毒学会合同シンポジウム:発達期マウスへのドーモイ酸投与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 2～. 第 47 回日本毒性学会学術年会、(2020.6.29)、Web 開催、シンポジウム、口演

Yuhji Taquahashi, Satoshi Yokota, Koich Morita, Masaki Tsuji, Kousuke Suga, Makiko Kuwagata, Motoki Hojyo, Akihiko Hirose, and Jun Kanno. Interim report of four-week interval intermittent inhalation study on multi-walled carbon nanotube in mice. 9th NANO Conference (2020.11.12-13) e-poster.

高橋 祐次、森田 紘一、辻 昌貴、菅 康佑、相崎 健一、大久保 佑亮、種村 健太郎、北嶋 聡、急性毒性試験の近代化による毒性機序研究、第 3 回医薬品毒性機序研究会(2021.1.15) Web 開催、シンポジウム

M. Hojo, Y. Yamamoto, Y. Sakamoto, A. Ohnuki, A. Maeno, T. Moriyasu, Y. Taquahashi, J. Kanno, A. Hirose, and D. Nakae. Declines in Serum Levels of Apolipoproteins during the Development of Peritoneal Mesothelioma by Multiwalled Carbon Nanotube in Rats, SOT 2021 (2021.3.17), Poster, virtual

Y. Taquahashi, S. Yokota, M. Hojyo, K. Morita, M. Tsuji, K. Suga, M. Kuwagata, A. Hirose, and J. Kanno, Interim Report of the 4-Week Interval Intermittent Whole Body Inhalation Study on Multiwalled Carbon Nanotube in Mice, SOT 2021 (2021.3.17), Poster, virtual
D. M. Saleh, W. T. Alexander, T. Numano, O. H.

Ahmed, S. Gunasekaran, D. B. Alexander, M. Abdelgied, A. El-Gazzar, H. Takase1, A. N. Ito, S. Takahashi, A. Hirose, M. Onishi, J. Kanno, and H. Tsuda, Thin-Tangled Multiwalled Carbon Nanotubes Are Carcinogenic to the Rat Lung after Administration by Intra-tracheal Instillation, SOT 2021 (2021.3.17), Poster, virtual

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

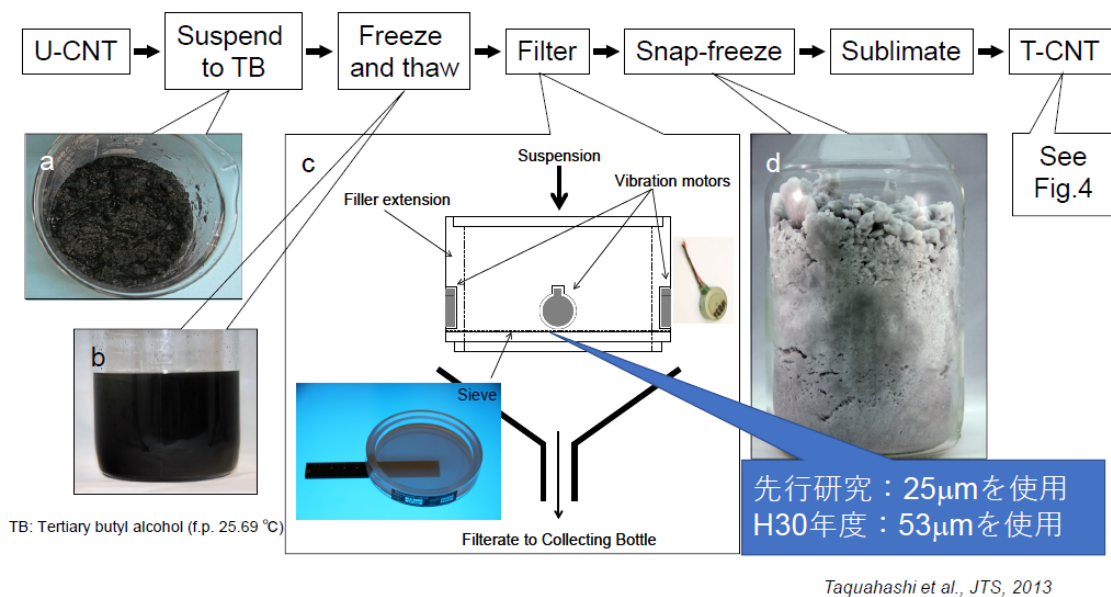


図1 Taquann 法の概要

Taquann 法はこれまで目開き 25 μ m の金属製フィルターを用いているが、H30 年度からの事業では、先行試験 (Particle Fibre Tox 2016) で用いられたものと同じ目開き 53 μ m 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/4W×26times	· 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/4W×26times	· 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/4W×26times	· 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			

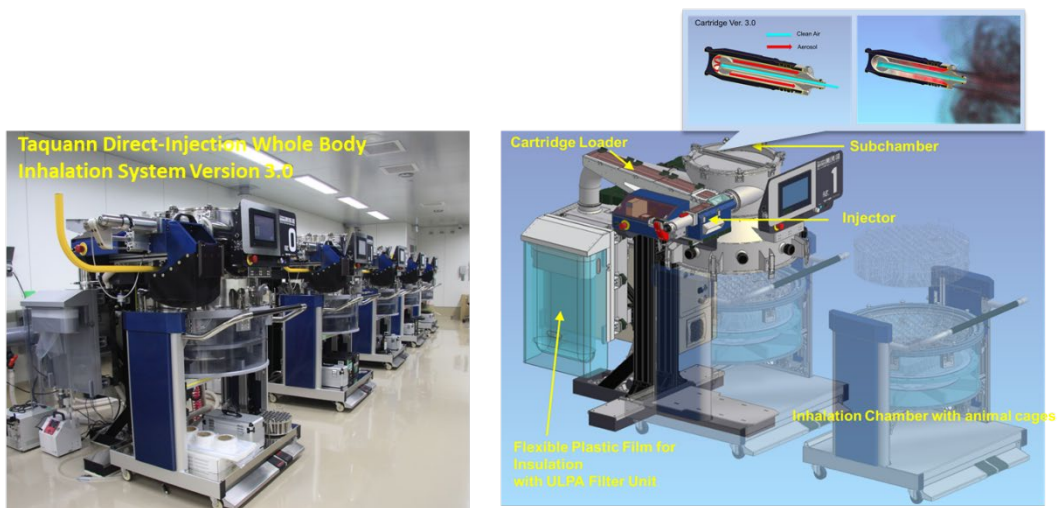


図2 Taquann 直噴全身吸入装置 Ver3.0

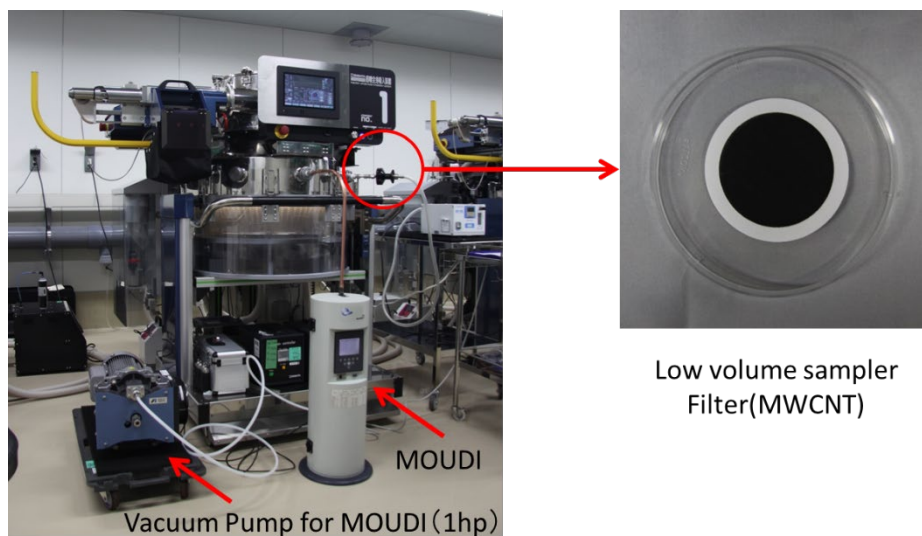


図3 エアロゾルモニタリングの概要

表2 2年間間欠吸入曝露実験のエアロゾル特性の測定結果

Group	Concentration (mg/m ³)	MMAD	sigmag
Low Concentration	2.7 ± 0.1	605 ± 600	7.3 ± 3.1
Range (Min.~Max.)		314 ~ 3436	5.3 ~ 21.6
Exclude Outliers		466 ± 105	6.6 ± 0.9
High Concentration	5.2 ± 0.2	803 ± 870	7.2 ± 2.7
Range (Min.~Max.)		339 ~ 4788	4.0 ~ 17.7
Exclude Outliers		577 ± 139	6.4 ± 1.7

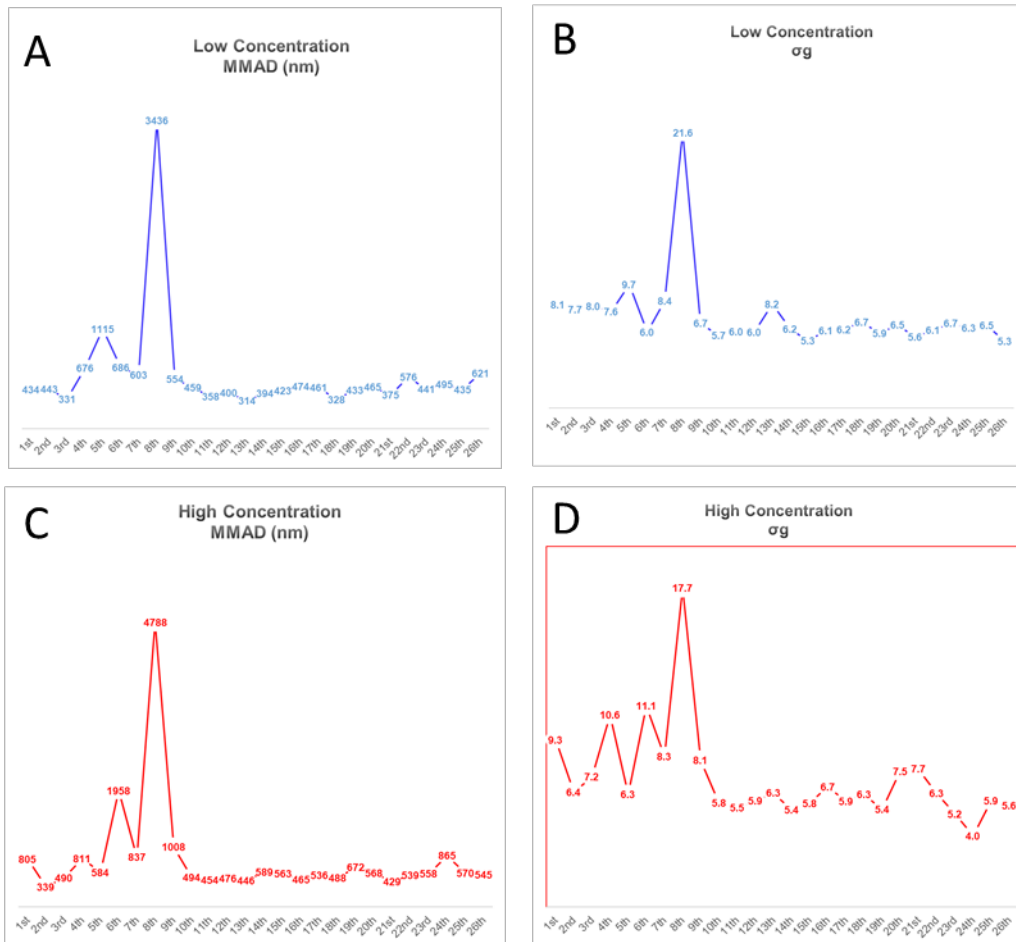


図 4. MMAD のバラツキ

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 。
 26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。 σg が比較的小さな値を示した場合のMMADの値から、Taquan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。

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
公益財団法人 日産厚生会 玉川病院 病理診断科 部長

研究協力者:北條 幹 東京都健康安全研究センター
薬事環境科学部生体影響研究科・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:栗形 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、ヒトで想定される暴露経路に即した動物実験によりハザードを同定し、メカニズムを同定し、用量作用関係の情報を取得し、そこからヒトに対する毒性の推定と用量相関性の推定を行うことであるが、ナノマテリアルに関して最も重要な暴露経路である吸入曝露に関しては、動物実験を遂行する際の技術的障壁が高く、実施例は数少ない。

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した。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行った。今年度は、本分担研究において、曝露開始後24ヵ月の最終解剖を実施した。

曝露濃度は、低濃度群(L群); $2.7 \pm 0.1 \text{ mg/m}^3$ 、高濃度群(H群); $5.2 \pm 0.2 \text{ mg/m}^3$ であった。群間に死亡率の差は認められなかった。肺の外観は、曝露濃度依存的に灰白色から灰色を呈して腫大し、肺重量が増加した。肉眼的観察においてL群に2例に肺がんを示唆する病変が観察された。

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2年間の吸入曝露実験を実施した。曝露時間は6時間/回、過剰な肺負荷量を避けるために4週間毎の間欠全身曝露吸入とし、今年度は、曝露開始後24ヵ月の最終定解剖を行った。現在病理標本を作製中である。

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。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 μ m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/m³)、高濃度群(H群、目標濃度6 mg/m³)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週毎に行い、2年間で26回の曝露を行った。

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

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℃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. 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、細胞塗抹標本を作製した。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%メイグリュンワルド染色液(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。

B-5. 血液検査及び血液生化学検査

採血直後の血液を対象として、電解質とヘマトクリットを測定した(STAX-5 inspire、株式会社テクノメディカ)。血清を対象として、乾式臨床化学分析装置(富士ドライケムNX500s、富士フィルム株式会社)を用いて血液生化学検査を行った。

C. 研究結果

C-1. 一般状態と体重推移

体重は初回曝露後54週まで、対照群とT-CNT7#53曝露群との間に差はみられなかったが、54週以降、H群で体重低下傾向であった(図1)。2年間の曝露期間において、死亡または切迫屠殺に供した動物は、対照群7/50匹、L群9/50匹、H群13/50匹であった。曝露後24ヶ月の最終解剖に供した動物数は、対照群

20 匹、L 群 18 匹、H 群 16 匹であった。死亡率について Kaplan-Meier 解析 (R version 4.0.4) を行い、Log-rank 検定を行ったところ、群間に差は認められなかった (図 2)。

C-2. 肉眼所見・肺重量・BALF 細胞

最終解剖において、肺は曝露濃度依存的に腫大し、色調は灰白色～灰色を呈した。胸腔壁の背側において、ミルキースポットが脊椎骨の両側に L 群 15/18 例、H 群では 15/16 例観察された (図 3)。L 群の 2/18 例において、肺に白色腫瘍が観察された (図 4)。また、胸水が L 群 3/18 例、H 群では 5/16 例観察された。肺右葉の気管近傍に位置するリンパ節は腫大し、灰色から黒色を呈する様子が L 群 12/18 例、H 群では 9/16 例観察された。肺の腫大に伴うと考えられる心肥大が、L 群 4/18 例、H 群では 6/16 例観察され、対照群にも 1/20 例観察された (表 1)。肺重量は、曝露濃度依存的に増加した (図 5)。肺負荷量は、L 群の 6 ヶ月、12 ヶ月においてそれぞれ 6.4 μ g/動物、22.3 μ g/動物、H 群の 6 ヶ月、12 ヶ月においてそれぞれ 15.2 μ g/動物、45.8 μ g/動物であった。

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。

C-3. 血液/生化学検査

最終解剖においては、電解質とヘマトクリットに影響はみられなかった。生化学検査においては、T-CNT7#53 曝露群において肝の胆道系酵素である LAP (leucine aminopeptidase)、TCHO、BUN の低下がみられたが、いずれも軽度であった (表 2、表 3)。

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、最終解剖を行った。現在、病理組織標本を作製中であるため、最終的な結論には至っていないが、以下の事が推察された。

Kaplan-Meier 解析では、死因を考慮せずに解析を行った。その結果、Log-rank 検定では、曝露による影響は認められていない。今後の病理組織評価によって死因を分類することができれば、検体による影響を明らかにできる可能性がある。肺の外観は、曝露濃度依存的に灰白色から灰色を呈して腫大し、肺重量が増加していた。このような外観の変化は 6 ヶ月及び 12 ヶ月の解剖では見られておらず、また病理組織評価においては明確な線維性肉芽腫の形成は認められていない。24 ヶ月では肺組織の弾力性を増しており、検体の肺への沈着に伴い、線維化が亢進していることが推察される。

肺に付属するリンパ節は、肉眼で明確に観察できるサイズに腫大し、検体の沈着と考えられる黒色を胸呈していた。肺病変として、L 群に 2 例に発がんを示唆する白色結節が観察されたが、H 群では観察されていない。

肉学所見では中皮腫と考えられる所見は観察されていないが、胸腔の腔壁側にはミルキースポットが観察されており、これが観察された脊椎の両側は、p53 \pm マウスを用いた MWCNT 吸入による先行研究において、肉眼では明らかな変化が観察されないが、中皮腫発がんを示唆する顕微鏡的病変が誘発されること確認している部位であるため、今後の病理組織評価が注目される部位である。

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

が、多くの細胞は 6 ヶ月、12 ヶ月の中間解剖時に得られた細胞よりも凝集している傾向が強かった。

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し 24 ヶ月の最終期解剖を実施した。群間に死亡率の差は認められなかった。肺の外観は、曝露濃度依存的に灰白色から灰色を呈して腫大し、肺重量が増加した。肉眼的観察において L 群に 2 例に肺がんを示唆する病変が観察された。

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、菅康佑氏、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

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.

Saleh DM, Alexander WT, Numano T, Ahmed OHM, Gunasekaran S, Alexander DB, Abdelgied M, El-Gazzar AM, Takase H, Xu J, Naiki-Ito A, Takahashi S, Hirose A, Ohnishi M, Kanno J, Tsuda H. Comparative

carcinogenicity study of a thick, straight-type and a thin, tangled-type multi-walled carbon nanotube administered by intratracheal instillation in the rat.

Hojo M, Yamamoto Y, Sakamoto Y, Maeno A, Ohnuki A, Suzuki J, Inomata A, Moriyasu T, Taquahashi Y, Kanno J, Hirose A, Nakae D., Histological sequence of the development of rat mesothelioma by MWCNT, with the involvement of apolipoproteins.

2. 学会発表

北嶋聡、種村健太郎、菅野純、室内揮発性有機化学物質の極低濃度下における吸入曝露の際のマウス中枢神経系への影響. 第 47 回日本毒性学会学術年会、(2020.6.30)、Web 開催、シンポジウム、口演

種村健太郎、齊藤洋克、古川佑介、相崎健一、北嶋聡、菅野純、低用量/低濃度化学物質の発生-発達期ばく露による情動認知行動毒性～情動認知行動毒性評価系の国際標準化に向けた対応～. 第 47 回日本毒性学会学術年会、(2020.6.30)、Web 開催、シンポジウム、口演

菅野純、発生発達期暴露による情動認知行動毒性の背景とその評価系に関する国際的動向. 第 47 回日本毒性学会学術年会、(2020.6.30)、Web 開催、シンポジウム、口演

小野竜一、相崎健一、北嶋聡、菅野純、化学物質の反復投与によるゲノムワイドなヒストン修飾の変化. 第 47 回日本毒性学会学術年会、(2020.6.30)、Web 開催、シンポジウム、口演

菅野純、北嶋聡、相崎健一、小野竜一、Percellome Project における精度管理とその解析への影響. 第 47 回日本毒性学会学術年会、(2020.6.30)、Web 開催、シンポジウム、口演

- 相崎健一、長谷武志、北嶋聡、小野竜一、北野宏明、菅野純、米国毒性学会合同シンポジウム: Current and future application of PERCELLOME database as a part of big data to toxicological research. 第 47 回日本毒性学会学術年会、(2020.7.1)、Web 開催、シンポジウム、口演
- 菅野純、シグナル毒性の概念とその拡張. 第 47 回日本毒性学会学術年会、(2020.7.1)、Web 開催、ワークショップ、口演
- 菅野純、職場環境における化学物質の毒性発現機構の多様性と評価・管理の連関性に関する一考察、第 289 回 日本産業衛生学会 関東地方会例会 (2020. 8.29)、口演
- Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Ryuichi Ono and Satoshi Kitajima、Application of PERCELLOME database as a part of big data to toxicological research: The 36th Annual Meeting of KSOT/KEMS, Special lecture, Web, Oral presentation.
- Yuhji Taquahashi, Satoshi Yokota, Koich Morita, Masaki Tsuji, Kousuke Suga, Makiko Kuwagata, Motoki Hojyo, Akihiko Hirose, and Jun Kanno. Interim report of four-week interval intermittent inhalation study on multi-walled carbon nanotube in mice. 9th NANO Conference (2020.11.12-13) e-poster.
- 種村健太郎、菅野純、低用量化学物質の周産期暴露による情動認知行動影響解と評価系の国際標準化に向けた展開、日本学術会議公開シンポジウム「食の安全と環境ホルモン」(2020.12.5) Web 口演
- J Kanno, K. Aisaki¹, R. Ono¹, and S. Kitajima. Comprehensive Histone, DNA Methylation, and mRNA Expression Analysis of Murine Liver Repeatedly Exposure to Chemicals—Percellome Project 2021 Update, SOT 2021 (2021.3.17), Poster, virtual
- M. Hojo, Y. Yamamoto, Y. Sakamoto, A. Ohnuki, A. Maeno, T. Moriyasu, Y. Taquahashi, J. Kanno, A. Hirose, and D. Nakae. Declines in Serum Levels of Apolipoproteins during the Development of Peritoneal Mesothelioma by Multiwalled Carbon Nanotube in Rats, SOT 2021 (2021.3.17), Poster, virtual
- Y. Taquahashi, S. Yokota, M. Hojyo, K. Morita¹, M. Tsuji, K. Suga, M. Kuwagata, A. Hirose, and J. Kanno, Interim Report of the 4-Week Interval Intermittent Whole Body Inhalation Study on Multiwalled Carbon Nanotube in Mice, SOT 2021 (2021.3.17), Poster, virtual
- D. M. Saleh, W. T. Alexander, T. Numano, O. H. Ahmed, S. Gunasekaran, D. B. Alexander, M. Abdelgied, A. El-Gazzar, H. Takase¹, A. N. Ito, S. Takahashi, A. Hirose, M. Onishi, J. Kanno, and H. Tsuda, Thin-Tangled Multiwalled Carbon Nanotubes Are Carcinogenic to the Rat Lung after Administration by Intra-tracheal Instillation, SOT 2021 (2021.3.17), Poster, virtual

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

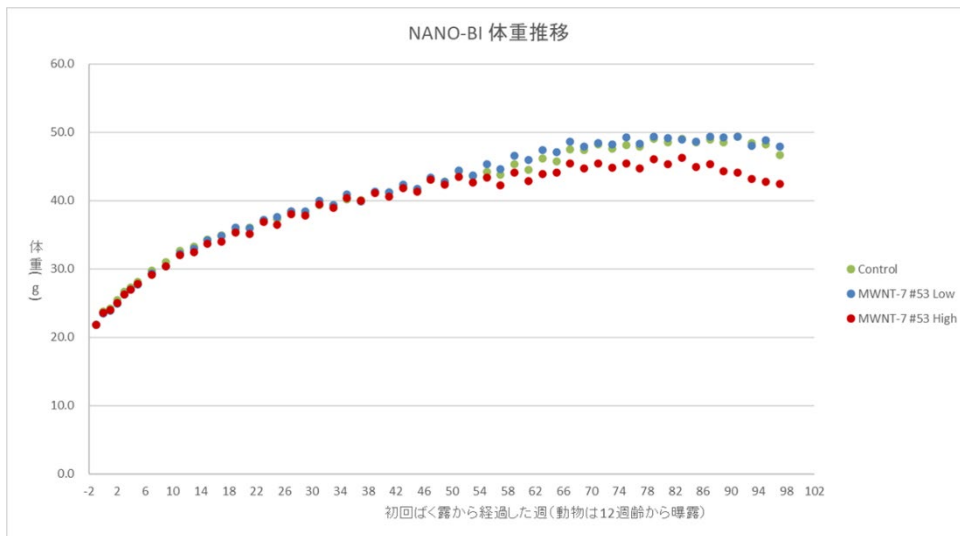


図 1 体重推移

体重は初回曝露後 54 週まで、対照群と T-CNT7#53 曝露群との間に差はみられなかったが、54 週以降、H 群で体重低下傾向であった。

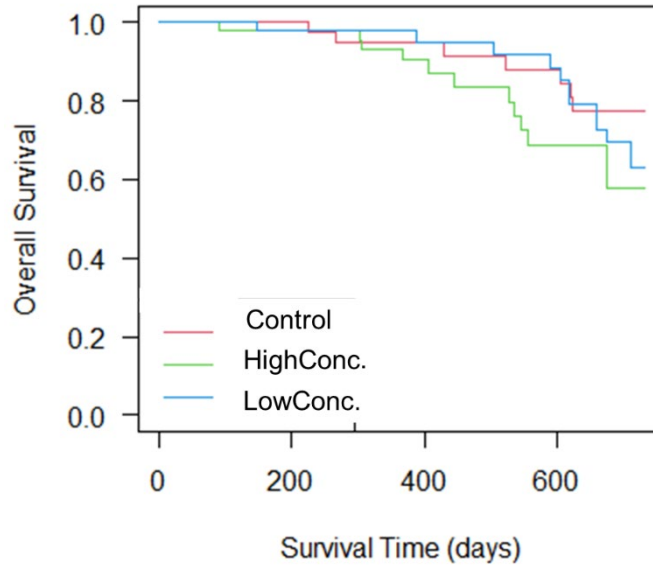


図 2 Kaplan-Meier 解析結果

死因は考慮せずに Kaplan-Meier 解析を行った。Log-rank 検定では群間に差は認められなかった。

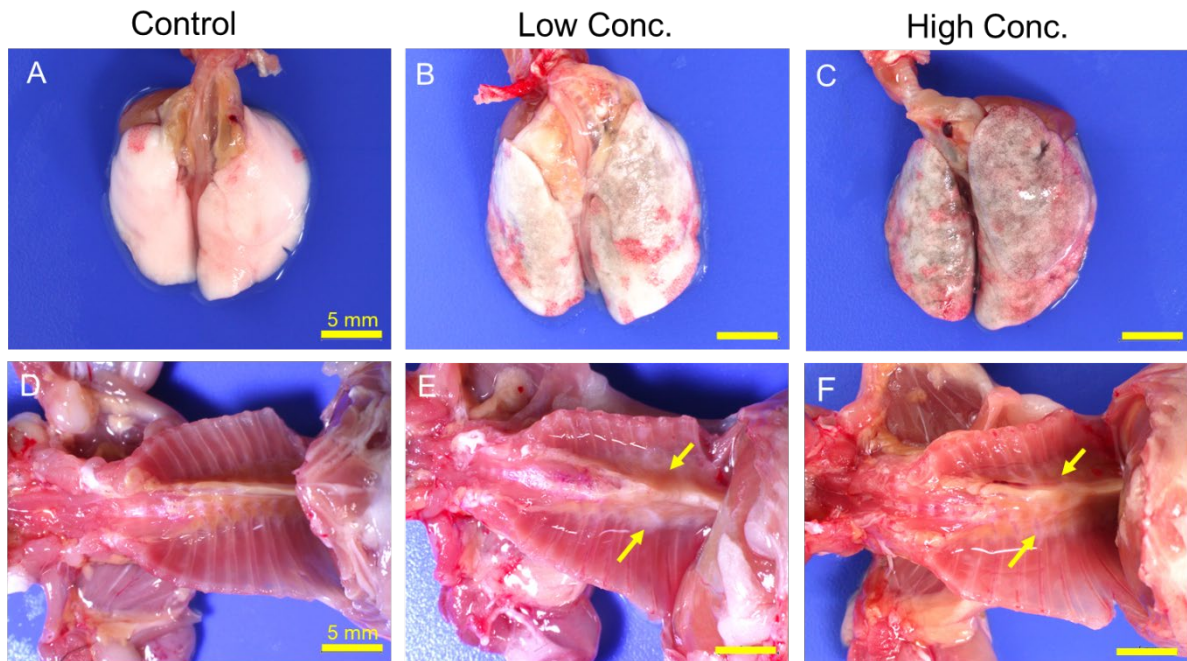


図3 肉眼所見

肺は曝露濃度依存的に腫大し、色調は灰白色～灰色を呈した(A～C)。胸腔壁の背側において、ミルクスポット(E,F:矢印)が脊椎骨の両側に L 群 15/18 例、H 群では 15/16 例観察された(スケールバー:5mm)。

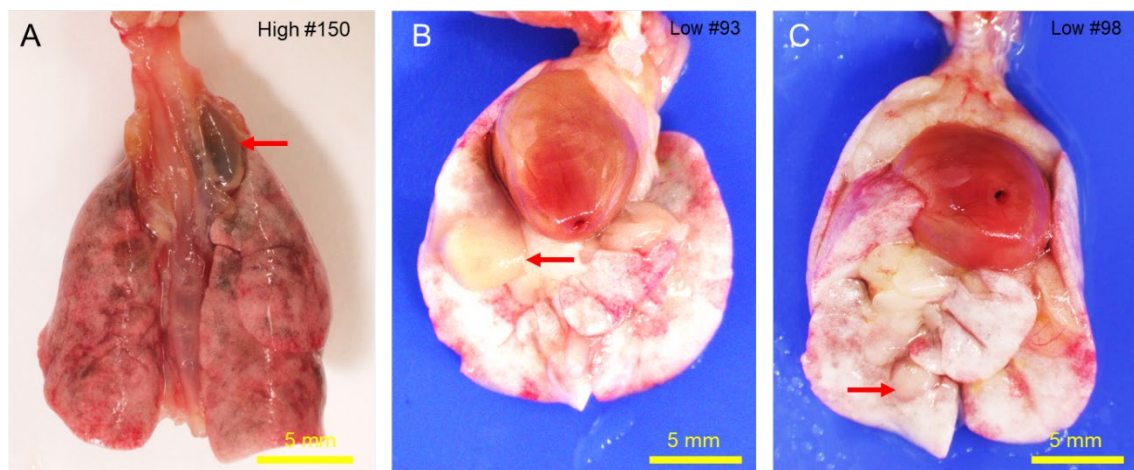


図4 肺に病変がみられた例

A: 肺右葉の気管近傍に位置するリンパ節は腫大し(矢印)、灰色から黒色を呈する様子が L 群 12/18 例、H 群では 9/16 例観察された。B:L 群の 2 例において、肺に白色腫瘍が観察された。

表 1:肉眼所見結果のまとめ

Autopsy Findings					
Period	24M	Control	Low Concentration	High Concentration	
Number of animals examined			20	18	16
Not remarkable			1	0	0
Organ	Findings				
Lung	Swelling		2	16	13
	Grayish white		0	18	0
	Grayish		0	0	16
	Edema		2	0	0
	Left median lobe, Raised Node		0	1	0
	Left caudal Lobe, Raised Node		0	1	0
	Lymph node, swelling		0	12	9
	Lymph node, black		0	12	9
Thymus	Swelling		1	1	0
Thoracic cavity	Milky spot		0	15	15
	Pleural effusion		0	3	5
Axillary lymph node	Swelling		0	0	1
Heart	Hypertrophy		1	4	6
Liver	Rough-surfaced		0	0	1
	Lateral left lobe, white macule		0	0	1
	Lateral left lobe, raised node		2	1	1
	Caudate lobe, raised node		1	0	0
	Swelling		1	0	0
	Small		0	0	1
	Adhesion		0	3	0
Adhesion with diaphragm		0	0	1	
Kidney	Left, white macule		0	0	2
	Swelling, bilateral		1	0	0
	Right, cystic kidney		1	0	0
	Discoloring		1	0	0
Spleen	Swelling		6	2	3
abdominal cavity	Mesenteric lymph nodes, swelling		4	2	0
	Hemorrhagic ascites		1	1	0
Seminal vesicle	Swelling, brown		18	16	15

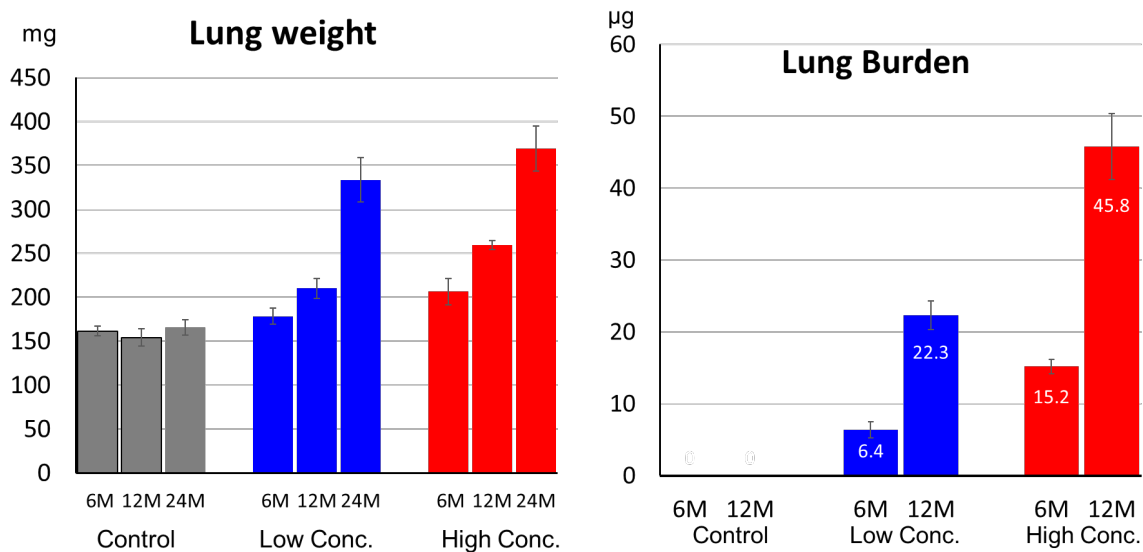


図5 肺重量と肺負荷量

肺重量は、曝露濃度依存的に増加した。

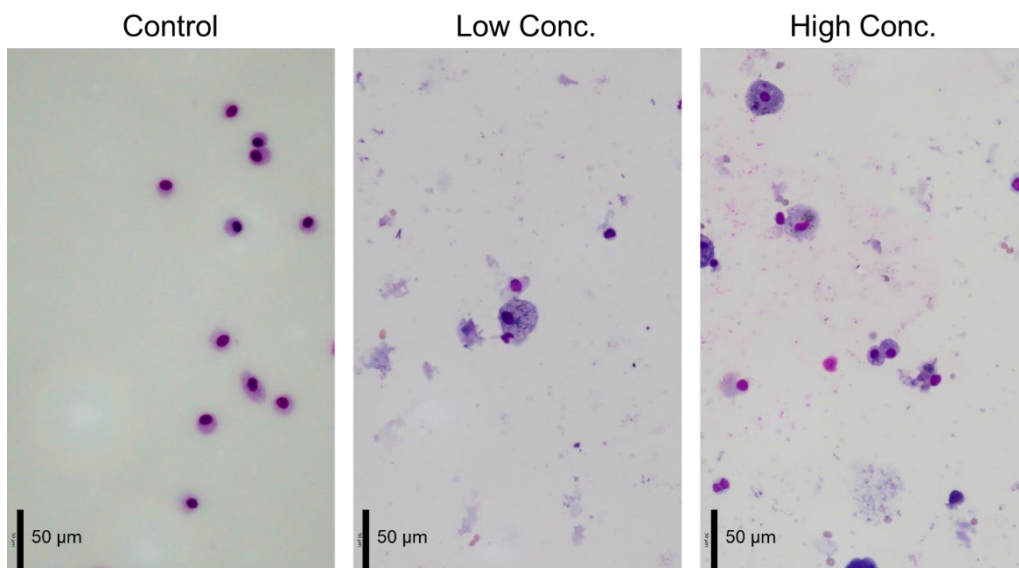


図6 BALF 細胞の観察結果

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。

表 2 血液検査結果のまとめ(電解質・ヘマトクリット)

Period	24M	Na ⁺ mmol/L	K ⁺ mmol/L	Cl ⁻ mmol/L	Hct(%) %
Control	Mean	152	5.2	111.6	29.8
	SD	4.1	0.5	3.9	9.1
	N	20	20	20	20
LowConc.	Mean	152.1	5.1	111.2	31
	SD	2	0.4	2	3.1
	N	18	18	18	18
HighConc.	Mean	152.3	5.3	111	32.7
	SD	1.7	0.5	1.5	10.1
	N	16	16	16	16

表 3 血液生化学検査結果まとめ

Period	24M	ALP U/l	CHE U/l	ALT U/l	AST U/l	LAP U/l	LDH U/l	TBIL mg/dl	TCHO mg/dl	TG mg/dl	CKMB U/l	BUN mg/dl	CRE mg/dl	AMYL U/l	ALB g/dl	TP g/dl	GLU mg/dl
Control	Mean	268	33	59	97	50	389	0.4	95	91	97	24	0.39	4671	2.1	5.0	189
	SD	129	8	86	109	9	176	0.2	27	40	24	5	0.15	1032	0.3	0.7	55
	N	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
LowConc.	Mean	242	28 *	42	66	46	314	0.3 *	93	75	82 *	20.7 *	0.29	5077	2.0	4.8	223
	SD	67	5	32	24	10	103	0.1	32	45	14	3.4	0.17	858	0.3	0.5	58
	N	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
HighConc.	Mean	242	31	53	84	43 **	391	0.4	77 *	66	101	21 *	0.26	4142	2.2	5.0	193
	SD	47	5	82	55	6	235	0.1	24	38	21	3.1	0.23	1177	0.3	0.6	45
	N	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16

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	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部	
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:	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、ラットの2年間の吸入試験と同レベルの評価が可能な慢性試験方法の開発を目指し、2年間にわたる間欠的な気管内投与試験を実施した。

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匹とした。ただし、経過観察と肺負荷量測定のためのサテライト動物を用意した。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MWNT-7(三井)を4週間毎に1回、合計26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、その他の群には経口ゾンデを用いた。実験開始から2年後に、最終解剖を実施し、病理組織学的検索および気管支肺胞洗浄液(BALF)分析と、肺負荷量の測定を行った。

組織学的には、投与群の全個体で、肺実質にび慢性に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。腫瘍性病変として、各投与群で腺腫と腺癌が、H群・HS群においては、胸腔内中皮腫が観察された。途中解剖及び最終解剖に供した動物における肺腫瘍の発現頻度は、C群、L群、H群およびHS群のそれぞれで、1/30例(3.3%)、4/30例(13.3%)、10/30例(33.3%; $p<0.01$)および6/30例(20.0%)であった。また、胸腔内中皮腫の発現頻度はそれぞれ0/30例(0%)、2/30例(6.7%)、8/30例(26.7%; $p<0.01$)および10/30例(33.3%; $p<0.01$)であった。BALF中の白血球数はHS群において対照群に対して有意な増加が認められた。BALF中のLDH活性および総タンパク質量は、全てのMWCNT投与群で有意に増加してい

た。最終解剖時のL群、H群およびHS群のMWCNT肺負荷量は、それぞれ、 920 ± 240 (Mean \pm S. D.) $\mu\text{g}/\text{Lung}$ 、 3615 ± 902 $\mu\text{g}/\text{Lung}$ および 3902 ± 350 $\mu\text{g}/\text{Lung}$ だった。

肺腫瘍の発生には用量依存性が認められ、その発現率はKasaiらの吸入曝露試験¹⁾の結果と同程度であったため、本研究における反復気管内投与法は、吸入曝露試験の代替法になりうることが示唆された。今回、吸入曝露試験では発症しなかった胸膜中皮腫が観察されたが、その発現率は、Suzuiら²⁾と同程度であった。H・HS群では、吸入曝露試験の結果に比べて肺内MWCNTの総蓄積量が多く、胸腔内へ移行した繊維量も多くなったことが推測され、そのために、中皮腫が発生したと考えられる。なお、今回、2種類の投与器具を用いたが、器具の違いによる腫瘍発生頻度に顕著な差異は見られなかった。本プロトコールで肺腫瘍と中皮腫を評価する場合、1回あたりの投与用量や投与回数を詳細に検討の上、総負荷量を調整することが肝要である。

A. 研究目的

ナノマテリアルの健康影響については、その特有の物理特性のために *in vitro* 試験等の簡便な評価手法が確立しておらず、*in vivo* 試験を元にした毒性の評価手法の検討が依然として重要である。MWCNTはアスベストに類似する性質を持つため、慢性毒性として肺がんや胸膜中皮腫などの呼吸器系への影響が懸念されている。ナノマテリアルの毒性評価方法としては、欧米ではヒトへの曝露形態に近い吸入試験が推奨されているが、慢性吸入試験の実施には多大なコストがかかる。過去には、MWNT-7 (三井) の2年間の全身吸入曝露試験が実施され、肺の腺腫および腺癌が発症することが報告されたが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週間で合計8回のMWCNT (日機装) の反復投与を行い、その後、2年間飼育し、肺腫瘍および胸腔内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、吸入曝露試験と気管内投与試験のどちらも最大で $1000 \mu\text{g}/\text{Lung}$ を超えているが^{1), 2)}、吸入曝露試験では、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)}。胸膜中皮腫の発症には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Numanoらが、反復気管内投与により1匹あたり総計 $1500 \mu\text{g}$ 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高頻度で発症することが示された。

本研究では、2年間の吸入曝露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)。MWNT-7の気管内投与を間欠的に実施し、右肩上がりの形状のAUCを描きながら最終的にKasaiらの結果と同等以上の肺負荷量を達成できるように投与量を設定した。

H30年度末から、低用量群に $0.125 \text{ mg}/\text{kg}$ 体重、高用量群に $0.5 \text{ mg}/\text{kg}$ 体重の用量で4週間に1回、気管内投与を行ってきたが、1年経過後までは投与に関連する増殖性病変の

発症は認められなかった。今年度は、2年間で合計26回の投与を終え、最終解剖を行い、発がん性を評価した。

B. 研究方法

i) MWCNTの調製

Taquann 処理 (53 μ m メッシュ)⁵⁾した MWNT-7 を 200°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。

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°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)、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 群に分けた。動物数は 1 群あたり 30 匹とし、経過観察のため全群に 10 匹の、さらに、MWCNT の肺負荷量測定のため L 群・H 群・HS 群それぞれに 15 匹のサテライト動物を用意した。

全動物について、1 週間に一度、体重を測定した。

9 週齢から、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、イソフルラン吸入麻酔

下で、1 mL/kg 体重の投与量で 4 週間に 1 度の頻度で気管内投与を行った (図 2)。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 体重とした。

iii) 剖検

半年経過後および 1 年経過後に、各群 5 匹を経過観察用に、別の 5 匹を MWCNT の肺負荷量測定用に、それぞれ解剖した (昨年度報告済み)。

2 年経過後 (26 回投与後) に最終解剖を実施した。全動物について、イソフルラン麻酔下で全採血し、全臓器を摘出し、10% 中性緩衝ホルマリン溶液で固定した。肺は気管からホルマリン溶液を注入して固定した。また、最終解剖以前に、人道的エンドポイントに達した動物および死亡動物についても同様に剖検した。

最終解剖では、各群最大 10 匹について、右葉にリン酸緩衝液 (PBS) を注入して BALF を回収した。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。また、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分析に用いた。

iv) 気管支肺胞洗浄液 (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 の上清の乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性

は、LDH Cytotoxicity Detection kit (タカラバイオ) により、また、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。

v) 病理組織学的解析

固定した臓器から、定法によりヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し、光学顕微鏡による病理組織検索を行った。

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。

vii) 統計学的解析

体重、臓器重量、BALF 中の白血球数、LDH 活性および総タンパク質量の結果については Dunnett の多重比較検定を、腫瘍の発現率の結果については Fisher の直接確率検定を行った。生存率については、Kaplan-Meier 法により生存期間を解析し、log-rank test により検定を行った。

<倫理面への配慮>

本研究では、人を対象とした研究、人の遺伝子解析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) 体重および臓器重量

最終解剖時の生存個体の C 群、L 群、H 群および HS 群の平均体重は、それぞれ、416.4 g、399.4 g、386.3 g および 380.5 g であり、C 群に対し、H 群および HS 群の体重は有意に低下した (表 1)。

主要臓器の臓器重量については、肺を除き、C 群に対する有意な変化はみられなかった (表 2)。肺全葉の重量は、いずれの投与群においても C 群に対して有意に増加した。

ii) 途中解剖と生存曲線

投与開始後 104 週までの観察期間において、C 群では、5/40 例の途中解剖を行い、内訳は、脳腫瘍を疑う 2 例、大顆粒リンパ球性白血病 (LGL) 2 例、腹腔内中皮腫 1 例であった。L 群では、10/55 例の途中解剖を行い、内訳は、投与直後の窒息 3 例、餌詰まり 1 例、骨肉腫 1 例、神経鞘腫 1 例、LGL2 例、ハーダー腺腫瘍を疑う 1 例、下垂体腫瘍 1 例であった。H 群では、20/55 例の途中解剖を行い、内訳は投与直後の窒息 2 例、LGL4 例、ジンバル腺腫瘍 1 例、下垂体腫瘍 3 例、肺腫瘍 1 例、胸腔内中皮腫 7 例、不明 2 例であった。HS 群では、16/55 例の途中解剖を行い、内訳は投与直後の窒息 1 例、LGL5 例、包皮腺腫瘍を疑う 1 例、腹腔内中皮腫 1 例、胃部の腫瘍 1 例、下垂体腫瘍 1 例、胸腔内中皮腫 6 例であった。

H 群・HS 群において、投与開始 80 週後から胸腔内中皮腫による瀕死例・死亡例が発生し (図 3・矢頭)、C 群に比較して有意な生存率の低下が認められた。最終解剖時に

における C 群、L 群、H 群および HS 群の生存率はそれぞれ、25/30 例 (83.3%)、22/30 例 (73.3%)、12/30 例 (40.0%) および 15/30 例 (50.0%) であった。

iii) BALF の生化学および細胞学的解析

BALF の沈殿の白血球数は、HS 群のみで C 群に対して投与群で有意に増加した。好中球は投与各群で、リンパ球は H 群、HS 群で有意な増加を示した。BALF 上清の LDH 活性と総タンパク質量は、C 群に対し、各投与群で有意に上昇し、HS 群では H 群よりもやや平均値が高かった (図 4)。

iv) 病理組織学的解析

肉眼的に、投与群の肺は MWCNT の沈着により黒色を呈し、投与用量に応じて色味は強かった (図 5)。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 5; 矢印)。これは昨年度報告したように、スプレー式ゾンドの先端が位置する気管粘膜部位で局所的に沈着した MWCNT であった。投与群の一部の動物では、肺実質に 1 から 3mm 程度の白色のドーム状の結節が認められた (図 6)。投与 80 週以降の途中解剖では、胸水の貯留や心タンポナーデにより状態の悪化した個体が多く、これらの個体では、臓側胸膜・横隔膜・心嚢膜等に、白色結節が播種状に観察された (図 7)。

組織学的には、投与群の全個体で、肺実質にび漫性に 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 8)。また、1 年経過後の解剖時と同様に MWCNT 繊維の沈着に関連した部位に反応性 II 型肺胞上皮細

胞過形成が見られた。また、気管支肺胞上皮過形成も散見された。

腫瘍性病変として、肺実質では、腺腫と腺癌が投与群で認められた (表 3)。腺癌の多くで、細胞異型の強い腫瘍細胞が間質や血管へ浸潤しているのが観察された (図 8)。腺腫と腺癌の両者を合わせた発生頻度は、C 群、L 群、H 群および HS 群で、それぞれ、3.3%、13.3%、33.3% および 20.0% であり、H 群では C 群に比較して有意な増加を示した (表 3)。いっぽう、H 群・HS 群では、中皮腫が認められた (表 3)。多くの症例が、上皮型と肉腫型の両方の特徴を示す中皮腫であり、横隔膜等周辺組織への浸潤が顕著であった (図 9)。胸腔内中皮腫の発生頻度は、C 群、L 群、H 群および HS 群で、それぞれ、0%、6.7%、26.7% および 20.0% であり、H 群・HS 群で有意な増加をみた (表 3)。

v) MWCNT の肺負荷量

最終解剖時の L 群、H 群および HS 群の、肺内の MWCNT 量はそれぞれ 920 ± 240 (Mean \pm S. D.) $\mu\text{g}/\text{Lung}$ 、 3615 ± 902 $\mu\text{g}/\text{Lung}$ および 3902 ± 350 $\mu\text{g}/\text{Lung}$ であった (図 10)。いずれの群においても、半年から 1 年後の結果と比べると、やや急な勾配をもって増加していた。

D. 考察

2 年間にわたる間欠の反復気管内投与により、MWCNT の発がん性試験を評価した結果、用量依存的な肺腫瘍および胸腔内中皮腫の増加が認められた。肺腫瘍の発生頻度は、Kasai ら¹⁾の吸入曝露試験と同程度であり、今回の気管内反復投与試験が、代替試験になりうることを示された。しかしながら、総

肺負荷量が Kasai らの結果より 2 倍程度多くなったため、下記の通り、肺腫瘍の発現率や、中皮腫の発症の有無等の差異をもたらしたと考えられる。

まず、2 年後の肺負荷量に着目し、肺腫瘍の発現率について、Kasai らの吸入曝露試験の結果と比較すると、やや肺腫瘍が発生しづらかったことがわかる。Kasai らの高濃度群では肺負荷量が 1800 $\mu\text{g}/\text{Lung}$ で、肺腫瘍の発現率が 16/50 例 (32%; $p < 0.01$) であったのに対して、肺負荷量がこの 2 倍以上だったにも関わらず、H 群、HS 群の発現率はそれぞれ、10/30 例 (33.3%; $p < 0.05$)、6/30 例 (20.0%) だった。これは、H 群・HS 群の最終解剖時の生存率が 40 から 50% と低かったことが要因の一つと思われる。例えば、同じ気管内投与の実験でも、Suzui ら²⁾の実験では生存率は 40% 前後で、肺腫瘍の発現率が 37% であったのに対し、Numano ら⁴⁾の実験では、中皮腫による早期死亡が多かったため、生存率は 5% であり、肺腫瘍の頻度は 1/19 例 (5%) であった。肺腫瘍の発生には 2 年の期間が必要と考えられる。いっぽう、Kasai らの中濃度群の結果は、肺負荷量が 150 $\mu\text{g}/\text{lung}$ で、肺腫瘍の発現率が 13/50 例 (26%; $p < 0.01$) だったのに対し、肺負荷量がこの 6 倍であった L 群では、早期死亡が少なかったにも関わらず、肺腫瘍の発現率が 4/30 例 (13.3%) と低かった。このことは、MWCNT 肺負荷量よりも、曝露形態の違いが及ぼす影響のほうが大きかったことを疑わせる。毎日の吸入曝露による呼吸器への MWCNT の沈着に比べると、4 週間に 1 度の気管内投与によるサージ的な MWCNT の負荷が、強い急性炎症を引き起こしたと考えられる。これが、肺組織における、慢性炎症、線維化

および免疫抑制的な微小環境の形成を阻害し、腫瘍化を抑制したのかもしれない。

次に、今回の結果を、気管内投与試験の既報と比較すると、L 群の肺腫瘍の発現率の低さは、AUC の形状の違いが関係していたことも考えられる。今回の試験は、右肩上がり AUC 形状の MWCNT 蓄積量だったが、L 群の肺腫瘍の発現率 (13.3%) は、右肩下がり AUC 形状と同程度の面積である Suzui らの結果 (36.8%) や、半分程度の AUC 面積である Abdelgied ら⁸⁾ (42.8%) あるいは Saleh ら⁹⁾ (25.0%) の結果よりも、低かった。MWCNT の種類が違うために、一概には言えないが、初期に高負荷を与えることが、肺腫瘍の誘発に、より重要であることが示唆された。

今回、H 群・HS 群で胸腔内中皮腫が発症したことは、Kasai らの吸入曝露試験との重要な相違点であった。不溶性の微粒子は肺実質に分布した後、大部分が肺門側へ向かうリンパ経路へ、ごく一部が胸膜へ向かう経路へ、それぞれ移行する。アスベストや MWCNT 等の微小繊維が胸膜を超えて胸腔へ移行すると、壁側胸膜のストーマにトラップされ、frustrated phagocytosis 等の機構により中皮組織の慢性炎症や中皮腫が発生すると考えられている¹⁰⁾。ヒトのアスベスト胸膜中皮腫で証明されたように、中皮腫の発症には長い期間を要するため、ラットの 2 年間の発がん試験で中皮腫が発症するには、実験初期に胸膜が MWCNT 繊維に曝露される必要があると思われる。今回の実験では、例えば半年経過時点で、L 群の肺負荷量は約 150 $\mu\text{g}/\text{Lung}$ で 2 年後の中皮腫発現率は有意な増加を示さなかった一方、H 群・HS 群の肺負荷量は約 700 $\mu\text{g}/\text{Lung}$ で同発現率が有意に増加したため、肺負荷量に応じ

て、胸腔内に移行した繊維が増えたものと思われる。同じく中皮腫を誘発した Suzui らあるいは Numano らの半年時点での負荷量は、約 700 $\mu\text{g}/\text{Lung}$ あるいは 1000 $\mu\text{g}/\text{Lung}$ 程度と推測される。これに対し、Kasai らの高濃度群の実験開始半年後の肺負荷量は、500 $\mu\text{g}/\text{Lung}$ 程度と推測される。吸入曝露試験においても、さらに高濃度の曝露により実験期間の初期に負荷が上がっていれば胸腔内の繊維の量が増加し、中皮腫が発症していた可能性はある。

最後に、H 群と HS 群の結果を比較すると、多少の差異はあるものの、使用器具の違いは、肺腫瘍・中皮腫の発がん性評価に及ぼす影響は軽微であることが示唆された。昨年度に報告したように、スプレー式ゾンデを使用すると、経ロゾンデよりも、均一に MWCNT が沈着することがわかっている。今回、HS 群で、H 群よりも、肺重量や BALF の分析結果の値がやや高かったのは、肺内で、比較的広範囲の肺胞に MWCNT による細胞障害が生じたからと考えられる。また、HS 群では、器具先端が位置する気管上皮への局所的な MWCNT 沈着とそれに関連した肉芽腫形成が起こった。しかし、これらの現象は、最終解剖までの発がん試験の結果に影響は及ぼさなかった。HS 群では肺腫瘍の発生頻度が、C 群に対して有意に上昇しなかったものの、これは前述の通り、生存数の少なさに起因するものと推測される。スプレー式ゾンデは高額で供給は限られているため、気管内投与のプロトコルを広く提案していく上で、経ロゾンデが使用可能なことは重要な点と言える。

E. 結論

ラットへ MWNT-7 の 4 週間に 1 度、合計 26 回の気管内投与を 2 年間実施した結果、用量依存的に肺腫瘍および胸膜中皮腫が誘発された。Kasai らの吸入曝露試験と同様の AUC 形状での反復曝露により、同程度の肺腫瘍が見られたため、代替法として有用であることが示唆された。しかしながら、肺腫瘍の頻度がやや低くなることや、負荷量が重い場合に中皮腫による早期解剖が増え、肺腫瘍の評価が難しくなること等の問題点があった。今回の 2 年間の試験をベンチマークとして、1 回あたりの投与量、投与頻度、投与回数を検討し、今後、さらに簡易化・最適化していく必要がある。なお、経ロゾンデとスプレー式ゾンデの器具の違いが発がん試験に及ぼす影響は軽微であった。

(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、大西誠先生、後藤裕子先生、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、故・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 Oct;13(1):53.
- 2) Multiwalled carbon nanotubes

- intratracheally instilled into the rat lung induce development of pleural malignant mesothelioma and lung tumors. Suzui M, Futakuchi M, Fukamachi K, Numano T, Abdelgied M, Takahashi S, Ohnishi M, Omori T, Tsuruoka S, Hirose A, Kanno J, Sakamoto Y, Alexander DB, Alexander WT, Jiegou X, Tsuda H. *Cancer Sci.* 2016 Jul;107(7):924-35.
- 3) Carcinogenicity of multi-walled carbon nanotubes: challenging issue on hazard assessment. Fukushima S, Kasai T, Umeda Y, Ohnishi M, Sasaki T, Matsumoto. *J Occup Health.* 2018 Jan 25;60(1):10-30.
 - 4) 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.
 - 8) Carcinogenic effect of potassium octatitanate (POT) fibers in the lung and pleura of male Fischer 344 rats after intrapulmonary administration. 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. *Part Fibre Toxicol.* 2019 Sep 2;16(1):34.
 - 9) Comparative carcinogenicity study of a thick, straight-type and a thin, tangled-type multi-walled carbon nanotube administered by intra-tracheal instillation in the rat. Saleh DM, Alexander WT, Numano T, Ahmed OHM, Gunasekaran S, Alexander DB, Abdelgied M, El-Gazzar AM, Takase H, Xu J, Naiki-Ito A, Takahashi S, Hirose A, Ohnishi M, Kanno J, Tsuda H. *Part Fibre Toxicol.* 2020 Oct 15;17(1):48.
 - 10) Asbestos, carbon nanotubes and the pleural mesothelium: a review of the hypothesis regarding the role of long fibre retention in the parietal pleura, inflammation and mesothelioma.

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

G. 研究発表

(学会発表)

前野愛、北條幹、坂本義光、生嶋清美、山本行男、湯澤勝廣、長谷川悠子、長澤明道、久保喜一、安藤弘、田中和良、鈴木仁、猪又明子、守安貴子、高橋祐次、横田理、小林憲弘、広瀬明彦、中江大。ラットによる多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の長期気管内反復投与試験：1年経過時点における報告。第47回日本毒性学会 2020.6.29-7.1 (オンライン)

Akihiko Hirose, Motoki Hojo, Yuhji Taquahashi, Jun Kanno, Ai Maeno, Yoshimitsu Sakamoto, Aya Ohnuki, Makoto Ohnishi, Yuko Goto, Dai Nakae. Development of an intermittent exposure type chronic toxicity assessment method for MWCNT as an alternative to the continuous two-year inhalation protocol. 9th Nanoconference

(NanOEH) 2020.11.12-13. (Online)
Yuhji Taquahashi, Satoshi Yokota, Koichi Morita, Makiko Kuwagata, Motoki Hojo, Akihiko Hirose, Jun Kanno. Interim report of four-week interval intermittent inhalation study on multi-walled carbon nanotube in mice. 9th Nanoconference (NanOEH) 2020.11.12-13. (Online)

Motoki Hojo, Yukio Yamamoto, Yoshimitsu Sakamoto, Aya Ohnuki, Ai Maeno, Takako Moriyasu, Yuhji Taquahashi, Jun Kanno, Akihiko Hirose, Dai Nakae. Declines in serum levels of apolipoproteins during the development of peritoneal mesothelioma by multiwalled carbon nanotube in rats. SOT 2021 第60回米国毒性学会 2021.3.12-16 (Online)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

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

表 1. 最終解剖時の体重

	C群	L群	H群	HS群
動物数 ^{a)}	25	27	17	20
体重 (g)	416.4±32	399.4±27	386.3±23**	380.5±41**

Mean ± S.D.

**: $p < 0.01$

a) サテライトを含む

表 2. 臓器重量

	C群	L群	H群	HS群
動物数	10	10	10	10
肺(左葉) (mg)	427.3±30	883.6±193**	1132.4±67** a)	1146.7±90**
脳 (g)	2.21±0.04	2.22±0.05	2.17±0.06	2.18±0.08
脾臓 (g)	1.10±0.22	1.13±0.29 ^{b)}	1.04±0.27	0.92±0.16 ^{b)}
肝臓 (g)	13.3±0.92	13.1±1.3	12.9±0.78	12.7±1.3
腎臓 (g)	2.71±0.19	2.76±0.22	2.66±0.09	2.67±0.15
副腎 (mg)	45.2±12	48.5±6.3	46.4±8.1	51.5±14 ^{c)}

Mean ± S.D.

**: $p < 0.01$

a) N=9 1個体欠測

b) N=9 LGL個体を除外

c) N=7 副腎腫瘍個体を除外

表 3. 肺腫瘍と胸腔内中皮腫の発生頻度

	C群	L群	H群	HS群
動物数	30	30	30	30
肺腺腫+肺腺癌	1 (3.3)	4 (13.3)	10** (33.3)	6 (20.0)
肺腺腫	0	1	6	3
肺腺癌	1	3	4	3
胸腔内中皮腫	0 (0)	2 (6.7)	8** (26.7)	10** (33.3)

腫瘍を発症した個体数

カッコ内は割合 (%)

**: $p < 0.01$

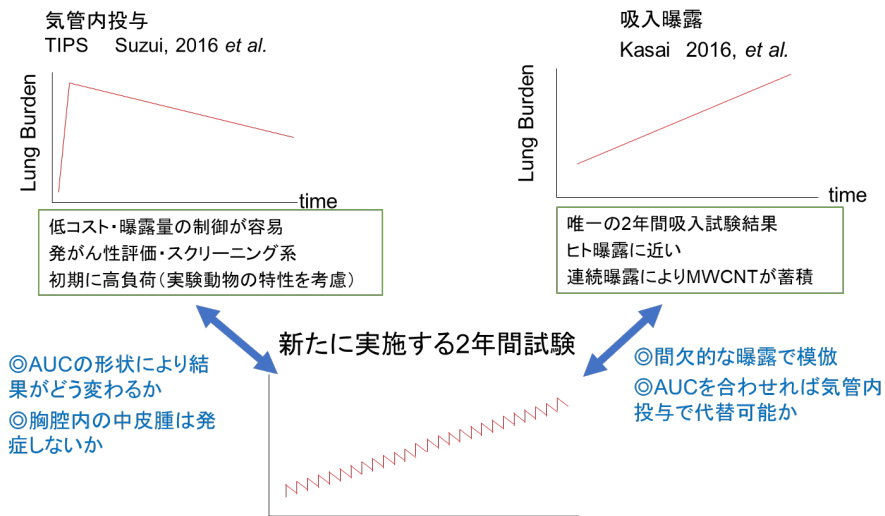


図 1. 既報の MWNT 慢性毒性評価と本研究の肺負荷量と研究の意義

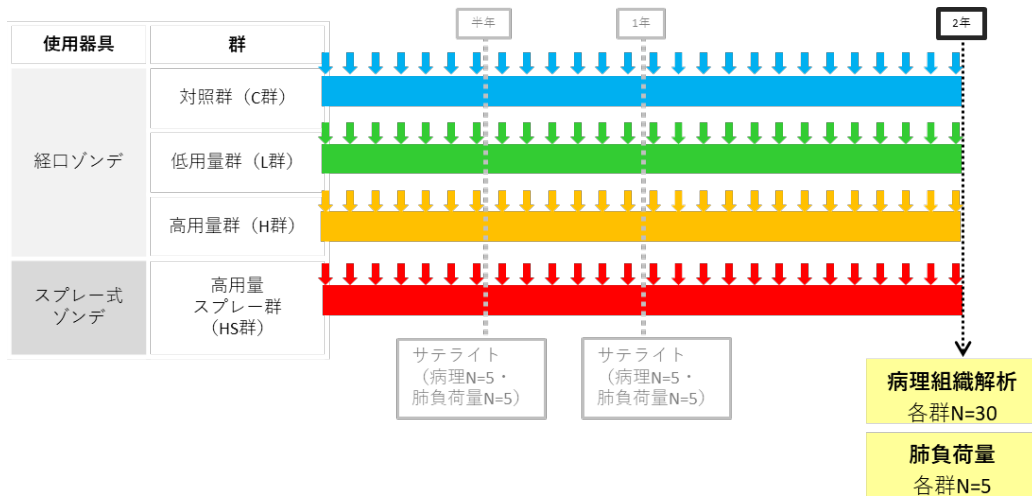


図 2. 実験デザイン

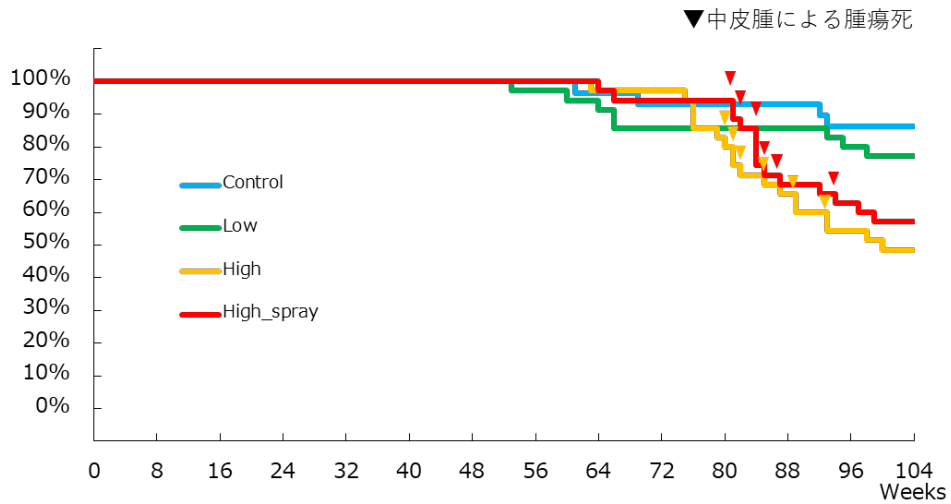


図 3. 生存曲線

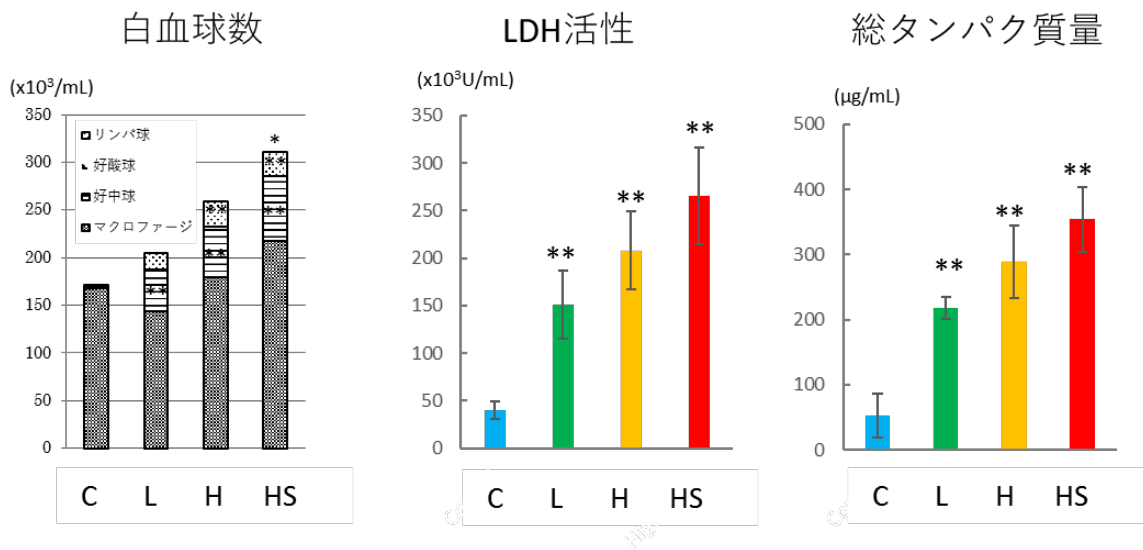


図 4. BALF の解析

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

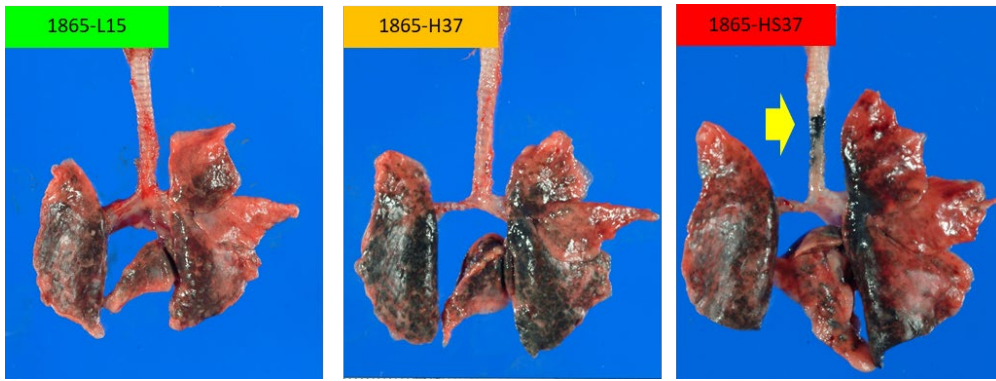


図 5. MWCNT 投与群の肺の肉眼所見
矢印：スプレー式ゾンデ群に特有の黒色斑

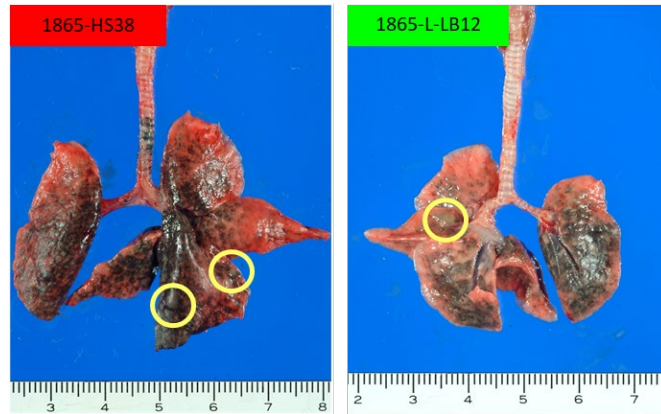


図 6. 肺腫瘍の肉眼所見
黄色丸印；白色結節

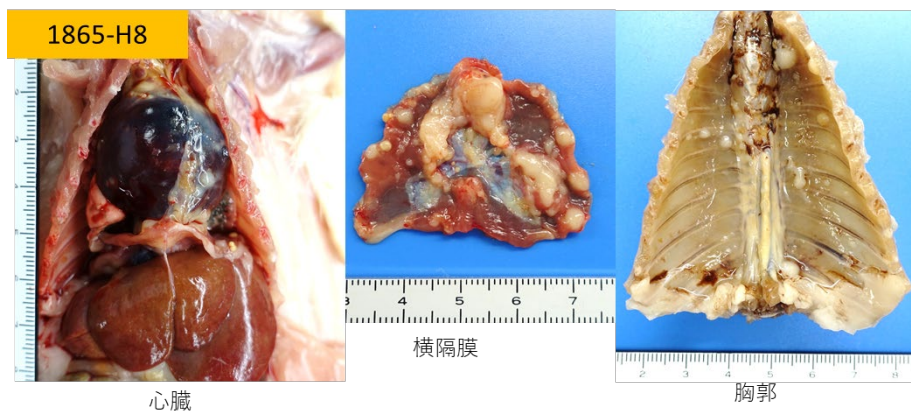


図 7. 胸腔内中皮腫の肉眼所見

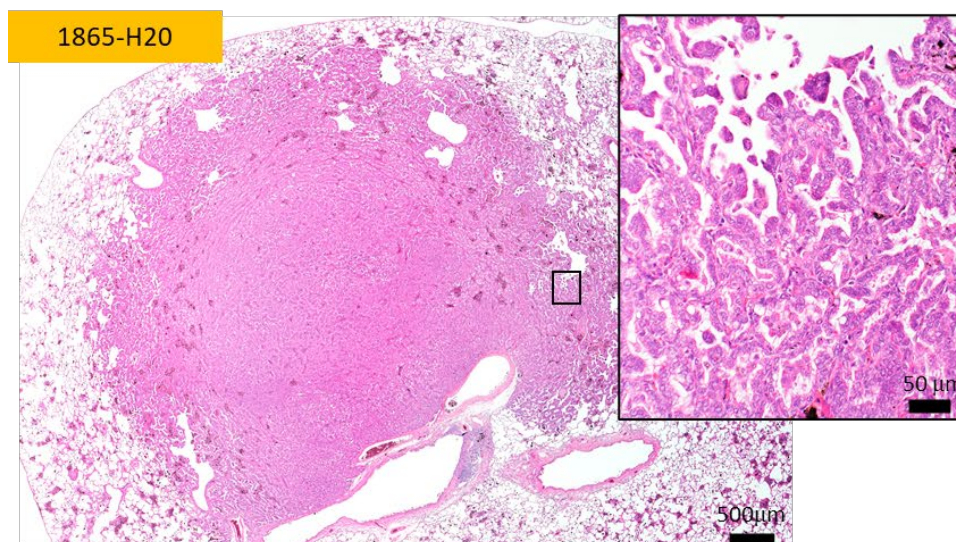
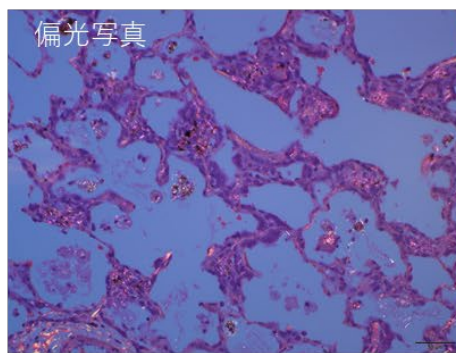
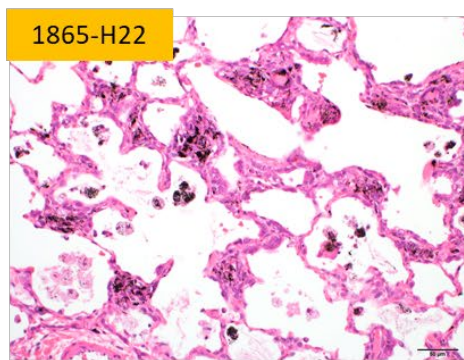
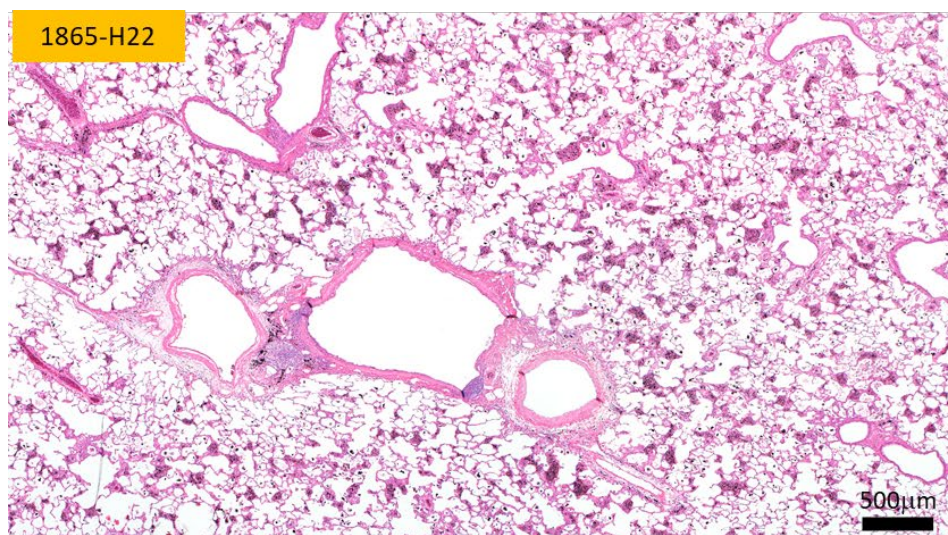


図 8. 投与群の肺の病理組織像 (H 群)
上：び漫性のマクロファージ集簇および肉芽腫性炎症
中：強拡大、MWCNT の分布 (偏光写真)
下：肺腺癌

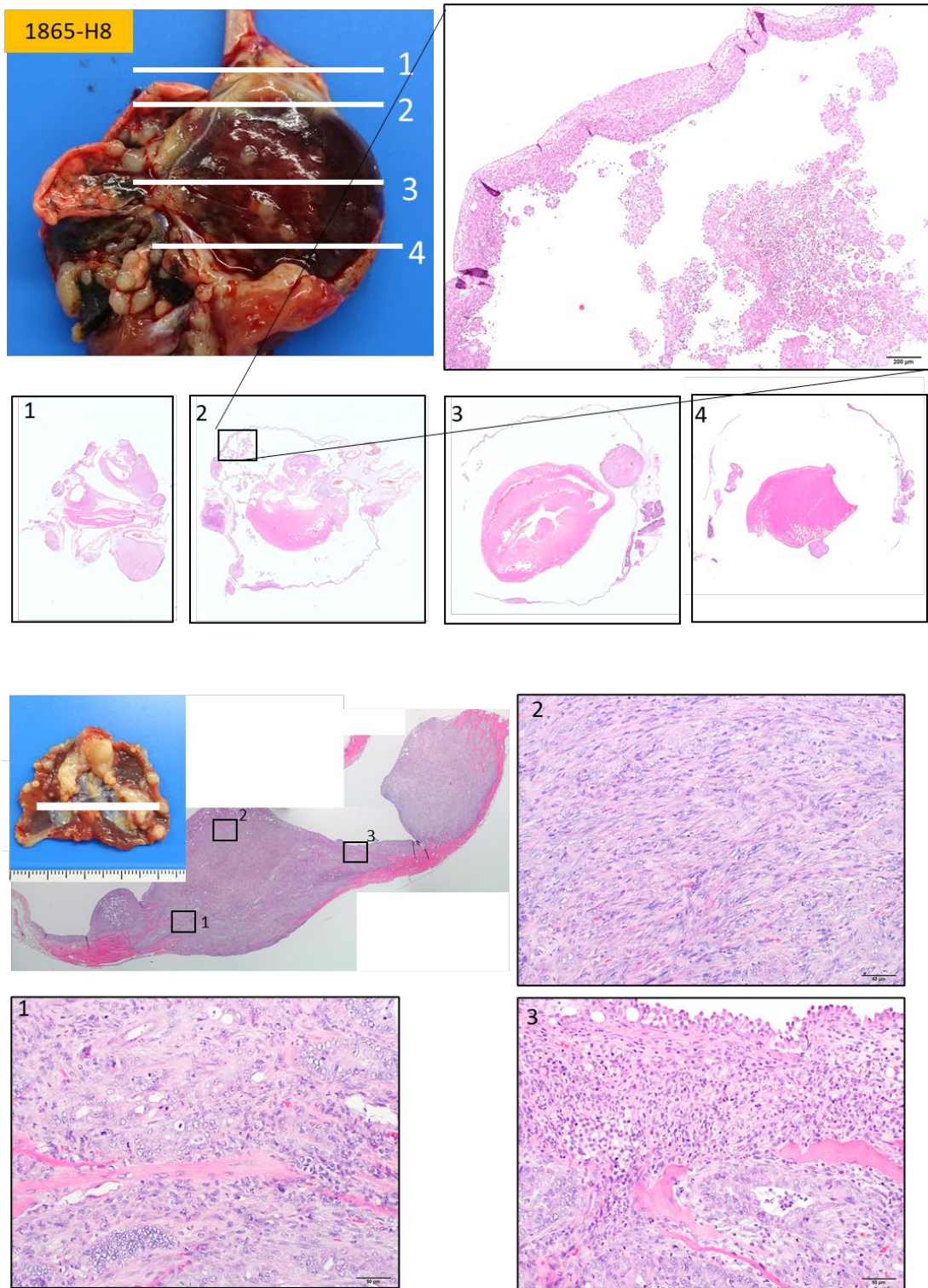


図 9. 胸腔内中皮腫の病理組織像 (H 群)

上：心嚢膜周囲

下：横隔膜周囲

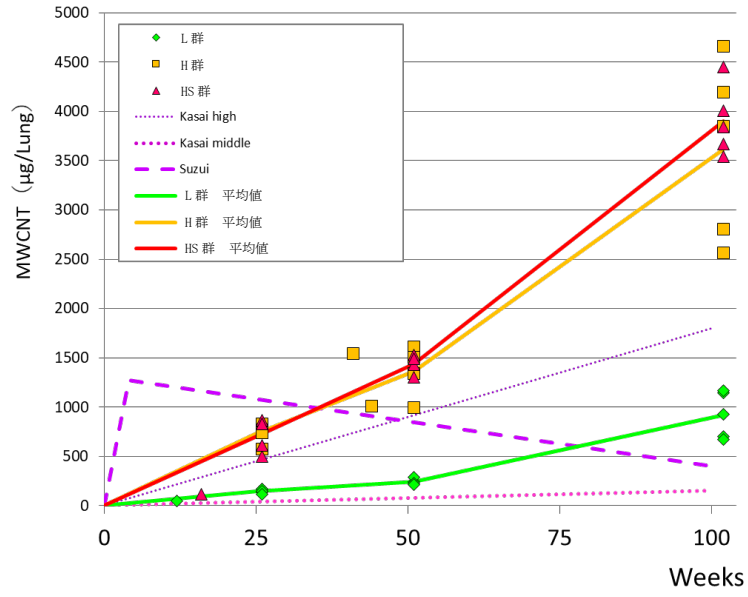


図 10. MWCNT の肺負荷量
半年後、1 年後、2 年後および途中解剖

令和2年度 厚生労働行政推進調査事業費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

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

分担研究課題名：ナノマテリアルの気管内投与暴露評価手法の開発に関する研究

研究分担者：津田 洋幸 名古屋市立大学津田特任教授研究室・特任教授

研究協力者：David B. Alexander 名古屋市立大学特任教授

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

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

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

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

研究要旨

目的：長さの異なる2層カーボンナノチューブ（DWCNT）について、慢性毒性・発がん性の差異の程度と有無について、当該研究室が開発した繊維および粒子状物質の経気管肺内噴霧投与（TIPS法）による実験を実施した。

方法：F344雄ラットを用いて長さが1.5、7.0および15 μ mのDWCNTをラット1匹当たり0.125、0.25gおよび0.5mg/ラット、投与本数は 22×10^{12} 本/ラットとなるように重さを調整して投与した。陽性対照としてMWCNT-7を0.5mg/ラット、無処置と分散剤PF68含有生理食塩水のみを投与した群とした。投与終了後4および104週後に屠殺した。

結果：肺腫瘍（adenoma+carcinoma）の発生頻度において各長さ群の合計において、無処置群および分散剤群と比べて有意の増加（ $P < 0.05$ ）が見られた（10/30）。MWCNT-7ではハウ選手が1例発生した。悪性中皮腫（malignant mesothelioma）は15 μ m群に2/10例hA生物学的には有意と考えられた。MWCNT-7では11/13であり、胸膜中皮に対して強い発がん性を示すことが確認された。

結論：1.5、7.0および15 μ m投与群のDWCNTの肺発がん性は1.5~15 μ mの範囲で発がん性があると考えられる。15 μ m群では悪性中皮腫が2例見られ、生物学的に有意と考える。またMWCNT-7の胸膜中皮における強い発がん性が再確認された。

A. 研究目的

異なる長さの2層カーボンナノチューブ（DWCNT）について、慢性毒性・発がん性における障害性と発がん性の有無とその程度についてMWCNT-7との比較において、当該研究室が開発してきた繊維および粒子状物質の経気管肺内噴霧投与（TIPS法）による実験を実施した。

B. 研究方法

方法 F344雄ラットを用いて長さが1.5、7.0および15 μ mのDWCNTをラット1匹当たり0.125、0.25gおよび0.5mg/ラット、投与本数は 22×10^{12} 本/ラットとなるように投与重量を調整して投与した。MWCNT-Nは0.5mg/ラットとした

C. 結果：

腫瘍 (adenoma+carcinoma) と悪性中皮腫の発生頻度において、

- 1) 長さの異なる DWCNT について、各長さ群と対照及び長さの相互間の発生頻度には有意差はみられなかった。
- 2) 3つの長さ群の合計 (20/30) において、対照との有意差が見られた。
- 3) 15 μm 群の2例の悪性中皮腫の発生は生物学的に有意と考えられる。
- 4) 発がんに関与する初期変化 (2週屠殺群) について解析中にある。

D. 考察

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 (Muller, 2009)。しかし我々の TIPS 投与において長さが 1.5、7.0、15 μm の DWCNT は肺発がん性を及ぼすことが明らかとした。また 15 μm 群の2例の悪性中皮腫の発生は、MWCNT-7 の様なある程度以上の (1.5~15 μm) MWCNT に対して実際の暴露を考慮したリスク評価データとして有用と考える。

E. 結論。

DWCNT の 1.5、7.0 および 15 μm 長さの TIPS 投与において、それぞれの長さ群には肺発がん性に有意差は見られなかったがそれらの合計において発がん性のあることは示された。MWCNT-7 の胸膜中皮における強い発がん性が再確認された。

F. 研究発表

1. 論文発表
 - 1) W Wang Q., Zhao Z., Alexander DB, Zhao D., Jiegou Xu, Tsuda H. Pleural translocation and lesions by pulmonary exposed multi-walled carbon nanotubes, *J. Toxic. Pathol.*, 33(3):145-151, 2020
 - 2) Saleh D., Alexander TW., Numano T., Ahmed M.H.O., Gunasekaran S., Alexander DB., Abdelgied M., El-gazzar AM., Takase H., Jiegou Xu., Naiki-ito A., Takashi S., Hirose A., Ohnishi M., Kanno J.,

Tsuda H. Comparative carcinogenicity study of a thick, straight-type and a thin, tangled-type multi-walled by carbon nanotube administered by intra-tracheal instillation in the rat. *Particle and Fibre Toxicology*, 17:48, 2020, <https://doi.org/10.1186/s12989-020-00382-y>

- 3) Sudo H., Tsuji AB., Sugyo A., Kurosawa G., Kurosawa Y., Alexander DB., Tsuda H., Saga T., Higashi T. Radiolabeled Human Monoclonal Antibody 067-213 has the Potential for Noninvasive Quantification of CD73 Expression. *Int. J. Mol. Sci.* 21(7); 2304 2020, <https://doi.org/10.3390/ijms21072304>

2. 学会発表

- 1) Saleh D., Alexander TW., T Numano T., Ahmed M.H.O., Gunasekaran S., Alexander DB., Abdelgied M., El-gazzar AM., Takase H., Naiki-ito A., Takashi S., Hirose A., Ohnishi M., Kanno J., Tsuda H. Thin-Tangled Multi Walled Carbon Nano Tubes are carcinogenic to the rat lung after administration by intra-tracheal instillation. Virtual 2021 SOT Annual Meeting & ToxExpo, March, 2021

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

令和2年度厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
「ナノマテリアル曝露による慢性影響の効率的評価手法開発に関する研究」

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

研究分担者： 堀端 克良	国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部 第二室長
研究協力者： 北條 幹	東京都健康安全研究センター・薬事環境科学部生体影響研究科・主任研究員
研究協力者： 小林 憲弘	国立医薬品食品衛生研究所生活衛生化学部 第三室長
研究協力者： 横田 理	国立医薬品食品衛生研究所毒性部 主任研究官
研究協力者： 高橋 祐次	国立医薬品食品衛生研究所毒性部 動物管理室長
研究協力者： 杉山 圭一	国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部 部長

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、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* 法を用いた肺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予備試験では CNT 気管内投与群だけでなく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とから、肺小核試験法における小核の発現と消失の時間軸を勘案して最適化を試みた。最適化した *in vivo-in vitro* 法を用いた肺小核試験法で CNT 気管内投与下における遺伝毒性の再評価を実施した結果、CNT 気管内投与群および陽性対照群ともに陽性となることを明らかにした。これにより、全身吸入曝露および気管内投与での CNT による遺伝毒性の発現形態が同様であることが示された。

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。ナノマテリアルの中でも、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 CNT（幅 70-110nm、長さ 1-4 μ m）を気管内注入し、肺組織のコメットアッセイ、酸化的 DNA 付加体の定量、そして一酸化窒素合成酵素の免疫組織化学的解析を行ったところ、すべて陽性の結果が報告されている。よって CNT 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。この試験系では *in vivo* で曝露したマウス肺を摘出後、*in vitro* で肺細胞を培養し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初期検討し、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ことから、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。その結果、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、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った。これを踏まえて、我々は小核の出現と時間経過による影響についての解析を行い、*in vivo-in vitro* 法を用いた肺小核試験の採材時期の最適化を行った。

今年度は昨年度までに最適化した試験条件を用いて、CNT をマウスに単回気管内投与し、幼若赤血球 (RET; Reticulocyte) を標的とした小核試験および *in vivo-in vitro* 法を用いたマウス肺小核試験により遺伝毒性を評価した。陽性対照には Ethyl methanesulfonate (EMS) を用いた。

B. 研究方法

(1) 被検物質

CNT 検体は Taquann 処理済みの MWNT-7 (三井物産、Lot No. 060125-01k) を用いた。EMS (Sigma-Aldrich Corporation, lot#: BCBZ8402) を陽性対照に使用した。また、0.1% Tween 80 を含む生理食塩液を気管内投与の陰性対照とした。

(2) 動物

日本エスエルシー株式会社より 11 週齢の雄性 C57BL/6N^{CrSlc} (SPF) マウスを購入して試験に用いた。陰性対照群および陽性対照群は各群 6 匹とし、CNT 曝露群は 11 匹、合計 23 匹を使用した。CNT 曝露群は解剖後、明らかに CNT に肺が曝露されていることができる個体を、ID の若い順に 6 匹選択して試験に供した。馴化期間は動物入荷後 1 週間とし、12 週齢の動物を試験に使用した (表 1)。

(3) 投与

① CNT および陰性対照 :

CNT は、エンドトキシンや Taquann 処理で使用する tert-ブチルアルコール等のわずかな夾雑物を除去するため、200°C・2 時間の熱処理をした後、0.1% Tween 80 を含む生理食塩液を加えて 0.5 mg/mL 投与液を調製した。投与液は、投与直前まで超音波浴槽を用いて十分に分散させた。イソフルラン麻酔下でマウス気管内投与用ゾンデを気管内に挿入し、100 μ L/匹 (0.05 mg/匹)

となるように投与液を気管内に噴射投与した。陰性対照群には 0.1% Tween 80 を含む生理食塩液を 100 μ L/匹となるように気管内に噴射投与した。CNT は投与後 48 時間以上肺内に残存するため、CNT および陰性対照については単回投与とした。

② 陽性対照：

EMS を使用直前に生理食塩液に溶解して、20 mg/mL 投与液を調製し、200 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) 採材

CNT 投与群および陰性対照投与群については単回投与後 48 時間後に、陽性対照群については最終投与後 24 時間後に採材を行った。イソフルラン深麻酔下で腹大動脈より採血を行い、その後、放血により安楽死を施し、肺を採材した。なお、CNT 投与群は明らかに CNT に肺が曝露されていることができる個体を、ID の若い順に 6 匹選択した。血液は抗凝固剤処理済みの採血管に、肺は PBS を入れた遠心管に入れ、全頭解剖終了までの間、氷上で保管した。

(5) 幼若赤血球小核試験

Litron 社の MicroFlow PLUS-M Kit を用いて同 Kit 付属のプロトコルに従い、RET を標的とした小核試験を実施した。血液を極低温下でメタノールを用いて固定した。その後、同 Kit 付属の抗 CD61 抗体 (血小板を染色)、抗 CD71 抗体 (RET を染色) および DNA 染色液等でそれぞれ染色し、フローサイトメーターを用いて 20,000 個程度の RET をそれぞれ測定し、RET 中の小核含有血球細胞を測定し、小核を有する細胞の誘発率を算出した。

(6) *in vivo-in vitro*法を用いたマウス肺小核試験

(6-1) 細胞分離培養および標本作製

採材後の肺を用いて、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. 肺を採材後、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。
- ii. 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。
- iii. 牛胎仔血清と 250 μ g/mL DNaseI を含む液を加えて、37°C 温浴中で 10 分間処理した。
- iv. セルストレーナーでろ過した後、300 \times g で 10 分間遠心分離して肺細胞 (沈査) を回収した。
- v. Percoll の密度勾配 (密度 : 1.089 及び 1.040 g/cm³) により遠心分離 (250 \times 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。
- vi. 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。

(6-2) 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。
- iii. 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。

(7) 統計学的解析、試験結果の評価

RET および肺細胞における小核誘発頻度について、陰性対照群と各群との間で

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 RET の出現頻度の結果を図 2 および表 2 に示した。陰性対照群の平均値は $0.45 \pm 0.06\%$ 、EMS 投与群の平均値は $2.21 \pm 0.32\%$ 、CNT 投与群の平均値は $0.42 \pm 0.03\%$ であり、陽性対照である 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が認められたが、CNT 投与群は有意な小核誘発率の増加は認められなかった(図 2 および表 2)。

各群における小核をもつ肺細胞の出現頻度の結果を図 3 および表 3 に示した。陰性対照群の平均値は $1.40 \pm 0.46\%$ 、EMS 投与群の平均値は $4.35 \pm 0.94\%$ 、CNT 投与群の平均値は $3.52 \pm 0.81\%$ であり、陽性対照である EMS 投与群および CNT 投与群は共に、陰性対照群と比較して有意な小核誘発率の増加が認められた(図 3 および表 3)。

以上の結果から、CNT は造血系では遺伝毒性を有さないが、直接曝露組織である肺では遺伝毒性を有することが明らかになった。これらの結果は、以前に我々が実施した CNT 全身吸入曝露下での *in vivo-in vitro* 法を用いた肺小核試験の結果と同様であったことから、今回の試験条件では全

身吸入曝露および気管内投与での CNT による遺伝毒性の発現形態に大きな差異は無いことが示された。今回の結果は、Kato らによる CNT 気管内注入下での肺組織コメットアッセイによる遺伝毒性評価結果とも矛盾しておらず、CNT は肺において、DNA 損傷性を有すると考えられる。

D. 結論

我々は小核の出現と時間経過による影響を考慮して、投与から採材までの期間を最適化した上で、*in vivo-in vitro* 法を用いた肺小核試験を実施し、CNT 気管内投与における遺伝毒性影響を RET 小核試験および肺細胞を用いた小核試験で評価した。その結果、CNT は造血系では遺伝毒性を示さないが、直接曝露組織である肺では小核を誘発し、遺伝毒性を示すことを明らかにした。これらの結果は、CNT 全身吸入曝露下での結果と矛盾せず、全身吸入曝露および気管内投与での CNT による遺伝毒性の発現形態が同様であることが示された。

E. 健康危機情報

特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

Chen R, You X, Cao Y, Masumura K, Ando T, Hamada S, Horibata K, Wan J, Xi J, Zhang X, Honma M, Luan Y: Benchmark dose analysis of multiple genotoxicity endpoints in gpt delta mice exposed to aristolochic acid I. *Mutagenesis*. geaa034. (2020)

Chikura S, Kimoto T, Itoh S, Sanada H, Muto S, Horibata K: Standard protocol for the PIGRET assay, a high-throughput reticulocyte Pig-a assay with an immunomagnetic separation, used in the

interlaboratory trial organized by the Mammalian Mutagenicity Study Group of the Japanese Environmental Mutagen and Genome Society. *Genes Environ.* 43(1):10. (2021)

Kasamatsu T, Kitazawa A, Tajima S, Kaneko M, Sugiyama K, Yamada M, Yasui M, Masumura K, Horibata K, Honma M: Development of a new quantitative structure-activity relationship model for predicting Ames mutagenicity of food flavor chemicals using StarDrop™ Auto-Modeller™I. *Genes Environ.* in press. (2021)

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. Environmental Mutagenesis and Genomics Society 51st Virtual Annual Meeting. On Line (2020.9)

堀端克良, 曹易懿, 山田雅巳, 増村健一, 能美健彦, 本間正充: 高等真核生物での遺伝情報発現に付随する突然変異誘発機構解析系の開発. 日本環境変異原学会第49回大会. 沼津 (2020.11)

G. 知的所有権の取得状況

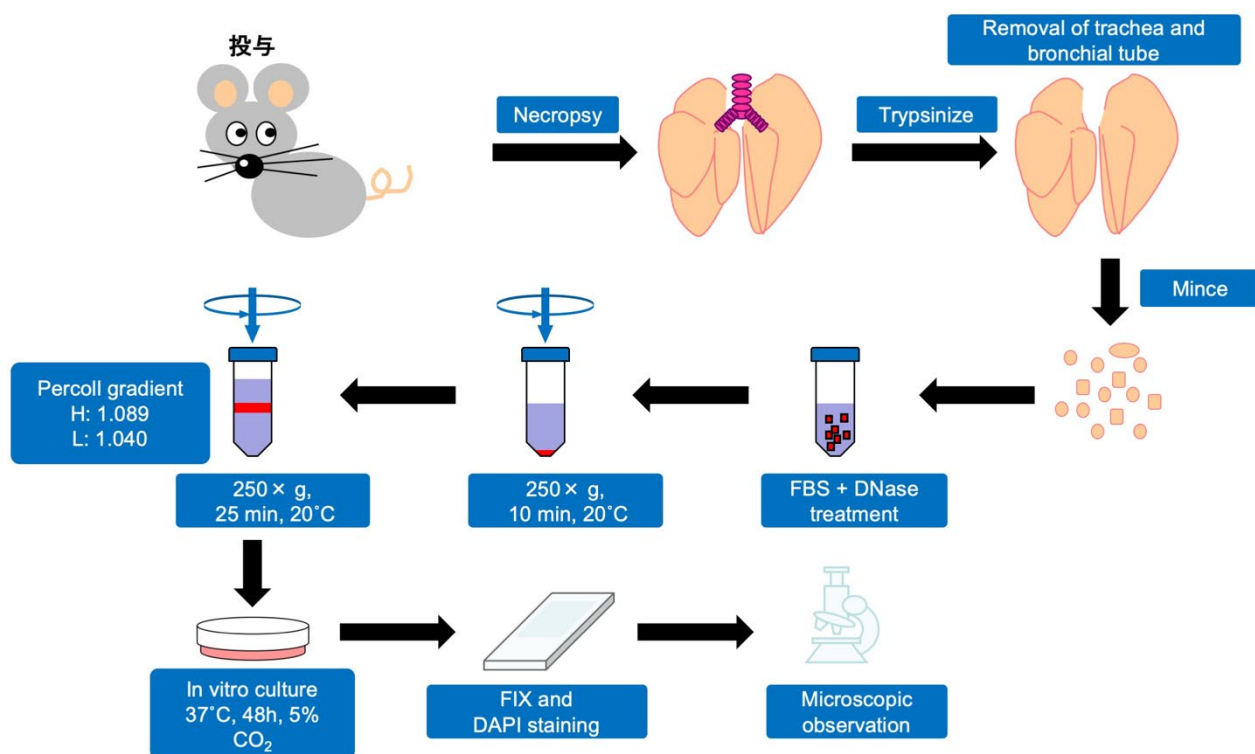
なし

表 1: 群構成

処理群	投与用量	投与経路	投与回数*	動物数
陰性対照 (0.1% Tween-saline)	100 μ L/匹	気管内投与	単回	6
被験物質 (CNT)	0.05 mg/匹 (100 μ L/匹)			11**
陽性対照 (EMS)	200 mg/kg	腹腔内投与	2回 (24時間ごと)	6

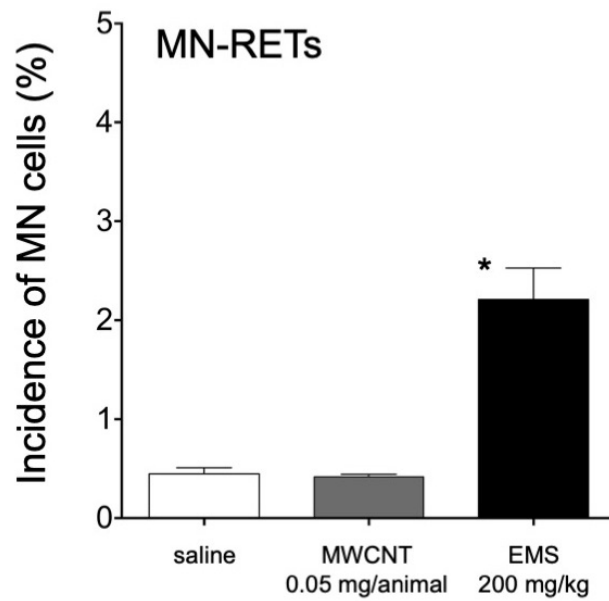
*CNTは体内に残存するため単回投与。陰性対照とCNT群はそれぞれ投与後48時間で採材、陽性対照群は2回目の投与後24時間で採材。

**解剖後、明らかにMWCNTに肺が曝露されていることができる個体を、IDの若い順に6匹選択して試験に供する。



[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



(* $p < 0.01$, Fisher's exact test, 2-tailed, vs. negative control)

図 2. 幼若赤血球における小核誘発率

表 2: 幼若赤血球小核試験の測定細胞数と小核誘発率

投与群	animal ID	測定細胞数	小核を持つ細胞数	小核誘発率
陰性対照	NC_1	20001	90	0.45
	NC_2	20000	98	0.49
	NC_3	20000	88	0.44
	NC_4	20000	75	0.38
	NC_5	20000	77	0.39
	NC_6	20000	108	0.54
	Total/ mean \pm SD	120001	536	0.45 \pm 0.06
CNT投与群	CNT_2	20000	84	0.42
	CNT_3	20000	85	0.43
	CNT_6	20000	78	0.39
	CNT_7	20000	92	0.46
	CNT_9	20000	84	0.42
	CNT_11	20002	78	0.39
	Total/ mean \pm SD	120002	501	0.42 \pm 0.03
陽性対照	PC_1	20000	326	1.63
	PC_2	20000	458	2.29
	PC_3	20000	411	2.06
	PC_4	20001	490	2.45
	PC_5	20000	485	2.43
	PC_6	20000	479	2.40
	Total/ mean \pm SD	120001	2649	2.21 \pm 0.32

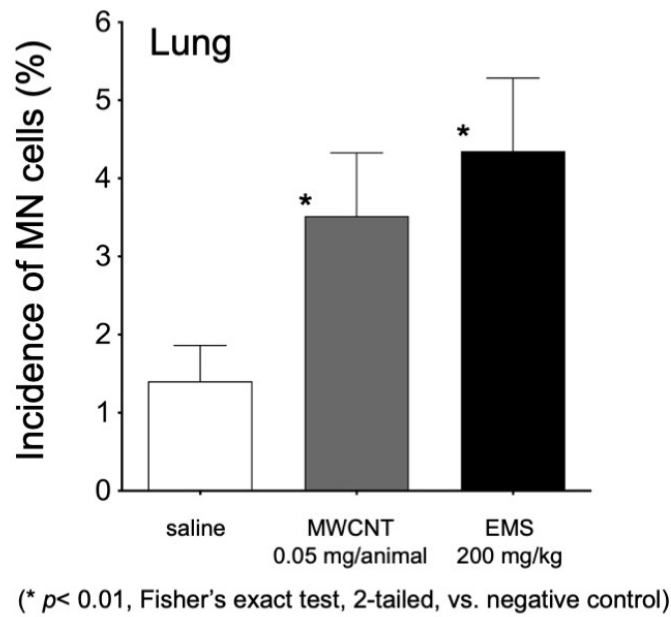


図 3. *in vivo-in vitro* 法を用いた肺小核試験の小核誘発率

表 3. *in vivo-in vitro* 法を用いた肺小核試験の小核試験の測定細胞数と小核誘発率

投与群	animal ID	測定細胞数	小核を持つ細胞数	小核誘発率
陰性対照	NC 1	1004	11	1.10
	NC_2	1014	9	0.89
	NC_3	1002	10	1.00
	NC_4	1002	18	1.80
	NC_5	1004	17	1.69
	NC_6	1029	20	1.94
	Total/ mean \pm SD	6055	85	1.40 \pm 0.46
CNT投与群	CNT 2	1000	23	2.30
	CNT_3	1001	33	3.30
	CNT_6	1000	36	3.60
	CNT_7	1000	40	4.00
	CNT_9	1000	32	3.20
	CNT_11	1000	47	4.70
	Total/ mean \pm SD	6001	211	3.52 \pm 0.81
陽性対照	PC 1	1021	34	3.33
	PC_2	1001	42	4.20
	PC_3	1016	34	3.35
	PC_4	1016	53	5.22
	PC_5	1000	56	5.60
	PC_6	1002	44	4.39
	Total/ mean \pm SD	6056	263	4.35 \pm 0.94

令和2年度 厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

分担研究報告書

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

分担研究課題名：ナノマテリアルの免疫制御システムへの影響評価に関する研究

研究分担者	石丸 直澄	徳島大学大学院医歯薬学研究部 教授
研究協力者	新垣 理恵子	徳島大学大学院医歯薬学研究部
	常松 貴明	徳島大学大学院医歯薬学研究部
	菅野 純	国立医薬品食品衛生研究所
	高橋 祐次	国立医薬品食品衛生研究所
	横田 理	国立医薬品食品衛生研究所
	栞形 麻樹子	国立医薬品食品衛生研究所
	辻 昌貴	国立医薬品食品衛生研究所
	森田 紘一	国立医薬品食品衛生研究所
	菅 康佑	国立医薬品食品衛生研究所

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（24ヶ月）における免疫制御システムへの影響評価について、*in vivo*での解析を実施した。さらに、*in vitro*でのRAW264.7細胞およびNIH3T3細胞を用いた実験系ならびにNF- κ B1遺伝子欠損マウスを用いたMWCNT-7による慢性腹膜炎モデルを用いた*in vivo*の実験を実施した。Taquan処理されたMWCNT-7の長期曝露によってBALF細胞数あるいはAM分画が増加する可能性が示された。加えて、MWCNT-7の長期曝露によって全身のマクロファージの分化に影響を受ける可能性が示された。一方で、MWCNT-7の直接の刺激に対してマクロファージからのMMP-12を介した線維芽細胞の活性化機構が存在し、マクロファージのNF- κ Bを介した活性化とMMP-12による線維化の制御機序が明らかになった。

A. 研究目的

ナノマテリアルの暴露による免疫系への影響に関しては、カーボンナノチューブの吸引による肺胞マクロファージの活性化を検討した研究がよく知られている。さらに、カーボンナノチューブの吸入暴露により、T細胞のマイトージェンに対する反応性が低下し、NK活性に関してもカーボンナノチューブ暴露により抑制されることが報告されている。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、暴露から24ヶ月後の解析を実施した。

B. 方法

・マウス

12週齢のC57BL/6 (B6) (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 (24ヶ月間) において適切に屠殺後解析を行った。また、MWCNT-7の腹腔内投与に関しては、B6マウス、WTマウスあるいはNF- κ B1 遺伝子欠損 (KO) (Jackson Lab) 雄マウス (8週齢) に 100 μ L の生理食塩水に懸濁した MWCNT-7 (1 または 10 μ g/マウス) を腹腔内投与した。腹腔内投与 8ヶ月～10ヶ月後に適切に解析を実施した。マウスを用いた動物実験に関しては、実験動物に関する取り扱いについて使用する動物の苦痛の軽減や安楽死の方法などを中心として国立医薬品食品衛生研究所ならびに徳島大学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。腹腔内投与実験にも Taquann 処理された MWCNT-7 (PEG 懸濁) を十分に分散、攪拌した後に、19ゲージ針/1mL 注射器 (テルモ) を用いて腹腔内投与を実施

した。

・フローサイトメトリー解析

肺胞洗浄液 (BALF) 中の単核球を採取するために、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 を流し込み、回収後、洗浄、遠心し、組織保存液 (MACS[®] Tissue Storage solution, Miltenyi Biotec) に浸漬した。また、脾臓は摘出後、保存液に浸漬し、冷蔵保存した。その後、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。蛍光色素標識 (fluorescein isothiocyanate : FITC, phycoerythrin : PE, Peridinin chlorophyll protein-cyanin 5.5 : PerCP-Cy5.5, PE-cyanin 7 : PE-Cy7, allophycocyanin : APC, APC-Cy7, APC-Alexa Fluor 700) された各種表面マーカー CD3, CD19, CD45.2, CD11b, CD11c, F4/80, CCR2 (CD192), CD206, CD54, CD163 に対する抗体 (eBioscience, San Diego, CA) にて染色ならびに 7-amino-actinomycin D (7-AAD) 処理、0.9%-formalin-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。頸部リンパ節に関しても、染色後固定した (未解析)。

。

・PEC 採取および病理組織解析

MWCNT-7 の腹腔内投与実験において、1 mL の PBS を腹腔内に注射し、洗浄液を回収後、遠心分離により PEC を

採取し、遺伝子解析に用いた。腹腔内の臓器、横隔膜、後腹膜を採取後、10% 中性緩衝ホルマリン液で固定後、パラフィンブロックの作成、スライド標本作成を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色あるいはアザン染色を実施した。アザン染色標本を用いて、肝組織の被膜の線維化を Adobe Photoshop Element 2020 による解析を行なった。肝臓被膜の 10 定点における線維領域長を測定することによって線維化の程度を評価した。

・培養細胞を用いた実験

マウス単球細胞株 RAW264.7、マウス線維芽細胞株 NIH3T3 を培養系に用いた。培養系で Taquann 処理 MWCNT-7(T-CNT) を 0~125 ng/ml の濃度で刺激した。細胞数、細胞の大きさ、MMP-12 mRNA の発現、線維芽細胞関連因子の mRNA 発現を定量 RT-PCR で検討した。

・定量化 RT-PCR 法

培養細胞あるいは PEC の、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 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を用いた。
MMP12; forward, 5'-TGGTATTCAAGGAGATGCACATTT-3',
reverse, 5'-GGTTTGTGCCTTGAAAACCTTTTAGT-3',
TGF-β1: forward, 5'-GACCGCAACAACGCCATCTAT-3', and
reverse, 5'-GGCGTATCAGTGGGGGTCAG-3';

Col1A2: forward, 5'-CCAAGGGTAACAGTGGTGAA-3' and reverse, 5'-CCATCACTGCCCCGAGCACC-3';
 Col3A: forward, 5'-AACGGAGCTCCTGGCCCCAT-3' and reverse, 5'-CCATCACTGCCCCGAGCACC-3';
 Col IV: forward, 5'-ATGCCCTTTCTCTTCTGCAA-3' and reverse, 5'-GAAGGAATAGCCGATCCACA-3';
 mSMA-F: GTTCAGTGGTGCCTCTGTCA
 mSMA-R: ACTGGGACGACATGGAAAAG
 β-actin; forward, 5'-GTGGGCCGCTCTAGGCACCA-3', and reverse, 5'-CGGTTGGCCTTAGGGTTCAGGGGG-3'。
 なお、BALF細胞および肺組織の一部をRNAlaterに浸漬し、冷蔵保存した(未解析)。

C. 研究結果

MWCNT-7の吸入暴露実験

Taquann処理したMWCNT-7の24ヶ月の吸入暴露(図1)による肺の免疫系を探索するために肺胞洗浄液(BALF)中の細胞(BALF細胞)数を検討したところ、低濃度及び高濃度暴露群ともに対照群に比較して有意に細胞数が増加していることが判明し、濃度依存的な増加が認められた(図2A)。また、BALF細胞の直径を細胞自動計測器で計測すると、対照群の細胞の直径に比較して、低濃度ならびに高濃度のMWCNT-7の曝露によって有意に小さくなっていた(図2B)。

続いて、各種標識抗体を用いてフロー

サイトメータによってBALF細胞の表面マーカーの解析を実施した。図3のようなフローサイトメータによるGating strategyにて各細胞分画の検討を進めた。BALF細胞中の血球系細胞(CD45.2⁺)の割合は、高濃度のMWCNT-7曝露で対照群に比較して有意に上昇していた(図4A)。BALF細胞中の肺胞マクロファージ(AM: alveolar macrophage)、単球(Mo: monocyte)、好酸球(Eo: eosinophil)の分画に関しては、高濃度MEWCNT-7曝露群で対照群に比較して、有意に増加していた(図4B)。Moに関してはMWCNT-7の曝露で変化は見られなかった(図4B)。Eoに関しては、高濃度のMWCNT-7曝露にて対照群よりも有意に低下していた(図4B)。F4/80⁺のAMの割合に関しても、高濃度MEWCNT-7曝露群で有意に増加していた(図4B)。また、CD11b+AMに関しても、高濃度MEWCNT-7曝露群で有意に増加していた(図4C)。

F4/80⁺AMにおけるM1/M2マクロファージ分化を検討するためにM1マクロファージマーカーの一つであるCD192、M2マクロファージのマーカーであるCD206を用いて、フローサイトメータにて各分画を解析したところ(図5A)、MWCNT-7の吸入暴露による変化は観察されなかった(図5B, C)。また、F4/80⁺AMにおけるCD54(ICAM-1)ならびにCD163(Scavengdr receptor)の発現について検討したところ、MWCNT-7の吸入暴露による影響は確認できなかった。

た (図 5 D)。

MWCNT-7の吸入暴露による全身的な免疫系への影響を検討するために、脾臓における免疫担当細胞分画をフローサイトメータにて解析したところ (図 6 A)、CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞ならびにCD19⁺B細胞の分画に各群で影響は認められなかった (図 6 B)。さらに、T細胞の活性化マーカーであるCD44/CD62Lを用いて、ナイーブT細胞 (CD44^{low}CD62L⁺)、エフェクターT細胞 (CD44^{high}CD62L⁻)、セントラルメモリーT細胞 (CD44^{high}CD62L⁺) 分画について検討すると、各群で有意な差は観察されなかった (図 6 C)。

さらに、頸部リンパ節におけるCD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞およびCD19⁺B細胞の割合に関しても、MWCNT-7の吸入暴露による変化は観察されなかった (図 7 A)。T細胞分画に関しても各群で有意な差は生じていなかった (図 7 B)。

脾臓と頸部リンパ節におけるマクロファージ分画についてフローサイトメータで解析を進めると (図8A)、脾臓ではF4/80+マクロファージの割合に各群で変化は観察されなかったが、CD192+M1型マクロファージの割合がMWCNT-7の吸入暴露 (低濃度群、高濃度群) によって、有意に低下することが明らかになり、CD206⁺M2型マクロファージには影響は見られなかった (図 8 B)。頸部リンパ節では、高濃度MWCNT-7暴露によってF4/80+マクロファージ分画が有意に増

加するとともに、CD206⁺M2型マクロファージ分画がMWCNT-7暴露によって、対照群に比較した有意に減少することが判明した (図 8 C)。

MMP-12を介した慢性炎症

R1年度までの研究 (R1年度本報告書) ならびに以前のMWCNT-7の吸入実験研究 (今井田班ならびに相磯班研究、PLoS One 2018) において、AMにおけるMMP-12を介した慢性炎症および線維化の役割が明らかになっていることから、*in vitro*において、マウスマクロファージ細胞株であるRAW267.4細胞にTaquann処理MWCNT-7を添加することによってMMP-12 mRNA発現が上昇するかどうかについて検討すると、MWCNT-7添加後 2 4 時間でのMMP-12 mRNA発現が有意に上昇することを定量RT-PCR法にて確認された (図 9 A)。また、MWCNT-7を処理されたRAW267.4細胞の培養上清を線維芽細胞株であるNIH-3T3細胞の増殖を上昇させることが分かり、線維化に関わる遺伝子群のmRNA発現を有意に上げることも明らかになった (図 9 B, C)。さらに、RAW267.4細胞におけるMMP-12 mRNA発現がNF-κBシグナルを介しているかどうかを確認するために、NF-κB阻害剤を用いると、MWCNT-7によるMMP-12 mRNA発現は有意に抑制されることが明らかになった (図 9 D)。

MWCNT-7 暴露による線維化はMWCNT-7の腹腔内投与後8ヶ月以降に観察されることが報告 (R25年度本事業

今井田班報告書) されていることから、MWCNT-7による慢性炎症ならびに線維化がマクロファージのNF- κ B-MMP-12基軸を介している反応であるのか否かを*in vivo*で検討するために、NF- κ B1遺伝子欠損(NF- κ B1KO)マウスにMWCNT-7を腹腔内投与し、8ヶ月後に病理組織学的解析ならびに腹腔マクロファージのMMP-12 mRNA発現を定量RT-PCR法による解析を加えた。WTマウスにMWCNT-7を腹腔投与すると肝表面など腹腔内に線維化を伴う慢性腹膜炎が誘導できる(図10A)。NF- κ B1KOマウスへのMWCNT-7投与では、対照群(WT)に比較して、組織学的(アザン染色)に線維化の程度が有意に低下していることが判明した(図10B)。さらに、WTへのMWCNT-7の腹腔内暴露によって腹腔マクロファージを含む腹腔滲出細胞(PEC)におけるMMP-12 mRNA発現は有意に上昇するのに対して、NF- κ B1KOマウスではMMP-12 mRNA発現は有意に抑制されていることが明らかになった(図10C)。

D. 考察

MWCNT-7の長期吸入暴露実験(24ヶ月)において、BALF細胞の細胞数が増加し、細胞直径は低下していた。このことは、12ヶ月間の暴露実験と同様の結果であった(R1本事業報告書)。一方で、12ヶ月暴露時点ではAM分画は対照群よりも少なくなっていたが、24ヶ月暴露

ではAM分画の割合は高濃度吸入群で対照群よりも高い値を示していた。このことは対照群のAM分画の加齢的变化ならびに高濃度MWCNT-7暴露によるAMへの影響が考えられた。しかし、M1/M2分化、CD54ならびにCD163を指標にした活性化に関しては、MWCNT-7暴露による影響は確認できなかった。全身の免疫系への影響として、T細胞ならびにB細胞の分画への影響は認められなかったが、脾臓のM1マクロファージへの分化抑制及び頸部リンパ節でのM2マクロファージへの分化抑制が確認された。12ヶ月暴露では見られなかったナノマテリアルの長期暴露の影響は、24ヶ月暴露によって現れた。BALF細胞の各種遺伝子発現に関しては未解析であり、今後検討する予定である。

今年度はナノマテリアルの免疫システムへの慢性影響を検討する目的で、細胞株を用いた*in vitro*の実験系および免疫システムへの影響の分子機構を明らかにする*in vivo*の実験系を立ち上げた。以前にMWCNT-7の吸入暴露後の長期観察で、肺マクロファージにおけるMMP-12の重要性が明らかにされた(PLoS One 2018)。MWCNT-7のマクロファージへの直接の影響を探るために、RAW264.7細胞を用いて検討したところ、MMP-12 mRNA発現が上昇し、その培養上清によってNIH3T3細胞における線維化が促進されたことから、*in vivo*で確認されているMWCNT-7と線維化の関係

を *in vitro* で再現できる実験系であると
考えられる。また、MWCNT-7 誘導性の
線維化を伴った慢性腹膜炎は、ナノマ
テリアル毒性における発癌機構を探る研
究過程で明らかにされてきた。今回は、
in vitro で観察された NF- κ B-MMP-12 を
介したマクロファージの線維化誘導能
を NF- κ B1KO マウスを用いて明らかに
することが可能となった。これまで、ナ
ノマテリアルに対してマクロファージ
の貪食、活性化、細胞死に関して多くの
報告や議論がなされてきた。一方で、慢
性炎症あるいは慢性毒性の観点から病
理的なアプローチができない状況で
あった。本研究では *in vitro* と *in vivo* の
実験系を効率的に組み合わせてナノマ
テリアルに対する免疫制御機構を明ら
かにできる可能性が示された。

E. 結論

1. MWCNT-7の24ヶ月の長期暴露によっ
てBALF細胞数あるいはAM分画が増
加する可能性が示された。
2. MWCNT-7の長期暴露によって全身の
マクロファージの分化に影響を受け
る可能性が示された。
3. 細胞株を用いた検討で、MWCNT-7の
直接の刺激に対してマクロファージ
からのMMP-12を介した線維芽細胞
の活性化機構の存在が示された。
4. MWCNT-7による線維化を伴う慢性炎
症にはマクロファージのNF- κ Bを介
した活性化とMMP-12による線維化

の制御機構が明らかにされた。

5.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Sato M, Arakaki R, Tawara H,
Tsunematsu T, Ishimaru N. Formation
of Autoimmune Lesions is Independent
of Antibiotic Treatment in NOD mice.
Int J Mol Sci, 2021, 22,3239. doi:
10.3390/ijms22063239.
2. Ohigashi I, Frantzeskakis M, Jacques A,
Fujimori S, Ushio A, Yamashita F,
Ishimaru N, Yin D, Cam M, Kelly M,
Awasthi P, Takada T, Takahama Y.
Thymoproteasome hardwires TCR
repertoire of CD8+ T cells with cortical
positive selection independent of
negative selection. J Exp Med. 2021,
218(4):e20201904. doi:
10.1084/jem.20201904.
3. Kurosawa M, Shikama Y, Furukawa M,
Arakakai R, Ishimaru N, Matsushita K.
Chemokines upregulated in epithelial
cells control senescence-associated T
cell accumulation in salivary glands of
aged and Sjögren's syndrome model
mice. Int J Mol Sci. 2021, 22:2302. doi:
10.3390/ijms22052302.
4. Tsunematsu T, Arakaki R, Kawai
H, Ruppert J, Yamada A, Tsuneyama

- K, Ishimaru N, Earnshaw WC, Pagano M, Kudo Y. APC/C-Cdh1 is required for the termination of CPC activity upon mitotic exit. J Cell Sci. 2020, 133(18): jcs251314. doi: 10.1242/jcs.251314.
5. Kisoda S, Shao W, Fujiwara N, Mouri Y, Tsunematsu T, Jin S, Arakaki R, Ishimaru N, Kudo Y. Prognostic value of partial-EMT-related genes in head and neck squamous cell carcinoma by a bioinformatic analysis. Oral Dis. 2020, doi: 10.1111/odi.13351.
6. 石丸直澄 (分担) わかりやすい病理学 改訂第 7 版 45-70, 317-322, 2021 ISBN978-4-524-22654-2
7. 石丸直澄 難病研究の進歩 シェーグレン症候群 生体の科学 71(5): 476-747, 2020 ISSN 0370-9531

学会発表

1. 新垣理恵子、佐藤真美、木曾田暁、Shao Wenhua、牛尾 綾、常松貴明、工藤保誠、石丸直澄 多層化カーボンナノチューブと酸化チタン吸入暴露による肺胞マクロファージの動態 第 109 回日本病理学会総会 ポスター発表 2020.7.1-31 (ウェブ)
2. 石丸直澄 口腔腫瘍の病理と遺伝子異常—癌形質と微小環境—オーバービュー 第 109 回日本病理学会総会シンポジウム 2020.7.1-31 (ウェブ)
3. 佐藤真美、新垣理恵子、牛尾綾、工藤保誠、石丸直澄 シェーグレン症候群

の標的臓器における IL-33 の役割 第 109 回日本病理学会総会 ポスター発表 2020.7.1-31 (ウェブ)

4. 常松貴明、新垣理恵子、工藤保誠、石丸直澄 染色体パッセンジャー複合体による胎児性癌の未分化性維持機構 第 109 回日本病理学会総会 口演 2020.7.1-31 (ウェブ)
5. 佐藤真美、牛尾綾、新垣理恵子、常松貴明、工藤保誠、石丸直澄 シェーグレン症候群モデルマウスにおける肺病変の解析 ポスター発表 第 62 回歯科基礎医学会学術大会 2020.9.11-10.9 (ウェブ)
6. 常松貴明、工藤保誠、石丸直澄 多角的アプローチによる口腔癌の発生・進展の分子機構の解明 第 62 回歯科基礎医学会学術大会 先端歯学国際教育研究ネットワーク・シンポジウム「歯学研究の今昔と次世代研究」2020.9.11-10.9 (ウェブ)
7. 石丸直澄 自己免疫疾患モデルを用いた発症機序の解明と治療戦略 東京工業大学化学生命科学研究所ウェブ講演会 2021.1.28 (ウェブ)
- 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

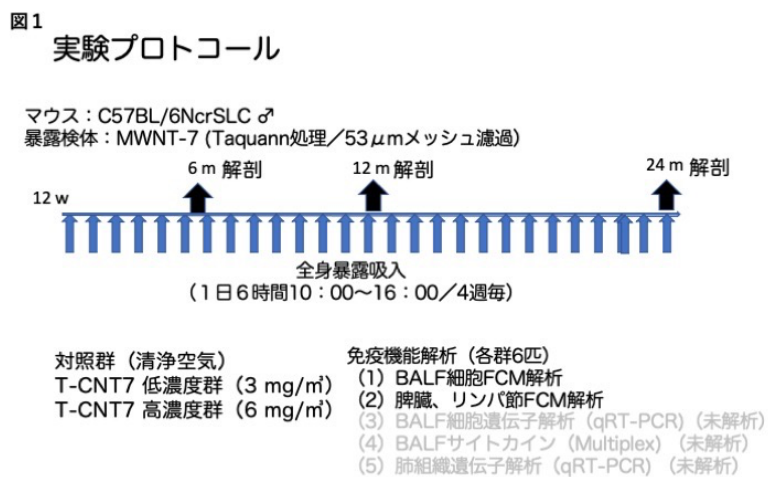


図1 MWCNT-7の長期吸入暴露(24ヶ月)実験
4週毎にTaquann処理したMWCNT-7を全身吸入装置にて暴露した。BALF細胞及び脾臓、頸部リンパ節細胞を用いたフローサイトメータ(FCM)解析を実施した。その他の解析は現在進めている。

図2

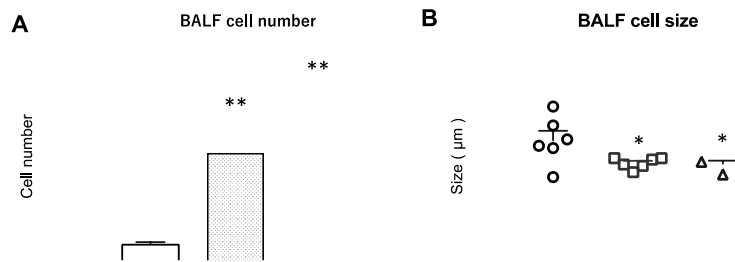


図2 MWCNT-7の長期吸入暴露（24ヶ月）によるBALF細胞の変化
A: BALF細胞の生細胞数を計測した。結果(number)=平均値±SD (n=6/group)
B: BALF細胞の直径。結果(μm)=平均値±SD (n=6/group) *p < 0.05, **p < 0.0001

図 3

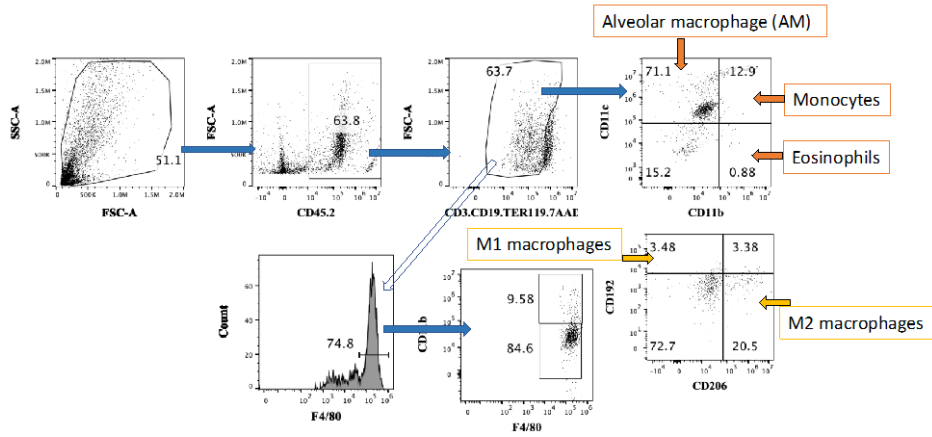


図 3 BALF細胞を用いたGating strategy

採取されたBALF細胞を用いて、各種標識抗体による反応、洗浄、固定後にフローサイトメータによる解析を実施した。SSC/FSC分画にてdebrisなどを除去し、CD45.2陽性血球細胞分画におけるCD3⁺CD19⁺TER119⁻7AAD⁻でゲートをかかけた後に、CD11c/CD11bで展開してAM、Mo、Eo分画とした。さらに、AM分画をCD192 (M1マクロファージ)、CD206 (M2マクロファージ)を検出した。一方で、F4/80ならびにCD11bを用いたAM分画を確認した。

図 4

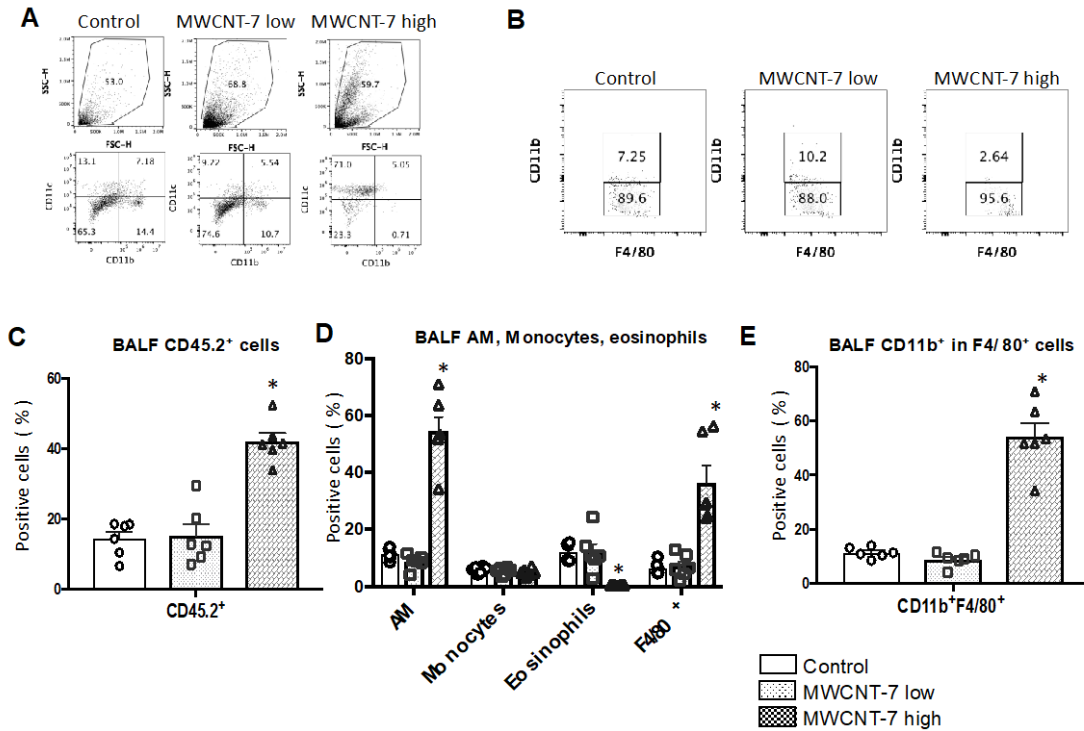


図 4 MWCNT-7長期吸入暴に夜BALF細胞における免疫細胞分画

A : BALF細胞における各種免疫細胞分画 SSC/FSC分画およびCD11b/CD11c分画

B : BALF細胞中のAM分画 (F4/80/CD11b)

C : BALF細胞中も血球系細胞分画 (CD45.2⁺)

D : BALF細胞中のAM、Mo、EoおよびF4/80⁺AM分画

E : BALF細胞中のCD11b⁺F4/80⁺AM分画

結果 (%) = 平均値 ± SD (n=6/group)、*p < 0.0001

図 5

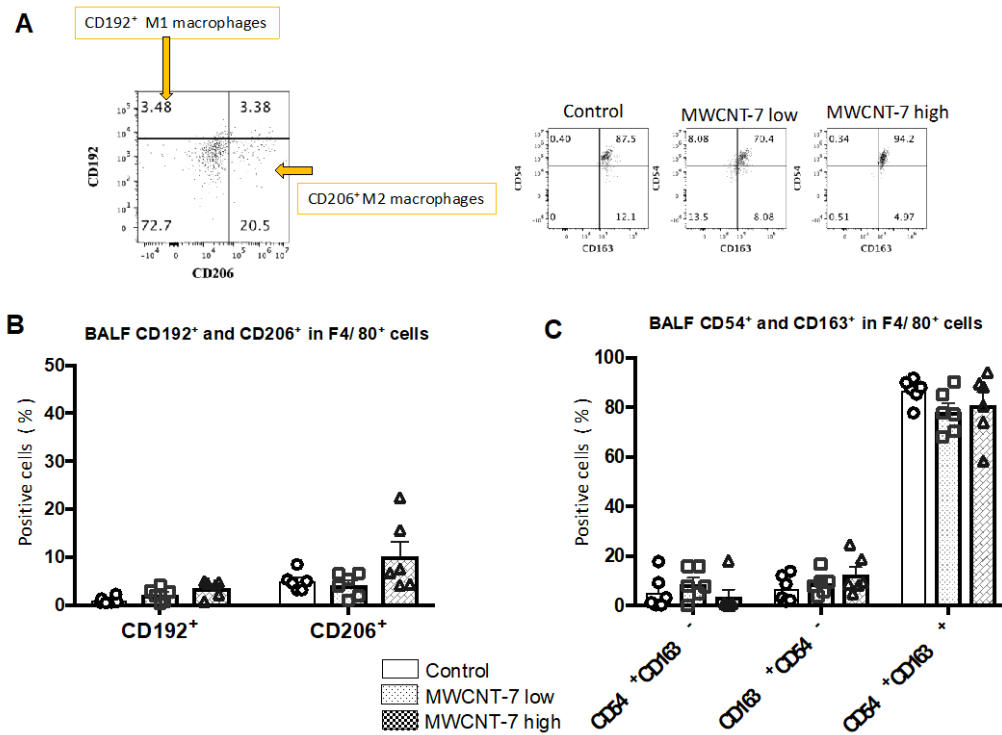


図5 MWCNT-7長期吸入暴露によるAMにおけるM1/M2分化およびCD54/CD163発現
 A: BALF細胞を用いたF4/80⁺AMにおけるCD192/CD206分画およびCD54/CD163分画
 B: AMのM1/M2分化 結果 (%) = 平均値 ± SD (n = 6 /group)
 C: AMにおけるCD54⁺CD163⁻、CD54⁻CD163⁺およびCD54⁺CD163⁺分画
 結果 (%) = 平均値 ± SD (n = 6 /group)

図 6

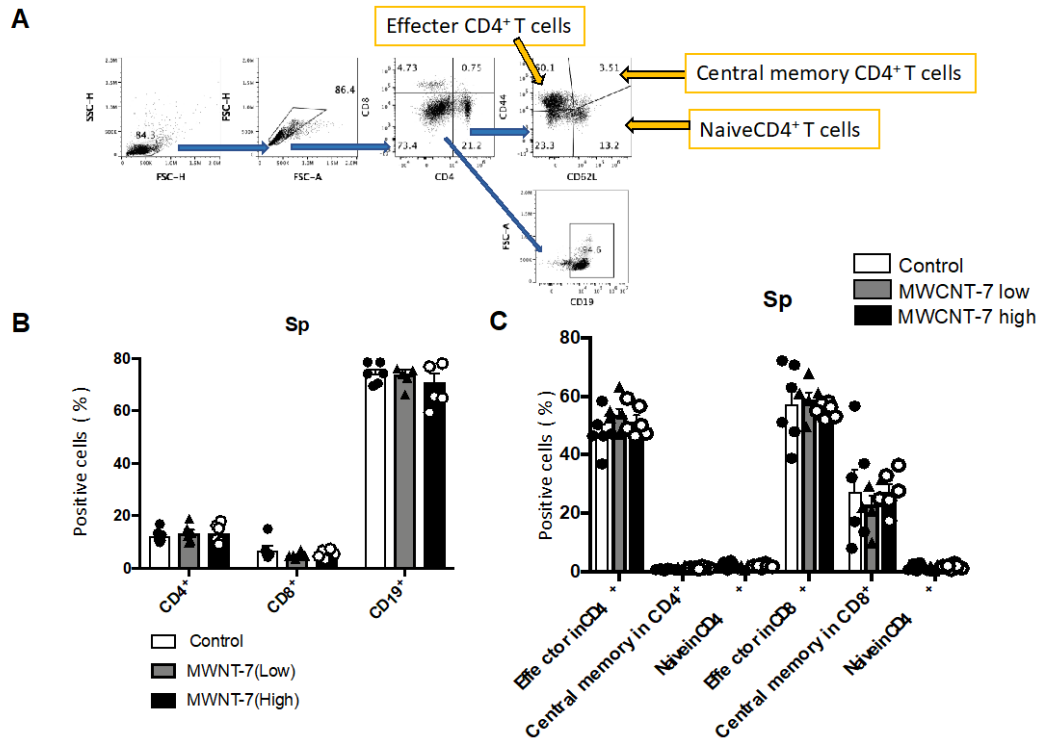


図 6 MWCNT-7長期吸入暴露による脾臓 (Spleen: Sp) におけるT及びB細胞分画への影響
 A : 脾細胞を用いた各種T細胞分画のフローサイトメータ解析によるGating strategy
 B : SpにおけるCD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞、CD19⁺B細胞分画 結果 (%) = 平均値 ± SD (n = 6 / group)
 C : SpでのCD4⁺またはCD8⁺T細胞における各分画 (Naive, Effector, Central memory)
 結果 (%) = 平均値 ± SD (n = 6 / group)

図 7

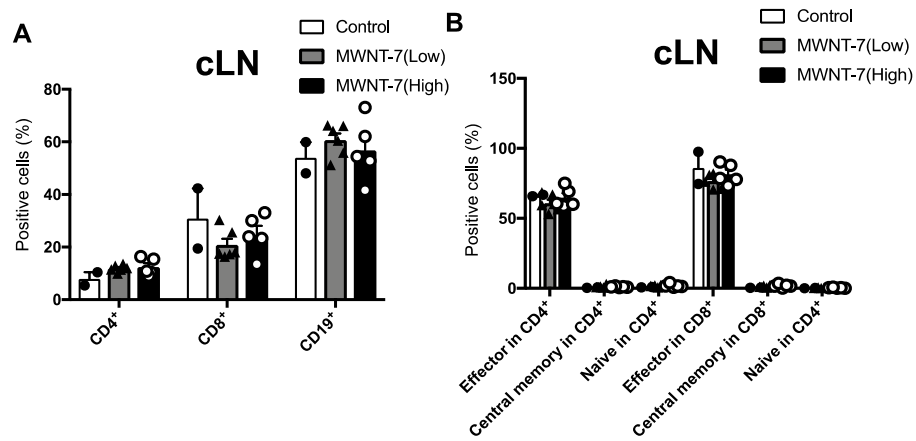


図 6 MWCNT-7長期吸入暴露による頸部リンパ節（cervical lymph node: cLN）におけるT及びB細胞分画への影響

A : cLNにおけるCD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞、CD19⁺B細胞分画 結果 (%) = 平均値 ± SD (n= 6 /group)

C : cLNでのCD4⁺またはCD8⁺T細胞における各分画 (Naïve, Effector, Central memory)

結果 (%) = 平均値 ± SD (n= 6 /group)

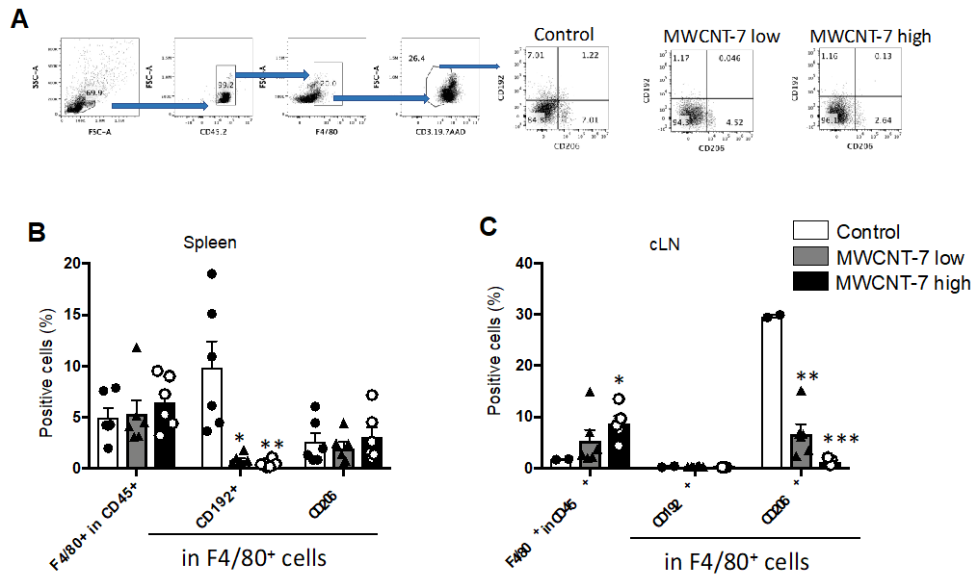


図8 MWCNT-7長期吸入暴露による脾臓ならびに頸部リンパ節におけるマクロファージ分化
 A：脾細胞及び頸部リンパ節細胞を用いたマクロファージ分画のフローサイトメータ解析
 B：SpにおけるF4/80⁺マクロファージにおけるCD192⁺(M1)及びCD206⁺(M2)分画
 C：cLNにおけるF4/80⁺マクロファージにおけるCD192⁺(M1)及びCD206⁺(M2)分画
 結果 (%) = 平均値 ± SD (n = 2 ~ 6 / group)、*p < 0.01, **p < 0.005, ***p < 0.001

図 9

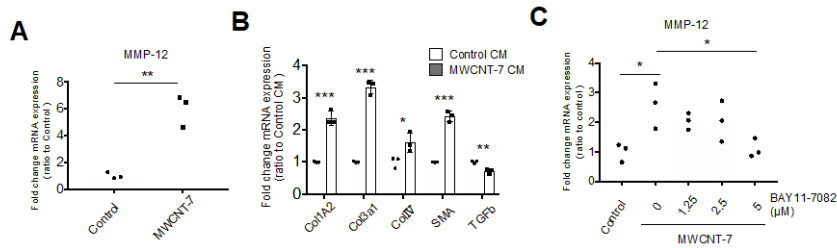


図 9 RAW264.7細胞へのMWCNT-7曝露によるMMP-12ならびにNF-κBの関与
 RAW264.7細胞にT-CNT(125 ng/ml)を添加し、24時間後に細胞を回収した。
 A：MMP-12 mRNA発現を定量RT-PCR法にて評価した。結果(対照処理細胞に対する相対値)=平均値±SD (triplicate), ***p < 0.005
 B：MWCNT-7処理したRAW264.7細胞培養上清(CM)を用いたNIH3T3細胞の線維化関連遺伝子mRNA発現の変化。結果(対照処理細胞に対する相対値)=平均値±SD (triplicate), *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.005
 C：RAW264.7細胞におけるMWCNT-7曝露によるMMP-12mRNA発現へのNF-κB阻害剤(BAY11-7082; 0~5 μM)の影響。結果(対照処理細胞に対する相対値)=平均値±SD (triplicate), *p < 0.05

図 10

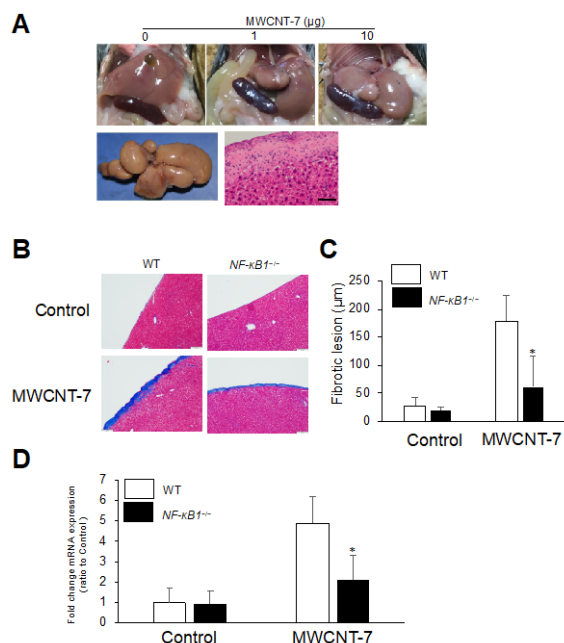


図 10 MWCNT-7の腹腔曝露（8ヶ月）による線維化におけるMMP-12ならびにNF-κBの関与
A：C57BL/6J雄（8週齢）にTaquinan処理したMWCNT-7を腹腔内投与（0, 1, 10 µg/マウス）10ヶ月後に解析した。上段は10 µg投与マウスの腹腔臓器の肉眼写真。下段は肝臓の肉眼写真ならびにHE染色像（スケールバー：100µm）を示す。

B：WTおよびNF-κB 1KO雄マウス（8週齢）にTaquinan処理したMWCNT-7を腹腔内投与（0, 10 µg/マウス）10ヶ月後に解析した。肝組織を用いたAZAN染色像を示す（スケールバー：200µm）。

C：AZAN染色した肝組織を用いて線維化領域を定量解析を行なった。結果 (µm²)=平均値±SD (n=4/group)。*p < 0.05

D：PECにおけるMMP-12 mRNA発現を定量RT-PCR法にて解析した。結果 (対照群に対する相対値)=平均値±SD (n=4/group), *p < 0.05

令和2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 の複数回の吸入曝露による respiratory syncytial virus (RSV) 感染マウスモデルでの影響評価に続いて、吸入曝露後の RSV 感染回復期における評価を実施した。前回同様にウイルス感染前 7、5 および 3 日に MWNT-7 を Taqaan 法により吸入曝露し、その後 RSV をマウスに経鼻感染させて評価した。感染 21 日後においては、全マウスで肺洗浄液中の肺炎マーカー CCL5 (RANTES) は検出されず、TGF- β は高用量曝露-感染群で上昇した。肺の病理組織像において、RSV 感染のみでは肺炎はほぼ終息していたのに対して、MWNT-7 曝露マウスではカーボン貪食マクロファージの集束や肺胞壁・膠原繊維の肥厚など明確な肺炎増悪化が認められ、特に高用量曝露で顕著であった。曝露群の気道上皮では、杯細胞等の粘性多糖の過分泌 (PAS 染色陽性) などが認められ、RSV 感染で亢進していることも見出した。この様に MWNT-7 吸入曝露により RSV 肺炎は回復期でも継続亢進しており、最盛期 (感染 5 日後) で見出した肺炎マーカーの上昇をよく反映した結果が得られた。また、喘息ほど顕著ではないが杯細胞等の増生など気道リモデリング様病変の亢進が見出されたことから、気道上皮の機能に関わる因子の探索研究も今後実施される必要があると考える。

A. 研究目的

ナノマテリアル曝露による最も懸念されている体内蓄積に伴う慢性影響については、研究がなされておらず、また定量的なリスク評価のために必要な慢性吸入曝露は多層カーボンナノチューブ(MWNT-7)による報告のみである。そのため、2年間の慢性吸入試験と同レベルの評価が可能な代替慢性試験法の開発は急務である。

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Taqaan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ウイルス感染への評価を実施した。そして、感染5日後での肺炎マーカーCCL5 (RANTES)の上昇や肺病理組織学的な検討から肺炎増悪化を見出した。

今年度は、MWNT-7の感染影響の持続性を検討するため、RSV感染回復期である感染21日後での影響評価を実施した。

B. 方法

MWNT-7 吸入曝露実験

国立衛研において Taqaan 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 1 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 21 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。-80°C での凍結保管後、国立衛研毒性部へ冷凍輸送した。

BALF 中のサイトカイン・ケモカインの定量

CCL5 (RANTES) の定量は R&D Systems 社製の Quantikine ELISA キットを用いた。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 およびマッソントリ

クロム染色下で実施した。さらに、薄層標本を常法に従いPAS染色して観察した。

(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) 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、何れのマウスでも検出限界以下であり、感染急性期で誘導される指標であることが判明した。一方、Pro-fibrogenic factorであるTGF- β は、0(対照) および3 mg/m³ (低用量) 曝露では感染の有無に関係なく前回の実験(感染5日後)と同程度のレベルで検出されたが、6 mg/m³ (高用量) 曝露では感染マウスで1.5~2倍程度上昇していた。

(2) 肺の病理組織学評価結果

HE染色およびマッソントリクロム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感染のみ(0 mg/m³ 曝露)では、部分的にリンパ球の浸潤は認められたが、ほぼ間質性の肺炎は終息していた。MWNT-7の低用量曝露では、感染の有無に関わらずカーボン貪食マクロファージの集束と肉芽腫様の細胞

が観察され、感染回復期においてもMWNT-7は肺組織に残存していることが判明した。高用量曝露では、カーボン貪食マクロファージマクロファージの集束が多いだけでなく、感染群において細胞壁の肥厚や動脈周囲へのリンパ球浸潤が残っており、また膠原繊維も多くみられるなど間質性肺炎の進行像が散見された。また、II型肺胞上皮細胞の部分的な増生も認められたので、PAS染色による評価を引き続き実施した。

PAS染色により感染の有無に関わらず、対照群では陽性細胞は確認されなかった。高用量曝露-RSV感染群では、細気管支での陽性細胞の数や細胞層が厚く見られ、部分的ではあるが気管支で粘性多糖を過分泌した杯細胞が認められた。また、PAS陽性細胞の存在部位とカーボン貪食マクロファージの集束は必ずしも関連があるようには見られなかった。

D. 考察

前回、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 複数回の吸入曝露-RSV 感染実験を実施し、感染5日後の最盛期において病態としての肺炎の増悪化は明確ではなかったが、CCL5 や TGF- β が影響評価の指標となる可能性があることが示された。そこで今年度は、MWNT-7 吸入曝露の RSV 感染からの回復期への影響を評価するため、前回試験と同条件によ

る感染 21 日後での検討を実施した。

これまでの研究実績から、マウスモデルにおいて RSV は感染 4・5 日後に増殖のピークを迎え、10 日ごろにはウイルスが消失して 2-3 週間後には肺炎が終息することが分かっていた。本試験でも RSV 感染対照群では肺炎はほぼ終息していることが病理組織像から確認された。BALF 中の肺炎マーカー CCL5 は全マウスにおいて検出限界以下であったが、TGF- β は最盛期と変わらないレベルで検出され、高用量曝露-感染群では対照より高値を示し、MWNT-7 吸入曝露の影響が回復期でも進行しつつある可能性が示された。そして、最盛期より II 型肺胞上皮細胞が増生しているような組織像が見られたことより、PAS 染色による解析を感染 5 日後の薄層標本とともに実施した。

感染回復期においては、集束マクロファージ以外の免疫担当細胞はあまり残存していないと予測していた。しかし、カーボン貪食マクロファージの周囲にリンパ球浸潤も多く残っており、本来免疫の回復に伴ってスカベンジンされるはずのリンパ球が、その機能の低下したマクロファージ近傍に残ったと考えられる。一方、PAS 陽性で示される粘性多糖分泌細胞は感染 5 日後よりむしろ感染 21 日後に多く見出された。これは MWNT-7 の影響がウイルス感染の動態とは異なって進行していることを強く示唆するものであった。また膠原繊維の

出現も TGF- β の増加と共に MWNT-7 の影響が進行していることを反映していた。

今回、高用量曝露-感染の一部マウスでは粘性多糖の過分泌が見られており、致死性の影響であった可能性も残されている。さらに部分的に杯細胞の増生があり、好酸球の浸潤がないため喘息とは機序は異なるが、気道リモデリングが生じている可能性も示された。今後、上皮細胞の損傷や修復に関わる因子の探索やマクロファージの機能との関連についてさらなる検討が必要と考えられる。

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 感染マウスへの感染回復期 (21 日後) での影響評価において、RSV 感染対照群では肺炎は終息していたのに対して、MWNT-7 曝露群では明確な肺炎像を確認した。
2. MWNT-7 曝露群では、カーボン貪食マクロファージの集束は感染の有無に関わらず認められたが、感染群では近傍のリンパ球の浸潤も顕著であった。
3. MWNT-7 曝露群では、粘性多糖を産生する PAS 陽性細胞が感染 5 日後より多く見られ、特に感染群ではその傾向が強かった。
4. MWNT-7 の吸入曝露による回復期の肺胞壁の肥厚等の間質性肺炎の残存は、これまで最盛期 (感染 5 日後) で見

出したCCL5などのマーカー上昇をよく反映するものであった。

10.1016/j.dib.2019.105011

2. 学会発表
なし.

F.健康危険情報

なし

G. 研究発表

1.論文発表

Tange, Y., Yoshitake, S., Watanabe, W. Data on producing an infusion fluid that contains nitric oxide. D. In Brief. (2020) 20, 105011-105014. DOI:

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2年度 厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

研究課題名：ナノマテリアル曝露による慢性影響の効率的評価手法開発に関する研究
分担研究課題名：ナノマテリアルの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。さらにこの応答がスタチンにより抑制されること、その効果には各種酸化チタンや MWCNT 類の物性により差異があることを見いだしている。今年度は、このような差異に関わる候補として、細胞のスカベンジャー受容体に着目し検討を行った。スカベンジャー受容体 MSR1 について siRNA によるノックダウンを行い各種 MWCNT 曝露による IL-1 β 産生への影響を調べたところ、特定のサイズの MWCNT による産生を軽度抑制する結果を得た。

A. 研究目的

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事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ナノマテリアルが、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明らかにしている。さらに、この応答をスタチンが抑制することを見だし、平成 30 年度および令和元年度の本研究において、スタチンの効果には、各種ナノマテリアルの物性により差異があることを明らかにしている。

今年度はこのような差異に関連する候補として、ナノマテリアルの細胞への取込過程においての関与が予想されるスカベンジャー受容体に着目し、その役割を解析した。

B. 研究方法

1. 実験材料および試薬

本研究では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）

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 μM 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、さらにスカベンジャー受容体 MSR1 に対する特異的 siRNA (Stealth™ Select RNAi; MSR1) あるいは Stealth RNAi negative control を lipofectamine RNAi MAX 試薬(Invitrogen) を用いて細胞に導入し、24 時間培養した。引き続き各種 MWCNT を無血清培地に添加し 4 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 アッセイキット (ミリポア社) を用いてサイトカイン濃度の測定を行った。

4. RNA 抽出および定量的リアルタイム RT-PCR

MSR1 ノックダウンは mRNA を定量して評価した。細胞から RNA を RNeasy Mini Kit を用いて抽出し DNase 処理を行った。ヒト MSR1、MARCO、および SR-B1 遺伝子に特異的な primer・FAM/ZEN/IBFQ 標識 probe、ならびに QuantiTect Probe RT-PCR Kit (Qiagen) を用い ABI Prism 7300 において定量的リアルタイム RT-PCR により測定した。発現量データは 18S rRNA の量で補正した。

C. 研究結果

1. 各種 MWCNT による IL-1 β 産生への MSR1 ノックダウンの影響

THP-1 マクロファージを MSR1 に対する特異的 siRNA で 24 時間処理すると、MSR1 mRNA の発現量は negative control siRNA で処理した場合に比較し 94%低下した。この処理により、同じく A 型に属するスカベンジャー受容体 MARCO の mRNA 発現量は 43%低下したが、B 型のスカベンジャー受容体 SR-B1 の mRNA 発現はほとんど影響されなかった。

長さや径の異なる四種類の MWCNT を THP-1 マクロファージに 8 μ g/mL の濃度で暴露し、培地への IL-1 β 放出に対する MSR1 siRNA 処理の影響を調べた。長さ: 0.5-2 μ m、径: 40-70 nm と最小の MWCNT-A、0.5-10 μ m とより長いものを含む MWCNT-B 刺激による IL-1 β 産生はほとんど影響されなかった。一方、平均長 4.51 μ m で

ある MWCNT-C 刺激による IL-1 β 放出は約 30%、最長の 10-100 μ m を有する MWCNT-D による IL-1 β 産生は約 30%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知られている。昨年度までの研究において、大きさの異なる各種 MWCNT は、強力な NLRP3 インフラマソーム活性化を介する IL-1 β 産生をもたらすこと、さらにスタチンはその応答を抑制するが、その効果は MWCNT の大きさに依存することを報告している。MWCNT-A は長さが 0.5-2 μ m であり、刺激による IL-1 β 産生はスタチンにより 30%抑制された。針状酸化チタン F (平均長 1.6 μ m) の場合も 30%抑制されるのに対し、より長いものが含まれる MWCNT-B、C、D による産生はスタチンにより 75-84%抑制された。

そこで今年度は MWCNT を認識する細胞膜受容体に着目した。A 型のスカベンジャー受容体 MSR1 について siRNA によるノックダウンを行いその役割を解析した。MSR1 ノックダウン (94%) により、平均長 4.51 μ m を超える MWCNT-C および-D 刺激による IL-1 β 産生は 30%程度抑制されたのに対し、より短い MWCNT-A および B 刺激の場合はほとんど影響されない結果を得た。

MSR1 siRNA 処理による MSR1 発現低下 (94%) は同じく A 型のスカベンジャー受容体 MARCO 発現低下 (40%) も伴っていた。MARCO はアスベストや MWCNT の細胞への接着や肺胞マクロファージへのシリカ取込への関与が報告されているが、私達はこれまで、MWCNT-C による IL-1 β 産生は MARCO ノックダウン (97%) に影響されない結果を得ている。したがって、MWCNT-C 刺激下の IL-1 β 産生の MSR1 siRNA による抑制において MARCO 低下の影響は無いと推定される。

MSR1 発現はスタチンにより約 40%低下することを確認している。しかし MSR1 の 94%ノックダウンによる MWCNT-C 刺激での IL-1 β 産生の低下

は 30%であり、スタチン作用において MSR1 発現低下の寄与は約 12%程度と推定される。スタチンは MWCNT-C および D 刺激による IL-1 β 産生を 70-85%程度抑制する効果を発揮する。したがってこのようなスタチン抑制効果においては、MSR1 発現低下ではなく他のメカニズムの寄与が大きいことが推定される。

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 産生において、スキャベンジャー受容体 MSR1 の役割を解析し、MWCNT の長さにより寄与が異なることを見いだした。

F. 研究発表

1. 論文発表

Cui H, Soga K, Tamehiro N, Adachi R, Hachisuka A, Hirose A, Kondo K, Nishimaki-Mogami T., Statins repress needle-like carbon nanotube- or cholesterol crystal-stimulated IL-1 β production by inhibiting the uptake of crystals by macrophages, *Biochem Pharmacol.*, in press.

2. 学会発表

最上(西巻)知子, 崔 紅艷, 曾我慶介, 為広紀正, 安達玲子, 蜂須賀暁子, 広瀬明彦, 近藤一成: 多層カーボンナノチューブによる IL-1 β 産生を抑制する化合物の同定. 第 47 回日本毒性学会学術年会, (2020.6.29), ポスター

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

研究分担者: 広瀬 明彦 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価 部長

研究要旨

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、工業用ナノ材料作業部会(WPMN)等の国際会合に参加して、ナノ材料に関する最新の国際動向を調査した。

OECDのWPMNにおいては、今後の検討対象に先端材料(Advanced materials)を加えることが決定しているが、現場では「advanced materials」の定義に関する情報が不足しており、今後、共有が必要である。また、先端材料の有害性、使用実態、曝露に関する情報のデータギャップがナノ材料よりも大きい等の問題点が指摘されていることから、今後、さらなる議論が必要であり、情報収集を継続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、工業用ナノ材料作業部会(WPMN)等の国際会合に参加して、ナノ材料に関する最新の国際動向を調査した。

開催)に参加し、国際動向に関する情報収集を行った。一つは、令和2年9月2日~4日にかけてオンラインで開催された第20回工業用ナノ材料作業部会(WPMN20)、もう一つはおよび令和2年9月15日にオンラインで開催された第2回先端材料に関するオンライン会合(Advanced Materials2)である。これらの会合に参加し、主として新規の先端材に関するリスク評価や、粒子サイズ分布の計測ガイドラインに関する情報収集を行った。

B. 研究方法

主として以下の2つの会合(オンライン

- ・ WPMN 20 (2-4 September 2020)

- 2nd Online Conference on Advanced Materials: Identification of action needs on chemical safety (15 September 2020)

C. 研究結果

i) WPMN20 における議論内容

WPMN20 における主な議論内容の一覧を下記に示す。

- Agreed the WPMN' s Mandate for 2021-2024
- Agreed the completion of the following documents:
 - Biopersistent/Biodurable manufactured nanomaterials
 - Recommendations for a Guidance Document on the determination of concentration of nanoparticles in biological samples
 - Safe(r) Innovation Approach for more sustainable MNs and nano-enabled products
- Agreed to approve the declassification of three documents related to AOP' s for nanomaterials via written procedure.
 - Advancing Adverse Outcome Pathway (AOP) Development for Nanomaterial Risk Assessment and Categorization - Final Report
 - Case Study Demonstration of Nanomaterial Key Event Investigation and Literature Review
- 2019 Workshop Report
- Approved 1 new project related to the testing of manufactured nanomaterials
 - Scoping review for a tiered approach for reliable bioaccumulation assessment of MNs in environmental organisms minimising use of higher tier vertebrate tests
- Noted progress and will continue working on the following projects:
 - Assessing the global readiness of regulatory and non-regulatory models for assessing occupational exposure to manufactured nanomaterials
 - Compilation of Available Tools and Models Used for Assessing Consumer Exposure to Manufactured Nanomaterials
 - Compilation of Available Tools and Models Used for Assessing Environmental Exposure to Manufactured Nanomaterials
 - Regulatory Risk Assessment Information Registry for MNs; Towards Enhanced Collaboration
 - Recommendations for guidance on adaptations needed when using OECD TG201, 202, 203 for the determination of the Ecotoxicity of MNs
 - Recommendations to integrated in vitro Approach for Intestinal

- Fate of Orally Ingested Nanomaterials
- Identified general issues and a path forward for:
 - Updating the Guidance Notes on Sample Preparation and Dosimetry
 - Finalising the revision of the document “Important Issues on Risk Assessment of Manufactured Nanomaterials”
 - Develop recommendations to further the discussion on the Safe(r) Innovation Approach
 - Develop recommendations for a strategic approach to Advanced Materials
 - Established two Ad Hoc Groups
 - To support the completion of the important issues on RA document
 - To support the discussion on Advanced Materials

WPMNN の SG (Steering Group)

WPMN には、以下の 4 つの Steering Group(SG)が存在しており、各グループで活動を行なっている。表 1 に WPMNN の SG について整理した。

表 1. WPMNN の SG (Steering Group)

略称	名称	主な内容
SGTA	Steering Group of Testing and Assessment	<ul style="list-style-type: none"> • テストガイドライン (TG) • ガイダンス文書 (GD)

SGAP	Steering Group of Risk Assessment and Regulatory Programmes	<ul style="list-style-type: none"> • リスク評価 • 規制分析
SG8	Steering Group of Exposure Measurement and Exposure Mitigation	<ul style="list-style-type: none"> • 暴露評価 • 暴露モデル
SG9	Steering Group of Environmentally Sustainable Use of manufactured Nanomaterials	<ul style="list-style-type: none"> • ライフサイクル評価 (LCA)

SG-AP (Risk Assessment) に関する議論

SG8 (Risk Assessment) に関する議論としては、以下の各プロジェクトの進捗報告があった。

- Advancing Adverse Outcome Pathways (Nano-AOP) Development for Nanomaterial Risk Assessment and Categorization (カナダ)
- Important Issues on Risk Assessment of Manufactured Nanomaterials (カナダ)
- Regulatory Risk Assessment Registry for MNs: Toward Enhanced Collaboration (カナダ)

SG8 (Exposure) に関する議論

SG8 (Exposure) に関する議論としては、以下の各暴露評価モデルの紹介および進捗報告があった。

- Compilation of available tools and models used for assessing environmental exposure to MNs and Evaluation of their Applicability in Exposure Assessment (カナダ)
- Compilation of available tools and models used for assessing consumer exposure to MNs and Evaluation of their Applicability in Regulatory Risk Assessments (カナダ)
- Assessing the global readiness of regulatory and nonregulatory models for assessing occupational exposure to MNs (デンマーク・米国)

現在、各国において、各ツールの実用性に関する報告書案を作成している。

SG9 (LCA) に関する議論

SG9 (LCA) に関する議論としては、「Moving Towards a Safe(r) Innovation Approach (SIA) for More Sustainable Nanomaterials and Nano-enabled Products」プロジェクトの紹介があった。これは、Safer Innovation Approach アドホックグループが作成したものであり、下記に関する議論が行われた。

- Safe(r) Innovation Approach, Safe(r)-by-design, Regulatory preparedness, Trusted Environment の概念
- Safe(r)-by-design のためのリスク評価ツール、フレームワーク
- Safe(r)-by-design の行政アプローチと考察

報告書(案)はWPMNからのコメントを基に修正後、公開に向けた手続きに進むこととなった。

Advanced materials に関する議論

WPMN では、今後の WPMN での検討に”Advanced materials”を加えることが決定しており、2021年6月開催予定のWPMN21で議論するため、WPMN21での議論に向けたAd hoc グループを設置することとなった。また、下記の3回のThematic Conference on Advanced Materialsの開催が決定している(うち2回は開催済)。

- Part 1 2020年6月開催
- Part 2 2020年9月開催
- Part 3 2021年6月開催予定

ii) Advanced Materials2 での議論内容

Advanced Materials2 においては、先端材料の安全性評価に関する議論に先立って、先端材料のグループ分けに関する議論が行われた。先端材料のグループ分けとして、以下のカテゴリーが提案された。

- Advanced Polymers
- Biopolymers
- Porus Materials
- Particle Systems
- Advanced Fibres
- Composites
- Metamaterials

また、議論を進めていく上で、「advanced materials」の定義に関する情報共有が必要

であることや、有害性、使用実態、暴露に関する情報がナノ材料よりも不足していることが挙げられた¹⁾。

「advanced materials」という用語は非常に幅広い範囲を指しており、現状では正確に定義されていない。

会議においては、Advanced materialsの例として、先端ポリマー (Advanced polymer) や、3D プリント製品 (3-D printing) 等の例が挙げられた²⁾。また、炭素繊維 (Carbon Fiber) に関する LCA 評価の取り組みが紹介された³⁾。

D. 考察・結論

OECD の WPMN においては、今後の検討対象に先端材料 (Advanced materials) を加えることが決定しているが、現場では

「advanced materials」の定義に関する情報が不足しており、今後、共有が必要である。また、先端材料の有害性、使用実態、暴露に関する情報がナノ材料よりも不足している等の問題点が指摘されていることから、今後、さらなる議論が必要であり、情報収集を継続する必要があると考えられる。

E. 参考文献等

1) Antonia Reihlen: Introduction and recap from the first online conference, Advanced Materials - Second Online Conference (2021).

2) Doris Volker, Kathrin Schwim: Advanced materials - Challenges for chemical safety: Perspective of UBA, Advanced Materials - Second Online Conference (2021).

3) Manuela Wexer: Potentials and Risk in the Recycling and Recovery of Carbon Fibers, Advanced Materials - Second Online Conference (2021).

F. 研究発表

なし

G. 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)

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

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

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Wang Q., Zhao Z., Alexander DB, Zhao D., Jiegou Xu, Tsuda H.	Pleural translocation and lesions by pulmonary exposed multi-walled carbon nanotubes	<i>J. Toxic. Pathol.</i>	33(3)	145-151	2020
Saleh D., Alexander TW., Numano T., Ahmed M.H.O., Gunasekaran S., Alexander DB., Abdelgied M., El-gazzar AM., Takase H., Jiegou Xu., Naiki-ito A., Takashi S., Hirose A., Ohnishi M., Kanno J., Tsuda H.	Comparative carcinogenicity study of a thick, straight-type and a thin, tangled-type multi-walled by carbon nanotube administered by intra-tracheal instillation in the rat.	<i>Particle and Fibre Toxicology</i>	17	48	2020
Cui H, Soga K, Tamehiro N, Adachi R, Hachisuka A, Hirose A, Kondo K, Nishimaki-Mogami T.	Statins repress needle-like carbon nanotube- or cholesterol crystal-stimulated IL-1 β production by inhibiting the uptake of crystals by macrophages.	<i>Biochem Pharmacol</i>	188	Article: 114580	2021

令和3年 3 月 29 日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 合田 幸広 印

次の職員の令和2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3年 3 月 29 日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 合田 幸広 印

次の職員の令和2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 動物管理室 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。

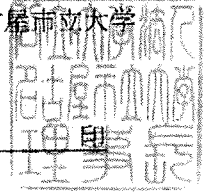
令和 3 年 月 日

厚生労働大臣 殿

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) 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。

令和3年 3 月 29 日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 合田 幸広 印

次の職員の令和2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 室長

(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。

令和3年 3 月 29 日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 合田 幸広 印

次の職員の令和2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・客員研究員

(氏名・フリガナ) 菅野 純・カンノ ジュン

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (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3年4月12日

厚生労働大臣 殿

機関名 九州保健福祉大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 兒玉 修



次の職員の令和2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) 生命医科学部 ・ 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。

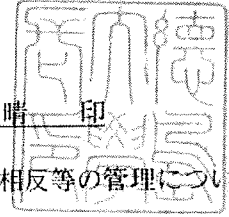
令和3年3月9日

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 澄晴 印



次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 ナノマテリアル曝露による慢性影響の効率的評価手法開発に関する研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) 大学院医歯薬学研究部・教授
(氏名・フリガナ) 石丸 直澄・イシマル ナオズミ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (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3年 3 月 29 日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 合田 幸広 印

次の職員の令和2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。

令和3年 3 月 29 日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 合田 幸広 印

次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 ナノマテリアル曝露による慢性影響の効率的評価手法開発に関する研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) 生活衛生化学部第三室 室長
(氏名・フリガナ) 小林 憲弘 (コバヤシ ノリヒロ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input 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) ・該当する口にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。



令和3年 4月 1日

厚生労働大臣 殿

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 和久 印

次の職員の令和2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。