

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

ナノマテリアル吸入曝露影響評価のための効率的慢性試験法の開発に関する研究

(21KD2004)

令和 3 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 広瀬 明彦

令和 4 年(2022 年)3月

令和 3 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
ナノマテリアル吸入曝露影響評価のための効率的慢性試験法の開発に関する研究 広瀬 明彦	2
II. 研究分担報告書	13
1. ナノマテリアル吸入曝露システムの効率化に関する研究 高橋 祐次	14
2. ナノマテリアルの慢性吸入曝露手法の改良に関する研究 横田 理	24
3. 間歇吸入曝露による慢性影響評価に関する病理学的研究 菅野 純	37
4. 慢性影響を考慮した効率的気管内投与法の確立に関する研究 北條 幹、広瀬 明彦	50
5. ナノマテリアルの短期気管内投与評価手法に関する研究 津田 洋幸	58
6. 曝露したナノマテリアルの体内分布に対するリンパ系の役割に関する研究 渡部 徹郎	61
7. ナノマテリアル慢性曝露における免疫応答に関する研究 石丸 直澄	67
8. 曝露評価手法に関する調査研究 小林 憲弘、広瀬 明彦	83
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	88

令和 3 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

ナノマテリアル吸入曝露影響評価のための効率的慢性試験法の開発に関する研究

研究代表者： 広瀬 明彦 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部長

研究要旨

本研究では、2年間の慢性吸入曝露による公表データが利用出来るカーボンナノチューブを中心として、今年度は、先行研究において開発してきた通常の二年間連続吸入曝露試験結果と比較可能な慢性間歇型曝露手法をさらに効率化するための曝露装置の改良と曝露回数を少なくした気管内投与プロトコルの開発を目的とする。さらに、定量的なリスク評価に備えて吸入曝露後の体内分布の把握とそのメカニズム解析を行うと共に、ナノマテリアルの曝露評価手法の最新情報を入手することも目的とする。慢性影響評価法の改良と吸入曝露装置の効率化研究においては、今年度は短期間に高濃度曝露して慢性影響観察を行うプロトコルの開発、Taquann 法自動化装置の開発検討と短期曝露に応じた分散手法の検討を行った。体内分布と慢性影響発現部位の解析に関して、リンパ系経路の解析を可能とするトランスジェニックマウス (Prox-1 マウス) の導入、肺のリンパ管内皮間葉移行 (EndMT) に関する検討を行うと共に、先行研究で行われた2年間の MWNT-7 の間歇曝露研究結果の病理及び免疫ネットワークの詳細な解析、TIPS 法による二層ナノチューブ (DWCNT) 発がん実験の解析を行った。また、OECD 作業グループ活動から曝露評価モデル等の情報収集を行った。本研究からは従来から使用してきた MWNT-7 同様の製造方法で作成した NT-7 を使用することとしたが、Taquann 法による繊維長や、繊維長分布、吸入曝露時の MMAD は従来のものとの同性を確認した。マウスへの NT-7 の単回吸入曝露でも肺泡マクロファージの M2 マクロファージへの分化が認められた。一方、ナノマテリアルの吸入曝露システムの効率化に関する吸入曝露装置の改修については、ボトルネックとなっている検体調製工程の自動化を検討し、シーブの大型化ではろ過効率の低下を招いたが、シーブの洗浄方法において逆洗することにより自動化の目処が立った。ろ液の凍結方法について噴霧凍結法が大量のろ液を瞬時に凍結可能であったが凍結検体の回収に課題が残り今後の改良の必要性が示された。短期間の間歇気管内投与実験では、全 13 回の投与が完了し、肺の MWCNT 蓄積率は予想よりも高くなったが、既報の情報から、用量依存的に肺腫瘍および胸膜中皮腫の誘発が期待できるレベルと考えられた。リンパ管を可視化できるリンパ管レポーターマウス : Prox1-GFP に対するナノマテリアル吸入曝露の結果、肺組織の線維化や肺泡上皮細胞の内皮間葉移行 (EMT) の誘導因子である TGF- β の受容体の発現が上昇していた。これに関連して肺泡上皮細胞の TGF- β の作用を検討したところ、EMT の分子機構の解明が可能となることを示すことができた。先行研究で行われた NMNT-7 の 2年間の間歇吸入曝露試験データの解析では、群間に死亡率の差は認められなかった。肺負荷量と肺重量、及び、体重の関係からは高用量曝露群の吸入量は、発癌性に関する用量相関性の保証されない高負荷量である可能性が考えられたが、肺組織について免疫染色を用いた詳細な解析を行った結果、前駆病変に当たる組織変化などの検討を進める必要性が示された。また、長期曝露後の BALF 細胞の解析では、肺泡マクロファージの割合が増加するとともに、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。一方、先行研究から行っている長さの異なる DWCNT (1.5、7.0 および 15 μm) について発がん性において線維の長さによる差異はないことが示された。海外動向調査で

は、OECD の工業用ナノ材料作業部会 (WPMN) 及び OECD が主催するナノマテリアルの曝露評価手法に関するウェビナーに参加し、OECD が開発あるいは評価したナノマテリアルの曝露評価ツール・モデルに関する情報を得た。ただし、現状ではモデルの使用にあたって幾つか課題も見られ、今後も開発・評価が継続される見通しであることから、引き続き情報収集を行う必要があると考えられた。

以上、現時点までの成果としては、間歇曝露型の吸入曝露装置の改良が進んでおり、慢性実験に向けた準備が整った。気管内投与では、短期間の間歇曝露による慢性観察試験を開始した。2 年間の間歇曝露による影響と、通常の連続曝露慢性実験の結果についての分子マーカーによる比較や Prox-1 マウスの活用によるナノマテリアルの体内分布の解析を行える環境と、短期曝露に対応する分散性の確認ができたところである。曝露評価に関しては、曝露評価ツール・モデルに関する OECD の最新動向を入手できた。

研究分担者

高橋 祐次 国立医薬品食品衛生研究所
毒性部 動物管理室長
津田 洋幸 名古屋市立大学 津田特任教授
研究室 特任教授
横田 理 国立医薬品食品衛生研究所
毒性部 主任研究官
菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所
毒性部 客員研究員
渡部 徹郎 東京医科歯科大学大学院
医歯学総合研究科・教授
石丸 直澄 徳島大学大学院医歯薬学研究
部 (歯学域)・教授
小林 憲弘 国立医薬品食品衛生研究所
生活衛生化学部 第三室長
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

ナノマテリアルの曝露により懸念された健康・環境へのリスク評価の必要性の国際的な高まりを受けて、従前の化学物質のリスク評価手法を拡張する方向で研究開発が進められてきており、2019 年にはナノマテリアルが欧州の REACH 登録制度の本格的な対象となったことを受け、その評価に必要な OECD 試験法ガイドラインの開発や改良が欧州を中心に急ピッチで進められている。さらに、近年ではナノマテリアルを含めた先端的材料やそれらを複合

的に組み合わせた新規物質をアドバンスドマテリアルと呼び、より広い分野の新材料マテリアルの安全性評価に焦点が移りつつある。毒性学的観点からは、評価対象がアドバンスドマテリアルに拡大することになっても、生体内への吸収性や蓄積性、表面活性の増強による重要な生体影響が慢性影響であることには変わりはない。しかも、国際的な SDG (持続可能な開発目標) に向けた合意の中、2019 年発表された欧州グリーンデール政策では化学物質のライフサイクル全体のヒトや環境への影響に対処する戦略が始まっている。そのため新材料マテリアルはより広範且つ長期に渡り使用され続けることが求められ、慢性影響評価はこれまで以上に重要な評価手法として位置づけられる。我々は、先行する研究において、費用と時間のかかる二年間連続吸入曝露試験をより省力化した試験法として改良することにより、効率的にナノマテリアルの慢性影響評価を行う試験系を開発することに取り組んでいる。その手始めとして先行研究において二年間連続吸入曝露試験の結果を概ね間歇曝露法で代替可能であることを確認してきた。しかし、曝露には依然 2 年間の期間を必要とすることに加え、曝露設備の占有率も高いという問題が残っていた。そこで、本研究ではさらにその効率を高める試験法の開発に加え、長期間の体内蓄積

性による影響をより詳細に解析して、慢性影響の予測性を評価できる指標の検討を行い、将来的な短期間試験の開発に試み基盤的研究を進めることを目的としている

具体的には、曝露手法をより効率化するために、間歇型曝露手法の利点を更に活かして、同じ設備を使って曝露日程をずらすことにより複数の慢性試験を同じ2年間に効率的に曝露できる手法を開発することを目的とする。また、先行研究ではカーボンナノチューブ曝露で誘発される肺がんと中皮腫について、それぞれ異なったリスク評価を行う必要のあることも明らかとなった。その為、本研究ではそれぞれのエンドポイントの誘発性評価に対して吸入曝露後の体内分布と毒性発現メカニズムが及ぼす影響を明らかにすることも目的とする。さらに、本研究で得られた指標をリスク管理基準等に適用するためには、管理の対象となる曝露シナリオを設定して基準値等を検討する必要があると考えられる。そこで、将来的なリスク評価や管理に備えて、ナノマテリアルの曝露評価手法の最新情報を入手することも目的とする。

B. 研究方法

本研究班は、慢性吸入曝露による実験データが利用出来るカーボンナノチューブを中心として、Taquann 法の曝露手法のさらなる効率化のための自動化等を含めた曝露装置の改良と曝露プロトコルの改良を検討する。装置の改良のめどが立った段階で2年間の慢性吸入試験を行う。体内分布と毒性発現メカニズムの解析に関してリンパ系経路の解析を可能とするトランスジェニックマウスの適用法を検討した後、吸入後のナノチューブの体内移行の解析を行う。曝露評価モデル等の情報に関しては OECD 作業グループの活動を中心に情報収

集を行う。

慢性影響評価法の改良と吸入曝露装置の効率化:

これまで、多層カーボンナノチューブ (MWCNT) は三井物産から提供された MWNT-7 を使用して研究を進めてきたが、保有する検体をほぼ使い切った状況であるが、三井物産では MWNT-7 の生産はすでに終了していることから、MWNT-7 と同様の製造法で生産された NT-7 をナノテクノロジービジネス推進協議会より入手し、今後の実験における MWCNT のベンチマーク物質として使用することとした。まず、NT-7 の物理化学的性状を評価し、高度分散法 (Taquann 法) 処理による影響を評価した。次に、Taquann 処理で得られた NT-7 (T-NT7#53) のエアロゾル濃度設定試験として、吸入曝露装置での質量濃度、エアロゾル粒子数 (CPC)、空気力学的質量中央値 (MMAD)、繊維長 (SEM) を測定した。(横田)。次に、C57/BL/6 雄性マウスとダブルトランスジェニックマウス (Prox1-GFP/Cdh5-BAC-CreERT2-ROSA-lox-stop-lox-tdTomato-SMA-GFP) に対して、T-NT7#53 の単回吸入曝露試験 (6時間/日) を実施し、曝露直後、1, 7, 14, 28 日経過後に解剖し肺組織や肺胞洗浄液 (BALF) のサンプリングを行った (横田)。尚、国立衛研に設置された Taquann 全身曝露吸入装置 (ver.3.0) は、今後の長期曝露実験に備え改修作業を本研究班で検討している。高分散性乾燥検体を得る工程では、検体を Tert-ブチルアルコール (TBA) に分散、濾過、瞬間凍結、凍結乾燥と煩雑な作業と人手を要する。複数のナノマテリアルを同時並行して効率の良い吸入ばく露実験方法の開発の律速段階となっているため、この工程の自動化するための研究を進めている。この検体調製の工程を改善するため、①ろ過に用いるシーブの大型化、②シーブの洗浄方法の検討、③ろ液の瞬間凍結方法の検討を行

別添 3

なった。(高橋)。

気管内投与法の開発として、ラットの気管内投与による2年間の発癌試験を実施した。Taquann 処理 (53 μ m メッシュ) された NT-7 (T-NT7#53) を、0.1% Tween80 含有生理食塩水を加えて超音波浴槽で分散させた。0.01 mg/mL の分散液の二次粒子径を DLS で測定した。また、予備試験として、F344 雄ラットに1週間に1度、1 mL/kg 体重の投与量で、マイクロスプレイヤー (PennCentury) を用いて4回投与した。低用量群 (L 群)、中用量群 (M 群)、高用量 (H 群) および超高用量群 (EH 群) の4群を設定し、0.0175、0.07、0.28 および 0.42 mg/kg 体重となるように投与し、肺の MWCNT 含有量を大西法により測定した。発癌試験は、TIPS に類似する初期集中型の反復投与とし、1週間に1度、13回投与後に2年間観察飼育する方法とした。F344 雄ラットを、対照群 (C 群)、L 群、M 群、H 群 および EH 群の5群に分け、予備実験と同様の投与用量で、1週間に1度、合計13回の投与を行い、投与完了後にサテライト動物の肺負荷量を測定した (北條、広瀬)。

体内分布と慢性影響発現部位の解析:

まず、先行研究において 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年間の間歇吸入曝露実験の結果を解析した (菅野)。また、気管内内噴霧法 (TIPS 法) により投与後104週まで観察した3種の異なる長さの2層カーボンナノチューブ (DWCNT) 線維 (1.5、7.0 および 15 μ m・各群 21×10^{12} の同一動物の本数) による肺と胸膜中皮における障害および発がんについて解析を行った (津田)。

体内分布の解析に関して、リンパ管内皮細胞を遺伝学的に蛍光タンパク質で標識したトラ

ンスジェニックマウス (リンパ管レポーターマウス: Prox1-GFP) に対して粒子状物質を、1日6時間で単回吸入曝露させて、体内分布と慢性影響発現部位の解析を行い、粒子状物質の吸入による組織炎症の惹起や、肺胞上皮細胞の上皮間葉移行 (EMT) や肺におけるリンパ管の内皮間葉移行 (EndMT) の誘導を検討し、そのメカニズムを明らかにする (菅野、渡部)。また、血管内皮細胞を遺伝学的に蛍光タンパク質で標識したトランスジェニックマウス (血管レポーターマウス: Cdh5-BAC-CreERT2-ROSA-lox-stop-lox-td Tomato-SMA-GFP) マウスから樹立した内皮間葉移行 (EndoMT) レポーター細胞を用いて、肺胞上皮細胞の上皮間葉移行 (EMT) の誘導因子である TGF- β の作用を検討した (渡部)。

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年間の吸入曝露後に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。さらに、NWNT-7 (NT-7) の全身吸入曝露実験を実施し、曝露後0、1、7、14 および28日での肺組織、BALF 細胞などを用いて、免疫学的な解析を行った。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 曝露による線維化の機転に関して、TGF- β 、NF- κ B シグナルを中心として解析を進めるとともに、in vivo での MMP-12 を介した線維化の機転を解析した (石丸)。

曝露評価手法の情報収集:

OECD の工業用ナノ材料作業部会 (WPMN) 及び OECD が主催するナノマテリアルの曝露評価手法に関するウェビナーに参加し (2021年12月2日)、既存あるいは新たに開発されたツールやモデルに関する情報収集を行った。

また、OECDから公開された報告書を調査し、内容を整理した(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

慢性影響評価法の改良と吸入曝露装置の効率化:

NT-7 原末の外観は MWNT-7 に比較して嵩が低く、また平均繊維長は $4.4 \pm 3.4 \mu\text{m}$ であり、MWNT-7 (平均繊維長約 $7 \mu\text{m}$) に比較して短かった。Taquann 法処理した NT-7 (T-NT7#53) の繊維長は $4.7 \pm 3.4 \mu\text{m}$ であり、平均繊維長には Taquann 処理による影響はみられなかった。Taquann 全身曝露吸入装置 ver 3.0 を用いた T-NT7#53 のエアロゾル濃度設定試験における質量濃度は、低濃度では 1.5 mg/m^3 、高濃度では 3.1 mg/m^3 、MMAD は 2 回のデータを取得しており、 $0.90 \mu\text{m}$ ($\sigma_g 5.82$) と $1.11 \mu\text{m}$ ($\sigma_g 5.64$) の結果が得られた。エアロゾル化した T-NT7#53 の繊維長は $5.6 \pm 3.5 \mu\text{m}$ であった。次に、T-NT7#53 低濃度群の全身曝露吸入実験を実施した。Sub-group A と B で実施した 2 回の平均質量濃度は 2.8 mg/m^3 、高濃度群では 5.0 mg/m^3 となった。MMAD は低濃度群において $0.96 \mu\text{m}$ ($\sigma_g: 7.4$) と $1.08 \mu\text{m}$ ($\sigma_g: 6.8$)、高濃度群において $1.4 \mu\text{m}$ ($\sigma_g: 5.0$) と $1.3 \mu\text{m}$ ($\sigma_g: 5.1$) の値を示した。

一方、BALF 細胞の観察を行った結果、曝露後 1 日経過した時点では L 群、H 群ともに好中球が観察された。また、L 群、H 群とも曝露から時間が経過するにつれて、NT7 を貪食

した肺胞マクロファージの数は減少傾向にあることを明らかにした。

Taquann 全身曝露吸入装置の改修では、①シーブの改良(大型化)の検討では、ろ過効率は 28% という結果が得られたが、手動による方法では約 80% であるため、ろ過効率は低下した。②シーブの洗浄方法の検討は、2-プロパノールによる逆洗によるシーブの洗浄は手動方法に比較して効率良く洗浄が可能であったが、縁部分には若干の残渣が残留した。③ろ液の瞬間凍結方法の検討では、ナノマテリアル検体を含む濾液は、瞬間凍結する必要があり、そのため凍結工程及びその検体を掻き取って凍結乾燥工程とする装置の設計を行った。凍結板への噴霧法では、噴霧された TBA は速やかに固化したが、10 回以上の操作では、固化した TBA の掻き取りが十分にできなくなり、板に TBA が次第に厚く堆積することとなった。噴霧凍結法では、ステンレス製の容器内部一面には固化した TBA が付着した状態となり、スクレイパーを用いた TBA の回収作業において、温度差による結露が発生し、理想的な状態の TBA が得られなかった。

気管内投与実験については、まず、Taquann 処理保土ヶ谷製サンプル (T-NT-7#53) の DLS による二次粒子径を確認したところ、ピーク値は 571.4 nm であり、三井製のサンプルよりやや低い値だった。4 回の反復投与の結果、肺内 MWCNT の蓄積率は L 群でおおよそ 40%、他の群では 60 から 80% であった。また、発癌試験の 13 回の投与が完了した。最終投与翌日の L 群、M 群、H 群および EH 群の肺負荷量は、それぞれ 30、191、980 および $1369 \mu\text{g/Lung}$ であった。総投与量と比べると蓄積率は、L 群が 47%、M 群が 75% であり、H 群と EH 群で 90% を超えていた。

体内分布と慢性影響発現部位の解析:

別添 3

2年間の間歇吸入曝露による低濃度群(L群); $2.7 \pm 0.1 \text{ mg/m}^3$ と高濃度群(H群); $5.2 \pm 0.2 \text{ mg/m}^3$ の群間に死亡率の差は認められなかった。肉眼的に肺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。2年目の肺負荷量は、L群; $61.1 \pm 2.2 \text{ } \mu\text{g/lung}$ 、H群; $91.6 \pm 21.5 \text{ } \mu\text{g/lung}$ であった。肉眼的にL群に2例に結節性病変を確認し、組織学的に腺癌であった。免疫染色においてTTF-1陽性、CC10陰性であり、II型肺胞上皮由来の腺癌である事が示された。2年間のTIPS法投与後2年間観察実験では、肺においては腺腫と腺がんの発生頻度は1.5、7、 $15 \mu\text{m}$ 群の合計数で有意であった(9/32、 $p < 0.05$)。これに肺胞上皮過形成を加えた数でも高度に有意(23/32、 $p < 0.0001$)であった。またMWCNT-7群では悪性中皮腫が高頻度(11/13、 $p < 0.0001$)に発生した。すなわち、前がんと腫瘍病変の発生において1.5、7.0および $15 \mu\text{m}$ 間の有意差はなく、また $1.5 \mu\text{m}$ の短いDWCNTでも発がんする可能性のあることが示された。

体内動態に関する研究において、EMTに関わるマーカー分子を文献的に検索し、過去にMWNT-7の気管内投与後の肺遺伝子発現をGeneChipにより網羅的に測定した結果と対比し、この条件下で変動が確認された。その変動の意義について解析を継続中である。また、リンパ管を可視化できるリンパ管レポーターマウス:Prox1-GFPに対してナノマテリアル吸入曝露実験を施行し、肺組織において線維化ならびに、肺胞上皮細胞のEMTの誘導因子であるTGF- β の受容体の発現が上昇していることを見出した。さらに、TGF- β の内皮細胞に対する作用をEndoMTレポーター細胞を用いて検討した結果、TGF- β 存在下で培養した細胞から、間葉系細胞マーカーである α

SMAを発現する細胞(EndoMTが誘導された細胞)が出現することを見出した。また、EndoMTが誘導された細胞においては、内皮細胞マーカーであるVEGFR2の発現が維持されている細胞(部分的EndoMTが誘導されている細胞)とVEGFR2発現が消失している細胞(完全にEndoMTが誘導されている細胞)が存在することを明らかにし、それぞれの細胞画分をFACSソーティングした。

免疫系への影響として、2年間のMWNT-7の吸入曝露によってBALF細胞数は増加した。また、BALF細胞のサイズは有意に低下した。また、高濃度のMWNT-7曝露によってBALF細胞内の肺胞マクロファージの割合は有意に増加した。MMP-12 mRNA発現はMWNT-7の曝露によってBALF細胞ならびに肺組織において濃度依存的に有意に上昇した。さらに、低濃度のMWNT-7曝露によってBALF細胞におけるCD54 mRNA発現の上昇が認められた。また、MWNT-7曝露によってBALF細胞におけるCox2 mRNA発現は有意に上昇した。一方で、MWNT-7曝露によって脾臓でのM1マクロファージ分画が低下し、頸部リンパ節ではM2マクロファージ分画が低下した。また、Taquann処理されたNT-7の短期吸入曝露によって、減少した肺胞マクロファージは曝露後4週で回復することが判明し、MMP-12あるいはCD54を介した肺胞マクロファージの活性化が短期試験においても確認された。一方で、RAW264.7細胞を用いた*in vitro*の実験において、Taquann処理MWCNT-7の添加によって直接MMP-12 mRNA発現が上昇することが明らかになった。加えて、NF- κ Bを介したMMP-12の関与がNF- κ B遺伝子ノックアウトマウスを用いて、明らかになった。

曝露評価手法の情報収集:

OECDが主催したナノマテリアルの曝露評

価手法に関するウェビナーでは、毎年、上市されるナノ関連製品が年々増加している状況から、人や環境への曝露は避けられず、新規ナノマテリアルの健康及び安全への懸念が高まっていることを受けて、OECD では新しい曝露評価ツール及びモデルの開発を行っていることが紹介されていた。ナノマテリアルの職業、消費者および環境曝露の評価に利用可能と考えられるツールおよびモデルを網羅的に情報収集し、54 のツールおよびモデルの詳細評価を行った結果、10 の職業曝露、7 の消費者曝露、6 の環境曝露評価ツール・モデルがナノマテリアルの曝露評価に適したものと判断された。

D. 考察

検体の Taquann 処理と Taquann 全身曝露吸入装置 (ver.3.0) の組み合わせによる吸入曝露は、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。今回、NT-7 を MWNT-7 に替わるベンチマーク物質として使用するにあたり、NT-7 原末の特性を明らかにするとともに、Taquann 処理による影響についても調べた。その結果、NT-7 の繊維長は MWNT-7 よりも短い。また、Taquann 処理による繊維長分布への影響は認められなかった。今後は、エアロゾル化した線維の Aggregate/Agglomerate の割合の比較、MMAD 測定などの情報からエアロゾルの特性を明らかにする。次に、先行研究で実施した MWCNT の間歇吸入曝露をより効率的に実施することを目的とし、肺への負荷量を考慮した間歇吸入曝露プロトコルを提案し、慢性影響評価を進める。今年度はまず、単回吸入曝露試験を実施し、肺への負荷量の経時変化に関する基礎データを取得し、また、肺組織の免疫応答や病理組織学的解析との結果とを合わせ

て、間歇曝露のプロトコルの立案を行う。肺負荷量の分析に先立ち、回収した BALF 細胞から肺胞マクロファージへの取り込みについて観察した結果、吸入曝露から時間が経過するにつれて、NT-7 を貪食した肺胞マクロファージの数は減少傾向を示したため、今後実施予定の肺負荷量についても、曝露から時間経過するにつれて減少すると予想される。単回吸入曝露試験における質量濃度測定の結果から、目標濃度を概ね達成し、エアロゾル効率も 40-42%とエアロゾル濃度設定試験(動物なし)におけるそれよりも低値を示したが、これは動物被毛への NT-7 の吸着によるロスが考えられた。この結果は、先行研究における MWNT-7 と同様の結果であり、Taquann 吸入曝露装置の精度の高さを示した。MMAD に関しても先行試験 (Particle Fibre Tox 2016) における MMAD とほぼ同等の結果を示した。

Taquann 全身曝露吸入装置の改修に関して、大型化したシープでは、十分なろ過効率が得られなかった。シープの洗浄方法については、逆洗することにより自動化の目処が立った。ろ液の凍結方法については、滴下掻き取り凍結法と 1 流体噴霧ノズルを用いた噴霧凍結方法を試みた。滴下掻き取り凍結は大量の検体処理は困難であり、噴霧凍結法は、大量のろ液を瞬時に凍結可能であるが、作業環境中に微細な凍結検体が漏れ出すこと、凍結検体を回収する際に空気中の水分を吸収し溶け出すことが課題となった。今後、これらの点を改良した方法により、Taquann 法の工程の自動化処理を進める必要がある。

ラットの気管内投与については、13 回投与後の H 群と EH 群における肺負荷量の蓄積率は、予備試験に比べると、かなり高くなった。仮に H 群で胸膜中皮腫の発生率が高すぎると、本研究の目的を果たせない恐れがあるが、H

別添 3

群は、Suzuiらの試験と同程度の肺負荷量であったため、彼らの結果と同様に、肺腫瘍と胸膜中皮腫の発生率が有意に増加することが期待される。一方、L 群ではクリアランスが良好であったことから、肺腫瘍が認められないレベル (NOAEL) が得られると思われる。現在は、経過観察中であり、最終年度に全動物の剖検を行う。

慢性吸入曝露による影響の解析では、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。肺負荷量と肺重量、及び、体重の関係からは H 群の吸入量は、肺毒性を超えて一般毒性が強く誘導される量に達しており、発癌性に関しては用量相関性が保証されない曝露濃度であったと考察するのが妥当であると考えられたが、肺組織について免疫染色を用いた詳細な解析を行った結果、用量相関性について、前駆病変に当たる組織変化などの検討を進める必要性が明らかとなり、今後、いくつかの遺伝子情報を含めた解析の必要性が示された。また、Prox1-GFP に対するナノマテリアル吸入曝露の結果、肺組織の線維化、肺胞上皮細胞の EMT 誘導因子の高進が示された。肺胞上皮細胞の TGF- β の作用を検討した結果から、ナノマテリアル曝露により肺組織において惹起される EndoMT は血管・リンパ管の透過性を上昇させることでナノマテリアルの体内取り込みの亢進の原因となることが予想される。今回同定した「部分的 EndoMT が誘導されている細胞」において発現している EndoMT 誘導因子を明らかにすることで、ナノマテリアル曝露による健康リスクの低減に寄与することが期待される。

一方、TIPS 法による慢性影響研究では、長さの異なる DWCNT (1.5、7.0 および 15 μ m) について同じ本数を肺内噴霧投与して 104 週の

発がん実験を行ったが、この長さにおいては発がん頻度に差異はなく、線維長と発がんとの相関はなかった。また 1.5 μ の短い DWCNT でも発がんする可能性が示された。

2 年間の MWNT-7 の吸入曝露による BALF 細胞やサイトカインの発現量の解析において、長期曝露 (24 ヶ月) 後の BALF 細胞中の肺胞マクロファージの割合が増加するとともに、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。また、NT-7 吸入曝露によって、肺胞マクロファージは M2 マクロファージへの分化が認められた。NT-7 吸入曝露によって、CD54 陽性肺胞マクロファージが増加した。加えて、肺組織における MMP-12 mRNA 発現が増加した。NT-7 吸入曝露によって、脾臓、頸部リンパ節での免疫担当細胞の分画へは大きな影響はなかったが、M2 型マクロファージの肺への動員の可能性が考えられた。

OECD において、ナノマテリアルの曝露評価ツール・モデルの評価が行われ、幾つかのモデルが曝露評価に適したものであると判断された。ただし、これらのツールやモデルの使用にあたっては、製品中のナノマテリアルの含有量、排出量、曝露中の粒径分布等のナノマテリアルのキャラクタリゼーションに関するデータが適切なものである必要があるため、これらのデータの正確性がモデルの予測結果に大きく影響すると考えられた。

E. 結論

研究要旨

本研究では、2 年間の慢性吸入曝露による公表データが利用出来るカーボンナノチュ

ープを中心として、今年度は、先行研究において開発してきた通常の二年間連続吸入曝露試験結果と比較可能な慢性間歇型曝露手法をさらに効率化するための曝露装置の改良と曝露回数を少なくした気管内投与プロトコルの開発を目的とする。さらに、定量的なリスク評価に備えて吸入曝露後の体内分布の把握とそのメカニズム解析を行うと共に、ナノマテリアルの曝露評価手法の最新情報を入手することも目的とする。慢性影響評価法の改良と吸入曝露装置の効率化研究においては、今年度は短期間に高濃度曝露して慢性影響観察を行うプロトコルの開発、Taquann 法自動化装置の開発検討と短期曝露に応じた分散手法の検討を行った。体内分布と慢性影響発現部位の解析に関して、リンパ系経路の解析を可能とするトランスジェニックマウス(Prox-1 マウス)の導入、肺のリンパ管内皮間葉移行(EndMT)に関する検討を行うと共に、先行研究で行われた 2 年間の MWNT-7 の間歇曝露研究結果の病理及び免疫ネットワークの詳細な解析、TIPS 法による二層ナノチューブ(DWCNT)発がん実験の解析を行った。また、OECD 作業グループ活動から曝露評価モデル等の情報収集を行った。本研究からは従来から使用してきた MWNT-7 同様の製造方法で作成した NT-7 を使用することとしたが、Taquann 法による繊維長さや、繊維長分布、吸入曝露時の MMAD は従来のもとの同性を確認した。マウスへの NT-7 の単回吸入曝露でも肺胞マクロファージの M2 マクロファージへの分化が認められた。一方、ナノマテリアルの吸入曝露システムの効率化に関する吸入曝露装置の改修については、ボトルネックとなっている検体調製工程の自動化を検討し、シーブの大型化ではろ過効率の低下を招いたが、シーブの洗浄方法において逆洗することにより自動化の目処が立った。ろ液の凍結方法について噴霧凍結法が大量のろ液を瞬時に凍結可能であったが凍結検体の

回収に課題が残り今後の改良の必要性が示された。短期間の間歇気管内投与実験では、全 13 回の投与が完了し、肺の MWCNT 蓄積率は予想よりも高くなったが、既報の情報から、用量依存的に肺腫瘍および胸膜中皮腫の誘発が期待できるレベルと考えられた。リンパ管を可視化できるリンパ管レポーターマウス：Prox1-GFP に対するナノマテリアル吸入曝露の結果、肺組織の線維化や肺胞上皮細胞の内皮間葉移行(EMT)の誘導因子である TGF- β の受容体の発現が上昇していた。これに関連して肺胞上皮細胞の TGF- β の作用を検討したところ、EMT の分子機構の解明が可能となることを示すことができた。先行研究で行われた NMNT-7 の 2 年間の間歇吸入曝露試験データの解析では、群間に死亡率の差は認められなかった。肺負荷量と肺重量、及び、体重の関係からは高用量暴露群の吸入量は、発癌性に関する用量相関性の保証されない高負荷量である可能性が考えられたが、肺組織について免疫染色を用いた詳細な解析を行った結果、前駆病変に当たる組織変化などの検討を進める必要性が示された。また、長期曝露後の BALF 細胞の解析では、肺胞マクロファージの割合が増加するとともに、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。一方、先行研究から行っている長さの異なる DWCNT(1.5、7.0 および 15 μ m)について発がん性において線維の長さによる差異はないことが示された。海外動向調査では、OECD の工業用ナノ材料作業部会(WPMN)及び OECD が主催するナノマテリアルの曝露評価手法に関するウェビナーに参加し、OECD が開発あるいは評価したナノマテリアルの曝露評価ツール・モデルに関する情報を得た。ただし、現状ではモデルの使用にあたって幾つか課題も見られ、今後も開発・評価が継続される見通しであることから、引き続き情報収集を行う必

要があると考えられた。

以上、現時点までの成果としては、間歇曝露型の吸入曝露装置の改良が進んでおり、慢性実験に向けた準備が整った。気管内投与では、短期間の間歇曝露による慢性観察試験を開始した。2年間の間歇曝露による影響と、通常の連続曝露慢性実験の結果についての分子マーカーによる比較や Prox-1 マウスの活用によるナノマテリアル曝露の体内分布の解析を行える環境と、短期曝露に対応する分散性の確認ができたところである。曝露評価に関しては、曝露評価ツール・モデルに関する OECD の最新動向を入手できた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Maeno A, Sakamoto Y, Hojo M, Tada Y, Suzuki J, Inomata A, Moriyasu T, Hirose A, Kemuriyama N, Miyajima K, Nakae D. A case of spontaneous Zymbal's gland carcinoma with lung metastasis in an aged Fischer 344 rat. *J Toxicol Pathol.* 2021 Oct;34(4):353-358. doi: 10.1293/tox.2021-0013. Epub 2021 Jul 23.
- 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 Jun;112(6):2185-2198. doi: 10.1111/cas.14873. Epub 2021 May 2.
- Wang Qiqi, Wang Qiong, Zhao Z., Fan J., Qin L., Alexander DB., Tsuda H., Zhao D and Xu J. Surfactant Proteins A/D-CD14 on Alveolar Macrophages Is a Common Pathway Associated With Phagocytosis of Nanomaterials and Cytokine Production. *Frontiers in Immunology*, 12: 1-13 (2021) doi: 10.3389/fimmu.2021.758941

2. 学会発表

- 横田理、河上強志、久保田領志、三浦伸彦、北嶋聡. In vivo 毒性試験のための二酸化チタン分散方法の検討. メタルバイオサイエンス研究会 2021. 神奈川. 2021.10.28. ポスター
- 前野愛、北條幹、坂本義光、湯澤勝廣、長谷川悠子、長澤明道、生嶋清美、平松恭子、海

銚藤文、山本行男、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. 多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の 2 年間ラット気管内反復投与試験における投与器具の違いによる毒性の比較:1 年経過時点での報告. 第 48 回日本毒性学会学術年会. 兵庫. 2021.6. ポスター

北條 幹、ラット反復気管内投与による多層カーボンナノチューブの発がん性評価手法の検討. 日本薬学会第 142 年会、オンライン (2022.3.26)

Taquahashi Y, Yokota S, Morita K, Tsuji M, Suga K, Kuwagata M, Hojyo M, Hirose A, Kanno J. Preliminary report of the two-year, every 4-week-interval intermittent whole body inhalation study of the multi-walled carbon nanotube in male mice, the 61st Annual Meeting of the Society of Toxicology, Virtual, March 27-31, 2022

Horibata K, Hojo M, Yokota S, Taquahashi Y, Kobayashi N, Takasawa H, Hamada S, Sugiyama K, Honma M. In Vivo Genotoxicity Assessment Of Multi-Walled Carbon Nanotubes Using The Optimized Lung Micronucleus Assay, The Environmental Mutagenesis and Genomics Society 2021 Annual meeting, Virtual Meeting, September 22-25, 2021

菅野純、北嶋聡、相崎健一、齊藤洋克、種村健太郎: 肺の遺伝子発現応答と毒性機序予測解析. 第 48 回日本毒性学会学術年会、(2021.7.9)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演

石丸直澄、新垣理恵子、常松貴明、高橋祐次、菅野純: ナノマテリアルの吸入曝露による肺免疫応答と線維化の分子機構. 第 48 回日本毒性学会学術年会、(2021.7.9)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演

菅野純、高木篤也、相崎健一、北嶋聡: 異物発癌に関わるトランスクリプトミクス特性. 第 48 回日本毒性学会学術年会、(2021.7.8)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演

相崎健一、小野竜一、菅野純、北嶋聡: トランスクリプトミクスから見た発癌物質の特性. 第 48 回日本毒性学会学術年会、(2021.7.8)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演

Dina Mourad Saleh, Shengyong Luo, David B. Alexander, Ahmed M. EL-Gazzar, Mohammed Abdelgaied, Omnia Hosny Mohammed, William T Alexandre, Sivagami Gunasekaran, Takamasa Numano, Hiroshi Takase, Makoto Ohnishi, Satoru Takahashi, Hiroyuki Tsuda. Comparative toxicity and carcinogenicity pulmonary study of double

walled carbon nanotubes (DWCNT) with multi walled carbon nanotubes-7 (MWCNTS -7) in rat model. 第 48 回日本毒性学会学術年会、神戸 (2021 年7月)

Dina Mourad Saleh, Omnia Hosny Mohamed Ahmed, David B. Alexander, William T. Alexander, Sivagami Gunasekaran, Takamasa Numano, Hiroshi Takase, Makoto Ohnishi, Satoru Takahashi, Masako Yudasaka, Ryota Yuge, Hiroyuki Tsuda Short term pulmonary toxicity study of carbon nano-horns (CNH) and carbon nano-brushes (CNB) using intra tracheal method 日本毒性病理学会、神戸 (2022 年1月)

Arakaki R, Tsunematsu T, Ishimaru N. Pulmonary immune response and molecular mechanism of fibrosis by inhalation exposure to nanomaterials. 第 50 回日本免疫学会学術集会 (2021.12.9 奈良)

Dina Mourad Saleh, Omnia Hosny Mohamed Ahmed, David B. Alexander, William T. Alexander, Hiroshi Takase, Makoto Ohnishi, Susumu Tomono, Jun Kanno, Akihiko Hirose, Satoru Takahashi, Hiroyuki Tsuda Two-Year study for the Assessment of the carcinogenic and toxic effect of double walled carbon nanotubes in the rat lung after intratracheal instillation Society of Toxicology, San Diego (2022 年3月)

小林 美穂, 若林 育海, 藤原 花汐, 鈴木 康弘, 中山 雅敬, 佐藤 靖史, 渡部 徹郎、Vasohibin-1 が誘導する微小管の翻訳後修飾を介した受容体エンドサイトーシス阻害と新規脈管新生抑制機構、第 45 回日本リンパ学会総会 (岡山)、Web 開催、2021.06.03、口演

渡部 徹郎、リンパ管の恒常性維持におけるシグナル・転写ネットワークの役割、第 48 回日本毒性学会学術年会、神戸 (Web 参加)、2021.07.09、口演

Katarzyna A. Inoue, Kazuki Takahashi, Sakakitani Shintaro, Daizo Koinuma, Akinari Sugauchi, Maki Saito, Atsushi Kaida, Yasuhiro Yoshimatsu, Toshihiro Uchihashi, Masahiko Miura, Kohei Miyazono, Tetsuro Watabe. Activation of epithelial-mesenchymal transition program in oral cancer cells under TGF- β -induced cell cycle arrest. TGF- β Superfamily Conference: Signaling in Development and Disease (FASEB) 、(Web 開催)、2021.07.20、ポスター発表

渡部 徹郎、Roles of TGF- β signals in the regulation of proliferation and migration of cancer cells、第 80 回日本癌学会学術総会、横浜、2021.10.02、口演

Tetsuro Watabe. Roles of signaling and transcriptional networks during maintenance of vascular systems. 第 44 回日本分子生物学会 横浜 2021.12.02、口演

G. 知的財産権の取得状況

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)

令和3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3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：ナノマテリアル吸入曝露影響評価のための効率的慢性試験法
の開発に関する研究(21KD2004)

分担研究課題名：ナノマテリアル吸入曝露システムの効率化に関する研究

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： 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。毒性が不明である物質を取り扱う基本的な戦略は、ヒトで想定されるばく露経路に即した動物実験によりハザード同定、メカニズム同定、用量作用関係の情報の取得を行い、これらの情報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。しかしながら、ナノマテリアルに関して最も重要なばく露経路である吸入に関しては、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、高度分散法（Taquann 法）及びそれをエアロゾル化するカートリッジ直噴式ダスト発生装置を独自開発した（Taquann 直噴全身吸入装置）。本装置により、多層カーボンナノチューブの2年間のマウス間欠ばく露吸入実験が実施可能となった。しかしながら、より効率的な吸入ばく露実験を行なうためには、ボトルネックとなる工程の Taquann 法による高分散処理を自動化する必要がある。Taquann 法は、tert-ブチルアルコール（TBA）に懸濁した検体を金属シープでろ過して凝集体・凝固体を除去、液体窒素によってろ液を急速凍結、その後、溶媒回収型真空ポンプにて表面張力による再凝集を防ぎながら乾燥検体を得る手法である。本分担研究では、Taquann 法を効率化ならびに自動化するため、①ろ過に用いるシープの大型化、②シープの洗浄方法の検討、③ろ液の瞬間凍結方法の検討を行なった。その結果、大型化したシープでは、シープの振動とろ液の攪拌が十分ではなく、現行の手法よりろ過効率が低かった。シープの洗浄方法については、逆洗することにより自動化の目処が立った。ろ液の凍結方法については、滴下掻き取り凍結法と1 流体噴霧ノズルを用いた噴霧凍結法を試みた。滴下掻き取り凍結は大量の検体処理は困難であり、噴霧凍結法は、大量のろ液を瞬時に凍結可能あるが、作業環境中に微細な凍結検体が漏れ出すこと、凍結検体を回収する際に空気中の水分を吸収し溶け出すことが課題となった。今後、これらの点を改良した方法により、Taquann 法の工程の自動化処理を進める計画である。

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曝露に関しては、動物実験を遂行する際の技術的障壁が高く、実施例は数少ない。

研究分担者らは、吸入毒性試験を実施する際のナノマテリアル特有の問題点を解決する目的で、今までの諸研究からその物性や毒性の情報が利用可能な MWNT-7 (Mitsui) をモデル物質として、高度分散法 (Taquann 法) 及び、それをエアロゾル化するカートリッジ直噴式ダスト発生装置を独自開発した (Taquann 直噴全身吸入装置)。そして、本装置により、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。

現在は、より効率的な吸入ばく露実験方法の開発を進めているが、その際に最も時間を要するのが Taquann 法による高分散乾燥検体を得る工程である。tert-ブチルアルコール (TBA) に懸濁した検体を金属シーブでろ過して凝集体・凝固体を除去、液体窒素によってろ液を急速凍結、その後、溶

媒回収型真空ポンプにて表面張力による再凝集を防ぎながら乾燥検体を得る手法である。この手法により吸入ばく露に適した高分散性の乾燥検体を得られるが、人手で行なう煩雑な作業であり、工程を自動化する必要がある。最も手間のかかる工程がろ過工程であり、ろ過・ろ液の瞬間凍結、フィルターの洗浄工程に 6 時間程度を要している (図 1)。この工程を改善するため、①ろ過に用いるシーブの大型化、②シーブの洗浄方法の検討、③ろ液の瞬間凍結方法の検討を行なった。

検体は、装置の組み立てろ過条件を決定する際には扱いが容易な米澱粉を使用し、ろ過効率を検討する際には、Taquann 法の開発時に用いた多層カーボンナノチューブのひとつである MWNT-7 (三井) を使用した。

B. 研究方法

B-1. シーブの改良(大型化)

これまで、シーブは直径 750 mm、容器の高さ 50 mm を使用している (セイシン企業、目開き 53 μ 、特注品)。シーブのフレームにはろ過効率を上げるため、円形の振動モータを取り付ける加工を施してある (図 2)。MWNT-7 (三井) を検体として使用した場合、目開き 53 μ m の金属製フィルターでは約 80% の回収率である。

本検討では、大量の検体をろ過するため、シーブサイズを 100 mm に拡大し、加振機 (CLF-25WX01、ミネベアミツミ) を 2 個装着した。シーブの枠はアクリル材で作製し、パッキンは PTFE を使用した。加振機による振動波形は 58Hz のサイン波を使用した。

B-2. 逆洗によるシーブの洗浄方法の検討

検体をろ過したシーブには多くの検体が残

る。TBA を含んだ残渣は、TBA の凝固点 (25.69℃) より温度が高い状態では泥状、温度が低下すると堅くメッシュに固着するため、除去することが難しく、時間を要する工程である。シーブの清浄度はろ過率を上げるために重要であるため、短時間で効率よく洗浄できることが望まれる。

今回は、使用したシーブからある程度残渣を除去したのち、シーブの上下を反転させ、ろ過方向とは逆向きに 2-プロパノールを噴霧して洗浄を行なった。噴霧は圧縮空気を送液タンクに 0.3MPa で供給し、3Hz で駆動させた (図 3)。

B-3. ろ液の凍結方法の検討

ろ液に含まれる検体の凝集をさけるため、これまでは液体窒素をろ液内に投入して瞬間的に凍結させている。液体窒素を用いた自動化は、液体窒素が輸送するラインを通過する際にその殆どが気化してしまうこと、液体窒素を保管場所から実験室に輸送するまで時間を要し、かつ、長期保存が難しいことから、これに替わる方法が望まれる。本件等では、氷冷したステンレス板にろ液を吹き付けて凍結させる方法 (滴下凍結掻き取法) と、1 流体ノズルを用い氷冷下でタンク内に噴霧して凍結する方法 (噴霧凍結) の方法を試みた。

(1) 滴下凍結掻き取法

特注品の掻き取装置を冷凍庫 (MF-300、アズワン) 内に設置し -20℃ の温度条件で検討を行なった。掻き取装置のステンレス製凍結板の有効寸法は 150×100mm (伝熱面積 150cm²)、掻き取板は PTFE 製とした。TBA のみを送液ポンプ (PB1011A-01-N、SMC) 及び滴下ノズル (KKBP 100 S303、いけうち) を用いて滴下 (0.15MP/3Hz で駆動) し、掻き取の様子をファイバースコープ (NTS500、

TESLONG)、掻き取面の温度変化をサーモグラフィ (F50B-STD 、 NPPON AVIONICS) にて観察した。なお、ノズル部は TBA が凍結しないように 40℃ に保温して機能を維持した。

(2) 噴霧凍結

特注品の噴霧装置を作製し冷凍庫 (MF-300、アズワン) 内にノズルと噴霧タンク (ステンレス製 φ270 mm × H440 mm の円柱容器) を設置し -20℃ の温度条件で検討を行なった。TBA のみを送液ポンプ (PB1011A-01-N、SMC) を用いて 0.3MP/5Hz で駆動し、噴霧凍結を行なった。なお、ノズル部は TBA が凍結しないように 40℃ に保温して機能を維持した。温度変化をサーモグラフィ (F50B-STD、NPPON AVIONICS) にて観察した。

C. 研究結果

C-1. シーブの改良 (大型化)

TBA に 200µg/mL 濃度で MWNT-7 を懸濁した液を約 1,000mL ろ過した。懸濁した。その結果、ろ過効率は 28% という結果が得られた。手動による方法では約 80% のろ過効率であるため、現行法に比較してろ過効率は低下した (図 4)。

C-2. 逆洗によるシーブの洗浄方法の検討

2-プロパノールによる逆洗によるシーブの洗浄は手動方法に比較して効率良く洗浄が可能であった。しかしながら、辺縁部分には若干の残渣が残留した。 (図 5)。

C-3. ろ液の凍結方法の検討

(1) 滴下凍結掻き取法

凍結板に噴霧された TBA は速やかに固化した。しかしながら、10 回以上の操作では、固化

した TBA の掻き取りが十分にできなくなり、板に付着した TBA が次第に厚く堆積した。それに伴い、冷却板からの冷却効果が低下し TBA の固化が緩慢となり継続困難となった(図 6)。

(2) 噴霧凍結

送液ポンプから約 500mL の TBA を 120 秒間で噴霧した。ポンプの吐出動作回数は 500 回で処理した。ステンレス製の容器内部一面には固化した TBA が付着した状態となった。スクレイパーを用いて TBA の回収作業を行なったところ、冷凍庫と室内との温度差による結露が発生した。そのため、TBA が水分を含み、凍結乾燥に理想的な状態の TBA が得られなかった。また、TBA を噴霧した際には凍結した微細な TBA がステンレスタンクから漏れ出し庫内に充満した。

D. 考察

検体調整自動化装置に求められる条件は、①TBA が凝固しない温度帯(37°C程度)を維持した環境にてろ過を行えること。②液体窒素を用いないろ液の瞬間凍結方法、③ろ過工程におけるケーキの生成抑制ができること、④フィルターの自動洗浄が可能であること、⑤装置のサイズは一般的な冷蔵庫程度のサイズであること、である。本分担研究では、ナノマテリアルの高分散検体を得る手法である Taquann 法の効率化を目指し、シーブの大型化、洗浄方法の効率化、ろ液の凍結方法の効率化を検討した。

シーブの大型化は、結果的にろ過効率が従来の方法よりも低下したため、十分な性能が得られなかった。この原因は、シーブに加振機からの振動が十分に伝わっていないこと、シーブ上の懸濁液の攪拌が十分ではないことであり、MWNT-7 がシーブ面にすぐに堆積することに

よってろ過が妨げられている。この対応のため、シーブを装着する枠をアクリル製からより振動が伝わりやすい硬質の材料(金属、ガラス等)に変更すること、より高い振動エネルギーを発生させることが可能な超音波振動を用いることを計画している。

逆洗によるシーブの洗浄は手動方法に比較して効率良く洗浄が可能であった。洗浄ノズルから噴射する角度を適切な角度にすることにより辺縁部に残留した残渣も除去が可能と考えられる。

ろ液の凍結方法として、滴下凍結掻き取り及び噴霧凍結法を検討した。滴下凍結掻き取り法は 10 回程度の処理(約 150 mL)の処理が可能であったが、大量の検体処理には不向きな手法と考えられた。噴霧凍結方法は 1 流体ノズルを採用し実験を行なった。1 流体ノズルは、液体を微細化するために空気を必要とする 2 流体ノズルとは異なり、液体のみで微細化が可能である。そのため、閉鎖空間内に噴霧しても圧力上昇が生じない。しかしながら、今回の実験では微細な TBA がステンレスタンク内か漏れ出る様子が観察された。蒸気圧が水よりも低い TBA であるため、気化した TBA が凍結したものである可能性があるが、作業者の安全性の観点から改良が必要と考えられる。また、凍結検体を回収する際に空気中の水分を吸収し溶け出すことが課題となった。水分を含んだ TBA の凍結乾燥では高分散検体を得ることができないため、この手法を選択する際には凍結乾燥用の容器内に噴霧し、その状態を維持したまま乾燥工程に入る必要がある。

E. 結論

ナノマテリアル吸入曝露システムの効率化するため、現在ボトルネックとなっているナノマテリアルの高分散検体を得る方法である

Taquann 法の自動化について検討した。その結果、大型化したシーブでは、十分なろ過効率が得られなかった。シーブの洗浄方法については、逆洗することにより自動化の目処が立った。ろ液の凍結方法については、滴下掻き取り凍結法と 1 流体噴霧ノズルを用いた噴霧凍結方法を試みた。滴下掻き取り凍結は大量の検体処理は困難であり、噴霧凍結法は、大量のろ液を瞬時に凍結可能あるが、作業環境中に微細な凍結検体が漏れ出すこと、凍結検体を回収する際に空気中の水分を吸収し溶け出すことが課題となった。今後、これらの点を改良した方法により、Taquann 法の工程の自動化処理を進める計画である。

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、鶴田祐吾氏、生田達也氏、寺門真吾氏に深く感謝する。

F. 研究発表

1. 論文発表

Taquahashi Y, Tsuruoka S, Morita K, Tsuji M, Suga K, Aisaki K and Kitajima S, A novel high-purity carbon-nanotube yarn electrode used to obtain biopotential measurements in small animals: flexible, wearable, less invasive, and gel-free operation, *Fundam Toxicol, Sci.* 2022, 9(1),17-21
doi.org/10.2131/fts.9.17

Taquahashi Y, Saito H, Kuwagata M, Kitajima S, Development of an inhalation exposure system of a pressurized metered-dose inhaler (pMDI) formulation for small experimental animals, *Fundam Toxicol, Sci.* 2021,8(6),169-175

doi.:10.2131/fts.8.169

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 Jun;112(6):2185-2198. doi: 10.1111/cas.14873. Epub 2021 May 2.

Yamamoto E, Taquahashi Y, Kuwagata M, Saito H, Matsushita K, Toyoda T, Sato F, Kitajima S, Ogawa K, Izutsu KI, Saito Y, Hirabayashi Y, Imura 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. Epub 2021 Jan 21.

2. 学会発表

高橋 祐次:粉体の吸入剤研究開発を推進する非臨床安全性評価手法の開発、ラウンドテーブルセッション、日本薬剤学会第 36 年会、招待講演 (2021.5.14)

山本 栄一、高橋 祐次:吸入剤に係る薬物動態の新規イメージング技術、第 48 回日本毒性学会学術年会、シンポジウム (2021.7.9)

Taquahashi Y, Yamamoto E, Kuwagata M, Saito H and Kitajima S, Development of an inhalation exposure system of a

pressurized metered-dose inhaler formulation for small experimental animal and visualizing the spatial localization of an inhalant in rat lungs by mass spectrometry imaging, The 37th Annual Meeting of KSOT/KEMS, invited (2021.11.2)

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

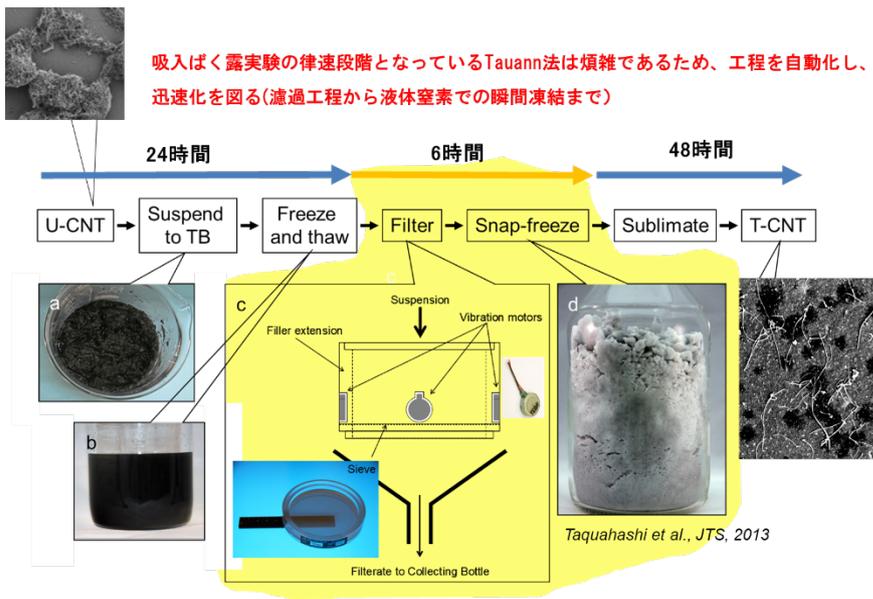


図1 Taquann 法の概要と律速段階

Taquann 法の工程において、律速段階となっているのはろ過工程である(黄色でハイライト)。この工程の前は、凍結融解および超音波処理による分散化、後工程は凍結乾燥であり時間を要するが人手はかからない。

株式会社セイシン企業特注品

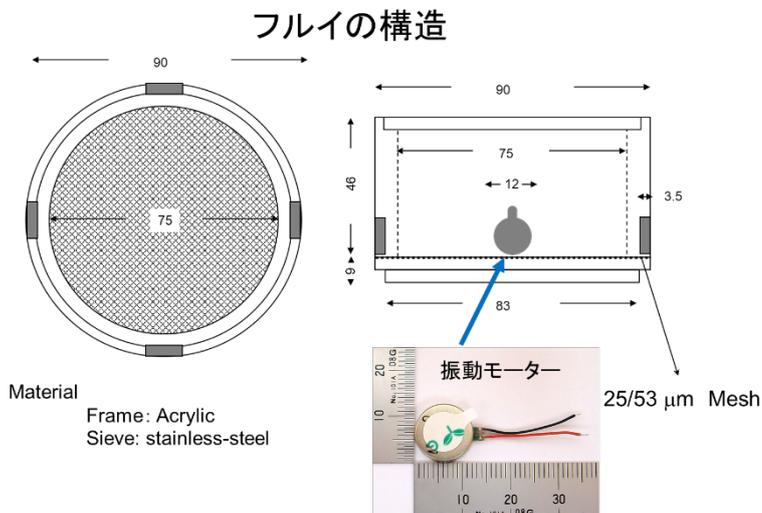


図2 Taquann にて使用するシーブ(フルイ)の構造

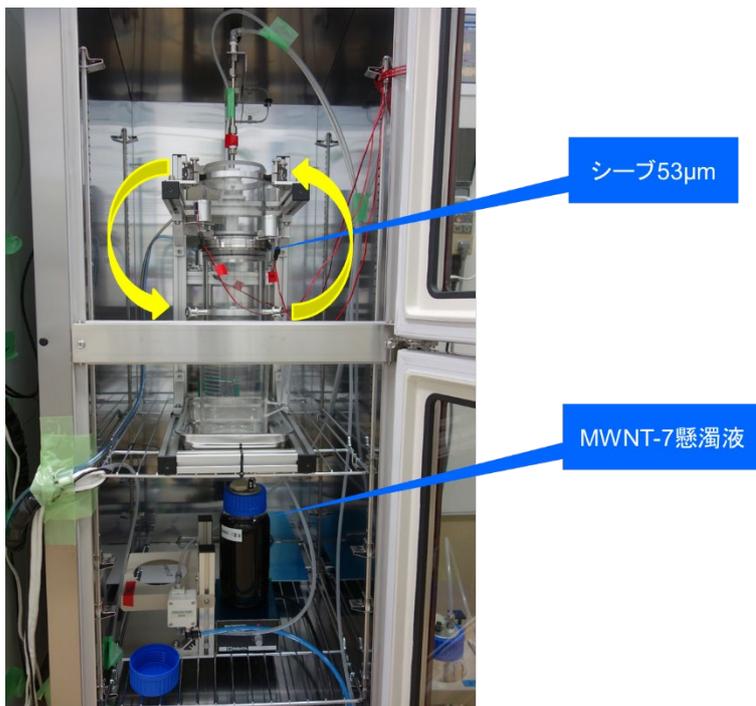


図 3 今年度検討したシープの概要

MWNT-7 のろ過では、加振機を 2 個使用し、直径 100mm のシープを振盪させろ過を行なった。
 入力電圧: 1.2V (Rms)、振動波形: サイン波 58Hz、パッキン: PTFE、シープ目開き: 53 μ m



図 4. MWNT-7 を検体とした場合のろ過効率

多くの検体がシープに残り、ろ過効率は28%であった。従来の方法(約80%)に比較して低値であった。

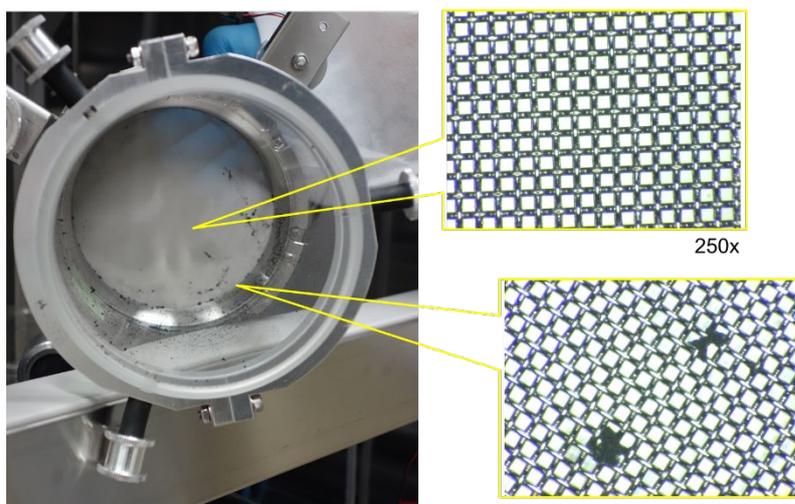


図 5. 洗浄後のシープ

2-プロパノールを用いて逆洗により洗浄を行なった。洗浄液が十分に散布されない辺縁部分には若干の検体が残存していた。

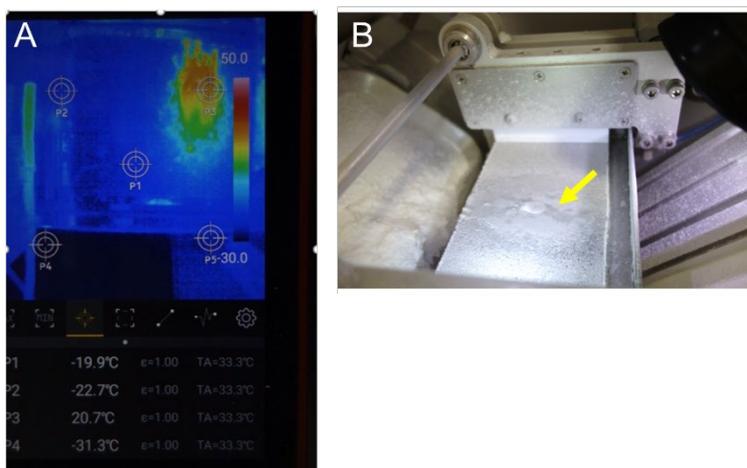


図 6. 滴下凍結掻き取法

40°Cに加温したTBAをポンプで氷冷したステンレス板(-20°Cの冷凍庫内に設置)に噴射した。A:サーモグラフィーによる観察の結果、噴射直後のステンレス板の温度は約20°Cであるが、すぐに-20°C程度まで低下した。B:凍結したTBAは10回程度の掻き取りが可能であるが、やがて冷却板にTBAの結晶が堆積し始め、掻き取りができなくなった(矢印)

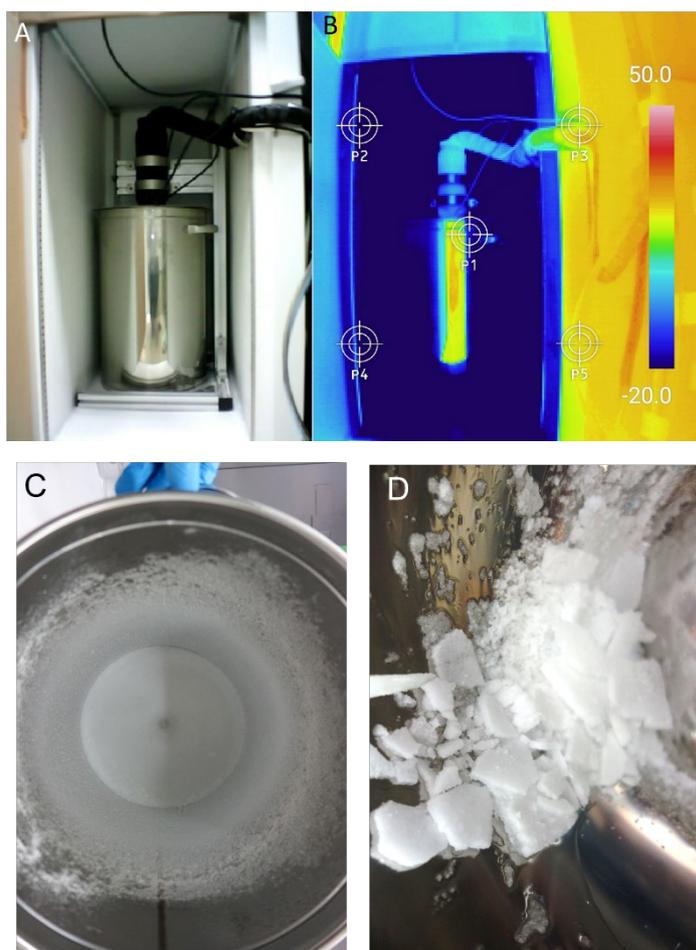


図 7. 噴霧凍結

-20℃の冷凍庫内に設置した1流体噴射ポンプとステンレス容器にTBAを噴射した。A:噴霧凍結装置の外観、B:サーモグラフィによる外観像。ポンプ内でTBAが凝固しないように加温した。C:ステンレス容器の内部にTBAが凍結して付着している様子。D:凍結したTBAはスクレイパーにて容易に掻き取りが可能であるが、結露によって生じた水分をTBA結晶が吸収し溶解する。

令和3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：ナノマテリアル吸入曝露影響評価のための効率的慢性試験法の開発に関する研究
(21KD2004)

分担研究課題名：ナノマテリアルの慢性吸入曝露手法の改良に関する研究

研究分担者： 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 動物管理室長

研究協力者： 菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 客員研究員

研究協力者： 北條 幹 東京都健康安全研究センター 薬事環境科学部 主任研究員

研究要旨

ナノテクノロジーは、環境、エレクトロニクス、エネルギー、ヘルスケア、情報通信等、様々な分野を切り拓く先端技術として、現代社会に大きな技術革新と利益をもたらしてきた。一方で、様々な種類のナノマテリアルに曝露される機会は増加するため、国民の健康被害防止の観点からナノマテリアルの安全性評価の実施が急務とされている。安全性評価を行う上では、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、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が重要である。しかし、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、実施例は数少ないという現状にある。

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多層カーボンナノチューブ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ている（Taquann 直噴全身吸入装置）。本分担研究は、先行で実施した2年にわたる間欠吸入曝露試験の研究成果を踏まえ、慢性影響評価の精度を担保しつつ、より効率的な間欠吸入曝露プロトコルの開発を行い、一度に複数の吸入毒性試験を実施可能な基盤体制を整備するものである。今年度は、単回吸入曝露試験をマウスに対して行い、肺負荷量の経時変化を評価することで、間欠吸入曝露試験のプロトコル立案につながる基礎的定量的データの取得を目的とした。

10週齢時に雄マウスに対して、カーボンナノチューブの単回吸入曝露を行った。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。質量濃度はL群、H群それぞれ2.8 mg/m³、5.0 mg/m³、MMADは0.96～1.4 μmであった。今後、肺負荷量と体内動態に関する経時変化の基礎データと免疫応答に関するデータとを照合し、迅速かつ効率的な慢性影響評価に資する間欠吸入曝露プロトコルの改良に取り組む。

A. 研究目的

ナノマテリアルの産業応用が急速に進展する中、製造者及び消費者の健康被害の防止のための規制決定、及び、産業界における安全面からの国際競争力保持の観点から、工業的に大量生産される様々な種類のナノマテリアルの安全性評価の実施が急務とされる。

安全性評価を行う上では、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、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が重要である。しかし、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 Mitsui MWNT-7 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 ver.3.0)¹⁾。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。

先行研究では、OECD TG451 により実施された 2 年間連続吸入曝露試験 (Particle Fibre Tox 2016, 13:53)、並びに気管内投与試験との比較を目的として、Taquann 直噴全身吸入装置を用い MWNT-7 の 2 年間の間欠全身曝露吸入試験を実施した。その結果、我々は 2 年間連続吸入曝露試験の結果を概ね間欠曝露試験法で代替可能であることを確

認した。しかし、曝露には依然 2 年間の期間を要することに加え、曝露設備の占有率も高いため、一度に複数のナノマテリアルを用いた吸入曝露による慢性影響評価の実施は困難という問題が残されていた。

本研究では、間欠曝露法の効率をさらに高める吸入曝露プロトコルを開発することを目的とし、今年度は、慢性影響評価に資する間欠吸入曝露プロトコルの立案のために、単回吸入曝露試験を実施し、肺負荷量と体内動態に関する経時的変化の基礎情報を得ることを目的とした。

B. 研究方法

B-1. NT-7 の高分散化処理 (Taquann 法)

これまで、多層カーボンナノチューブ (MWCNT) は三井物産から提供された MWNT-7 を使用して研究を進めてきたが、保有する検体をほぼ使い切った状況であること、また、三井物産では MWNT-7 の生産はすでに終了していることから、MWNT-7 と同様の製造法で生産された NT-7 をナノテクノロジービジネス推進協議会より入手し、今後の実験における MWCNT のベンチマーク物質として使用することとした。

NT-7 原末をガラス製ビーカー中で tert-butyl alcohol (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 NT-7 の乾燥検体 (T-NT-7#53) を得た (図 1)。

B-2. マウス全身曝露吸入実験

1) 動物

(1) 単回吸入曝露試験 (Part1)

C57BL/6NcrSLC (日本エスエルシー株式会社) 雄性マウスを 9 週齢で購入し 1 週間の馴化期間を経たのち 10 週齢にて T-NT-7#53 を 1 日 6 時間、単回吸入曝露した。このマウスは当研究部において、これまでの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) 単回吸入曝露試験 (Part2)

NT-7 の体内動態を評価するため、遺伝学的にリンパ管内皮細胞と血管内皮細胞を蛍光標識したダブルトランスジェニックマウス (Prox1-GFP/Cdh5-BAC-CreERT2-ROSA-lox-stop-lox-tdTomato-SMA-GFP) に対して、T-NT-7#53 を 1 日 6 時間、単回吸入曝露した。このマウスは、リンパ管内皮細胞が GFP (緑) で、血管内皮細胞が tdTomato (赤) で蛍光標識されたマウスで、NT-7 の体内動態評価に資する研究リソースとして東京医科歯科大学の渡部徹郎の提供により当研究所に 8 週齢にて搬入され、2 週間の馴化期間を経て 10 週齢で単回吸入曝露試験に供した。(詳細は、研究分担者東京医科歯科大学・教授 渡部徹郎の項を参照)。

2) 飼育条件

飼育ケージは、ポリカーボネート製のアウトターケージと PET 製インナーケージを使用した。紙製の床敷を使用し、1 ケージ当り 5 匹のマウスを収容した。ケージラックはケミカルセーフティ対応のケージ個別換気式飼育装置 (RAIR HD SUPER MOUSE 750™ 個別換気

式飼育装置 特型) を使用した。飼育条件は、温度; $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、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、また、飲水は給水用寒天 (日本エスエルシー株式会社) を自由摂取させた。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) 単回吸入曝露試験 (Part1)

対照群、T-NT-7#53 低濃度群 (目標濃度 2.5 mg/m^3)、T-NT-7#53 高濃度群 (目標濃度 5.0 mg/m^3) の 3 群構成とした。各群 50 匹のマウスを使用し、6 時間 (10:00 ~ 16:00) の吸入曝露を実施した (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 (Sub-Group A, B) に分けて曝露を実施した。

(2) 単回吸入曝露試験 (Part2)

対照群、T-NT-7#53 曝露群 (目標濃度 5.0 mg/m^3) の 2 群構成とした。対照群 5 匹、曝露群 25 匹のマウスを使用し、6 時間 (10:00 ~ 16:00) の吸入曝露を実施した (表 2)。

4) ダスト発生装置

NT-7 のエアロゾル化は、既設の Taquann 直噴全身吸入装置 Ver3.0 を使用した (図 2)。この装置は、検体を充填する金属製カートリッジ、圧縮空気をカートリッジに噴射する噴射装置、

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

カートリッジへの検体の充填はT-NT-7#53をTBに0.08 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-NT-7#53を低濃度群では0.8 mg/カートリッジ、高濃度群では1.6 mg/カートリッジを充填した。

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2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89本のカートリッジを使用した。

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

6) 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、6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 $4 \sim 5 \text{ hr}$ 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30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-NT-7#53 の単回吸入曝露試験 (Part1)

NT-7原末の外観はMWNT-7に比較して嵩が低く、また平均繊維長は $4.4 \pm 3.4 \mu\text{m}$ であり、MWNT-7 (平均繊維長約 $7 \mu\text{m}$) に比較して短かい値を示した (図4)。Taquann法処理したNT-7 (T-NT-7#53) の繊維長は $4.7 \pm 3.4 \mu\text{m}$ であり、平均繊維長にはTaquann処理による影響は認められなかった (図4)。Taquann全身曝露吸入装置 ver 3.0を用いたT-NT-7#53のエアロゾル濃度設定試験における質量濃度は、低濃度は 0.5 mg/カートリッジ で 1.5 mg/m^3 (エアロゾル効率40%)、高濃度は 1.0 mg/カートリッジ で 3.1 mg/m^3 (エアロゾル効率44%) となった。この結果を踏まえ、カートリッジあたりのT-NT-7の量を1.6倍量増やしたところ、低濃度は 2.8 mg/m^3 (エアロゾル効率46%)、高濃度は 6.2 mg/m^3 (エアロゾル効率47%) となった。MMADの2回のデータは、 $0.90 \mu\text{m}$ (σ 5.82) と $1.11 \mu\text{m}$ (σ 5.64) を示した。なお、エアロゾル化したT-NT7#53の繊維長は $5.6 \pm 3.5 \mu\text{m}$ であった (図4)。

次に、T-NT-7#53低濃度群の全身曝露吸入試験を実施した。Sub-group AとBで実施

した2回の平均質量濃度は 2.8 mg/m^3 (エアロゾル効率42%)、高濃度群では 5.0 mg/m^3 (エアロゾル効率42%) となった。MMADは低濃度群において $0.96 \mu\text{m}$ (σ : 7.4) と $1.08 \mu\text{m}$ (σ : 6.8)、高濃度群において $1.4 \mu\text{m}$ (σ : 5.0) と $1.3 \mu\text{m}$ (σ : 5.1) の値を示した。

一方、気管支肺胞洗浄液 (BALF) 細胞の観察を行った結果、曝露直後 day1 ではL群、H群ともに好中球が観察された。また、L群、H群とも曝露から時間が経過するにつれて、肺胞マクロファージの貪食割合が減少傾向にあることを明らかにした (図5)。

2) T-NT-7#53 の単回吸入曝露試験 (Part2)

T-NT-7#53曝露群の全身曝露吸入試験の質量濃度は 4.9 mg/m^3 (エアロゾル効率40%) となった。MMADは $1.2 \mu\text{m}$ (σ : 5.7) の値を示した。

D. 考察

本分担研究で使用した 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試験が可能であることが特徴である。実際に、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、安定的なデータを取得した。

本分担研究は、先行研究で実施した MWCNT の間欠吸入曝露をより効率的に実施することを目的とし、肺への負荷量を考慮した間欠吸入曝露プロトコルを提案し、慢性影響評価を進める。今年度はまず、単回吸入曝露試験を実施し、肺への負荷量の経時変化に関する基礎データを取得し、また、肺組織の免疫応答や病理組織学的解析との結果とを合わせて、間欠曝露のプロトコルの立案を行う。肺負荷量の分析に先立ち、回収した

BALF 細胞から肺胞マクロファージへの取り込みについて観察した結果、吸入曝露から時間が経過するにつれて、NT-7 を貪食した肺胞マクロファージの数は減少傾向を示したため、今後実施予定の肺負荷量についても、曝露から時間経過するにつれて減少すると予想される。

単回吸入曝露試験における質量濃度測定の結果から、目標濃度を概ね達成し、エアロゾル効率も 40-42%とエアロゾル濃度設定試験(動物なし)におけるそれよりも低値を示したが、これは動物被毛への NT-7 の吸着によるロスが考えられた。この結果は、先行研究における MWNT-7 と同様の結果であり、Taquann 吸入曝露装置の精度の高さを示した。MMAD に関しては、OECD TG451 により実施された先行試験 (Particle Fibre Tox 2016) における MMAD (1.3~1.4 μm 、 σg 2.6~3.0) とほぼ同等の結果を示した。これらの結果からも Taquann 吸入曝露装置の有用性を確認した。

本分担研究の遂行により、ナノマテリアルの吸入曝露による慢性影響評価において課題とされていた「希少な検体」を「少量」で吸入曝露することを可能とし、今後、本成果をもとに間欠曝露プロトコルの効率化を提案することで「一度に複数検体」を吸入曝露することことも可能となる。

E. 結論

Taquann 全身曝露吸入装置 Ver.3.0 を使用し、T-NT-7#53 をマウスに 6 時間の単回全身曝露吸入を実施した。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。今後、単回

吸入曝露による肺負荷量の時間経過を定量的に評価し、適切な間欠吸入曝露試験プロトコルを提案する。

謝辞: 本研究の遂行にあたり、技術的支援をいただいた、辻昌貴氏、森田絃一氏、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

Wakayama T, Yokota S, Noguchi K, Sugawara T, Sonoda K, Wanta A: Quantitative Evaluation of Spermatogenesis by Histochemistry, *Histochemistry and Cell Biology.* 157(3):287-295. (2022)
[doi.10.1007/s00418-022-02080-6](https://doi.org/10.1007/s00418-022-02080-6)

Yokota S: Evaluation of sperm epigenome as a molecular index of reproductive toxicity for elucidating the mechanisms of transgenerational inheritance, *BIO Clinica.* 37(1): 41-47. (2022) Invited

Sekine N, Yokota S (Co-First), Oshio S: Sperm morphology is different in two common mouse strains, *BPB Reports.* 4: 162-165. (2021) [doi. 10.1248/bpbreports.4.5_162](https://doi.org/10.1248/bpbreports.4.5_162)

Yokota S, Takeda K, Oshio S: Spatio-temporal small non-coding RNAs expressed in the germline as an early biomarker of testicular toxicity and transgenerational effects

caused by prenatal exposure to nanosized particles, *Front. Toxicol.* 3: 32. (2021)
doi.10.3389/ftox.2021.691070

Yokota S, Sekine N, Wakayama T, Oshio S: Impact of chronic vitamin A excess on sperm morphogenesis in mice, *Andrology.* 9(5):1579–1592. (2021)
doi.10.1111/andr.13013

2. 学会発表

Taquahashi Y, Yokota S, Morita K, Tsuji M, Suga K, Kuwagata M, Hojyo M, Hirose A, Kanno J: Preliminary report of the two-year, every 4-week-interval intermittent whole body inhalation study of the multi-walled carbon nanotube in male mice, the 61st Annual Meeting of the Society of Toxicology (2022.3.27–31), Poster Virtual.

横田理、河上強志、久保田領志、三浦伸彦、北嶋聡: In vivo 毒性試験のための二酸化チタン分散方法の検討、メタルバイオサイエンス研究会 2021 (2021.10.28)、Web 開催、ポスター

宮澤正幸、横田理、吉岡弘毅、三浦伸彦: 薬毒物の感受性時刻差、メタルバイオサイエンス研究会 2021 (2021.10.27)、Web 開催、ポスター

三浦伸彦、宮澤正幸、横田理、吉岡弘毅: 毒性発現強度の時刻差を利用した毒性発現機構解明、メタルバイオサイエンス研究会 2021 (2021.10.27)、Web 開催、シンポジウム、口演

Horibata K, Hojo M, Yokota S, Taquahashi Y, Kobayashi N, Takasawa H, Hamada S, Sugiyama K, Honma M: In Vivo Genotoxicity Assessment Of Multi-Walled Carbon Nanotubes Using The Optimized Lung Micronucleus Assay, The Environmental Mutagenesis and Genomics Society 2021 Annual meeting (2021.9.22–

25), Poster Virtual.

横田理、武田健: ディーゼル排気由来超微小粒子の胎児期曝露が児の海馬神経活動に影響を及ぼし、学習・記憶障害を引き起こす、第 61 回日本先天異常学会学術集会 (2021.8.7)、Web 開催、ポスター

横田理、関根尚、北嶋聡、押尾茂: マウス精子形態形成へのビタミン A 過剰の関与、第 48 回日本毒性学会学術年会 (2021.7.9)、Web 開催、口頭

宮澤正幸、照井楓香、桂川真一、香川(田中)聡子、河村伊久雄、横田理、吉岡弘毅、三浦伸彦: 6-メルカプトプリンに対するマウスの感受性時刻差、第 48 回日本毒性学会学術年会 (2021.7.9)、Web 開催、口頭

前野愛、北條幹、坂本義光、湯澤勝廣、長谷川悠子、長澤明道、生嶋清美、平松恭子、海鉦藤文、山本行男、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: 多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の2年間ラット気管内反復投与試験における投与器具の違いによる毒性の比較: 1年経過時点での報告、第 48 回日本毒性学会学術年会 (2021.7)、Web 開催、ポスター

横田理、若山友彦、押尾茂: レチノイド過剰により生じるマウス精子形成のステージ出現頻度の変化、第 40 回アンドロロジー学会 (2021.6.12)、Web 開催、口頭

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

表1 単回吸入曝露実験 (Part1) の群構成

Group	Examinations	N	Necropsy after inhalation exposure				
			Day0	Day1	Day7	Day14	Day28
Control 0 mg/m ³ 6hr/D	•Lung Burden	18	6	3	3	3	3
	•Histopathology(perfusion)	10	0	3	2	2	3
	•Immune function						
	BALF	22	0	6	5	5	6
	Pulmonary interstitium mRNA Spleen, Lymph node						
Subtotal		50	Consist of two sub-groups, A&B				
T-NT-7 #53um L 2.5 mg/m ³ 6hr/D	•Lung Burden	18	6	3	3	3	3
	•Histopathology(perfusion)	10	0	3	2	2	3
	•Immune function						
	BALF	22	0	6	5	5	6
	Pulmonary interstitium mRNA Spleen, Lymph node						
Subtotal		50	Consist of two sub-groups, A&B				
T-NT-7 #53um H 5.0 mg/m ³ 6hr/D	•Lung Burden	18	6	3	3	3	3
	•Histopathology(perfusion)	10	0	3	2	2	3
	•Immune function						
	BALF	22	0	6	5	5	6
	Pulmonary interstitium mRNA Spleen, Lymph node						
Subtotal		50	Consist of two sub-groups, A&B				
Total number of animals		150					

表2 単回吸入曝露実験 (Part2) の群構成

Group	Examinations	N	Necropsy after inhalation exposure				
			Day0	Day1	Day3	Day6	Day14
Control 0 mg/m ³ 6hr/D	•Lung Burden	0	—	—	—	—	—
	•Histopathology(perfusion)	5	1	1	1	1	1
	•Immune function						
	BALF	0	—	—	—	—	—
	Pulmonary interstitium mRNA Spleen, Lymph node						
Subtotal		5					
T-NT-7 #53um H 5.0 mg/m ³ 6hr/D	•Lung Burden	0	—	—	—	—	—
	•Histopathology(perfusion)	25	5	5	5	5	5
	•Immune function						
	BALF	0	—	—	—	—	—
	Pulmonary interstitium mRNA Spleen, Lymph node						
Subtotal		25					
Total number of animals		30					

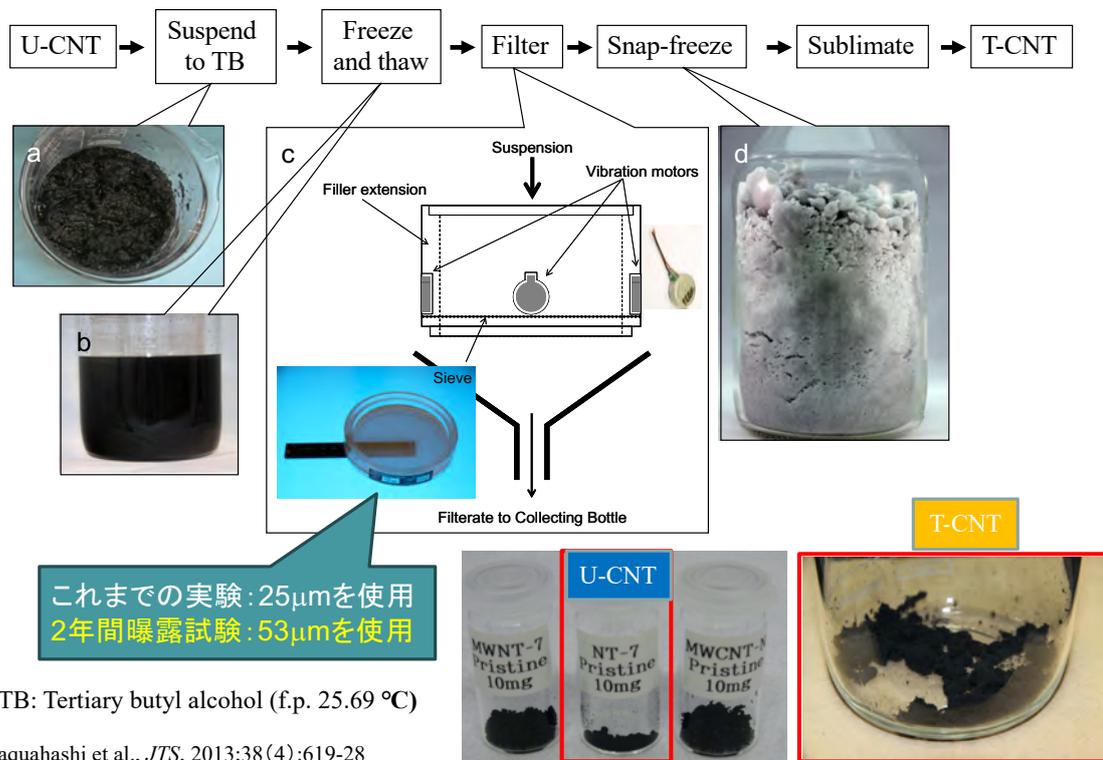


図1 Taquann法の概要

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。

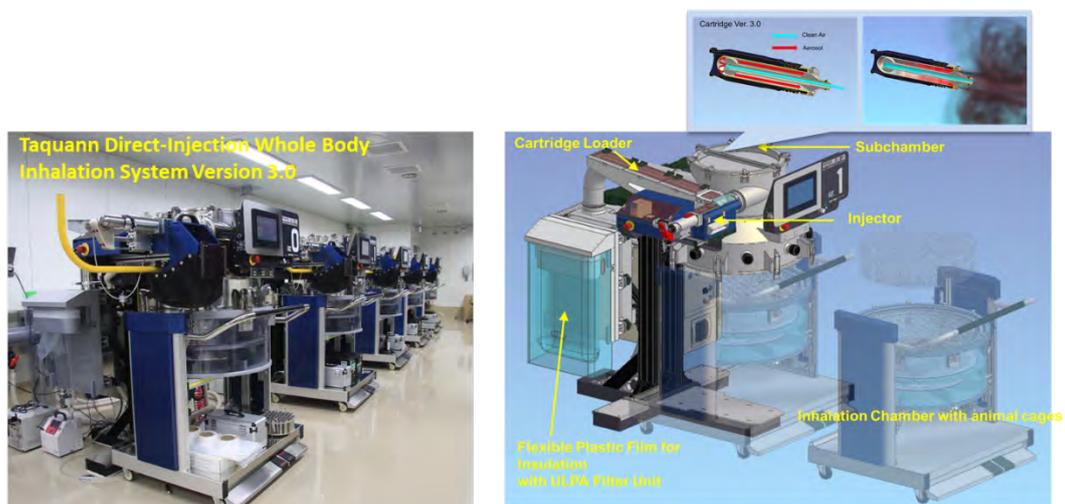


図2 Taquann 直噴全身吸入装置 Ver3.0

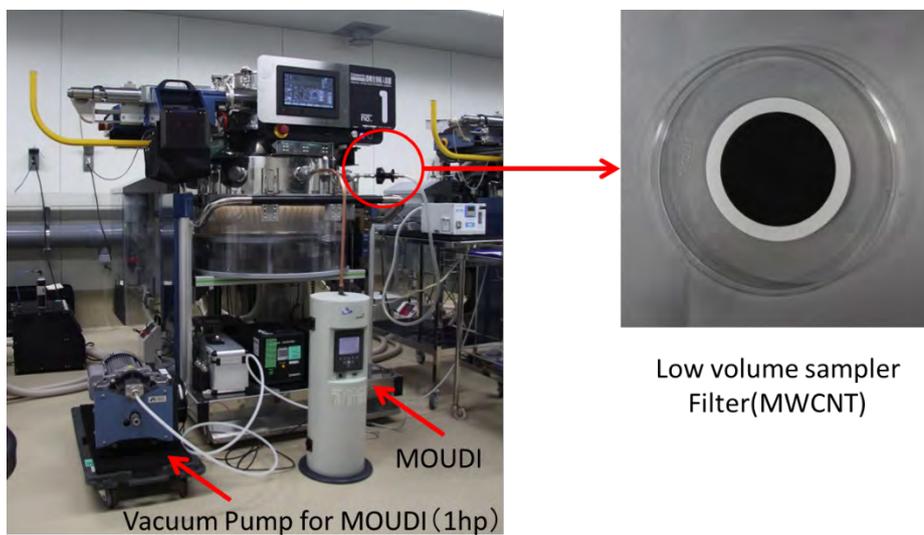


図3 エアロゾルモニタリングの概要

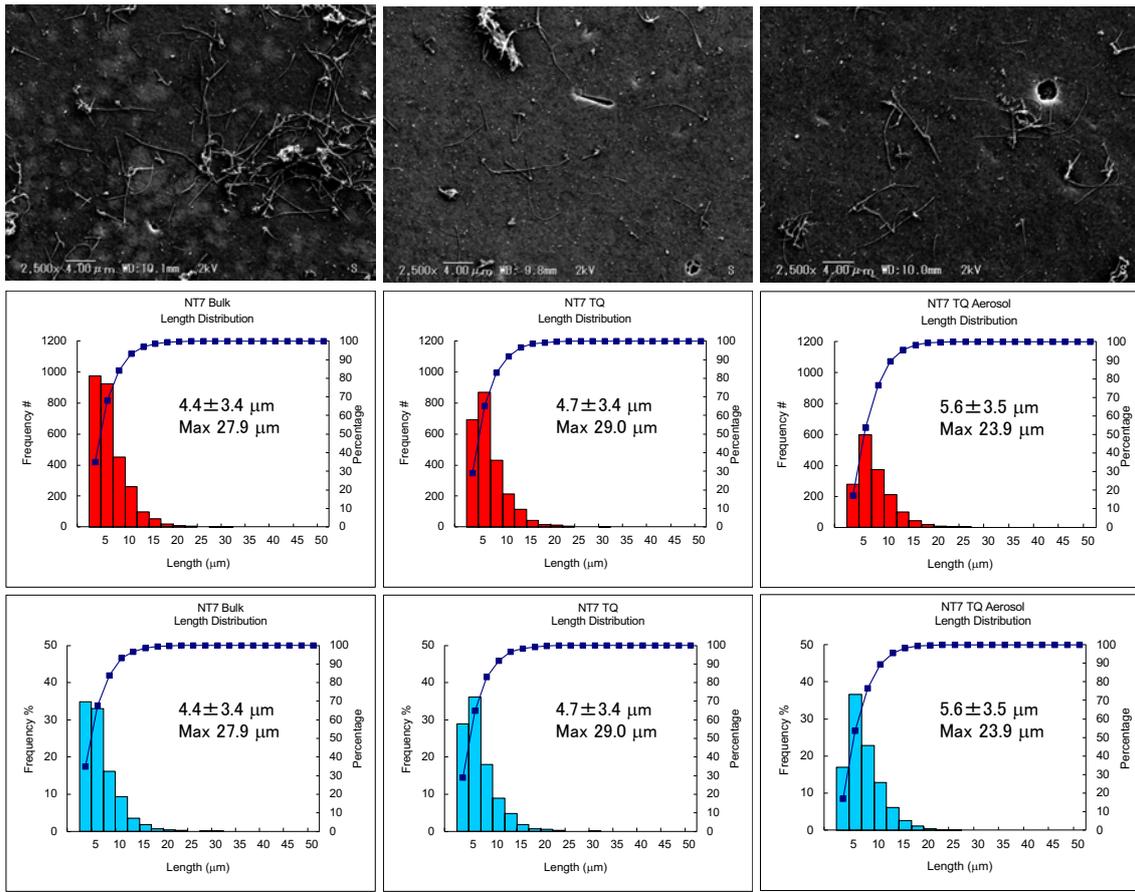


図4 NT-7の繊維長分布

走査型電子顕微鏡 (SEM) を用い、NT-7 の繊維長分布を評価した。(左)NT-7 原末 (NT7 Bulk) の繊維長の平均長さは $4.4 \pm 3.4 \mu\text{m}$ 、(中央) Taquann 処理 NT-7 (NT7 TQ) の繊維長の平均長さは $4.7 \pm 3.4 \mu\text{m}$ 、(右) Taquann 処理検体をエアロゾル化した T-NT7 (NT-7 TQ aerosol) の繊維長の平均長さは $5.6 \pm 3.5 \mu\text{m}$ となり、Taquann 処理を行っても NT-7 原末の繊維長に影響を及ぼさないことが示された。

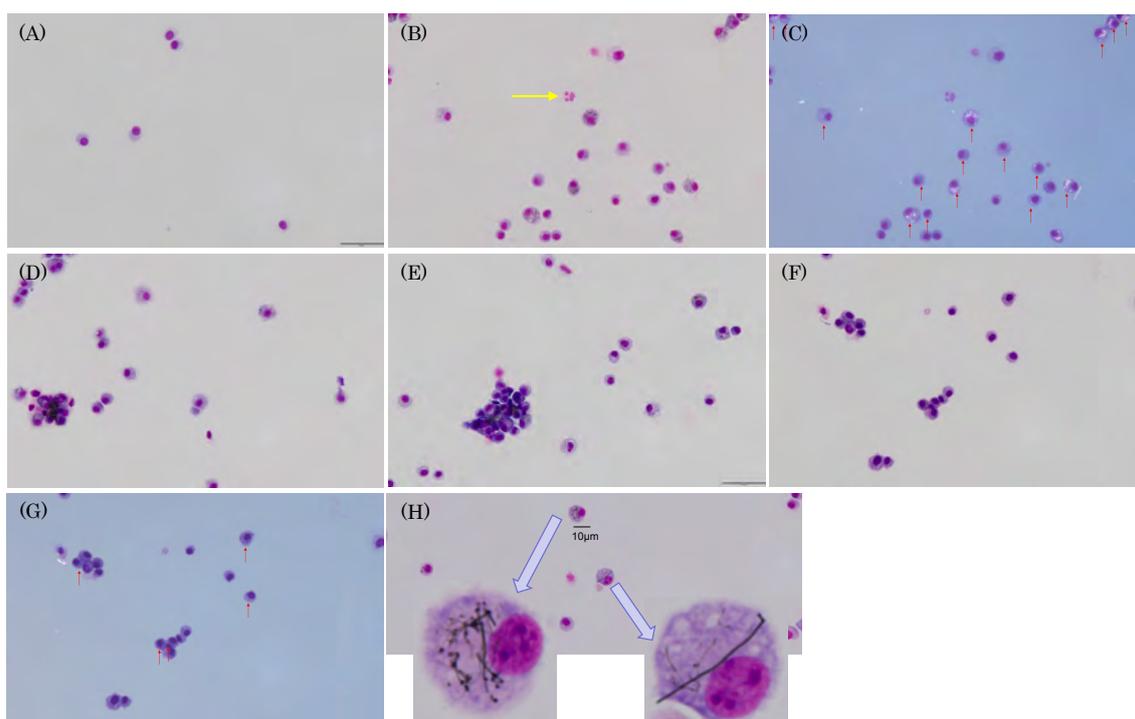


図5 気管支肺胞洗浄液(BALF)中に含まれる細胞へのNT-7の取り込み

回収したBALFは、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、メタノール固定した後、pH6.4リン酸緩衝液にて洗浄した。3%メイグリユンワルド染色液にて染色した後、5%ギムザ染色液にて染色し、pH6.4リン酸緩衝液で洗浄し、乾燥、封入を行った。(B-G)NT-7の吸入曝露から時間経過するにつれ、肺胞マクロファージの貪食割合が減少していることが明らかとなった。(C, G)NT-7の貪食像は偏光をかけることで確認することが可能である。(A)ControlのBALF細胞、(B)曝露後1日経過したBALF細胞、(C)曝露後1日経過したBALF細胞の偏光像、(D)曝露後7日経過したBALF細胞、(E)曝露後14日経過したBALF細胞、(F)曝露後28日経過したBALF細胞、(G)曝露後28日経過したBALF細胞の偏光像、(H)NT-7を貪食した肺胞マクロファージの拡大像、黄矢印:好中球、赤矢印:NT-7を貪食した肺胞マクロファージ

令和3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:

ナノマテリアル吸入曝露影響評価のための効率的慢性試験法の開発に関する研究
(21KD2004)

分担研究課題名: 間歇吸入曝露による慢性影響評価に関する病理学的研究

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: 前野 愛 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

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 室長

研究要旨

ナノマテリアル曝露により懸念された健康・環境へのリスク評価の必要性の国際的な高まりを受けて 15 年近くが過ぎ、従前の化学物質のリスク評価・管理の枠組みを拡張する方向で様々な評価法の開発が進められてきた。さらに、ナノマテリアルよりもより広い分野の新材料マテリアルの安全性評価に焦点が移りつつある。毒性学的観点からは、評価対象がアドバンスドマテリアルに拡大することになっても、生体内への吸収性や蓄積性、表面活性の増強による重要な生体影響が慢性影響であることには変わりはない。この社会的ニーズにかなった新材料マテリアルはより広範且つ長期間に渡り使用され続けることが求められることとなり、慢性影響評価はこれまで以上に重要な評価手法として位置づけられるようになると考えられる。本研究では、この間歇型曝露手法の利点を更に活かして、複数の慢性試験を同時期に効率的に曝露できる手法を開発することを目的とする。本分担研究では、先ず、先行研究において 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 年間の間歇吸入曝露実験の結果を解析する。曝露時間は 6 時間/回、過剰な肺負荷量を避けるために 4 週毎の間歇全身曝露吸入を継続し、計 26 回の曝露を実施した。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。肉眼的に肺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。2 年目の肺負荷量は、L 群; $61.1 \pm 2.2 \text{ } \mu\text{g/lung}$ 、H 群; $91.6 \pm 21.5 \text{ } \mu\text{g/lung}$ であった。肉眼的に L 群に 2 例に結節性病変を確認し、組織学的に腺癌であった。免疫染色において TTF-1 陽性、CC10 陰性であり、II 型肺胞上皮由来の腺癌である事が示された。MWNT-7 の終末細気管支領域への集積と、それによる組織反応の様態を解析し、用量作用関係に検討に必要な諸要件を検討した。

A. 研究目的

新素材としての産業用ナノマテリアルについては、新しい物性に伴う未知のヒト健康影響の懸念に対して適正な安全性評価手法の確立が急務となっているが、これまで 15 年近くにわたり OECD や各国が各種研究を精力的に行ってきたにもかかわらず、未だに体系的な評価手法は見いだせない。我々は、これまでの研究において、慢性影響に関する知見を積み上げ、二年間の連続吸入曝露との結果を比較可能な間歇型曝露手法の開発を行ってきた。本研究では、間歇型曝露手法の効率化を更に推し進めて、より効率的な曝露手法を開発することを目的とする。本分担研究では、先ず、先行研究において 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 年間の間歇吸入曝露実験の結果を解析する。

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担当するが、今年度は、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。

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

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

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

免疫機能解析用の動物は、開胸後に留置針を気管に挿入し生理食塩水または細胞保存液 (MACS® Tissue Storage Solution, MACS) を 1 mL 注入して BALF を採取した。この作業

を2回行い、約2 mLのBALFを回収した。BALFを回収した肺は、遺伝子発現解析用に副葉を採取してRNALater®に保存した。その後、4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液(和光純薬工業、組織固定用、用時調製)を約1.5 mL注入し、同組成の固定液に浸漬固定した(免疫機能解析用のサンプルは研究分担者の石丸直澄教授が解析を実施)。

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

倫理面への配慮

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

B-4. 肺組織の病理学的解析

固定した肺のパラフィン切片を情報に従って作成し、H&E染色に加え、マッソントリクローム

染色を実施した。TTF-1、CC10、及びKi-67に対する免疫染色をすべての肺パラフィン切片に対して実施した。

B-5. BALF 細胞の染色

回収したBALFは、スライドガラス(Matsunami)をセットしたShandon™ EZ single cytofunnel (A78710003, Thermo Fisher Scientific)に150µL分注し、Cytospin 3 (Thermo Fisher Scientific)を用いて、700 rpm、5分間の遠心を行い、細胞塗抹標本作製した。冷風乾燥、メタノール(試薬特級、富士フイ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(富士フイ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(富士フイ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-6. 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、富士フイルム株式会社)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・肺負荷量

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)。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(図 4)。L群の 2/18例において、肺に白色腫瘍が観察された(図 5)。胸水が L群 3/18例、H群では 5/16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)。

肺重量と肺負荷量は、曝露濃度依存的に増加した(図 6A, B)。肺負荷量は、L群の 6ヶ月、12ヶ月及び 24ヶ月においてそれぞれ 6.4 μ g/動物、22.3 μ g/動物、61.1 μ g/動物、H群の 6ヶ月、12ヶ月及び 24ヶ月においてそれぞれ 15.2 μ g/動物、45.8 μ g/動物、91.6 μ g/動物であった。24ヶ月の時点における肺負荷量はバラツキが大きかった(図 6C)。肺重量と各時点、各群の肺重量と肺負荷量の関係をプロットすると、6ヶ月及び 12ヶ月では各群が明らかに分離するが、24ヶ月では L群と H群が近接していた(図 6D, E, F)。呼吸量は基礎代謝量に応じて増加すること、基礎代謝量は体表面積、或いは体重と関連することから、肺負荷量測定に供した各動物の体重推移と肺負荷量を比較した(図 7A, B, C)。24ヶ月時点では、L群

においては、体重が重い個体ほど肺負荷量が多い傾向にあった。一方、H群では体重が最も軽い個体(#121)の肺負荷量が最も多く、体重と肺負荷量の相関性は明瞭ではなかった。

曝露期間中の体重の積分値として、期間中の平均体重との関係をみると(図 7D)、統計学的有意差はないものの、24ヶ月目においては肺負荷量が多いほど、期間平均体重は減る傾向がみられた。また、肺絶対重量が H群と L群とで差が無い状況にあること(図 7E)から、H群の吸入量は、肺毒性を超えて一般毒性が強く誘導される量に達しており、これは図 1の体重曲線からも示唆されたことではあるが、H群は、発癌性に関しては用量相関性が保証されない曝露濃度であったと考察するのが妥当であると考えられた。

BALF から得られた細胞の観察を行った結果、細胞数は L群、H群で増加しており、T-CNT7#53を貪食した大型の細胞が観察された(図 8)。

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)。

C-4. 肺組織の病理学的解析

MWNT-7 の沈着が 2年時は、1年時の状況よりも進行し(図 3)、線維化を伴う慢性肉芽腫性異物反応が用量相関性をもって惹起された。呼吸細気管支炎、リンパ系病変、胸膜病変を認めた。上皮性増殖性病変の発生を、低用量群及び高用量群に認め、対照群には認めなかった。低用量群において肉眼的に観察可能

な肺腺癌が誘発された。

TTF-1、CC10、Ki-67 免疫染色の結果の概要は以下の通りである。

(1) TTF-1 (II型肺胞上皮細胞のマーカー)

正常部では、肺胞内のII型上皮、及び、終末細気管支のクララ細胞の一部の細胞核に陽性であった。肉眼的に確認された腺癌は、TTF-1 陽性、CC10 陰性であった。終末細気管支近傍に MWNT-7 を貪食したマクロファージの集簇を多く認め、それによる局所的な慢性炎症の領域にほぼ一致して TTF-1 陽性細胞の密度の増加を認めた。

(2) CC10 (クララ細胞のマーカー)

CC10 陽性像は、終末細気管支上皮の細胞質に認めた。クララ細胞の多くは核が TTF-1 陽性であった。

(3) Ki-67 (分裂期細胞のマーカー)

今回の染色では、やや染色性が弱いと判定された(肺内のリンパ装置を陽性対照と見做しての判定)。その条件下で、腺癌、終末細気管支近傍の局所的慢性炎症領域の TTF-1 陽性細胞の密集部位のいずれも、標識率は1%に満たなかった。

D. 考察

本分担研究では Taquann 全身曝露吸入装置 Ver.3.0 を使用し T-CNT7#53 の2年間の間歇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、詳細な病理組織学的解析を実施中であるため、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ヶ月では肺の弾性が増しており、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。

肺重量と肺負荷量の関係については、L群H群ともに、6ヶ月、12ヶ月並びに24ヶ月において吸入曝露回数と肺負荷量の相関関係が見られた。L群(2.7mg/m³)とH群(5.2mg/m³)は公比約2であるが、24ヶ月において、H群の肺負荷量(91.6µg/lung)はL群の肺負荷量(61.1µg/lung)の2倍には到達しなかった。呼吸量と基礎代謝量は相関することから、体重低下による影響が考えられたが、図7Cに示すように、H群では最も体重が低値を示した個体の肺負荷量が最も多く、体重との関連は説明できなかった。肺からの排泄低下である可能性もあるが、肺負荷量測定では全肺を溶解して検体を回収するため、病理組織学的解析による検討ができないため明らかにすることはできなかった。

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塊を形成する傾向が強かった。今後、凝集塊を示すマクロファージの詳細な解析を行ない、細胞膜、細胞外マトリクスの変化との関係を明らかにする計画である。

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+/-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、さらに病理組織評価を進める。

肺組織の病理組織学的解析により肺腫瘍の誘発を確認したが、肉眼的に確認可能な肺腫瘍の発生についての用量相関性がはっきりしないことから、微小病変、前駆病変の発生の確認を免疫染色により確認した。その結果、終末細気管支近傍におけるMWNT-7を貪食したマクロファージの集簇を多く認め、それによる局所的な慢性炎症の領域にはほぼ一致してTTF-1陽性細胞の密度の増加を認めた。この密集像は病理組織診断学的には過形成性の範疇に留まるが、その原因と考えられるMWNT-7が恒久的にその部位に存在すると想定されることから、腫瘍性増生に発展する基盤となる病変であると考えerる必要性が残る。繊維状の難分解性の異物は、異物除去機構による肺からの排除の速度が遅く、十分に長い期間残留する可能性が高いと考えられるためである。過形成性と診断されたII型上皮の遺伝子解析、遺伝子発現解析の必要性を含め、更なる検討を進める。

E. 結論

Taquann 全身曝露吸入装置 Ver.3.0 を用いてのT-CNT7#53の2年間の間歇吸入曝露実験を実施した24ヵ月の最終期解剖で得られた結果を解析した結果、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。肺負荷量と肺重量、及び、体重の関係からはH群の吸入量は、肺毒性を超えて一般毒性が強く誘導される量に達しており、発癌性に関しては用量相関性が保証されない曝露濃度であったと考察するのが妥当であると考えられたが、肺組織について免疫染色を用いた詳細な解析を行った結果、用量相関性について、前駆病変に当たる組織変化などの検討を進める必要性が明らかとなり、今後、いくつかの遺伝子情報を含めた解析の必要性を検討する。

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、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

Okubo Y, Ohtake F, Igarashi K, Yasuhiko Y, Hirabayashi Y, Saga Y, Kanno J. Cleaved Delta like 1 intracellular domain regulates neural development via Notch signal-dependent and -independent pathways. Development. 2021 Oct 1;148(19):dev193664. doi: 10.1242/dev.193664. Epub 2021 Oct 4. 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 Jun;112(6):2185-2198. doi: 10.1111/cas.14873. Epub 2021 May 2.

2. 学会発表

Jun Kanno : Histone Modification, DNA Methylation, and mRNA Expression Analysis of Murine Liver Repeatedly Exposure to a Chemical. ASIATOX-IX、(2021.10.22)、Virtual、Oral

ナノ毒性学—粉体毒性学からの複合毒性領域としての展開—Nanomaterials! Let's broaden our minds, Asbestos. 筑波大学大学院、(2021.10.13)、茨城、講義

J. Kanno, K.-I. Aisaki, R. Ono, S. Kitajima : Analysis of Murine Liver mRNA Expression, DNA Methylation, And Histone After Repeated Exposure To Chemicals. EUROTOX 2021 virtual congress、(2021.9.29)、Oral

菅野純、北嶋聡、相崎健一、齊藤洋克、種村健太郎: 肺の遺伝子発現応答と毒性機序予測解析. 第 48 回日本毒性学会学術年会、(2021.7.9)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演

石丸直澄、新垣理恵子、常松貴明、高橋祐次、菅野純: ナノマテリアルの吸入暴露による肺免疫応答と線維化の分子機構. 第 48 回日本毒性学会学術年会、(2021.7.9)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演

菅野純、高木篤也、相崎健一、北嶋聡: 異物発癌に関わるトランスクリプトミクス特性. 第 48 回日本毒性学会学術年会、(2021.7.8)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演

相崎健一、小野竜一、菅野純、北嶋聡: トランスクリプトミクスから見た発癌物質の特性. 第 48 回日本毒性学会学術年会、(2021.7.8)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演

菅野純: 「子供の毒性学: 脳の発達を中心に」—イントロダクション—. 第 48 回日本毒性学会学術年会、(2021.7.8)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演

齊藤洋克、北嶋聡、菅野純、種村健太郎: 低用量化学物質の発生-発達期ばく露による成熟後の神経行動毒性の検出と評価—発生-発達期マウスへのネオニコチノイド系農薬ばく露影響解析を中心に—. 第 48 回日本毒性学会学術年会、(2021.7.8)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演

菅野純、相崎健一、小野竜一、北嶋聡: 毒性 Omics と AI による慢性毒性予測. 第 48 回日本毒性学会学術年会、(2021.7.7)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演

夏目やよい、相崎健一、北嶋聡、Samik GHOSH、北野宏明、水口賢司、菅野純: PPAR α リガンドの比較毒性オミクス. 第 48 回日本毒性学会学術年会、(2021.7.7)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演

J. KANNO, K. AISAKI, R. ONO, AND S. KITAJIMA: Comprehensive Histone, DNA Methylation and mRNA Expression Analysis of Murine Liver Repeatedly Exposed to Chemicals. CTDC11, (2021.6.15), Virtual, Oral

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

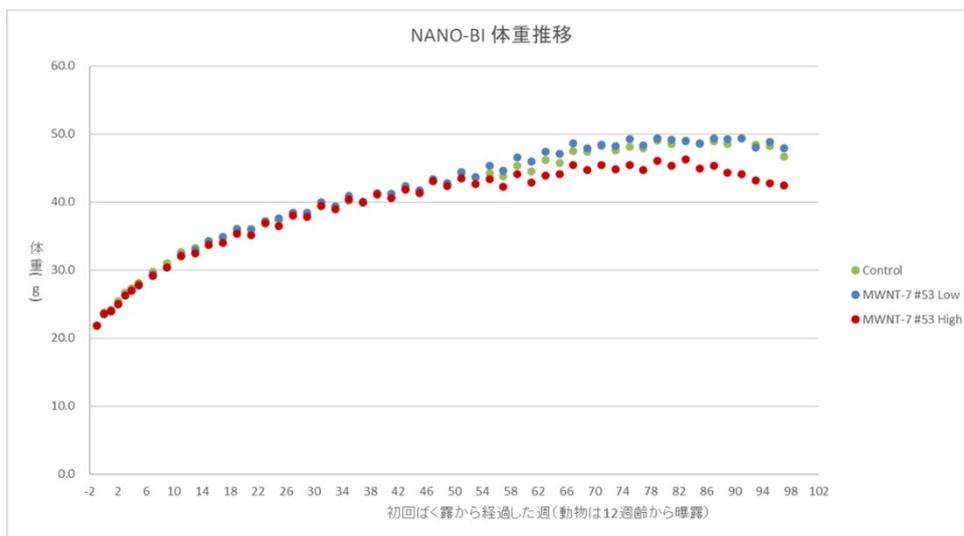


図 1: 体重推移は初回曝露後 54 週まで、対照群と T-CNT7#53 曝露群との間に差はみられなかったが、54 週以降、H 群で体重低下傾向であった。

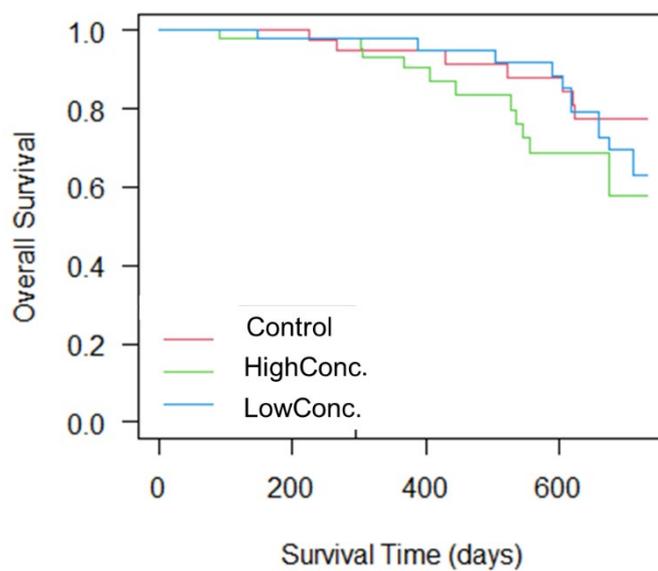


図 2:【Kaplan-Meier 解析】; 死因は考慮せずに Kaplan-Meier 解析を行った。Log-rank 検定では群間に差は認められなかった。

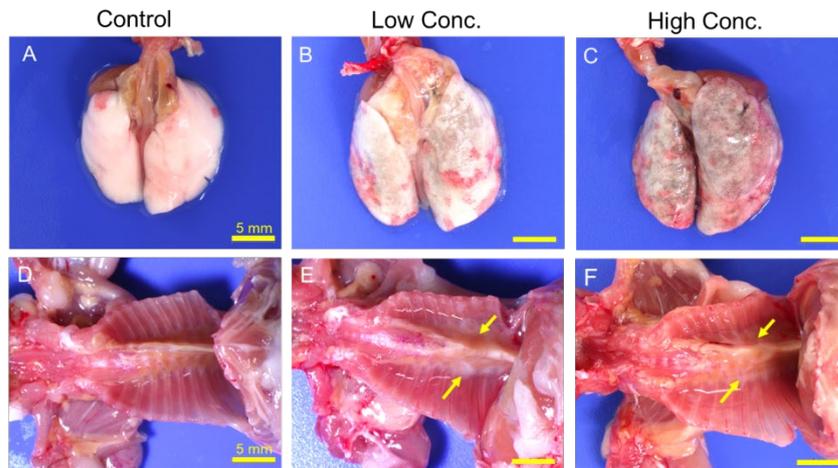


図 3:【肉眼所見】肺は曝露濃度依存的に腫大し、色調は灰白色～灰色を呈した(A～C)。胸腔壁の背側において、ミルキースポット(E,F:矢印)が脊椎骨の両側にL群 15/18例、H群では 15/16例観察された(スケールバー:5mm)。

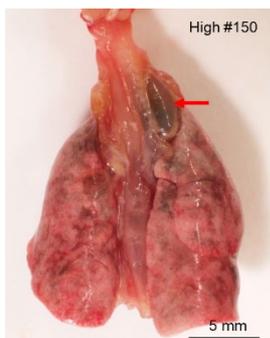


図 4:【傍気管リンパ節の腫大】肺右葉の気管近傍に位置するリンパ節は腫大し(矢印)、灰色から黒色を呈する様子がL群 12/18例、H群では 9/16例観察された。

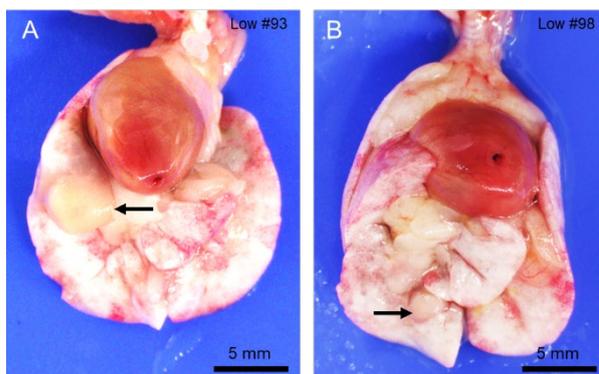


図 5:【肺に結節性病変がみられた例】L群の2例において、肺に白色腫瘍が観察された。

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

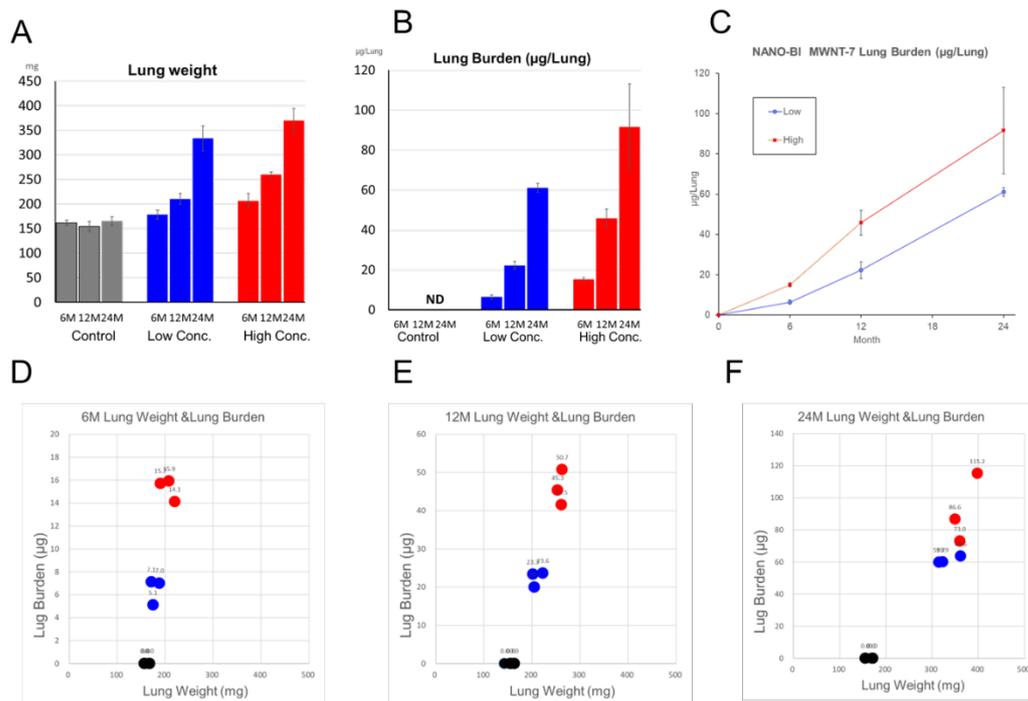


図 6:【肺重量と肺負荷量】肺重量と肺負荷量は曝露濃度依存的に増加した。A:肺重量及び B:肺負荷量の群間比較(各群、各時点 n=3)。C:肺負荷量の経時的変化。D~E:各個体の肺重量(x 軸)と肺負荷量(y 軸)をプロットした図。2 年目の肺負荷量はバラツキが大きい。

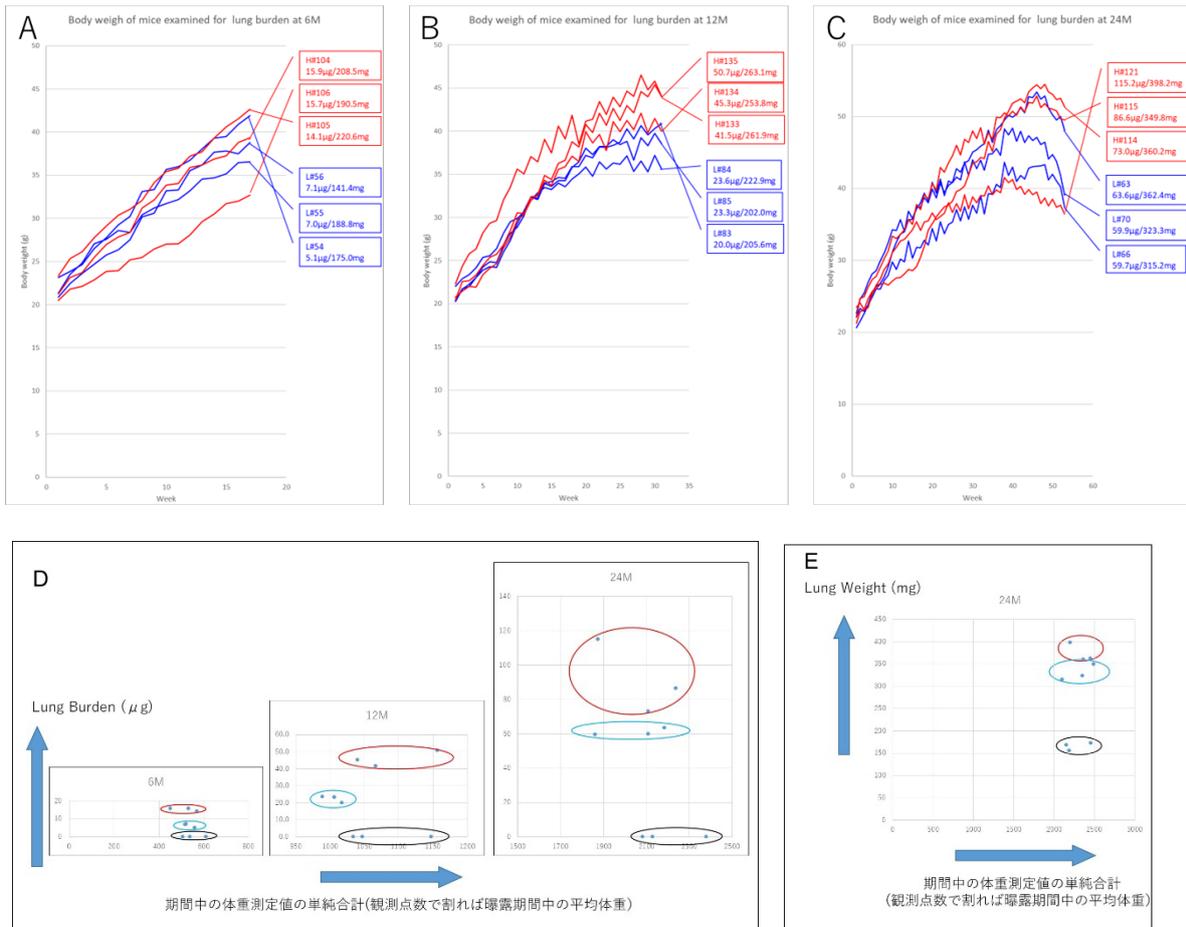


図 7:【体重推移と肺負荷量】肺負荷量測定に供した各動物の体重推移に肺負荷量(吹き出し)をプロットした。肺負荷量の吹き出しは、値が大きい順に上から配置した。A:6ヶ月、B:12ヶ月、C:24ヶ月。12ヶ月のL群においては、体重が重い個体ほど肺負荷量が多いが、H群では、最も体重が低値である個体(#121)の肺負荷量が多い。D:曝露期間中の平均体重で比較すると、肺負荷が増すと平均体重が減少する傾向がみられる。E:24ヶ月時点では、肺の絶対重量がH群とL群で差が無くなっている。

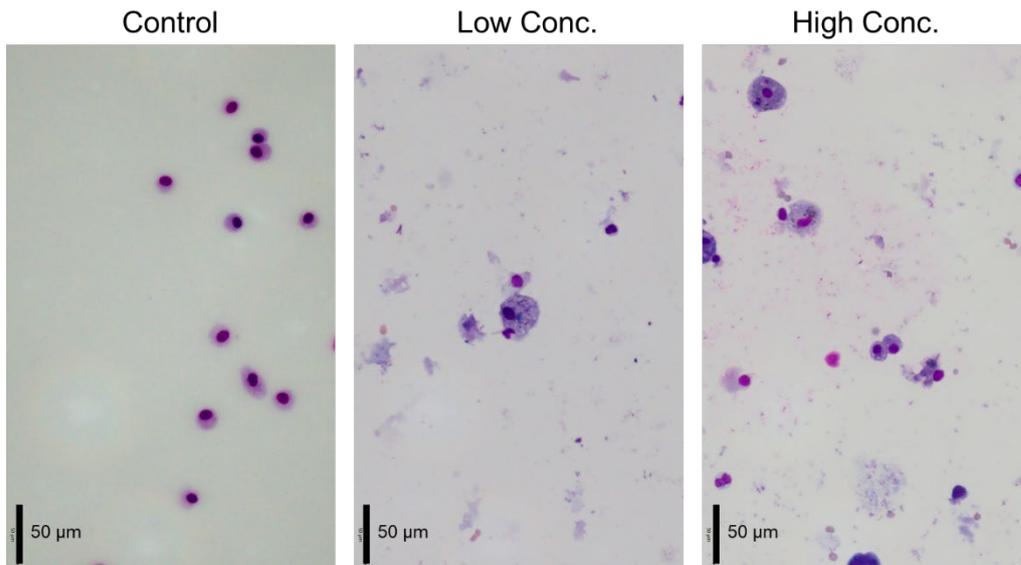


図 8:【BALF 細胞の観察結果】BALF から得られた細胞の観察を行った結果、細胞数は L 群、H 群で増加しており、T-CNT7#53 を貪食した大型の細胞が観察された。

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: ナノマテリアル吸入曝露影響評価のための効率的慢性試験法の開発に関する研究

分担研究課題名: 慢性影響を考慮した効率的気管内投与法の確立に関する研究

研究分担者: 北條 幹	東京都健康安全研究センター	薬事環境科学部 主任研究員
研究分担者: 広瀬 明彦	国立医薬品食品衛生研究所	安全性予測評価部 部長
研究分担者: 高橋 祐次	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部 室長
研究分担者: 小林 憲弘	国立医薬品食品衛生研究所	生活衛生科学部 室長
研究分担者: 菅野 純	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部 客員研究員
研究分担者: 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: 中江 大	帝京平成大学健康医療スポーツ学部	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: 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: 猪又 明子	東京都健康安全研究センター	薬事環境科学部
研究協力者: 中村 麻里	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: 篠岡 恭子	東京都健康安全研究センター	薬事環境科学部
研究協力者: 稲葉 涼太	東京都健康安全研究センター	精度管理室
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

MWCNT の 2 年間の吸入試験の報告は MWNT-7 をラットに吸入させた Kasai らの試験 1 報のみである。本研究では、こ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、気管内反復投与による、MWNT-7 の肺腫瘍および胸膜中皮腫の誘発性について十分な用量反応性データを得ることを目的とした。

今回使用する保土ヶ谷製の MWNT-7 (NT-7) の投与分散液における二次粒子径は 571.4 nm であり、三井製の MWNT-7 に比べやや小さかった。F344 雄性ラットを 4 群に分け、0.0175、0.07、0.28 および 0.42 mg/kg 体重の条件で 4 回の反復気管内投与を行い、予備的に肺負荷量を測定したところ、それぞれ、7.1、55.8、182.9 および 274.0 $\mu\text{g}/\text{Lung}$ であった。蓄積率は最も低い用量では 40%、他の群では 60%から 80%であった。

予備試験の結果を確認後、同じ投与条件で 2 年間の本試験を行うこととした。F344 雄性ラットを対照群 (C 群)、低用量群 (L 群)、中用量群 (M 群) 高用量群 (H 群) および超高用量群 (EH 群) の 5 群に分け、動物数はそれぞれ 40、50、50、50 および 30 匹とした (投与群については肺負荷量測定のためのサテライト動物 10 匹を含む)。10 週齢から、C 群には 0.1% Tween 含有生理食塩水を、0.0175、0.07、0.28 および 0.42 mg/kg 体重の用量で MWNT-7 (保土ヶ谷) を 1 週間毎に 1 回、合計 13 回、気管内に投与した。最終投与の翌日に、投与群の 5 匹ずつを剖検し、MWCNT の肺負荷量を測定した結果、それぞれ 30、191、980 および 1369 $\mu\text{g}/\text{Lung}$ であった。蓄積率は、L 群が 47%、M 群が 75%

であり、H群とEH群で90%を超えていた。既報と比較する限りでは、用量依存的に肺腫瘍および胸膜中皮腫の誘発が期待できるレベルと考えられる。

現在、残りの動物は観察中であり、途中解剖および2年後の最終解剖の病理組織学的検索により、MWNT-7の発癌性を評価する。

A. 研究目的

ナノマテリアルは、多様かつ特殊な物理特性のために *in vitro* 試験等の簡便な評価手法が確立しておらず、特に慢性毒性については *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。過去には、Kasai らにより MWNT-7 の2年間の全身吸入曝露試験が実施され、肺の腺腫および腺癌が発症することが報告されたが¹⁾、吸入試験の実施には特殊な設備とコストが必要となるため、2年間の連続吸入による発癌試験の報告は他に無く、慢性影響を評価できる効率的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り、Suzui らは MWNT-7 に類似する形状の MWCNT-N について、2週間で合計8回の反復気管内投与 (TIPS法) 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⁾。一方で、2019年には Numano らは、TIPS法により MWNT-7 を投与した結果、5%の動物に肺腫瘍が、95%の動物に胸膜中皮腫が発生した。³⁾ これらの TIPS法による試験では MWCNT の最大肺負荷量は吸入曝露試験と同程度であったが、吸入曝露では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⁾、TIPS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となるため、AUCの形状等点で違いがあった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

いに起因すると考えられてきた。

しかし、昨年度の我々の MWNT-7 の2年間の間欠気管内投与試験で AUC を右肩上がりにした結果、TIPS試験の結果より頻度が低いものの、やはり胸膜中皮腫が誘発され、胸膜中皮腫は気管内投与で発生しやすいことが示された。また、これは、胸腔への MWCNT 繊維の移行効率が高いことが原因と考えられる。我々の結果と、Numano らの報告とを踏まえると、気管内投与による呼吸器毒性の評価には、中皮腫による早期死亡を考慮した用量設定が重要である。

一方で、肺腫瘍に関しては、我々の試験結果を AUC をもとに Kasai らの試験と比較すると、用量反応性が異なることが示唆された。ただし、我々の試験では、2用量しか設定できなかったことと、上記の通り中皮腫の発症により、肺発がんを評価できる個体数が減少したことから、MWNT-7 による肺発がん性について十分な用量反応性を把握することはできなかった。

そこで、本研究では、2年間の吸入曝露試験を代替しリスク評価へ活用できる試験法の開発を目指し、気管内投与による肺発がんの用量反応性を把握できる2年試験を行うこととした。TIPS試験のように2年間の実験期間の初期に13回の反復投与後に無処置で飼育するプロトコルを採用し、胸膜中皮腫が発生し得る超高用量から NOAEL になることが想定される低用量まで投与群を4用量設定した。また、被験物質は、過去の試験で利用してきた三井製の MWNT-7 ではなく、Kasai らが使用した保土ヶ谷製 (NT-7) を用いることにした。

今年度は、予備試験として、サンプル分散状態の確認と 4 回反復投与後の肺負荷量の測定を行った後、2 年間の本試験を開始した。

B. 研究方法

i) MWCNT の調製と二次粒子径の測定

保土ヶ谷製の MWNT-7 (NT-7) を Taquann 処理 (53 μ m メッシュ)⁴⁾した。この T-NT-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 (100W) で 30 分以上分散させた。サンプル濃度は、0.0175、0.07、0.28 および 0.42 mg/mL とし、それぞれを低用量群 (L 群)、中用量群 (M 群)、高用量 (H 群) および超高用量群 (EH 群) の投与に用いた。

また、0.01 mg/mL の分散液の二次粒子径を DLS で測定した。

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 (ジャクソンラボラトリー・ジャパン)、コンベンショナル飼育室にて、床敷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。

予備実験として、4 回の反復投与による肺蓄積のレベルを確認するため 10 週齢のラットに 1 週間に 1 度、合計 4 回、T-NT-7 を気管内投与した。投与用量は、L 群、M 群、H 群および EH 群の各 4 匹の動物対し、0.0175、0.07、0.28 および 0.42 mg/kg 体重とした。イソフルラン吸入麻酔下で、動物に 1 mL/kg 体重の投与量でマイクロスプレイヤー (PennCentury) を用いて投与した。

2 年間の本試験の実験デザインは、1 週間に 1 度、13 回投与後に 2 年間観察飼育することとした。F344 雄ラットを、対照群 (C 群)、L 群、M 群、H 群および EH 群の 5 群に分け、動物数は C 群は 40 匹、L・M・H 群は 50 匹、EH 群は 30 匹とした (投与群については肺負荷量のサテライト動物を含む)。

10 週齢の時点から、1 週間に 1 度、1 mL/kg 体重の投与量で、マイクロスプレイヤーを用いて合計 13 回投与した。投与用量は、予備試験と同様に、L 群、M 群、H 群および EH 群の各群について、0.0175、0.07、0.28 および 0.42 mg/kg 体重と設定した。

全動物について、1 週間に一度、体重を測定した。

iii) 剖検

予備試験では、4 回目の投与 1 週間後に全動物をイソフルラン深麻酔下の全採血により安楽死させ、肺の全葉を摘出し、ホルマリン固定した。

本試験については、13 回目の投与翌日に、全投与群 (4 群) について、サテライト動物 5 匹を剖検し、肺の全葉をホルマリン固定した。

vi) 肺負荷量の測定

肺内の MWCNT の測定は、Ohnishi らの蛍光マーカーを用いて検出する手法 (大西法) に従った^{5), 6)}。肺組織をアルカリ溶液で溶解し、十分に分散させ、残存する肺組織を酸で溶解した後、MWCNT にベンゾ-ジ-ペリレン (B[ghi]P) を吸着させた。フィルターで MWCNT 繊維を捕捉してから、アセトニトリル溶液に B[ghi]P を脱着させ、HPLC の分析に供した。

<倫理面への配慮>

本研究では、人を対象とした研究、人の遺伝子解析および疫学研究は行っていない。動物飼育及び動物実験は東京都健康安全研究センター動物実験実施規程に基づいて、動物実験委員会の事前審査および承認を受け、その管理のもと実施された。

C. 研究結果

i) T-NT-7 の分散状態

Taquann 処理サンプル (T-NT-7#53) は、0.1% Tween80 含有生理食塩水に良好に分散し、目視では三井製の T-MWNT-7 #53 よりも速やかな分散性が確認された。

DLS による二次粒子径のピーク値は 571.4 nm であり、三井製のサンプルと比較すると小さかった (図 1)。

ii) 予備試験

4 回の反復投与の結果、剖検時、肺には、び慢性に黒色斑が観察され、用量に応じて色味は強くなっていた。L 群、M 群、H 群および EH 群の総投与量の平均値は、それぞれ、17.2、68.8、275.3 および 413.0 $\mu\text{g}/\text{Lung}$ であった (図 2・灰色棒グラフ)。一方、肺内の MWCNT 量の測定結果は、それぞれ、7.1、55.8、182.9 および 274.0 $\mu\text{g}/\text{Lung}$ であった (図 2)。蓄積率は L 群でおよそ 40%、他の群では 60%から 80%であった。

iii) 本試験 (13 回投与)

全投与群で、投与期間中に体重の抑制傾向が認められ、投与終了後には、いずれの群も平均体重が投与群に比べ 5%程度低い値となった (図 3)。

本試験における、13 回投与後の L 群、M

群、H 群および EH 群の、総投与量の平均値は、それぞれ、64、255、1014 および 1519 であった (図 4・灰色棒グラフ)。一方、肺内の MWCNT 量の測定結果はそれぞれ 30、191、980 および 1369 $\mu\text{g}/\text{Lung}$ であった。蓄積率は、L 群が 47%、M 群が 75%であり、H 群と EH 群で 90%を超えていた。(図 4)。

なお、実験開始 21 週後に、H 群の 1 匹が死亡した。膀胱内に出血が見られ、投与との関連は無いと考えられた。

現在、残りの動物は観察中であり、途中解剖および 2 年後の最終解剖から、発癌性を評価する。なお、最終解剖時にも各群 5 匹のサテライト動物について肺負荷量を測定する予定である。

D. 考察

今回の研究班で用いる NT-7 は、これまで使用してきた三井製の MWNT-7 に比べて性状が異なることが示唆されている。原末の凝集体の形状が異なることや平均長が短いことが報告されており (横田研究分担者)、我々の DLS の測定結果も、T-MWNT-7 と比べるとやや小さい粒子径であることが示された。Kasai らの 2 年間の吸入試験と比較するためには、今回の保土ヶ谷製の NT-7 を使うことは、より適切であると考えられる。例えば、平均長が異なることは、胸膜中皮腫の誘発性に影響を与える可能性がある。三井製を用いた Numano らの報告や、我々の昨年度の試験で、中皮腫発生率が高かったのに対し、保土ヶ谷製を用いた Kasai らの報告で中皮腫が発生しなかったことに関係があるかもしれない。

13 回投与後の H 群と EH 群における肺負荷量の蓄積率は、予備試験に比べると、

かなり高くなった。4回目以降から次第にクリアランス機能が低下したためと推測される。この結果から、EH群では、Numanoらの報告と同様に、早期の胸膜中皮腫の発生が予想される。いっぽう、仮にH群で胸膜中皮腫の発生率が高くなりすぎると、本研究の目的を果たせない恐れがあるが、H群は、Suzuiらの試験と同程度の肺負荷量であったため、彼らの結果と同様に、肺腫瘍と胸膜中皮腫の発生率が有意に増加することが期待される。一方、L群ではクリアランスが良好であったことから、肺腫瘍が認められないレベル (NOAEL) が得られると思われる。

E. 結論

T-NT-7 の投与サンプルの性状は三井製 MWNT-7 とはやや異なることがわかった。また、予備的に4回の反復投与による肺内負荷量の確認を行った。本試験の13回投与後の肺負荷量は、予想よりも蓄積率が高くなってしまったが、既報の情報から、用量依存的に肺腫瘍および胸膜中皮腫の誘発が期待できるレベルと考えられる。

(謝辞)

本研究の遂行にあたり、技術的な助言をいただいた、大西誠先生、後藤裕子先生、また、技術的支援をいただいた、生嶋清美氏、平松恭子氏、湯澤勝廣氏、長澤明道氏、矢野範男氏に深く感謝する。

F. 参考文献

- 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;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) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.

- 6) Improved method for measurement of multi-walled carbon nanotubes in rat lung. Ohnishi M, Suzuki M, Yamamoto M, Kasai T, Kano H, Senoh H, Higashikubo I, Araki A, Fukushima S. J Occup Med Toxicol. 2016 Sep 15:11:44.

G. 研究発表 (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. 112(6): 2185–2198, 2021
- Maeno A., Sakamoto Y., Hojo M., Tada Y., Suzuki J., Inomata A., Moriyasu T., Hirose A., Kemuriyama N., Miyajima K., Nakae D. A case of spontaneous Zymbal's gland carcinoma with lung metastasis in an aged Fischer 344 rat. J Toxicol Pathol. (4):353-358, 2021
- Tada Y., Hojo M., Yuzawa K., Nagasawa A., Suzuki J., Inomata A., Moriyasu T., Nakae D. Iron oxide nanoparticles exert inhibitory effects on N-Bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN)-induced lung tumorigenesis in rats. Regul Toxicol Pharmacol. 128:105072, 2022.

(学会発表)

前野 愛, 北條 幹, 坂本 義光, 湯澤 勝廣, 長谷川 悠子, 長澤 明道, 生嶋 清美, 平松 恭子, 海鉾 藤文, 山本 行男, 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: 多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の2年間ラット気管内反復投与試験における投与器具の違いによる毒性の比較: 1年経過時点での報告. 第48回日本毒性学会学術年会、神戸/ハイブリッド (2021. 7. 7-9)

雑賀 絢, 北條 幹, 生嶋 清美, 前野 愛, 武藤 千恵子, 中村 麻里, 海鉾 藤文, 坂本 義光, 湯澤 勝廣, 長澤 明道, 山本 行男, 田中 和良, 安藤 弘, 大貫 文, 五十嵐 剛, 秋山 美乃里, 牧 倫郎, 島田 知子, 鈴木俊也, 鈴木 仁, 猪又 明子, 守安 貴子: マウス吸入曝露試験による硫酸アンモニウムの喘息増悪影響の評価. 第62回大気環境学会年会、オンライン (2021. 9. 15-17)

北條 幹、ラット反復気管内投与による多層カーボンナノチューブの発がん性評価手法の検討. 日本薬学会第142年会、オンライン (2022. 3. 26)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

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

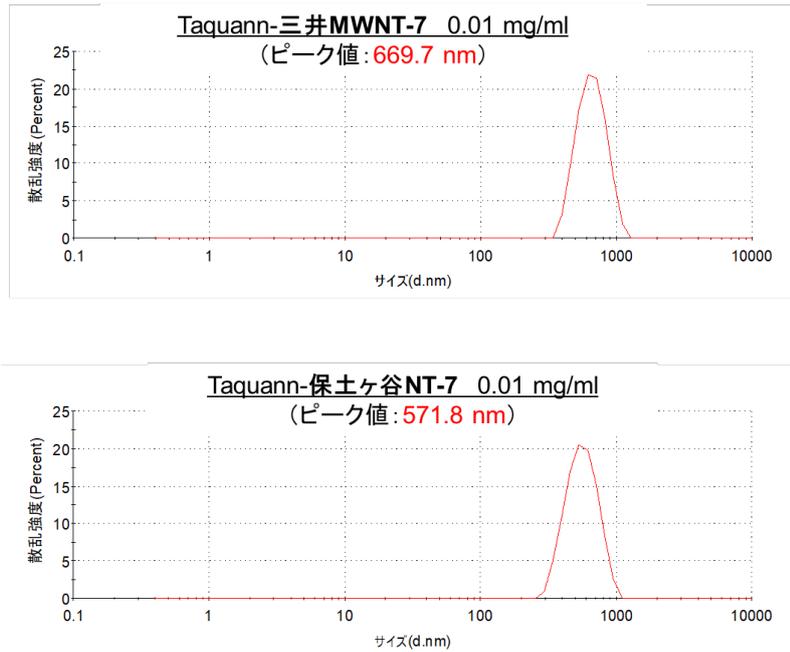


図 1. MWNT-7 の投与用分散液の DLS 測定結果
(三井製 MWNT-7 と保土ヶ谷製 NT-7 の比較)

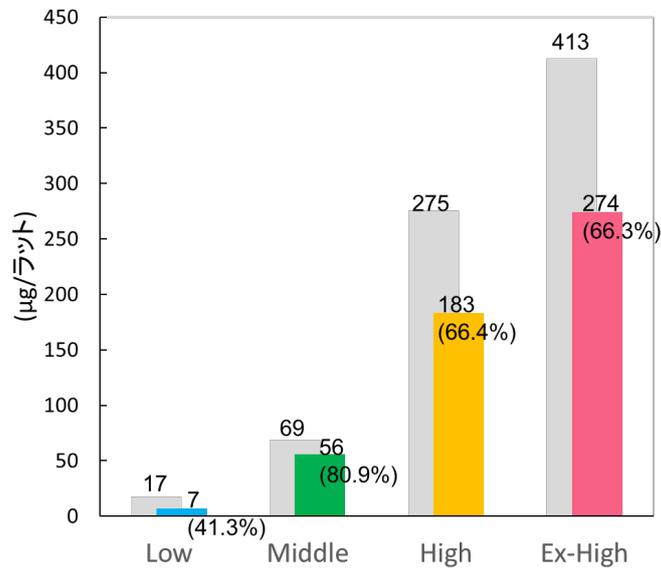


図 2. 予備試験 (4 回投与) における投与総量 (灰色) と肺負荷量の測定結果

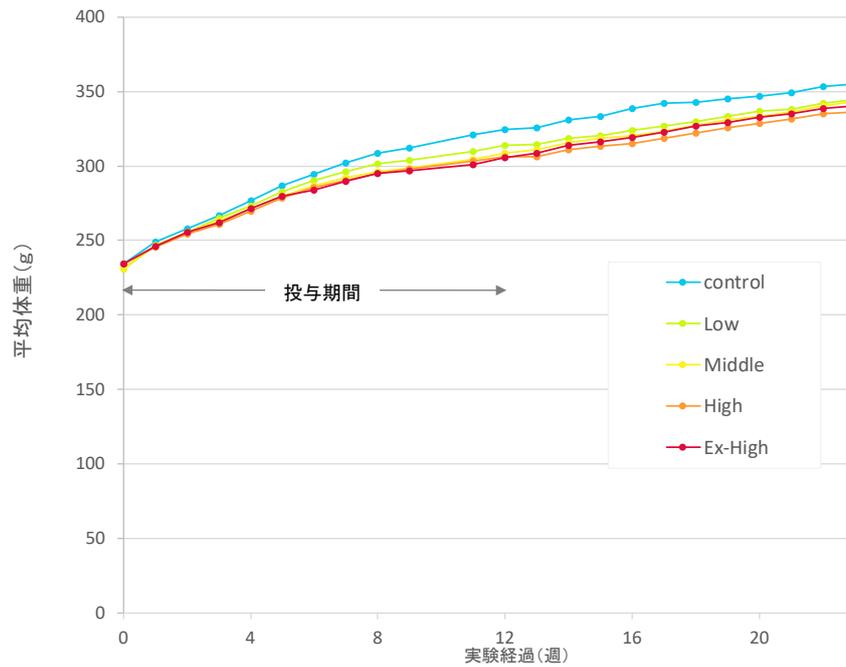


図 3. 本試験における体重推移（年度末時点）
投与 11 週目は欠測

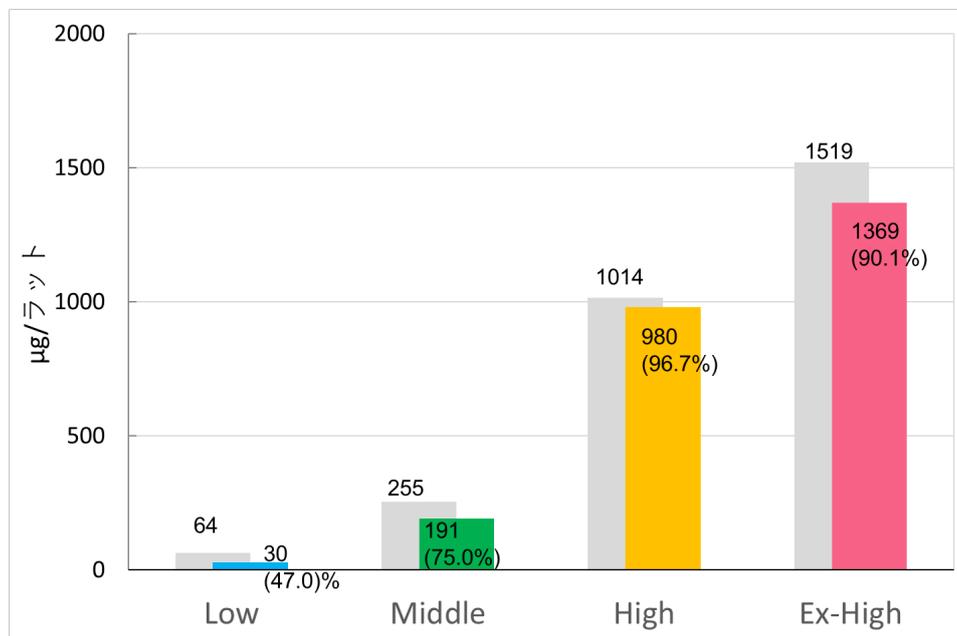


図 4. 本試験（13回投与）における投与総量（灰色）と肺負荷量の測定結果

令和3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：ナノマテリアル吸入曝露影響評価のための効率的慢性試験法の開発に関する研究

分担研究課題名：ナノマテリアルの短期気管内投与評価手法に関する研究

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 研究員

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

高橋 祐次 国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター・室長

魏 民 大阪市立大学大学院医学研究科分子病理学 准教授

鶴岡 秀志 信州大学先端領域融合研究群 先鋭材料研究所 教授

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）線維の気管支と肺における毒性・発がん性について、当研究室が開発してきた経気管肺内噴霧投与（TIPS法）による試験研究を実施した。

方法：F344雄ラットを用いて長さが1.5、7.0および15 μ mに調整作製したDWCNTを体重300gラット1匹あたりの投与本数 22×10^{12} 本となるように調整して投与した。陽性対照としてMWCNT-7を0.5mg/ラット、対照は無処置と分散剤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週（開始後6週）と104週後に屠殺し、肺と胸膜中皮の炎症程度と腫瘍発生について解析した。

結果：6wの肺胞炎症程度は長さに相関した。104wの肺腫瘍（adenoma+carcinoma）の発生頻度においてDWCNTの長さとの相関は見られなかったが、3種の線維長群の合計の頻度において、無処置群および分散剤群（共に腫瘍発生なし）と比べて有意の増加（9/32、 $P < 0.05$ ）が見られた。また、MWCNT-7では悪性中皮腫（malignant mesothelioma）が有意に発生した（11/13、 $P < 0.001$ ）であり、胸膜中皮に対して強い発がん性を示すことが再確認された。

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の範囲では発がん性があるが、頻度に線維長との相関はなかった。またMWCNT-7はこの条件では胸膜中皮に強い発がん性を示すことが再確認された。

A. 研究目的

カーボンナノチューブの長さや肺障害性及び発がん性との関連について解析する目的で、長さ 1.5、7.0 および 15 μm 長さの 2 層カーボンナノチューブ (DWCNT) を MWCNT-7 との比較において、当該研究室が開発してきた線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

F344 雄ラットを用いて製造時の長さが 1.5、7.0 および 15 μm の DWCNT をラット 1 匹当たり投与本数は 22×10^{12} 本/ラットとなるように調整して、投与は 2 週間に 8 回 TIPS 投与した。陽性対照として MWCNT-7 は 0.5mg/ラットとした。対照群は無処置及び溶媒 vehicle (0.5% poloxamer 188 solution) (P5556; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) とした (1 群 10 ~ 13 匹)。DWCNT と MWCNT-7 は Taquan 法にて分散して t-ブチルアルコールにて凝集を防いで凍結保存し、投与直前に室温にて凍結乾燥させて、溶媒に加えて超音波分散させて用いた。

C. 結果

- 1) 6 週屠殺群 (各群 3 ~ 5 匹) を除き、75 週生存以上生存動物を有効数とした。1 群 8 ~ 13 匹であった。
- 2) Vehicle 中の各線維状凝集体の長さは 1.5 μm は 4 μm ; 7.0 μm は 6 μm ; 15 μm は 10 μm であったが群間の有意差はなかった。
- 3) 投与終了 6 w では肺胞肉芽形と増殖細胞核マーカー PCNA ラベル率は長さ按比例して 15 μm で最も高く、ついで 7 μm 、1.5 μm は最少であった。
- 4) 肺胞上皮腫 (adenoma+carcinoma) と胸膜中皮悪性中皮腫の発生頻度:

長さが 1.5 μm は 4/13; 7.0 μm は 3/8*; 15 μm は 2/11、3 線維長群の合計頻度は 9/32***であった。これらに前がん病変の過形成を加えると 23/32***であった (対・対照 * $P < 0.05$ 、*** $p < 0.001$)。すなわち、7 μm および 1.5、7.0、15 μm の合計の頻度において対照群より有意の増加を示したが線長間には有意差はなかった。

5) MWCNT-7 群では、肺胞上皮腫 (が 2/13 (有意差なし)、悪性中皮腫発生は 11/13 ($P < 0.001$) であった。

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)。DWCNT の 1.5 μm 長さでも発がんが見られ、単に短い線維に発癌性がないという推察は必ずしも成立しないと考えられた (実験モデルが異なるのでそのまま当てはめることは難しいが)。また、有意差は 7.0 μm の ($p < 0.05$) であったが、他の長さ 1.5 と 15 μm 群と併せた合計頻度では有意差が示され、この「長さの範囲の意 DWCNT には発がん性のある可能性が示された。MWCNT-7 の胸膜中皮における強い発がん性が再確認された。

E. 結論

本研究において DWCNT は肺腫瘍 (adenoma+carcinoma) の発生において製造時の長さが 7 μm および 1.5、7.0、15 μm の合計の頻度において対照群より有意の増加を示したが線長間には有意差はなかった。すなわち発がん性においては長さによる差異はないことが判った。

F. 研究発表

1. 論文発表
- 1) Tanaka H., Gunasekaran S., Saleh D.,

- Alexander TW, Alexander DB., Ohara H., Tsuda H. Effects of oral bovine lactoferrin on a mouse model of inflammation associated colon cancer. *Biochem. Cell Biol.* 99:159-165 (2021).
- 2) Wang Qiqi, Wang Qiong, Zhao Z., Fan J., Qin L., Alexander DB., Tsuda H., Zhao D and Xu J. Surfactant Proteins A/D-CD14 on Alveolar Macrophages Is a Common Pathway Associated With Phagocytosis of Nanomaterials and Cytokine Production. *Frontiers in Immunology*, 12: 1-13 (2021) doi: 10.3389/fimmu.2021.758941
3. Dina Mourad Saleh, Omnia Hosny Mohamed Ahmed, David B. Alexander, William T. Alexander, Hiroshi Takase, Makoto Ohnishi, Susumu Tomono, Jun Kanno, Akihiko Hirose, Satoru Takahashi, Hiroyuki Tsuda Two-Year study for the Assessment of the carcinogenic and toxic effect of double walled carbon nanotubes in the rat lung after intratracheal instillation *Society of Toxicology, San Diego* (2022 年 3 月)

2. 学会発表

1. Dina Mourad Saleh, Shengyong Luo, David B. Alexander, Ahmed M. EL-Gazzar, Mohammed Abdelgaied, Omnia Hosny Mohammed, William T Alexander, Sivagami Gunasekaran, Takamasa Numano, Hiroshi Takase, Makoto Ohnishi, Satoru Takahashi, Hiroyuki Tsuda Comparative toxicity and carcinogenicity pulmonary study of double walled carbon nanotubes (DWCNT) with multi walled carbon nanotubes-7 (MWCNTS -7) in rat model. 第48回日本毒性学会学術年会、神戸 (2021年 7 月)
2. Dina Mourad Saleh, Omnia Hosny Mohamed Ahmed, David B. Alexander, William T. Alexander, Sivagami Gunasekaran, Takamasa Numano, Hiroshi Takase, Makoto Ohnishi, Satoru Takahashi, Masako Yudasaka, Ryota Yuge, Hiroyuki Tsuda Short term pulmonary toxicity study of carbon nano-horns (CNH) and carbon nano-brushes (CNB) using intra tracheal method 日本毒性病理学会, 神戸 (2022 年 1 月)

H.知的財産所有権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

令和3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:ナノマテリアル吸入曝露影響評価のための効率的慢性試験法の開発に関する研究
(21KD2004)

分担研究課題名:曝露したナノマテリアルの体内分布に対するリンパ系の役割に関する研究

研究分担者:渡部 徹郎 東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 教授

研究協力者:小林 美穂 東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 助教

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

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:高橋 祐次 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 室長

研究要旨

ナノマテリアルの産業応用が進展する中、健康被害の防止のために、ヒトで想定される曝露経路に即した動物実験により、曝露したナノマテリアルがどのようにして体内に分布し、上皮間葉移行(EMT)や内皮間葉移行(EndoMT)の誘導を介して肺組織を変容させていくかについて時空間的な解析をする必要がある。

本分担研究では、曝露したナノマテリアルの体内分布に対するリンパ系の役割を明らかにすることを目的として、リンパ管内皮細胞を遺伝学的に蛍光タンパク質で標識した Prox1-GFP トランスジェニックマウスに対して、ナノマテリアルの吸入曝露実験を実施した。ナノマテリアルの吸入曝露を行ったマウスの肺組織においては、線維化のマーカである SM22 α と α SMA の発現と、EMT 誘導を介して線維化を引き起こす TGF- β の受容体 (TGF β -RII) の発現が上昇することが明らかとなった。肺の微小環境における TGF- β は肺胞上皮細胞の EMT を誘導するのみならず、血管やリンパ管内皮細胞の EndoMT を誘導することが報告されている。今回 EndoMT レポーター細胞を TGF- β 存在下で培養した細胞から、間葉系細胞マーカーである α SMA を発現する細胞 (EndoMT が誘導された細胞) が出現することを見出した。また、EndoMT が誘導された細胞においては、内皮細胞マーカーである VEGFR2 の発現が維持されている細胞 (部分的 EndoMT が誘導されている細胞) と VEGFR2 発現が消失している細胞 (完全に EndoMT が誘導されている細胞) が存在することを明らかにし、それぞれの細胞画分を FACS ソーティングし、EndoMT が段階的に進行していることを見出した。

今後、Prox1-GFP マウスを用いて曝露したナノマテリアルの体内分布におけるリンパ系の関与を明らかにしつつ、肺組織の変化を EMT と EndoMT を中心に検討する。

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に、ナノマテリアル吸入曝露による影響を評価するための効率的な慢性試験法を開発することは急務である。そのためにはヒトで想定される曝露経路に即した動物実験により、曝露したナノマテリアルがどのようにして体内に分布していくか時空間的な解析をする必要がある。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、曝露したナノマテリアルが肺胞から脈管系に移行していくことがこれまでの研究によって明らかとなっている。リンパ管は肺を含む全身に分布しており、末梢組織における体液や老廃物を汲み出し、末梢リンパ管から集合リンパ管・リンパ節を介して静脈へと還流することで全身の体液の恒常性維持に重要な役割を果たしている。しかし、ナノマテリアルの体内分布の変化におけるリンパ系の役割については未解明な部分が多い。

本分担研究では、曝露したナノマテリアルの体内分布に対するリンパ系の役割を明らかにすることを目的として、これまで観察が困難であったリンパ管をリンパ管内皮細胞特異マーカーである Prox1 遺伝子のプロモーターにより緑色蛍光タンパク質 (GFP) を発現するトランスジェニックマウス (Prox1-GFP マウス: 参考文献参照) に対して、ナノマテリアルの吸入曝露実験を実施した。

さらに、血管内皮細胞を遺伝学的に蛍光タンパク質で標識したトランスジェニックマウス (血管レポーターマウス: Cdh5-BAC-CreERT2-ROSA-lox-stop-lox-tdTomato-SMA-GFP) マウスから樹立した内皮間葉移行 (EndoMT) レポーター細胞を用いて、肺胞上皮細胞の上皮間葉移行 (EMT) の誘導因子である TGF- β の作用を検討した。

B. 研究方法

本年度では、東京医科歯科大学において

飼育していた Prox1-GFP マウスに対してナノマテリアルの全身曝露実験を行うために、三協ラボサービスにおいて繁殖を行った上で国立医薬品食品衛生研究所へと移動した。Prox1-GFP マウスの genotyping は定法に従って行い、PCR には下記のプライマーを用いた。

Prox1-GFP-F: GATGTGCCATAAATCCCAGAG CCTAT

Prox1-GFP-R: GGTCGGGGTAGCGGCTGAA

吸入曝露実験の検体は多層カーボンナノチューブ (NT-7) を用いた。対照群 (Ctrl 群、清浄空気のみ: 5 頭)、曝露群 (NT-7 群: 25 頭) の 2 群構成とした。Taquann 全身曝露吸入装置 Ver.3.0 を使用し、1 日 6 時間 (10:00~16:00) の全身曝露吸入を単回行った。

肺組織のサンプリングは曝露開始後 0 日・1 日・3 日・6 日・14 日後に行った。左肺は免疫組織染色用に、右肺は RNA 抽出用に採取した。今年度は、本分担研究において、肺組織における遺伝子発現変化を検討するために線維化のマーカーならびに TGF- β 受容体の発現を定量的 RT-PCR を施行することで検討した。組織からの RNA 抽出ならびに定量的 RT-PCR は定法に従って行い、PCR には下記のプライマーを用いた。

α SMA-F: AGCGTGAGATTGTCCGTGACAT

α SMA-R: GCGTTCGTTTCCAATGGTGA

SM22 α -F: GTGTGGCTGAAGAATGGTGTGA

SM22 α -R: GCCACCTGTTCCATCTGCTTAA

TGF β -RII-F: AGCGGCCAGAAGTTTGTCTA

TGF β -RII-R: ATGGCCGAGGTTACAGACAC

EndoMT レポーター細胞を TGF- β 存在下で 72 時間培養し、内皮細胞由来の細胞を標識する蛍光タンパク質である tdTomato、間葉系細胞を標識する GFP、そして内皮細胞を標識する VEGFR2 に対する抗体で FACS ソーティングし、用いて、肺胞上皮細胞の上皮間葉移行 (EMT) の誘導因子である TGF- β の作用を α SMA などの間葉系細胞のマーカーの発現を定量的 RT-PCR で測定することで検討した。

C. 研究結果

これまでの報告により、ナノマテリアルの吸入曝露により肺組織における炎症応答が起こり、線維化が誘導されることが明らかとなっている。そこで、今回の吸入曝露が線維化のマーカーである SM22 α ならびに α SMA の発現に与える影響を検討したところ、曝露開始後 3 日後までは対照群比較して有意な変化はなかったが、曝露 7 日後で両マーカーの発現がナノマテリアル吸入曝露により上昇することが示された(図 1)。また、肺胞上皮細胞の EMT を誘導することで線維化を誘導する TGF- β の受容体 (TGF β -RII) の発現を検討したところ、曝露直後に上昇することが明らかとなった(図 1)。

肺の微小環境における TGF- β は肺胞上皮細胞の EMT を誘導するのみならず、血管やリンパ管内皮細胞の EndoMT を誘導することが報告されている。EndoMT レポーター細胞を TGF- β 存在下で培養した細胞から、間葉系細胞マーカーである α SMA を発現する細胞 (EndoMT が誘導された細胞) が出現することを見出した。また、EndoMT が誘導された細胞においては、内皮細胞マーカーである VEGFR2 の発現が維持されている細胞 (部分的 EndoMT が誘導されている細胞) と VEGFR2 発現が消失している細胞 (完全に EndoMT が誘導されている細胞) が存在することを明らかにし、それぞれの細胞画分を FACS ソーティングし、EndoMT が段階的に進行していることを見出した(図 2)。

D. 考察

本分担研究では Prox1-GFP マウスに対して

ナノマテリアルの吸入曝露を行い、経時的に解剖を行った上で、組織免疫染色ならびに定量的 RT-PCR を行うためのサンプルを採取した。定量的 RT-PCR の結果からナノマテリアルの全身曝露により肺組織の線維化が誘導され、その原因として TGF- β シグナルが惹起されている可能性が推察された。ただ、実際に TGF- β シグナルが活性化されているかについては他のシグナル因子などの発現も検討する必要がある。また今後、線維化を誘導する要因として、炎症性シグナルが活性化されているか検討するために、IL-1 などの炎症性サイトカインの発現を検討することを計画している。

現在、病理組織標本を作製中であるが、ナノマテリアルの体内分布がどのように変化するかを検討する必要がある。さらに Prox1-GFP マウスを用いる利点を活かすために、今後の解析においては採取した肺組織を透明化処理して 3 次元で観察することも有用であると考えられる。

また、EndoMT レポーター細胞を用いた検討により、EndoMT の段階的な進行を検出できることを見出した。今後、この実験系を用いて、部分的 EndoMT が誘導されている細胞において発現している EndoMT 誘導する制御因子を同定していくことを計画している。

E. 結論

ナノマテリアルの吸入曝露をリンパ管の可視化が可能な Prox1-GFP マウスに対して行い、肺組織において線維化が経時的に進行していることを確認した。今後、この実験系を用いて曝露したナノマテリアルがどのようにして体内に分布するかを観察するとともに、

リンパ系の関与を検討する。また、EndoMT レポーター細胞を用いることにより、EndoMT 制御因子の同定を試みる。

F. 参考文献

Choi I, Chung HK, Ramu S, Lee HN, Kim KE, Lee S, Yoo J, Choi D, Lee YS, Aguilar B et al. (2011) Visualization of lymphatic vessels by Prox1-promoter directed GFP reporter in a bacterial artificial chromosome-based transgenic mouse. *Blood* 117, 362–365.

G. 研究発表

1. 論文発表

Yoshimatsu Y, Watabe T. Emerging roles of inflammation-mediated endothelial-mesenchymal transition in health and disease. *Inflamm Regen*. 2022 Feb 7;42(1):9.

Ikami Y, Terasawa K, Sakamoto K, Ohtake K, Harada H, Watabe T, Yokoyama S, Hara-Yokoyama M. The two-domain architecture of LAMP2A regulates its interaction with Hsc70. *Exp Cell Res*. 2022 Feb 1;411(1):112986.

Inubushi T, Fujiwara A, Hirose T, Aoyama G, Uchihashi T, Yoshida N, Shiraishi Y, Usami Y, Kurosaka H, Toyosawa S, Tanaka S, Watabe T, Kogo M, Yamashiro T. Ras signaling and its effector RREB1 are required for the dissociation of MEE cells in palatogenesis. *Dis Model Mech*. 2022 Feb 1;15(2):dmm049093.

Asano Y, Okano D, Matsusaki M, Watabe T, Yoshimatsu Y, Akashi M, Shimoda H. Construction of transplantable artificial vascular tissue based on adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells by a cell coating and cryopreservation technique. *Sci Rep*. 2021 Sep 9;11(1):17989.

Kodama S, Podyma-Inoue KA, Uchihashi T,

Kurioka K, Takahashi H, Sugauchi A, Takahashi K, Inubushi T, Kogo M, Tanaka S, Watabe T. Progression of melanoma is suppressed by targeting all transforming growth factor- β isoforms with an Fc chimeric receptor. *Oncol Rep*. 2021 Sep;46(3):197.

Nishino K, Yoshimatsu Y, Muramatsu T, Sekimoto Y, Mitani K, Kobayashi E, Okamoto S, Ebana H, Okada Y, Kurihara M, Suzuki K, Inazawa J, Takahashi K, Watabe T, Seyama K. Isolation and characterisation of lymphatic endothelial cells from lung tissues affected by lymphangioliomyomatosis. *Sci Rep*. 2021 Apr 16;11(1):8406.

Terasawa K, Kato Y, Ikami Y, Sakamoto K, Ohtake K, Kusano S, Tomabechi Y, Kukimoto-Niino M, Shirouzu M, Guan JL, Kobayashi T, Iwata T, Watabe T, Yokoyama S, Hara-Yokoyama M. Direct homophilic interaction of LAMP2A with the two-domain architecture revealed by site-directed photo-crosslinks and steric hindrances in mammalian cells. *Autophagy*. 2021 Apr 14:1-19.

2. 学会発表

Tetsuro Watabe. Roles of signaling and transcriptional networks during maintenance of vascular systems. 第44回日本分子生物学会 2021.12.02 Yokohama

Tetsuro Watabe. Roles of TGF- β family signals during progression of oral cancer.. 13th BMP Conference 2021.10.27 web

Yasuhiro Yoshimatsu, Kentaro Maeda, Naoya Takahashi, Ikumi Wakabayashi, Shiori Kimuro, Kazuki Takahashi, Miho Kobayashi, Katarzyna A. Inoue, Masanori Hirashima, Kohei Miyazono, Tetsuro Watabe . Role of an ETS family transcription factor in endothelial mesenchymal transition (EndoMT)-driven EMT. 第80回日本癌学会学術総会 2021.10.01

Katarzyna A. Inoue, Kazuki Takahashi, Sakakitani Shintaro, Daizo Koinuma, Akinari Sugauchi, Maki Saito, Atsushi Kaida, Yasuhiro Yoshimatsu, Toshihiro Uchihashi, Masahiko Miura, Kohei Miyazono, Tetsuro Watabe. Activation of epithelial-mesenchymal transition program in oral cancer cells under TGF- β -induced cell cycle arrest. TGF- β Superfamily Conference: Signaling in Development and Disease (FASEB) 2021.07.20

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

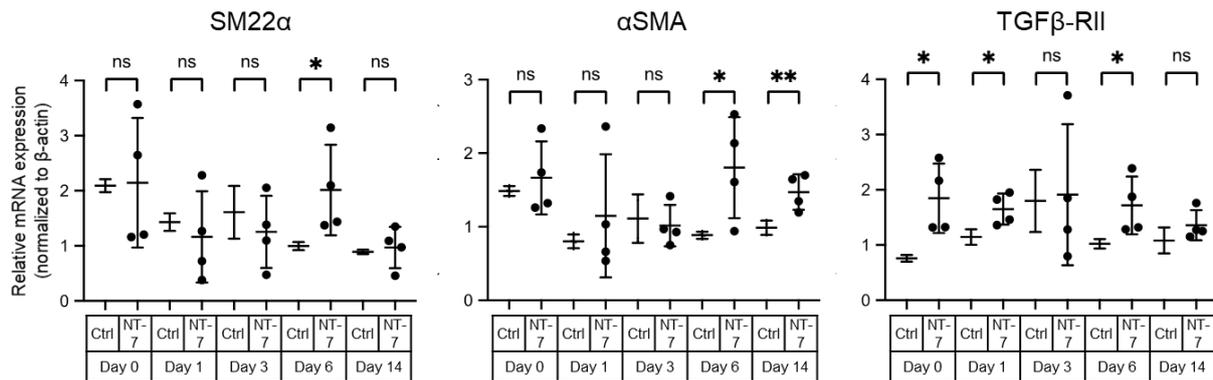


図1 ナノマテリアル吸入曝露した Prox1-GFP マウスの肺における遺伝子発現の変化の検討
 ナノマテリアル(NT-7)を吸入曝露(単回 6 時間)した Prox1-GFP マウスから曝露後 0 日・1 日・3 日・6 日・14 日後に肺組織をサンプリングし、定量的 RT-PCR を施行した。線維化のマーカーである SM22 α ならびに α SMA の発現と、線維化誘導シグナルとなる TGF- β の受容体 (TGF β -RII) の発現がナノマテリアル吸入曝露により上昇することが明らかとなった。

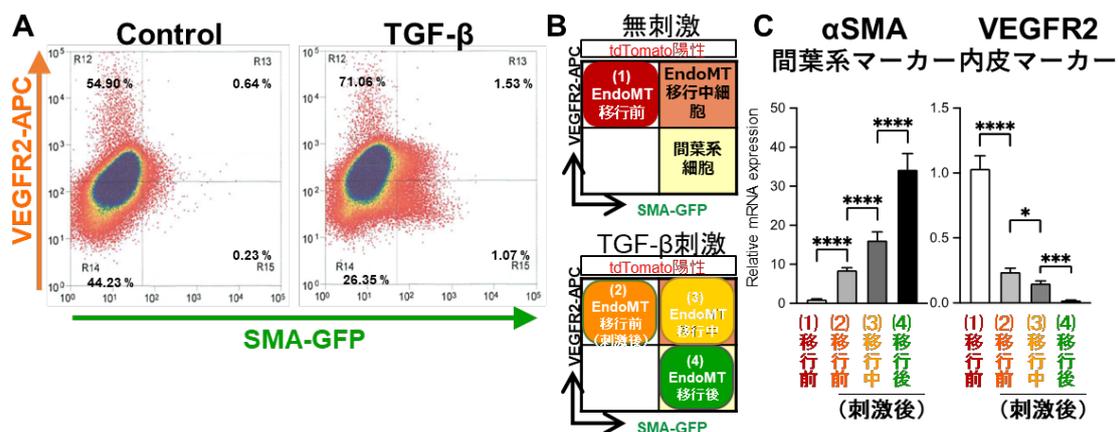


図2. EndoMT レポーター細胞を用いた EndoMT 遷移状態の同定

(A) EndoMT レポーター細胞を TGF- β 刺激すると VEGFR2 の発現が低下し、SMA-GFP の発現が上昇する EndoMT が多段階で誘導される細胞が観察される。(B, C) EndoMT の遷移状態を TGF- β 刺激した EndoMT レポーター細胞を FACS 分画することで解析した。EndoMT の進展とともに α SMA の発現が上昇し、VEGFR2 の発現が段階的に減少することが見出された。

令和3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	
	大塚 邦紘	徳島大学大学院医歯薬学研究部	
	木野 倫子	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	
	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。本年度の研究は、昨年度の長期曝露（24ヶ月）における免疫制御システムへの影響評価に加えて、新たなカーボンナノチューブであるNT-7の短期曝露実験を実施した。さらに、*in vitro*でのRAW264.7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肺胞マクロファージの活性化が継続していることがわかった。一方で、Taquan処理されたNT-7の短期吸入曝露によって、減少した肺胞マクロファージは曝露後4週で回復することが判明し、MMP-12あるいはCD54を介した肺胞マクロファージの活性化が短期試験においても確認された。また、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、マクロファージを起点として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

ナノマテリアルの曝露による免疫系への影響に関しては、カーボンナノチュ

ーブの吸引による肺胞マクロファージの活性化を検討した研究がよく知られている。さらに、カーボンナノチューブ

の吸入暴露により、T細胞のマイトージェンに対する反応性が低下し、NK活性に関してもカーボンナノチューブ暴露により抑制されることが報告されている。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に関して不明な点が多い。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) の長期暴露による肺における免疫系への影響に関して、暴露から24ヶ月後の昨年度の報告できなかった点について解析を実施した。また、NT-7の短期暴露による肺免疫の変化について検討した。加えて、MWCNTの*in vitro* および*in vivo*での線維化の分子機構について検討を進めた。

B. 研究方法

・マウスへの吸入暴露

MWCNT 長期暴露実験：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。

NT-7 短期暴露実験：12 週齢の C57BL/6 (B6) (雄) を用い、各群 5 匹ずつで NT-7 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、暴露後 0、7、14 および 28 日後において適切に屠殺後解析を行った。

・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、染色後固定した上で解析した。

・ *In vitro* 実験系

マウス単球細胞株 RAW264.7 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

BALF 細胞、肺組織、培養系の細胞からの RNA 抽出に関して通法に従い全 RNA を抽出後、逆転写反応により cDNA を得た。下記のプライマーセットを用いて、PCR 反応によって各遺伝子 mRNA を定量化した。転写レベルは 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)を用いた。

MMP12; forward, 5'-TGTTTCAAGGAGATGCACATTT-3', reverse, 5'-GGTTTGTGCCTTGAAAACCTTTAGT-3', F4/80: forward, 5'-CTTTGGCTATGGGCTTCCAGTC-3', and reverse, 5'-GCAAGGAGGACAGAGTTTATCGTG-3'; MARCO, forward, 5'-

AGAAAGGGAGACTGGAAGC-3', and reverse, 5'-CCTCTGGAGTAACCGAGCAT-3'; SRB1, forward, 5'-GGCTGCTGTTTGTCTGCG-3', and reverse, 5'-CTGCTTGATGAGGGAGGG-3'; Cox2, forward, 5'-AGGAGACATCCTGATCCTGGT-3' β -actin; forward, 5'-GTGGCCGCTCTAGGCACCA-3', and reverse, 5'-CGGTTGGCCTTAGGGTTCAGGGGG-3'。

・MWCNT の腹腔内投与実験:雄 B6 マウス(10 週齢)に腹腔内に 0、1、10 μ g(1 匹あたり)の Taquann 処理済みの MWCNT を投与し、6~12 ヶ月にて肝臓、脾臓、腹腔内滲出細胞を用いて病理学および免疫学的検討を実施した。さらに、NF- κ B1 遺伝子欠損マウスを用いて MWCNT の腹腔内投与実験を実施した。

<倫理面への配慮>

本研究では、人を対象とした研究、人の遺伝子解析、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

MWCNT 長期暴露実験

2 年間の MWCNT の吸入暴露による肺および全身の免疫系について解析し報告した(R2 報告済み)。今年度は、BALF 細胞を用いた MWCNT の長期暴露による各種遺伝子発現の変動に関して解析した

(図 1)。MMP-12 mRNA 発現は MWCNT の暴露によって BALF 細胞ならびに肺組織において濃度依存的に有意に上昇した(図 2)。さらに、低濃度の MWCNT 暴露によって BALF 細胞における CD54 mRNA 発現の上昇が認められた(図 3)。また、MWCNT 暴露によって BALF 細胞における Cox2 mRNA 発現は有意に上昇した(図 4)。

NT-7 短期暴露実験

図 5 のような実験スケジュールで実施した。NT-7 暴露直後では、BALF 細胞の生細胞の割合は減少し、暴露 4 週では回復することがわかった(図 6)。BALF 細胞数は暴露後、1、2、4 週で対照群に比較して高くなっていた(図 7)。BALF 細胞のサイズに関しては、暴露後、2 週にて NT-7 暴露群で有意に低下していた(図 7)。

NT-7 暴露後の BALF 細胞中の肺胞マクロファージ (Alveolar macrophage:AM CD11c⁺CD11b⁻) に関して、2 週での高濃度暴露群で有意に減少していたが、その他の週で変化はなかった(図 8、9)。また、F4/80⁺ の未熟な単球を含めた割合に関しては、0 週と 2 週で NT-7 暴露によって割合が有意に上昇していることがわかった(図 9)。CD192 (M1 MΦ marker) および CD206 (M2 MΦ marker) によって分化パターンを検討すると、暴露後 2 週での低濃度 NT-7 暴露群で、対照群に比較して有意に M2 MΦ への分化が進んでいた(図 10)。

AM における CD54 および CD163 の発現について検討すると、暴露後 0 週、1 週および 2 週にて NT-7 暴露群で有意に発現が上昇していた(図 11)。なお、CD163

の発現に関して変化は認められなかった(図 11)。

肺組織における MMP-12 mRNA および CD54 mRNA の発現に関して、定量 RT-PCR にて検討すると、暴露後 0 週、1 週、4 週で MMP-12 mRNA の発現が有意に上昇していた(図 12)。CD54 mRNA 発現に関して変化は認められなかった(図 12)。なお、暴露後 2 週のサンプルに関しては、mRNA の採取ができなかった。

脾臓の細胞数、細胞のサイズに関しては、暴露による影響は確認されなかった(図 13)。一方、MΦ の M1/M2 分化を検討すると、CD206 陽性 MΦ の割合が暴露後 0 週で有意に低下していた(図 14)。

頸部のリンパ節の細胞数、細胞のサイズに関しては暴露による影響は認められなかった(図 15)。リンパ節における MΦ の分化パターンに関しては、暴露後 2 週での高濃度群で CD206 陽性細胞の割合が有意に減少していた(図 16)。

MWCNT の腹腔内投与実験

B6 マウスに Taquann 処理をした MWCNT (T-CNT) を腹腔内に投与後、10 ヶ月で線維化を伴う腹膜炎を発症することがわかり(図 17 A~G)、その発症機序に NF-κB を介した MMP-12 の関与が NF-κB 遺伝子ノックアウトマウスを用いて、明らかになった(図 18 A~D)。

さらに、RAW264.7 細胞を用いた *in vitro* の実験で、T-CNT の添加によって直接 MMP-12 mRNA 発現が上昇することが明らかになった(図 19 A~E)。

E. 結論

MWCNT-7の全身吸入の長期暴露(24ヶ月)後のBALF細胞中の肺胞マクロファージの割合が増加するとともに、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。

NT-7の全身吸入による短期暴露実験では、暴露後のBALF細胞は減少し、経時的に回復することがわかった。NT-7吸入暴露によってBALF中の単球および未分化マクロファージが増加することがわかった。また、NT-7吸入暴露によって、肺胞マクロファージはM2マクロファージへの分化が認められた。NT-7吸入暴露によって、CD54陽性肺胞マクロファージが増加した。加えて、肺組織におけるMMP-12 mRNA発現が増加した。NT-7吸入暴露によって、脾臓、頸部リンパ節での免疫担当細胞の分画へは大きな影響はなかったが、M2型マクロファージの肺への動員の可能性が考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Sugiura D, Okazaki I, Maeda TK, Maruhashi T, Shimizu K, Arakaki R, Takemoto T, Ishimaru N, Okazaki T. PD-1 agonism by anti-CD80 inhibits T cell activation and alleviates autoimmunity. *Nat Immunol*. 2022. S1074-7613(22)00136-4.
2. Shikama Y, Kurosawa M, Furukawa M, Kudo Y, Ishimaru N, Matsushita K. The priming potential of interferon lambda-1 for antiviral defense in the oral mucosa. *Inflammation*. 2022. 19:1-14
3. Iwata K, Kawarabayashi K, Yoshizaki K, Yian T, Saito K, Sugimoto A, Kurogoushi R, Yamada A, Yamamoto A, Kudo Y, Ishimaru N, Fukumoto S, Iwamoto T. von Willebrand factor D and EGF domains regulate ameloblast differentiation and enamel formation. *J Cell Physiol*. 2021, 237(3):1964-1979.
3. Chen S, Tamaki N, Kudo Y, Tsunematsu T, Miki K, Ishimaru N, Ito HO. Protective effects of resveratrol against 5-fluorouracil-induced oxidative stress and inflammatory responses in human keratinocytes. *J Clin Biochem Nutr*. 2021. 69(3):238-246.
4. Shao W, Fujiwara N, Mouri Y, Kisoda S, Yoshida K, Yoshida K, Yumoto H, Ozaki K, Ishimaru N, Kudo Y. Conversion from epithelial to partial-EMT phenotype by *Fosobacterium nucleatum* infection promotes invasion of oral cancer cells. *Sci Rep*. 2021, 11(1): 14943.
5. Yoshikawa Y, Izawa T, Hamada Y, Takenaga H, Wang Z, Ishimaru N, Kamioka H. Role of B[a]P and FICZ in subchondral bone metabolism and experimental temporomandibular joint osteoarthritis via AhR/Cyp1a1 signaling axis. *Sci Rep*. 2021, 11(1): 14927
6. 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.
7. 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.
 8. 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.
- ## 2. 学会発表
1. 新垣理恵子, 清水朱里, 佐藤真美, 俵宏彰, 常松貴明, 石丸直澄 唾液腺における常在型自然リンパ球の同定とシェーグレン症候群病態への関与 第110回日本病理学会学術集会 (2021. 4. 23東京)
 2. 佐藤真美, 牛尾綾, 常松貴明, 新垣理恵子, 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 第 110 回日本病理学会学術集会 (2021. 4. 23 東京)
 3. 石丸直澄, 新垣理恵子, 常松貴明, 高橋祐次, 菅野純 ナノマテリアルの吸入暴露による肺免疫応答と線維化の分子機構 第48回日本毒性学会学術年会 (2021.7.9 神戸)
 4. 佐藤真美, 牛尾綾, 福田一稀, 俵宏彰, 大塚邦紘, 常松貴明, 新垣理恵子, 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病態探索 第29回日本シェーグレン症候群学会学術集会 (2021.9.24 ウェブ)
 5. 田村海, 新垣理恵子, 太田康, 石丸直澄 シェーグレン症候群モデルマウスを用いたドライノーズ病態の解析 第29回日本シェーグレン症候群学会学術集会 (2021.9.24 ウェブ)
 6. 俵宏彰, 新垣理恵子, 大塚邦紘, 石丸直澄 シェーグレン症候群モデルマウスを用いた M3PAM を用いた治療効果とその作用機序 第29回日本シェーグレン症候群学会学術集会 (2021.9.24 ウェブ)
 7. 常松貴明, 新垣理恵子, 石丸直澄 HPV 陽性癌細胞の増殖に必須の脱ユビキチン化酵素の同定とその分子メカニズムの解明 第57回口腔組織培養学会学術大会 (2021.11.6 ウェブ)
 8. Arakaki R, Tsunematsu T, Ishimaru N. Pulmonary immune response and molecular mechanism of fibrosis by inhalation exposure to nanomaterials. 第50回日本免疫学会学術集会 (2021.12.9 奈良)

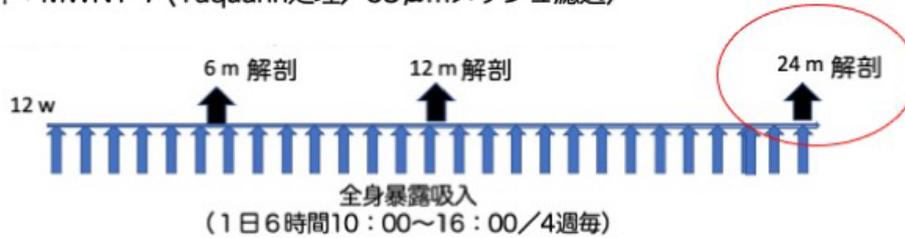
9. Otsuka K, Tsukumo S, Arakaki R, Yagita H, Ishimaru N, Yasutomo K. Single-cell RNA sequencing reveals accumulation of CD4 and CD8 T cells with unique phenotypes in salivary glands of Sjögren's syndrome model mice. 第 50 回日本免疫学会学術集会 (2021.12.9 奈良)
(2020.9)

G. 知的財産権の取得状況

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

図1
実験プロトコール

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

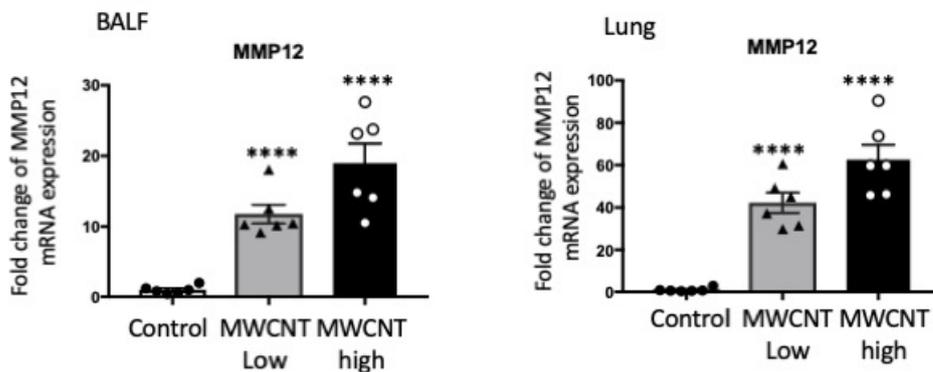


対照群 (清浄空気)
T-CNT7 低濃度群 (3 mg/m³)
T-CNT7 高濃度群 (6 mg/m³)

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

図2

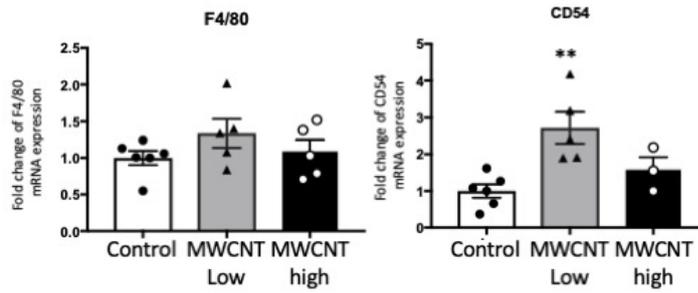
Enhanced MMP12 mRNA expression of BALF cells and lung in MWCNT-7-exposed for 24 months



*p<0.01
****p<0.00001

图3

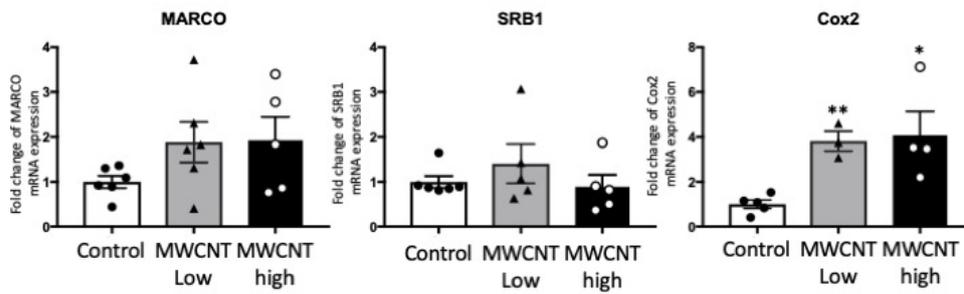
F4/80 and CD54/ICAM1 mRNA expression of BALF cells in MWCNT-7-exposed mice for 24 months



**p<0.01

图4

Scavenger receptors and Cox2 mRNA expression of BALF cells in MWCNT-7-exposed mice for 24 months

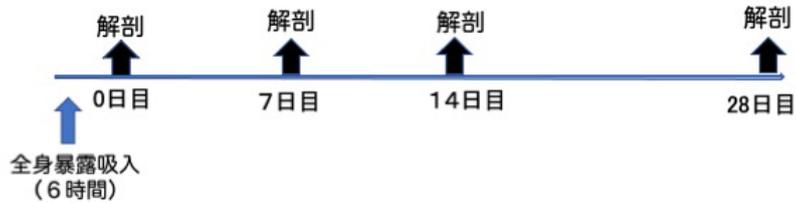


*p<0.05
**p<0.01

図5

Experimental protocol

マウス：C57BL/6NcrSLC ♂
 暴露検体：NT-7 (Taquann処理)

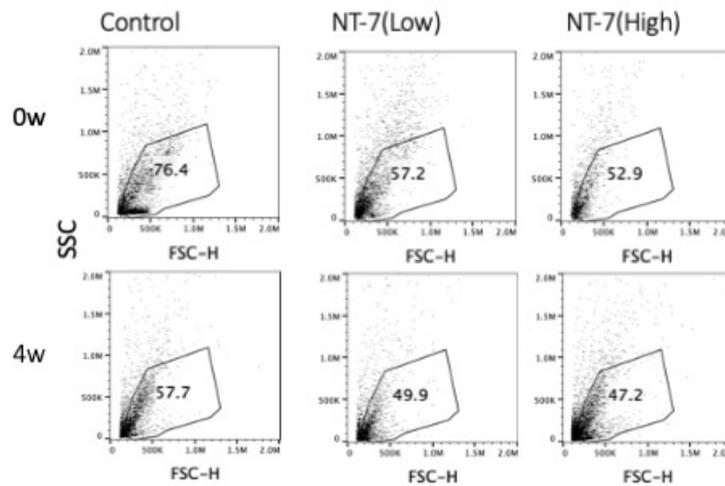


対照群 (清浄空気)
 NT-7 低濃度群
 NT-7 高濃度群

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

図6

Effect of NT-7 exposure on BALF cells



暴露直後はBALF細胞 (生細胞) は減少する。
 暴露後4週では回復。

図7 Effect of NT-7 exposure on BALF cells

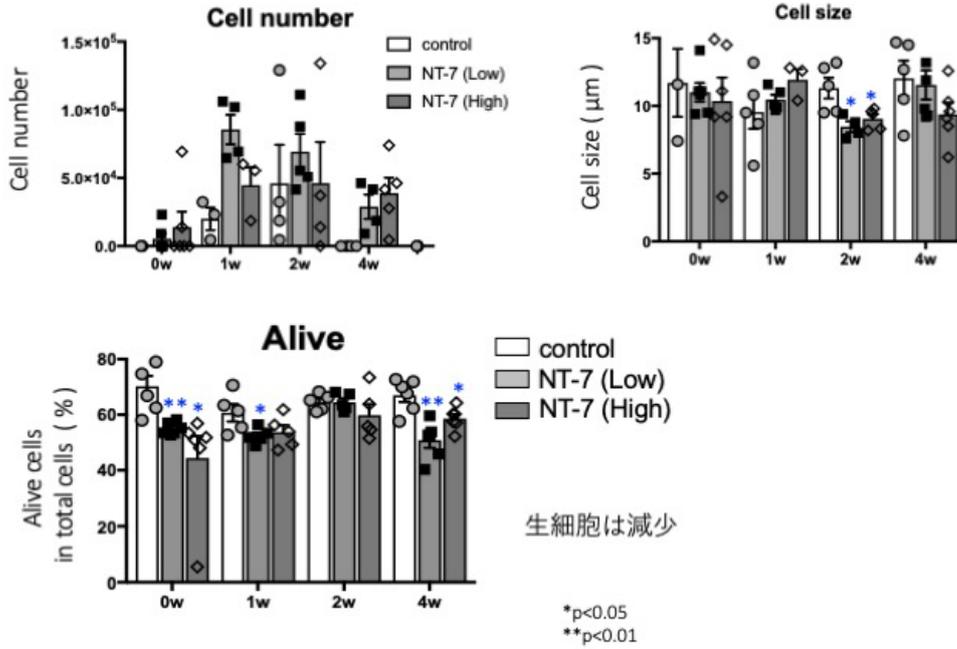


図8 Effect of NT-7 exposure on alveolar macrophages

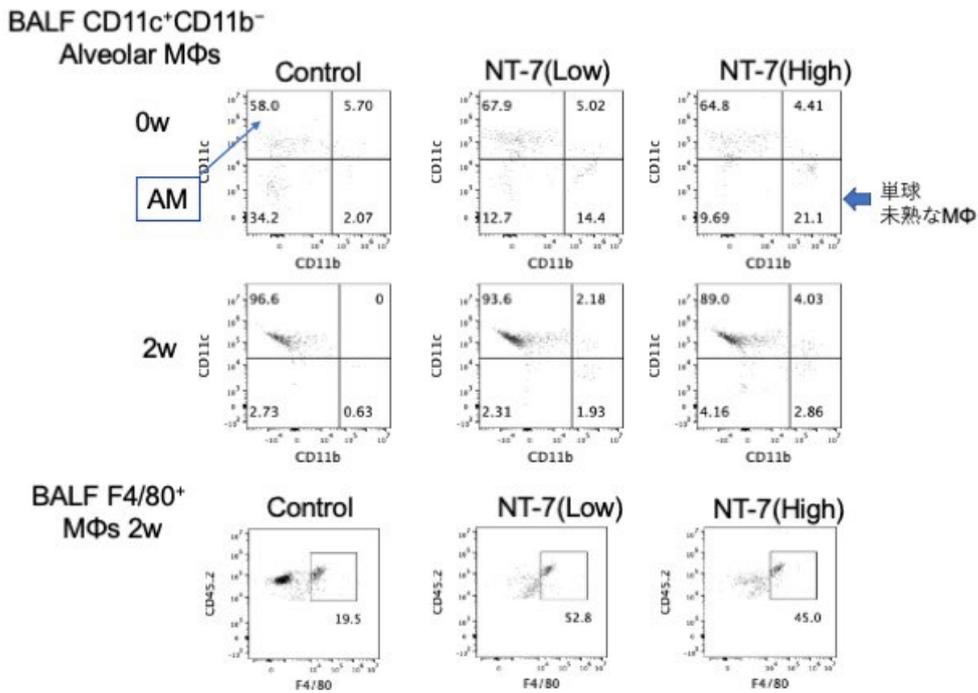
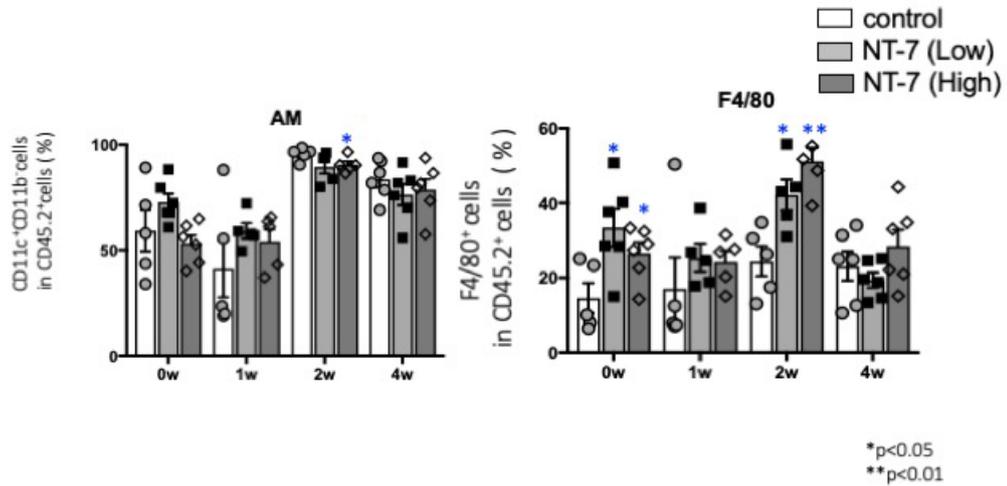


図9

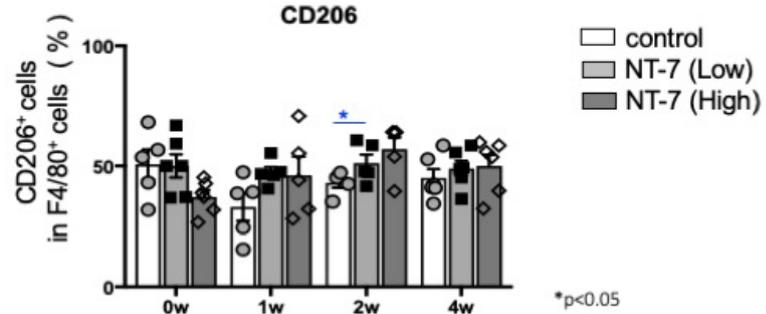
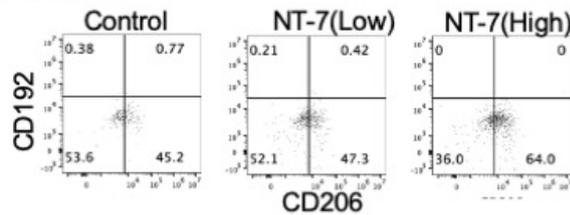
Effect of NT-7 exposure on alveolar macrophages



暴露後に未熟な単球あるいはマクロファージが増加する

図10 Differentiation into M2 macrophage by NT-7 exposure

BALF CD206⁺ MΦs 2w



暴露後2週間でM2 MΦへのシフト

図11 CD54 expression on alveolar macrophages in BALF cells

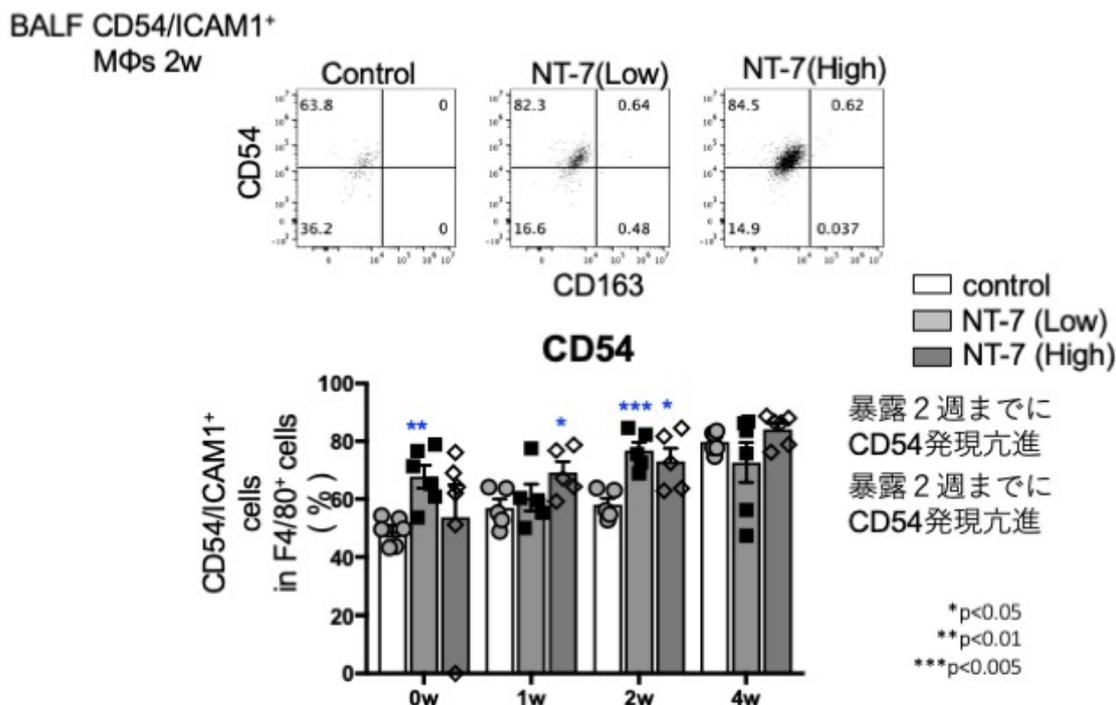


図12 MMP12 and CD54 mRNA expression of lung tissues from NT-7-exposure mice

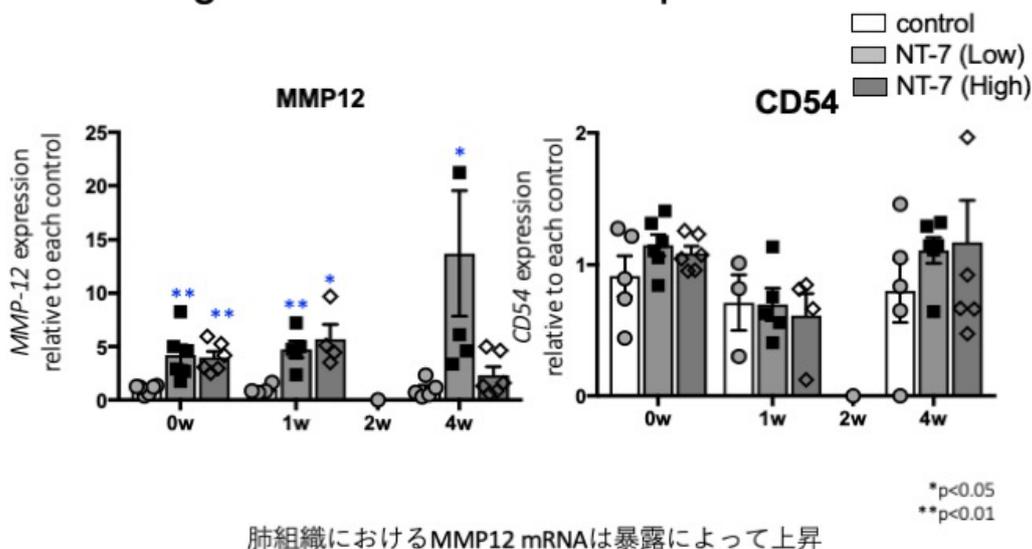


図 13

Effect of NT-7 exposure on spleen cells

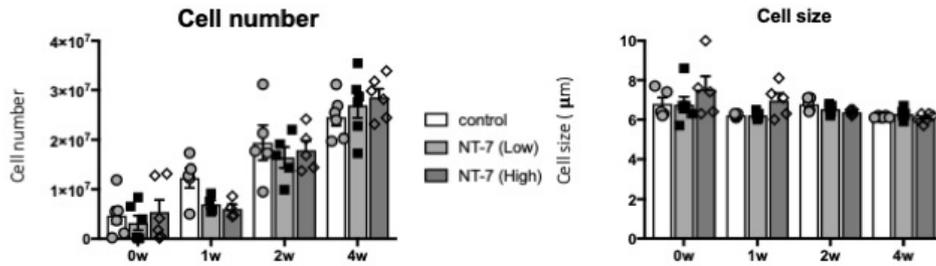
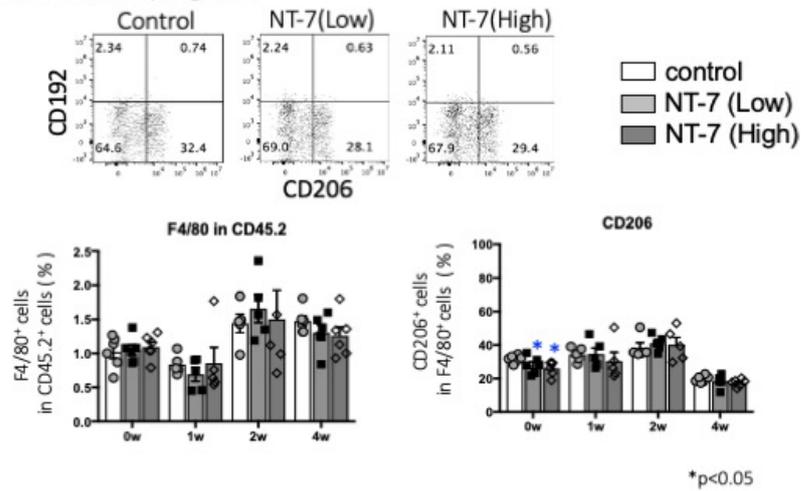


図 14

Effect of NT-7 exposure on spleen macrophages

Sp CD206⁺ macrophages 0w



暴露直後にM2Φの肺への動員?
AMΦではM2へシフト

Figure 15

Effect of NT-7 exposure on lymph node cells

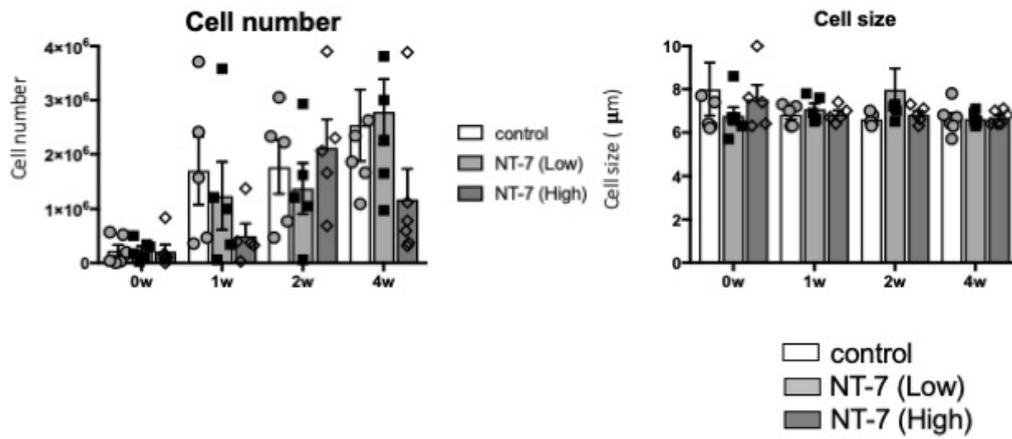
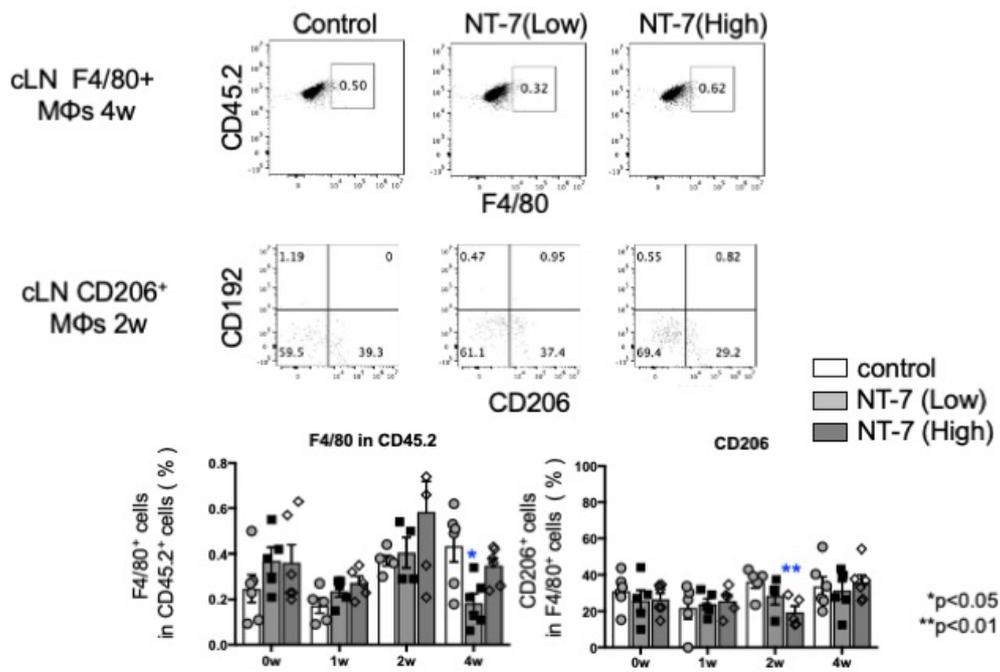


Figure 16 Effect of NT-7 exposure on lymph node cells



Exposure to Multi-Wall Carbon Nanotubes Promotes Fibrous Proliferation by Production of Matrix Metalloproteinase-12 via NF- κ B Activation in Chronic Peritonitis

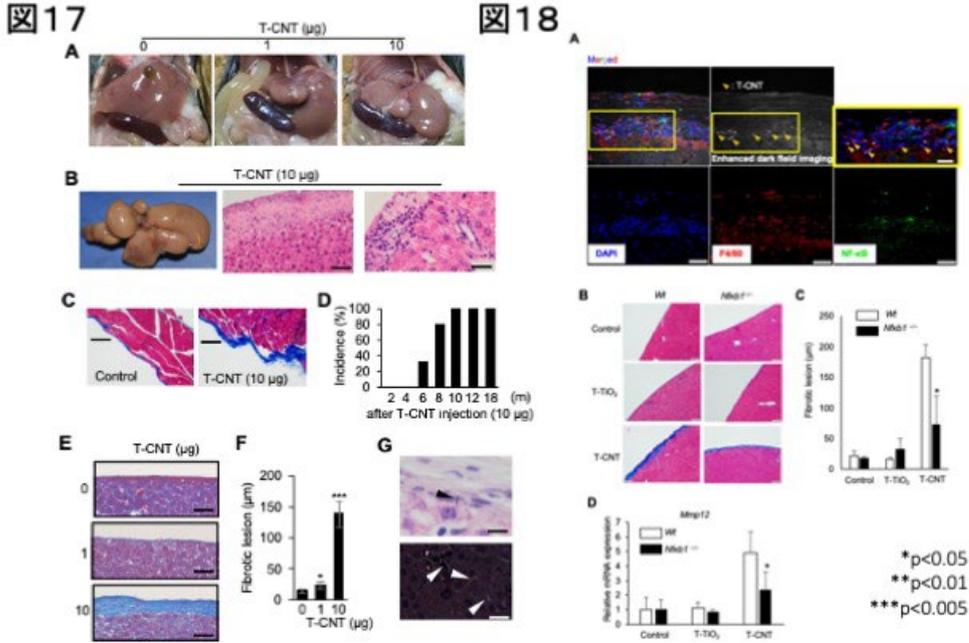
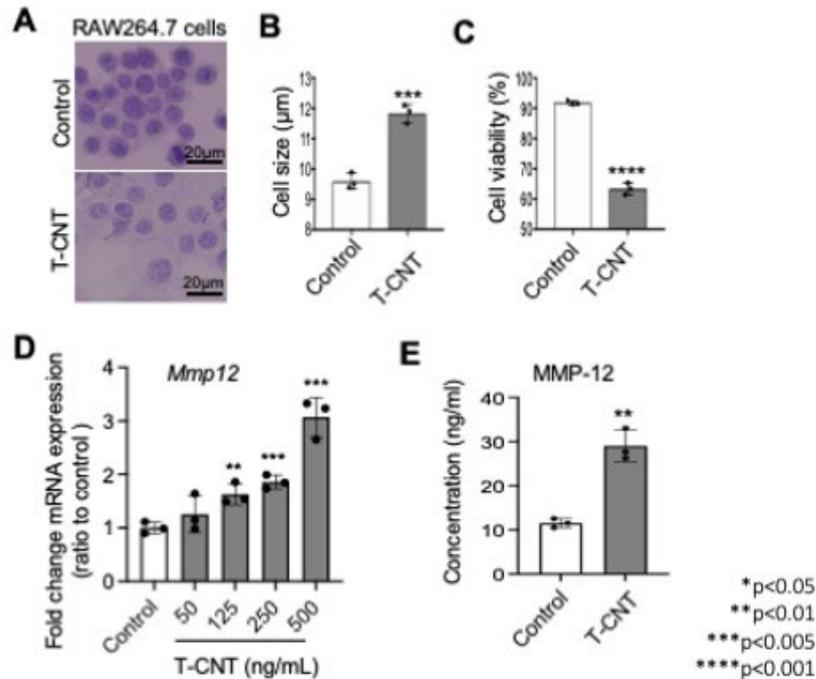


Figure 19 *In vitro* culture of macrophages with T-CNTs



令和3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: ナノマテリアル吸入曝露影響評価のための効率的慢性試験法の開発に関する研究

分担研究課題名: 曝露評価手法に関する調査研究

研究分担者: 小林 憲弘 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 室長
研究協力者: 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

本研究班で得られた試験結果を適切な管理基準に適用するためには、曝露シナリオを設定する必要がある。そこで、OECDの工業用ナノ材料作業部会(WPMN)及びOECDが主催するナノマテリアルの曝露評価手法に関するウェビナーに参加し、既存あるいは新たに開発されたツールやモデルに関する情報収集を行った。また、OECDから公開された報告書を調査し、内容を整理した。

毎年、上市されるナノ関連製品が年々増加されており、人や環境への曝露は避けられず、新規ナノマテリアルの健康及び安全への懸念が高まっていることを受けて、OECDでは新しい曝露評価ツール及びモデルの開発を行っている。ナノマテリアルの職業、消費者および環境曝露の評価に利用可能と考えられるツールおよびモデルを網羅的に情報収集し、54のツールおよびモデルの詳細評価を行った結果、10の職業曝露、7の消費者曝露、6の環境曝露評価ツール・モデルがナノマテリアルの曝露評価に適したものであると判断された。ただし、これらのツールやモデルの使用にあたっては、製品中のナノマテリアルの含有量、排出量、曝露中の粒径分布等のナノマテリアルのキャラクターゼーションに関するデータが適切なものである必要があるため、これらのデータの正確性がモデルの予測結果に大きく影響すると考えられた。c

曝露評価手法・モデルに関しては今後も開発・評価が継続される見通しであることから、引き続き情報収集を行う必要があると考えられた。

A. 研究目的

本研究班で得られた試験結果を適切な管理基準に適用するためには、曝露シナリオを設定する必要がある。そこで本研究では、ナノ材料および先端材料のリスク評価の支援を目的とし、OECDを主とした中心とした国際機関におけるグループ化およびリードアクロスの方法について調査することを目的とした。

今年度は、OECDのナノマテリアル作業グループ(WPMN)の曝露評価プロジェクト(SG8)などで進められている、労働及び消費者曝

露合同プロジェクトのレポート、環境曝露プロジェクトのレポート案などの動向調査を行った。また、来年度以降はWPMNに加えISO等の曝露計測手法および曝露評価モデルに関しての調査を行いながら、リスク評価への適用性を考慮しつつ情報を整理する。

B. 研究方法

OECDのナノマテリアル作業グループ(WPMN)の会合(WPMN2021)及びOECD主催のナノマテリアルの曝露評価手法に関するウェビナーに参加し(2021年12月2日)、

既存あるいは新たに開発されたツールやモデルに関する情報収集を行った。

また、2021年8月以降に公表された下記の2つの報告書を調査し、内容を整理した。

・Evaluation of Tools and Models for Assessing Occupational and Consumer Exposure to Manufactured Nanomaterials-Part II: Performance testing results of tools/models for occupational exposure
Project: Assessing the Global Readiness of Regulatory and Non-regulatory Models for Assessing Occupational Exposure to Manufactured Nanomaterials
Series on Testing and Assessment, No. 347

・Evaluation of Tools and Models for Assessing Occupational and Consumer Exposure to Manufactured Nanomaterials-Part III: Performance testing results of tools/models for consumer exposure
Project: Compilation of Available Tools and Models Used for Assessing Consumer Exposure to Manufactured Nanomaterials and Evaluation of their Applicability in Exposure Assessments
Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 101
Series on Testing and Assessment, No. 348

C. 研究結果

i) WPMN21 における議論内容

WPMN21 における主な議論内容を以下に整理した。

1. Exposure Measurement and Exposure Mitigation (暴露方法と暴露軽減)
 - 以下の4つの新プロジェクト提案が紹介され、更なる専門家の推薦に資するよう Web 会議を開催することとなった。
 - ①曝露モデルの使用に関するガイダンスの作成
 - ②更なるモデル評価のための曝露実測データの収集または生成
 - ③曝露量の評価及び決定のための因子で測定可能なものの特定
 - ④ナノマテリアル放出量測定方法の使用に関するガイダンスの作成
2. Compilation of available tools and models used for assessing consumer exposure to MNs and evaluation of their applicability in exposure assessment
 - 公表の承認を得るため C B C に上程することが承認された。
3. Assessing the readiness of regulatory and non-regulatory models for assessing occupational exposure to MNs
(ナノ材料への職業暴露を評価するための規制モデルおよび非規制モデルの世界的な準備状況の評価)
 - デンマークが職業曝露プロジェクトの結果について報告した。
4. Compilation of available tools and models used for assessing environmental exposure to MNs and

evaluation of their applicability in exposure assessment

(ナノ材料の規制暴露評価における環境暴露評価のための利用可能なツールとモデルの適用性の評価)

- カナダが消費者曝露プロジェクトの結果を報告した。
- 最終報告書案は曝露量測定及び曝露量緩和運営グループ、ナノマテリアル作業班、曝露評価作業班の3つのコメント・ラウンドを経て作成されたことが紹介された。
- WPMNは3つの文書を公開の承認を求めてCBCに上程することを了承した。

ii) ナノマテリアルの暴露評価手法に関する報告書の概要

ナノマテリアルの労働及び消費者暴露合同プロジェクト「Evaluation of Tools and Models for Assessing Occupational and Consumer Exposure to Manufactured Nanomaterials」の報告書においては、図1に示す3つの報告書で構成されている。

「Part I: Compilation of tools/models and analysis for further evaluation」において、使用するモデルの収集・選定を行っている。また、「Part II: Performance testing results of tools/models for occupational exposure」及び「Part III: Performance testing results of tools/models for consumer exposure」において、それぞれ労働暴露・消費者暴露の予測に使用するツール・モデルの評価を行っている。

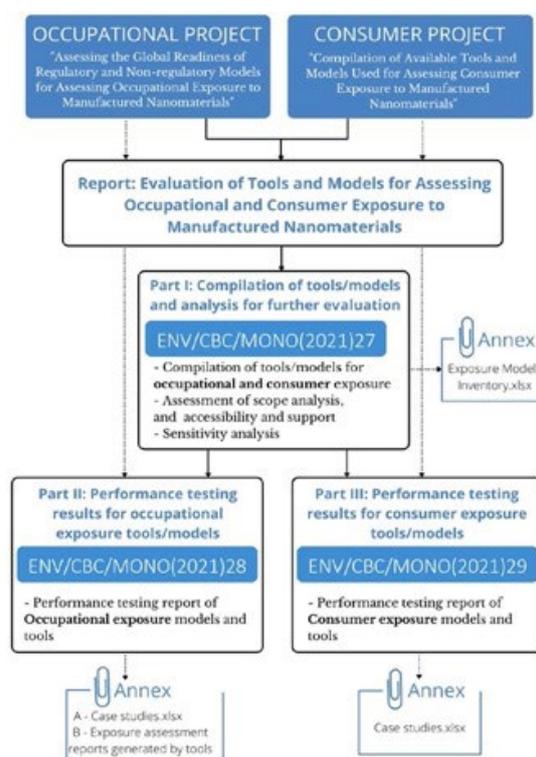


図1. 報告書の構成

「Part II: Performance testing results of tools/models for occupational exposure」及び「Part III: Performance testing results of tools/models for consumer exposure」共に、ナノマテリアルの評価に特化して開発された「Nanospecific tools」と、一般の化学物質の評価用に開発された「Conventional chemical ECHA recommended tools」の両方を対象とした評価を行っている。

「Part II: Performance testing results of tools/models for occupational exposure」では、ナノマテリアルに特化した9つのツール・モデルは、性能の評価基準 (spearman の相関係数が>0.6 かつ<10%の過小評価) を満たしたことが記載されている (表1)。一方、一般化学物質用のツール・モデルは、評価を行った5つのうち1

つを除いて、この基準を満たさなかったとされている。

表 1. 労働暴露の予測に用いたモデルの評価結果まとめ

Model	Tested in	Nano-specific	Number of comparisons	Spearman correlation (All / H / S / A)	< 10% of total cases underpredicted	Potential to be used for exposure assessment to MNM
ISO/TS 12901-2:2014 CB nanotool v1.0 (Part 2)	calIBRAte	yes	28	(0.63 / - / - / -)*	yes	Suitable with comments
BIORAMA Risk assessment and risk control module (Occupational exposure section)	OECD	yes	53	(0.84 / 0.80 / 0.31 / -)	yes	Suitable with comments
Stoffenmanager nano v1.0	calIBRAte	yes	82	(0.78 / - / - / -)	N/A	Suitable
Engineered Nanoparticle Airborne Exposure (CPSC EAP Model) v1.0	OECD	yes	39	(0.63 / 0.61 / 1.0 / -)	no (10.7% and 18% when LC applied)	Suitable with comments
LICARA nanosCAN v1.0	calIBRAte	yes	2	N/A	N/A	Suitable
NanoSafer v1.0 (original and simplified version)	calIBRAte + OECD update	yes	50	Original: (0.72 / 0.80 / 0.40 / -) Simplified: (0.72 / 0.80 / 0.40 / -)	Original: yes Simplified: no	Suitable with comments
GUIDEnano	calIBRAte	yes	25	(- / 0.98 / 1.0 / 0.98 / -)**	no	Suitable with comments
Swiss Precautionary Matrix v3.0	calIBRAte	yes	25	N/A	N/A	Suitable with comments
ConsExpo nano 2.0	calIBRAte	yes	5	N/A	yes	Suitable with comments
RISKOFDERM	calIBRAte	no	16	1.0 (filling mixing or loading) and 0.4 (spraying)	no	Suitable for indicative use
MEASE2 2.0	OECD	no	63	(0.40 / 0.40 / 0.35 / 0.87)	yes	no
EMAP Expo tool 2.0	OECD	no	40	(0.54 / 0.25 / - / -)	yes	no
Stoffenmanager 8.3	OECD	no	52	(0.18 / 0.51 / 0.62 / 0.73)	no	no
Advanced REACH Tool v1.5	OECD	no	60	(0.51 / 0.51 / - / -)	no	no

*Note: For ISO CB nanotool correlation is given for particle number concentration. **Note: For GUIDEnano Spearman correlation was calculated individually for spraying and leakpoint source domains. For each model it is indicated under which project it has been tested, whether or not the model is nanospecific, total number of comparisons used for the performance testing, Spearman correlations obtained, and whether the tool underpredicted in more than 10% the cases tested. In the final column, it is indicated whether the tool has potential to be used for exposure assessment to MNM based on the results obtained and the criteria established in this report. N/A: Not applicable. Spearman correlation is provided for all domains / powder Handling / Spraying or leak-point source / Abrasion (All / H / S / A).

また、「Part III: Performance testing results of tools/models for consumer exposure」においては、評価を行った7のツール・モデルは、過大評価となるケースが多かったものの、予測に使用できると評価された(表2)。

ただし、暴露排出データベースにおいて、多くの測定データが棄却あるいは不適切であった。これは、排出係数、製品使用量、粒径分布、待機中濃度の時系列変化が入手できなかったためであると考えられる。

これらのデータギャップを埋めるために、ナノマテリアルの製品暴露に関する実験を行う際には、以下の情報が適切であるかどうかを考慮することが推奨される。

- Amount of product used for the experiment (実験で使用された製品の

量)

- Fraction of MNMs in product (製品中のナノマテリアルの割合)
- Emission rate (排出係数)
- Characterization of particle size distribution (粒径分布のキャラクターゼーション)
- characterization during the exposure (暴露中のキャラクターゼーション)
- Time evolution of air concentration during the exposure (暴露中の大気中濃度の時系列変化)

表 2. 消費者暴露の予測に用いたモデルの評価結果まとめ

Model/Tool	Tester	Number of comparisons	Spearman correlation	Trend over total comparison (overestimation/underestimation)
ENAE v1.0	HC	13	0.75	overestimation
GUIDEnano v.30	HC	7	0.70	overestimation
Boxall et al. 2007	HC	13	0.72	overestimation
Stoffenmanager Nano v1.0	HC	16	0.79	N/A*
ConsExpo nano v3.0	RIVM	7	N/A	overestimation
Swiss Precautionary Matrix v3.1	HC	9	N/A	N/A
NanoSafer v1.1	NRCHIE and HC	4	0.83	overestimation

Note: * Not applicable. ** Performed in EU H2020 calIBRAte project

D. 考察・結論

OECD が主催するナノマテリアルの暴露評価手法に関するウェビナーに参加し、既存あるいは新たに開発されたツールやモデルに関する情報収集を行った。

毎年、上市されるナノ関連製品が年々増加されており、人や環境への暴露は避けられず、新規ナノマテリアルの健康及び安全への懸念が高まっていることを受けて、OECD では新しい暴露評価ツール及びモデルの開発を行っている。ナノマテリアルの職

業、消費者および環境暴露の評価に利用可能と考えられるツールおよびモデルを網羅的に情報収集し、54のツールおよびモデルの詳細評価を行った結果、10の職業暴露、7の消費者暴露、6の環境暴露評価ツール・モデルがナノマテリアルの暴露評価に適したものであると判断された。ただし、これらのツールやモデルの使用にあたっては、製品中のナノマテリアルの含有量、排出量、暴露中の粒径分布等のナノマテリアルのキャラクターゼーションに関するデータが適切なものである必要があるため、これらのデータの正確性がモデルの予測結果に大きく影響すると考えられた。

暴露評価手法・モデルに関しては今後も開発・評価が継続される見通しであることから、引き続き情報収集を行う必要があると考えられた。

E. 参考文献等

なし

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)

別添 5

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
Maeno A, Sakamoto Y, Hojo M, Tada Y, Suzuki J, Inomata A, Moriyasu T, Hirose A, Kemuriyama N, Miyajima K, Nakae D..	A case of spontaneous Zymbal's gland carcinoma with lung metastasis in an aged Fischer 344 rat.	<i>J. Toxic. Pathol.</i>	34(3)	353-358	2021
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.	<i>Cancer Sci.</i>	112(6)	112(6)	2021
Wang Qiqi, Wang Qiong, Zhao Z., Fan J., Qin L., Alexander DB., Tsuda H., Zhao D and Xu J.	Surfactant Proteins A/D-CD14 on Alveolar Macrophages Is a Common Pathway Associated With Phagocytosis of Nanomaterials and Cytokine Production.	<i>Frontiers in Immunology</i>	12	1-13	2021

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

次の職員の令和3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 ナノマテリアル吸入曝露影響評価のための効率的慢性試験法の開発に関する研究

3. 研究者名 (所属部署・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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

厚生労働大臣殿

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

次の職員の令和3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 ナノマテリアル吸入曝露影響評価のための効率的慢性試験法の開発に関する研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 安全性生物試験研究センター毒性部・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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

厚生労働大臣 殿

機関名 公立大学名古屋市立大学

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3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 ナノマテリアル吸入曝露影響評価のための効率的慢性試験法の開発に関する研究

3. 研究者名 (所属部署・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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

厚生労働大臣殿

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

次の職員の令和3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 ナノマテリアル吸入曝露影響評価のための効率的慢性試験法の開発に関する研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 安全性生物試験研究センター毒性部 ・ 主任研究官

(氏名・フリガナ) 横田 理 ・ ヨコタ サトシ

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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

厚生労働大臣 殿

機関名 国立大学法人東京医科歯科大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 田 中 雄 二 郎

次の職員の令和 3 年度 厚生労働行政推進調査事業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 ナノマテリアル吸入曝露影響評価のための効率的慢性試験法の開発に関する研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 大学院医歯学総合研究科 ・ 教授
(氏名・フリガナ) 渡部 徹郎 ・ ワタベ テツロウ

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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

厚生労働大臣殿

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

次の職員の令和3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 ナノマテリアル吸入曝露影響評価のための効率的慢性試験法の開発に関する研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 毒性部・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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

厚生労働大臣 殿

機関名 徳島大学

所属研究機関長 職 名 学 長

氏 名 河 村 保 彦

次の職員の令和3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 ナノマテリアル吸入曝露影響評価のための効率的慢性試験法の開発に関する研究
3. 研究者名 (所属部署・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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

厚生労働大臣殿

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

次の職員の令和3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 ナノマテリアル吸入曝露影響評価のための効率的慢性試験法の開発に関する研究

3. 研究者名 (所属部署・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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

厚生労働大臣 殿

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

次の職員の令和3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 ナノマテリアル吸入曝露影響評価のための効率的慢性試験法の開発に関する研究

3. 研究者名 (所属部署・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) ^{ホウジョウ}北條 ^{モトキ}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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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 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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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。