

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 4 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 広瀬 明彦

令和 5 年(2023年)3月

令和 4 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	12
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	13
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	20
3. 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	34
4. 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	43
5. 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	46
6. 間欠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	53
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	59
8. 曝露評価手法に関する調査研究 小林 憲弘、広瀬 明彦	71
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	76

令和 4 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 客員研究員

研究要旨

本研究では、2年間の慢性吸入曝露試験結果が唯一利用出来る多層カーボンナノチューブのデータに基づくナノマテリアルの吸入曝露リスク評価法の開発を目指す研究行っており、今年度は、検体調製工程の自動化の実用化を目指した改良と、短期間間欠吸入慢性観察実験を開始した。また、短期間の間欠気管内投与は、経過観察をすると共に、用量依存性の解析研究も開始した。さらに、体内分布の把握とそのメカニズム解析を引き続き行うと共に、ナノマテリアルの曝露評価手法の最新国際情報を入手することを目的とした。

ナノマテリアルの吸入曝露システムの効率化に関しては、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、ろ過効率に大きく影響するケーキの生成抑制を攪拌子を導入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、ドライアイス冷媒として用いることで、同重量の TBA を固化することが可能であることが示された。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 について、単回吸入曝露試験における肺負荷量の経時的変化の結果をもとに、NT-7 の半減期はおよそ 7 日であることを明らかにし、この結果をもとに 1 週間に 1 回の 13 回の間欠吸入曝露試験を開始した。一方、短期間のラット間欠気管内投与実験では、全 13 回の投与が完了し経過観察中であり、肺負荷量を既報と比べると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。Prox1-GFP に対するナノマテリアル吸入曝露の結果、気管支の分岐部分において MWNT-7 が集積し、リンパ管の形状が変化することが示された。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た検討において RNA-sequencing を行った結果、部分的 EndoMT が誘導されている細胞の特異的マーカー候補を同定した。また、NT-7 の単回吸入曝露による肺免疫への影響は MWCNT-7 吸入曝露と異なった反応性が存在することが明らかになった。加えて、MWCNT-7 曝露によるマクロファージを介した慢性化および線維化の分子機序の一旦が明らかにされた。一方、TIPS 法で多層ナノチューブを投与した際の用量依存性と発がん標的組織の関係を明らかにする事を目的として、MWCNT-7 を 0.00008~0.5mg/ラットで用量依存性を検討する慢性観察研究を開始した。曝露評価に関しては、曝露評価ツール・モデルの開発とガイドライン文書の進捗に関する OECD の最新動向を入手できた。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、今年度の成果としては、間欠曝露型の吸入曝露装置の実用化の目処が立ってきており、短期吸入曝露慢性実験に加えて発がん性の用量相関性解析も開始できた。また、ナノマテリアル曝露の体内分布解析が透明化技術により順調に進展しており、in vitro 研究でも特異的マーカー候補を明らかにできている。曝露評価に関しても曝露評価ツール・モデルに関する OECD の最新動向を入手できている、全体として概ね目標に向けて進展している。

研究分担者

高橋 祐次 国立医薬品食品衛生研究所
毒性部 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や中皮腫について、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:

国立衛研に設置された Taquann 全身曝露吸入装置 (ver.3.0) は、長期曝露実験に備え改修作業を検討している。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、昨年度の検討結果を基に、本年度は、濾過率向上させるためケーキの生成抑制を目的とした攪拌子を組み込んだ装置の開発、並びに液体窒素に替わる冷媒としてドライアイスを用いた TBA の瞬間凍結方法を検討した。(高橋)。

先行研究では、多層カーボンナノチューブとして MWNT-7 を使用してきたが、本研究からは MWNT-7 と同様の製造法で生産された NT-7 を使用している。昨年度確立した NT-7

の高度分散法 (Taquann 法) 処理による単回吸入曝露試験を実施した。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。単回吸入曝露後の肺負荷量を測定し、NT-7 の半減期を求めた。その結果をもとに、間欠吸入曝露試験 (1 週間に 1 回 6 時間、13 週にわたって間欠曝露) を開始した (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 の間欠吸入曝露試験 (1 週間に 1 回 6 時間、3 週にわたって間欠曝露) を実施し、曝露直後に解剖し肺組織) のサンプリングを行った (横田)。

気管内投与法の開発として、TIPS に類似する初期集中型の反復投与によるラットの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。F344雄ラットを対照群 (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、一回当たり、それぞれ0、0.0175、0.07、0.28 および0.42 mg/kg体重の用量で、マイクロプレイヤー (PennCentury) を用いて、13回投与した。肺のMWCNT含有量を大西法により測定した。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:

TIPS (経気管肺内噴霧投与) 法で多層ナノチューブを投与した際の低用量域における発がん標的組織 (肺・胸膜中皮) を明らかにして、用量と発がん標的組織 (肺、胸膜中皮) の関係を明らかにする事を目的として、MWCNT-7を4日間、1回/日にて0.00008~0.5mg/ラットの用量で投与して、104週観察する研究を行う (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)に対してナノマテリアル吸入曝露実験を施行した。摘出した肺組織を透明化した上で3次元で蛍光顕微鏡で観察することで、MWNT-7粒子が集積する動態とリンパ管の関係を3次元レベルで解析した(渡部・菅野・高橋)。さらに、ナノマテリアル吸入曝露によって活性化されるTGF- β シグナルの内皮細胞に対する作用を明らかにするために、EndoMTレポーターマウス(Cdh5-BAC-CreERT2-ROSA-lox-stop-lox-tdTomato-SMA-GFP)から樹立したEndoMTレポーター細胞(EMRECs)にTGF- β 存在下で培養し、内皮細胞マーカーであるVEGFR2と間葉系細胞マーカーであるSMA-GFPの発現を指標にFACSソーティングし、RNA-sequencingを施行することで部分的EndoMTが誘導されている細胞の特異的マーカーを探索した。(渡部)。

免疫系への吸入曝露による慢性影響については、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、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、解析を進めるとともに、マウス骨髄細胞誘導マクロファージのNT-7に対する反応性を検討した。一方で、*in vivo*の実験として、MWCNT-7のマウス腹腔内投与による線維化の分子機序を検討した(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)の会合に参加し、曝露評価プロジェクト(SG8)で進められているプロジェクトの情報収集を行った。2022年6月にOECDより「Particle Size and Size Distribution of Nanomaterials: OECD Test Guideline 125」(以下、TG225)が出版されたことから、このTG125とそのバリデーション報告書を調査し、その内容を整理した(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:

Taquann法の自動化検討における攪拌工程を組み込んだ装置の開発では、熱可塑性のPolyoxymethylene樹脂を素材とした攪拌子を作製し、攪拌子の上下運動によって攪拌子がシーブ面と衝突しないようにするため、装置内でのシーブ面の位置を固定し、シーブ面から5mm上までを攪拌子の可動範囲と設計として、実際に装置を作製した。

ろ液の凍結方法としてドライアイスで冷媒とした実験を行った。ドライアイスを500g投入した広口瓶は約10分後には0°C以下となった。ドライアイスの昇華に伴い広口瓶内が二酸化炭素雰囲気になったところで、TBA500 mLを投入したところ、約22分後にTBAは固化し凍結乾燥可能な状態となった。また、ドライアイスを広口瓶に投入後、しばらく放置することで広口瓶内は二酸化炭素のみに置換されるため、広口瓶に空気中の水分が凝集することによる

別添 3

結露の発生を抑制することが可能であった。

TBA は吸湿すると凝固しなくなるため、この点からも優れた性質であると考えられた。

昨年度実施した、Taquann 全身曝露吸入装置 ver 3.0 を用いた T-NT7#53 の単回吸入曝露試験の肺負荷量の結果は、単回吸入曝露試験日を day0 として、day0: 低用量群 1.7 μg 、高用量群 3.5 μg 、day1: 低用量群 2.0 μg 、高用量群 4.1 μg 、day7: 低用量群 1.9 μg 、高用量群 2.3 μg 、day14: 低用量群 1.73 μg 、高用量群 1.9 μg 、day28: 低用量群 1.1 μg 、高用量群 1.3 μg の値を示した。

一方、間欠吸入曝露試験における全 13 回の平均質量濃度は、低濃度では 2.7 mg/m^3 (エアロゾル効率 45%)、高濃度では 4.7 mg/m^3 (エアロゾル効率 39%)、MMAD のデータは、低濃度群で 1.1 μm (σg 5.8) と高濃度群で 1.2 μm (σg 5.3) の結果が得られた。間欠吸入曝露試験における肺負荷量については現在計測中である。

ラット気管内投与実験については、13 回の投与は昨年度に完了している。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 $\mu\text{g}/\text{Lung}$ 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。現在、経過観察中であり、年度末 (試験開始後 81 週経過) までに途中解剖した個体は、各群 2 匹程度で、いずれも、投与との関連は無いものと考えられた。

体内分布と慢性影響発現部位の解析:

2 年間の TIPS 法投与後 2 年間観察実験では、0.0008~0.5 $\text{mg}/\text{ラット投与}$ の 5 群構成にて投与を開始した。投与 52 週後に (5 匹)、75 週後に (5 匹)、最終 104 週 (15 匹) 後に肺と胸膜中皮の炎症程度と腫瘍発生について解析する。

屠殺時には胸郭洗浄液、血液、胸郭、肺、肝、腎、脾、骨髄等を採取して炎症の程度、前がん病変を含む腫瘍病の発生について詳しく解析する予定である。6 ヶ月経過で、斃死ラットはない。

体内動態に関する研究において、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、ナノマテリアル吸入曝露実験を施行し、摘出した肺組織を透明化して 3 次元レベルで観察することによって、気管支の分岐部分において MWNT-7 と考えられる粒子が集積し、曝露量依存的に粒子の集積が増加することを見出した。また、細気管支付近では細い管状に局所的に粒子が集積することを明らかにした。また、MWNT-7 を吸入させた Prox1-GFP TG mouse の透明化肺が得られ 3 画像分析の準備を進めた。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を FACS ソーティングして、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) 画分を FACS ソーティングした。得られた細胞画分における内皮細胞マーカーと間葉系細胞マーカーの発現を検討した結果、それぞれのマーカーの発現が EndoMT の移行に伴い変化することが示された。さらに、RNA-sequencing 解析の結果、部分的 EndoMT が誘導されている細胞の特異的マーカー候補を同定した。

免疫系への影響として、NT-7 の短期吸入曝露によって、曝露直後に減少した BALF 細胞数は曝露後 4 週で回復することが判明し、BALF 細胞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明らかになった。NT-7 吸入暴露による M2 タイプマクロファージへの分化誘導、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。さらに、マウス骨髄由来マクロファージを用いて NT-7 の反応性を検討すると、MWCNT-7 で確認された細胞死、MMP-12 発現の亢進は認められなかった一方で、RAW264.7 細胞を用いた *in vitro* の実験ならびに NF- κ B 遺伝子ノックアウトマウスを用いた *in vivo* の実験により MWCNT-7 の暴露による NF- κ B-MMP12 を起点とした慢性線維化の分子機序が明らかになった。

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 TG125 では、粒径分布に関するナノ特有の TG の必要性について記述されている。TG125 は、粒径 1-1000 nm の粒子と繊維、長さ 1-20 μ m の繊維を対象としたものであり、分散液はガス・液中で物理的・化学的に安定でなければならないことが強調されている。

粒子計測のための顕微鏡的手法として、TEM/SEM, AFM について記述されている。

TEM/SEM では、粒径は 2 次元に投影されたものであり、粒径分布は数ベースとなる。計測にあたって、試料は数日間(試料調製の期間)安定である必要がある。また、統計的に有用な情報を得るには 10^3 個の粒子が必要とされている。

液中の粒子の計測手法としては、CLS, DLS, NTA/PTA について記述されている。以下では、これらの手法のうち最も広く用いられている動的光散乱(DLS)は、流体力学的な粒径が得られ、粒径分布は強度ベースとなる。20 分間(計測時間)の安定性が必要であり、0.2v%よりも低濃度の試料に適用できる。統計的に有用な情報が得られるには 10^5 個以上の粒子が必要で

ある。

D. 考察

Taquann 法の効率化に関して、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。本年度は、ケーキの生成抑制を目的として、攪拌子を組み込んだ装置の開発を行った。現在、攪拌を行いながらシーブを振動させる方法の開発に着手している。

ドライアイス冷媒として用いる TBA の固化方法は凍結乾燥に十分な性能を有していることが示された。ドライアイスの潜熱は 573.5 KJ/Kg、比熱は 835.8 J/kgK、相転換温度は -78.5°Cである。これらの値から、質量 500g を冷媒として用い、相転換温度から TBA が十分に凍結すると考えられる 20°Cに到達するまでの吸熱量を計算すると 500g のドライアイスは 41,450kJ を吸熱する。一方、TBA500 mL と広口ガラス瓶(質量 750g)が 33°Cから 20°Cまで温度低下する際に放熱する熱量は 6,876 kJ と計算されることから、ドライアイス 500g を冷媒として 500mL の TBA を固化するには十分な吸熱量であると考えられた。

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間欠吸入曝露試験を実施した。本研究では、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

別添 3

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。今年度は昨年度実施した単回吸入曝露試験の肺負荷量の結果について整理し、その結果もとに間欠吸入曝露プロトコルの提案と曝露実験を実際に開始した。

単回吸入曝露試験の肺負荷量について測定したところ、昨年度実施した BALF 細胞での取り込み結果と同様の結果を定量的に得た。これらの結果から半減期を算出した結果、およそ 7 日であることを明らかにした。

上記の結果をもとに、間欠吸入曝露試験プロトコルについて、隔週で 13 週にわたり吸入曝露実験をすることとした。間欠吸入曝露試験における質量濃度測定の結果から、目標濃度は概ね達成され、エアロゾル効率も 40 %程度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。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。また、低用量群と高用量群とで同一の MMAD が得られたことから、Taquann 法ならびに本吸入曝露装置の精度の高さが示された。今後、間欠吸入曝露試験における肺負荷量の経時変化に関するデータを取得し、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、間欠曝露プロトコルの有用性を検証していく。

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、かなり高くなったが、H 群は Suzui ら 2016 の試験と、EH 群は Numano ら 2019 の試験と、それぞれ肺負荷量とが同レベルであったため、前者で肺腫瘍の発生を、後者で胸膜中皮腫の有意な発生率を

捉えることができると期待される。Numano ら 2019 の試験では、試験開始から 47 週時点で中皮腫の発生が確認されており、本試験ではこれに比べて中皮腫発生時期が遅い(発生率が低い)ことが推測される。これは用いた検体の違い、つまり MWNT-7 と NT-7 の違いに起因するのかもしれない。

また、Prox1-GFP に対するナノマテリアル吸入曝露の結果、気管支の分岐部分において MWNT-7 と考えられる粒子が集積し、リンパ管の形状が変化することが示された。以上の結果から、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部分的 EndoMT マーカー候補の機能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、慢性観察終了時には、TIPS 法により MWCNT-7 の低用量域における発がんの用量依存性と発がん標的組織(肺、胸膜中皮)の標的性を明らかにすることが可能になると考えられる。

NT-7 吸入曝露後の BALF 細胞は減少し、経時的に回復することがわかった。この現象は MWCNT-7 の吸入曝露でも同様であった。また、NT-7 吸入曝露によって 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。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。MWCNT-7 の吸入曝露では M1 型への分化が目立っていた点と相違している。NT-7 吸入曝露によって、肺組織における MMP-12 mRNA 発現上昇が確認されたが、BALF 細胞では MWCNT-7 との違いがある可能性が示さ

れた。BMDMを用いた *in vitro* の実験系はナノマテリアルに対するマクロファージの直接の反応を検証する上で極めて有用である。一方で、MWCNT-7 の腹腔内投与による慢性腹膜炎のモデルでは腹腔内マクロファージの NF- κ B の活性化を介して MMP-12 の発現が調節されており、線維化の MMP-12 を介した分子メカニズムが存在する可能性が示されたが、TGF- β などの線維化に関与する分子との関連性は不明である。

TG125 では、は個々の繊維の直径と長さをペアで測定することを新しいスタンダードプロトコルとして提案している。繊維の粒径分布測定のバリデーションでは、SEM と TEM の両方を用いて評価が行われた。銀ナノファイバーの粒径分布の室間比較の例長い繊維では、SEM と TEM の結果の乖離が大きい結果となっている。この理由として、TEM の適用範囲は $< 5 \mu\text{m}$ であることが挙げられる。以上のことから、ナノファイバーの計測においては、TEM と SEM の両方を用いて計測することが推奨される。

E. 結論

研究要旨

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。

ナノマテリアルの吸入曝露システムの効率化では、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、ろ過効率に大きく影響するケーキの生成抑制を攪拌子を導入するこ

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、ドライアイスを冷媒として用いることで、同重量の TBA を固化することが可能であることが示された。今後、これらの点を組み込んだ方法により、Taquann 法の工程の自動化処理を進める計画である。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、肺負荷量の経時的変化を明らかにした。NT-7 の半減期はおおよそ 7 日と計算され、その結果をもとに 1 週間に 1 回 (1 日 6 時間)、13 週にわたる間欠吸入曝露実験を実施した。その結果、13 回にわたり安定した曝露濃度と MMAD の結果を得ることに成功した。一方、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、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。ただし、胸膜中皮腫の発生率は既報より低い可能性がある。Prox1-GFP に対するナノマテリアル吸入曝露の結果、気管支の分岐部分において MWNT-7 が集積し、リンパ管の形状が変化することが示された。さらに、TGF- β の内皮細胞に対する作用について EndoMT レポーター細胞を用いた検討において RNA-sequencing を行った結果、部分的 EndoMT が誘導されている細胞の特異的マーカー候補を同定した。また、NT-7 の単回吸入曝露による肺免疫への影響は MWCNT-7 吸入曝露と異なった反応性が存在することが明らかになった。加えて、MWCNT-7 曝露によるマクロファージを介した慢性化および線維化の分子機序の一旦が明らかにされた。一方、TIPS 法で多層ナノチューブを投与した際の用量依存性と発がん標的組織の関係を明らかにする事を目的として、MWCNT-7 を $0.00008 \sim 0.5\text{mg}$ /ラットの用量で投与する慢性観察研究を開始した。曝露評価に関しては、曝露評価ツール・モデルの開発とガイドライン文書(特に TG125)の進捗に関す

る OECD の最新動向を入手できた。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、今年度の成果としては間歇曝露型の吸入曝露装置の実用化の目処が立ってきており、短期吸入曝露慢性実験に加えて発がん性の用量相関性解析も開始できた。また、ナノマテリアル曝露の体内分布解析が透明化技術により順調に進展しており、in vitro 研究でも特異的マーカー候補を明らかにできている。曝露評価に関しても曝露評価ツール・モデルに関する OECD の最新動向を入手でき、全体として当初の予定より遅れ気味であるが目標に向けて進展している。

F. 研究発表

1. 論文発表

Horibata K, Takasawa H, Hojo M, Taquahashi Y, Shigano M, Yokota S, Kobayashi N, Sugiyama KI, Honma M, Hamada S. In vivo genotoxicity assessment of a multiwalled carbon nanotube in a mouse ex vivo culture. *Genes Environ.* 44: 24, 2022. doi:10.1186/s41021-022-00253-2

Hojo M, Maeno A, Sakamoto Y, Ohnuki A, Tada Y, Yamamoto Y, Ikushima K, Inaba R, Suzuki J, Taquahashi Y, Yokota S, Kobayashi N, Ohnishi M, Goto Y, Numano T, Tsuda H, Alexander DB, Kanno J, Hirose A, Inomata A, Nakae D: Two-year intermittent exposure of a multiwalled carbon nanotube by intratracheal instillation induces lung tumors and pleural mesotheliomas in F344 rats. *Part Fibre Toxicol.* 19: 38, 2022. doi:10.1186/s12989-022-00478-7

Saleh D., Luo S., Ahmed HM Omnia, Alexander DB., Alexander TW., Gunasekaran S., El-gazzar AM., Abdelgied M., Numano T., Takase H., Ohnishi M.,

Tomono S., Randa Hussein Abd el Hady, Fukamachi K., Kanno J, Hirose A, Jiegou Xu, Suzuki S., Naiki-ito A., Takashi S., Tsuda H. Assessment of the toxicity and carcinogenicity of double-walled carbon nanotubes in the rat lung after intratracheal instillation: a two-year study. *Particle and Fibre Toxicology*, 19: 30, 2022.

doi:10.1186/s12989-022-00469-8

Tsunematsu T, Arakaki R, Sato M, Saito M, Otsuka K, Furukawa Y, Taquahashi Y, Kanno J, Ishimaru N. Exposure to Multi-Wall Carbon Nanotubes Promotes Fibrous Proliferation by Production of Matrix Metalloproteinase-12 via NF-κB Activation in Chronic Peritonitis. *Am J Pathol.* 192:1559-1572, 2022. doi: 10.1016/j.ajpath.2022.07.009.

2. 学会発表

Taquahashi Y, Yokota S, Tsuji M, Morita K, Suga K, Hojo M, Hirose A, Kanno J, Preliminary report on a two-year, 4-week-interval intermittent whole body inhalation study of the multi-walled carbon nanotube (MWNT-7) in male mice, SOT 2023 Abstract Number/Poster Board number: 4715/ P621 (2023.3.22)

高橋祐次、横田理、広瀬明彦、菅野純：ナノマテリアルの慢性吸入ばく露試験法の効率化、第 49 回日本毒性学会学術年会、北海道 (2022.6.30) シンポジウム

菅野純：粉体吸入実験装置の考察。第 13 回粉末吸入剤研究会シンポジウム、(2022.11.24)、ANA クラウンプラザホテル富山、シンポジウム、口演。

菅野純：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、(2022.10.12)、茨城、講義。

Akiko OHNO, Asuka NISHIDA, Kazutoshi IJIMA, Akihiko HIROSE, Takao ASHIKAGA, in silico elucidation of physicochemical properties factor on

- activation of THP-1 cells of TiO₂ NP, 264th ACS National Meeting & Exposition, August 21-25, 2022 (Chicago)
- 大野 彰子, 西田 明日香, 飯島 一智, 広瀬 明彦, 足利 太可雄, THP-1 細胞への活性化に及ぼす二酸化チタンナノ粒子の物理化学的特性因子, 第 49 回日本毒性学会学術年会, 2022 年 6 月 30 日(木)―7 月 2 日(土)(札幌)
- 横田理, 関根尚, 市瀬孝道, 藤ノ木政勝, 若山友彦, 北嶋聡, 押尾茂: ナノ銀の妊娠曝露により生じる, 雄性生殖系列を介した継世代・多世代影響, 第 41 回アンドロロジー学会, 福島 (2022.6.3)
- 前野愛, 北條幹, 坂本義光, 湯澤勝廣, 長澤明道, 生嶋清美, 山本行男, 平松恭子, 矢野範男, 大貫文, 稲葉涼太, 鈴木仁, 横田理, 高橋祐次, 小林憲弘, 菅野純, 広瀬明彦, 猪又明子, 中江大. 多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の2年間間欠気管内反復投与によるラット発がん性試験. 第 49 回日本毒学会学術年会(2022.6.30)、札幌、ポスター
- 北條幹:ラット気管内投与法によるナノマテリアルの発癌性の評価手法の発展と課題. 第 49 回日本毒学会学術年会(2022.6.30)、札幌、シンポジウム、口演
- 前野愛, 北條幹, 坂本義光, 湯澤勝廣, 長澤明道, 平松恭子, 大貫文, 稲葉涼太, 鈴木仁, 横田理, 高橋祐次, 小林憲弘, 広瀬明彦, 猪又明子, 中江大. 多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の2年間間欠気管内投与によるラット肺腫瘍及び中皮腫の発生. 第 39 回日本毒学会学術年会(2023.1.25-26)、船堀、ポスター
- Saleh D., Alexander TW., Alexander DB., Abdelgied M., El-gazzar AM., Ahmed HM Omnia, Gunasekaran S., Takase H., Naiki-Ito A., Suzuki S., Gi M., Taquahashi, Y., Hirose A., Kanno J., Tsuruoka S., Tsuda H. The toxic and carcinogenic potential of three different sizes of double-walled carbon nanotubes in the rat lung after intratracheal instillation. ICT 2022 THE XVITH INTERNATIONAL CONGRESS OF TOXICOLOGY、オランダ 2022.9.18-22
- Takaaki Tsunematsu, Rieko Arakaki, Mami Sato, Kunihiro Otsuka and Naozumi Ishimaru: Exposure to Multi-Wall Carbon Nanotubes Promotes Fibrous Proliferation by Production of Matrix Metalloproteinase-12 via NF- κ B Activation in Chronic Peritonitis, 第 51 回日本免疫学会学術集会(2022.12.7-9)熊本市、口演
- Naozumi Ishimaru, Kazuki Fukuda, Takaaki Tsunematsu, Rieko Arakaki, Mami Sato, Kunihiro Otsuka: Exposure to carbon nanotubes sustains chronic inflammation by macrophage activation via MMP-12. 第 111 回日本病理学会総会(2022.4.14-16)神戸市、口演
- 高橋 和樹, 勝又 寿枝, 小林 美穂, 池田 行徳, 篠原 満利恵, 前田 健太郎, 吉松 康裕, 松永 行子, 渡部 徹郎. 内皮間葉移行(EndoMT)レポーター内皮細胞を用いた EndoMT の可視化とがん細胞の脈管内侵入機序の解明. 第 46 回日本リンパ学会総会 東京 2022.06.04、口演
- 勝又 寿枝, 高橋 和樹, 小林 美穂, 前田 健太郎, 紀室 志織, 松永 行子, 吉松 康裕, 渡部 徹郎. 内皮間葉移行(EndoMT)レポーター内皮細胞を用いた EndoMT 遷移段階の検出. 第 46 回日本リンパ学会総会 東京 2022.06.03、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4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4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 毒性部 客員研究員

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濾過工程の際のケーキの生成抑制のため、攪拌装置の開発、②効率的なる液の瞬間凍結法としてドライアイスを用いる方法を開発した。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曝露経路である吸入曝露に関しては、動物実験を遂行する際の技術的障壁が高く、実施例は数少ない。

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

その一方で、時間を要する工程があり、特に濾過工程は煩雑であるため連続作業が難しい (図 1)。本分担研究では、検体調製を自動化し、ナノマテリアルの吸入曝露実験の効率化を目的とした。

B. 研究方法

B-1. 攪拌装置の開発

これまで、シープは直径 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)。シープ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。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。

昨年度の検討では、大量の検体をろ過することを目的として、シープサイズを 100 mm に拡大し、加振機を装着し 58Hz のサイン波にて振動しつつ濾過を行ったが、濾過効率は 28% と手動に比較して大幅に低下した。この原因は、シープに加振機からの振動が十分に伝わっていないこと、シープ上の懸濁液の攪拌が十分ではないことであり、MWNT-7 がシープ面にすぐに堆積 (ケーキ生成) することによってろ過が妨げられていることが考えられた。

本年度は、攪拌工程を自動的に行える装置の開発をおこなった。具体的には、攪拌子をモータによって動作させる方法とした。シープ面に攪拌子が衝突しない方法、攪拌子の形状も検討した。

B-1. 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、これまでに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。

昨年度は、氷冷したステンレス板に TBA を吹き付けて凍結させる方法 (滴下凍結掻き取法) と、一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。滴下凍結掻き取り法は 10 回程度(約 150 mL)の処理が可能であったが、それ以上は熱容量が不足し大量の検体処理には不向きな手法と考えられた。噴霧凍結方法は微細な TBA がステンレスタンク内から漏れ出るため作業者の安全性確保に難があること、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。

本年度は、ドライアイス冷媒として用いた方法を検討した。液体窒素はデュワー瓶での長期保存が難しく、自動化処理における冷媒としては使いにくい。ドライアイスは比較的保存が容易である。1000mL の広口瓶に 500g のドライアイス投入し、TBA500mL を投入して固化の程度を観察した。またその際の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. 攪拌装置の開発

攪拌子は、熱可塑性の Polyoxymethylene 樹脂(POM 樹脂)を素材とした。POM 樹脂は耐摩耗性・耐薬品性・低吸水性・高機械的強度を有しており、本装置の目的に適した素材であることから選択した。攪拌子の上下運動によって攪拌子がシープ面と衝突しないようにする方法には、装置内でのシープ面の位置を固定し、シープ面から 5 mm 上までを攪拌子の可動範囲とすることにした。実際に作製した装置を図 2 に示した。

C-2. ろ液の凍結方法の検討

Taquann 法処理のため、TBA は 35°C に設定した恒温槽内に保管し液体状態として保存している。ドライアイス投入した広口瓶は約 10 分後には 0°C 以下となった。ドライアイスの昇華に伴い広口瓶内が二酸化炭素雰囲気

気になったところで、TBA500 mL を投入したところ、約 22 分後に TBA は固化し凍結乾燥可能な状態となった(図 3)。

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。

本年度は、ケーキの生成抑制を目的として、攪拌子を組み込んだ装置の開発を行った。現在、攪拌を行いながらシープを振動させる方法の開発に着手している。

ドライアイス冷媒として用いる TBA の固化方法は凍結乾燥に十分な性能を有していることが示された。

ドライアイスの潜熱は 573.5 KJ/Kg、比熱は 835.8 J/kgK、相転換温度は -78.5°C である。これらの値から、質量 500g を冷媒として用い、相転換温度から TBA が十分に凍結すると考えられる 20°C に到達するまでの吸熱量を計算すると 500g のドライアイスは 41,450kJ を吸熱する。一方、TBA500 mL と広口ガラス瓶(質量 750g)が 33°C から 20°C まで温度低下する際に放熱する熱量は 6,876 kJ と計算されることから、ドライアイス 500g を冷媒として 500mL の TBA を固化するには十分な吸熱量であると考えられた。また、ドライアイス投入後、しばらく放置することで広口瓶内は二酸化炭素のみに置換されるため、広口瓶と空気の温度差による結露の発生を抑制することが可能であった。TBA は吸湿すると凝固しなくなるため、この点からも優れた性質であると考えら

れる。

同様の計算で、液体窒素 500g(約 625mL)が相転換温度の-196°Cから 20°Cまでに吸収する熱は 113,046 kJと計算されるが、実際に TBA 500 mLを固化させるための液体窒素量は約 1L である。液体窒素の相転換温度は-196°Cと低く、TBA と液体窒素の境界面は気体の窒素となるため、熱交換の効率が低いと考えられる。

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、ろ過効率に大きく影響するケーキの生成抑制を攪拌子を導入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、ドライアイス冷媒として用いることで、同重量の TBAを固化することが可能であることが示された。今後、これらの点を組み込んだ方法により、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、ニイガタ株式会社 橋本 真氏、浅野敏行氏に深く感謝する。

F. 研究発表

1. 論文発表

鶴岡秀志、高橋祐次、カーボンナノチューブのヘルスケア応用、2022, Nanofiber 13(1,2) 19-244.

高橋祐次、齊藤洋克、栗形麻樹子、北嶋聡、加圧式定量噴霧式吸入器(pMDI)製剤の

げっ歯類を対象とした鼻部ばく露装置の開発、Jpn. J. Clin.Toxicol. 2022 35(3) 255-259

高橋祐次、鶴岡秀志、相崎健一、大久保佑亮、北嶋聡、バイタルサインをモニタリングするための最先端技術の基礎と臨床;バイタルサインの統合的評価による急性毒性試験の致死性予測 Jpn. J. Clin.Toxicol. 36, 73-77, 2023

Hojo M, Maeno A, Sakamoto Y, Ohnuki A, Tada Y, Yamamoto Y, Ikushima K, Inaba R, Suzuki J, Taquahashi Y, Yokota S, Kobayashi N, Ohnishi M, Goto Y, Numano T, Tsuda H, Alexander DB, Kanno J, Hirose A, Inomata A, Nakae D. Two-year intermittent exposure of a multiwalled carbon nanotube by intratracheal instillation induces lung tumors and pleural mesotheliomas in F344 rats. Part Fibre Toxicol. 2022 May 19;19(1):38.

Tsunematsu T, Arakaki R, Sato M, Saito M, Otsuka K, Furukawa Y, Taquahashi Y, Kanno J, Ishimaru N. Exposure to Multiwall Carbon Nanotubes Promotes Fibrous Proliferation by Production of Matrix Metalloproteinase-12 via NF- κ B Activation in Chronic Peritonitis. Am J Pathol. 2022 Aug 10;S0002-9440(22)00240-1. doi: 10.1016/j.ajpath.2022.07.009.

Horibata K, Takasawa H, Hojo M, Taquahashi Y, Shigano M, Yokota S, Kobayashi N, Sugiyama KI, Honma M, Hamada S. In vivo genotoxicity assessment of a multiwalled carbon nanotube in a mouse ex vivo culture. Genes Environ. 2022 Oct 19;44(1):24.

Yokota S, Miyaso H, Hirai T, Suga K, Wakayama T, Taquahashi Y, Kitajima S. Development of a non-invasive method for testicular toxicity evaluation using a novel compact magnetic resonance imaging system. *J Toxicol Sci.* 2023;48(2):57-64.

Makiko Kuwagata, Masaru Tsuboi, Toshime Igarashi, Mariko Tsurumoto, Takuya Nishimura, Yuhji Taquahashi, Satoshi Kitajima, A 90-day repeated oral dose toxicity study of 2-Butylbenzo[d]isothiazol-3(2H)-one in rats, *Fundam. Toxicol. Sci.* 10(2) March 02, 2023 p.69-82

Makiko Kuwagata, Masaru Tsuboi, Toshime Igarashi, Mariko Tsurumoto, Takuya Nishimura, Yuhji Taquahashi, Satoshi Kitajima, A 90-day dose toxicity study of 2-(2H-benzotriazol-2-yl)-6-dodecyl-4-methylphenol in rats, *Fundam. Toxicol. Sci.* 10 (2) March 02, 2023 p.59-68 [doi.org/10.2131/fts.10.59]

2. 学会発表

Taquahashi Y, Yokota S, Hirose A, Kanno J Streamline of chronic inhalation exposure study protocol for nanomaterial, 第 49 回日本毒性学会学術年会 シンポジウム (2022.6.30)

Taquahashi Y, Tsuruoka S, Aisaki K, Okubo Y Kitajima S, An approach to prediction of mortality in acute toxicity studies by integrated assessment of vital signs, 第 49 回日本毒性学会学術年会 シンポジウム(2022.6.30)

Taquahashi Y, Non-clinical Safety Issue in Pediatric Drug Development: What

issues are to be considered from now on? 第 49 回日本毒性学会学術年会 シンポジウム (2022.7.2)

高橋祐次, 動物を用いない新たなリスク評価アプローチ法の開発: In vivo 毒性試験の経験に基づく NGRA による安全性評価手法に関する考察, 日本動物実験代替法学会シンポジウム 第 35 回大会 (2022.11.20)

高橋祐次, DPI 製品化の課題: 粉体の吸入剤研究開発における有効性・薬物動態・安全性の評価を推進する非臨床評価手法の開発, 第 13 回 粉末吸入剤研究会シンポジウム (2022.11.24)

Taquahashi Y, Tsuruoka S, Okubo Y Tanemura K, Aisaki K, Kitajima S, Modernization of acute toxicity testing with integrated assessment of multiple vital signs as endpoints, 第 96 回日本薬理学会学術年会シンポジウム (2022.12.2)

Taquahashi Y, Yokota S, Tsuji M, Morita K, Suga K, Hojyo M, Hirose A, Kanno J, Preliminary report on a two-year, 4-week-interval intermittent whole body inhalation study of the multi-walled carbon nanotube (MWNT-7) in male mice, SOT 2023 Poster (2023.3.22)

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

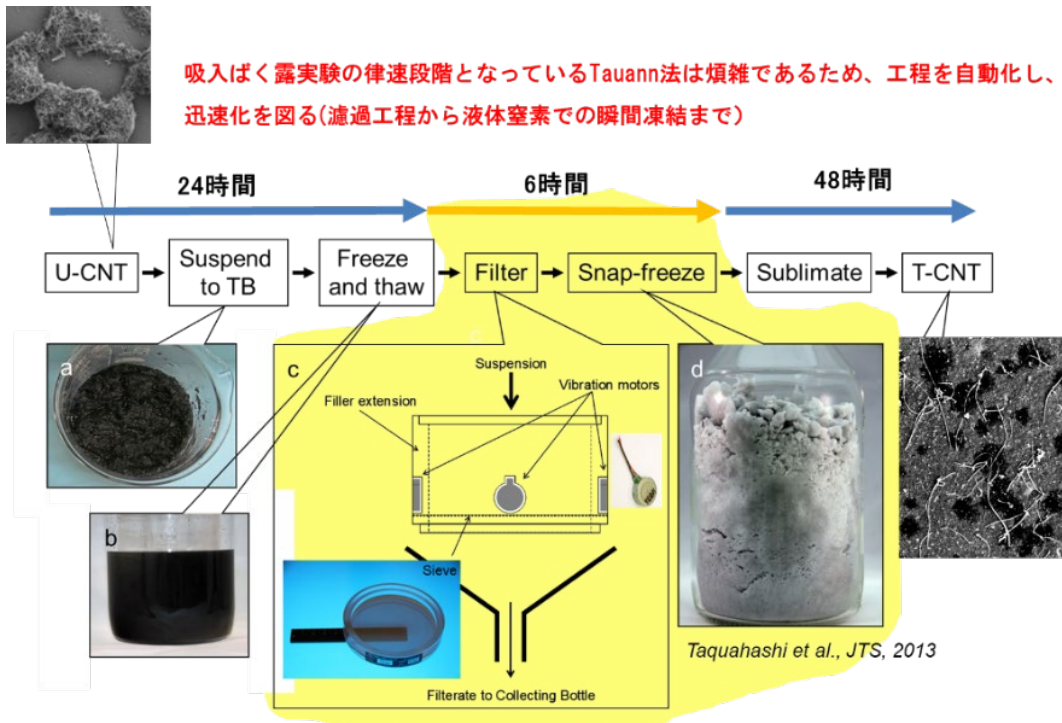


図1 Taquann法の概要と律速段階

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。

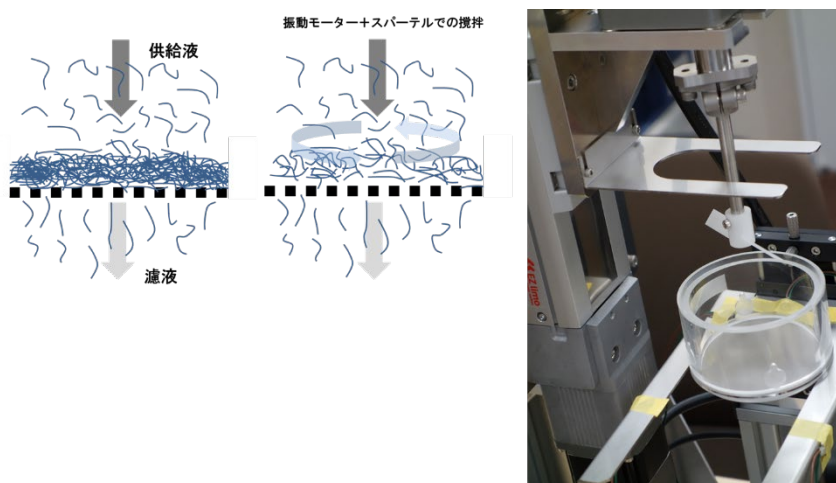


図2 攪拌装置を組み込んだ濾過装置の開発

ケーキの生成抑制が濾過効率を向上させるためには、ケーキ生成抑制が必要である。現在、実験

者が手動で行っているが、自動化のためにさせるには必須である。種々の検討の結果、Polyoxymethylene 樹脂製の攪拌子をシープ面から約 5mm 上部で回転させる装置を開発した。

ドライアイス500g + TBA500mL

TBA投入後約22分後の温度分布



tert-butyl alcohol,
melting point: 25.6°C

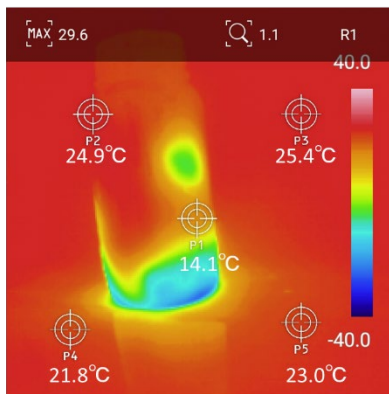


図 3 ドライアイスによる TBA の固化

ドライアイス500gを1000mLの広口瓶に投入後約10分程度放置し、広口瓶内が二酸化炭素雰囲気になったところでTBA500mLを投入した。TBA投入後、約20分程度で完全に固化した。

令和4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 毒性部 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）。本分担研究の目的は、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ことである。

今年度は、昨年度実施した単回吸入曝露試験の肺負荷量の経時変化に関する解析、ならびに、これらの結果をもとに間欠吸入曝露試験を実施した。7 週齢時より、週に 1 回 6 時間、13 週にわたって、雄マウスに対して、カーボンナノチューブの間欠吸入曝露を行った。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 2.7 mg/m³、4.7 mg/m³、MMAD は L、H 群ともに 1.1 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、昨年度実施した単回吸入曝露試験の肺負荷量と体内動態に関する経時的变化を明らかにすること、また、肺負荷量を考慮した間欠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变化と慢性影響評価に資する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) はナノテクノロジービジネス推進協議会より入手した NT-7 を MWCNT のベンチマーク物質として使用した。

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

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) 間欠吸入曝露試験

C57BL/6NcrSLC (日本エスエルシー株式会社) 雄性マウスを 5 週齢で購入し 2 週間の馴化期間を経たのち 7 週齢にて T-NT-7#53 を 1 週間に 1 回、1 日 6 時間、13 週にわたって合計 13 回の間欠吸入曝露を実施した。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。

(3) 間欠吸入曝露試験(リンパ管マウス用プレ試験)

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 週間に 1 回 (1 日 6 時間: 10:00~16:00)、3 週にわたって合計 3 回の間欠吸入曝露試験を実施した。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 週齢より吸入曝露試験を実施した。(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 OUTER ケージと PET 製 INNER ケージを使用した。紙製の床敷を使用し、1 ケージ当り 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 750TM 個別換気式飼育装置 特型) を使用した。飼育条件は、温度; $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度; $55 \pm 5\%$ 、換気回数; 約 20 回/h、照明時間; 8 時~20 時点灯 (照明明暗サイクル 12 時間) とし、固型飼料 CRF-1 (オリエンタル酵母工業株式会社) を自由摂取させ、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

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) 間欠吸入曝露試験

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、1 週間に 1 回、1 日 6 時間 (10:00~16:00)、13 週にわたって合計 13 回の間欠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/m³)測定を並行して行った。

相対濃度測定は、対応濃度 3×10^5 個/mL、2.5 nmの粒径が測定可能な凝縮粒子計数装置(Condensation

Particle Counter; CPC、CPC3776、サンプリング流量：1.5 L/min、TSI、MN、USA) を用いた。この情報はリアルタイムに得られることからエアロゾルの濃度コントロールに使用した。

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

先行研究において、CPCによるMWCNTの測定において、 1×10^3 個/mL程度の粒子数測定であっても、一時的に低値で推移することが散見されたことから、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 μ 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、 ϕ 55 mmろ紙ホルダー、柴田科学)にフッ素樹脂バインダーガラス繊維フィルター(Model TX40HI20-WW、 ϕ 55mm、捕集効率(DOP 0.3 μ 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 L/minの流量で曝露時間の6時間において、0~1hr、2~3hrおよび4~5hrの3回実施した。エアロゾルを吸引しフィルターに検体を捕集した。ろ過捕集後のフィルターの重量から予め秤量したフィルターの重量を差し引いた値を検体の重量とし、吸引空気量1.5 L/min \times 60min = 90 Lから1 m³当りの質量濃度を算出した。フィルターの秤量にはマイクロ天秤(XP26V、METTLER TOLEDO)を使用した。

7) エアロゾルの粒度分布

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

吸引時間は30分(低濃度群)または40分(高濃度群)とした。各分級ステージには専用のアルミホイルにシリコンオイルを塗布したものを装着し検体を回収した。尚、シリコンオイル塗布アルミホイルは、使用前に50℃のインキュベーター内で3日以上留置しシリコンオイルに含まれる溶媒を除去した。マイクロ天秤(XP26V、METTLER TOLEDO)を使用してアルミホイルの質量を、MOUDI装着前と、MWCNT回収後に測定し、その差分を検体質量とした(図3)。

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

倫理面への配慮

本実験は動物愛護に関する法律、基準、指針を遵守し国立医薬品食品衛生研究所・動物実験委員会の承認のもとに人道的実施された。ナノマテリアルの実験に際しては、当研究所の専用実験施設内で、その運用規則に従い実施しており、曝露・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

単回吸入曝露試験において回収したBALF

細胞から肺胞マクロファージへの NT-7 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ていた。今年度、肺負荷量について測定したところ、顕微鏡下での BALF 細胞での取り込み結果と同様の結果を定量的に得た。これらの結果から半減期を算出した結果、高濃度群では $t_{1/2}=6.7$ 日という結果が得られた。

2) T-NT-7#53 の間欠吸入曝露試験

Taquann 全身曝露吸入装置 ver 3.0 を用いた T-NT-7#53 の間欠吸入曝露試験における質量濃度の平均結果は、低濃度は 0.8 mg/カートリッジ で 2.7 mg/m^3 (エアロゾル効率 45%)、高濃度は 1.6 mg/カートリッジ で高濃度は 4.7 mg/m^3 (エアロゾル効率 39%) となった (表3、図4)。MMAD のデータは、低濃度群で $1.1 \mu\text{m}$ ($\sigma_g 5.8$) と高濃度群で $1.2 \mu\text{m}$ ($\sigma_g 5.3$) を示した。

一方、肺負荷量については、単回吸入曝露試験日を day0 として、day0: 低用量群 $1.7 \mu\text{g}$ 、高用量群 $3.5 \mu\text{g}$ 、day1: 低用量群 $2.0 \mu\text{g}$ 、高用量群 $4.1 \mu\text{g}$ 、day7: 低用量群 $1.9 \mu\text{g}$ 、高用量群 $2.3 \mu\text{g}$ 、day14: 低用量群 $1.73 \mu\text{g}$ 、高用量群 $1.9 \mu\text{g}$ 、day28: 低用量群 $1.1 \mu\text{g}$ 、高用量群 $1.3 \mu\text{g}$ の値を示した (図 5)。間欠吸入曝露試験における肺負荷量については現在計測中である。

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実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。今年度は昨年度実施した単回吸入曝露試験の肺負荷量の結果について整理し、その結果もとに間欠吸入曝露プロトコルの提案と曝露実験を実際に開始した。

間欠吸入曝露試験プロトコルについて、隔週で 13 週にわたり吸入曝露実験をすることとした。間欠吸入曝露試験における質量濃度測定の結果から、目標濃度は概ね達成され、エアロゾル効率も 40% 程度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。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 ($1.3 \sim 1.4 \mu\text{m}$ 、 $\sigma_g 2.6 \sim 3.0$) とほぼ同等の結果を示した。また、低用量群と高用量群とで同一の MMAD が得られたことから、Taquann 法ならびに本吸入曝露装置の精度の高さが示された。

今後、間欠吸入曝露試験における肺負荷量の経時変化に関するデータを取得し、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、間欠曝露プロトコルの有用性を検証していく。

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、肺負荷量の経時変化を明らかにした。NT-7 の半減期はおおよそ 7 日と計算され、その結果をもとに 1 週間に 1 回 (1 日 6 時間)、13 週にわたる間欠吸入曝露実験を実施した。その結果、13 回にわたり安定した曝露濃度と MMAD の結果を得ることに成功した。

今後、間欠吸入曝露による肺負荷量の時間経過を定量的に評価し、組織学解析ならびに免疫応答解析の結果を踏まえ、適切な間欠吸入曝露試験プロトコルを提案したい。

謝辞: 本研究の遂行にあたり、技術的支援をいただいた、当研究所毒性部の辻昌貴氏、森田紘一氏、菅康佑氏、相田麻子氏、および、東京都健康安全研究センターの前野愛氏に深く感謝する。

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

- Kaneko S, Okada Y, Yokota S, Takamatsu K: Reactive Blue Dye: Highlights of Vacuoles in Human Sperm. *J Med Diagn Meth.* 12 (2) No. 1000400 (2023).
- Yoshioka H, Yokota S, Tominaga S, Tsukiboshi Y, Suzui M, Shinohara Y, Yoshikawa M, Sasaki H, Sasaki N, Maeda T, Miura N: Involvement of Bmal1 and Clock in bromobenzene metabolite-induced diurnal renal toxicity. *Biological Pharm Bull.* In press. (2023)
- Tsukiboshi Y, Ogata A, Noguchi A, Mikami Y, Yokota S, Ogata K, Yoshioka H: Sasa veitchii extracts protect phenytoin-induced cell

proliferation inhibition in human lip mesenchymal cells through modulation of miR-27b-5p. *Biomedical Research (Tokyo).* 44 (2) 73–80. (2023).

Yokota S*, Miyaso H, Hirai T, Suga K, Wakayama T, Taquahashi Y, Kitajima S: Development of a non-invasive method to evaluate testicular toxicity using a novel compact magnetic resonance imaging system. *J Toxicol Sci.* 48(2): 57-64. (2023)

Miyaso H, Takano K, Nagahori K, Li Z, Kawata S, Kuramasu M, Wu X, Ogawa Y, Yoshioka H, Matsuno Y, Yokota S, Itoh M: Neonatal corticosterone administration increases p27-positive Sertoli cell number and decreases Sertoli cell number in the testes of mice in prepuberty. *Sci Rep.* 12;12(1):19402. (2022)

Horibata K, Takasawa H, Hojo M, Taquahashi Y, Shigano M, Yokota S, Kobayashi N, Sugiyama K, Honma M, Hamada S: In vivo genotoxicity assessment of a multiwalled carbon nanotube in a mouse ex vivo culture. *Genes and Environment.* 44: 24. (2022)

Hojo M, Maeno A, Sakamoto Y, Ohnuki A, Tada Y, Yamamoto Y, Ikushima K, Inaba R, Suzuki J, Taquahashi Y, Yokota S, Kobayashi N, Ohnishi M, Goto Y, Numano T, Tsuda H, Alexander DB, Kanno J, Hirose A, Inomata A, Nakae D: Two-year intermittent exposure of a multiwalled carbon nanotube by intratracheal instillation induces lung tumors and pleural mesotheliomas in

F344 rats. Particle and Fibre Toxicology. 19(1): 38. (2022)

横田理、押尾茂: 化学物質曝露により生じる雄性生殖機能障害と発生・発達毒性、DOHaD 研究、第 11 巻、第 2 号、p103-8. (2023)

Wakayama T, Yokota S, Noguchi K, Sugawara T, Sonoda K, Wanta A: Quantitative Evaluation of Spermatogenesis by Histochemistry. Histochem Cell Biol. 157(3):287-295. (2022)

2. 学会発表

Taquahashi Y, Yokota S, Tsuji M, Morita K, Suga K, Hojyo M, Hirose A, Kanno J: Preliminary report on a two-year, 4-week-interval intermittent whole body inhalation study of the multi-walled carbon nanotube (MWNT-7) in male mice, the 62st Annual

Meeting of the Society of Toxicology, Nashville, Tennessee, USA (2023.3.22)

高橋祐次、横田理、広瀬明彦、菅野純: ナノマテリアルの慢性吸入ばく露試験法の効率化、第 49 回日本毒性学会学術年会、北海道 (2022.6.30) シンポジウム

横田理、関根尚、市瀬孝道、藤ノ木政勝、若山友彦、北嶋聡、押尾茂: ナノ銀の妊娠期曝露により生じる、雄性生殖系列を介した継世代・多世代影響、第 41 回アンドロロジー学会、福島 (2022.6.3)

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表1 単回吸入曝露実験の群構成

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 間欠吸入曝露実験の群構成

Group	Examinations	N	Necropsy after inhalation exposure			
			5th	13th	12M	24M
Control 0 mg/m ³ 6hr/day/week x 13 times	•Lung Burden	12	3	3	3	3
	•Histopathology(perfusion)	26	0	0	6	20
	•Immune function					
	BALF	12	0	0	6	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/day/week x 13 times	•Lung Burden	12	3	3	3	3
	•Histopathology(perfusion)	26	0	0	6	20
	•Immune function					
	BALF	12	0	0	6	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/day/week x 13 times	•Lung Burden	12	3	3	3	3
	•Histopathology(perfusion)	26	0	0	6	20
	•Immune function					
	BALF	12	0	0	6	6
	Pulmonary interstitium mRNA Spleen, Lymph node					
	Subtotal	50	Consist of two sub-groups, A&B			
Total number of animals		150				

表 3 間欠吸入曝露実験:曝露濃度の結果

曝露濃度結果 (mg/m ³)															
1週目		2週目		3週目		4週目		5週目		6週目		7週目			
A		A		A		A		A		A		A			
Low	High	Low	High	Low	High	Low	High	Low	High	Low	High	Low	High		
1	2.30	4.20	1	2.16	4.10	1	2.57	4.42	1	2.40	4.48	1	2.79	4.53	
2	2.57	4.91	2	2.52	4.62	2	2.87	5.23	2	2.71	5.21	2	2.90	4.62	
3	2.93	5.61	3	2.79	4.53	3	3.01	5.62	3	2.78	5.84	3	3.04	4.94	
Ave	2.60	4.91	Ave	2.49	4.42	Ave	2.82	5.09	Ave	2.63	5.18	Ave	2.87	4.99	
SD	0.26	0.58	SD	0.26	0.23	SD	0.18	0.50	SD	0.17	0.56	SD	0.12	0.40	
B		B		B		B		B		B		B			
Low	High	Low	High	Low	High	Low	High	Low	High	Low	High	Low	High		
1	2.43	4.27	1	2.80	4.48	1	2.40	3.73	1	2.60	4.57	1	2.67	4.80	
2	2.63	5.59	2	2.89	5.03	2	2.50	4.62	2	2.98	5.22	2	2.66	5.09	
3	2.90	5.38	3	2.91	5.47	3	2.81	4.57	3	3.11	5.48	3	2.82	5.27	
Ave	2.65	5.08	Ave	2.87	4.99	Ave	2.57	4.31	Ave	2.90	5.09	Ave	2.72	5.05	
SD	0.19	0.58	SD	0.05	0.40	SD	0.17	0.41	SD	0.22	0.38	SD	0.07	0.19	
8週目		9週目		10週目		11週目		12週目		13週目					
A		A		A		A		A		A					
Low	High	Low	High	Low	High	Low	High	Low	High	Low	High				
1	2.51	4.29	1	2.47	4.34	1	2.44	3.68	1	2.51	3.62				
2	2.66	4.38	2	2.86	5.01	2	2.52	4.17	2	2.66	4.29				
3	2.92	5.00	3	2.66	4.66	3	2.79	4.80	3	2.76	4.50				
Ave	2.70	4.56	Ave	2.66	4.67	Ave	2.58	4.22	Ave	2.64	4.14				
SD	0.17	0.32	SD	0.16	0.27	SD	0.15	0.46	SD	0.10	0.38				
B		B		B		B		B		B					
Low	High	Low	High	Low	High	Low	High	Low	High	Low	High				
1	2.51	4.13	1	2.46	4.11	1	2.34	3.78	1	2.46	4.99				
2	2.84	4.63	2	2.71	4.58	2	2.72	4.97	2	2.76	4.77				
3	2.71	4.64	3	2.69	4.83	3	2.67	5.20	3	2.79	5.64				
Ave	2.69	4.47	Ave	2.62	4.51	Ave	2.58	4.65	Ave	2.67	5.21				
SD	0.14	0.24	SD	0.11	0.30	SD	0.17	0.62	SD	0.15	0.37				

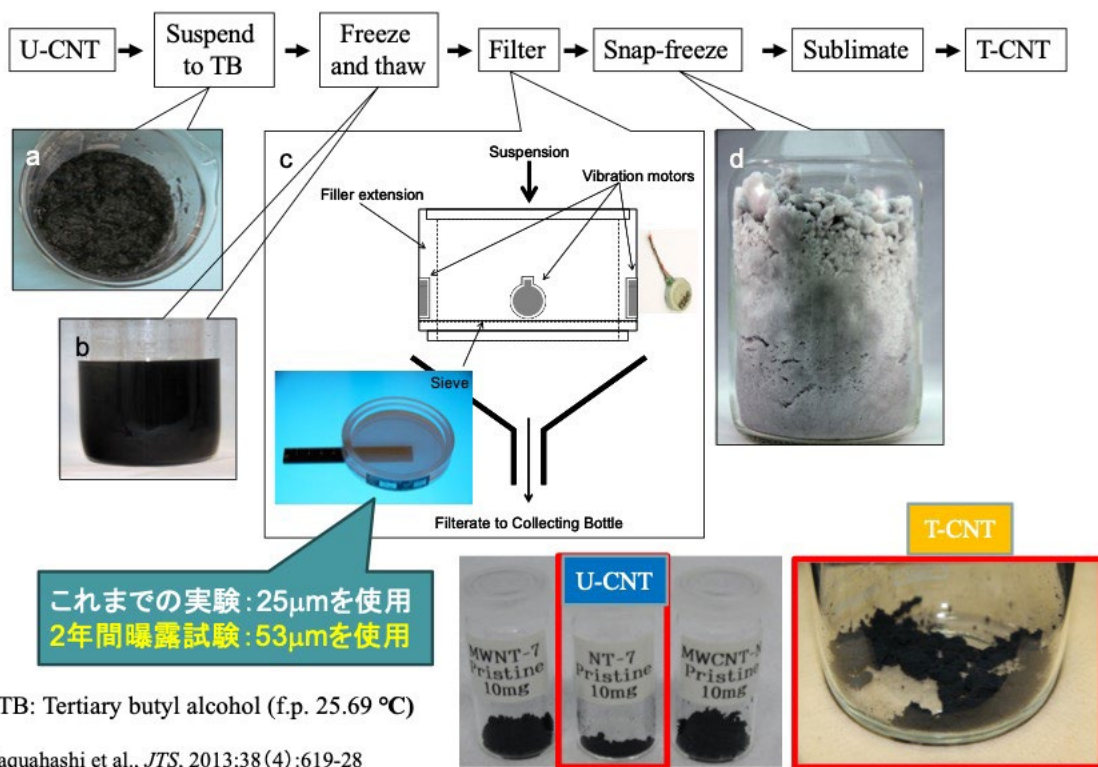


図1 Taquann法の概要

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。

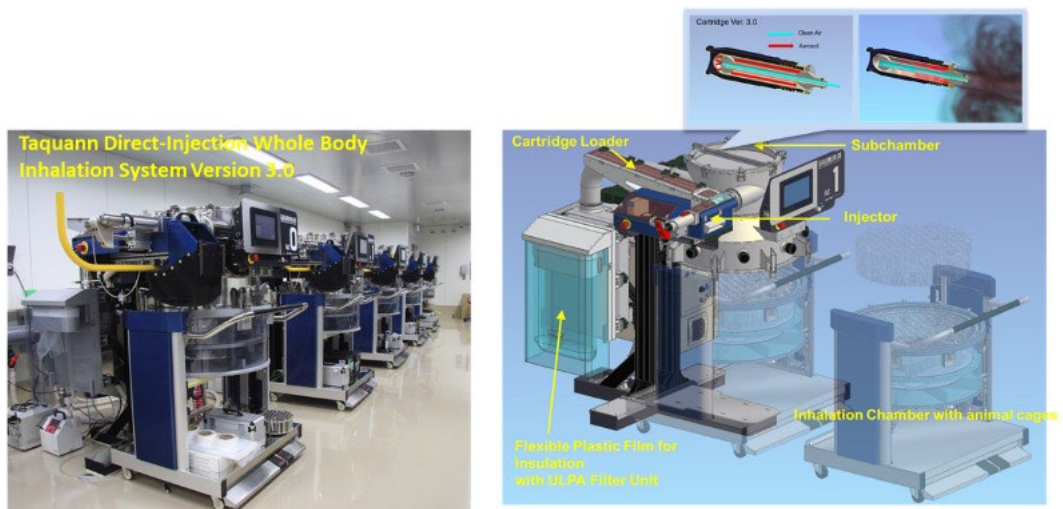


図2 Taquann 直噴全身吸入装置 Ver3.0

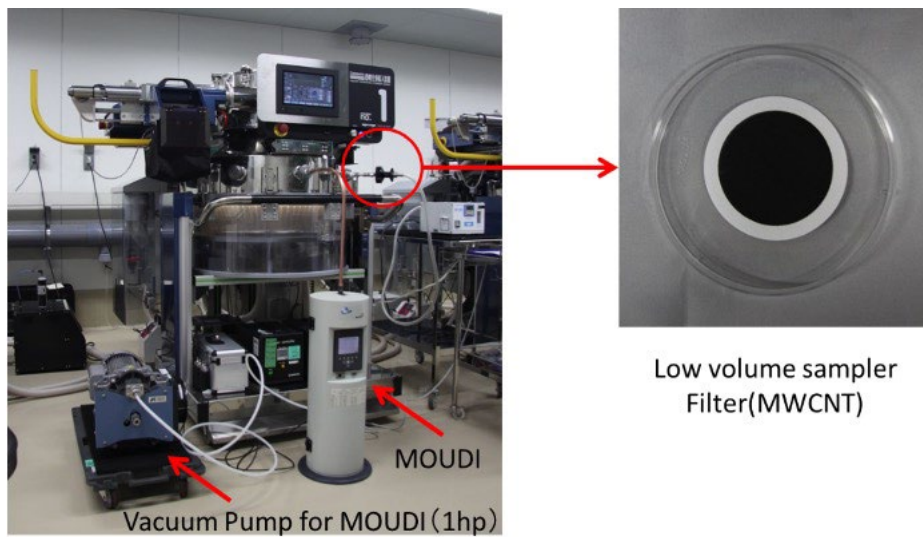
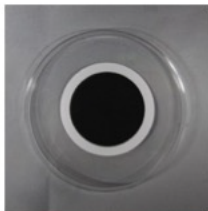


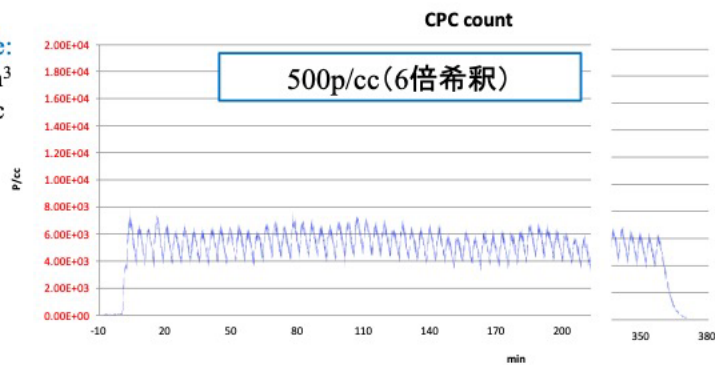
図3 エアロゾルモニタリングの概要

Low volume sampling (LVS)
 フィルターに捕集されたエアロゾルの質量(mg)を、吸引空気量 1.5L/min×60min=90Lから 1m³当りの質量濃度を算出。



mg/m ³	A		B	
	Low	High	Low	High
1	2.6	4.9	2.7	5.1
2	2.5	4.4	2.9	5.0
3	2.8	5.1	2.6	4.3
4	2.6	5.2	2.9	5.1
5	2.9	5.0	2.7	5.1
6	2.9	4.6	2.7	5.0
7	2.6	4.4	2.6	4.6
8	2.7	4.6	2.7	4.5
9	2.7	4.7	2.6	4.5
10	2.6	4.2	2.6	4.7
11	2.6	4.1	2.7	5.2
12	2.6	3.8	2.5	4.6
13	2.7	4.5	2.8	4.4
Ave	2.7	4.6	2.7	4.8
SD	0.1	0.4	0.1	0.3

Low dose:
 2.7 mg/m³
 3000 p/cc



High dose:
 4.7mg/m³
 4800 p/cc

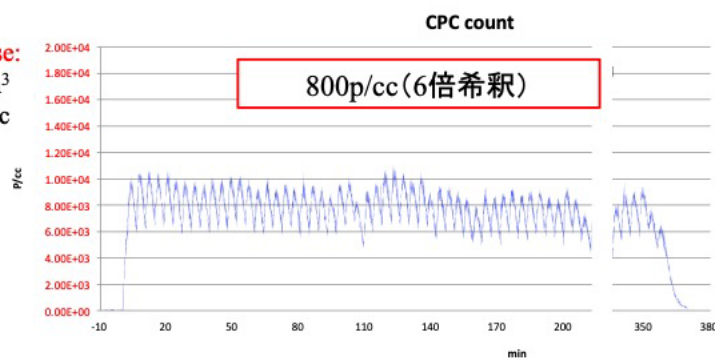


図4 間欠吸入曝露試験の結果

1週間に1回(6時間:10:00~16:00)、13週にわたりNT-7の間欠吸入曝露試験を実施した。(左図)Low volume sampler(LVS)を用い、フィルターに捕集されたNT-7の質量(mg)を、吸引空気量 1.5L/min x 60 min= 90Lから 1m³あたりの質量濃度を算出した。(右図)凝縮粒子計数装置(Condensation Particle Counter; CPC、CPC3776、サンプリング流量: 1.5 L/min、TSI、MN、USA)を用い、定量範囲に入るように6倍希釈し粒子数を測定した。低用量群は3000 p/cc、高用量群は4800 p/ccを示した。

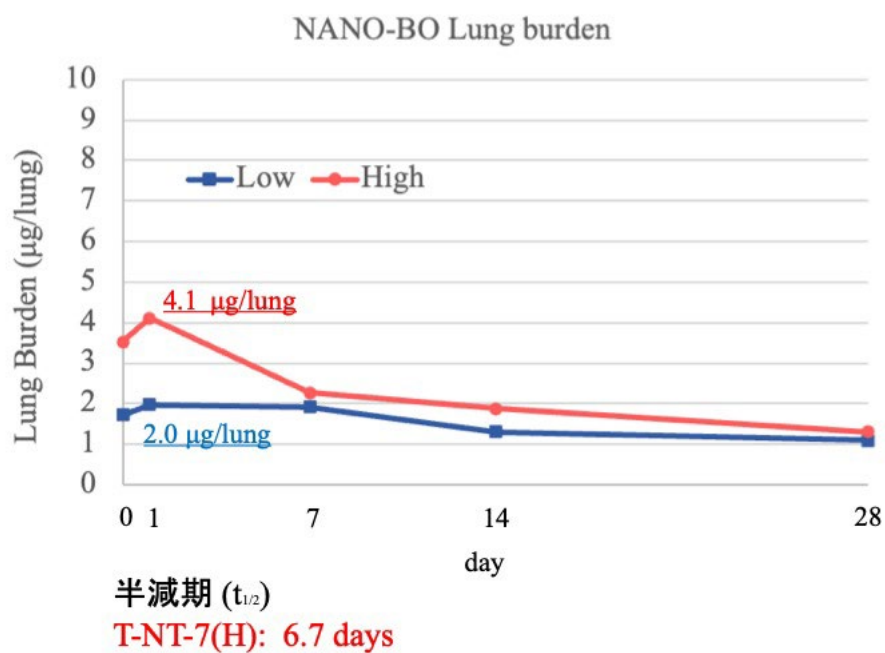


図5 肺負荷量(単回吸入曝露試験の結果)

単回吸入曝露試験日を day0 とし、曝露直後(day0)、1 日後(day1)、7 日後(day7)、14 日後(day14)、28 日後(day28)の肺負荷量を定量した。得られた結果から NT-7 の半減期はおよそ 7 日であることが判明した。

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 客員研究員
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: 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: 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: 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: 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: 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、保土ヶ谷製 MWNT-7 (NT-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 NT-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。

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、L 群、M 群、H 群および EH 群にはそれぞれ 0.0175、0.07、0.28 および 0.42 mg/kg 体重の用量で Taquann 処理 NT-7 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。試験開始後 81 週経過時点において、投与に関連した死亡は認められていない。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、NT-7 の発癌性を評価する。

また、前回の研究班で報告した三井製 MWNT-7 の 2 年間の間欠気管内投与試験では、胸膜中皮腫が高頻度に発生し、その発生部位が縦隔部であることが示唆されたため、今回、発生部位について詳細な組織学的な解析を行うため、別途、EH 群と同条件で少数の動物に NT-7 を反復投与し 1 週間後に剖検し、胸郭全体を固定し標本作製した。

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 (保土ヶ谷製) 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。

気管内投与法を用いた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 (三井製) を投与した結果、5%の動物に肺腫瘍が、95%の動物に胸腔中皮腫が発生した。³⁾ さらに、我々の MWNT-7 (三井製) の 2 年間の間欠気管内投与試験では、TIPS 試験の結果より頻度が低いものの、やはり胸腔中皮腫が誘発され、胸腔中皮腫は気管内投与で発生しやすいことが示された (Hojo ら)⁴⁾。これは、気管内投与では Dose Rate が著しく高いために胸腔への 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投与頻度や用量設定が重要である。

一方で、肺腫瘍に関しては、我々の間欠投与試験の結果を 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。2 年間の実験期間の初期 (13 週間) に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、過去に本研究班で使用されてきた三井製の 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。

13 週間の反復投与は令和 3 年度に終了しており、今年度は、経過観察を行った。

また、Hojo らの間欠投与試験で発生した胸腔中皮腫の詳細な組織学的解析からは、その発生部位が縦隔部、特に Retrocardiac Pleural Fold (RPF) 周辺であることが示唆された。そこで、追加試験として、中皮腫の発生が期待される超高用量群 (EH 群) と同じ条件で投与した少数の動物に関して、RPF を含む胸膜全体の組織学的な解析を行うこととした。

B. 研究方法

i) MWCNT の調製

保土ヶ谷製の MWNT-7 (NT-7) を Taquan 処理 (53 μ m メッシュ)⁵⁾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。

なお、0.01 mg/mL の分散液を DLS で測定した二次粒子径は 571.4 nm であった。

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。

2 年間の本試験については、1 週間に 1 度、13 回投与後に 2 年間観察飼育した。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測定のため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 (PennCentury 製) 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。

胸膜の詳細観察用の追加試験については、本試験の EH 群と同様に 5 匹の雄性 F344 ラ

ットについて実施し、13 回の反復投与終了の 1 週間後に剖検した。

全動物について、1 週間から 4 週間に一度以上の頻度で、体重を測定した。

iii) 剖検・採材

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 10% 中性ホルマリン溶液にて固定した。

追加試験については、胸腔内全体の胸膜の状態を詳細に観察するため、横隔膜および胸郭を部分的に除去した後、胸郭全体をホルマリン固定した。RPF を含む縦隔胸膜や横隔膜組織の強い収縮を避けるため、また、胸郭全体の切片を作製するため、セロイジン包埋を行った。脱灰後、水洗、脱水 (70%、80%、90%、95%、100% アルコールの順にそれぞれ 24 時間以上) を行い、ジエチルエーテル・アルコール等量混合液に 24 時間浸漬させた。次に、1% セロイジン液に 3 日間浸漬した後、1% セロイジン液を交換し、液量が 2/3 になるまで濃縮させ、クロロホルム蒸気で硬化させた (24 時間)。ブロックを頭尾軸に沿って、一定間隔で切り出した。

vi) 肺負荷量の測定

肺内の MWCNT の測定は、Ohnishi らの蛍光マーカーを用いて検出する手法 (大西法) に従った^{6),7)}。肺組織をアルカリ溶液で溶解し、十分に分散させ、残存する肺組織を酸で溶解した後、MWCNT にベンゾ-ジ-ペリレン (B[ghi]P) を吸着させた。フィルターで MWCNT 繊維を捕捉してから、アセトニトリル溶液に B[ghi]P を脱着させ、HPLC の分析に供した。

<倫理面への配慮>

本研究では、人を対象とした研究、人の

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

C. 研究結果

i) 本試験

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 1)。

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 2・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 2)。

今年度末 (試験開始後 81 週経過) までに途中解剖した個体は、各群 2 匹程度で、いずれも、投与との関連は無いものと考えられた (表 1)。餌詰まりによる死亡が目立ったため、体重減少など、状態の悪い個体については同じ成分の粉末飼料に変更して対応することとする。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。

胸膜の詳細観察用の標本については、セロイジン包埋を実施し、ブロックの作製を完了したところである (図 3)。

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)、我々の昨年度の 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。中皮腫が高頻度で発生した Numano らや Hojo らの試験は三井製を用いていたのに対し、中皮腫が発生しなかった Kasai らの報告では、保土ヶ谷製を用いていた。試験方法だけではなく、製造元の違いもこの差異に寄与したのかもしれない。

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、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。

本試験の投与プロトコールは Numano らの試験と類似しているため、EH 群では早期

の中皮腫死亡が予想された。Numanoらの報告では試験開始後47週時点で初めて中皮腫個体が発生し、次々と死亡したのに対し、本試験では、試験開始後81週経過時点において、1例も中皮腫の個体は確認されていない。これは、前述のようにNT-7の繊維長が短いために、中皮腫誘発性が弱いからかもしれない。引き続き、注意して観察を行う。

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。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。試験開始後81週経過時点において、投与に関連した死亡は認められていない。

(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、技術的支援をしていただいた、生嶋清美氏、湯澤勝廣氏、宮尾佳伸氏、河合礼果氏、平松恭子氏、長澤明道氏、故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(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) Two-year intermittent exposure of a multiwalled carbon nanotube by intratracheal instillation induces lung tumors and pleural mesotheliomas in F344 rats. Hojo M, Maeno A, Sakamoto Y, Ohnuki A, Tada Y, Yamamoto Y, Ikushima K, Inaba R, Suzuki J, Taquahashi Y, Yokota S, Kobayashi N, Ohnishi M, Goto Y, Numano T, Tsuda H, Alexander DB, Kanno J, Hirose A,

Inomata A, Nakae D. Part Fibre Toxicol. 2022, 19(1), 38

- 6) Novel method using hybrid markers: development of an approach for pulmonary measurement of multi-walled carbon nanotubes. Ohnishi M, Yajima H, Kasai T, Umeda Y, Yamamoto M, Yamamoto S, Okuda H, Suzuki M, Nishizawa T, Fukushima S. J Occup Med Toxicol. 2013 Oct 25;8(1):30.
- 7) Improved method for measurement of multi-walled carbon nanotubes in rat lung. Ohnishi M, Suzuki M, Yamamoto M, Kasai T, Kano H, Senoh H, Higashikubo I, Araki A, Fukushima S. J Occup Med Toxicol. 2016 Sep 15;11:44.

G. 研究発表

(論文発表)

- Hojo M, Maeno A, Sakamoto Y, Ohnuki A, Tada Y, Yamamoto Y, Ikushima K, Inaba R, Suzuki J, Taquahashi Y, Yokota S, Kobayashi N, Ohnishi M, Goto Y, Numano T, Tsuda H, Alexander DB, Kanno J, Hirose A, Inomata A, Nakae D: Two-year intermittent exposure of a multiwalled carbon nanotube by intratracheal instillation induces lung tumors and pleural mesotheliomas in F344 rats. Part Fibre Toxicol. 19(1), 38, 2022.
- Horibata K, Takasawa H, Hojo M, Taquahashi Y, Shigano M, Yokota S, Kobayashi N, Sugiyama KI, Honma M, Hamada S: In vivo genotoxicity assessment of a multiwalled carbon nanotube in a mouse ex vivo culture.

Genes Environ. 44(1), 24.

(学会発表)

- 前野 愛, 北條 幹, 坂本 義光, 湯澤 勝廣, 長澤 明道, 生嶋 清美, 山本 行男, 平松 恭子, 矢野 範男, 大貫 文, 稲葉 涼太, 鈴木 仁, 横田 理, 高橋 祐次, 小林 憲弘, 菅野 純, 広瀬 明彦, 猪又 明子, 中江 大: 多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の2年間間欠気管内投与によるラット発がん性試験. 第49回日本毒性学会学術年会 (札幌). 2022年6月30日
- 北條 幹: ラット気管内投与法によるナノマテリアルの発癌性の評価手法の発展と課題. 第49回日本毒性学会学術年会 (札幌) シンポジウム. 2022年6月30日
- 前野 愛, 北條 幹, 坂本 義光, 湯澤 勝廣, 長澤 明道, 平松 恭子, 大貫 文, 稲葉 涼太, 鈴木 仁, 横田 理, 高橋 祐次, 小林 憲弘, 広瀬 明彦, 猪又 明子, 中江 大: 多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の2年間間欠気管内投与によるラット肺腫瘍及び中皮腫の発生. 第39回日本毒性病理学会学術集会 (東京・ハイブリッド). 2023年1月25-26日
- Taquahashi Y, Yokota S, Tsuji M, Morita K, Suga K, Hojo M, Hirose A, Kanno J. Preliminary report on a two-year, 4-week-interval intermittent whole body inhalation study of the multi-walled carbon nanotube (MWNT-7) in male mice. Society of Toxicology 62nd Annual Meeting, Nashville, US, 2023. 3. 19-23.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を

含む)

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

表 1 途中解剖個体の一覧 (2023 年 3 月時点) D: 斃死、MS: 瀕死

群名	動物番号	剖検種別	解剖日	経過週	所見
H	14	D	2022/4/11	21	膀胱内出血
M	24	D	2022/8/24	40	急激な体重減少。餌詰まり
L	40	D	2022/11/9	51	体重減少後、回復せず。餌詰まり
H	29	MS	2022/11/11	51	脳出血あり
C	7	MS	2022/12/13	56	下半身麻痺状態で発見、肉眼的には異常なし
EH	4	MS	2023/1/16	61	下垂体腫瘍
H	37	D	2023/2/8	64	持続的な体重減少。餌詰まり
L	14	D	2023/3/14	69	突然死、餌詰まり
C	6	D	2023/3/20	70	持続的な体重減少。餌詰まり
H	22	MS	2023/3/20	70	貧血、黄疸、脾臓腫大

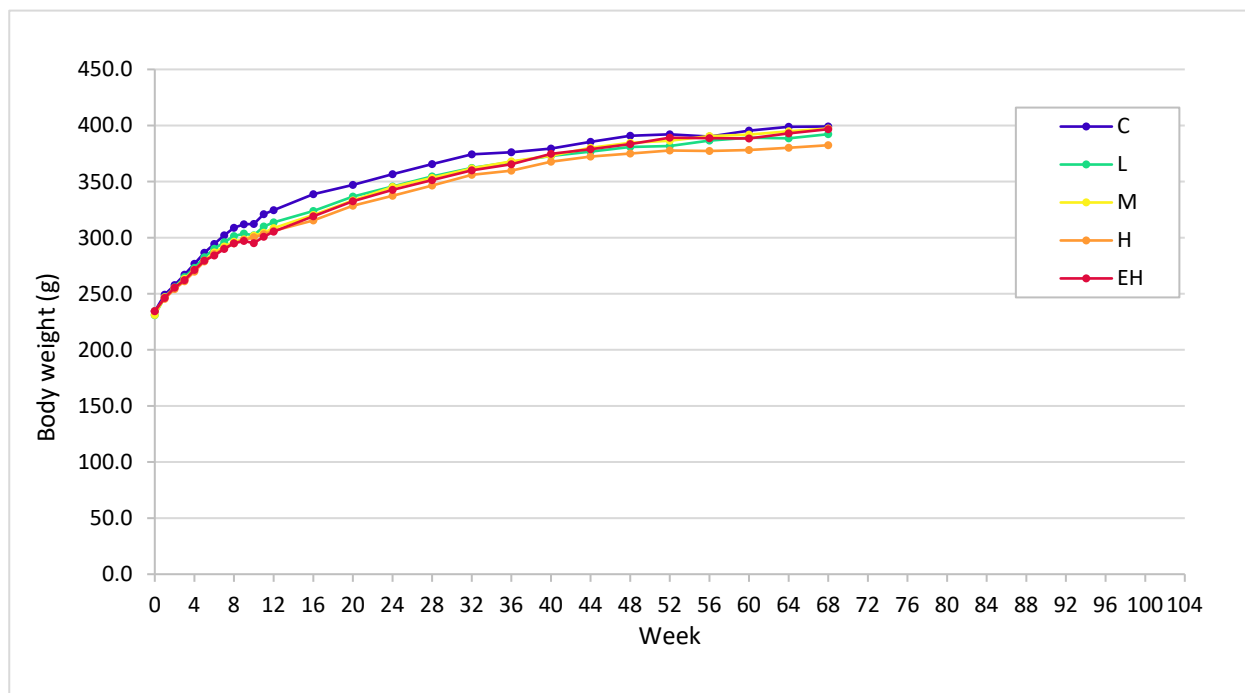


図 1. 本試験における体重推移 (令和 4 年度末時点)

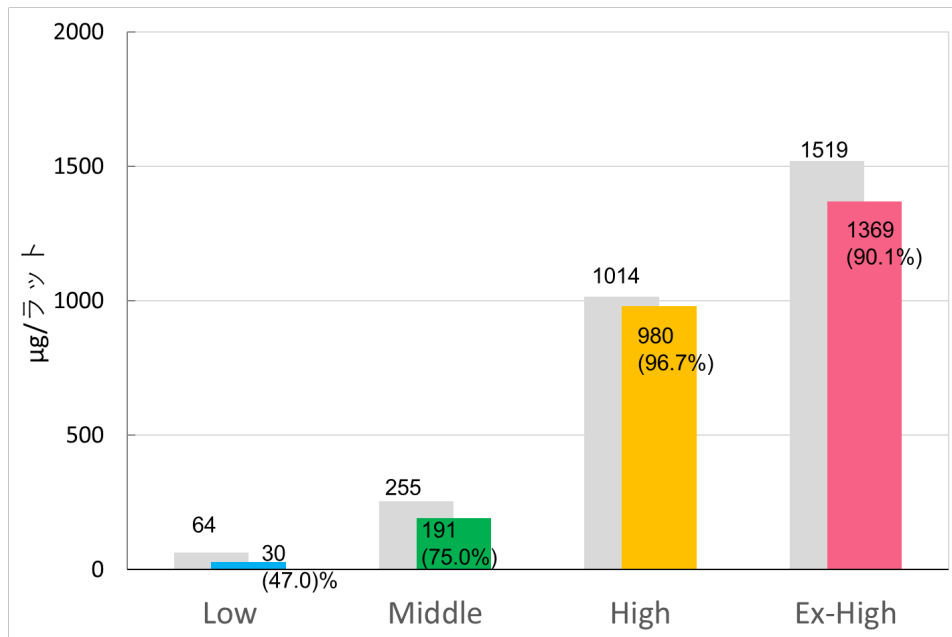


図2. 本試験における投与総量（灰色）と肺負荷量の測定結果



図3. 追加試験におけるラット胸郭部のセロイジン包埋後の切り出しサンプル

令和4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 名古屋市立大学大学院医学研究科・特任教授

研究協力者：David B. Alexander 名古屋市立大学大学院医学研究科・客員教授

William T. Alexander 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・大学院医学研究科大学院生

研究要旨

MWCNT-7は、日本バイオアッセイ研究センターで実施された吸入曝露試験（Kaeai et al., Particle and Fibre Toxicol, 2016）において肺に発がん性を示すことが分かったが、当研究室が開発した経気管肺内噴霧投与（TIPS法）では胸腔に悪性中皮腫を発生させた（Numano et al., Cancer Sci, 2019）。このように、同一のMWCNTが投与方法によって発がん標的臓器が異なってしまう機序は明らかではなく、リスク評価において問題となっている。上記の2試験におけるMWCNT-7の肺内蓄積量は、吸入曝露試験では2年後に1.0～2.0mg/gラットに達し、気管内投与（TIPS）法では、投与終了の12週に1.5mg/ラットとなり2年後までに約半量が残存する。よって、投与したMWCNTの肺蓄積量は吸入曝露においてTIPSより少ない事になる。本研究では、MWCNT-7をTIPS法にて投与して、低用量域における発がん頻度と発がん標的組織（肺・胸膜中皮）を明らかにする事を目的とした。

F344雄ラットを用いて、MWCNT-7を0.5%PF68溶液にて分散させてTIPS法において1日1回・4日間（合計4回）に、0.00008mgから既知の0.5mg/ラットの群構成にて投与した。現在、肺と胸膜中皮の炎症程度と腫瘍発生について解析する実験を実施中である。

A. 研究目的

MWCNT-7は日本バイオアッセイ研究センターで実施された吸入曝露試験では肺に発がん性を示し（Kasai et al., Particle and Fibre Toxicol, 2016）、当該研究室が開発した経気管肺内噴霧投与（TIPS法）では胸腔に悪性中皮腫を発生させる（Numano et al., Cancer Sci, 2019）。同じ物質で投与方法の差異によって異なる組織形態の腫瘍が発生する機

序は明らかではない。吸入曝露試験におけるMWCNT-7の肺内蓄積量2年後には約1.0～2.0mg/gラット、TIPSでは、12週後には約半量となる。よって、吸入曝露では初期には肺内蓄積量はTIPS法より圧倒的に少ない事になる。吸入曝露試験には高額な経費が要求されるために、用量を変えた試験を実施することは全く困難（恐らくあり得ない）であり、行政（リスク評価）において大きな問題となって

いる。

本研究では、MWCNT-7 を TIPS 法にて投与して、吸入暴露法を考慮した低用量域における発がん標的組織（肺・胸膜中皮）を明らかにして、用量と発がん標的組織（肺、胸膜中皮）の関係を明らかにする事を目的とした。

B. 研究方法

F344 雄ラットを用いて、MWCNT-7 を実験開始の 1～4 日間に 1 日 1 回/・TIPS 法にて 0.00008mg から既知の 0.5mg/ラットの群構成にて投与終了後 52 週（5 匹）、75 週（5 匹）、104 週（15 匹）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する。

G 1 : 無処置

G 2 : 溶媒（生食 0.5mL+0.5%PF68）X 4

G 3 : 0.0008 mg/rat MWCNT-7
(0.0002mg/0.5mLx 4)

G 4 : 0.004 mg/rat MWCNT-7
(0.001mg/0.5mLx 4)

G 5 : 0.02 mg/rat MWCNT-7
(0.005mg/0.5mLx4)

G 6 : 0.1 mg/rat MWCNT-7
(0.025mg/0.5mLx 4)

G 7 : 0.5 mg/rat MWCNT-7
(0.125mg/0.5mLx 4)

各群構成は 25 匹として、投与終了後 52 週（5 匹）、75 週（5 匹）、104 週（15 匹）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する。屠殺時には胸郭洗浄液、血液、胸郭、肺、肝、腎、脾、骨髄等を採取して炎症の程度、前がん病変を含む腫瘍病の発生について詳しく解析する。

C. 結果

現在 6 ヶ月を経過中である。斃死ラットはない。今年中に 1 年の経過が得られ、前がん病変（過形成、腺腫とそれらに伴い遺

伝子変化）についてのデータが得られる。

D. 考察

慢性観察終了時には、TIPS 法により MWCNT-7 の低用量域における発がんの用量依存性と発がん標的組織（肺、胸膜中皮）の標的性を明らかにすることが可能になると考えられる。

E. 結論

MWCNT-7 は吸入曝露試験において肺に発がん性を経気管肺内噴霧投与（TIPS 法）では胸腔に悪性中皮腫を発生させるが、同一の MWCNT が投与方法によって発がん標的臓器が異なる機序は明らかではない。本研究では、MWCNT-7 を TIPS 法にて投与して、低用量域における発がん頻度と発がん標的組織（肺・胸膜中皮）を明らかにする事を目的とした。

F344 雄ラットを用いて、MWCNT-7 を TIPS 法において 00008mg/ラットから 0.5mg/ラットの群構成にて投与した実験を実施中である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Aoyama Y., Naiki-Ito A., Xiaochen K., Komura M., Kato H., Nagayasu Y., Inaguma S., Tsuda H., Tomita M., Matsuo Y., Takiguchi S., Takahashi S. Lactoferrin Prevents Hepatic Injury and Fibrosis via the Inhibition of NF- κ B Signaling in a Rat Non-Alcoholic Steatohepatitis Model *Nutrients* 14, 42 (2022)

<https://doi.org/10.3390/nu14010042>

Saleh D., Luo S., Ahmed HM Omnia, Alexander DB., Alexander TW., Gunasekaran S., El-gazzar AM., Abdelgied M., Numano T., Takase H., Ohnishi M., Tomono S., Randa Hussein

Abd el Hady, Fukamachi K., Kanno J., Hirose A., Jiegou Xu, Suzuki S., Naiki-ito A., Takashi S., Tsuda H.
Assessment of the toxicity and carcinogenicity of double-walled carbon nanotubes in the rat lung after intratracheal instillation: a two-year study. Particle and Fibre Toxicology, 19:30(2022)
<https://doi.org/10.1186/s12989-022-00469-8>

2. 学会発表

Saleh D., Alexander TW., Alexander DB., Abdelgied M., El-gazzar AM., Ahmed HM Omnia, Gunasekaran S., Takase H., Naiki-ito A., Suzuki S., Gi M., Taquahashi, Y., Hirose A., Kanno J., Tsuruoka S., Tsuda H. The toxic and carcinogenic potential of three different sizes of double-walled carbon nanotubes in the rat lung after intratracheal instillation. ICT 2022 THE XVITH INTERNATIONAL CONGRESS OF TOXICOLOGY、オランダ
2022.9.18-22

G. 知的財産所有権の出願・登録状況

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4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

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、気管支の分岐部分において NT-7 と考えられる粒子が集積し、曝露量依存的に粒子の集積が増加することが観察された。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 存在下で培養して、EndoMT が誘導された細胞から FACS ソーティングによって分画した部分的 EndoMT が誘導されている細胞 (間葉系細胞マーカーである SMA の発現が上昇しているが、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) における特異的マーカー候補を同定した。この候補の発現は TGF- β により上昇し、EndoMT が進行するとともに低下しており、ナノマテリアルの吸入曝露による EndoMT の進行を抑制するための標的となることが期待される。

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、肺胞上皮細胞の内皮間葉移行 (EndoMT) 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、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った。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: 1 頭)、低濃度曝露群 (Low concentration 群: 3 頭)、高濃度曝露群 (High concentration 群: 3 頭) の 3 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 13 回行った。

肺組織のサンプリングは最終曝露後に行った。左肺は免疫組織染色用に、右肺は透明化用に採取した。今年度は、本分担研究において、肺組織における吸入ナノマテリアルの分布を観察するために、定法に従って肺組織の透明化を行い、3 次元レベルの観察を Leica THUNDER モデル生物実体顕微鏡を用いて施行した。

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、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。定量的 RT-PCR は定法に従って行い、PCR には下記ライマーを用いた。

VEGFR2-F: AGCGTGAGATTGTCCGTGACAT
VEGFR2-R: GCGTTCGTTTCCAATGGTGA
SM22 α -F: GTGTGGCTGAAGAATGGTGTGA
SM22 α -R: GCCACCTGTTCCATCTGCTTAA
FACS 分画した細胞集団における遺伝

子発現を網羅的に解析するために、RNA sequencing を定法に従って施行し、TGF- β 刺激によって発現が上昇し、EndoMT が進行するとともにその発現が低下する細胞膜に分布する因子を探索した。

C. 研究結果

低濃度ならびに高濃度のナノマテリアル (NT-7) を吸入曝露した Prox1-GFP マウスから肺組織をサンプリングし、透明化処置を行い、実体顕微鏡によって観察したところ、ナノマテリアルの吸入量依存的に気管が黒ずんでいることが観察された (図 1)。

さらに、透明化した肺における GFP で標識されたリンパ管を蛍光顕微鏡で観察した。NT-7 を吸入曝露していない群では規則正しい構造の毛細リンパ管が観察されたのに対して、高濃度で曝露した群ではその構造が観察されなかった (図 2)。

また、明視野での観察により、ナノマテリアルと考えられる黒い物質が粒状に特に気管支の分岐部分に観察された (図 2)。また、蓄積物はリンパ管付近に分布している可能性が示唆された。

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。EndoMT 誘導の分子機構を明らかにするために、昨年度までに樹立した EndoMT レポーター細胞 (EMREC) を用いて、EndoMT の遷移状態を解析した。TGF- β 刺激した EMREC を VEGFR2 (内皮細胞マーカー) と SMA-GFP (間葉系細胞マーカー) の発現を指標に FACS 分画した。TGF- β 無処理の細胞における VEGFR2 陽性 (+):SMA-GFP 陰性 (-)

の細胞画分を「内皮細胞 (EC)」とした。また、TGF- β 存在下で 72 時間培養した EMREC における VEGFR2+:SMA-GFP- の細胞画分を「TGF- β 処理した内皮細胞 (T β -EC)」、VEGFR2+:SMA-GFP+ の細胞画分を「Partial EndoMT (Partial)」、VEGFR2-:SMA-GFP+ の細胞画分を「Full EndoMT (Full)」として遺伝子発現解析を施行した (図 3A)。その結果、EndoMT の進展 (EC \Rightarrow T β -EC \Rightarrow Partial \Rightarrow Full) とともに段階的に VEGFR2 の発現が減少し (B)、 α SMA の発現が上昇する (C) ことが見出された。

Partial EndoMT においては、EndoMT の誘導のために重要な様々な細胞変化が起こっており、Partial EndoMT を誘導する分子的機構を解明することは必要な意義を持つが、その特異的なマーカーが同定されていなかったため、その解析は困難であった。今回 EC と比較して、T β -EC と Partial において発現が上昇して Full で低下する候補因子を RNA sequencing の結果を解析して同定した。Partial EndoMT の特異マーカーとして同定された因子の発現は T β -EC において最も高く、EndoMT の進行とともに低下することが mRNA (図 3D) とタンパク質 (図 3E) レベルで明らかとなった。

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、採取した肺組織を透明化処理して 3 次元で観察した。得られた結果からナノマテリアルの全身曝露によりナノマテリアルが気管そしてリンパ管の近傍に集積している可能性が推察された。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経時的に肺のサンプルを回収して検討する必要がある。

また、EndoMT レポーター細胞を用いた検討により、Partial EndoMT 特異マーカーの候補を同定した。今後、この実験系を用いて、今回得られた候補因子の EndoMT の誘導における作用を解析することで、EndoMT を制御する分子機序を解明する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

Takahashi K, Podyma-Inoue KA, Saito M, Sakakitani S, Sugauchi S, Iida K, Iwabuchi S, Koinuma D, Kurioka K, Konishi T, Tanaka S, Kaida A, Miura M, Hashimoto S, Okada M, Uchihashi T, Miyazono K, *Watabe T. TGF- β generates a population of cancer cells

residing in G1 phase with high motility and metastatic potential via keratin-associated protein 2-3. *Cell Reports*. 2022, 40(13):111411.

Takahashi K, Abe K, Kubota SI, Fukatsu N, Morishita Y, Yoshimatsu Y, Hirakawa S, Kubota Y, Watabe T, Ehata S, Ueda HR, Shimamura T, Miyazono K. A new analysis modality for vascular structures combining tissue-clearing technology and topological data analysis. *Nat Commun*. 2022, 13(1):5239

Kobayashi M, Fujiwara K, Takahashi K, Yoshioka Y, Ochiya T, *Podyma-Inoue KA, *Watabe T. Transforming growth factor- β -induced secretion of extracellular vesicles from oral cancer cells evokes endothelial barrier instability via endothelial-mesenchymal transition. *Inflammation and Regeneration*. 2022, 42(1):38.

Nakayama K, Nishijo T, Miyazawa M, Watabe T, Azuma M, Sakaguchi H. Hapten sensitization to vaginal mucosa induces less recruitment of dendritic cells accompanying TGF- β -expressing CD206 + cells compared with skin. *Immun Inflamm Dis*. 2022, 10(4):e605.

2. 学会発表

健康の維持における血管とリンパ管の役割, 渡部徹郎, Tie2・リンパ・血管研究会ミニセッション, 2022/05/19, 国内, 口頭.

内皮間葉移行(EndoMT)レポーター内皮細胞を用いた EndoMT の可視化とがん細胞の脈管内侵入機序の解明, 高橋和樹, 勝又寿枝, 小林美穂, 池田行徳, 篠原満利恵,

前田健太郎, 吉松康裕, 松永行子, 渡部徹郎, 第 46 回日本リンパ学会総会, 2022/06/04, 国内, 口頭.

口腔がん細胞由来エクソソームによる内皮不安定化機構, 小林美穂, 藤原花汐, 高橋和樹, 井上カタジナアナ, 渡部徹郎, 第 46 回日本リンパ学会総会, 2022/06/04, 国内, 口頭.

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 Relationship between age-dependent vascular endothelial cell decline and stress responsiveness, Miho Kobayashi, Honoka Hirose, Masanori Nakayama, Tetsuro Watabe, The 22nd International Vascular Biology Meeting (IVBM2022), 2022/10/14, 国外, 口頭.

Roles of TGF- β signals during formation and maintenance of vascular systems, Tetsuro Watabe, The 22nd International Vascular Biology Meeting (IVBM2022), 2022/10/16, 国外, 口頭. 27. Targeting tumor microenvironment networks for developing novel therapeutic strategies, Tetsuro Watabe, KVBM2022, 2022/11/25, 国外, 口頭.

脈管の恒常性維持と加齢との関係, 小林美穂, 高橋和樹, 勝又寿枝, 廣瀬穂香, 吉松康

裕, 中山雅敬, 松永行子, 渡部徹郎, 第 45 回日本分子生物学会年会, 2022/12/02, 国内, ポスター.

内皮間葉移行 (EndoMT) レポーター内皮細胞を用いた EndoMT 遷移段階の検出, 勝又寿枝, 高橋和樹, 小林美穂, 前田健太郎, 吉松康裕, 松永行子, 渡部徹郎, 第 45 回日本分子生物学会年会, 2022/12/03, 国内, ポスター.

加齢に伴う血管内皮細胞の減少とストレス応答性の関係, 小林美穂, 廣瀬穂香, 中山雅敬, 渡部徹郎, 第 30 回日本血管生物医学学会 学術集会 (CVMW2022), 2022/12/16, 国内, 口頭.

脈管の恒常性維持と破綻における負のアンジオクラインシグナルの役割, 渡部徹郎, 第 30 回日本血管生物医学学会 学術集会 (CVMW2022), 2022/12/17, 国内, 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
なし

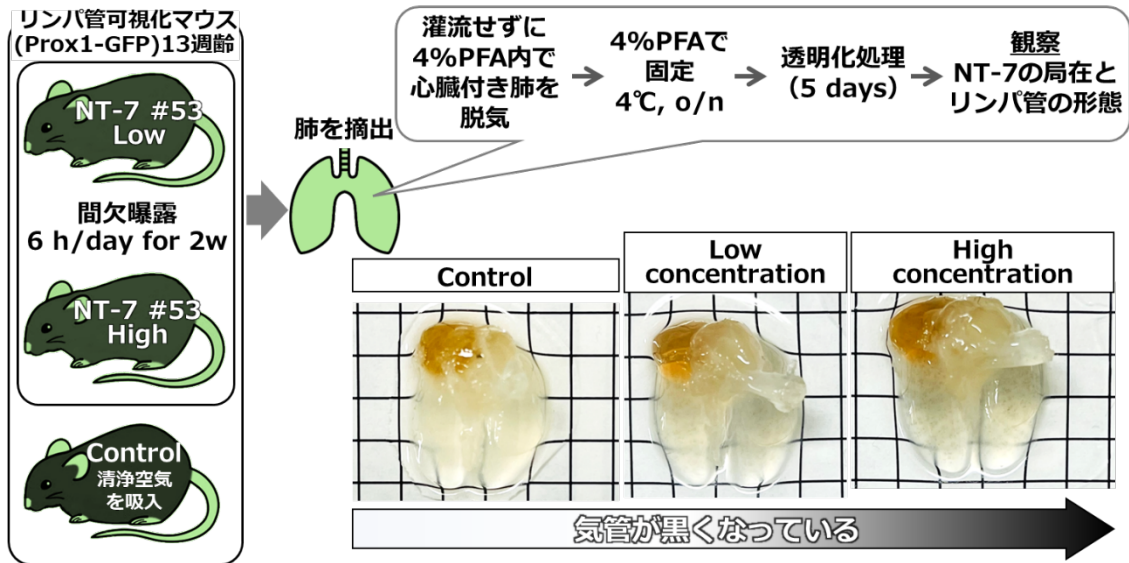


図1 ナノマテリアル吸入曝露した Prox1-GFP マウスの肺の透明化

低濃度ならびに高濃度のナノマテリアル (NT-7) を吸入曝露 (1 回 6 時間、2 週間) した Prox1-GFP マウスから肺組織をサンプリングし、透明化処置を行った。実体顕微鏡によって観察したところ、ナノマテリアルの吸入量依存的に気管が黒ずんでいることが観察された。

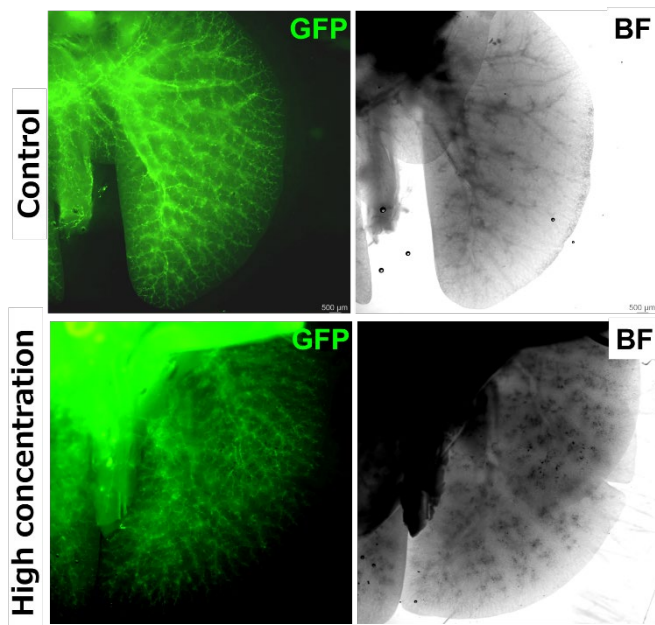


図2. ナノマテリアル吸入曝露した Prox1-GFP マウスの肺におけるリンパ管とナノマテリアルの観察

透明化した肺を蛍光 (GFP) ならびに明視野 (Bright field: BF) で顕微鏡観察した。NT-7 を吸入曝露していない群 (上段) では規則正しい構造の毛細リンパ管 (GFP で標識) が観察されたのに対して、高濃度で曝露した群 (下段) ではその構造が観察されなかった。また、明視野での観察により、ナノマテリアルと考えられる黒い物質が粒状に特に気管支の分岐部分に観察された。

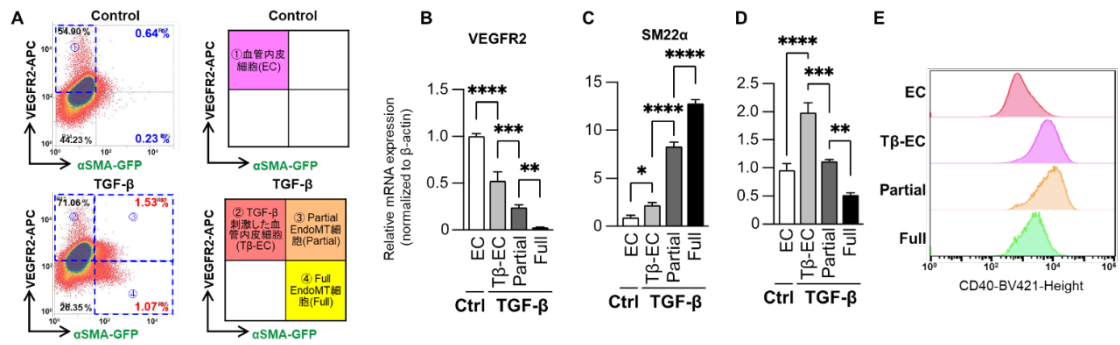


図 3. EndoMT レポーター細胞を用いた Partial EndoMT 特異マーカーの同定

(A) EndoMT の遷移状態を TGF- β 刺激した EndoMT レポーター細胞を VEGFR2 (内皮細胞マーカー) と SMA-GFP (間葉系細胞マーカー) の発現を指標に FACS 分画することで解析した。TGF- β 無処理の細胞における VEGFR2+:SMA-GFP- の細胞画分を「内皮細胞 (EC)」とし、TGF- β 処理の細胞における VEGFR2+:SMA-GFP- の細胞画分を「TGF- β 処理した内皮細胞 (T β -EC)」、VEGFR2+:SMA-GFP+ の細胞画分を「Partial EndoMT (Partial)」、VEGFR2-:SMA-GFP+ の細胞画分を「Full EndoMT (Full)」として遺伝子発現解析を施行した。(B, C) EndoMT の進展とともに段階的 VEGFR2 の発現が減少し(B)、 α SMA の発現が上昇する(C)ことが見出された。(D, E) Partial EndoMT の特異マーカーとして同定された因子の発現が T β -EC において最も高く、EndoMT の進行とともに低下することが mRNA (D) とタンパク質 (FACS 解析の定量化: E) レベルで明らかとなった。

令和4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:間欠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 毒性部 客員研究員
研究協力者:横田 理 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 主任研究官
研究協力者: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 16 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、この間欠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。昨年度までに 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年間の間欠吸入曝露実験(曝露時間6時間/回、4週毎、計26回、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); $5.2 \pm 0.2 \text{ mg/m}^3$)の結果を解析し、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 TTF-1 陽性の腺癌を L 群に2例にみとめた。本年度は、II型肺胞上皮の過形成の背景病変の解析を継続するとともに、過形成初期の病変の局在、及び MWNT-7 を貪食したマクロファージの肺内局在と、リンパ管の走行との関係を解明する目的で、リンパ管内皮を可視化可能な Prox1-GFP マウスの国立衛研動物施設への導入および、Taquann 吸入装置による MWNT-7 の吸入実験を開始した。これらにより 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の解析を開始した。

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 16 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欠型曝露手法の開発を行ってきた。本研究では、間欠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、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年間の間欠吸入曝露実験の結果の解析結果をもとに、本年度は、II型肺胞上皮の過形成初期の病変の局在、及びMWNT-7を貪食したマクロファージの肺内局在と、リンパ管の走行との関係を解明するため、リンパ系経路を可視化可能なProx1-GFPマウスの国立衛研動物施設への導入、および、Taquann吸入装置によるMWNT-7の吸入実験を開始した。これらにより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の解析を開始した。

B. 研究方法

本分担研究では、主として肺の病理組織学的な検討を実施した。以下に検体、曝露方法、使用動物の概要を記載する(詳細は研究分担者 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 室長 高橋祐次、及び研究分担者、東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 教授 :渡部 徹郎の項を参照)。

B-1. 検体

検体は多層カーボンナノチューブの一つであるMWNT-7(三井、lot No.: 060125-01k)を使用した。高分散性の乾燥検体とするため、tert-ブチルアルコール(特級、関東化学株式会社)に懸濁、53 μ mの金属シーブ(特注品、セイシン企業)でろ過、凍結乾燥によって乾燥

検体を得る Taquann 法処理を行った。

B-2. マウス全身曝露吸入実験

1) 動物

Prox1-GFP トランスジェニック雄性マウスを使用した。

2) 群構成

吸入曝露実験の検体は MWNT-7 を用いた。対照群 (Ctrl 群、清浄空気のみ : 1 頭)、低濃度曝露群 (Low concentration 群 : 3 頭)、高濃度曝露群 (High concentration 群 : 3 頭) の 3 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 13 回行った。

3) 吸入曝露実験装置

MWNT-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(共同開発 柴田科学株式会社、特許申請中)。

B-3. 解剖

肺組織のサンプリングは最終曝露後に行った。左肺は免疫組織染色用に、右肺は透明化用に採取した。今年度は、本分担研究において、肺組織における吸入ナノマテリアルの分布を観察するために、定法に従って肺組織の透明化を行い、3次元レベルの観察を Leica THUNDER モデル生物実体顕微鏡を用いて施行した。

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

低濃度ならびに高濃度の MWNT-7 を吸入曝露した Prox1-GFP トランスジェニックマウスから肺組織をサンプリングし、透明化処置を行い、実体顕微鏡によって観察した。その結果、MWNT-7 は、終末細気管支周囲に局在することが示された。透明化肺を GFP 励起光(455nm)にて蛍光観察を実施した結果、終末細気管支・気管支細動脈の系列(BA)のリンパ管と、肺細静脈系列(V)のリンパ管の二つの系列が交互に、肺門から末梢に向けて放射状に分布する事が確認された。そして、前者 BA 系列のリンパ管周囲に局限して MWNT-7 が局在し、V 系列のリンパ管の周囲には局在しない事が判明した。また、末梢の毛細リンパ管の形状が、MWNT-7 の吸入により変化している可能性が示唆され(図1)、今後の解析例数の追加による組織計測値の有意差検定が必要であると考察された。今後、MWNT-7 の沈着部位の細胞構成を確認する為に、透明化肺をパラフィンブロック化し、連続組織切片による解析を進める予定である。

D. 考察

昨年度解析した、2 年間の間欠曝露実験における前駆病変の解析の結果、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の必要性が残った。

この様な初期病変の局在には MWNT-7 を貪食したマクロファージの肺内挙動と特定の部位への局在、及び、マクロファージと密接な関係の存在が想定される肺内リンパ管の局在と反応の解析が重要であると考えた。その為に国立医薬品食品衛生研究所に導入した Prox1-GFP トランスジェニックマウスから肺組織をサンプリングし、透明化処置を行い、実体顕微鏡下で GFP 蛍光観察を実施した結果、終末細気管支・気管支細動脈の系列(BA)のリンパ管周囲に局限して MWNT-7 が局在すること、末梢毛細リンパ管の形状が、MWNT-7 の吸入により変化している可能性が示唆されたことから内皮の内皮間葉移行(EndoMT)を含めた細胞の詳細解析を透明化肺をパラフィンブロック化し、連続組織切片とする事、等により更に進める。

E. 結論

リンパ系経路を可視化可能な Prox1-GFP マウスの国立医薬品食品衛生研究所の動物施設への導入および、Taquam 吸入装置による MWNT-7 の吸入実験を開始した。これらにより 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の解析を開始した。今後、リンパ管内皮細胞の内皮間葉移行(EndoMT)を含めた肺病変の形成過程の詳細解析を透明化肺をパラフィンブロック化し、連続組織切片とする事、等により進める。

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

1. 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.
2. Taquahashi, Y, Ogawa, Y, Takagi, A, Tsuji, M, Morita, K, Kanno, J.(2013) An improved dispersion method of multi-wall carbon nanotube for inhalation toxicity studies of experimental animals. *J Toxicol Sci.* 38(4):619-28.

G. 研究発表

1. 論文発表

Saleh D., Luo S., Ahmed HM Omnia, Alexander DB., Alexander TW., Gunasekaran S., El-gazzar AM., Abdelgied M., Numano T., Takase H., Ohnishi M., Tomono S., Randa Hussein Abd el Hady, Fukamachi K., Kanno J., Hirose A., Jiegou Xu, Suzuki S., Naiki-ito A., Takashi S., Tsuda H. Assessment of the toxicity and carcinogenicity of double-walled carbon nanotubes in the rat lung after intratracheal instillation: a two-year study. *Particle and Fibre Toxicology*, 19:30(2022)
<https://doi.org/10.1186/s12989-022-00469-8>

Tsunematsu T, Arakaki R, Sato M, Saito M, Otsuka K, Furukawa Y, Taquahashi Y, Kanno J, Ishimaru N. Exposure to Multi-Wall Carbon

Nanotubes Promotes Fibrous Proliferation by Production of Matrix Metalloproteinase-12 via NF- κ B Activation in Chronic Peritonitis. *Am J Pathol.* 2022.192:1559-1572 (2022)
doi:

10.1016/j.ajpath.2022.07.009.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

Taquahashi Y, Yokota S, Tsuji M, Morita K, Suga K, Hojyo M, Hirose A, Kanno J, Preliminary report on a two-year, 4-week-interval intermittent whole body inhalation study of the multi-walled carbon nanotube (MWNT-7) in male mice, SOT 2023 Abstract Number/Poster Board number: 4715/ P621 (2023.3.22)

高橋祐次、横田理、広瀬明彦、菅野純:ナノマテリアルの慢性吸入ばく露試験法の効率化、第49回日本毒性学会学術年会、北海道 (2022.6.30) シンポジウム

菅野純:粉体吸入実験装置の考察. 第13回

粉末吸入剤研究会シンポジウム、
(2022.11.24)、ANA クラウンプラザホテル
富山、シンポジウム、口演。

菅野純: 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、(2022.10.12)、茨城、講義。

前野愛、北條幹、坂本義光、湯澤勝廣、長澤
明道、生嶋清美、山本行男、平松恭子、
矢野範男、大貫文、稲葉涼太、鈴木仁、
横田理、高橋祐次、小林憲弘、菅野純、
広瀬明彦、猪又明子、中江大. 多層カー
ボンナノチューブ(MWCNT)の2年間間
欠気管内反復投与によるラット発がん性試
験. 第49回日本毒学会学術年会
(2022.6.30)、札幌、ポスター

Saleh D., Alexander TW., Alexander DB.,
Abdelgied M., El-gazzar AM., Ahmed HM
Omnia, Gunasekaran S., Takase H., Naiki-

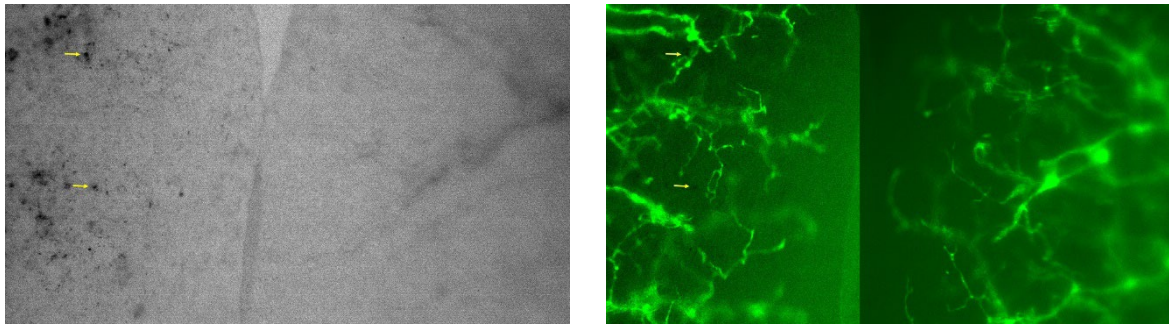
Ito A., Suzuki S., Gi M., Taquahashi, Y.,
Hirose A., Kanno J., Tsuruoka S., Tsuda H.
The toxic and carcinogenic potential of
three different sizes of double-walled
carbon nanotubes in the rat lung after
intratracheal instillation. ICT 2022 THE
XVITH INTERNATIONAL CONGRESS
OF TOXICOLOGY、オランダ 2022.9.18-
22

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:透明化した肺の同一部位の、透過像(左)および GFP 蛍光像(右)を示す。黄色矢印は、MWNT-7 の沈着の一部を示す。両図それぞれの左半分が高濃度吸入暴露群の肺、右半分が対象群の肺である。

右図 GFP 蛍光像の左半において、上から水平に 4 本のリンパ系列が描出されており、上から 1 番目と 3 番目が終末細気管支・気管支細動脈の系列(BA)のリンパ管系に相当する。この 1 番目と 3 番目に沿って、左図透過像の左半において黒色粒状の MWNT-7 の局在が確認される(黄色→)。2 番目と 4 番目の系統が肺細静脈系列(V)であり、そこには MWNT-7 の局在は確認されない。



令和4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：ナノマテリアル慢性曝露における免疫応答に関する研究

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	常松 貴明	徳島大学大学院医歯薬学研究部	
	牛尾 綾	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、昨年度に実施した新たなカーボンナノチューブであるNT-7の単回暴露実験のサンプルを用いて詳細な解析を実施した。NT-7の単回暴露でのBALF細胞中のマクロファージの動態はM2型マクロファージへの分化が促進しており、MWCNT-7の暴露による変化と類似していたが、CD54あるいはMMP-12などマーカー分子の発現に関しては、MWCNT-7の暴露で見られた大きな変化ではなかった。さらに、*in vitro*でマウス骨髄由来マクロファージを用いてNT-7の反応性を検討すると、MWCNT-7で確認された細胞死、MMP-12発現の亢進は認められなかった。一方で、Taquan処理されたMWCNT-7の腹腔内投与による長期暴露での腹腔マクロファージと線維化のメカニズムに関して、マクロファージ細胞株、線維芽細胞株を用いた*in vitro*ならびにNF- κ B1遺伝子ノックアウトマウスを用いた *in vivo*での実験結果からNF- κ B-MMP-12経路を介して線維化が亢進することが明らかになった。今年度の研究では、NT-7の単回吸入暴露による肺免疫への影響はMWCNT-7吸入暴露と異なった反応性が存在することが明らかになった。加えて、MWCNT-7暴露によるマクロファージを介した慢性化および線維化の分子機序の一旦が明らかにされた。

A. 研究目的

ナノマテリアルの暴露による免疫系への影響に関しては、カーボンナノチューブの吸引による肺胞マクロファージの活性化を検討した研究がよく知られている。さらに、カーボンナノチューブの吸入暴露により、T細胞のマイトージェンに対する反応性が低下し、NK活性に関してもカーボンナノチューブ暴露により抑制されることが報告されている。一方で、ナノマテリアルの暴露による慢性的な免疫システムへの詳細な影響に関しては不明のままである。また、一定期間のカーボンナノチューブの暴露後の長期観察により肺の線維化ならびに慢性炎症の持続が確認されているものの、長期間の全身暴露による免疫系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(図1)。

今年度は昨年度に実施したカーボンナノチューブNT-7の短期暴露による肺免疫の変化について引き続き検討を加えた。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NF- κ Bの活性化を中心に検討を進めた。

B. 研究方法

・マウスへの吸入暴露

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、1 ml のシリンジ(SS-01T 針無しシリンジ, TERUMO)に 1 ml 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。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。マウス線維芽細胞株 NIH-3T3 細胞を RAW264.7 細胞への T-CNT 処理培養上清を用いて検討した。また、マウス骨髄由来マクロファージ(MBDM)の作成に関しては、雄マウス(C57BL/6、7 週齢)の大腿骨より骨髄細胞を採取し、リコンビナント M-CFS (100 ng/mL)添加培地にて 7 日間培養することで成熟マクロファージに分化させた。MBDM への T-CNT ならびに NT-7(0~250 ng/ml)の添加による反応が検討された。

・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; (f) 5'-TGTTATTCAAGGAGATGCACATTT-3', (r) 5'-GGTTTGTGCCTTGAAAACCTTTTAGT-3',
ICAM-1 (CD54); (f) 5'-AACTGTGGCACCGTGCAGTC-3', (r) 5'-AGGGTGAGGTCCTTGCCTACTTG-3'
Tim4; (f) 5'-GCTGCTTCCAACAACAGTCA-3', (r) 5'-GTGATTGGATGCAGGCAGAG-3' β-actin;
forward, 5'-GTGGGCCGCTCTAGGCACCA-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 μg (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-κB1 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

NT-7 短期暴露実験

12 週齢雄 B6 マウスに NT-7 を単回吸入暴

露した後、1、7、14、28 日にてサンプルを採取した(図 2)。BALF 細胞中の肺胞マクロファージ分画について M1/M2 分化パターンをフローサイトメータにて解析した。暴露後 0 週、1 週では対象群と暴露群との間に大きな差は認められないが、暴露後 2 週での CD206 陽性 (M2 型)マクロファージの割合が低濃度暴露群で有意に上昇していた(図 3)。暴露後 4 週では対象群と暴露群で M1 型ならびに M2 型マクロファージの割合は変化はなかった(図 3)。

肺組織における MMP-12mRNA 遺伝子ならびに CD54 mRNA 遺伝子発現に関して、NT-7 暴露 0 週(直後)では、MMP-12 mRNA 発現が対象群に比較して低濃度群ならびに高濃度群で有意に増加していた。暴露 1 週でもこの有意な増加が確認された(図 4)。暴露後 2 週でのサンプルに関しては mRNA の精製ができなかった。暴露後 4 週では、低濃度暴露群で MMP-12 mRNA 発現が対象群に比較して有意に増加していた(図 4)。一方、CD54 mRNA の発現に関しては、暴露後 0、1、4 週(2 週サンプル不備)での変化は認められなかった(図 4)。

BALF 細胞を用いたマーカー遺伝子発現に関しては、NT-7 暴露直後に CD54 mRNA 発現が低濃度群ならびに高濃度群で上昇しているが有意な変化ではなかった(図 5)。4 週での CD54 mRNA 発現の変化は認められなかった(図 5)。MMP-12 mRNA 発現に関しては、暴露直後には変化は見られないが、暴露後 4 週の高濃度群で発現上昇が認められるが有意な差ではなかった。さらに、CNT の受容体の一つとされる Tim4 mRNA 発現に関して検討したところ、暴露後 1 週での低濃度群で上昇していたが有意な差ではなかった(図 5)。今回の BALF 細胞を用い

た定量 RT-PCR による遺伝子発現検討では、各サンプルの状態、RNA 精製に不備があったものと考えられ、データが正しく取得できなかった可能性がある。

NF- κ B 活性を介した MMP-12 の発現調節と CNT との関与

Taquann 処理をした MWCNT (T-CNT)をマウスの腹腔内投与による免疫学的変化の検討に関して、昨年度までに報告した内容に加え、NF- κ B 遺伝子ノックアウトマウスを用いた内容をまとめると、T-CNT の腹腔内投与後 8 ヶ月以降に効率的に腹膜での線維化が亢進し、慢性腹膜炎の病態を呈していた (図 6)。また、その変化は NF- κ BKO マウスへの腹腔内投与では線維化の程度は有意に軽減され、けーとなる MMP-12 mRNA 発現も有意に低下していた (図 6)。

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 NF- κ Bp65 の核内以降が Western blot 法あるいは蛍光染色法にて確認された (図 7 A, B)。加えて、NF- κ B 阻害剤 (BAY11-7082) の添加により T-CNT によって上昇した MMP-12 mRNA 発現が低下することが判明した (図 7 C)。また、T-CNT で刺激された RAW264.7 細胞の培養上清 (Conditioned medium: CM) をマウス線維芽細胞 (NIH-3T3) に添加培養することによって、線維芽細胞の増殖 (線維化) のマーカー遺伝子に関して、定量 RT-PCR で検討すると、Col1a2、Col3a1、Col4a1 ならびに Acta2 mRNA が有意に上昇していた (図 7 D)。

マウス骨髄由来マクロファージを用いた

実験系

マウス骨髄細胞を用いて *in vitro* にてマクロファージへの分化を試みた。M-CSF を添加した培地にて 7 日間培養すると、CD11b⁺F4/80⁺マクロファージへの分化が確認された (図 8)。マウス骨髄由来マクロファージ (MBDM) を用いて T-CNT を添加刺激すると、MMP12 mRNA 発現は T-CNT 濃度依存的に上昇した (図 9)。さらに、NT-7 の添加による MBDM の変化を検討すると、T-CNT で観察された細胞傷害は確認されなかった (図 9)。

D. 考察

NT-7 吸入暴露後の BALF 細胞は減少し、経時的に回復することがわかった。この現象は MWCNT-7 の吸入暴露でも同様であった。また、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。NT-7 吸入暴露によって、肺マクロファージは M2 マクロファージへの分化が認められた。MWCNT-7 の吸入暴露では M1 型への分化が目立っていた点と相違している。NT-7 吸入暴露によって、肺組織における MMP-12 mRNA 発現上昇が確認されたが、BALF 細胞では MWCNT-7 との違いがある可能性が示された。BMDM を用いた *in vitro* の実験系はナノマテリアルに対するマクロファージの直接の反応を検証する上で極めて有用である。一方で、MWCNT-7 の腹腔内投与による慢性腹膜炎のモデルでは腹腔内マクロファージの NF- κ B の活性化を介して MMP-12 の発現が調節されており、線維化の MMP-12 を介した分子メカニズムが存在する可能性が示されたが、TGF- β などの線維化に関与する分子との関連性は不明である。

E. 結論

- NT-7 吸入暴露後の BALF 細胞は減少し、経時的に回復し、BALF 中の単球および未分化マクロファージが増加した。
- 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、CD54 陽性肺胞マクロファージが増加していた。
- NT-7 吸入暴露によって、肺組織における MMP12mRNA 発現上昇が確認された
- BMDM を用いた *in vitro* の実験系で MWCNT-7 と NT-7 の反応性の違いが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Narwidina A, Miyazaki A, Iwata K, Kurogoushi R, Sugimoto A, Kudo Y, Kawarabayashi K, Yamakawa Y, Akazawa Y, Kitamura T, Nakagawa H, Yamaguchi-Ueda K, Hasegawa T, Yoshizaki K, Fukumoto S, Yamamoto A, Ishimaru N, Iwasaki T, Iwamoto T. Iroquois homeobox 3 regulates odontoblast proliferation and differentiation mediated by Wnt5a expression *Biochem Biophys Res Commun.* 650:47-54, 2023
2. Shao W, Tsunematsu T, Umeda M, Tawara H, Fujiwara N, Mouri Y, Arakaki R, Ishimaru N, Kudo Y. Cancer cell-derived novel periostin isoform promotes invasion in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Med.* 00:1-16, 2023
3. Sato M, Arakaki R, Tawara H, Nagao R, Tanaka H, Tamura K, Kawahito Y, Ostuka K, Ushio A, Tsunematsu T, Ishimaru N. Disturbed natural killer cell homeostasis in the salivary gland enhances autoimmune pathology via IFN- γ in a mouse model of primary Sjogren's syndrome. *Front Med.* 9:1036787, 2022
4. Nagatomo R, Kaneko H, Kamatsuki S, Ichimura-Shimaizu M, Ishimaru N, Tsuneyama K, Inoue K. Short-chain fatty acid profiling in biological samples from a mouse model of Sjogren's syndrome based on derivatized LC-MS/MS assay. *J Chromat B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 1210, 123432, 2022
5. Tsunematsu T, Arakaki R, Sato M, Saito M, Otsuka K, Furukawa Y, Taquahashi Y, Kanno J, Ishimaru N. Exposure to Multi-Wall Carbon Nanotubes Promotes Fibrous Proliferation by Production of Matrix Metalloproteinase-12 via NF- κ B Activation in Chronic Peritonitis. *Am J Pathol.* 192:1559-1572, 2022
6. Otsuka K, Sato M, Tsunematsu T, Ishimaru N. Virus Infections Play Crucial Roles in the Pathogenesis of Sjogren's syndrome. *Viruses.* 14:1474, 2022
7. Horii Y, Iniwa T, Onitsuka M, Tsukimoto J, Tanaka Y, Ike H, Fukushi Y, Ando H, Takeuchi Y, Nishioka SI, Tsuji D, Ikuo M, Yamazaki N, Takiguchi Y, Ishimaru N, Ito K. Reversal neuroinflammation in novel GS model mice by single i.c.v. administration of CHO-derived rhCTSA precursor protein. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 25:297-310, 2022
8. Maruhashi T, Sugiura D, Okazaki IM, Shimizu K, Maeda TK, Ikubo J, Yoshikawa H, Maenaka K, Ishimaru N, Kosako H, Takemoto T, Okazaki T. Binding of LAG-3 to stable peptide-MHC class II limits T cell function and suppresses autoimmunity and

- anti-cancer immunity. *Immunity*. 55:912-24, 2022
9. 大塚邦紘、常松貴明、石丸直澄 シェーグレン症候群の病理診断 診断病理39 (4) 255-261,2022
 10. 大塚邦紘、常松貴明、牛尾綾、佐藤真美、石丸直澄 カラー図説:シェーグレン症候群の病理 日本臨床80(10),1538-1543,2022
- ## 2. 学会発表
1. Naozumi Ishimaru, Kazuki Fukuda, Takaaki Tsunematsu, Rieko Arakaki, Mami Sato, Kunihiro Otsuka: Exposure to carbon nanotubes sustains chronic inflammation by macrophage activation via MMP-12. 第111回日本病理学会総会 (2022.4.14-16、神戸市)
 2. 佐藤真美、新垣理恵子、常松貴明、工藤保誠、石丸直澄 シェーグレン症候群疾患モデルにおける肺病変発症への CCL6 の役割第111回日本病理学会総会 (2022年4月14日、神戸市)
 3. 大塚邦紘、九十九伸一、近藤博之、新垣理恵子、佐藤真美、福田一稀、俵宏彰、常松貴明、石丸直澄、安友康二 シングルセル RNA-seq で紐解くシェーグレン症候群モデルに特徴的に出現するT細胞集団の解析第111回日本病理学会総会 (2022年4月15日、神戸市)
 4. 常松貴明、新垣理恵子、工藤保誠、石丸直澄 口腔扁平上皮癌における Borealin の高発現をもたらす Survivin 安定化機構の解明 第111回日本病理学会総会 (2022年4月16日、神戸市)
 5. 田村海、新垣理恵子、石丸直澄 シェーグレン症候群モデルマウス鼻腔組織の病態解析 第111回日本病理学会総会(2022年4月16日、神戸市)
 6. 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 Extraglandular lesions in Sjogren's syndrome model mice 第20回四国免疫フォーラム (2022年6月11日、オンライン 香川大学)
 7. 常松貴明、石丸直澄 頭頸部扁平上皮癌における染色体パッセンジャー複合体構成因子 Borealin の新たな機能 第39回分子病理研究会 内灘かほくシンポジウム (2022年7月8~9日、石川県河北郡)
 8. 佐藤真美、牛尾綾、大塚邦紘、常松貴明、石丸直澄 シェーグレン症候群モデルマウス肺病変におけるケモカインの機能分析 第64回歯科基礎医学会学術大会 (2022年9月17~18日、徳島市)
 9. 大塚邦紘、九十九伸一、近藤博之、佐藤真美、俵宏彰、常松貴明、石丸直澄、安友康二 シングルセル RNA-seq で紐解くシェーグレン症候群モデルに特徴的に出現するT細胞集団の解析 第64回歯科基礎医学会学術大会 (2022年9月17~18日、徳島市)
 10. 田村海、川人祐樹、佐藤真美、大塚邦紘、常松貴明、石丸直澄 シェーグレン症候群モデルマウスにおける鼻腔組織の病態解析 第64回歯科基礎医学会学術大会 (2022年9月17~18日、徳島市)
 11. 川人祐樹、田村海、佐藤真美、大塚邦紘、常松貴明、石丸直澄 シェーグレン症候群モデルマウスである NFS/sld マウスの変異遺伝子 *Mucin19* の発現解析と病態との関連性 第64回歯科基礎医学会学術大会 (2022年9月17~18日、徳島市)
 12. 石丸直澄 唾液腺免疫難病研究の最前線 第33回日本臨床口腔病理学会学術大会シンポジウム (2022年9月23日、札幌市)
 13. 大塚邦紘、近藤博之、九十九伸一、新垣理恵子、佐藤真美、常松貴明、石丸直澄、安友康二 シングルセル RNA-seq とマルチプレックス Spatial 解析を基盤としたシェーグレン症候群の標的臓器微小環境変化の解明 第33回日本臨床口腔病理学会学術大会 (2022年9月23日、札幌市)
 14. 三好 瑞希, 月本 準, 堀井 雄登, 竹内美絵, 加守 虹穂, 福池 凜, 木野 倫子, 石丸 直澄, 伊藤 孝司 先天代謝異常症ガラクトシアリドーシスに対するより効果的な遺伝子治療薬開発 (第95回日本生化学会大会, 2022年11月千葉)
 15. Takaaki Tsunematsu and Naozumi Ishimaru Cell Cycle machinery unravels the molecular mechanism of Cancer cell cannibalism (第

- 45 回日本分子生物学学会年会、2022 年 12 月 千葉)
16. 俵 宏彰, 常松 貴明, 永尾 瑠佳, 佐藤 真美, 大塚 邦紘, 石丸 直澄 : がんにおける染色体パッセンジャー複合体構成因子 Borealin の高発現をもたらす新たな機能 (第 45 回日本分子生物学学会年会, 2022 年 12 月千葉)
 17. 三好 瑞希, 月本 準, 堀井 雄登, 竹内 美絵, 加守 虹穂, 福池 凜, 木野 倫子, 石丸 直澄, 伊藤 孝司 : 効率的治療を目的としたリソソーム性ノイラミニダーゼ 1 欠損症に対する AAV5 遺伝子治療 (第 45 回日本分子生物学学会年会, 2022 年 12 月千葉)
 18. 福池 凜, 月本 準, 堀井 雄登, 竹内 美絵, 加守 虹穂, 三好 瑞希, 木野 倫子, 石丸 直澄, 伊藤 孝司 : AAVPHP.eB ベクターの脳室内単回投与による NEU1 欠損症に対する遺伝子治療 (第 45 回日本分子生物学学会年会, 2022 年 12 月千葉)
 19. Takaaki Tsunematsu, Rieko Arakaki, Mami Sato, Kunihiro Otsuka and Naozumi Ishimaru: Exposure to Multi-Wall Carbon Nanotubes Promotes Fibrous Proliferation by Production of Matrix Metalloproteinase-12 via NF- κ B Activation in Chronic Peritonitis (第 51 回日本免疫学会学術集会 2022 年 12 月 7-9 日 熊本市)
 20. KAWAHITO Yuki, Kai Tamura, Mami Satoh, Kunihiro Otsuka, Takaaki Tsunematsu and Naozumi Ishimaru : Role of Mucin 19 in Pathogenesis of a Mouse Model for Sjögren's Syndrome (第 51 回日本免疫学会学術集会 2022 年 12 月 7-9 日 熊本市)
 21. Kai Tamura, KAWAHITO Yuki, Mami Satoh, Kunihiro Otsuka, Takaaki Tsunematsu and Naozumi Ishimaru : Pathological analysis of nasal tissue in a murine model of Sjögren's syndrome (第 51 回日本免疫学会学術集会 2022 年 12 月 7-9 日 熊本市)
 22. Kunihiro Otsuka, Shin-ichi Tsukumo, Rieko Arakaki, Mami Satoh, Hdeo Yagita, Naozumi Ishimaru and Koji Yasutomo : CD153⁺ CD4⁺ T cells exacerbate the autoimmune pathology via the interaction with CD30⁺ cells in salivary glands in Sjögren's syndrome (第 51 回日本免疫学会学術集会 2022 年 12 月 7-9 日 熊本市)
 23. Mami Satoh, Aya Ushio, Kunihiro Otsuka, Takaaki Tsunematsu and Naozumi Ishimaru : Th2 response enhances the differentiation into follicular B cells to progress the pulmonary autoimmune lesions in a mouse model of Sjögren's syndrome (第 51 回日本免疫学会学術集会 2022 年 12 月 7-9 日 熊本市)
 24. 俵 宏彰, 常松 貴明, 永尾 瑠佳, 福田 一稀, 佐藤 真美, 大塚 邦紘, 牛尾 綾, 石丸 直澄 頭頸部扁平上皮癌における染色体パッセンジャー複合体構成因子 Borealin の高発現をもたらす新たな役割 (第 58 回日本口腔組織培養学会学術大会・総会, 2022 年 12 月 鹿児島)
 25. 常松 貴明, 俵 宏彰, 石丸 直澄 : HPV 陽性癌における新規脱ユビキチン化酵素複合体の分子機構の解明 (第 58 回日本口腔組織培養学会学術大会・総会 2022 年 12 月 鹿児島)

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

ナノマテリアルの免疫系への慢性影響

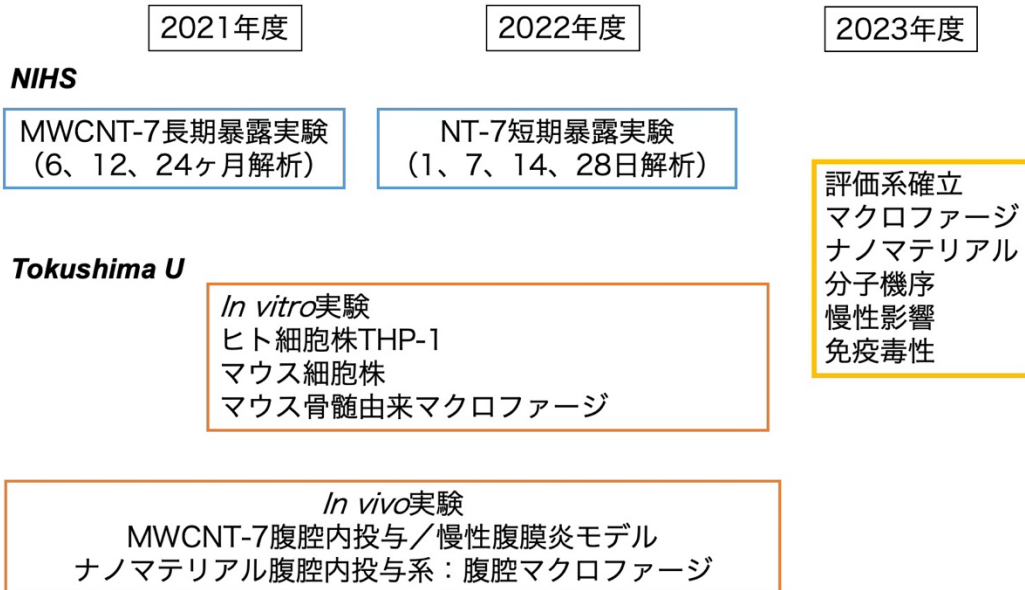
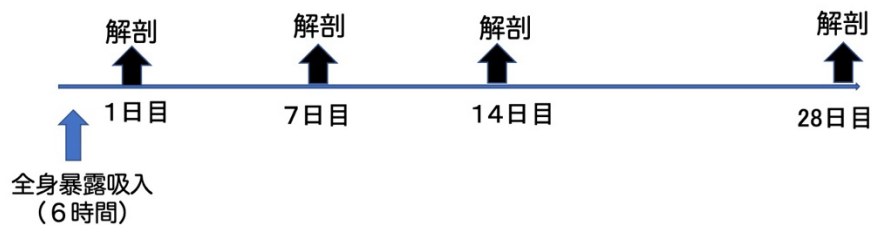


図 2

Experimental protocol

2021~2022

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

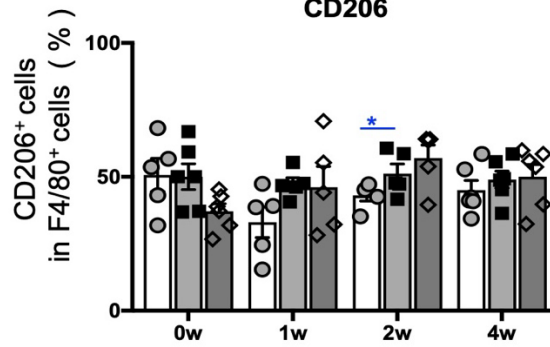
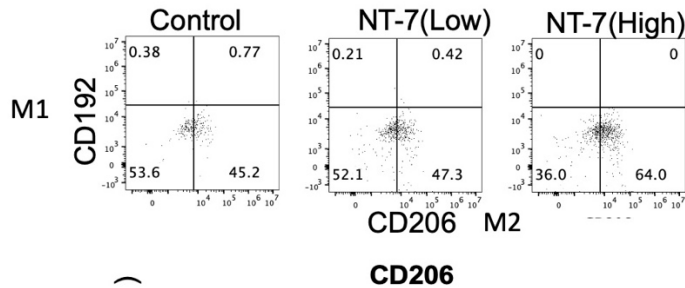


対照群 (清浄空気)
NT-7 低濃度群 (2.7 mg/m³)
NT-7 高濃度群 (5.2 mg/m³)

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

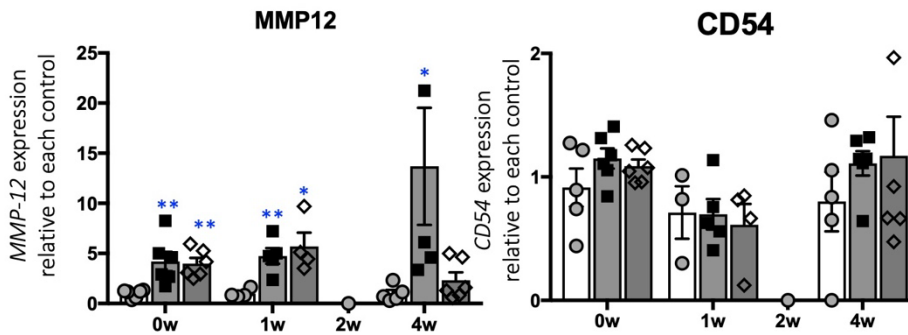
図 3 Differentiation into M2 macrophage by NT-7 exposure

BALF CD206⁺ MΦs 2w



暴露後2週間でM2 MΦへのシフト

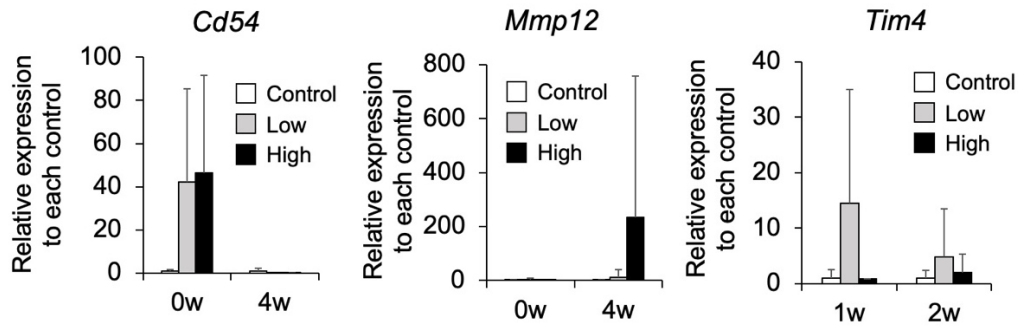
図 4 MMP12 and CD54 mRNA expression of lung tissues from NT-7-exposure mice



肺組織におけるMMP12 mRNAは暴露によって上昇

図 5

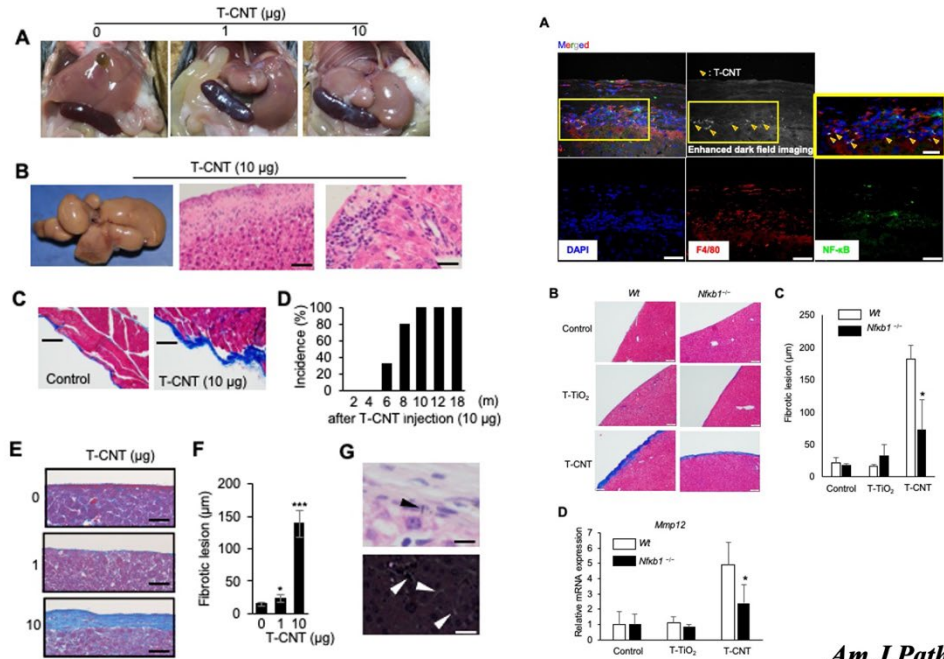
MMP12, CD54, and Tim mRNA expression of BALF cells from NT-7-exposure mice



MWCNT-7との違い？

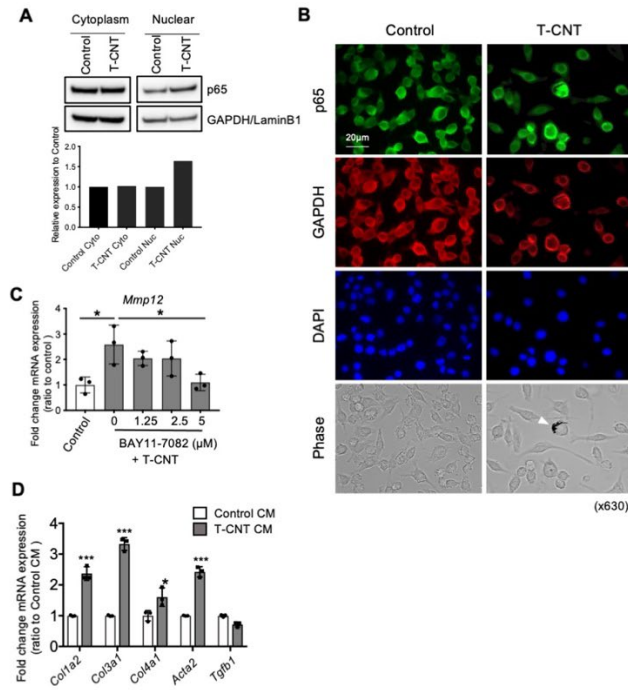
図 6

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



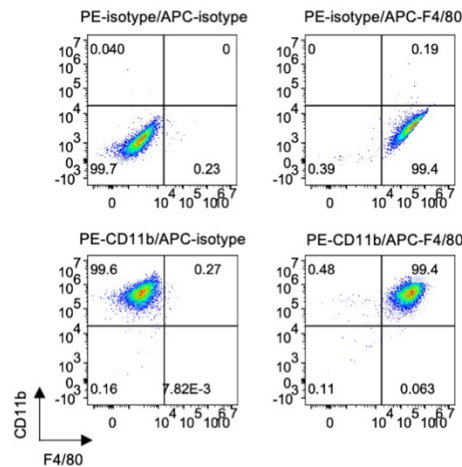
Am J Pathol 2022

7 *In vitro* culture of RAW264.7 cells with T-CNTs



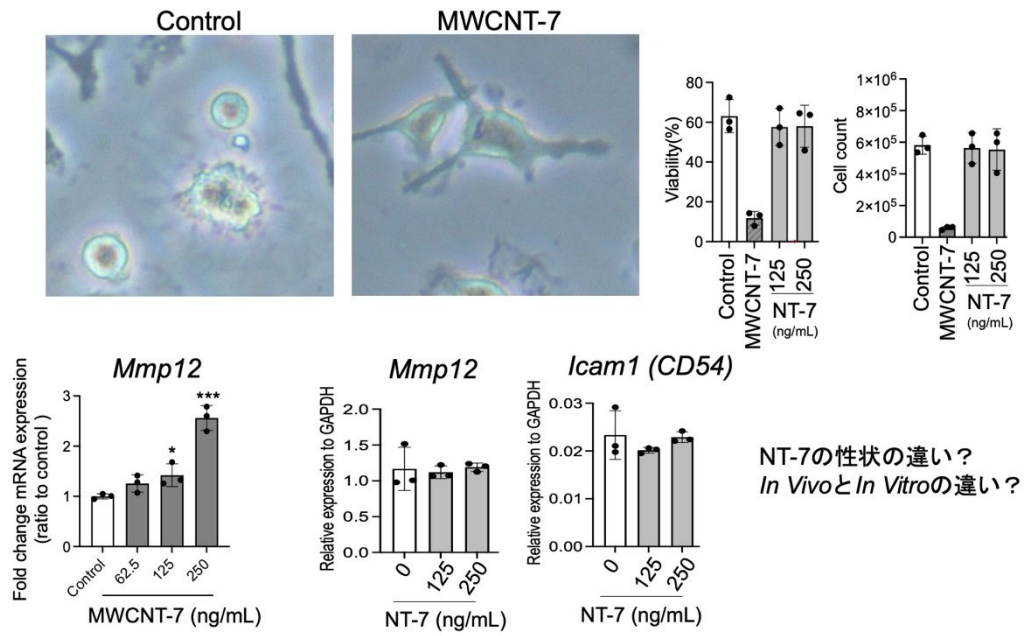
Am J Pathol 2022

8 MMP12 mRNA expression of bone marrow-derived macrophages stimulated with T-CNT



Bone marrow cells were collected from femurs and tibiae of male C57BL/6J mice (7-week old). Obtained whole BM cells were cultured in petri dishes with RPMI-1640 containing 10% FBS, 20 mM HEPES, 1m M non-essential amino acids and recombinant M-CSF (100 ng/mL) for 7 days. Attached cells were used as bone marrow-derived macrophages (BMDMs).

図9 骨髓細胞由来マクロファージを用いた*In vitro*実験



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
(21KD2004)

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・客員研究員

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、OECD のナノマテリアル作業グループ (WPMN) の会合に参加し、曝露評価プロジェクト (SG8) などで進められているプロジェクトの情報収集を行った。

2022年6月にOECDより「Particle Size and Size Distribution of Nanomaterials: OECD Test Guideline 125」(以下、TG225)が出版され、2023年2月にはTG125に関するウェビナーが開催された。このTG125とそのバリデーション報告書を調査し、その内容を整理した。

OECDでは今後も暴露評価手法・モデルに関して開発・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、OECD のナノマテリアル作業グループ (WPMN) の会合に参加し、曝露評価プロジェクト (SG8) などで進められているプロジェクトの情報収集を行った。

B. 研究方法

2022年6月にOECDより「Particle

Size and Size Distribution of Nanomaterials: OECD Test Guideline 125」(以下、TG225)が出版され、2023年2月にはTG125に関するウェビナーが開催された。このTG125¹⁾とそのバリデーション報告書²⁾を調査し、その内容を整理した。

「OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 1 : Physical-Chemical properties | OECD Guidelines for the Testing of Chemicals | OECD iLibrary (oecdilibrary. org)」

C. 研究結果

i) TG125 の背景

背景では、粒径分布に関するナノ特有の TG の必要性について記述されている。NM の キャラクターゼーションはグループ化・リードアクロスの基本であり、OECD では 1981 年に TG110 が出版されているが、ナノマテリアルには不適であることから、新たなガイドラインが必要である。TG125 は、ドイツの国家プロジェクトが元になっており、テストガイドラインプログラム各国調整官作業部会 (WNT) のプロジェクト 1.4 として、2018 年から実施されているものである。

ii) TG125 の概要

TG125 は、以下の構成となっている。

- ・ TG125 の構成
- ・ 重要性と使用方法
- ・ 粒子計測：方法、限界、適用性
- ・ 繊維計測：方法と限界
- ・ 質疑応答
- ・ 別冊

「重要性と使用方法」では、TG125 は 粒径 1-1000 nm の粒子と繊維、長さ 1-20 μm の繊維を対象としたものであり、分散液はガス・液中で物理的・化学的に安定でなければならないことが強調されている。ただし、試料調製方法は TG125 の範囲外となっている。

iii) 粒子計測

TG125 において粒子計測には、少なくとも 2 つの計測方法を選択する。また、目的に合った計測量が得られる正しい方法を選択する必要がある。計測方法によって計測量の

種類 (数, 表面積, 重量) が異なる。多くの手法では単位の換算はできない点に注意する必要がある。また、計測方法によって適用できる粒径が異なる (図 1)。試料分散と安定性は最も重要であるが、目的・手法に合った試料調製方法が存在しない場合もある。

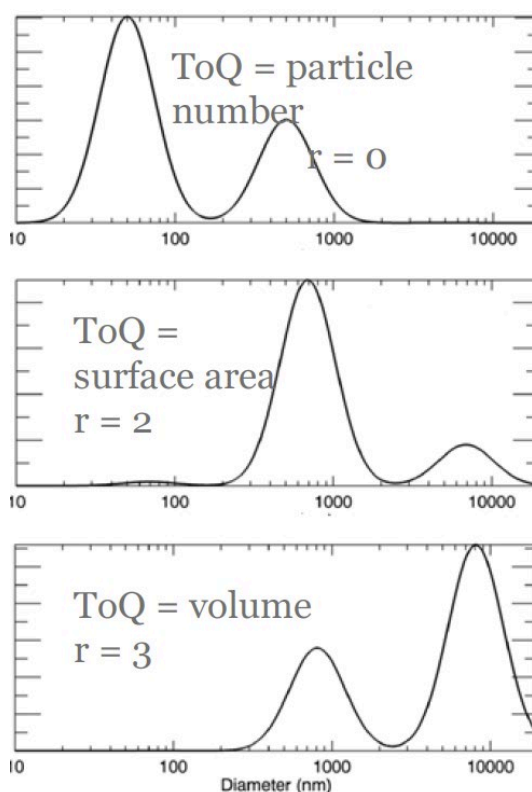


図 1. 計測量の種類

粒子計測のための顕微鏡的手法として、TEM/SEM, AFM について記述されている。

TEM/SEM では、粒径は 2 次元に投影されたものであり (図 2)、粒径分布は数ベースとなる。計測にあたって、試料は数日間 (試料調製の期間) 安定である必要がある。また、統計的に有用な情報を得るには 10^3 個の粒子が必要とされている。

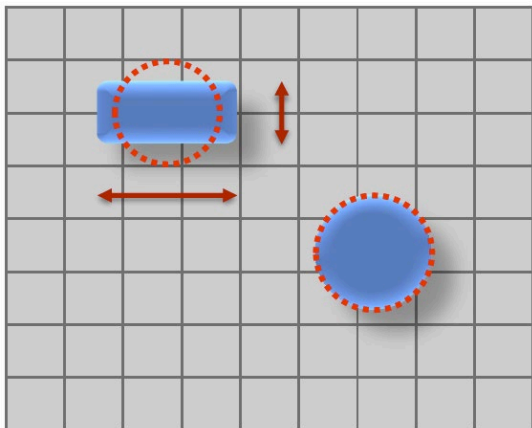
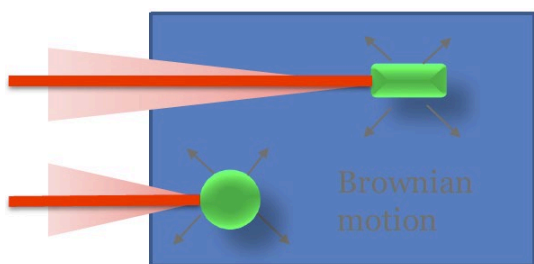


図 2. TEM/SEM 計測のイメージ

液中の粒子の計測手法としては、CLS, DLS, NTA/PTA について記述されている。以下では、これらの手法のうち最も広く用いられている動的光散乱 (DLS) について記述する。DLS は、流体力学的な粒径が得られ、粒径分布は強度ベースとなる (図 3)。20 分間 (計測時間) の安定性が必要であり、0.2v% よりも低濃度の試料に適用できる。統計的に有用な情報が得られるには 10^5 個以上の粒子が必要であり、粒子の組成は分からない。



$$I_{\text{out}} = I(\text{Vol}_p, t)$$

図 3. DLS 計測のイメージ

粒子計測の室間比較 (ILC) に関しては、ポリスチレン混合液 (90/125 nm) を用いて

24~45 機関で評価が行われたが、DLS を用いた報告が圧倒的に多かった。幾つかの計測手法は 2 つの粒径分布のモード (最頻値) を正しく測定できた (図 4)。粒径分布に差がない場合は、ほとんどの計測手法で正しく計測できたが、差がある場合は小さい粒子を過小評価されることがある。全ての計測手法にはメリット・デメリットがあることから、少なくとも 2 つの独立した計測手法を用いることを推奨する。

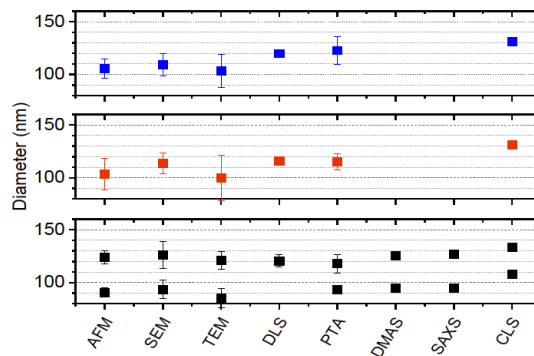


図 4. ポリスチレン混合液 (90/125 nm) を用いた室間比較

iv) 繊維計測

TG125 では個々の繊維の直径と長さをペアで測定することを新しいスタンダードプロトコルとして提案している。

繊維の粒径分布測定のバリデーションでは、SEM と TEM の両方を用いて評価が行われた。銀ナノファイバーの粒径分布の室間比較の例を図 5 (直径) と図 6 (長さ) に示す。さらに、各参加者は、SEM と TEM で直径と長さの中央値を計測し、エラーバーとして室間の不確実性を表示したものを図 7 に示す。長い繊維では、SEM と TEM の結果の乖離が大きい結果となっている。この理由と

して、TEM の適用範囲は $<5\mu\text{m}$ であることが挙げられる。

以上のことから、ナノファイバーの計測においては、TEM と SEM の両方を用いて計測することが推奨される。

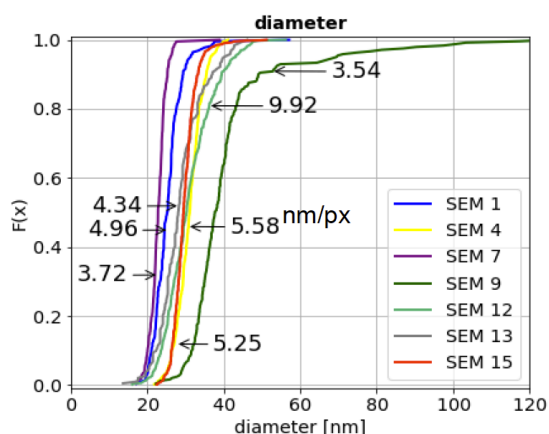


図 5. 銀ナノファイバーの粒径分布(直径)の室間比較

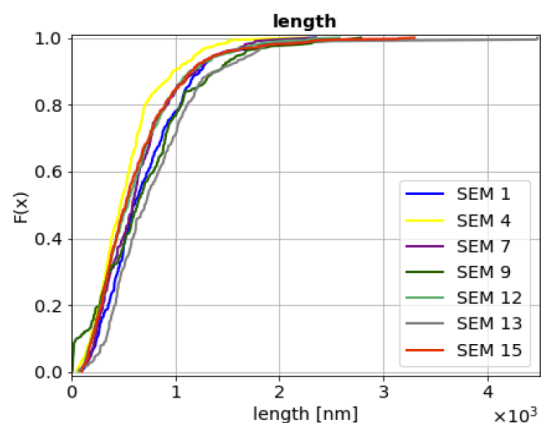


図 6. 銀ナノファイバーの粒径分布(長さ)の室間比較

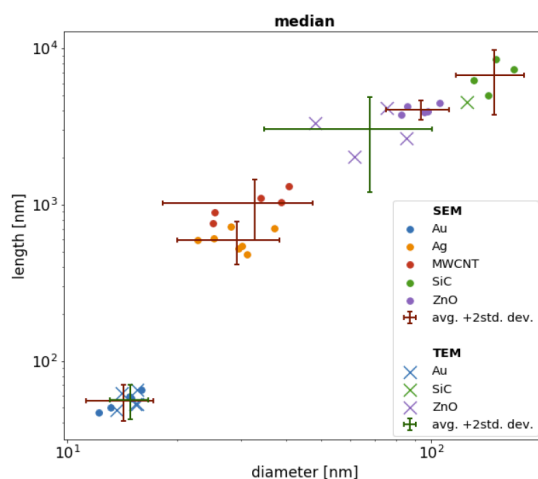


図 7. 銀ナノファイバーの粒径分布の室間比較のまとめ

バリデーション試験に関する詳細は TG125 のバリデーション報告書²⁾に記載されている。

「No. 352 Validation Report on Particle and Fibre Size Distribution Measurements of Nanomaterials. Supporting TG 125 on Particle Size and Particle Size Distribution of Nanomaterials

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。

今年度は、TG125 に関する OECD の最新動向を入手できた。OECD では今後も暴露評価手法・モデルに関して開発・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

- 1) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 1 : Physical-Chemical properties | OECD Guidelines for the Testing of Chemicals | OECD iLibrary (oecdilibrary. org)
https://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-1-physical-chemical-properties_20745753
- 2) No. 352 Validation Report on Particle and Fibre Size Distribution Measurements of Nanomaterials. Supporting TG 125 on Particle Size and Particle Size Distribution of Nanomaterials. [https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/cbc/mono\(2022\)7&doclanguage=en](https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/cbc/mono(2022)7&doclanguage=en)

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
Horibata K, Takasawa H, Hojo M, Taquahashi Y, Shigano M, Yokota S, Kobayashi N, Sugiyama KI, Honma M, Hamada S.	<i>In vivo</i> genotoxicity assessment of a multiwalled carbon nanotube in a mouse <i>ex vivo</i> culture.	<i>Genes Environ.</i>	44	24	2022
Hojo M, Maeno A, Sakamoto Y, Ohnuki A, Tada Y, Yamamoto Y, Ikushima K, Inaba R, Suzuki J, Taquahashi Y, Yokota S, Kobayashi N, Ohnishi M, Goto Y, Numano T, Tsuda H, Alexander DB, Kanno J, Hirose A, Inomata A, Nakae D.	Two-year intermittent exposure of a multiwalled carbon nanotube by intratracheal instillation induces lung tumors and pleural mesotheliomas in F344 rats.	<i>Part Fibre Toxicol.</i>	19	38	2022
Saleh D., Luo S., Ahmed HM Omnia, Alexander DB., Alexander TW., Gunasekaran S., El-gazzar AM., Abdelgied M., Numano T., Takase H., Ohnishi M.,	Assessment of the toxicity and carcinogenicity of double-walled carbon nanotubes in the rat lung after intratracheal instillation: a two-year study.	<i>Particle and Fibre Toxicol.</i>	19	30	2022

別添 5

<p>Tomono S., Randa Hussein Abd el Hady, Fukamachi K., Kanno J., Hirose A., Jiegou Xu, Suzuki S., Naiki-ito A., Takashi S., Tsuda H.</p>					
<p>Tsunematsu T, Arakaki R, Sato M, Saito M, Otsuka K, Furukawa Y, Taquahashi Y, Kanno J, Ishimaru N.</p>	<p>Exposure to Multi-Wall Carbon Nanotubes Promotes Fibrous Proliferation by Production of Matrix Metalloproteinase-12 via NF-κB Activation in Chronic Peritonitis.</p>	<p><i>Am J Pathol.</i></p>	<p>192</p>	<p>1559 -1572</p>	<p>2022</p>

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4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) 安全性予測評価部・客員研究員

(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4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) 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 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4年厚生労働行政推進調査事業費補助金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 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4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。

令和5年4月1日

厚生労働大臣 殿

機関名 公立大学法人名古屋市立大学

所属研究機関長 職 名 理事長

氏 名 郡 健二郎

次の職員の令和4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) 大学院医学研究科・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4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 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4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。

- 研究事業名 化学物質リスク研究事業
- 研究課題名 ナノマテリアル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
- 研究者名 (所属部局・職名) 安全性生物試験研究センター毒性部・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 checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立医薬品食品衛生研究所	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

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

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

厚生労働大臣 殿

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4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口腔分子病態学分野・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4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) 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。