

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 5 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 広瀬 明彦

令和 6 年（2024 年）3 月

令和5年度 厚生労働行政推進調査事業費補助金研究報告書

目 次

I. 総括研究報告書	1
ナノマテリアル吸入曝露影響評価のための効率的慢性試験法の開発に関する研究 広瀬 明彦	2
II. 研究分担報告書	13
1. ナノマテリアル吸入曝露システムの効率化に関する研究 高橋 祐次	14
2. ナノマテリアルの慢性吸入曝露手法の改良に関する研究 横田 理	19
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	33
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	55
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	61
8. 曝露評価手法に関する調査研究 小林 憲弘、広瀬 明彦	76
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	82

令和 5 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

令和5年度 厚生労働行政推進調査事業費補助金(化学物質リスク研究事業)
総括研究報告書

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 一般財団法人化学物質評価研究機構 安全性評価技術研究所 技術顧問

研究要旨

本研究では、2年間の連続慢性吸入曝露試験をより高越的に評価するための間欠型の慢性吸入曝露評価手法の開発を目指す研究を行っている。今年度は、昨年度に引き続き検体調製工程の自動化装置の開発、短期間間欠吸入慢性観察実験、短期間の間欠気管内投与結果の解析と用量依存性の解析研究の経過観察、吸入後の体内分布の把握とマクロファージを介したメカニズム研究と共にナノマテリアルの曝露評価手法の最新国際情報の入手を行った。

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、良好な懸濁状態を維持しつつ、濾過工程を簡便に実施可能な装置を開発した。これにより、効率的な吸入曝露実験の実施並びに実験実施者の労働安全への貢献が期待される。従来使用してきた 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变化の結果より、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、野生型マウス、リンパ管マウス、ラットに対して 1 週間毎に 1 回の 13 回の間欠吸入曝露試験を実施した。一方、13 週間のラット反復気管内投与の試験では、肺腫瘍と胸膜中皮腫が発生し、総負荷量に対する用量反応性のデータを得ることができた。肺腫瘍発生の用量反応性は、基本的に吸入試験と類似するものと考えられ、肺負荷量をベースとして 2 年間の慢性吸入試験をある程度代替し得ることが示された。Prox1-GFP マウスに NT-7 を 3 週間(1 回/週)吸入曝露した結果、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。抗 GFP 抗体による免疫染色肺切片の観察において集積部位の細胞組織反応の詳細解析が可能であることが示された。凝集体は、終末細気管支周囲の領域に気管支に沿って規則的な模様を描くように局在することが示され、リンパ管の形状に影響することが示唆された。さらに吸入曝露した肺を 3 次元で解析したところ、肺周縁部の微小リンパ管の増生などの変化が観察された。また、EndoMT レポーター細胞を用いた検討により、CD40 が部分的 EndoMT から完全 EndoMT への移行を抑制していること示され、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り得ると考えられた。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ために MWCNT-7 を低用量域(0.00008mg/ラット)から 5 用量群で投与した慢性観察研究では、74 週までに最高用量群(0.5mg/ラット)の 4 例に腫瘍病変が肉眼所見として認められた。免疫系への影響では、NT-7 の単回吸入長期曝露による肺免疫への影響は MWCNT-7 吸入曝露と類似していた。加えて、骨髄由来マクロファージを用いて *in vitro* での NT-7 と MWCNT-7 の反応性に違いが見られた。曝露評価手法の情報収集に関しては、OECD の TG 126 に記載されている疎水性指標は他の物性パラメータの中でも、ナノマテリアルの様々な相互作用に関するより多くの情報を提供する可能性があると考えられた。

以上、効率的慢性試験法の開発に関して、13 週間の短期間欠型の気管内曝露実験により既報の 2 年間連続慢性曝露吸入試験の結果と中用量群まではよく似た用量依存性を示すことが明

らかにでき、気管内投与でもある程度吸入試験の代替になりうることを示すことができた。さらに、現在進行中のマウスへの同様の間欠吸入曝露試験結果と比較も可能となり、肺への負荷量解析と慢性影響に関する種差を明らかにすることも可能となると考えられる。

研究分担者

高橋 祐次 国立医薬品食品衛生研究所
毒性部 動物管理室長
津田 洋幸 名古屋市立大学大学院医学研究科 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欠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資する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。本研究では、この新規手法をISOのTC229において標準化することを目指している。

また、先行研究ではカーボンナノチューブ曝露で誘発される肺がんと中皮腫について、それぞれ異なったリスク評価を行う必要のあることも明らかとなった。その為、本研究ではそ

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出てくると考えられる。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た。本年度は、これまで自動化に向けて検討してきた個々の装置を統合的に配置し、自動化装置と

して完成させることに注力した。(高橋)。

上述の方法をもとに、NT-7の高度分散法 (Taquann法) 処理による短期間欠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。野生型マウス、遺伝学的にリンパ管内皮細胞を蛍光標識したトランスジェニックマウス (Prox1-GFP)、ラットに対して間欠吸入曝露試験 (1週間に1回6時間、13週にわたって間欠曝露) を実施した (横田)。曝露5回目と13回目、曝露経過1年目に解剖し肺組織のサンプリングを行い、肺負荷量を測定した (横田)。

慢性吸入試験と比較可能な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年間の発がん試験を実施した。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、マイクロスプレイヤー (PennCentury) を用いて、1週間に1度、13回投与した。試験開始104週後に最終解剖を行い、定法により病理検索を実施した (北條、広瀬)。

体内分布と慢性影響発現部位の解析:

本年度では、Prox1-GFPマウスに対して多層カーボンナノチューブ (NT-7) の全身曝露実験を行った。対照群 (1頭)、低濃度曝露群 (3頭)、高濃度曝露群 (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3回行った。最終曝露後に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、肺組織における吸入ナノマテリアルの分布

別添 3

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(渡部・菅野)。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、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。また、FACS分画した細胞集団における遺伝子発現をRNA sequencing法で網羅的に解析した(渡部)。

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、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0.5mg/ラットで投与を行った。各群構成は25匹として、投与終了後52週(5匹)、72週(5匹)解剖例では腫瘍発生について詳細に検討中である(津田)。

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)の全身吸入曝露後12ヶ月での長期観察を実施し、免疫学的な解析を行った。BALF細胞における肺胞マクロファージの表面マーカー、BALF細胞あるいは肺組織における各種遺伝子mRNA発現を検討した。さらに、リンパ節あるいは脾臓におけるNT-7長期暴露の影響を検討した。また、*in vitro*の実験系として、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(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。2023年7月にOECDより「Test Guideline No.126: Determination of the Hydrophobicity Index of Nanomaterials Through an Affinity Measurement (親和力計測によるナノマテリアルの疎水性指数の測定)」(以下、TG225)が出版されたことから、TG126について調査し、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:

自動化装置は、低湿度状態と、濾過条件に最適な温度管理を行うため、全体を風防で覆う設計とした。低湿度の条件を実現させるため風防上部に除湿した圧縮空気の導入部を設けた。攪拌子は、耐摩耗性・耐薬品性・低吸水性・高機械的強度を有している熱可塑性のPolyoxymethylene 樹脂(POM 樹脂)を素材を使用し、十字状の形状とした。シープ面への衝突をさけるため、攪拌子の位置は固定し、シープ面を上下に ± 70 mm稼働させるダンパーを組み込んだシステムを採用した。シープに検体の懸濁液を輸送する方法は、ナノマテリアルの懸濁状態が良好な状態であることが望まれる。そのため、耐圧容器に懸濁液を入れ、圧縮空気をもちいて圧送する方式とした。濾過後のシープの洗浄は、洗浄用のチャンネルにシープを移動してイソプロピルアルコールを噴霧する仕様とした。ろ液の凍結にはドライアイス

別添 3

使用するため濾過装置近傍の温度低下により液が凝固することが想定される。そのため、シーブ及び漏斗を電熱線ヒータにて被覆して加温する方法を採用した。また、濾過装置上層部に温風ヒータを設置した。最終的に、これらの装置をすべて組み込み自動化装置を完成させた。装置のサイズは、装置のコントローラ部分を除き、安全キャビネット内に収納可能なサイズとなった。

Taquann 全身曝露吸入装置 ver 3.0 を用いた NT-7 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 2.5~2.7 mg/m³ (エアロゾル効率 45%)、高濃度は 1.6 mg/カートリッジで 4.4~4.7 mg/m³ (エアロゾル効率 39%) となった。MMAD のデータは、低濃度群で 1.1~1.4 μm (σg 6.0) と高濃度群で 1.2~1.6 μm (σg 4.5) を示した。肺負荷量については、間欠吸入曝露 5 回目 (5th): 低用量群 6.4 μg/Lung、高用量群 13.4 μg/Lung、13 回目 (13th): 低用量群 18.4 μg/Lung、高用量群 40.6 μg/Lung、曝露 1 年経過時: 低用量群 4.6 μg/Lung、高用量群 22.3 μg/Lung の値を示した。

ラット 13 回反復気管内投与実験については、試験開始後 73 週時点で、EH 群で初めて胸膜中皮腫が観察された。その後、H 群および EH 群で最終解剖までに胸膜中皮腫と疑われる病変により、9 および 11 例を剖検した。現在、最終解剖の標本は観察途中だが、肉眼観察結果をもとにすると、肺の腫瘍を認めた例数とその頻度 (%) は、C、L、M、H および EH 群において、それぞれ、2 例 (5.2%)、4 例 (10.5%)、13 例 (33.3%)、5 例 (13.1%) および 3 例 (15.0%) であった。一方、胸膜中皮腫は、C 群・L 群では観察されず、M 群、H 群および EH 群の例数と頻度はそれぞれ 1 例 (2.6%)、11 例 (28.9%) および 12 例 (60.0%) であった。

体内分布と慢性影響発現部位の解析:

体内動態に関する研究において、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ところ、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。今回 3 週間にわたり NT-7 の吸入曝露を行った Prox1-GFP マウスの肺を透明化し、ライトシート顕微鏡を用いてリンパ管の構造を 3 次元で解析したところ、NT-7 の吸入曝露により、肺周縁部の微小リンパ管の増生などの変化が観察された。病理学的には、終末細気管支周囲の領域に気管支に沿ってに規則的な模様を描くように局在することが示された。抗 GFP 抗体を用いた DAB 発色免疫染色切において、リンパ管が終末細気管支の壁外側、および、静脈に接して、そして、胸膜近傍まで分布する事を確認した。また、連続切片の画像情報をトレースすることで、3 次元構築を再確認できた。ヘマトキシレン単染色においても、リンパ管、および NT-7 と、それらの周囲に位置する細胞の種類の同定が凡そ可能なことが示された。さらに、今回 TGF-β 存在下で培養して EndoMT が誘導された EndoMT レポーター細胞から分画した部分的 EndoMT が誘導されている細胞の特異的マーカーとして CD40 を同定した。CD40 の発現を siRNA で低下させることで TGF-β による EndoMT の誘導が亢進されたことから、CD40 は部分的 EndoMT から完全 EndoMT への移行を抑制していることが示唆された。

2 年間の TIPS 法投与後 2 年間観察実験では 74 週までに無処置及び溶媒対照群で 3 例、0.0008 mg/ラット群で 1 例、0.004 mg/ラット群で

別添 3

1 例、0.5mg/ラット群 4 例の死亡がみられた。そのうち 0.5mg/ラット群に肉眼的肺腫瘍/中皮腫が認められた。

免疫系への影響として、NT-7 の単回長期暴露での BALF 細胞中の肺胞マクロファージ数は増加し、M1 および M2 のマクロファージの分化マーカーの発現は低下し、身分化マクロファージ・単球が増加していた。また、BALF 細胞および肺組織における *Mmp12* mRNA 発現は NT-7 の長期暴露によって増加した。一方で、マウス骨髄由来マクロファージ (MBDM) を用いて T-CNT ならびに NT-7 を添加刺激し、*Mmp12*、*Icam1*、*Tim4* mRNA 発現を定量 RT-PCR にて検討すると、*Mmp12* mRNA 発現は T-CNT にて有意に上昇するが、NT-7 の添加では変化が認められなかった。さらに、*Icam1* ならびに *Tim4* mRNA 発現は T-CNT の刺激で低下する一方で、NT-7 の添加では変化が確認されなかった。

曝露評価手法の情報収集:

OECD Test Guideline No. 126 では、親和力 (affinity) 計測によるナノマテリアル (NMs) の疎水性指数 (Hy) の測定方法を記載している。

ガイドラインで疎水性指数 (Hy) は「水が非極性分子を排除する傾向から生じる、水環境における非極性基または分子の会合」と定義される。様々な加工表面 (コレクター) への結合率を測定することにより、Hy は NM が非極性 (疎水性) 表面への結合を好む (水に対する親和性が低い) 傾向を示す。

この方法は推奨プロトコルを使用し、界面活性剤の有無に関わらず水溶液に分散された NM または NM 粉末に適用される。

D. 考察

本研究では、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ており、この本研究で提案している試験法については、現在 ISO の標準化に向けて標準化プロジェクトに入る前段活動として本研究班のプロトコルを TC229 会議に提案して議論を行っている。

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。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、① TBA 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。ナノマテリアルは凝集する性質が強く、また、Taquann 法で使用する溶媒のターシャルブチルアルコールは室温で凝固するため、作業者はこの二つに注意しながら作業をする必要があった。本分担研究は、良好な懸濁状態を維持しつつ、濾過工程を簡便に実施することに注力して自動化装置の開発に取り組んだ。今年度は、これらの条件を個別に検討し、自動化装置に実装した結果、濾過工程を実施する装置は安全キャビネット内に収まるサイズとして完成させた。これにより、効率的な検体調製並びに吸入曝露実験が可能となる。また、濾過工程における作業者の労働安全にも貢献が期待される。

昨年度実施の野生型マウスの単回吸入曝露試験における肺への負荷量推移の結果について半減期はおよそ 1 週間という結果を得ていた。この結果をもとに、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

別添 3

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 法の有用性が示された。

肺負荷量に関しては、野生型マウス間欠吸入曝露 5 回目(5th)と 13 回目(13th)、1 年経過時(52 週目)の肺負荷量を定量した。昨年度実施の、単回吸入曝露の時に得られた肺負荷量の半減期はおよそ 1 週間であったが、今回、13 回の間欠吸入曝露直後の肺負荷量が半減にするのにおよそ 39 週間を要した。このように、単回曝露の時と比べて間欠曝露においては、肺負荷量のクリアランスの低下が示唆されたものの、時間経過とともに、肺負荷量は減少したため、過負荷のない間欠吸入曝露プロトコルが提案された。

一方、今年度ラットの吸入曝露実験を開始した。マウスの曝露実験結果と概ね同様の結果を示し、本装置はマウスのみならずラットにも適用可能であることを確認した。今後、2 年間の慢性影響評価を実施し、先行の 2 年間連続吸入曝露試験の結果との相違を明らかにする。

ラットの 13 週間反復投与試験の結果、肺腫瘍の観察頻度は、L 群・M 群に関しては用量依存性に増加し、M 群の肺負荷量と肺腫瘍の観察頻度は、Kasai らの吸入試験の 0.2 mg/m³ 群の結果と、概ね一致するものであった。吸入試験の結果では、2 mg/m³ 群においてさらに発現頻度が高くなったのに対し(33.3%)、本研

究では、H 群、EH 群では頻度が低下した。これは、中皮腫により早期死亡が多く発生したため、発生時期の遅い肺腫瘍の頻度が、見かけ上、低下したものと思われる。また、2 年間の肺負荷量の Area Under the Curve(AUC)の形状は、吸入試験とは異なるにもかかわらず、同程度の肺発がんの反応性が認められたことから、早期に投与を完了させる IT による 2 年試験も慢性吸入試験の代替になり得ると考えられる。一方、胸膜中皮腫の発生頻度は、直線的に増加し、特に、1000 $\mu\text{g}/\text{rat}$ の総投与量を超える場合、CNT の肺発がんの評価に影響することがわかった。なお、今回の中皮腫の発現頻度や早期死亡の例数は MWNT-7 を用いた既報の TIPS 試験結果よりも低く、これは、保土ヶ谷製の NT-7 を用いたことが理由かもしれない。

Prox1-GFP マウスへのナノマテリアルの吸入曝露により採取した肺組織の透明化処理後の観察結果から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。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大型の MWNT-7 の凝集体が局在すること、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。他方、大型の MWNT-7 の凝集体が局在しない肺細静脈系列(V系列)の近傍の肺胞には、MWNT-7 を貪食した肺胞マクロファージが孤在性に認められた。BA 系列領域における組織反応と V 系列領域近傍の肺胞領域における組織反応には、差異があることが確認された。両領域における、マクロファージとリンパ管、特に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作成した連続パラフィン切片において詳細に進める予定である。また、EndoMT レポ

一ター細胞を用いた検討により、EndoMT は段階的に起きていることが証明され、Partial EndoMT 特異的なマーカーとして同定された CD40 が Full EndoMT への移行を抑制することで EndoMT を制御していることが明らかとなった。このことから、CD40 が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り得ると考えられた。

TIPS法による慢性影響研究では、74 週までに 0.5mg/ラット群で 4 匹の死亡と肺の腫瘍性病変(肉眼所見)が認められたが、その他の群では MWCNT-7 曝露による腫瘍性病変を伴う死亡は認められていない。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 の単回吸入長期曝露によって肺胞マクロファージの割合ならびに細胞数は有意に増加しており、M1/M2 への分化に至らない未分化なマクロファージあるいは単球の分画の増加が認められた。R4 年度までに NT-7 吸入曝露後の肺胞マクロファージは減少し、経時的 28 日まで回復することが判明していた。この後 12 ヶ月まで漸増していたものと考えられる。従来用いられた MWCNT-7 の長期曝露においても未分化分画のマクロファージ・単球が増加していた点は共通の現象である。

NT-7 の長期曝露での肺組織および BALF 細胞における指標マーカーとして、CD54、Tim4 あるいは MMP12 を検討したところ、Mmp12 mRNA の濃度依存的な上昇が確認された。これまでに、肺胞マクロファージにおけるカーボンナノチューブの反応として MMP-12 が注目されてきたが、NT-7 の長期曝露においても MMP-12 が有用な毒性マーカーになりうる可能性が高い。一方で、*in vitro* の実験系では

NT-7 の反応性と T-CNT の反応性が異なっていた。さらに、NT-7 の短期曝露実では肺胞マクロファージの M2 への分化が亢進している点と T-CNT の短期曝露では M1 への分化にシフトしている点から両者のナノマテリアルに対する反応性の違いがある可能と考えられる。

OECD の WPMN の曝露評価プロジェクト (SG8) の情報収集として、今年度行った TG126 における調査では、水性指数 (Hy) の潜在的な利用可能性として、次の 3 点が挙げられていた。まずナノ粒子の環境中挙動の指標として使えると考えられる。カルボキシル基が付加したポリスチレンでは、-COOH の含量が増加するほど、疎水性が減少することが報告されている。また、生物濃縮性の指標としても活用できると考えられる。Hy が高いほど、微生物への吸着量が増加することが報告されている。さらに、異なる種類のナノ粒子の凝集の指標としても活用できる可能性がある。

E. 結論

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、ナノマテリアル吸入曝露方法を効率化するため、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種々の条件を検討し、これらの機能を統合した形で組

別添 3

み込み、最終的には安全キャビネット内に収まるサイズの自動化装置として完成させた。

Taquann 全身曝露吸入装置 Ver.3.0 を使用し、NT-7 をマウスに 6 時間の単回全身曝露吸入を実施し、肺負荷量の経時的变化を明らかにした。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。また、肺負荷量の経時的变化についても明らかにした。13 週間のラット反復気管内投与の試験では、肺腫瘍と胸膜中皮腫が発生し、総負荷量に対する用量反応性のデータを得ることができた。肺腫瘍発生の用量反応性は、基本的に吸入試験と類似するものと考えられ、肺負荷量をベースとして 2 年間の慢性吸入試験をある程度代替し得ることが示された。

Prox1-GFP に対するナノマテリアル吸入曝露の結果、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。凝集体は、終末細気管支周囲の領域に気管支に沿って規則的な模様を描くように局在することが示された。GFP 励起光蛍光観察においては、終末細気管支領域(BA 系列)への集積と、肺細静脈系列(V 系列)の近傍の肺胞マクロファージへの集積が確認された。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。さらに Prox1-GFP マウスに NT-7 を 3 週間(1 回/週)吸入曝露した肺を 3 次元で解析したところ、肺周縁部の微小リンパ管の増生などの変化が観察された。また、EndoMT レポーター細胞を用いた検討により、CD40 が部分的 EndoMT から完全 EndoMT へ

の移行を抑制していること示され、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り得ると考えられた。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ために MWCNT-7 を低用量域(0.00008mg/ラット)から 5 用量群で投与した慢性観察研究では、74 週までに最高用量群(0.5mg/ラット)の 4 例に腫瘍病変が肉眼所見として認められた。免疫系への影響では、NT-7 吸入長期曝露後の BALF 中の肺胞マクロファージは増加した。NT-7 吸入長期曝露によって、肺胞マクロファージは未分化な分画が増加し、肺組織および BALF 細胞における *Mmp12* mRNA 発現上昇が確認された。さらに、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。曝露評価に関しては、OECD の TG 126 に記載されている疎水性指標は他の物性パラメータの中でも ナノマテリアルの様々な相互作用に関するより多くの情報を提供する可能性があると考えられた。

以上、効率的慢性試験法の開発に関して、13 週間の短期間欠型の気管内曝露実験により既報の 2 年間連続慢性曝露吸入試験の結果と中用量群まではよく似た用量依存性を示すことが明らかにでき、気管内投与でもある程度吸入試験の代替になりうることを示すことができた。さらに、現在進行中のマウスへの同様の間欠吸入曝露試験結果と比較も可能となり、肺への負荷量解析と慢性影響に関しての種差を明らかにすることも可能となると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Hojo M, Maeno A, Sakamoto Y, Yamamoto Y,

- Taquahashi Y, Hirose A, Suzuki J, Inomata A, Nakae D: Time-course of transcriptomic change in the lungs of F344 rats repeatedly exposed to a multiwalled carbon nanotube in a 2-year test. *Nanomaterials (Basel)*. 2023; 13(14):2105.
- Miyauchi A, Akashi T, Yokota S, Taquahashi Y, Hirose A, Hojo M, Yoshida H, Kurokawa M, Watanabe W: Effects of inhalation of multiwalled carbon nanotube (MWCNT) on respiratory syncytial virus (RSV) infection in mice. *J Toxicol Sci*. 48(7): 411-20. (2023)
- Shimizu M, Hojo M, Ikushima K, Yamamoto Y, Maeno A, Sakamoto Y, Ishimaru N, Taquahashi Y, Kanno J, Hirose A, Suzuki J, Inomata A, Nakae D: Continuous infiltration of small peritoneal macrophages in the mouse peritoneum through CCR2-dependent and -independent routes during fibrosis and mesothelioma development induced by a multiwalled carbon nanotube, MWNT-7. *J Toxicol Sci*. 2023;48(12):617-639.
- Sultana N., Fukamachi K., Jiegou Xu., Tsuda H., Suzui M. mRNA expression profile of cytokines in rat primary alveolar macrophages treated with multiwalled carbon nanotube (MWCNT). *Fundam. Toxicol. Sci.*, Vol.10(1), 27-30 (2023)
- Sultana N., Fukamachi K., Roy DC., Jiegou Xu., Tsuda H., Suzui M mRNA expression levels of CCL4, IL6, and CXCL2 in multiwalled carbon nanotube induced lung tumors in rats. *Fundam. Toxicol. Sci.*, Vol. 10(4), 137-141 (2023)
- 北條 幹: カーボンナノチューブの発がん性. *Precision Medicine*, 2023 年 6 巻 4 号, p.30-34
- 北條 幹, 坂本義光, 前野愛: 最前線・ナノマテリアルの実際の危険性—ラット慢性試験によるカーボンナノチューブの発がん性評価. *ファルマシア*, 2023 年 59 巻 7 号, p. 659-663
- Hirose A, Maeno A, Hojo M, Taquahashi Y, Yokota S, Sakamoto Y, Kanno J: Comparison of tumorigenesis of MWCNT by intratracheal instillations and inhalation. ASIATOX 10th Annual Meeting, Taipei, Taiwan, (July 17-20, 2023).
- Tsuda H, Ahmed O, Saleh D, Alexander W, Alexander D, Numano T, Takase H, Naiki-Ito A, Hirose A, Kanno J, Yudasaka M, Yuge R, Tomono S, Wei M, Hojo M, Tsuruoka S., Carcinogenicity risk assessment of various carbon nanotubes by intra-tracheal intrapulmonary spray (TIPS) dosing followed by 2-year observation., *BOHS Inhaled Particles / NanOEH Conference 2023* (2023 5. 15-18, Manchester), *Annals of Work Exposures and Health*. 67. i43-i44. 10.1093/annweh/wxac087.105.)
- Yuhji Taquahashi, Koichi Morita, Kousuke Suga, Masaki Tsuji, Yusuke Okubo, Ken-ich Aisaki, Satoshi Kitajima, New approach for assessment of acute oral toxicity by multiple parameters of vital signs: development of a less invasive method for measuring biopotential in small laboratory animal using carbon-nanotube yarn as surface electrodes, 63rd Society of Toxicology Annual Meeting, (Accepted), Abstract Number/Poster Board number 3077/P180, 2024.3.11
- 高橋祐次、森田紘一、辻昌貴、菅康佑、相崎健一、北嶋聡、平林容子、先端素材カーボンナノチューブヤーンを使用した実験用小動物における低侵襲な生体電位測定法の開発、第 70 回 日本実験動物学会総会、2023.5.24
- 三浦伸彦、吉岡弘毅、横田理: 酸化チタンナノ粒子と精巣機能障害、第 50 回日本毒性学会学術年会、神奈川 (2023.6.21)、シンポジウム
- Yokota S, Suga K, Taquahashi Y, Kitajima S: Development of a non-invasive method for testicular toxicity evaluation using a novel compact magnetic resonance imaging

2. 学会発表

- system, the 48th Annual Conference of the American Society of Andrology, Boston, USA (2023.4.21)
- Hojo M, Shimizu M, Ikushima K, Maeno A, Sakamoto Y, Yamamoto Y, Taquahashi Y, Kanno J, Hirose A, Suzuki J, Inomata A, Nakae D: Phenotypic characterization of macrophages during peritoneal mesothelioma development induced by a multiwalled carbon nanotube in wildtype C57BL mice. EUROTOX 2023, Ljubljana, Slovenia (Sep 10-13, 2023).
- Tsuda H. CARBON NANOTUBES, INNOVATIVE MATERIALS OF THE 21TH CENTRY: CARCINOGENICITY EVALUATION OF CARBON NANOTUBES WITH DIFFERENT WALL STRUCTURES The 51st International Symposium of The Princess Takamatsu Cancer Research Fund 東京 11月
- Jun Kanno, Yuhji Taquahashi, Naozumi Ishimaru, Miho Kobayashi, Tetsuro Watabe, and Satoshi Kitajima. Basic lung responses to multiwall carbon nanotubes monitored in mouse whole body inhalation studies. Symposium: Nanosafety and Nanotoxicology. ASIATOX-X, (2023.7.18), Taipei, Taiwan, (Oral).
- Jun Kanno, Yuhji Taquahashi, Naozumi Ishimaru, Satoshi Kitajima. 159 Keynote: An Overview of Carbon Nanotube Carcinogenesis from Mouse Inhalation Data, BOHS Inhaled Particles / NanOEH Conference 2023 (2023 5. 15-19, Manchester), Annals of Work Exposures and Health, Volume 67, Issue Supplement_1, May 2023, Pages i40–i41, <https://doi.org/10.1093/annweh/wxac087.097>
- Miho Kobayashi, Honoka Hirose, Masanori Nakayama, Tetsuro Watabe. Attenuation of the stress response is involved in the age-related reduction of microvascular density. Asia-Australia Vascular Biology Meeting 2023 (AAVBM2023), 2023.09, Korea, (poster)
- Kazuki Takahashi, Miho Kobayashi, Hisae Katsumata, Yukinori Ikeda, Tatsuhiko Anzai, Katarzyna A. Podyma-Inoue, Daniel M Alcaide, Kentaro Maeda, Jihwan Park, Kunihiro Takahashi, Yukiko Matsunaga, Yasuhiro Yoshimatsu, Tetsuro Watabe. Endothelial-mesenchymal transition (EndoMT) reporter cells visualized multiple groups of cells during progression of TGF- β induced EndoMT. Asia-Australia Vascular Biology Meeting 2023 (AAVBM 2023), 2023.09, Korea, (Oral)
- Naozumi Ishimaru. Chronic Immunotoxicity of Multi-Walled Carbon Nanotubes on Macrophages via MMP-12. Inhaled Particles/NanOEH conference 2023 Invitation Lecture, 2023.5.15, Manchester, UK.
- Aya Ushio, Kunihiro Otsuka, Takaaki Tsunematsu, Yuhji Taquahashi, Jun Kanno, Naozumi Ishimaru. The influence of multi-walled carbon nanotube for immune systems. 第 113 回日本病理学会総会 2024.3.28、名古屋

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 5 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5年度 厚生労働行政推進調査事業費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

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

分担研究課題名:ナノマテリアル吸入曝露システムの効率化に関する研究

研究分担者: 高橋 祐次 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 室長
研究協力者: 菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所客員研究員
公益財団法人 日産厚生会 玉川病院 病理診断科 部長

研究要旨

工業的に大量生産されるナノマテリアルの産業応用が急速進展する中、製造者及び製品利用者の健康被害の防止のための規制決定、及び、業界における安全面からの国際競争力の保持の観点から、基礎的定量的な毒性情報を得る評価法の確立が急がれる。毒性が不明である物質を取り扱う基本的な戦略は、ヒトで想定される曝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曝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年間のマウス間欠曝露吸入実験をはじめとして、複数のナノマテリアルの吸入曝露実験を実施可能となった。しかしながら、より効率的な吸入曝露実験を行なうためには、ボトルネックとなる工程のTaquan法による高分散処理を自動化する必要がある。Taquan法は、tert-ブチルアルコール(TBA)に懸濁した検体を金属シーブで濾過して凝集体・凝固体を除去、液体窒素によってる液を急速凍結、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、Taquan法において、最も時間と人手を要している工程を効率に自動化するための方法を検討した。最終的に、安全キャビネット内に収まるサイズの自動化装置が完成した。これにより、効率的な吸入曝露実験が可能となり、また、作業者の労働安全にも貢献することが期待される。

A. 研究目的

工業的に大量生産されるナノマテリアルの産業応用が急速進展する中、製造者及び製品利用者の健康被害の防止

のための規制決定及び、業界における安全面からの国際競争力の保持の観点から、基礎的定量的な毒性情報を得る評価法の確立が急がれる。毒性未知の

物質を取り扱う基本的な戦略は、ヒトで想定される暴露経路に即した動物実験によりハザードを同定し、メカニズムを同定し、用量作用関係を情報の取得し、そこからヒトに対する毒性の推定と用量相関性の推定を行うことであるが、ナノマテリアルに関して最も重要な暴露経路である吸入暴露に関しては、動物実験を遂行する際の技術的障壁が高く、実施例は数少ない。

研究分担者らは、吸入毒性試験を実施する際のナノマテリアル特有の問題点を解決する目的で、今までの諸研究からその物性や毒性の情報が利用可能な MWNT-7 (Mitsui) をモデル物質として、高度分散法 (Taquann 法) 及び、それをエアロゾル化するカートリッジ直噴式ダスト発生装置を独自開発した (Taquann 直噴全身吸入装置)。そして、本装置により、一般的なナノマテリアルについても、従来法に比較して容易に、高分散状態の検体として、マウスやラットを用いた全身曝露吸入試験を実施することが可能となり、MWNT-7 以外の多層カーボンナノチューブ、複数種類の二酸化チタン及びナノシリカの曝露実験を進めてきた。

その一方で高分散乾燥検体を得るための Taquann 法は、人手、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

現在まで、シーブは直径 750 mm、容器の高さ 50 mm を使用している (セイシン企業、目開き 53 μ 、特注品)。シーブのフレームには濾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、約 80% の回収率であるが、MWNT-7 がシーブ面に堆積 (ケーキ生成) することを防止することが必要である。手動ではセルスクレイパーでろ液を攪拌してケーキ生成を抑制している。自動化に際しては、攪拌子をモータによって動作させる方法とした。シーブ面に攪拌子が衝突しない方法、攪拌子の形状も検討した。

ろ液に含まれる検体の凝集をさけるため、これまでは液体窒素をろ液内に投入して瞬間的に凍結させている。液体窒素を用いた自動化は、液体窒素が輸送するラインを通過する際にその殆どが気化してしまうこと、液体窒素を保管場所から実験室に輸送するまで時間を要し、かつ、長期保存が難しいことから、これに替わる方法が望まれる。昨年度の検討により、ドライアイス冷媒として用いた方法が有効であることが示されたことから、この手法を採用した。

Taquann 法ではターシャルブチルアルコールを溶媒としている。ターシャルブチルアルコールは約 25°C で凝固するため、室温条件での凍結乾燥には都合が良いが、濾過するには凝固を防止する措置が必要となる。この手法についても検討を行った。また、ターシャルブチルアルコールは非常に吸湿しやすい。先行研究では、吸湿したターシャルブチルアルコールは凝固しにくく、また、検体の分散性も低下する。これを防止するための手法についても検討を行った。

C. 研究結果

自動化装置は、低湿度状態と、濾過条件に最適な温度管理を行うため、全体を風防で覆う設計とした。低湿度の条件を実現させるため風防上部に除湿した圧縮空気の導入部を設

けた。

攪拌子は、耐摩耗性・耐薬品性・低吸水性・高機械的強度を有している熱可塑性の Polyoxymethylene 樹脂 (POM 樹脂) を素材を使用し、十字状の形状とした。シーブ面への衝突をさけるため、攪拌子の位置は固定し、シーブ面を上下に±70mm 稼働させるダンパーを組み込んだシステムを採用した。

シーブに検体の懸濁液を輸送する方法は、ナノマテリアルの懸濁状態が良好な状態であることが望まれる。そのため、耐圧容器に懸濁液を入れ、圧縮空気をもちいて圧送する方式とした。

濾過後のシーブの洗浄は、洗浄用のチャンネルにシーブを移動してイソプロピルアルコールを噴霧する仕様とした。

ろ液の凍結にはドライアイスを使用するため濾過装置近傍の温度低下によりろ液が凝固することが想定される。そのため、シーブ及び漏斗を電熱線ヒータにて被覆して加温する方法を採用した。また、濾過装置上層部に温風ヒータを設置した。

最終的に、これらの装置をすべて組み込み自動化装置を完成させた(図 2)。

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濾過を行えること。②液体窒素を用いないろ液の瞬間凍結方法、③濾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。

ナノマテリアルは溶媒中でも凝集する性質が強く、また、Taquann 法で使用する溶媒のターシャルブチルアルコールは室温で凝固す

るため、作業者はこの二つに注意しながら作業をする必要があった。本分担研究は、良好な懸濁状態を維持しつつ、濾過工程を簡便に実施することに注力して自動化装置の開発に取り組んだ。これらの条件を個別に検討し、自動化装置に実装した結果、濾過工程を実施する装置は安全キャビネット内に収まるサイズとし、コントローラ部分は安全キャビネットの外部に設置する仕様となった。これにより、効率的な検体調製並びに吸入曝露実験が可能となる。また、濾過工程における作業者の労働安全にも貢献が期待される。

E. 結論

ナノマテリアル吸入曝露方法を効率化するため、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種々の条件を検討した。その結果、最終的には安全キャビネット内に収まるサイズの自動化装置として完成させた。

謝辞:

本研究の遂行にあたり、技術的支援をしていただいた、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

Hojjo M, Maeno A, Sakamoto Y, Yamamoto Y, Taquahashi Y, Hirose A, Suzuki J, Akiko Inomata A, Dai Nakae D, Time-Course of Transcriptomic Change in the Lungs of F344 Rats Repeatedly Exposed to a Multiwalled Carbon Nanotube in a 2-Year Test, Nanomaterials (Basel).

2023 Jul 19;13(14):2105. doi:
10.3390/nano13142105.

Shimizu M, Hojo M, Ikushima K,
Yamamoto Y, Maeno A, Sakamoto Y,
Ishimaru N, Taquahashi Y, Kanno J,
Hirose A, Suzuki J, Inomata A, Nakae
D, Continuous infiltration of small
peritoneal macrophages in the mouse
peritoneum through CCR2-dependent
and -independent routes during
fibrosis and mesothelioma
development induced by a multiwalled
carbon nanotube, MWNT-7, J Toxicol
Sci 2023;48(12):617-639. doi:
10.2131/jts.48.617.

Miyauchi A, Akashi T, Yokota S,
Taquahashi Y, Hirose A, Hojo M,
Yoshida H, Kurokawa M, Watanabe
W., Effects of inhalation of multi-
walled carbon nanotube (MWCNT) on
respiratory syncytial virus (RSV)
infection in mice. J Toxicol Sci.
2023;48(7):411-420. doi:
10.2131/jts.48.411.

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. doi:
10.2131/jts.48.57.

Kuwagata M, Tsuboi M, Igarashi T,
Tsurumoto M, Nishimura T,
Taquahashi Y, Satoshi Kitajima: A 90-
day repeated oral dose toxicity study

of 2-Butylbenzo[d]isothiazol-3(2H)-
one in rats Fundam. Toxicol. Sci.
2023; 10: 69-82.

Kuwagata M, Tsuboi M, Igarashi T,
Tsurumoto M, Nishimura T,
Taquahashi Y, Satoshi Kitajima: A 90-
day dose toxicity study of 2-(2H-
benzotriazol-2-yl)-6-dodecyl-4-
methylphenol in rats Fundam. Toxicol.
Sci. 2023; 10: 59-68.

2. 学会発表

Yuhji Taquahashi, Koichi Morita,
Kousuke Suga, Masaki Tsuji, Yusuke
Okubo, Ken-ich Aisaki, Satoshi
Kitajima, New approach for assessment
of acute oral toxicity by multiple
parameters of vital signs: development
of a less invasive method for measuring
biopotential in small laboratory animal
using carbon-nanotube yarn as surface
electrodes, 63rd Society of Toxicology
Annual Meeting, (Accepted), Abstract
Number/Poster Board number
3077/P180, 2024.3.11

高橋祐次、森田紘一、辻昌貴、菅康佑、相
崎健一、北嶋聡、平林容子、先端素材カー
ボンナノチューブヤーンを使用した実験用
小動物における低侵襲な生体電位測定法
の開発、第 70 回 日本実験動物学会総
会、2023.5.24

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

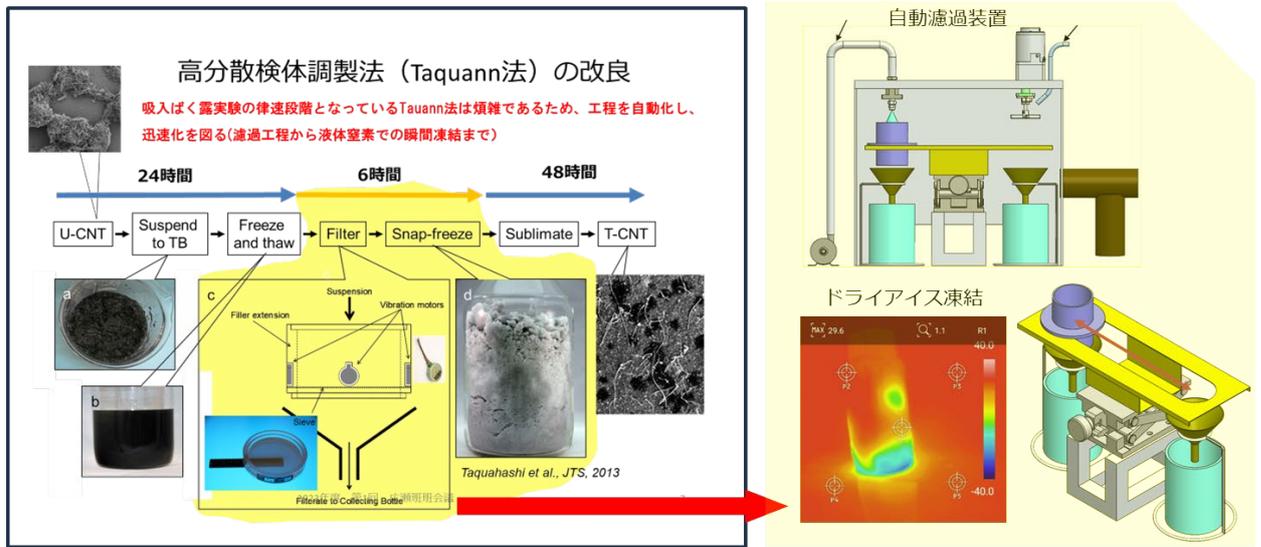


図1 Taquann 法の律速段階を自動化する構想図

Taquann 法の工程において、律速段階となっているのは濾過工程(左図 黄色でハイライト)であるため、この工程を自動化するための装置を開発し、凍結するための冷媒は液体窒素から、管理が容易なドライアイスに変更する。

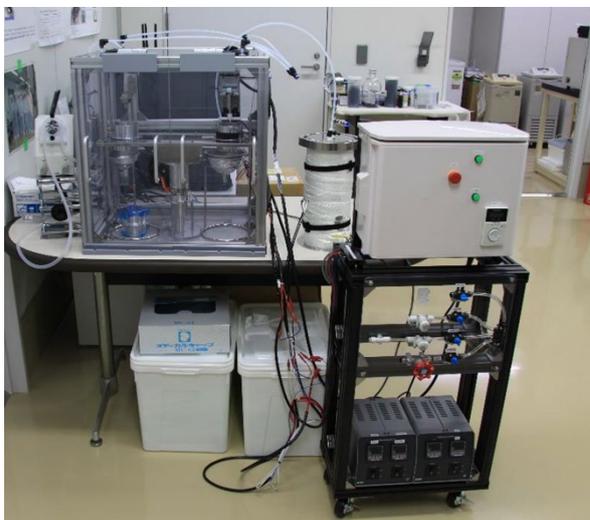


図2 一連の装置を組み込んだ濾過装置の全体像

濾過効率を向上させるケーキ生成抑制のための攪拌子、振動子を装着したシーブ、溶媒として使用するターシャルブチルアルコールの凝固を防ぐ加温装置等を組み込みこんだ自動化装置を開発した。

令和5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 第二室 室長
研究協力者: 高橋 祐次 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 動物管理室 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

ナノテク産業の発展に伴い、ナノマテリアルの安全性評価の実施が国民の健康被害防止の観点から急務とされている。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、先行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用いている。本分担研究の目的は、先行で実施した2年にわたる長期間欠吸入曝露試験の研究成果を踏まえ、より効率的な短期間欠吸入曝露プロトコルの確立を目指し、一度に複数の吸入毒性試験を実施可能な基盤を整備することである。

今年度は、昨年度実施した野生型マウスの多層カーボンナノチューブ短期間欠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、その体内分布を把握するためのリンパ管マウスを用いた短期間欠吸入曝露試験を実施した。加えて、動物種差を考慮するため、ラットに対しても同様の曝露実験を実施した。

いずれの曝露実験においても、週に1回6時間、13週にわたって、多層カーボンナノチューブの短期間欠吸入曝露試験を行った。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2.5 mg/m³、4.4 mg/m³、MMADはL、H群ともに1.1-1.6 μmを示した。今後、肺負荷量と体内動態に関する経時変化に関するデータと慢性影響に関するデータとを照合し、迅速かつ効率的な短期間欠吸入曝露プロトコルの確立に向けて研究を進めていく。

A. 研究目的

先行研究では、Taquann 直噴全身吸入装置を用い MWNT-7 の2年間の長期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短期間欠吸入曝露プロトコルを開発することを目的としている。

B. 研究方法

B-1. NT-7の高分散化処理(Taquann法)

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た後、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、分散を図りつつ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) 短期間欠吸入曝露試験(野生型マウス)

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回の短期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。

(2) 短期間欠吸入曝露試験(リンパ管マウス)

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を蛍光標識したトランスジェニックマウス(Prox1-GFP)に対して、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回の短期間欠吸入曝露を実施した。このマウスは、リンパ管内皮細胞がGFP(緑)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6週齢にて搬入され、1週間の馴化期間を経て7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)。

(3) 短期間欠吸入曝露試験(ラット)

F344/DuCrjCrlj(日本エスエルシー株式会社)雌性ラットを5週齢で購入し1週間の馴化期間を経たのち6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回の短期間欠吸入曝露を実施した。

2) 飼育条件

飼育ケージは、ポリカーボネート製のアウトターケージとPET製インナーケージを使用した。紙製の床敷を使用し、1ケージ当り5匹のマウスまたは1ケージ当り1匹のラットを収容した。ケージラックはケミカルセーフティ対応のケージ個別換気式飼育装置(RAIR HD SUPER MOUSE 750™ 個別換気式飼育装置 特型)を使用した。飼育条件は、温度;25±1℃、湿度;55±5%、換気回数;約20回/h、照明時間;8時~20時

点灯（照明明暗サイクル12時間）とし、固型飼料CRF-1（オリエンタル酵母工業株式会社）を自由摂取させた。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。ケージ内の飼育環境を改善する目的で、マウスにはシェファードシャック（Shepherd Specialty Papers社）を、ラットには積木（日本クレア株式会社）をケージ内に設置した。

3) 群構成

対照群、T-NT-7#53 低濃度群（目標濃度 2.5 mg/m³）、T-NT-7#53 高濃度群（目標濃度 5.0 mg/m³）の3群構成とした。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回の短期間欠吸入曝露を実施した。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、野生型マウスの実験においては、各群を二つのサブグループ（Sub-Group A, B）に分けて50匹に対し曝露を実施し（表1）、リンパ管マウスにおいては、25匹に曝露を実施した（表1, 2）。一方、ラットにおいては、曝露チャンバーに20匹収容するデザインであるため、20匹に曝露を実施した（表3）。

4) ダスト発生装置

T-NT-7#53のエアロゾル化は、既設のTaquann直噴全身吸入装置Ver3.0を使用した（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（0.8 mg）、高濃度群では20 mL（1.6 mg）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。

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。その後は濃度を維持するため4分間隔で噴射し、目標設定濃度での曝露を実施した。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、アクリル製のアウトターチャンバーとPET樹脂で作製したインナーチャンバー(直径660 mm、高さ477 mm)の二重構造となっており、検体が触れるインナーチャンバーは交換可能であり、検体の変更に容易に対応できるシステムとなっている(共同開発 柴田科学株式会社、特許所得済)。メインチャンバーの気積は179 Lである。メインチャンバーの上部は円錐状となって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 μmを超える粒子が含まれているため、測定セル内で繊維が重なり、過小評価されると想定される。

質量濃度測定は、ローボリウムサンプラー(080050-155、φ55 mmろ紙ホルダー、柴田科学)にフッ素樹脂バインダーガラス繊維フィルター(Model TX40HI20-WW、φ55mm、捕集効率(DOP 0.3 μm):99.9%、東京ダイレック)を装着し、サンプリングポンプ(Asbestos sampling pump AIP-105、柴田科学)に接続して1.5 L/minの流量で曝露時間の6時間において、0~1hr、2~3hrおよび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 $1.5 \text{ L/min} \times 60 \text{ min} = 90 \text{ L}$ から 1 m^3 当りの質量濃度を算出した。フィルターの秤量にはマイクロ天秤 (XP26V、METTLER TOLEDO) を使用した。

7) エアロゾルの粒度分布

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

吸引時間は 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°C のインキュベーター内で 3 日以上留置しシリコンオイルに含まれる溶媒を除去した。マイクロ天秤 (XP26V、METTLER TOLEDO) を使用してアルミホイルの質量を、MOUDI 装着前と、MWCNT 回収後に測定し、その差分を検体質量とした (図 3)。

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

倫理面への配慮

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

Taquann 全身曝露吸入装置 ver 3.0 を用いた T-NT-7#53 の短期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 2.5~2.7 mg/m³ (エアロゾル効率 45%)、高濃度は 1.6 mg/カートリッジで 4.4~4.7 mg/m³ (エアロゾル効率 39%) となった (図 4)。MMAD のデータは、低濃度群で 1.1~1.4 μm (σ_g 6.0) と高濃度群で 1.2~1.6 μm (σ_g 4.5) を示した。

2) 野生型マウス肺負荷量の結果

肺負荷量については、間欠吸入曝露 5 回目 (5th): 低用量群 6.4 $\mu\text{g/Lung}$ 、高用量群 13.4 $\mu\text{g/Lung}$ 、13 回目 (13th): 低用量群 18.4 $\mu\text{g/Lung}$ 、高用量群 40.6 $\mu\text{g/Lung}$ 、曝露 1 年経過時: 低用量群 4.6 $\mu\text{g/Lung}$ 、高用量群 22.3 $\mu\text{g/Lung}$ の値を示した (図 5)。曝露 2 年経過時のデータは今後の解剖にて、また、リンパ管マウスやラットの肺負荷量データに関しては現在測定中である。

D. 考察

本分担研究は、先行研究で実施した MWCNT の長期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短期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ものである。今年度は

短期間欠吸入曝露試験のマウス・ラットへの実施ならびに肺負荷量の解析を行った。

昨年度実施のマウス単回吸入曝露試験における肺への負荷量推移の結果から半減期を算出し、 $t_{1/2}=6.7$ 日(およそ1週間)という結果を得ている。この結果をもとに、短期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 , og 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、本法の有用性が示された。

肺負荷量に関しては、野生型マウス間欠吸入曝露5回目(5th)と13回目(13th)、1年経過時(52週目)の肺負荷量を定量した。昨年度実施の、単回吸入曝露の時に得られたNT-7肺負荷量の半減期はおよそ1週間であったが、13回の短期間欠吸入曝露試験直後の肺負荷量が半減にするのにおよそ39週間を要した。このように、単回曝露の時と比べて短期間欠曝露においては、肺負荷量のクリアランスの低下が示唆されたものの、時間経過とともに、肺負荷量は減少したため、過負荷のない間欠吸入曝露プロトコルを提案できたものと考えている。

一方、今年度F344ラットにおける曝露実験を開始した。マウスの曝露実験結果と概ね同様の結果を示し、本装置はマウスのみならずラットにも適用可能であることを確認した。今回、

本システムを用いて初めてラット吸入曝露試験を実施し、今後、マウスの試験結果とを比較し、肺への負荷量および慢性影響に関する種差を明らかにしていく。さらに、先行のラット2年間連続吸入曝露試験の結果との相違を明らかにし、本研究で提案する短期間欠吸入曝露プロトコルの有用性について検証を進めていく。

以上、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していくことで「一度に複数検体」を吸入曝露する体制整備が見込まれる。

E. 結論

Taquann 全身曝露吸入装置 Ver.3.0 を使用し、T-NT-7#53 をマウスおよびラットに間欠全身曝露吸入を実施し、肺負荷量の経時的变化を明らかにした。

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、リンパ管マウスによるNT-7の体内動態評価とともに、病理組織学解析と免疫応答解析の結果を踏まえ、適切な短期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

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Miyaso H, Yokota S, Suga K, Hashimoto Y, Kouno C, Nagahori K, Itoh M, Kitajima S: Histological differences between the central and peripheral areas of the testes of busulfan-administrated mice. *J Toxicol Sci.* 49(4):139-149. (2024)
- Tsukiboshi Y, Noguchi A, Horita H, Mikami Y, Yokota S, Ogata K, Yoshioka H: Let-7c-5p associate with inhibition of phenobarbital-induced cell proliferation in human palate cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 696: 149516. (2024)
- Hashimoto K, Arakawa H, Imamura R, Nishimura T, Kitajima S, Sato T, Makiyama K, Ogawa T, Yokota S*: A novel alternative method for long-term evaluation of male reproductive toxicity and its recovery using a pre-pubertal mouse testis organ culture system. *J Appl Toxicol.* 44: 784-793. (2024)
- Tominaga S, Yoshioka H, Yokota S, Tsukiboshi Y, Suzui M, Nagai M, Hara H, Maeda T, Miura N: Copper-induced diurnal hepatic toxicity is associated with Cry2 and Per1 in mice. *Environ Health Prev Med.* 28: 78-86. (2023)
- Tsukiboshi Y, Horita H, Mikami Y, Yokota S, Ogata K, Yoshioka H: Involvement of microRNA-4680-3p against phenytoin-induced cell proliferation inhibition in human palate cells. *J Toxicol Sci.* 49(1): 1-8. (2024)
- Yokota S*, Wakayama T, Miyaso H, Suga K, Fujinoki M, Kaneko S, Kitajima S: Reactive blue 2 labels protamine in late-haploid spermatis and spermatozoa and can be used for toxicity evaluation. *Andrologia.* Volume 2023: 1-12.
- Yoshioka H, Wu S, Moriishi T, Tsukiboshi Y, Yokota S, Miura N, Yoshikawa M, Matsui N, Inagaki N, Matsushita Y, Nakao M: Sasa veitchii extract alleviates non-alcoholic steatohepatitis in methionine-choline deficient diet-induced mice by regulating peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Traditional and kanpo.* 10(3): 259-268. (2023)
- Miyauchi A, Akashi T, Yokota S, Taquahashi Y, Hirose A, Hojo M, Yoshida H, Kurokawa M, Watanabe W: Effects of inhalation of multi-walled carbon nanotube (MWCNT) on respiratory syncytial virus (RSV) infection in mice. *J Toxicol Sci.* 48(7): 411-20. (2023)
- Saito H, Yokota S*, Kitajima S: Immunohistochemical analysis of the vimentin filaments in Sertoli cells is a powerful tool for the prediction of spermatogenic dysfunction. *Acta Histochemica.* 125(5): 152046. (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.* 46: 824-829. (2023)
- 横田理: 小動物用コンパクト MRI を用いた非侵襲的画像解析の毒性評価への応用—動物からヒトへのトランスレーションリサーチを目指して—、中毒研究、第 37 巻第 1 号、p63-69. (2024.3.10)

2. 学会発表

Yokota S, Suga K, Taquahashi Y, Kitajima S:

Development of a non-invasive method for testicular toxicity evaluation using a novel compact magnetic resonance imaging system, the 48th Annual Conference of the American Society of Andrology, Boston, USA (2023.4.21)

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 野生型マウス:短期間欠吸入曝露実験の群構成

Group	Examinations	N	Necropsy after inhalation exposure			
			5th	13th	12M	24M
Control	• Lung Burden	12	3	3	3	3
0 mg/m ³	• Histopathology(perfusion)	26	0	0	6	20
6hr/day/week x 13 times	• 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	• Lung Burden	12	3	3	3	3
2.5 mg/m ³	• Histopathology(perfusion)	26	0	0	6	20
6hr/day/week x 13 times	• 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	• Lung Burden	12	3	3	3	3
5.0 mg/m ³	• Histopathology(perfusion)	26	0	0	6	20
6hr/day/week x 13 times	• 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2 リンパ管マウス:短期間欠吸入曝露実験の群構成

Group	Examinations	N	Necropsy after inhalation exposure		
			4M	12M	24M
Control	•① Total RNA、② Immunohistochemistry	9	3	3	3
0 mg/m ³	•③ 3D	9	3	3	3
6hr/D/W×13times	•④ Visum	3	1	1	1
	余剰	4			
Subtotal		25			
NT-7 #53um L	•① Total RNA、② Immunohistochemistry	9	3	3	3
3 mg/m ³	•③ 3D	9	3	3	3
6hr/D/W×13times	•④ Visum	3	1	1	1
	余剰	4			
Subtotal		25			
NT-7 #53um H	•① Total RNA、② Immunohistochemistry	9	3	3	3
6 mg/m ³	•③ 3D	9	3	3	3
6hr/D/W×13times	•④ Visum	3	1	1	1
	余剰	4			
Subtotal		25			
Total number of animals		75			

表 3 ラット:短期間欠吸入曝露実験の群構成

Group	Examinations	N	13th	12M	24M
Control 0 mg/m ³ 6hr/day/week x 13 times	•Lung Burden	20	3	5	12
	•Histopathology(perfusion)				
	•Immune function				
	BALF				
	Pulmonary interstitium mRNA				
Spleen, Lymph node					
	Subtotal	20			
T-NT-7 #53um L 2.5 mg/m ³ 6hr/day/week x 13 times	•Lung Burden	20	3	5	12
	•Histopathology(perfusion)				
	•Immune function				
	BALF				
	Pulmonary interstitium mRNA				
Spleen, Lymph node					
	Subtotal	20			
T-NT-7 #53um H 5.0 mg/m ³ 6hr/day/week x 13 times	•Lung Burden	20	3	5	12
	•Histopathology(perfusion)				
	•Immune function				
	BALF				
	Pulmonary interstitium mRNA				
Spleen, Lymph node					
	Subtotal	20			
Total number of animals		60			

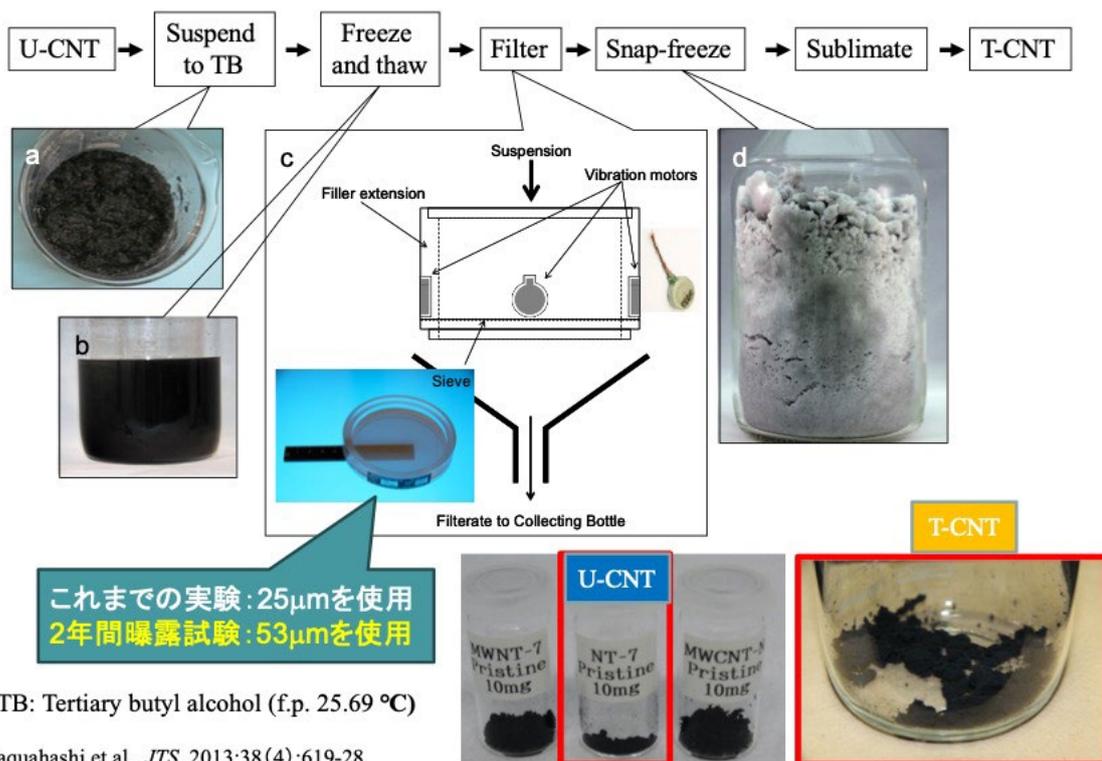


図1 Taquann 法の概要

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。

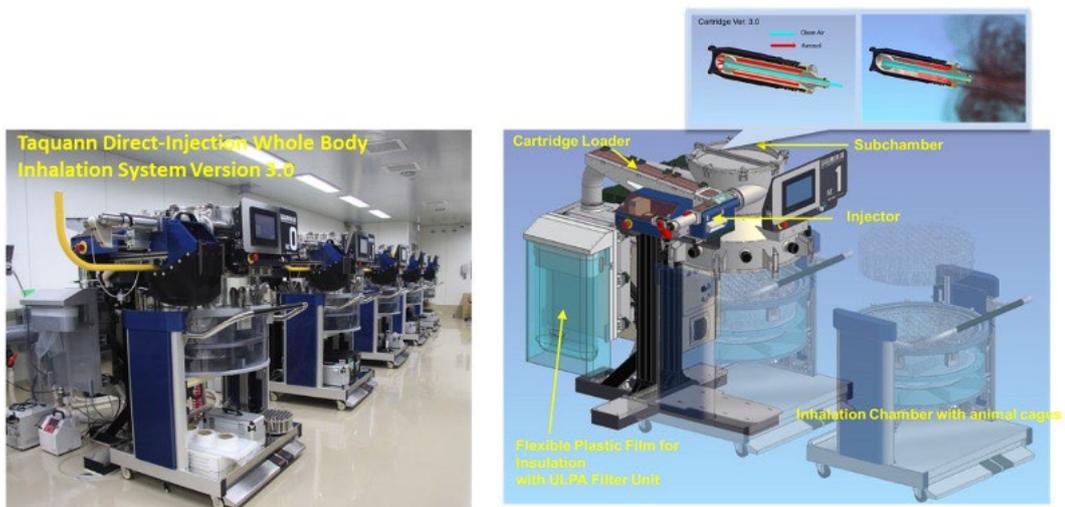


図2 Taquann 直噴全身吸入装置 Ver3.0

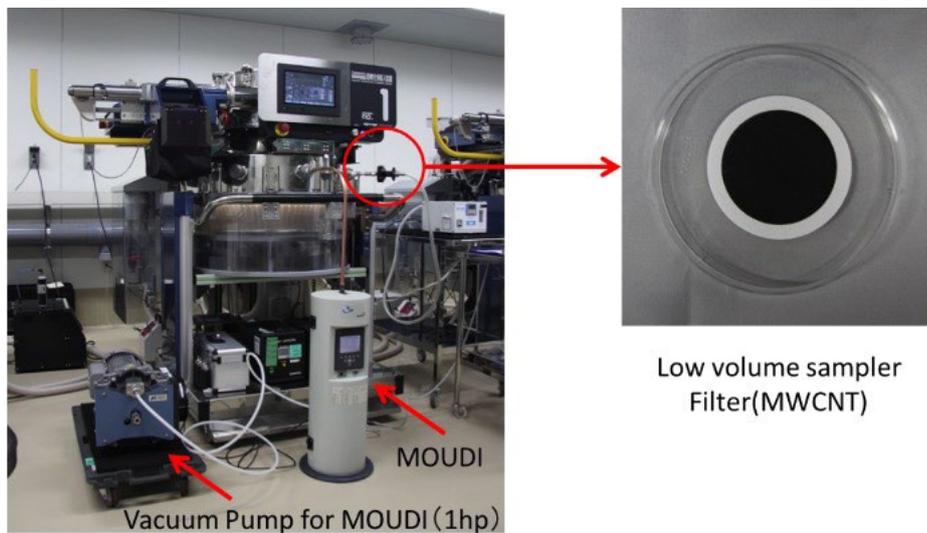
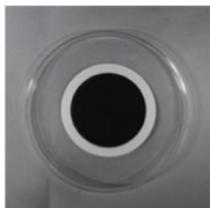


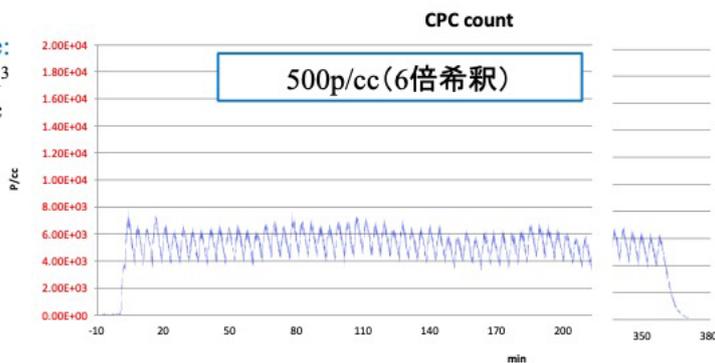
図3 エアロゾルモニタリングの概要

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。

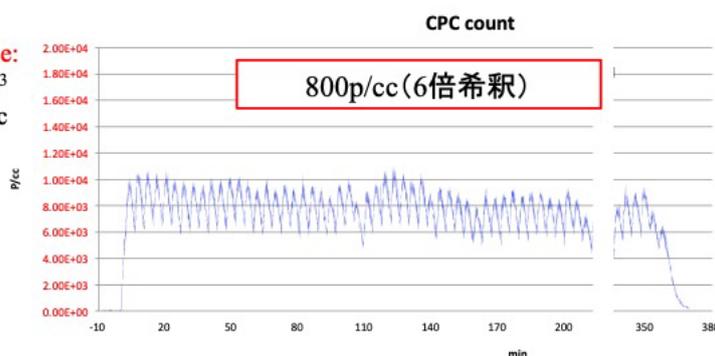


mg/m ³	A		B	
	Low	High	Low	High
1	2.6	4.9	2.7	5.1
2	2.5	4.4	2.9	5.0
3	2.8	5.1	2.6	4.3
4	2.6	5.2	2.9	5.1
5	2.9	5.0	2.7	5.1
6	2.9	4.6	2.7	5.0
7	2.6	4.4	2.6	4.6
8	2.7	4.6	2.7	4.5
9	2.7	4.7	2.6	4.5
10	2.6	4.2	2.6	4.7
11	2.6	4.1	2.7	5.2
12	2.6	3.8	2.5	4.6
13	2.7	4.5	2.8	4.4
Ave	2.7	4.8	2.7	4.8
SD	0.1	0.4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

Low dose:
 2.7 mg/m³
 3000 p/cc

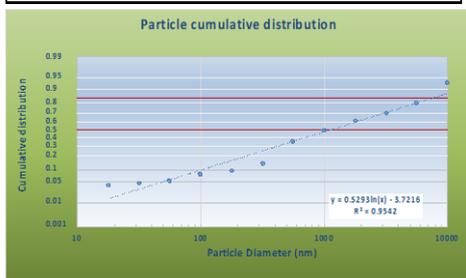


High dose:
 4.7 mg/m³
 4800 p/cc



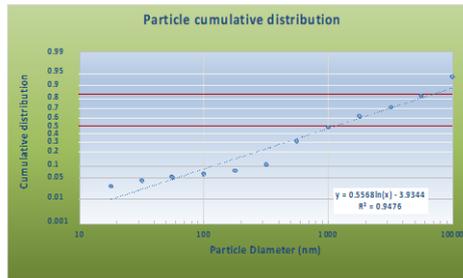
B-12 Low

Total Mass (ug)	Concentration (ug/m ³)	MMAD (nm)	Deviation (σg)
993	2494	1128	6.613



B-12 High

Total Mass (ug)	Concentration (ug/m ³)	MMAD (nm)	Deviation (σg)
1426	4556	1193	6.023



MOUDI	MMAD	A-1	B-2	A-3	B-4	A-5	B-6	A-7	B-8	A-9	B-10	A-11	B-12	平均
Low	nm	-	-	1106	1125	-	-	-	1082	-	1341	1193	1132	1128
	σg	-	-	5.7	5.1	-	-	-	5.1	-	5.4	6.6	6.6	5.8
High	nm	-	1120	1287	1388	-	1367	-	-	1401	1573	-	1172	1193
	σg	-	5.3	4.5	4.9	-	4.7	-	-	5	5.1	-	6	5.3

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。MMADは、低濃度群において1,128 nm (σg: 5.8)、高濃度群において1,193 nm (σg: 5.3)となり、同様の物理化学的特性を示した。

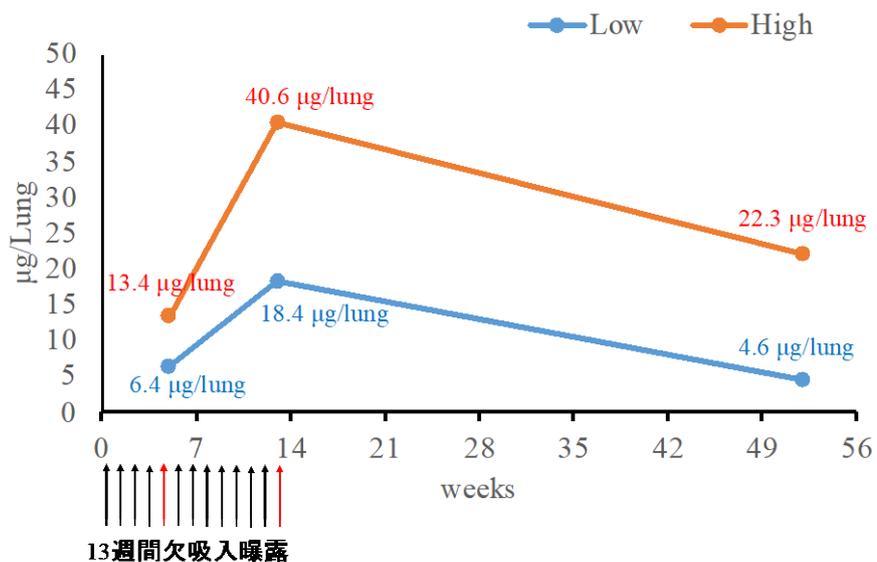


図5 肺負荷量(単回吸入曝露試験の結果)

間欠吸入曝露試験 5 回目(5th)と 13 回目(13th)、1 年(52 週目)経過時の肺負荷量を測定した結果、5th: 低用量群 6.4 µg/Lung、高用量群 13.4 µg/Lung、13th: 低用量群 18.4 µg/Lung、高用量群 40.6 µg/Lung、曝露 1 年経過時: 低用量群 4.6 µg/Lung、高用量群 22.3 µg/Lung の値を示した。単回吸入曝露の時に得られた NT-7 肺負荷量の半減期はおよそ 1 週間であったが、13 回の間欠吸入曝露直後の肺負荷量がおおよそ半減にするのに 39 週間を要した。

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	化学物質評価機構	安全性評価技術研究所 顧問
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:横田 理	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、40、40、40 および 20 匹とした。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、試験開始から 104 週目まで経過観察した。

最終投与の翌日に、サテライト動物を剖検し、肺内の MWCNT の量を測定した結果、L 群、M 群、H 群および EH 群の負荷量はそれぞれ 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。試験開始 73 週時点以降、H 群・EH 群で最終解剖までに胸膜中皮腫と疑われる病変により、9 例・11 例を剖検した。最終解剖の標本は、組織検索の途中だが、肉眼観察結果をもとにすると、肺の腫瘍を認めた例数とその頻度 (%) は、C、L、M、H および EH 群において、それぞれ、2 例 (5.2%)、4 例 (10.5%)、13 例 (33.3%)、5 例 (13.1%) および 3 例 (15.0%) であった。一方、胸膜中皮腫は、C 群・L 群では観察されず、M 群、H 群および EH 群の例数と頻度はそれぞれ 1 例 (2.6%)、11 例 (28.9%) および 12 例 (60.0%) であった。

本研究では、4 用量を設定した NT-7 の 13 週間の反復気管内投与による 2 年試験を実施した結果、肺腫瘍と胸膜中皮腫が発生し、総負荷量に対する用量反応性を把握することができた。肺腫瘍発生の用量反応性は、基本的には Kasai らの吸入試験と類似する

ものと考えられた。従って、ITによる2年間試験も、総肺負荷量（AUC面積）を合わせることで、2年間の慢性吸入試験をある程度代替し得ること、すなわち、リスク評価に活用し得ることが示された。ただし、高用量の気管内投与は中皮腫による早期死亡が多発させ、腫瘍の評価困難になることが再確認された。

A. 研究目的

欧州では、近年ナノマテリアルのREACH登録制度が開始し、*in vitro*を中心とした新しい評価法も整備されつつある。しかし、ナノマテリアルの最も重要なエンドポイントと考えられる慢性毒性を*in vitro*試験で捕捉することは困難である。例えば、CNT等のナノマテリアルの発癌性が指摘されてきたが、その機序は、長期体内蓄積によるものと推測され、Ames試験など現状の*in vitro*遺伝毒性試験は有効ではない。このことから、ナノマテリアルの慢性吸入毒性については、動物を用いた評価手法の検討が依然として重要である。過去には、日本バイオアッセイセンターの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。¹⁾しかし、吸入試験の実施には特殊な設備とコストが必要である。また発がん性試験を実施できる施設は世界的にもごく限られており、2年間の連続吸入による発がん試験に代わって慢性の呼吸器影響を評価できる評価手法が求められている。

ラット気管内投与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回の気管内噴霧投与 Intra-Tracheal Intra-Plumonary Spray (TIPS)後に2年間観察する実験で、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、Numanoらは、TIPS法によりMWNT-7（三井製）を12週間で合計12回投与した結果、5%の動物に肺腫

瘍が、95%の動物に胸膜中皮腫が発生した。³⁾さらに、我々が実施したMWNT-7（三井製）を4週間に1度、2年間の間欠気管内投与した試験では、上記TIPS試験の結果より頻度が低いものの、やはり胸膜中皮腫が発生し、胸膜中皮腫は気管内投与試験に特有の結果であることが示された（Hojoら）⁴⁾。これは、総曝露量が吸入と同程度だとしても、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³⁾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、我々の間欠投与試験では肺腫瘍が発生したものの⁴⁾、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高い用量域からNOAELになることが想定される低い用量域まで投与群を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。

最終年度にあたる今年度は、途中死亡例および 2 年後の最終解剖の結果を報告する。

B. 研究方法

i)MWCNT の調製

保土ヶ谷製の MWNT-7 (NT-7) を Taquann 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 23.0 \pm 0.2°C、湿度 49.7 \pm 6%、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。

1 週間に 1 度、13 回投与後に 2 年間観察飼育した。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、L・M・H 群は 40 匹、EH 群は 20 匹とした。ただし、投与群については、13 週時点・最終解剖時点での肺負荷量の測定のため、別途、サテライト動物を用意し

た。

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、L 群、M 群、H 群および EH 群の各群について、0.0175、0.07、0.28 および 0.42 mg/kg 体重と設定した。

全動物について、1 週間から 4 週間に一度以上の頻度で、体重を測定した。

iii)剖検・採材

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% 中性緩衝ホルマリン溶液にて固定し、肺負荷量の測定に供した。

試験開始 104 週後に最終解剖を実施した。全動物について、イソフルラン麻酔下で全採血し、全臓器を摘出し、ホルマリン溶液で固定した。肺は、30cm 水柱圧で気管からホルマリン溶液を注入することにより固定した。

また、最終解剖以前に、人道的エンドポイントに達した動物および死亡動物についても同様に剖検した。最終解剖では、各群 8 匹について、右葉にリン酸緩衝液 (PBS) を注入して BALF を回収した。ただし、EH 群の生存率が著しく低かったため、EH 群を除く 4 群に関して解析した。BALF は遠心分離し、沈殿は白血球数の計数に、上清は LDH および総タンパク質量の測定に用いた。

また、MWCNT 投与群のサテライト動物 (4 ないし 5 匹) の肺は、全葉をホルマリン溶液で固定後、肺負荷量の測定の

iv)病理組織学的解析

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

v)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[*gh*]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[*gh*]P を脱着させ、HPLC の分析に供した。

vi)気管支肺胞洗浄液 (BALF) の分析

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

BALF の上清の総タンパク質量は、2-D Quant Kit (Cytiva) により、乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性は LDH Cytotoxicity Detection kit (タカラバイオ) により、測定した。

vii)統計学的解析

体重、臓器重量、BALF 中の白血球数、総タンパク質量および LDH 活性の結果については Dunnett の多重比較検定を用いた。生存率については、Kaplan-Meier 法により生存期間を解析し、log-rank test により検定を行った。

<倫理面への配慮>

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

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 1・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 1)。

実験開始後 73 週時点で、EH 群で初めて胸膜中皮腫が観察された。その後、H 群および EH 群で最終解剖までに胸膜中皮腫と疑われる病変により、9 および 11 例を剖検した。

Kaplan-Meier による生存曲線の通り (図 2)、H 群・EH 群は C 群に対し有意な生存率の低下が認められた。

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。また最終解剖時点では H 群のみで C 群に対する有意な減少を認めた (図 3)。

事故等の途中死亡の動物を除外し、最終的に発がん性の評価に供する動物の有効数は、C 群 38 匹、L 群 38 匹、M 群 39 匹、H 群 38 匹および EH 群 20 匹であった。最終解剖

の標本については、現在、組織検索の途中だが、肉眼観察結果をもとにすると、肺の腫瘍を認めた例数とその頻度 (%) は、C、L、M、HおよびEH群において、それぞれ、2例 (5.2%)、4例 (10.5%)、13例 (33.3%)、5例 (13.1%) および3例 (15.0%) であった。一方、胸膜中皮腫は、C群・L群では観察されず、M群、H群およびEH群の例数と頻度はそれぞれ1例 (2.6%)、11例 (28.9%) および12例 (60.0%) であった。

観察済みの個体の増殖性病変の組織像のいくつかを図4に示す。EH群で認められた直径約7 mmのドーム状の腫瘍は腺がんと診断され (図4A)、乳頭状の増殖を示した (図4B)。免疫染色の結果、大半の腫瘍細胞はTTF1陽性であった (図4C)。胸膜中皮腫は2年間間欠投与の時と同様に、縦隔胸膜、特に Retrocardiac pleural folds (RPF) 周辺から発生した (図4D)。また、組織学的には、上皮性 (epithelioid)、肉腫性 (sarcomatoid) および二相性 (biphasic; 図4E) の3種の組織型が確認されており、肉腫性の中には一部骨化する例もあった (図4F)。

最終解剖におけるBALF内の白血球の構成は大半がマクロファージであり、投与群の動物でも顆粒球やリンパ球の増加は認められなかった。また、BALF上清の総タンパク質量は、肺泡領域の血管透過性の指標として、BALF上清のLDH活性は、呼吸器上皮の細胞毒性の指標として、それぞれ測定したが、投与に関連した変化は認められなかった。

D. 考察

Taquann処理NT-7を、13週間のIT投与

による反復曝露した結果、ラットにおいて肺腫瘍と胸膜中皮腫が誘発された。肺腫瘍の観察頻度は、L群・M群に関しては用量依存性に増加した。M群は、13週後の肺負荷量の値 (2年間のピーク値) は191 $\mu\text{g}/\text{rat}$ で、腫瘍の観察頻度は33.3%であった。この結果は、Kasaiらの吸入試験の0.2 mg/m^3 群の結果：2年後の肺負荷量152 $\mu\text{g}/\text{lung}$ ；肺腫瘍の発現頻度26.0%に、概ね一致するものであった。吸入試験の結果では、2 mg/m^3 群 (負荷量1369 $\mu\text{g}/\text{lung}$) においてさらに発現頻度が高くなったが (33.3%)、本研究では、H群、EH群では頻度が低下した。これは、試験前からの予想通り、中皮腫により早期死亡が多く発生したため、発生時期の遅い肺腫瘍の頻度が見かけ上、低下したものである。仮に、中皮腫の途中死亡個体を除いて肺腫瘍の観察頻度を算出すると、H群・EH群の頻度は、16.1%・33.3%となる。肺負荷量を横軸に、肺腫瘍の頻度を縦軸にとった用量反応曲線は、大きな傾きで立ち上がり、30%前後の頻度でプラトーになるKasaiらの吸入試験の結果の形状とよく似たものになる。

本研究において、2年間の肺負荷量の Area Under the Curve (AUC) の形状は、Kasaiらの週5日・2年間の曝露実験のように右肩上がりではなく、13週をピークに減少する台形である。にも関わらず、吸入試験と同程度の肺発がんの反応性が認められたことから、CNTの肺発がんの評価には曝露方法や曝露期間の違いは大きな影響は与えず、総負荷量およびAUC面積が重要であったことが示唆される。

一方、中皮腫の発生頻度は、用量反応性に、直線的に増加することがわかった。H

群・EH群における高頻度の誘発（それぞれ28.9%・60.0%）は、上記のとおり、肺腫瘍の評価を妨げることになった。過去のIT投与による2年間の反復試験の結果を踏まえると、投与プロトコルの違いに関わらず、MWNT-7の反復投与は1000 µg/ratの総投与量を超える場合、肺腫瘍の評価が困難であることが推察される。しかし、今回の中皮腫の発現頻度は、既報を踏まえた予想よりやや低く、早期死亡の発生時期もやや後半にシフトした。Numanoらの試験（総投与量1500 µg/ratの1用量で実施）EH群の投与プロトコルはとほぼ同一であったが、47週から最終解剖直前までの期間に95%の動物が中皮腫により死亡していた。また、Satoらの、3用量を設定した2年間試験でも、総投与量200 µg程度の中用量群・1000 µg程度の高用量群で、発現頻度は、60.0%、94.9%であった⁸⁾。これら2つの既報との差異は、本研究で用いた検体が、Numanoら、Satoらが用いた三井製のMWNT-7ではなく保土ヶ谷製のNT-7であったことが理由かもしれない。MWNT-7と比較して、原末の凝集体の形状が異なり、平均長が短いこと（横田）、DLSによる二次粒子径のサイズがやや小さいこと（北條・1年目報告）、*in vitro*でのマクロファージに対する毒性が弱いこと（石丸）等が本研究班で示されている。

なお、Kasaiらの吸入試験や、2年間の間欠反復投与の結果とは異なり、最終解剖のBALFの解析で、毒性影響は観察されなかった。これは、反復投与終了後（13週以降）、2年間の飼育の間に、気管支および肺胞に受けた急性的な傷害は回復したためと考えられる。また、このことは、肺がんや中

皮腫の誘発には、実験期間の後半に加えられた急性的な作用ではなく、実験期間の初期に組織に蓄積したMWCNTが与える低レベルかつ持続的な作用が重要であったことを示唆している。

E. 結論

本研究では、保土ヶ谷製のMWNT-7（NT-7）を用い、4用量を設定した13週間のラット反復気管内投与を実施した結果、肺腫瘍と胸膜中皮腫が発生し、総負荷量に対する用量反応性を把握することができた。肺腫瘍発生用量反応性は、基本的にはKasaiら¹⁾の2年間の吸入試験と類似するものと考えられた。従って、ITによる2年間試験も、総肺負荷量（AUC面積）をそろえることで、2年間の慢性吸入試験をある程度代替し得ること、すなわち、リスク評価に活用し得ることが示された。

ただし、総投与量1000 µg/rat以上の高用量の気管内投与は中皮腫による早期死亡が多発させ、腫瘍の評価困難になることが再確認された。投与期間やCNTの種類により異なるものの、この総投与量を最高用量の目安に、3から4群程度の用量設定することが、肺腫瘍および胸膜中皮腫を正しく評価するために重要であると考えられる。

（謝辞）

本研究の遂行にあたり、技術的な助言をいただいた、沼野琢旬先生、大西誠先生、後藤裕子先生、また、技術的支援をいただいた、生嶋清美氏、湯澤勝廣氏、五十嵐海氏、宮尾佳伸氏、河合礼果氏、平松恭子氏、長澤明道氏、安藤弘氏、野村紗希子氏、籾岡恭子氏、雑賀絢氏、中村麻里氏、

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.
- 8) Difference in carcinogenicities of two different vapor grown carbon fibers with different physicochemical characteristics induced by intratracheal instillation in rats. Sato K, Fukui H, Hagiwara Y, Ogawa R, Nishioka A, Numano T, Sugiyama T, Kawabe M, Mera Y, Yoneda T. *Part Fibre Toxicol.* 2023 Sep 28;20(1):37.

G. 研究発表

(論文発表)

Hojo M, Maeno A, Sakamoto Y, Yamamoto Y, Taquahashi Y, Hirose A, Suzuki J, Inomata A, Nakae D: Time-course of transcriptomic change in the lungs of F344 rats repeatedly exposed to a multiwalled carbon nanotube in a 2-year test. *Nanomaterials (Basel)*. 2023; 13(14):2105.

Miyauchi A, Akashi T, Yokota S, Taquahashi Y, Hirose A, Hojo M, Yoshida H, Kurokawa M, Watanabe W: Effects of inhalation of multi-walled carbon nanotube (MWCNT) on respiratory syncytial virus (RSV) infection in mice. *J Toxicol Sci*. 2023; 48(7):411-420.

Shimizu M, Hojo M, Ikushima K, Yamamoto Y, Maeno A, Sakamoto Y, Ishimaru N, Taquahashi Y, Kanno J, Hirose A, Suzuki J, Inomata A, Nakae D: Continuous infiltration of small peritoneal macrophages in the mouse peritoneum through CCR2-dependent and -independent routes during fibrosis and mesothelioma development induced by a multiwalled carbon nanotube, MWNT-7. *J Toxicol Sci*. 2023;48(12):617-639.

北條 幹:カーボンナノチューブの発がん性. *Precision Medicine*, 2023年6巻4号, p.30-34

北條 幹, 坂本義光, 前野愛:最前線・ナノマテリアルの実際の危険性—ラット慢性試験によるカーボンナノチューブの発がん性評価. *ファルマシア*, 2023年59巻7号, p. 659-663

(学会発表)

Tsuda H, Ahmed O, Saleh D, Alexander

W, Alexander D, Numano T, Takase H, Naiki-Ito A, Hirose A, Kanno J, Yudasaka M, Yuge R, Tomono S, Wei M, Hojo M, Tsuruoka S:

Carcinogenicity risk assessment of various carbon nanotubes by intraTracheal Intra-Pulmonary Spray (TIPS) dosing followed by 2-year observation. 2023 Inhaled Particles and NanOEh conference, Manchester, UK (May 15-18, 2023).

Hirose A, Maeno A, Hojo M, Taquahashi Y, Yokota S, Sakamoto Y, Kanno J: Comparison of tumorigenesis of MWCNT by intratracheal instillations and inhalation. ASIATOX 10th Annual Meeting, Taipei, Taiwan, (July 17-20, 2023).

Hojo M, Shimizu M, Ikushima K, Maeno A, Sakamoto Y, Yamamoto Y, Taquahashi Y, Kanno J, Hirose A, Suzuki J, Inomata A, Nakae D: Phenotypic characterization of macrophages during peritoneal mesothelioma development induced by a multiwalled carbon nanotube in wildtype C57BL mice. *EUROTOX 2023*, Ljubljana, Slovenia (September 10-13, 2023).

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

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

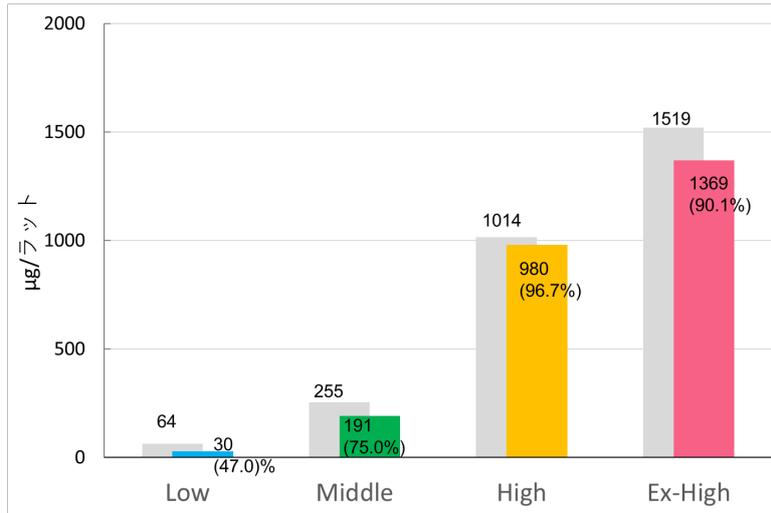


図1. 総投与量（灰色）と13週時点の肺負荷量測定結果

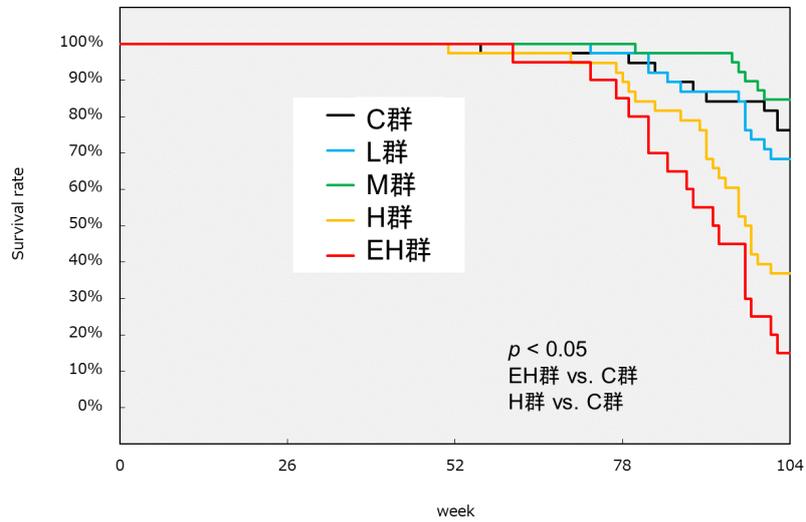


図2. Kaplan-Meier 法による生存曲線

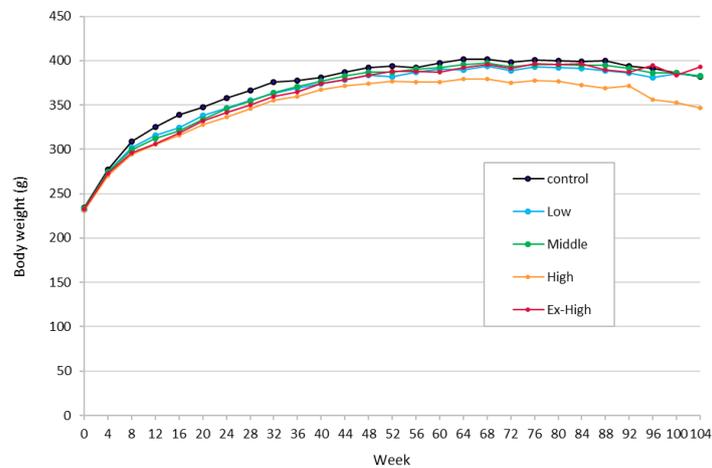


図3. 平均体重の推移

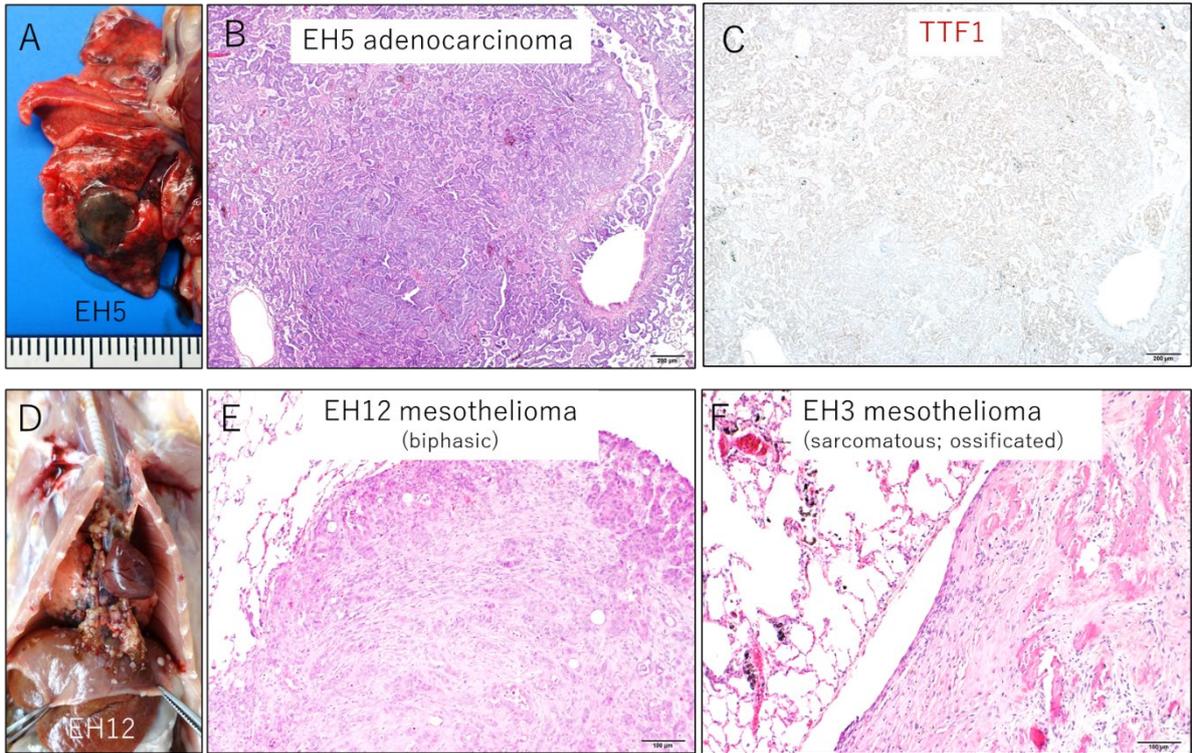


図4. 病理組織像 (増殖性病変)

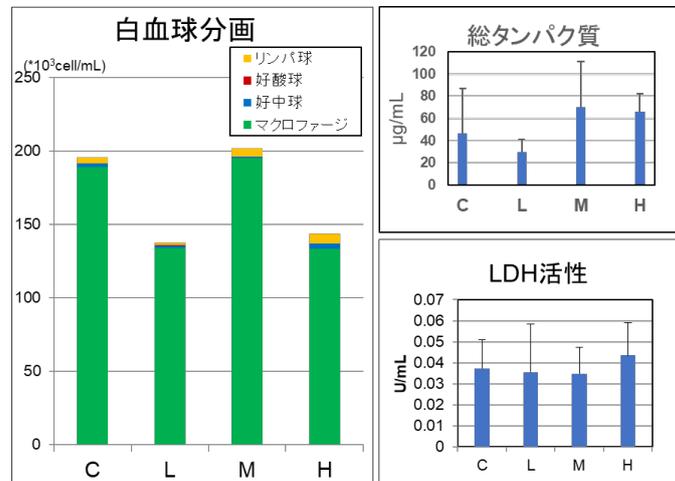


図5. BALF の解析
(エラーバー : SD)

令和5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（Kasai 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・細胞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。Kasai論文における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、Numanoの気管内投与（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の肺内蓄積量は吸入曝露においてTIPSより少ないことになり、それが肺と胸膜中皮における発がんの差異に関与した可能性があり、投与用量の差異（吸入曝露の方が少ない）が関与した可能性がある。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）を明らかにすることを目的とした。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、投与開始52週（5匹）、75週（5匹）、104週（15匹）後に解剖し、肺と胸膜中皮の炎症程度と腫瘍発生について解析する実験を実施中である。現在74週までに0.5mg/ラット群で4匹の死亡と肉眼所見として肺に腫瘍性病変が認められた。終了時には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。

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ことになる。吸入曝露試験の実施には高額の経費が要求されるために、低用量領域から発がん用量まで試験を実施することは全く困難であり、今後実施されることは恐ら

くあり得ない。しかし、実際には行政（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）に於けるリスク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）後に解剖し、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）X4

G 3：0.0008 mg/rat MWCNT-7
(0.0002mg/0.5mLx4)

G 4：0.004 mg/rat MWCNT-7
(0.001mg/0.5mLx4)

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

G 6：0.1 mg/rat MWCNT-7
(0.025mg/0.5mLx4)

G 7：0.5 mg/rat MWCNT-7
(0.125mg/0.5mLx4)

各群構成は25匹として、投与終了後52週（5匹）、72週（5匹）解剖例では腫瘍発生について詳細に検討中である。104週（15匹以上）後に解剖し、肺と胸膜中皮の炎症程度と腫瘍発生について解析する。104週における解剖時には胸郭洗浄液、血液、胸膜（中皮）、肺、肝、腎、脾、骨髄等を採取して炎症の程度、前がん病変を含

む腫瘍病変の発生について詳しく解析する。

C. 結果

52週に死亡した0.5mg/ラット群1匹に肺腫瘍と背側胸膜中皮腫（肉眼所見）が観察された。その後、74週までに無処置群で1匹、溶媒対照群で2匹、0.0008 mg/ラット群で1匹、0.004 mg/ラット群で1匹、0.5mg/ラット群3匹の死亡がみられた。そのうち0.5mg/ラット群では肉眼的肺腫瘍/中皮腫が見られたが、他の群では白血病または肺うっ血が認められた。

D. 考察

74週までに0.5mg/ラット群で4匹の死亡と肺の腫瘍性病変（肉眼所見）が認められたが、その他の群ではMWCNT-7曝露による腫瘍性病変を伴う死亡は認められていない。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

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ためにMWCNT-7を0.00008～0.5mg/ラットで投与する慢性観察研究を開始し、74週までに0.5mg/ラット群で4匹の死亡と肉眼所見として肺に腫瘍性病変が認められた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Sultana N., Fukamachi K., Jiegou Xu., Tsuda H., Suzui M mRNA expression profile of cytokines in rat primary alveolar macrophages treated with multiwalled carbon nanotube (MWCNT). Fundam.

Toxicol. Sci., Vol.10(1), 27-30 (2023)

Sultana N., Fukamachi K., Roy DC., Jiegou

Xu., Tsuda H., Suzui M mRNA expression
levels of CCL4, IL6, and CXCL2 in

multiwalled carbon nanotube induced lung
tumors in rats. Fundam. Toxicol. Sci., Vol.
10(4), 137-141 (2023)

2. 学会発表

Tsuda H. CARBON NANOTUBES,

INNOVATIVE MATERIALS OF THE

21TH CENTRY: CARCINOGENICITY

EVALUATION OF CARBON

NANOTUBES WITH DIFFERENT WALL

STRUCTURES The 51st International

Symposium of The Princess Takamatsu

Cancer Research Fund 東京 1 1 月

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5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。今回 3 週間にわたり NT-7 の吸入曝露を行った Prox1-GFP マウスの肺を透明化し、ライトシート顕微鏡を用いてリンパ管の構造を 3 次元で解析したところ、NT-7 の吸入曝露により、肺周縁部の微小リンパ管の増生などの変化が観察された。今後 NT-7 の吸入曝露を行った肺組織における遺伝子発現解析を進める予定である。

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 TGF- β 存在下で培養して EndoMT が誘導された EndoMT レポーター細胞から分画した部分的 EndoMT が誘導されている細胞の特異的マーカーとして CD40 を同定した。CD40 の発現を siRNA で低下させることで TGF- β による EndoMT の誘導が亢進されたことから、CD40 は部分的 EndoMT から完全 EndoMT への移行を抑制していることが示唆された。以上の結果から CD40 は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。

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。Taquan 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 3 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、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 は定法に従って行った。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)。さらにこれらの肺におけるリンパ管の構造をライトシート顕微鏡で観察したところ、NT-7 の吸入曝露によるリンパ管の構造の変化が 3 次元でより詳細に観察された (図 3)。

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 4A)。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、 α SMA の発現が上昇することが見出された。

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 CD40 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明らかとなった。

また、CD40 の発現を siRNA で低下させたところ、TGF- β による α SMA ならびに TGF- β ファミリーメンバーである Activin の発現上昇が亢進することが示された (図 4B)。

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、EndoMT レポーター細胞を用いた本実験系は、EndoMT 移行段階を検出・分取できる初の解析システムである。この実験系により、EndoMT は段階的に起こっていることが証明され、Partial EndoMT 特異的なマーカーとして同定された CD40 が Full EndoMT への移行を抑制することで EndoMT を制御していることが明らかとなった(図 4C)。

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 レポーター細胞によって同定した EndoMT 制御因子を標的とした治療薬を開発することでナノマテリアルの曝露に対する治療法の開発につなげたい。

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†, Kobayashi M†, Katsumata H, Tokizaki S, Anzai T, Ikeda Y, Alcaide D, Maeda K, Ishihara M, Tahara K, Kubota Y, Itoh F, Park J, Takahashi K, Matsunaga Y, Yoshimatsu Y, Inoue KA, Watabe T (†: contributed equally). CD40 is expressed in the subsets of endothelial cells undergoing partial EndoMT in tumor microenvironment. *Cancer Science*. 2024 115(2):490-506. doi: 10.1111/cas.16045. †: co-first author (equal contribution)

Tokisaki S, Inoue KA, Matsumoto T, Takahashi K, Kobayashi M, Ibi H, Uchida S, Iwabuchi S, Harada H, Hashimoto S, Miyazono K, Shirouzu M and Watabe T. Inhibition of TGF- β signals suppresses tumor formation by regulation of tumor microenvironment networks. *Cancer Science*. 2024 Jan;115(1):211-226. doi: 10.1111/cas.16006.

2. 学会発表

小林 美穂, 廣瀬 穂香, 中山 雅敬, 渡部 徹郎. 加齢に伴う微小血管密度の低下におけるストレス応答性の役割. 第 31 回日本血管生物医学会学術集会 (CVMW2023) 神戸 2023 年 12 月、口演 高橋和樹, 勝又寿枝, 小林美穂, 時崎詩織, 池田行徳, 前田健太郎, 井上カタジナアンナ, 松永行子, 吉松康裕, 渡部徹郎、TGF- β による内皮間葉移行(EndoMT)の段階的遷移を EndoMT レポーター内皮細胞は可視化した、第 31 回日本血管生物医学会学術集会 (CVMW2023)、2023 年 12 月、神戸、口演

小林 美穂, 藤原 花汐, 廣瀬 穂香, 鈴木 康弘, 小林 ゆめ, 中山 雅敬, 佐藤 靖史, 渡部 徹郎. α -チューブリンの脱チロシン化によるシグナル伝達調節がもたらす生理的役割. 第 46 回日本分子生物学会年会 神戸 2023 年 12 月、口演

Honoka Hirose, ○Miho Kobayashi, Masanori Nakayama, Tetsuro Watabe, Relationship

between aging-related reduction of microvessel density and endothelial stress tolerance、第 46 回日本分子生物学会年会、2023 年 12 月、神戸、ポスター
 小林美穂、高橋和樹、藤原花汐、吉岡祐亮、落谷孝広、井上カタジナアンナ、渡部徹郎、口腔がん細胞が放出する細胞外小胞を介した血管不安定化の分子機構、第 96 回日本生化学会大会、2023 年 11 月、福岡、口演

Tetsuro Watabe, Targeting tumor microenvironment networks for developing novel therapeutic strategies. FAOPS 2023 (The 10th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress), 2023.11.01, Daegu, 口演
 渡部徹郎、がん微小環境ネットワークを制御するシグナルを標的とした治療法の開発。第 64 回日本脈管学会学術総会、2023.10.26, 横浜、口演
 小林美穂、口腔がん細胞由来細胞外小胞による血管不安定化の分子機構、第 10 回日本細胞外小胞学会学術集会、2023 年 10 月、札幌、口演
 渡部徹郎、がんの進展における内皮間葉移行の役割。第 82 回日本癌学会学術総会、2023.09.22, 横浜、口演

Miho Kobayashi, Honoka Hirose, Masanori Nakayama, Tetsuro Watabe. Attenuation of the stress response is involved in the age-related reduction of microvascular density. Asia-Australia Vascular Biology Meeting 2023 (AAVBM2023), 2023.09, Korea, ポスター

Kazuki Takahashi, Miho Kobayashi, Hisae Katsumata, Yukinori Ikeda, Tatsuhiko Anzai, Katarzyna A. Podyma-Inoue, Daniel M Alcaide, Kentaro Maeda, Jihwan Park, Kunihiko Takahashi, Yukiko Matsunaga, Yasuhiro Yoshimatsu, Tetsuro Watabe. Endothelial-mesenchymal transition (EndoMT) reporter cells visualized multiple groups of cells during progression of TGF- β induced EndoMT. Asia-Australia Vascular

Biology Meeting 2023 (AAVBM 2023), 2023.09, Korea, 口演
 Tetsuro Watabe, Characterization of TGF- β -induced partial endothelial-mesenchymal transition (EndoMT) using EndoMT reporter cells. TGF β meeting 2023, 2023.08.17, Uppsala, 口演
 渡部徹郎、がん進展における血管恒常性破綻が果たす役割。日本血管生物医学会第 3 回血管研究会、東京、2023.07.30, 口演
 渡部徹郎、がん進展における血管恒常性破綻が果たす役割。第 3 回動的恒常性研究会、京都、2023.07.14, 口演
 渡部徹郎、脈管の恒常性維持とその破綻における TGF- β シグナルの役割。第 55 回日本動脈硬化学会総会、2023.07.09, 東京、口演
 渡部徹郎、健康寿命延伸におけるリンパ管制御の意義。第 23 回日本抗加齢医学会総会、2023.06.10, 東京、口演
 小林美穂、廣瀬穂香、小林ゆめ、渡部徹郎、微小管の翻訳後修飾と細胞内輸送のダイナミクス、第 75 回日本細胞生物学会大会、2023 年 6 月、奈良、ポスター
 小林美穂、廣瀬穂香、中山雅敬、渡部徹郎、加齢に伴う脈管減少の分子機構、第 47 回日本リンパ学会総会 2023 年 6 月、浜松、口演
 小林美穂、健康寿命延伸における血管と微小管との関係、第 8 回血管生物医学会若手研究会 2023 年 5 月、浜松、口演
 渡部徹郎、がん微小環境の制御による新規治療法の開発。第 31 回日本医学会総会 2023.04.23, 東京、口演

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

出願番号：特願 2023-205003

発明者：渡部 徹郎 高橋 和樹 小林 美穂 井上 カタジナアンナ

発明の名称：部分的内皮間葉移行マーカーとしての遺伝子の発現産物の使

用

なし

出願人：国立大学法人東京医科歯科
大学

3. その他
なし

出願日：2023年12月5日

2. 実用新案登録

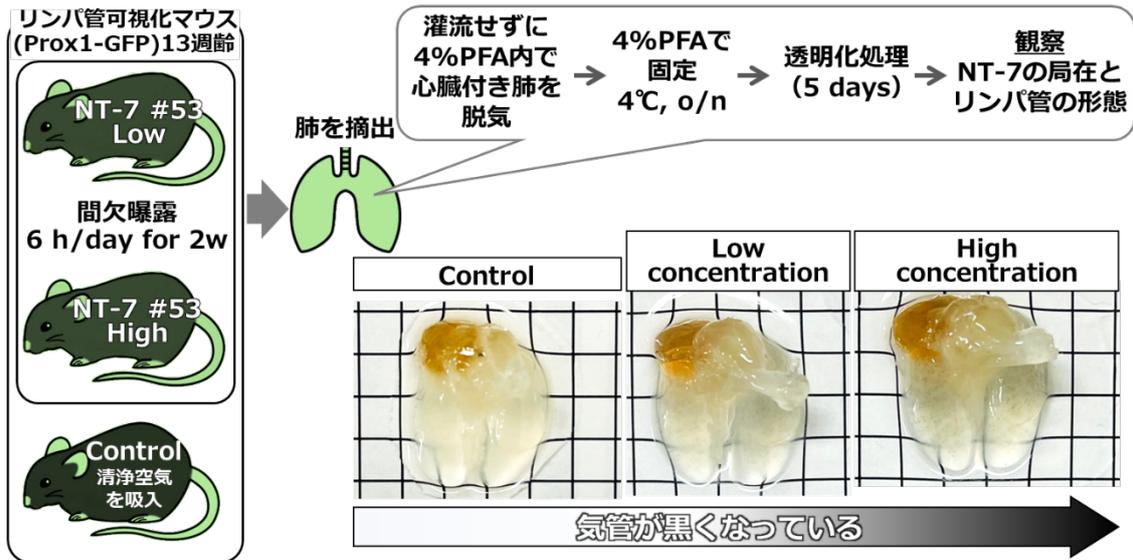


図1 ナノマテリアル吸入曝露した Prox1-GFP マウスの肺の透明化

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。

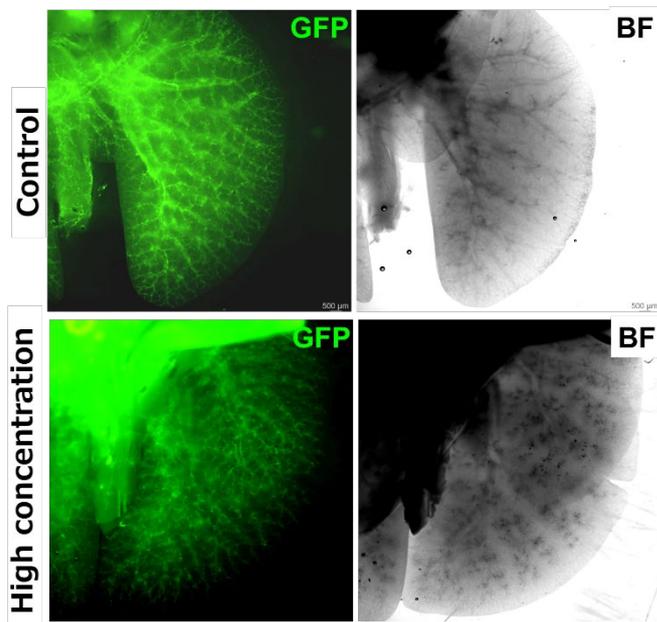


図2. ナノマテリアル吸入曝露した Prox1-GFP マウスの肺におけるリンパ管とナノマテリアルの観察

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。

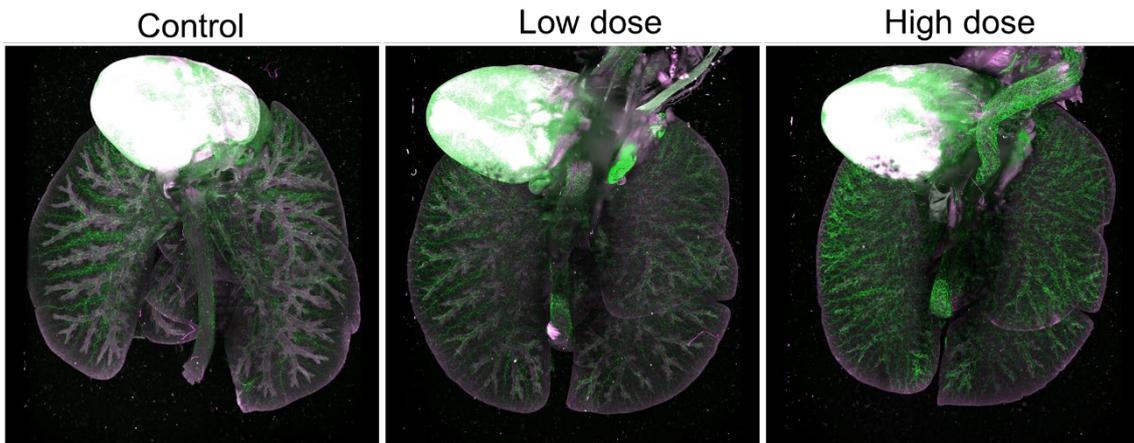


図3. ナノマテリアル吸入曝露した Prox1-GFP マウスの肺におけるリンパ管とナノマテリアルの観察

透明化した肺をライトシート顕微鏡で観察した。NT-7 を吸入曝露していない群 (Control) 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、低濃度 (Low dose) そして高濃度 (High dose) で曝露した群ではその構造が用量依存的に乱れていることが観察された。

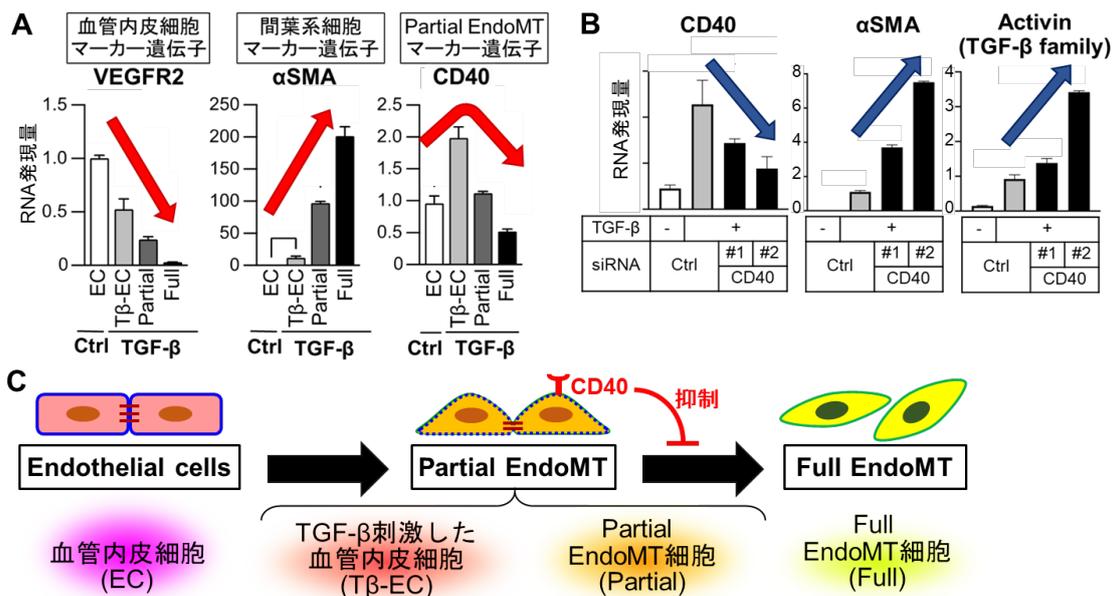


図 4. EndoMT レポーター細胞を用いた Partial EndoMT 特異マーカーの同定

(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 (Tβ-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。EndoMT の進展とともに段階的 VEGFR2 の発現が減少し、αSMA の発現が上昇することが見出された。Partial EndoMT の特異マーカーとして同定された因子の発現が Tβ-EC において最も高く、EndoMT の進行とともに低下することが明らかとなった。(B) CD40 の発現を siRNA で低下させたところ、TGF-β による αSMA ならびに TGF-β ファamilyメンバーである Activin の発現上昇が亢進することが示された。(C) EndoMT レポーター細胞を用いた本実験系は、EndoMT 移行段階を検出・分取できる初の解析システムである。この実験系により、EndoMT は段階的に起こっていることが証明され、Partial EndoMT 特異的なマーカーとして同定された CD40 が Full EndoMT への移行を抑制することで EndoMT を制御していることが明らかとなった。

令和5年度 厚生労働行政推進調査事業費補助金(化学物質リスク研究事業)
分担研究報告書

研究課題:

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

分担研究課題名: 間歇吸入曝露による慢性影響評価に関する病理学的研究

研究分担者: 菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所客員研究員
公益財団法人 日産厚生会 玉川病院 病理診断科 部長
研究協力者: 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 17 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広い分野の新材料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、生体における吸収性や蓄積性、表面活性の増強による生体影響の最大の焦点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は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位置を占めると考えられる。本研究では、この間歇型曝露手法の利点を活かして、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。初年度に OECD TG451 により実施された MWNT-7 (NT-7) の先行試験 (Particle Fibre Tox 2016, 13:53) との比較、および、本事業において並行して実施される気管内投与実験との比較を目的とした 2 年間の間歇吸入曝露実験 (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。2 年度目は、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 NT-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、Taquan 吸入装置による NT-7 の吸入実験を実施した。これらにより NT-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実施した。

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 17 年近くにわたり OECD や各国が各種研究を精力的に行ってきたにもかかわらず、未だに体系的な評価手法は見いだせない。我々は、これまでの研究において、慢性影響に関する知見を

積み上げ、二年間の連続吸入曝露との結果を比較可能な間歇型曝露手法の開発を行ってきた。本研究では、間歇型曝露手法をより効率的なものとするを目的とする。本分担研究では、OECD TG451により実施された MWNT-7(NT-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た気管内投与実験との比較を目的とした2年間の間歇吸入曝露実験の結果の解析結果をもとに、昨年度は、II型肺胞上皮の過形成初期の病変の局在、及び NT-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 NT-7 の吸入実験を実施した。本年度はこれらにより NT-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進めた。

B. 研究方法

光学顕微鏡及び、3次元蛍光顕微鏡による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(NT-7)をナノテクノロジービジネス推進協議会より入手した。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 の金属シープ(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

①実験1(実験コード NANO-BU): 吸入曝露実験の検体は 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3回行った。3回の曝露の平均濃度は、Low:2.7mg/m³、および High:4.7mg/m³であった。

②実験2(実験コード NANO-BX): 吸入曝露実験の検体は NT-7 を用いた。対照群(Ctrl 群、清浄空気のみ:10 頭)、低濃度曝露群(Low concentration 群:10 頭)、高濃度曝露群(High concentration 群:10 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。13回の曝露の平均濃度は、Low:2.5mg/m³、および High:4.4mg/m³であった。

3)吸入曝露実験装置

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(共同開発 柴田科学株式会社、特許 5899592、特許 7112685、特許 7111296、特開 2019-190914、特開 2019-190915)。

B-3. 解剖

肺組織のサンプリングは最終曝露後に行った。肺は透明化用に採取した。今年度も、昨年度に引き続き、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。

さらに、透明化した肺をパラフィン包埋し、光学顕微鏡用の10 μ m厚の連続切片を作成し、抗GFP抗体を用いたDAB発色免疫染色切片を作成し、ヘマトキシリンによる各染色を加え、組織切片上でのリンパ管内皮細胞の永久免疫染色標本作製し、3次元蛍光像との対比の検討を行った。

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NT-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、NT-7の凝集体は、終末細気管支周囲の領域に気管支に沿って規則的な模様を描くよう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NT-7の凝集体が局在し、V系列のリンパ管の周囲には凝集体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、NT-7の吸入により変化している可能性が示唆された(図1)。

抗GFP抗体を用いたDAB発色免疫染色切において、リンパ管が終末細気管支の壁外側、および、静脈に接して、そして、胸膜近傍まで分布する事を確認した。また、連続切片の画像情報をトレースすることで、3次元構築を再確認できた。ヘマトキシリン単染色においても、リンパ管、およびNT-7と、それらの周囲に位置する細胞の種類と同定が凡そ可能なことが示された。

今後、NT-7の沈着部位の細胞構成を確認する為に、連続パラフィン切片における複数の免疫染色を検討し、解析を進める予定である。その際に、現行の染色プロトコールにおいてはマクロファージの共染が問題となることが判明したことから、染色プロトコールの改良を進める予定である。また、細胞レベルの空間的遺伝子発現解析(Xenium, 10x Genomics)の導入も考慮された。

D. 考察

2年間の間歇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NT-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NT-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 NT-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)のリンパ管周囲に限局して大型の NT-7 の凝集体が局在すること、末梢毛細リンパ管の形状が、NT-7 の吸入により変化している可能性が示唆された。他方、大型の NT-7 の凝集体が局在しない肺細静脈系列(V 系列)の近傍の肺胞には、NT-7 を貪食した肺胞マクロファージが孤在性に認められた。BA 系列領域における組織反応と V 系列領域近傍の肺胞領域における組織反応には、差異があることが確認された。両領域における、マクロファージとリンパ管、特に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作成した連続パラフィン切片において詳細に進める予定である。遺伝子発現解析には、細胞レベルの空間的遺伝子発現解析 (Xenium) の導入も考慮される。

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、Taquan 吸入装置による NT-7 の吸入実験により NT-7 の終末細気管支領域(BA 系列)への集積と、肺細静脈系列(V 系列)の近傍の肺胞マクロファージへの集積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

Motomu Shimizu, Motoki Hojo, Kiyomi Ikushima, Yukio Yamamoto, Ai Maeno, Yoshimitsu Sakamoto, Naozumi Ishimaru, Yuhji Taquahashi, Jun Kanno, Akihiko Hirose, Jin Suzuki, Akiko Inomata, Dai Nakae. Continuous infiltration of small peritoneal macrophages in the mouse peritoneum through CCR2-dependent and -independent routes during fibrosis and mesothelioma development induced by a multiwalled carbon nanotube, MWNT-7. J Toxicol Sci. 2023;48(12):617-639. doi: 10.2131/jts.48.617

Jun Kanno, Yuhji Taquahashi, Naozumi Ishimaru, Satoshi Kitajima. 159 Keynote: An Overview of Carbon

Nanotube Carcinogenesis from Mouse Inhalation Data. *Annals of Work Exposures and Health*, Volume 67, Issue Supplement_1, May 2023, Pages i40–i41, <https://doi.org/10.1093/annweh/wxac087.097>.

2. 学会発表

Jun Kanno, Yuhji Taquahashi, Naozumi Ishimaru, Miho Kobayashi, Tetsuro Watabe, and Satoshi Kitajima. Basic lung responses to multiwall carbon nanotubes monitored in mouse whole body inhalation studies. Symposium: Nanosafety and Nanotoxicology. ASIATOX-X, (2023.7.18), Taipei, Taiwan, Oral.

Hojo M, Shimizu M, Ikushima K, Maeno A, Sakamoto Y, Yamamoto Y, Taquahashi Y, Kanno J, Hirose A, Suzuki J, Inomata A, Nakae D: Phenotypic characterization of macrophages during peritoneal mesothelioma development induced by a multiwalled carbon nanotube in wildtype C57BL mice. EUROTOX 2023, Ljubljana, Slovenia (Sep 10-13, 2023).

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、GFP 蛍光像に NT-7 の2値化強調像を重ねたものを示す。系列(BA)に黒色粒状のNT-7の局在が確認される(黒色)。NT-7の大型の凝集体のうち、2本のGFP陽性線に挟まれたものは、気管支内の凝集体であり、GFP陽性線の外にあるものが、終末細気管支から肺胞洞付近の凝集体である。

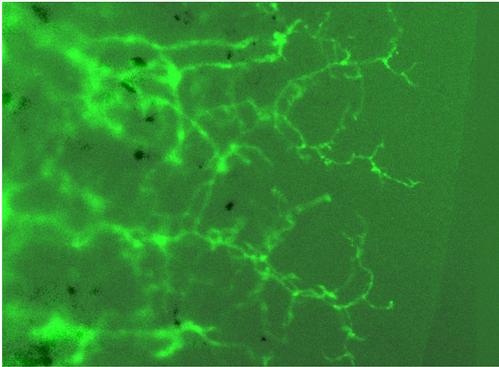
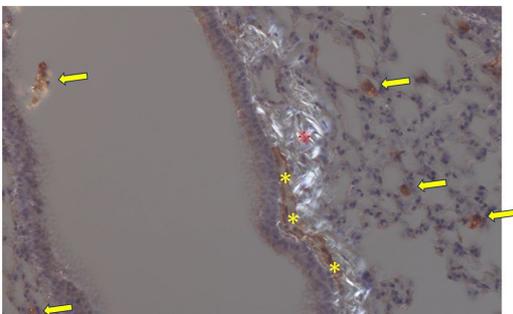


図2:透明化した肺をパラフィン包埋し、DAB 発色抗 GFP 抗体免疫染色により、リンパ管の局在を示した肺細静脈系列(V)の領域の顕微鏡像。黄色*が静脈に伴行するリンパ管を示す。偏光により NT-7 を発光させており、黄色矢印は、NT-7 を貪食した肺胞マクロファージ(DAB 発色あり)を示す。肺細静脈系列(V)の領域には NT-7 の大型の凝集体は認められないが、NT-7 を貪食した肺胞マクロファージが確認される。赤※印の部分の白色偏光は静脈壁の平滑筋及び線維成分による。



令和5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、新たなカーボンナノチューブであるNT-7の単回曝露後12ヶ月での解析を実施した。NT-7の単回長期曝露でのBALF細胞中の肺胞マクロファージ数は増加し、M1およびM2のマクロファージの分化マーカーの発現は低下し、身分化マクロファージ・単球が増加していた。BALF細胞および肺組織における*Mmp12* mRNA発現はNT-7の長期曝露によって増加した。今年度の実験の結果から、NT-7の長期曝露によって肺胞マクロファージの分化異常が生じる可能性が示され、従来検討されてきたMWCNT-7の長期曝露との類似性が示された。骨髄由来マクロファージを用いて*in vitro*でのNT-7とMWCNT-7の反応性に違いが見られたこと、前年度のNT-7の短期曝露実験の結果を考慮すると、両者のナノマテリアルで初期の反応性に違いがあるものと考えられる。

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。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、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。

今年度は昨年度に実施したカーボンナノチューブNT-7の短期暴露に引き続いて暴露後12ヶ月での長期暴露による肺免疫の変化について検討を加えた。さらに、*in vitro*でのNT-7およびMWCNT-7の比較検討を行った。

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 6 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 12 ヶ月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

雄マウス(C57BL/6、7 週齢)の大腿骨より骨髓細胞を採取し、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。マウス骨髓由来マクロファージ (Mouse bone marrow-derived macrophage: MBDM) への Taquann 処理 MWCNT-7 (T-CNT: 0~125 ng/ml)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'-TGGTATTCAAGGAGATGCACATTT-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。

<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 長期暴露実験

12 週齢雄 B6 マウスに NT-7 を単回吸入暴露した後、12 ヶ月にてサンプルを採取した(図 1)。BALF 細胞中の F4/80⁺肺胞マクロファージの割合は対象群に比較して高濃度群で優位に上昇していた(図 2A, B)。M1 および M2 マクロファージへの分化マーカー(CD192, CD206, CD54, CD163)についてフローサイトメーターにて検討すると、CD192、CD206、CD163 分子の表面発現は NT-7 の暴露によって低下することがわかった(図 3 ~ 6)。CD54 の発現は優位な変化は認められなかった(図 7)。

頸部リンパ節ならびに脾臓におけるマクロファージの割合、細胞数に関して、暴露による変化は認められなかった(図 8)。さらに、M1/M2 マーカーの発現に関しても NT-7 の長期暴露で変化は観察されなかった(図 9、10)。

BALF 細胞における *Icam1* (CD54)、*Timd4*(*Tim4*) および *Mmp12* mRNA 発現を定量 RT-PCR にて検討すると、*Icam1* ならびに *Tim4* mRNA 発現に関しては長期暴露による変化は認められなかったが、*Mmp12* mRNA 発現は NT-7 の暴露濃度依

存的に有意に上昇することが明らかになった(図 1 1)。

肺組織における *Mmp12* ならびに *Adgre1* (*F4/80*) mRNA 発現は NT-7 の長期暴露で有意に上昇していたが、*CD54* mRNA に関しては変化が認められなかった(図 1 2)。

脾臓における CD4⁺T 細胞、CD8⁺T 細胞、CD19⁺B 細胞の割合、細胞数に関して、NT-7 の長期暴露による変化は認められなかった(図 1 3)。頸部リンパ節における T 細胞分画、B 細胞の割合および細胞数に関しても NT-7 暴露による変化は観察されなかった(図 1 4)。さらに、脾臓ならびの頸部リンパ節での CD4⁺細胞ならびに CD8⁺T 細胞の活性化状態 (effector marker: CD44^{high}CD62L⁻)を検討すると、NT-7 の長期暴露による変化は認められなかった(図 1 5)。

マウス骨髄由来マクロファージを用いた実験系

マウス骨髄由来マクロファージ (MBDM) を用いて T-CNT ならびに NT-7 を添加刺激し、*Mmp12*、*Icam1*、*Tim4* mRNA 発現を定量 RT-PCR にて検討すると、*Mmp12* mRNA 発現は T-CNT にて有意に上昇するが、NT-7 の添加では変化が認められなかった(図 1 6)。また、*Icam1* ならびに *Tim4* mRNA 発現は T-CNT の刺激で低下する一方で、NT-7 の添加では変化が確認されなかった(図 1 6)。

D. 考察

R5年度の研究では、NT-7の単回吸入長期暴露によって肺胞マクロファージの割合ならびに細胞数は有意に増加しており、M1/M2 への分化に至らない未分化なマクロ

ファージあるいは単球の分画の増加が認められた。R4 年度までに NT-7 吸入暴露後の肺胞マクロファージは減少し、経時的 28 日までに回復することが判明していた。この後 12 ヶ月まで漸増していたものと考えられる。従来用いられた MWCNT-7 の長期暴露においても未分化分画のマクロファージ・単球が増加していた点は共通の現象である。

NT-7 の長期暴露での肺組織および BALF 細胞における指標マーカーとして、CD54、Tim4 あるいは MMP12 を検討したところ、*Mmp12* mRNA の濃度依存的な上昇が確認された。これまでに、肺胞マクロファージにおけるカーボンナノチューブの反応として MMP-12 が注目されてきたが、NT-7 の長期暴露においても MMP-12 が有用な毒性マーカーになりうる可能性が高い。一方で、*in vitro* の実験系では NT-7 の反応性と T-CNT の反応性が異なっていた。さらに、NT-7 の短期暴露実では肺胞マクロファージの M2 への分化が亢進している点と T-CNT の短期暴露では M1 への分化にシフトしている点から両者のナノマテリアルに対する反応性の違いがある可能が考えられる。

同種の炭素からなるカーボンナノチューブであるが、製造過程、濾過状態、マテリアル長など性状が異なっているものと推測される。性状の異なるカーボンナノチューブに対するマクロファージの反応性の違いはナノマテリアルの大きさ、分散性などで大きく異なる可能性が考えられる。ナノマテリアルの毒性評価指標として最終的には *in vivo* の実験系が極めて有用であるが、*in vitro* での簡便性のある実験系も併用しながら検討を進める必要がある。

E. 結論

- NT-7 吸入長期暴露後の BALF 中の肺胞マクロファージは増加した。
- NT-7 吸入長期暴露によって、肺胞マクロファージは未分化な分画が増加した。
- NT-7 吸入長期暴露によって、肺組織および BALF 細胞における *Mmp12* mRNA 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. Tawara H, Tsunematsu T, Kitajima S, Nagao R, Matsuzawa S, Otsuka K, Ushio A, Ishimaru N. The non-canonical function of borealin, a component of chromosome passenger complex, promotes glycolysis via stabilization of survivin in squamous cell carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 706:149741, 2024.
2. Shimizu M, Hojo M, Ikushima K, Yamamoto Y, Maeno A, Sakamoto Y, Ishimaru N, Taquahashi Y, Kanno J, Hirose A, Suzuki J, Inomata A, Nakae D. Continuous infiltration of small peritoneal macrophages in the mouse peritoneum through CCR2-dependent and -independent routes during fibrosis and mesothelioma development induced by a multiwalled carbon nanotube, MWNT-7. *J Toxicol Sci*. 12:617-639, 2023.
3. Jin S, Tsunematsu T, Horiguchi T, Mouri Y, Shao W, Miyoshi K, Mizusawa N, Hagita H, Sarubo M, Yoshida K, Yoshida K, Fujiwara N, Kitajima S, Ozaki K, Qi G, Ishimaru N, Kudo Y. Involvement of the PTUB1-YAP1 axis in driving

- malignant behaviors in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Med.* 12:22156-22169, 2023.
4. Sugimoto A, Iwata K, Kurogoshi R, Tanaka M, Nakashima Y, Yamakawa Y, Oishi A, Yoshizaki K, Fukumoto S, Yamamoto A, Ishimaru N, Iwamoto T. C-terminus of PIRZO1 governs Ca²⁺ influx and intracellular ERK1/2 signaling pathway in mechanotransduction. *Biochem Biophys Res Commun.* 682:39-45, 2023.
 5. Ishimaru N, Otsuka K, Tsunematsu T, Taquahashi Y, Kanno J. Chronic Immunotoxicity of Multi-Walled Carbon Nanotubes on Macrophages via MMP-12. *Annals of Work Exposures and Health* 67(Supplement 1) i74, 2023.
 6. Sato-Fukuba M, Arakaki R, Ushio A, Otsuka K, Nagao R, Matsuzawa S, Tawara H, Tsunematsu T, Ishimaru N*. CD4⁺ T-cell-dependent differentiation of CD23⁺ follicular B cells contributes to the pulmonary pathology in a primary Sjögren's syndrome mouse model. *Front Immunol.* 14:1217492, 2023.
 7. Narwidina A, Miyazaki A, Iwata K, Kurogoshi 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.
 8. 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.* 12:8510-8525, 2023.
 9. 石丸直澄 :シェーグレン症候群疾患モデルからのトランスレーショナル研究 *炎症と免疫* 31(3):35-39, 2023.
 10. 石丸直澄 :臓器間ネットワークと自己免疫疾患 *臨床免疫・アレルギー科* 80(3):311-316, 2023.
- ## 2. 学会発表
1. 大塚邦紘、近藤博之、九十九伸一、新垣理恵子、永尾瑠佳、佐藤真美、牛尾綾、青田桂子、石丸直澄、安友康二 CD153-CD30 相互反応を介したシェーグレン症候群の病態形成機構の解明 第 112 回日本病理学会総会 2023.4 山口
 2. 常松貴明、俵宏彰、佐藤真美、福田一稀、大塚邦紘、牛尾綾、石丸直澄 DNA 損傷シグナルによって誘導されるがん細胞の新たな機能とその分子機構 第 112 回日本病理学会総会 2023 年 4 月 15 日 下関
 3. 大塚邦紘、石丸直澄、安友康二 CD153+ CD4+ T cell によるシェーグレン症候群の新たな発症機序の解明 第 5 回 口腔医科学フロンティア研究会 2023.4 新潟
 4. Naozumi Ishimaru. Chronic Immunotoxicity of Multi-Walled Carbon Nanotubes on Macrophages via MMP-12. Inhaled Particles/NanOEH conference

- 2023 Invitation Lecture, 2023.5.15, Manchester, UK.
5. 石丸直澄 膠原病における唾液腺病変とその成立機序～シェーグレン症候群の病理～ 第40回膠原病臨床病理研究会 東京 2023年6月23日
 6. 常松貴明、石丸直澄 “がんの共食い”の分子機構とその生物学的意義の解明、第40回分子病理研究会 2023年7月14日 札幌
 7. 俵宏彰、常松貴明、永尾瑠佳、松鎮史、大塚邦紘、牛尾綾、石丸直澄 染色体パッセンジャー複合体構成因子 Borealin-Survivin 相互作用は頭頸部扁平上皮癌の代謝を制御する 第34回日本臨床口腔病理学会総会 2023年8月 大阪
 8. 常松貴明、石丸直澄 “がんの共食い”の分子機構とその生物学的意義の解明 2023年度徳島大学先端酵素学研究所シンポジウム 2023年9月14日、徳島
 9. 大塚邦紘、近藤博之、九十九伸一、牛尾綾、福場-佐藤真美、俵宏彰、永尾瑠佳、常松貴明、石丸直澄、安友康二 シングルセル解析を基盤としたシェーグレン症候群の発症機序の解明 第65回歯科基礎医学会学術大会 2023.9 東京
 10. 大塚邦紘、近藤博之、九十九伸一、牛尾綾、永尾瑠佳、青田桂子、石丸直澄、安友康二 シングルセル解析を基盤としたシェーグレン症候群の発症機序の解明 第31回日本シェーグレン症候群学会学術集会 2023.9 静岡
 11. 松澤鎮史、牛尾綾、永尾瑠佳、大塚邦紘、俵宏彰、常松貴明、石丸直澄 シェーグレン症候群と胸腺における T細胞の分化・成熟の関連についての検討 第31回日本シェーグレン症候群学会 2023年9月 浜松
 12. 永尾瑠佳、山本安希子、大塚邦紘、牛尾綾、福場真美、俵宏彰、常松貴明、石丸直澄 Trat1 を起点としたシェーグレン症候群の発症機序の解析 第31回日本シェーグレン症候群学会 2023年9月 浜松
 13. 石丸直澄 シェーグレン症候群疾患モデルを基盤としたトランスレーショナルリサーチ～SS 発症における臓器間コミュニケーションの分子機序～ 第31回日本シェーグレン症候群学会 2023年9月 浜松
 14. 俵宏彰、常松貴明、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非依存的な Borealin-Survivin 相互作用がもたらす新たな機能 第65回歯科基礎医学会学術大会 2023年9月 東京
 15. 俵宏彰、常松貴明、大塚邦紘、牛尾綾、石丸直澄 口腔扁平上皮癌における Survivin の核内蓄積がもたらす新たな機能 第59回日本口腔組織培養学会 2023年11月 栃木
 16. 常松貴明、俵宏彰、石丸直澄、DNA 損傷シグナルによってがん細胞が獲得する新たな機能 第59回日本口腔組織培養学会総会・学術大会、2023年11月25日 栃木
 17. Otsuka K, Kondo H, Tsukumo S, Ushio A, Ishimaru N, Yasutomo K. CD153+ CD4+ T cells and CD30+ cells exacerbate the autoimmune pathology in salivary glands of Sjögren's syndrome. 第52回日本免疫学会学術集会 千葉 2024.1
 18. Ruka Nagao, Akiko Yamamoto, Kunihiro Otsuka, Aya Ushio, Mami Fukuba, Hiroaki Tawara, Takaaki Tsunematsu, Naozumi Ishimaru. Analysis of the suppression mechanism for activated T cells via co-inhibitory receptors in Sjögren's syndrome. 第52回日本免疫学会学術集会 2024年1月 千葉
 19. Takaaki Tsunematsu, Ruka Nagao, Shigefumi Matsuzawa, Kunihiro Otsuka, Aya Ushio, Naozumi Ishimaru The

- molecular mechanism of “Cancer cell cannibalism” and its significance in cancer progression 第 52 回日本免疫学会総会・学術集会 2024 年 1 月 19 日、幕張
20. Shigefumi Matsuzawa, Aya Ushio, Ruka Nagao, Hiroaki Tawara, Kunihiro Otsuka, Takaaki Tsunematsu, Naozumi Ishimaru. Investigation of the relationship between T cell differentiation and maturation and autophagy in the thymus. 第 5 2 回日本免疫学会学術集会 2024 年 1 月 千葉
21. 永尾瑠佳、山本安希子、牛尾綾、大塚邦紘、松澤鎮史、常松貴明、石丸直澄
Analysis of the role of co-inhibitory receptors on T cells to the pathogenesis of Sjögren's syndrome. 第 113 回日本病理学会総会 2024 年 3 月 名古屋
22. Aya Ushio, Kunihiro Otsuka, Takaaki Tsunematsu, Yuhji Taquahashi, Jun Kanno, Naozumi Ishimaru. The influence of multi-walled carbon nanotube for immune systems. 第 113 回日本病理学会総会 2024.3.28、名古屋
23. Hiroaki Tawara, Takaaki Tsunematsu, Ruka Nagao, Sigefumi Matsuzawa, Kunihiro Otsuka, Aya Ushio, Naozumi Ishimaru. Borealin-Survivin complex directly regulates keratinocyte differentiation in head and neck squamous cell carcinoma. 第 113 回日本病理学会総会 2024.3.28、名古屋
24. Shigefumi Matsuzawa, Aya Ushio, Ruka Nagao, Hiroaki Tawara, Kunihiro Otsuka, Takaaki Tsunematsu, Naozumi Ishimaru. The relationship between autophagy in the neonatal thymus and Sjogren syndrome. 第 113 回日本病理学会総会 2024.3.28、名古屋
25. 常松貴明、吉川治孝、永尾瑠佳、松澤鎮史、大塚邦紘、牛尾綾、石丸直澄 がん特殊化リボソームの同定と機能解析 第 113 回日本病理学会総会、2024 年 3 月 28 日 名古屋
26. 石丸直澄 免疫難病の新たな病態と治療戦略～シェーグレン症候群の病理～ 四国歯学会 特別講演 2024 年 3 月 20 日 徳島

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

Experimental protocol

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

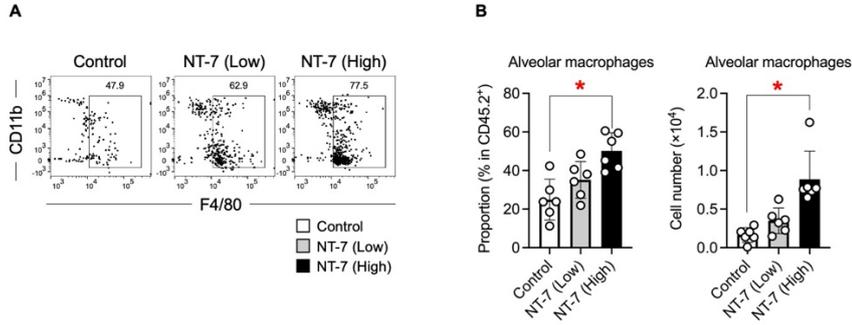


対照群 (清浄空気)
 NT-7 低濃度群 (2.7 mg/m³)
 NT-7 高濃度群 (5.2 mg/m³)

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

図 2

The proportion and number of alveolar macrophages were increased by long-term exposure to NT-7



Flowcytometric analysis was performed by using BALF. Each panels were gated on CD45.2⁺ CD3ε⁻ CD19⁻ TER119⁻. F4/80⁺ cells were defined as alveolar macrophages (AM).
 The proportion and number of AMs were significantly increased in NT-7 highly exposure, compared to Control (B).

图 3

M1 and M2 polarization of AMs was changed by NT-7 exposure

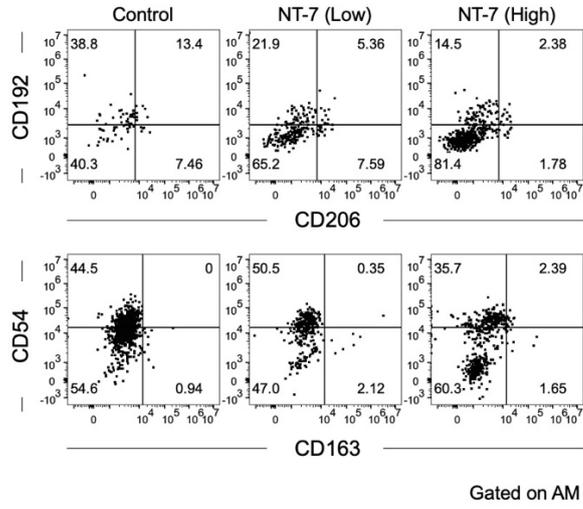
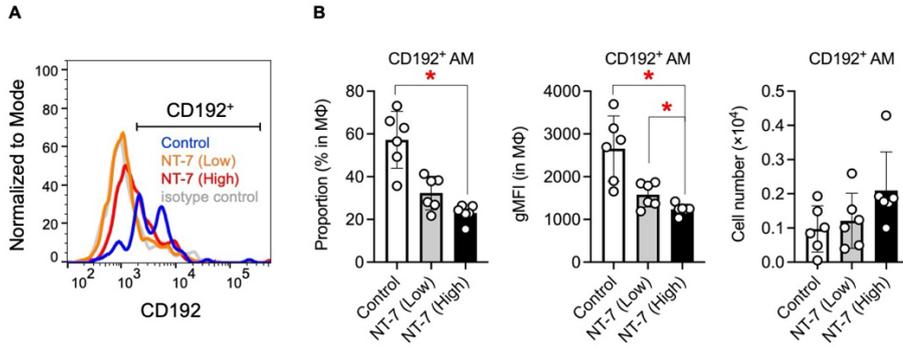


图 4

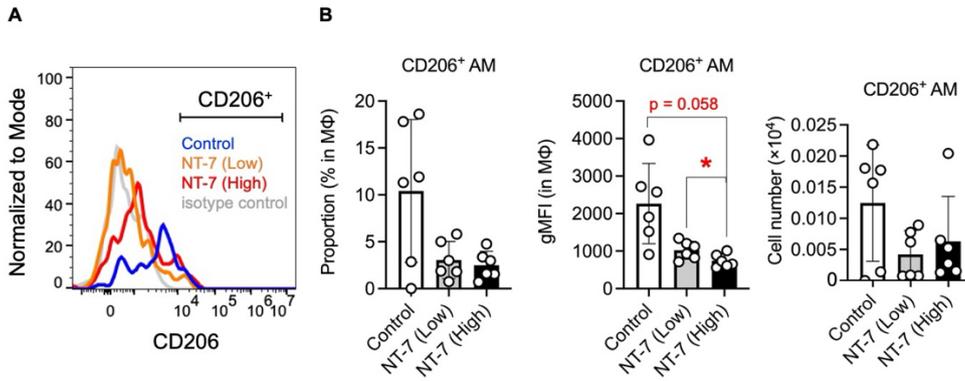
The proportion and gMFI of CD192⁺ AMs were decreased by NT-7 exposure



CD192 expression level in F4/80⁺ CD45.2⁺ CD3ε⁻ CD19⁻ TER119⁻ cells from BALF (A).
The proportion of CD192 on AMs were significantly decreased in NT-7 highly exposure, compared to Control (B).
The gMFI of CD192 on AMs were significantly decreased in NT-7 highly exposure, compared to Control and low exposure (B).
(CD192: CCR2)

图 5

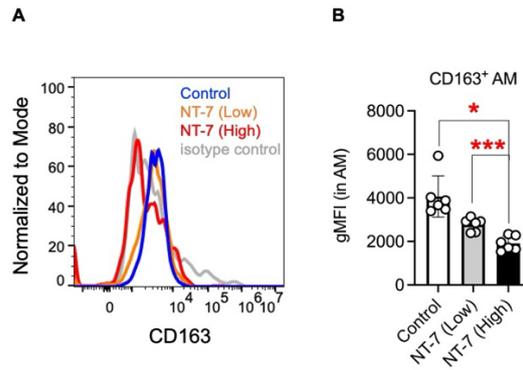
The proportion and gMFI of CD206⁺ AMs were decreased by NT-7 exposure



CD206 expression level in F4/80⁺ CD45.2⁺ CD3ε⁻ CD19⁻ TER119⁻ cells from BALF (A).
The gMFI of CD206 on AMs were significantly decreased in NT-7 highly exposure, compared to low exposure (B).

图 6

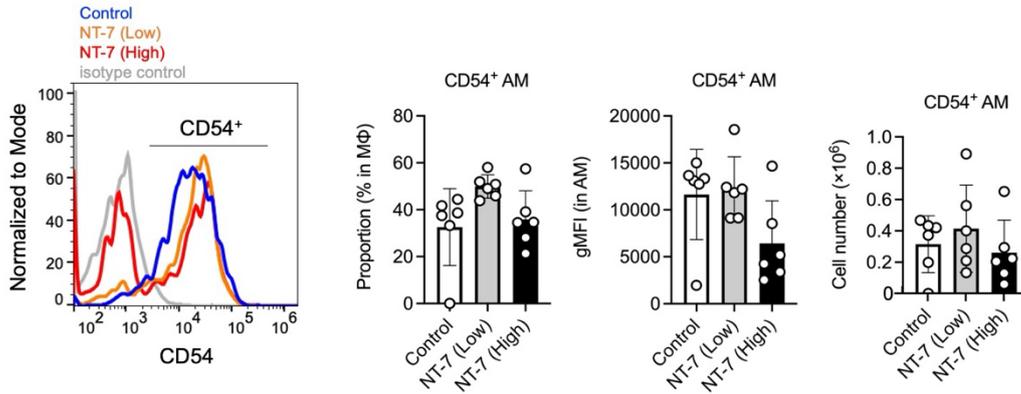
The gMFI of CD163 in AMs were decreased by NT-7 exposure



CD163 expression level in F4/80⁺ CD45.2⁺ CD3ε⁻ CD19⁻ TER119⁻ cells from BALF (A).
The gMFI of CD163 on AMs were significantly decreased in NT-7 highly exposure, compared to Control and low exposure (B).

图 7

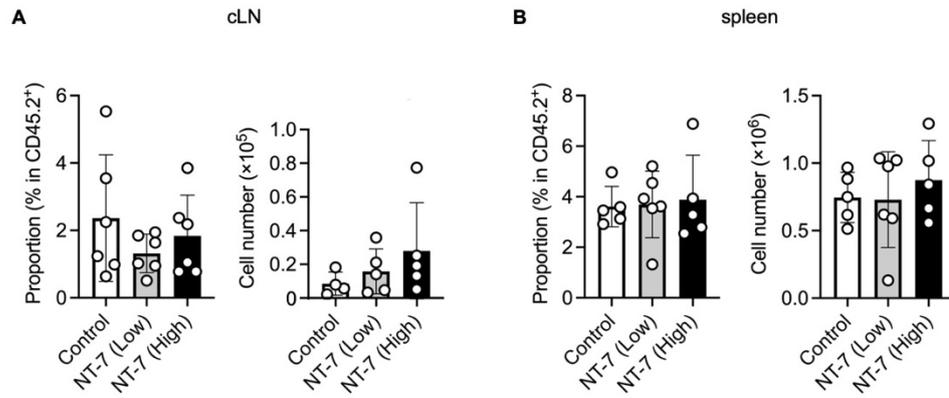
CD54⁺ AMs were not changed by NT-7 exposure



CD54 expression level in F4/80⁺ CD45.2⁺ CD3ε⁻ CD19⁻ TER119⁻ cells from BALF (A). The proportion, gMFI of CD54 on AMs were not changed between each condition (B). The cell number CD54⁺ AMs were not changed between each condition (B).

图 8

The proportion and number of macrophages in cLN and spleen were not changed by NT-7 exposure



The proportion and cell number of macrophages from cLNs (A) and spleen (B) were not changed between each condition.

Figure 9 CD192⁺ and CD206⁺ macrophages in lymphoid tissues were not changed by NT-7 exposure

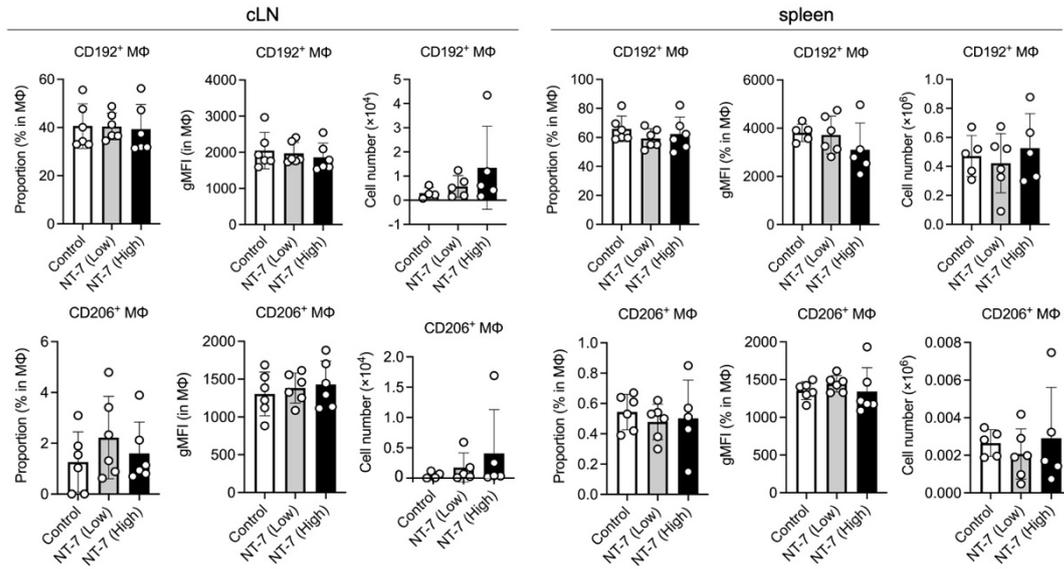
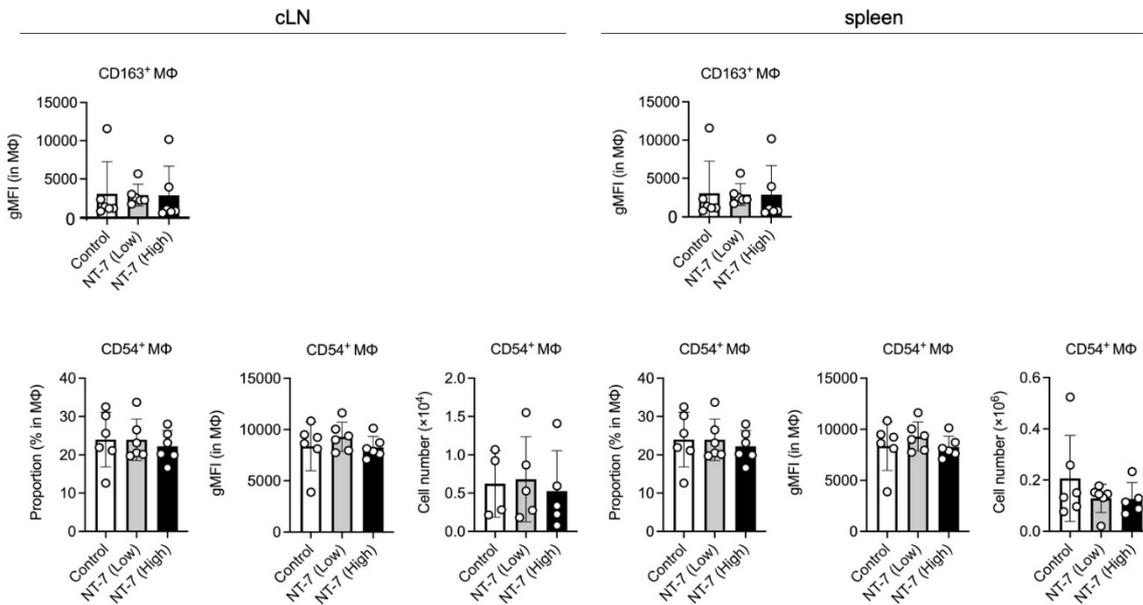
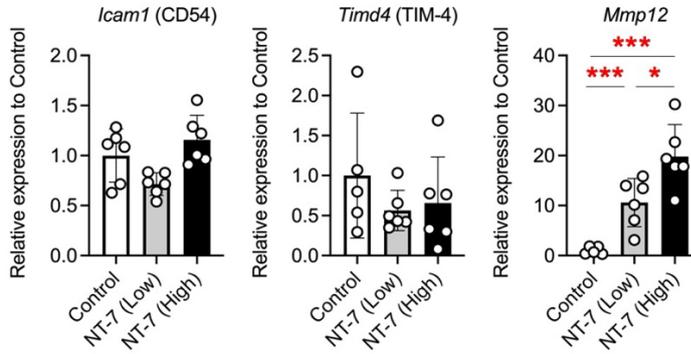


Figure 10 CD163⁺ and CD54⁺ macrophages in lymphoid tissue were not changed by NT-7 exposure



1 1

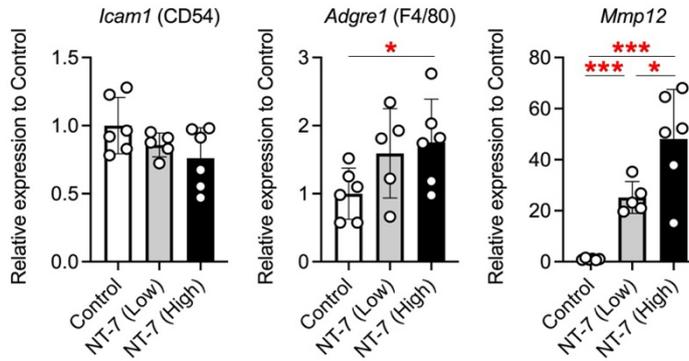
Mmp12 mRNA expression in BALF was upregulated by NT-7 exposure



qPCR was performed by using BALF.
 The gene expression levels of *Mmp12* was significantly upregulated by NT-7 low and high exposure.
 The gene expression levels of *Icam1* and *Timd4* were not changed between each condition.

1 2

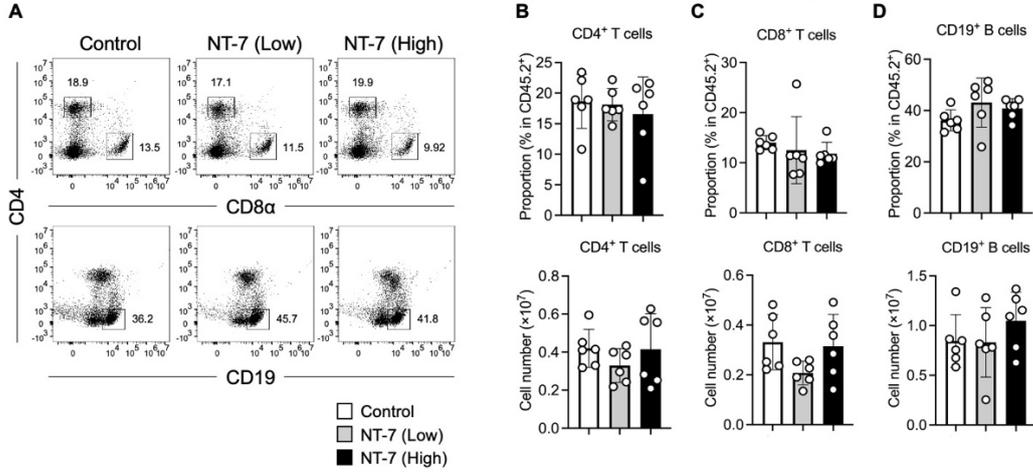
Mmp12 mRNA expression of lung tissue was upregulated by NT-7 exposure



qPCR was performed by using whole Lung tissue.
 The gene expression levels of *Mmp12* was significantly upregulated by NT-7 low and high exposure.
 The gene expression levels of *Adgre1* was significantly upregulated by NT-7 high exposure.
 The gene expression levels of *Icam1* was not changed between each condition.

13

T and B cell subsets in spleen were not changed by long-term exposure to NT-7.

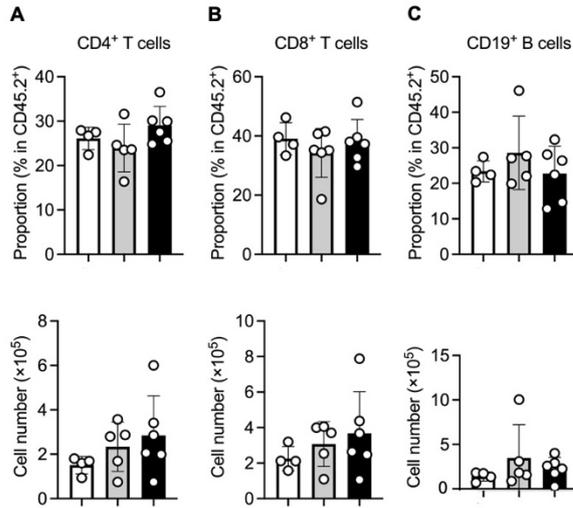


(A) Flow cytometric analysis by using spleen. Each panels were gated on CD45.2⁺.

The proportion and number of CD4⁺ T cells (B), CD8⁺ T cells (C) and CD19⁺ B cells (D) from spleen.

14

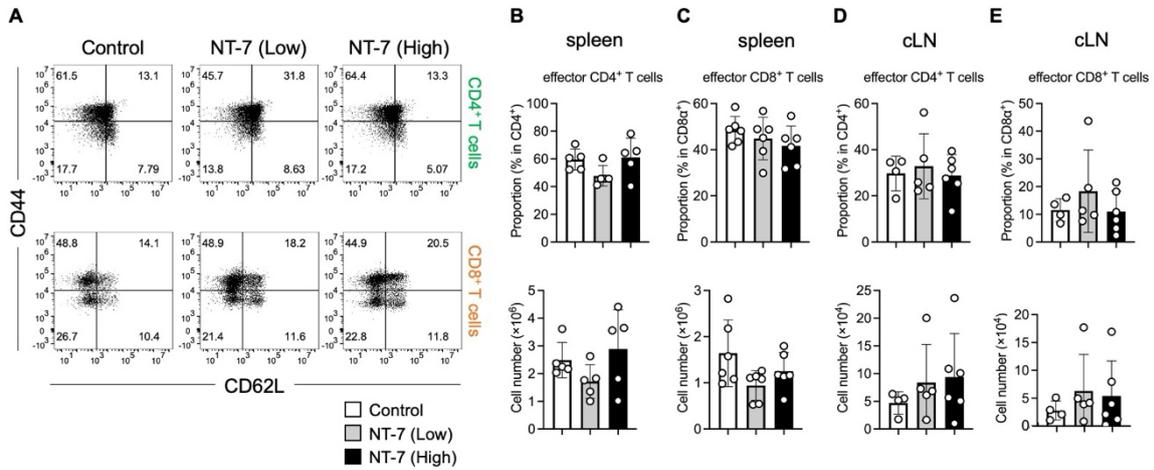
T and B cell subsets in cLNs were not changed by long-term exposure to NT-7



The proportion and number of CD4⁺ T cells (A), CD8⁺ T cells (B) and CD19⁺ B cells (C) from cLNs.

图 1 5

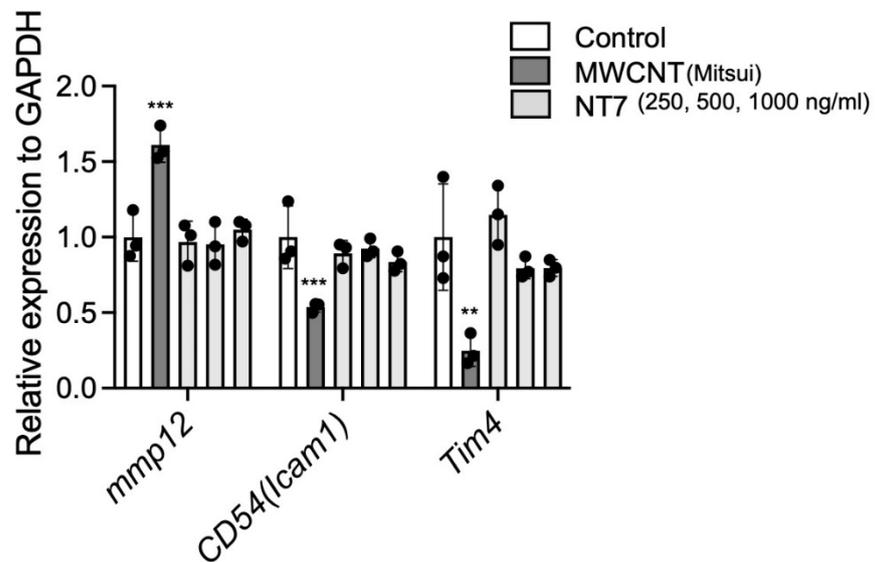
The proportions and numbers of effector T cells were not changed by long-term exposure to NT-7.



Flowcytometric analysis by using spleen. Each panels were gated on CD4⁺ (upper) and CD8⁺ (lower). CD44^{high} CD62L^{low} T cells were defined as effector T cells (A). The proportion and number of effector CD4⁺ T cells (A), effector CD8⁺ T cells (B) in spleen, and effector CD4⁺ T cells (C), effector CD8⁺ T cells (D) in cLNs.

图 1 6

In vitro reaction of bone marrow-derived macrophages to MWCNT-7 (T-CNT) and NT-7



令和5年度 厚生労働行政推進調査事業費補助金(化学物質リスク研究事業)分担研究報告書

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

分担研究課題名: 曝露評価手法に関する調査研究

研究分担者: 小林 憲弘 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 室長
研究協力者: 広瀬 明彦 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部・客員研究員

研究要旨

本研究班全体で得られたナノマテリアルの吸入曝露試験の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した。

2023年7月にOECDより「Test Guideline No.126: Determination of the Hydrophobicity Index of Nanomaterials Through an Affinity Measurement (親和力計測によるナノマテリアルの疎水性指数の測定)」(以下、TG126)が出版されたことから、TG126について調査し、その内容を整理した。

TG126において疎水性指数(Hy)は「水が非極性分子を排除する傾向から生じる、水環境における非極性基または分子の会合」と定義される。様々な加工表面(コレクター)への結合率を測定することにより、HyはNMが非極性(疎水性)表面への結合を好む(水に対する親和性が低い)傾向を示す。この方法は推奨プロトコルを使用し、界面活性剤の有無に関わらず水溶液に分散されたNMまたはNM粉末に適用される。

Hyは他のパラメータの中でもナノマテリアルの様々な相互作用に関する情報をより多く提供する可能性があると考えられる。

A. 研究目的

本研究班全体で得られたナノマテリアルの吸入曝露試験の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した。具体的には、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)で進められているプロジェクトの動向調査を行った。

B. 研究方法

2023年7月にOECDより「Test Guideline No.126: Determination of the Hydrophobicity Index of Nanomaterials Through an Affinity Measurement (親和力計測によるナノマテリアルの疎水性指数の測定)」(以下、TG126)が出版された。また、同9月には上記TG126に関するウェビナーが開催された。そこで、TG126¹⁾を調査し、その内容を整理した。

OECD Guidelines for the Testing of

Chemicals, Section 1, Test Guideline No. 126: Determination of the Hydrophobicity Index of Nanomaterials Through an Affinity Measurement

OECD Test Guideline No. 126 では、親和力 (affinity) 計測によるナノマテリアル (NMs) の疎水性指数 (Hy) の測定方法を記載している。

ガイドラインで、疎水性指数 (Hy) は「水が非極性分子を排除する傾向から生じる、水環境における非極性基または分子の会合」と定義される。

様々な加工表面 (コレクター) への結合率を測定することにより、Hy は NM が非極性 (疎水性) 表面への結合を好む (水に対する親和性が低い) 傾向を示す。

この方法は推奨プロトコルを使用し、界面活性剤の有無に関わらず水溶液に分散された NM または NM 粉末に適用される。

C. 研究結果

i) TG126 の背景

法的枠組み (REACH) では、オクタノール/水分配係数 (Kow) の報告が義務付けられている。Kow は、水環境における化学物質の挙動と輸送の指標であり、環境暴露モデルの主要パラメータや、ヒトへのリスク評価に用いられる。しかし、Kow はナノマテリアルの評価には適用されない。そこで、液体中の NM の挙動に関する情報を取得する手順を開発する必要がある。

疎水性は「OECD の工業ナノマテリアルの物理化学的決定枠組み」において関連パラメータとして指定されており、他のパラメータの中でも NM の相互作用に関する情報

をより多く提供する可能性がある。水生生物および陸生生物 (生物蓄積および残留性を含む)、ヒトの細胞表面との接触 (皮膚・肺を通じた人体への輸送と、その結果としての組織・器官への蓄積または血液循環からの除去を含む)。

化学物質の疎水性は次のような影響を与える

- 細胞への取り込み
- 毒性
- 免疫応答 / 免疫細胞相互作用
- 溶血
- タンパク質の吸着

疎水性、サイズ、表面電荷は、ナノ粒子の生体適合性に影響を与える主なパラメータである。欧州委員会 (EC) の JRC の、OECD テストガイドラインプログラム (TGP) へのナノマテリアルの疎水性に対処する新しい TG を開発する提案が、2019 年の TGP 作業計画の新規項目として受け入れられた。

最終的な新しい TG126「親和性測定によるナノマテリアルの疎水性指数の決定」が、2023 年に採用された。

ii) 測定原理

この試験では、分散した NM と異なるコレクターとの結合率を測定することにより、NM の疎水性指数 (Hy) を定量化することができる (図 1)。コレクターは、異なる特性を示すように設計された表面である。パラメータ H^* は、NM が水相に留まらずに疎水性表面に結合する傾向を直接測定するものである。テストでは 3 種類のコレクターを使用する。疎水性コレクターは NM の疎水性を測定するもので、すなわち NM とコレクター

間の疎水性相互作用を伴う。他の2つのコレクターは親水性で、正と負に帯電しており、リファレンスとネガティブコントロールの役割を果たす。負に帯電した NM の場合、親水性の正に帯電したコレクターがリファレンスとなり、静電相互作用を促進することで結合率が最大になる。プラスに荷電した NM の場合、親水性のマイナスに荷電したコレクターがこの役割を果たす。参照コレクターへの結合率は、NM の表面への輸送によってのみ制限される。もう1つのコレクター (NM と同じ表面電荷を持つ) はネガティブコントロールである。疎水性インデックスは、疎水性コレクター上の NM の結合率と、参照コレクター (結合率が最大になる親水性コレクター) 上の NM の結合率との比の対数として定義される。コレクターは、異なる疎水性と表面電荷を示すように設計されている。それらは以下の特性を示す: - 非常に低い表面粗さ (<< NM サイズ) - 以下に述べるように表面自由エネルギーの極性成分のある値 - 以下に述べるように測定媒体中のある電位。Owens-Fowkes-Wendt 理論によると、固体の全表面エネルギーは、 γ LW (Lifschitz-van der Waals 成分) と呼ばれる分散成分 (非極性相互作用を考慮) と、 γ AB (酸塩基成分) と呼ばれる極性成分の和である。 γ AB が低い固体材料は「疎水性」とみなされる。固体の γ AB の増加は、その親水性の増加に対応する。疎水性コレクターは、熟練度試験のようにフルオロカーボンコーティングをベースとすることができ、非常に低い γ AB を提供する。その後、親水性材料の層を追加することで、 γ AB を増加させることができる。

すでに水性媒体に分散している NM は、測

定を行う前にリン酸緩衝液 (PB) で希釈される。粉末の場合、NM は PB に分散される。疎水性の高い NM の分散を促進するために、界面活性剤を添加することができる。この場合、界面活性剤の濃度を漸減させながら (安定した分散を得ることができる最小濃度で)、4 回の測定を行う。各濃度で測定した H 値から、界面活性剤無添加の NM の y 値を外挿することができる ([界面活性剤]=0 における H_{yx})。分散液は脱気された後、液体セルによってコレクターに注入され、表面に運ばれる。時間の関数としてコレクターに結合する粒子の数 (結合率) は、コレクターへの親和性を決定する。時間の関数としての結合粒子の画像化は、暗視野顕微鏡とカメラによって行われる。画像解析ソフトウェアを使用して、粒子を自動的に検出し、カウントし、結合曲線を作成する。結合粒子は、画像シーケンス上の位置を追跡することにより、結合していない粒子と区別される。テストは、異なるコレクターに結合する粒子の数を時間の関数として返す。これらの実験データは、最初に NM の疎水性を定性的に評価するために使用できる。

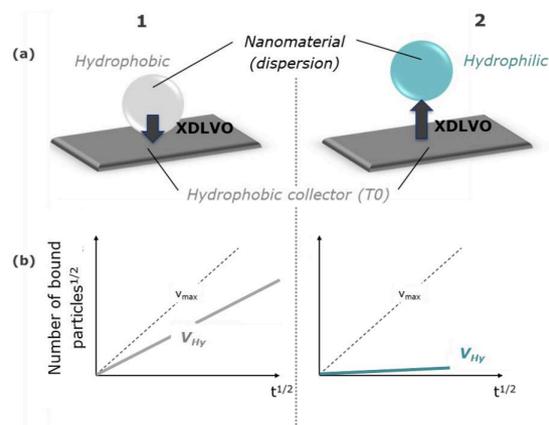


図 1. H_y の測定原理

H_y は下記の式で表される。

$$H_y = \log(v_{Hy}/v_{max})$$

すなわち、ナノマテリアルの疎水性が高ければ、 H_y は 0 に近づき、浸水性が高ければ、 $H_y < -1$ となる。 $H_y = -1$ であれば、 T_5 と比較して T_0 に 10%結合していることを示す。

iii) 方法の詳細

試料は水性媒体中に分散させ、脱気する必要がある。NM の表面特性や化学的性質を変化させることなく、安定性の条件を満たす分散を保証する分散プロトコルを使用することを推奨する。例えば、非常に強力な超音波処理プロトコルは、NM の表面からコーティングを除去する可能性があり、これは NM の特性を変化させるので避けるべきである。表面処理は、ここでは改質ではなく、被検物質固有の性質であり、この方法は表面処理された NM にも適用できる。水性媒体にすでに分散している NM を PB で希釈する。粉末状の場合、NM は PB に分散される。他の方法では分散しない疎水性の高い NM の分散を促進するために、界面活性剤を添加することができる。この場合、安定した分散を得るのに必要な最小濃度から始めて、界面活性剤の濃度を 4 段階上昇させた一連の溶液を調製する。それぞれ同じプロトコルに従って測定する。3 つの異なる表面またはコレクター（疎水性、陽性、陰性）を透明基板上に調製するか、機能化スライドプロバイダーから購入する。調製プロトコルの例

は、付録の「マイクロ流体セルの取り付け」に記載されている。暗視野顕微鏡で表面に焦点を合わせやすくするため、図 3 に示すように、コレクターをスライドの中央部（幅方向）に、横から縦にきれいに傷をつける必要がある。次に、各基板に、体積、表面、高さを制御したマイクロ流体セルを取り付ける。市販の多チャンネル粘着スライド（Ibidi 社製、6 チャンネル粘着スライドや Chipshop 社製 16 チャンネル粘着スライドなど）または自作のマイクロ流体セルを、試験手順で示した条件に従って測定に使用することができる。

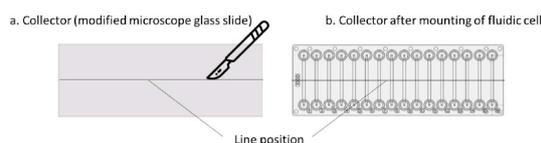


図 3. コレクターの準備方法

測定は、コレクターに電荷を掛け、結合している粒子数を暗視野顕微鏡により測定する。

1 フレームあたりのコレクターに結合する粒子数の測定は、フリーソフト ImageJ とその Trackmate プラグイン²を用いて行う。暗視野顕微鏡では、粒子は背景よりも明るい。粒子の検出は、ピクセル強度分布の閾値処理によって行われる。解析は、各フレームの粒子の自動検出と、一連のフレーム内の粒子の位置の追跡からなる。最後のフレームから数えて 2 フレーム以上連続して動いていないオブジェクトがカウントされる。この自動計算により、1 フレームあたりの結合粒子数が定量化される。時間は、フレーム番号にフレーム遅延 (30 秒) を掛けることによって計算され、コレクタ上の物質の結合

速度に対応する単位時間あたりの結合粒子の数に達する。結果のテキストファイルは、フィッティング用のデータ処理ソフトウェアにインポートできる³⁴。各コレクター上の結合粒子数を時間の平方根の関数としてプロットすると、図4に示すような線形トレンドラインが得られる。この関数はコレクターごとに計算される。これは、Microsoft Excel[®] または任意の種類 of データ処理ソフトウェアで利用可能なフィッティングウィザードを使用して、線形関数でフィッティングできる。フィットは、異なるコレクターにNMが結合する速度を表す v と呼ばれる直線の傾きを返す。

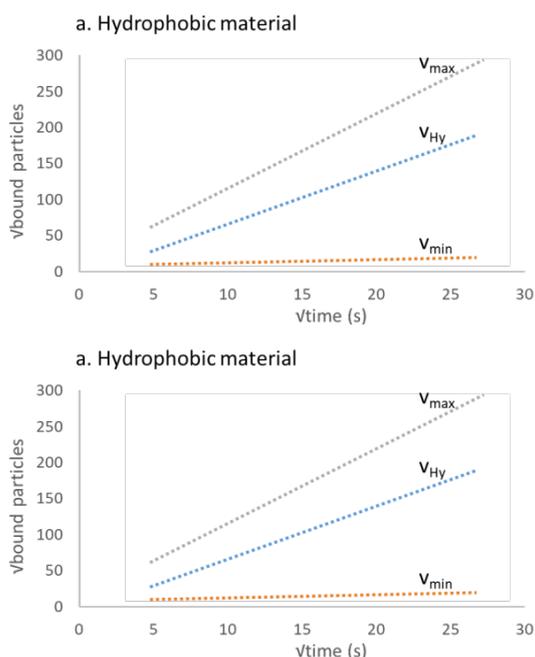


図4. 疎水性 (a) 及び親水性 (b) 物質の解析結果の例

結合速度は、疎水性コレクターの結合速度 v_{Hy} と、支配的な静電引力 v_{max} を示す親水性コレクター（測定媒体中で一般的なように、負に帯電した物質に対しては親水性

の正に帯電したコレクター、正に帯電した物質に対しては親水性の負に帯電したコレクター) の結合速度の値の比の対数として定義される疎水性指数 H_y の計算に使用される。この指数の値が $0 \sim -1$ である場合、NMは疎水性であるとみなされ、 -1 より低い値を示す場合は親水性であるとみなされる。 0 に近いほど疎水性が高い。界面活性剤を使用して分散を行う疎水性NMの場合、界面活性剤の各濃度について H^* ¹⁴⁶ の値が計算される。それぞれの H は、界面活性剤によって特性が変更された NM の疎水性指数に対応する。次にこれらの値をプロットし、界面活性剤無添加の \hat{N}_0 の値を線形回帰によって外挿する (図5)。この外挿は、 a が界面活性剤濃度に直線的に比例する濃度範囲で行われる。プロットが直線的でない場合は、飽和を避けるために界面活性剤濃度を下げる必要がある。最初の定性的評価は、試験媒体中へのNMの分散性から得られる。この条件が達成できない場合、NMは疎水性が高いと考えられ、 H^* は 0 に近いと仮定される。この場合 H^* を定量化するために、疎水性の高いNMの分散を促進する界面活性剤を添加しする。

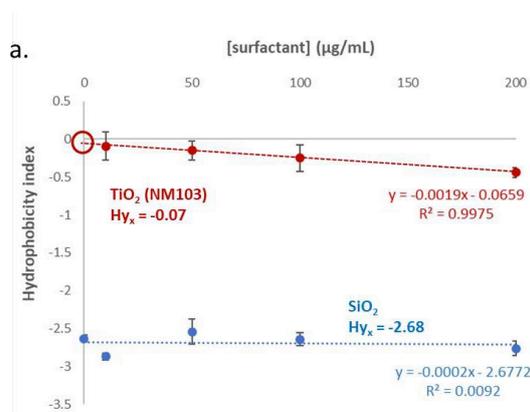


図5. 疎水性NM (NM103、疎水性コーティング)

グ TiO₂)、および親水性 NM (SiO₂) を、界面活性剤の濃度を減少させながら測定した結果に基づく。 H^{∞} は、[界面活性剤]=0 に対する外挿値。

vH_y/v_{max} の比の対数を用いて H_y を計算することで、測定された NM の疎水性指数を定量的に評価することができる。 H が負の値であればあるほど、その NM は疎水性が低いことを意味する。図 6 に測定物質の指標を示す。

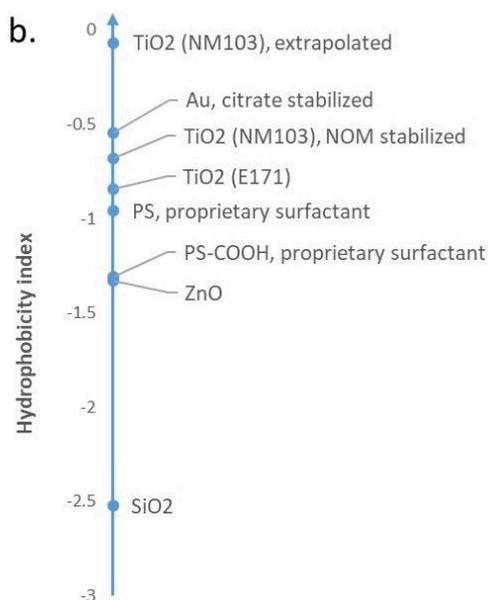


図 6. 本方法で試験した材料の疎水性指数 (H^{∞}) の指標スケール。0 に近いほど疎水性が高い。

D. 考察・結論

H_y の潜在的な利用可能性として、次の 3 点が挙げられる。

1. ナノ粒子の環境中挙動の指標として使えらる。カルボキシル基が付加したポリスチレンでは、-COOH の含量が増加するほど、疎水性が減少す

ることが報告されている。

2. また、生物濃縮性の指標としても活用できると考えられる。 H_y が高いほど、微生物への吸着量が増加することが報告されている。
3. さらに、異なる種類のナノ粒子の凝集の指標としても活用できる可能性がある。

以上のことから、 H_y は他の物性パラメータの中でもナノマテリアルの様々な相互作用に関する情報をより多く提供することができると考えられる。

E. 参考文献等

- 1) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 1, Test Guideline No.126: Determination of the Hydrophobicity Index of Nanomaterials Through an Affinity Measurement
<https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/ae9c0fd1-en.pdf?expires=1715147292&id=id&accnam=e=guest&checksum=47DCC75ECFD45C482035BD9EFFB0EC67>

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
Hojo M, Maeno A, Sakamoto Y, Yamamoto Y, Taquahashi Y, Hirose A, Suzuki J, Inomata A, Nakae D.	Time-course of transcriptomic change in the lungs of F344 rats repeatedly exposed to a multiwalled carbon nanotube in a 2-year test.	Nanomaterials (Basel).	13(14)	2105	2023
Miyauchi A, Akashi T, Yokota S, Taquahashi Y, Hirose A, Hojo M, Yoshida H, Kurokawa M, Watanabe W.	Effects of inhalation of multi-walled carbon nanotube (MWCNT) on respiratory syncytial virus (RSV) infection in mice.	J. Toxicol. Sci.	48(7)	411-420	2023
Shimizu M, Hojo M, Ikushima K, Yamamoto Y, Maeno A, Sakamoto Y, Ishimaru N, Taquahashi Y, Kanno J, Hirose A, Suzuki J, Inomata A, Nakae D.	Continuous infiltration of small peritoneal macrophages in the mouse peritoneum through CCR2-dependent and -independent routes during fibrosis and mesothelioma development induced by a multiwalled carbon nanotube, MWNT-7.	J. Toxicol. Sci.	48(12)	617-639	2023
Sultana N., Fukamachi K., Jiegou Xu., Tsuda H., Suzui M.	mRNA expression profile of cytokines in rat primary alveolar macrophages treated with multiwalled carbon nanotube (MWCNT).	Fundam. Toxicol. Sci.	10(1)	27-30	2023

別添 5

Sultana N., Fukamachi K., Roy DC., Jiegou Xu., Tsuda H., Suzui M.	mRNA expression levels of CCL4, IL6, and CXCL2 in multiwalled carbon nanotube induced lung tumors in rats.	Fundam. Toxicol. Sci.	10(4)	137-141	2023
北條 幹	カーボンナノチューブの発がん性	Precision Medicine,	6(4)	30-34	2023
北條 幹、坂本義光、前野愛	最前線・ナノマテリアルの実際の危険性—ラット慢性試験によるカーボンナノチューブの発がん性評価	ファルマシア	59(7)	659-663	2023

厚生労働大臣 殿

機関名 一般財団法人化学物質評価研究機構

所属研究機関長 職名 理事長

氏名 今田中 伸哉

次の職員の令和5年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業

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

3. 研究者名 (所属部署・職名) 安全性評価技術研究所・技術顧問

(氏名・フリガナ) 広瀬 明彦・ヒロセ アキヒコ

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

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 本間 正充

次の職員の令和5年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 化学物質リスク研究事業
- 研究課題名 ナノマテリアル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。

令和 6 年 3 月 4 日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 本間 正充

次の職員の令和 5 年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 化学物質リスク研究事業
- 研究課題名 ナノマテリアル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) ・該当する口にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

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5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) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

厚生労働大臣 殿

機関名 公立大学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5年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 化学物質リスク研究事業
- 研究課題名 ナノマテリアル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) ・該当する口にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

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5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 本間 正充

次の職員の令和5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) ・該当する口を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5年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 化学物質リスク研究事業
- 研究課題名 ナノマテリアル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 (所属部署・職名) 大学院医歯薬学研究部・教授
(氏名・フリガナ) 石丸 直澄・イシマル ナオズミ

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、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。

令和 6 年 3 月 4 日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 本間 正充

次の職員の令和 5 年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業

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

3. 研究者名 (所属部署・職名) 生活衛生化学部・第三室 室長

(氏名・フリガナ) 小林 憲弘・コバヤシ ノリヒロ

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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