

厚生労働行政推進調査事業費補助金

化学物質リスク研究事業

ナノマテリアル吸入曝露影響評価のための効率的慢性試験法の開発に関する研究

(21KD2004)

令和3年度～令和5年度 総合研究報告書

研究代表者 広瀬 明彦

令和6年（2024年）3月

厚生労働行政推進調査事業費補助金総合研究報告書（令和 3 年度～令和 5 年度）

目 次

I. 総合研究報告書

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 1

広瀬 明彦

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 19

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）
総合研究報告書（令和3年度-令和5年度）

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)

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による発がん性の公表データが利用できるカーボンナノチューブを検証物質として、先行研究において同様の結果を得る評価法として開発してきた間欠型の慢性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、将来的な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している。

慢性影響評価法の改良と吸入曝露装置の効率化研究においては、R3年度は短期間に高濃度曝露して慢性影響観察を行うプロトコルの開発、Taquann法自動化装置の開発検討と短期曝露に応じた分散手法の検討を行い、1回/週で13週間曝露するプロコルを設定し、R4年度に慢性実験開始した。吸入曝露装置の改修については、検体調製工程の自動化を検討し、濾過中に発生するケーキ抑制による濾過効率の増強とドライアイスを用いた凍結方法を採用したシステムを構築した。一方、ラットの13週のNT-7反復気管内投与実験においては、肺負荷量の比較により、Kasaiらの2年間慢性曝露吸入試験の結果と中用量群まではよく似た結果となり、気管内投与でも用量依存性を示すことが明らかにできた。先行研究から行っている気管内内噴霧法(TIPS法)による慢性実験では長さの異なる二層カーボンナノチューブについて発がん性において線維の長さによる差異がないことを示した。

体内分布と慢性影響発現部位の解析に関して、リンパ系経路の解析を可能とするトランスジェニックマウス(Prox-1マウス)の導入、肺のリンパ管内皮間葉移行(EndoMT)に関する検討を行った。Prox-1マウスに対するNT-7吸入曝露の結果、肺組織の線維化や肺胞上皮細胞の内皮間葉移行(EMT)の誘導因子であるTGF- β の受容体の発現が上昇していた。さらに、Prox1マウスに対する3週間NT-7吸入曝露後の肺の透明化による三次元観察により、肺組織の気管支の分岐部分においてNT-7と考えられる粒子が曝露量依存的に粒子の集積が増加することと、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。EndoMTレポーター細胞を用いた検討では、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ことが考えられた。先行研究で行われた慢性影響の研究結果の解析研究において、2年間のMWNT-7の間欠曝露実験結果の病理解析を行ったところ、先行研究で行われたNMNT-7の2年間の間欠吸入曝露試験データの解析では、中用量群でマウスにおける腺癌の誘発を確認したが、高用量群では体重増加抑制による影響で発癌性を確認することが困難となる事が示唆された。TIPS法でのNMNT-7慢性観察研究において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/ラットの5用量群で投与した実験は観察中であり、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。BALF細胞の解析では、NT-7の

長期暴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た。MWCNT-7 と同様に NT-7 の長期暴露によって肺胞マクロファージにおける MMP12 が肺毒性の評価マーカーとして重要であることが明らかになった。

曝露評価における情報収集調査では、OECD が開発あるいは評価した曝露評価ツール・モデルの使用に関する手順のガイダンスと OECD テストガイドライン No. 125 および No. 126 に関する情報を整理した。

本研究の主目的としての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。

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

材料の安全性評価法の開発に焦点が移りつつある。一方で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、ナノサイズの材料の大きさや表面活性の観点から生体内への吸収性や蓄積性が生体が与える重要な生体影響は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) に向けた合意の中で、化学物質のライフサイクル全体におけるヒトや環境への影響に対処する必要性が高まり、今後、開発される新材料はより広範且つ長期に渡る使用が想定されることから、慢性曝露への懸念はますます重要な評価項目となっていくものと考えられる。

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という問題が残っていた。そこで、本研究ではさらに試験法の効率化を進める曝露法の開発に加え、体内蓄積性を根拠とした短期曝露試験の開発を進めるこ

A. 研究目的

ナノマテリアル曝露により懸念される健康・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、2019 年にはナノマテリアルが欧州の化学物質管理のための 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、より広い分野の先端

とを目的としている。具体的には、間欠型曝露手法の利点を活かして、複数の慢性試験の曝露日程をずらすことによって、同じ試験設備で2年間の実験期間に複数の慢性試験を同時に実行可能となることから、慢性実験の一件あたりの試験期間の短縮を図ることで効率化を図れる。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(図1)。

また、先行研究ではカーボンナノチューブ曝露で誘発される肺がんと中皮腫について、それぞれ異なったリスク評価を行う必要のあることも明らかとなった。その為、本研究ではそれぞれのエンドポイントの腫瘍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、リスク管理の目的とする曝露シナリオが重要であることから、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法の曝露手法の改良と効率化、体内分布と毒性発現メカニズムの解析、曝露評価モデル等の情報収集を行う。各研究項目の具体的な方法は以下のとおりである。

慢性影響評価法の改良と吸入曝露装置の効率化:

本研究では、多層カーボンナノチューブとして三井物産から提供されたMWNT-7と同様の製造法で生産されたNT-7(ナノテクノロジービジネス推進協議会(NBCI)より提供)を使用している。NT-7をtert-ブチルアルコールに分散後、53 μ mメッシュ濾過し凍結乾燥することで得られた高分散性のTaquann法処理検体を使用した(T-NT7#53)。次に、エアロゾル曝露装置には

Taquann全身曝露吸入装置(ver.3.0)を用い、低濃度(2.5 mg/m³)、高濃度(5.0 mg/m³)の2用量で、C57BL/6Nマウスに対し、T-NT-7#53の間欠(1日6時間、1週毎13週間曝露)吸入曝露試験(R4年度)を実施し、R5年度に当該マウスの肺への負荷量の測定を一部実施した(横田)。また、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、同様の間欠吸入曝露試験を実施した(R5年度)(横田)。さらに、マウスとラットとの種差を比較するため、F344/DuCrjラットに対し、同様の間欠吸入曝露試験を実施した(R5年度)(横田)。

このTaquann全身曝露吸入装置(ver.3.0)は、2年間の長期曝露実験に備えR3年度に改修作業を実施した。また、高分散性乾燥検体を得る工程は、分散、濾過、瞬間凍結、凍結乾燥と煩雑な作業と人手を要し、実験の律速段階となっているため、自動化を進めた(R4及び5年度)(高橋)。

気管内投与法の開発検討として、ラットの13週間の間欠気管内投与による2年間の発癌試験を実施した(R3からR5年度)。NT-7(T-NT7#53)を、0.1% Tween80含有生理食塩水で分散させ、F344雄ラットに对照群、低、中、高および超高用量群の5群(0.0175、0.07、0.28および0.42 mg/kg bw)に分け(1群40匹)、1週間に1度マイクロスプレイヤー(PennCentury)を用いて合計13回の投与を行った。投与終了後にサテライト動物の肺負荷量を測定した(R5年度)。2年間観察し、肺腫瘍および胸膜中皮腫の発症率を評価した(北條、広瀬)。また、気管内内噴霧法(TIPS法)により投与後104週まで観察した3種の異なる長さの2層カーボンナノチューブ(DWCNT)線維による発がん性について解析を行った(R3年度)(津田)。一方、今までのTIPS投与によるMWNT-7の胸膜中皮の発がん性は高用量域(0.5~1.8mg/ラット)であったの

別添3

で、R4年度から低用量域(0.0008 mg/ラット)から高用量域の間の5用量群(0.0008、0.004、0.02、0.1、0.5 mg/ラット)を設定して慢性影響試験を開始し、R5年度も引き続き経過を観察中である(R5年度)(津田)。

体内分布と慢性影響発現部位の解析:

まず、先行研究においてOECD TG451により実施されたMWNT-7の先行試験(Particle Fibre Tox 2016, 13:53)との比較、および、本事業において並行して実施される気管内投与実験との比較を目的とした2年間の間欠吸入曝露実験の体重や肺重量等の解析(R3年度)に加え、慢性炎症、線維化、及び上皮性腫瘍性病変の解析を行った(TTF-1、CC10、Ki-67免疫染色)(R4年度)(菅野)。

体内分布の解析に関して、リンパ管内皮細胞を遺伝学的に蛍光タンパク質で標識したトランスジェニックマウス(リンパ管レポーターマウス:Prox1-GFP)に対してNT-7を1日6時間で単回吸入曝露させて(R3年度)、肺におけるリンパ管内皮を免疫染色により可視化する(R4年度)。組織炎症の惹起や、肺胞上皮細胞の上皮間葉移行(EMT)や肺におけるリンパ管の内皮間葉移行(EndMT)の誘導を検討する(R4年度)(菅野、渡部)。また、NT-7吸入曝露後のリンパ管レポーターマウス由来の肺を透明化し、NT-7の分布ならびにリンパ管形態への影響を検討した(R5年度)(渡部、菅野)。一方、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-Tomato-SMA-GFP)マウスから樹立した内皮間葉移行(EndoMT)レポーター細胞を用いて、肺胞上皮細胞の上皮間葉移行(EMT)の誘導因子であるTGF- β の作用を検討した(R4年度)。また、EndoMTレポーター細胞を用いて、EndoMTの遷移段階の細胞集団を可視的に分離し、それぞれの遷移段階で起こる遺伝子発

現変化をRNA-シーケンシング解析にて同定した(R5年度)(渡部)。また、NT-7吸入曝露後のリンパ管レポーターマウス由来の肺を透明化し、NT-7の分布ならびにリンパ管形態への影響を検討した(R5年度)(渡部、菅野)。

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/ラットの5用量群で投与を行った(R4年度、R5年度)(津田)。

免疫系への吸入曝露による慢性影響については、MWNT-7の2年間の吸入曝露後に得られたサンプルを用いて肺を中心とした免疫細胞分画あるいは各種遺伝子発現に関して検討を加えた。さらに、NT-7の単回全身吸入曝露実験を実施し、曝露後0、1、7、14および28日での肺組織、BALFなどの免疫学的な解析を行った(R3年度)。また、*in vitro*の実験系として、RAW264.7(マウスマクロファージ細胞株)およびNIH3T3細胞(マウス線維芽細胞株)を用いてMWCNT-7曝露による線維化の機転に関して、解析を進めるとともに、マウス骨髄細胞誘導マクロファージのNT-7に対する反応性を検討した(R4年度)。NT-7の単回全身吸入曝露実験の曝露後12ヶ月での肺組織、BALFなどの免疫学的な解析を行った。さらに、*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。研究手法として、BALF細胞の表面分子の発現に関しては、蛍光色素標識各種抗体を用いて、フローサイトメーターにて解析した。また、各種遺伝子mRNA発現に関しては、定量PCR法にて定量化を行なった(R5年度)(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)

などで進められている、労働及び消費者曝露合同プロジェクトのレポート、環境曝露プロジェクトのレポート案に関する情報収集を行った(R3及び4年度)。特にR4年度は、OECDの「Particle Size and Size Distribution of Nanomaterials: OECD Test Guideline 125」(以下、TG125)とそのバリデーション報告書を調査し、その内容を整理した。また、R5年7月には「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):親和力計測によるナノマテリアルの疎水性指数 (Hy) の測定方法が出版されたことから、その内容について情報を整理した(R5年度)(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:

野生型マウスの短期間欠吸入曝露試験における全13回の平均質量濃度は、低濃度は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(σ_g 6.0)と高濃度群で1.2~1.6 μm(σ_g 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。曝露2年経過時のデータは今後の解剖にて、また、下記吸入曝露実験における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。

一方、リンパ管マウスの間欠吸入曝露試験における全13回の平均質量濃度は、低濃度では2.5 mg/m³(エアロゾル効率42%)、高濃度では4.4 mg/m³(エアロゾル効率37%)、MMADのデータは、低濃度群で1.5 μm(σ_g 5.4)の結果が得られた。

F344 ラットの間欠吸入曝露試験における全13回のうち11回の平均質量濃度は、低濃度では2.5 mg/m³(エアロゾル効率42%)、高濃度では4.3 mg/m³(エアロゾル効率36%)、MMADのデータは、低濃度群で1.4 μm(σ_g 6.0)と高濃度群で1.5 μm(σ_g 5.0)の結果が得られた。引き続き、吸入曝露試験及び肺への負荷量測定、慢性毒性評価を実施し、マウスとの種差を明らかにしていく。

Taquann法の自動化装置の検討では、ろ過効率をあげる手法として、プロペラ状のフィンをシーブの上面で回転させることでケーキ生成の抑制を実現した。濾過工程では、TBAが凝固しない温度帯(37°C程度)を維持するため、シーブ並びに漏斗をヒータで加温する仕様とした。瞬間凍結は液体窒素に換わり、ハンドリングが容易なドライアイスを使用することとした。TBAは吸湿性が高く、また、吸湿したTBAでは凍結乾燥中に検体の凝集が生じるため、ドライヤー機能を備えたコンプレッサーから供給する圧縮空気を作業環境中に流入させることにしている(圧縮空気に含まれる水蒸気の理論値は1.37g/m³)。フィルターの洗浄方法については、イソプロピルアルコールを用いた逆洗を採用することとした。最終的には、これら装置をすべて組み込み、安全キャビネット内に収まる装置として完成させた。

ラット気管内投与実験については、投与完了直後の曝露群4群の肺負荷量は、それぞれ30、191、980 および 1369 $\mu\text{g}/\text{Lung}$ であった。2年後に全動物を剖検した。途中解剖の個体および最終解剖の肉眼観察において、肺に腫瘍のある個体は、対照群、低用量群、中用量群、高用量群および超高用量群において、例数とその頻度(%)は、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、対照・低用量群では観察されず、用量群、高用量群および超高用量群において、それぞれ1例(2.6%)、11例(28.9%)および12例(60.0%)であった。

3種の異なる長さのDWCNTによる2年間のTIPS法投与後2年間観察実験では、肺においては腺腫と腺がんの発生頻度は1.5、7、15 μm 群の合計数で有意であった。また陽性対照としたMWCNT-7群では悪性中皮腫が高頻度(11/13、 $p<0.0001$)に発生した。腫瘍病変の発生において1.5、7.0 および 15 μm 間の有意差はなく、また1.5 μm の短いDWCNTでも発がんする可能性のあることが示された。

体内分布と慢性影響発現部位の解析:

先行研究の2年間の間欠吸入曝露による低濃度群(L群)と高濃度群(H群)の群間に死亡率の差は認められなかった。2年目の肺負荷量は、L群; 61.1 \pm 2.2 $\mu\text{g}/\text{lung}$ 、H群; 91.6 \pm 21.5 $\mu\text{g}/\text{lung}$ であった。肉眼的にL群に2例に結節性病変を確認し、II型肺胞上皮由来と考えられるTTF1陽性の細胞からなる肺腺癌の誘発を認めた。

体内動態に関する研究において、Prox1-GFP対するNT-7の6時間単回吸入実験において肺におけるGFP抗体による免疫染色によりリンパ管内皮を検索した。その結果、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。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間定が凡そ可能なことが示された。また、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間定が凡そ可能なことが示された。

加えて、ナノマテリアル吸入曝露をした肺組織において線維化ならびに、肺胞上皮細胞のEMTの誘導因子であるTGF- β の受容体の発現が上昇していることを見出した。そこで、TGF- β の内皮細胞に対する作用を分子的に明らかにするためにEndoMTレポーター細胞を用いて検討した結果、EndoMTが誘導された細胞において、間葉系細胞マーカーの発現が上昇しているなかでも、内皮細胞マーカーであるVEGFR2の発現が維持されている細胞(部分的EndoMT状態の細胞)とVEGFR2発現が消

失している細胞(完全 EndoMT 状態の細胞)が存在することを明らかにした。EndoMT レポーター細胞を FACS ソーティングで EndoMT の各遷移段階の細胞集団を分取して RNA シークエンシング解析した結果、部分的 EndoMT が誘導されている細胞で発現が上昇する部分的 EndoMT 特異的マーカーを複数同定した。そのなかでも炎症に関わる CD40 は、内皮細胞に過剰発現させると EndoMT を誘導することが明らかとなった。

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 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、先行研究の 2 年間の MWNT-7 の吸入曝露によって BALF 細胞数は増加した。また、高濃度の MWNT-7 曝露によって BALF 細胞内の肺泡マクロファージの割合は有意に増加した。MMP-12 mRNA 発現は MWNT-7 の曝露によって BALF 細胞ならびに肺組織において有意に上昇した。一方で、MWNT-7 曝露によって脾臓での M1 マクロファージ分画が低下し、頸部リンパ節では M2 マクロファージ分画が低下した。また、Taquan 処理された NT-7 の短期吸入曝露によっては、曝露直後に減少した BALF 細胞数は曝露後4週で回復することが判明し、BALF 細胞中の単球および未分化マクロファージが増加することが明らかになった。NT-7 吸入曝露による M2 タイプマクロファージへの分化誘導、MMP-12 あるいは CD54 を介した肺泡マクロファージの活性化が短期試験においても確認された。一方で、RAW264.7 細胞を用いた *in vitro* の実験ならびに NF- κ B 遺伝子ノックアウトマウスを用いた *in vivo* の実験により MWCNT-7 の曝露による NF- κ B-MMP12 を起点とした慢性線維化の分子機

序が明らかになった。NT-7 曝露後 12 ヶ月では高濃度曝露群において対照群に比較して BALF 細胞中の肺泡細胞割合ならびに細胞数ともに有意に増加していた。また、肺泡マクロファージにおける CD192、CD206、CD163 の発現が NT-7 曝露により低下していた。加えて、BALF 細胞における MMP12 mRNA 発現が NT-7 曝露により有意に上昇することが判明した。マウス骨髄由来マクロファージへ NT-7 を添加すると、MWCNT-7 で認められた MMP12 mRNA 発現の上昇が確認できなかった。

曝露評価手法の情報収集:

OECD ではナノマテリアルの職業、消費者および環境曝露の評価に利用可能と考えられるツールおよびモデルを網羅的に情報収集し、54 のツールおよびモデルの詳細評価を行った結果、10 の職業曝露、7 の消費者曝露、6 の環境曝露評価ツール・モデルがナノマテリアルの曝露評価に適したものであると判断された。これらのプロジェクトは 2017 年からカナダを中心に、消費者・職業・環境曝露モデルの使用に関するガイダンス文書の作成を目的に実施されているものであり、2022 年 6 月の WPMN ではカナダのレポート案を最終化することが了承された。

OECD の TG125 では、粒径分布に関するナノ特有の TG の必要性について記述され、分散液はガス・液中で物理的・化学的に安定でなければならないことが強調されている。粒子計測のための顕微鏡的手法として、TEM/SEM、AFM について、粒径は 2 次元に投影されたものであり、粒径分布は数ベースとなる。計測にあたって、試料は数日間(試料調製の期間)安定である必要がある。また、統計的に有用な情報を得るには 103 個の粒子が必要とされている。OECD の TG. 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 粉末に適用できる。

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。今回、NT-7 を MWNT-7 に替わるベンチマーク物質として Taquann 処理した T-NT-7#53 を用い、昨年度実施した野生型マウスの間欠吸入曝露試験における曝露 5 週目と 13 週目、ならびに、曝露後 1 年目の肺負荷量の解析を行った。また、野生型マウス、リンパ管マウス、ならびに、F344 ラットの間欠吸入曝露試験を実施した。先行研究で実施した T-NT-7#53 のマウス単回吸入曝露で実施した肺への負荷量の経時的变化により算出された NT-7 の半減期およそ 7 日 (1 週間) の結果を考慮し、本研究では、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、マウスにおいてもラットにおいてもエアロゾル効率は

40 %程度と動物種による動物被毛への T-NT-7#53 の吸着による変化は認められなかった。また、昨年度実施した野生型マウスの間欠吸入曝露試験の結果とも概ね一致しており、T-NT-7#53 のエアロゾル化におけるデータの再現性を確認した。MMAD に関しては、OECD TG451 に準拠した先行試験 (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ており、より少ない検体量で実施可能な Taquann 法の有用性を示した。また、T-NT-7#53 の低用量群と高用量群における MMAD は概ね等しい結果が得られたことから、Taquann 法ならびに本吸入曝露装置の精度の高さが示された。

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 回の間欠吸入曝露直後の肺負荷量が半減するのにおよそ 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と考えている。

一方、曝露吸入装置の改修では、①濾過中に発生するケーキ抑制して濾過効率を上げる手法としてプロペラ状のフィンを回転させる、② TBA の吸湿と凝固防止のため、乾燥した雰囲気下で保温された環境、③凍結工程の簡便化のため液体窒素からドライアイスを用いた凍結方法を採用し、これらの装置を統合した自動化装置を完成させた。

ラットの NT-7 の短期間反復気管内投与については、組織標本の観察中であるが、肉眼観察レベルでは、肺腫瘍の頻度は NT-7 の投与により有意に増加すると見込まれる。用量依存性

に関して、中用量群(33.3%)よりも高用量群、超高用量群で頻度が低下したのは、胸膜中皮腫の発生により早期死亡が多かったためと推測される。肺負荷量のピーク値をもとに、Kasai ら (Part Fibre Toxicol, 2016) の吸入試験の結果と用量反応性について比較すると、中用量群まではよく似た結果になることがわかった。一方、Kasai らの結果とは異なり中皮腫が高頻度に発生し、やはり中皮腫は気管内投与特有のものと考えられた。今回、Numano ら (2019) の MWNT-7 の 2 年試験で 95% に中皮腫が発生した総投与量と同じ用量に設定した超高用量群では、その頻度は 60% にとどまった。これは NT-7 より MWNT-7 の方が誘発能の高いことを示唆している。

一方、長さの異なる DWCNT を用いた TIPS 法による慢性影響研究では、長さにおいては発がん頻度に差異はなく、線維長と発がんとの相関はなかった。一方で、1.5 μ の短い DWCNT でも発がんする可能性が示された。R4 から開始している MWNT-7 の用量依存性試験では、最高用量群において既に中皮腫瘍(1個)が観察され、順調に実験が進んでおり、MWNT-7 の低用量域における発がん標的性(肺または胸膜中皮)の機序が明らかとなることが期待される。

内分布と慢性影響発現部位の解析研究において、先行研究の慢性吸入曝露による影響の解析では、肺重量、肺負荷量、体重などを総合的に解析すると、高用量群は全身毒性が強く表れた結果、発癌性試験としては過剰投与であったものと考察された。

Prox1-GFP に対するナノマテリアル吸入曝露の結果、肺組織の線維化、肺胞上皮細胞の TGF- β 経路および EMT 誘導因子の亢進が示された。また、EndoMT レポーター細胞における TGF- β の作用を検討した結果から、ナノマテリアル曝露により肺組織において惹起される EndoMT は炎症作用亢進の原因となることが予

想される。また、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。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。

実際に、ナノマテリアル吸入曝露マウス由来の透明化肺では、気管支全体へのナノマテリアルの集積と、微細リンパ管の増加が観察された。GFP 蛍光観察を実施した結果では、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 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。加えて、間欠曝露後の長期間観察を実施中であり、EndoMT やリンパ管の形態・走行に対する慢性影響を検討する。

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。

2 年間の MWNT-7 の吸入曝露による BALF 細胞やサイトカインの発現量の解析において、長期曝露後の BALF 細胞中の肺胞マクロファージの割合が増加するとともに、脾臓あるいは

ンパ節など全身のマクロファージ分化にも影響が生じることが示された。加えて、*in vitro* の実験系および腹腔内投与による慢性腹膜炎モデルの系により MWNT-7 曝露によるマクロファージによる MMP-12 を介した慢性炎症の機転が示された。また、R4 年度に解析した NT-7 短期吸入曝露によって、肺胞マクロファージ数は MWCNT-7 の曝露に比較して早期に回復する可能性が示され、BALF 細胞内では単球および未分化マクロファージが増加するとともに、M2 タイプマクロファージへの分化が進む可能性がある。NT-7 吸入曝露によって肺胞マクロファージの CD54 ならびに MMP12 の発現が亢進することから、*in vivo* の評価系として有用であることが確認された。12 ヶ月の NT-7 の長期吸入曝露による肺胞マクロファージ数は増加することが明らかになった。NT-7 の長期曝露によって M1 および M2 マクロファージマーカーの発現は低下し、未分化なマクロファージ・単球が増加する可能性が示された。BALF 細胞および肺組織における MMP12 mRNA 発現は NT-7 長期曝露によって増加していた。一方、NT-7 と MWCNT-7 の *in vitro* での反応性に違いがあることが判明した。

曝露評価手法の情報収集に関する研究では、OECD において、カナダを中心に作成を進めているガイダンス文書は、ナノマテリアルの職業、消費者および環境曝露の評価に利用可能と考えられるツール・モデルの使用に関する手順をユーザーに対して提供することが期待される。OECD の TG125 では、は個々の繊維の直径と長さをペアで測定することを新しいスタンダードプロトコルとして提案している。繊維の粒径分布測定のパリテーションでは、SEM と TEM の両方を用いて評価が行われた。銀ナノファイバーの粒径分布の室間比較の例長い繊維では、SEM と TEM の結果の乖離が大きい結果となっている。この理由として、TEM の適用範囲はく

5 μm であることが挙げられる。以上のことから、ナノファイバーの計測においては、TEM と SEM の両方を用いて計測することが推奨される。OECD の TG126 では、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ナノマテリアル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。

E. 結論

本研究では、2 年間の連続慢性吸入曝露による発がん性の公表データが利用できるカーボンナノチューブを検証物質として、先行研究において同様の結果を得る評価法として開発してきた間欠型の慢性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、将来的な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している。

慢性影響評価法の改良と吸入曝露装置の効率化研究においては、R3 年度は短期間に高濃度曝露して慢性影響観察を行うプロトコルの開発、Taquann 法自動化装置の開発検討と短期曝露に応じた分散手法の検討を行い、1 回/週で 13 週間曝露するプロコルを設定し、R4 年度に慢性実験開始した。13 週にわたる間欠吸入曝露を実施し、曝露実験における再現性と精度の高さを確認した。また、Taquann システムを用いて初めてラット吸入曝露試験を実施し、先行で実施されたラット用いた 2 年間連続吸入曝露試験の結果と比較することが可能となると共に、マウスの結果とを比較し、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ことが可能となった。ナノマテリアルの吸入

曝露システムの効率化に関する吸入曝露装置の改修については、ボトルネックとなっている検体調製工程の自動化を検討しており、加温、乾燥した雰囲気中で、濾過中に発生するケーキ抑制して濾過効率を上げ、液体窒素よりも取り扱いが容易なドライアイスを用いた凍結方法を採用したシステムを構築した。

一方、ラットの13週の反復気管内投与実験においては、肺負荷量の比較により、Kasaiら(Part Fibre Toxicol, 2016)の2年間慢性曝露吸入試験の結果と中用量群まではよく似た結果となり、気管内投与でも用量依存性を示すことが明らかにできた。さらには、本ラットの曝露実験結果とマウスの結果とを比較し、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ことが可能となった。

先行研究から行っている気管内内噴霧法(TIPS法)による慢性実験では長さの異なるDWCNTについて発がん性において線維の長さによる差異はないことを示された。

体内分布と慢性影響発現部位の解析に関して、リンパ系経路の解析を可能とするトランスジェニックマウス(Prox-1マウス)の導入、肺のリンパ管内皮間葉移行(EndoMT)に関する検討を行った。リンパ管を可視化できるリンパ管レポーターマウス:Prox1-GFPに対するナノマテリアル吸入曝露の結果、肺組織の線維化や肺胞上皮細胞の内皮間葉移行(EMT)の誘導因子であるTGF- β の受容体の発現が上昇していた。これに関連して肺胞上皮細胞のTGF- β の作用を検討したところ、EMTの分子機構の解明が可能となることを示すことができた。さらに、リンパ管レポーターマウスProx1-GFPに対する3週間NT-7吸入曝露後の肺の透明化による三次元観察により、肺組織の気管支の分岐部分においてNT-7と考えられる粒子が曝露量依存的に粒子の集積が増加することと、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。凝集

体は、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として確認された。一方、ナノマテリアル吸入曝露により肺の内皮細胞でEndoMTが誘導され、炎症反応が惹起される可能性が示唆された。EndoMTレポーター細胞を用いた検討では、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ことが考えられた。

先行研究で行われた慢性影響の研究結果の解析研究において、2年間のMWNT-7の間欠曝露実験結果の病理解析を行ったところ、先行研究で行われたNMNT-7の2年間の間欠吸入曝露試験データの解析では、免疫染色結果を踏まえてマウスにおける腺癌の誘発を確認したが、高用量群では体重増加抑制を来す曝露濃度では、発癌性が確認困難となる事が示唆された。TIPS法での慢性観察研究において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/ラットの5用量群で投与した実験は観察中であり、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。

BALF細胞の解析では、NT-7の長期暴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た。MWCNT-7の長期暴露と同様にNT-7の長期暴露によって肺胞マクロファージにおけるMMP12が肺毒性の評価マーカーとして重要であることが明らかになった。さらに、*in vitro*での反応では、MWCNT-7とNT-7でマクロファージの貪食を含めた反応性に相違があることが考えられた。

海外動向調査では、OECDの工業用ナノ材料作業部会(WPMN)及びOECDが主催するナノマテリアルの曝露評価手法に関するウェブ

ナー等の会議情報から、OECD が開発あるいは評価したナノマテリアルの職業、消費者および環境曝露の評価に利用可能と考えられるツール・モデルの使用に関する手順のガイダンスと OECD テストガイドライン No. 125 および OECD テストガイドライン No. 126 に関する情報を整理した。TG125 では個々の繊維の直径と長さをペアで測定することを新しいスタンダードプロトコルとして提案されており、TEM と SEM の両方を用いて計測することが推奨されている。TG126 では、疎水性指数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と考えられた。

本研究の主目的としての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った。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 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 multi-walled 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

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

Hojo M, Maeno A, Sakamoto Y, Ohnuki A, Tada Y, Yamamoto Y, Ikushima K, Inaba R, Suzuki J, Taquahashi Y, Yokota S, Kobayashi N, Ohnishi M, Goto Y, Numano T, Tsuda H, Alexander DB, Kanno J, Hirose A, Inomata A, Nakae D: Two-year intermittent exposure

- of a multiwalled carbon nanotube by intratracheal instillation induces lung tumors and pleural mesotheliomas in F344 rats. Part
Fibre Toxicol. 19: 38, 2022.
 doi:10.1186/s12989-022-00478-7
- Saleh D., Luo S., Ahmed HM Omnia, Alexander DB., Alexander TW., Gunasekaran S., El-gazzar AM., Abdelgied M., Numano T., Takase H., Ohnishi M., Tomono S., Randa Hussein Abd el Hady, Fukamachi K., Kanno J., Hirose A., Jiegou Xu, Suzuki S., Naiki-ito A., Takashi S., Tsuda H. Assessment of the toxicity and carcinogenicity of double-walled carbon nanotubes in the rat lung after intratracheal instillation: a two-year study. *Particle and Fibre Toxicology*, 19: 30, 2022. doi:10.1186/s12989-022-00469-8
- Tsunematsu T, Arakaki R, Sato M, Saito M, Otsuka K, Furukawa Y, Taquahashi Y, Kanno J, Ishimaru N. Exposure to Multi-Wall Carbon Nanotubes Promotes Fibrous Proliferation by Production of Matrix Metalloproteinase-12 via NF- κ B Activation in Chronic Peritonitis. *Am J Pathol.* 192:1559-1572, 2022. doi: 10.1016/j.ajpath.2022.07.009.
- Maeno A, Sakamoto Y, Hojo M, Tada Y, Suzuki J, Inomata A, Moriyasu T, Hirose A, Kemuriyama N, Miyajima K, Nakae D. A case of spontaneous Zymbal's gland carcinoma with lung metastasis in an aged Fischer 344 rat. *J Toxicol Pathol.* 2021 Oct;34(4):353-358. doi: 10.1293/tox.2021-0013. Epub 2021 Jul 23.
- Hojo M, Yamamoto Y, Sakamoto Y, Maeno A, Ohnuki A, Suzuki J, Inomata A, Moriyasu T, Taquahashi Y, Kanno J, Hirose A, Nakae D. Histological sequence of the development of rat mesothelioma by MWCNT, with the involvement of apolipoproteins. *Cancer Sci.* 2021 Jun;112(6):2185-2198. doi: 10.1111/cas.14873. Epub 2021 May 2.
- Wang Qiqi, Wang Qiong, Zhao Z., Fan J., Qin L., Alexander DB., Tsuda H., Zhao D and Xu J. Surfactant Proteins A/D–CD14 on Alveolar Macrophages Is a Common Pathway Associated With Phagocytosis of Nanomaterials and Cytokine Production. *Frontiers in Immunology*, 12: 1-13 (2021) doi: 10.3389/fimmu.2021.758941
- Cui H, Soga K, Tamehiro N, Adachi R, Hachisuka A, Hirose A, Kondo K, Nishimaki-Mogami T. Statins repress needle-like carbon nanotube- or cholesterol crystal-stimulated IL-1 β production by inhibiting the uptake of crystals by macrophages. *Biochem Pharmacol.* 2021 Jun;188:114580. doi: 10.1016/j.bcp.2021.114580. Epub 2021 Apr 28.
- 2. 学会発表**
- 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 X* (2023, 7. 17-20. Taipei)
- 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. 15-19, Manchester) (*Annals of Work Exposures and Health.* 67. i43-i44. doi: 10.1093/annweh/wxac087.105.)
- 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).*
- 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、微粒子毒性の in vivo 吸入毒性試験方法と課題－吸入毒性試験ガイドラインの変遷と吸入ばく露実験装置の開発について－、日本薬学会第 144 年会(横浜、2024.3.30)
- 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
- 三浦伸彦、横田理、吉岡弘毅:二酸化チタンナノ粒子が示す二相性の精巣機能障害、メタルバイオサイエンス研究会 2023、岐阜 (2023.10.5-6)、ポスター
- 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)
- 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 CENTURY: 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, 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
- 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
- Taquahashi Y, Yokota S, Tsuji M, Morita K, Suga K, Hojo M, Hirose A, Kanno J, Preliminary report on a two-year, 4-week-interval intermittent whole body inhalation study of the multi-walled carbon nanotube (MWNT-7) in male mice, SOT 2023 Abstract Number/Poster Board number: 4715/ P621 (2023.3.22)
- 高橋 祐次、動物を用いない新たなリスク評価アプローチ法の開発: In vivo 毒性試験の経験に基づく NGRA による安全性評価手法に関する考察、日本動物実験代替法学会 第 35 回大会、招聘講演 (2022.11.20)
- 高橋祐次、横田理、広瀬明彦、菅野純: ナノマテリアルの慢性吸入ばく露試験法の効率化、第 49 回日本毒性学会学術年会、北海道 (2022.6.30) シンポジウム
- 菅野純: 粉体吸入実験装置の考察. 第 13 回粉末吸入剤研究会シンポジウム、(2022.11.24)、ANA クラウンプラザホテル富山、シンポジウム、口演.
- 菅野純: ナノ毒性学—粉体毒性学からの複合毒性領域としての展開—Nanomaterials! Let's broaden our minds, Asbestos. 筑波大学大学院、(2022.10.12)、茨城、講義.
- Akiko OHNO, Asuka NISHIDA, Kazutoshi IJIMA, Akihiko HIROSE, Takao ASHIKAGA, in silico elucidation of physicochemical properties factor on activation of THP-1 cells of TiO₂ NP, 264th ACS National Meeting & Exposition, August 21-25, 2022 (Chicago)
- 大野 彰子, 西田 明日香, 飯島 一智, 広瀬明彦, 足利 太可雄, THP-1 細胞への活性化に及ぼす二酸化チタンナノ粒子の物理化学的特性因子, 第 49 回日本毒性学会学術年会, 2022 年 6 月 30 日(木)—7 月 2 日(土)(札幌)
- 横田理、関根尚、市瀬孝道、藤ノ木政勝、若山友彦、北嶋聡、押尾茂: ナノ銀の妊娠曝露により生じる、雄性生殖系列を介した継世代・多世代影響、第 41 回アンドロロジー学会、福島 (2022.6.3)
- 前野愛、北條幹、坂本義光、湯澤勝廣、長澤明道、生嶋清美、山本行男、平松恭子、矢野範男、大貫文、稲葉涼太、鈴木仁、横田理、高橋祐次、小林憲弘、菅野純、広瀬明彦、猪又明子、中江大. 多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の2年間間欠気管内反復投与によるラット発がん性試験. 第 49 回日本毒学会学術年会(2022.6.30)、札幌、ポスター
- 北條幹: ラット気管内投与法によるナノマテリアルの発癌性の評価手法の発展と課題. 第 49 回日本毒学会学術年会(2022.6.30)、札幌、シンポジウム、口演
- 前野愛、北條幹、坂本義光、湯澤勝廣、長澤明道、平松恭子、大貫文、稲葉涼太、鈴木仁、横田理、高橋祐次、小林憲弘、広瀬明彦、猪又明子、中江大. 多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の2年間間欠気管内投与によるラット肺腫瘍及び中皮腫の発生. 第 39 回日本毒学会学術年会(2023.1.25-26)、船堀、ポスター
- Saleh D., Alexander TW., Alexander DB., Abdelgied M., El-gazzar AM., Ahmed HM Omnia, Gunasekaran S., Takase H., Naiki-Ito A., Suzuki S., Gi M., Taquahashi, Y., Hirose A., Kanno J., Tsuruoka S., Tsuda H. The toxic and carcinogenic potential of three different sizes of double-walled carbon nanotubes in the rat lung after intratracheal instillation. ICT 2022 THE XVITH INTERNATIONAL CONGRESS OF TOXICOLOGY、オランダ 2022.9.18-22
- Takaaki Tsunematsu, Rieko Arakaki, Mami Sato, Kunihiro Otsuka and Naozumi Ishimaru: Exposure to Multi-Wall Carbon Nanotubes Promotes Fibrous Proliferation by Production of Matrix Metalloproteinase-12 via NF- κ B Activation in Chronic Peritonitis, 第 51 回日本免疫学会学術集会(2022.12.7-9)熊本市、口演
- Naozumi Ishimaru, Kazuki Fukuda, Takaaki Tsunematsu, Rieko Arakaki, Mami Sato, Kunihiro Otsuka: Exposure to carbon nanotubes sustains chronic inflammation by

- macrophage activation via MMP-12. 第 111 回日本病理学会総会 (2022.4.14-16) 神戸市、口演
- 高橋 和樹, 勝又 寿枝, 小林 美穂, 池田 行徳, 篠原 満利恵, 前田 健太郎, 吉松 康裕, 松永 行子, 渡部 徹郎. 内皮間葉移行 (EndoMT) レポーター内皮細胞を用いた EndoMT の可視化とがん細胞の脈管内侵入機序の解明. 第 46 回日本リンパ学会総会 東京 2022.06.04、口演
- 勝又 寿枝, 高橋 和樹, 小林 美穂, 前田 健太郎, 紀室 志織, 松永 行子, 吉松 康裕, 渡部 徹郎. 内皮間葉移行 (EndoMT) レポーター内皮細胞を用いた EndoMT 遷移段階の検出. 第 46 回日本リンパ学会総会 東京 2022.06.03、口演
- 横田理、河上強志、久保田領志、三浦伸彦、北嶋聡. In vivo 毒性試験のための二酸化チタン分散方法の検討. メタルバイオサイエンス研究会 2021. 神奈川. 2021.10.28. ポスター
- 前野愛、北條幹、坂本義光、湯澤勝廣、長谷川悠子、長澤明道、生嶋清美、平松恭子、海鉦藤文、山本行男、安藤弘、田中和良、鈴木仁、猪又明子、守安貴子、高橋祐次、横田理、小林憲弘、広瀬明彦、中江大. 多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の 2 年間ラット気管内反復投与試験における投与器具の違いによる毒性の比較: 1 年経過時点での報告. 第 48 回日本毒性学会学術年会. 兵庫. 2021.6. ポスター
- 北條 幹、ラット反復気管内投与による多層カーボンナノチューブの発がん性評価手法の検討. 日本薬学会第 142 年会、オンライン (2022.3.26)
- Taquahashi Y, Yokota S, Morita K, Tsuji M, Suga K, Kuwagata M, Hojyo M, Hirose A, Kanno J. Preliminary report of the two-year, every 4-week-interval intermittent whole body inhalation study of the multi-walled carbon nanotube in male mice, the 61st Annual Meeting of the Society of Toxicology, Virtual, March 27-31, 2022
- Horibata K, Hojo M, Yokota S, Taquahashi Y, Kobayashi N, Takasawa H, Hamada S, Sugiyama K, Honma M. In Vivo Genotoxicity Assessment Of Multi-Walled Carbon Nanotubes Using The Optimized Lung Micronucleus Assay, The Environmental Mutagenesis and Genomics Society 2021 Annual meeting, Virtual Meeting, September 22-25, 2021
- 菅野純、北嶋聡、相崎健一、齊藤洋克、種村健太郎: 肺の遺伝子発現応答と毒性機序予測解析. 第 48 回日本毒性学会学術年会、(2021.7.9)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演
- 石丸直澄、新垣理恵子、常松貴明、高橋祐次、菅野純: ナノマテリアルの吸入曝露による肺免疫応答と線維化の分子機構. 第 48 回日本毒性学会学術年会、(2021.7.9)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演
- 菅野純、高木篤也、相崎健一、北嶋聡: 異物発癌に関わるトランスクリプトミクス特性. 第 48 回日本毒性学会学術年会、(2021.7.8)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演
- 相崎健一、小野竜一、菅野純、北嶋聡: トランスクリプトミクスから見た発癌物質の特性. 第 48 回日本毒性学会学術年会、(2021.7.8)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演
- Dina Mourad Saleh, Shengyong Luo, David B. Alexander, Ahmed M. EL-Gazzar, Mohammed Abdelgaied, Omnia Hosny Mohammed, William T Alexandre, Sivagami Gunasekaran, Takamasa Numano, Hiroshi Takase, Makoto Ohnishi, Satoru Takahashi, Hiroyuki Tsuda. Comparative toxicity and carcinogenicity pulmonary study of double walled carbon nanotubes (DWCNT) with multi walled carbon nanotubes-7 (MWCNTS -7) in rat model. 第 48 回日本毒性学会学術年会、神戸 (2021 年 7 月)
- Dina Mourad Saleh, Omnia Hosny Mohamed Ahmed, David B. Alexander, William T. Alexander, Sivagami Gunasekaran, Takamasa Numano, Hiroshi Takase, Makoto Ohnishi, Satoru Takahashi, Masako Yudasaka, Ryota Yuge, Hiroyuki Tsuda Short term pulmonary toxicity study of carbon nano-horns (CNH) and carbon nano-brushes (CNB) using intra tracheal method 日本毒性病理学会、神戸 (2022 年 1 月)

Arakaki R, Tsunematsu T, Ishimaru N.

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

Dina Mourad Saleh, Omnia Hosny Mohamed

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

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

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

Katarzyna A. Inoue, Kazuki Takahashi,

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

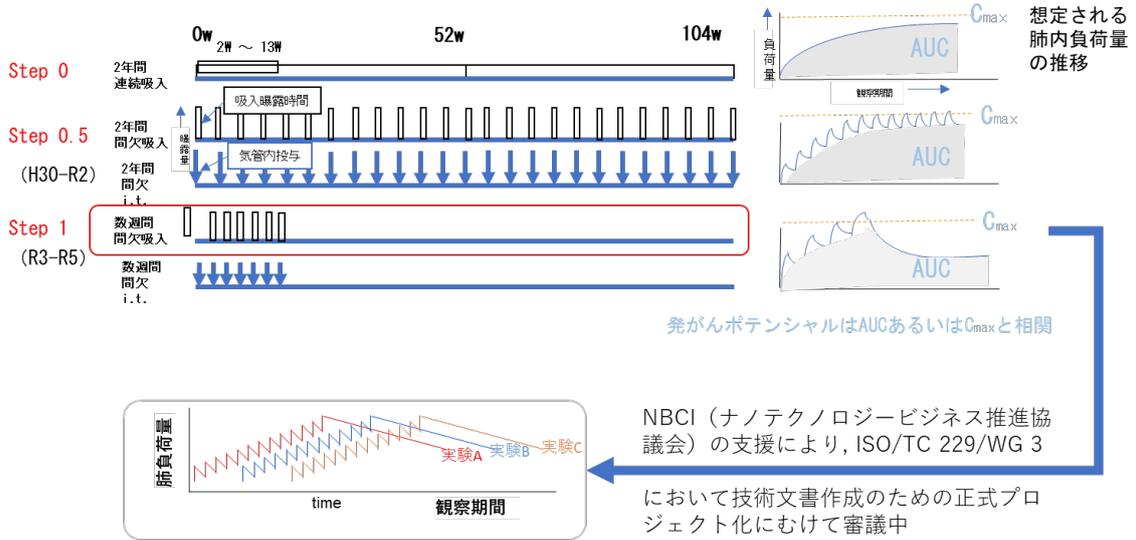
渡部 徹郎、Roles of TGF- β signals in the regulation of proliferation and migration of cancer cells、第 80 回日本癌学会学術総会、横浜、2021.10.02、口演

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

G. 知的財産権の取得状況

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

2年間の連続吸入試験との同等性を検証するための間欠型曝露プロトコルの開発Step



↑ 同じ設備で3つの慢性実験を同時に進行すると
→ 一件あたりの慢性実験の期間を短期化できる

図1 慢性吸入曝露試験の最適化とISO標準化計画

別添4

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

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

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Maeno A, Sakamoto Y, Hojo M, Tada Y, Suzuki J, Inomata A, Moriyasu T, Hirose A, Kemuriyama N, Miyajima K, Nakae D..	A case of spontaneous Zymbal's gland carcinoma with lung metastasis in an aged Fischer 344 rat.	<i>J. Toxic. Pathol.</i>	34(3)	353-358	2021
Hojo M, Yamamoto Y, Sakamoto Y, Maeno A, Ohnuki A, Suzuki J, Inomata A, Moriyasu T, Taquahashi Y, Kanno J, Hirose A, Nakae D.	Histological sequence of the development of rat mesothelioma by MWCNT, with the involvement of apolipoproteins.	<i>Cancer Sci.</i>	112(6)	112(6)	2021
Wang Qiqi, Wang Qiong, Zhao Z., Fan J., Qin L., Alexander DB., Tsuda H., Zhao D and Xu J.	Surfactant Proteins A/D-CD14 on Alveolar Macrophages Is a Common Pathway Associated With Phagocytosis of Nanomaterials and Cytokine Production.	<i>Frontiers in Immunology</i>	12	1-13	2021
Horibata K, Takasawa H, Hojo M, Taquahashi Y, Shigano M, Yokota S, Kobayashi N, Sugiyama KI, Honma M, Hamada S.	<i>In vivo</i> genotoxicity assessment of a multiwalled carbon nanotube in a mouse <i>ex vivo</i> culture.	<i>Genes Environ.</i>	44	24	2022
Saleh D., Luo S., Ahmed HM Omnia, Alexander DB., Alexander TW., Gunasekaran S., El-gazzar AM., Abdelgied	Assessment of the toxicity and carcinogenicity of double-walled carbon nanotubes in the rat lung after intratracheal instillation: a two-year study.	<i>Particle and Fibre Toxicol.</i>	19	30	2022

別添4

M., Numano T., Takase H., Ohnishi M., Tomono S., Randa Hussein Abd el Hady, Fukamachi K., Kanno J., Hirose A., Jiegou Xu, Suzuki S., Naiki-ito A., Takashi S., Tsuda H.					
Hojo M, Maeno A, Sakamoto Y, Ohnuki A, Tada Y, Yamamoto Y, Ikushima K, Inaba R, Suzuki J, Taquahashi Y, Yokota S, Kobayashi N, Ohnishi M, Goto Y, Numano T, Tsuda H, Alexander DB, Kanno J, Hirose A, Inomata A, Nakae D.	Two-year intermittent exposure of a multiwalled carbon nanotube by intratracheal instillation induces lung tumors and pleural mesotheliomas in F344 rats.	<i>Part Fibre Toxicol.</i>	19	38	2022
Tsunematsu T, Arakaki R, Sato M, Saito M, Otsuka K, Furukawa Y, Taquahashi Y, Kanno J, Ishimaru N.	Exposure to Multi-Wall Carbon Nanotubes Promotes Fibrous Proliferation by Production of Matrix Metalloproteinase-12 via NF- κ B Activation in Chronic Peritonitis.	<i>Am J Pathol.</i>	192	1559-1572	2022
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.	<i>J. Toxicol. Sci.</i>	48(7)	411-420	2023
Shimizu M, Hojo M, Ikushima K, Yamamoto Y, Maeno A, Sakamoto Y, Ishimaru N, Taquahashi Y, Kanno J,	Continuous infiltration of small peritoneal macrophages in the mouse peritoneum through CCR2-dependent and -independent routes during	<i>J. Toxicol. Sci.</i>	48(12)	617-639	2023

別添4

Hirose A, Suzuki J, Inomata A, Nakae D.	fibrosis and mesothelioma development induced by a multiwalled carbon nanotube, MWNT-7.				
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
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