

令和2年度厚生労働行政推進調査事業費補助金
(化学物質リスク研究事業)

I. 総括研究報告書

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

研究代表者: 広瀬 明彦 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部長

研究要旨

本研究はナノマテリアル曝露により最も懸念されている体内蓄積に伴う慢性影響についてより効率的な定量的リスク評価手法を開発する為に、既に報告されている多層カーボンナノチューブ(MWCNT)のうちのMWNT-7による2年間の慢性吸入試験と同レベルの評価が可能な代替慢性試験法の検討を行うことを目的としている。また、遺伝毒性や免疫影響に関する指標についても今回開発する慢性試験プロトコルへの適用性を検証すると共に、リスク評価に関する国際動向を把握することを目的としている。

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

よりも大きく、今後も継続的に情報収集を行う必要があると考えられた。

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

研究分担者

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

A. 研究目的

新素材としての産業用ナノマテリアルについては、新しい物性に伴う未知のヒト健康影響の懸念に対して適正な安全性評価手法の確立が急務となっているが、既に10年以上にわたり OECD や各国が各

種研究を精力的に行ってきたにもかかわらず、未だにナノマテリアル曝露による最も懸念されている体内蓄積に伴う慢性影響を検討した慢性実験はほとんど行われてきていない。特に近年では、動物試験を用いない *in vitro* 試験系を中心とした評価法の確立が重要視されているが、肝心の *in vivo* 影響の評価や AOP が確立していなければ、信頼性の高い *in vitro* 試験系の開発は不可能である。我々は、先行する研究において当初より慢性影響を中心とした *in vivo* 試験研究を進めてきており、発がん性を主とした慢性影響の評価法を検討してきた。一方、定量的な慢性吸入曝露によるリスク評価には、多層カーボンナノチューブ (MWNT-7) で報告されたように2年間の慢性吸入試験を行うことが必須であるが、現実的にあらゆるナノマテリアルで慢性吸入試験を行うことはできない。その為、慢性影響を効率的に評価できる評価手法の確立は急務である。そこで、先行研究で開発してきたナノマテリアル分散法および気管内投法を用いて、先ず通常の2年間の連続吸入曝露試験法を代替できる試験法として、短期間曝露と慢性観察による慢性影響評価法を確立することを本研究班の目的とした。

理想的な代替試験法としては、短期の

曝露での連続吸入曝露試験法と同等性の結果を得ることができることでえあると考えられる。しかし、短期曝露の試験と2年間連続曝露の試験のNOAELを単純に比較することでは、試験条件の違いがあまりにも大きいので、数字上の相関性を示すのみで、リスク評価への有用性を示すには限界があると考えた。そこで、本研究では、まずは2年間の間欠吸入曝露と、2年間の連続吸入曝露ではどのくらい異なるのかを調べて、連続曝露と間隔を開けた曝露との同等性について検討することとした。つまり、一日あたりの投与量、あるいは総投与量、あるいは肺内の負荷量のいずれが発がん性の強さと相関するかについて調べることを目的としています。現在時点で吸入曝露によるナノマテリアルの慢性試験データが利用出来るMWCNTを中心として吸入曝露法と気管内曝露法の比較研究を行う。

本研究における試験条件の違いと毒性の違いを検証した結果を用いて、間欠吸入曝露の回数をどのくらい短くすれば、2年間の間欠気管内投与と比較できるかの検証を継続研究で行うことにより、将来的に短期吸入曝露の試験と2年間連続吸入曝露の試験の定量的な同等性を明らかにすることができると考えている。

また、将来的なスクリーニング試験法やin vitro試験法を開発する為には、AOP (Adverse Effect Pathway)の確立(同定)が必要であり、慢性曝露によるAdverse Effectに至る生体反応のキーとなる影響指標をendpointとして試験系を開発しておけば、短期曝露による慢性影響を評価するために有用な試験法の開発に寄与できると考えられるため、発がん性や炎症反

応に関連する遺伝毒性や免疫毒性指標に関する研究も同時に行うことを目的とする。

B. 研究方法

本研究班は、吸入曝露法と気管内曝露法の比較研究をとおして慢性吸入曝露試験の代替性を模索する研究と、慢性影響評価に必要なAOPに基づいた短期間曝露による慢性影響指標に関する研究、及び国際動向収集と共に研究班の成果をOECD等に提案していくことを目指す研究体制で構成している。

慢性吸入曝露試験の代替手法検討:

H30年度の予備試験の結果を参考にして、国立衛研に新たに設置したTaquann全身曝露吸入装置(ver.3.0)を用い、53 μ mメッシュ濾過したMWNT-7(T-CNT7#53)の2年間吸入曝露実験を行った。C57BL/6NcrSLC雄性マウスを使用し、12週齢時に吸入曝露を実施した。曝露は4週間に一回の頻度で実施し、一日当たりの曝露時間は6時間とした。群構成は、対照群、低濃度群(目標濃度2mg/m³)、高濃度群(目標濃度6mg/m³)の3群構成とし、各群50匹の動物を実験に供した。エアロゾルの特性は、質量濃度、エアロゾル粒子数(CPC)、空気力学的質量中央値(MMAD)の測定を行った(高橋)。R2年度に2年目の最終定期解剖を実施した。解剖に際して、肺負荷量測定用の肺サンプル、免疫機能解析用のBALFの採取、病理評価のサンプリング、血液検査、血液生化学検査を実施した。病理標本用の動物は、気道内のMWCNTの人為的移動を避けるため、気管からの固定液の注入は行わず、点滴回路を用いた灌流装置

により灌流固定し、常法によりパラフィン包埋切片を作製、HE及び特殊染色により病理組織学的評価を(菅野)。

ラット気管内投与試験にもTaquann処理(53 μ mメッシュ)したMWNT-7(T-CNT7#53)を用いた。200°Cで2時間処理したMWCNTに、0.1% Tween80含有生理食塩水を加え超音波浴槽で30分以上分散させた。低用量の試料は0.125mg/mL、高用量の試料は0.5mg/mLの濃度にそれぞれ調製した。経口ゾンデあるいはスプレー式ゾンデにより、4週間に1度、合計26回の投与を実施した。F344雄性ラットにMWCNT懸濁液を、低用量群には、0.125mg/kg/回、高用量群及び高用量スプレー群には0.5mg/kg/回の用量で投与した。途中解剖及び実験開始104週時点で生存した全個体について、病理組織学的評価した。また、肺のMWCNTの含有量を大西法により測定した(北條、広瀬)。

一方、長さの異なる二層ナノチューブ(DWCNT)(15, 7, 1 μ m)についてPOTの場合と同じプロトコルにて、各群14~16匹として1匹あたりの2週における全投与量は 22×10^{12} 本/ラットとなるように調整して、投与終了後6時間、4、52、104週後に屠殺し、慢性影響の比較を行った(津田)。

慢性影響指標に関する研究:

発がん性の指標となる遺伝毒性試験について、小核の出現と消失の時間経過による影響についての先行研究に基づき、*ex vivo*培養法を応用した気管内投与下における*in vivo-in vitro*法を用いた肺小核試験法を実施した。0.1% Tween 80を含む生理食塩液に超音波で分散したMWCNT-7をマウスに100 μ L/匹(0.05 mg/匹)で単回

気管内投与し、48時間後に血液および肺を採材した。また、陽性対照には遺伝毒性物質であるEthyl methanesulfonate(EMS)を200 mg/kgの用量で2日連続腹腔内投与し、最終投与後24時間に採材した。得られた血液検体および肺を用いてそれぞれ幼若赤血球小核試験および肺小核試験によりMWCNT-7の遺伝毒性を評価した(堀端)。

免疫系への吸入曝露による慢性影響については、MWNT-7の2年間の吸入曝露実験の24ヵ月曝露の解剖から得られたサンプルを用いて肺を中心とした免疫細胞分画あるいは各種遺伝子発現に関して検討を加えた。また、*in vitro*の実験系として、RAW264.7(マウスマクロファージ細胞株)およびNIH3T3細胞(マウス線維芽細胞株)を用いてMWCNT-7曝露による繊維化の機転を探索するとともに、B6マウスあるいはNF- κ B1KOマウスを用いたMWCNT-7誘導性慢性腹膜炎モデルによる線維化に至る慢性炎症の分子機序を検討した(石丸)。感染性への影響評価については、MWNT-7のTaquann法による複数回(3回)の吸入曝露マウスに対してRSV感染実験を行った。方法としては、BALB/cマウスに対して、RSV感染の7、5および3日前にMWNT-7を0, 3 および6 mg/m³, 6時間吸入曝露を実施した。続いてRSVを経鼻感染させ、回復期である21日後の肺胞洗浄液(BALF)中のサイトカイン・ケモカイン定量や肺病理組織学的な解析を行った(渡辺)。一方、炎症反応の初期応答であるマクロファージでのインフラマソーム活性化を介するIL-1 β 産生については、ナノマテリアルの取込への関与が予想されるスキャベンジャー受容体MSR1の役割を解析し

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

国際動向に関する研究:

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

<倫理面への配慮>

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

C. 研究結果

慢性影響評価手法検討:

MWNT-7 吸入曝露実験では、目開き 53 μm の金属製フィルターを用いて Taquann 法処理した MWNT-7 (T-CNT7#53) を、C57BL/6NcrSLC 雄性マウスに、対照群、低濃度群、高濃度群の 3 群構成で 4 週毎に 6 時間/日の 2 年間の吸入曝露を行った。T-CNT7#53 低濃度群の全身曝露吸入実験における全体の平均質量濃度は $2.7 \pm 0.1 \text{ mg/m}^3$ 、高濃度群では $5.2 \pm 0.2 \text{ mg/m}^3$ であり、目標濃度に対して低濃度群では 86%、高濃度群では 83% の値であった。Taquann 全身曝露吸入装置 ver 3.0 における T-CNT7#53 の値は 400~500nm と考えられた。

体重は初回曝露後 54 週まで、対照群と

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

2 年間のラット気管内反復投与試験では、実験開始 80 週頃から、高用量群及び高用量スプレー群で、胸腔内中皮腫による瀕死例・死亡例が多数発生した。最終解剖時、高用量群および高用量スプレー群の体重は有意に低下し、肺全葉の重量は、いずれの MWCNT 投与群においても C 群に対して有意に増加した。組織学的には、MWCNT 繊維の沈着や MWCNT を食したマクロファージの凝集が肺実質全体にび慢性に認められ、MWCNT の沈

着部位に関連して、II 型肺胞上皮細胞の反応性過形成が認められた。腫瘍性病変として、肺実質では腺腫と腺癌が、胸腔内では中皮腫が観察された(図、表)。腺腫と腺癌の両者を合わせた発生頻度は、高用量群で有意に増加し、胸腔内中皮腫の発生頻度は、高用量群及び高用量スプレー群で有意に増加した(表)。最終解剖時の低用量群、高用量群及び高用量スプレー群の、肺内の MWCNT 量はそれぞれ 920 ± 240 (Mean \pm S.D.) $\mu\text{g/Lung}$ 、 3615 ± 902 $\mu\text{g/Lung}$ 及び 3902 ± 350 $\mu\text{g/Lung}$ であった(図)。

TIPS 法による POT と酸化チタンの比較では、2 週投与+4週観察群において、投与肺と胸膜における炎症と障害作用は球状 TiO₂ より POT により顕著な傾向が見られた。52 週では POT (0.5mg) と MWCNT-7 における肺組織と胸腔洗浄液における炎症像、M ϕ 増加、肺胞上皮、胸膜中皮の 8-OHdG 値、PCNA 値、CCL2 レベルの有意の増加が見られた。104 週では、肺胞上皮過形成・腺腫・腺がんの合計および胸膜中皮過形成と悪性中皮腫の合計頻度において POT (0.25 と 0.5mg 合計) と MWCNT-7 群で有意の増加が見られた。長さの異なる DWCNT 曝露による慢性影響は現在解析中である。陽性対照の MWCNT-7 では 104 週に達する前にすべてのラットは胸膜悪性中皮腫で死亡している。また、1.5、7.0 および 15 μm 投与群の DWCNT の肺発がん性は 1.5~15 μm の範囲で発がん性があると考えられる。15 μm 群では悪性中皮腫が 2 例見られ、生物学的に有意と考える。また MWCNT-7 の胸膜中皮における強い発がん性が再確認された。

慢性影響指標に関する研究:

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

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

は、RSV 感染のみでは肺炎はほぼ終息していたのに対して、曝露マウスではカーボン貪食マクロファージの集束や肺胞壁・膠原繊維の肥厚など明確な増悪肺炎像が認められ、特に高用量曝露で顕著であった。さらに曝露マウス気道上皮での杯細胞等での粘性多糖の過分泌(PAS 染色陽性)は、RSV 感染で亢進していることも見出した。この様に MWNT-7 吸入曝露により RSV 肺炎は回復期でも継続亢進しており、最盛期(感染 5 日後)で見出した肺炎マーカーの上昇をよく反映した結果が得られた。マクロファージにおいて MWCNT による NLRP3 インフラマソーム活性化・IL-1 β 分泌応答におけるスキャベンジャー受容体 MSR1 の役割を解析した。特異的 siRNA 処理により MSR1 発現はほぼ完全に抑制されたが、MWCNT 刺激による IL-1 β 産生は最大でも 30%に止まった。抑制効果は MWCNT のサイズにより異なり、より長い MWCNT では軽度の抑制が認められたが、短いものでは効果は無かった。

国際動向に関する研究:

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

。

D. 考察

慢性影響評価手法検討に関する研究に関しては、まず、H30 年度末から開始した MWNT-7 によるマウス Taquann 全身吸入および Taquann 処理 MWNT-7 のラット気管内投与の 2 つの反復曝露試験について 2 年間の曝露試験を終了した。得られたデータから、慢性の連続吸入試験の肺内負荷量と同レベルにすることが可能であることが示された。

Taquann 全身曝露吸入装置(ver.3.0)を用いた吸入曝露実験については、汎用性が高く、少量の検体で全身曝露吸入実験が可能であることが特徴である。カートリッジ操作を自動化する技術を導入し、OECD ガイドラインで規定されている 6 時間の曝露実験を可能とした。MMAD は、計算値に約 10 倍の幅があったが、 σ_g の大きな値を外れ値とし、小さい測定値に注目すると 400nm から 500nm の範囲にあると考えられた。この値は、OECD TG451 により実施された先行試験(Particle Fibre Tox 2016)における MMAD(1.3~1.4 μm 、 σ_g 2.6~3.0)に比較すると約 1/3 程度であり、より微細なエアロゾルであると考えられる。MWNT-7 の 2 年間の間欠吸入曝露実験において、最終解剖を行ったが、病理組織標本は作製中であるため、最終的な結論には至っていないが、以下の事が示された。Kaplan-Meier 解析では、死因を考慮せずに解析を行った。その結果、Log-rank 検定では、曝露による影響は認められていない。今後の病理組織評価によって死因を分類することができれば、検体による影響を明らかにできる可能性がある。肺の外観は、曝露濃度依存的に灰

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

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

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

一方、先行研究から引き続き行っている気管内投与法のプロトコルとしての TIP 法について、長さの異なる DWCNT について、これまでの報告で 0.7µm の MWCNT の腹腔内投与では発がん性はみられなかった報告 (Muller, 2009) から、1.5、7.0、15µm の DWCNT について TIPS 投与を行った。実験した長さの範囲 (1.5 ~ 15µm) で発がん性は認められたが、発がん性あるいはその強度において長さによる明らかな差異はなかった。

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

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

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

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

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

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

以上、今年度の成果としては、間欠曝露型の吸入及び気管内投与の慢性実験について、ほぼ順調に一年を経過し、2年目に入ったところである。チタン酸カリウムや二層ナノチューブの慢性影響の確認と免疫系における慢性マーカーの確認や感染性への吸入曝露の影響とマクロファージ(*in vitro*)を用いた慢性影響のメカニズム解析を行うことができたと考えられる。

E. 結論

慢性影響に関する研究に関して、2年間の慢性吸入毒性試験と同レベルの肺内負荷量を達成するために短期間曝露の慢性観察試験のプロトコルを確立し、2年間の間欠曝露試験(4週毎に1回曝露)を行った。Taquann 全身曝露吸入装置 Ver.3.0 を用いての T-CNT7#53 の2年間の間欠吸入曝露実験を実施し 24 ヶ月の最終期解剖を実施した。群間に死亡率の差は認められなかった。肺の外観は、曝露濃度依存的に灰白色から灰色を呈して腫大し、肺重量が増加した。肉眼的観察において L 群に 2 例に肺がんを示唆する病変が観察された。ラットへ 4 週間に 1 度、合計 26 回の気管内投与を 2 年間実施した結果では、用量依存的に肺腫瘍および胸膜中皮腫が誘発された。Kasai *et al.* 2016 の吸入曝露試験と同様の AUC 形状での反復曝露により、同程度の肺腫瘍が見られたため、代替法として有用と考えられた。TIPS 法による長さの異なる DWCNT 曝露による慢性影響では実験した長さの範囲(1.5~15 μ m)では発がん肺発がんが見られたが長さによる明らかな差異はなかった。

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

盾せず、全身吸入曝露および気管内投与での MWCNT-7 による遺伝毒性の発現形態が同様であることが示された。免疫ネットワークへの影響については、MWCNT-7 の全身吸入曝露の長期曝露(24 ヶ月)後の BALF 細胞の肺胞マクロファージの割合が高濃度の MWCNT-7 曝露で増加するとともに、脾臓あるいはリンパ節など全身のマクロファージ分化にも影響が生じることが示された。加えて、*in vitro* の実験系および腹腔内投与による慢性腹膜炎モデルの系により MWNT-7 曝露によるマクロファージによる MMP-12 を介した慢性炎症の機転が示された。一方、感染性に対する影響としては、Taquann 法による MWNT-7 の複数回の吸入曝露により、RSV 感染回復期での影響を感染病態変化として確認し、これまで見出した CCL5 等のマーカー変動が MWNT-7 の感染応答への影響指標として有用である可能性を示した。*In vitro* メカニズム解析研究において、MWCNT 刺激による IL-1 β 産生へのスカベンジャー受容体 MSR1 の寄与は MWCNT の物性により異なったが、大きな寄与は無かった。

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

以上、間欠曝露型の吸入及び気管内投与の慢性実験について、曝露実験を終

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

F. 研究発表

1. 論文発表

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

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

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

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

2. 学会発表

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Horibata K, Takasawa H, Taquahashi Y, Yokota S, Hamada S, Honma M: In Vivo Genotoxicity Assessment Of Multi-Wall Carbon Nanotubes Using Lung Micronucleus Assay. Environmental Mutagenesis and Genomics Society 51st Virtual Annual Meeting. On Line (2020.9)

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

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

石丸直澄 自己免疫疾患モデルを用いた発症機序の解明と治療戦略 東京工業

大学化学生命科学研究所ウェブ講演
会 2021.1.28(ウェブ)

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

G. 知的財産権の取得状況

1. 特許取得(出願中)

特許出願; 柴田眞利、菅野 純、生田達
也、鶴田祐吾、高橋祐次: 吸入曝露
試験用カートリッジ、試験物質供給
装置及び吸入曝露試験装置 特願
2018-81836、2019.4.20

特許出願; 柴田眞利、菅野 純、生田達
也、鶴田祐吾、高橋祐次: 試験物
質供給装置及び吸入曝露試験装
置 特願 2018-81837、2019.4.20

2. 実用新案登録 (該当なし)

3. その他 (該当なし)

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

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

腫瘍を発症した個体数

カッコ内は割合 (%)

**: $p < 0.01$ Fisherの直接確率検定

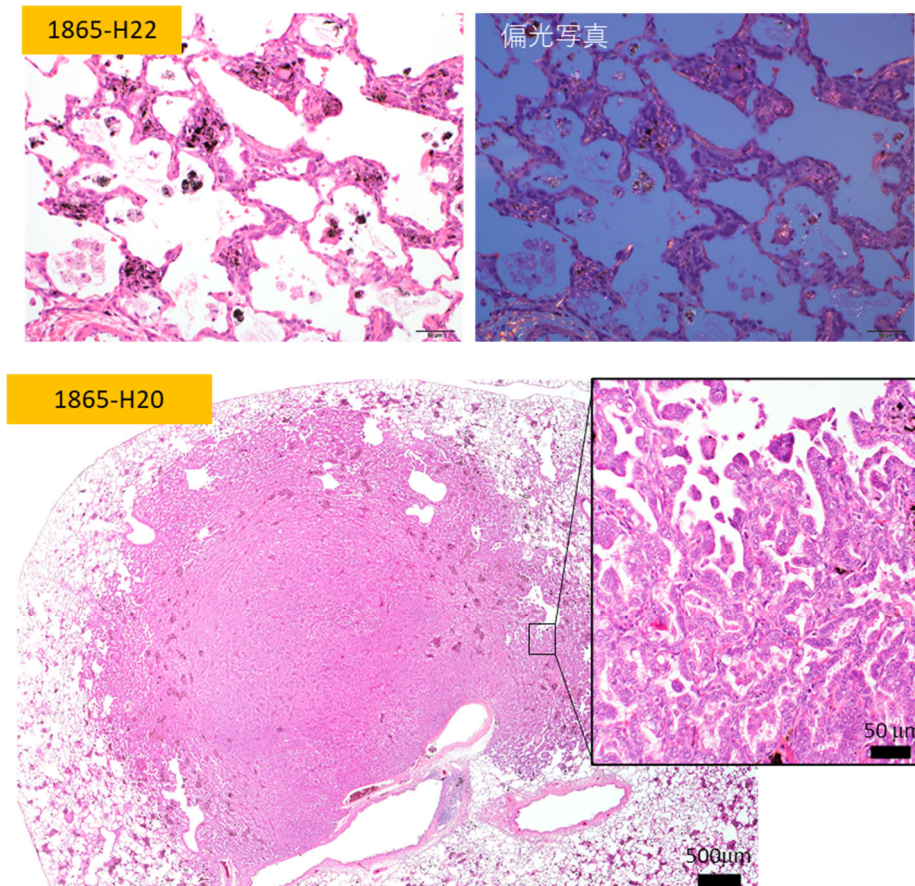


図 1. ラット 2 年間反復気管内投与試験における肺組織の病理像 ※いずれも高用量群
 上：肺胞領域のマクロファージ集簇および肉芽腫性炎症
 下：肺腺癌

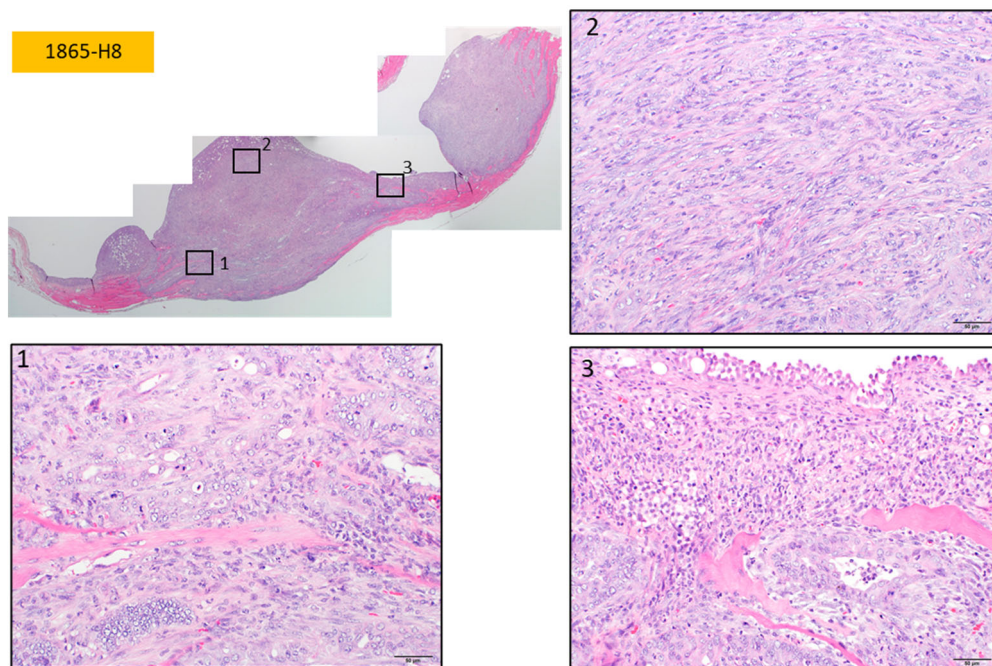


図 2. ラット 2 年間反復気管内投与試験において観察された中皮腫像（横隔膜）高用量群

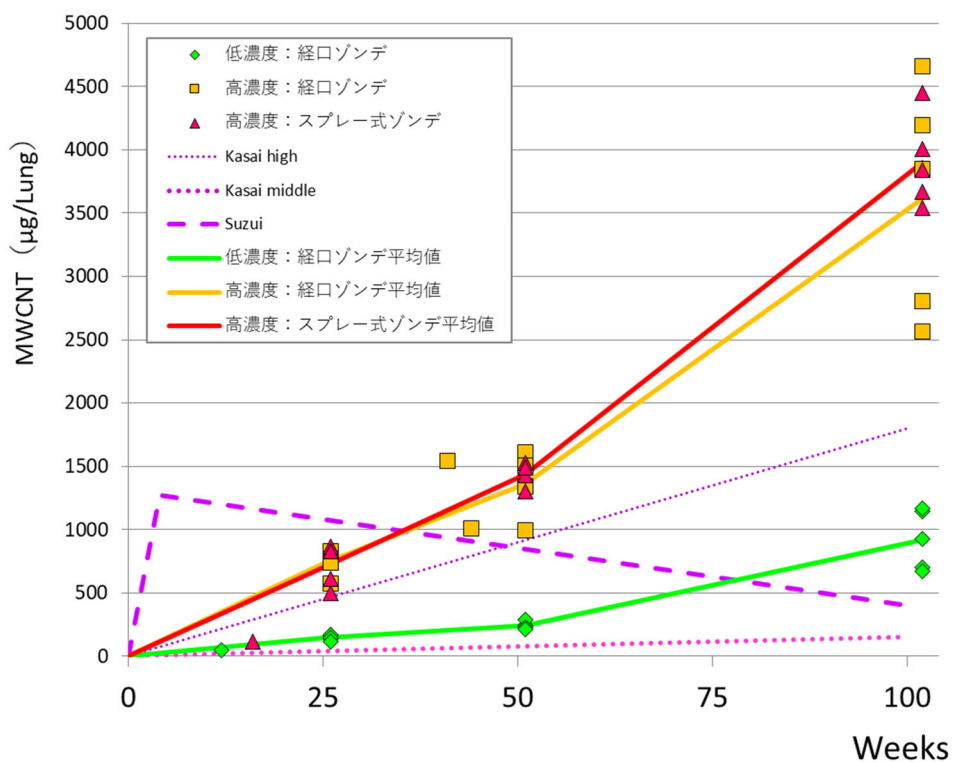


図 3. ラット 2 年間反復気管内投与試験における MWCNT 肺負荷量の推移
 ※比較のため、Kasai *et al.* 2016 及び Suzui *et al.* 2016 の結果も示す