

総合研究報告書（H30 年度－R2 年度）
（H30-化学-指定-004）

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、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がない上に、定量的にリスク評価に必要な慢性吸入曝露は多層カーボンナノチューブ(MWNT-7)による報告のみである現状を鑑み、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開発を行うことを目的としている。また、これまでに他のナノマテリアルで検討してき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曝露試験プロトコルへの適用性を検証すると共に、本研究班の研究成果をもって本代替法の有用性を国際的に発信していくことを目的としている。

慢性影響に関する研究に関して、代替試験法として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間欠型曝露の慢性観察試験のプロトコルを確立し、2年間のMWNT-7曝露試験(4週毎に1回曝露)を行った。Taquann 全身曝露吸入装置を用いた吸入曝露実験については、C57BL/6NcrSLC 雄性マウスを使用し、12週齢時に吸入曝露を開始し、曝露6ヵ月、1年目の中間定期解剖と2年目の最終定期解剖を実施した。対照群(C群)、低濃度群(L群)、高濃度群(H群)の3群構成で試験を実施し、26回/2年間の平均質量濃度はL群、H群それぞれ $2.7 \pm 0.1 \text{ mg/m}^3$ 、 $5.2 \pm 0.2 \text{ mg/m}^3$ 、MMADは400~500nmと考えられた。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みられた。ラットの2年間の間欠気管内投与(4週間毎に1回、合計26回)の結果、高用量群では肺腫瘍と胸膜中皮腫の発現率が有意に増加した。最終解剖時のMWCNTの肺負荷量は低用量群では約 $900 \mu\text{g/lung}$ 、高用量群では約 $3600 \mu\text{g/lung}$ であった。短期間気管内噴霧(2週8回投与)＋慢性観察(TIPS)法によるチタン酸カリウムの曝露(104週後)で肺胞上皮過形成・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有意な増加が見られた。長さが1.5、7.0および $15 \mu\text{m}$ のDWCNTの肺発がん性はこのながさの合計の頻度において発がん性がみられた。 $15 \mu\text{m}$ 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、MWCNT-7の遺伝毒性指標として、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いて最適化したマウス *in vivo* 肺小核試験遺伝毒性試験を用いてMWCNT-7気管内投与による遺伝毒性影響を評価し、陽性となることを明らかにした。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とともに、マクロファージを介した線維化に至る慢性炎症の分子機序が示された。感染性に対する影響では、MWNT-7の単回吸入曝露では明確でなかった急性期での影響が、複数回曝露により肺炎マーカーCCL5および線維化マーカーTGF- β の上昇で認め

られ、回復期では明確な肺炎増悪化として明らかとなった。急性期で上昇する肺炎マーカー等が肺炎増悪化への感染影響指標となることが判明した。*In vitro* メカニズム解析研究では、様々なナノマテリアルによる NLRP3 インフラマソームを介する炎症応答が、酸化チタンや MWCNT 等の物性の違いによりスタチンによる抑制効果が異なることを見いだした。海外動向調査では、本研究班で検証している短期曝露による慢性観察試験法の有用性の周知を目的とした単行本の出版および、OECD のナノマテリアル作業グループ (WPMN) における慢性吸入曝露ガイドライン試験との相同性に関する比較研究の紹介を行った。また、OECD では新規の先端材料 (Advanced Materials) に関するリスク評価の問題や、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実施した。現時点では、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る。

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 動物管理室
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
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年度に、MWNT-7を用いた慢性試験における体内負荷量を測定するため手法として、走査電顕にて繊維数を基盤として測定する方法(SEM法)と、Benzo[ghi]peryleneをマーカーとして定量する方法(大西法)がTaquann法処理したMWNT-7を用いた場合の比較可能性についてバリデーションを行っており(菅野)、必要に応じて両手法使い分けて肺負荷量を測定した。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の2年間吸入曝露実験をH30年度末に開始した。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2 mg/m³)、高濃度群(目標濃度6 mg/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)。曝露6ヵ月、1年目の中間定期解剖と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)。

ラットへの気管内投与試験法には、Taquann処理(53 μ mメッシュ)したMWNT-7を再懸濁して用いた。200 $^{\circ}$ 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。投与試料のキャラクタリゼーションとして、動的光散乱(DLS)により二次粒径分布を、SEM法により繊維長の分布を解析した(小林、北條)。2年間のラット反復投与試験は、経口ゾンデあるいはスプレーゾンデにより、4週間に1度、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。実験開始半年経過後および1年経過後に、経過観察と肺負荷量の測定のためのサテライト動物を剖検した後、実験開始2年後まで飼育し(各群最大30匹)、発がん性を評価した。病理組織学的な検索に加え、BALF中の白血球数・LDH活性・総タンパク質量を測定した。MWCNTの肺負荷量は、大西法により測定した(北條、

広瀬)。

一方、短期間気管内噴霧+慢性観察(2週8回投与、TIPS法)によるチタン酸カリウム(POT)、アナターゼ型二酸化チタニウムの炎症、発がん性をMWNT-7と比較した。また、POTの気管内噴霧投与について投与検体のTaquannと非Taquann法処理による発がん性の差異についての実験も行っている。長さの異なる二層ナノチューブ(DWCNT)(15, 7, 1 μ m)については、TIPS投与(ラット1匹当たり0.125、0.25gおよび0.5mg/ラット、1群21~26匹)後2年間観察する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いて最適化したマウス*in vivo-in vitro*法を用いた肺小核試験により、MWCNT-7気管内投与による遺伝毒性影響の検証を行った。超音波で分散したMWCNT-7をマウスに0.05 mg/匹の用量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、MWCNT-7の2年間の吸入曝露実験の6ヵ月、1年および2年間の曝露の定期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(石丸)。また、*in vitro*の実験系として、細胞株を用いてMWCNT-7暴露による繊維化の機転を探索するとともに、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)。感染性への影響については、これまで経鼻投与で観察された影響が、Taquann法による吸入曝露でも再現できるか確認する必要があるため、H30年度は上記の単回曝露試験に合わせて、実験を行った。方法としては、BALB/cマウスに対して、MWNT-7を目標濃度0, 3 および6 mg/m³、6時間吸入曝露を行い、3日後にRSV感染を実施し、感染5日後の肺胞洗浄液(BALF)や肺病解析を行った。R1年度は単回試験の結果を受けて複数回曝露(感染7, 5および3日前)の検討を実施した。R2年度は、複数回曝露での急性期における肺炎増悪化が明らかであったので、感染21日後での回復期への影響を検討した(渡辺)。一方、炎症反応の最初反応であるマクロファージへの影響に関しては、ナノマテリアルの物性によるインフラマソーム活性化応答の違いを、スタチンによる抑制の差異ならびにスカベンジャー受容体の役割に着目して検討した。THP-1マクロファージに各種MWNT類を曝露し、NLRP3インフラマソーム依存的なIL-1 β 分泌へのスタチン処理、あるいは受容体をsiRNAでノックダウンし、その影響を解析した(最上)。

国際動向に関する研究:

OECDのナノマテリアル作業グループにおいて、慢性吸入試験法の代替法としての*in vivo*短期間曝露試験の開発の有用性について発表すると共に、本研究班の成果の学会発表や気管内投与法の有用性の海外発信および情報収集を行った(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:

Taquann 法処理 MWNT-7 の肺内負荷量を測定に関して、大西法では0.2~2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲内で、定量が可能であることが示された。MWNT-7 のマウス単回吸入曝露実験を実施し、肺負荷量測定を実施した。実際の曝露濃度は低濃度群 2.7 mg/m³、高濃度群 5.1 mg/m³ であった。曝露終了直後の肺負荷量は、低濃度群、高濃度群それぞれ $3.98 \pm 0.83 \mu\text{g}/\text{Lung}$ (N=3)、 $6.19 \pm 0.57 \mu\text{g}/\text{Lung}$ (N=3) であり肺負荷量は、ほぼ濃度依存的であった。

2年間の MWNT-7 吸入曝露実験では、曝露開始後 12 ヶ月の定期解剖を行った際の曝露濃度の平均値は低用量群、高用量群それぞれ $2.6 \pm 0.1 \text{mg}/\text{m}^3$ 、 $5.0 \pm 0.2 \text{mg}/\text{m}^3$ であった。エアロゾル粒子数(CPC)の平均値は低濃度群、高濃度群それぞれ $1963 \pm 800/\text{mL}$ 、 $5849 \pm 4471/\text{mL}$ 、空気力学的質量中央値(MMAD)は低濃度群、高濃度群それぞれ $613 \pm 259 \text{nm}$ 、 $832 \pm 531 \text{nm}$ であった。吸入曝露肺の肉眼所見では僅かに灰色を呈していた。6 ヶ月目の肺負荷量は、低濃度群、高濃度群それぞれ 6.4 ± 1.1 、 $15.2 \pm 1.0 \mu\text{g}/\text{Lung}$ 、一年目の肺負荷量は低濃度群、高濃度群それぞれ 22.3 ± 2.0 、 $45.8 \pm 4.6 \mu\text{g}/\text{Lung}$ であった。肺の病理組織では、終末細気管支領域および肺胞洞に沿って MWNT-7 を貪食したマクロファージの集簇像を認める領域では肉芽腫形成と周囲の軽度の線維化が観察された。6 ヶ月解剖の胸壁及び横隔膜の病理組織標本の観察の結果、所謂ストーマ部に慢性炎症細胞集簇巣を中等度の頻度で認め、集簇巣内に単繊維 MWNT-7 を貪食するマクロファージをごく少数認めた。また、この慢性炎症細胞集簇巣を覆う中皮に立方上皮化を認めた。

2年間、26回の吸入曝露実験における平均質量濃度はL群、H群それぞれ $2.7\pm 0.1\text{ mg/m}^3$ 、 $5.2\pm 0.2\text{ mg/m}^3$ 、MMADは測定器の不調と考えられる外れ値を除くと400～500nmと考えられた。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、肺重量は増加した。肉眼的観察ではL群に2例に肺がんを示唆する病変がみられた。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た。

2年間のラット反復気管内投与試験に用いたMWCNT試料の二次粒子径は平均720.2nmであり、繊維の長さの平均値は $6.03\pm 3.86\text{ }\mu\text{m}$ であった。組織学的には、半年経過後、1年経過後のいずれについても、MWCNT繊維の沈着やMWCNTを貪食したマクロファージの凝集が肺実質全体にびまん性に認められ、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。また、横隔膜や心嚢膜等の中皮組織における炎症反応が半年経過後から観察された。1年経過後から、実験終了時まで、高用量群および高用量スプレー群で、胸腔内中皮腫による腫瘍死が頻発した。高用量群および高用量スプレー群の最終解剖時の生存率は、50%および40%であった。腫瘍性病変として、肺実質では、腺腫と腺癌が投与群で認められ、両者を合わせた発生頻度は、対照群、低用量群、高用量群および高用量スプレー群で、それぞれ、3.3%、13.3%、33.3% ($p<0.01$) 及び20.0%であった。一方、胸腔内中皮腫は、それぞれ0%、6.7%、26.7% ($p<0.01$) および20.0% ($p<0.01$) であった。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 $3902\pm 350\text{ }\mu\text{g/Lung}$ であった。なお、高用量群と高用量スプレー群の比較から、スプレー式ゾンデを用いると、MWCNT繊維の沈着が均一になることや、BALF内の白血球数やLDH活性等の値が高く、肺組織への障害性がやや強いことがわかった。

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。またこのPOTの発がん性に関する投与サンプルの違い(Taquannと非Taquann法処理)についての実験はR3年1月に終了する予定である。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:

遺伝毒性指標としては、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の全身吸入曝露後(6ヶ月)での肺胞洗浄液(BALF)細胞における免疫細胞分画に関して、フローサイトメーターにて解析したところ、MWCNT-7曝露によって正常マクロファージ分画の割合は大きく減少するとともに、未熟あるいは異常マクロファージ分画の割合が増加することが判明した。また、BALF細胞あるいは肺組織における線維化関連遺伝子の一つである MMP12 mRNA 発現が対照群に比較して有意に上昇していた。さらに、吸入曝露一年後では、BALF 細胞数は MWCNT-7 曝露にて増加する一方で、肺胞マクロファージの割合に関しては曝露 6 ヶ月と同様に、対照群に比較して有意に減少していた。また、スカベンジャー受容体の一つである CD163 の肺胞マクロファージでの発現が MWCNT-7 曝露で有意に低下していた。加えて、BALF および肺組織での MMP12mRNA 発現は、曝露後 6 ヶ月と同様に、対照群に比較して有意に上昇していた。2年間の曝露群では、高濃度 MWCNT-7 曝露によって、肺胞マクロファージは有意に増加していたことが明らかになるとともに、脾臓およびリンパ節におけるマクロファージ分化に影響が認められた。一方で、ナノマテリアル曝露によるマクロファージの MMP12 発現の調節機構を探るために、NF- κ B 1KO マウスへの MWCNT-7 の単回腹腔内投与による腹腔内マクロファージの動態を検討すると、NF- κ B を介した MMP12 の発現ならびに腹腔内の線維化が対照マウスに対して有意に軽減されていた。H30 年度は単回吸入曝露試験に合わせた RSV 感染実験を実施した。感染 5 日後の肺胞洗浄液中の肺炎指標 CCL5

レベルの上昇は顕著ではないが、肺の線維化に関する指標となる TGF- β は MWNT-7 曝露により有意に上昇した。また、ほぼ全葉で針状結晶が散見された。この結果を受けて、R1 年度は複数回曝露(感染 7、5 および 3 日前)による影響を、肺負荷量の測定と併せて解析した。曝露量の増加に伴って CCL5 レベルは有意に上昇した。また、MWNT-7 貪食マクロファージの集束など特徴的な病変も観察された。R2 年度は上記の感染後急性期への影響に加えて、複数回吸入曝露後の RSV 感染 21 日後(回復期)における影響を検討した。感染のみではほぼ肺炎は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リンパ球浸潤、さらに粘性多糖分泌細胞の増生など病変像が確認された。急性期で得られた MWNT-7 曝露による肺炎マーカー CCL5 等の上昇が、感染影響の指標となることが明らかとなった。マクロファージにおいて MWCNT-SD1 による NLRP3 インフラマソーム活性化・IL-1 β 分泌をスタチンが抑制する作用を見いだしているが、各種の酸化チタンナノマテリアルや MWCNT 類によるインフラマソーム活性化への影響を調べたところ、スタチンによる抑制効果には、ナノマテリアルの物性により差異があることを見出した。そこで取込への関与が予想されるスカベンジャー受容体に着目し、MSR1 について siRNA によるノックダウンを行った。各種 MWCNT 曝露による IL-1 β 産生への影響を調べたところ、特定の MWCNT による産生について軽度の抑制が観察された。

国際動向に関する研究:

気管内投与手法の利便性の周知を目的として、国内外の研究者と共同で単行本の執筆を行った。さらに、第 19 回 OECD ナノマテリアルの作業グループ(WPMN)において、本研究班で検討している短期間吸入(および

気管内投与)曝露による慢性影響試験プロトコルの慢性吸入曝露試験との同一性に関する比較研究を紹介した。また、第 20 回 WPMN (ONLINE 開催) および先端材料 (Advanced Materials) に関するオンライン会合に参加し、新規の先端材料 (Advanced Materials) 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。

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、昨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 つの反復曝露試験を継続してきた。得られたデータを基に、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できる短期間曝露の慢性観察試験のプロトコルとして、2 年間にわたる間欠的吸入曝露および気管内投与の投与量の目安を設定することが可能となった。

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、移転の伴い設備を新しくしたところであるが、曝露条件を確立し、H30 年度内に 2 年間の曝露実験を開始し 6 ヶ月及び 1 年の定期解剖、並びに 2 年目の最終解剖を実施した。エアロゾル特性の測定において、安定した質量濃度が得られているが、エアロゾル粒子数を測定する CPC 及び MMAD 測定においては値のバラツキが大きい。CPC に関しては、曝露チャンパーと CPC の間に接続している希釈装置の流量が安定しないことが原因であることが判明している。MMAD に関しては、測定装置 (MOUDI、カノマックス) 内でのサンプルの再飛散が多いことが直接の原因であるが、比重の高い酸化チタンではこの現象はみられな

い。Taquann 法処 MWNT-7 は高分散性であり嵩高いため、再飛散が生じやすいと考えられる。再飛散が多かったサンプルのデータを除けば、53 μ m メッシュろ過の Taquann 処理検体の MMAD は 400-500nm と考えられた。曝露肺の病理組織標本では極軽度の肉芽腫が観察されたが繊維化の程度を把握するため、特殊染色を実施して確認する。肺負荷量に関しては、曝露濃度並びに曝露期間依存的に増加した。

6 ヶ月の時点における肺の病理組織学的評価は BALF を採取した後の肺であるため、本来の病理組織像を必ずしも反映しているとは限らないが、洗浄により変化しない器質的变化である、明確な肺胞構造の改変や線維性肉芽腫形成は認められなかった。24 ヶ月の最終解剖では、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 \pm -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、反復曝露によって、MWCMT が肺実質にびまん性に沈着し、既報の長期試験の結果と同様に、肉芽腫性炎症や II 型肺胞上皮の反応性過形成を引き起こした。発がん試験の結果

としては、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、肺腫瘍の発生頻度は、吸入曝露試験(Kasai *et al.* 2016)と同程度であったため、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 $\mu\text{g}/\text{Lung}$)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1500 $\mu\text{g}/\text{rat}$ 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経時的に上げる場合、あるいは、肺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 の結果と同程度であった。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、発がん性に与える影響は、負荷量の経時的な変化のパターン(AUC形状)よりも、早期の肺負荷量のほうが強い可能性が示唆された。例えば、半年時点における今回の高用量群の肺負荷量と、Suzui *et al.*2016 のそれは、どちらも1000 $\mu\text{g}/\text{Lung}$ 弱であった。

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、慢性実験の結果 POT は、その炎症や傷害性について、MWCNT-7 よりは良いものの球状 TiO₂ よりも顕著であり、は、作用や催腫瘍性が明らかとなり、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、有意の催腫瘍性のあることが示された。また、この POT の発がん性に対して投与サンプルの分散方による違いを検証する実験が進行中である。また長さの異なる DWCNT 曝露実験でも発がん性のあることが観察されたが、実験した長さの範囲(1.5~15 μm)では発がん性あるいはその強度に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、我々が以前に実施した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は直接曝露組織である肺において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、胞免疫の機能不全に関与する可能性が示唆された。2年間の長期暴露では、高濃度MWCNT-7 暴露群で、肺胞マクロファージが増加していたのに加え、全身免疫系のマクロファージ分化への影響も確認された。また、NF- κ B 1KO マウスへのMWCNT-7 の単回腹腔内投与実験により、MWCNT-7 暴露によるマクロファージのMMP12の発現にはNF- κ B を介した調節機構の存在が明らかになった。

一方、感染性に対する影響としては、これまで RSV 感染マウスでは、MWNT-7 経鼻投与により炎症サイトカインの産生亢進および肺炎増悪化の結果を得ているが、MWNT-7 の曝露局在部位での影響であった。これが H30 年度の吸入曝露法の導入により全肺葉についても観察でき、MWNT-7 の凝集塊は少なくかつ針状の繊維が確認された。しかし、肺炎増悪は明確でなく、肺の線維化指標の一つである TGF- β は有意に上昇した。これらの結果を受けて、R1 年度に複数回曝露を実施した結果、肺用量依存的な負荷と肺炎マーカー CCL5 の上昇など、急性期への肺炎増悪化が明確となった。そこで、R2 年度は複数回曝露後、RSV 感染からの回復期への影響を繊維化など中心に検討した。感染対照マウスでの肺炎終息傾向に対して、曝露マウスではカーボン貪食マクロファージの集束やリンパ球浸潤、線維化など増悪化肺炎像が確認され、特にスカベンジされなかったリンパ球の残存はマクロファージの機能低下によると考えられた。さらに高用量曝露—感染により細気管支での粘性多糖分泌細胞の増生が認められ、気道上皮機能への影響も示唆された。これらの結果から、MWNT-7 の複数回吸入曝露により急性期で上昇する肺炎マーカー等が、肺炎増悪化への感染影響指標となることが判明した。

In vivo メカニズム解析研究において、様々なナノマテリアルにより惹起される NLRP3 インフラマソームを介する炎症応答は、酸化チタンや MWCNT 等の物性の違いによりスタチンによる抑制効果が異なることを見いだした。各種ナノマテリアルの物性の違いによる差異は、マクロファージによる認識・取り込み過程において生じる可能性がある。スカベンジャー受容体 MSR1 に着目し、その役割を解析したが、大きな寄与は認められなかった。

OECD のナノマテリアル作業グループにおいて提案していた短期間 *in vivo* 曝露試験の有用性検証プロジェクトは、製品開発時のスクリーニングやカテゴリー評価等への補助ツールとしての適用の可能性はあるものの、現在のレギュラトリーにおける審査等の評価項目として採用できるほどのレベルではないというのが OECD 加盟国の判断であり、短期 *in vivo* 試験法という概念だけでは、プロジェクト案を推し進めるのは困難であると考えられた。そこで、より慢性毒性試験の影響を正確に代替できる手法開発として、本研究班の研究成果は有用な候補であると考えている。本研究の最終的な成果も加えて、OECD に慢性毒性試験をより効率的に評価する手法として将来提案することを目指す予定である。また、粒子サイズ分布に関しては、作成中の OECD ガイドラインでは測定中に沈殿がみられた場合、安定な状態で再測定する必要があることから、測定中に沈殿が生じない方法で試料を調製することが重要であると考えられた。

以上、現時点までの成果としては、間欠曝露型の吸入慢性実験について、ほぼ順調に 2 年の観察期間を終了するところであるが、気管内投与では 2 年後に有意な肺がんの誘発を認めており、通常の連続曝露慢性実験の結果との比較が可能となる煮込みである。加えて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細胞を用いた慢性影響のメカニズムの解析結果もほぼ順調に得られる見込みである。

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)を用いた吸入曝露実験については、現在まで6ヵ月、1年の定期解剖並びに2年の最終解剖を実施した。エアロゾル特性の測定において、安定した質量濃度が得られており、肺負荷量は、曝露濃度並びに曝露期間依存的に増加した。6ヵ月及び1年の定期解剖では肺内に吸入されたほとんどの T-CNT7#53 は、終末気管支内および肺胞管への移行部(中間帯)に存在しており、この領域の既存の線維成分が反応性に増殖していた。肺胞内集簇巣が認められたが線維成分の増加、及び隣接する肺胞構造に大きな変化は確認されず、貪食マクロファージの集簇巣であった。結論として、曝露後6ヵ月では、曝露肺に明確な線維性肉芽腫の形成は認められなかった。2年の試験終了時点において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。ラット気管内投与による2年間の発がん試験では、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。また、総負荷量を高くすると中皮腫による早期死亡が頻発し、2年後の肺腫瘍の評価に影響を及ぼすため、投与用量や頻度等、総負荷量の設定に関わる点を今後、改善していく必要がある。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。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では実験した長さの範囲(1.5~15 μ m)では発がん性あるいはその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遺伝毒性についての研究では、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いて最適化したマウス *in vivo-in vitro* 法を用いた肺小核試験により、MWCNT-7は気管内投与下においても全身吸入曝露下と同様にDNA損傷性を有することが明らかになった。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とともに、マクロファージを介した線維化に至る慢性炎症の分子機序が示された。一方、感染性に対する影響としては、Taquann法によるMWNT-7の単回および複数回の吸入曝露により、経鼻投与と異なり肺全葉での分布が可能になった。これによりRSV感染後急性期での肺炎マーカーCCL5の有意な上昇や肺繊維化の因子であるTGF- β の上昇、さらにはカーボン貪食マクロファージの集束など特徴的な病変も確認された。感染回復期において、感染対照での肺炎終息傾向に対して、これらの病変は曝露マウスで明確に残存していた。これらの結果から、MWNT-7の複数回吸入曝露により急性期で上昇する肺炎マーカーCCL5等が、慢性期での感染影響指標となることが判明した。*In vitro*メカニズム解析研究において、様々なナノマテリアルにより惹起されるNLRP3インフラマソームを介する炎症応答へのスタチンの効果を検証したところ、酸化チタン・MWCNT等の物性の違いにより抑制効果が異なること

を見いだした。スクャベンジャー受容体 MSR1 について、大きな寄与は認められなかった。

海外動向調査では、本研究班で検証している短期曝露による慢性観察試験法の有用性の周知を目的とした単行本の出版および OECD のナノマテリアル作業グループ (WPMN) における慢性吸入曝露ガイドライン試験との相同性に関する比較研究の紹介を行った。また、OECD を中心とした新規の先端材料 (Advanced Materials) 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継続して実施した。現時点では、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. doi:

10.1293/tox.2019-0075

Saleh DM, Alexander WT, Numano T, Ahmed OHM, Gunasekaran S, Alexander DB, Abdelgied M, El-Gazzar AM, Takase H, Xu J, Naiki-Ito A, Takahashi S, Hirose A, Ohnishi M, Kanno J, Tsuda H. Comparative carcinogenicity study of a thick, straight-type and a thin, tangled-type multi-walled carbon nanotube administered by intra-tracheal instillation in the rat. *Part Fibre Toxicol.* 2020 Oct 15;17(1):48. doi: 10.1186/s12989-020-00382-y.

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. doi:10.1016/j.bcp.2021.114580

Landsiedel R., Gamo M. Hirose A. The Role of *In vivo* Screening Studies in Assessing Manufactured Nanomaterials, *In vivo Inhalation Toxicity Screening Methods for Manufactured Nanomaterials*, Takebayashi T., Landsiedel R., Gamo M. eds, In *Current Topics in Environmental Health and Preventive Medicine*, Springer (Springer Nature Singapore Pte Ltd), pp1-21, 2019, doi:10.1007/978-981-13-8433-2

Tsuda, H., Alexander D. Development of intratracheal intrapulmonary of spraing (TIPS) administration as a feasible assay method for testing the toxicity and carcinogenic potential of multiwall carbon nanotubes, *In vivo Inhalation Toxicity Screening Methods for Manufactured Nanomaterials*, Takebayashi T., Landsiedel R., Gamo M. eds, In *Current Topics in Environmental Health and Preventive*

- Medicine, Springer (Springer Nature Singapore Pte Ltd), pp145-163, 2019, doi:10.1007/978-981-13-8433-2
- Abdelgied M., Elgazzar AM., Alexander TW., Numano T., Iigou M., Naiki-Ito A., Takase H., Hirose A., Taquahashi Y., Kanno J., Abdelhamid, M., Khaled AA., Takahashi S., Alexander BD, Tsuda H. Carcinogenic effect of potassium octatitnate (POT) fibers in the lung and pleura of male Fischer 344 rats after intrapulmonary administration, *Particle and Fibre Toxicology*. 16:34, 2019. doi: 10.1186/s12989-019-0316-2
- Numano T., Higuchi H., Alexander D., Alexander W., Abdelgied M., Elgazzar AM., Saleh D, Takase H., Hirose A., Naiki-Ito A., Suzuki S., Takahashi S., Tsuda H. MWCNT-7 administered to the lung by intratracheal instillation induces development of pleural mesothelioma in F344 rats, *Cancer Sci.*, 110 (8): 2485-2492, 2019
- Abdelgied M., Elgazzar AM., Alexander D., Alexander W., Numano T., Iigo M., Naiki-Ito A., Takase H., Abdou KB., Hirose A., Taquahashi Y., Kanno J., Abdelhamid M., Tsuda H., Takahashi S. Pulmonary and pleural toxicity of potassium octatitanate fibers, rutile titanium dioxide nanoparticles, and MWCNT-7 in male Fischer 344 rats, *Arch. Toxicol.*, 93(4): 909-920, 2019. doi: 10.1007/s00204-019-02410-z
- Elgazzar AM., Abdelgied M., Alexander D., Alexander W., Numano T., Iigo M., Naiki A., Takahashi S., Takase H., Hirose A., Kanno J., Elokke OM., Nasem AM., Tsuda H. Comparative pulmonary toxicity of a DWCNT and MWCNT-7 in rats, *Arch. Toxicol.*, 93: 49-59, 2019, doi:10.1007/s00204-018-2336-3
- Abdelgied M, El-Gazzar AM, Alexander DB, Alexander WT, Numano T, Iigou M, Naiki-Ito A, Takase H, Abdou KA, Hirose A., Taquahashi Y, Kanno J., Tsuda H., Takahashi S. Potassium octatitanate fibers induce persistent lung and pleural injury and are possibly carcinogenic in male Fischer 344 rats. *Cancer Sci.* 109(7):2164-2177. 2018. doi: 10.1111/cas.13643
- Liao D, Wang Q, He J, Alexander DB, Abdelgied M, El-Gazzar AM, Futakuchi M, Suzui M, Kanno J., Hirose A., Xu J, Tsuda H. Persistent Pleural Lesions and Inflammation by Pulmonary Exposure of Multiwalled Carbon Nanotubes. *Chem Res Toxicol.* 15;31(10):1025-1031. 2018. doi: 10.1021/acs.chemrestox.8b00067
- Sakamoto Y, Hojo M., Kosugi Y, Watanabe K, Hirose A., Inomata A, Suzuki T, Nakae D. Comparative study for carcinogenicity of 7 different multi-wall carbon nanotubes with different physicochemical characteristics by a single intraperitoneal injection in male Fischer 344 rats. *J Toxicol Sci.* 43(10):587-600. 2018. doi: 10.2131/jts.43.587
- Otsuka K, Yamada K, Taquahashi Y., Arakaki R, Ushio A, Saito M, Yamada A, Tsunematsu T, Kudo Y, Kanno J, Ishimaru N. Long-term polarization of alveolar macrophages to a profibrotic phenotype after inhalation exposure to multi-wall carbon nanotubes. *PLoS One* 13(10): e0205702, 2018

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, Koichi 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
- Y. Taquahashi, S. Yokota, M. Hojyo, K. Morita, M. Tsuji, K. Suga, M. Kuwagata, A. Hirose, and J. Kanno, Interim Report of the 4-Week Interval Intermittent Whole Body Inhalation Study on Multiwalled Carbon Nanotube in Mice, SOT 2021 (2021.3.17), Poster, virtual
- 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 (November 2020 Virtual, USA)
- 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)
- Hojjo M, Yamamoto Y, Sakamoto Y, Ohnuki A, Maeno A, Moriyasu T, Taquahashi Y, Kanno J, Hirose A and Nakae D. Declines in serum levels of apolipoproteins during the development of peritoneal mesothelioma by multiwalled carbon nanotube in rats. 60th SOT annual meeting (SOT2021) (Online), 2021.3.12.
- 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回日本病理学会学術集会(2020年7月 Web開催 福岡)
- 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soウェブ講演会 2021.1.28(ウェブ)
- 最上(西巻)知子, 崔 紅艶, 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
- J. Kanno, Y. Taquahashi, A. Hirose., Improved aerosol generation method and newly designed whole body rodent inhalation apparatus for the testing of nanomaterials. EUROTOX 2019(55th Congress of the European Societies of Toxicology) (2019.9.10), Helsinki, Finland, Poster
- Jun Kanno, Analysis of the effect of epigenetic modification on gene expression by the newly designed repeated dose study – progress report of the Percellome Project. Gordon Research Conference: Cellular and Molecular Mechanisms of Toxicity (2019.8.11-16), Proctor Academy, NH, USA, Poster
- Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Kentaro Tanemura., The Concept of “Signal Toxicity” for the Mechanistic Analysis of So-Called Low Dose Effect and Delayed Effect after Perinatal Exposure. 第15回国際毒性学会(ICT XV) (2019.7.17), Hawaii, USA, Poster
- Yuhji Taquahashi, Satoshi Yokota, Koichi Morita, Masaki Tsuji, Akihiko Hirose, Jun Kanno., Improved Aerosol Generation Method and Newly Designed Whole Body Rodent Inhalation Apparatus for the Testing of Nanomaterials in Human-Relevant Exposure Scenario. 第15回国際毒性学会(ICT XV) (2019.7.16), Hawaii, USA, Poster
- 菅野純, 幹細胞分化から見る子どもの毒性学: シグナル毒性としての中樞神経影響の評価の現状 「シグナル毒性」の概念と子どもの毒性学. 第46回日本毒性学会学術年会, (2019.6.28), 徳島, シンポジウム, 口演
- 種村健太郎, 北嶋聡, 菅野純, 幹細胞分化から見る子どもの毒性学: シグナル毒性としての中樞神経影響の評価の現状 低用量化学物質の周産期ばく露による情動認知行動毒性～子どもの毒性学に向けた評価系開発の現在～. 第46回日本毒性学会学術年会, (2019.6.28), 徳島, シンポジウム, 口演
- 菅野純, 北嶋聡, 相崎健一, 小野竜一, エピジェネティクス解析と人工知能による毒性オミクスの展開 Percellome トキシコゲノミクスのエピジェネティクス基盤 —「新型」反復曝露試験の解析—. 第46回日本毒性学会学術年会, (2019.6.28), 徳島, シンポジウム, 口演
- 夏目やよい, 相崎健一, 北嶋聡, Samik GOSH, 北野宏明, 水口賢司, 菅野純, エピジェネティクス解析と人工知能による毒性オミクスの展開 Garudaプラットフォームによる多角的毒性予測. 第46回日本毒性学会学術年会, (2019.6.28), 徳島, シンポジウム, 口演
- 小野竜一, 相崎健一, 北嶋聡, 菅野純, 毒性エピゲノミクスの新潮流 Percellome プ

- プロジェクトから見えてきたエピジェネティクス影響. 第46回日本毒性学会学術年会, (2019.6.27), 徳島, シンポジウム, 口演
菅野純, 梅田ゆみ, 鈴木正明, 武田知起, 後藤裕子, 山野荘太郎, 平井繁行, 竹内哲也, 高橋祐次, ノンカーボン素材ナノマテリアルの有害性評価の現状と課題 架橋型アクリル酸系水溶性ポリマーの肺毒性. 第46回日本毒性学会学術年会, (2019.6.26), 徳島, シンポジウム, 口演
梅田ゆみ, 笠井辰也, 山野荘太郎, 平井繁行, 竹内哲也, 大西誠, 相磯成敏, 菅野純, ノンカーボン素材ナノマテリアルの有害性評価の現状と課題 ナノ酸化チタンの肺毒性. 第46回日本毒性学会学術年会, (2019.6.26), 徳島, シンポジウム, 口演
大西誠, 後藤裕子, 笠井辰也, 山本正弘, 鈴木正明, 武田知起, 東久保一朗, 菅野純, フィルター捕集したカーボンブラックのHPLCを用いた微量定量法の開発. 第92回日本産業衛生学会, (2019.5.23), 名古屋, 口演
加納浩和, 笠井辰也, 齋藤新, 平井繁行, 鈴木正明, 梅田ゆみ, 妹尾英樹, 大西誠, 竹内哲也, 三角恭平, 福島昭治, 菅野純, メタクリル酸ブチルのラット及びマウスへの吸入ばく露による発がん性及び慢性毒性. 第92回日本産業衛生学会, (2019.5.23), 名古屋, ポスター
- Jun Kanno, "Nanomaterial Inhalation toxicity". The 3rd EU-Asia Dialogue on Nanosafety: Occupational Exposures to Manufactured Nanomaterials (MN) and Waste Disposal, (2019.3.18), Bangkok, Thailand, Invited, Keynote
- Masatoshi Hagiwara, Jun Kanno, Dana C. Dolinoy, Cheryl Lyn Walker, Society of Toxicology and Japanese Society of Toxicology Symposium: Epigenetic Modification of Chronic Pathology and Toxicology Lecturers. Society of Toxicology (SOT) 58th Annual Meeting (SOT2019) and ToxExpo, (2019.3.12), Baltimore, USA, Symposium
- Y. Taquahashi, S. Yokota, K. Morita, M. Tsuji, Y. Hirabayashi, A. Hirose, and J. Kanno, Development of Whole Body Inhalation System for Well-Dispersed Nanomaterials Toxicity Testing (Taquann Direct-Injection Whole Body Inhalation System). Society of Toxicology (SOT) 58th Annual Meeting (SOT2019) and ToxExpo, (2019.3.12), Baltimore, USA, Poster
- 高橋祐次, 新素材の毒性評価-工業的ナノマテリアルの高分散性小規模全身ばく露吸入装置の開発-, JST-CRDS 2019年度 科学技術未来戦略 WS, 2019.12.3 (東京)
- 前野 愛, 坂本 義光, 北條 幹, 湯澤 勝廣, 長谷川 悠子, 長澤 明道, 久保 喜一, 安藤 弘, 海鋒 藤文, 田中 和良, 鈴木 俊也, 猪又 明子, 守安 貴子, 広瀬 明彦, 中江大. 多層カーボンナノチューブ (MWCNT) のラット気管内投与試験の生体内分布と呼吸器毒性における投与器具の比較. 第46回日本毒性学会学術年会 2019.6.27(徳島)
- Hojjo M, Maeno A, Sakamoto Y, Onuki A, Hasegawa Y, Yuzawa K, Kubo Y, Nagasawa A, Ohnishi M, Goto Y, Suzuki T, Inomata A, Moriyasu T, Hirose A, Nakae D. Clearance of multi-walled carbon nanotubes in rat lungs after intratracheal instillation: a comparison of different instillation devices. 55th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2019) 2019.9.10 (Helsinki, Finland)
- 坂本義光, 広瀬明彦, 中江大 Time course of histopathology and the status of involved humoral factors during the carcinogenesis of MWCNT in rats. 第78回日本癌学会学術総会 2019.9.28(京都)
- 北條 幹, 坂本 義光, 山本 行男, 前野 愛, 多田 幸恵, 長谷川 悠子, 湯澤 勝廣, 長澤 明道, 田中 和良, 矢野 範男,

- 鈴木 俊也, 猪又 明子, 守安 貴子, 広瀬 明彦, 中江 大. MWCNT 誘発性のラット腹膜中皮腫発症過程における炎症および免疫関連因子に着目した病理組織学的解析. 第 36 回日本毒性病理学会学術集会. 2020.2.14(東京)
- 坂本 義光, 北條 幹, 前野 愛, 鈴木 俊也, 猪又 明子, 守安 貴子, 広瀬 明彦, 中江 大. 多層カーボンナノチューブを反復気管内投与したラットにおける肺神経内分泌細胞(PNEC)の増生. 第 36 回日本毒性病理学会学術集会 2020.2.14(東京)
- 前野 愛, 坂本 義光, 北條 幹, 湯澤 勝廣, 長谷川 悠子, 長澤 明道, 大貫 文, 鈴木 俊也, 猪又 明子, 守安 貴子, 後藤 裕子, 大西 誠, 小林 憲弘, 広瀬 明彦, 中江 大. 異なる投与器具を用いた多層カーボンナノチューブ(MWCNT)のラット気管内投与試験における肺毒性と肺負荷量の比較. 第 36 回日本毒性病理学会学術集会 2020.2.14(東京)
- Tsuda H., Demonstration of the carcinogenicity of a flexible tangled multi-walled carbon nanotube in the rat lung, AACR サテライトミーティング-Environmental Carcinogenesis: Potential Pathway to Cancer Prevention, Charlotte (USA) 2019 年 6 月
- 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. The Joint Meeting of The 6th Asian Congress on Environmental Mutagens and the 48th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (November 2019 Tokyo, Japan)
- 新垣理恵子, 牛尾綾, 大塚邦紘, 工藤保誠, 石丸直澄: 多層化カーボンナノチューブ吸入曝露初期の肺胞マクロファージの動態 第 108 回日本病理学会学術集会 (2019 年 4 月 東京)
- Mami Sato, Rieko Arakakai, Aya Ushio, Yasusei Kudo, Naozumi Ishimaru. Effect of multi-wall carbon nanotube exposure on pulmonally immune cells at the early stage. 第 48 回日本免疫学会学術集会 (2019 年 12 月)
- Watanabe W, Akashi T, Hirose A, Miyauchi A, Yoshida H, Kurokawa M. Effects of double-walled carbon nanotubes on the early phase of respiratory syncytial virus infection in mice. 55th Congress of the European Societies of Toxicology, (September 2019 Helsinki, Finland)
- Nishimaki-Mogami T, Cui H, Soga K, Adachi R, Tamehiro N, Hachisuka A, Kondo K, Hirose A: Discovery of an inhibitor of multiwall carbon nanotubes-stimulated IL-1 β secretion via inflammasome activation (EUROTOX 2019) (September 2019 Helsinki, Finland)
- 大西 誠, 笠井辰也, 山本正弘, 鈴木正明, 東久保一朗, 菅野 純. マーカー法を用いた生体試料中のカーボンブラックの微量定量法の開発. 第 91 回日本産業衛生学会学術年会 2018.5.17(熊本)
- 三角恭平, 大西 誠, 山本正弘, 平井繁行, 菊地芳典, 後藤裕子, 武田知起, 笠井辰也, 鈴木正明, 菅野 純 Comparison of Floating Coefficient for Carbon Blacks using N-SHOt Cyclone. 第 45 回日本毒性学会学術年会 2018.7.18(大阪)
- 高橋祐次, 相磯成敏, 大西 誠, 石丸直澄, 菅野 純, マクロファージの機能に着目したナノマテリアルのマウス吸入ばく露による慢性影響評価, 第 45 回日本毒性学会学術年会, シンポジウム, 2018.7.18(大阪)
- 高橋祐次, トキシコロジスト・ブラッシュアップセミナー: 肺・呼吸器の毒性変化を考えるナノマテリアルの毒性: 肺毒性を中心として, 第 19 回日本毒性学会生涯教育講習会, 2018.7.17(大阪)
- Jun Kanno, Chuen-Jinn Tsai, Improvement of Inhalation Toxicity Testing for

- Nanomaterials and Compliance
Monitoring for Ambient PM. Xth
International Aerosol Conference (IAC
2018), Plenary Session 4, 2018.9.6. (St.
Louis)
- Abdelgied M., Elgazzar AM., Alexander D.,
Alexander W., Numano T., Iigo M.,
Naiki-Ito A., Abdelhamed M., Takase H.,
Hirose A., Taquahashi Y., Kanno J.,
Takahashi S., Tsuda H. Potassium
octatitanate fibers are possibly
carcinogenic in male Fisher 344 rats.
54th congress of the European societies of
toxicology (EUROTOX2018) (September
2018 Brussels, Belgium)
- Hirose A., Hojo M., Kobayashi N., Impact of
sample preparation of MWCNT for
developmental toxicity by intratracheal
instillation. The 10th Congress of
Toxicology in Developing Countries
(CTDC2018) (April 2018 Belgrade,
Serbia)
- Hojo M, Kobayashi N, Hasegawa Y,
Sakamoto Y, Murakami S, Yamamoto Y,
Tada Y, Maeno A, Kubo Y, Ando H,
Shimizu M, Taquahashi Y, Suzuki T,
Nakae D, Hirose A: Relationship between
developmental toxicity of multi-wall
carbon nanotubes (MWCNT) and lung
inflammation in pregnant mice after
repeated intratracheal instillation. 54th
congress of the European societies of
toxicology (EUROTOX2018) (September
2018 Brussels, Belgium)
- Watanabe W, Akashi T, Hirose A, Miyauchi A,
Yoshida H, Kurokawa M. Effects of
double-walled carbon nanotubes on the
pneumonia in respiratory syncytial
virus-infected mice. 54th Congress of the
European Societies of Toxicology,
(September 2018 Brussels, Belgium)
- 渡辺 渡、明石 敏、宮内亜宜、吉田裕樹、
黒川昌彦 二層カーボンナノチューブ曝
露のRSウイルス肺炎への影響 第66回
日本ウイルス学会総会(2018年10月京
都)
- 坂本義光, 北條幹, 鈴木俊也, 猪又明子, 守
安貴子, 広瀬明彦, 中江大: 多層カーボ
ンナノチューブ(MWCNT)を単回経気管
噴霧投与した後終生飼育したラットの肺
および中皮組織における増殖性病変の
発生. 第45回日本毒性学会学術年会
(2018年7月大阪)
- 坂本義光, 多田幸恵, 北條幹, 前野愛, 鈴木
俊也, 猪又明子, 守安貴子, 中江大: ラッ
トにおいてDHPNで誘発されたメソテリン
陽性肺増殖性病変の病理組織化学的性
状. 第35回日本毒性病理学会学術集会
(2019年1月東京)
- 津田洋幸, 徐結苟, Alexander WT., Alexander
DB., Abdelgied M., Elgazzar A., 沼野琢
旬, 広瀬明彦, 菅野純. ナノマテリアルの気
管支内投与による毒性と発がん性の簡易
検出システムの開発 第45回日本毒性
学会学術年会 大阪 2018年7月
- 津田洋幸, 徐結苟, Alexander WT., Alexander
DB., Abdelgied M., Elgazzar A., 沼野琢
旬, 広瀬明彦, 菅野純. ナノマテリアル特に
カーボンナノチューブによる肺・胸膜中皮
障害と発がん性の経気管肺内噴霧投与
(TIPS)試験法の開発 第45回日本毒性
学会学術年会(2018年7月大阪)
- 北條幹, 小林憲弘, 長谷川悠子, 安藤弘, 久
保喜一, 海鉦藤文, 田中和良, 五十嵐海,
村上詩歩, 多田幸恵, 生嶋清美, 湯澤勝
廣, 坂本義光, 前野愛, 鈴木俊也, 猪又
明子, 守安貴子, 高橋祐次, 広瀬明彦,
中江大: 多層カーボンナノチューブのマウ
ス気管内投与による発生毒性と肺の炎症
との関連性. 第45回日本毒性学会学術
年会(2018年7月大阪)
- 堀端克良: Pig-a / PIG-A 遺伝子変異試験に
よるヒトを含めた *in vivo* 遺伝毒性モニタ
リング. 平成30年度日本環境変異原学会
公開シンポジウム (2018年6月東京)
- 堀端克良: Pig-a アッセイの標準化に関する

研究:バリデーション研究の推進とヒトへの適用. 日本環境変異原学会第47回大会(2018年11月京都)

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

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

2. 実用新案登録 (該当なし)

3. その他 (該当なし)