

令和 3 年度厚生労働行政推進調査事業費補助金
(化学物質リスク研究事業)

I . 総括研究報告書

ナノマテリアル吸入曝露影響評価のための効率的慢性試験法の開発に関する研究

研究代表者： 広瀬 明彦 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部長

研究要旨

本研究では、2年間の慢性吸入曝露による公表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、今年度は、先行研究において開発してきた通常の二年間連続吸入曝露試験結果と比較可能な慢性間歇型曝露手法をさらに効率化するための曝露装置の改良と曝露回数を少なくした気管内投与プロトコルの開発を目的とする。さらに、定量的なリスク評価に備えて吸入曝露後の体内分布の把握とそのメカニズム解析を行うと共に、ナノマテリアルの曝露評価手法の最新情報を入手することも目的とする。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、今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った。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 (EndMT) に関する検討を行うと共に、先行研究で行われた2年間の MWNT-7 の間歇曝露研究結果の病理及び免疫ネットワークの詳細な解析、TIPS 法による二層ナノチューブ (DWCNT) 発がん実験の解析を行った。また、OECD 作業グループ活動から曝露評価モデル等の情報収集を行った。本研究からは従来から使用してきた MWNT-7 同様の製造方法で作成した NT-7 を使用することとしたが、Taquann 法による繊維長や、繊維長分布、吸入曝露時の MMAD は従来のものとの同性を確認した。マウスへの NT-7 の単回吸入曝露でも肺泡マクロファージの M2 マクロファージへの分化が認められた。一方、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、シーブの大型化ではろ過効率の低下を招いたが、シーブの洗浄方法において逆洗することにより自動化の目処が立った。ろ液の凍結方法について噴霧凍結法が大量のろ液を瞬時に凍結可能であったが凍結検体の回収に課題が残り今後の改良の必要性が示された。短期間の間歇気管内投与実験では、全 13 回の投与が完了し、肺の MWCNT 蓄積率は予想よりも高くなったが、既報の情報から、用量依存的に肺腫瘍および胸膜中皮腫の誘発が期待できるレベルと考えられた。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泡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。これに関連して肺泡上皮細胞の 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。先行研究で行われた NMNT-7 の 2年間の間歇吸入曝露試験データの解析では、群間に死亡率の差は認められなかった。肺負荷量と肺重量、及び、体重の関係からは高用量曝露群の吸入量は、発癌性に関する用量相関性の保証されない高負荷量である可能性が考えられたが、肺組織について免疫染色を用いた詳細な解析を行った結果、前駆病変に当たる組織変化などの検討を進める必要性が示された。また、長期曝露後の BALF 細胞の解析では、肺泡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。一方、先行研究から行っている長さの異なる DWCNT (1.5、7.0 および 15 μ m) 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が示された。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ビナーに参加し、OECD が開発あるいは評価したナノマテリアルの曝露評価ツール・モデルに関する情報を得た。ただし、現状ではモデルの使用にあたって幾つか課題も見られ、今後も開発・評価が継続される見通しであることから、引き続き情報収集を行う必要があると考えられた。

以上、現時点までの成果としては、間歇曝露型の吸入曝露装置の改良が進んでおり、慢性実験に向けた準備が整った。気管内投与では、短期間の間歇曝露による慢性観察試験を開始した。2 年間の間歇曝露による影響と、通常の連続曝露慢性実験の結果についての分子マーカーによる比較や Prox-1 マウスの活用によるナノマテリアルの体内分布の解析を行える環境と、短期曝露に対応する分散性の確認ができたところである。曝露評価に関しては、曝露評価ツール・モデルに関する OECD の最新動向を入手できた。

研究分担者

高橋 祐次 国立医薬品食品衛生研究所
毒性部 動物管理室長
津田 洋幸 名古屋大学 津田特任教授
研究室 特任教授
横田 理 国立医薬品食品衛生研究所
毒性部 主任研究官
菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所
毒性部 客員研究員
渡部 徹郎 東京医科歯科大学大学院
医歯学総合研究科・教授
石丸 直澄 徳島大学大学院医歯薬学研究
部 (歯学域)・教授
小林 憲弘 国立医薬品食品衛生研究所
生活衛生化学部 第三室長
北條 幹 東京都健康安全研究センター・
薬事環境科学部生体影響研究
科・主任研究員

A. 研究目的

ナノマテリアルの曝露により懸念された健康・環境へのリスク評価の必要性の国際的な高まりを受けて、従前の化学物質のリスク評価手法を拡張する方向で研究開発が進められてきており、2019 年にはナノマテリアルが欧州の REACH 登録制度の本格的な対象となったことを受け、その評価に必要な OECD 試験法ガイドラインの開発や改良が欧州を中心に急ピッチで進められている。さらに、近年ではナノマテリアルを含めた先端的材料やそれらを複合

的に組み合わせた新規物質をアドバンスドマテリアルと呼び、より広い分野の新材料マテリアルの安全性評価に焦点が移りつつある。毒性学的観点からは、評価対象がアドバンスドマテリアルに拡大することになっても、生体内への吸収性や蓄積性、表面活性の増強による重要な生体影響が慢性影響であることには変わりはない。しかも、国際的な SDG (持続可能な開発目標) に向けた合意の中、2019 年発表された欧州グリーンデール政策では化学物質のライフサイクル全体のヒトや環境への影響に対処する戦略が始まっている。そのため新材料マテリアルはより広範且つ長期に渡り使用され続けることが求められ、慢性影響評価はこれまで以上に重要な評価手法として位置づけられる。我々は、先行する研究において、費用と時間のかかる二年間連続吸入曝露試験をより省力化した試験法として改良することにより、効率的にナノマテリアルの慢性影響評価を行う試験系を開発することに取り組んでいる。その手始めとして先行研究において二年間連続吸入曝露試験の結果を概ね間歇曝露法で代替可能であることを確認してきた。しかし、曝露には依然 2 年間の期間を必要とすることに加え、曝露設備の占有率も高いという問題が残っていた。そこで、本研究ではさらにその効率を高める試験法の開発に加え、長期間の体内蓄積

性による影響をより詳細に解析して、慢性影響の予測性を評価できる指標の検討を行い、将来的な短期間試験の開発に試汁基盤的研究を進めることを目的としている

具体的には、曝露手法をより効率化するために、間歇型曝露手法の利点を更に活かして、同じ設備を使って曝露日程をずらすことにより複数の慢性試験を同じ2年間に効率的に曝露できる手法を開発することを目的とする。また、先行研究ではカーボンナノチューブ曝露で誘発される肺がんと中皮腫について、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誘発性評価に対して吸入曝露後の体内分布と毒性発現メカニズムが及ぼす影響を明らかにすることも目的とする。さらに、本研究で得られた指標をリスク管理基準等に適用するためには、管理の対象となる曝露シナリオを設定して基準値等を検討する必要があると考えられる。そこで、将来的なリスク評価や管理に備えて、ナノマテリアルの曝露評価手法の最新情報を入手することも目的とする。

B. 研究方法

本研究班は、慢性吸入曝露による実験データが利用出来るカーボンナノチューブを中心として、Taquann 法の曝露手法のさらなる効率化のための自動化等を含めた曝露装置の改良と曝露プロトコルの改良を検討する。装置の改良のめどが立った段階で2年間の慢性吸入試験を行う。体内分布と毒性発現メカニズムの解析に関してリンパ系経路の解析を可能とするトランスジェニックマウスの適用法を検討した後、吸入後のナノチューブの体内移行の解析を行う。曝露評価モデル等の情報に関しては OECD 作業グループの活動を中心に情報収

集を行う。

慢性影響評価法の改良と吸入曝露装置の効率化:

これまで、多層カーボンナノチューブ (MWCNT) は三井物産から提供された MWNT-7 を使用して研究を進めてきたが、保有する検体をほぼ使い切った状況であるが、三井物産では MWNT-7 の生産はすでに終了していることから、MWNT-7 と同様の製造法で生産された NT-7 をナノテクノロジービジネス推進協議会より入手し、今後の実験における MWCNT のベンチマーク物質として使用することとした。まず、NT-7 の物理化学的性状を評価し、高度分散法 (Taquann 法) 処理による影響を評価した。次に、Taquann 処理で得られた NT-7 (T-NT7#53) のエアロゾル濃度設定試験として、吸入曝露装置での質量濃度、エアロゾル粒子数 (CPC)、空気力学的質量中央値 (MMAD)、繊維長 (SEM) を測定した。(横田)。次に、C57/BL/6 雄性マウスとダブルトランスジェニックマウス (Prox1-GFP/Cdh5-BAC-CreERT2-ROSA-lox-stop-lox-tdTomato-SMA-GFP) に対して、T-NT7#53 の単回吸入曝露試験 (6時間/日) を実施し、曝露直後、1, 7, 14, 28 日経過後に解剖し肺組織や肺胞洗浄液 (BALF) のサンプリングを行った (横田)。尚、国立衛研に設置された Taquann 全身曝露吸入装置 (ver.3.0) は、今後の長期曝露実験に備え改修作業を本研究班で検討している。高分散性乾燥検体を得る工程では、検体を Tert-ブチルアルコール (TBA) に分散、濾過、瞬間凍結、凍結乾燥と煩雑な作業と人手を要する。複数のナノマテリアルを同時並行して効率の良い吸入ばく露実験方法の開発の律速段階となっているため、この工程の自動化するための研究を進めている。この検体調製の工程を改善するため、①ろ過に用いるシーブの大型化、②シーブの洗浄方法の検討、③ろ液の瞬間凍結方法の検討を行

別添 3

なった。(高橋)。

気管内投与法の開発として、ラットの気管内投与による2年間の発癌試験を実施した。Taquann 処理 (53 μ m メッシュ) された NT-7 (T-NT7#53) を、0.1% Tween80 含有生理食塩水を加えて超音波浴槽で分散させた。0.01 mg/mL の分散液の二次粒子径を DLS で測定した。また、予備試験として、F344 雄ラットに1週間に1度、1 mL/kg 体重の投与量で、マイクロスプレイヤー (PennCentury) を用いて4回投与した。低用量群 (L 群)、中用量群 (M 群)、高用量 (H 群) および超高用量群 (EH 群) の4群を設定し、0.0175、0.07、0.28 および 0.42 mg/kg 体重となるように投与し、肺の MWCNT 含有量を大西法により測定した。発癌試験は、TIPS に類似する初期集中型の反復投与とし、1週間に1度、13回投与後に2年間観察飼育する方法とした。F344 雄ラットを、対照群 (C 群)、L 群、M 群、H 群 および EH 群の5群に分け、予備実験と同様の投与用量で、1週間に1度、合計13回の投与を行い、投与完了後にサテライト動物の肺負荷量を測定した (北條、広瀬)。

体内分布と慢性影響発現部位の解析:

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年間の間歇吸入曝露実験の結果を解析した (菅野)。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 (1.5、7.0 および 15 μ m・各群 21×10^{12} の同一動物の本数) による肺と胸膜中皮における障害および発がんについて解析を行った (津田)。

体内分布の解析に関して、リンパ管内皮細胞を遺伝学的に蛍光タンパク質で標識したトラ

ンスジェニックマウス (リンパ管レポーターマウス: Prox1-GFP) に対して粒子状物質を、1日6時間で単回吸入曝露させて、体内分布と慢性影響発現部位の解析を行い、粒子状物質の吸入による組織炎症の惹起や、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) の誘導を検討し、そのメカニズムを明らかにする (菅野、渡部)。また、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-td 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 (渡部)。

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、NWNT-7 (NT-7) の全身吸入曝露実験を実施し、曝露後0、1、7、14 および28日での肺組織、BALF細胞などを用いて、免疫学的な解析を行った。また、*in vitro* の実験系として、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、TGF- β 、NF- κ B シグナルを中心として解析を進めるとともに、*in vivo* での MMP-12 を介した線維化の機転を解析した (石丸)。

曝露評価手法の情報収集:

OECD の工業用ナノ材料作業部会 (WPMN) 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ビナーに参加し (2021年12月2日)、既存あるいは新たに開発されたツールやモデルに関する情報収集を行った。

また、OECDから公開された報告書を調査し、内容を整理した(小林、広瀬)。

<倫理面への配慮>

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

C. 研究結果

慢性影響評価法の改良と吸入曝露装置の効率化:

NT-7 原末の外観は MWNT-7 に比較して嵩が低く、また平均繊維長は $4.4 \pm 3.4 \mu\text{m}$ であり、MWNT-7 (平均繊維長約 $7 \mu\text{m}$) に比較して短かった。Taquann 法処理した NT-7 (T-NT7#53) の繊維長は $4.7 \pm 3.4 \mu\text{m}$ であり、平均繊維長には Taquann 処理による影響はみられなかった。Taquann 全身曝露吸入装置 ver 3.0 を用いた T-NT7#53 のエアロゾル濃度設定試験における質量濃度は、低濃度では 1.5 mg/m^3 、高濃度では 3.1 mg/m^3 、MMAD は 2 回のデータを取得しており、 $0.90 \mu\text{m}$ ($\sigma_g 5.82$) と $1.11 \mu\text{m}$ ($\sigma_g 5.64$) の結果が得られた。エアロゾル化した T-NT7#53 の繊維長は $5.6 \pm 3.5 \mu\text{m}$ であった。次に、T-NT7#53 低濃度群の全身曝露吸入実験を実施した。Sub-group A と B で実施した 2 回の平均質量濃度は 2.8 mg/m^3 、高濃度群では 5.0 mg/m^3 となった。MMAD は低濃度群において $0.96 \mu\text{m}$ ($\sigma_g: 7.4$) と $1.08 \mu\text{m}$ ($\sigma_g: 6.8$)、高濃度群において $1.4 \mu\text{m}$ ($\sigma_g: 5.0$) と $1.3 \mu\text{m}$ ($\sigma_g: 5.1$) の値を示した。

一方、BALF 細胞の観察を行った結果、曝露後 1 日経過した時点では L 群、H 群ともに好中球が観察された。また、L 群、H 群とも曝露から時間が経過するにつれて、NT7 を貪食

した肺胞マクロファージの数は減少傾向にあることを明らかにした。

Taquann 全身曝露吸入装置の改修では、①シーブの改良(大型化)の検討では、ろ過効率は 28% という結果が得られたが、手動による方法では約 80% であるため、ろ過効率は低下した。②シーブの洗浄方法の検討は、2-プロパノールによる逆洗によるシーブの洗浄は手動方法に比較して効率良く洗浄が可能であったが、縁部分には若干の残渣が残留した。③ろ液の瞬間凍結方法の検討では、ナノマテリアル検体を含む濾液は、瞬間凍結する必要があり、そのため凍結工程及びその検体を掻き取って凍結乾燥工程とする装置の設計を行った。凍結板への噴霧法では、噴霧された TBA は速やかに固化したが、10 回以上の操作では、固化した TBA の掻き取りが十分にできなくなり、板に TBA が次第に厚く堆積することとなった。噴霧凍結法では、ステンレス製の容器内部一面には固化した TBA が付着した状態となり、スクレイパーを用いた TBA の回収作業において、温度差による結露が発生し、理想的な状態の TBA が得られなかった。

気管内投与実験については、まず、Taquann 処理保土ヶ谷製サンプル (T-NT-7#53) の DLS による二次粒子径を確認したところ、ピーク値は 571.4 nm であり、三井製のサンプルよりやや低い値だった。4 回の反復投与の結果、肺内 MWCNT の蓄積率は L 群でおおよそ 40%、他の群では 60 から 80% であった。また、発癌試験の 13 回の投与が完了した。最終投与翌日の L 群、M 群、H 群および EH 群の肺負荷量は、それぞれ 30、191、980 および $1369 \mu\text{g/Lung}$ であった。総投与量と比べると蓄積率は、L 群が 47%、M 群が 75% であり、H 群と EH 群で 90% を超えていた。

体内分布と慢性影響発現部位の解析:

別添 3

2 年間の間歇吸入曝露による低濃度群 (L 群); $2.7 \pm 0.1 \text{ mg/m}^3$ と高濃度群 (H 群); $5.2 \pm 0.2 \text{ mg/m}^3$ の群間に死亡率の差は認められなかった。肉眼的に肺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。2 年目の肺負荷量は、L 群; $61.1 \pm 2.2 \text{ } \mu\text{g/lung}$ 、H 群; $91.6 \pm 21.5 \text{ } \mu\text{g/lung}$ であった。肉眼的に L 群に 2 例に結節性病変を確認し、組織学的に腺癌であった。免疫染色において TTF-1 陽性、CC10 陰性であり、II 型肺胞上皮由来の腺癌である事が示された。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、 $15 \text{ } \mu\text{m}$ 群の合計数で有意であった ($9/32$ 、 $p < 0.05$)。これに肺胞上皮過形成を加えた数でも高度に有意 ($23/32$ 、 $p < 0.0001$) であった。また MWCNT-7 群では悪性中皮腫が高頻度 ($11/13$ 、 $p < 0.0001$) に発生した。すなわち、前がんと腫瘍病変の発生において 1.5、7.0 および $15 \text{ } \mu\text{m}$ 間の有意差はなく、また $1.5 \text{ } \mu\text{m}$ の短い DWCNT でも発がんする可能性のあることが示された。

体内動態に関する研究において、EMT に関わるマーカー分子を文献的に検索し、過去に MWNT-7 の気管内投与後の肺遺伝子発現を GeneChip により網羅的に測定した結果と対比し、この条件下で変動が確認された。その変動の意義について解析を継続中である。また、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 に対してナノマテリアル吸入曝露実験を施行し、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。さらに、TGF- β の内皮細胞に対する作用を EndoMT レポーター細胞を用いて検討した結果、TGF- β 存在下で培養した細胞から、間葉系細胞マーカーである α

SMA を発現する細胞 (EndoMT が誘導された細胞) が出現することを見出した。また、EndoMT が誘導された細胞においては、内皮細胞マーカーである VEGFR2 の発現が維持されている細胞 (部分的 EndoMT が誘導されている細胞) と VEGFR2 発現が消失している細胞 (完全に EndoMT が誘導されている細胞) が存在することを明らかにし、それぞれの細胞画分を FACS ソーティングした。

免疫系への影響として、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、BALF 細胞のサイズは有意に低下した。また、高濃度の MWNT-7 曝露によって BALF 細胞内の肺胞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濃度依存的に有意に上昇した。さらに、低濃度の MWNT-7 曝露によって BALF 細胞における CD54 mRNA 発現の上昇が認められた。また、MWNT-7 曝露によって BALF 細胞における Cox2 mRNA 発現は有意に上昇した。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、Taquann 処理された NT-7 の短期吸入曝露によって、減少した肺胞マクロファージは曝露後 4 週で回復することが判明し、MMP-12 あるいは CD54 を介した肺胞マクロファージの活性化が短期試験においても確認された。一方で、RAW264.7 細胞を用いた *in vitro* の実験において、Taquann 処理 MWCNT-7 の添加によって直接 MMP-12 mRNA 発現が上昇することが明らかになった。加えて、NF- κ B を介した MMP-12 の関与が NF- κ B 遺伝子ノックアウトマウスを用いて、明らかになった。

曝露評価手法の情報収集:

OECD が主催したナノマテリアルの曝露評

価手法に関するウェビナーでは、毎年、上市されるナノ関連製品が年々増加している状況から、人や環境への曝露は避けられず、新規ナノマテリアルの健康及び安全への懸念が高まっていることを受けて、OECD では新しい曝露評価ツール及びモデルの開発を行っていることが紹介されていた。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。

D. 考察

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使用するにあたり、NT-7 原末の特性を明らかにするとともに、Taquann 処理による影響についても調べた。その結果、NT-7 の繊維長は MWNT-7 よりも短い。また、Taquann 処理による繊維長分布への影響は認められなかった。今後は、エアロゾル化した線維の Aggregate/Agglomerate の割合の比較、MMAD 測定などの情報からエアロゾルの特性を明らかにする。次に、先行研究で実施した MWCNT の間歇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歇吸入曝露プロトコルを提案し、慢性影響評価を進める。今年度はまず、単回吸入曝露試験を実施し、肺への負荷量の経時変化に関する基礎データを取得し、また、肺組織の免疫応答や病理組織学的解析との結果とを合わせ

て、間歇曝露のプロトコルの立案を行う。肺負荷量の分析に先立ち、回収した BALF 細胞から肺胞マクロファージへの取り込みについて観察した結果、吸入曝露から時間が経過するにつれて、NT-7 を貪食した肺胞マクロファージの数は減少傾向を示したため、今後実施予定の肺負荷量についても、曝露から時間経過するにつれて減少すると予想される。単回吸入曝露試験における質量濃度測定の結果から、目標濃度を概ね達成し、エアロゾル効率も 40-42%とエアロゾル濃度設定試験(動物なし)におけるそれよりも低値を示したが、これは動物被毛への NT-7 の吸着によるロスが考えられた。この結果は、先行研究における MWNT-7 と同様の結果であり、Taquann 吸入曝露装置の精度の高さを示した。MMAD に関しても先行試験 (Particle Fibre Tox 2016) における MMAD とほぼ同等の結果を示した。

Taquann 全身曝露吸入装置の改修に関して、大型化したシープでは、十分なろ過効率が得られなかった。シープの洗浄方法については、逆洗することにより自動化の目処が立った。ろ液の凍結方法については、滴下掻き取り凍結法と 1 流体噴霧ノズルを用いた噴霧凍結方法を試みた。滴下掻き取り凍結は大量の検体処理は困難であり、噴霧凍結法は、大量のろ液を瞬時に凍結可能であるが、作業環境中に微細な凍結検体が漏れ出すこと、凍結検体を回収する際に空気中の水分を吸収し溶け出すことが課題となった。今後、これらの点を改良した方法により、Taquann 法の工程の自動化処理を進める必要がある。

ラットの気管内投与については、13 回投与後の H 群と EH 群における肺負荷量の蓄積率は、予備試験に比べると、かなり高くなった。仮に H 群で胸膜中皮腫の発生率が高すぎると、本研究の目的を果たせない恐れがあるが、H

別添 3

群は、Suzuiらの試験と同程度の肺負荷量であったため、彼らの結果と同様に、肺腫瘍と胸膜中皮腫の発生率が有意に増加することが期待される。一方、L 群ではクリアランスが良好であったことから、肺腫瘍が認められないレベル (NOAEL) が得られると思われる。現在は、経過観察中であり、最終年度に全動物の剖検を行う。

慢性吸入曝露による影響の解析では、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。肺負荷量と肺重量、及び、体重の関係からは H 群の吸入量は、肺毒性を超えて一般毒性が強く誘導される量に達しており、発癌性に関しては用量相関性が保証されない曝露濃度であったと考察するのが妥当であると考えられたが、肺組織について免疫染色を用いた詳細な解析を行った結果、用量相関性について、前駆病変に当たる組織変化などの検討を進める必要性が明らかとなり、今後、いくつかの遺伝子情報を含めた解析の必要性が示された。また、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 EMT 誘導因子の高進が示された。肺胞上皮細胞の 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 は血管・リンパ管の透過性を上昇させることでナノマテリアルの体内取り込みの亢進の原因となることが予想される。今回同定した「部分的 EndoMT が誘導されている細胞」において発現している EndoMT 誘導因子を明らかにすることで、ナノマテリアル曝露による健康リスクの低減に寄与することが期待される。

一方、TIPS 法による慢性影響研究では、長さの異なる DWCNT (1.5、7.0 および 15 μ m) について同じ本数を肺内噴霧投与して 104 週の

発がん実験を行ったが、この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。また 1.5 μ の短い DWCNT でも発がんする可能性が示された。

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 (24 ヶ月) 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。また、NT-7 吸入曝露によって、肺胞マクロファージは M2 マクロファージへの分化が認められた。NT-7 吸入曝露によって、CD54 陽性肺胞マクロファージが増加した。加えて、肺組織における MMP-12 mRNA 発現が増加した。NT-7 吸入曝露によって、脾臓、頸部リンパ節での免疫担当細胞の分画へは大きな影響はなかったが、M2 型マクロファージの肺への動員の可能性が考えられた。

OECD において、ナノマテリアルの曝露評価ツール・モデルの評価が行われ、幾つかのモデルが曝露評価に適したものであると判断された。ただし、これらのツールやモデルの使用にあたっては、製品中のナノマテリアルの含有量、排出量、曝露中の粒径分布等のナノマテリアルのキャラクターゼーションに関するデータが適切なものである必要があるため、これらのデータの正確性がモデルの予測結果に大きく影響すると考えられた。

E. 結論

研究要旨

本研究では、2 年間の慢性吸入曝露による公表データが利用出来るカーボンナノチュ

ープを中心として、今年度は、先行研究において開発してきた通常の二年間連続吸入曝露試験結果と比較可能な慢性間歇型曝露手法をさらに効率化するための曝露装置の改良と曝露回数を少なくした気管内投与プロトコルの開発を目的とする。さらに、定量的なリスク評価に備えて吸入曝露後の体内分布の把握とそのメカニズム解析を行うと共に、ナノマテリアルの曝露評価手法の最新情報を入手することも目的とする。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、今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った。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(EndMT)に関する検討を行うと共に、先行研究で行われた 2 年間の MWNT-7 の間歇曝露研究結果の病理及び免疫ネットワークの詳細な解析、TIPS 法による二層ナノチューブ(DWCNT)発がん実験の解析を行った。また、OECD 作業グループ活動から曝露評価モデル等の情報収集を行った。本研究からは従来から使用してきた MWNT-7 同様の製造方法で作成した NT-7 を使用することとしたが、Taquann 法による繊維長さや、繊維長分布、吸入曝露時の MMAD は従来のもとの同性を確認した。マウスへの NT-7 の単回吸入曝露でも肺胞マクロファージの M2 マクロファージへの分化が認められた。一方、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、シーブの大型化ではろ過効率の低下を招いたが、シーブの洗浄方法において逆洗することにより自動化の目処が立った。ろ液の凍結方法について噴霧凍結法が大量のろ液を瞬時に凍結可能であったが凍結検体の

回収に課題が残り今後の改良の必要性が示された。短期間の間歇気管内投与実験では、全 13 回の投与が完了し、肺の MWCNT 蓄積率は予想よりも高くなったが、既報の情報から、用量依存的に肺腫瘍および胸膜中皮腫の誘発が期待できるレベルと考えられた。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。先行研究で行われた NMNT-7 の 2 年間の間歇吸入曝露試験データの解析では、群間に死亡率の差は認められなかった。肺負荷量と肺重量、及び、体重の関係からは高用量暴露群の吸入量は、発癌性に関する用量相関性の保証されない高負荷量である可能性が考えられたが、肺組織について免疫染色を用いた詳細な解析を行った結果、前駆病変に当たる組織変化などの検討を進める必要性が示された。また、長期曝露後の BALF 細胞の解析では、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。一方、先行研究から行っている長さの異なる DWCNT(1.5、7.0 および 15 μ m)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が示された。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ビナーに参加し、OECD が開発あるいは評価したナノマテリアルの曝露評価ツール・モデルに関する情報を得た。ただし、現状ではモデルの使用にあたって幾つか課題も見られ、今後も開発・評価が継続される見通しであることから、引き続き情報収集を行う必

要があると考えられた。

以上、現時点までの成果としては、間歇曝露型の吸入曝露装置の改良が進んでおり、慢性実験に向けた準備が整った。気管内投与では、短期間の間歇曝露による慢性観察試験を開始した。2年間の間歇曝露による影響と、通常の連続曝露慢性実験の結果についての分子マーカーによる比較や Prox-1 マウスの活用によるナノマテリアル曝露の体内分布の解析を行える環境と、短期曝露に対応する分散性の確認ができたところである。曝露評価に関しては、曝露評価ツール・モデルに関する OECD の最新動向を入手できた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 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

2. 学会発表

- 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

鈴藤文、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)