

令和4年度 厚生労働行政推進調査事業費補助金(化学物質リスク研究事業)  
分担研究報告書

研究課題:

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

分担研究課題名:間欠吸入曝露による慢性影響評価に関する病理学的研究

研究分担者:菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 客員研究員  
研究協力者:横田 理 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 主任研究官  
研究協力者:高橋 祐次 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 室長

**研究要旨**

ナノマテリアル曝露により懸念された健康・環境へのリスク評価の必要性の国際的な高まりを受けて 16 年近くが過ぎ、従前の化学物質のリスク評価・管理の枠組みを拡張する方向で様々な評価法の開発が進められてきた。さらに、ナノマテリアルよりも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。この社会的ニーズにかなった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ることとなり、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ようになると考えられる。本研究では、この間欠型曝露手法の利点を更に活かして、複数の慢性試験を同時期に効率的に曝露できる手法を開発することを目的とする。昨年度までに 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(曝露時間6時間/回、4週毎、計26回、曝露濃度は低濃度群(L群);  $2.7 \pm 0.1 \text{ mg/m}^3$ 、高濃度群(H群);  $5.2 \pm 0.2 \text{ mg/m}^3$ )の結果を解析し、2年目の肺負荷量は、L群;  $61.1 \pm 2.2 \text{ } \mu\text{g/lung}$ 、H群;  $91.6 \pm 21.5 \text{ } \mu\text{g/lung}$  で TTF-1 陽性の腺癌を L 群に 2 例にみとめた。本年度は、II型肺胞上皮の過形成の背景病変の解析を継続するとともに、過形成初期の病変の局在、及び MWNT-7 を貪食したマクロファージの肺内局在と、リンパ管の走行との関係を解明する目的で、リンパ管内皮を可視化可能な Prox1-GFP マウスの国立衛研動物施設への導入および、Taquann 吸入装置による MWNT-7 の吸入実験を開始した。これらにより MWNT-7 の終末細気管支領域への集積と、それによる組織反応の様態の解析を開始した。

**A. 研究目的**

新素材としての産業用ナノマテリアルについては、新しい物性に伴う未知のヒト健康影響の懸念に対して適正な安全性

評価手法の確立が急務となっているが、これまで 16 年近くにわたり OECD や各国が各種研究を精力的に行ってきたにもかかわらず、未だに体系的な評価手法

は見いだせない。我々は、これまでの研究において、慢性影響に関する知見を積み上げ、二年間の連続吸入曝露との結果を比較可能な間欠型曝露手法の開発を行ってきた。本研究では、間欠型曝露手法の効率化を更に推し進めて、より効率的な曝露手法を開発することを目的とする。本分担研究では、OECD TG451により実施されたMWNT-7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結果の解析結果をもとに、本年度は、II型肺胞上皮の過形成初期の病変の局在、及びMWNT-7を貪食したマクロファージの肺内局在と、リンパ管の走行との関係を解明するため、リンパ系経路を可視化可能なProx1-GFPマウスの国立衛研動物施設への導入、および、Taquann吸入装置によるMWNT-7の吸入実験を開始した。これらによりMWNT-7の終末細気管支領域への集積と、それによる組織反応の様態の解析を開始した。

## B. 研究方法

本分担研究では、主として肺の病理組織学的な検討を実施した。以下に検体、曝露方法、使用動物の概要を記載する(詳細は研究分担者 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 室長 高橋祐次、及び研究分担者、東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 教授 :渡部 徹郎の項を参照)。

### B-1. 検体

検体は多層カーボンナノチューブの一つであるMWNT-7(三井、lot No.: 060125-01k)を使用した。高分散性の乾燥検体とするため、tert-ブチルアルコール(特級、関東化学株式会社)に懸濁、53 $\mu$ mの金属シーブ(特注品、セイシン企業)でろ過、凍結乾燥によって乾燥

検体を得る Taquann 法処理を行った。

### B-2. マウス全身曝露吸入実験

#### 1) 動物

Prox1-GFP トランスジェニック雄性マウスを使用した。

#### 2) 群構成

吸入曝露実験の検体は MWNT-7 を用いた。対照群 (Ctrl 群、清浄空気のみ : 1 頭)、低濃度曝露群 (Low concentration 群 : 3 頭)、高濃度曝露群 (High concentration 群 : 3 頭) の 3 群構成とした。Taquann 全身曝露吸入装置 Ver.3.0 を使用し、1 日 6 時間 (10:00~16:00) の全身曝露吸入を 13 回行った。

#### 3) 吸入曝露実験装置

MWNT-7のエアロゾル化は、既設の Taquann直噴全身吸入装置 Ver3.0を使用した(共同開発 柴田科学株式会社、特許申請中)。

### B-3. 解剖

肺組織のサンプリングは最終曝露後に行った。左肺は免疫組織染色用に、右肺は透明化用に採取した。今年度は、本分担研究において、肺組織における吸入ナノマテリアルの分布を観察するために、定法に従って肺組織の透明化を行い、3次元レベルの観察を Leica THUNDER モデル生物実体顕微鏡を用いて施行した。

### 倫理面への配慮

本実験は動物愛護に関する法律、基準、指針を遵守し国立医薬品食品衛生研究所・動物実験委員会の承認のもとに人道的実施された。

ナノマテリアルの実験に際しては、当研究所の専用実験施設内で、その運用規則に従い実施しており、暴露・漏洩を防止する対策については万全を期して実験を行った。

### C. 研究結果

低濃度ならびに高濃度の MWNT-7 を吸入曝露した Prox1-GFP トランスジェニックマウスから肺組織をサンプリングし、透明化処置を行い、実体顕微鏡によって観察した。その結果、MWNT-7 は、終末細気管支周囲に局在することが示された。透明化肺を GFP 励起光(455nm)にて蛍光観察を実施した結果、終末細気管支・気管支細動脈の系列(BA)のリンパ管と、肺細静脈系列(V)のリンパ管の二つの系列が交互に、肺門から末梢に向けて放射状に分布する事が確認された。そして、前者 BA 系列のリンパ管周囲に局限して MWNT-7 が局在し、V 系列のリンパ管の周囲には局在しない事が判明した。また、末梢の毛細リンパ管の形状が、MWNT-7 の吸入により変化している可能性が示唆され(図1)、今後の解析例数の追加による組織計測値の有意差検定が必要であると考察された。今後、MWNT-7 の沈着部位の細胞構成を確認する為に、透明化肺をパラフィンブロック化し、連続組織切片による解析を進める予定である。

### D. 考察

昨年度解析した、2 年間の間欠曝露実験における前駆病変の解析の結果、終末細気管支近傍における MWNT-7 を貪食したマクロファージの集簇を多く認め、それによる局所的な慢性炎症の領域にほぼ一致して TTF-1 陽性細胞の密度の増加を認めた。この密集像は病理組織診断学的には過形成性の範疇に留ま

るが、その原因と考えられる MWNT-7 が恒久的にその部位に存在すると想定されることから、腫瘍性増生に発展する基盤となる病変であると考えerの必要性が残った。

このような初期病変の局在には MWNT-7 を貪食したマクロファージの肺内挙動と特定の部位への局在、及び、マクロファージと密接な関係の存在が想定される肺内リンパ管の局在と反応の解析が重要であると考えた。その為に国立医薬品食品衛生研究所に導入した Prox1-GFP トランスジェニックマウスから肺組織をサンプリングし、透明化処置を行い、実体顕微鏡下で GFP 蛍光観察を実施した結果、終末細気管支・気管支細動脈の系列(BA)のリンパ管周囲に局限して MWNT-7 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ことから内皮の内皮間葉移行(EndoMT)を含めた細胞の詳細解析を透明化肺をパラフィンブロック化し、連続組織切片とする事、等により更に進める。

### E. 結論

リンパ系経路を可視化可能な Prox1-GFP マウスの国立医薬品食品衛生研究所の動物施設への導入および、Taquam 吸入装置による MWNT-7 の吸入実験を開始した。これらにより MWNT-7 の終末細気管支領域への集積と、それによる組織反応の様態の解析を開始した。今後、リンパ管内皮細胞の内皮間葉移行(EndoMT)を含めた肺病変の形成過程の詳細解析を透明化肺をパラフィンブロック化し、連続組織切片とする事、等により進める。

謝辞:

本研究の遂行にあたり、技術的支援をしていただいた、辻昌貴氏、森田紘一氏、菅康佑氏、

相田麻子氏、相原妃佐子に深く感謝する。

## F. 参考文献

1. Kasai T, Umeda Y, Ohnishi M, Mine T, Kondo H, Takeuchi T, Matsumoto M, Fukushima S. Lung carcinogenicity of inhaled multi-walled carbon nanotube in rats. Part Fibre Toxicol. 2016 Oct 13;13(1):53.
2. Taquahashi, Y, Ogawa, Y, Takagi, A, Tsuji, M, Morita, K, Kanno, J.(2013) An improved dispersion method of multi-wall carbon nanotube for inhalation toxicity studies of experimental animals. J Toxicol Sci. 38(4):619-28.

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

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)  
<https://doi.org/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- $\kappa$ B Activation in Chronic Peritonitis. Am J Pathol. 2022.192:1559-1572 (2022) doi:

10.1016/j.ajpath.2022.07.009.Okubo Y, Ohtake F, Igarashi K, Yasuhiko Y, Hirabayashi Y, Saga Y, Kanno J. Cleaved Delta like 1 intracellular domain regulates neural development via Notch signal-dependent and -independent pathways. Development. 2021 Oct 1;148(19):dev193664. doi: 10.1242/dev.193664. Epub 2021 Oct 4.

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.

### 2. 学会発表

Taquahashi Y, Yokota S, Tsuji M, Morita K, Suga K, Hojyo 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、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。

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

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

#### H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

図 1:透明化した肺の同一部位の、透過像(左)および GFP 蛍光像(右)を示す。黄色矢印は、MWNT-7 の沈着の一部を示す。両図それぞれの左半分が高濃度吸入暴露群の肺、右半分が対象群の肺である。

右図 GFP 蛍光像の左半において、上から水平に 4 本のリンパ系列が描出されており、上から 1 番目と 3 番目が終末細気管支・気管支細動脈の系列(BA)のリンパ管系に相当する。この 1 番目と 3 番目に沿って、左図透過像の左半において黒色粒状の MWNT-7 の局在が確認される(黄色→)。2 番目と 4 番目の系統が肺細静脈系列(V)であり、そこには MWNT-7 の局在は確認されない。

