

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)

I . 総括研究報告書

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)
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 客員研究員

研究要旨

本研究では、2年間の慢性吸入曝露試験結果が唯一利用出来る多層カーボンナノチューブのデータに基づくナノマテリアルの吸入曝露リスク評価法の開発を目指す研究行っており、今年度は、検体調製工程の自動化の実用化を目指した改良と、短期間間欠吸入慢性観察実験を開始した。また、短期間の間欠気管内投与は、経過観察をすると共に、用量依存性の解析研究も開始した。さらに、体内分布の把握とそのメカニズム解析を引き続き行うと共に、ナノマテリアルの曝露評価手法の最新国際情報を入手することを目的とした。

ナノマテリアルの吸入曝露システムの効率化に関しては、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、ろ過効率に大きく影響するケーキの生成抑制を攪拌子を導入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、ドライアイス冷媒として用いることで、同重量の TBA を固化することが可能であることが示された。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 について、単回吸入曝露試験における肺負荷量の経時的変化の結果をもとに、NT-7 の半減期はおよそ 7 日であることを明らかにし、この結果をもとに 1 週間に 1 回の 13 回の間欠吸入曝露試験を開始した。一方、短期間のラット間欠気管内投与実験では、全 13 回の投与が完了し経過観察中であり、肺負荷量を既報と比べると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。Prox1-GFP に対するナノマテリアル吸入曝露の結果、気管支の分岐部分において MWNT-7 が集積し、リンパ管の形状が変化することが示された。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た検討において RNA-sequencing を行った結果、部分的 EndoMT が誘導されている細胞の特異的マーカー候補を同定した。また、NT-7 の単回吸入曝露による肺免疫への影響は MWCNT-7 吸入曝露と異なった反応性が存在することが明らかになった。加えて、MWCNT-7 曝露によるマクロファージを介した慢性化および線維化の分子機序の一旦が明らかにされた。一方、TIPS 法で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事を目的として、MWCNT-7 を 0.00008~0.5mg/ラットで用量依存性を検討する慢性観察研究を開始した。曝露評価に関しては、曝露評価ツール・モデルの開発とガイドライン文書の進捗に関する OECD の最新動向を入手できた。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、今年度の成果としては、間欠曝露型の吸入曝露装置の実用化の目処が立ってきており、短期吸入曝露慢性実験に加えて発がん性の用量相関性解析も開始できた。また、ナノマテリアル曝露の体内分布解析が透明化技術により順調に進展しており、in vitro 研究でも特異的マーカー候補を明らかにできている。曝露評価に関しても曝露評価ツール・モデルに関する OECD の最新動向を入手できている、全体として概ね目標に向けて進展している。

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 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み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や中皮腫について、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:

国立衛研に設置された Taquann 全身曝露吸入装置 (ver.3.0) は、長期曝露実験に備え改修作業を検討している。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、昨年度の検討結果を基に、本年度は、濾過率向上させるためケーキの生成抑制を目的とした攪拌子を組み込んだ装置の開発、並びに液体窒素に替わる冷媒としてドライアイスを用いた TBA の瞬間凍結方法を検討した。(高橋)。

先行研究では、多層カーボンナノチューブとして MWNT-7 を使用してきたが、本研究からは MWNT-7 と同様の製造法で生産された NT-7 を使用している。昨年度確立した NT-7

の高度分散法 (Taquann 法) 処理による単回吸入曝露試験を実施した。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。単回吸入曝露後の肺負荷量を測定し、NT-7 の半減期を求めた。その結果をもとに、間欠吸入曝露試験 (1 週間に 1 回 6 時間、13 週にわたって間欠曝露) を開始した (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 の間欠吸入曝露試験 (1 週間に 1 回 6 時間、3 週にわたって間欠曝露) を実施し、曝露直後に解剖し肺組織) のサンプリングを行った (横田)。

気管内投与法の開発として、TIPS に類似する初期集中型の反復投与によるラットの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。F344雄ラットを対照群 (C群)、低用量群 (L群)、中用量群 (M群)、高用量群 (H群) および超高用量群 (EH群) の5群に分け、一回当たり、それぞれ0、0.0175、0.07、0.28 および0.42 mg/kg体重の用量で、マイクロプレイヤー (PennCentury) を用いて、13回投与した。肺のMWCNT含有量を大西法により測定した。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:

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低用量域における発がん標的組織 (肺・胸膜中皮) を明らかにして、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、MWCNT-7を4日間、1回/日にて0.00008~0.5mg/ラットの用量で投与して、104週観察する研究を行う (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)に対してナノマテリアル吸入曝露実験を施行した。摘出した肺組織を透明化した上で3次元で蛍光顕微鏡で観察することで、MWCNT-7粒子が集積する動態とリンパ管の関係を3次元レベルで解析した(渡部・菅野・高橋)。さらに、ナノマテリアル吸入曝露によって活性化されるTGF- β シグナルの内皮細胞に対する作用を明らかにするために、EndoMTレポーターマウス(Cdh5-BAC-CreERT2-ROSA-lox-stop-lox-tdTomato-SMA-GFP)から樹立したEndoMTレポーター細胞(EMRECs)にTGF- β 存在下で培養し、内皮細胞マーカーであるVEGFR2と間葉系細胞マーカーであるSMA-GFPの発現を指標にFACSソーティングし、RNA-sequencingを施行することで部分的EndoMTが誘導されている細胞の特異的マーカーを探索した。(渡部)。

免疫系への吸入曝露による慢性影響については、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、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、マウス骨髓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。一方で、*in vivo*の実験として、MWCNT-7のマウス腹腔内投与による線維化の分子機序を検討した(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)の会合に参加し、曝露評価プロジェクト(SG8)で進められているプロジェクトの情報収集を行った。2022年6月にOECDより「Particle Size and Size Distribution of Nanomaterials: OECD Test Guideline 125」(以下、TG225)が出版されたことから、この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(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:

Taquann法の自動化検討における攪拌工程を組み込んだ装置の開発では、熱可塑性のPolyoxymethylene樹脂を素材とした攪拌子を作製し、攪拌子の上下運動によって攪拌子がシーブ面と衝突しないようにするため、装置内でのシーブ面の位置を固定し、シーブ面から5mm上までを攪拌子の可動範囲と設計として、実際に装置を作製した。

ろ液の凍結方法としてドライアイスで冷媒とした実験を行った。ドライアイスを500g投入した広口瓶は約10分後には0°C以下となった。ドライアイスの昇華に伴い広口瓶内が二酸化炭素雰囲気になったところで、TBA500 mLを投入したところ、約22分後にTBAは固化し凍結乾燥可能な状態となった。また、ドライアイスを広口瓶に投入後、しばらく放置することで広口瓶内は二酸化炭素のみに置換されるため、広口瓶に空気中の水分が凝集することによる

別添 3

結露の発生を抑制することが可能であった。

TBA は吸湿すると凝固しなくなるため、この点からも優れた性質であると考えられた。

昨年度実施した、Taquann 全身曝露吸入装置 ver 3.0 を用いた T-NT7#53 の単回吸入曝露試験の肺負荷量の結果は、単回吸入曝露試験日を day0 として、day0: 低用量群 1.7 μg 、高用量群 3.5 μg 、day1: 低用量群 2.0 μg 、高用量群 4.1 μg 、day7: 低用量群 1.9 μg 、高用量群 2.3 μg 、day14: 低用量群 1.73 μg 、高用量群 1.9 μg 、day28: 低用量群 1.1 μg 、高用量群 1.3 μg の値を示した。

一方、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 2.7 mg/m^3 (エアロゾル効率 45%)、高濃度では 4.7 mg/m^3 (エアロゾル効率 39%)、MMAD のデータは、低濃度群で 1.1 μm (σg 5.8) と高濃度群で 1.2 μm (σg 5.3) の結果が得られた。間欠吸入曝露試験における肺負荷量については現在計測中である。

ラット気管内投与実験については、13 回の投与は昨年度に完了している。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 $\mu\text{g}/\text{Lung}$ 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。現在、経過観察中であり、年度末 (試験開始後 81 週経過) までに途中解剖した個体は、各群 2 匹程度で、いずれも、投与との関連は無いものと考えられた。

体内分布と慢性影響発現部位の解析:

2 年間の TIPS 法投与後 2 年間観察実験では、0.0008~0.5 $\text{mg}/\text{ラット投与}$ の 5 群構成にて投与を開始した。投与 52 週後に (5 匹)、75 週後に (5 匹)、最終 104 週 (15 匹) 後に肺と胸膜中皮の炎症程度と腫瘍発生について解析する。

屠殺時には胸郭洗浄液、血液、胸郭、肺、肝、腎、脾、骨髄等を採取して炎症の程度、前がん病変を含む腫瘍病の発生について詳しく解析する予定である。6 ヶ月経過で、斃死ラットはない。

体内動態に関する研究において、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、ナノマテリアル吸入曝露実験を施行し、摘出した肺組織を透明化して 3 次元レベルで観察することによって、気管支の分岐部分において MWNT-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を見出した。また、細気管支付近では細い管状に局所的に粒子が集積することを明らかにした。また、MWNT-7 を吸入させた Prox1-GFP TG mouse の透明化肺が得られ 3 画像分析の準備を進めた。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を FACS ソーティングして、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) 画分を FACS ソーティングした。得られた細胞画分における内皮細胞マーカーと間葉系細胞マーカーの発現を検討した結果、それぞれのマーカーの発現が EndoMT の移行に伴い変化することが示された。さらに、RNA-sequencing 解析の結果、部分的 EndoMT が誘導されている細胞の特異的マーカー候補を同定した。

免疫系への影響として、NT-7 の短期吸入曝露によって、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 吸入暴露による 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。さらに、マウス骨髄由来マクロファージを用いて NT-7 の反応性を検討すると、MWCNT-7 で確認された細胞死、MMP-12 発現の亢進は認められなかった一方で、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 の暴露による 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。

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 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ている。TG125 は、粒径 1-1000 nm の粒子と繊維、長さ 1-20 μ m の繊維を対象としたものであり、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 について記述されている。

TEM/SEM では、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 10^3 個の粒子が必要とされている。

液中の粒子の計測手法としては、CLS, DLS, NTA/PTA について記述されている。以下では、これらの手法のうち最も広く用いられている動的光散乱(DLS)は、流体力学的な粒径が得られ、粒径分布は強度ベースとなる。20 分間(計測時間)の安定性が必要であり、0.2v%よりも低濃度の試料に適用できる。統計的に有用な情報が得られるには 10^5 個以上の粒子が必要で

ある。

D. 考察

Taquann 法の効率化に関して、検体調整自動化装置に求められる条件は、①TBA が凝固しない温度帯(37°C程度)を維持した環境にてろ過を行えること。②液体窒素を用いないろ液の瞬間凍結方法、③ろ過工程におけるケーキの生成抑制ができること、④フィルターの自動洗浄が可能であること、⑤装置のサイズは一般的な冷蔵庫程度のサイズであること、である。本年度は、ケーキの生成抑制を目的として、攪拌子を組み込んだ装置の開発を行った。現在、攪拌を行いながらシーブを振動させる方法の開発に着手している。

ドライアイス冷媒として用いる TBA の固化方法は凍結乾燥に十分な性能を有していることが示された。ドライアイスの潜熱は 573.5 KJ/Kg、比熱は 835.8 J/kgK、相転換温度は -78.5°Cである。これらの値から、質量 500g を冷媒として用い、相転換温度から TBA が十分に凍結すると考えられる 20°Cに到達するまでの吸熱量を計算すると 500g のドライアイスは 41,450kJ を吸熱する。一方、TBA500 mL と広口ガラス瓶(質量 750g)が 33°Cから 20°Cまで温度低下する際に放熱する熱量は 6,876 kJ と計算されることから、ドライアイス 500g を冷媒として 500mL の TBA を固化するには十分な吸熱量であると考えられた。

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間欠吸入曝露試験を実施した。本研究では、先行研究で実施した MWCNT の間欠吸入曝露をより効率的に実施することを

別添 3

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る。今年度は昨年度実施した単回吸入曝露試験の肺負荷量の結果について整理し、その結果もとに間欠吸入曝露プロトコルの提案と曝露実験を実際に開始した。

単回吸入曝露試験の肺負荷量について測定したところ、昨年度実施した BALF 細胞での取り込み結果と同様の結果を定量的に得た。これらの結果から半減期を算出した結果、およそ 7 日であることを明らかにした。

上記の結果をもとに、間欠吸入曝露試験プロトコルについて、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、エアロゾル効率も 40 %程度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。MMAD に関しては、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 、 σg 2.6~3.0) とほぼ同等の結果を示した。また、低用量群と高用量群とで同一の MMAD 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。今後、間欠吸入曝露試験における肺負荷量の経時変化に関するデータを取得し、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、間欠曝露プロトコルの有用性を検証していく。

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、かなり高くなったが、H 群は Suzui ら 2016 の試験と、EH 群は Numano ら 2019 の試験と、それぞれ肺負荷量とが同レベルであったため、前者で肺腫瘍の発生を、後者で胸膜中皮腫の有意な発生率を

捉えることができると期待される。Numano ら 2019 の試験では、試験開始から 47 週時点で中皮腫の発生が確認されており、本試験ではこれに比べて中皮腫発生時期が遅い(発生率が低い)ことが推測される。これは用いた検体の違い、つまり MWNT-7 と NT-7 の違いに起因するのかもしれない。

また、Prox1-GFP に対するナノマテリアル吸入曝露の結果、気管支の分岐部分において MWNT-7 と考えられる粒子が集積し、リンパ管の形状が変化することが示された。以上の結果から、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部分的 EndoMT マーカー候補の機能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、慢性観察終了時には、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。

NT-7 吸入曝露後の BALF 細胞は減少し、経時的に回復することがわかった。この現象は MWCNT-7 の吸入曝露でも同様であった。また、NT-7 吸入曝露によって BALF 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わかった。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。MWCNT-7 の吸入曝露では M1 型への分化が目立っていた点と相違している。NT-7 吸入曝露によって、肺組織における MMP-12 mRNA 発現上昇が確認されたが、BALF 細胞では MWCNT-7 との違いがある可能性が示さ

れた。BMDMを用いた *in vitro* の実験系はナノマテリアルに対するマクロファージの直接の反応を検証する上で極めて有用である。一方で、MWCNT-7 の腹腔内投与による慢性腹膜炎のモデルでは腹腔内マクロファージの NF- κ B の活性化を介して MMP-12 の発現が調節されており、線維化の MMP-12 を介した分子メカニズムが存在する可能性が示されたが、TGF- β などの線維化に関与する分子との関連性は不明である。

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バリデーションでは、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 $< 5 \mu\text{m}$ 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。

E. 結論

研究要旨

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。

ナノマテリアルの吸入曝露システムの効率化では、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、ろ過効率に大きく影響するケーキの生成抑制を攪拌子を導入するこ

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、ドライアイスを冷媒として用いることで、同重量の TBA を固化することが可能であることが示された。今後、これらの点を組み込んだ方法により、Taquann 法の工程の自動化処理を進める計画である。Taquann 全身曝露吸入装置 Ver.3.0 を使用し、T-NT-7#53 をマウスに 6 時間の単回全身曝露吸入を実施し、肺負荷量の経時的変化を明らかにした。NT-7 の半減期はおおよそ 7 日と計算され、その結果をもとに 1 週間に 1 回 (1 日 6 時間)、13 週にわたる間欠吸入曝露実験を実施した。その結果、13 回にわたり安定した曝露濃度と MMAD の結果を得ることに成功した。一方、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、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る。ただし、胸膜中皮腫の発生率は既報より低い可能性がある。Prox1-GFP に対するナノマテリアル吸入曝露の結果、気管支の分岐部分において MWNT-7 が集積し、リンパ管の形状が変化することが示された。さらに、TGF- β の内皮細胞に対する作用について EndoMT レポーター細胞を用いた検討において RNA-sequencing を行った結果、部分的 EndoMT が誘導されている細胞の特異的マーカー候補を同定した。また、NT-7 の単回吸入曝露による肺免疫への影響は MWCNT-7 吸入曝露と異なった反応性が存在することが明らかになった。加えて、MWCNT-7 曝露によるマクロファージを介した慢性化および線維化の分子機序の一旦が明らかにされた。一方、TIPS 法で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事を目的として、MWCNT-7 を $0.00008 \sim 0.5\text{mg}$ /ラットの用量で投与する慢性観察研究を開始した。曝露評価に関しては、曝露評価ツール・モデルの開発とガイドライン文書(特に TG125)の進捗に関す

る OECD の最新動向を入手できた。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、今年度の成果としては間歇曝露型の吸入曝露装置の実用化の目処が立ってきており、短期吸入曝露慢性実験に加えて発がん性の用量相関性解析も開始できた。また、ナノマテリアル曝露の体内分布解析が透明化技術により順調に進展しており、in vitro 研究でも特異的マーカー候補を明らかにできている。曝露評価に関しても曝露評価ツール・モデルに関する OECD の最新動向を入手でき、全体として当初の予定より遅れ気味であるが目標に向けて進展している。

F. 研究発表

1. 論文発表

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-κB Activation in Chronic Peritonitis. *Am J Pathol.* 192:1559-1572, 2022. doi: 10.1016/j.ajpath.2022.07.009.

2. 学会発表

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、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

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)