

令和 5 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5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 一般財団法人化学物質評価研究機構 安全性評価技術研究所 技術顧問

研究要旨

本研究では、2年間の連続慢性吸入曝露試験をより高越的に評価するための間欠型の慢性吸入曝露評価手法の開発を目指す研究を行っている。今年度は、昨年度に引き続き検体調製工程の自動化装置の開発、短期間間欠吸入慢性観察実験、短期間の間欠気管内投与結果の解析と用量依存性の解析研究の経過観察、吸入後の体内分布の把握とマクロファージを介したメカニズム研究と共にナノマテリアルの曝露評価手法の最新国際情報の入手を行った。

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、良好な懸濁状態を維持しつつ、濾過工程を簡便に実施可能な装置を開発した。これにより、効率的な吸入曝露実験の実施並びに実験実施者の労働安全への貢献が期待される。従来使用してきた 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变化の結果より、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、野生型マウス、リンパ管マウス、ラットに対して 1 週間毎に 1 回の 13 回の間欠吸入曝露試験を実施した。一方、13 週間のラット反復気管内投与の試験では、肺腫瘍と胸膜中皮腫が発生し、総負荷量に対する用量反応性のデータを得ることができた。肺腫瘍発生の用量反応性は、基本的に吸入試験と類似するものと考えられ、肺負荷量をベースとして 2 年間の慢性吸入試験をある程度代替し得ることが示された。Prox1-GFP マウスに NT-7 を 3 週間(1 回/週)吸入曝露した結果、肺組織においては、気管支の分岐部分において NT-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が観察された。抗 GFP 抗体による免疫染色肺切片の観察において集積部位の細胞組織反応の詳細解析が可能であることが示された。凝集体は、終末細気管支周囲の領域に気管支に沿って規則的な模様を描くように局在することが示され、リンパ管の形状に影響することが示唆された。さらに吸入曝露した肺を 3 次元で解析したところ、肺周縁部の微小リンパ管の増生などの変化が観察された。また、EndoMT レポーター細胞を用いた検討により、CD40 が部分的 EndoMT から完全 EndoMT への移行を抑制していること示され、ナノマテリアルの吸入曝露による EndoMT の進行を抑制するための標的となり得ると考えられた。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ために MWCNT-7 を低用量域(0.00008mg/ラット)から 5 用量群で投与した慢性観察研究では、74 週までに最高用量群(0.5mg/ラット)の 4 例に腫瘍病変が肉眼所見として認められた。免疫系への影響では、NT-7 の単回吸入長期曝露による肺免疫への影響は MWCNT-7 吸入曝露と類似していた。加えて、骨髄由来マクロファージを用いて *in vitro* での NT-7 と MWCNT-7 の反応性に違いが見られた。曝露評価手法の情報収集に関しては、OECD の TG 126 に記載されている疎水性指標は他の物性パラメータの中でも、ナノマテリアルの様々な相互作用に関するより多くの情報を提供する可能性があると考えられた。

以上、効率的慢性試験法の開発に関して、13 週間の短期間欠型の気管内曝露実験により既報の 2 年間連続慢性曝露吸入試験の結果と中用量群まではよく似た用量依存性を示すことが明

らかにでき、気管内投与でもある程度吸入試験の代替になりうることを示すことができた。さらに、現在進行中のマウスへの同様の間欠吸入曝露試験結果と比較も可能となり、肺への負荷量解析と慢性影響に関する種差を明らかにすることも可能となると考えられる。

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 名古屋市立大学大学院医学研究科 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 Deal 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欠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資する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、間欠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。本研究では、この新規手法をISOのTC229において標準化することを目指している。

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

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出てくると考えられる。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た。本年度は、これまで自動化に向けて検討してきた個々の装置を統合的に配置し、自動化装置と

して完成させることに注力した。(高橋)。

上述の方法をもとに、NT-7の高度分散法 (Taquann法) 処理による短期間欠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。野生型マウス、遺伝学的にリンパ管内皮細胞を蛍光標識したトランスジェニックマウス (Prox1-GFP)、ラットに対して間欠吸入曝露試験 (1週間に1回6時間、13週にわたって間欠曝露) を実施した (横田)。曝露5回目と13回目、曝露経過1年目に解剖し肺組織のサンプリングを行い、肺負荷量を測定した (横田)。

慢性吸入試験と比較可能な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年間の発がん試験を実施した。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、マイクロスプレイヤー (PennCentury) を用いて、1週間に1度、13回投与した。試験開始104週後に最終解剖を行い、定法により病理検索を実施した (北條、広瀬)。

体内分布と慢性影響発現部位の解析:

本年度では、Prox1-GFPマウスに対して多層カーボンナノチューブ (NT-7) の全身曝露実験を行った。対照群 (1頭)、低濃度曝露群 (3頭)、高濃度曝露群 (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3回行った。最終曝露後に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、肺組織における吸入ナノマテリアルの分布

別添 3

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(渡部・菅野)。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レポーター細胞をTGF- β 存在下で72時間培養し、内皮細胞由来の細胞を標識する蛍光タンパク質であるtdTomato、間葉系細胞を標識するGFP、そして内皮細胞を標識するVEGFR2に対する抗体でFACSソーティングし、TGF- β の作用を α SMAなどの間葉系細胞のマーカーの発現を定量的RT-PCRで測定することで検討した。また、FACS分画した細胞集団における遺伝子発現をRNA sequencing法で網羅的に解析した(渡部)。

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、F344雄ラットを用いてMWCNT-7を実験開始の1~4日間に1日1回/・TIPS法にて0.00008mgから0.5mg/ラットで投与を行った。各群構成は25匹として、投与終了後52週(5匹)、72週(5匹)解剖例では腫瘍発生について詳細に検討中である(津田)。

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)の全身吸入曝露後12ヶ月での長期観察を実施し、免疫学的な解析を行った。BALF細胞における肺胞マクロファージの表面マーカー、BALF細胞あるいは肺組織における各種遺伝子mRNA発現を検討した。さらに、リンパ節あるいは脾臓におけるNT-7長期曝露の影響を検討した。また、*in vitro*の実験系として、マウス骨髄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(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。2023年7月にOECDより「Test Guideline No.126: Determination of the Hydrophobicity Index of Nanomaterials Through an Affinity Measurement (親和力計測によるナノマテリアルの疎水性指数の測定)」(以下、TG225)が出版されたことから、TG126について調査し、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:

自動化装置は、低湿度状態と、濾過条件に最適な温度管理を行うため、全体を風防で覆う設計とした。低湿度の条件を実現させるため風防上部に除湿した圧縮空気の導入部を設けた。攪拌子は、耐摩耗性・耐薬品性・低吸水性・高機械的強度を有している熱可塑性のPolyoxymethylene 樹脂(POM 樹脂)を素材を使用し、十字状の形状とした。シープ面への衝突をさけるため、攪拌子の位置は固定し、シープ面を上下に ± 70 mm稼働させるダンパーを組み込んだシステムを採用した。シープに検体の懸濁液を輸送する方法は、ナノマテリアルの懸濁状態が良好な状態であることが望まれる。そのため、耐圧容器に懸濁液を入れ、圧縮空気をもちいて圧送する方式とした。濾過後のシープの洗浄は、洗浄用のチャンネルにシープを移動してイソプロピルアルコールを噴霧する仕様とした。ろ液の凍結にはドライアイス

別添 3

使用するため濾過装置近傍の温度低下により液が凝固することが想定される。そのため、シーブ及び漏斗を電熱線ヒータにて被覆して加温する方法を採用した。また、濾過装置上層部に温風ヒータを設置した。最終的に、これらの装置をすべて組み込み自動化装置を完成させた。装置のサイズは、装置のコントローラ部分を除き、安全キャビネット内に収納可能なサイズとなった。

Taquann 全身曝露吸入装置 ver 3.0 を用いた NT-7 の間欠吸入曝露試験における質量濃度の平均結果は、低濃度は 0.8 mg/カートリッジで 2.5~2.7 mg/m³ (エアロゾル効率 45%)、高濃度は 1.6 mg/カートリッジで 4.4~4.7 mg/m³ (エアロゾル効率 39%) となった。MMAD のデータは、低濃度群で 1.1~1.4 μm (σg 6.0) と高濃度群で 1.2~1.6 μm (σg 4.5) を示した。肺負荷量については、間欠吸入曝露 5 回目 (5th): 低用量群 6.4 μg/Lung、高用量群 13.4 μg/Lung、13 回目 (13th): 低用量群 18.4 μg/Lung、高用量群 40.6 μg/Lung、曝露 1 年経過時: 低用量群 4.6 μg/Lung、高用量群 22.3 μg/Lung の値を示した。

ラット 13 回反復気管内投与実験については、試験開始後 73 週時点で、EH 群で初めて胸膜中皮腫が観察された。その後、H 群および EH 群で最終解剖までに胸膜中皮腫と疑われる病変により、9 および 11 例を剖検した。現在、最終解剖の標本は観察途中だが、肉眼観察結果をもとにすると、肺の腫瘍を認めた例数とその頻度 (%) は、C、L、M、H および EH 群において、それぞれ、2 例 (5.2%)、4 例 (10.5%)、13 例 (33.3%)、5 例 (13.1%) および 3 例 (15.0%) であった。一方、胸膜中皮腫は、C 群・L 群では観察されず、M 群、H 群および EH 群の例数と頻度はそれぞれ 1 例 (2.6%)、11 例 (28.9%) および 12 例 (60.0%) であった。

体内分布と慢性影響発現部位の解析:

体内動態に関する研究において、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 Prox1-GFP トランスジェニックマウスに対して、ナノマテリアルの吸入曝露実験を実施したところ、ナノマテリアルの吸入曝露を行ったマウスの肺組織においては、気管支の分岐部分において NT-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が観察された。今回 3 週間にわたり NT-7 の吸入曝露を行った Prox1-GFP マウスの肺を透明化し、ライトシート顕微鏡を用いてリンパ管の構造を 3 次元で解析したところ、NT-7 の吸入曝露により、肺周縁部の微小リンパ管の増生などの変化が観察された。病理学的には、終末細気管支周囲の領域に気管支に沿ってに規則的な模様を描くように局在することが示された。抗 GFP 抗体を用いた DAB 発色免疫染色切において、リンパ管が終末細気管支の壁外側、および、静脈に接して、そして、胸膜近傍まで分布する事を確認した。また、連続切片の画像情報をトレースすることで、3 次元構築を再確認できた。ヘマトキシレン単染色においても、リンパ管、および NT-7 と、それらの周囲に位置する細胞の種類の同定が凡そ可能なことが示された。さらに、今回 TGF-β 存在下で培養して EndoMT が誘導された EndoMT レポーター細胞から分画した部分的 EndoMT が誘導されている細胞の特異的マーカーとして CD40 を同定した。CD40 の発現を siRNA で低下させることで TGF-β による EndoMT の誘導が亢進されたことから、CD40 は部分的 EndoMT から完全 EndoMT への移行を抑制していることが示唆された。

2 年間の TIPS 法投与後 2 年間観察実験では 74 週までに無処置及び溶媒対照群で 3 例、0.0008 mg/ラット群で 1 例、0.004 mg/ラット群で

別添 3

1 例、0.5mg/ラット群 4 例の死亡がみられた。そのうち 0.5mg/ラット群に肉眼的肺腫瘍/中皮腫が認められた。

免疫系への影響として、NT-7 の単回長期暴露での BALF 細胞中の肺胞マクロファージ数は増加し、M1 および M2 のマクロファージの分化マーカーの発現は低下し、身分化マクロファージ・単球が増加していた。また、BALF 細胞および肺組織における *Mmp12* mRNA 発現は NT-7 の長期暴露によって増加した。一方で、マウス骨髄由来マクロファージ (MBDM) を用いて T-CNT ならびに NT-7 を添加刺激し、*Mmp12*、*Icam1*、*Tim4* mRNA 発現を定量 RT-PCR にて検討すると、*Mmp12* mRNA 発現は T-CNT にて有意に上昇するが、NT-7 の添加では変化が認められなかった。さらに、*Icam1* ならびに *Tim4* mRNA 発現は T-CNT の刺激で低下する一方で、NT-7 の添加では変化が確認されなかった。

曝露評価手法の情報収集:

OECD Test Guideline No. 126 では、親和力 (affinity) 計測によるナノマテリアル (NMs) の疎水性指数 (Hy) の測定方法を記載している。

ガイドラインで疎水性指数 (Hy) は「水が非極性分子を排除する傾向から生じる、水環境における非極性基または分子の会合」と定義される。様々な加工表面 (コレクター) への結合率を測定することにより、Hy は NM が非極性 (疎水性) 表面への結合を好む (水に対する親和性が低い) 傾向を示す。

この方法は推奨プロトコルを使用し、界面活性剤の有無に関わらず水溶液に分散された NM または NM 粉末に適用される。

D. 考察

本研究では、MWCNT の間欠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

荷量を考慮した間欠吸入曝露プロトコルを提案し、慢性影響評価を進めており、この本研究で提案している試験法については、現在 ISO の標準化に向けて標準化プロジェクトに入る前段活動として本研究班のプロトコルを TC229 会議に提案して議論を行っている。

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。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、① TBA 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。ナノマテリアルは凝集する性質が強く、また、Taquann 法で使用する溶媒のターシャルブチルアルコールは室温で凝固するため、作業者はこの二つに注意しながら作業をする必要があった。本分担研究は、良好な懸濁状態を維持しつつ、濾過工程を簡便に実施することに注力して自動化装置の開発に取り組んだ。今年度は、これらの条件を個別に検討し、自動化装置に実装した結果、濾過工程を実施する装置は安全キャビネット内に収まるサイズとして完成させた。これにより、効率的な検体調製並びに吸入曝露実験が可能となる。また、濾過工程における作業者の労働安全にも貢献が期待される。

昨年度実施の野生型マウスの単回吸入曝露試験における肺への負荷量推移の結果について半減期はおよそ 1 週間という結果を得ていた。この結果をもとに、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

別添 3

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 法の有用性が示された。

肺負荷量に関しては、野生型マウス間欠吸入曝露 5 回目(5th)と 13 回目(13th)、1 年経過時(52 週目)の肺負荷量を定量した。昨年度実施の、単回吸入曝露の時に得られた肺負荷量の半減期はおよそ 1 週間であったが、今回、13 回の間欠吸入曝露直後の肺負荷量が半減にするのにおよそ 39 週間を要した。このように、単回曝露の時と比べて間欠曝露においては、肺負荷量のクリアランスの低下が示唆されたものの、時間経過とともに、肺負荷量は減少したため、過負荷のない間欠吸入曝露プロトコルが提案された。

一方、今年度ラットの吸入曝露実験を開始した。マウスの曝露実験結果と概ね同様の結果を示し、本装置はマウスのみならずラットにも適用可能であることを確認した。今後、2 年間の慢性影響評価を実施し、先行の 2 年間連続吸入曝露試験の結果との相違を明らかにする。

ラットの 13 週間反復投与試験の結果、肺腫瘍の観察頻度は、L 群・M 群に関しては用量依存性に増加し、M 群の肺負荷量と肺腫瘍の観察頻度は、Kasai らの吸入試験の 0.2 mg/m³ 群の結果と、概ね一致するものであった。吸入試験の結果では、2 mg/m³ 群においてさらに発現頻度が高くなったのに対し(33.3%)、本研

究では、H 群、EH 群では頻度が低下した。これは、中皮腫により早期死亡が多く発生したため、発生時期の遅い肺腫瘍の頻度が、見かけ上、低下したものと思われる。また、2 年間の肺負荷量の Area Under the Curve(AUC)の形状は、吸入試験とは異なるにもかかわらず、同程度の肺発がんの反応性が認められたことから、早期に投与を完了させる IT による 2 年試験も慢性吸入試験の代替になり得ると考えられる。一方、胸膜中皮腫の発生頻度は、直線的に増加し、特に、1000 $\mu\text{g}/\text{rat}$ の総投与量を超える場合、CNT の肺発がんの評価に影響することがわかった。なお、今回の中皮腫の発現頻度や早期死亡の例数は MWNT-7 を用いた既報の TIPS 試験結果よりも低く、これは、保土ヶ谷製の NT-7 を用いたことが理由かもしれない。

Prox1-GFP マウスへのナノマテリアルの吸入曝露により採取した肺組織の透明化処理後の観察結果からナノマテリアルが気管そしてリンパ管の近傍に集積している可能性が推察された。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大型の MWNT-7 の凝集体が局在すること、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。他方、大型の MWNT-7 の凝集体が局在しない肺細静脈系列(V系列)の近傍の肺胞には、MWNT-7 を貪食した肺胞マクロファージが孤在性に認められた。BA 系列領域における組織反応と V 系列領域近傍の肺胞領域における組織反応には、差異があることが確認された。両領域における、マクロファージとリンパ管、特に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作成した連続パラフィン切片において詳細に進める予定である。また、EndoMT レポ

一ター細胞を用いた検討により、EndoMT は段階的に起きていることが証明され、Partial EndoMT 特異的なマーカーとして同定された CD40 が Full EndoMT への移行を抑制することで EndoMT を制御していることが明らかとなった。このことから、CD40 がナノマテリアルの吸入曝露による EndoMT の進行を抑制するための標的となり得ると考えられた。

TIPS法による慢性影響研究では、74 週までに 0.5mg/ラット群で 4 匹の死亡と肺の腫瘍性病変(肉眼所見)が認められたが、その他の群では MWCNT-7 曝露による腫瘍性病変を伴う死亡は認められていない。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 の単回吸入長期曝露によって肺胞マクロファージの割合ならびに細胞数は有意に増加しており、M1/M2 への分化に至らない未分化なマクロファージあるいは単球の分画の増加が認められた。R4 年度までに NT-7 吸入曝露後の肺胞マクロファージは減少し、経時的 28 日までに回復することが判明していた。この後 12 ヶ月まで漸増していたものと考えられる。従来用いられた MWCNT-7 の長期曝露においても未分化分画のマクロファージ・単球が増加していた点は共通の現象である。

NT-7 の長期曝露での肺組織および BALF 細胞における指標マーカーとして、CD54、Tim4 あるいは MMP12 を検討したところ、Mmp12 mRNA の濃度依存的な上昇が確認された。これまでに、肺胞マクロファージにおけるカーボンナノチューブの反応として MMP-12 が注目されてきたが、NT-7 の長期曝露においても MMP-12 が有用な毒性マーカーになりうる可能性が高い。一方で、*in vitro* の実験系では

NT-7 の反応性と T-CNT の反応性が異なっていた。さらに、NT-7 の短期曝露実では肺胞マクロファージの M2 への分化が亢進している点と T-CNT の短期曝露では M1 への分化にシフトしている点から両者のナノマテリアルに対する反応性の違いがある可能が考えられる。

OECD の WPMN の曝露評価プロジェクト (SG8) の情報収集として、今年度行った TG126 における調査では、水性指数 (Hy) の潜在的な利用可能性として、次の 3 点が挙げられていた。まずナノ粒子の環境中挙動の指標として使えると考えられる。カルボキシル基が付加したポリスチレンでは、-COOH の含量が増加するほど、疎水性が減少することが報告されている。また、生物濃縮性の指標としても活用できると考えられる。Hy が高いほど、微生物への吸着量が増加することが報告されている。さらに、異なる種類のナノ粒子の凝集の指標としても活用できる可能性がある。

E. 結論

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、ナノマテリアル吸入曝露方法を効率化するため、現在ボトルネックとなっているナノマテリアルの高分散検体を得る方法である Taquann 法の自動化について種々の条件を検討し、これらの機能を統合した形で組

別添 3

み込み、最終的には安全キャビネット内に収まるサイズの自動化装置として完成させた。

Taquann 全身曝露吸入装置 Ver.3.0 を使用し、NT-7 をマウスに 6 時間の単回全身曝露吸入を実施し、肺負荷量の経時的变化を明らかにした。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。また、肺負荷量の経時的变化についても明らかにした。13 週間のラット反復気管内投与の試験では、肺腫瘍と胸膜中皮腫が発生し、総負荷量に対する用量反応性のデータを得ることができた。肺腫瘍発生の用量反応性は、基本的に吸入試験と類似するものと考えられ、肺負荷量をベースとして 2 年間の慢性吸入試験をある程度代替し得ることが示された。

Prox1-GFP に対するナノマテリアル吸入曝露の結果、肺組織においては、気管支の分岐部分において NT-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が観察された。凝集体は、終末細気管支周囲の領域に気管支に沿って規則的な模様を描くように局在することが示された。GFP 励起光蛍光観察においては、終末細気管支領域(BA 系列)への集積と、肺細静脈系列(V 系列)の近傍の肺胞マクロファージへの集積が確認された。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。さらに Prox1-GFP マウスに NT-7 を 3 週間(1 回/週)吸入曝露した肺を 3 次元で解析したところ、肺周縁部の微小リンパ管の増生などの変化が観察された。また、EndoMT レポーター細胞を用いた検討により、CD40 が部分的 EndoMT から完全 EndoMT へ

の移行を抑制していること示され、ナノマテリアルの吸入曝露による EndoMT の進行を抑制するための標的となり得ると考えられた。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ために MWCNT-7 を低用量域(0.00008mg/ラット)から 5 用量群で投与した慢性観察研究では、74 週までに最高用量群(0.5mg/ラット)の 4 例に腫瘍病変が肉眼所見として認められた。免疫系への影響では、NT-7 吸入長期曝露後の BALF 中の肺胞マクロファージは増加した。NT-7 吸入長期曝露によって、肺胞マクロファージは未分化な分画が増加し、肺組織および BALF 細胞における *Mmp12* mRNA 発現上昇が確認された。さらに、BMDM を用いた *in vitro* の実験系で MWCNT-7 と NT-7 の反応性の違いが示された。曝露評価に関しては、OECD の TG 126 に記載されている疎水性指標は他の物性パラメータの中でも ナノマテリアルの様々な相互作用に関するより多くの情報を提供する可能性があると考えられた。

以上、効率的慢性試験法の開発に関して、13 週間の短期間欠型の気管内曝露実験により既報の 2 年間連続慢性曝露吸入試験の結果と中用量群まではよく似た用量依存性を示すことが明らかにでき、気管内投与でもある程度吸入試験の代替になりうることを示すことができた。さらに、現在進行中のマウスへの同様の間欠吸入曝露試験結果と比較も可能となり、肺への負荷量解析と慢性影響に関しての種差を明らかにすることも可能となると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Hojo M, Maeno A, Sakamoto Y, Yamamoto Y,

- Taquahashi Y, Hirose A, Suzuki J, Inomata A, Nakae D: Time-course of transcriptomic change in the lungs of F344 rats repeatedly exposed to a multiwalled carbon nanotube in a 2-year test. *Nanomaterials (Basel)*. 2023; 13(14):2105.
- Miyauchi A, Akashi T, Yokota S, Taquahashi Y, Hirose A, Hojo M, Yoshida H, Kurokawa M, Watanabe W: Effects of inhalation of multi-walled carbon nanotube (MWCNT) on respiratory syncytial virus (RSV) infection in mice. *J Toxicol Sci*. 48(7): 411-20. (2023)
- Shimizu M, Hojo M, Ikushima K, Yamamoto Y, Maeno A, Sakamoto Y, Ishimaru N, Taquahashi Y, Kanno J, Hirose A, Suzuki J, Inomata A, Nakae D: Continuous infiltration of small peritoneal macrophages in the mouse peritoneum through CCR2-dependent and -independent routes during fibrosis and mesothelioma development induced by a multiwalled carbon nanotube, MWNT-7. *J Toxicol Sci*. 2023;48(12):617-639.
- Sultana N., Fukamachi K., Jiegou Xu., Tsuda H., Suzui M. mRNA expression profile of cytokines in rat primary alveolar macrophages treated with multiwalled carbon nanotube (MWCNT). *Fundam. Toxicol. Sci.*, Vol.10(1), 27-30 (2023)
- Sultana N., Fukamachi K., Roy DC., Jiegou Xu., Tsuda H., Suzui M mRNA expression levels of CCL4, IL6, and CXCL2 in multiwalled carbon nanotube induced lung tumors in rats. *Fundam. Toxicol. Sci.*, Vol. 10(4), 137-141 (2023)
- 北條 幹:カーボンナノチューブの発がん性. *Precision Medicine*, 2023 年 6 巻 4 号, p.30-34
- 北條 幹, 坂本義光, 前野愛:最前線・ナノマテリアルの実際の危険性—ラット慢性試験によるカーボンナノチューブの発がん性評価. *ファルマシア*, 2023 年 59 巻 7 号, p. 659-663
- Hirose A, Maeno A, Hojo M, Taquahashi Y, Yokota S, Sakamoto Y, Kanno J: Comparison of tumorigenesis of MWCNT by intratracheal instillations and inhalation. ASIATOX 10th Annual Meeting, Taipei, Taiwan, (July 17-20, 2023).
- Tsuda H, Ahmed O, Saleh D, Alexander W, Alexander D, Numano T, Takase H, Naiki-Ito A, Hirose A, Kanno J, Yudasaka M, Yuge R, Tomono S, Wei M, Hojo M, Tsuruoka S., Carcinogenicity risk assessment of various carbon nanotubes by intra-tracheal intrapulmonary spray (TIPS) dosing followed by 2-year observation., *BOHS Inhaled Particles / NanOEH Conference 2023* (2023 5. 15-18, Manchester), *Annals of Work Exposures and Health*. 67. i43-i44. 10.1093/annweh/wxac087.105.)
- Yuhji Taquahashi, Koichi Morita, Kousuke Suga, Masaki Tsuji, Yusuke Okubo, Ken-ich Aisaki, Satoshi Kitajima, New approach for assessment of acute oral toxicity by multiple parameters of vital signs: development of a less invasive method for measuring biopotential in small laboratory animal using carbon-nanotube yarn as surface electrodes, 63rd Society of Toxicology Annual Meeting, (Accepted), Abstract Number/Poster Board number 3077/P180, 2024.3.11
- 高橋祐次、森田紘一、辻昌貴、菅康佑、相崎健一、北嶋聡、平林容子、先端素材カーボンナノチューブヤーンを使用した実験用小動物における低侵襲な生体電位測定法の開発、第 70 回 日本実験動物学会総会、2023.5.24
- 三浦伸彦、吉岡弘毅、横田理:酸化チタンナノ粒子と精巣機能障害、第 50 回日本毒性学会学術年会、神奈川 (2023.6.21)、シンポジウム
- Yokota S, Suga K, Taquahashi Y, Kitajima S: Development of a non-invasive method for testicular toxicity evaluation using a novel compact magnetic resonance imaging

2. 学会発表

- system, the 48th Annual Conference of the American Society of Andrology, Boston, USA (2023.4.21)
- Hojo M, Shimizu M, Ikushima K, Maeno A, Sakamoto Y, Yamamoto Y, Taquahashi Y, Kanno J, Hirose A, Suzuki J, Inomata A, Nakae D: Phenotypic characterization of macrophages during peritoneal mesothelioma development induced by a multiwalled carbon nanotube in wildtype C57BL mice. EUROTOX 2023, Ljubljana, Slovenia (Sep 10-13, 2023).
- Tsuda H. CARBON NANOTUBES, INNOVATIVE MATERIALS OF THE 21TH CENTRY: CARCINOGENICITY EVALUATION OF CARBON NANOTUBES WITH DIFFERENT WALL STRUCTURES The 51st International Symposium of The Princess Takamatsu Cancer Research Fund 東京 11月
- Jun Kanno, Yuhji Taquahashi, Naozumi Ishimaru, Miho Kobayashi, Tetsuro Watabe, and Satoshi Kitajima. Basic lung responses to multiwall carbon nanotubes monitored in mouse whole body inhalation studies. Symposium: Nanosafety and Nanotoxicology. ASIATOX-X, (2023.7.18), Taipei, Taiwan, (Oral).
- Jun Kanno, Yuhji Taquahashi, Naozumi Ishimaru, Satoshi Kitajima. 159 Keynote: An Overview of Carbon Nanotube Carcinogenesis from Mouse Inhalation Data, BOHS Inhaled Particles / NanOEH Conference 2023 (2023 5. 15-19, Manchester), Annals of Work Exposures and Health, Volume 67, Issue Supplement_1, May 2023, Pages i40–i41, <https://doi.org/10.1093/annweh/wxac087.097>
- Miho Kobayashi, Honoka Hirose, Masanori Nakayama, Tetsuro Watabe. Attenuation of the stress response is involved in the age-related reduction of microvascular density. Asia-Australia Vascular Biology Meeting 2023 (AAVBM2023), 2023.09, Korea, (poster)
- Kazuki Takahashi, Miho Kobayashi, Hisae Katsumata, Yukinori Ikeda, Tatsuhiko Anzai, Katarzyna A. Podyma-Inoue, Daniel M Alcaide, Kentaro Maeda, Jihwan Park, Kunihiro Takahashi, Yukiko Matsunaga, Yasuhiro Yoshimatsu, Tetsuro Watabe. Endothelial-mesenchymal transition (EndoMT) reporter cells visualized multiple groups of cells during progression of TGF- β induced EndoMT. Asia-Australia Vascular Biology Meeting 2023 (AAVBM 2023), 2023.09, Korea, (Oral)
- Naozumi Ishimaru. Chronic Immunotoxicity of Multi-Walled Carbon Nanotubes on Macrophages via MMP-12. Inhaled Particles/NanOEH conference 2023 Invitation Lecture, 2023.5.15, Manchester, UK.
- Aya Ushio, Kunihiro Otsuka, Takaaki Tsunematsu, Yuhji Taquahashi, Jun Kanno, Naozumi Ishimaru. The influence of multi-walled carbon nanotube for immune systems. 第 113 回日本病理学会総会 2024.3.28、名古屋

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)