

スト同様の体内滞留時間を示すか否か、等の要素を明らかにする必要があり、将来検討すべき課題である。しかし、動物実験でMWCNTにより、アスベストと類似したメカニズムにより中皮腫が発生することが示されたことから、新製品開発の際にはこの様な特性を十分に考慮することが望まれる。また現時点では、MWCNTを扱うヒトは暴露を最小限にすることが重要であると思われた。

今年度新たに実施したMWCNTの用量反応性試験では各用量群とも用量依存的に中皮腫と思われる腫瘍が腹腔内に認められた。前回の試験でのMWCNTの投与量は3mg/animal (1 x 10⁹本/動物)であったが、今回、0.003mg/kg群 (1 x 10⁶本/動物)で腹腔内臓器の癒着が肉眼的に認められない動物でも腫瘍発生が認められており、少なくとも腹腔内臓器の癒着が中皮腫発生の必須条件ではないことが示唆された。

フラレンに関しては本実験条件下(観察期間26週間)では中皮腫が観察されなかったが、貪食細胞が凝集塊の表面を浸蝕し微細な粒子として他部位へ運び出す可能性が形態学的に示唆されたことから、今後、さらに観察期間を延長し、生体に及ぼす影響について調査する予定である。

E. 結論

ナノマテリアルの短期発がんモデルとして、雄p53(+/-)マウスにMWCNTを単回腹腔内投与し、26週間観察した結果、腹腔内に中皮腫が発生し、その程度はア

スベストと同程度であった。一方、フラレン投与では発がん性は観察されなかった。また、MWCNTの追加実験から、腹腔内腫瘍発生に腹膜癒着の発生しない量からの用量相関性が確認された。

F. 健康危機情報

p53(+/-)マウスを用いたMWCNTの単回腹腔内投与試験により、中皮腫の発生が確認されたため、厚生労働省健康危機管理調整官宛に健康危険情報通報(グレードB: 情報提供、経過注視)を行った。

G. 研究発表

論文発表

Takagi A, Hirose A, Nishimura T, Fukumori N, Ogata A, Ohashi N, Kitajima S, Kanno J. Induction of mesothelioma in p53+/- mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube. J Toxicol Sci. 2008 Feb;33(1):105-16.

2. 学会発表

菅野 純、広瀬明彦、高木篤也、ナノマテリアルの毒性試験、毒性評価、日本薬学会第128年会、2008年3月26-28日、横浜

H. 知的財産所有権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

3. その他

317031、特願 2004-219285)

国内特許申請中（特願 2003-

平成 19年度 厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)
分担研究報告書

研究課題名:ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法の開発のための有害性評価および
体内動態評価に関する基盤研究

分担研究課題名:ナノマテリアルの発ガン性評価手法の開発に関する研究

分担研究者: 津田 洋幸 名古屋市立大学大学院医学研究科 生体機能分子医学講座 分子毒性学 教授
研究協力者: 深町 勝巳 名古屋市立大学大学院医学研究科 生体機能分子医学講座 分子毒性学 助教
徐 結苟 名古屋市立大学大学院医学研究科 生体機能分子医学講座 分子毒性学 研究員
David B. Alexander 名古屋市立大学大学院医学研究科 生体機能分子医学講座
分子毒性学 客員教授

研究要旨

TiO₂ (TD) 粒子やフラーレン (C60) などの物質は吸入と経皮膚曝露が危惧される。とくに発がん性の評価は重要であるが、吸入曝露評価においては、膨大な設備を要するためにハザード評価、リスク評価ともに十分なデータは得られていない。本研究では、専用の吸入設備を要しない試験法として、簡便で実験者に安全な経気管肺内噴霧法を開発した。この方法を用いて、TD は、乳腺発がん高感受性雌ヒト正常型 c-Ha-ras 遺伝子トランスジェニックラット (Tg) に、C60 は通常の F344 雄ラットに、予め発がん物質を投与した後に両物質を投与して発がんプロモーション作用の評価を行った。Tg においては TD は肺と乳腺腫瘍、C60 は肺腫瘍の発生において発がんプロモーション作用が見出され、長期投与では肺と乳腺に発がん性を示す可能性がある。乳腺腫瘍においては曝露部位と離れておりその機序について検討中である。

A. 研究目的

ナノ粒子（ここでは人工的に作成したものをさす）はその新機能や優れた物理化学的特性から多分野における全く新しい素材として世界中で開発が進められ、一部のものは既に市場に出回っている。しかし、今までに無い素材であるために生体影響についての知見は乏しい。しかしながらナノ粒子のカーボンブラックと TiO₂ は雌ラットにおいて肺に発がん性を示すことが分かってきた。さらに、肺以外の臓器における発がん性や神経系、免疫系への毒性影響などのデータは十分に得られていないのが現状である。ナノ粒子の生体内への吸収や分布あるいは ADME についての情報もほとんど得られていない。本研究では、TD と C60

を対象物質として、ラットにおける肺内投与における発がんプロモーション作用に注目し今後の評価法の基礎的知見を得ることを目的とした。

B. 研究方法

通常吸入装置を用いない簡易ラット肺内噴霧試験法を開発し得た。ラットをジエチルエーテルによる軽度麻酔下に噴霧ノズルを気管内に装入して肺内全体に被検物質を投与するものである。キセノンランプ光を胸壁を透過させて胸腔内に光を入れ、声門より噴霧ノズルを気管内に挿入して検体溶液（懸濁液）を投与することにより、検体を肺胞内まで投与した。予備実験においてインジゴ色素を用いた実験では肺胞内まで十分に

送達でき、この手技の動物に対する侵襲は軽度であった。この方法にて、TD と C60 の肺と乳腺の発がんプロモーション作用の有無を評価した

1. 乳腺発がん高感受性雌ヒト正常型 c-Ha-ras 遺伝子トランスジェニックラット (Tg) に既知の発がん物質の N-bis(hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN)を選び、0.2%の用量で2週間飲水投与し、投与終了2週間経過後より、TD (直径 20nm、ルチル型無コーティング) 500ppm と 250ppm 生食に懸濁して2週に1回0.5ml/ラットの用量で肺内投与し全経過 16 週まで投与・観察した。

2. F344 雄ラットを用いて、C60 の肺発がん・発がんプロモーション作用の有無を評価した。DHPN を 0.2%の用量で2週間飲水投与し、投与終了2週間経過後より C60 の 500ppm、250ppm、溶媒を投与した。C60 は砂糖水分散液溶液 ((財)化学物質評価研究機構調製) に懸濁して2週に1回 1ml/ラットの用量にて TD と同じ方法にて肺内投与し、全経過 40 週で終了した。肺の腫瘍性病変、炎症性の程度・サイトカインの誘導等の病理学的、生化学的解析を行った。

(倫理面への配慮)

実験は動物保護および倫理指針を遵守し、名古屋市立大学動物実験倫理委員会の審査を経て実験を実施した。

C. 研究結果

1. Tg ラットにおける TD の肺・乳腺発がんプロモーション実験において、肺内に投与した TD の臓器分布量 (micro g/wet g) は、500ppm 投与群で、肺 126±52 ; 脳 59±104 ; 頸部リンパ節 12.3±23.3 ; 乳腺 11.3±20.1 ; 肝 7.25±9.89 ; 卵巣 4.19±4.86 ; 腎 4.09±4.15 ; 腎 2.61±1.32 ; 子宮 2.5±3.1 であって、肺以外では脳に沈着していた (国立衛研・徳永・内野)。病理組織学的には TD の多くは肺胞マクロファージ内に取りこまれ、その周囲には軽度のリンパ球等の集簇をみる炎症性反応がみられた。電顕において、これらの沈着物質は TD の凝集体であることを確認した。肺の肺

胞上皮過形成と腺腫を併せた組織切片 1 cm² あたりを占める面積 (mm²) は、500ppm 投与群 1.08±0.87 ; 生食対照群 0.27±0.26 で 500ppm 投与群に有意の増加がみられた。乳腺腫瘍は生食対照群 3.33±3.16 個/ラット ; 250ppm 投与群 6.70±3.43 ; 500ppm 投与群 6.64±3.26 であり、両投与群で有意の増加がみられた。投与局所の肺以外に遠隔の乳腺においてもプロモーション作用が観察され、投与部位以外にも腫瘍を発生させる可能性が示唆された。

2. F344 雄ラットを用いた C60 の肺発がんプロモーション作用実験では、C60 の肺内分布量 (micro g/wet g) は、DHPN-500ppm 投与群 328±110 ; DHPN-250ppm 群 82±31、DHPN-Vehicle 群 0 であった (国立衛研・西村)。病理組織学的には C60 は肺胞マクロファージ内に取りこまれ、その周囲には軽度のリンパ球等の集簇をみる炎症性反応がみられた。C60 のマクロファージ内における形態については電顕にて観察している。

肺の腫瘍病変 (腺腫+癌) の頻度は、500ppm 投与群 5/10 (50%) ; 250ppm 投与群 5/10 (50%) ; 溶媒群 5/10 (50%) であり、500ppm 群で有意の増加を示した。癌は腺扁平上皮癌であった。病理組織切片 1 cm² あたりを占める腺腫と癌の併せた個数は、500ppm 投与群 4.0±1.9 ; 250ppm 投与群 1.4±1.6 ; 溶媒対照群 1.0±1.3 で 500ppm 投与群に有意の増加がみられた。同様に面積値においても 500ppm 投与群に有意の増加がみられた。

1 と 2 の両実験における肺の炎症性の程度・サイトカインの誘導等の病理学的、生化学的解析を行っている。

D. 考察

我々の開発した簡便な肺内投与方法は被検物質を溶媒懸濁あるいは溶解した状態で直接肺内に噴霧するもので、単なる気管内投与 (instillation) と較べて肺胞内にも充分被検物質が送達されることが確認され、今後有用な方法になると考えられる。

1. の実験において、TD は雌ラットの肺に対して発がん性を示すことは既に知られているが、この方法において、雌ラットにおいてプロモーション作用が観察され、過去のデータとこのモデルとの結果の整合性が確認された。さらに、TD は肺から、脳、リンパ節、乳腺、肝、卵巣等に移動して蓄積されていることが分かった。この実験において、曝露組織から遠隔の乳腺においてもプロモーション作用が認められたことについての機序については、今後の解析が必要である。

また、脳においてかなり多く（肺の約半分量）検出された事は、注目すべき所見で、移動経路の特定と脳組織における有害作用の有無について明らかにする必要がある。また電顕観察において、肺胞内でTD凝集体がマクロファージに貪食されている事は、今後異物による炎症反応やマクロファージによるROS産生について解析を進める必要がある。

CO60は((財)化学物質評価機構でショ糖溶液に分散化する事に成功しており、共同研究による提供を受けた。C60もTDと同様に、肺胞マクロファージ内に取りこまれ、その周囲には軽度のリンパ球等の集簇をみる炎症性反応がみられた。C60のマクロファージ内における形態については電顕にて観察している。肺の腫瘍病変において癌は腺扁平上皮癌であって、今までTDやカーボンブラックの吸入曝露で雌ラットに見られたものと同様である。一般にげっ歯類における化学物質による肺腫瘍は殆どが腺腫・腺がんであることから、このような扁平上皮癌の発生は異物発がんに共通の現象かも知れない。

E. 結論

TiO₂粒子などを中心的な対象物質として、専用の設備を要しない肺内投与法を検討し、経気管噴霧法を開発した。これを応用してラットにおけるTDとC60の肺発がんプロモーション作用、TDの乳腺発がんプロモーション作用が検出された。C60の発がん性は現状では分かっていないので、この評価系でプロモーション作用が証明されれ

ば、発がん物質である可能性が高い。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Onishi, T., Fukamachi, K., Ohshima, Y., Jiegou, X., Ueda, S., Iigo, U, Takasuka, N., Naito, A., Fujita K., Matsuoka Y., Izumi K., and Tsuda, H. Possible application of human c-Ha-ras proto-oncogene transgenic rats in a medium-term bioassay model for carcinogens. *Tox. Pathol.* 35: 436-443, 2007.
2. Tsuda, H., Iigo, M., Takasuka, N., Ueda, S., Ohshima Y., Fukamachi, K., Shirai, T., Hirano, S., Matsuda, E., and Wakabayashi, K. Possible enhancing activity of diacylglycerol on 4-nitroquinoline 1-oxide induced carcinogenesis of the tongue in human c-Ha-ras proto-oncogene transgenic rats. *Food and Chemical Toxicology* 45: 1013-1019, 2007.
3. Iigo, M., Shimamura, M., Hirano, S., Tokutake, S., Alexander, D.B. and Tsuda, H. Tanaka, T., (Editor) Cancer prevention and anti-metastatic effects by oral administration of procyanidins. *Cancer: Disease Progression and Chemoprevention*, p. p. 277-297, ISBN:81-308-0150-7, 2007.
4. Naiki-Ito, A., Asamoto, M., Jplaowadp, M., Talajasjo S., Uamashita, H., Tsuda, H., Ogawa, K. and Shirai, T. Gpx2 Is an Overexpressed Gene in Rat Breast Cancers Induced by Three Different Chemical Carcinogens. *Cancer Res* 67(23): 11353-11358, 2007.
5. Matsuoka, T., Hamaguchi, T., Fukamachi, K., Yoshida, M., Watanabe G., Taaya, K., Tsuda, H. and Tsubura, A. Molecular analysis of rat mammary carcinogenesis: an approach from

carcinogenesis research to cancer prevention.
Med Mol Morphol 40: 185-190, 2007.

2.学会発表

1) Carcinogenicity of nanomaterials, is it specific to nanoscale? Nanomaterials: Evaluating The Benefits And The Risks, Symposium in The 11th International Congress of Toxicology (ICTXI), July 15-19, 2007, Montreal, Canada,

2) 「ナノ粒子の発がん性評価の現状ー社会受容は可能かー」

日本薬学会第128年会シンポジウム「ナノマテリアルの医薬品への展開とリスク」
パシフィコ横浜、2008年3月28日

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

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。

平成 19年度 厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)
分担研究報告書

研究課題名: ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法の開発のための有害性評価
および体内動態評価に関する基盤研究

分担研究課題名: ナノマテリアルの生体内分析法の確立と体内動態の評価手法に関する研究

分担研究者: 西村 哲治 国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生化学部 室長
研究協力者: 小縣 昭夫 東京都健康安全研究センター環境保健部 生体影響研究科
大橋 則雄 東京都健康安全研究センター環境保健部 環境衛生研究科
福原 信隆 東京都健康安全研究センター環境保健部 生体影響研究科
久保田領志 国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生化学部
清水久美子 国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生化学部

研究要旨

ナノマテリアルであるC₆₀類は、様々な産業用材として利用されようとしている。これらのC₆₀類をヒトが経口摂取した場合の健康影響や体内動態等についての情報は極めて少なく、その評価が急務となっている。本年度は、ラットに強制単回経口投与を実施し、組織中のC₆₀を測定することにより、分散溶媒の違いによるC₆₀の吸収効率および吸収されたC₆₀体内分布の比較検討を行った。C₆₀は投与個体 28 匹のうち 2 匹から検出された。検出された臓器は、リボソーム懸濁溶液による投与の 1 日後の 1 個体の腎臓および腸管リンパ節、コーンオイル溶液投与の 1 日後の 1 個体の腸管リンパ節から検出された。コーンオイル溶液、スクアラン溶液、 γ -シクロデキストリンと包接した形態を溶解した水溶液、ポリビニルピロリドン溶液、ホスファチジルイノシトールまたはホスファチジルセリン溶液による投与個体の肝臓、腎臓、脾臓および腸管リンパ節からは検出されなかった。

一方、スクリーニングや生理作用発現メカニズムの解析には、実験動物への投与研究と並行して *in vitro* 試験系の確立が必要である。そのため、培養細胞へのC₆₀曝露研究のための手法の開発を行った。長期曝露を想定した細胞増殖影響におけるコロニー形成率への影響を検討した結果、わずかではあるが、C₆₀を継続して曝露した細胞、C₆₀を曝露した細胞、の順にコロニー形成率が低下した。これまでの検討では短期的な曝露においては細胞増殖や細胞毒性に影響は認められなかったが、長期曝露もしくは長期的に継続維持した後に影響が生じる可能性が示唆された。

また、取り込まれたC₆₀の細胞内小器官の分布を解析した結果、核分画に高い割合で検出された。

多層カーボンナノチューブ(MWCNT)が呼吸等を介して体内に入った場合の体内運命や体内動態を把握するために、臓器中のMWCNTを確認する方法として、臓器を強アルカリで溶解後、電子顕微鏡で観察による解析方法を設定した。さらに、ラットに経気道的に投与したMWCNTの各臓器への移行を検討した結果、経気道投与されたMWCNTは、投与後1日目の肺に高密度に存在することが明らかとなった。さらに、投与後の1日目の肝臓からも有意な量のMWCNTが検出され、経気道投与されたMWCNTは肺を経由して短時間で肝臓に移行することが示唆された。

A. 研究目的

ナノマテリアルである C₆₀類は、化学修飾や金属ドーブなどの化学変化体が示す有用な物性のため、様々な産業用材として応用されようとしている。これらの C₆₀類をヒトが経口摂取した場合の健康影響や体内動態等についての情報は極めて少なく、その評価が急務となっている。しかし、経口摂取した C₆₀の消化管からの吸収に関する情報は乏しく、健康影響や体内動態等を検討するための評価手法も確立しているとはいえない。そこで、本年度は、ラットに強制単回経口投与を実施し、組織中の C₆₀を測定することにより、分散溶媒の違いによる C₆₀の吸収効率および吸収された C₆₀体内分布の比較検討を行った。

一方、スクリーニングや生理作用発現メカニズムの解析には、実験動物への投与研究と並行して *in vitro* 試験系の確立が必要である。そのため、培養細胞への C₆₀曝露研究のための手法の開発を行い、長期曝露を想定した細胞増殖影響におけるコロニー形成率への影響を検討した。

多層カーボンナノチューブ (MWCNT) が呼吸等を介して体内に入った場合の体内運命や体内動態を把握するために、電子顕微鏡による生体試料中の解析方法の開発を行った。

ラットに経気道的に投与した MWCNT の生体内での臓器への移行および蓄積を明らかにすることを目的として、臓器中 MWCNT の確認試験法を開発し、MWCNT が肺を経由して肝臓への移行を示唆する結果を得た。

B. 研究方法

1. C₆₀ のラットへの経口投与における吸収・体内分布に関する検討

コーンオイルまたはスクアランに溶解した溶液、 γ -シクロデキストリンと包接した形態を溶解した水溶液、ポリビニルピロリドン溶液、リポソーム懸濁溶液、ホスファチジルイノシトールまたはホスファチジルセリン溶液を、それぞれ C₆₀ の最大溶解濃度で調製した。

日本エスエルシーから購入し、24 時間の馴化期間を経た 6 週齢の Wistar ラット雄を実験に用いた。C₆₀ 溶液を、10 ml/kg 体重の用量で各々 4 匹

に単回強制経口投与した。投与後 1 日目、7 日目に、それぞれの投与群の 2 匹を解剖し、肝臓、腎臓、脾臓、腸管リンパ節および血液を採取した。採取した臓器および血液は、分析まで -80°C で保存した。

保存しておいた臓器は溶解し、細片化した後、50~150mg を正確に分取した。0.01M ドデシル硫酸ナトリウム 0.5ml および回収率補正のためのサロゲート物質として C₇₀ トルエン溶液 0.5ml を加え、ホモジナイズした。残渣をトルエン 5mL および酢酸 0.5mL で順次洗い、ホモジネートと合わせた。遮光して、室温で 5 時間、230 回/min で振とう抽出した。振とう後、3500 rpm、10 分遠心し、トルエン層を分取した。窒素気流下で 5 倍に濃縮し、分析用試料とした。臓器重量が 150mg を超えるものについては、臓器重量が 150mg の場合と同じ比率になるように 0.01M ドデシル硫酸ナトリウム、トルエンおよび酢酸を添加した。血液については、5ml に対して 0.01M ドデシル硫酸ナトリウム 0.5ml、C₇₀ トルエン溶液 0.5ml、トルエン 5mL および酢酸 0.5mL を加え、遮光して、室温で 5 時間、230 回/min で振とう抽出した。振とう後、3500 rpm、10 分遠心し、トルエン層を分取した。窒素気流下で 5 倍に濃縮し、分析用試料とした。

C₆₀ および C₇₀ の定性定量は、液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析計を用いた。C₆₀ および C₇₀ の液体クロマトグラフィーでの分離は、C30 系逆相カラムの Devesil RPFULLERENE を使い、移動相はトルエン：アセトニトリル = 70%：30% のアイソクラティック法で、流速 1ml/min で行った。質量分析は、大気圧化学イオン化法 (APCI) のネガティブイオンモードで、モニターするプレカーサイオンとプロダクトイオンは、C₆₀ ではともに m/z = 720、C₇₀ ではともに m/z = 840 により測定を行った。

2. 培養細胞に対する C₆₀ の影響に関する検討

2. 1 リポソームの調製

L- α -fosファチジルコリンおよび 3-sn-fosファチジル-L-セリンをクロロホルムで溶解し、

それぞれの脂質の同一重量相当分に当たる容量を、総容量が 0.5~1ml となるようにガラスチューブに移した。1mg/ml C₆₀ のトルエン溶液を加え、攪拌して十分に混和した。窒素ガスでクロロホルムを穏やかにとぼして脂質膜を作成した。両脂質の合計最終濃度が 1mg/ml となるように PBS(-) を加え、攪拌してリポソーム懸濁液とし、培地量の 1/8 容量を細胞に曝露した。

2. 2 HepG2 細胞に対する細胞増殖性 (コロニー形成能) 試験

細胞は、ヒト肝がん由来株細胞である HepG2 細胞を用いた。

C₆₀ を添加していないリポソームもしくは C₆₀ を添加したリポソームを HepG2 細胞に曝露した。それぞれの細胞の単細胞浮遊液を調製し、直径 100mm のプラスチックシャーレに 1 枚当たり 100 細胞を播種した。培養液は、MEM (MINIMUM ESSENTIAL MEDIUM EAGLE: シグマ社) に、非動化した 20% ウシ胎児血清、1% ペニシリン・ストレプトマイシン溶液 (GIBCO 社)、1mM ピルビン酸ナトリウム (GIBCO 社)、1% 非必須アミノ酸溶液 (GIBCO 社) を添加したものをを用いた。

播種後、10 日間培養し、Mg⁺⁺、Ca⁺⁺ 不含有生理食塩水で 2 回細胞表面を洗浄し、室温で風乾した。メタノールを加え、室温で 5 分間静置して細胞を固定した。メタノールを除いた後、5% のギムザ染色液を加え室温で 5 分間静置して細胞を染色した。

5%ギムザ染色液を洗浄除去した後、染色されたコロニーを数えた。

2. 3 C₆₀ の細胞内小器官における分布

直径 100mm のプラスチック培養皿にヒト肝がん由来の培養株細胞である HepG2 細胞を 2.5x10⁶ 細胞播種し、上述の培養液の仔ウシ血清濃度を 10% とした培養液により、CO₂ インキュベーター中で 37°C、1 日間膳培養した。C₆₀ を添加したリポソームを培地に加え、培養をさらに 2 日間継続した。

C₆₀ を含んだ培地をすて、Mg⁺⁺、Ca⁺⁺ 不含有生

理食塩水で 2 回細胞表面を洗浄した。0.05% トリプシン・0.2mM EDTA により単細胞浮遊溶液を作製した。1,000rpm、4°C、5 分間遠心して細胞を集め、細胞を Mg⁺⁺、Ca⁺⁺ 不含有生理食塩水で浮遊して、1,000rpm、4°C、5 分間遠心して細胞を集めた。この操作をさらに 2 回繰り返し、5x10⁶ 細胞/ml となるように 10mM HEPES·KOH (pH7.55)·1.5mM MgCl₂·10mM KCl·1mM DTT·0.5mM PMSF 溶液に浮遊し、氷上で 10 分間静置した。ダウンス型ホモジナイザーで 50 回ホモジナイズした後、1,000rpm、4°C、3 分間遠心して破壊できなかった細胞と細胞破壊溶液を分離した。沈殿として回収された細胞は、5x10⁶ 細胞/ml となるように 10mM HEPES·KOH (pH7.55)·1.5mM MgCl₂·10mM KCl·1mM DTT·0.5mM PMSF 溶液に再浮遊し、氷上で 10 分間静置した後、ダウンス型ホモジナイザーで 50 回ホモジナイズした。1,000rpm、4°C、3 分間遠心して破壊できなかった細胞と細胞破壊溶液を分離し、上清として回収された細胞破壊溶液を先に分取した細胞破壊溶液とあわせた。この溶液を 3,000rpm、4°C、5 分間遠心して沈殿 (粗核分画) と上清 (粗細胞質画分) に分離した。沈殿 (粗核分画) は、8.55% (w/v) ショ糖·10mM Tris·HCl (pH8.0)·5mM MgCl₂·1mM DTT·0.5mM PMSF·0.1% Tritonx-100 溶液に 1x10⁷ 細胞相当 (核) /ml となるように再浮遊し、ダウンス型ホモジナイザーで 30 回ホモジナイズした。4,000rpm、4°C、10 分間遠心して沈殿と上清に分離し、沈殿を核分画とした。上清は、前操作で得られた上清 (粗細胞質画分) と合わせ、10,000rpm、4°C、10 分間遠心して、沈殿と上清に分離した。沈殿はミトコンドリア画分とした。上清は、さらに 40,000rpm、4°C、10 分間遠心して、沈殿 (ミクロソーム画分) と上清 (膜画分) に分離した。溶液画分と、沈殿画分を 5mL の 10mM HEPES·KOH (pH7.55)·1.5mM MgCl₂·10mM KCl·1mM DTT·0.5mM PMSF 溶液に浮遊した溶液について、それぞれ容量 5mL に対して 0.01M ドデシル硫酸ナトリウム 0.5ml、

トルエン 5mL および酢酸 0.6mL を加えて、遮光し、室温で5時間、230回/minで振とう抽出した。振とう後、3500 rpm、10分遠心し、トルエン層を分取した。窒素気流下で5倍に濃縮し、分析用試料とした。

C₆₀の定性定量は、前述に従い、C30系逆相カラムのDeveosil RPFULLERENEを用い、移動相として流速1ml/minでトルエン:アセトニトリル=70%:30%のアイソクラティック法により液体クロマトグラフィーで分離した。質量分析は、大気圧化学イオン化法(APCI)のネガティブイオンモードで、モニターするプレカーサイオンとプロダクトイオンは、C₆₀ではともにm/z=720、C₇₀ではともにm/z=840により測定を行った。

3. MWCNTの経気道投与に関する検討

7週齢に達したF344/DuCrIj雄ラット1群3匹に、ラット当たりMWCNT 0.5mgあるいは1mgを0.2% CMCに懸濁し、経気道投与した。投与後、1, 3, 7日目に解剖し、主要臓器を摘出、ホルマリン液に保存した。また、一部臓器は電子顕微鏡標本作製のため、定法に従い、グルタルアルデヒドで固定した。電子顕微鏡は、電界放射型走査電顕(日立S-800型)を用いた。

C. 研究結果

1. C₆₀のラットへの経口投与における吸収・体内分布に関する検討

C₆₀は投与個体28匹のうち2匹から検出された。検出された臓器は、リポソーム懸濁溶液による投与の1日後の1個体の腎臓および腸管リンパ節、コーンオイル溶液投与の1日後の1個体の腸管リンパ節から検出された。コーンオイル溶液、スクアラン溶液、 γ -シクロデキストリンと包接した形態を溶解した水溶液、ポリビニルピロリドン溶液、ホスファチジルイノシトールまたはホスファチジルセリン溶液による投与個体の肝臓、腎臓、脾臓および腸管リンパ節からは検出されなかった。リポソーム懸濁溶液による投与個体の肝臓および脾臓、コーンオイル溶液投与個体の肝臓、腎臓および脾臓からは検出しなかった。コーンオイル投与の個体の腸管リンパ節で1.5 $\mu\text{g/g}$ 湿重量、リポソーム投与個体の腸管リンパ節で0.67 $\mu\text{g/g}$

湿重量、腎臓で0.13 $\mu\text{g/g}$ 湿重量で検出された。

2. 培養細胞に対するC₆₀の影響に関する検討

スクリーニングや生理作用発現メカニズムの解析には、実験動物への投与研究と並行して *in vitro* 試験系の確立が必要である。そのため、培養細胞へのC₆₀曝露研究のための手法の開発を行い、長期曝露を想定した細胞増殖影響におけるコロニー形成率への影響を検討した。わずかではあるが、C₆₀を継続して曝露した細胞、C₆₀を曝露した細胞の順にコロニー形成率が低下した。

また、取り込まれたC₆₀の細胞内小器官の分布を解析した結果、80%以上の高い割合で核分画に検出された。

3. MWCNTの生体試料からの検出と経気道投与に関する検討

3. 1 MWCNTの経気道投与実験動物の剖検

MWCNT 1mg投与後1日目の肺では、MWCNTが黒灰色斑として散在し、針先大~胡麻粒大でやや隆起して認められた。気管内壁は黒色帯を呈していた。投与後3日目の肺では、1日目と同様にMWCNTの黒灰色斑が散在して認められたが、胸部リンパは赤色を呈し、腎門リンパは灰赤色を呈していた。

電子顕微鏡による観察では、気管のMWCNTの付着がみられない部位では線毛が均一に方向性を形成して粘液細胞の中に整列してみられる正常に近い気管表面を示していたが、付着部ではMWCNTが線毛細胞とネット状の形態を形成している像観察された。また、線毛に絡みつきMWCNTが塊状を形成して広く付着し、線毛の不整な乱れが著しい像も観察された。

投与後7日目では、MWCNTの黒灰色斑はやはり散在して認められたが、黒く見える部分がうすくなっているように見受けられた。胸部リンパは赤く、頸部リンパが腫大して点状出血している個体が見られた。

電子顕微鏡による観察では、気管に残存しているMWCNTは粘液等におおわれて太い形状を示していた。肺を切断した気管支中にMWCNTを含んでいると思われる塊が存在していた。

MWCNT を含んだ細胞塊が2カ所の部位の肺胞腔でみられ、周囲の肺胞腔ではマクロファージ等の細胞が著しく増加していた。

その他の主要臓器の観察では、1mg 投与群の投与後1日目の解剖時、小葉の明瞭な個体が1例認められたが、3日、7日後の観察では認められず、他の臓器においても特記すべき変化を認めなかった。

3. 2 生体試料中の MWCNT の確認方法の確立

臓器中の MWCNT を確認する方法として、電子顕微鏡で観察する方法を開発した。

MWCNT を曝露したラットから摘出した臓器は、使用時までホルマリン液中に保存した。電子顕微鏡で観察する際、臓器は水で洗浄し、ろ紙で過剰の水を除いて試料とした。試料を秤量した後、100mL の丸底フラスコに入れ、エタノール 20mL、水 10mL、水酸化カリウム 1 g を加え、マントルヒーターで1時間加熱還流し、試料を溶解した。溶解液はロータリーエバポレーターで約 10 mL まで濃縮した後、超高速遠心分離機で 40,000rpm、90 分間遠心分離した。上澄液を除き、沈殿物は水 10mL で2回、同様の条件で遠心分離による洗浄を行った。得られた沈殿物について、電子顕微鏡標本作製し MWCNT の存在の有無を観察した。電子顕微鏡は、透過型電子顕微鏡(日立 H-7000 型)を用いた。

3. 3 肺中の MWCNT の確認

MWCNT 1mg を経気道投与後、1日目に解剖し、肺を摘出してホルマリン液中で保存した。保存しておいた肺を水で洗浄し、試料とした。重量は、0.227g であった。上記の3. 2臓器中の MWCNT の確認方法の確立の方法に従って、黒～黒褐色の層が存在する白色ゼリー状沈殿を得た。沈殿の一部を注意してミクロスパーテルでかき取り、電子顕微鏡標本作製し、MWCNT の存在の有無を観察した結果、MWCNT が多数観察された。

3. 4 肝臓中 MWCNT の確認

MWCNT 1mg を経気道投与後、1日目に解剖

し、肝臓を摘出してホルマリン液中で保存した。保存しておいた肝臓を水で洗浄し、試料とした。水で洗浄した肝臓を試料Aとし、表面に付着している可能性を考えて、水で洗浄後に解剖用ハサミ等を用いて表面全体を取り除いた肝臓を試料Bとした。また、MWCNT を投与していない肝臓を、ホルマリン未処理で摘出直後の肝臓を試料Cとした(2.914g)。重量は、試料Aが1.7g、試料Bが0.7g、試料Cが2.941gであった。上記の3. 2臓器中の MWCNT の確認方法の確立の方法に従って、黒～黒褐色の層が存在する白色ゼリー状沈殿を得た。沈殿の一部を注意してミクロスパーテルでかき取り、電子顕微鏡標本作製し、MWCNT の存在の有無を観察した。試料A、試料B共に MWCNT の存在が観察された。一方、試料Cでは観察されなかった。

D. 考察

1. C₆₀ のラットへの経口投与における吸収・体内分布に関する検討

C₆₀ が検出された臓器の数が少なく、同じ投与個体のもう一方の個体では検出されていないなど、本検討からは吸収の有無もしくは体内分布を明確に結論付けることはできないが、2例で腸管リンパ節から検出されていることを考慮すると、経口投与された C₆₀ が腸管から吸収され、腸管リンパ節に移送された可能性が示唆される。検出の有無は個体差やその他の要因も考えられるが、腸管リンパで検出されていることが正しければ、経口投与された C₆₀ が腸管から吸収され、それが腸管リンパに輸送されたことが推測される。今後は投与回数や投与方法をさらに検討し、実験動物における、C₆₀ の吸収、体内挙動についてさらに調査する必要がある。

2. 培養細胞に対する C₆₀ の影響に関する検討

スクリーニングや生理作用発現メカニズムの解析には、実験動物への投与研究と並行して *in vitro* 試験系の確立が必要である。そのため、培養細胞への C₆₀ 曝露研究のための手法の開発を行った。長期曝露を想定した細胞増殖影響における

コロニー形成率への影響を検討した結果、短期的な曝露においては細胞増殖や細胞毒性に影響は認められなかったが、長期に曝露すること、もしくは長期的に継続維持することにより影響が生じる可能性が示唆された。

また、取り込まれた C₆₀ は核画分に集積する可能性が示唆された。

3. 臓器中の MWCNT の確認方法の確立と

MWCNT の経気道投与

経気道投与された MWCNT が肝臓試料から検出されて結果は、肺を経由し肝臓に移行することを示唆している。しかし、肝臓への移行については、投与量と移行量の比率、投与後の時間と移行量の変遷、生存期間と肝臓への移行量との関係、コンタミネーションの可能性の否定についてなど、さらに精査し、再度確認する必要がある。

また、開発した臓器中 MWCNT の確認試験法は、本報告では適用した臓器が肺および肝臓のみであるが、MWCNT を、臓器分解物の残渣と共に沈殿として分離、電子顕微鏡での観察を可能にした点で、簡易で有効な手法であると考えられる。他の臓器についても適用の可能性を今後検討し実施していく予定であるが、臓器によっては分解物の残渣が僅かな場合も予想され、全ての臓器に適用できる方法としてさらに詳細な検討をあわせて行う。

E. 結論

1. C₆₀ のラットへの経口投与における吸収・体内分布に関する検討

C₆₀ は投与個体 28 匹のうち 2 匹から検出された。検出された臓器は、リポソーム懸濁溶液による投与の 1 日後の 1 個体の腎臓および腸管リンパ節に、コーンオイル溶液投与の 1 日後の 1 個体の腸管リンパ節であった。コーンオイル溶液、スクアラン溶液、 γ -シクロデキストリンと含接し溶解した水溶液、ポリビニルピロリドン溶液、ホスファチジルイノシトールまたはホスファチジルセリン溶液による投与個体の肝臓、腎臓、脾臓および腸管リンパ節からは検出されなかった。

2. 培養細胞に対する C₆₀ の影響に関する検討

長期曝露を想定した細胞増殖影響におけるコロニー形成率への影響を検討した結果、C₆₀ を継続して曝露した細胞、C₆₀ を曝露した細胞の順にわずかではあるがコロニー形成率が低下した。短期的な曝露においては細胞増殖や細胞毒性に影響は認められなかったが、長期に曝露することもしくは長期的な継続維持することにより影響が生じる可能性が示唆された。

また、取り込まれた C₆₀ は核画分に集積する可能性が示唆された。

3. 臓器中の MWCNT の確認方法の確立と MWCNT の経気道投与に関する検討

臓器中の MWCNT を確認する方法として、臓器を強アルカリで溶解後、電子顕微鏡で観察する試験法を開発した。経気道投与された MWCNT は、投与後 1 日目の肺に高密度に存在することが明らかとなった。さらに、投与後の 1 日目の肝臓からも有意な量の MWCNT が検出され、経気道投与された MWCNT は肺を経由して短時間で肝臓に移行することが示唆された。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文・総説発表

1) Takagi, A., Hirose, A., Nishimura, T., Fukumori, N., Ogata, A., Kitajima, S., Kanno, J.: Induction of mesothelioma in p53^{+/-} mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube. *J. Toxicol. Sci.* (accepted)

2) 西村哲治, ナノ粒子の有害性評価とリスク対策, p33-42, 技術情報協会, 平成 19 年 10 月

2. 学会発表

1) 福森信隆, 大橋則雄, 高畑淳, 高橋博, 安藤弘, 久保喜一, 長澤明道, 小縣昭夫, 西村哲治, 上村尚: 多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の形状および分散に関する検討, 日本薬学会第

- 127 年会(2007.3)
- 2) Nishimura, T., Shimizu, K., Kubota, R., Tahara, M., Hirose, M., Tokunaga, H. : Development of dispersion method for the cell culture medium to establish in vitro screening system for fullerene. International Congress of Toxicology (2007.6)
- 3) 西村哲治, 清水久美子, 久保田領志, 田原麻衣子, 徳永裕司, 広瀬明彦: フラーレンの生物学的影響評価のための In Vitro 試験法の検討ー培養液への分散方法ー, 第 13 回日本環境毒性学会・バオアッセイ研究会合同研究発表会 p22 (2007.9)
- 4) Nishimura, T., Shimizu, K., Kubota, R., Tahara, M., Hirose, M., Tokunaga, H. : Establishment of dispersion methods for in vitro screening system for fullerene. 44th Congress of The European Societies of Toxicology T41 (2007.10)
- 5) Tokunaga, H., Uchino, T., Ikarashi, Y., Nishimura, T. : Studies for cytotoxicity of titanium dioxide as manufactured nanomaterial into the cultured cell lines. SETAC North America 28th Annual Meeting (2007.11)
- 6) Kubota, R., Tahara, M., Shimizu, K., Tokunaga, H., Hirose A., Ema, M., and Nishimura, T. Quantitative determination of C₆₀ fullerene by LC-MS/MS and its tissue distribution following oral administration to rats. 47th Annual Meeting of Society of Toxicology (2008)
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

平成 19 年度 厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告

研究課題名：ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法の開発のための有害性評価および
体内動態評価に関する基盤研究

分担研究課題名：ナノマテリアルの吸入暴露手法の開発に関する研究

分担研究者： 西沢共司 日本バイオアッセイ研究センター 試験管理部 部長
研究協力者： 後藤薫 日本バイオアッセイ研究センター 企画調整部 施設課長
笠井辰也 日本バイオアッセイ研究センター 試験管理部 吸入試験室 室長補佐
佐々木俊明 日本バイオアッセイ研究センター 試験管理部 吸入試験室 室長補佐

研究要旨

ナノテクノロジーの研究開発が進み、ナノマテリアルを材料とした製品が盛んに使用されるようになってきた。しかし、その安全性や毒性についての研究はまだ始まったばかりである。ナノマテリアルの中でも、カーボンナノチューブはその形状が繊維状物質であるという物理的特性から、アスベストと同様の毒性を示す可能性も推測される。

今回、カーボンナノチューブの一種であるマルチウォールナノチューブ（MWNT）のミスト状態での吸入暴露法を検討し、鼻部暴露チャンバーを用いてラットへの 2 時間の暴露試験を試みた。

ミスト状態での MWNT の発生は、MWNT の分散剤として Tween 20 を用いて作製した MWNT 水溶性懸濁液をミスト化することにより行った。動物への暴露実験では MWNT 懸濁液のミスト発生は安定して実施できたが、MWNT の暴露濃度は、 $11 \mu\text{g}/\text{m}^3$ と低濃度に留まった。今後、ミスト状態での暴露法により、MWNT の暴露実験をさらに高濃度で実施するためには、分散剤の選択を含めた MWNT 懸濁液の作製法の検討やミスト発生法の改良が必要と思われる。また、MWNT 粒子を想定した測定器の開発が望まれる。

A. 研究目的

ナノマテリアルは一般的に大きさが 1 ～100nm 程度の超微粒子とされるが、ナノテクノロジーの分野の研究開発が進み、既にナノマテリアルを材料とした化粧品、衣料、医薬品などに盛んに使用されるようになってきた。しかし、その安全性や毒性についての研究はまだ始まったばかりである。

特に作業環境や一般生活の環境において、ヒトが吸入した場合の健康への影響が懸念されている。ナノマテリアルの中でも、カーボンナノチューブはその形状が繊維状物質であるという物理的特性から、アスベストと同様の毒性を示す可能性も推測される。今回、本基盤研究において平成 18 年度に行われた「ナノマテリアルの吸入暴露手法

の開発に関する研究」の成果を踏まえた上で、カーボンナノチューブの一種であるマルチウォールナノチューブ(MWNT)のミスト状態での吸入暴露法を検討し、鼻部暴露チャンバーを用いてラットへの2時間の暴露試験を試みた。

B. 研究方法

B-1. 実験材料

MWNTは、国立医薬品食品衛生研究所 総合評価研究室 広瀬明彦先生の御厚意により享受した。

ミスト状態での吸入暴露法の検討にあたり、MWNTの水溶性懸濁液を作製した。MWNT懸濁液の調製には、関東化学株式会社より購入したTween 20を分散剤として用い、水はMilli Q (Millipore)で作製した超純水を使用した。

B-2. ミスト状態でのMWNTの発生方法

MWNTを含むミストの発生は、MWNT懸濁液をミスト化することにより行った。ミスト発生は柴田科学(株)のミスト発生器(図1)を使用した。ミスト発生器の試料容器内のMWNT懸濁液を、ネブライザーに3.9L/minの清浄空気(発生空気)を供給することによりミスト化した。発生ミストは40L/minの清浄空気(希釈空気)と混合した後、ヒーターで120℃に加熱し、可能な限り水分を蒸発させた。次に、中和器(ニュートライザー、核種：アメリカシウム241(241Am))で粒子の荷電を中和し、暴露チャンバーに導入した。

B-3. 鼻部暴露チャンバー

暴露チャンバーは、flow-past型の鼻部暴露チャンバー(SIS-20B型、容積約

19L、柴田科学(株)) (図1)を用いた。チャンバーはULPAフィルターで浄化された空気20L/min及びミストの希釈空気40L/minで換気し、ミスト発生中はチャンバー内を-50Pa程度の陰圧状態となるよう調整した。

チャンバーの排気はサイクロン、活性炭フィルター、高性能フィルター、ULPAフィルターで処理した。

B-4. MWNT懸濁液の検討

動物への暴露実験は動物へのストレスを考慮して、2時間とした。この動物への暴露実験に先立って、暴露中(2時間)に安定してナノレベルのミスト粒子が発生できるよう、MWNT懸濁液について下記の項目について検討した。

(1) 分散剤Tween 20の濃度

(2) 懸濁液中のMWNTの濃度

B-5. 動物を用いた暴露試験

(1) 試験動物

試験動物としてCrI:CD(SD)IGSラットの雄を用いた。生後5週齢、体重幅110~130gのラットを日本チャールス・リバーから購入し、導入後に検疫・馴化を1週間行い、6週齢時に溶媒対照群として25匹、MWNT投与群として25匹、合計50匹を使用した。溶媒対照群は0.1mg/mL Tween 20水溶液のミストを暴露した。

暴露した動物は、暴露直後及び暴露後3日、7日、14日、28日に解剖(各群5匹)し、臓器(肺、肝臓、脾臓、腎臓、脳)及び血液を採取した。採取した臓器と血液は国立医薬品食品衛生研究所 総合評価研究室 広瀬明彦先生に送付した。なお、暴露直後の解剖は当センターで、暴露後

28日までの飼育及び解剖は株式会社薬物安全性試験センター・埼玉研究所において行った。

(2) ミスト状態での MWNT の発生方法

後述する MWNT 懸濁液の検討結果 (C-1) から、溶媒溶液として 0.1mg/mL Tween 20 水溶液を用いることとし、その溶媒中に MWNT を加え、0.1mg/mL の MWNT 懸濁液を調製した。MWNT 懸濁液はよく攪拌した後、超音波分散装置により、30 分以上処理したものを発生に用いた。

MWNT 懸濁液を前述のミスト発生器を用いてミスト化し、鼻部暴露装置に導入し、MWNT を動物の鼻部に暴露した。

(3) 暴露濃度の測定

暴露チャンバー内の空気を動物の呼吸域付近から、ダストサンプラーに装着したテフロンバインダーフィルター (T60A20、55φ) 及び石英フィルター (QR-100、47φ) に、暴露の開始から終了までの 2 時間、10L/min の吸引速度で捕集した。

石英フィルターに捕集したミスト粒子は、柴田科学(株)に依頼して OC/EC カーボンアナライザー (Desert Research Institute、DRI 2001) により、有機物由来の炭素及び元素性の炭素の定量分析を行った。また、テフロンバインダーフィルターに捕集したミスト粒子は、電子天秤により重量計測し、それぞれ捕集量と捕集空気量より粒子濃度の算出を試みた。

(4) チャンバー内粒子の粒径分布の測定

暴露チャンバー内の空気を動物の呼吸域付近から採取し、Scanning Mobility

Particle Sizer (以下 SMPS) (TSI 社、MODEL 3034) を用い、粒径 10~487nm の粒子の粒径分布を測定した。

同様に暴露チャンバー内の空気をアンダーセンサンプラーを用いてテフロンバインダーフィルター (T60A20、80φ) に 2 時間、28.3L/min の吸引速度で捕集し、粒径分布の測定を行った。

(5) 暴露チャンバー内粒子のその他の機器による測定

暴露チャンバー内の空気を動物の呼吸域付近から採取し、Optical Particle Controller (以下 OPC) (柴田科学(株)、OPC-AP-600)、デジタル粉じん計 (柴田科学(株)、LD-1)、繊維状粒子計測器 (柴田科学(株)、F-1) により計測を実施した。

OPC とデジタル粉じん計はともに光散乱方式を採用した計測器であるが、OPC は 1L 当たりの粒子数 (個数濃度) として、デジタル粉じん計は質量濃度 (相対濃度、単位: CPM) として測定値を表示した。繊維状粒子計測器は、アスベストなどの繊維状粒子を計測するために特化された計測器であり、1L 当たりの繊維数として表示した。

C. 研究結果

C-1. MWNT 懸濁液の検討

(1) 分散剤 Tween 20 の濃度

MWNT 懸濁液の作製に分散剤として Tween 20 を使用したが、Tween 20 の濃度により、ミスト発生が不安定になることが判明した。原因は、Tween 20 の濃度が高いと、界面活性剤 Tween 20 に由来する泡がミスト発生器のネブライザ内部を満たし、ミストの流路を妨害したことで

あった。

そこで、0.5、0.4、0.2、0.1、0.05mg/mL の Tween 20 水溶液を作製しミスト発生を実施した。その結果、2時間のミスト発生時間を通じて、0.1mg/mL以下の Tween 20 水溶液では泡の詰まりが生じなかった。この結果より Tween 20 水溶液の濃度は 0.1mg/mL以下とした。

(2) 懸濁液中の MWNT の濃度

MWNT 懸濁液のミスト発生中、懸濁液内で MWNT の凝集体が生じ、この MWNT の凝集体によりネブライザへの懸濁液供給管が詰まり、ミスト発生が不安定になることが判明した。

そこで、分散剤である Tween 20 の濃度と MWNT 濃度に適切な比率があるか検討を行った。0.5、0.2、0.1mg/mL の Tween 20 水溶液を調製し、それぞれに Tween20 濃度の半量、等量、倍量の MWNT を添加し、MWNT の分散状態を観察した。その結果、Tween 20 水溶液の濃度に対し MWNT の添加量が半量、等量の場合は MWNT の分散が良く、MWNT の凝集体が生じる割合が低かった。従って、Tween 20 の濃度に対する MWNT の懸濁濃度は、等量以下とすることとした。

以上 (1) 及び (2) の検討結果より、MWNT 懸濁液の Tween 20 の濃度は 0.1mg/mL とし、MWNT の濃度も Tween 20 の等量 0.1mg/mL とした。

C-2. 動物を用いた暴露試験

(1) 溶媒対照群のミスト発生状況

溶媒対照群では、安定的に Tween 20 水溶液のミスト発生が行われた。図 2 に

チャンバー内粒子をデジタル粉じん計と OPC で測定した結果を示した。デジタル粉じん計及び OPC の測定データの変動係数 (CV 値) は 8.5%、6.0%であり、ミスト発生は安定して行われたと思われた。また、SMPS の測定結果を nm 単位での 15 分平均の体積粒径分布として図 3 に、体積粒径分布の中位径 (平均値 135.2nm) の経時的変化を図 4 に示した。それぞれ安定に推移した。

従って、溶媒対照群のラットへの暴露は安定して実施できた。

(2) MWNT 投与群のミスト発生状況

MWNT 投与群でも、安定的に MWNT 懸濁液のミスト発生が行われた。チャンバー内粒子のデジタル粉じん計と OPC の測定結果を図 5 に示した。デジタル粉じん計及び OPC の測定データの変動係数 (CV 値) は 9.6%、2.8%であり、ミスト発生は安定して行われたと思われた。また、SMPS の nm 単位での 15 分平均の体積粒径分布結果を図 6 に、体積粒径分布の中位径 (平均値 132.5nm) の経時的変化を図 7 に示した。それぞれ、2時間の間、安定した値を示している。

従って、MWNT 投与群でもラットへの暴露は安定して実施できた。

(3) 暴露濃度の測定結果

OC/EC カーボンアナライザーにより、暴露チャンバー内から捕集された粒子中の有機物由来の炭素及び元素性の炭素の定量分析を行った。定量結果と捕集空気量より MWNT のチャンバー内濃度の算出を試みた。結果を表 1 に示した。有機物由来の炭素は、溶媒対照群と MWNT 投与群の両方から検出され、主に Tween 20

によるものと思われる。元素性の炭素は MWNT 投与群からのみ検出され、MWNT 由来の炭素であると思われる。MWNT は炭素原子のみから成ることから定量結果より、MWNT 濃度を算出した。MWNT 投与群の MWNT 濃度は $11 \mu\text{g}/\text{m}^3$ であった。

また、テフロンフィルターにチャンパー内粒子を捕集した結果、MWNT 投与群ではフィルターは灰色に着色した(写真 1)。しかし、フィルターを電子天秤により重量計測した結果、MWNT 投与群及び溶媒対照群ともに、捕集前と捕集後のフィルター重量に差が無く、粒子濃度の算出ができない結果となった。

(4) 粒径分布の測定結果

SMPS で測定した体積粒径分布(10~487nm)の結果を 15 分平均値として、図 3 (溶媒対照群)と図 6 (MWNT 投与群)に示した。さらに、計測結果の 2 時間平均を算出し、図 8 に溶媒対照群と MWNT 投与群の結果を重ねて表示した。両群を比較すると、若干の分布の違いが 10~100nm と 300~400nm の部分にみられ、それらの領域では MWNT 投与群の値が高かった。特に 300~400nm の粒径部分の変化は MWNT の $1 \mu\text{m}$ 以下の粒子の存在による変化だと推測される。

また、アンダーセンサンプラーで捕集した粒子の粒径分布の結果を、溶媒対照群、MWNT 投与群ともに図 9 に示した。溶媒対照群では $0.43 \mu\text{m}$ 未満の粒子の割合が最も多く質量基準において 50%を占めたが、MWNT 投与群では $0.43 \mu\text{m}$ 未満の粒子と $0.43\sim 0.65 \mu\text{m}$ の粒子が最も多くそれぞれ質量基準において 33%を占

めた。なお、計測データから求めた空気力学的質量中位径 (MMAD: 単位 μm) 及び幾何標準偏差 σ_g は、溶媒対照群の Tween 20 粒子では 0.56、2.25、MWNT 投与群の Tween 20 と MWNT の混合粒子では 0.48、6.15 であった。

(5) その他の機器の測定結果

溶媒対照群と MWNT 投与群の OPC、デジタル粉じん計、繊維状粒子計測器の測定結果を図 10、11、12 に示した。

OPC で測定した個数濃度は、溶媒対照群で平均 7235 個/L、MWNT 投与群で平均 10387 個/L であり、MWNT 投与群の値は、溶媒対照群の約 1.4 倍であった。

デジタル粉じん計で測定した相対濃度は、溶媒対照群で平均 25.7cpm、MWNT 投与群で平均 93.3cpm であり、MWNT 投与群の相対濃度は溶媒対照群の約 3.6 倍であった。

繊維状粒子計測器で検出したアスベスト様の繊維状粒子は、溶媒対照群では全く計測されなかったが、MWNT 投与群では 1L 当たり平均 21.1 粒子が計測された。

以上の計測結果は、ともに溶媒対照群よりも MWNT 投与群の方が高い値となり、MWNT 懸濁液のミスト発生により、MWNT 投与群のチャンパー内に MWNT 粒子が存在した結果と考えられる。

D. 考察

今回、MWNT のミスト状態での吸入暴露法を検討し、鼻部暴露チャンパーによるラットへの 2 時間の暴露試験を試みた。ミスト状態での MWNT の発生は、MWNT 懸濁液をミスト化することにより行い、安定した粒子の発生を目指した。

その際、MWNT 懸濁液に添加した界面活性剤 Tween 20 が原因で発生する泡や懸濁液内の MWNT の凝集体の生成を防ぐため、懸濁液内の MWNT 量を低く抑えた。その結果、動物への暴露実験では MWNT 懸濁液のミスト発生は安定して実施できた。また、吸入チャンバー内粒子の SMPS による体積粒径分布やアンダーセンサンプラーによる粒径分布の結果から、吸入チャンバー内に MWNT の $1\mu\text{m}$ 以下の粒子が存在したと推察された。しかし、MWNT の暴露濃度は、 $11\mu\text{g}/\text{m}^3$ と低濃度に留まった。ミスト状態での暴露法により、MWNT の粒子による暴露実験をさらに高濃度で実施するためには、分散剤の選択を含めた高濃度の MWNT 懸濁液の作製法の検討及び高濃度 MWNT 懸濁液のミスト化に適したミスト発生器の改良が必要と思われる。

今回、チャンバー内の MWNT 濃度の算出に OC/EC カーボンアナライザーによる炭素量の測定データを使用した。OC/EC カーボンアナライザーは有機物由来の炭素と元素性の炭素の定量が行えることから、粒子のフィルター捕集後に重量法による濃度算出が行えない等の場合、炭素原子のみから成る MWNT のような物質では濃度の算出に有効であると思われる。また、SMPS、OPC、デジタル粉じん計、繊維状粒子計測器などの機器をチャンバー内粒子の測定に用いた。それぞれの機器で MWNT 投与群と溶媒対照群の測定結果に差がみられ、チャンバー内粒子のモニターとして一定の指標となり得たと考えられる。しかし、いずれの計測機器も繊維状物質である

MWNT を計測することを想定していない計測器である。MWNT のさらなる吸入暴露法の開発のためには、MWNT 粒子を想定した測定器の開発が望まれる。また、チャンバー内の MWNT の凝集状態の確認のために、SEM 等による形態観察も必要と思われる。

E. 結論

MWNT のミスト状態での吸入暴露法を検討し、鼻部暴露チャンバーを用いてラットへの 2 時間の暴露試験を試みた。ミスト状態での MWNT の発生は、MWNT 懸濁液をミスト化することにより行った。動物への暴露実験では MWNT 懸濁液のミスト発生は安定して実施できたが、MWNT の暴露濃度は、 $11\mu\text{g}/\text{m}^3$ と低濃度に留まった。今後、ミスト状態での暴露法により、MWNT の粒子による暴露実験をさらに高濃度で実施するためには、懸濁液の作製法やミスト発生法の改良が必要と思われる。また、MWNT 粒子を想定した測定器の開発が望まれる。

F. 研究発表

- 1.論文発表
なし。
- 2.学会発表
なし。

G. 知的財産権の出願・登録状況

- ・特許取得・実用新案登録
なし。

表 1. OC/EC カーボンアナライザーによるチャンバー内粒子の炭素濃度算出結果

	溶媒対照群 濃度 ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	MWNT 投与群 濃度 ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)
有機物由来の炭素 (Tween 20 由来の炭素)	23	29
元素性炭素 (MWNT)	0	11

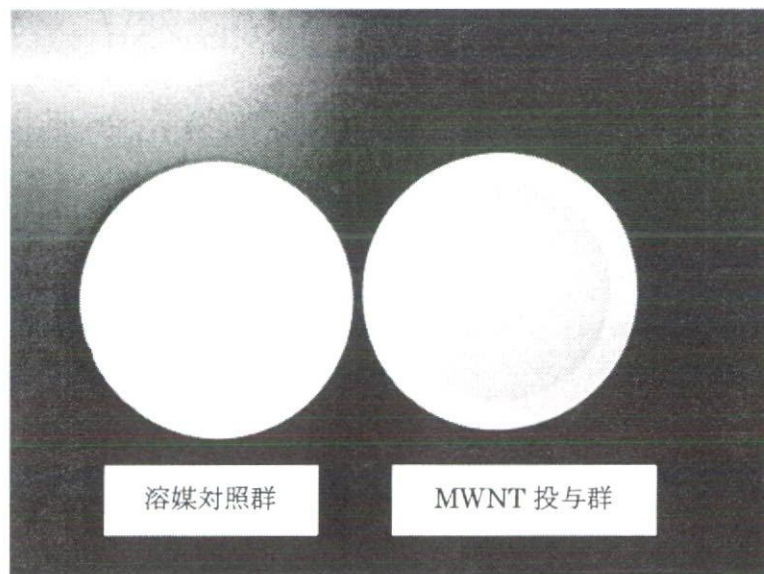


写真 1. 溶媒対照群及び MWNT 投与群のミスト粒子を捕集したテフロンフィルター