

200941011A

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法 に関する総合研究

(H20- 化学 - 一般 -006)

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者

福島昭治

平成 22 (2010) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法 に関する総合研究

(H20-化学-一般-006)

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者

福島昭治

平成 22 (2010) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金研究報告書目次

目 次

I. 総括研究報告書

ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法に関する総合研究	1
福島昭治	

II. 分担研究報告書

1. ナノマテリアルの全身吸入暴露法、及び気管内投与法を用いた経気道暴露による健康影響の評価手法の確立	
1) 実験動物への暴露量および暴露形態を把握するためのナノマテリアルの性状、拡散状態及び濃度を把握する方法に関する研究	13
鷹屋光俊	
2) ナノマテリアルの経気道暴露による呼吸器への生体影響の評価手法に関する研究	23
相磯成敏	
3) ナノマテリアルの経気道暴露による肺外影響の評価手法に関する研究	29
甲田茂樹	
4) 超微形態学的手法を用いたナノマテリアルの経気道暴露による中枢神経系への影響の特徴と検出系の確立	35
吉田 緑	
5) ナノマテリアルの吸入暴露実験、及び、肺の c-DNA マイクロアレイによる毒性評価に関する研究	45
小川幸男	
6) ナノマテリアルの経気道暴露による中期発がん試験法の開発に関する研究	53
長野嘉介	

2. *in vitro* 及び *in vivo* 試験系によるスクリーニング法の有効性の評価
 - 1) ナノ材料の発がん性スクリーニングのための *in vitro* 系
での遺伝毒性試験による評価手法に関する研究 59
浅倉真澄
 - 2) ナノ材料の経気道暴露による発がん性スクリーニングのための
in vivo 系での遺伝毒性試験による評価手法に関する研究 67
野口 忠
3. ナノ材料の吸入暴露情報に関する調査研究 75
山本雅也

I. 総括研究報告書

ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法に関する総合研究（H20-化学-一般-006）

研究代表者 福島昭治

中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究センター 所長

研究要旨

ナノマテリアルは極めて微細であり一般生活環境や産業現場の気中に拡散しやすいため、経気道的に容易に体内に侵入する可能性が高く、それによるヒトへの健康影響が懸念される。本研究の目的は、ナノマテリアルの経気道暴露によるヒトへの健康影響の評価に役立つ手法を開発することである。本年度は、多層カーボンナノチューブ（MWCNT）を用いて、気中濃度の測定等の検討を行った。また、生体影響の評価手法を検討するために、MWCNTをラットに経気道投与し、MWCNTの肺内沈着と呼吸器以外の臓器への影響の検索、肺のマイクロアレイ解析、嗅球の電子顕微鏡検索を行った。また、肺を標的とした中期発がん性試験の検討を行った。さらに、MWCNTの吸入暴露のためのダスト発生法について検討した。培養細胞を用いた*in vitro*試験系については、CHL/IU細胞を用いた遺伝毒性試験(小核試験、染色体異常試験、遺伝子突然変異試験)を実施した。*in vivo*試験系については、gpt deltaラットを用いてgpt 突然変異とSpi-変異頻度を調べた。また、酸化チタンについて文献情報の収集・整理を行った。その結果、気中MWCNTの濃度測定の検討では、ばく露実験での濃度監視に表面積計が優れていることがわかった。MWCNTの肺内沈着については電子顕微鏡検索によりMWCNTであることが確認できた。また、肝臓、嗅球等、肺以外の臓器にはMWCNTの移行や影響が認められなかった。肺のマイクロアレイ解析では、炎症、酸化的ストレス、DNA損傷に関与する遺伝子の増加がみられた。MWCNTの肺を標的とした中期発がん性試験は、DHPNを用いたイニシエーション法を採用した。MWCNTの吸入暴露のためのダスト発生法については、音振動でダストを発塵させる発生器の製作を行っている。培養細胞を用いた*in vitro*試験系では、染色体の数的異常および多核細胞の誘発があり、MWCNTは細胞分裂に何らかの阻害作用があることが示唆された。*in vivo*試験系については、gpt 突然変異やSpi-変異頻度の増加はみられなかった。酸化チタンの毒性影響に関しては、気管内投与、エアロゾルへの全身暴露による試験情報を収集した。以上の研究成果は、ナノマテリアルによるヒトの健康への影響の評価手法の確立と機序の解明に資することができる。

研究分担者氏名・所属施設名および所属における職名（50音順）

相磯 成敏	中央労働災害防止協会	日本バイオアッセイ研究センター	病理検査部 病理検査室 室長
浅倉 眞澄	中央労働災害防止協会	日本バイオアッセイ研究センター	病理検査部 培養細胞試験室 室長
小川 幸男	国立医薬品食品衛生研究所	安全性生物試験研究センター	毒性部 室長
甲田 茂樹	独立行政法人労働安全衛生総合研究所	有害性評価研究グループ	部長
鷹屋 光俊	独立行政法人労働安全衛生総合研究所	環境計測管理研究グループ	首席研究員
長野 嘉介	中央労働災害防止協会	日本バイオアッセイ研究センター	副所長
野口 忠	中央労働災害防止協会	日本バイオアッセイ研究センター	病理検査部 微生物試験室 室長
吉田 緑	国立医薬品食品衛生研究所	安全性生物試験研究センター	病理部 室長
山本 雅也	国立医薬品食品衛生研究所	安全性生物試験研究センター	毒性部 主任研究官

A. 研究目的

ナノマテリアルは極めて微細であり一般生活環境や産業現場の空气中に拡散しやすいため、経気道的に容易に体内に侵入する可能性が高く、それによるヒトへの健康影響が懸念される。本研究の目的は、ナノマテリアルの経気道暴露によるヒトへの健康影響の評価に役立つ手法を開発することである。

この目的のため、形状がアスベストに類似しており吸入暴露による発がん性が懸念されているMWCNTに焦点をあて、ナノマテリアルの全身吸入暴露法、及び気管内投与法を用いた経気道暴露による健康影響の評価手法の確立のために、1) 実験動物への暴露量および暴露形態を把握するためのナノマテリアルの性状、拡散状態及び濃度を把握する方法に関する研究（鷹屋）、2) ナノマテリアルの経気道暴露による呼吸器への生体影響の評価手法に関する研究（相磯）、3) ナノマテリアルの経気道暴露による肺外影響の評価手法に関する研究（甲田）、4) 超微形態学的手法を用いたナノマテリアルの経気道暴露によ

る中枢神経系への影響の特徴と検出系の確立（吉田）、5) ナノマテリアルの吸入暴露実験及び肺のc-DNAマイクロアレイによる毒性評価に関する研究（小川）、6) ナノマテリアルの経気道暴露による中期発がん試験法の開発に関する研究を行う。また、*in vitro*及び*in vivo*試験系によるスクリーニング法の有効性を評価するために、1) ナノマテリアルの発がん性スクリーニングのための*in vitro*系での遺伝毒性試験による評価手法に関する研究（浅倉）、2) ナノマテリアルの経気道暴露による発がん性スクリーニングのための*in vivo*系での遺伝毒性試験による評価手法に関する研究（野口）を行う。さらに、産業用ナノマテリアルの暴露情報、特に吸入暴露に関する情報を収集・整理する（山本）。これらの研究成果を基にナノマテリアルの吸入によるヒトへの健康影響の総合的評価手法を確立する。

B. 研究方法

I. ナノマテリアルの全身吸入暴露法、及び気管内投与法を用いた経気道暴露による健康影響

の評価手法の確立

I-1. 実験動物への暴露量および暴露形態を把握するためのナノマテリアルの性状、拡散状態及び濃度を把握する方法に関する研究

鷹屋は、1) 模擬発生装置を用いた気中MWCNTの濃度測定、2) 生体内寿命の評価法の検討、3) MWCNTの毒性評価法の検討および毒性発現に関わる生体因子の検索を行った。

1) 模擬発生装置を用いた気中MWCNTの濃度測定では、MWCNTの模擬粉じんを発生させ、ナノからサブミクロンの大きさの気中粒子について、光散乱式粒子カウンター(Optical Particle Counter; OPC)、凝縮核カウンター (Condensed Nuclei Counter; CNC)、走査移動度式粒子サイザー (Scanning Mobility Particle Sizer ; SMPS)、表面積計の4つの測定装置で濃度変化を測定することにより、チャンバー内での濃度評価に最も適した測定方法の選択を行った。

2) 生体内寿命の評価法の検討では、生理食塩水およびリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中でのMWCNTからの触媒金属粒子の溶出について測定した。また、MWCNTが導電性であることに着目し、MWCNTを電極に付着させ、その電流量から電極面積を求める方法で、MWCNTの表面積の変化を測定する試みを行った。

3) MWCNTの毒性評価法検討および毒性発現に関わる生体因子の検索では、ヒトII型肺胞上皮細胞由来のA549細胞を用いて、細胞毒性を検索した。また、ストレス関連遺伝子 (ヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1)、熱ショックタンパク質70 (HSP70)、メタロチオネイン-2A (MT-2A))、免疫関連遺伝子 (インターロイキン-6 (IL-6)、腫瘍壊死因子 (TNF- α))、線維化関連遺伝子 (コラーゲン1A1 (COL1A1)、熱ショックタンパク質47 (HSP47)) を対象に遺伝子の発現量 (mRNA量) の測定を行った。さらに、MWCNT耐性細胞樹立の試みを行った。

I-2. ナノマテリアルの経気道暴露による呼吸器への生体影響の評価手法に関する研究

相磯は、気管内投与したラットに光学顕微鏡レベルで観察された肺内沈着物がMWCNTであることを確認するために、透過型電子顕微鏡による超微細形態検索を行った。

(倫理面への配慮) 本研究は、日本バイオアッセイ研究センターの「動物実験に関する指針」に基づき実施した。

I-3. ナノマテリアルの経気道暴露による肺外影響の評価手法に関する研究

甲田は、MWCNTを40および160 $\mu\text{g}/\text{匹}$ の用量で単回気管内投与し、1、7、28および91日後に解剖したラットについて、肝臓、腎臓、脾臓を中心とした光学顕微鏡レベルの病理組織学的検索を行った。

(倫理面への配慮) 本研究は日本バイオアッセイ研究センターの「動物実験に関する指針」に基づき実施した実験により得られた材料を使用した。

I-4. 超微形態学的手法を用いたナノマテリアルの経気道暴露による中枢神経系への影響の特徴と検出系の確立

吉田は、MWCNT、フラーレンを単回吸入暴露したラットの嗅球を超微形態学的に観察した。また、酸化チタンを経気道暴露したラットの肺の経時的变化を光顕レベルで観察した。また、被験物質の細胞内局在を観察する目的でエネルギー分散型X線分光器(EDS)を用いてCNT暴露嗅球を解析した。

(倫理面への配慮) これらの実験は、実験動物の適切な扱いに関する国内外の法規・規則・ガイドライン等に準拠し試験実施施設における動物実験委員会による事前審査を受ける等、適切な倫

理面への配慮下で行った。

I-5. ナノマテリアルの吸入暴露実験、及び、肺のc-DNAマイクロアレイによる毒性評価に関する研究

小川は、ナノマテリアルの生体障害作用を分子レベルで明らかにするため、当研究班の野口班員の実施した研究から得られたラットの肺を材料として、マイクロアレイ解析を実施した。すなわち、雄gpt deltaラットにナノマテリアルとしてMWCNTを40または160 μ g/animalの用量で単回気管内投与後、31と90日後に解剖を行い、得られた肺のサンプルを対象に当研究部で開発されたPercellome手法を用いて遺伝子発現解析を行った。また、MWCNTの単回経気道暴露法について西沢班員の担当部分を引き継ぎ、MWCNTダスト発生法などについて検討した。

(倫理面への配慮)

マイクロアレイのデータ解析に使用した動物の屠殺に当たっては、麻酔薬の使用や頸椎脱臼法など苦痛の少ない方法を用いるといった、当該本研究の実験動物取り扱い倫理規定に準拠した対応を行っている。

I-6. ナノマテリアルの経気道暴露による中期発がん試験法の開発に関する研究

長野は、MWCNTを材料として、肺を標的とした経気道投与による中期発がん試験法について検討した。試験法は、MWCNTは非遺伝毒性物質と考えられているため、既知の発がん物質(イニシエーター)を投与し、その発がんへの修飾作用を検出する方法を基本とし、1) 中期発がん試験に使用する動物、2) イニシエーション処理の方法、3) 被験物質であるMWCNTの投与方法、4) 発がん性の検出方法、5) 陽性対照群について、検討した。

II. *in vitro* 及び*in vivo* 試験系によるスクリーニング法の有効性の評価

II-1. ナノマテリアルの発がん性スクリーニングのための*in vitro* 系での遺伝毒性試験による評価手法に関する研究

浅倉は、発がん性スクリーニング法のための*in vitro* 系での遺伝毒性試験による評価手法の開発を目的として、試験系の検討を行った。試験材料にMWCNT (Lot No.061220、三井物産(株)提供: MWNT-7) を用い、細胞にチャイニーズハムスター肺由来の細胞株(CHL/IU)を用いて以下の検討を行った。①分散方法の検討、②細胞への取り込みの検討、③遺伝毒性試験(小核試験、染色体異常試験、遺伝子突然変異試験)。

(倫理面への配慮) 使用した細胞は、チャイニーズハムスター由来の細胞株であり、ヒト由来の細胞は使用していない。

II-2. ナノマテリアルの経気道暴露による発がん性スクリーニングのための*in vivo* 系での遺伝毒性試験による評価手法に関する研究

野口は、トランスジェニック動物である gpt delta ラットにMWCNTを1匹あたり40及び160 μ gの用量で気管内に単回投与し、投与後29日目及び90日目における肺の病理組織学検査およびgpt 突然変異とSpi-変異頻度を測定した。

(倫理面への配慮) 本研究は、日本バイオアッセイ研究センターの「動物実験に関する指針」に基づき実施した。

III. ナノマテリアルの吸入暴露情報に関する調査研究

山本は、産業用ナノマテリアルのリスク評価法としての吸入暴露システムの開発のための適切な吸入暴露条件や毒性評価法等を提言することを目的として、産業用ナノマテリアルの職業暴露情報や吸入暴露を介した毒性影響に関する情報

を収集し、整理した。本年度は、金属系ナノマテリアルの酸化チタンに焦点を当て、文献情報等の公開情報の収集・整理を行った。文献検索には Medline を用い、2004 年以降の最新情報に焦点をあてて検索を行い、必要により総説を用い補完した。

(倫理面への配慮)

本研究は、公表情報を収集し、整理したものであり、倫理面での問題はない。

C. 研究結果

I. ナノマテリアルの全身吸入暴露法、及び気管内投与法を用いた経気道暴露による健康影響の評価手法の確立

I-1. 実験動物への暴露量および暴露形態を把握するためのナノマテリアルの性状、拡散状態及び濃度を把握する方法に関する研究 (鷹屋)

1) 模擬発生装置を用いた気中MWCNTの濃度測定では、粒径50nm以下の極めて小さい粒子の発生は観測されなかったが、50-100nmの粒子の発生は観測された。

2) 生体内寿命の評価法の検討では、生理食塩水、PBSのいずれでも明瞭な濃度変化がみられなかった。なお、生理食塩水では鉄、コバルトともに、明瞭な濃度変化は観測されないが、PBSでは、鉄の濃度の低下が観測された。

3) MWCNTの毒性評価法検討および毒性発現に関わる生体因子の検索では、MWCNTの毒性評価を、至適細胞数を検討した上で行ったところ、添加48時間後で最も顕著な毒性が認められた。なお、高濃度ばく露ではかえって生存率が回復(上昇)した。遺伝子の発現量(mRNA量)の測定では、免疫関連遺伝子(IL-6およびTNF- α)の顕著な増加が認められた。また、酸化ストレスマーカーであるHO-1発現量の上昇を観察した。しかし、線維化関連遺伝子や他のストレスマーカー

一遺伝子の発現量に対してはほとんど影響を与えなかった。

I-2. ナノマテリアルの経気道暴露による呼吸器への生体影響の評価手法に関する研究(相磯)

昨年度実施したラットの気管内投与試験で観察された肺内沈着物は超微細形態的手法による検索を行った結果、グラファイトの層状構造が確認された。

I-3. ナノマテリアルの経気道暴露による肺外影響の評価手法に関する研究(甲田)

MWCNT(40および160 μ g/匹)を単回気管内投与したラットを経時的に解剖し、肝臓、腎臓、脾臓を中心とした光学顕微鏡レベルの観察を行った結果、40および160 μ g/匹の両用量とも、対照群と発生率や程度に差がみられる所見はなかった。また、光学顕微鏡レベルの観察では、肝臓等の組織中におけるMWCNT繊維の存在は確認できなかった。

I-4. 超微形態学的手法を用いたナノマテリアルの経気道暴露による中枢神経系への影響の特徴と検出系の確立(吉田)

MWCNT、フラーレンを単回曝露したラット嗅球の神経細胞および神経線維の超微形態において異常は認められなかった。酸化チタンを単回吸入後経時的に光学顕微鏡レベルで観察したラット肺では、投与4週まで酸化チタンと思われる褐色色素が主に肺胞マクロファージに観察された。脳およびその他の組織に形態学的変化は認められなかった。EDSを用いて電顕サンプルにおける各種元素の分布を調べたが、MWCNTを曝露したラットの嗅球において、炭素元素は観察視野全体に分布しており、部位特異的な分布を認めることはできなかった。

I-5. ナノマテリアルの吸入暴露実験、及び、肺のc-DNAマイクロアレイによる毒性評価に関する研究（小川）

MWCNTを単回経気道暴露したラット肺のマイクロアレイ解析の結果、炎症に関連する遺伝子発現の増加を認めた。個別の遺伝子ではオステオポンチンが1ヶ月目のMWCNTの低及び高用量群で有意に増加し、その増加は3ヶ月目のMWCNTの高用量群でも確認された。また、酸化ストレス応答遺伝子のスーパーオキシドディスムターゼ-2(SOD2)が1ヶ月目のMWCNTの低及び高用量群で有意に増加した。さらにDNA修復に関与するポリ(ADP-リボース)合成酵素-1(Parp1)遺伝子がMWCNT投与により軽度ながら有意に増加した。MWCNTのダスト発生法ではMcKinneyらの方法での機器製作を進めるとともに、実験者への暴露及び環境への漏出を避けるための方策を検討した。

I-6. ナノマテリアルの経気道暴露による中期発がん試験法の開発に関する研究（長野）

中期発がん試験に使用する動物は、相磯の研究と比較するためにF344系ラットを選択した。イニシエーション処理の方法は、イニシエーターとしてDHPNを選択し、0.1%の濃度で2週間飲水投与する方法を採用した。被験物質であるMWCNTの投与方法については、相磯の研究をもとに最高用量は肺に明らかな変化が起きる用量である160 µg/匹を選択し、被験物質の作用が持続的になるように、2週間に1回、4回に分割して投与する方法とした。

II. *in vitro* 及び*in vivo* 試験系によるスクリーニング法の有効性の評価

II-1. ナノマテリアルの発がん性スクリーニングのための*in vitro* 系での遺伝毒性試験による評価手法に関する研究（浅倉）

試験の結果、①MWCNTの分散性は、DMSO/培養液<培養液<CMC(1%水溶液)<Tween80(0.1mg/ml水溶液)の順となった。またSEM像から、MWCNTの繊維が一本一本バラバラになっていることを確認した。②光学顕微鏡およびSEMの観察から、MWCNT繊維が細胞内に入っていることが観察できた。③小核、染色体構造異常、遺伝子突然変異は誘発しないが、多核および染色体数異常(倍数体)を誘発した。

II-2. ナノマテリアルの経気道暴露による発がん性スクリーニングのための*in vivo* 系での遺伝毒性試験による評価手法に関する研究（野口）

MWCNTをgpt delta ラットに単回気管内投与した結果、投与後29日および90日の肺重量は増加傾向を示した。また、肺の組織病理学的変化としてMWCNTの沈着を伴う肺泡マクロファージの浸潤とII型肺胞上皮の増生、およびMWCNTの沈着を伴う軽度の肉芽腫が認められた。しかし、肺のトランスジーンgpt突然変異およびSpi-欠失変異に変化は認められなかった。

III. ナノマテリアルの吸入暴露情報に関する調査研究（山本）

職業暴露に関しては、過去に大規模な疫学調査が実施されているが、粒径や詳しい性状に関する情報は得られなかった。毒性影響に関しては、気管内投与、エアロゾルへの全身暴露による*in vivo* の試験結果が蓄積されてきている。酸化チタンの毒性は、粒径、組成、表面の性状、結晶構造、実際の分散状態など様々な要因の影響を受けており、今後の毒性の評価や実験を行う場合は、これらを十分に考慮する必要があることが示された。

D. 考察

I. ナノマテリアルの全身吸入暴露法、及び気管内投与法を用いた経気道暴露による健康影響の評価手法の確立

I-1. 実験動物への暴露量および暴露形態を把握するためのナノマテリアルの性状、拡散状態及び濃度を把握する方法に関する研究（鷹屋）

1) 模擬発生装置を用いた気中のMWCNT濃度測定の結果、粒径50nm以下の極めて小さい粒子の発生は観測されなかったが、50-100nmの粒子の発生は観測され、一次粒子の飛散の可能性が高いことを示唆している。また、ばく露濃度を評価する装置の比較という観点で今回の実験結果をみると、凝縮核カウンターについては、温度・圧力の外乱に弱く、表面積計の方が勝れていると考えられる。

2) 生体内寿命の評価法の検討では、生理食塩水並びにPBSを用いた金属濃度測定の結果より、触媒としてコバルトを用いたMWCNTであれば、生理食塩水、PBSのいずれを用いても、触媒由来金属をマーカーとしてMWCNTの変化を追うことは可能であると考えられる。しかし、鉄についてはPBSを用いることは困難であった。電気化学測定による表面積測定を用いてMWCNTの形状変化を評価するためには、電極形成に関して尚検討を要する。

3) MWCNTの毒性評価法検討および毒性発現に関わる生体因子の検索では、至適細胞数を検討した上でMWCNTの毒性評価を行ったところ、添加48時間後で顕著な毒性が認められた。無処理群（対照群）の細胞数の増加を考慮すると、より長時間での観察は不適と考えられる。また高濃度ばく露で生存率が回復（上昇）したが、MWCNTの高濃度添加のため、分散したMWCNTの再凝集が生じ、細胞毒性が軽減した可能性が考えられる。本検討で用いたA549細胞はII型上皮由来の

細胞であり、IL-6やIL-8などの発現・分泌が報告されている。MWCNTは免疫関連遺伝子の発現量を顕著に増加させたことから、免疫系への影響を検討する上でも適当な細胞と考えられる。A549細胞をMWCNTの存在下で培養し続けたところ、生き残り、増えてきた細胞を得た。そこで親株との毒性を検討したところ、有意差は認められないもののわずかな生存率の上昇を認めた。

I-2. ナノマテリアルの経気道暴露による呼吸器への生体影響の評価手法に関する研究（相磯）

本年度の研究結果により、昨年度、気管内投与したラットの肺に認められた黒色沈着物にMWCNTを構成するグラファイトの多層構造を認めたことから、当該沈着物はMWCNTであると考えられ、MWCNTは光学顕微鏡を用いた検索においても、ある程度の長さを有する繊維は認識することが可能であることが確認された。従って、光学顕微鏡による病理組織学的検索は、MWCNTの生体影響の概略を調べるには、有効な検索手段であると考えられる。

I-3. ナノマテリアルの経気道暴露による肺外影響の評価手法に関する研究（甲田）

MWCNT（40および160 μ g/匹）を単回気管内投与したラットを経時的に解剖し、肝臓、腎臓、脾臓を中心とした光学顕微鏡レベルの観察を行った結果、MWCNT投与群に対照群と発生率や程度に差がみられる所見はなく、40および160 μ g/匹の用量の経気道暴露では肝臓、腎臓、脾臓に光学顕微鏡レベルでの病理組織学的変化は認められないことがわかった。一方、肝臓、腎臓、脾臓の組織中にMWCNT繊維の明らかな移行は認められなかったが、今回の研究は光学顕微鏡レベルでの観察であり、これらの臓器へのMWCNTの移行の有無を明らかにするためには、

電子顕微鏡等による詳細な検索が必要であると考えられる。

I-4. 超微形態学的手法を用いたナノマテリアルの経気道暴露による中枢神経系への影響の特徴と検出系の確立 (吉田)

MWCNT、フラーレンを単回暴露した嗅球において、電子顕微鏡観察において異常は認められなかったことから、昨年度の研究結果と併せ、MWCNTあるいはフラーレンの吸入暴露は、ともにラットの嗅球や中枢神経系に器質的な影響を与えないと考えられた。EDSは細胞内の元素を解析できる非常に有用な方法であるが、MWCNTを投与した嗅球で炭素の蓄積が認められなかったことから、MWCNT暴露による粒子が嗅球内に存在しない可能性も考えられた。しかし炭素が豊富なエポキシ樹脂で包埋した電顕標本であることから、さらなる検討が必要かもしれない。ラットに吸入暴露を行った酸化チタンの吸入暴露により肺に明らかなチタンの沈着が投与後4週間まで観察されたことから、投与した酸化チタンが肺内に長くとどまる可能性を示すと考えられた。

I-5. ナノマテリアルの吸入暴露実験、及び、肺のc-DNAマイクロアレイによる毒性評価に関する研究 (小川)

MWCNT 投与ラット肺において炎症、酸化ストレス等に関与する遺伝子の増加を認めた。なお、肺の炎症に関しては組織学的にも確認された。MWCNT による酸化ストレスについては多くの論文が報告されており、本実験系においても遺伝子レベルで確認された。また、DNA 修復に関与する Parp1 遺伝子がMWCNT 投与により有意に増加したことから、MWCNT により肺の DNA 損傷が生じている可能性が示唆された。McKinney らの、MWCNT を載せたゴム膜の下

にスピーカーを置き、振動でダストを発塵させる方法は、MWCNT 以外の粒子の混在を疑われることがなく形態的にも二次的変形が加わらず、12 mg/m³ までの濃度が達成されている点で優れていると考えられ、その発生器の製作を行っており、完成後にその性能について検討を加える予定である。

I-6 ナノマテリアルの経気道暴露による中期発がん試験法の開発に関する研究 (長野)

MWCNTの経気道投与による肺を標的とした中期発がん性試験の試験プロトコールについて検討した結果、実験動物としてF344系ラットを使用し、イニシエーション処理としてDHPNを0.1%の濃度で飲水に混入して2週間投与し、2週間の休薬期間の後、MWCNTを0、2.5、10および40 μg/匹の用量で1回/2週、4回気管内投与する方法が、最も適した方法であると考えられた。発がん性の検出方法としては、肺腫瘍の発生について発生動物数と腫瘍および前腫瘍性変化の発生個数を、解剖時の肉眼的観察と病理組織学的検査によって検索する方法を用いるのが基本であると考えられる。また、陽性対照群としては、MWCNTと形状が類似し、かつ、発がん性を有するクロシドライトが適切であると考えられる。

II. *in vitro* 及び*in vivo* 試験系によるスクリーニング法の有効性の評価

II-1. ナノマテリアルの発がん性スクリーニングのための*in vitro* 系での遺伝毒性試験による評価手法に関する研究 (浅倉)

①DLS測定によるMWCNTの分散性は、細胞毒性の結果とほぼ一致した。また、MWCNTの繊維が十分に拡散されていることを確認した。②MWCNTに対する細胞の反応は、MWCNT繊維が細胞内に入ることによって起こると考えられた。③遺伝毒性試験の結果からは、MWCNT

は、DNAに直接反応する物質ではなく、細胞内に取り込まれ、細胞分裂時に何らかの阻害作用をすることが予想された。

II-2. ナノマテリアルの経気道暴露による発がん性スクリーニングのための *in vivo* 系での遺伝毒性試験による評価手法に関する研究 (野口)

MWCNTをgpt delta ラットに気管内投与した結果、炎症性影響によるII型肺胞上皮(肺幹細胞)の増生が認められたことから突然変異の増加が想定されたが、突然変異の増加は認められなかった。

III. ナノマテリアルの吸入暴露情報に関する調査研究 (山本)

酸化チタンなどナノマテリアルの主要な反応として多くの実験で、肺の炎症、好中球の浸潤がみられており、これはマクロファージによる排泄機構が機能せず、酸化体の関与、過剰投与での遺伝毒性が考えられる。2006年にWHO国際がん研究機関(IARC)は、酸化チタンについて、疫学データからは発がん性の根拠は不十分だが、吸入及び気管支内投与の動物実験の結果から動物で発がん性の根拠が十分であるとして、酸化チタンのIARC分類をGroup 2B(発がん性を有する可能性のある物質)に変更した。また、米国の国立労働安全衛生研究所は、酸化チタンの許容値としてマイクロサイズの酸化チタンより15倍厳しい0.1 mg/m³を提案した。これは、暴露量として粒子の表面積を用いた用量—作用曲線で動物実験のデータをヒトに外挿してえられたものであるが、酸化チタンの毒性を表面積で説明できるかは意見がわかれている。酸化チタンの毒性は、粒径、組成、表面の性状、結晶構造、実際の分散状態など様々な要因があるため、毒性の評価や実験を行う場合も、これらを十分に考慮する必要がある。

また、労働環境気中の粒子の径、形状やその存在比率などについてより詳細な調査が必要である。

E. 結論

I. ナノマテリアルの全身吸入暴露法、及び気管内投与法を用いた経気道暴露による健康影響の評価手法の確立

I-1. 実験動物への暴露量および暴露形態を把握するためのナノマテリアルの性状、拡散状態及び濃度を把握する方法に関する研究 (鷹屋)

模擬発生装置を用いた気中MWCNTの濃度測定では、全てのナノ粒子について、あるいは全てのMWCNTについて、普遍的な、結論ではないが、粉体として取り扱う作業においても、ナノ一次粒子の気中への発生の可能性はゼロではないということがわかった。また、各種測定器の利点・欠点が明らかになり、ばく露実験での濃度監視には表面積計が優れていると考えられることがわかった。生体内寿命の評価法の検討では、生体内寿命評価に関して電子顕微鏡観察の補助的方法として検討した方法のいずれについても尚、実験方法の検討・改良が必要であった。MWCNTの毒性評価法検討および毒性発現に関わる生体因子の検索では、MWCNTの毒性発現は長時間経過して生じる。そのため毒性評価にはMWCNT添加時の至適細胞数を予め検討することが必要であることが示された。またMWCNTは免疫系に大きく影響する可能性が示された。

I-2. ナノマテリアルの経気道暴露による呼吸器への生体影響の評価手法に関する研究 (相磯)

光学顕微鏡を用いた病理組織学的検索でMWCNTと推定していた沈着物質は、透過型電子顕微鏡像によりMWCNTであることが確認された。光学顕微鏡による病理組織学的検索は、MWCNTの生

体影響の概略を調べるには、有効な検索手段であると考えられる。

I-3. ナノマテリアルの経気道暴露による肺外影響の評価手法に関する研究（甲田）

MWCNTをラットに40および160 μg /匹の用量で単回気管内投与し、1、7、28および91日後に解剖し、肝臓、腎臓、脾臓を中心とした光学顕微鏡レベルの観察を行った。その結果、40および160 μg /匹の用量とも、肝臓、腎臓、脾臓へのMWCNTの明らかな移行は認められなかった。また、これらの臓器には病理組織学的変化がみられなかった。今回の研究ではこれら肺外臓器へのMWCNTの移行を示す明らかな証拠は得られなかったが、電子顕微鏡等による詳細な検索が必要であると考えられる。

I-4. 超微形態学的手法を用いたナノマテリアルの経気道暴露による中枢神経系への影響の特徴と検出系の確立（吉田）

MWCNTのミストおよびリポゾームを用いたフローレンを雄ラットに単回吸入暴露したが、嗅球を始めとする中枢神経系への影響は認められなかった。EDS解析は、細胞内元素の分布を解析する有用な方法であるが、今回のEDS解析ではMWCNTの嗅球における分布は明らかにならなかった。

I-5. ナノマテリアルの吸入暴露実験、及び、肺のc-DNAマイクロアレイによる毒性評価に関する研究（小川）

MWCNTを経気道曝露したラットの肺の定量的マイクロアレイ解析実験を行い、炎症、酸化的ストレスに関連する遺伝子の増加を認めた。また、DNA修復に関連する遺伝子の増加が認められたことから、DNA損傷も生じている可能性が示唆された。また、McKinneyらの方法による発生器

の製作を行い、その性能について検討するとともに、実験者への暴露及び環境への漏出を避けるための方策を立て、実験を遂行できるように計画を進めた。

I-6. ナノマテリアルの経気道暴露による中期発がん試験法の開発に関する研究（長野）

ナノマテリアルの吸入暴露による中期発がん試験法を開発することを目的として、多くのナノマテリアルで共通して標的臓器となる可能性が高い肺を標的とした中期発がん試験に利用可能なイニシエーション処理と試験プロトコールについて検討した。その結果、試験プロトコールは、実験動物としてF344系ラットを使用し、イニシエーション処理としてDHPNを0.1%の濃度で飲水に混入して2週間投与し、2週間の休薬期間の後、MWCNTを0、2.5、10および40 μg /匹の用量で1回/2週、4回気管内投与する方法を選択した。

II. *in vitro* 及び*in vivo* 試験系によるスクリーニング法の有効性の評価

II-1. ナノマテリアルの発がん性スクリーニングのための*in vitro* 系での遺伝毒性試験による評価手法に関する研究（浅倉）

①DLS測定およびSEM観察により昨年度の分散条件が適切であったことが証明された。②MWCNTは細胞内に取り込まれており、培養細胞による細胞毒性試験、遺伝毒性試験での評価が正当であることを証明した。③遺伝毒性試験の結果、染色体の数的異常および多核細胞の誘発が認められた。この結果より、細胞内に取り込まれたMWCNTは細胞分裂時に何らかの阻害作用をしていることが示唆された。

II-2. ナノマテリアルの経気道暴露による発がん性スクリーニングのための*in vivo* 系での遺伝毒性試験による評価手法に関する研究（野

ロ)

現在開発されている遺伝毒性を調べるトランスジェニック動物の中で gpt delta 動物は、欠失変異が評価できる点からも評価レスポンスが高く最も適している動物である。さらに gpt delta 動物でナノマテリアルの *in vivo* 突然変異原試験を評価するには、試験プロトコルの最適化等更なる調査が必要である。

Ⅲ. ナノマテリアルの吸入暴露情報に関する調査研究 (山本)

酸化チタンの職業暴露及び吸入毒性に関する公開情報を収集し、整理した。職業暴露に関しては、過去に大規模な疫学調査が実施されているが、粒径や詳しい性状に関する情報は得られなかった。毒性影響に関しては、気管内投与、エアロゾルへの全身暴露による *in vivo* の試験結果が蓄積されてきている。しかし、酸化チタンの毒性は、粒径、表面の性質の違い、結晶構造、実際の分散状態など様々な要因の影響を受けるため、毒性の評価や実験を行う場合は、これらを十分に考慮する必要がある。

F. 健康危機情報

該当しない

G. 研究発表

1. 論文発表

- Aiso, S., Yamazaki, K., Umeda, U., Asakura, M., Takaya, M., Toya, T., Koda, S., Nagano, K., Arito, H. and Fukushima, S.: Pulmonary toxicity of intratracheally instilled multiwall carbon nanotubes in male Fischer 344 rats, *Industrial Health*, In press
- Asakura, M., Sasaki, T., Sugiyama, T., Takaya, M., Koda, S., Nagano, K., Arito, H. and Fukushima, S.: Cytotoxicity and mutagenicity of multiwall carbon nanotubes with cultured Chinese

hamster lung cells in comparison with chrysotile A fibers, *Journal of Occupational Health*, 2010, 52: 155-166.

Kano, H., Umeda, Y., Kasai, T., Sasaki, T., Matsumoto, M. and Yamazaki, K., Nagano, K., Arito, H., Fukushima, S.: Carcinogenicity studies of 1,4-dioxane administered in drinking-water to rats and mice for 2 years. *Food and Chemical Toxicology*, 2009, 47: 2776-2784.

Kasai, T., Kano, H., Umeda, Y., Sasaki, T., Ikawa, N., Nishizawa, T., Nagano, K., Arito, H., Nagashima, H. and Fukushima, S.: Two-year inhalation study of carcinogenicity and chronic toxicity of 1,4-dioxane in rats, *Inhalation Toxicology*, 2009, 21: 889-897.

Ohbayashi, H., Umeda, Y., Senoh, H., Kasai, Kano, H., Nagano, K., Arito, H. and Fukushima, S.: Enhanced hepatocarcinogenicity by combined inhalation and oral exposures to N,N-dimethylformamide in male rats, *J Toxicol. Sci.*, 2009, 34: 53-63

Ohnishi, M., Take, M., Yamamoto, S., Fukushima, S. and Yajima H.: Identification of an N-acetylcysteine conjugate in the urine after oral administration of 2,4-dichloro-1-nitrobenzene to rat. *The Journal of Toxicological Science* 2009, 34: 233-237.

○ Takaya, M., Serita, F., Yamazaki, K., Aiso, S., Kubota, H., Asakura, M., Ikawa, N., Nagano, K., Arito, H. and Fukushima, S.: Characteristics of multiwall carbon nanotubes for an intratracheal instillation study with rats, *Industrial Health*, In press

Take, M., Ohnishi, M., Nagano, K., Yamamoto, S. and Fukushima, S.: Design and performance of a system for blood collection of rats under whole-body inhalation exposure. *The Journal of Toxicological Science* 2009, 34: 221-226.

Yamazaki, K., Suzuki, M., Kano, H., Umeda, Y., Matsumoto, M., Asakura, M., Nagano, K., Arito, H. and Fukushima, S.: Oral carcinogenicity and toxicity of 2-amino-4-chlorophenol in rats. *Journal of Occupational Health*, 2009, 51: 249-260.

2. 学会発表

○浅倉眞澄、長野嘉介、有藤平八郎、福島昭治：多層カーボンナノチューブの培養細胞を用いる小核試験及び細胞形質転換試験、2010年、第83回日本産業衛生学会

○相磯成敏、梅田ゆみ、山崎一法、長野嘉介、戸谷忠雄、久保田久代、鷹屋光俊、甲田茂樹、有藤平八郎、福島昭治：ラットに単回気管内投与した多層カーボンナノチューブの気管支周囲リンパ組織と縦隔部リンパ節への移行と病理組織変化、2010年、第83回日本産業衛生学会

○相磯成敏、梅田ゆみ、妹尾英樹、高信健司、長野嘉介、福島昭治：複層カーボンナノチューブの単回気管内投与によるラットの肺毒性、2010年、第26回日本毒性病理学会

高信健司、妹尾英樹、梅田ゆみ、相磯成敏、長野嘉介、福島昭治：F344ラットにみられた悪性エナメル上皮腫の1例、2010年2月、第26回日本毒性病理学会

○浅倉眞澄、長野嘉介、有藤平八郎、福島昭治：多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の培養細胞を用いる細胞毒性および変異原性、2009年、第82回日本産業衛生学会

○相磯成敏、梅田ゆみ、山崎一法、長野嘉介、戸谷忠雄、鷹屋光俊、甲田茂樹、有藤平八郎、福島昭治：多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の単回気管内投与によるラットの肺及び肺外への影響：I. 病理学的検索、2009年、第82回日本産業衛生学会

○芹田富美雄、鷹屋光俊、久保田久代、甲田茂樹、相磯成敏、山崎一法、長野嘉介、有藤平八郎、福島昭治：多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の単回気管内投与によるラットの肺及び肺外への影響：II. 気管注入時の投与物質及び肺内MWCNTのSEM観察、2009年、第82回日本産業衛生学会

山崎一法、加納浩和、梅田ゆみ、松本道治、妹尾英樹、長野嘉介、有藤平八郎、福島昭治：2-アミノ-4-クロロフェノールのラット及びマウスへの経口投与による発がん性と慢性毒性、2009年、第82回日本産業衛生学会

妹尾英樹、梅田ゆみ、片桐卓、相磯成敏、長野嘉介、福島昭治：N,N-Dimethyl formamideの吸入曝露と飲水投与における肝臓病変の比較、2009年、第25回日本毒性病理学会

梅田ゆみ、妹尾英樹、片桐卓、相磯成敏、長野嘉介、福島昭治：F344ラットの大腿部に認められた滑膜肉腫の1例、2009年、第25回日本毒性病理学会

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

Ⅱ. 分担研究報告書

分担研究名 実験動物へのばく露量およびばく露形態を把握するためのナノマテリアルの性状・拡散状態及び濃度を把握する方法に関する研究

分担研究者 鷹屋 光俊 独立行政法人労働安全衛生総合研究所環境計測管理研究グループ上席研究員
協力研究者 三浦 伸彦 独立行政法人労働安全衛生総合研究所健康障害予防研究グループ主任研究員

研究要旨

本分担研究では、被験物質の性状・濃度を正しく把握するドーズキャラクタリゼーションを担当している。本年度は、多層カーボンナノチューブ（MWCNT）のばく露チャンパー内での挙動を把握するための基礎的検討、生体内寿命を評価する実験方法を決定するための各種予備的検討、ならびに生体内での挙動（生体に与える影響）を分子生物学的手法により把握し、さらに *in vitro* 系による有害性評価へも発展可能にするために、培養細胞を用いた検討を行った。

A. 研究目的

動物実験を行う際、ばく露・気管内投与のいずれの手法を用いる場合でも、被験物質の性状・濃度を正しく把握するドーズキャラクタリゼーションを行うことは、生体影響を定量的に評価するために必要不可欠である。しかし、ナノ材料に関しては、動物の体内はもとより、環境中や比較的制御された環境であるばく露チャンパー内のナノ粒子についてさえ、濃度・性状・動態を知るキャラクタリゼーション技術は確立されているとはいえない。本分担研究では、分担研究者が職場環境におけるナノ粒子発生状況に関する測定を重ねて得た知見をもとに、ばく露チャンパー中の空気、気管内投与試料懸濁液、動物体内におけるナノ材料のキャラクタリゼーション法の開発・評価を行うことを目的としている。

本研究ではさらに、分子生物学的手法を用いてMWCNTの生体内の挙動把握あるいは有害性評価手法の開発を目指し、*in vitro* 系で評価するため、培養細胞系を用いた検討も併せて行った。

B. 研究方法

本分担研究の目標は、全てのナノ材料に適用可能な普遍的なキャラクタリゼーションの開発であるが、現実的には難しい点も多いため、主に、本研究の動物実験で用いられている多層カーボンナノチューブ（MWCNT）を試料として、チャンパー内での挙動・生体内寿命・分子生物学的手法による検出等を検討した。

2年目の年度の本年度は

- (1) MWCNTの模擬粉じんを発生させ、ナノからサブミクロンの大きさの気中粒子について、各種の測定装置で濃度変化を測定することに

より、チャンパー内での濃度評価に最も適した測定方法の選択を行うための実験。(鷹屋)

- (2) 生体内寿命を模擬生体液を用いて行う実験を行う際、何を測定指標にすべきかを決定するための予備的実験。(鷹屋)

- (3) MWCNTの生体内挙動を、培養細胞系を用いて分子生物学的手法により把握するとともに、毒性評価にも資する実験系の開発を行うための検討。(三浦)

の3つのサブテーマに関して実験的研究をおこなった。

- (1) 模擬発生装置をもちいた気中MWCNTの濃度測定

① MWCNTの測定について

空気中粒子状物質の生体影響を確実に評価する方法として、被験物質粒子を含む空気(エアロゾル)を、実験動物に呼吸させる、吸入ばく露実験がある。吸入ばく露実験を正しく行うためには、粒子濃度・粒子径分布などが一定である被験物質エアロゾルを生成させる必要があり、エアロゾル生成の前提条件として、粒子濃度・粒子径分布を正しく把握できる方法が不可欠である。ナノ材料由来のナノ粒子に関しては、測定装置そのものは存在するものの、大気中のバックグラウンド粒子の影響などの問題があり、測定は容易ではない。また、MWCNTについては、他のナノ粒子にはみられない、形状が繊維状である・電気の良い伝導体である、炭素材料であるため、黒い(光の反射率が低い)などの特徴を持つ。これらの影響を把握するために模擬的にMWCNT粉じんを発生させ、各測定器の測定結果を比較することとした。

② 実験方法

MWCNTの模擬粉じんを発生させる装置として、柴田科学製の堆積粉じん再発じん装置SKY-2を用いた。この装置は内径11cm長さ33cmの塩化ビ

ニール製パイプ2本を積み重ねた形であり、下方のパイプのほぼ真ん中から、インピンジャーと二連球を用いて発生させた、粉じんを吹き込む。2本のパイプの中間部には多数の孔をあけた整流板がはさんである。粉じんは、上方から取り出す構造である。通常は上方に吸入性粉じんのみを捕集するPM4用のサンプラー（インパクター・エルトリエータの両方が使用可能）を取り付けるが、今回は、分級装置を外したサンプラーをコネクター代わりにとりつけ、静電気力でチューブ内壁に粒子が吸着して濃度低下するのを防ぐため、導電性シリコンチューブと、黄銅-クロムメッキの3方分岐管を用いてMWCNTエアロゾルを測定器に導いた。

用いた測定器は、光散乱式粒子カウンター（Optical Particle Counter; OPC）、凝縮核カウンター（Condensed Nuclei Counter; CNC）、走査移動度式粒子サイザー（Scanning Mobility Particle Sizer; SMPS）、表面積計の4つの装置である。装置の構成を図1に示す。

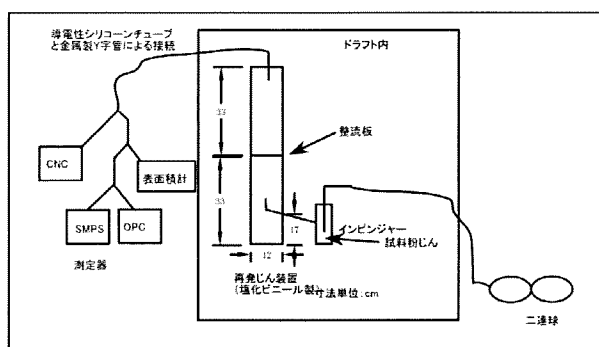


図1 装置の構成

OPCは、試料空気が光を横切るときに、粒子によって散乱した光を測定することにより粒子を計測する装置である。散乱光パルスの大きさを測定することにより、粒子を粒子径別に測定することが可能である。今回はリオン製のKA80Bを用いた。これは主にクリーンルーム管理等に用いるために工場内に設置して粉じん粒子をモニターする目的に開発された装置であり、300, 500, 1000, 2000, 5000nmの5段階の粒子径別に個数を測定できる。OPCはその原理上用いる光の波長の概ね半分以上の大きさの粒子しか計測できない。今回用いた装置では300nmが検出の下限である。

CNCは、OPCでは測定できないナノサイズ（粒径<100nm）の粒子を測定するために設計された装置である。CNCは、装置内に過飽和状態のアルコール蒸気または水蒸気を入れたチャンバーがある。

（今回用いた装置はイソプロパノール使用）そのチャンバー内に試料空気を吹き込むと、試料空気中の微小粒子を核として霧粒が生成する、この霧粒は、光散乱で検出可能な大きさであるため、霧粒を検出

することによりナノサイズの粒子を測定することができる。今回用いた装置は米国TSI社製3007であり、10nmから1000nmの粒子数を計測する。ただし、CNCは原理上粒子の大きさに関する情報を得ることはできない。

SMPSは、CNCを検出部とし、CNCに導入する粒子の大きさを制御することにより、CNCを単独で用いた場合に測定できない粒子の粒子径別の濃度を測定を行う装置である。粒子を粒子径別に分離するためには、DMA（微分移動度粒子解析器）という装置をもちいる。この装置は粒子に電荷を持たせた上で、装置内に高電圧を用いて粒子を静電気力で動かす機構を有している。加える高電圧の電圧を制御することにより任意の粒子径の粒子だけ取り出すことができる。今回は米国TSI社製の3080DMAと3010CNCを組み合わせて構成したSMPSを用い、9nm~420nmの粒子を3分間かけて粒子径別に測定をおこなった。

表面積計は、試料エアロゾルに高電圧を加えると、エアロゾルの粒子の表面積に応じて静電気が溜まるという性質を利用して、粒子の総表面積を測定する装置である。ナノスケールも含めて粒子量をリアルタイムに計測可能であることと、難溶解性物質の有害性は、粒子の質量ではなく表面積に比例するという仮説があるため、ナノ粒子のばく露アセスメント用に有望視されている計測器である。本研究では、TSI社製Aerotek9000型表面積計を用いた。

(2) 生体内寿命の評価法の検討

粒子状物質を動物に投与して、有害性を評価する際、特に長期的な影響を評価する際には、粒子の生体内での物理化学的性状の変化(以下本項では生体内寿命と呼ぶ)を評価することは非常に重要になる。生体内寿命を評価する方法として、実際に投与動物の臓器内試験物質が残存しているかどうかを観察する方法や、金属元素などの場合は、各臓器の金属濃度を測定する方法などがある。本研究の場合、対象物質が炭素と、ごく僅かの触媒由来の鉄でできたMWCNTであるため、元素濃度を測定する方法は使えない。また実際の粒子の観察についても、光学顕微鏡レベルだけではなく、電子顕微鏡観察を用いる必要がある。電子顕微鏡観察で生体内寿命を評価するためには、MWCNT粒子を完全に残したまま、生体由来組織を除去する前処理方法が必要であり、本研究の初年度である昨年初年度より実験を行っているが、未だ確立していない。

生体内寿命を評価する別の方法として、生理食塩水や生理食塩水に各種のアミノ酸やタンパク質などを加えた疑似生体液に浸漬して、粒子の時間変化を測定する方法が広く行われている¹⁻⁴⁾。この方法を用いて、粒子の形態変化を走査電子顕微鏡で観