

ルフォトンレーザー顕微鏡 (Carl Zeiss LSM 700) にて観察を行った。

B-IV MWCNT 気管内投与マウス肺の標本透明化液 (SCALECIEW-A2) による検討

① 肺組織の透明化検討

B-II②で気管内投与を行った肺組織のうち、コントロール群から2匹の肺組織、投与群から3匹の肺組織を用いて、非侵襲的な臓器内観察の手法として近年報告されている標本透明化液 (SCALECIEW-A2) を用いて、肺の透明化により投与した MWCNT の検出の可能性を試みた。近年、脳組織における組織の透明化についての研究報告がされている (Hiroshi Hama, et al. Nature Neuroscience 14, 1481-1488, 2011) 。本研究において、微小な MWCNT の肺組織全体での分散度合いや変化などを評価することに標本透明化液 (SCALECIEW-A2) が使用できるか検討を行った。B-II②で気管内投与を行った肺組織を4%パラホルムアルデヒド (PFA)/PBS で摂氏4℃の条件下で10時間固定した。その後、固定した肺を20%スクロース/PBS 溶液に移し、摂氏4℃の条件下で24時間の置換を行った。その後、室温にて4%パラホルムアルデヒド (PFA)/PBS にて20分間の再固定を行い、固定された肺を標本透明化液 (SCALECIEW-A2) 中に浸漬した。室温にて振盪を続け、外観から肺が透過して観察できるまで検討した。

C. 研究結果

C-I MWCNT の光学的特性の検討

① 分光蛍光光度計による検討

MWCNT (Taquann法処理-MWCNT-7) の光学的特性を分光蛍光光度計 (日本分光FP-6300型) により検討した。tBuOH (石津製薬株式会社) に混濁したMWCNTおよび溶媒であるtBuOHの蛍光高度を測定した。分光蛍光光度計の測定条件として、励起波長を220nm~750nm、励起側バンド幅を5nm、蛍光側バンド幅を5nm、データ取り込み間隔を5nm、走査速度を200nm/minとして詳細な検討を行った。MWCNTの混濁液およびtBuOHからは、図5、図6に示すように同様な励起-蛍光の関係にある3つ波形が見られた。励起波長を220nm~750nmにおいて、MWCNTのみに認める励起-蛍光関係にある波形は認めなかった。

② シングルフォトンレーザー顕微鏡による検討

MWCNT (Taquann法処理-MWCNT-7) をtBuOHに混濁した溶液と、tBuOH単体を材料に病理組織標本を作成し検討した。シングルフォトンレーザー顕微鏡では、455, 488, 555, 639nmの励起波長にて励起を行った。tBuOHにMWCNTを混濁した溶液と、tBuOH単体を材料に、病理組織標本を作成し検討した。いずれの材料も、上記した4つ全ての波長において、蛍光は見られず、MWCNT混濁液、tBuOHのシングルフォトンレーザーによる蛍光観察はで

きなかった。

③ 赤外フーリエ分光イメージングによる検討

可視光領域での観察が、①②のいずれの実験でも出来ないことがわかったため、赤外領域分光による観察が可能か検討するための準備を行った。MWCNTを混濁した溶液、tBuOH、B-II②で行ったMWCNT(10 μ g/mouse)を気管内投与した58週齢のA/Jマウスの肺組織病理標本を作製した。赤外フーリエ分光イメージングによる検討を行う準備を行い、来年度より、分析を始められる予定である。

C-II MWCNTのマウス気管内投与による検討

① 気管内投与に関する予備的検討

気管より直接投与した1群では図7、図8に示すように、肺胞内にMWCNTの集塊が確認された。その他の群においても、気道や肺胞内にMWCNTと思われる針状の繊維が見られたが、1群のように集塊となったMWCNTは見られなかった。これは、1群は屠殺後に肺を摘出後、気管から直接投与しており、投与時のMWCNT混濁液の状態を反映したものと考えられる。2、3群では光学顕微鏡のみで同定できる集塊見つけられなかった。現在、高橋主任研究官(国立衛研毒性部; 全身吸入暴露による生体影響を分担研究)の協力を仰ぎ、国立衛研毒性部にてハイパーイメージング装置による検討を続けている。念のため、食道～胃にかけて病理組織標本を作成し、気管内投

与が食道内投与になってしまっている症例はなかったか検証したが、食道および胃内にMWCNTと思われる針状繊維は認められなかった(図9)。

2、3群の4匹において気管内投与後により死亡したマウスは1匹もなかった。

② 12週齢 C57BL/6J マウスを用いた気管内投与による検討

全身吸入暴露と同様に12週齢C57BL/6Jマウスを用いて、気管内投与を行った。投与群、コントロール群、いずれも投与後1日目および3日目の病理組織標本で肺組織に目立った変化は見られなかった。気管内投与を行った11匹全てにおいて、肺胞内にMWCNTの集塊は確認できなかった。この原因としては、肺内に投与されたMWCNTのうち集塊を形成しているものは、刺激が強く咳などで排出される可能性も考えられる。また、気管内投与が完遂できていない可能性が考えられた。12週齢C57BL/6Jマウスの気管径は非常に細く、気管内投与での安定した完遂率は今後の修練が必要と考える。また、ラットでの気管内投与実験も合わせて行う必要があると考える。

C-III MWCNT全身吸入暴露投与後のマウス肺組織における病理組織学的検討

① 全身吸入暴露後のマウス肺組織の病理組織標本での検討

国立衛研毒性部(全身吸入暴露による生体影響を分担研究)から提供を受けた全身吸入

暴露を行った12週齢 C57BL/6J マウスの肺組織の標本作製を行った (図 10)。いずれの標本でも、H. E. 標本を光学顕微鏡にて観察する限り、MWCNT の集塊を見つけることはできなかった (図 11、図 12、図 13)。少なくとも音響式ダスト発生装置による拡散状況はよい状態であることが推測される。なお、光学顕微鏡での観察では、明らかな針状繊維は見られず、念のため行ったシングルフォトンレーザー顕微鏡 (Carl Zeiss LSM 700) での、455, 488, 555, 639nm 波長による励起でも蛍光を発する物質は見られなかった。国立衛研毒性部にてハイパーイメージング装置による検討を続けている。

C-IV MWCNT 気管内投与マウス肺の標本透明化液 (SCALECIEW-A2) による検討

① 肺組織の透明化検討

非投与群2匹、投与群3匹の肺、心臓および縦隔組織は、標本透明化液 (SCALECIEW-A2) に浸漬開始後2週目から肺組織の辺縁が透明化し始め、12週後には肺組織全体が完全に透明化することができた。12週後も心臓について軽度の色調の変化を認めるのみで透明化には至らなかった (図 14)。非投与群2匹では、外観からは肺内部での所見は特に見られなかったが、MWCNT 投与群の3匹のうち、1匹の肺組織では、ホルマリン固定の段階では外観からは観察することができなかった肺組織内部の結節が、外観から透過して観察することができた (図 15)。肺組織についての標

本透明化液 (SCALECIEW-A2) の利用は未だ報告がなく、今回の実験で、初めて肺内を透過し外観から観察する手法を確立することができ、病理組織学的な手法に加えて、MWCNT の毒性評価を行う上で、有効に利用できる可能性が示唆された。現在のところ、完全に外観からの観察が可能になるまで12週間を要するため、固定条件や浸透について、今後改善を図りたい。

D. 結論

本分担研究では、肺内での MWCNT の分布を観察する目的で MWCNT の光学的特性を分光蛍光光度計やシングルフォトンレーザー顕微鏡を用いて検討した。分光蛍光光度計では、MWCNT に特有のピークを観察することは出来なかった。シングルフォトンレーザー顕微鏡による観察においても455, 488, 555, 639nm 波長による励起でも蛍光は見られなかった。MWCNT (Taquann 法処理-MWCNT-7) は、ごく小さな針状繊維で、繊維長は約1~10 μm 、繊維径は約30~120nm の構造をしているため、これまでの病理組織標本を鏡検する手法のみでは、観察が困難なことが予想される。MWCNT の光学的特性を検討し、新たな観察法の確立が望まれる。今後は可視光域外である中赤外、近赤外領域での光学的検討を続けていく予定である。

マウスへの気管内投与手技について検討するため、58週齢の A/J マウスへの投与実験と12週齢 C57BL/6J マウスへの投与実験を行

い、週齢による気管径の違いから、マウスへの気管内投与を行う上で技術上の課題を評価した。ラットへの気管内投与の経験をふまえると、マウスでの気管内投与は熟練を要することがわかった。特に12週齢マウスへの気管内投与は比較的困難な手技といえる。さらに、ラットによる気管内投与による検討も必要であると考えられる。

MWCNT 全身吸入暴露後のマウス肺組織において病理組織標本を作成し、検討を行ったが、いずれの標本でも、MWCNT の集塊は見られなかった。なお、光学顕微鏡での観察では、明らかな針状繊維は見られず、現在国立衛研毒性部にてハイパーイメージング装置による検討を続けている。

今後、各分担研究とさらなる連携を行い、針状 MWCNT による肺組織への、腫瘍性病変を含めた有害性評価を行う予定である。

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

横平政直；橋本希；中野裕子；山川けいこ；岸宗佑；二宮芙美子；井上達史；竿尾光祐；今井田克己、胸腔内投与による針状微粒子 TISMO の影響、第 28 回日本毒性病理学会総会および学術集会、2012. 02

横平政直；橋本希；山川けいこ；中野裕子；二宮芙美子；岸宗佑；井上達史；竿尾光祐；今井田克己、The promotion effects of lung tumor by left pulmonary ligation in A/J mice、第 70 回日本癌学会総会、2011. 10

高橋祐次、小川幸男、高木篤也、相磯成敏、今井田克己、菅野純、音響式ダスト発生装置を用いた多層カーボンナノチューブの全身暴露吸入と肺内負荷量の測定、第 39 回日本毒性学会学術年会、仙台国際センター2012. 7

Yuhji Taquahashil, Yukio Ogawa, Atsuya Takagi, Shigetoshi Aiso, Katsumi Imaida, Jun Kanno, Whole Body Inhalation Exposure of Multi-Walled Carbon Nanotube by Using an Acoustical Dust Generator and Measurements of Its Body Burden in Lung, The 6th International Congress of Asian Society of Toxicology, July 17-20, 2012

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

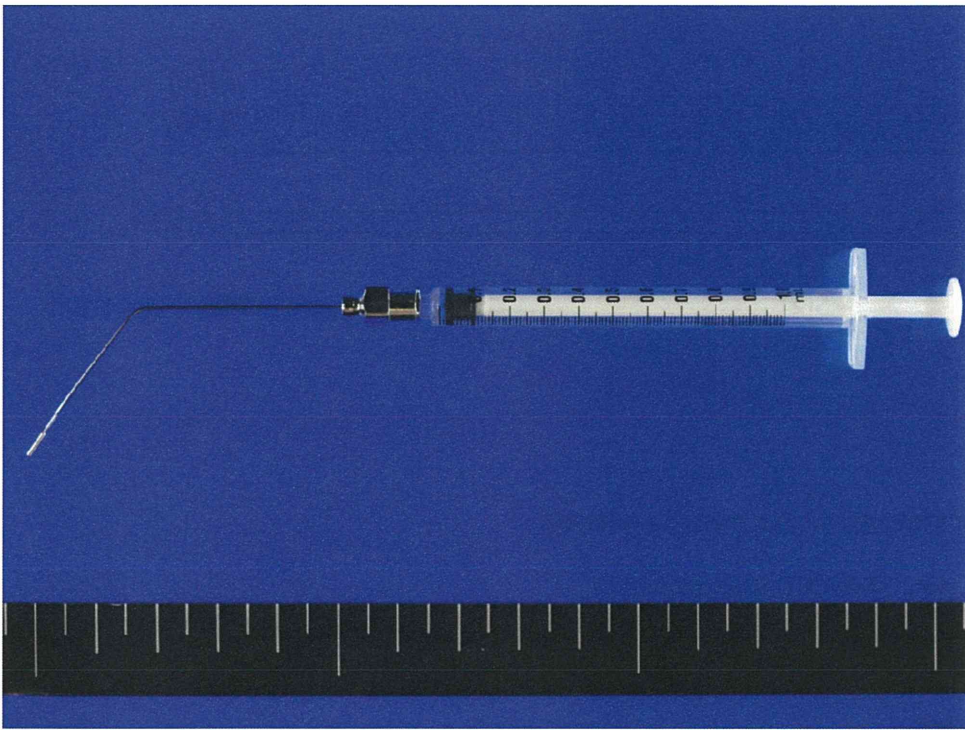


図 1. DIMS 型経気道ゾンデ（マウス用）（DIMS 医科学研究所）および 1cc ツベルクリン用シリンジ（テルモ）

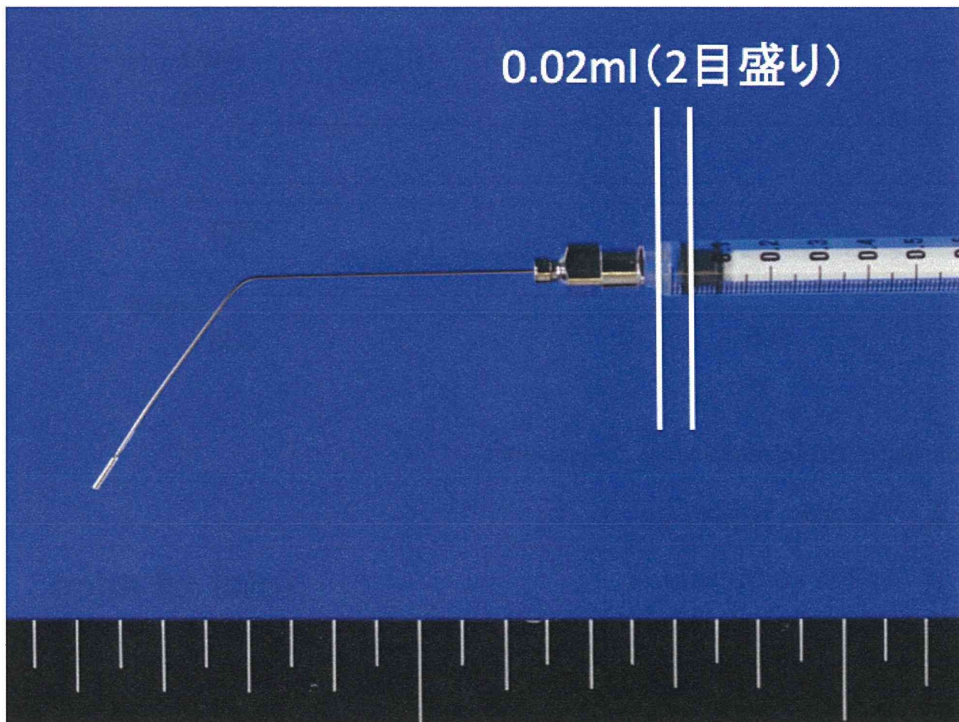
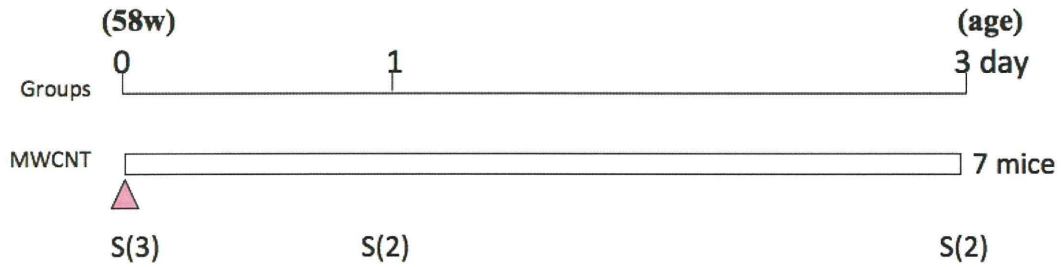


図 2. DIMS 型経気道ゾンデ（マウス用）（DIMS 医科学研究所）および 1cc ツベルクリン用シリンジ（テルモ）



Animals: A/J mouse, male, 58-week-old

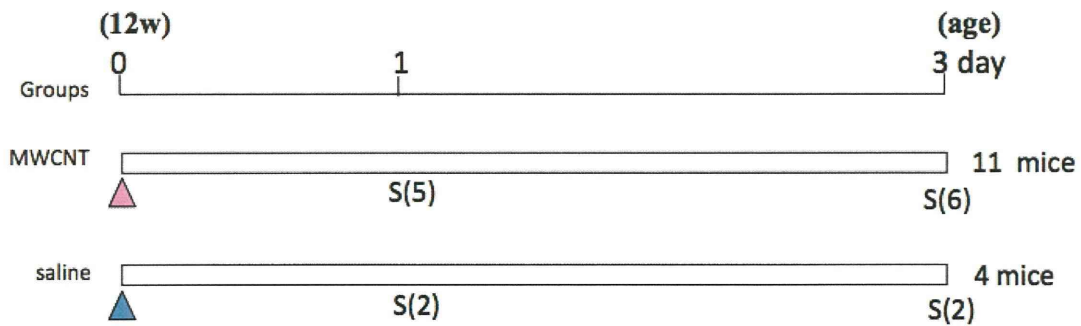
▲ : MWCNT, 10 μ g/mouse, i.t.

Total 7 mice

Experimental design:

58週齢の雄性 A/J マウスにおける MWCNT 気管内投与実験

図 3. 58 週齢の A/J マウスへの気管内投与実験の実験デザイン



Animals: C57BL6/J male mouse, 12-week-old

▲ : MWCNT, 10 μ g/mouse, i.t.

▲ : Saline + 0.1% Tween 80

Total 15 mice

Experimental design:

12週齢の雄性 C57BL6/J マウスにおける MWCNT 気管内投与実験

図 4. 12 週齢の C57BL6/J マウスへの気管内投与実験の実験デザイン

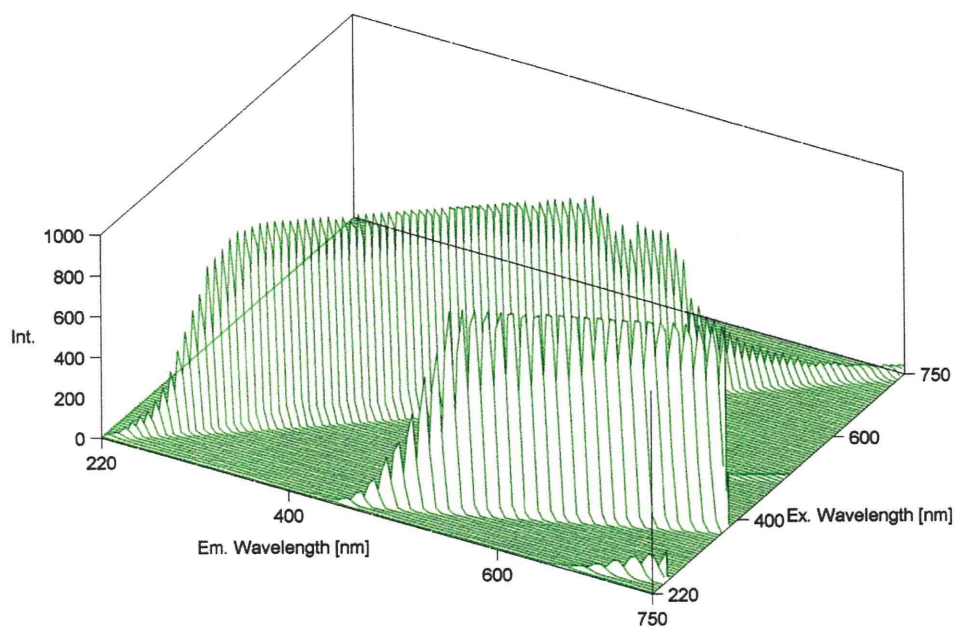


図 5. MWCNT (Taquann 法処理-MWCNT-7) の分光蛍光光度計検討結果
 (計測条件：励起波長 220nm～750nm、励起側バンド幅 5nm、蛍光側バンド幅 5nm、データ取り込み間隔 5nm、走査速度 200nm/min)

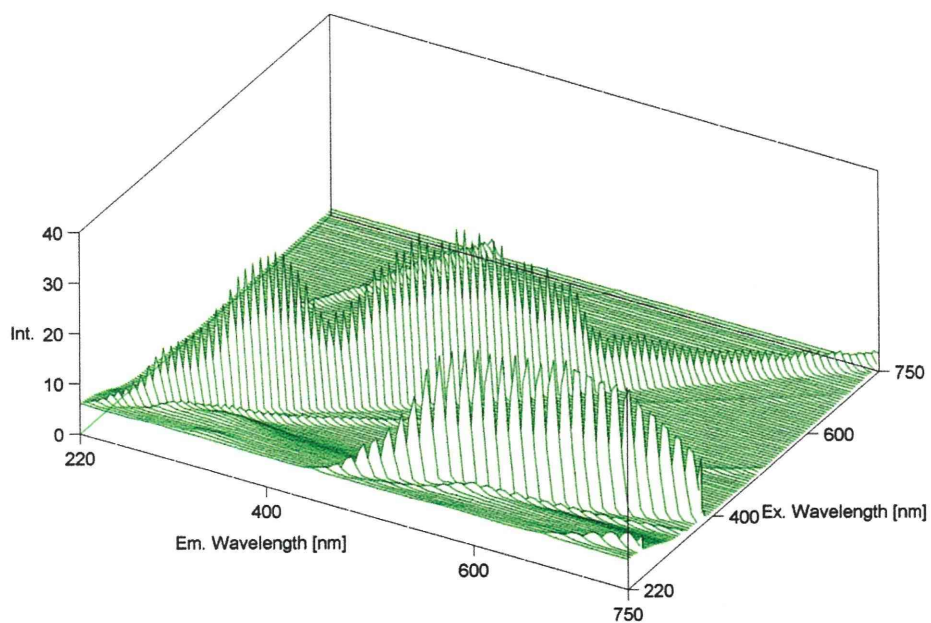


図 6. tBuOH の分光蛍光光度計検討結果
 (計測条件：励起波長 220nm～750nm、励起側バンド幅 5nm、蛍光側バンド幅 5nm、データ取り込み間隔 5nm、走査速度 200nm/min)

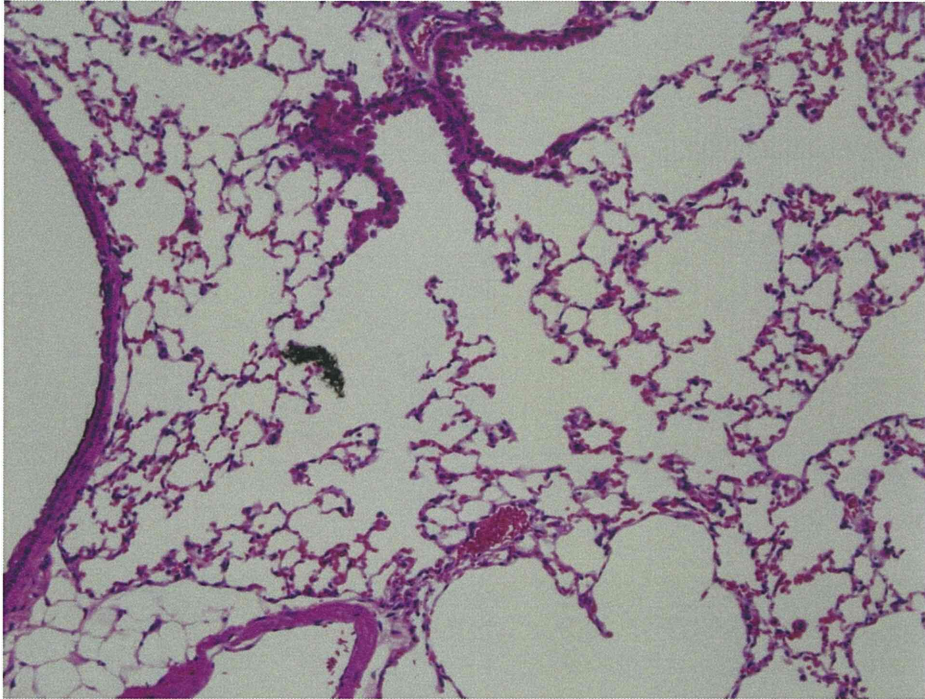


図 7. 58 週齢の A/J マウスへの気管内投与実験の病理組織像（弱拡像）
（1 群：屠殺直後に気管～肺を一塊にして取り出し、気管より確実に投与を行った群）

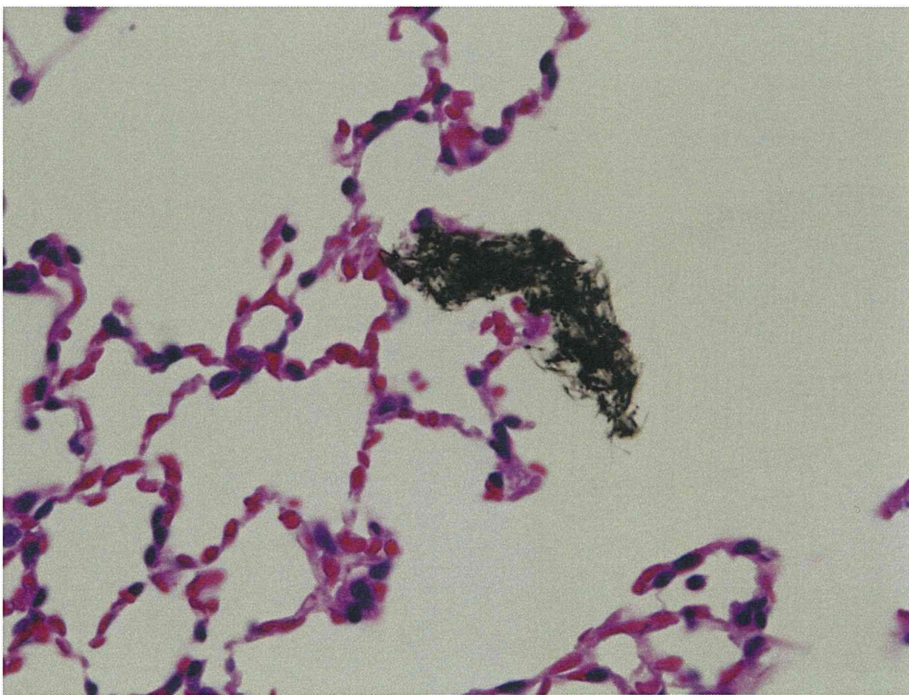


図 8. 58 週齢の A/J マウスへの気管内投与実験の病理組織像（強拡像）
（1 群：屠殺直後に気管～肺を一塊にして取り出し、気管より確実に投与を行った群）

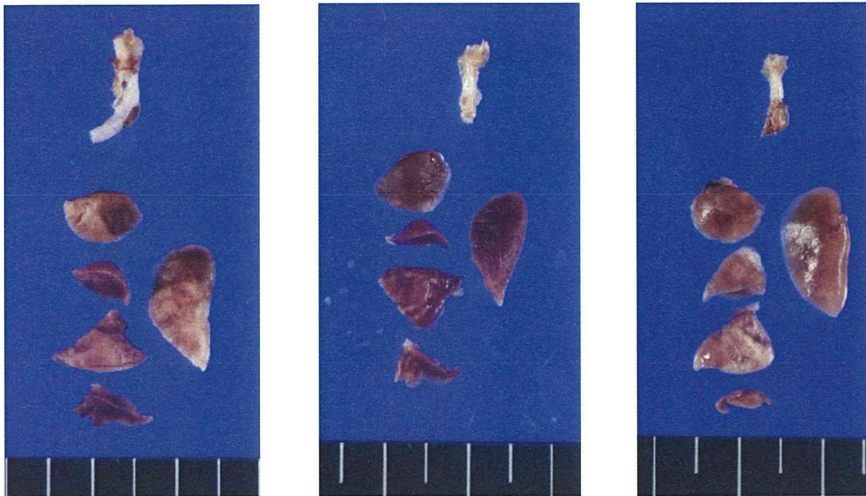


図 9. 58 週齢の A/J マウスへの気管内投与実験
(左から 1 群、2 群、3 群)

- 1 群：屠殺直後に気管～肺を一塊にして取り出し、気管より確実に投与を行った群
- 2 群：気管内投与後 1 日目で屠殺した群
- 3 群：気管内投与後 3 日目で屠殺した群

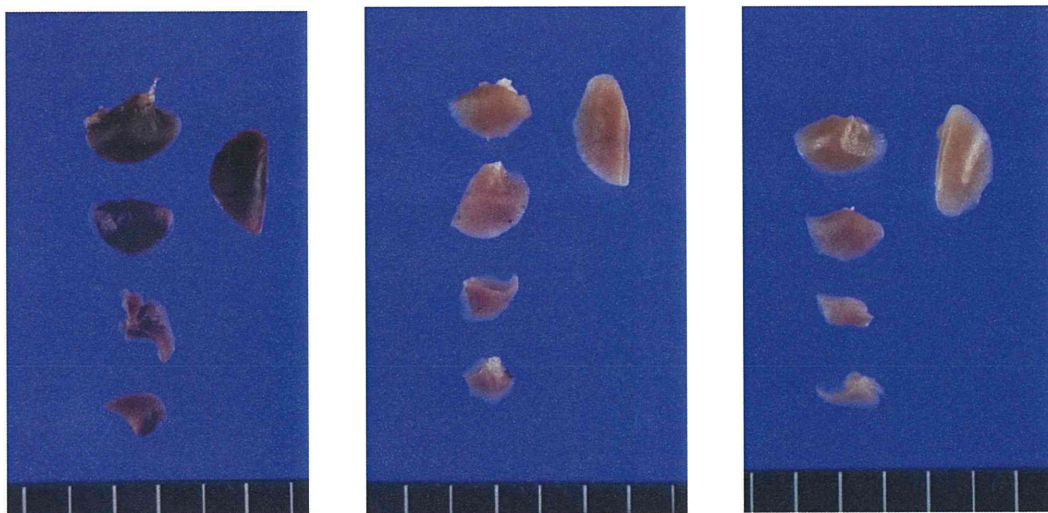


図 10. 全身吸入暴露実験
(左から、コントロール。吸入暴露条件(1)：290ug/m³、4 時間、暴露 1 日後。
吸入暴露条件(2)：329ug/m³、4 時間、暴露 3 日後。)

①:Control

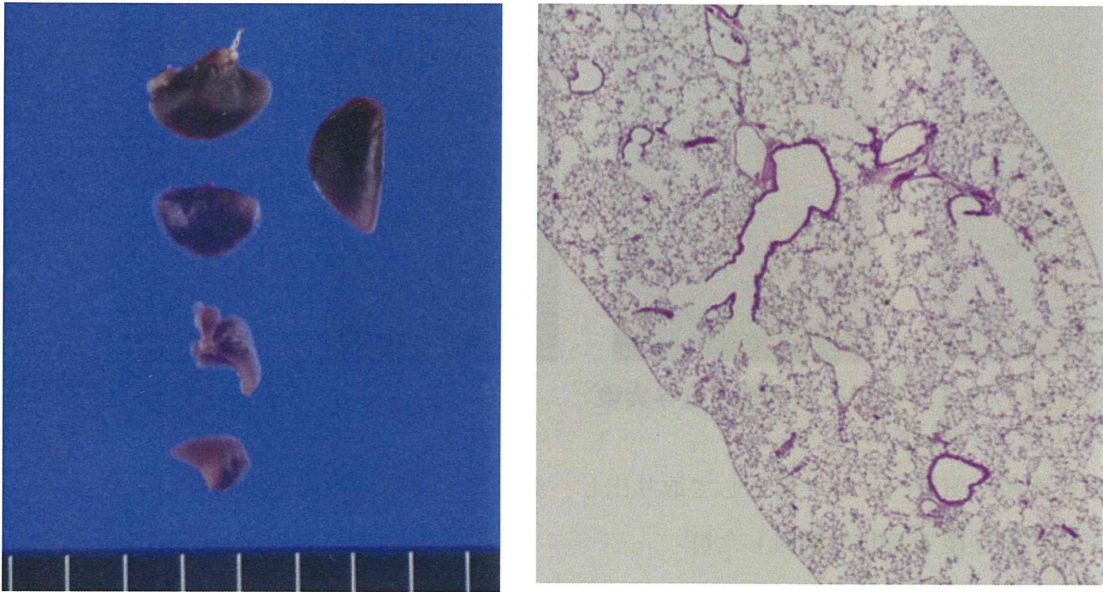
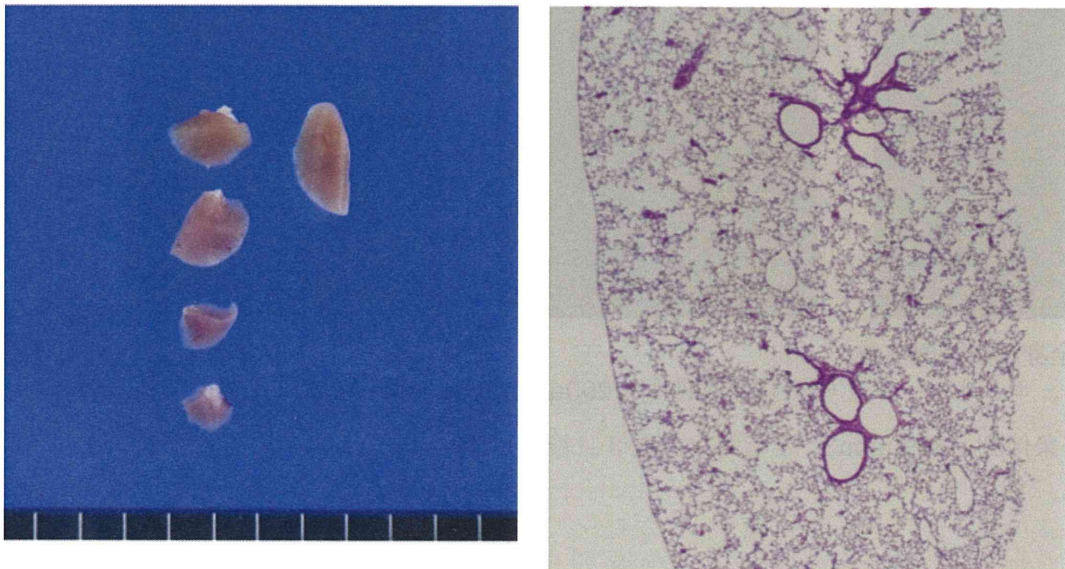


図 11. 全身吸入暴露実験：コントロール（非暴露群）肉眼像および病理組織像

②:吸入暴露1日後の肺、290ug/m³、4時間暴露



HE染色、偏光顕微鏡にても、検出できず。

図 12. 全身吸入暴露実験：
吸入暴露条(1)：290ug/m³、4時間、暴露1日後の肉眼像および病理組織像

③: 吸入暴露三日後の肺、329ug/m³、4時間暴露



HE染色、偏光顕微鏡にても、検出できず。

図 13. 全身吸入暴露実験：
吸入暴露条(1)：290ug/m³、4時間、暴露1日後の肉眼像および病理組織像

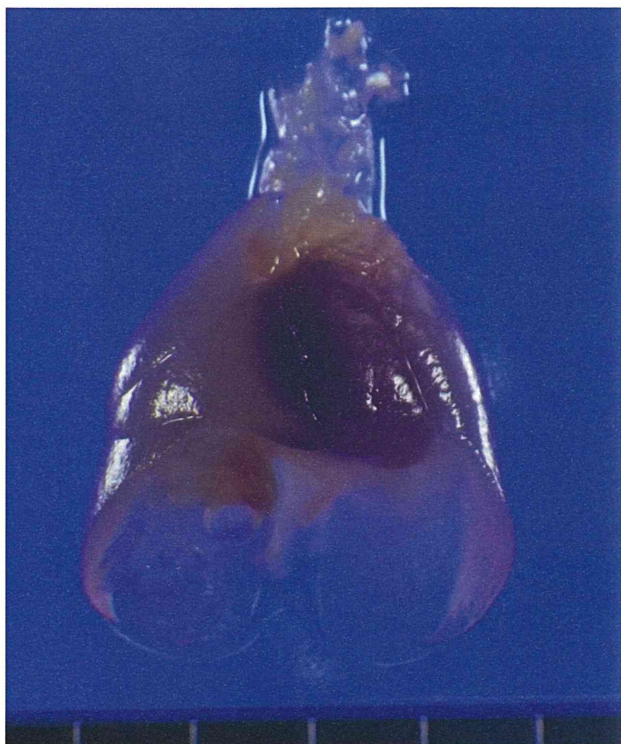


図 14. 12 週齢 C57BL/6J マウスへの気管内実験のコントロール群
(標本透明化液 (SCALECIEW-A2) に浸漬後 12 週の肺、心臓および縦隔組織)



図 15. 12 週齢 C57BL/6J マウスへの気管内実験の MWCNT 投与群
(標本透明化液 (SCALECIEW-A2) に浸漬後 12 週の肺、心臓および縦隔組織)

平成23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

ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法に関する研究

- 全身暴露吸入による肺を主標的とした毒性評価研究 -

分担研究報告

分担研究課題

「ナノマテリアルの全身暴露吸入方法に関する研究」

研究分担者	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
研究協力者	菅野 純	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 部長
	高橋祐次	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
	生田達也	柴田科学株式会社
	鶴田祐吾	柴田科学株式会社

研究要旨

先行研究において、腹腔内投与によって中皮腫発がん性が示された多層カーボンナノチューブ (MWCNT) を対象として、MWCNT の懸濁液の気管内投与を実施し、標的臓器である肺等への影響について多くの成果を得た。並行して、国立医薬品食品衛生研究所・環境保全型動物飼育棟内に、人体の暴露様式に即した全身暴露吸入試験装置の設置を行った。この装置は、米国 National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) が考案した音響式ダスト発生装置の基本概念を導入し、独自の暴露チャンバーを組み合わせて、1 群最大 16 匹、3 群の実験を可能としたものである。本分担研究では、運用上残された課題である MWCNT の特性に合わせての暴露制御パラメータ (送風量・圧、音響音圧・周波数) の最適化を行い、吸入暴露条件を確立することに取り組んだ。検体は MWCNT (MWNT-7、三井) を用いた。暴露濃度の制御は、暴露チャンバー内の相対濃度をパーティクルカウンター (最小検出直径 0.3 μm) で測定し、フィードバック制御によりスピーカーの電圧をコントロールして行った。暴露制御パラメータの検討の結果、4 時間の暴露時間、200,000 cpm を設定値とした条件において、平均質量濃度 (±標準偏差) は $275.3 \pm 28.5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ が得られた。暴露チャンバー内の MWCNT を走査型電子顕微鏡で観察すると 80%以上が単離さ

れた状態にあり、長さが10 μ m以下の線維が60%（幾何平均長11.6 μ m）を占め、20 μ mを超える線維も15%含まれていた。最適化された暴露条件下で実際にマウスに暴露を行い、DNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現変動解析に供した。加えて、MWCNT原末を高度に分散処理する独自の方法（Taquann法）を開発した。Taquann法で処理した検体は液相にも気相にも速やかに再分散する。吸入暴露実験に供したところ、従来のパーティクルカウンターによる検出が困難となったため、現在、凝縮粒子カウンターを導入し条件検討を進めている。

A. 研究目的

ナノマテリアルの有害性は暴露経路により大きく変わることが既に示されている。人においては、全身暴露による吸入毒性が最も重要であることは関係者の一致した見解であるが、実際にはその検討が最も進んでいない。その最大の理由は、粒子状物質を定量的に吸入暴露させることが設備的にも技術的にも難しい上に、ナノマテリアルが凝集体を作り易く分散性の確保の面で更なる工夫を要する点にある。先行研究結果の判断の下、人体の暴露様式に即した全身暴露吸入を実現できる装置として、米国 National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) が考案した「音響式ダスト発生装置」の概念を導入し、これに独自の暴露チャンバーを組み合わせ、1群最大16匹、

3群の実験を可能とした施設を国立医薬品食品衛生研究所 環境保全型動物飼育棟内（26号館）に設置した。今年度は運用上の課題であるMWCNTの特性に合わせた暴露制御パラメータ（送風量・圧、音響音圧・周波数）の最適化に取り組み、吸入暴露条件を確立することを目的とした。更に、MWCNT原末の分散性を高める方法に着手し、極めて分散性の高い検体を得る方法（Taquann法）を開発した。

B. 研究方法

B-1. MWCNT 検体

MWCNTは三井物産（現 現保土ヶ谷化学(株)）のMWNT-7を使用した。

粒度分布（繊維径 40-90 nm

平均一次粒径 長さ；10 μ m

直径；60 nm

製品粒径	30-100 μm (SEM)	さ 460 mm、容積 39.3 L) 及びそれを取り囲むエンクロージャーから構成される。ダスト発生カラムはシリンダーの両端にラテックス製ダイヤフラムを装着した太鼓のような構造である。検体となる MWCNT はダスト発生カラム内に投入する。スピーカー(実質振動半径 165.8 mm、入力 150 W、再生周波数帯～2.5 kHz、出力音圧レベル 92.5 dB/W)からの音響エネルギーによりラテックス製ダイヤフラムが振動して MWCNT は分散されダスト発生カラム内にエアロゾルが発生する。ダスト発生カラム内へ一定の流量で送風しエアロゾルを暴露チャンバー内に導入する。暴露チャンバー(直径 550 mm、高さ 550 mm、気積 105.5 L) はマウスを最大 16 匹収容できる構造を有している(詳細については、特許出願準備中のため省略)。暴露チャンバーは 40 L/min の流量で換気される。暴露チャンバー内の MWCNT の濃度のモニタリングは、相対濃度(count per minute; cpm) と質量濃度(mg/m^3) を並行して行った。相対濃度は暴露チャンバー内のエアロゾルを 0.1cf/min(2.83 L/min)の流量で吸引してパーティクルカウンター(OPC-110GT、柴田科学)で測定した。この情報は音響式ダスト発生装置の制御部に入力して濃度制御のフィ
密度	0.005-0.01 g/m^3 (沈降嵩密度法)	
比表面積	25-30 m^2/g (窒素吸着法)	
化学組成	炭素純度 99.5%以上	
製品形状	繭状凝集体	
(MWNT-7 のナノマテリアル情報提供シート(保土ヶ谷化学工業(株) H22 年 3 月)より抜粋)		

B-2. 全身暴露吸入装置概要

NIOSH から複製許可と共に導入したダスト発生装置¹⁾を基に、柴田科学株式会社で新たに設計した全身暴露吸入装置を国立医薬品食品衛生研究所 環境保全型動物飼育棟(26号館)603室に装置を設置した(研究協力者: 生田達也、鶴田祐吾、柴田科学株式会社)。本装置は、コンプレッサー、マスフローコントローラー、音響式ダスト発生装置及び暴露チャンバーから構成される。コンプレッサーで圧縮された空気は、HEPA フィルター、マスフローコントローラーを経て、音響式ダスト発生装置に送風される。音響式ダスト発生装置は、制御装置、エアロゾルを生成するアクリル製のダスト発生カラム(直径 330 mm、高

ードバック制御に使用した。質量濃度測定は 10 L/min の流量で暴露チャンバー内のエアロゾルを吸引して MOUDI (Micro-Orifice Uniform-Deposit Impactor、Model 125 NanoMOUDI、KANOMAX) で測定した。

全身暴露吸入装置の概要を図1及び図2に記載した。

B-3. 目標濃度と暴露時間

本研究で使用したパーティクルカウンターは最小検出粒径 0.3 μm 、測定可能な最大相対濃度は 0.1 cf (2.83 L) 当たり 300,000 cpm (Count Per Minute) である。最大濃度を超えた範囲での使用はパーティクルカウンターの検出部に深刻な障害が生じるため、目標濃度は 100,000 cpm から検討を開始した。制御パラメータの検討を重ねて、最終的には 200,000 cpm の目標濃度で稼動することとした。

暴露時間は2時間から検討を開始し、最終的に4時間とした。音響式ダスト発生装置には、稼働中に検体を追加投入できない構造となっているため、検体の残存量を目視で確認しながら検討を進めた。初回に約 200mg の MWCNT を投入したところ、4時間の暴露終了後にもダスト発生チャンバー内にMWCNTは残

存していた。以降、実験毎に約 30 mg の MWCNT を追加して検討を進めた。

B-4. 暴露チャンバー内のMWCNT濃度制御

目標濃度の制御は、音響式ダスト発生装置の上部に組み込まれた制御装置を介して行う。パラメータは、1)パワーアンプ部からスピーカーへの出力電圧(ボリュームコントローラ)、2)ダスト発生カラムから暴露チャンバーの送風量、3)音響周波数(Hz)及び4)フィードバックループのPIDパラメータである。

1)の出力電圧はボリューム開度1/2(約1.5V)固定で検討した。以下、各パラメータの詳細について記載する。

B-4-1. 送風量の検討

音響式ダスト発生装置の発生カラム内で生成したエアロゾルは、送風量一定のもと暴露チャンバーに送られる(最大送風量:20 L/min)。送風量を多くすることで、目標濃度へ速やかに達するが、オーバーシュートが大きくなる。また、発生カラムとエンクロージャーの差圧コントロールの範囲を超えるような過剰/過小な送風量はラテックス製ダイアフラムの形状に影響を与えるため、MWCNT

の分散が良好に保てなくなる。目標濃度に対して変動幅が最も小さくなるように送風量を検討した。

B-4-2. 音響周波数の検討

音響式ダスト発生装置のスピーカーからは緩やかな変調を伴った正弦波（10～数十Hz）が出力される。一定の周波数の正弦波が出力されるのではなく、設定した周期（秒）で周波数が徐々に変化する設計となっている。また、一周毎に矩形波のブレイクノイズが挿入され検体の凝集を防ぐようになっている（図3）。効率よくエアロゾルを発生させ、かつ濃度が一定に保たれる周波数について検討した。

B-4-3. フィードバック制御パラメータの検討

目標濃度、パーティクルカウンターで測定した暴露チャンバー内の相対濃度及びスピーカー駆動電圧はフィードバックループを構成し、PID（Proportional-Integral-Derivative）アルゴリズムを使用したフィードバック制御により濃度制御を行っている。PIDパラメータ（比例定数、積分定数、微分定数）を検討し、応答性の良く濃度の変

動幅が最も小さくなる数値を検討した。

B-5. 暴露チャンバー内質量濃度測定

相対濃度測定に平行して、暴露チャンバー内の質量濃度（ mg/m^3 ）を測定した。10 L/minの流量で暴露チャンバー内のエアロゾルを吸引して MOUDI（Micro-Orifice Uniform-Deposit Impactor、Model 125 NanoMOUDI、KANOMAX、分級サイズ；No. 1；10 μm 、No. 2；5.6 μm 、No. 3；3.2 μm No. 4；1.8 μm 、No. 5；1.0 μm 、No. 6；0.56 μm 、No. 7；0.32 μm 、No. 8；0.18 μm 、No. 9；0.10 μm 、No. 10；0.056 μm 、No. 11；0.032 μm 、No. 12；0.018 μm 、No. 13；0.01 μm ）に導いた。吸引は暴露時間を通して行った。各分級ステージには専用のアルミホイルにシリコンオイルを塗布したものを装着しMWCNTを回収した。尚、シリコンオイル塗布アルミホイルは、使用前に 50°Cのインキュベーター内で3日以上留置しシリコンオイルに含まれる溶媒を除去した。マイクロ天秤（XP26V、METTLER TOLEDO）を使用してアルミホイルの質量を、MOUDI 装着前と、MWCNT 回収後に測定し、その差分をMWCNT質量とした。

B-6. 暴露チャンバー内のMWCNTの形状観察

質量測定に使用したアルミホイルを走査型電子顕微鏡 SEM (VE-9800、KEYENCE) で観察した。MOUDI では質量濃度測定を主眼としているため、MWCNT の繊維が重なり合い、暴露チャンバー内の MWCNT の分散状態を確認しにくい。そのため、10 L/min の流量で 10 分間暴露チャンバー内のエアロゾルを吸引し、メンブレンフィルター(孔径 0.025 μm VSWP、ミリポア、 ϕ 12 mm)に吸着させて回収し SEM 観察を行い、分散状態の確認を行った。

B-7. MWCNT の分散処理方法の検討

ナノ材料は極めて微細な粒子状の物質であるが、容易に凝集する性質を有している(本研究で使用した MWCNT は、供与された状態ではその大部分が繭状の凝集体である)。ヒトの気道系の太さと構造、労働環境における暴露を想定すると、肺に到達するナノ材料の状態は、高度に分散されたものであることが想定される。ヒトに比較して細い気道を持つ実験動物では、凝集体が多く含まれる検体では、気道の比較的起始部に近い部分に凝集体が沈着することによる炎症が問題となり、ヒトへの外挿が可能であるかが論議される状況にある。そのため、ヒトにおける有害性を動物実験により予想・推定す

るためには凝集体の少ない分散性の確保された検体を使用することが必要となる。この課題を解決するために、MWCNT 原末を高度に分散化する処理法(Taquann 法)を開発した。Taquann 法の詳細については、特許出願準備中であるため省略する。

この検体を使用して、暴露を行い、MWCNT 原末と比較した。

C. 研究結果

C-1. ダスト発生装置からの送風量の検討

音響式ダスト発生装置からの送風量は 10 L/min から検討を開始した。この送風量では速やかに暴露チャンバー内の濃度が上昇したが、暴露開始直後のオーバーシュートが大きかった。スピーカーへの駆動電圧はオン/オフを繰り返す状態であり、定常状態に達してからもハンチングが大きかった(図 4)。送風量をしぼることで暴露開始直後のオーバーシュートと定常状態のハンチングは解消された。200,000 cpm、4 時間の暴露において、2 L/min の送風量で安定した結果が得られた。

C-2. 音響周波数の検討

目視でダスト発生装置チャンバー内の MWCNT の様子を観察すると、40 Hz 以上でダ

イアフラム上のMWCNTが全てチャンバー内に舞い上がり、凝集体のサイズは小さくなった。基底周波数を30Hz、周波数の変動範囲を10Hz（周波数は30Hz～40Hzの範囲で変動）、可変時間を10秒と設定して暴露を行ったところ、速やかに暴露チャンバー内の濃度が上昇したが、オーバーシュートが非常に大きかった。検討を進めた結果、基底周波数を20Hz、周波数の変動範囲を10Hz（周波数は20Hz～30Hzの範囲で変動）、可変時間を10秒とし、200,000cpm、4時間の暴露、2L/minの送風量で安定した結果が得られた。

C-3. PID制御パラメータの検討

検討の取り掛かりとなる値は、オートチューニングにより設定した。オートチューニングによる設定値では外乱に対しての反応性が十分ではなかったため、送風量、音響周波数の検討に平行して、各定数の調整を行った。比例定数0.481、積分定数16.3sec、微分定数2.42secの条件で安定した結果が得られた。

C-5. 暴露チャンバー内の質量濃度測定

相対濃度の目標値を200,000cpm、4時間の暴露時間で、濃度制御が良好であった4回の結果を表1に示した。平均質量濃度（±標

準偏差）は $275.3 \pm 28.5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ であった。

一方、粒度分布は実験毎に異なった分布であった（図5）。

C-6. 暴露チャンバー内のMWCNTの状態観察

MOUDIの各分級ステージの観察結果を図6及び図7に示した。分級ステージNo.4、No.5、No.6及びNo.7には肉眼観察でもMWCNTが回収されている様子が確認された。SEM観察において、分級ステージNo.1では多角形の粒子が確認されるのみで、線維状のMWCNTは観察されなかった。No.2～No.7には線維状のMWCNTが多く観察された。No.8では線維状のMWCNTが観察されたが数は少なかった。No.9～No.13では線維状のMWCNTの存在を明確に確認できなかった。加速電圧を上げることで、不明瞭ながら像が検出されたため、このステージに捕集されるMWCNTはアルミニウム表面のシリコンオイル層に埋没しているものと考えられた。

MWCNTの分散状態を確認する目的で、暴露チャンバー内のエアロゾルをメンブレンフィルターに吸着させて回収しSEM観察を行った結果、86%は孤立した繊維として観察された。繊維のサイズは 11.420 ± 17.059 （幾何

平均±標準偏差、n=475) であり、2.5 μm 以下の短い繊維から、200 μm を超える長い繊維まで観察された。凝集している繊維 (凝集塊) は14%であった。凝集塊のは7.5 μm 以下のサイズが 80%以上を占め、最大のサイズは22 μm であった (図8-11)。

C-6. Taquann 法処理検体の暴露実験

Taquann 法処理検体を暴露実験に供した結果を図12に示した。Taquann 法処理検体は32 mg、MWCNT 原末は43 mg をダスト発生チャンバーに投入した。相対濃度の設定値は100,000 cpm、暴露時間は2時間とした。MWCNT 原末では相対濃度100,000 cpm に達した後、暴露開始30分以降徐々に濃度が低下した。検体量が十分で無かったことが原因と考えられる。相対濃度の平均値は77,176 cpm、最大値は100,990 cpm、質量濃度は1143 μg/m³であった。一方、Taquann 処理MWCNT では、相対濃度の平均値は10,498 cpm、最大値は18,600 cpm、質量濃度は407 μg/m³であった。相対濃度から質量濃度へ変換する際に用いる質量濃度変換係数 (K 値) は、MWCNT 原末では41.9 pg/m³/cpm、Taquann 処理MWCNT では109.6 pg/m³/cpm となり3倍近い開きがあった (表2)。

D. 考察及び結論

検体としてMWCNT 原末を使用し、安定した暴露状態が得られる制御パラメータ (送風量・圧、音響音圧・周波数) の最適化が成し遂げられ、吸入暴露条件を確立することができた。この条件下で実際にマウスに全身暴露吸入を実施し、本研究課題の他の分担研究である「DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現変動解析」(研究分担者: 高木室長、国立医薬品食品衛生研究所 毒性部)、「ナノマテリアル吸入暴露による体内動態に関する研究」(研究分担者: 高橋主任研究官、国立医薬品食品衛生研究所 毒性部) の試料に供した。また、分散性の高いMWCNT が得られるTaquann 法を開発した。この検体は、「ナノマテリアル吸入暴露による肺の病理組織学的評価 (慢性及び腫瘍性病変)」(研究代表者/研究分担者: 今井田 教授 香川大学医学部医学科腫瘍病理学)、「強制経気道投与方法を用いた粒子状物質の呼吸器への生体影響に関する研究」(分担研究者: 相磯部長、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) にも使用された。

NIOSH で開発されたダスト発生装置と、それを基に開発した柴田科学製のダスト発生