

装置は、スピーカー特性、パワーアンプ、ダスト発生カラムのサイズ、エンクロージャーの材質、制御プログラム、暴露チャンバー内のエアロゾル濃度測定装置が異なる。そのため、NIOSH から報告されている条件とは異なる制御パラメータとなった。NIOSH で検討された濃度は  $10 \text{ mg/m}^3$  のオーダーであり、今回の分担研究で検討した  $0.3 \text{ mg/m}^3$  とは異なることも要因の一つと考えられる。低濃度での検討となった理由は、パーティクルカウンターの測定限界 ( $300,000 \text{ cpm}$ ) に制限を受けたためである。

ダスト発生装置からの送風量は、スピーカーの制御電圧と共に、濃度制御に大きな影響があった。NIOSH で最適化された条件は  $6 \text{ L/min}$  であるが、本分担研究では  $2 \text{ L/min}$  が最適な条件であった。ダスト発生カラムへはカラムの下端から清浄空気が流入し、カラム上段からエアロゾルが流れ出して暴露チャンバーへ導かれる。暴露チャンバー内の濃度が目標値に達すると、スピーカー駆動電圧は低下してエアロゾルの生成は減少するが、 $2 \text{ L/min}$  以上の送風量ではその後も濃度の上昇が継続し、結果としてハンチングを引き起こした。 $2 \text{ L/min}$  以下の流量では、暴露開始から目標値濃度に達するまで時間を要し、また、

暴露チャンバー内の濃度が目標値を下回った場合の反応性が鈍かった。

音響周波数の検討においては、基底周波数を  $20 \text{ Hz}$ 、可変範囲を  $10 \text{ Hz}$  とし、 $20 \sim 30 \text{ Hz}$  の周波数を  $10$  秒間で変動させることで最適な制御が可能となった。 $40 \text{ Hz}$  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、速やかに暴露チャンバー内の相対濃度が上昇する。しかしながら、目標濃度に達しスピーカー駆動電圧がゼロになっても濃度上昇が継続し、パーティクルカウンターの測定上限に近い値にまで達した。ダスト発生カラムに高濃度のエアロゾルがストックされるためにこの現象が生じるものと考えられる。

$2 \text{ L/min}$  の送風量、 $20 \sim 30 \text{ Hz}$  の音響周波数の条件は装置の可変範囲の中では比較的レベルの設定である。このことは、本装置がより高濃度の条件の稼動が可能であることを示しており、実際、NIOSH では  $12 \text{ mg/m}^3$  の濃度で制御できることを報告している。本システムにおいても、パーティクルカウンターの前段に希釈装置を設置することで、より高濃度で稼動させることが可能となる。次年度は、低用量と高用量の暴露を予定しており、低用量は  $0.3 \text{ mg/m}^3$ 、高用量は  $3 \text{ mg/m}^3$  を目

標値として稼働させる予定である。

PID 制御パラメータの検討では、設定の取り掛かりとなる初期値をオートチューニングで設定した。本装置に組み込まれているオートチューニングは、操作量を強制的に上限値と下限値に反復して変化させて測定値を観測し、制御対象の特性を推測するリミットサイクル法を使用している。既述したように、濃度制御には送風量と音響周波数も大きな影響を与えるため、これらのパラメータの検討に平行して、オートチューニングで得られた設定値を変化させて最適化した。

送風量、音響周波数、PID パラメータが最適化された際の相対濃度推移、スピーカー駆動電圧推移、質量濃度及び MOUDI で得られた粒度分布を図 4 及び図 5 に示した。最適化された条件では、駆動電圧がゼロにはならず、常にダイアフラムが振動している状態であった。K 値は 3~4  $\text{pg}/\text{m}^3/\text{cpm}$  に収束した。

一方、粒度分布については、実験毎に異なったプロファイルを示している。この原因については、1) 測定誤差、2) 分級ステージからの再飛散、3) ダスト発生カラム内での粒度分布の変化、が想定される。

粒度分布を得るためのデータは、MOUDI から回収した分級ステージのアルミホイルを

$\mu\text{g}$  単位で測定して得る。このレベルでの測定は気圧、温度、湿度の影響を受けるため、実験室の空調の状態によっては影響を受けている可能性は否定できないが、検証はできていない。

再飛散は、アルミホイルで捕捉できる量を超過した場合に発生する。本研究で使用している装置では 1  $\text{mg}/\text{プレート}$  が上限とされている (MOUDI の販売元からの情報)。本研究では、最大でも 300  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  であり、上限を超えていないため、再飛散の可能性は低いと考えられる。アルミホイルの上面に塗布するシリコンオイル層の厚さが影響している可能性については検証ができていない。

ダスト発生カラム内で発生したエアロゾルのうち、小さなサイズの粒子は滞留時間が長く、大きな粒子は比較的速やかにダイアフラム上に沈降すると考えられる。最適化された暴露条件では、スピーカーの駆動電圧はゼロにならず、常にダイアフラムは振動状態にある。しかしながら、駆動電圧の推移は全く同じではない。ダスト発生カラムは、下端から清浄空気が流入し、カラム上段からエアロゾルが流れ出して暴露チャンバーへ導かれる構造となっている。ダスト発生カラムは直径 330 mm、高さ 460 mm、気積 39.3 L であり、

ダイヤフラムの振動状態に依存して、上層から下層に至る粒度分布が異なっている可能性が考えられる。濃度制御が良好であった4回実験の電圧推移について幾何平均値を求めたところ、 $0.794 \pm 0.364V$ 、 $0.857 \pm 0.216V$ 、 $0.876 \pm 0.359V$  及び  $0.719 \pm 0.366V$  であり差は認められなかった。NIOSHからは、100Wの高エネルギーと25Wの低エネルギーでスピーカーを駆動させた場合の粒度分布について比較した結果が報告されており、差が無いことが報告されている。また、ダスト発生カラム内のMWCNTは一回の実験で全てが消費されずに、残存するものがある。一度使用した検体と新しい検体では、発生するエアロゾルの粒度分布が変化する可能性が考えられる。この差異について、本研究では検討を行わなかったが、NIOSHからは、新しい検体と一度使用した検体間では粒度分布に変化が無いと報告されている。以上のことから、現段階では、実験毎に異なる粒度分布の原因について特定できていない。エアロゾルの粒度分布が異なる場合、マウスの肺に吸引されるMWCNTのプロファイルが変わるため、この件については最優先の課題として今後検討を進める。

本分担研究では、検体の分散性を高める処

理方法として Taquann 法を開発した。実際にダスト発生装置でエアロゾルとしてパーティクルカウンターで測定すると、MWCNT 原末に比較して相対濃度が有意に低い値を示した。質量濃度は得られているため、エアロゾルとして暴露チャンバー内に存在していたことは明らかである。質量濃度を相対濃度で除した質量濃度変換係数 (K 値) は、MWCNT 原末では  $41.9 \text{ pg/m}^3/\text{cpm}$ 、Taquann 処理MWCNTでは  $109.6 \text{ pg/m}^3/\text{cpm}$  と大きく異なる。本分担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が  $0.3 \mu\text{m}$  である。Taquann 法処理検体をSEMで観察するとほとんどが単繊維として観察され、凝集しているものは僅かであった(図13)。すなわち、Taquann 法処理検体は、気相において最小検出径以下の粒子の状態で分散しており、K 値が Taquann 法処理MWCNT でMWCNT 原末よりも大きい値を示したのは、パーティクルカウンターで測定できない粒子が存在していたためと考えられる。

マウスの気道径は細く、凝集体が多い検体では気道の起始部に沈着し、肺にまで到達するものは少ないことが想定される。ヒトへの外挿性が高いデータをマウスから得るためには、分散性の高い検体を使用することが必

須である。Taquann 法処理 MWCNT はこれを満たすものであり、本研究課題においては Taquann 法処理検体で今後の事業を進める計画である。当初、Taquann 法の一回の処理で得られる検体量は 1 mg 程度であり、そのため吸入暴露実験に必要な量を得るために時間を要していた。現在は、一回の処理で得られる検体量を 10 倍まで高める工夫を行うとともに、処理装置の数を増やし量産体制を整えている。

また、パーティクルカウンターから得られる相対濃度は、暴露チャンバー内の濃度制御に使用するパラメータであるため、Taquann 法処理検体を使用するにはより微細な粒子を測定できる装置が必要となる。そのため、凝縮型パーティクルカウンター (Model3776、B. TSI) を導入し 2.5nm のサイズまで測定可能な体制とした。

以上、本分担研究では先行研究の成果により国立医薬品食品衛生研究所 環境保全型動物飼育棟内に設置した全身暴露吸入装置について、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の最適化に取り組み、吸入暴露条件を確立し、マウスに暴露を行った。更に、MWCNT 原末の分散性を

高める Taquann 法を開発した。本年度確立したこの二つの技術は、MWCNT の全身暴露吸入による生体影響を調べる上では極めて有効な手段であることが示された。

#### 【引用文献】

1) Walter McKinney, Bean Chen, and Dave Frazer, Computer controlled multi-walled carbon nanotube, Inhalation Toxicology, 2009, 1-9

#### B. 健康危機情報

なし

#### C. 研究発表

1) Jun Kanno, Atsuya Takagi, Tetsuji Nishimura, Akihiko Hirose, Nanomaterial Toxicology - Importance of Chronic Toxicity Assessment, Attendance at 5th International Conference on Nanotechnology - Occupational and Environmental Health, (2011.8.10)

(Boston, USA), Oral

- 2) 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年(平成24年)7月17日(火) - 19日(木)  
<口演、発表要旨登録済み>

- 3) Yuhji Taquahashil, Yukio Ogawa 1, Atsuya Takagil, Shigetoshi Aiso2, 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, Sendai International Center, Sendai, Japan  
<ポスター、発表要旨登録済み>

#### D. 知的財産の出願・登録情報

##### 1. 特許申請準備中

- (1) ディスポーザブルチャンバーについて、柴田科学株式会社と特許出願準備中であ

る。

##### 【発明の名称】

化学物質の全身暴露吸入実験装置

##### 【発明者】

国立医薬品食品衛生研究所毒性部  
菅野 純、小川 幸男、高橋 祐次  
柴田科学株式会社  
生田 達也、鶴田 祐吾

- (2) Taquann 法について、特許出願準備中である。

##### 【発明の名称】

液相ろ過臨界乾燥により気相分散性に優れたカーボンナノチューブ (CNT) 等のナノマテリアル粒子を得る方法

##### 【発明者】

国立医薬品食品衛生研究所毒性部  
菅野 純、高橋 祐次

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし



図1 音響式ダスト発生装置

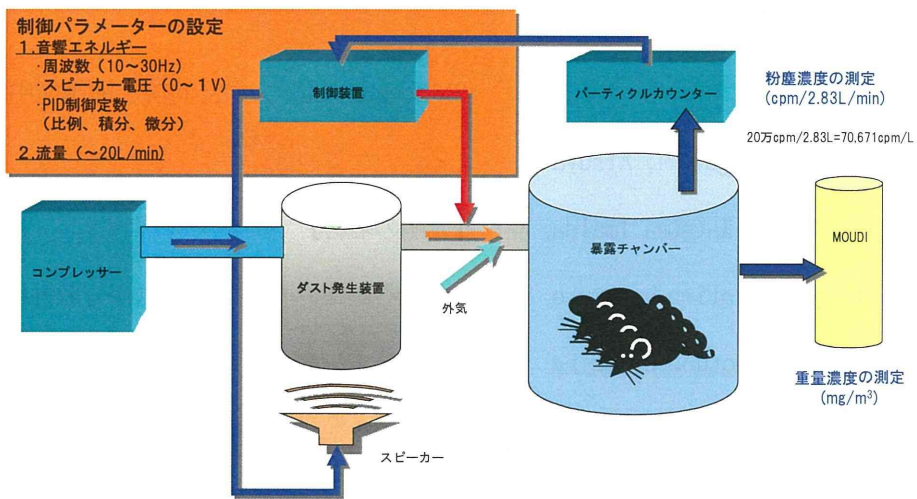


図2 全身暴露吸入装置の概略図

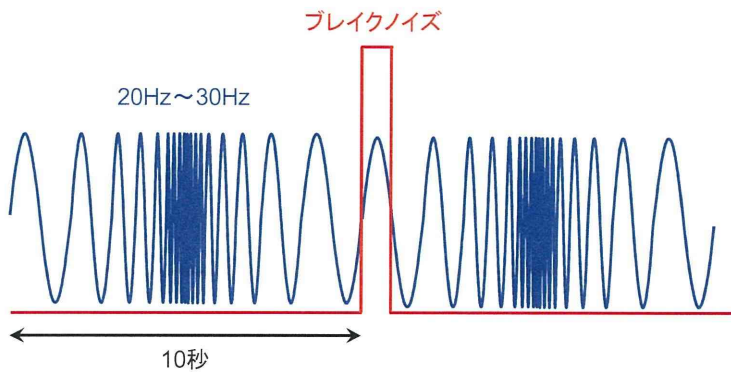


図3 音響式ダスト発生装置から出力される波形のイメージ

基底周波数20Hzとし20Hz~30Hzの周波数域を1周期10秒間で変化させる。1周期終了後に矩形波のブレイクノイズが出力される。

表1 暴露チャンバー内の質量濃度測定結果

目標濃度 200,000 cpm、4時間の暴露を行った質量濃度測定結果。暴露チャンバー内のエアロゾルを10 L/minの流量でMOUDIに分級して回収し、マイクロ天秤で測定した。

		Test1	Test2	Test3	Test4	mean	SD
total mass	$\mu\text{g}$	789	656	659	539	660.8	68.4
mass concentration	$\mu\text{g}/\text{m}^3$	329	273	275	225	275.3	28.5
cpm average	cpm/2.83L	193,372	191,105	186,228	191,403	190,527	2,906
	cpm/ $\text{m}^3$	68,329,000	67,528,000	65,805,000	67,634,000	67,324,000	1,026,743
cpm Max.	cpm/2.83L	206,700	209,060	213,200	213,820	210,695	2,588
	cpm/ $\text{m}^3$	73,039,000	73,873,000	75,336,000	75,555,000	74,450,750	914,463
K value	$\text{pg}/\text{m}^3/\text{cpm}$	4.8	4.0	4.2	3.3	4.1	0.5

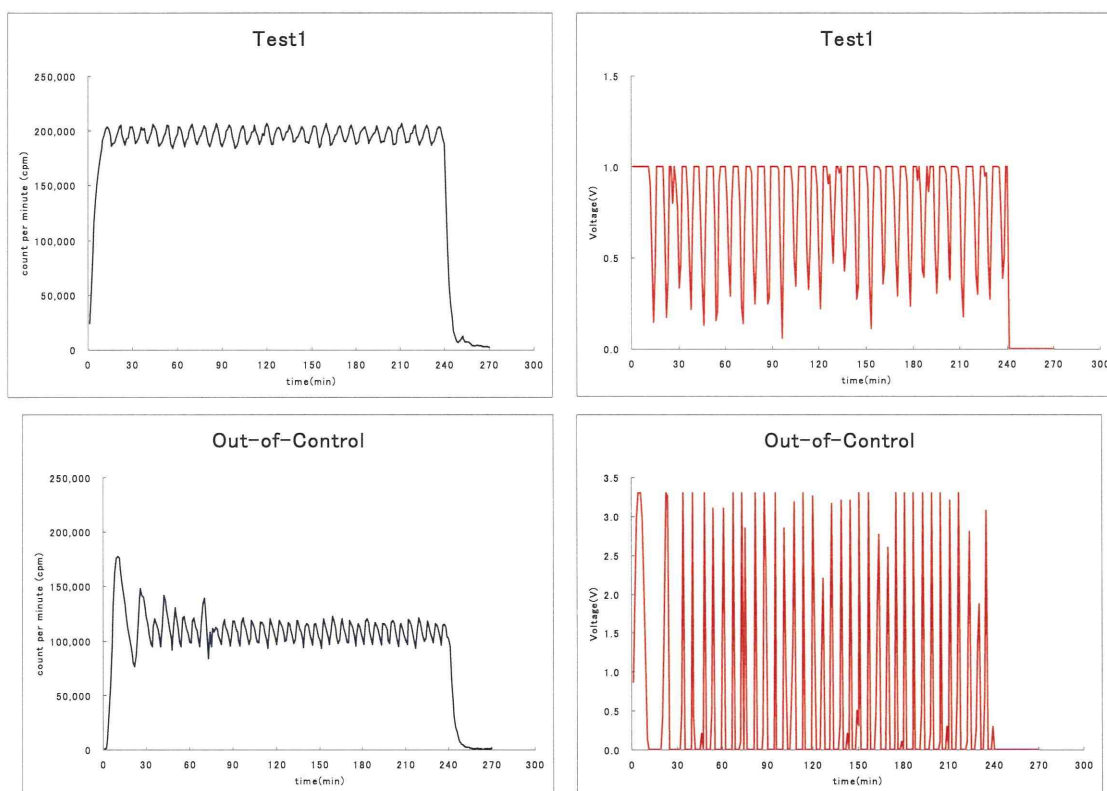


図4 暴露チャンバー内の相対濃度推移とスピーカー駆動電推移

目標濃度 200,000 cpm、4時間の暴露を行った場合の相対濃度推移 (左図) とスピーカー駆動電推移 (右図) の代表例。上段は十分に制御された状態 (Test1)。スピーカー駆動電圧は常に出力されている。下段は制御が出来ていない場合 (Out-of-Control)。スピーカー駆動電圧はオン/オフを繰り返している。

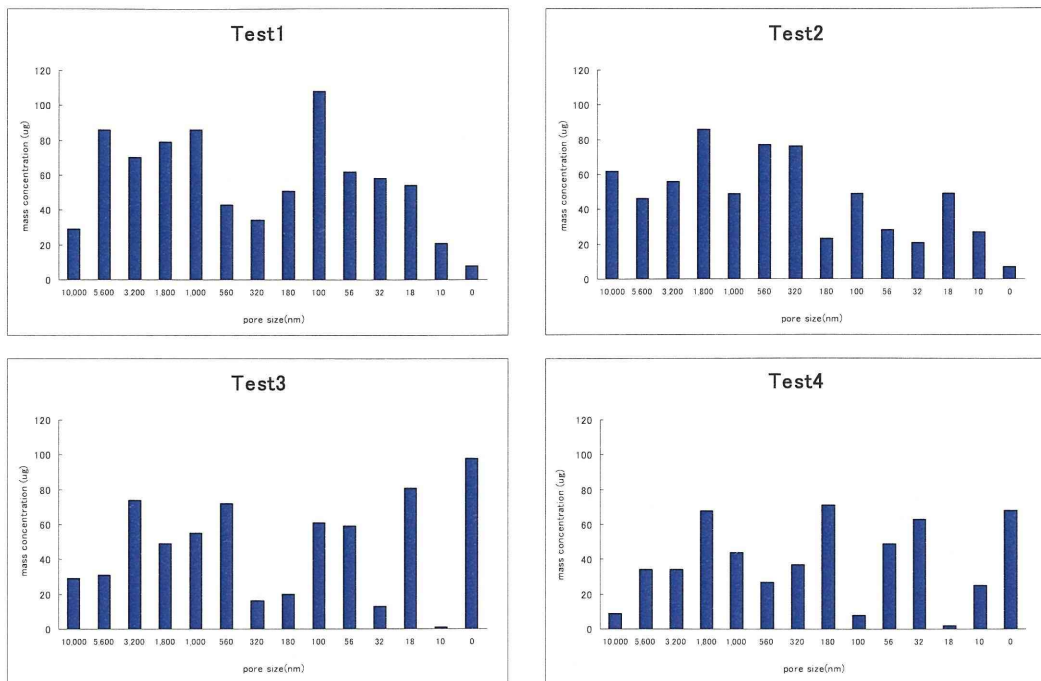


図5 暴露チャンバー内のMWCNTの粒度分布

目標濃度 200,000 cpm、4時間の暴露を行った質量濃度測定結果について、粒度分布を示した。実験毎に異なる分布を示した

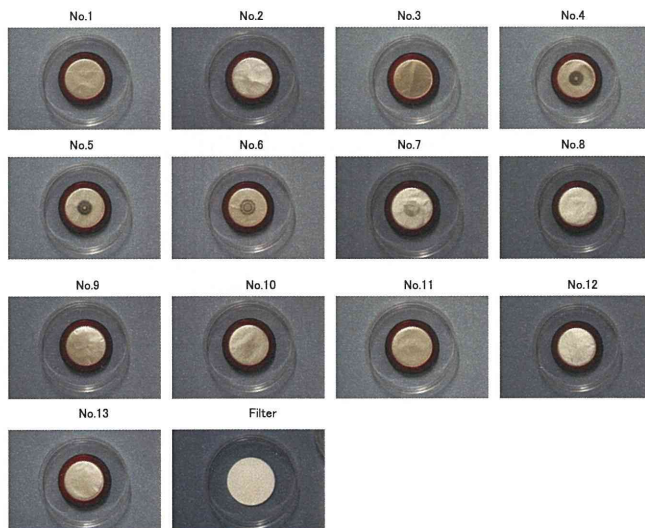


図6 MOUDIの各分級ステージの様子(肉眼)



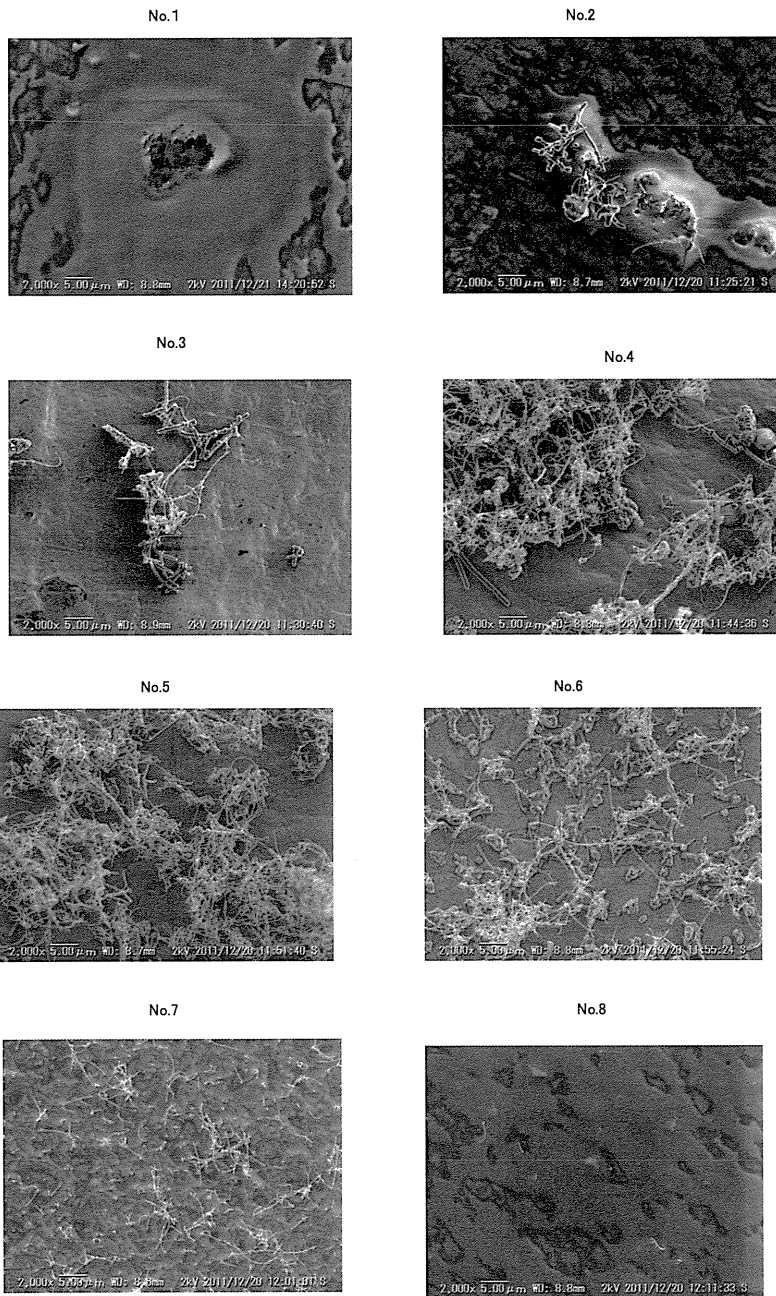


図7 MOUDIの各分級ステージの様子(走査型電子顕微鏡像)

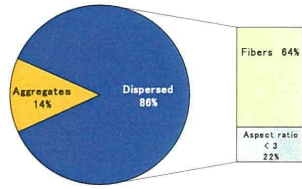
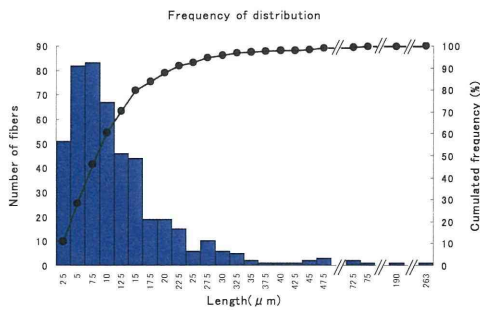


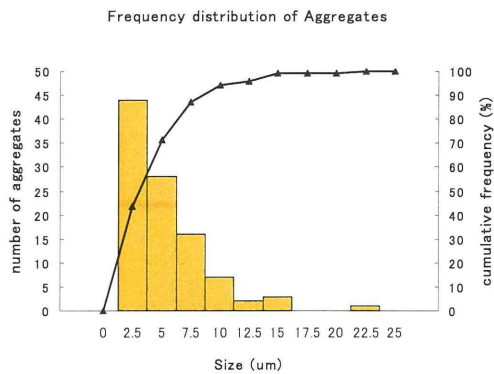
図8 暴露チャンバー内のMWCNTの分散状態

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、走査型電子顕微鏡でその状態を観察した。86%が孤立した繊維として観察された。



階級値(μm)	度数	比率%	累積比率%
2.5	51	10.9	10.9
5	82	17.5	28.4
7.5	83	17.7	46.2
10	67	14.3	60.5
12.5	46	9.8	70.3
15	44	9.4	79.7
17.5	19	4.1	83.8
20	19	4.1	87.8
22.5	15	3.2	91.0
25	6	1.3	92.3
27.5	10	2.1	94.4
30	6	1.3	95.7
32.5	5	1.1	96.8
35	2	0.4	97.2
37.5	1	0.2	97.4
40	1	0.2	97.6
42.5	1	0.2	97.9
45	2	0.4	98.3
47.5	3	0.6	98.9
---	---	---	---
72.5	2	0.4	99.4
75	1	0.2	99.6
---	---	---	---
190	1	0.2	99.8
---	---	---	---
262.5	1	0.2	100
合計	468		

図9 暴露チャンバー内のMWCNTの繊維の長さの分布



階級値(μm)	度数	比率%	累積比率%
2.5	44	43.6	43.6
5.0	28	27.7	71.3
7.5	16	15.8	87.1
10.0	7	6.9	94.1
12.5	2	2.0	96.0
15.0	3	3.0	99.0
17.5	0	0.0	99.0
20.0	0	0.0	99.0
22.5	1	1.0	100
合計	101		

図10 暴露チャンバー内の凝集塊の大きさの分布



図 11 暴露チャンバー内のMWCNT

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、走査型電子顕微鏡でその状態を観察した。

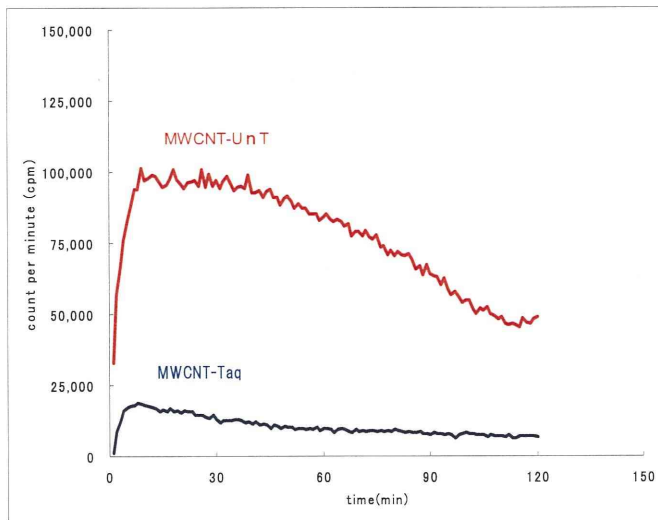


図 12 Taquann 法処理-MWCNT の相対濃度推移

MWCNT-UnT: 原末 MWCNT、MWCNT-Taq : Taquan 法処理-MWCNT。Taquann 法処理 MWCNT は原末 MWCNT の測定に使用している従来型のパーティクルカウンターでは測定が困難となる。

表2 Taquann 法処理-MWCNT の質量濃度と相対濃度

MWCNT-UnT:原末MWCNT、MWCNT-Taq : Taquan 法処理-MWCNT。Taquann 法処理MWCNT は相対濃度が十分に検出できていないため、K値が原末MWCNTに比較して大きな値となっている。

		MWCNT-UnT	MWCNT-Taq
Total mass	$\mu\text{g}$	1,371	488
Mass concentration	$\mu\text{g}/\text{m}^3$	1,143	407
cpm Average	cpm/2.83L	77,176	10,498
	cpm/ $\text{m}^3$	27,271,000	3,710,000
cpm Max.	cpm/2.83L	100,990	18,600
	cpm/ $\text{m}^3$	35,686,000	6,572,000
K value	$\text{pg}/\text{m}^3/\text{cpm}$	41.9	109.6

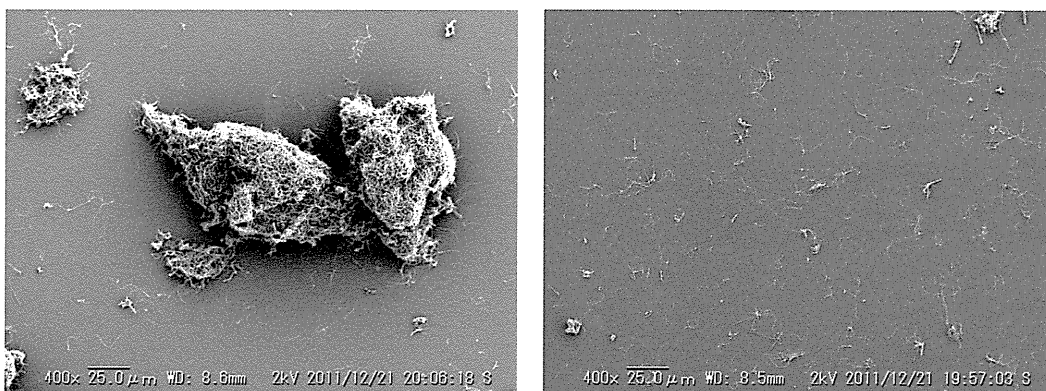


図13 Taquann 法処理-MWCNT と原末MWCNT の比較 (走査型電子顕微鏡像)

原末MWCNT (左) と Taquan 法処理-MWCNT (右)。Taquan 法処理-MWCNT ほとんどが孤立した繊維として観察される

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

「ナノマテリアル吸入暴露による体内動態に関する研究」

研究分担者 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

研究要旨

「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 -」では、肺に焦点を絞り、工業的ナノマテリアルの吸入暴露の人への外挿性の高い有害性情報を獲得する方法を迅速に確立することを目的としている。そのために、人体の暴露様式に即した全身暴露吸入試験装置を用いてナノマテリアルの全身暴露吸入試験を実施し、用量作用関係を含む有害性情報の取得、及びその詳細な病態解析を進めている。本分担研究では、生体影響の用量作用関係を明らかにするための情報として、ナノマテリアル吸入暴露による体内動態に関する研究を行った。具体的には、カーボンナノチューブ (CNT) の一つである多層カーボンナノチューブ (MWCNT) を検体として、マウスの肺から MWCNT を抽出する方法の確立と、実際に全身暴露吸入したマウスの肺に沈着した MWCNT のサイズの測定を行った。水酸化カリウム、SDS 及び EDTA からなる肺溶解液を独自に開発し、走査型電子顕微鏡による観察に適したサンプルが得られた。MWCNT (MWNT-7、三井物産 (現 現保土ヶ谷化学(株)) の原末 (MWCNT-UnT) 及び、高度に分散処理した Taquann 法処理-MWCNT (MWCNT-Taq) を音響式ダスト発生装置によりマウスに全身暴露吸入し、肺に沈着した MWCNT の差異を観察した。MWCNT-Taq 吸入マウス肺には、MWCNT-UnT 吸入マウス肺よりも長い MWCNT が観察された。分散性の高い MWCNT-Taq 検体は、鼻腔など上気道で捕捉されることが少なく、気管支及び肺胞レベルにまで効率よく到達した可能性が考えられる。

## A. 研究目的

「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 -」では、肺に焦点を絞り、工業的ナノマテリアルの吸入暴露の人への外挿性の高い有害性情報を獲得する方法を迅速に確立することを目的としている。そのために、人体の暴露様式に即した全身暴露吸入試験装置を用いてナノマテリアルの全身暴露吸入試験を実施し、用量作用関係を含む有害性情報の取得、及びその詳細な病態解析を進めている。本分担研究では、生体影響の用量作用関係を明らかにするための情報として、ナノマテリアル吸入暴露による体内動態に関する研究を行った。具体的には、カーボンナノチューブ (CNT) の一つである多層カーボンナノチューブ (MWCNT) を、マウスの肺から抽出する方法の確立と、実際に全身暴露吸入したマウスの肺に沈着した MWCNT のサイズの測定を行った。

低分子化合物の体内動態は、mass spectroscopy、あるいは isotope を用いて定量することが一般に行われている。CNT の体内動態の測定にもこれに準じた方法が適用され、isotope と mass spectroscopy を使用する方法<sup>1)</sup>、Raman 分光を使用する方法<sup>2)</sup>、組織を灰化して除去後更に高温で CNT を酸化して二酸化炭素として定量する方法<sup>3)</sup>が報告されている。これらの測定方法は検量線を基に質量に換算されるため、定量性を有しており CNT の体内動態の概要を把握するには優れた方法である。

しかしながら、CNT の生体影響を評価するための情報として不十分な点がある。即ち、CNT のような線維状で安定性が高い物質では、体内に蓄積された「本数」と「サイズ」が生体影響に対して重要な意味を持つ。経口投与、静脈内投与あるいは気管内投与では投与した検体全量が一旦、体内にとどまるため、組織負荷量を質量で表現することが可能である。しかし、CNT が不均一なサイズの粒子から構成されることを考慮すると、吸入を介した各組織への分布、クリアランスまでを含めて考察する場合には、数とサイズの把握が必須である。吸入暴露においては、体内に負荷された絶対量を規定するのは困難である。粒子状物質の吸入において粒径分布はエアロゾルの特性を示す重要なパラメーターであると同時に、呼吸器系の部位別の沈着率をある程度決定する。細気管支から肺胞まで到達する幾何学的な粒子径は  $0.5 \mu\text{m}$  以下が主体であるが、CNT のように長さは数ミクロンであるが、アスペクト比が大きい線維状物質では、空気動力学径 (Aero Dynamic Diameter) を考慮する必要がある。

本分担研究では、組織に沈着する MWCNT を直接的に把握する方法として、組織を溶解して MWCNT を回収し、走査型顕微鏡による観察を試みた。

## B. 研究方法

本分担研究において、最も検討に時間を要したのは肺を溶解して MWCNT を抽出する過程で

あった。種々の方法を試みた結果、水酸化カリウムを主体とした溶解液を使用し、メンブレンフィルターでろ過して、フィルター上の粒子を走査型電子顕微鏡（SEM）により観察する方法を選択した。

#### 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 $\mu\text{m}$ 直径；60 nm
製品粒径	30-100 $\mu\text{m}$ (SEM)
密度	0.005-0.01 $\text{g}/\text{m}^3$ (沈降高密度法)
比表面積	25-30 $\text{m}^2/\text{g}$ (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)

全身暴露吸入には、MWCNTの原末（MWCNT-Unt）及びTaquann法により高度に分散処理したMWCNT（MWCNT-Taq）を使用した。

#### B-2. 使用動物

動物は雄性マウス（C57BL/6NCrSlc、SPF、SLC、19週齢、体重 29.3-35.0 g）を使用した。音響式ダスト発生装置を使用し、MWCNT-Unt及びMWCNT-Taqを2時間の単回全身暴露吸入を行った。暴露濃度はそれぞれ、

1142.5  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 及び、406.7  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ であった。この動物から肺（気管を含む）を採取し実験に供した。

#### 【倫理面への配慮】

動物の取扱いについては、動物の愛護及び管理に関する法律（昭和48年法律第105号、平成17年法律第68号一部改正）、実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準（平成18年環境省告示第88号）、厚生労働省の所轄する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針（平成18年6月1日付厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知）、動物実験の適正な実施に向けたガイドライン（平成19年6月1日日本学術会議）、及び国立医薬品食品衛生研究所では国立医薬品食品衛生研究所動物実験委員会が定める国立医薬品食品衛生研究所・動物実験の適正な実施に関する規程（平成19年4月1日）を遵守した。肺サンプルの採取においては、マウスをエーテル麻酔下で放血致死させて行った。

#### B-3. 肺溶解液の調製

肺溶解液として5w/v% 水酸化カリウム（和光純薬工業株式会社、試薬特級）、0.5 w/v% EDTA・2Na（同仁化学研究所、試験研究用）、0.1w/v% SDS（和光純薬工業株式会社、試薬特級）をMilliQ水に溶解して調製した。

#### B-4. SEM観察用MWCNT分散液の調製

肺から抽出したMWCNTは、0.1w/v% TritonX（ICN）、1w/v% EDTA・2Naを0.01Mリン酸緩衝

液に溶解したSEM観察用MWCNT分散液を添加し、ピペッティングにより再懸濁させた。

#### B-5. 肺からのMWCNTの抽出

肺溶解液に含まれるSDSは、室温、強アルカリ条件では溶解しないため、60°Cに設定したインキュベーター内で肺溶解液を加熱して透明な液体とした。肺サンプル（約200 mg）をガラスバイアル（10 mL固定用ガラスビン、日新EM）に入れ、加熱した肺溶解液を5 mL添加した。

このガラスバイアルをホットプレート上に置き、肺溶解液が沸騰しない状態で約30分加熱した。肺サンプルが溶解したならば、50°C以下に冷却し、ガラスバイアルにキャップをして50°Cに設定したインキュベーター内で24時間放置した。目視観察により肺溶解液が澄明であることを確認後、再びホットプレートで加熱し、液量を約3 mLに減じた。1.5 mLのエッペンドルフチューブ2本に肺溶解液を分注し、高速微量冷却遠心機（MX-205、TOMY）で25°C、20,000×g、60分の条件で遠心分離を行い、沈渣を回収した。沈渣にはMWCNTとSDSの結晶が含まれるため、1.5 mLの70%エタノール（和光純薬工業）を添加し、ボルテックスを用いて溶解し、再び20,000×g、25°C、60分の条件で遠心分離しMWCNTのみを回収した。上清を取り除いた後、エッペンドルフチューブをブロックヒーターで80°Cの条件で加熱しエタノールを除去した。SEM観察用MWCNT分散液1 mLを添加し、40°Cに設定した

インキュベーター内で24時間放置して沈渣を再分散した。

#### B-6. SEM観察試料の作製と観察

ガラス繊維性フィルター（GF/F、φ21 mm、Whatman）の中心を11 mmのポンチで打ち抜いて作製したドーナツ状のフィルターをロート型ガラス濾過器（51G-1、三商）に載せ、その中心上にメンブレンフィルター（孔径0.025 μm VSWP、ミリポア、φ12 mm）を設置し、ピペッティングにより十分に分散させたMWCNT分散液50 μLをメンブレンフィルター上に滴下し吸引濾過した。50 μLのMilliQ水を滴下してMWCNTを洗浄した後、メンブレンフィルターを室温で乾燥し、真鍮製SEM観察台（S-GA、φ15×5 mm、日新EM）にカーボンシール（φ12 mm、日新EM）で固定した。オスミウムコーター（HPC-1 SW型、真空デバイス）により2秒間オスミウムコートを行いSEM（VE-9800、KEYENCE）で2000倍、加速電圧2kVの条件で観察した。MWCNTの計測には、ImageJ（<http://rsbweb.nih.gov/ij/>）を使用し、MWCNTの繊維長と直径を、計測可能な繊維約400本について計測した。直径は一本の繊維から3箇所を測定し、その平均値を代表値とした。

### C. 研究結果

MWCNTの抽出過程の概要を図1に示した。水酸化カリウム、SDS及びEDTAを添加した肺溶解液を使用することで肺を完全に溶解するこ



とが可能となった(図2)。また、TritonX 及び EDTA を添加した SEM 観察用分散液に MWCNT を再分散しメンブレンフィルターでろ過することにより、生体由来の残渣が少なく、MWCNT の分散性が良好な SEM 観察試料を得ることができた(図3)。

吸入暴露した MWCNT の測定結果を表1及び図4に示した。MWCNT-Unt では、415本のMWCNTを観察し、平均繊維長  $3.477 \pm 3.197 \mu\text{m}$  (最小  $0.215 \mu\text{m}$ 、最大  $27.421 \mu\text{m}$ )、平均繊維径は  $241 \pm 153 \text{ nm}$  (最小  $68 \text{ nm}$ 、最大  $1103 \text{ nm}$ ) であった。MWCNT-Taq では420本のMWCNTを測定し、幾何平均繊維長  $4.389 \pm 5.281 \mu\text{m}$  (最小  $0.216 \mu\text{m}$ 、最大  $66.430 \mu\text{m}$ )、平均径は  $313 \pm 181 \text{ nm}$  (最小  $61 \text{ nm}$ 、最大  $1290 \text{ nm}$ ) であった。

#### D. 考察及び結論

本分担研究では、全身暴露吸入による MWCNT の体内動態、特に組織沈着量(数)とサイズを明らかにすることを目的として、肺から MWCNT を抽出する方法を検討し、SEM 観察を行った。

この方法を開発する上では、1) SEM 観察の障害となる生体由来の残渣を完全に除去すること、2) SEM 観察時のバックグラウンドが均一で個々の試料粒子が際立って観察され、かつ小さなサイズの試料粒子も捕捉できるフィルターを使用すること、が課題であった。

試料粒子を捕捉する上では、ガラス繊維製のフィルターが適している。実際に、吸入暴

露実験において、暴露チャンバー内の重量濃度 ( $\text{mg}/\text{m}^3$ ) を測定のために分級して MWCNT を回収する超精密カスケードインパクト (Micro-Orifice Uniform-Deposit Impactor、Model 125 NanoMOUDI、KANOMAX) では、最も孔径が小さい段 ( $0.01 \mu\text{m}$ ) の後に最終フィルターとしてホウケイ酸ガラス繊維製のフィルター (GF/A、 $\phi 47 \text{ mm}$ 、Whatman) が使用されている。また、酸、アルカリ及び有機溶媒にも耐性があるため、溶解した液を直接ろ過できる利点もある。しかしながら、SEM 観察においては、凹凸が大きくバックグラウンドが均一ではないために適していない。SEM 観察用のメンブレンフィルターとして、ポリカーボネイト性のフィルターが入手可能である (SEmpore、日本電子データム)。耐薬品性に優れバックグラウンドが均一であるが、孔径が  $0.6 \mu\text{m}$  であり、小さなサイズの MWCNT が捕捉されない可能性がある。実際に使用してみたところ、孔に MWCNT が嵌入している様子が観察された。

以上の検討結果から、最終的には酢酸セルロースとニトロセルロースの混合物からなるメンブレンフィルター ( $0.025 \mu\text{m}$  VSWP、 $\phi 12 \text{ mm}$ 、ミリポア) を選択した。このメンブレンフィルターは試料粒子の捕捉には優れるが、酸、アルカリ及び有機溶媒に対して耐性がないため、フィルターに展開する分散液は中性の水溶液を使用することが必要となる。

肺の溶解方法として、酸(塩酸及び硝酸)を使用した方法、酵素消化法(プロティナーゼ K 及びトリプシン)による方法も試みた。

種々の濃度の塩酸を組織に添加し加熱処理したが、茶色く濁った溶解液しか得られなかった（これは後述する水酸化鉄（III）のコロイドと考えられる。）硝酸を添加し加熱することにより、水酸化カリウムと同様の澄明な溶解液が得られたが硝酸の原液（67.5%、13 mol/L）を使用する必要があった。そのため、遠心分離後の工程においても酸としての影響が大きく、耐酸性を持たないメンブレンフィルターが使用できないため、SEM 観察試料を得ることが出来なかった。また、硝酸は酸化作用が強いため、カーボンナノチューブの一部が酸化される懸念もある。酵素消化方法では十分な溶解状態が得られなかった。

水酸化カリウムによる溶解は澄明な溶解液が得られ、肉眼観察レベルでは十分と考えられた。SDS を添加することにより水酸化カリウムの濃度は 5w/v%でも良好な結果が得られた。さらに SDS は室温、強アルカリの条件では溶解しないため、加熱処理によって肺を溶解後に、室温条件で遠心分離を行うと MWCNT の上を覆うように SDS の結晶が堆積し、試料の損失を防ぐことに寄与する。低温では溶解液の流動性が低下するため、本実験では 25°Cで遠心分離することにより良好な結果が得られた。しかしながら、水酸化カリウムと SDS のみの溶解液では、SEM 観察においては、生体由来と考えられる極微量の夾雑物が MWCNT を覆ってしまい観察に障害があった。この夾雑物は鉄化合物と考えられ、肺溶解液及び SEM 観察用 MWCNT 分散液に EDTA を添加することで除去す

ることが可能となった。溶解直後の肺溶解液は淡緑色を呈しているが、次第に黄色に変化する。これは、赤血球のヘモグロビンや CYP など鉄を含むタンパク質由来の鉄イオンがアルカリ条件で淡緑色の水酸化鉄（II）となり、酸化されることで水酸化鉄（III）を生成したものと考えられる。肺溶解液にフェロシアン化カリウムを添加することで濃青色沈澱が得られたことから鉄イオンの存在が示された（図 2）。

全身暴露吸入肺から取り出した MWCNT は、MWCNT-Unt と MWCNT-Taq ではプロファイルが異なった。MWCNT-Taq では、MWCNT-Unt よりも繊維長が長い MWCNT が観察されている。繊維径も比較的太いが、長い MWCNT は径も太い傾向にあるため、それが反映された結果と考えられる。MWCNT-Taq には凝集成分が僅かであり、パーティクルカウンター（最小検出径：0.3  $\mu$ m）で相対濃度（CPM）を測定すると、MWCNT-Unt に比較して相対濃度が有意に低い値を示した。すなわち、MWCNT-Taq は、気相において最小検出径以下の粒子の状態で分散していることが示された。このため、鼻腔など呼吸器の上部で捕捉されるものが少なく、気管、気管支及び肺にまで到達した可能性が考えられる。

観察された MWCNT の繊維径は、MWNT-7 の MSDS に記載されている径（60nm）よりも太いものの割合が高い。この原因について現在検討を行っているが、明らかにできていない。

本年度の研究においては、MWCNT を肺から抽出する方法を開発に注力した。実際に MWCNT

をマウスに全身暴露吸入し、MWCNT を観察することが可能となり、一定の成果が得られた。一方、本方法の MWCNT の回収率を明らかにすることが出来ていないため、定量性という点において課題がある。次年度はバリデーションされた方法として確立することに注力し、MWCNT を単回全身暴露吸入したマウスの経時的な組織沈着量の推移を明らかにする。

#### 【引用文献】

- 1) Sheng-tao Yang, et al., Biodistribution of Pristine Single-Walled Carbon Nanotubes In Vivo, J. Phys. Chem. C, 111 (48), 17761-17764, 2007
- 2) Zhuang Liu, et al., Circulation and long-term fate of functionalized, biocompatible single-walled carbon nanotubes in mice probed by Raman spectroscopy, PNAS, 105 (5) 1410-1415, 2008
- 3) Moritaka Tamra, et al., A determination method of pristine multiwall carbon nanotubes in rat lungs after intratracheal instillation exposure by combustive oxidation-nondispersive infrared analysis, Talanta, 84, 802-808, 2011

#### E. 健康危機情報

なし

#### F. 研究発表

- 1) Jun Kanno, Atsuya Takagi, Tetsuji Nishimura, Akihiko Hirose, Nanomaterial Toxicology - Importance of Chronic Toxicity Assessment, Attendance at 5th International Conference on Nanotechnology - Occupational and Environmental Health, (2011.8.10) (Boston, USA), Oral
- 2) 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年(平成24年)7月17日(火) - 19日(木)  
<口演、発表要旨登録済み>
- 3) Yuhji Taquahashil, Yukio Ogawa 1, Atsuya Takagi1, Shigetoshi Aiso2, 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, Sendai International Center, Sendai, Japan  
<ポスター、発表要旨登録済み>

G. 知的財産の出願・登録情報

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし