

では約 6 倍の肺重量であることから、MWCNT-Taq の投与用量を $60.0 \mu\text{g}/\text{rat}$ とし、1匹当たり 0.12ml を投与した。その他、コントロール群として、被験物質の媒体である Tween80 を 0.1% 添加した滅菌生理食塩水を同様に、1匹当たり 0.12ml を投与した群を設けた (図 8)。気管内投与は投与液 0.12ml の全量を、シリンジ内の投与液の後方に満たした空気 0.18ml で押し込むことによって肺内に注入した。被験物質懸濁液の調製方法としては、Tween80 を 0.1% 添加した滅菌生理食塩水に、MWCNT-Taq を設定濃度となる様に加え、超音波を用いて懸濁した。気管内投与には、B-I ①、②と同様に、DIMS 型経気道ゾンデ (ラット用) (DIMS 医科学研究所) およびラット気管内挿管器具 (バイオリサーチセンター株式会社) の光ファイバー付きラット用喉頭鏡を併用することで確実に行った。倫理面への配慮として、被験物質投与時の麻酔はネブタールの腹腔内投与により、過度の疼痛を与えることなく倫理的観点をふまえ、安全に行うことができた。実験は現在まで順調に継続している。1 年間の飼育期間の後、倫理面に即した麻酔下で解剖を行い、病理組織学的な評価を行う予定である。

C. 研究結果

C-I MWCNT-Taq の単回気管内投与によるマウスを用いた長期毒性試験

① MWCNT-Taq ($10 \mu\text{g}/\text{mouse}$) の単回気管内投与によるマウスを用いた長期毒性試験

実験開始時に、MWCNT-Taq 投与群 20 匹のうち、1 匹が投与時に死亡した。よって、投与群 19 匹、control 群 10 匹で実験を継続しているが、その後は全個体が生存しており、外観上は両群間で、全身状態に明らかな差はない。しかし、実験開始 31 週目から現在に至るまで、control 群と比べて、MWCNT-Taq 投与群が有意に体重増加抑制が見られる。(図 9) この原因については、MWCNT-Taq 投与による何らかの影響が生じていることが推測され、実験終了後、解剖時の肉眼的観察および病理組織学的評価を行い、MWCNT-Taq 気管内投与による長期毒性を検討する予定である。

② 超低濃度 MWCNT-Taq の単回気管内投与によるマウスを用いた長期毒性の用量相関性

実験開始後、現在に至るまで、4 群全てにおいて全ての個体が生存し、いずれの群間においても、全身状態に明らかな差は見られない。体重についても control 群と比べて、いずれの群間においても有意な差は見られない。(図 10) 実験終了後、解剖時の肉眼的観察および病理組織学的評価を行い、MWCNT-Taq の超低用量気管内投与による長期毒性を検討する予定である。

C-II MWCNT-Taq ($60 \mu\text{g}/\text{rat}$) の単回気管内投与によるラットを用いた長期毒性試験

実験開始後 33 週で、control 群 20 匹のうち、1 匹が死亡したが、その他、control 群の 9 匹および投与群 20 匹は全ての個体が生存しており、両群間で、全身状態に明らかな差はない。実験開始から現在に至るまで、両群の体重については有意差は見られていない。

(図 11) 実験終了後、解剖時の肉眼的観察および病理組織学的評価を行い、MWCNT-Taq 気管内投与による長期毒性を検討する予定である。

D. 結論

本分担研究では、初年度である平成 23 年度では、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等を用いて検討した。また、マウスへの気管内投与について予備試験を複数回行い、平成 24 年度に開始した気管内投与による長期毒性試験へと引き継ぐことができた。

マウスへの気管内投与手技については、平成 23 年度では、様々な週齢のマウスを用いて行い、使用する器具についても工夫し、12 週齢の C57BL マウスへの気管内投与を愛護的に、確実にを行うことができるようになった。マウス用ゾンデだけでなく、マウス用気管挿

管器具（光ファイバー付き喉頭鏡）を併用することで、気管や口腔内を損傷せずに、確実な投与を行うことが出来るようになり、超低用量のMWCNT-Taq 投与が可能になった。

現在進行している3つの長期実験のうち、B-I ① MWCNT-Taq (10 μ g/mouse) の単回気管内投与によるマウスを用いた長期毒性試験の途中経過では、実験開始後31週目から、control 群と比べて、MWCNT-Taq 投与群が有意に体重増加抑制が見られる。(図9) この原因については、MWCNT-Taq 投与による何らかの影響が生じていることが推測され、実験終了後の病理組織学的評価を迅速に行って肺での毒性の評価を行いたい。なお、投与後31週目以降に、体重増加抑制が生じてきていることは大変興味深いデータであり、MWCNT-Taq の気管内投与による長期毒性影響を観察する意義を示唆する所見である。また、気管内投与が単回であったにも関わらず、長期での試験においても影響が出ていることは今後の投与回数についても様々な検討を行う必要があると考える。

B-I ② 超低濃度 MWCNT-Taq の単回気管内投与によるマウスを用いた長期毒性の用量相関性試験では、超低用量群のいずれの群間においても有意な体重差は生じていないが、今後、長期にわたり観察し、検討を続けていく予定である。

B-II MWCNT-Taq (60 μ g/rat) の単回気管内投与によるラットを用いた長期毒性試験では、B-I ① MWCNT-Taq (10 μ g/mouse) の単回気管内投与によるマウスを用いた長期毒性試験の経過で見られた、群間での有意な体重増加抑制は見られていない。マウスとラットでの種差や投与量が個体に与える影響等によるものも考えられるが、実験終了後の病理組織学的な評価をふまえて、その関連を検討する予定である。

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

Non-invasive X-ray Micro-computed Tomographic Evaluation of Indomethacin on Urethane-induced Lung Carcinogenesis in Mice. Ueno T, Imaida K, Yoshimoto M, Hayakawa T, Takahashi M, Imai T, Yanaka A, Tsuta K, Komiya M, Wakabayashi K and Mutoh M, Anticancer Research, 2012 in press.

Yokohira M, Nakano Y, Hashimoto N, Yamakawa K, Ninomiya F, Kishi S, Saoo K, Imaida K. Toxicity of nicotine by repeated intratracheal instillation to F344 rats. J. Toxicol. Pathol., 25:257-263, 2012.

Nakada T, Kiyotani K, Iwano S, Uno T, Yokohira M, Yamakawa K, Fujieda M, Saito T, Yamazaki H, Imaida K, Kamataki T. Lung tumorigenesis promoted by anti-apoptotic effects of cotinine, a nicotine metabolite through activation of PI3K/Akt pathway. J. Toxicol. Sci., 37: 555-563, 2012.

Yokohira M, Nakano Y, Yamakawa K, Kishi S, Ninomiya F, Saoo K, Imaida K. Strain differences in pleural mesothelial cell reactions induced by potassium octatitanate fibers (TISMO) infused directly into the thoracic cavity. Exp. Toxicol. Pathol., 2013 in press.

2. 学会発表

Kishi S, Yokohira M, Hashimoto N, Nakano Y, Yamakawa K, Inoue T, Imaida K Toxicity and Mesothelial Cell Reactions Induced by Potassium Octatitanate Fibers (TISMO) Induced into the Left Thoracic Cavity in A/J Female Mice. Society of Toxicology 2012 Annual meeting, San Francisco, USA, 2012.

3. 書籍

横平政直, 今井田克己. 疾患モデルの作製と利用ーがん. 第4章 呼吸器系, 第1項 肺, 373-382, (株)エル・アイ・シー, 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

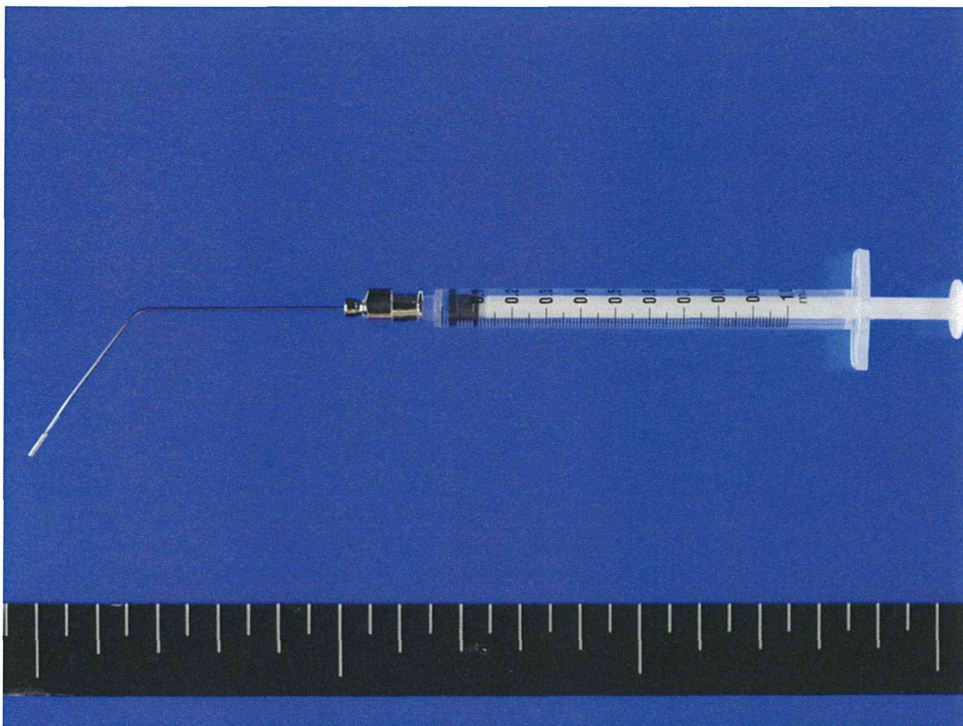


図 1. DIMS 型経気道ゾンデ (マウス用) (DIMS 医科学研究所) および 1cc ツベルクリン用シリンジ (テルモ)

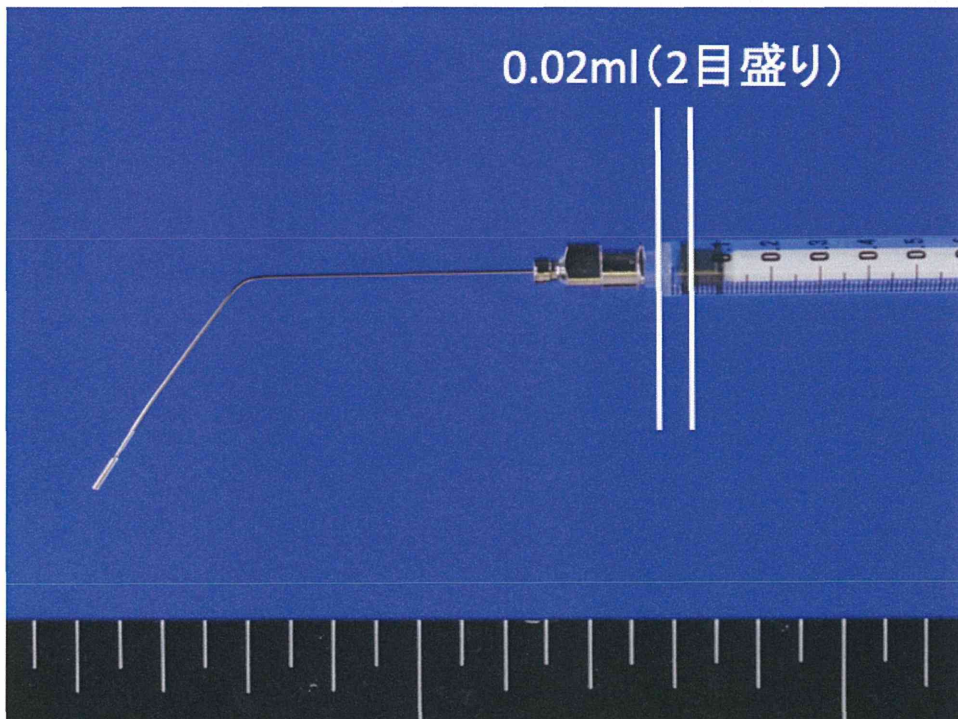


図 2. DIMS 型経気道ゾンデ (マウス用) (DIMS 医科学研究所) および 1cc ツベルクリン用シリンジ (テルモ)

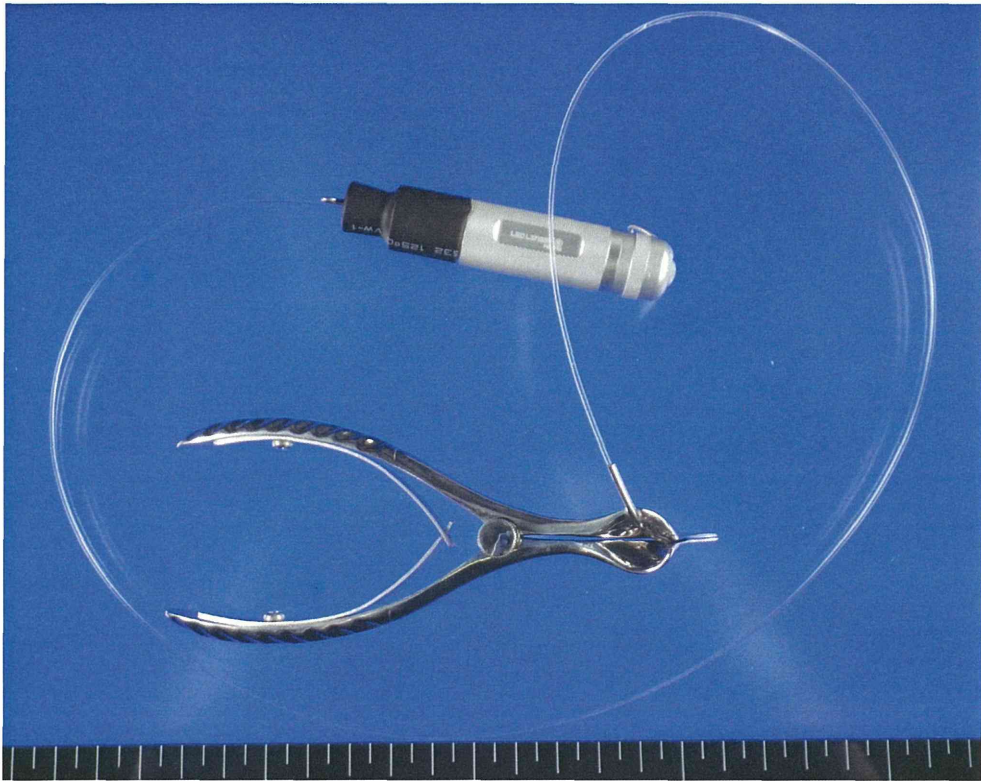


図 3. マウス気管内挿管器具 (バイオリサーチセンター株式会社)
電源、光ファイバー、マウス用喉頭鏡

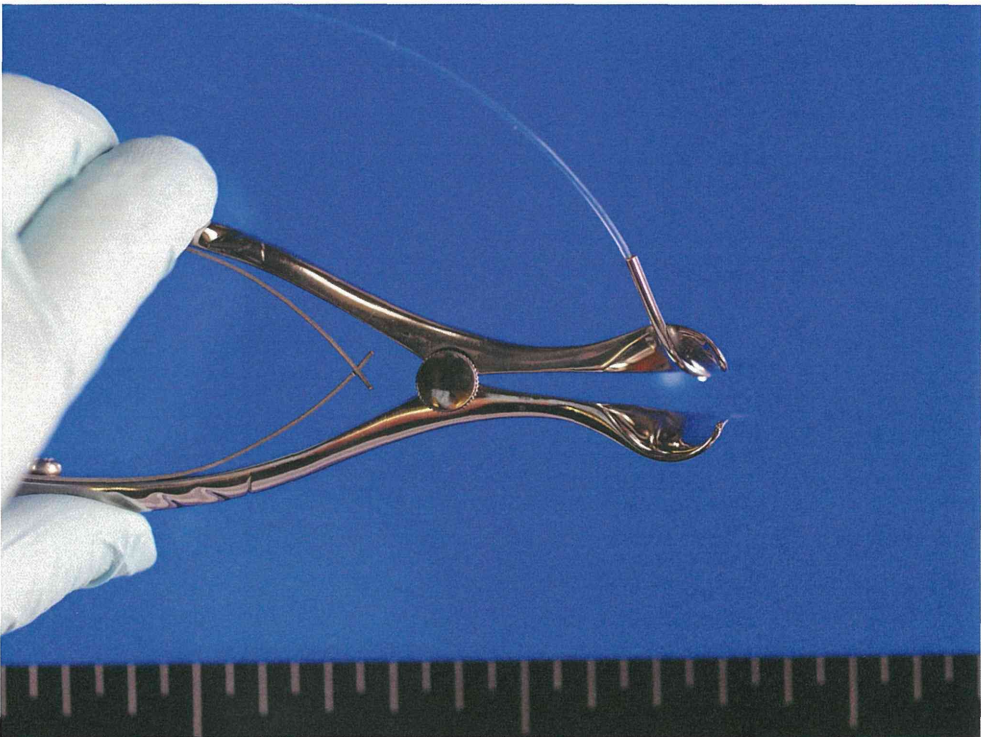


図 4. マウス気管内挿管器具 (バイオリサーチセンター株式会社)
電源点灯時のマウス用喉頭鏡

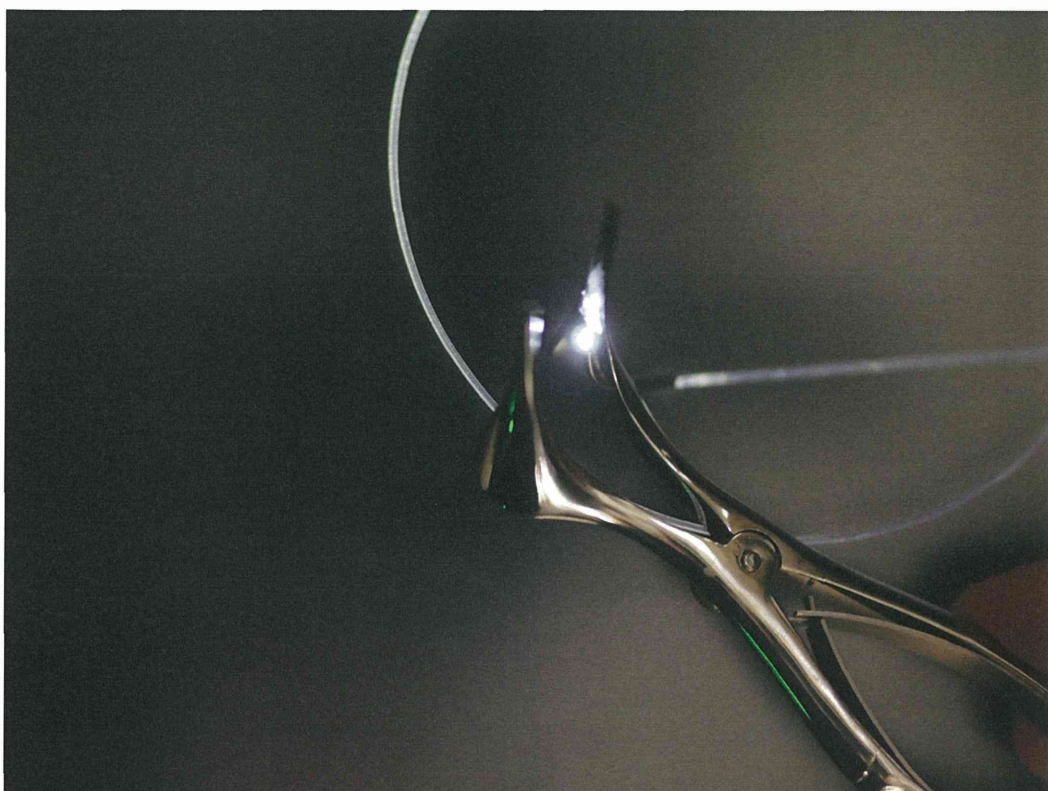
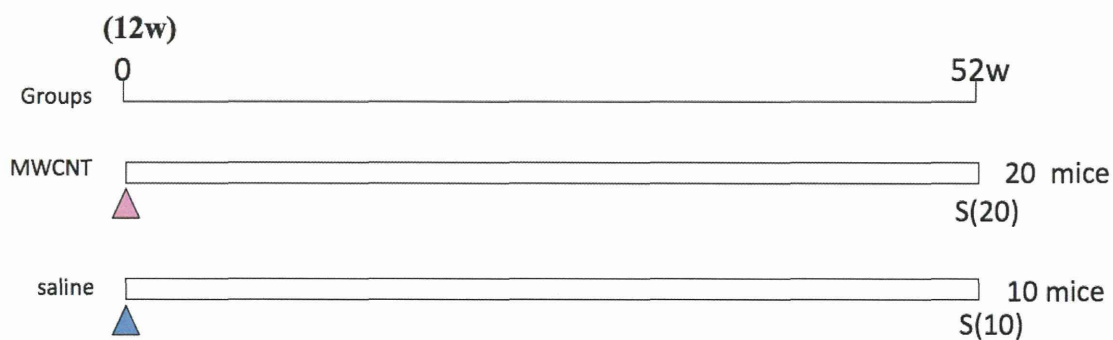


図 5. マウス気管内挿管器具 (バイオリサーチセンター株式会社)
暗所での光源点灯時のマウス用喉頭鏡

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



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

▲ : MWCNT, 10 μ g/mouse, i.t.

▲ : Saline + 0.1% Tween 80

Total 30 mice

図 6. B-I① MWCNT-Taq (10 μ g/mouse) の単回気管内投与によるマウスを用いた長期毒性試験の実験デザイン

Experimental design:

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

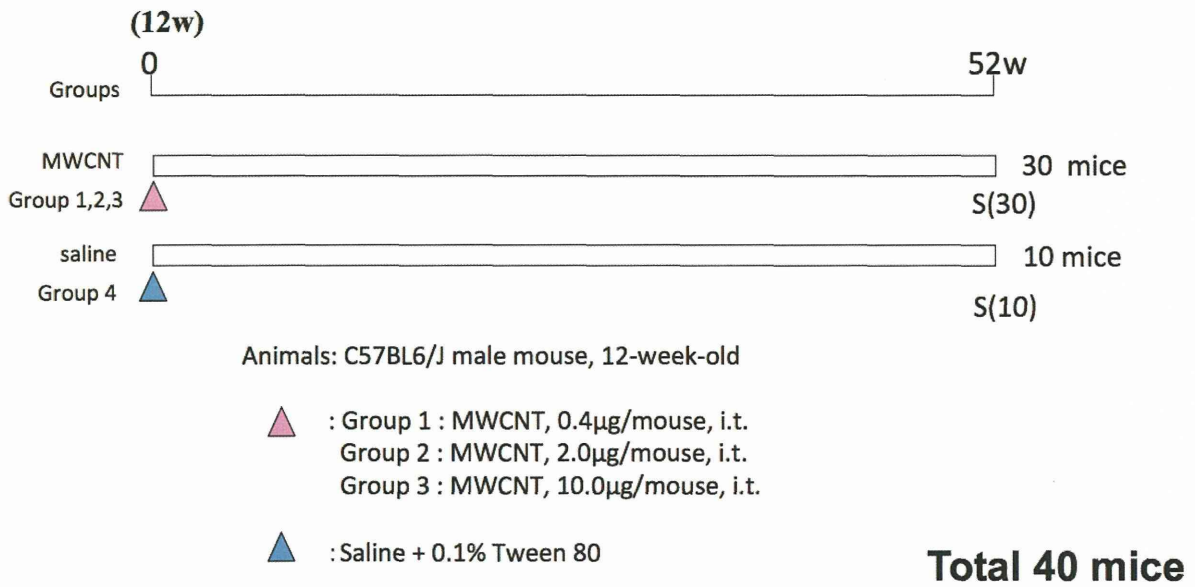


図 7. B- I ② 超低濃度 MWCNT-Taq の単回気管内投与によるマウスを用いた長期毒性試験の実験デザイン

Experimental design:

6週齢の雄性 F344 ラットにおける MWCNT 気管内投与実験

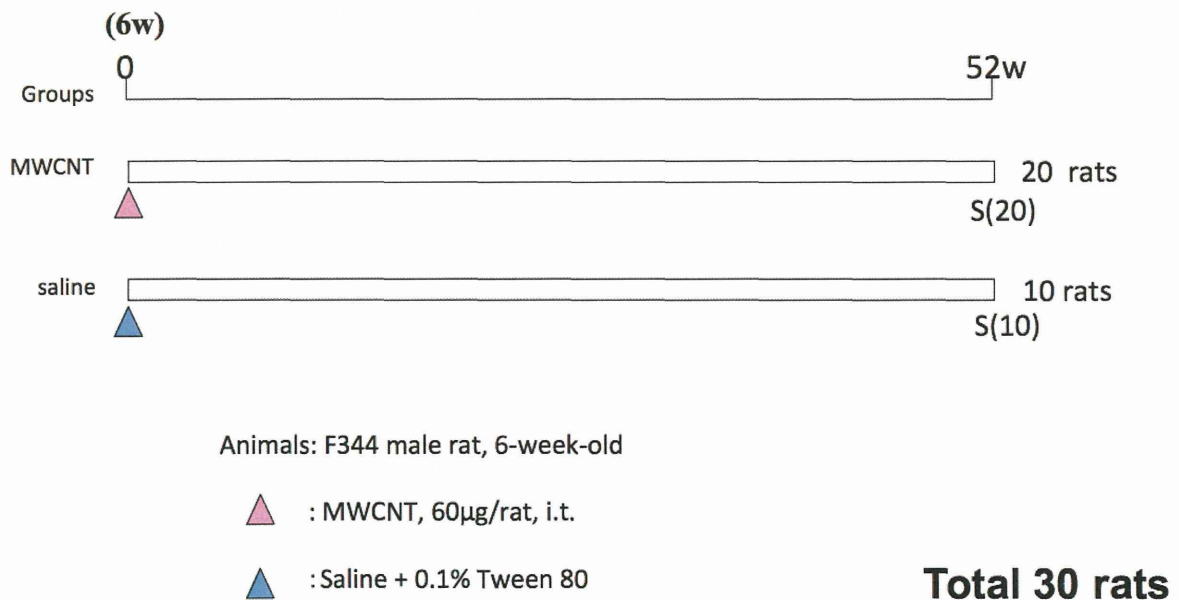


図 8. C-II MWCNT-Taq (60 µg/rat) の単回気管内投与によるラットを用いた長期毒性試験の実験デザイン

MWCNT-Taq(10 μ g/mouse)の単回気管内投与によるマウスを用いた長期毒性試験

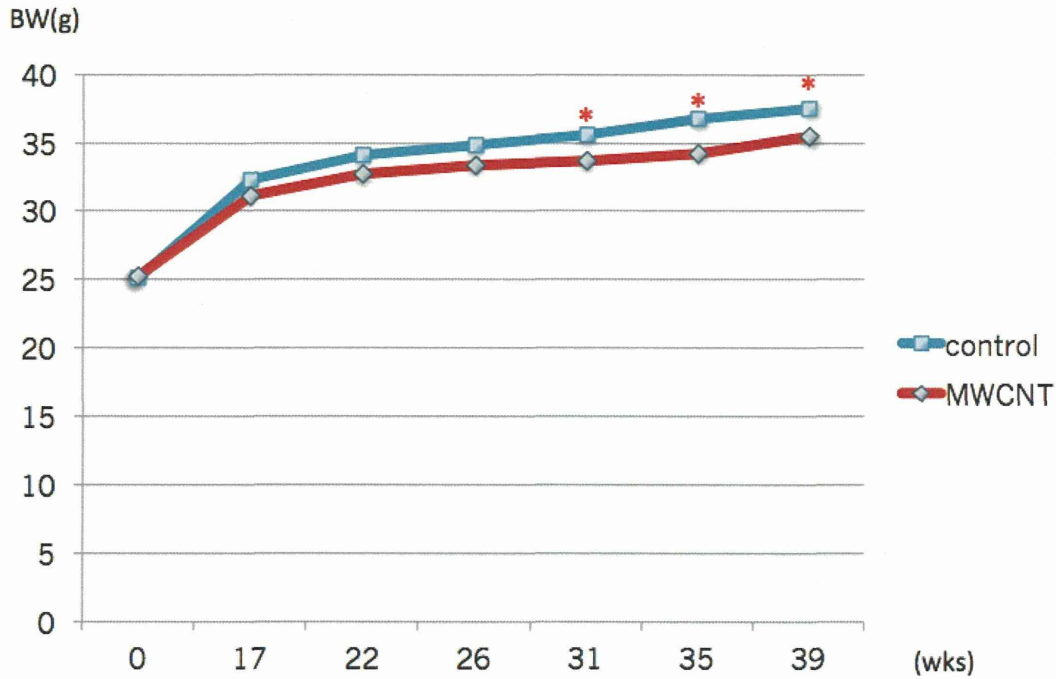


図 9. B- I ① MWCNT-Taq (10 μ g/mouse) の単回気管内投与によるマウスを用いた長期毒性試験の体重曲線

超低濃度MWCNT-Taqの単回気管内投与によるマウスを用いた長期毒性試験

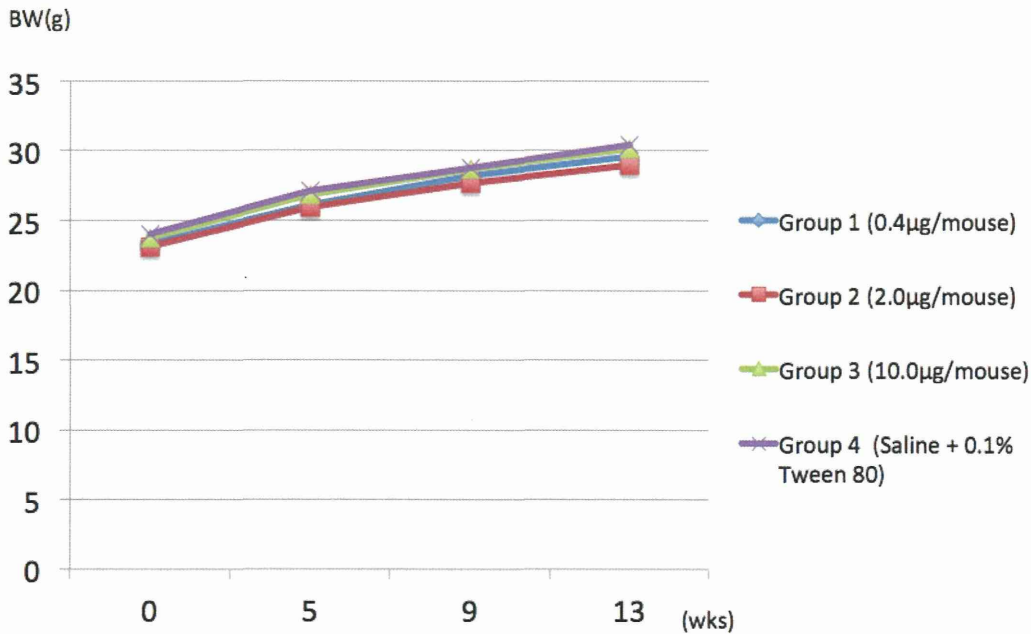


図 10. MWCNT-Taq (60 μ g/rat) の単回気管内投与によるラットを用いた長期毒性試験の体重曲線

MWCNT-Taq (60 μ g/rat) の単回気管内投与によるラットを用いた長期毒性試験

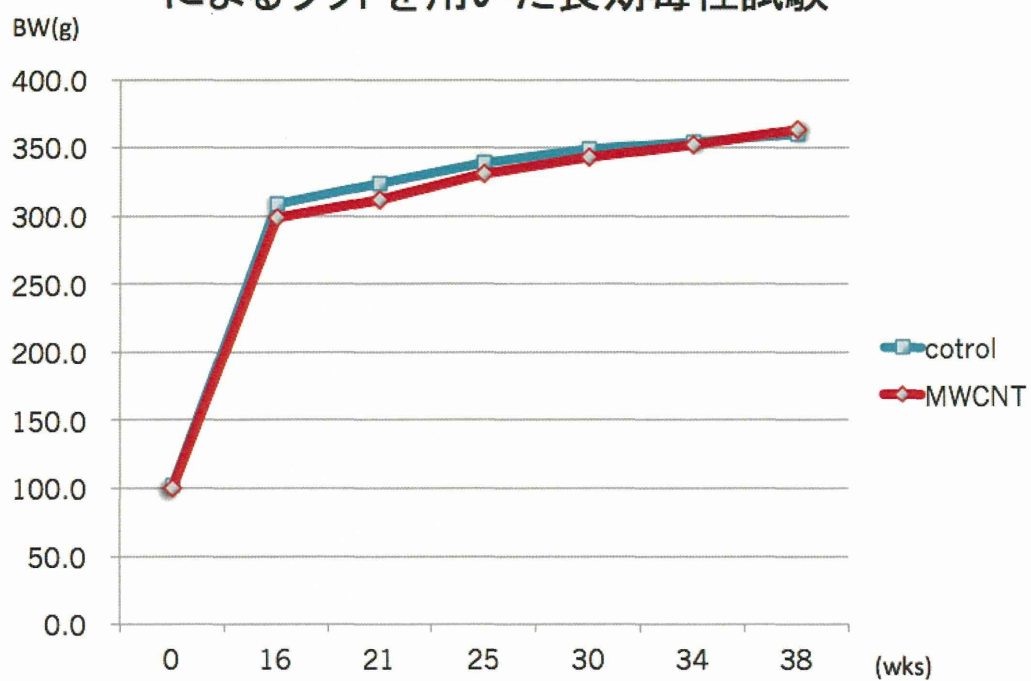


図 11.B-I ② 超低濃度 MWCNT-Taq の単回気管内投与によるマウスを用いた長期毒性試験の体重曲線

平成24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
研究協力者 生田達也 柴田科学株式会社
研究協力者 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を複製許可と共に導入し柴田科学で新たに設計したものである。これに独自に開発した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。H23年度は、三井物産の MWNT-7 の原末 (MWCNT-Bulk) を検体として、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、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。並行して、MWCNT-Bulk から凝集体を除去し、分散性に優れた検体の調製方法 (Taquann 法) が開発されたため、H24年度は、Taquann 法の検体 (MWCNT-Taq) を全身吸入暴露に適用する方法に取り組んだ。音響式ダスト発生装置を用いた検討では、音響エネルギーによる挙動が MWCNT-Bulk とは異なり、ダスト発生量が少なく十分な濃度調節ができなかった。MWCNT-Taq による精度の高い暴露にはダスト発生装置の改造が必要となり、金属製のカートリッジに充填し、圧縮空気を吹き込んでカートリッジ内の検体を気相に分散させる方法を開発し、マウスに全身暴露吸入を行った。暴露チャンバー内のエアロゾルの形態観察により、単離している繊維が多く観察され、良好な分散状態であることが確認された。新たに開発したカートリッジ直噴式ダスト発生装置は、Taquann 法処理検体に適したダスト発生方法であるため、MWCNT のみならずナノマテリアル全般の全身暴露吸入による生体影響を調べる有効な手段となることが期待される。

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、実験動物を用いた毒性試験としては、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」を導入し、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。H23 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、MWCNT 原末を検体して、4 時間の暴露時間、目標相対濃度を 200,000 cpm と設定した条件において、平均質量濃度が約 0.3 mg/m³ が得られた。

本年度は、H23 年度に開発された MWCNT 原末を高度に分散処理する独自の方法 (Taquann 法) で処理した Taquann 法処理 MWCNT を気相に分散させ、動物に暴露する方法を開発した。

B. 研究方法

B-1. MWCNT 検体

MWCNT は三井物産の MWNT-7 を使用した。

繊維径 70-170 nm (平均 100 nm) ^{a)}

長さ 1-19 μm (> 5 μm 27.5%) ^{a)}

繊維数 3.55 × 10¹¹ 本/g ^{a)}

製品形状 繭状凝集体を含む単離繊維

化学組成 炭素純度 99.5%以上

鉄 : 3500 ppm (0.35%) ^{a)}

硫黄 : 470 ppm ^{a)}

塩素 : 20 ppm ^{a)}

フッ素 : <5 ppm ^{a)}

臭素 : <40 ppm ^{a)}

^{a)} 東京都健康安全研究センターの測定データ ^{1,2)}

H23 年度の分担研究では、MWNT-7 の原末 (MWCNT-Bulk) を使用して研究を進めた。H24 年度の分担研究では、検体自体に分散性を高める処理 (Taquann 法) を行った検体

(MWCNT-Taq) を使用し研究を進めることとした。Taquann 法で処理した検体は原末に含まれる凝集体が除去され、分散性の高い繊維を多く含むためナノ構造体として動物に投与することが可能となる。

Taquann 法は、検体をターシャルブタノール (TB) に懸濁後、目開き 25 μm の金属製フィルターでろ過し、直ちに液体窒素で濾液を固化した後、溶媒回収型真空ポンプで TB を回収することで分散性の高い検体を得る方法である。この方法は H23 年度の分担研究で開発された方法であるが、当初は 1 回の処理で得られる検体量が少なく (1 mg/24 時間)、全身暴露吸入装置の 1 回の実験に必要な量である 30 mg 以上を得るために時間を要した。H24 年度に量産化する方法を構築し全身暴露吸入に適用することが可能となった (詳細は、高橋祐次分担研究者報告を参照)。

B-2. 全身暴露吸入装置概要

(1) 音響式ダスト発生装置

NIOSH から複製許可と共に導入したダスト発生装置 ³⁾ 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アフラムを装着した太鼓のような構造である。検体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アフラムが振動して 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（図 1、図 2）。

MWCNT-Bulk を検体としたダスト発生条件は H23 年度に確立しており、目標相対濃度を 200,000 cpm と設定とした条件において、平均質量濃度が約 0.3 mg/m³ が得られている。

(2) カートリッジ直噴式ダスト発生装置

NIOSH から導入した音響式ダスト発生装置に、MWCNT-Taq を適用してダスト発生条件の検討を行ったが、音響エネルギーによる挙動が MWCNT-Bulk とは異なり、濃度の高い暴露にはダスト発生装置の改造が必要となった。新たに開発したダスト発生装置では、金属製のカートリッジに MWCNT-Taq を充填し、圧縮空気によりカートリッジ内の検体を気相に分散させる方法を選択した。カートリッジ直噴式ダスト発生装置は検体を充填するカートリッジ、圧縮空気をカートリッジに噴射する噴射装置及び検体を気相に分散させるサブチャンバーから構成される（図 3）。カートリッジ（容量：23.5 mL、内寸：直径 22 mm 高さ 65 mm）はアルミニウム製の筒、4 つの噴出孔を有するキャップ及び真鍮製の台座から構成される。台座の中心には圧縮空気を注入するオリフィスが装着されている（図 4）。

カートリッジを装着する噴射装置は、サブチャンバー（容量：21.2 L、内寸：直径 300 mm 高さ 300 mm）に接続されており、噴射された検体はサブチャンバー内で気相に分散された後、希釈されつつ暴露チャンバーとの接続パイプを通して一定の流量（10 L/min）で暴露チャンバーに導く構造となっている（図 5）。

カートリッジへの MWCNT-Taq の充填は、MWCNT-Taq を所定の濃度（0.05 mg/mL）で TB に再懸濁し、各カートリッジに懸濁液 10 mL を分注して液体窒素で固化させた後、デシケータに格納して有機溶媒回収型ポンプで TB を昇華除去回収することで達成した。

噴射装置からカートリッジへの圧縮空気の供給圧力は 0.4 Mpa、噴射時間は 0.8 秒とし、カートリッジを交換しつつ 6 分間隔で噴射を繰り返した。

(3) 暴露チャンバー

動物を収容し検体を暴露する暴露チャンバーは、先行研究において独自に開発したものを使用した（図 6）。（研究協力者：生田達也、鶴田祐吾、柴田科学）。暴露チャンバーは、直径 550 mm、高さ 550 mm、気積 105.5 L のサイズである。動物は、チャンバーの蓋から吊るしたステンレス金網製のケージに個別に収容する。マウスは最大 16 匹収容が可能である。暴露チャンバーはアクリル製の OUTER チャンバーと柔軟な導電性樹脂で作製した INNER チャンバーの 2 重構造となっている。検体が触れる INNER チャンバーは交換可能であり、検体の変更に容易に対応できるシステムとなっている（特許出願済）。暴露チャンバーは 10 L/min の流量で換気を行った。

(4) 暴露チャンバー内のエアロゾル濃度測定

暴露チャンバー内の MWCNT の濃度のモニタリングは、相対濃度と質量濃度（mg/m³）測定を並行して行った。相対濃度は 0.3 μm 以上の粒径に対応したパーティクルカウンター

(OPC-110GT、流量：2.83 L/min、柴田科学)と、2.5 nm から 3 μm までの粒径範囲を測定する凝縮粒子カウンター (CPC3776、流量：0.3 L/min、TSI) を用いた。質量濃度測定は、ローボリウムサンプラー (080050-155、 ϕ 55 mm ろ紙ホルダー、柴田科学) にフッ素樹脂処理ガラス繊維フィルター (Model T60A20、 ϕ 55mm、捕集効率 (DOP 0.3 μm): 96.4%、東京ダイレック) を装着し、サンプリングポンプ (Asbestos sampling pump AIP-105、柴田科学) に接続して 1.5 L/min の流量で暴露時間の2時間を通してエアロゾルを吸引しフィルターに検体を捕集した。ろ過捕集後のフィルターの質量から予め秤量したフィルターの質量を差し引いた値を検体の質量とし、これをサンプリングに要した吸引空気量 (180 L) で除して 1 m^3 当りの質量濃度に換算した。フィルターの秤量にはマイクロ天秤 (XP26V、METTLER TOLEDO) を使用した。

B-3. 目標濃度と暴露時間

音響式ダスト発生装置を用いた検討では、昨年度 MWCNT-Bulk にて確立した条件で得られた 0.3 mg/m^3 以上の質量濃度が得られることを目標とした。この場合、相対濃度 200,000 cpm (OPC) である。また、MWCNT-Taq は分散性が高いことから、より微細な粒子の発生が想定されるため、CPC での測定を平行して行った。暴露時間は2時間とした。

カートリッジ直噴式ダスト発生装置では、原理的にはカートリッジに充填した検体量と使用するカートリッジの本数、暴露チャンバーの換気流量及び暴露時間で質量濃度が決まる。0.5 mg を充填したカートリッジを使用し、総換気流量約 15 L/min (基礎換気流量; 10 L/min, OPC; 2.83 L/min, CPC; 0.3 L/min、質量濃度測定; 1.5 L/min) とし、この流量から計算される半減期に相当する6分間隔で検体を噴射した。噴射作業は実験者が手動で実施した。

B-4. 暴露チャンバー内のMWCNT濃度制御

音響式ダスト発生装置のMWCNTの濃度制御は、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った。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ル)、2) ダスト発生カラムから暴露チャンバーの送风量、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。

カートリッジ直噴式ダスト発生装置については、B-3 で記載した条件である。

B-5. 暴露チャンバー内のMWCNTの状態観察

暴露チャンバー内のMWCNTの分散状態を確認するため、エアロゾルをサンプリングポンプ (Asbestos sampling pump AIP-105、柴田科学) で 5 L/min の流量で3分間吸引し、酸化アルミニウム製のフィルター (Anodisc 25、 ϕ 21 mm、孔径 0.1 μm 、ワットマン) に捕集し、オスミウムコーター (HPC-1SW、真空デバイス) で5秒間のオスミウムコートを行って走査型電子顕微鏡 (VE-9800、キーエンス) で形態観察した。フィルターホルダーは、ステンレス製のフィルターホルダー (xx3002500、ミリポア) をオープンフェイスに加工したものを使用した。

C. 研究結果

C-1. 音響式ダスト発生装置を用いた検討

30 mg の MWCNT-Taq を音響式ダスト発生装置に投入し、送风量 (2-10 L/min)、音響周波数 (10~40Hz)、音響エネルギー (スピーカ駆動電圧) の条件検討を行った。その結果、音響エネルギーによる挙動が MWCNT-Bulk とは異なることが明らかとなった。MWCNT-Bulk では音響エネルギーを増加させることでダスト発生量が増加するが、MWCNT-Taq では音響エネルギーの増加量に見合ったダスト発

生量が得られなかった。また、ダスト発生チャンバー内に十分な検体量があるにもかかわらず、ダスト発生量は時間と共に減少する傾向にあった(図7)。ダスト発生量も、CPCの相対濃度表示で100/mLを超えることはなく相対濃度を示標としたフィードバックコントロールも困難であったため、ダスト発生装置の改良を行い、新規のダスト発生装置を使用した実験を進めた。

ダスト発生装置のカラムに付着した検体を走査型電子顕微鏡で観察すると、MWCNT-Bulkは硬くパッキングされた凝集塊であるのに対してMWCNT-Taqは緩く絡まった状態の繊維塊であった(図8)。

C-2. カートリッジ直噴式ダスト発生装置による検討

カートリッジ直噴式ダスト発生装置を使用し、MWCNT-Taqの暴露を行った結果を、図9及び表1に示した。この実験では、暴露チャンバー内にマウスを12匹(C57BL/6NCrSlc、SPF、SLC、10-11週齢、体重23.8-30.8g)収容し、一日2時間、5日間の反復暴露吸入を実施した。

CPCによる2時間の相対濃度平均値は、それぞれ832/mL、855/mL、1,229/mL、962/mL及び2,295/mLであった。質量濃度は1.5 mg/m³、1.5 mg/m³、1.8 mg/m³、1.3 mg/m³及び3.5 mg/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、 1.76×10^{-6} 、 1.81×10^{-6} 、 1.50×10^{-6} 、 1.33×10^{-6} 及び 1.51×10^{-6} であった。

なお、OPCは装置の測定の上限值(300,000cpm)を一時的に超える場合があったため、測定を中止した。

相対濃度の推移は、噴射後2分程度でピークを迎え、その後低下する鋸歯状を呈した。また、実験日によって相対濃度の推移は異なった。噴射後のカートリッジには検体が残存しており、その多くはカートリッジのオリフ

イスを固定するEリングに認められ、真鍮製の台座部、アルミ製のチューブには残存は殆ど認められなかった。

C-3. 暴露チャンバー内のMWCNTの状態観察

オープンフェイスのフィルターホルダーを使用し、酸化アルミニウム製フィルターに捕集した繊維の状態を走査型電子顕微鏡で観察した(図10)。多くの繊維は単分散状態であり、MWCNT-Taqは暴露チャンバー内の気相においても分散性が保持された状態であることが確認された。凝集した繊維も認められるが、そのサイズはMWCNT-Taqを調製する際に使用する金属性フィルターの目開き(25 μm)以下であり、大きな凝集塊はTaquann処理を行う過程で効果的に除去されていることが確認された。

D. 考察及び結論

H23年度の分担研究では、MWCNT-Bulkを検体として音響式ダスト発生装置によるダスト発生条件を確立し、実際にマウスに全身暴露吸入を実施した。H24年度の分担研究では、MWCNT-7の原末に含まれる凝集塊を液相の状態ですりつぶしにより除去し、表面張力がかからない状態で乾燥するTaquann法により分散性を高めたMWCNT-Taqを使用して、全身暴露吸入に適用する方法を確立した。問題点として実験日毎の相対濃度推移と質量濃度にはバラツキが認められたが、質量濃度変換係数(K値)はほぼ一定であったことから、MWCNT-Taqの気相での分散状態、その粒度分布が一定の状態を保たれていることを示唆していることから、この問題は早期に解決可能であると考察された。

今後、全身暴露実験の実施と並行して、MOUDI(Micro-Orifice Uniform-Deposit Impactor、Model 125 NanoMOUDI、KANOMAX)を用いてチャンバー内のエアロゾルを分級して捕集を行い、粒度分布を明らかにする予

定である。また、噴射作業の自動無人化、及び、暴露濃度の一層の安定化の為にカートリッジ内検体の残存を減らす事を進め、それを組み合わせるなど方策によりチャンパー内の鋸歯状濃度変動の変動幅の低減を図る方策を実施する。

この一連の開発研究の過程で、MWCNT-Bulkは音響エネルギーによって凝集塊が衝突することによって繊維が単離されるが、MWCNT-Taqは音響式ダスト発生装置では逆に凝集が進むことが判明した。このことは、音響式ダスト発生装置は検体の性状が分散性に大きく影響する事を示唆している。これに対して、ここで確立したカートリッジ直噴方式は、Taquann法処理検体を用いることで、汎用性が高い可能性が示唆される。

以上、本分担研究ではMWCNT原末の分散性を高めるTaquann法処理検体を使用して、気相に効果的に分散する原理を開発し、実際にマウスに暴露を行った。新たに開発したダスト発生装置は、Taquann法処理検体に適したダスト発生方法であるため、これらを組み合わせることで、MWCNTのみならずナノマテリアル全般の全身暴露吸入による生体影響を調べる有効な手段となることが期待される。

【引用文献】

- 1) 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) Sakamoto Y, Nakae D, Fukumori N, Tayama K, Maekawa A, Imai K, Hirose A, Nishimura T, Ohashi N, Ogata A., Induction of mesothelioma by a single intrascrotal administration of multi-wall carbon nanotube in intact

male Fischer 344 rats., J Toxicol Sci. 2009 Feb;34(1):65-76.

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

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

- 1) 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(2012.7.18)
- 2) Yuhji Taquahashi, 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 (2012.7.20)

G. 知的財産の出願・登録情報

1. 特許取得

特許出願: 柴田眞利、菅野純、生田達也、鶴田祐吾、小川幸男、高橋祐次、「吸入曝露試験装置」、特願 2012-148848 (2012.7.2)

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

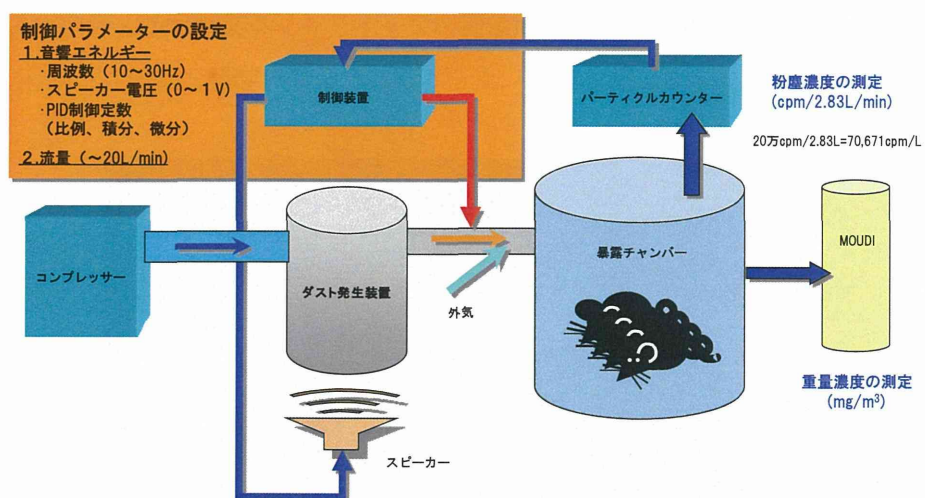


図2 全身暴露吸入装置の概略図

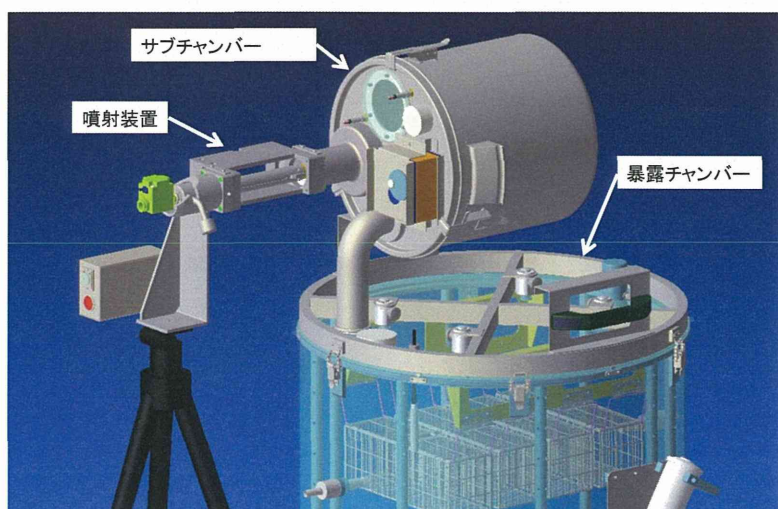


図3 新規に開発した「カートリッジ直噴式ダスト発生装置」の概略図

カートリッジを装填する噴射装置と検体を気相に分散させるサブチャンバーから構成される。

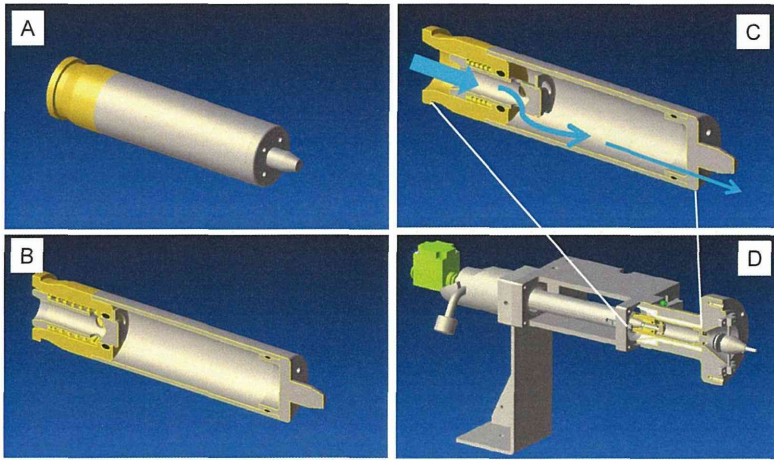


図4 検体を充填するカートリッジ

カートリッジの概観 (A) とその断面 (B)。噴射装置にカートリッジを装填すると台座から圧縮空気が注入できるようにオリフィスが開く (C)。カートリッジを噴射装置に装填した断面 (D)。

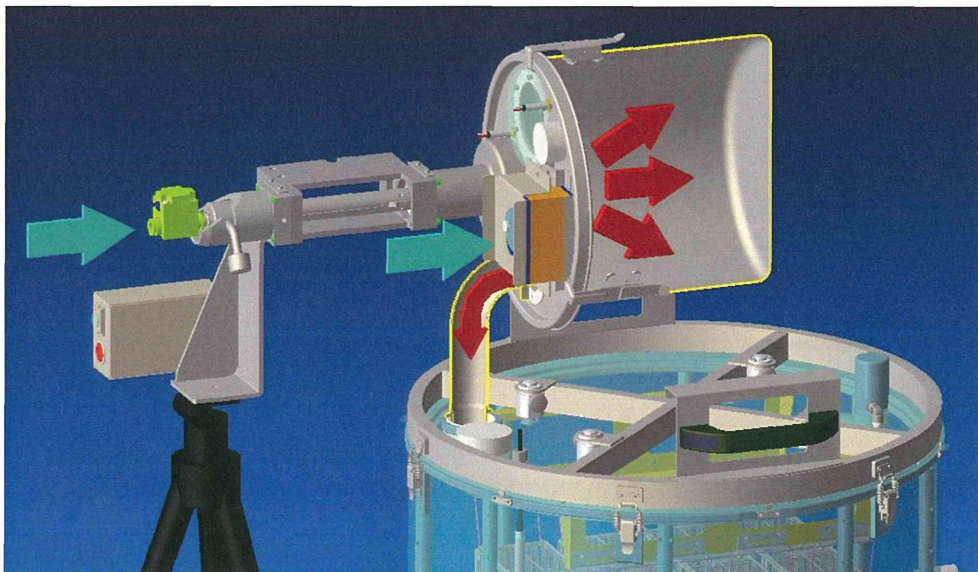


図5 カートリッジ直噴式ダスト発生装置の空気の流れ

圧縮空気とともにカートリッジ内の検体をサブチャンバーに吹き込む。サブチャンバー（容積：21.2L）でエアロゾルとなった検体は、接続パイプを通過して暴露チャンバー（容積：105L）に一定の流量で導入される。



図6 暴露チャンバー

暴露チャンバーは独自に開発した（特許出願済）。アクリル製のアウターチャンバーと柔軟な樹脂で作製したインナーチャンバーの2重構造としている。検体が触れるインナーチャンバーは交換可能であり、検体の変更に容易に対応できるシステムとなっている。動物はステンレス金網製のケージに格納し、チャンバーの蓋から吊るして収容する。マウスは最大 16 匹収容が可能である。

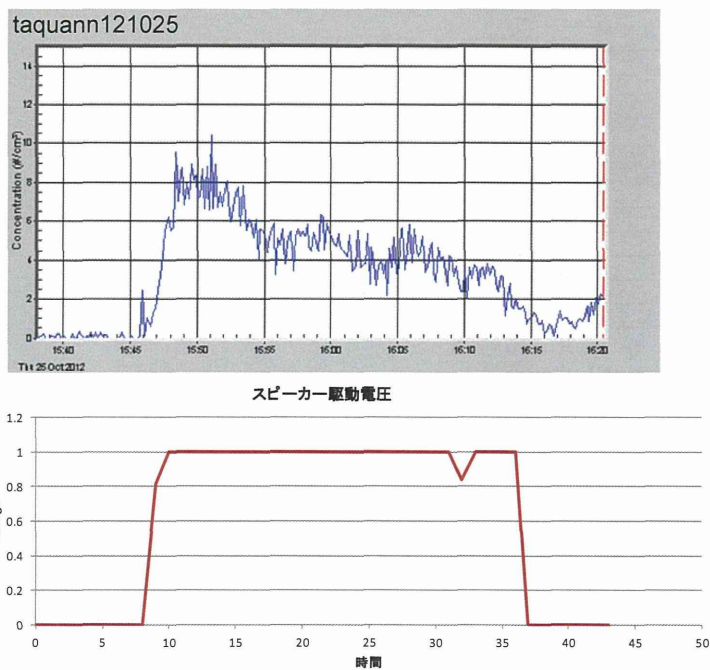


図7 音響式ダスト発生装置でMWCNT-Taq をエアロゾルにした相対濃度推移とスピーカー駆動電圧

MWCNT-Taq は 30 mg を使用した。スピーカーの駆動電圧（下図）は、最大出力の1Vで駆動しているが、ダスト発生量は少なく（10/mL）、時間とともに発生量が減少した。

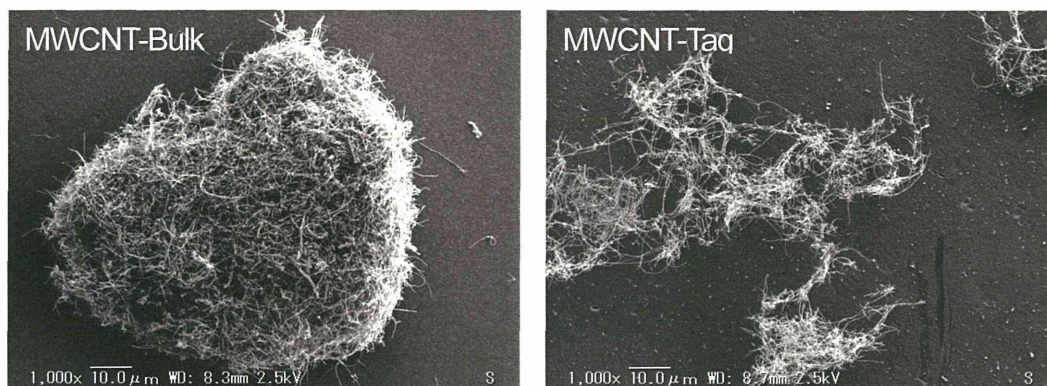


図8 音響式ダスト発生装置のカラム壁に付着したMWCNTの様子

MWCNT-Bulk は硬くパッキングされた形態を示したが（左図）、MWCNT-Taq はゆるく繊維が絡まった状態であった（右図）。

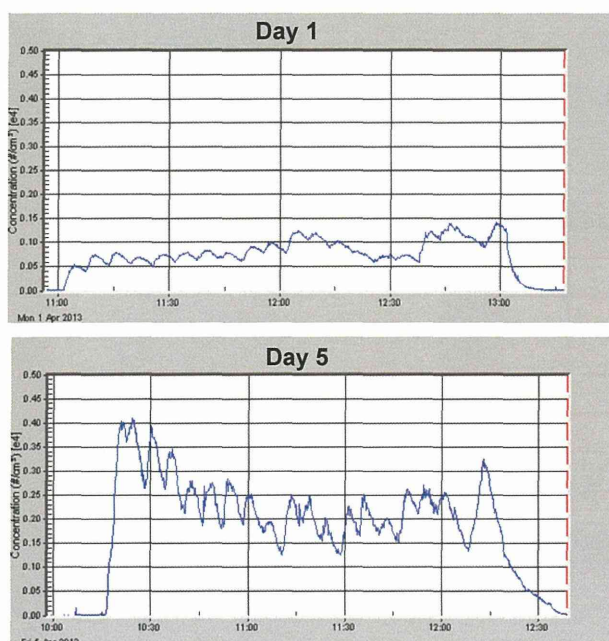


図9 カートリッジ直噴式ダスト発生装置でMWCNT-Taqをエアロゾルとした相対濃度推移（CPCカウンターの推移）

MWCNT-Taq 0.5 mg をカートリッジに充填し、6分間隔で噴射し、マウスに一日2時間の全身暴露吸入を5日間行った。実験日により、発生するエアロゾルの量が異なった。

表1 カートリッジ直噴式ダスト発生装置を使用して MWCNT-Taq を全身暴露吸入した平均相対濃度と平均質量濃度

	Day1	Day2	Day3	Day4	Day5
平均相対濃度(#/mL)	832	855	1,229	962	2,295
SD	248	320	266	291	658
平均質量濃度 (mg/m ³)	1.5	1.5	1.8	1.3	3.5
K値(× 10 ⁻⁶)	1.76	1.81	1.50	1.33	1.51

MWCNT-Taq 0.5 mg をカートリッジに充填し、6 分間隔で噴射し、マウスに一日 2 時間の全身暴露吸入を 5 日間行った。質量濃度測定は 1.5 L/min の流量で 2 時間の暴露時間を通してサンプリングを行った。

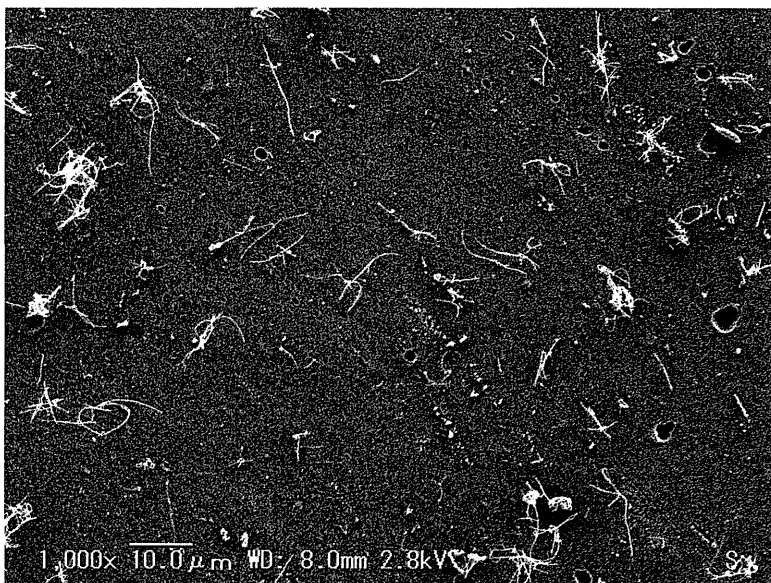


図10 カートリッジ直噴式ダスト発生装置でエアロゾルにした MWCNT-Taq の形態

暴露チャンバー内のエアロゾルを 5 L/min の流量で 3 分間吸引し、酸化アルミニウム製フィルター（孔径：0.1 μm）に捕集し走査型電子顕微鏡で観察した。フィルターホルダーはステンレス製のオープンフェイス型を使用した。