

図 15 MWCNT-Taq 単回気管内投与ラットマウスから採取した気管支肺胞洗浄液：好中球

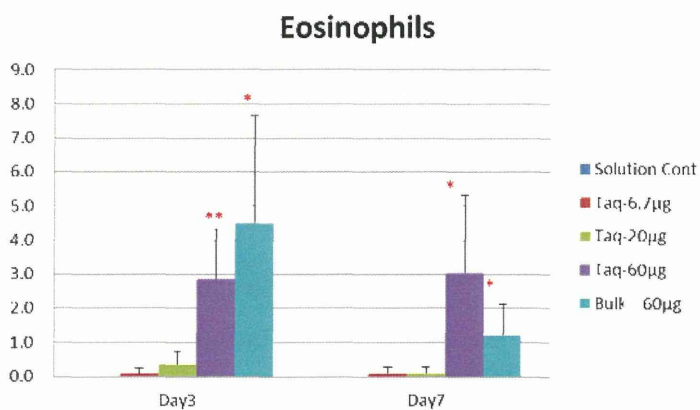


図 16 MWCNT-Taq 単回気管内投与ラットマウスから採取した気管支肺胞洗浄液：好酸球

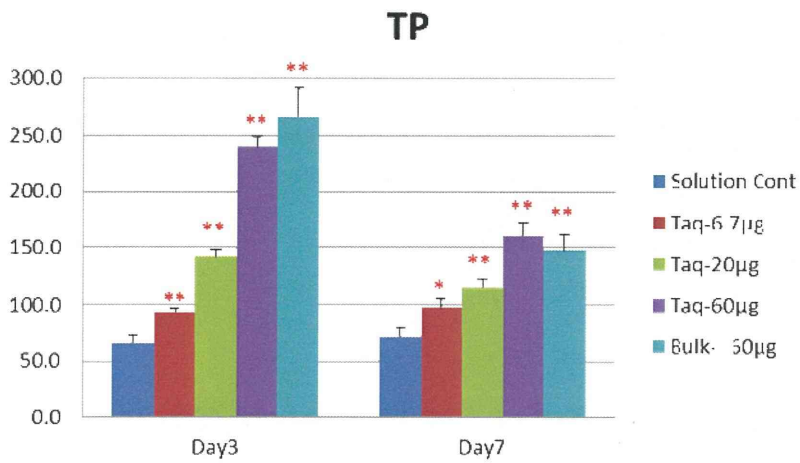


図 17 MWCNT-Taq 単回気管内投与ラットマウスから採取した
気管支肺胞洗浄液：総蛋白

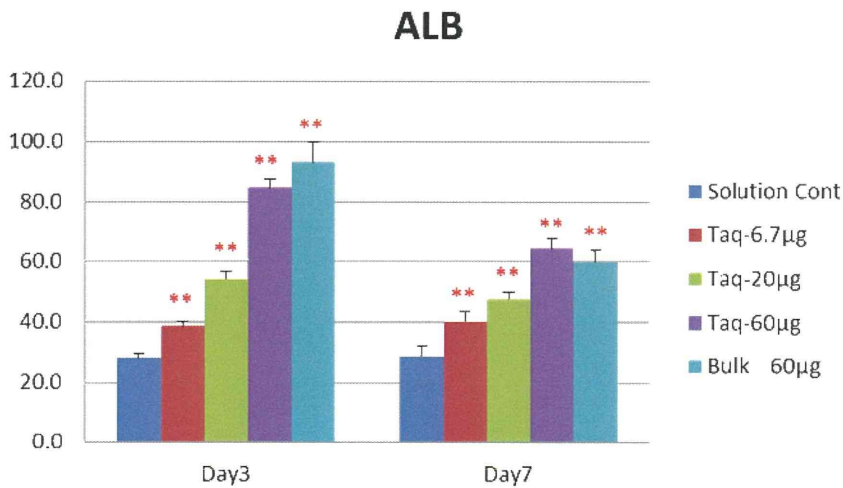


図 18 MWCNT-Taq 単回気管内投与ラットマウスから採取した
気管支肺胞洗浄液：アルブミン

ALP

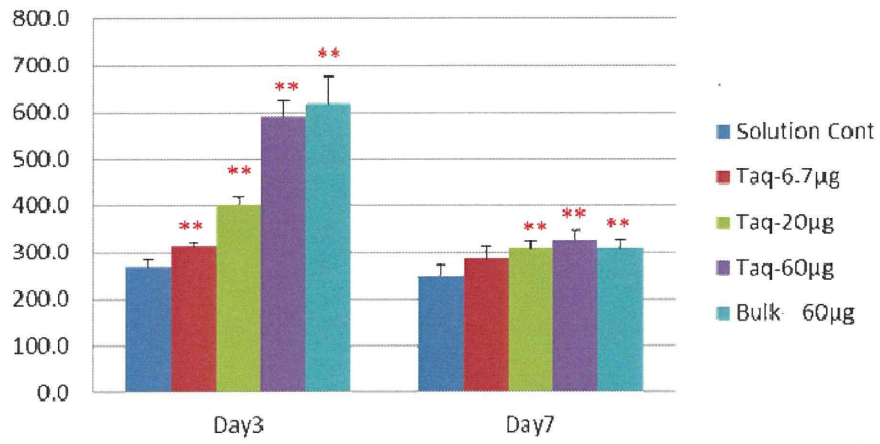


図 19 MWCNT-Taq 単回気管内投与ラットマウスから採取した
気管支肺胞洗浄液：アルカリフォスファターゼ

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

本年度該当なし。

IV. 研究成果の刊行物・別刷

本年度該当なし。

V. 班會議資料
(2012年10月5日開催)

厚生労働省科学研究費補助金
化学物質リスク評価研究事業

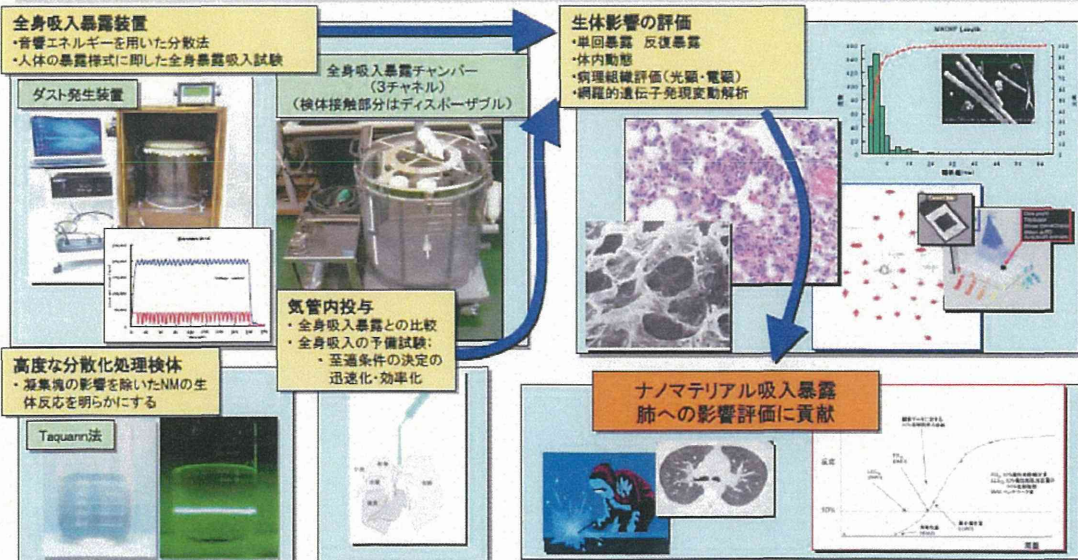
ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法に関する研究

「全身暴露吸入による肺を主標的
とした毒性評価研究」
(今井田班班会議)

国立医薬品食品衛生研究所
2012年10月5日

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
ー全身暴露吸入による肺を主標的とした毒性評価ー

目的: 肺に焦点を絞り、ナノマテリアル(NM)の吸入暴露の人への外揮性の高い有害性情報を獲得する方法を確立する
必要性: NM開発で世界をリードする日本において、NM製品化が急速に進んでおり、安全性確認の方策の早期確立が必要
独創性: 人体の暴露様式に即した全身暴露吸入試験装置の開発から、毒性発現メカニズムを含めた有害性情報の獲得までの総合的研究
期待される成果: NMの吸入毒性評価の迅速化・効率化、NMのリスクを最小化するための実質安全レベルの試算が可能となる



研究班構成

今井田克己 香川大学医学部医学科 病態病理・生感防 御医学講座 腫瘍病理学・教授	研究統括及び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)
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・ 部長	ナノマテリアル吸入暴露による肺の病理組織学的評 価(急性期及び非腫瘍性病変)
高木 篤也 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・室長	DNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現変動解析
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・研究員	ナノマテリアルの吸入暴露方法に関する研究
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	ナノマテリアルの吸入暴露方法に関する研究及びナ ノマテリアル吸入暴露による体内動態

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-

ナノマテリアル吸入暴露による 体内動態に関する研究

分担研究者 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

背景-1

-MWCNTの組織負荷量は「本数」と「サイズ」で示す-

- 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う。
- CNTの体内動態の測定方法については、isotope、mass spectroscopyなど低分子化合物と同様の方法を適用し「質量」に換算した研究が報告されている。
- しかしながら、CNTの吸入暴露における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。
 - ・吸入暴露では、全ての粒子が体内に取り込まれることはない。
 - ・CNTは不均一なサイズの粒子から構成される。
 - ・粒度分布は呼吸器系の部位別の沈着率をある程度決定する。
 - ・アスペクト比が大きいため、空気動力学径を考慮する必要がある。

背景-2

-分散性の高いMWCNTを使用する必要性-

- 検体に用いたMWCNTには製造過程で共有結合により分岐あるいは凝集状態を示す成分が含まれている。
- CNTの吸入試験に際しては、この凝集成分が気道上部に捕捉されるため単繊維の吸入を阻害する可能性がある。
- ヒトに比較して細い気道径を有するマウスを用いた動物実験では、この影響が大きいことが推察されるため、実験動物を使用してヒトへの外挿性の高いデータを得るためには、凝集成分を除去した上で分散性に優れた検体を使用する必要がある。

本分担研究の目的

- 本分担研究では、MWCNTの生体影響を評価するための情報として、体内に蓄積されたMWCNTの「本数」と「サイズ」を直接的に把握する方法の確立を目的とする。具体的には、肺組織を化学的に溶解してMWCNTを回収し、走査型顕微鏡（SEM）による観察が可能な方法の確立を試みた。
- 並行して、吸入させる検体の分散方法の開発に取り組んだ。すなわち、凝集性分による影響が少なく、実際にヒトに吸入されることが想定される単繊維成分のみからなる分散性の高い検体を得る処理法である。このような検体を吸入した実験動物を用意することで、人に対する外挿性の高い検体について、肺内に取り込まれる繊維のサイズ、肺内の分布、及び、全身臓器への再分布を把握することが可能となる。

肺からのMWCNTの抽出方法の検討

溶解方法の検討結果

溶解方法	溶解性	備考
塩酸	×	残渣が多い
硝酸	◎	中和が困難
プロテイナーゼK	×	残渣が多い
トリプシン	×	残渣が多い
水酸化カリウム	◎	5w/v% KOH 0.1% SDS 0.5w/v% EDTA・2Na

フィルターの検討結果

製品名	素材	ポアサイズ	耐薬品性	SEM観察	備考
グラスファイバーフィルター GF/A (ワットマン)	ガラス繊維	1.6 μ m	◎	×	凸凹があり SEMでのMWCNTの 観察は不可
SEMpore (日本電子データム)	ポリカーボネート	0.6 μ m	◎	◎	孔にMWCNTが嵌入する
ニュークリポアメンブレン (GEヘルスケア)	ポリカーボネート	0.05 μ m	◎	◎	吸引る過により変形する
メンブレンフィルター (ミリポア)	酢酸セルロース 硝酸セルロース	0.025 μ m	×	◎	酸、アルカリ、 有機溶媒に耐性無し
ANOPORE (アライアンスバイオシステムズ)	酸化アルミニウム	0.02 μ m	◎	◎	未実施

肺からMWCNTを抽出する方法の概要

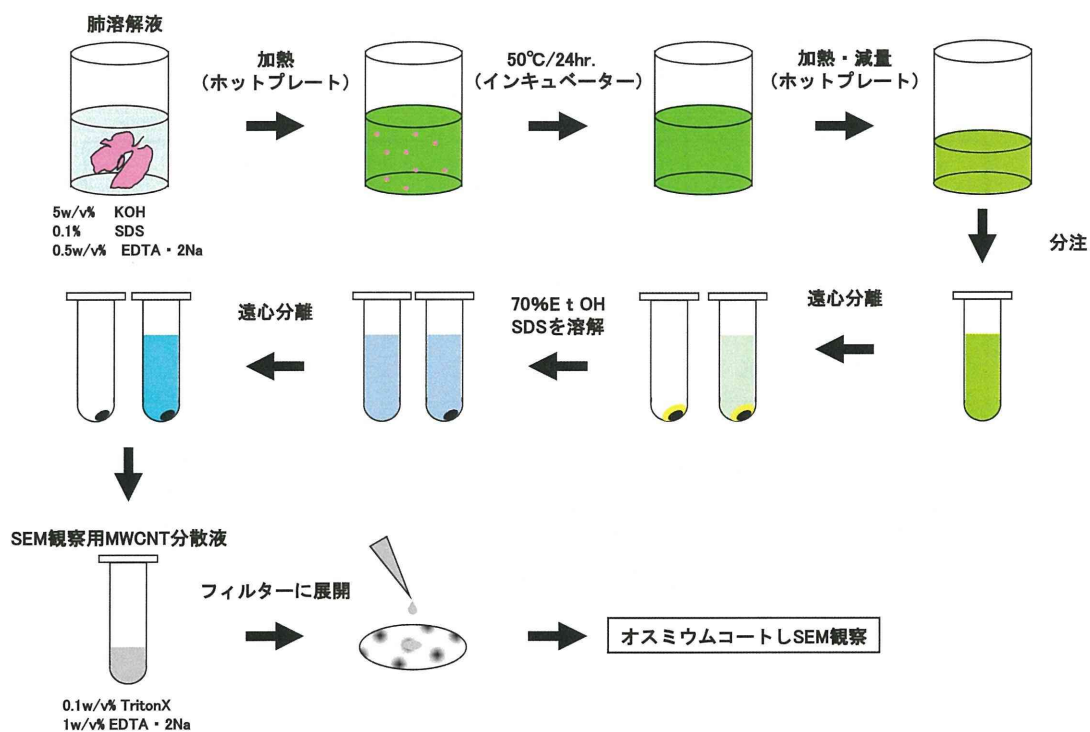
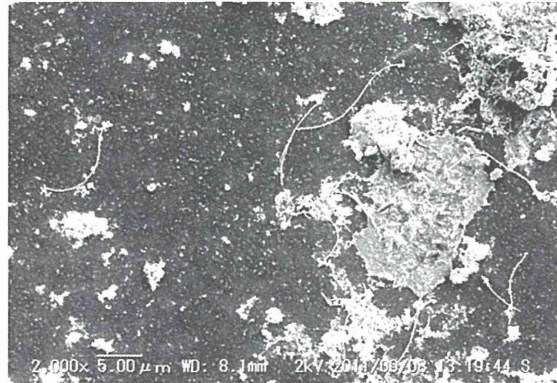


図3 肺から抽出したMWCNTのSEM像

EDTA (+)



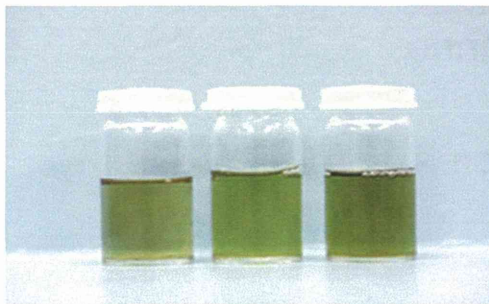
EDTA (-)



EDTAを添加することで残渣を除去することが可能となった。

肺溶解液の概観

溶解直後の様子



減量後の様子



溶解直後は、淡緑色を呈しているが、次第に黄色を呈してくる。残渣の主な成分は鉄と考えられる

水酸化鉄(II) ($\text{Fe}(\text{OH})_2$) は酸素が存在する状態では容易に酸化されて水酸化鉄(III)へと変化する。酸化の進行に伴い、淡緑色→灰緑色→黒褐色→赤褐色へと色相が変化する。
(ウィキペディア 水酸化鉄より抜粋)

MWCNTの分散性を高める方法の開発

11

Modified dispersion method

- “Taquann” Method

– By Taquahashi and Kanno

- Patent Pending
- Manuscript in preparation

Two Key ideas are,

- We can disperse well in liquid phase,
- Use “Critical point drying” to avoid re-aggregation by surface tension during drying process.

Manuscript in preparation

Taquann法の概要-1 (CNT懸濁液の調製)



水冷下でTBAを撹拌しながらシャーベット状にし、CNTと混合する。



凍結



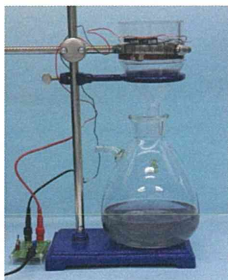
MWCNT 0.2gを500mLのTBに懸濁後に転倒混和により混合し30分放置後の様子。凍結融解による分散性の向上効果が得られる。

ろ過工程へ



CNT懸濁液

Taquann法の概要-2 (ろ過、凍結、臨界乾燥)



CNT懸濁液のろ過工程。フィルターに振動モーターを装着し、振動を与えながらろ過する。



振動モーター
◆標準電圧：3V
◆13000 r p m
◆振動量：17.6m/s² (1.8G)

<http://akizukidenshi.com/catalog/g/gP-00933/>



液体窒素で直ちに凍結し、固化した状態のものを固相のまま溶媒回収型真空ポンプで液相を介さずに乾燥させ、TBAを分離除去する。

完成



分散性の高い乾燥状態のCNTが残渣として得られる。

Taquann法処理検体の特徴 (再懸濁性)



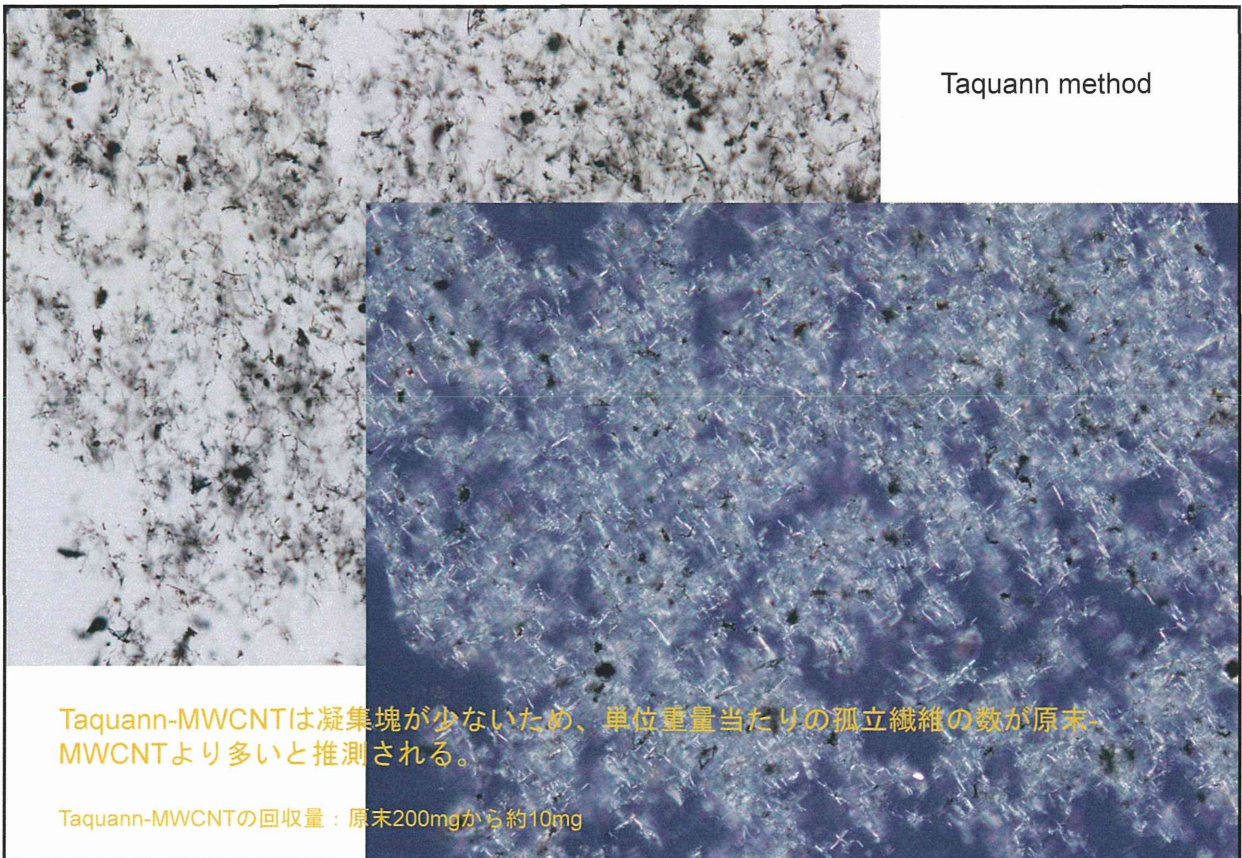
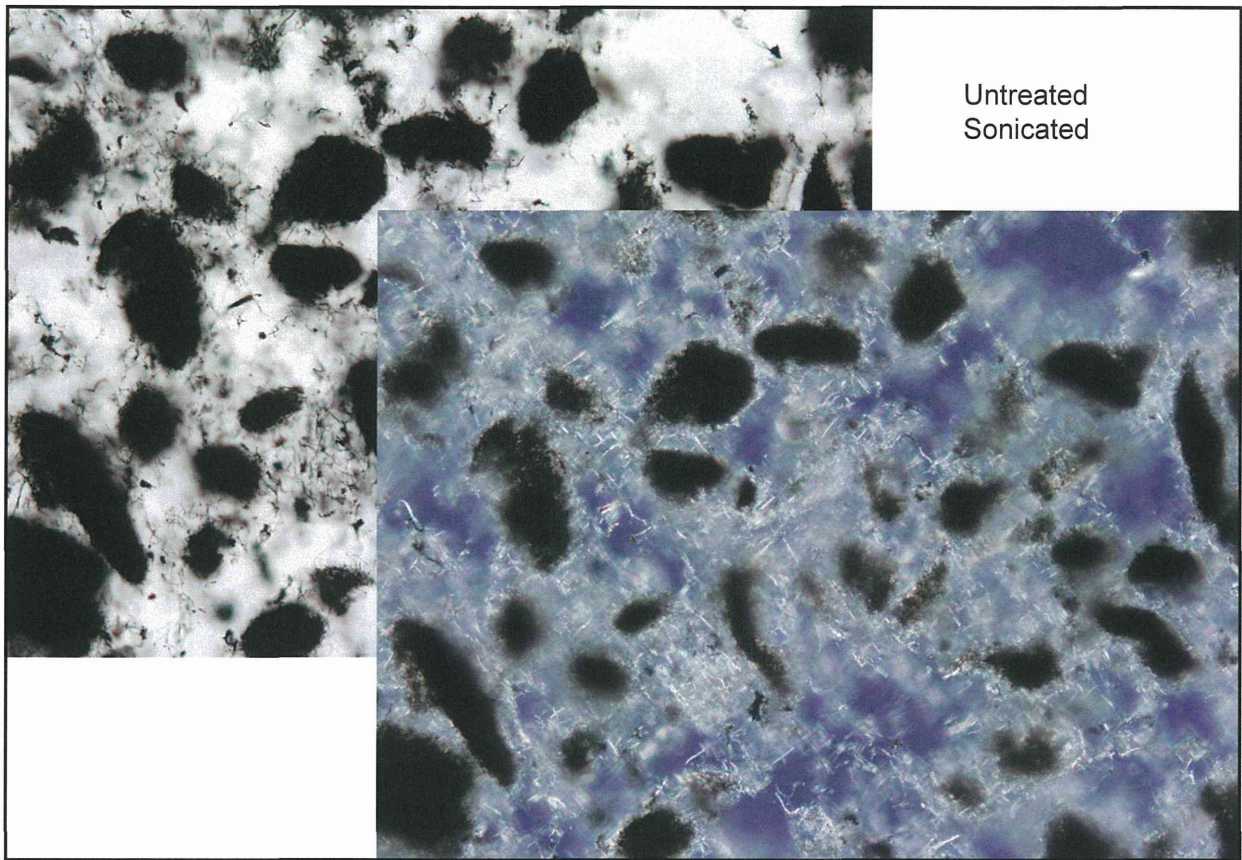
MWCNTの未処理原末とTaquann法で得られた検体との比較

左：同じ重量 (1mg)で比較すると、Taquann法で得られた検体は未処理原末よりも嵩高い
右：200ug/mLの検体をTBAに再懸濁した。Taquann法で得られた検体は速やかに再懸濁し、分散状態が保持される。

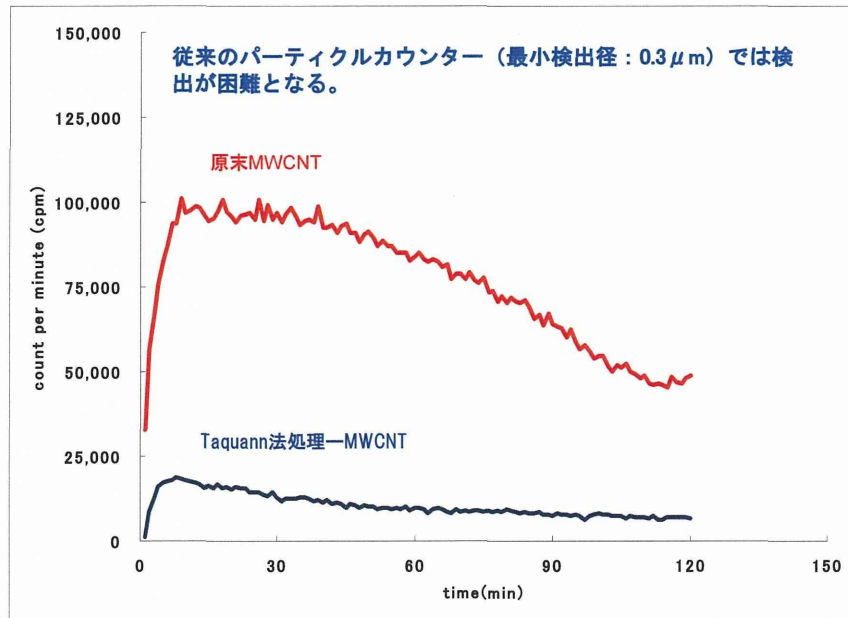
Taquann法で得られた検体のSEM画像 (未処理原末との比較)



TBAに再懸濁し、メンブレンフィルターに展開後にSEM (VE-9800、KEYENCE) で観察した。未処理原末では、凝集したMWCNTが観察されたが、Taquann法で得られた検体は、ほとんどが単繊維として観察された。



Taquann処理検体の全身暴露吸入



ほぼ同一重量の検体をダスト発生装置に装填し、気相に分散し、同一条件にて動物吸入チャンバーに送り込んだものの経時的な測定結果を示す。ほぼ同重量の検体が気相で想起されているにもかかわらず、Taquann法処理検体は検出感度以下の微細な粒子からなっていることが間接的に示された。

実験に供した肺サンプル

- 動物：雄性マウス（C57BL/6NCrSlc、SPF、SLC、19週齢、体重 29.3-35.0 g）
- 音響式ダスト発生装置を使用し、MWCNT原末（MWCNT-Unt）及び Taquann処理したMWCNT（MWCNT-Taq）を全身暴露吸入した。
暴露時間：2時間（単回）
暴露濃度：MWCNT-Unt 1142.5 μg/m³、
MWCNT-Taq 406.7 μg/m³