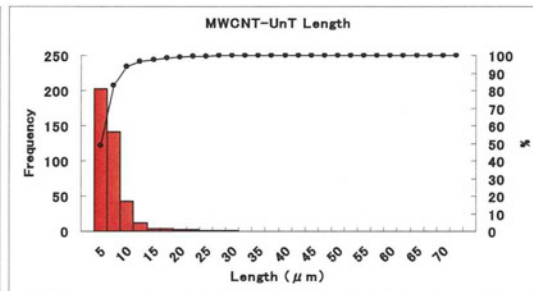
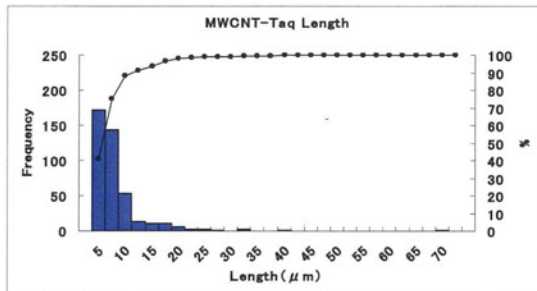


## 吸入暴露肺に沈着したMWCNTのサイズ

	N	Average length	Average width	Percentage >5um	Percentage >10um	Max. Length	Min. Length
MWCNT-UnT	415	3.477 ± 3.2 (2.673)	241 ± 153 (209)	<u>16.876</u>	<u>0.036</u>	27.421	0.579
MWCNT-Taq	421	4.390 ± 5.28 (3.000)	313 ± 181 (270)	<u>25.178</u>	<u>0.093</u>	66.43	0.216

MWCNT-UnT : Untreated MWCNT, MWCNT-Taq: MWCNT-Taquann  
 Dimensions: length:um, width: nm  
 Numbers in parentheses are geometric means



21

## まとめ

- 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。
- MWCNT-Taqには凝集成分が僅かである。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。

22

## 今後の計画

### 平成24年度

マウス吸入暴露肺におけるMWCNTの観察

- ・ MWCNT-Taqを検体とし、マウスに単回/反復暴露を行い、急性及び慢性反応についての病理組織学的評価、MWCNTの組織沈着量及びDNAマイクロアレイ解析を行う実験に平行して、肺に沈着するMWCNTのプロファイルを明らかにする。

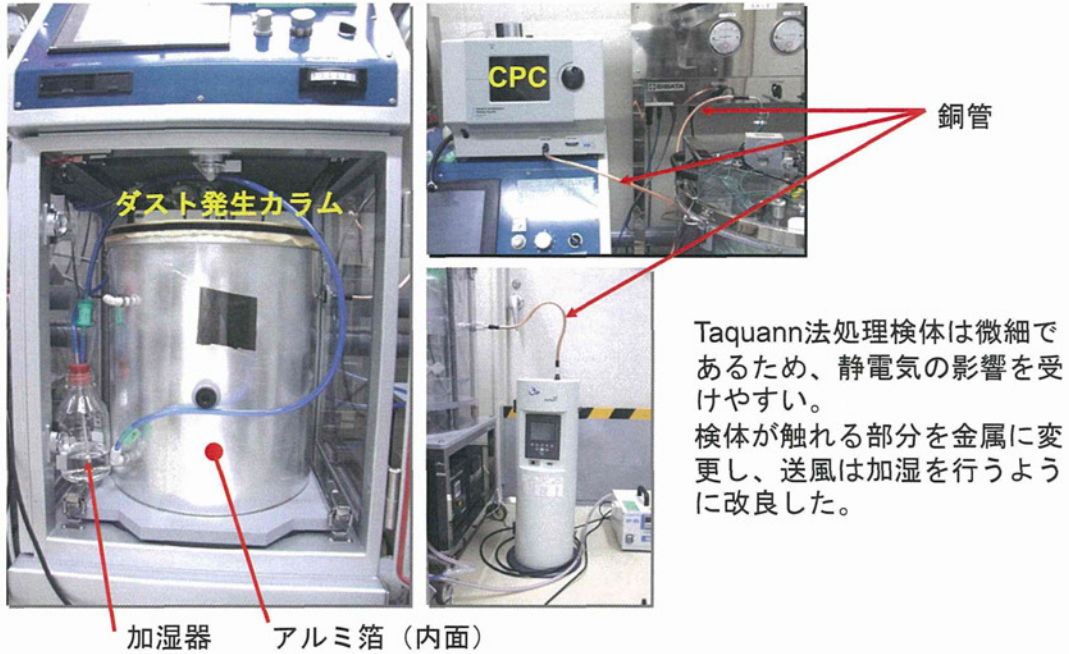
### 平成25年度

- ・ MWCNT-Taqを検体とし、腫瘍性病変の誘発までを観察する実験に平行して、肺に沈着するMWCNTのプロファイルを明らかにする。

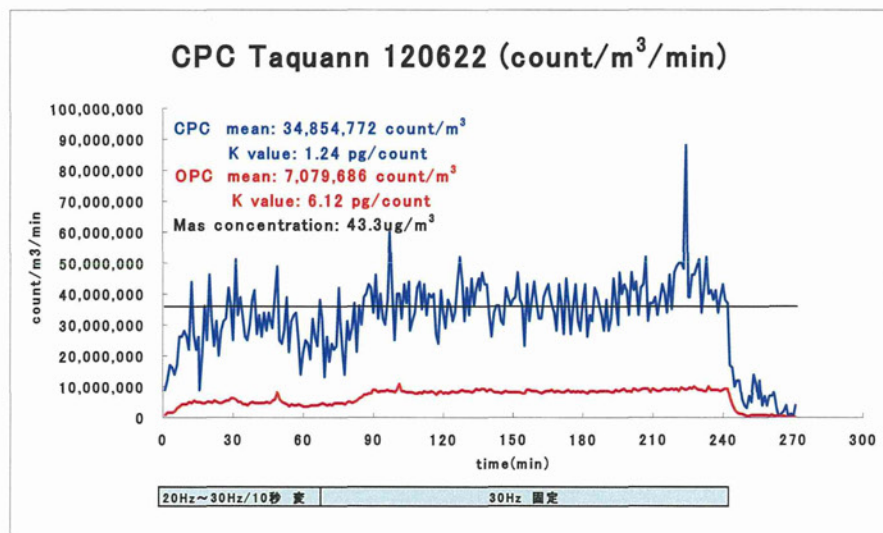
## 予想される成果

人の実際の暴露様式に即した全身暴露吸入方法と、分散性に優れたTaquann法処理-MWCNTを組み合わせることにより生体影響について人への外挿性の高いデータが得られると予想される。本研究の結果と合わせて解析することで、生体影響の用量作用関係を明らかにすることが期待できる。

## Taquann法処理検体を使用するための改良



## Taquann法処理-MWCNTを使用した暴露条件検討



Taquann法処理検体を使用し、暴露条件の設定を行っている。CPCを用いた暴露濃度の制御は、相対濃度の変動幅が大きく十分な制御が出来ていない。





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-

# ナノマテリアルの全身暴露吸入方法 に関する研究

分担研究者 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

1

## 背景

- 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が、実際にはその検討が最も進んでいない。

### 【理由】

- 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。
- 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。

先行研究結果の判断の下、人体の暴露様式に即した全身吸入暴露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」の概念を導入した装置を開発した。

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。

2



## 本分担研究の目的

- 人において最も重要と考えられる暴露経路は吸入暴露経路である。肺の末梢に届くMWCNTは単線維の高度に分散されたものであることが想定される。
- 動物実験によりナノ材料であるMWCNTの人における有害性を予想・推定するためには、実際の暴露様式に即した全身吸入暴露装置を用い、凝集体を含まない分散性の確保された検体を使用する事が有用である。
- 本分担研究では、既設の全身吸入暴露装置の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(送风量・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。

## 音響式ダスト発生装置(米国NIOSH考案)

### 【特徴】

- ダスト発生装置は、ラテックス製ダイヤフラムを装備したダスト発生カラム、スピーカー、エンクロージャー及び制御装置から構成される。
- スピーカーの音響エネルギーにより、MWCNTを気相に分散させる。
- 暴露濃度の制御は、暴露チャンバー内の相対濃度(cpm)を制御装置にフィードバックし、スピーカー駆動電圧を制御してダスト発生量をコントロールする。



# 音響式ダスト発生装置と暴露チャンバー

NIOSHオリジナル



柴田科学(株)タイプ  
(製品名:DF-7)



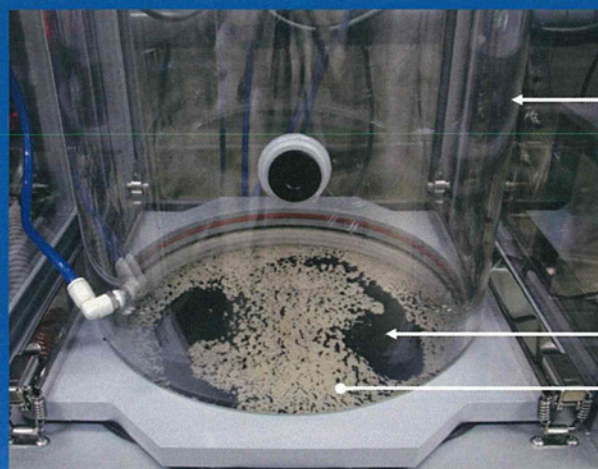
暴露チャンバー



マウスは16匹収納可能

5

## ダスト発生部



ダスト発生カラム  
φ : 330mm  
H : 460mm  
V : 39.3L

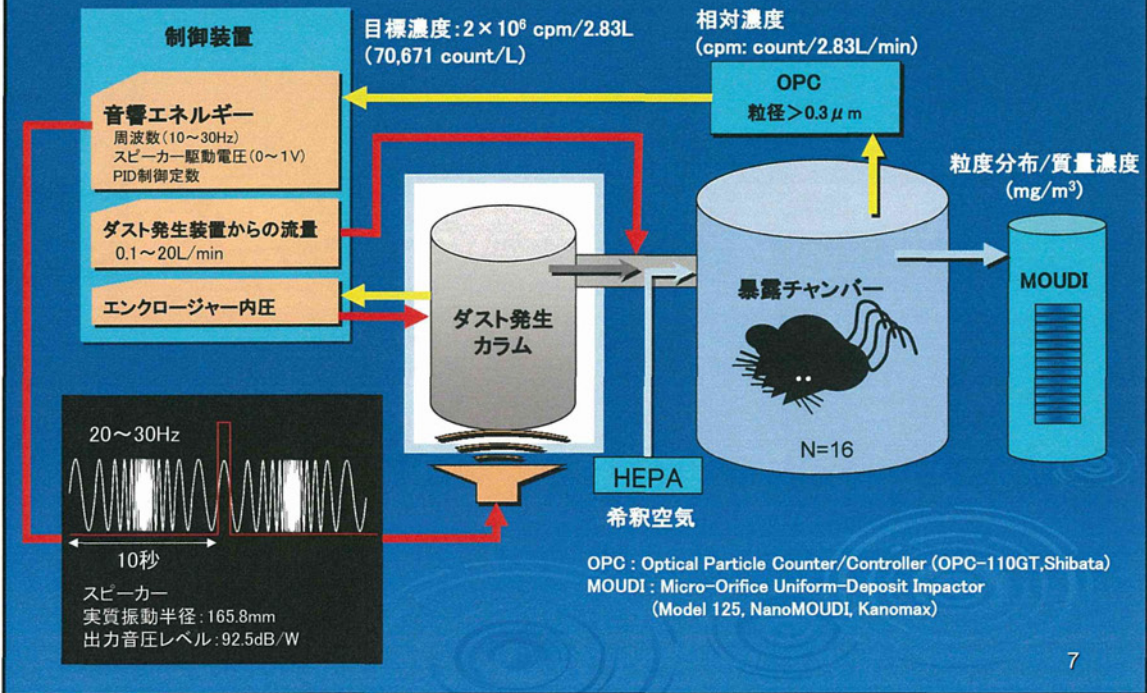
MWCNT (MWNT-7)

ラテックス製ダイヤフラム

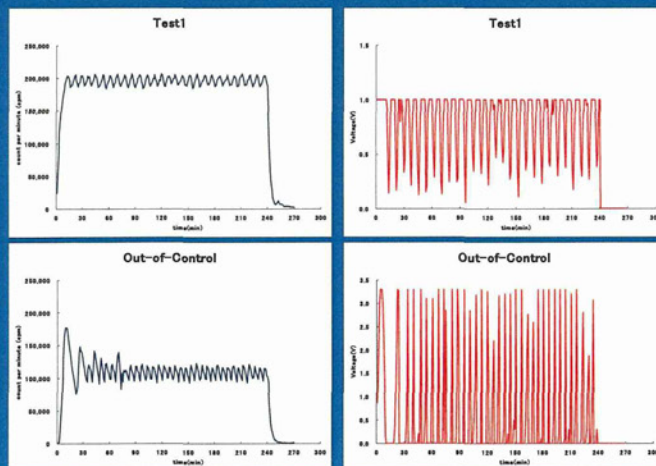
6



# 全身暴露吸入装置の概略



## 暴露チャンバー内の相対濃度推移と スピーカー駆動電圧推移

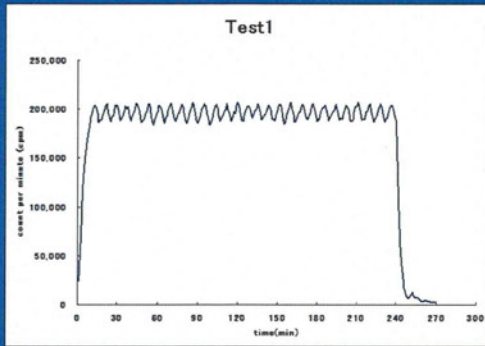


目標濃度200,000 cpm、4時間の暴露を行った場合の相対濃度推移(左図)とスピーカー駆動電圧推移(右図)の代表例。上段は十分に制御された状態(Test1)。スピーカー駆動電圧は常に出力されている。下段は制御が出来ない場合(Out-of-Control)。スピーカー駆動電圧はオン/オフを繰り返している。

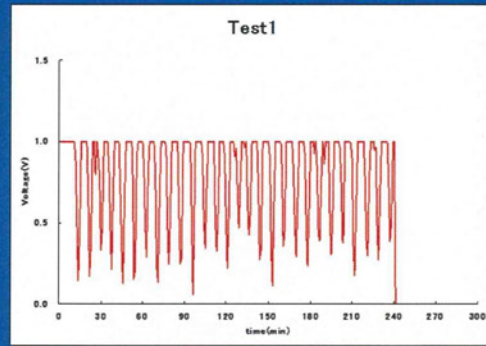


# 相対濃度が十分に制御できた場合の質量濃度

暴露チャンバー 相対濃度 (CPM)

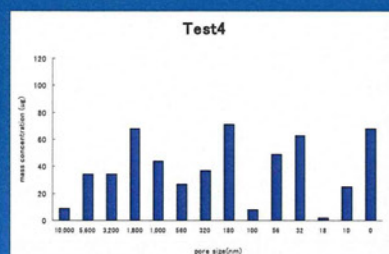
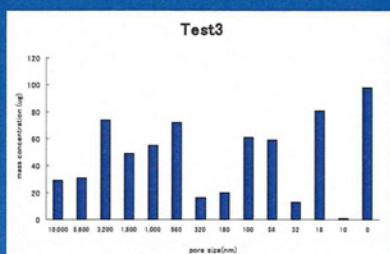
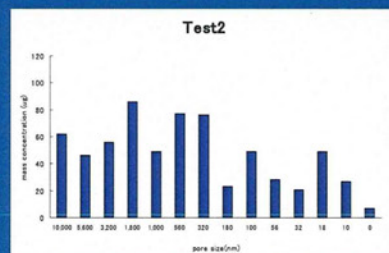
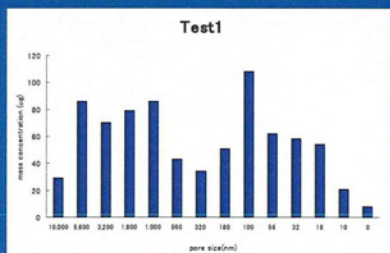


DF-7 電圧推移



		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

# 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。実験毎に異なった分布を示した。



## まとめ

1. ダスト発生装置からの送風量の検討  
2 L/minの送風量で安定した結果が得られた
2. 音響周波数の検討  
基底周波数 ; 20 Hz、周波数の変動範囲 ; 10 Hz (20Hz~30Hz)、  
可変時間 ; 10秒
3. PID制御パラメータの検討  
比例定数0.481、積分定数16.3sec、微分定数2.42sec
4. 暴露チャンバー内の質量濃度測定  
MWCNT原末を用い、相対濃度の目標値を200,000 cpm、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、平均質量濃度は  
275.3 ± 28.5 µg/m<sup>3</sup>であった。粒度分布は実験毎に異なった。

## 予測される成果

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。

人の実際の暴露様式に即した全身暴露吸入方法と、分散性に優れたTaquann法処理-MWCNTを組み合わせることにより、人への外挿性の高いデータが得られることが期待される。



## 今後の計画

平成24年度からは、分散性優れたTaquann法処理MWCNTを検体として使用する（Taquann法の詳細は高橋の分担研究を参照）

### <平成24年度>

- Taquann法処理MWCNTを用い、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する。
- Taquann法処理MWCNTを用い、マウスに単回/反復暴露を行う。マウスはC57BL/6（野生型マウス）を使用し、急性及び慢性反応についての病理組織学的評価、MWCNTの組織沈着量、DNAマイクロアレイ解析に供する。

### <平成25年度>

- Taquann法処理MWCNTを用い、マウスに反復暴露を行う。マウスはC57BL/6（p53ヘテロ欠損マウス）を使用し、腫瘍性病変の誘発までを観察する実験に供する。

2012年10月5日 今井田班会議

# DNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現 変動解析

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

高木 篤也

## 背景

# MWCNT気管内投与ラット肺のマイクロアレイ 解析

(ナノ材料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  
福島班)



## 目的

ナノ材料の生体障害作用を分子レベルで明らかにするため、長野班員との共同で、gpt deltaラット雄にナノ材料としてMWCNTを単回経気道曝露後、1ヶ月と3ヶ月後の肺を対象とした定量的なマイクロアレイ解析（Percellome法）を行なった。

## Experimental protocol

- ・ Animal : male gpt delta rat (13 weeks old) SLC
- ・ Chemicals : MWCNT (Nano Carbon Technologies 社, NWNT-7)  
直径80-110nm、長さ 5-20 $\mu$ mが $\uparrow$ 27.5%  
Quartz (US Silica社, MIN-U-SIL5) 直径1.6 $\mu$ m
- ・ Vehicle : 0.1%Tween80, PBS
- ・ Administration: single i.t.
- ・ Dose: MWCNT (40 or 160 $\mu$ g/kg), Quartz (160 $\mu$ g/kg)
- ・ Sampling : 1 or 3 M
- ・ Microarray analysis : AFFYMETRIX, Gene Chip Rat Genome 230 2.0  
Array and “Percellome” method

### 病理所見 (1M)

	肺胞マクロ ファージの浸潤	Ⅱ型細胞増生	肉芽形成
対照群			
1001			
1003			
1005			
MWCNT 40 $\mu$ g/匹群			
1103	+	+	
1105	+	+	
1107	+	+	
MWCNT 160 $\mu$ g/匹群			
1201	+	+	+
1205	+	+	+
1207	+	+	+
Quartz 160 $\mu$ g/匹群			
1303	+		
1305	+		
1307	+		

### 病理所見 (3M)

	肺胞マクロ ファージの浸潤	Ⅱ型細胞増生	肉芽形成
対照群			
1002			
1004			
1006			
MWCNT 40 $\mu$ g/匹群			
1102	+	+	
1104		+	
1106	+	+	
MWCNT 160 $\mu$ g/匹群			
1202	+	+	+
1204	+	+	+
1206	+	+	+
Quartz 160 $\mu$ g/匹群			
1302	+		
1304	+	+	
1306	+	+	



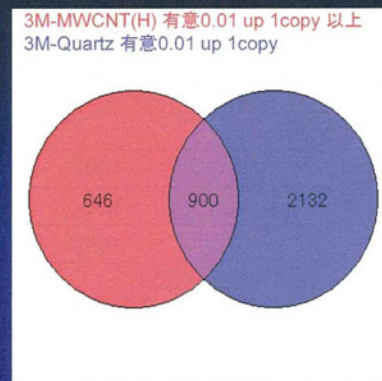
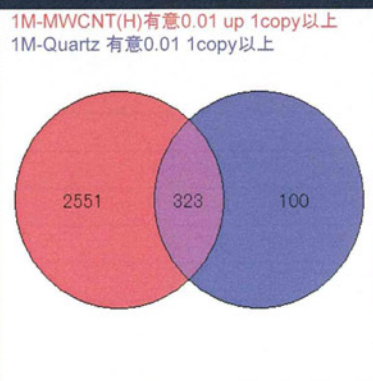
変動遺伝子数 ( $p < 0.05$ 、1copy以上)

	up	down
MWCNT (L) 1M	820	10
MWCNT (H) 1M	2874	36
Quartz 1M	423	203
MWCNT (L) 3M	211	13
MWCNT (H) 3M	1546	4
Quartz 3M	3032	13

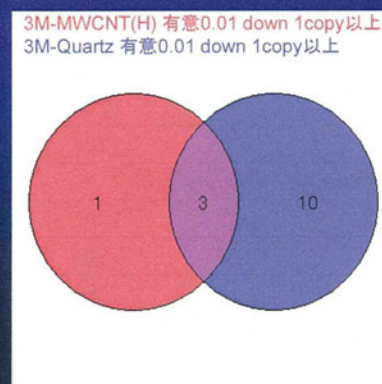
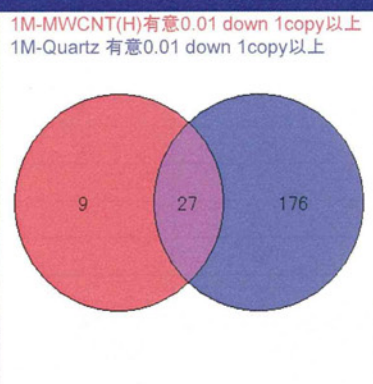
1M

3M

Up



Down



## Gene ontology 解析 (1M)

1M MWCNT & Quartz		1M MWCNT		1M Quartz	
transport	27	transport	188	translation	13
translation	20	metabolic process	123	transport	8
signal transduction	19	regulation of transcription, DNA-dependent	120	metabolic process	7
metabolic process	18	signal transduction	117	regulation of transcription, DNA-dependent	7
immune response	18	protein transport	80	cell differentiation	6
regulation of transcription, DNA-dependent	13	intracellular protein transport	68	multicellular organismal development	6
proteolysis	11	protein amino acid phosphorylation	68	biotin biosynthetic process	5
transcription	10	transcription	65	apoptosis	4
cell adhesion	9	translation	65	cell-cell signaling	4
inflammatory response	9	electron transport	63	signal transduction	4
intracellular protein transport	9	proteolysis	63	synaptic transmission	4
lipid metabolic process	9	ion transport	58	transcription	4
cell proliferation	7	intracellular signaling cascade	51	RNA splicing	3
chemotaxis	7	apoptosis	48	cell adhesion	3
carbohydrate metabolic process	7	immune response	47	cell cycle	3
electron transport	6	vesicle-mediated transport	47	cell cycle arrest	3
ion transport	6	regulation of transcription	42	cell proliferation	3
small GTPase mediated signal transduction	6	cell proliferation	39	electron transport	3
protein amino acid phosphorylation	6	carbohydrate metabolic process	38	induction of apoptosis	3
antigen processing and presentation	6	cell adhesion	38	ion transport	3
multicellular organismal development	5	cell cycle	36	nervous system development	3
apoptosis	5	protein complex assembly	35	regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	3
protein transport	5	small GTPase mediated signal transduction	35	small GTPase mediated signal transduction	3
intracellular signaling cascade	5	ubiquitin cycle	35	ATP synthesis coupled proton transport	2
protein complex assembly	5	negative regulation of cell proliferation	34	body fluid secretion	2
ubiquitin cycle	5	multicellular organismal development	33	brain development	2
fatty acid metabolic process	5	inflammatory response	32	cholesterol transport	2
defense response	5	lipid metabolic process	31	cobalamin biosynthetic process	2
cell-cell signaling	4	cell motility	28	dendrite development	2
cell cycle	4	protein folding	28	endocytosis	2
protein modification process	4	anti-apoptosis	27	generation of precursor metabolites and energy	2
response to drug	4	induction of apoptosis	27	immune response	2
cell motility	4	cell differentiation	26	inflammatory response	2
positive regulation of cell proliferation	4	nervous system development	26	lactation	2
neutrophil chemotaxis	4	G-protein coupled receptor protein signaling pathway	24	lung development	2
G-protein coupled receptor protein signaling pathway	4	protein modification process	24	mRNA processing	2

## Gene ontology 解析 (3M)

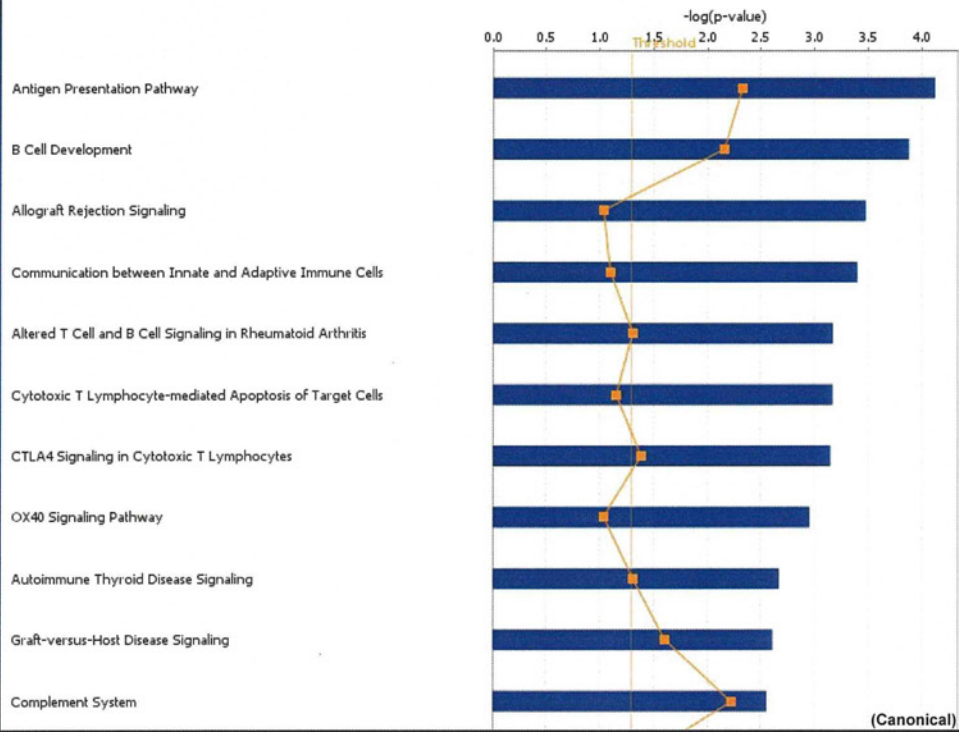
3M MWCNT & Quartz		3M MWCNT		3M Quartz	
transport	72	transport	50	transport	147
regulation of transcription, DNA-dependent	46	regulation of transcription, DNA-dependent	37	regulation of transcription, DNA-dependent	114
signal transduction	45	metabolic process	28	signal transduction	113
metabolic process	38	protein transport	28	metabolic process	86
protein transport	30	transcription	24	translation	84
protein amino acid phosphorylation	26	signal transduction	23	transcription	61
electron transport	26	intracellular protein transport	19	protein amino acid phosphorylation	57
transcription	24	protein amino acid phosphorylation	18	protein transport	53
proteolysis	23	vesicle-mediated transport	17	electron transport	52
intracellular protein transport	23	proteolysis	16	immune response	49
ion transport	23	intracellular signaling cascade	15	proteolysis	47
multicellular organismal development	23	cell cycle	14	intracellular signaling cascade	46
immune response	21	electron transport	13	intracellular protein transport	42
apoptosis	19	translation	13	apoptosis	41
translation	18	small GTPase mediated signal transduction	12	ion transport	41
nervous system development	17	apoptosis	11	cell adhesion	40
cell adhesion	16	cell adhesion	11	multicellular organismal development	40
cell proliferation	16	induction of apoptosis	10	cell proliferation	40
cell cycle	16	regulation of transcription	10	protein folding	35
ubiquitin-dependent protein catabolic process	16	ER to Golgi vesicle-mediated transport	9	cell cycle	33
small GTPase mediated signal transduction	15	ion transport	9	lipid metabolic process	33
ubiquitin cycle	14	mRNA processing	9	ubiquitin cycle	32
cell differentiation	14	RNA splicing	8	small GTPase mediated signal transduction	31
cell motility	14	multicellular organismal development	8	vesicle-mediated transport	30
regulation of transcription	14	transcription from RNA polymerase II promoter	8	carbohydrate metabolic process	29
regulation of apoptosis	14	ubiquitin cycle	8	inflammatory response	29
lipid metabolic process	13	cell proliferation	7	anti-apoptosis	29
carbohydrate metabolic process	13	lipid metabolic process	7	cell differentiation	27
protein modification process	13	negative regulation of transcription	7	positive regulation of cell proliferation	27
G-protein coupled receptor protein signaling pathway	13	protein folding	7	negative regulation of cell proliferation	25
protein folding	12	protein targeting	7	protein modification process	25
vesicle-mediated transport	12	regulation of translation	7	G-protein coupled receptor protein signaling pathway	25
inflammatory response	12	cell differentiation	6	cell motility	24
anti-apoptosis	12	cell division	6	response to stress	24
negative regulation of cell proliferation	11	cell motility	6	regulation of transcription	22



## Pathway 解析 (1M MWCNT & Quartz)

Analysis: 1M up and - 2010-12-16 04:07 午後

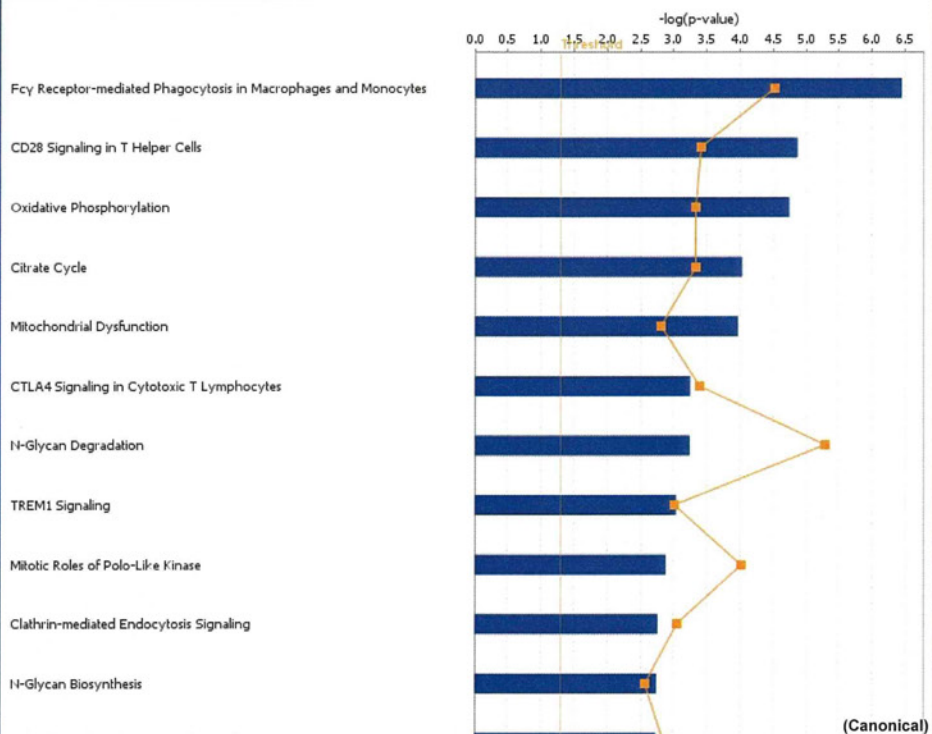
■ 1M up and - 2010-12-16 04:07 □ □ □ ■ - Ratio



## Pathway 解析 (1M MWCNT)

Analysis: 1M Mw sub - 2010-12-16 04:16 午後

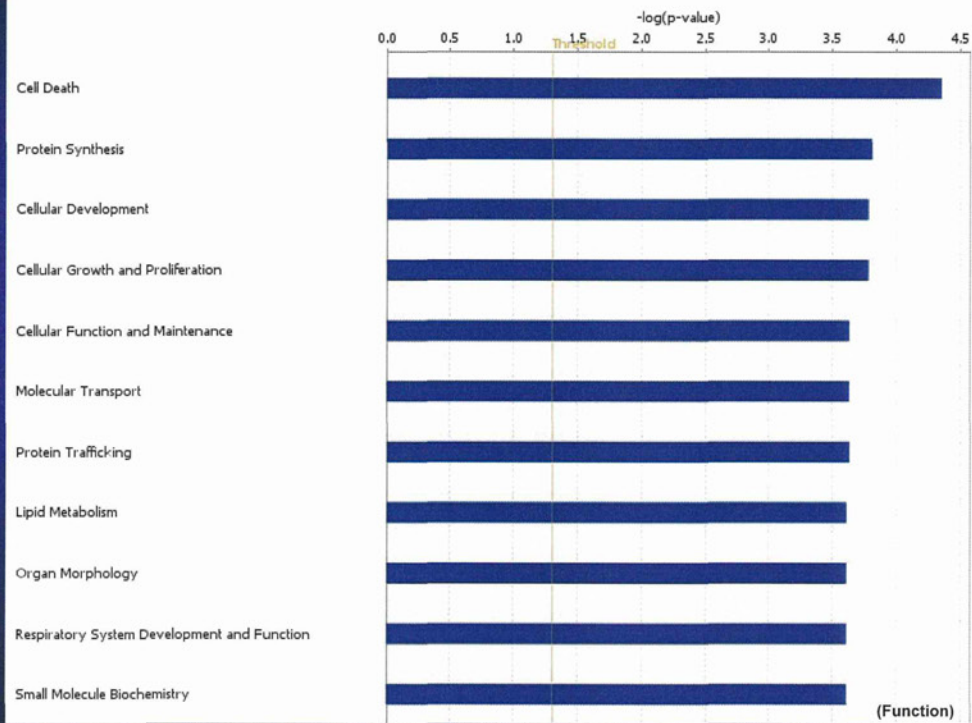
■ 1M Mw sub - 2010-12-16 04:16 □ □ □ ■ - Ratio



## Pathway 解析 (1M Quartz)

Analysis: 1M quartz sub - 2010-12-16 04:30 午後

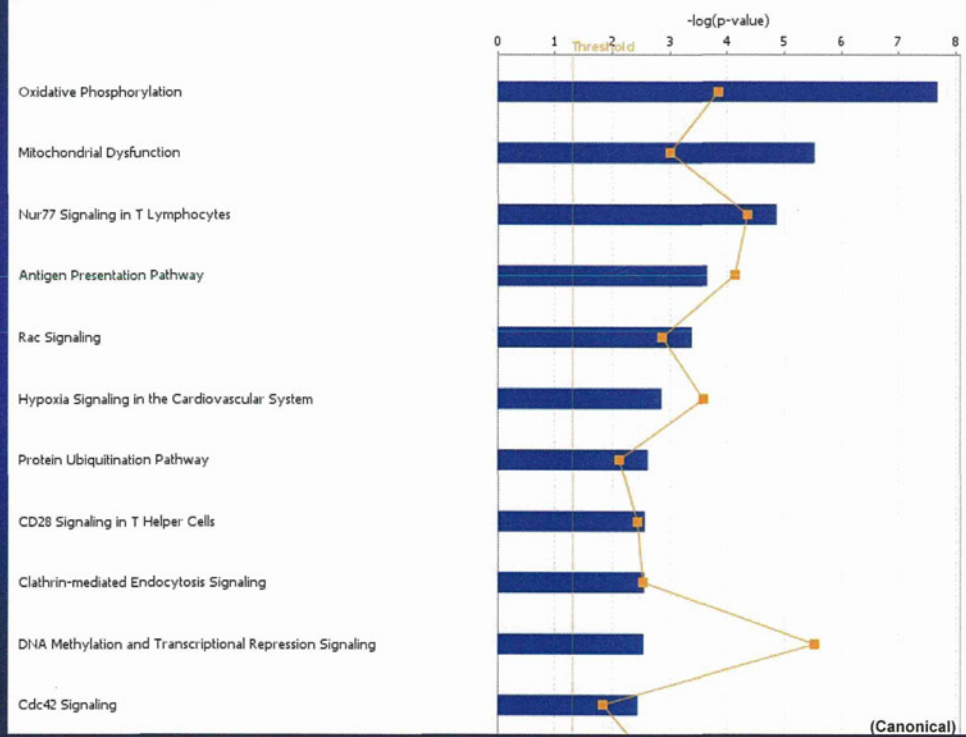
■ 1M quartz sub - 2010-12-16 04:30 □ □



## Pathway 解析 (3M MWCNT & Quartz)

Analysis: 3M up MW & Q - 2010-12-16 04:40 午後

■ 3M up MW & Q - 2010-12-16 04:40 □ □ Ratio

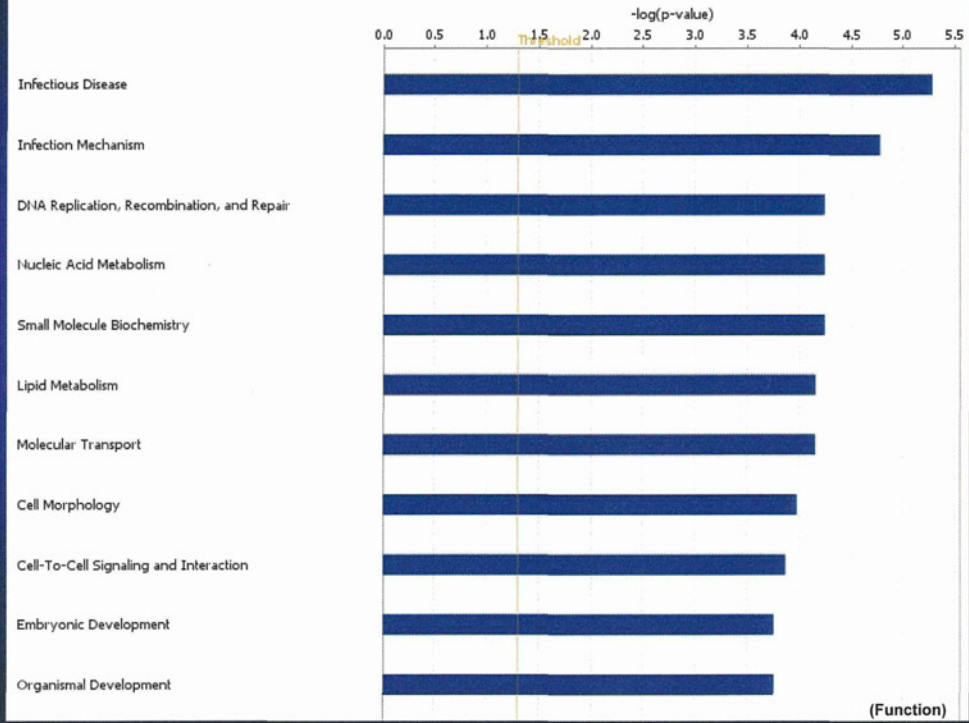




## Pathway 解析 (3M MWCNT)

Analysis: 3M up MW sub - 2010-12-16 04:50 午後

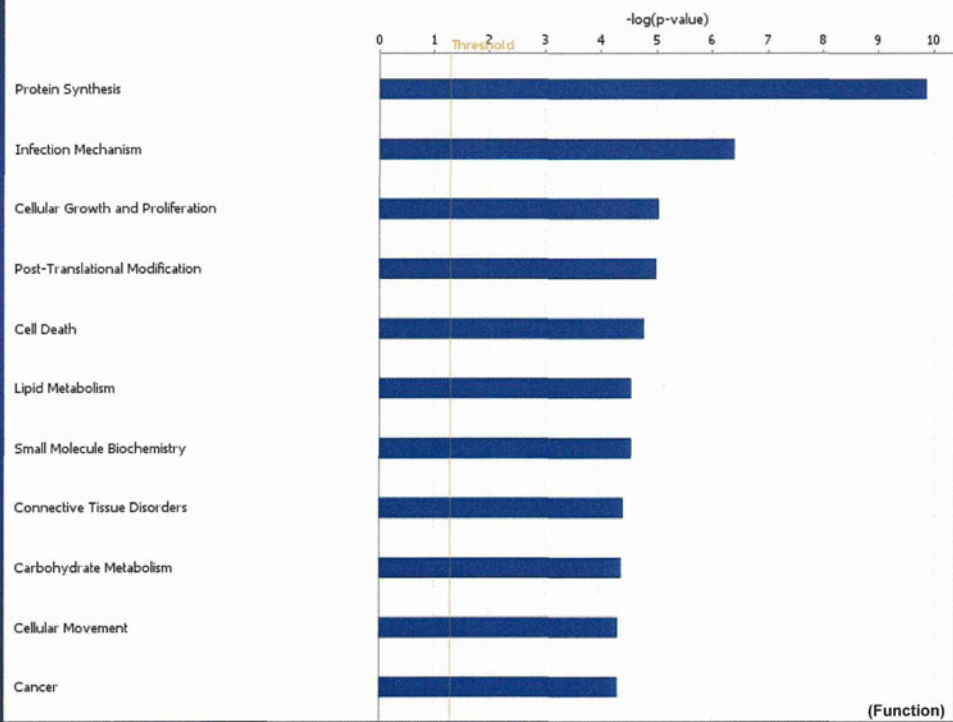
■ 3M up MW sub - 2010-12-16 04:50 □ □



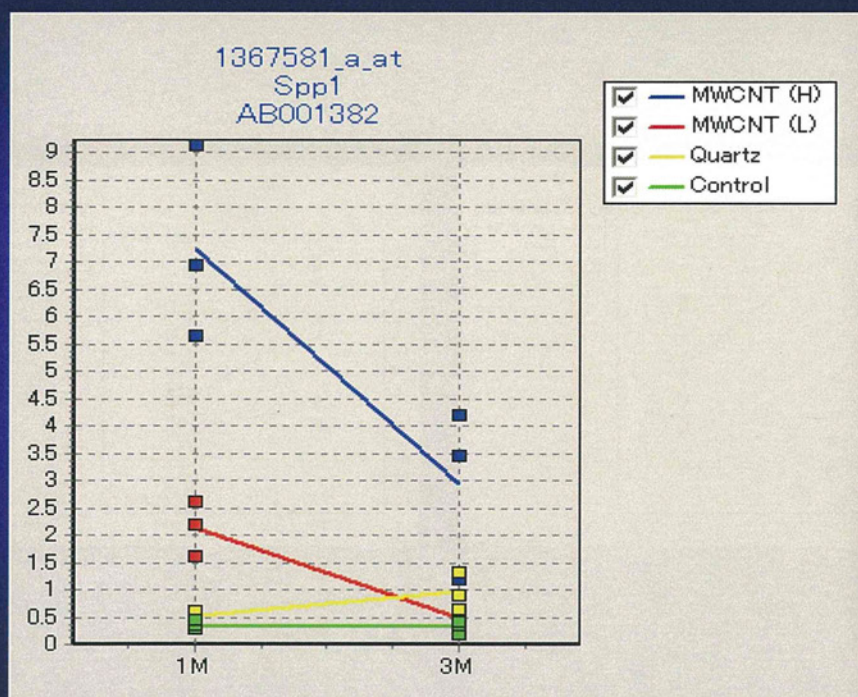
## Pathway 解析 (3M Quartz)

Analysis: 3M up Q sub - 2010-12-16 05:10 午後

■ 3M up Q sub - 2010-12-16 05:10 □ □



## Osteopontin



## 病理所見 (1M)

	肺胞マクロ ファージの浸潤	Ⅱ型細胞増生	肉芽形成
<b>対照群</b>			
1001			
1003			
1005			
<b>MWCNT 40 μg/匹群</b>			
1103	+	+	
1105	+	+	
1107	+	+	
<b>MWCNT 160 μg/匹群</b>			
1201	+	+	+
1205	+	+	+
1207	+	+	+
<b>Quartz 160 μg/匹群</b>			
1303	+		
1305	+		
1307	+		