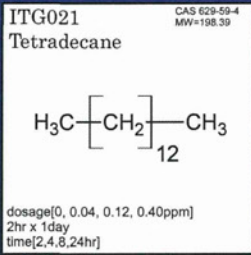
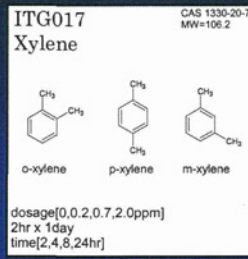
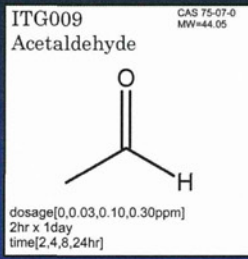
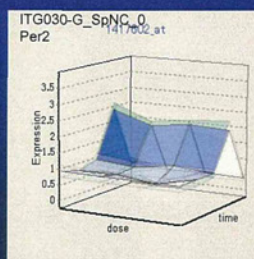
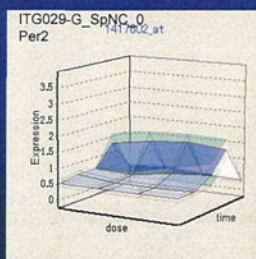
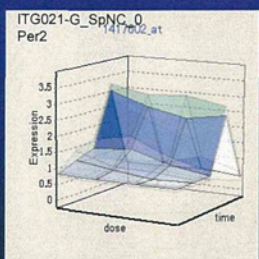
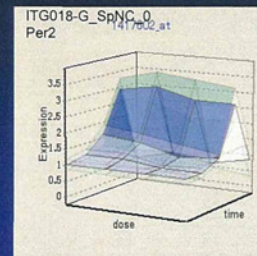
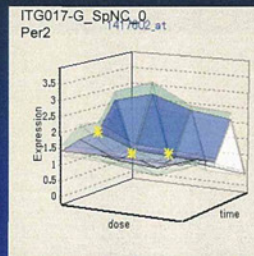
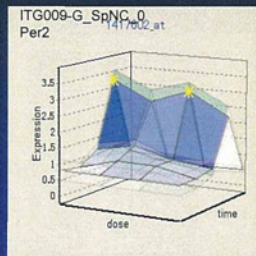
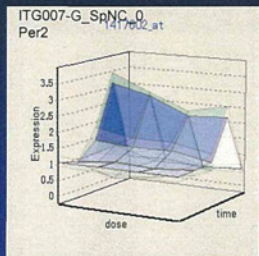


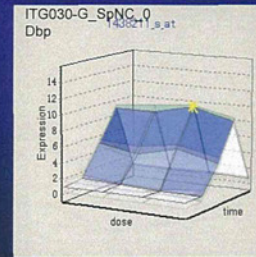
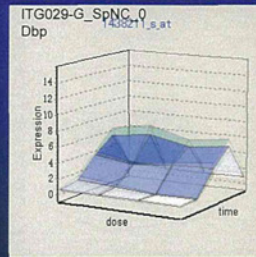
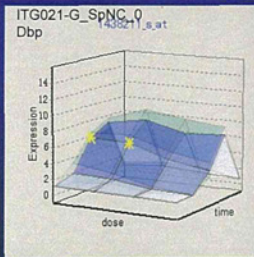
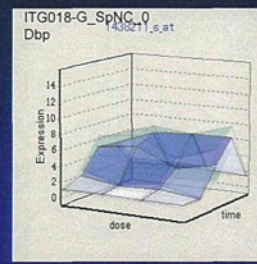
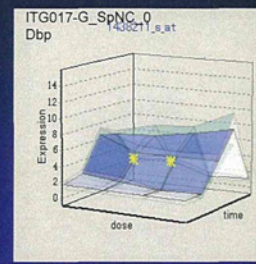
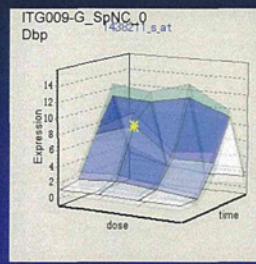
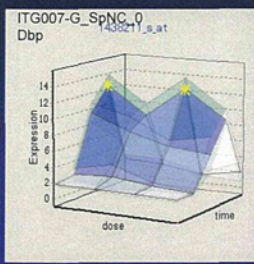
化合物



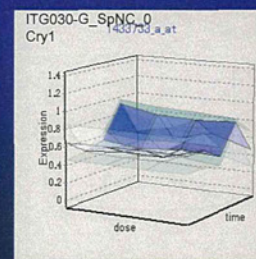
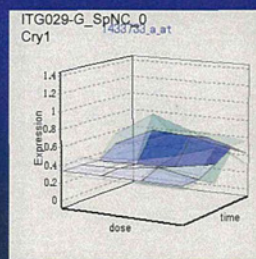
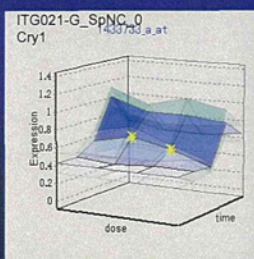
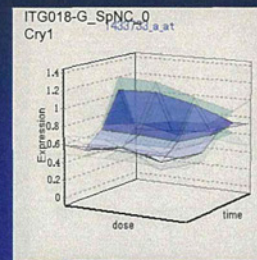
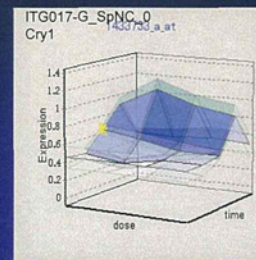
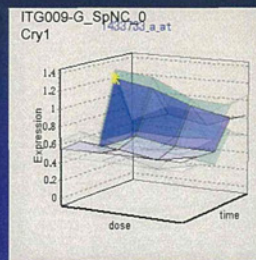
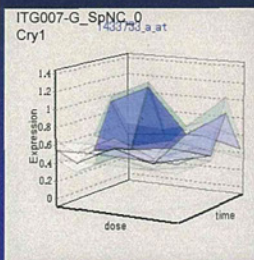
Per2



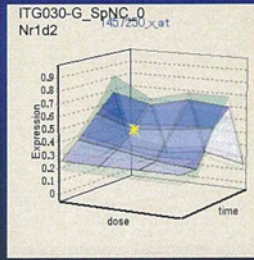
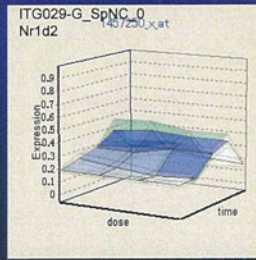
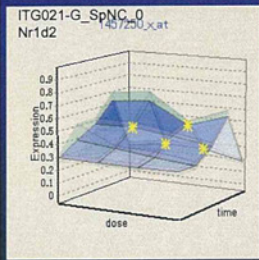
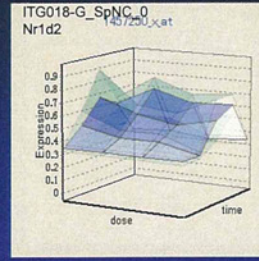
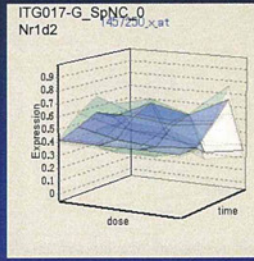
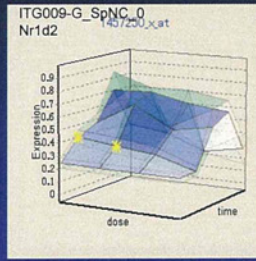
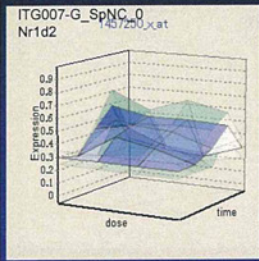
Dbp



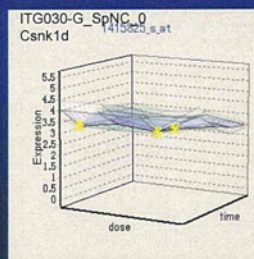
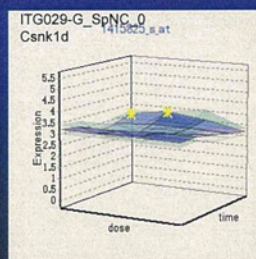
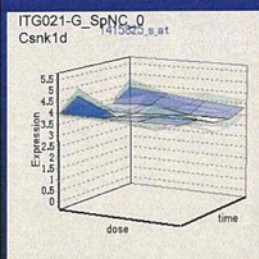
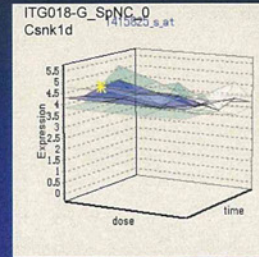
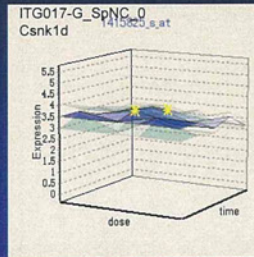
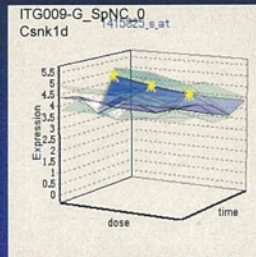
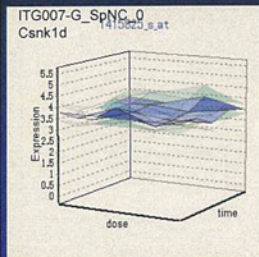
Cry1



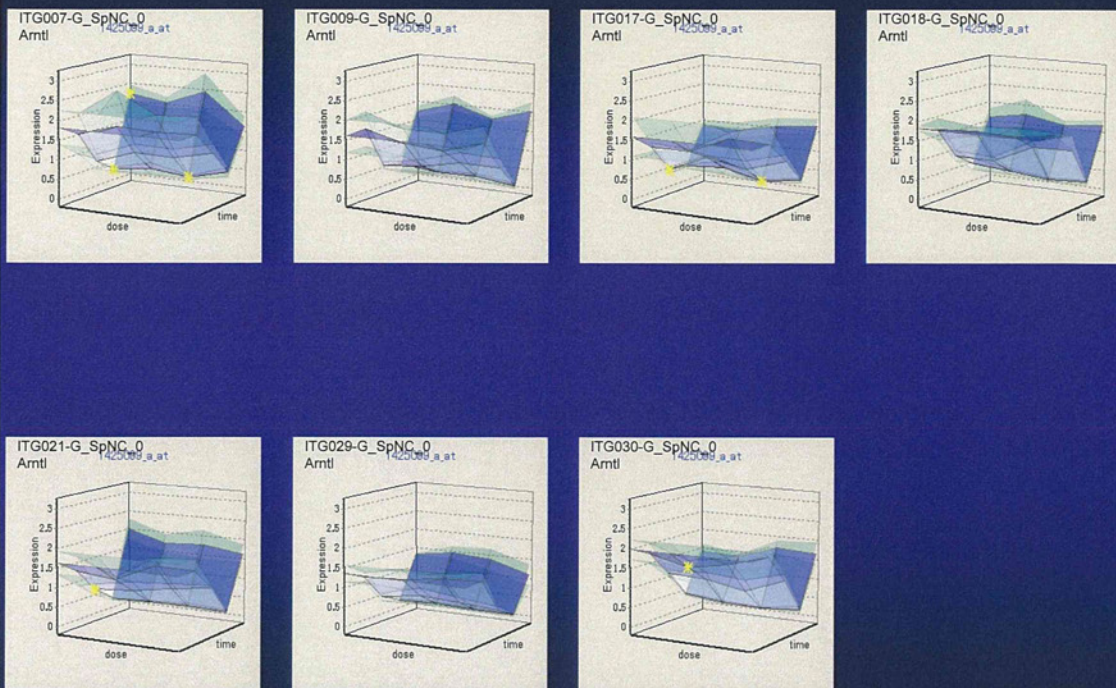
Nr1d2



Csnk1d



Arntl



まとめ

1. マウス肺の遺伝子発現に及ぼすMWCNT吸入曝露の影響を分子レベルで明らかにするため、マイクロアレイ解析を実施し、変動する遺伝子を同定した。
2. IPA解析から免疫系の遺伝発現増加が抽出された。
3. 変動遺伝子中に複数のCircadian rhythm関連遺伝子が含まれていた。これらの変動の一部は、先に実施したラットMWCNT曝露でも確認された。さらに、ITGデータベースの解析結果からは、MWCNTと類似した発現パターンを示すものはなかった。このことから、Circadian rhythmの変動は、粒子状物質の肺における炎症反応に関連している可能性が示唆された。
4. 今後、Taquann法処理MWCNTを吸入曝露させ、同様にマイクロアレイ解析を実施し、肺病変発生と対比させ詳細に検討する予定である。

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 肺の病理組織学的評価 (慢性及び腫瘍性病変)

香川大学医学部腫瘍病理学 今井田 克己

1. MWCNT の組織内での検出評価方法の検討

- 分光蛍光光度計による検討
- シングルフォトンレーザー顕微鏡による検討
- ハイパーイメージング装置による検討

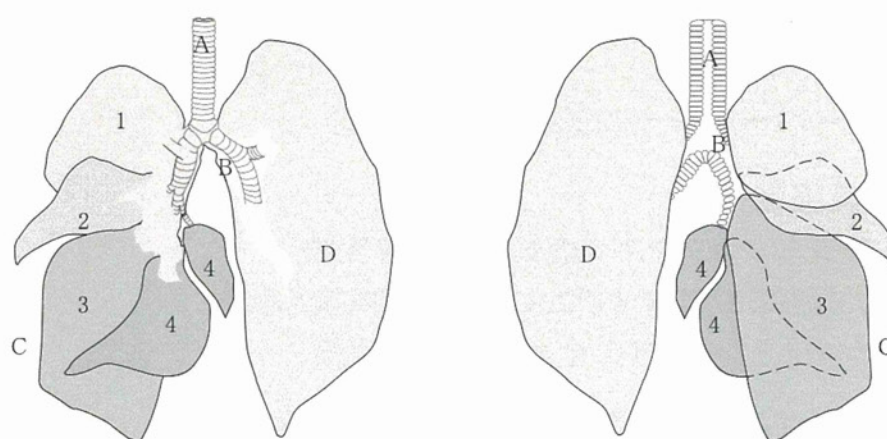
2. 予備実験

- 58週齢A/Jマウスへの気管内投与実験
- 12週齢C57BL6/Jマウスへの気管内投与実験
- C57BL6/Jマウスの全身暴露投与実験

3. MWCNTの気管内投与による慢性毒性の検討

- 12週齢C57BL6/Jマウスへの気管内投与実験
- 6週齢F344ラットへの気管内投与実験

1. MWCNT の組織内での検出評価方法の検討



ラットおよびマウスの呼吸器系の外貌

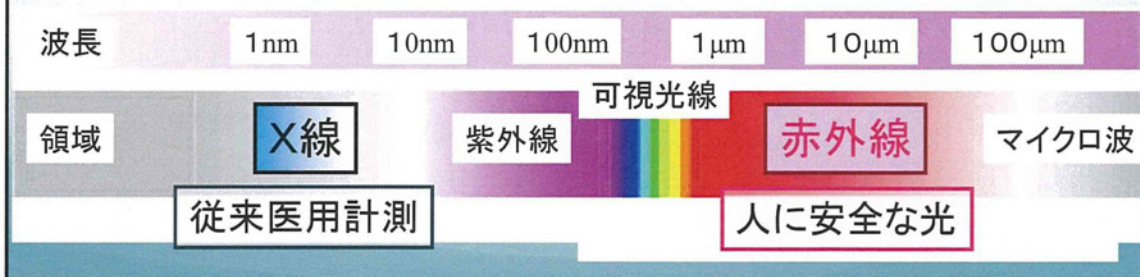
A:気管, B:気管支, C:右葉, D:左葉, 1:上葉, 2:中葉, 3:下葉, 4:副葉

MWCNT の光学的特性の検討 ①

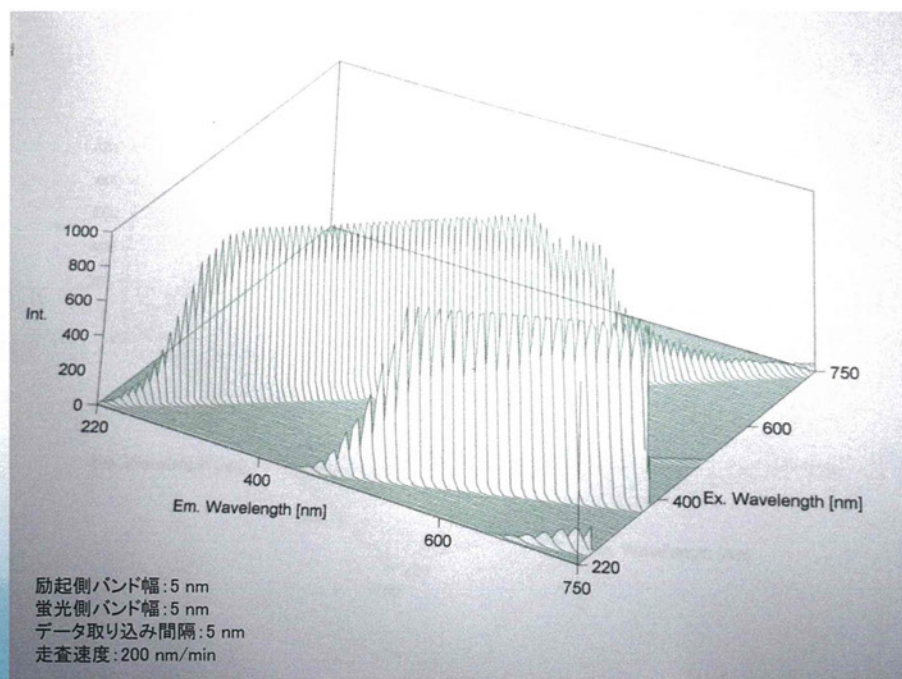
物質: MWCNT (Taquann法処理)

溶媒: t-BtOH

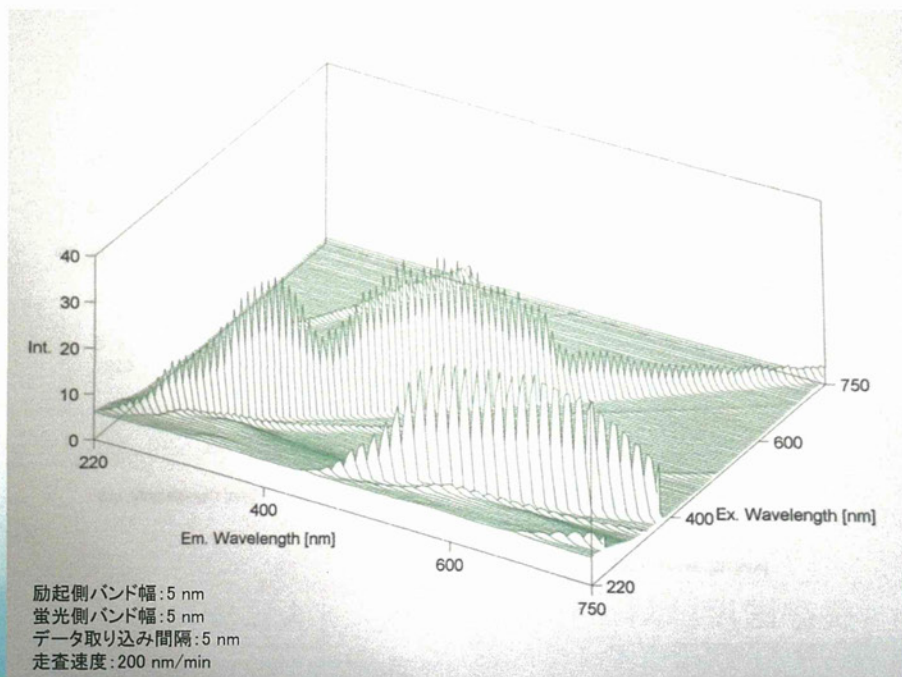
t-BtOH に分散した MWCNT を蛍光光度計にて、励起 (220-750 nm) を行い、発せられた蛍光を3次元スペクトル解析した。



蛍光光度計観察結果 (MWCNT in t-BtOH)



蛍光光度計観察結果 (t-BtOH)



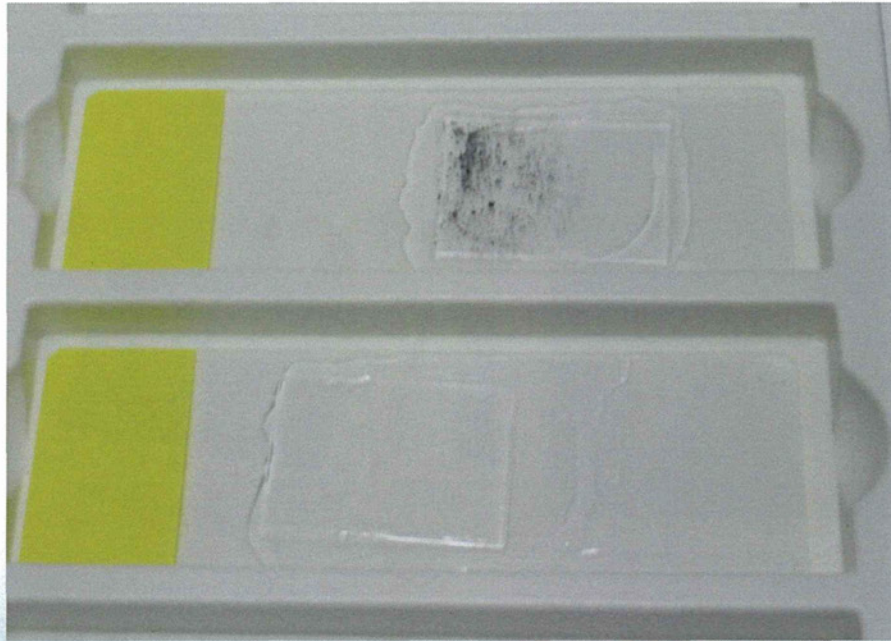
MWCNTの光学的特性の検討 ②

物質: MWCNT (Taquann法処理)

溶媒: t-BtOH

t-BtOH に分散した MWCNT を無蛍光なスライドガラスに塗布し、カバーガラス圧着後、封入剤で周囲をコーティングし標本を作成した。

シングルフォトンレーザー顕微鏡(455, 488, 555, 639nm)にて、励起を行い、蛍光を発するか観察した。



455, 488, 555, 639nmの波長のシングルフォトンレーザーによる励起では、蛍光は観察できなかった。

シングルカーボンナノチューブの観察法

4Cp02 単層カーボンナノチューブの近赤外蛍光分光

(東大院工) ○丸山茂夫・宮内雄平・村上陽一・千足真平・枝村理夫

【はじめに】

単層カーボンナノチューブ(Single-Walled Carbon Nanotubes, SWNTs)の最も特徴的な物性は、カイラル指数(n, m)によってユニークに決定される幾何学形状によって、金属や半導体になる電子特性であり、電子デバイスや光学デバイスとしての応用を考える場合には金属ナノチューブと半導体ナノチューブを併せて分ける必要がある。さらに、半導体ナノチューブのバンドギャップは対称性とその直径にほぼ比例するが、金属ナノチューブもまた詳細な電子構造はカイラリティに依存し、究極的にはカイラリティを制御した合成あるいは分離が必要となる。一方、SWNTsの合成に関しては、レーザーアブレーションやアーク放電法に加えて、大量合成と基板への蒸着合成の可能性を有する触媒 CVD 法が注目されており、Smalley らが開発した HiPco 法[1,2]やアルコールを供養源とした触媒 CVD 法(ACCCVD 法)[3-6]によって高品質な SWNTs の大量合成も進められている。本研究では、ACCCVD 法による SWNTs と HiPco 法による SWNTs とに対して、昨年発表された近赤外蛍光分光法[7,8]を適用して、カイラリティ分布の測定を行い、カイラリティを制御した SWNTs 合成の第一歩とする。

【実験装置・方法】

著者はアルコールを供養源とする触媒 CVD 法(ACCCVD 法)によって低圧で高純度の単層カーボンナノチューブの生成が可能であることを示した[3,4]。簡易には、酢酸鉄($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Fe}$) および酢酸[コバルト($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Co-H}_2\text{O}$)]をエタノールに溶解させて耐熱性の Y 型ゼオライト(HSZ-390HA)粉末を加えることによって、それぞれ 2.5wt% の Fe/Co 複合粒子を担持させた。その際、図 1 に示す簡易な装置に上記触媒を置いて、電気を一定温度(850°C)まで昇温する同 30kHz の超音波を 300sec 間照射し、エタノールを真空とした後で 10 Torr 程度のエタノールを 10 分間反応させて SWNTs を合成した。ACCCVD 法サンプルと比較して Rice 大学から供給された HiPco サンプル(batch: HPR113.4)を用いた。生成直後のサンプルを顕微鏡分光(セネテック トロン STR250)によって計測するとともに、カップ・ホーン型の超音波分散機(Hielscher GmbH, UP-400S, 460W/cm²)で界面活性剤(SDS 1%)を加えた D_2O 溶液に分散させ、遠心分離(20,627g × 24h)の上澄みの孤立した SWNTs が多いサンプルを可視・近赤外吸収分光(HITACHI U-4000)および近赤外蛍光分光(Horiba JY SPX FLUOROLOG-311)で分析した。近赤外蛍光分光に関しては、Xe ランプ光源の光を指形用モノクロメータで分光して単色励起としこれを 500nm から 900nm の範囲でスキャンし、蛍光は検出用モノクロメータで分光して、900nm から 1300nm の範囲を液体窒素冷却 InGaAs 検出器で計測した。励起/検出光ともにスリット幅を 10nm 固定ステップを 5nm、積分時間は 2 秒とした。

【結果・考察】

各径ラマン散乱による Radial Breathing Mode (RBM) の測定結果を図 2 に Kataura プロットと比較し

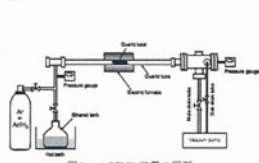


図 1 ACCVD 装置の概観

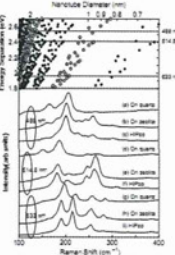


図 2 ラマン散乱の比較 (RBM)

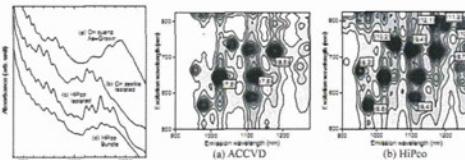


図 3 吸収分光

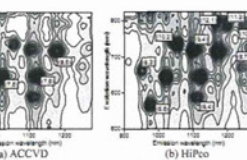


図 4 赤外蛍光分光の 3 次元マップ

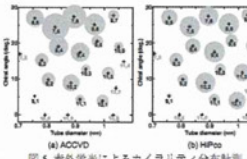


図 5 赤外蛍光によるカイラリティ分布計測

て示す。3 通りの励起光による RBM からサンプルの直径分布がおよそわかり、HiPco とゼオライト担持 ACCVD の SWNTs の直径分布が極めて近いことがわかる。詳細に比較するとわずかに HiPco の方が直径の太い側に分布している。また、ACCCVD 法によって石英基板に直接合成した SWNTs は明らかに太い直径となっており、かつピーク位置がわずかに高エネルギー側にずれている。

図 3 には吸収分光結果を示す。石英基板に生成した直後のサンプル(a)(6)および遠心分離していない HiPco サンプル(d)と比較して、(b,c)の遠心分離したサンプルではシャープな構造が観察される。これらの孤立化したサンプルではピーク位置は一貫しており、HiPco の方が低エネルギー側に(直径の太い方)に広い分布をもつことがわかる。

励起波長をスキャンして近赤外蛍光スペクトルを測定し、励起波長と発光波長の関数として蛍光強度をプロットした蛍光 3 次元マップを図 4 に示す。図 3 の(b,c)に対応するサンプルで ACCVD と HiPco とを比較している。蛍光 3 次元マップにおけるピーク位置は Weisman らの報告[8]と完全に一致し、彼らのアサインによるカイラリティも図 4 に示した。ACCCVD 法による SWNTs のピークは明らかに HiPco の場合と比べて少なく、(7,5), (7,6), (8,6)に対応するピークが顕著しており、カイラリティが選択的に生成できているとも考えられる。

図 5 は直径とカイラル角でつくる平面に図 4 における各ピークの高さが兩種となる円のプロットしてカイラリティ分布を表現した。HiPco の分布はカイラル角に対して比較的一様で特別な armchair 側(カイラル角が 30 度に近い側)に分布するようには見えないが、ACCCVD の結果はこの傾向が明確に現れている。

【文献】

- [1] P. Nikolaev, M.J. Bronikowski, R.K. Bradley, F. Rohmund, D.T. Colbert, K.A. Smith, R.E. Smalley, Chem. Phys. Lett. 313 (1999) 91-97.
- [2] M.J. Bronikowski, P.A. Willis, D.T. Colbert, K.A. Smith, R.E. Smalley, J. Vac. Sci. Technol. A 19 (2001) 1800-1805.
- [3] S. Maruyama, R. Kojima, Y. Miyazaki, S. Chiashi, M. Kohno, Chem. Phys. Lett. 360 (2002) 229-234.
- [4] Y. Murakami, Y. Miyazaki, S. Chiashi, S. Maruyama, Chem. Phys. Lett. 374 (2003) 55-58.
- [5] Y. Murakami, S. Yamakita, T. Okubo, S. Maruyama, Chem. Phys. Lett. 375 (2003) 393-398.
- [6] Y. Murakami, Y. Miyazaki, S. Chiashi, S. Maruyama, Chem. Phys. Lett. 377 (2003) 49-54.
- [7] M.J. O'Connell, S.M. Bachilo, C.B. Huffman, V.C. Moore, M.S. Strano, E.H. Haroz, K.L. Rialto, P.J. Boul, W.H. Noon, C. Kittrell, J. Ma, R.H. Hauge, R.B. Weisman, R.E. Smalley, Science 297 (2002) 593-596.
- [8] S.M. Bachilo, M.S. Strano, C. Kittrell, R.H. Hauge, R.E. Smalley, R.B. Weisman, Science 298 (2002) 2361-2366.

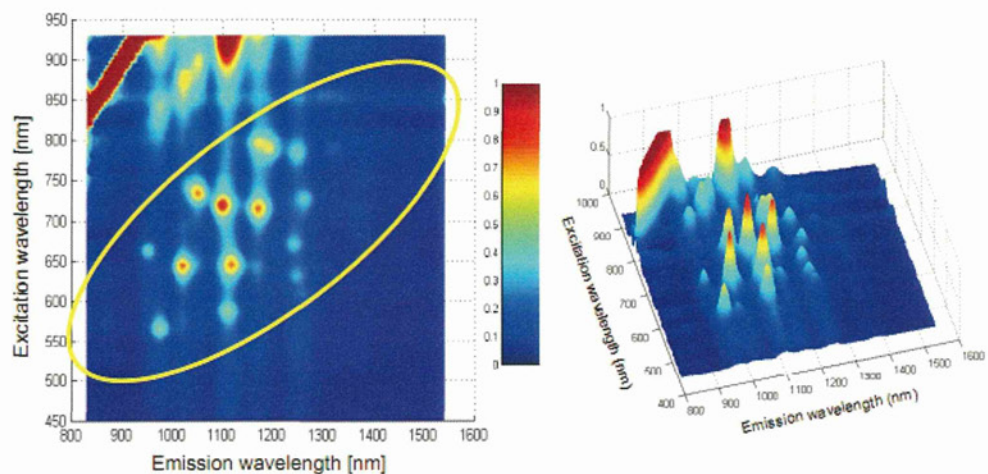
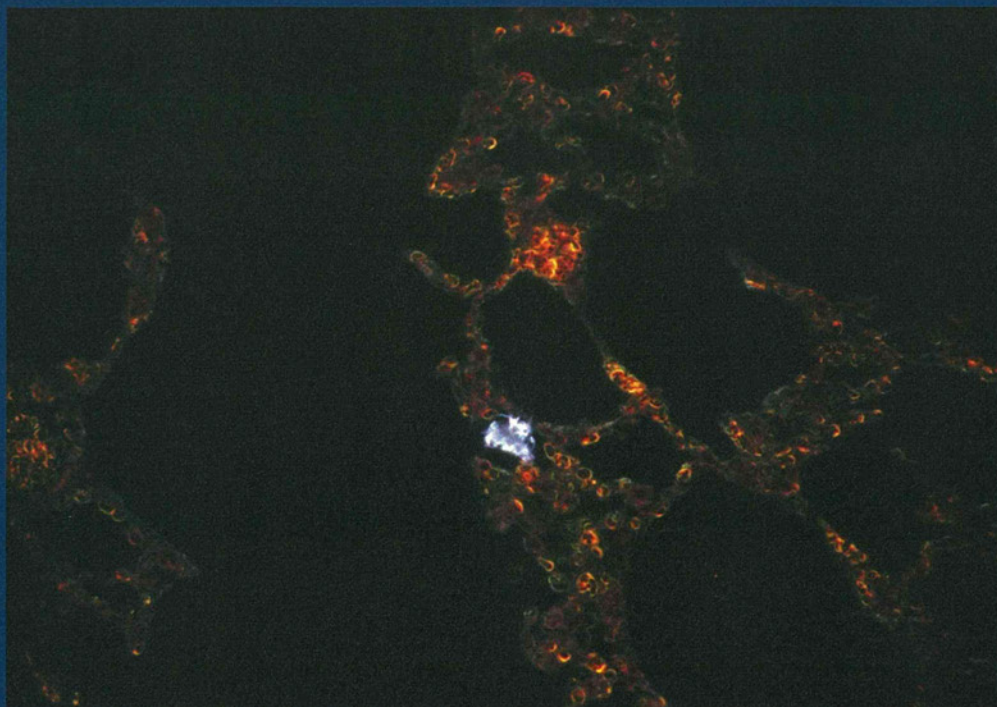


Fig.3.2 Contour plot and 3-D plot of normalized fluorescence intensity versus excitation and emission wavelength for SWNTs synthesized by HiPco process.

丸山茂夫教授 東京大学大学院 工学系研究科 機械工学専攻

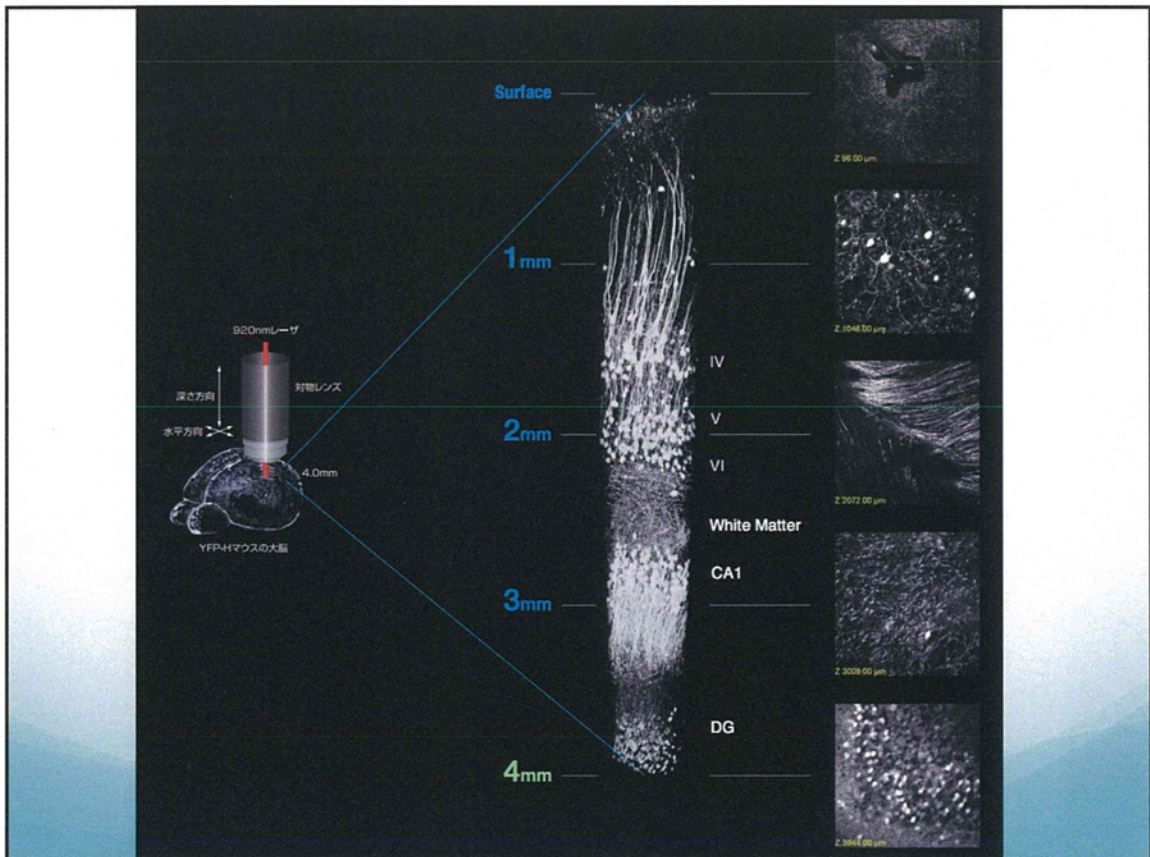
ハイパーイメージング装置による検討(国立衛研)



組織透明化液による検討



- 独立行政法人理化学研究所が開発した組織透明化液。
- 生体から散乱を取り除き、外観から深部まで観察することが可能。
- 現在のところ、マウスの脳組織にて報告がある。



SCALEVIEW-A2

お願い

- ・常温(2~35℃)で直射日光を避けて保管下さい。
- ・ご使用後は、本体ネジ部をきれいに拭いてからキャップを締めて下さい。
- ・キャップが開いたまま放置されると乾燥により性能が多化します。
- ・冷蔵庫以下で保管した場合、成分が析出することがあります。室温(25℃程度)放置により溶解し性能は復帰します。
- ・使用後、対物レンズ先端に付着しているSCALEVIEW-A2はガーゼで乾拭きと水拭き後、極少量の無水アルコールをガーゼに含ませて入念に拭き取して下さい。
- ・SCALEVIEW-A2(アルカリ溶液pH9前後)や容器(プラスチック)を廃棄する場合には、地方自治体の法規に従って廃棄して下さい。
- ・SCALEVIEW-A2は、無垢の鉄、銅、鍍金、アルミ等を腐食させることがあります。
- ・1,300 nmより長い波長を利用する場合、取得画像が暗くなります。

安全に関するお願い

- △皮膚に付着しますと皮膚炎が起こる場合もあります。
- 万一皮膚に付着したり目に入った場合は早急に以下の処置を行って下さい。
- 皮膚に付着した場合:水及び石鹸で洗い流す。外観に変化があるか、痛みが続く場合は、直ちに医師の診断を受ける。
- 目に入った場合:きれいな水で洗眼(15分以上)し、直ちに医師の診断を受ける。
- 飲み込んだ場合:嘔吐させること。水で口の中をよく洗う。直ちに医師の診断を受ける。

実験プロトコル例

以下の内容は、オリジナル論文(1)におけるマウス脳の透明化実験の概略です。

1. マウスを4% paraformaldehyde (PFA)/PBSで灌流固定する。
2. 脳を取り出した後、4%PFA/PBSで固定(4℃、10 hrs)し、20%Sucrose/PBSに置換(4℃、24 hrs)する。
3. OCTコンパウンドで包埋し、凍結する。
4. 凍結した脳を解凍・洗浄し、4%PFA/PBSで再固定する(室温、20 min)。
5. 固定された脳をSCALEVIEW-A2中に浸漬する。

アダルトマウス脳1個につき30 ml以上のSCALEVIEW-A2をご使用下さい。

透明化には1週間以上必要です。
浸漬中は、シェーカー等でゆっくり振とうさせてください。
1日毎にSCALEVIEW-A2を交換すると、透明化が進みやすくなります。

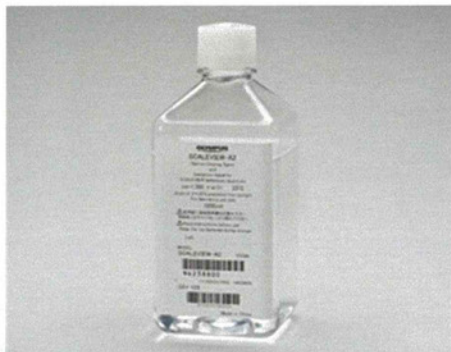
SCALEVIEW-A2に浸漬することで、脳は1方向につきニアに10~30%程度膨潤します。

6. 脳が透明化した後、SCALEVIEW-A2を浸液として使用し、深部観察が可能です。
観察時、必要に応じて脳が動くことを防ぐためにアガロースなどで容器底面に脳を固定して下さい。
7. 観察が終わったら、脳を再びSCALEVIEW-A2で浸漬し保存することが可能です。

文献(1)

Hiroshi Hama, Hiroshi Kurokawa, Hiroyuki Kawano, Ryoko Ando, Tomomi Shimogori, Hisayori Noda, Kiyoko Fukami, Asako Sakaue-Sawano & Atsushi Miyawaki
Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain
Nature Neuroscience, advance online publication, 30 August 2011 (doi:10.1038/nn.2928)

オリンパス株式会社



実験プロトコル例

以下の内容は、オリジナル論文(1)におけるマウス脳の透明化実験の概略です。

1. マウスを4% paraformaldehyde (PFA)/PBSで灌流固定する。
2. 脳を取り出した後、4%PFA/PBSで固定(4℃、10 hrs)し、20%Sucrose/PBSに置換(4℃、24 hrs)する。
3. ~~OCTコンパウンドで包埋し、凍結する。~~
4. ~~凍結した脳を解凍・洗浄し、4%PFA/PBSで再固定する(室温、20 min)。~~
5. 固定された脳をSCALEVIEW-A2中に浸漬する。

アダルトマウス脳1個につき30 ml以上のSCALEVIEW-A2をご使用下さい。

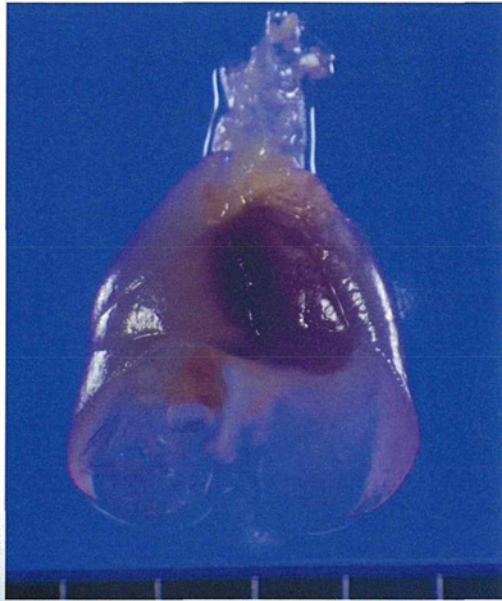
透明化には1週間以上必要です。
浸漬中は、シェーカー等でゆっくり振とうさせてください。
1日毎にSCALEVIEW-A2を交換すると、透明化が進みやすくなります。
SCALEVIEW-A2に浸漬することで、脳は1方向につきニアに10~30%程度膨潤します。

6. 脳が透明化した後、SCALEVIEW-A2を浸液として使用し、深部観察が可能です。
観察時、必要に応じて脳が動くことを防ぐためにアガロースなどで容器底面に脳を固定して下さい。
7. 観察が終わったら、脳を再びSCALEVIEW-A2で浸漬し保存することが可能です。

文献(1)

Hiroshi Hama, Hiroshi Kurokawa, Hiroyuki Kawano, Ryoko Ando, Tomomi Shimogori, Hisayori Noda, Kiyoko Fukami, Asako Sakaue-Sawano & Atsushi Miyawaki
Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain
Nature Neuroscience, advance online publication, 30 August 2011 (doi:10.1038/nn.2928)

オリンパス株式会社



透明化処置を行った12週齢C57BL/6Jマウスの胸部臓器

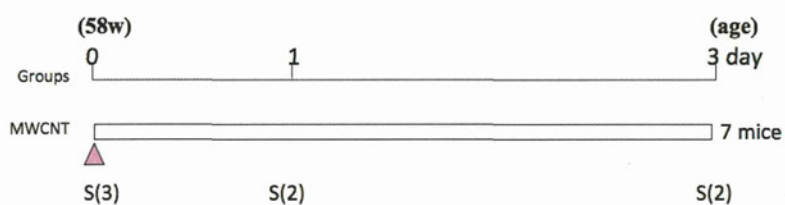
(標本透明化液 (SCALECTEW-A2) に浸漬後12週の肺、心臓および縦隔組織)



12週齢C57BL/6Jマウスの肺 (非透明化処置)

2. 気管内投与および全身吸入 暴露試験の予備実験

気管内投与に関する予備的検討



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

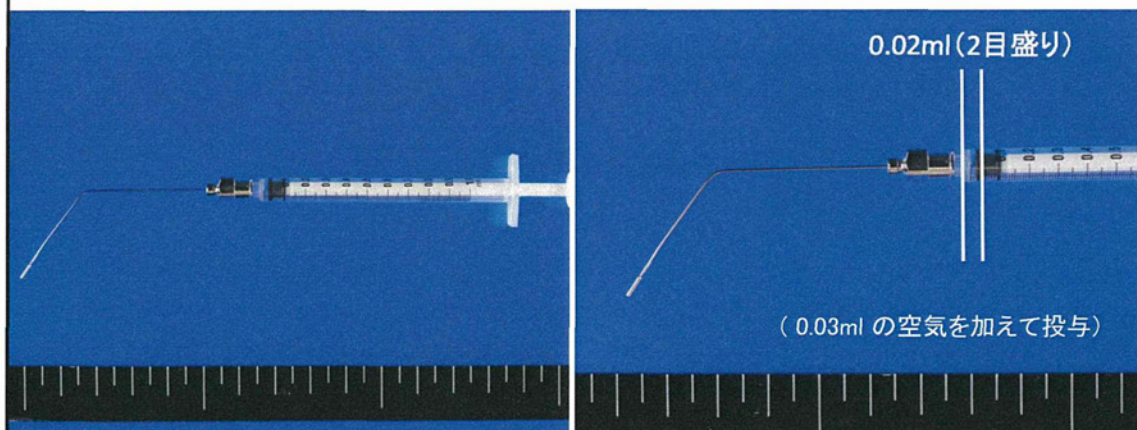
▲ : MWCNT, 10 μ g/mouse, i.t.

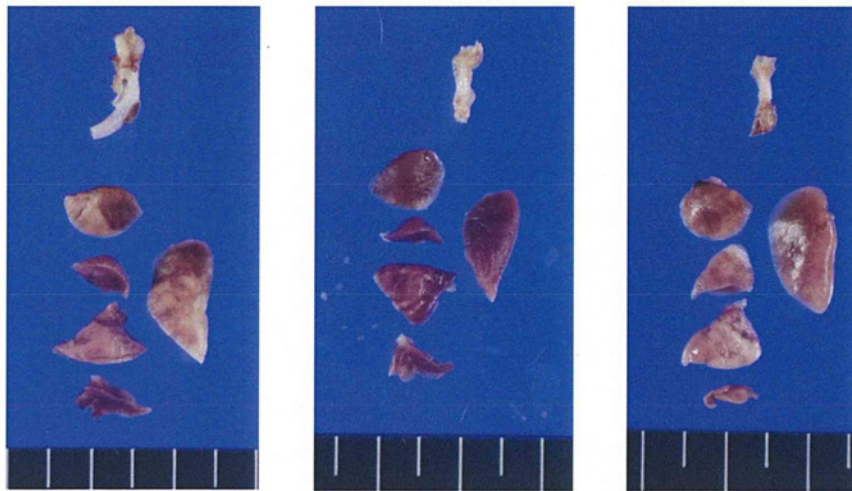
Total 7 mice

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

DIMS型経気道ゾンデ(マウス用)





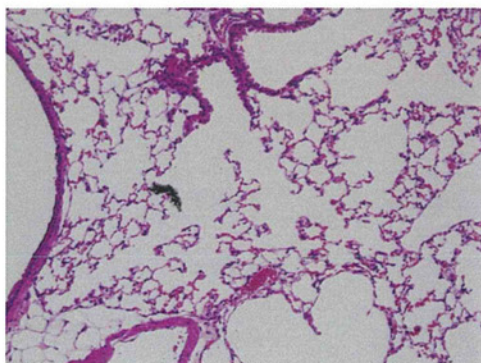
58 週齢の A/J マウスへの気管内投与実験

(左から1群、2群、3群)

Day 0 : 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

Day 1 : 気管内投与後1日目で屠殺した群

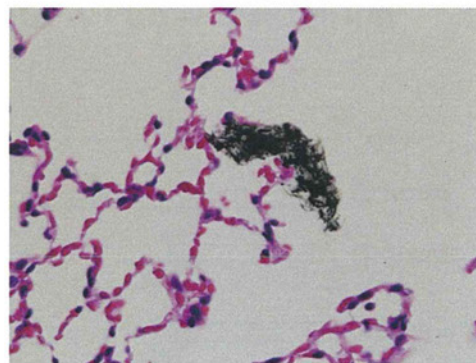
Day 3 : 気管内投与後3日目で屠殺した群



58 週齢の A/J マウスへの気管内投与実験の病理組織像 (弱拡大像)

Day 0 :

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。

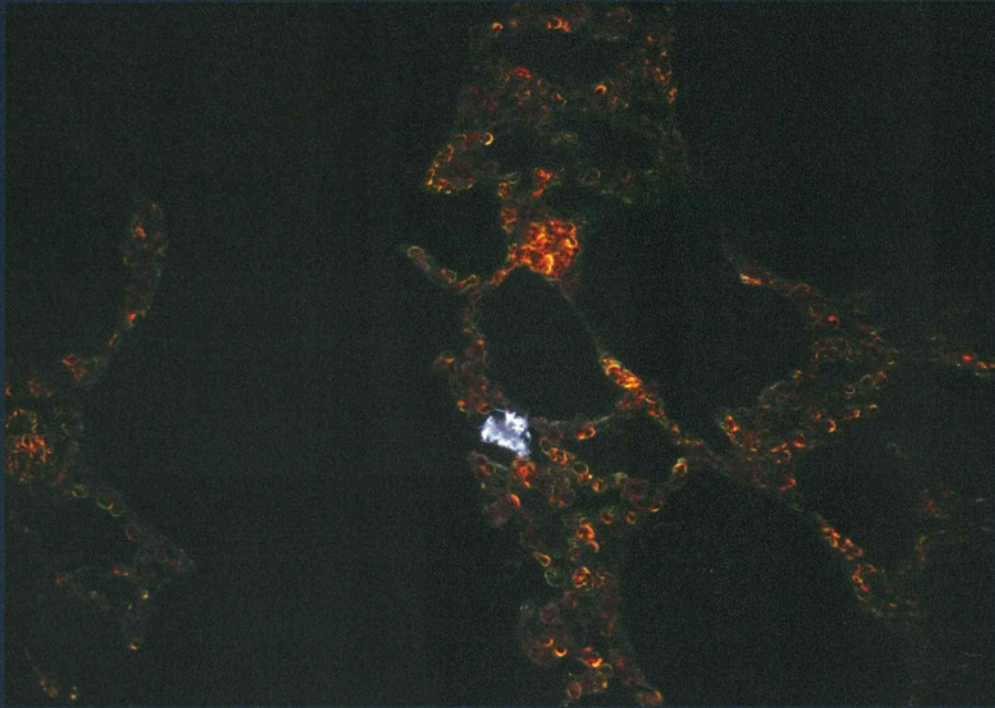


58 週齢の A/J マウスへの気管内投与実験の病理組織像 (強拡大像)

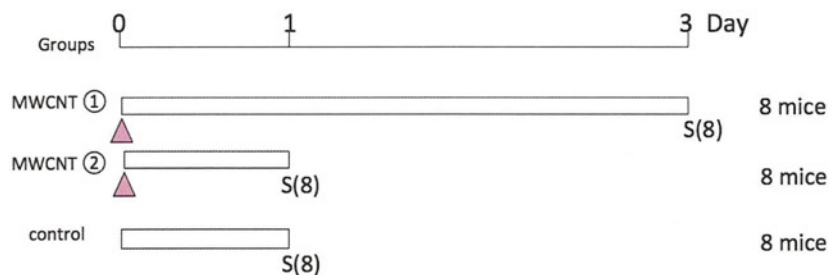
Day 0 :

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。

ハイパーイメージング装置による検討 : Day 1



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



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

Total 24 mice

▲ : MWCNT, 10 μ g/mouse, i.t.

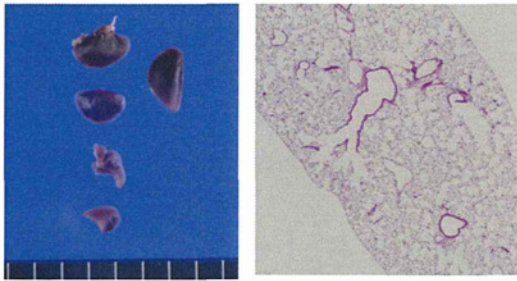
MWCNT ① : 329 μ g/m³, 4時間暴露

MWCNT ② : 290 μ g/m³, 4時間暴露

Experimental design:

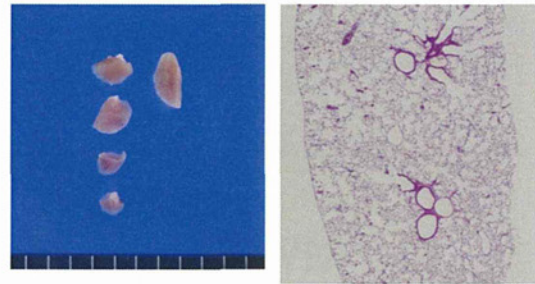
雄性 C57BL6/J マウスにおける MWCNT 全身暴露吸入実験(国立衛研毒性部)

①: Control



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

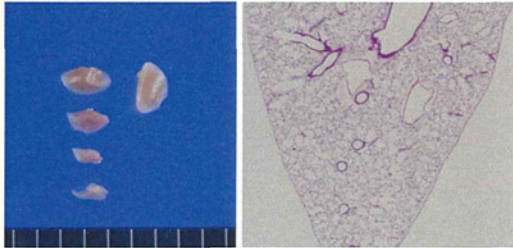
②: 吸入暴露1日後の肺、290ug/m3、4時間暴露



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

HE染色、偏光顕微鏡にても、検出できず。

③: 吸入暴露三日後の肺、329ug/m3、4時間暴露

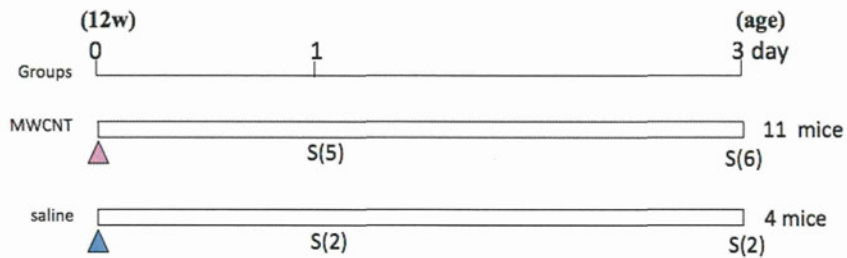


全身吸入暴露実験：
吸入暴露条件②：329ug/m3、4時間、暴露1日後の肉眼像および病理組織像

HE染色、偏光顕微鏡にても、検出できず。

吸入暴露条件①②、いずれの場合においても、
HE染色標本にて、明らかな MWCNT は観察できず。

12週齢C57BL/6Jマウスを用いた 気管内投与による検討



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

▲ : MWCNT, 10μg/mouse, i.t.

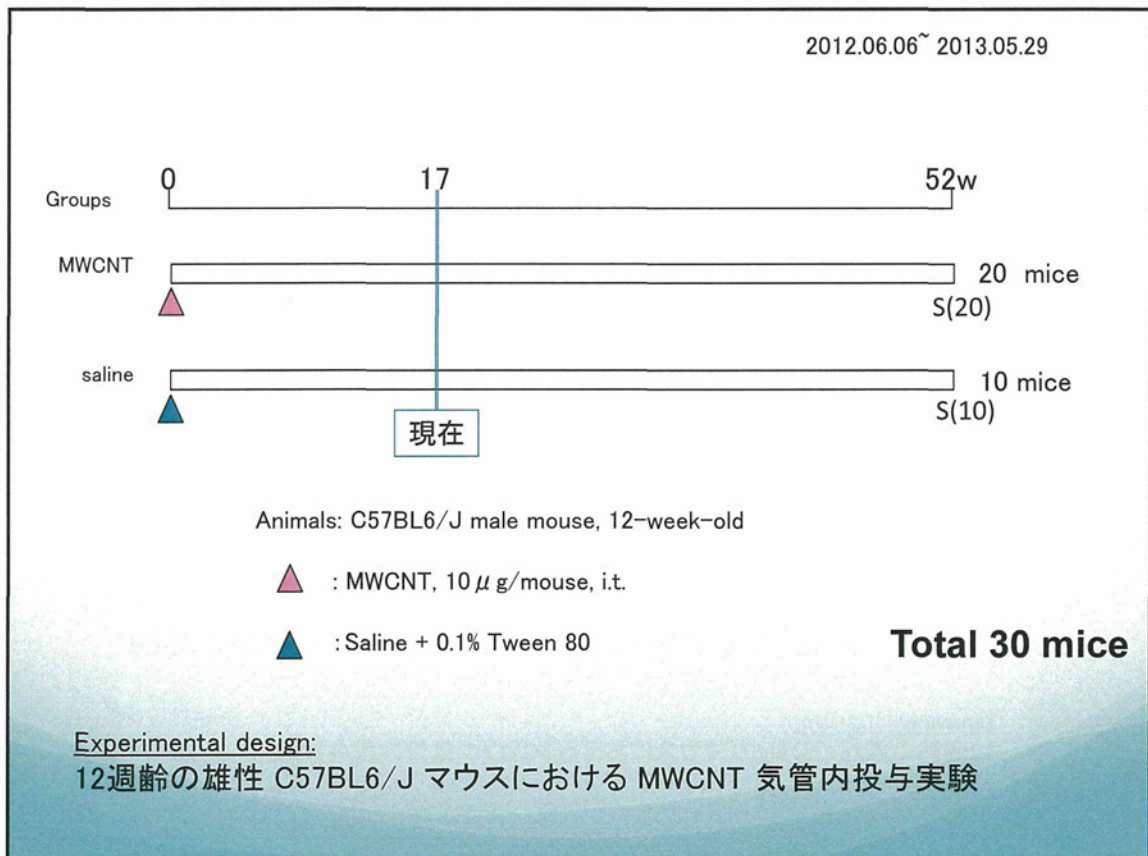
▲ : Saline + 0.1% Tween 80

Total 15 mice

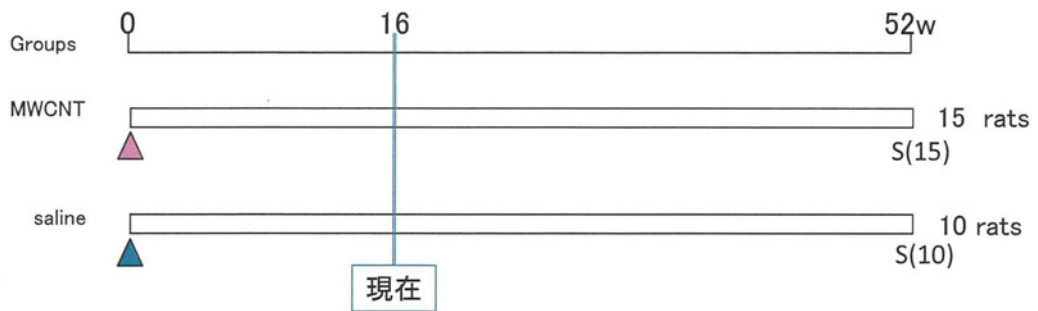
Experimental design:

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

3. MWCNTの気管内投与による慢性毒性の検討



2012.06.13 ~ 2013.06.05



Animals: F344 male rat, 6-week-old

▲ : MWCNT, 60 μ g/rat, i.t.

▲ : Saline + 0.1% Tween 80

Total 25 rats

Experimental design:

6週齢の雄性 F344 ラットにおける MWCNT 気管内投与実験

研究の目的

- I. 亜急性毒性試験を実施して、マウス呼吸器に対するMWCNT-Taqの亜急性毒性のプロファイルを把握する(MWCNT-Taq: 国衛研提供)。
- II. 先行研究(平成20-22年度、福島班)で得られたラットのサンプルを用いて、MWCNT-Bulkの生体影響に関して、さらに踏み込んだ研究を行う。
- III. ラットとマウスそれぞれのMWCNTによる亜急性毒性を明らかにして、ヒトの健康影響評価に外挿する際に役立たせる。

研究方法

- I. マウス呼吸器に対するMWCNTの亜急性毒性のプロファイルを把握するために、Taquan法処理-MWCNT(MWCNT-TAQ)をマウスに単回気管内投与、投与後91日までの、呼吸器を主体とした毒性影響を、気管支肺胞洗浄液を採取した検索(昨年度報告)と光学顕微鏡レベルの病理組織学的検索(本年度報告)を行った。
- II. 先行研究(平成20-22年度、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)で保存したMWCNT-Bulk気管内投与ラットの肺サンプルについて透過型電子顕微鏡によるMWCNTによる肺毒性の病態解析を進めた(昨年度報告)。