

究部において、MWCNT の腹腔内投与試験に使用した実績がある<sup>3,5)</sup>。雄性マウスを使用し、18 週齢で全身暴露吸入を開始した。個体識別は Genotyping 時の耳パンチによった。

#### (2) 飼育条件

ポリカーボネイト製のケージに紙製の床敷を使用し、1 ケージ当り 4 匹のマウスを収容した。ケージラックはケミカルセーフティ対応のケージ個別換気式飼育装置 (商品名: VIC システム、ダイダン株式会社) を使用した。飼育条件は、温度;  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度;  $55 \pm 5\%$ 、換気回数; 約 20 回/h、照明時間; 8 時~20 時点灯 (照明明暗サイクル 12 時間) とし、固型飼料 CRF-1 (オリエンタル酵母工業株式会社) を付属の給餌器を使用して自由摂取させ、飲水は市水をフィルター濾過し自動給水装置により自由摂取させた。

#### (3) 群構成

対照群、低用量群及び高用量群の 3 群の構成で実験を行った。1 群当り 48 匹の動物を使用し、病理組織用に 33 匹、組織沈着量測定用に 15 匹を割り当てた。全身暴露吸入実験の目標とする質量濃度は、低用量群  $1 \text{ mg}/\text{m}^3$ 、高用量群  $2 \text{ mg}/\text{m}^3$  とした (表 1)。

#### (4) 暴露スケジュール

暴露時間は 2 時間/日とし、週 1 回の暴露を 5 週間実施した。暴露チャンバーの収容動物数は 16 匹であるため、各群を A、B、C の 3 亜群に分けて暴露を行った。

### B-3. 全身暴露吸入装置

#### (1) カートリッジ直噴式ダスト発生装置

カートリッジ直噴式ダスト発生装置は H24 年度の当分担研究で開発したものである<sup>2)</sup> (研究協力者: 生田達也、鶴田祐吾、柴田科学)。金属製のカートリッジに T-CNT 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。この装置は、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キャリアエアの気相に分散させるサブチャンバーから構成される (図 1 A、図 1 B)。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 1 C)。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、キャリアエアにより希釈されつつ接続パイプを通して一定の流量 ( $10 \text{ L}/\text{min}$ ) で暴露チャンバーに導かれる構造となっている (図 1 D)。

カートリッジへの T-CNT の充填は、T-CNT を所定の濃度 ( $0.05 \text{ mg}/\text{mL}$ ) 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 を昇華除去することで達成した (図 2)。低用量群用に  $0.25 \text{ mg}/\text{カートリッジ}$ 、高用量群用に  $0.5 \text{ mg}/\text{カートリッジ}$  のものを用意した。

噴射装置からカートリッジへの圧縮空気の供給圧力は  $0.8 \text{ Mpa}$ 、噴射時間は 0.2 秒、1 カートリッジ当たり 5 回の噴射を実験者が手動で実施した。暴露チャンバーの総換気流量は約  $15 \text{ L}/\text{min}$  (基礎換気流量;  $10 \text{ L}/\text{min}$ 、OPC;  $2.83 \text{ L}/\text{min}$ 、CPC;  $0.3 \text{ L}/\text{min}$ 、質量濃度測定;  $1.5 \text{ L}/\text{min}$ ) と設定し、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。目標濃度に速やかに到達させるため、暴露開始時の 2 本は 1 分間隔で噴射した (図 3)。なお、対照群は、検体を充填しないカートリッジを使用して同じスケジュールで圧縮空気のみを噴射させた。

### (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4)。(研究協力者:生田達也、鶴田祐吾、柴田科学)。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アウターチャンバーと柔軟な導電性樹脂で作製したインナーチャンバーの2重構造となっている。インナーチャンバーは、直径550 mm、高さ550 mm、気積105.5 Lである。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(特許出願済)。暴露チャンバーは15 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(CPM; count per minutes)と質量濃度( $\text{mg}/\text{m}^3$ )測定を並行して行った。

相対濃度測定は、 $0.3 \cdot \mu\text{m}$ 以上の粒径に対応した光散乱粒子計数装置(Optical Particle Counter; OPC、OPC-110GT、流量:2.83 L/min、対応濃度: $3 \times 10^6$ 個/2.83 L、柴田科学)と、2.5 nmから $3 \cdot \mu\text{m}$ までの粒径範囲を測定する凝縮粒子計数装置(Condensation Particle Counter; CPC、CPC3776、流量:0.3 L/min、対応濃度: $3 \times 10^5$ 個/mL、TSI)を用いた。OPCの前段には希釈装置(柴田科学)を設置し10倍希釈した条件で測定を行った。

質量濃度測定は、ローボリウムサンプラー(080050-155、 $\phi 55$  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、 $\phi 55$  mm、捕集効率(DOP 0.3  $\cdot \mu\text{m}$ ):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、吸引空気量1.5 L/min  $\times$  120min=180 Lから $1 \text{ m}^3$ 当りの質量濃度を算出した。フィルターの秤量にはマイクロ天秤(XP26V、METTLER TOLEDO)を使用した。

なお、暴露チャンバー内の温度と湿度は、チャンバー内に温湿度計を設置して測定した。

### B-5. 暴露チャンバー内のMWCNTの分散状態及び繊維の長さ測定

暴露チャンバー内のエアロゾル化したMWCNTの分散状態と繊維の長さを測定するため、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、 $\phi 21$  mm、孔径0.1  $\mu\text{m}$ 、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)で形態画像を得て、繊維の長さを測定した。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. 暴露チャンバー内のエアロゾル濃度

相対濃度は、カートリッジから噴射後約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(図5)。噴射後のカートリッジには検体が残存しているものもあり、その多くはカートリッジのオリフィスを固定する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。CPCによる2時間の相対濃度の平均値は、

低用量群； $8.2 \pm 2.7 \times 10^5$  個/L/min (N=14、Aグループの5回目の値は実験中にCPCの障害があったため除外した)、高用量群； $19.2 \pm 4.0 \times 10^5$  個/L/min (N=15)であった。OPCによる2時間の相対濃度の平均値は、低用量群； $7.0 \pm 0.7 \times 10^5$  個/L/min (N=10、5回は測定上限を一時的に超えたため除外した)。高用量群は、OPCの測定の上限值 ( $3 \times 10^5$  CPM) を超えるため測定は実施しなかった。質量濃度は、低用量群  $1.19 \pm 0.16$  mg/m<sup>3</sup>、(N=15)、高用量群  $2.52 \pm 0.35$  mg/m<sup>3</sup>、(N=15)であった(表2)。相対濃度と質量濃度には相関性が認められた(図6)。

暴露チャンバー内の温度は、動物の導入直後から0.5~1℃上昇した。湿度はほぼ一定の値であった(図7)。

#### C-2. 暴露チャンバー内のMWCNTの分散状態及び繊維の長さ測定

T-CNTは暴露チャンバー内の気相において多くの繊維が単離分散状態が保持されてい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T-CNTを調製する際に使用する金属性フィルターの目開き(25・m)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。T-CNT繊維の長さの平均値は $7.3 \pm 4.9$ ・m(Max. 33.0・m, N=618)であり(図8)、これはU-CNT繊維の平均値、長さの分布と同様であった。

#### D. 考察及び結論

T-CNTとカートリッジ直噴式ダスト発生装置により、全身暴露吸入に適用する方法を確立した。低用量群は目標濃度を達成し、高用量群では目標濃度に対して25%程度超える質量濃度であった。実験日毎の相対濃度推移と質量濃度には多少のバラツキが認められたが、相対濃度と質量濃度には相関性が認められ、質量濃度変換係数(K値)もほぼ一定

であることからT-CNTの気相での分散状態、その粒度分布は一定の状態を保たれていることが示された。また、暴露チャンバー内でエアロゾル化したT-CNTの単離繊維の長さの分布は、U-CNTの単離繊維のそれと同様であったことから、Taquann法処理とエアロゾル化を行っても原体の特性を維持した検体を暴露することが可能であることが示された。

暴露チャンバー内の温度上昇が認められたが、これは換気流量が少ないことが原因と考えられる。換気流量を増加させることは容易であるが、使用するカートリッジ数も増加するため、その調整が必要である。

装置の課題として、暴露チャンバー内の内圧が上昇すること、カートリッジに検体が残存することが挙げられる。内圧上昇は聴覚的衝撃として動物へ影響を与える可能性がある。そこで、さらなる改良を実施した。圧縮空気による暴露チャンバー内の圧力上昇を減弱させるため、サブチャンバーに煙突状の排圧管を装着し、その先にポリ袋で覆ったフィルターを装着し、ダスト発生装置から暴露チャンバーへのキャリアエアは、マスフローコントローラーを介して行うこととした。カートリッジのアルミ製部品をステンレス製に交換し、Eリングも小型化して検体が残存しないようにした。現在、試運転中の改良型の濃度変動は旧型とほぼ同様の推移を示すことを確認した。ステンレス製カートリッジでは検体の残存は認められなかった。

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ダスト発生装置を開発し、実際にマウスに対して反復暴露を実施した。ヒトに比較して細い気道を持つ実験動物では、気道の比較的起始部に凝集体・凝固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示唆された。また、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汎用性の高い有効な手段となることが期待される。

#### 【引用文献】

- 1) Taquahashi Y, Ogawa Y, Takagi A, Tsuji M, Morita K, Kanno J. Improved dispersion method of multi-wall carbon nanotube for inhalation toxicity studies of experimental animals. *J Toxicol Sci.* 2013;38(4):619-28.
- 2) Han JH, Lee EJ, Lee JH, So KP, Lee YH, Bae GN, Lee SB, Ji JH, Cho MH, Yu IJ. Monitoring multiwalled carbon nanotube exposure in carbon nanotube research facility. *Inhal Toxicol.* 2008 Jun;20(8):741-9.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) Takagi A, Hirose A, Futakuchi M, Tsuda H, Kanno J. Dose-dependent mesothelioma induction by intraperitoneal administration of multi-wall carbon nanotubes in p53 heterozygous mice. *Cancer Sci.* 2012 Aug;103(8):1440-4.

#### E. 健康危機情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Taquahashi Y, Ogawa Y, Takagi A, Tsuji M, Morita K, Kanno J. Improved dispersion method of multi-wall carbon nanotube for inhalation toxicity studies of experimental animals. *J Toxicol Sci.* 2013;38(4):619-28.

##### 2. 研究発表

- 1) Taquahashi Y, Ogawa Y, Takagi A, Tsuji M, Hirose A, Kanno J, Highly-Dispersed, Aggregate/Agglomerate-Eliminated Multi-Wall Carbon Nanotube Shows Increase In Mesotheliomagenic Potency Per Unit Weight In p53 Heterozygous Mice Intraperitoneal Injection Model. The XIII International Congress of Toxicology (2013.7, Seoul)
- 2) Taquahashi Y, Ogawa Y, Takagi A, Tsuji M, Kanno J, An Improved Dispersion Method of MWCNT for Whole Body Inhalation Exposure System 6th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health (2013.10, Nagoya)

#### 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

表1 p53+/-マウスの反復全身暴露吸入実験の群構成

	目標濃度		動物数	解剖時期					
	mg/m <sup>3</sup>			0D	13W	26W	39W	52W	
Control 0ug/cartridge	0	病理組織	33	48	3	7	7	8	8
		組織沈着量	15		3	3	3	3	3
Taquann L 250ug/cartridge	1	病理組織	33	48	3	7	7	8	8
		組織沈着量	15		3	3	3	3	3
Taquann H 500ug/cartridge	2	病理組織	33	48	3	7	7	8	8
		組織沈着量	15		3	3	3	3	3

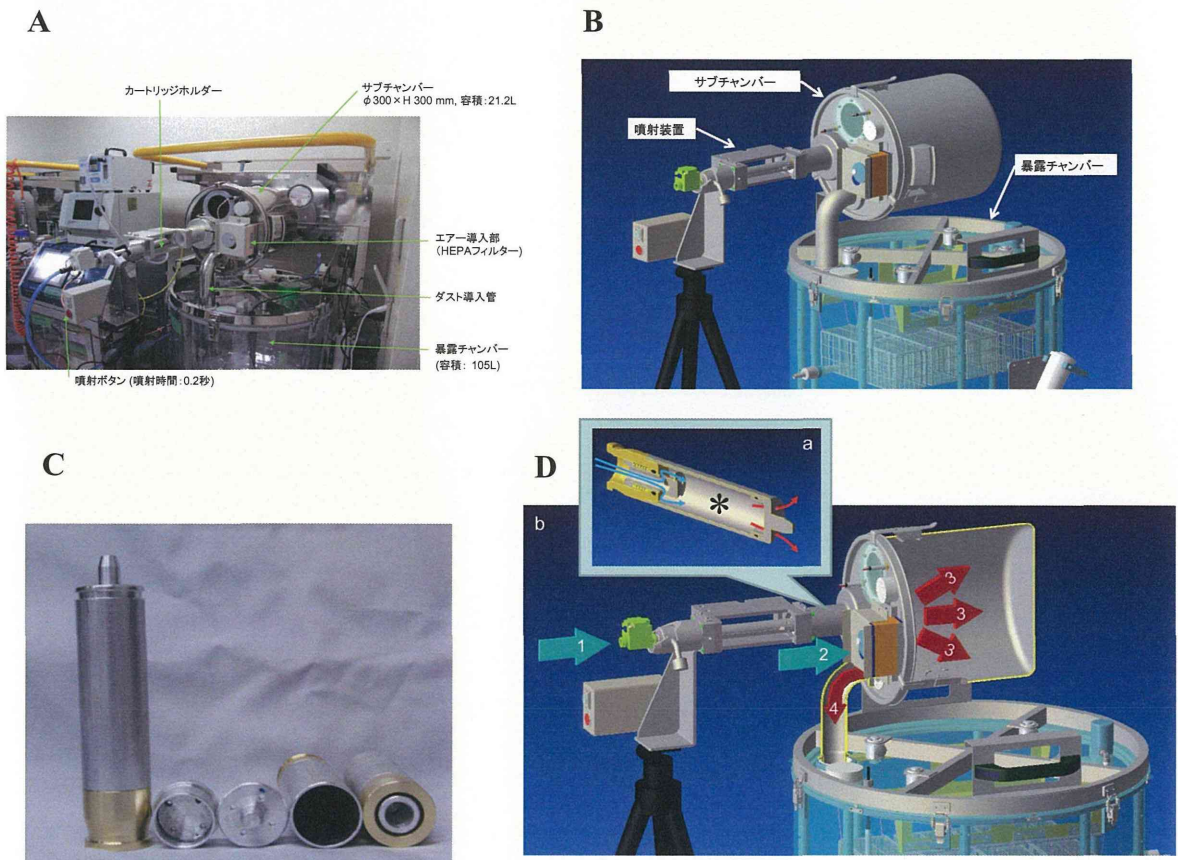


図1 カートリッジ直噴式ダスト発生装置

A: カートリッジ直噴式ダスト発生装置の概観。B: カートリッジ直噴式ダスト発生装置の模式図、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。C: カートリッジ(Φ22 mm×H65 mm 容量 23.5mL)。D: カートリッジ直噴式ダスト発生装置のダスト発生方法の模式図。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、接続パイプを通して暴露チャンバー（容積：105L）に一定の流量で導入される。(a) 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。(b) 青色の矢印は清浄空気（1は圧縮空気、2は室内空気）、赤色の矢印はエアロゾルの流れを示す。



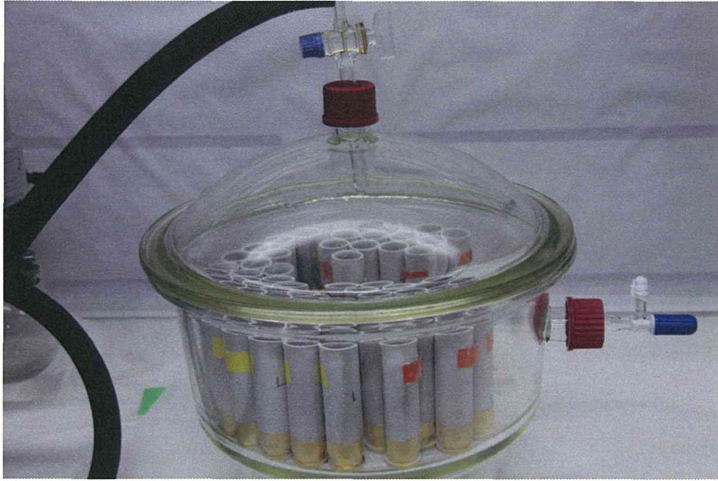


図2 T-CNTのカートリッジへの充填方法

T-CNT をターシャルブチルアルコールに所定の濃度で再度懸濁し、カートリッジに分注（10mL）して液体窒素で固化、真空ポンプで昇華させた。

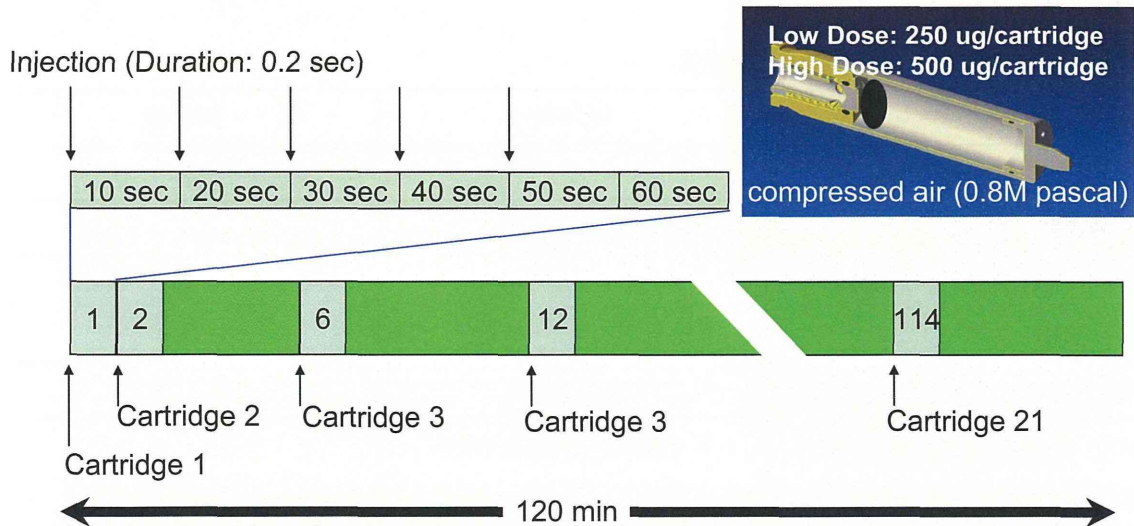


図3 カートリッジ直噴方式ダスト発生装置暴露方法

カートリッジ1本当たり、低用量は0.25mg、高用量は0.5mgのT-CNTを充填した。カートリッジに圧縮空気を噴射してダストを発生させた（0.8MPa、0.2秒×5回、10秒間隔）。目標濃度まで速やかに到達させるため、最初の2回は1分間隔で噴射を行い、以降は濃度推移を確認しつつ、約6分間隔で噴射を行った（21本/2時間）。

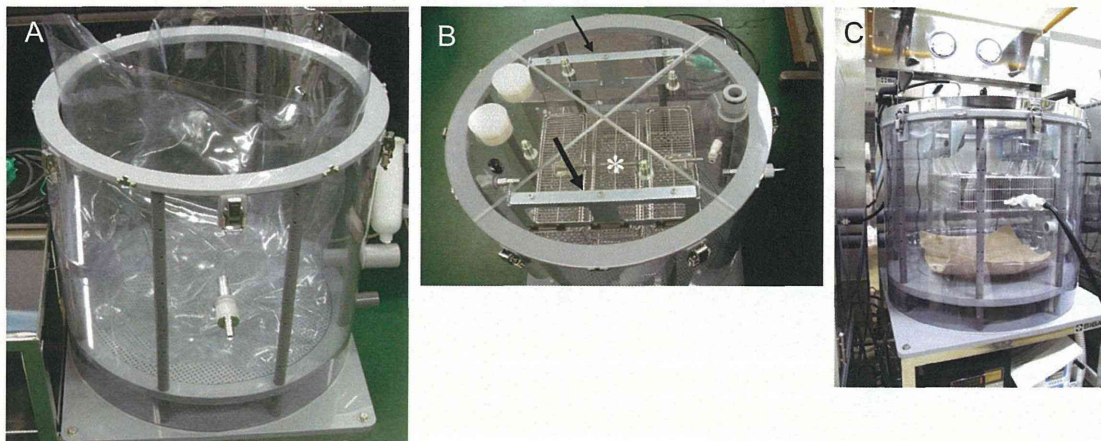


図4 暴露チャンバー

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 OUTER チャンバーと柔軟な樹脂で作製した INNER チャンバーの 2 重構造としている。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。A: INNER チャンバーと OUTER チャンバー。 OUTER チャンバーのサイズは  $\Phi 550\text{mm} \times H550\text{mm}$ 、気積：105.5L である。差圧は、室内  $>$  INNER  $>$  INNER と OUTER 間に調節され柔軟な INNER チャンバーの形状を保つ構造である。B: 暴露チャンバーの蓋を示す。マウスは 16 匹収容が可能である。蓋の下部に吊り下げ金具（矢印）を装着しており、マウスはステンレス金網製のケージ（\*）に収容する（蓋も交換可能）。C: 暴露チャンバーの全体像。

表2 暴露チャンバー内の濃度測定結果

	低用量	高用量
目標濃度 ( $\text{mg}/\text{m}^3$ )	1	2
質量濃度 ( $\text{mg}/\text{m}^3$ )	$1.19 \pm 0.16$ (N=15)	$2.52 \pm 0.35$ (N=15)
CPC 相対濃度 (0-120min, #/L/min)	$8.2 \pm 2.7 \times 10^5$ (N=14)	$19.2 \pm 4.0 \times 10^5$ (N=15)
質量濃度変換係数 (K)	$1.56 \times 10^{-9}$	$1.35 \times 10^{-9}$
OPC 相対濃度 (0-120min, #/L/min)	$7.0 \pm 0.7 \times 10^5$ (N=10)	-

数値は平均値  $\pm$  SD で表記した。



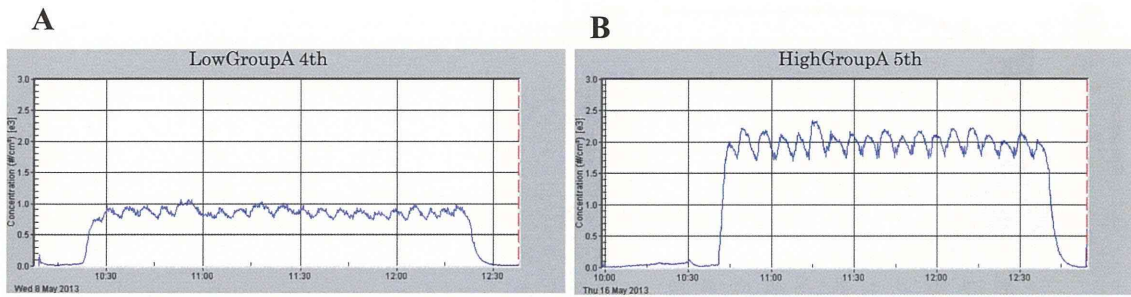


図5 相対濃度の推移 (CPC)

相対濃度は、カートリッジから噴射後約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。A:低用量群の相対濃度の代表例、B:高用量群の相対濃度の代表例。

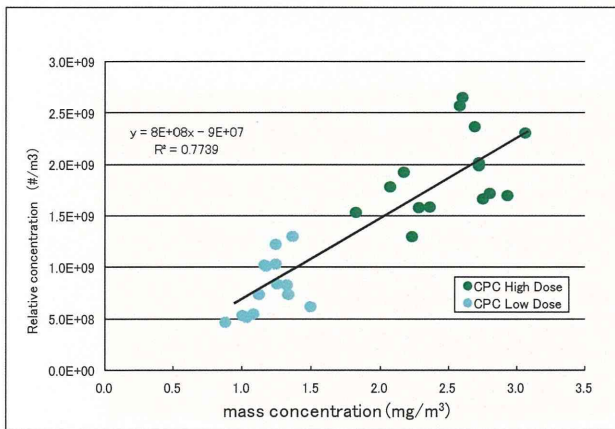


図6 相対濃度 (CPC) と質量濃度の関係

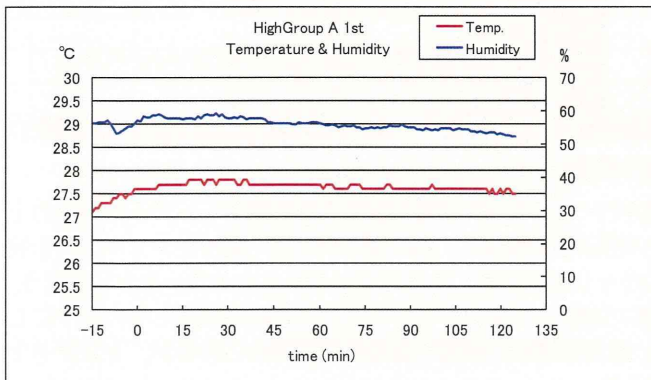


図7 暴露チャンバー内の温度、湿度推移

動物導入直後からチャンバー内の温度は0.5~1°C上昇した。湿度には変動は認められなかった。

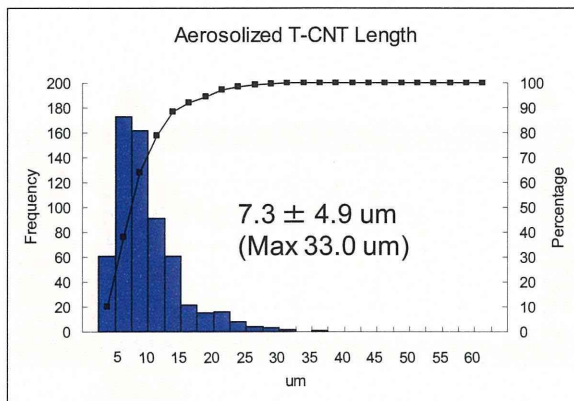


図8 暴露チャンバー内でエアロゾル化したT-CNTの長さ分布

暴露チャンバーからフィルターに吸着させてサンプリングしたT-CNTをSEM (x2,500)で観察し長さを測定した (N=618)

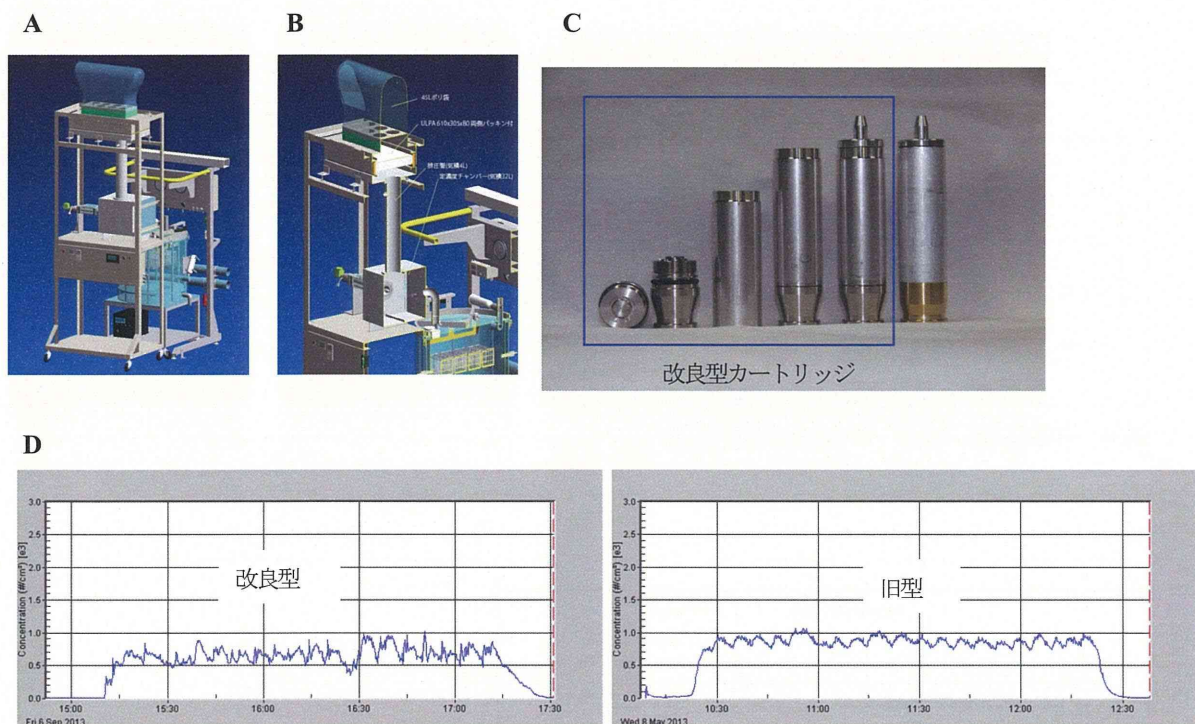


図9 カートリッジ直噴式ダスト発生装置の改良

ダスト発生装置の問題点を改善するため、改良を行った。A、B:圧縮空気による暴露チャンバー内の圧力上昇を減弱させるため、サブチャンバーに煙突状の排気管を装着し、その先にポリ袋で覆ったフィルターを装着し、ダスト発生装置から暴露チャンバーへのキャリアエアは、マスフローコントローラーを介して行う。C:カートリッジのアルミ製部品をステンレス製に交換し、Eリングも小型化して検体が残存しないようにした。D:改良型と旧型の相対濃度 (CPC) の比較。改良型は短い時間で濃度変動が認められるが、トレンドとしては旧型とほぼ同様の推移を示すことを確認した。

平成25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を得るため、ナノマテリアル吸入暴露により、肺内に沈着した検体の体内動態に関する研究を行った。具体的には、多層カーボンナノチューブ (MWCNT) を検体として、マウスの吸入暴露肺から MWCNT を抽出し、繊維数を把握する方法の確立を行った。また、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。そのため、H23 年度に MWCNT を高度に分散する方法 (Taquann 法) を独自に開発し (特許出願済)、H24 年度は、その工程を改良して全身吸入装置へ使用するため量産体制を整え、これと組み合わせるカートリッジ直噴式ダスト発生装置を開発した。

本年度の分担研究において、p53+/-マウスに Taquann 法処理済み MWCNT (T-CNT) をカートリッジ直噴式ダスト発生装置により 1 群 48 匹、2 用量で 1 日 2 時間、週 1 回、5 週間の反復全身暴露吸入実験を行うために必要な T-CNT 約 300 mg を供給した。5 週間の吸入の後、経時的に肺をサンプリングし、肺内に沈着した MWCNT の繊維数の計測と病理組織学的観察を実施した。吸入終了直後の高用量群の肺に沈着した MWCNT 繊維数は  $1.3 \times 10^7$  本/動物 (n=1) であり、質量に換算すると  $4.4 \cdot \text{g}/\text{動物}$  であった。繊維の長さの平均値は  $8.0 \pm 5.0 \cdot \text{m}$ 、最大の長さは  $33.1 \cdot \text{m}$  であった。この値は暴露チャンバー内の T-CNT エアロゾルの値 (平均値:  $7.3 \pm 4.9 \cdot \text{m}$ 、最大  $33.0 \cdot \text{m}$ ) と同様であり、エアロゾル化した繊維はその長さに関わらず、マウスの肺にまで到達したと考えられた。組織学的に、凝集体・凝固体は観察されず、単離繊維が気管支上皮の粘液層に小集合としてトラップされている像、及び単離繊維が肺胞内にまで到達している像が観察された。好中球浸潤像は弱く、肺胞内の MWCNT はもっぱらマクロファージに貪食されて存在していた。吸入終了後 13 週目の肺には凝集体・凝固体及び異物肉芽腫を認めず、肺胞洞 (肺胞管) から肺胞内に MWCNT を貪食したマクロファージを認め、分葉核球の軽度の浸潤と胚胞壁の軽度の肥厚を時に伴っていた。また、壁側胸膜面 (横隔膜面) には、MWCNT を貪食したマクロファージを伴う円形細胞小集簇を認め、そこを被覆する中皮の立方上皮化を時に認めた。この胸膜病変は先に報告した腹腔内投与実験において中皮腫初期病変と考えられた像と類似していた。

以上、Taquann 法処理検体とカートリッジ直噴式ダスト発生装置の組み合わせにより、MWCNT の吸入試験に際しての課題である凝集体による影響が除去され、単離繊維による肺胞病変及び胸膜病変が観測されたことから、本法が実験動物を使用したヒトへの外挿性の高いデータを得るために有効であることが示された。今後、更に経時的な組織沈着量の推移と肺病変との関係を明らかにする計画である。

略号：

MWCNT：多層カーボンナノチューブ

CNT：カーボンナノチューブ

p53+/-マウス：p53 遺伝子ヘテロ欠失 C57BL/6NcrSlc マウス

T-CNT：Taquann 法処理 MWCNT (MWNT-7、三井物産)

U-CNT：MWCNT 原末 (MWNT-7、三井物産)

## 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う。

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>、MWCNT と一定の割合で結合する標識分子とハイブリッドを形成し、標識分子をMWCNTから脱着して濃度分析を行い、間接的にMWCNT定量する方法<sup>4)</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のような繊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。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 μm以下が主体であるが、CNTのように長さは数μmであるが、アスペクト比が大きい繊維状物質では、空気動力学径 (Aerodynamic diameter ;  $d_{ae}$ ) を考慮する必要がある。

本分担研究は、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「本数」と「サイズ」を直接的に把握する方法の確立、及び、当該研究班において実施される実験検体の測定を目的とする。具体的には、肺組織を溶解してMWCNTを回収し、走査型顕微鏡 (SEM) により観察する方法である。熱安定性が極めて高いアスベストでは、組織を灰化する方法が適用されている。ほぼ炭素のみから構成されるナノマテリアルでは高温

処理は一般的でなく、熱に比較的安定なことが知られるMWCNTについては不可能ではないが、塩との共存下での燃焼促進現象が知られているMWCNTについては、各種の塩を含む生体成分との混合状態での安定条件を設定することは容易ではない。本分担研究では、H23年度に肺組織を化学的に溶解後にMWCNTを遠心分離して回収する方法を開発し、実際に肺内に取り込まれたMWCNTの観察を行った。H24年度は、定量的に繊維数を把握する方法を開発した。

並行して、吸入させる検体の分散方法の改良を行った。既述したように、粒子状物質の吸入において、粒径分布は呼吸器系の部位への沈着量を決める重要なファクターである。微細な粒子は肺胞まで到達するが、大きな粒子は気道の上層部で効果的に除去される。一方、ナノマテリアルの全身暴露吸入実験において問題となるのが、検体の凝集である。人が現実的に暴露される環境下では、凝集体は先に落下し、肺に到達するのは高度に分散されたものであることが想定される。また、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末梢の比較的近位に捕捉されるため、それよりも末梢の肺胞レベルへの単離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、凝集体によるこのような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(図1)。以上の点から、凝集成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離繊維成分のみからなる分散性の高い検体を得る処理法(Taquann法、特許出願済)を独自に開発した<sup>5)</sup>。

H25年度の分担研究では、p53+/-マウスを

対象とした反復全身暴露吸入実験を実施するため、Taquann法処理検体の量産を行い供給した。全身暴露吸入したp53+/-マウスの肺を臓器沈着量測定及び病理組織評価に供した。

## 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) <sup>a)</sup>
長さ	1-19 $\cdot$ m (> 5 $\cdot$ m 27.5%) <sup>a)</sup>
繊維数	3.55 $\times$ 10 <sup>11</sup> 本/g <sup>a)</sup>
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%) <sup>a)</sup>
	硫黄 : 470 ppm <sup>a)</sup>
	塩素 : 20 ppm <sup>a)</sup>
	フッ素 : <5 ppm <sup>a)</sup>
	臭素 : <40 ppm <sup>a)</sup>

<sup>a)</sup>東京都健康安全研究センターの測定データ<sup>6,7)</sup>

### B-2. MWCNTの分散処理方法 (Taquann法)

Taquann法は、走査型電子顕微鏡 (SEM) の試料作製方法である「臨界点乾燥」の概念を、液相での分散と濾過に組み合わせた技術であり、濾液の乾燥時に表面張力を受けないため、分散性が確保される事を利用したものである。具体的には、200 mgのMWCNT原末を三級ブタノール (TB、融点 ; 25.69 ° C、関東化学株式会社 特級) 500 mLに分散、懸濁させて、凍結融解による分散促進を一回行った後、金属製フィルター(セイシン企業、目開き25  $\mu$  m) でろ過し大型の凝集体を除くとともに、分散を図り、ろ液を直ちに液体窒素で凍結・固化させる。固相状態のろ液を溶媒回収型真空ポンプ (Vacuubrand、MD4C NT+AK+EK) により減圧し、液相を介さずに昇華させ、TBを分離除去することで、分散性の高い乾燥状態のMWCNTを得る (図2、図3)。Taquann法の開発当初は、1回の処理(24時間)で1 mg程度の生産量であったが、H24年度に工程の工夫と機器の増設により量産体制を整えた。本年



度は、p53+/-マウスを対象とした反復全身暴露吸入実験に必要となる検体約300 mgを約300時間で製造し供給した。

以下、MWCNTの原末をU-CNT、Taquann法処理MWCNTをT-CNTと記載する。

### B-3. p53+/-マウスの全身暴露吸入実験

実験に供したマウスはC57BL/6NCrSlcをバックグラウンド(40代以上)とするp53+/-マウス(自家繁殖、解剖時体重、吸入終了直後; 33.3±4.3g、吸入終了後13週目; 41.8±6.7)を使用した。1日2時間、週1回、5週間実施の反復全身暴露吸入実験を、対照群、低用量群及び高用量群の3群の構成で実施した。各群に48匹の動物を使用し、病理組織用に33匹、組織沈着量測定用に15匹を割り当てた。カートリッジ直噴式ダスト発生装置を使用して、T-CNTをエアロゾル化し全身暴露吸入させた。凝縮粒子計数装置(CPC)による2時間暴露の相対濃度の平均値は、低用量群;  $8.2 \pm 2.7 \times 10^5$ 個/L/min、高用量群;  $19.2 \pm 4.0 \times 10^5$ 個/L/minであった。質量濃度は、低用量群 $1.2 \pm 0.16$  mg/m<sup>3</sup>、高用量群 $2.5 \pm 0.35$  mg/m<sup>3</sup>であった。暴露チャンバー内のエアロゾル化したT-CNT繊維の長さの平均値は $7.3 \pm 4.9 \cdot \text{m}$ (Max.  $33.0 \cdot \text{m}$ )であった(暴露実験の詳細は小川幸男分担研究者報告を参照)。反復5回の暴露終了直後と暴露終了後13週にマウスを解剖しサンプルを得た。

#### 【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)、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。

### B-4. 肺からのMWCNT抽出方法

#### (1) 肺溶解液の調製

肺溶解液は5w/v%水酸化カリウム(和光純薬工業株式会社、試薬特級)、0.1w/v% SDS(和光純薬工業株式会社、試薬特級)に、生体由来の金属イオンを除去するため0.1 w/v% EDTA・2Na(同仁化学研究所、試験研究用)、及び、水酸化鉄(II)が酸化して不溶性の水酸化鉄(III)に変化することを防止する目的で、2w/v%アスコルビン酸ナトリウム(和光純薬工業株式会社、試薬特級)を加えた。各試薬はMilliQ水に混合後、80°Cで加熱して完全に溶解した。

#### (2) 肺からのMWCNTの抽出

肺サンプル(気管及び左右主気管支を除く全肺約200 mg)をマイクロチューブ(エッペンドルフ、Protein LoBind、2 mL)に入れ、加温した肺溶解液を1.8 mL添加した。可能な限り酸素を除去するため、真空デシケーター内で肺の脱気を行った後、窒素ガス雰囲気中でマイクロチューブを密栓した。マイクロチューブを80°Cに設定したインキュベーター内で24時間静置して肺を溶解した。目視観察により肺溶解液が澄明であることを確認後、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、上清を取り除いた後、マイクロチューブをインキュベーター内で50°Cの条件で加熱しエタノールを除去した。0.1w/v% TritonX (ICN) 100・Lに沈渣を再分散してSEM観察に供した(図4)。

#### (3) 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のポンチで打ち抜きドーナツ状とし、ロート型ガラス濾過器(51G-1、三商)に載せ、その中心上にアルミナフィルター(ワットマン、孔径0.02 μm、φ12mm、Anodisc)を置き、ピペッティングにより十分に分散させたMWCNT再分散液の1・Lをアルミナフィルター上に滴下し吸引ろ過

した。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5秒間オスミウムコートを行いSEM (VE-9800、KEYENCE) で2,500倍、加速電圧2~2.8 kVの条件で観察した。観察はフィルターの直径に沿って行った。MWCNTの繊維長と数の計測には、ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) を使用した。

#### (4) MWCNT繊維数の算出

肺に含まれるMWCNT繊維の本数 ( $C_t$ ) は、MWCNT懸濁液の調製量 ( $100 \cdot L$ 、 $V$ )、 $1 \cdot L$  のMWCNT懸濁液がフィルターに展開した面積 ( $S_t$ )、計測した繊維数 ( $C$ )、繊維数を計測した視野の面積 ( $S_v$ ) を基に以下の式で計算した。

$$C_t = C \times \frac{S_t}{S_v} \times V$$

計測した1視野当たりの面積は、 $1,818 \cdot \text{m}^2$  ( $49.23 \times 36.92 \cdot \text{m}$ )、1サンプル当たり500本以上の繊維数又は30以上の視野を観察した。なお、視野の辺縁に存在し、全長が確認できない繊維については計測対象から除外した。

#### B-5. 病理組織標本の作製

マウスはペントバルビタールナトリウム (ソムノペンチル; 共立製薬株式会社) を腹腔内投与し麻酔下で放血致死後に解剖した。4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液を直ちに右心室より灌流し、血液が完全に置換されたのち、同組成液に全肺を浸漬した (気道内のMWCNT等の人為的移動を避けるため、気管からの固定液の注入は行わなかった)。

### C. 研究結果

#### C-1. 肺に沈着したMWCNT繊維

H24年度の研究により、T-CNTは有効数字一桁の精度で  $3 \times 10^6$  本/ $\cdot \text{g}$  の繊維数、平均長  $8 \cdot \text{m}$  であった (図5)。反復吸入暴露直後の高用量群の1例について測定した結果 (計測繊維数 694 本)、肺に沈着したMWCNT

繊維数は  $1.3 \times 10^7$  本/動物であり、質量に換算すると  $4.4 \cdot \text{g}$ /動物であった。繊維の長さの平均値は  $8.0 \pm 5.0 \cdot \text{m}$ 、最大の長さは  $33.1 \cdot \text{m}$  であった。 (図6)。

#### C-2. 肺及び胸膜の病理組織

吸入終了直後の肺では、MWCNTの凝集体・凝固体は観察されず、単離繊維が気管支上皮の粘液層に小集合としてトラップされている像、及び単離繊維が肺胞内にまで到達しているのが観察された。好中球浸潤像は弱く、肺胞内のMWCNTはもっぱらマクロファージに貪食されて存在していた。

吸入終了後13週目の肺には凝集体・凝固体及び異物肉芽腫を認めず、肺泡洞 (肺胞管) から肺胞内にMWCNTを貪食したマクロファージを認め、分葉核球の軽度の浸潤と胚胞壁の軽度の肥厚を時に伴っていた。終末細気管支上皮による肺泡洞へ向けての顕微鏡的増殖巣を時に認めた。この変化はMWCNTを貪食したマクロファージを近傍に伴っていた。また、壁側胸膜面 (横隔膜面) には、MWCNTを貪食したマクロファージを伴う円形細胞小集簇を認め、そこを被覆する中皮の立方上皮化を時に認めた。この胸膜病変は先に報告した腹腔内投与実験において中皮腫初期病変と考えられた像<sup>8)</sup>と類似していた。

### D. 考察及び結論

p53+/-マウスにT-CNTを2用量で反復全身暴露吸入実験を行い、肺のMWCNTの組織沈着量と、肺及び胸膜 (壁側胸膜を含む) 病理組織学的検討を行った。

本分担研究では、H24年度にTaquann法の改良を行い、全身暴露吸入実験に供することのできる検体量を確保する体制を整えた。具体的にはU-CNTのTBへの分散性を高める工程、及び、ろ過効率を高める工夫の追加により、1回あたりの収率向上を果たした。律速段階は固化したTBろ液を真空ポンプで昇華

する工程であるが、これに対しては、ポンプの台数を増設して対応した。

反復全身暴露吸入後の肺に沈着したMWCNTの繊維数（質量換残置）及び繊維長の分布の計測法を確立した。特に、肺内から回収した繊維の長さ（分布）が暴露チャンバーからサンプリングしたT-CNTエアロゾルとほぼ同一であったことは、本測定法が十分な精度を有していることを示唆するものと考えた。また、十分に分散された単離T-CNTはカートリッジ直噴式ダスト発生装置との組み合わせにより、約30 $\mu$ mまでのT-CNTは長さによる選択を受けず、マウスの肺にまで到達したと考えられる。

長さ20 $\cdot$ m、直径0.2 $\cdot$  $\cdot$ m、比重2.8のアスベスト繊維の空気動力学径 $d_{ae}$ の理論値は0.814 $\cdot$  $\cdot$ mである<sup>9)</sup>。MWNT-7の比重は2.1と報告されていることから<sup>10)</sup>、MWNT-7繊維の $d_{ae}$ の理論値はより小さく計算される。以上より、マウスの気道系は1 $\cdot$  $\cdot$ m以下の $d_{ae}$ を有する粒子は一律に肺（全肺サンプル内）に到達すること、また組織学的に10 $\cdot$  $\cdot$ m超のMWCNTが末梢の肺胞まで到達すること、が本実験から確認された。この値は諸家の報告に見る「1 $\sim$ 5 $\mu$ m径の粒子が肺胞まで到達しやすい」という結論と大きくは矛盾しない。今後、末梢肺胞に分布するMWCNTの繊維長を顕微鏡的に測定する必要がある。

本研究が用いた、Taquann法処理検体を用いたカートリッジ直噴式ダスト発生全身暴露吸入装置（Taquann吸入システム）は、凝集体・凝固体をほぼ完全に除去し、マウス肺内にはほぼ単離繊維のみを吸入させ、それによる終末細気管支から肺胞域にかけての炎症性および増殖性の病理組織学的変化を誘発させた。その一部は胸腔に達し、壁側胸膜面に中皮腫初期病変との関連を示唆する顕微鏡的病変<sup>9)</sup>を誘発することを示した。

Taquann吸入システムは、これまで、MWCNTの吸入試験に際しての課題であった凝集

体・凝固体による影響を排除することに成功し、実験動物によるヒトへの外挿性の高いデータが得られる可能性が示された。今後、このマウスの検体を用いマウスの経時的な組織沈着量の推移を明らかにし、肺病変との関係を明らかにする計画である。

#### 【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
- 4) Ohnishi M, Yajima H, Kasai T, Umeda Y, Yamamoto M, Yamamoto S, Okuda H, Suzuki M, Nishizawa T, Fukushima S. Novel method using hybrid markers: development of an approach for pulmonary measurement of multi-walled carbon nanotubes. *J Occup Med Toxicol*. 2013 Oct 25;8(1):30.
- 5) Taquahashi Y, Ogawa Y, Takagi A, Tsuji M, Morita K, Kanno J. An Improved dispersion method of multi-wall carbon nanotube for inhalation toxicity studies of experimental animals. *J Toxicol Sci*. 2013;38(4):619-28.
- 6) 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.

- 7) 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.
- 8) Takagi A, Hirose A, Futakuchi M, Tsuda H, Kanno J. Dose-dependent mesothelioma induction by intraperitoneal administration of multi-wall carbon nanotubes in p53 heterozygous mice. Cancer Sci. 2012 Aug;103(8):1440-4.
- 9) Sturm R, A theoretical approach to the deposition of cancer-inducing asbestos fibers in the human respiratory tract, The Open Lung Cancer Journal, 2009 2, 1-11
- 10) Morishita T, Matsushita M, Katagiria Y, Fukumori K, A novel morphological model for carbon nanotube/polymer composites having high thermal conductivity and electrical insulation, J. Mater. Chem., 2011, 21, 5610-5614

#### E. 健康危機情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- (1) Taquahashi Y, Ogawa Y, Takagi A,

Tsuji M, Morita K, Kanno J. An Improved dispersion method of multi-wall carbon nanotube for inhalation toxicity studies of experimental animals. J Toxicol Sci. 2013;38(4):619-28.

##### 2. 学会発表

- (1) 高橋祐次、高木篤也、辻 昌貴、菅野純、凝集体を除去し分散性を高めた多層カーボンナノチューブは p53+/-マウス腹腔内投与モデルにおいて単位重量当りの中皮腫誘発能が増加する、第40回日本毒性学会学術年会 一般口演 (2013. 6. 18)
- (2) 菅野 純、高橋祐次、ナノマテリアルの高分散小型全身暴露吸入システムの開発、第40回日本毒性学会学術年会 シンポジウム (2013. 6. 17)
- (3) Taquahashi Y, Ogawa Y, Takagi A, Tsuji M, Hirose A, Kanno J, Highly-Dispersed, Aggregate/Agglomerate-Eliminated Multi-Wall Carbon Nanotube Shows Increase In Mesotheliomagenic Potency Per Unit Weight In p53 Heterozygous Mice Intraperitoneal Injection Model. The XIII International Congress of Toxicology (2013. 7. 3 Seoul)
- (4) Taquahashi Y, Ogawa Y, Takagi A, Tsuji M, Morita K, Kanno J. An Improved Dispersion Method of MWCNT for Whole Body Inhalation Exposure System, 6th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health (2013. 10. 29, Nagoya)

#### G. 知的財産の出願・登録情報

##### 1. 特許取得

特許出願：菅野純、高橋祐次、「高分散

性ナノマテリアルの調製方法」、特願  
2012-158343 (2012. 7. 17 )

2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし



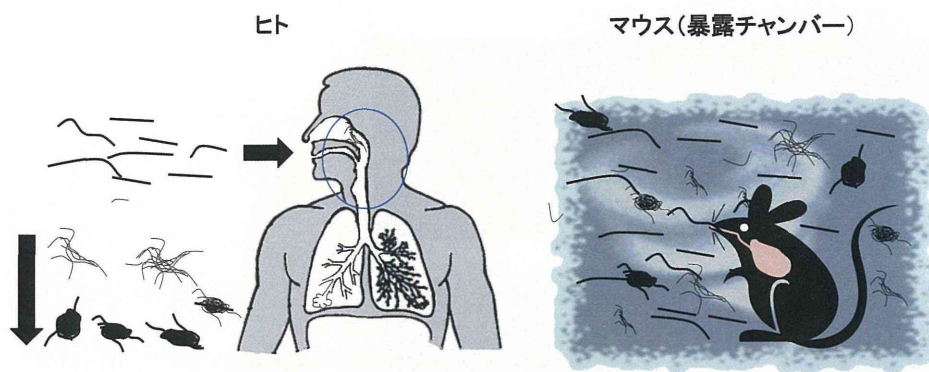


図1 ナノマテリアルのヒトとマウスの暴露状態

ナノマテリアルのヒトの現実の暴露経路のひとつは吸入であり、ヒトへの外挿性の高い動物実験の実施には分散性の高い検体が必要である。ヒトの作業環境では、凝集体・凝固体は比較的速やかに落下する。また、凝集体・凝固体が吸入されたとしても、上気道部で効果的に除去されるため、肺胞に到達するのは、高度に分散された単一繊維と考えられる。一方、マウスの吸入暴露実験においては、ダスト発生装置で発生させたエアロゾルはキャリアーエアに混合して暴露チャンバーに送り込まれ、凝集体・凝固体は単離繊維と共に常時攪拌された状態にある。また、上気道部はヒトに比較して短く細いため、凝集成分が気道末梢の比較的近くに捕捉され、それよりも末梢の肺胞レベルへの単繊維の吸入を阻害する可能性がある。

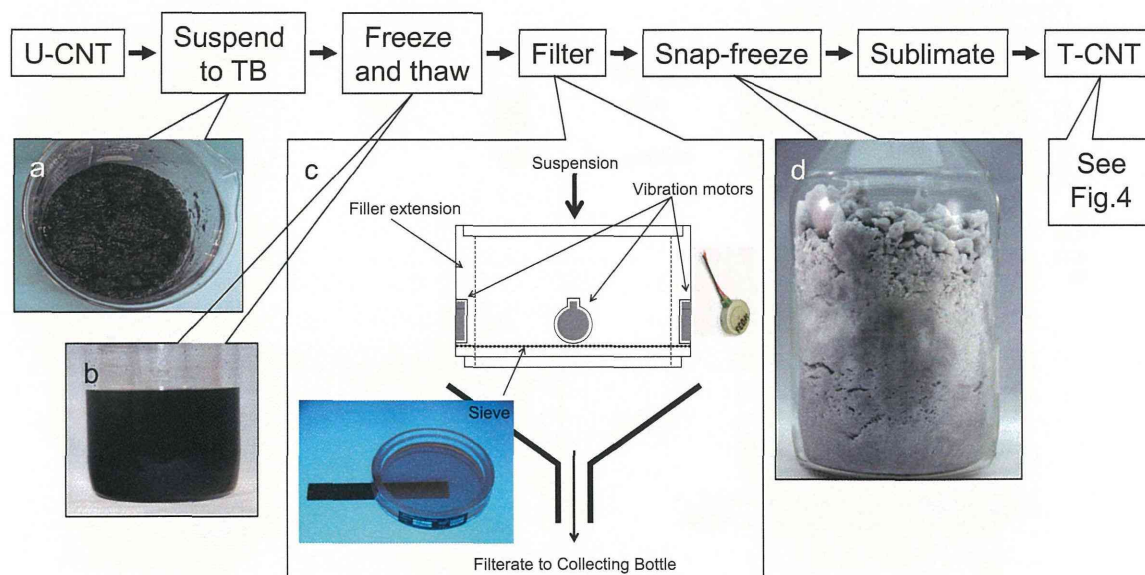


図2 Taquan 法の概要

(a) MWCNT 原末 (U-CNT) を三級ブタノール (TB) に混合して氷冷して TB をシャーベット状にして金属性スパーテルで混ぜ十分に混和する。(b)  $-25^{\circ}\text{C}$  で一晩凍結したのち再融解を行う。(c) 金属製フィルター(セイシン企業、目開き  $25 \cdot \mu\text{m}$ ) でろ過し大型の凝集体を除く。ろ過効率を向上させるため、金属製フィルターには携帯電話に使用されている振動モーター (FM34F T.P.C. DC MOTOR、振動量:  $17.6 \text{ m/s}^2$ , G) をリムに 4 個装着し、フィルターを振動させる。(d) ろ液は直ちに液体窒素で凍結・固化し固相のまま溶媒回収型真空ポンプにより減圧し、液相を介さずに昇華させ、分散性の高い乾燥状態の MWCNT を得る。Taquahashi et al., JTS, 2013;38(4):619-28

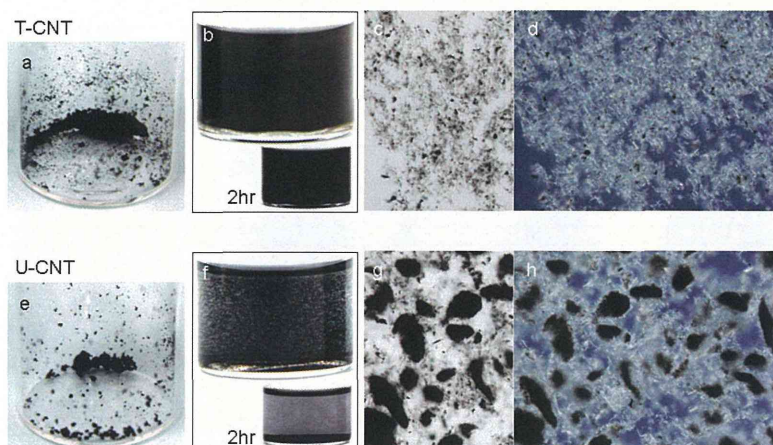


図3 Taquann 法処理検体 (T-CNT) の光学顕微鏡像

MWCNT の原末 (U-CNT) には大きな凝集体が認められるが、T-CNT には大きな凝集体は認められず、単離した繊維が多く認められる。1 mg の U-CNT 及び T-CNT を 5 mL の TB に再懸濁後に静置してその様子を観察した。T-CNT の懸濁状態は静置後 2 時間保たれた。Taquahashi et al., JTS, 2013;38(4):619-28

真空デシケーター内で肺を脱気  
窒素ガス雰囲気中で密栓する

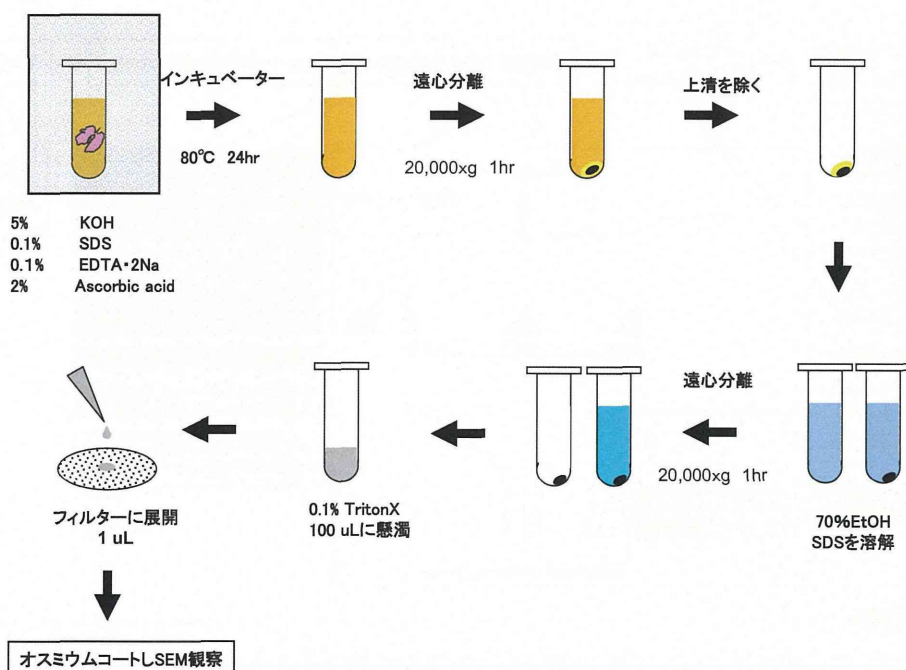


図4 肺からのMWCNT抽出方法の概略図

肺サンプル (約 200 mg) をマイクロチューブ (2 mL) に入れ、80°Cに加熱した肺溶解液 (5w/v% 水酸化カリウム、0.1w/v% SDS、0.1 w/v% EDTA・2Na、2w/v%アスコルビン酸ナトリウム) を加える。真空デシケーター内で肺を脱気し、窒素ガス雰囲気中で密栓する。80°Cに設定したインキュベーター内で 24 時間以上静置して肺を溶解する。高速微量冷却遠心機で 25°C、20,000×g、60 分の条件で遠心分離を行い、沈渣を回収する。1.5 mL の 70%エタノールを添加し、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上清を除去しMWCNTのみを回収した。0.1w/v% TritonX 100・Lを添加しMWCNTの懸濁液を得る。懸濁液 1・Lを分取し、アルミナ製フィルターに展開し、オスミウムコートしてSEMで観察した。