

小活

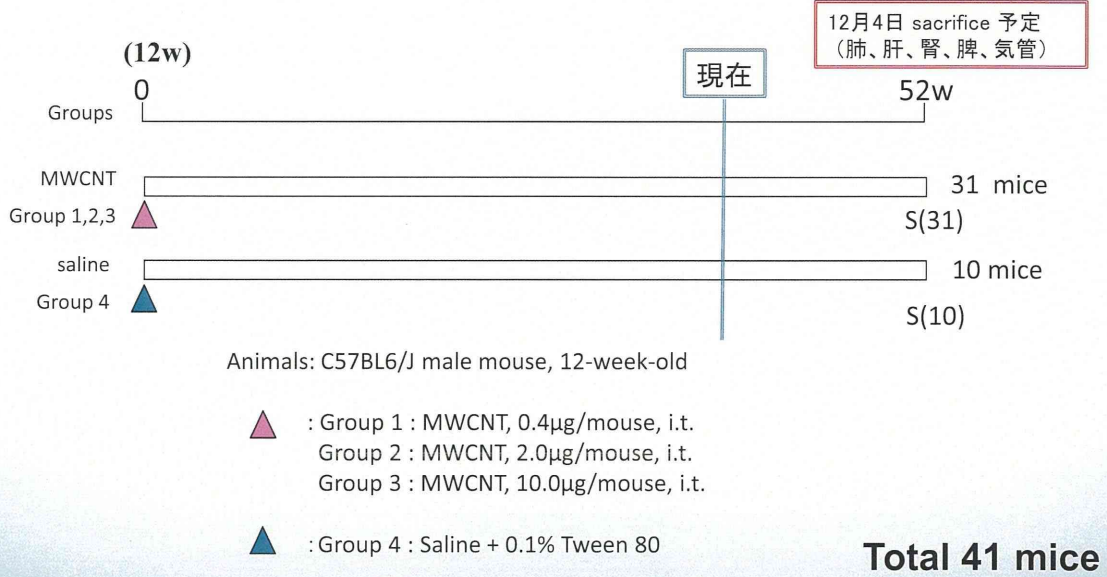
- 群間で体重に有意差はなかった。
- MWCNT 投与群で、肺および腎臓の相対重量が有意に低下していた。
- MWCNT 投与群の20匹の中で、5匹の肺組織で合計6本のMWCNTと思われる針状物質が認められた。周囲に反応性病変がみられなかった。
- 群間で、Inflammation score や組織学的所見に有意差がなかった。

総括

- マウスおよびラットでの、52週間の気管内投与実験では、いずれもごく少数ではあるが、肺内に MWCNT が残存している動物が存在した。
- マウスおよびラットにおいて、MWCNT投与による炎症性 score および病理組織学的所見に有意差は見られなかった。

12ER 雄性 C57BL6/J マウスにおける低用量 MWCNT 気管内投与実験(52w)

2012.12.11.~ 2013.12.04.



Experimental design:

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

ナノマテリアルの全身暴露吸入方法に関する研究

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

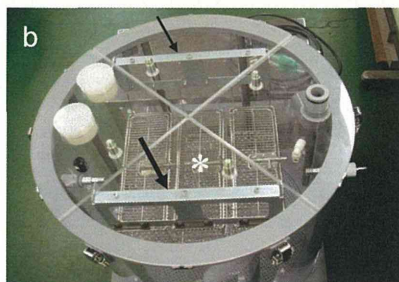
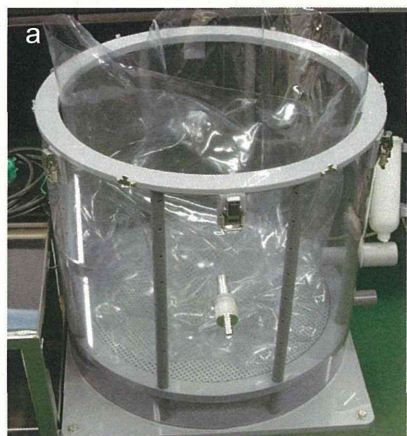
ナノマテリアルの高分散小型全身暴露吸収システム

- 多くの検体を評価するため、検体の切り替えが容易であること
粒子状の検体に汚染されたダスト発生装置、暴露チャンバーを除染することは困難である
- 施設の改造は最小限であること
- 汎用性が高く、分散性が良いこと
- 検体の形状に影響を与えない分散方法であること

暴露チャンバー

特許出願:「吸入曝露試験装置」
特願2012-148848

検体が触れる部分をディスポーザブルとし、検体を切り替える際の除染の問題を回避した



全体像

- ・マウスは16匹収容が可能
- ・蓋の下部に吊り下げ金具を装着(矢印)
- ・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)

- ・インナーチャンバー:導電性樹脂(交換可能)
- ・アウターチャンバー:アクリル製
- ・Φ550mm × H550mm、気積:105.5L
- ・差圧:室内>インナー>インナーとアウター間
差圧により柔軟なインナーチャンバーの形状を保つ

3

音響式ダスト発生装置(米国NIOSH考案)

- ダスト発生装置は、ラテックス製ダイア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、電圧制御によりダスト発生量をコントロールする。

MWCNT(MWNT-7、三井物産)の原末(U-CNT)を検体とし、音響式ダスト発生装置による吸入曝露実験を行った。

4

音響式ダスト発生装置

NIOSHオリジナル

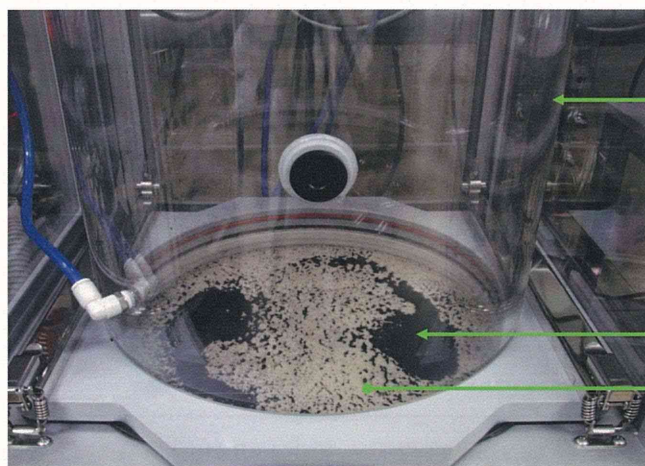


柴田科学(株)
(製品名:DF-7)



5

音響式ダスト発生装置 ダスト発生カラム



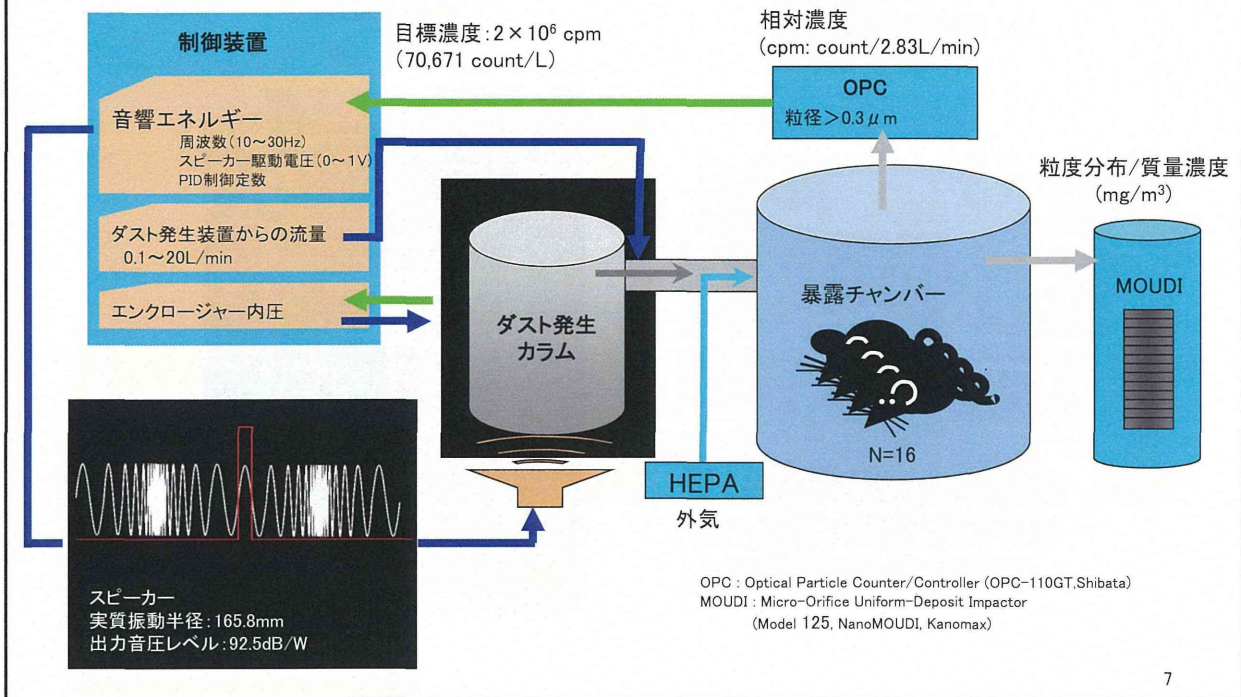
ダスト発生カラム
φ : 330mm
H : 460mm
V : 39.3L

MWCNT (MWNT-7)

ラテックス製ダイヤフラム

6

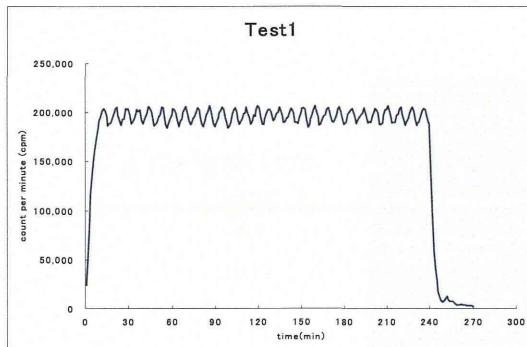
音響式ダスト発生装置を使用した全身暴露吸入装置の概略



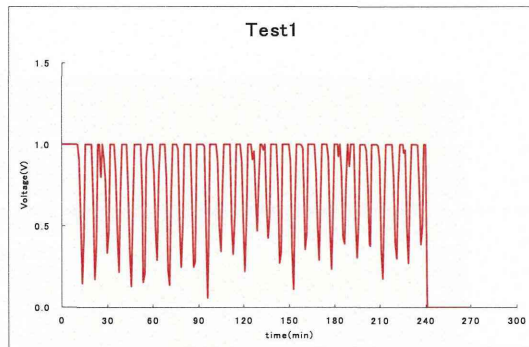
7

音響式ダスト発生装置 U-CNTを使用した性能評価

暴露チャンパー内 相対濃度



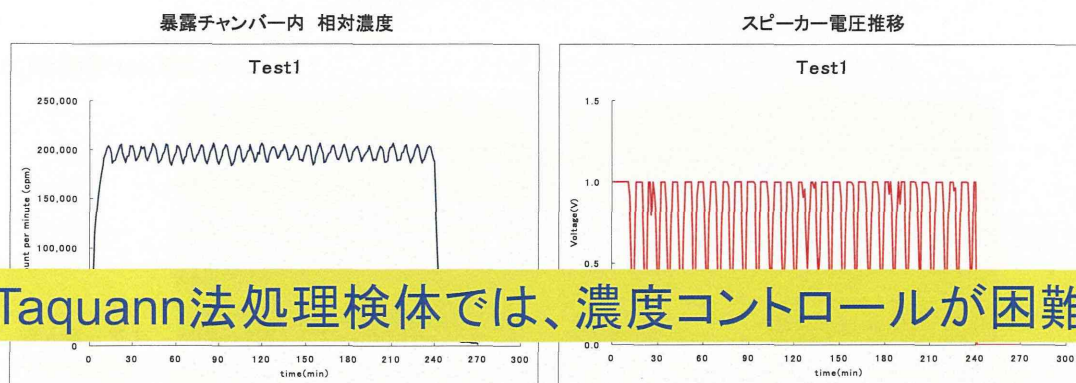
スピーカー電圧推移



Date of measurement	2011/12/13	2011/12/16	2011/12/19
Mass concentration (mg/m^3)	0.328	0.290	0.273
OPC Average cpm (/L) \pm s.d.	$68,329 \pm 6,542$	$70,644 \pm 6,310$	$67,528 \pm 10,454$
K-value ($\text{mg}/\text{m}^3/\text{cpm}$)	4.80×10^{-9}	4.10×10^{-9}	4.10×10^{-9}

8

音響式ダスト発生装置 U-CNTを使用した性能評価



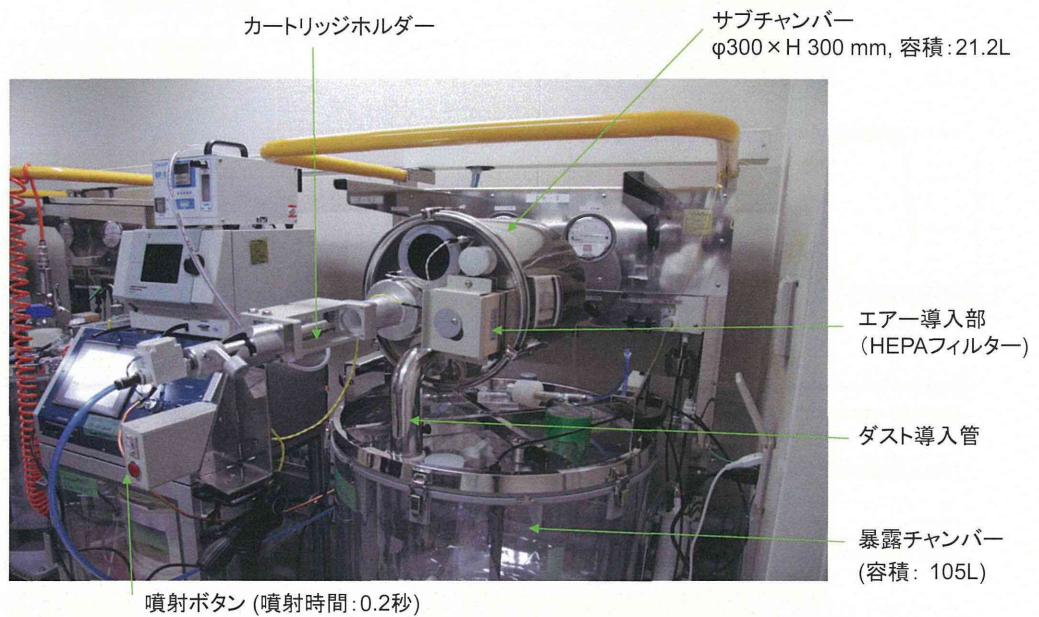
Taquann法処理検体では、濃度コントロールが困難

Date of measurement	2011/12/13	2011/12/16	2011/12/19
Mass concentration (mg/m ³)	0.328	0.290	0.273
OPC Average cpm (1/L) ±s.d.	68,329±6,542	70,644±6,310	67,528±10,454
K-value (mg/m ³ /cpm)	4.80 × 10 ⁻⁹	4.10 × 10 ⁻⁹	4.10 × 10 ⁻⁹

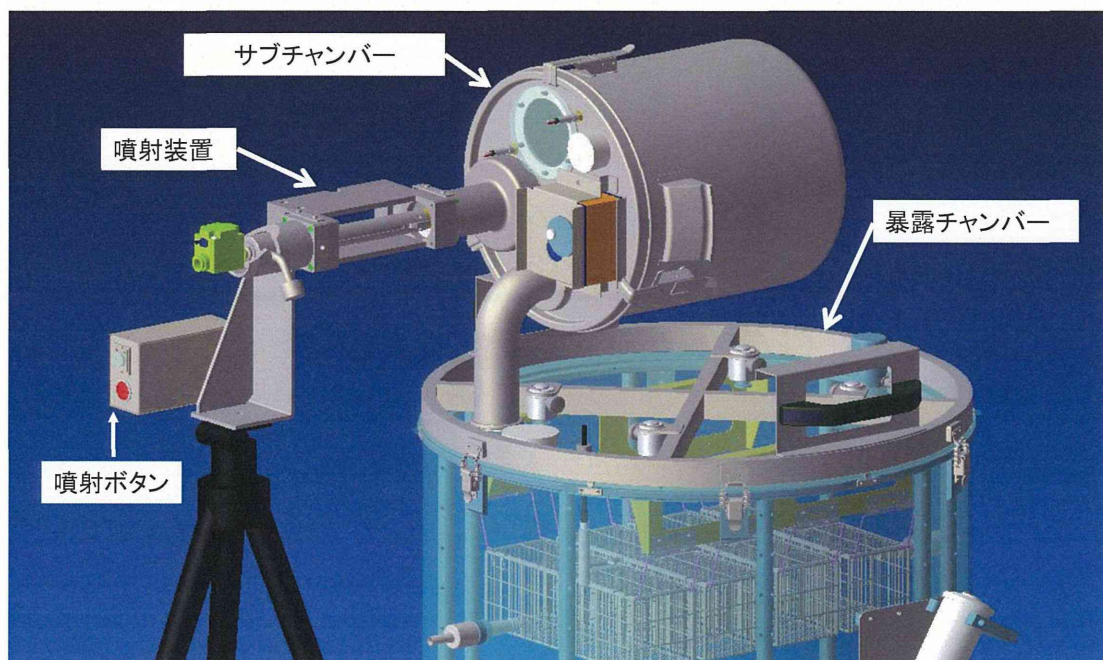
9

Taquann法処理検体に適した ダスト発生装置の開発

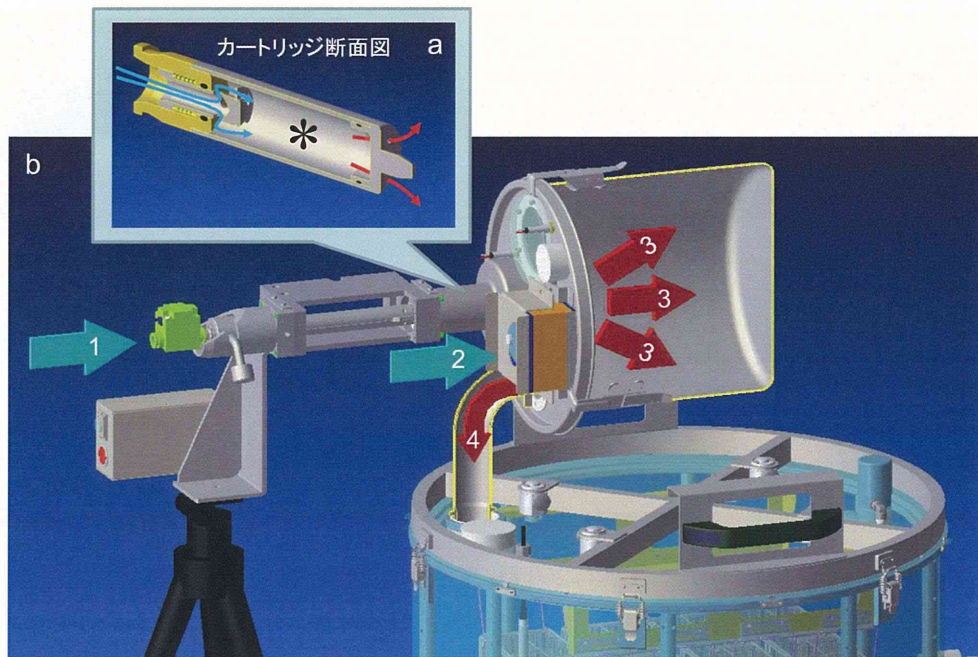
カートリッジ直噴式ダスト発生装置



カートリッジ直噴式ダスト発生装置 模式図



カートリッジ直噴式ダスト発生装置 ダスト発生方法の模式図



Taquahashi et al., JTS, 2013

13

T-CNTのカートリッジへの充填方法



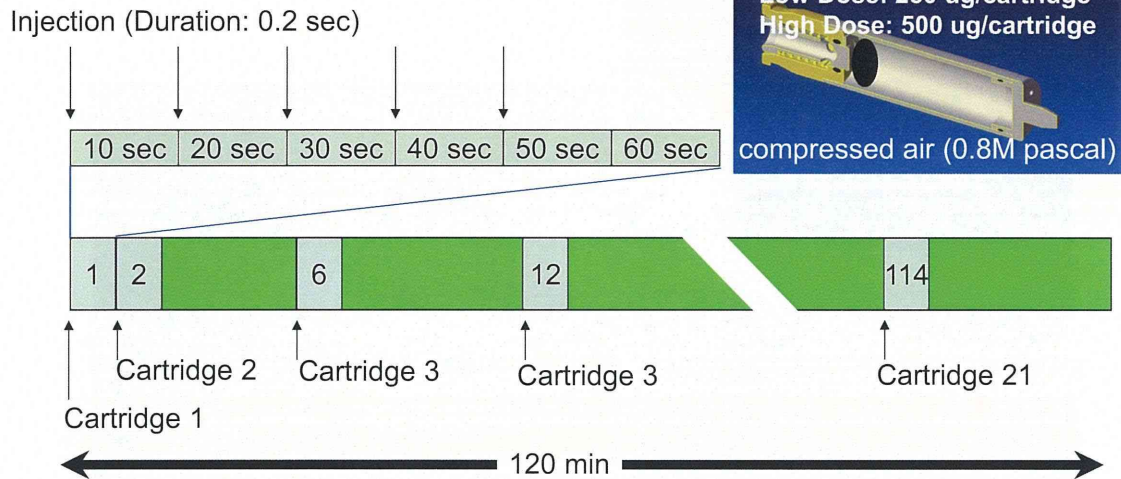
カートリッジ
Φ22 mm × H65 mm
容量 23.5mL



T-CNTを再度懸濁してカートリッジに分注後、液体窒素で固化、真空ポンプで昇華させる

14

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250ug、高用量は500ugのT-CNTを充填
- カートリッジに圧縮空気を噴射(0.8MPa、0.2秒×5回、10秒間隔)
- 最初の2回は1分間隔、以降は6分間隔で検体をチャンバー内へ導入(21本/2時間)

15

カートリッジ直噴方式ダスト発生装置 性能評価

<相対濃度測定>

- 凝縮粒子カウンター(CPC、CPC3776、TSI)
粒径範囲 2.5 nm~3um、サンプル流量0.3L/min
- 光散乱粒子カウンター(OPC、OPC-110GT、柴田科学)
粒径範囲 >0.3um以上、サンプル流量 2.83L/min
※高用量はOPCの測定範囲の上限(3,000,000cpm, 1,060,071 #/L/min)を超えたため測定は未実施

<質量濃度測定>

- ローボリウムサンプラー(φ55mm、柴田科学)+フッ素樹脂処理ガラス繊維(T60A20、東京ダイレック)
- サンプリングポンプ(AIP-105、柴田科学)、サンプル流量 1.5L/min
- マイクロ天秤(XP26V、METTLER TOREDO)

<暴露チャンバー内のT-CNTの形態観察>

- フィルターホルダー(φ25mm、ミリポア)+酸化アルミニウム製フィルター(Anodisc 25、ワットマン)
- サンプリングポンプ(AIP-105、柴田科学)、サンプル流量 5L/min × 3min
- 走査型電子顕微鏡(VE-9800、キーエンス)

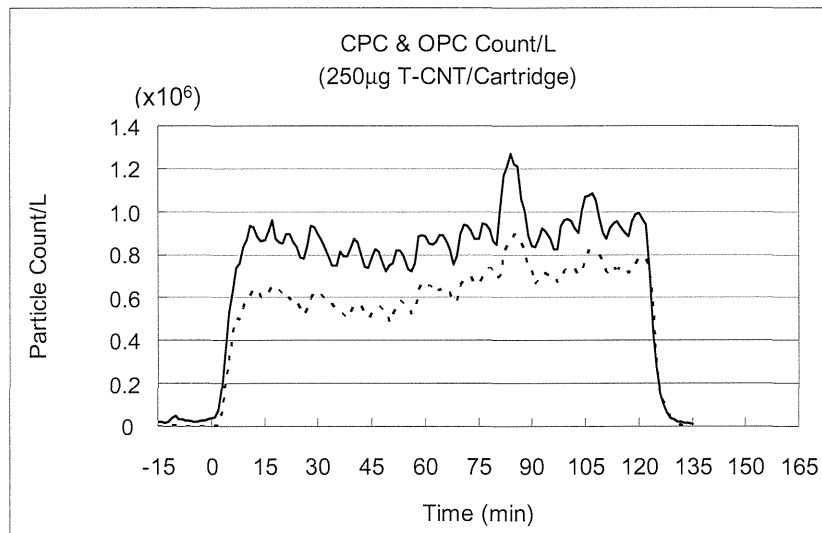
16

カートリッジ直噴式ダスト発生装置を使用してT-CNT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

17

相対濃度推移



実線: CPC 点線: OPC

Taquahashi et al., JTS, 2013

18

暴露チャンバーからサンプリングしたT-CNT

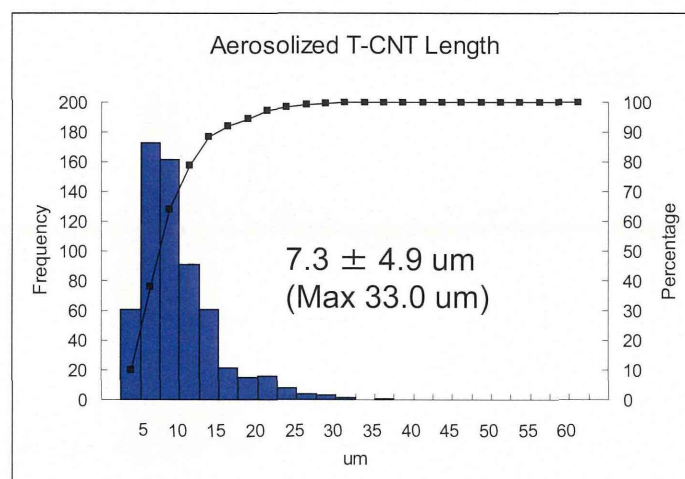
Taquahashi et al., JTS, 2013



5L/min for 3 minutes SEM x1,000 (scale bars are 10 μm).

19

暴露チャンバー内のT-CNTの長さ



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)

20

p53+/-マウス全身暴露吸入実験

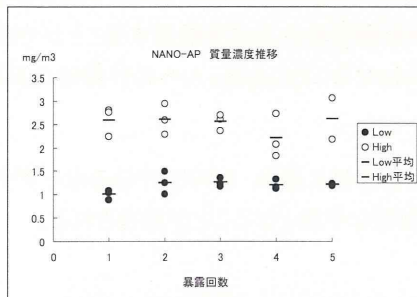
2時間/日 × 5日反復暴露

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

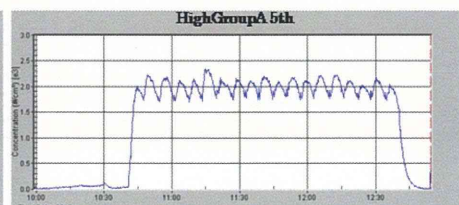
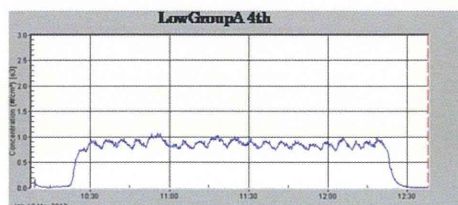
暴露を終了し、観察中

21

p53+/-マウス全身暴露吸入実験 暴露チャンバー内の濃度



	低用量 mg/m ³	高用量 mg/m ³
1回目	1.00	2.59
2回目	1.25	2.60
3回目	1.26	2.55
4回目	1.20	2.20
5回目	1.21	2.62



22

改良型カートリッジ直噴式ダスト発生装置



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、サブチャンパ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た改良を行った。

23

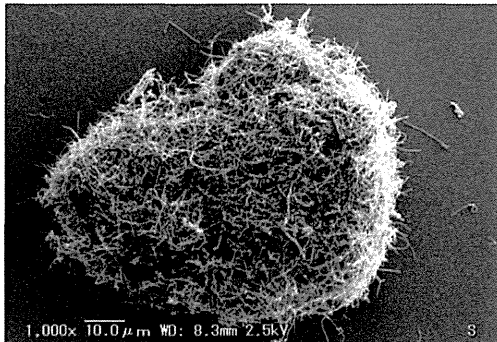
まとめ

- 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ったが、人の実際の暴露様式に即した全身暴露吸入方法を開発することができ、これに分散性に優れた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と思われる。
- またこの全身暴露吸入方法は、外部への漏洩の危惧もなく安全性に優れ、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。

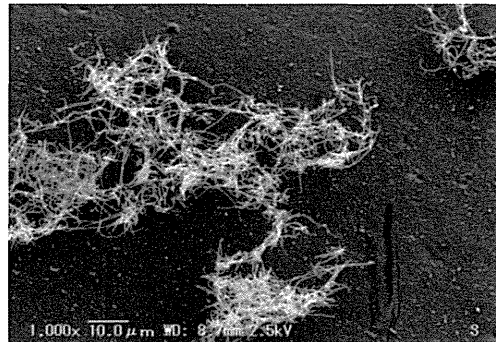
24

音響式ダスト発生装置 ダスト発生チャンバー内のMWCNT

U-CNT



T-CNT



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-(H23-化学-一般-005)

ナノマテリアルの吸入暴露による体内動態 に関する研究

高橋 祐次
Taquahashi, Yuhji

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

- ・ 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。
- ・ カーボンナノチューブ(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「サイズと粒型の分布(以下、「性状」)が生体影響に対して重要な意味を持つ。
- ・ 肺に含まれるMWCNTの抽出し、繊維の性状の把握、定量化を行った。

背景-2

- ・ 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多く含まれている。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末梢への吸入を阻害する可能性がある。
- ・ ヒトで想定される暴露状況に比較して、凝集体・凝固体の沈着による影響が大きいこと、気道系がヒトより相対的に短いマウスを用いた動物実験では、推察されるため、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。
- ・ MWCNTを高度に分散する方法(Taquann法)を独自に開発した。

高分散性MWCNTの調製方法 (Taquann法)

Taquahashi Kanno

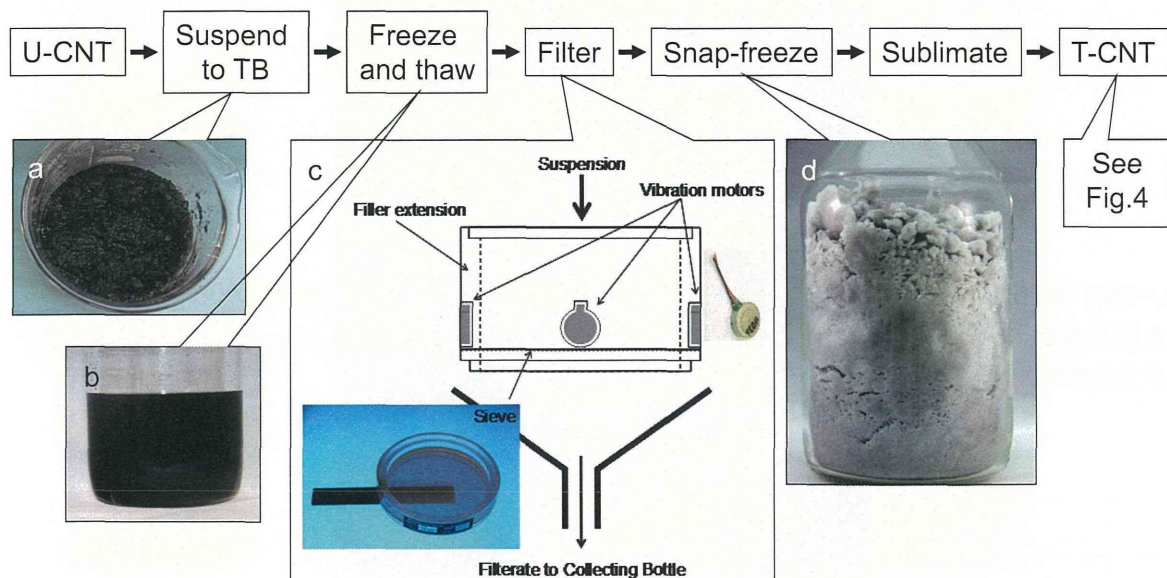
Taquann法

特許出願 特願2012-15843
「高分散性ナノマテリアルの調製方法」

- 走査型電子顕微鏡の試料作製方法である「臨界点乾燥」に着想を得た技術である。
- MWCNT原末(U-CNT)をt-ブチルアルコール(TB、融点 25.69°C)に懸濁し、金属性フィルター(目開き 25 μm)で濾過し、大型の凝集体・凝固体を除去する。
- 濾液を直ちに液体窒素で凍結・固化し、TBを溶媒回収型真空ポンプでTBを昇華させて回収する。
- 液相で濾過するため、濾過効率が良く、表面張力を受けない状態で乾燥させるため、分散性が確保される。

5

Taquann法の概要



Taquahashi et al., JTS, 2013

6