

相関性が認められた。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 $7.3 \pm 4.9 \mu\text{m}$ (Max. $33.0 \mu\text{m}$) であり、U-CNT 繊維の平均値、長さの分布と同等であった。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であり、かつ原体に含まれる単離繊維の形状及び大きさの分布が保たれていることが確認された。カートリッジ直噴式ダスト発生装置と Taquann 法処理検体を組み合わせることで、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。

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

本分担研究の目的は、工業的に大量生産されるナノマテリアルの毒性評価をヒトで想定される現実的且つ重要な暴露経路である全身暴露吸入により実施するため、その暴露方法を開発することにある。

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示されている。ヒトにおいては、全身暴露による吸入毒性が最も重要であるが、実験動物を用いた毒性試験の報告は限られている。従来、粉体の吸入暴露実験施設が大規模施設に限られること、ナノマテリアルが凝集しやすいことがその理由である。

先行研究[H20-化学一般-006]の判断の下、腹腔内投与によって中皮腫発がん性が示された多層カーボンナノチューブ (MWCNT) を対象として、人体の暴露様式に即した全身暴露吸入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」¹⁾を導入し、これに独自に開発した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。H23年度は MWCNT (MWNT-7、三井) の特性に合わせた暴露制御パラメータ (送風量・圧、音響音圧・周波数) の最適化を行い、マウスに暴露を行った。

本研究班では、検体そのものの分散性を高める方法の開発が行われた。すなわち、凝集体・凝固体を除去し分散性の高い検体が得られる Taquann 法を開発した²⁾。ナノマテリアルは、その比表面積が極めて大きいことがバルク状態の物質とは異なる特性を示す要因であるが、隣接する分子の表面原子との影響も強くなるため容易に凝集する要因にもなっている (本研究で使用した MWCNT は、供与された状態ではその大部分が繭状の凝集体・凝固体である)。一方で、空中に舞い上がった MWCNT の挙動を考えると、沈降速度が速い凝集体・凝固体はその比率が減少し、またヒトの肺に到達するまでに、上気道部分において凝集体・凝固体は効果的に排除されることから、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。実際に、HanらはCNTを使用している作業環境中のモニタリングを行い、分散したCNTが気中に存在していることを報告している³⁾。そこで、動物実験によりナノマテリアルのヒトにおける吸入毒性を予想・推定するためには、凝集体・凝固体を含まない分散性の確保された検体を使用しての全身暴露吸入試験が有用である。

H23年度の分担研究では、MWCNT原末(U-CNT)と並行してTaquann法処理を行った検体(T-CNT)での研究も進めた。音響式ダスト発生装置を用いた検討では、音響エネルギーによる挙動がU-CNTとは異なり、ダスト発生量が少なく十分な濃度を保つことが出来なかった。H24年度はTaquann法処理検体に適したカートリッジ直噴式ダスト発生装置を開発した。H25年度は、p53+/-マウスを用い、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実施した。

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) ^{a)}
長さ	1-19 μ m (> 5 μ m 27.5%) ^{a)}
繊維数	3.55×10^{11} 本/g ^{a)}
製品形状	繭状凝集体及び単離繊維
化学組成	炭素純度 99.5%以上 鉄：3500 ppm(0.35%) ^{a)} 硫黄：470 ppm ^{a)} 塩素：20 ppm ^{a)} フッ素：<5 ppm ^{a)} 臭素：<40 ppm ^{a)}

^{a)}東京都健康安全研究センターの測定データ^{4,5)}

MWNT-7の原末(U-CNT)にTaquann法を適用

した検体(T-CNT)を用意した。T-CNTはU-CNTに含まれる凝集体を含まず、もっぱら分散性の高い単離繊維からなる。Taquann法は、検体を三級ブタノール(TB)に懸濁後、目開き25 μ mの金属製フィルターで濾過し、直ちに液体窒素で濾液を固化した後、真空にてTBを昇華させ、乾燥状態の高分散性検体を得る方法である。(詳細は、高橋祐次分担研究者報告を参照)。

B-2. 動物、群構成及び暴露スケジュール

動物は、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。

(1) 音響式ダスト発生装置

①動物

H23年度では、MWCNTの肺組織沈着量測定実験の検討にC57BL/6NCrSlc(SLC、雄、19週齢)、DNAマイクロアレイの実験には、C57BL/6Jマウス(日本チャールスリバー、雄、12週齢)を使用した。

②群構成

DNAマイクロアレイ実験では、対照群とU-CNT暴露群の2群とした。U-CNTは目標相対濃度を 2×10^5 cpm(OPC)とした。

③暴露スケジュール

肺組織沈着量の測定実験では2時間の単回暴露を行った。DNAマイクロアレイ実験

では、4時間の単回暴露を行った。

(2) カートリッジ直噴式ダスト発生装置

①動物

性能評価実験では、C57BL/6NCrSlc (SLC、雄、10-11 週齢)、慢性影響評価実験では、自家繁殖した C57BL/6NCrSlc をバックグラウンドとする p53+/-マウス (雄、18 週齢) を使用した。このマウスは当研究部において、MWCNT の腹腔内投与実験に使用した実績がある^{4,6)}。

②群構成

性能評価実験では T-CNT をカートリッジ 1 本当たり 0.5 mg を充填して 2 時間の暴露を行った。

慢性影響評価実験では、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 mg/m³、高用量群 2 mg/m³とした。

③暴露スケジュール

性能評価実験及び慢性影響評価実験ともに暴露時間は 2 時間/日とし、週 1 回の暴露を 5 週間実施した。慢性影響評価実験では、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) 音響式ダスト発生装置

NIOSH から複製許可と共に導入したダスト発生装置⁷⁾を基に、柴田科学株式会社で新たに設計した全身暴露吸入装置を国立医薬品食品衛生研究所 環境保全型動物飼育棟 (26 号館) 603 室に装置を設置した (研究協力者：生田達也、

鶴田祐吾、柴田科学株式会社)。本装置は、コンプレッサー、マスフローコントローラー、音響式ダスト発生装置及び暴露チャンバーから構成される。コンプレッサーで圧縮された空気は、HEPA フィルター、マスフローコントローラーを経て、音響式ダスト発生装置に送風される。音響式ダスト発生装置は、制御装置、エアロゾルを生成するアクリル製のダスト発生カラム (直径 330 mm、高さ 460 mm、容積 39.3 L) 及びそれを取り囲むエンクロージャーから構成される。ダスト発生カラムはシリンダーの両端にラテックス製ダイアフラムを装着した太鼓のような構造である。検体はダスト発生カラム内に投入する。スピーカー (実質振動半径 165.8 mm、入力 150 W、再生周波数帯域 ~2.5 kHz、出力音圧レベル 92.5 dB/W) からの音響エネルギーによりラテックス製ダイアフラムが振動して MWCNT は分散されダスト発生カラム内にエアロゾルが発生する。ダスト発生カラム内へ一定の流量で送風しエアロゾルを暴露チャンバー内に導入する (図 1、図 2)。

音響式ダスト発生装置のスピーカーからは緩やかな変調を伴った正弦波 (10~数十 Hz) が出力される。一定の周波数の正弦波が出力されるのではなく、設定した周期 (秒) で周波数が徐々に変化する設計となっている。また、一周毎に矩形波のブレイクノイズが挿入され検体の凝集を防ぐようになっている (図 3)。効率よくエアロゾルを発生させ、かつ濃度が一定に保たれる周波数について検討した。エアロゾルの濃度制御は、スピーカー駆動電圧に対して PID アルゴリズムを使用したフィードバック制御を行い、目標とする相対濃度に調節した。H23 年度に U-CNT を検体として、PID パラメータ (比例定数、積分定数、微分定数) を検討し、応答性の良く濃度の変動幅が最も小さくなる数値を検討した。目標相対濃度を 2×10^5 cpm と設定とし以下の条件で安定した濃度制御が可能となった。

①ダスト発生装置からの送風量； 2 L/min

②音響周波数

- ・基底周波数；20 Hz
- ・周波数の変動範囲；10 Hz
- ・可変時間；10 秒

③PID 制御パラメータ

- ・比例定数 0.481
- ・積分定数 16.3sec
- ・微分定数 2.42sec

(2)カートリッジ直噴式ダスト発生装置

H23～H24 年度に音響式ダスト発生装置に、T-CNT を適用してダスト発生条件の検討を行ったが、音響エネルギーによる挙動がU-CNT とは異なり、安定した暴露実験にはダスト発生装置の改造が必要となった。そこで、H24 年度に新たに開発したダスト発生装置では、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方法を選択した²⁾ (研究協力者：生田達也、鶴田祐吾、柴田科学)。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 4A、図 4B)。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 4C)。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 L/min) で暴露チャンバーに導かれる構造となっている (図 4D)。

カートリッジへの T-CNT の充填は、T-CNT を所定の濃度 (0.05 mg/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 5)。低用量群用に 0.25 mg/カートリッジ、高用量群用に 0.5 mg/カートリッジを用意した。

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 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 L/min (基礎換気流量；10 L/min、OPC；2.83 L/min、CPC；0.3 L/min、質量濃度測定；1.5 L/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 6)。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 7)。(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ト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。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。

(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、単位当りの粒子の個数に相当する

相対濃度 (CPM; count per minutes) と質量濃度 (mg/m^3) 測定を並行して行った。

相対濃度測定は、0.3 μm 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: 3×10^5 個/2.83 L、柴田科学) と、2.5 nm から 3 μm 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: 3×10^5 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。OPC と CPC の相対濃度は単位が異なるため、両者の値の比較のために個/L/min を算出した。

質量濃度測定は、ローボリウムサンプラー (080050-155、 ϕ 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、 ϕ 55mm、捕集効率 (DOP 0.3 μm): 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。濾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 $1.5 \text{ L/min} \times 120 \text{ min} = 180 \text{ L}$ から 1 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。

音響式ダスト発生装置を用いた実験では、ナノ粒子用の分級装置 (MOUDI: Micro-Orifice Uniform-Deposit Impactor, Model 125 NanoMOUDI, KANOMAX) を使用して粒度分布の検討を行った (分級サイズ No. 1; 10 μm , No. 2; 5.6 μm , No. 3; 3.2 μm , No. 4; 1.8 μm , No. 5; 1.0 μm , No. 6; 0.56 μm , No. 7; 0.32 μm , No. 8; 0.18 μm , No. 9; 0.10 μm , No. 10; 0.056 μm , No. 11; 0.032 μm , No. 12; 0.018 μm , No. 13; 0.01 μm)。各分級ステージには専用のアルミホイルにシリコンオイルを塗布したものを装着し

MWCNT を回収した。シリコンオイル塗布アルミホイルは、使用前に 50°C のインキュベーター内で 3 日以上留置しシリコンオイルに含まれる溶媒を除去して使用した。サンプリングは暴露時間を通して 10 L/min の流量で暴露チャンバー内のエアロゾルを吸引した。

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、 ϕ 21 mm、孔径 0.1 μm 、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. 音響式ダスト発生装置

<U-CNT を使用した実験>

U- 暴露チャンバー内の濃度測定結果

U-CNT を検体として、OPC 相対濃度の目標値を $2.0 \times 10^5 \text{ cpm}$ (2.83L)、4 時間の暴露時間で、濃度制御が良好であった 4 回の結果を表 1 に、代表的な質量濃度の推移とスピーカー駆動電圧の推移を図 8 に示した。平均質量濃度は 0.22 ~ 0.33 mg/m^3 であった。一方、粒度分布は実験毎に異なった分布であった (図 9)。この暴露条件でマウスに単回暴露を行い、DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現変動解析に供した。

②暴露チャンバー内のMWCNTの状態観察

MOUDI の各分級ステージの観察結果を図 10 及び図 11 に示した。分級ステージNo. 4、No. 5、No. 6 及びNo. 7 には肉眼観察でもMWCNT が回収されている様子が確認された。SEM 観察において、分級ステージNo. 1 では多角形の粒子が確認されるのみで、線維状のMWCNT は観察されなかった。No. 2～No. 7 には線維状のMWCNT が多く観察された。No. 8 では線維状のMWCNT が観察されたが数は少なかった。No. 9～No. 13 では線維状のMWCNT の存在を明確に確認できなかった。加速電圧を上げることで、不明瞭ながら像が検出されたため、このステージに捕集されるMWCNT はアルミニウム表面のシリコンオイル層に埋没しているものと考えられた。MWCNT の分散状態を確認する目的で、暴露チャンバー内のエアロゾルをメンブレンフィルターに吸着させて回収しSEM 観察を行った。繊維のサイズは $11.420 \pm 17.059 \mu\text{m}$ (平均土SD、n=475) であった。(図 12)。

<T-CNT を使用した実験>

T-CNT を検体として、送風量 (2-10 L/min)、音響周波数 (10～40Hz)、音響エネルギー (スピーカ駆動電圧) の条件検討を行った。その結果、音響エネルギーによる挙動がU-CNT とは異なることが明らかとなった。U-CNT では音響エネルギーを増加させることでダスト発生量が増加するが、T-CNT では音響エネルギーの増加量に見合ったダスト発生量が得られなかった。また、ダスト発生チャンバー内に十分な検体量があるにもかかわらず、ダスト発生量は時間と共に減少する傾向にあった (図 13)。ダスト発生量も、CPC の相対濃度表示で 10 個/mL を超えることはなく相対濃度を示標としたフィードバックコントロールも困難であったため、ダスト発生装置の改良を行い、新規のダスト発生装置を使用した実験を進めた。

ダスト発生装置のカラムに付着した検体を走査型電子顕微鏡で観察すると、U-CNT は硬くパッキングされた凝集塊であるのに対してT-CNT は緩く絡まった状態の繊維塊であった (図 14)。

C-2. カートリッジ直噴式ダスト発生装置

<性能評価実験>

①暴露チャンバー内の濃度測定結果

T-CNT を検体とし、カートリッジ直噴式ダスト発生装置を使用して暴露を行った結果を、図 15 及び表 2 に示した。この実験では、暴露チャンバー内にマウスを 12 匹 (C57BL/6NCrSlc、SPF、SLC、10-11 週齢、体重 23.8-30.8 g) 収容し、一日 2 時間、5 日間の反復暴露吸入を実施した。

CPC による 2 時間の相対濃度は、 $8.3 \sim 23.0 \times 10^5$ 個/L/min であった。質量濃度は $1.28 \sim 3.46 \text{ mg/m}^3$ であった。相対濃度から質量濃度へ変換する際に用いる質量濃度変換係数 (K 値) は、 $1.33 \times 10^{-9} \sim 1.81 \times 10^{-9}$ であった。なお、OPC は装置の測定の上限值 ($3 \times 10^5 \text{ cpm}$) を一時的に超える場合があったため、測定を中止した。

相対濃度の推移は、噴射後 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。また、実験日によって相対濃度の推移は異なった。噴射後のカートリッジには検体が残存しており、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。

②暴露チャンバー内のMWCNTの状態観察

オープンフェイスのフィルターホルダーを使用し、酸化アルミニウム製フィルターに捕集した繊維の状態を走査型電子顕微鏡で観察

した(図16)。多くの繊維は単離分散状態であり、T-CNTは暴露チャンバー内の気相においても分散性が保持された状態であ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 μm)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 $7.3 \pm 4.9 \mu\text{m}$ (Max. $33.0 \mu\text{m}$, $N=618$)であり、これはU-CNT 繊維の平均値、長さの分布と同等であった。

<p53+/-マウスの慢性影響評価実験>

群構成を表3に示した。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(3×10^5 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 $1.19 \pm 0.16 \text{ mg/m}^3$ ($N=15$)、高用量群 $2.52 \pm 0.35 \text{ mg/m}^3$ ($N=15$)であった(表4)。相対濃度と質量濃度には相関性が認められた(図17)。質量濃度変換係数(K値)は、CPC低用量群の平均値; 1.56×10^{-9} 、CPC高用量群の平均値; 1.35×10^{-9} 、OPC低用量群の平均値; 1.77×10^{-9} であった。CPCで測定した相対濃度推移の代表例を図18に示した。

暴露チャンバー内の温度は、動物の導入直後から $0.5 \sim 1^\circ\text{C}$ 上昇した。湿度はほぼ一定の値であった(図19)。

D. 考察及び結論

H23年度では、U-CNTを検体として音響式ダスト発生装置によるダスト発生条件を確立し、マウスに全身暴露吸入を実施してDNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現変動解析に供した。H24年度では、Taquann法により分散性を高めたT-CNTを使用して、音響式ダスト発生装置による暴露条件の検討を行ったが、音響エネルギーによる挙動がU-CNTとは異なり、安定した濃度調節ができなかった。

T-CNTに適したダスト発生方法として、カートリッジ直噴式ダスト発生装置を新たに開発し、全身暴露吸入に適用する方法を確立した。H24年度の性能評価実験では、実験日毎の相対濃度推移と質量濃度には3倍程度のバラツキが認められたが、圧縮空気の噴射回数及び噴射時期を調節することで、これを解決した。H25年度のp53+/-マウスを使用した慢性影響評価実験では、5週間に亘る実験において安定した暴露を行うことが可能であった。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で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等であったことから、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。

この一連の開発研究の過程で、U-CNTは音響エネルギーによって凝集塊が衝突することによって繊維が単離されるが、T-CNTは音響色ダ

スト発生装置では逆に凝集が進むことが判明した。このことは、音響式ダスト発生装置は検体の性状が分散性に大きく影響する事を示唆している。これに対して、ここで確立したカートリッジ直噴方式は、Taquann 法処理検体を用いることで、汎用性が高い可能性が示唆される。また、質量濃度と OPC で測定した相対濃度から計算した質量濃度変換係数は、U-CNT と音響式ダスト発生装置の組み合わせでは凡そ 4×10^{-9} 、T-CNT とカートリッジ直噴式ダスト発生装置の組み合わせでは 2×10^{-9} 以下であった。T-CNT とカートリッジ直噴式ダスト発生装置の組み合わせは、音響式ダスト発生装置に比較して、より微細な粒子が発生していることが示唆される。

カートリッジ直噴式ダスト発生装置の課題として、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 (図 20A、20B)。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 (図 20C)。改良型の試運転を行い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 (図 20D)。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。

以上、本分担研究では MWCNT 原末の凝集体・凝集塊を除去し分散性を高めた 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。ヒト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、ヒト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) Walter McKinney, Bean Chen, and Dave Frazer, Computer controlled multi-walled carbon nanotube, Inhalation Toxicology, 2009, 1-9
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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
Feb;34(1):65-76.

- 6) 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) 高橋祐次、小川幸男、高木篤也、相磯成敏、今井田克己、菅野純、音響式ダスト発生装置を用いた多層カーボンナノチューブの全身暴露吸入と肺内負荷量の測定、第39回日本毒性学会学術年会(2012.7.18)
- 2) Yuhji Taquahashi, Yukio Ogawa, Atsuya Takagi, Shigetoshi Aiso, Katsumi Imaida, Jun Kanno, Whole Body Inhalation Exposure of Multi-Walled Carbon Nanotube by Using an Acoustical Dust Generator and Measurements of Its Body Burden in Lung, The 6th International Congress of Asian Society of Toxicology (2012.7.20)
- 3) 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*

rats., J Toxicol Sci. 2009

Toxicol Sci. 2013;38(4):619-28.

- 4) 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)
- 5) 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



図1 音響式ダスト発生装置

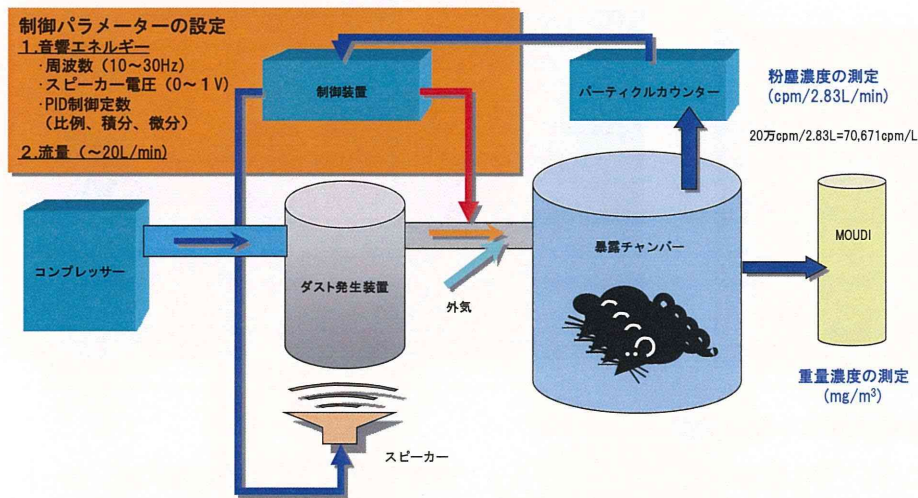


図2 全身暴露吸入装置の概略図

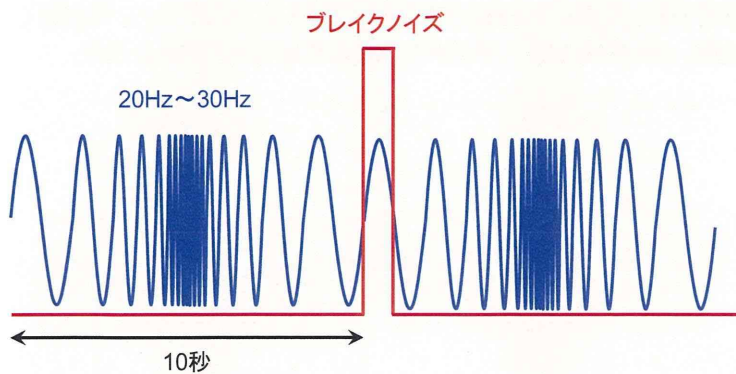


図3 音響式ダスト発生装置から出力される波形のイメージ

基底周波数20Hzとし20Hz～30Hzの周波数域を1周期10秒間で変化させる。1周期終了後に矩形波のブレイクノイズが出力される。

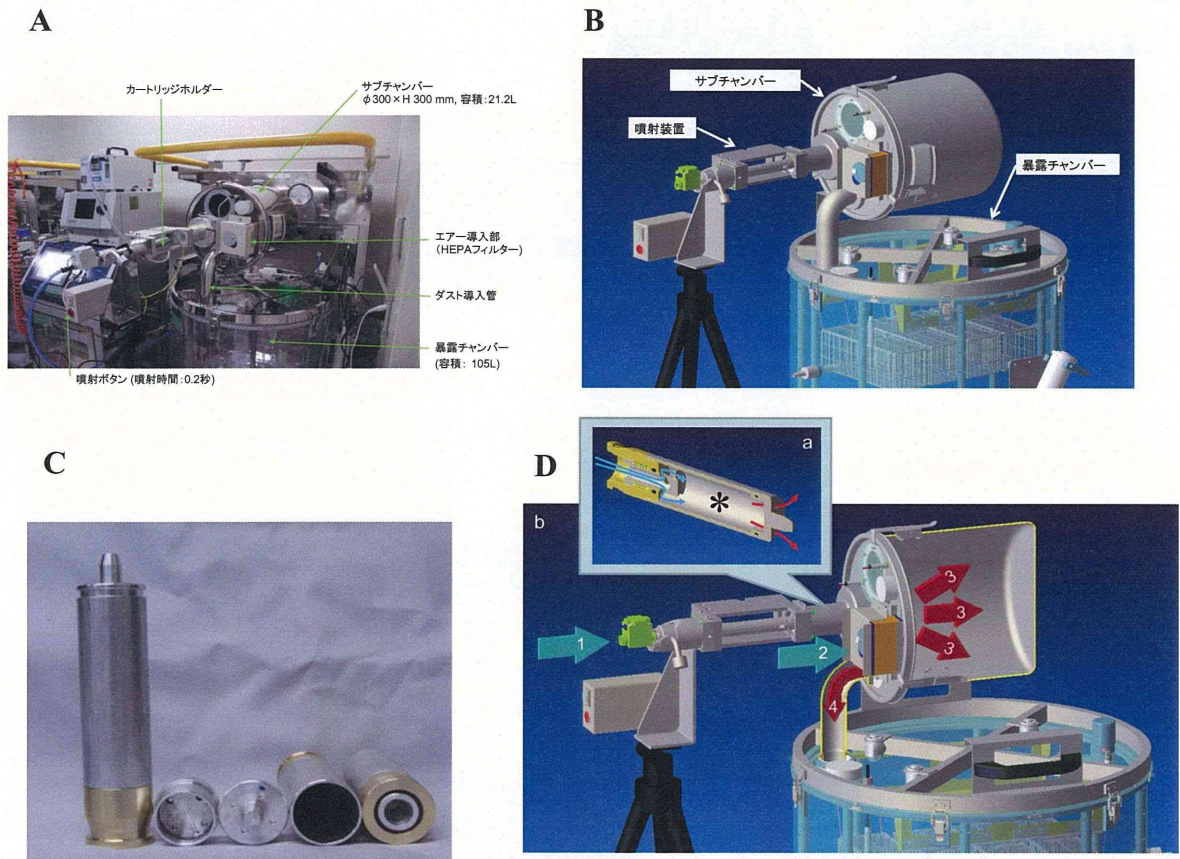


図4 カートリッジ直噴式ダスト発生装置

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5 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。

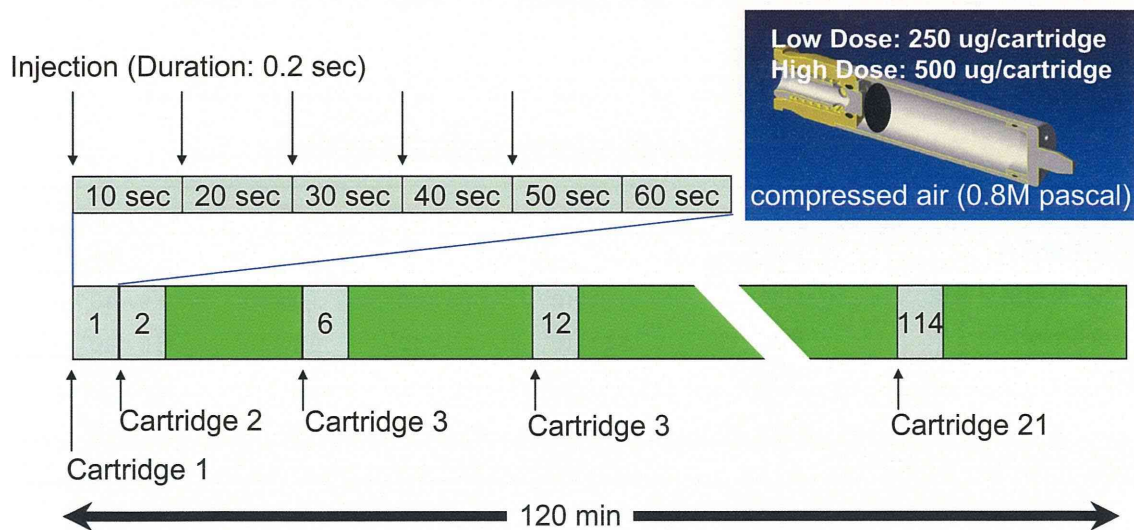


図6 カートリッジ直噴方式ダスト発生装置暴露方法

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）。

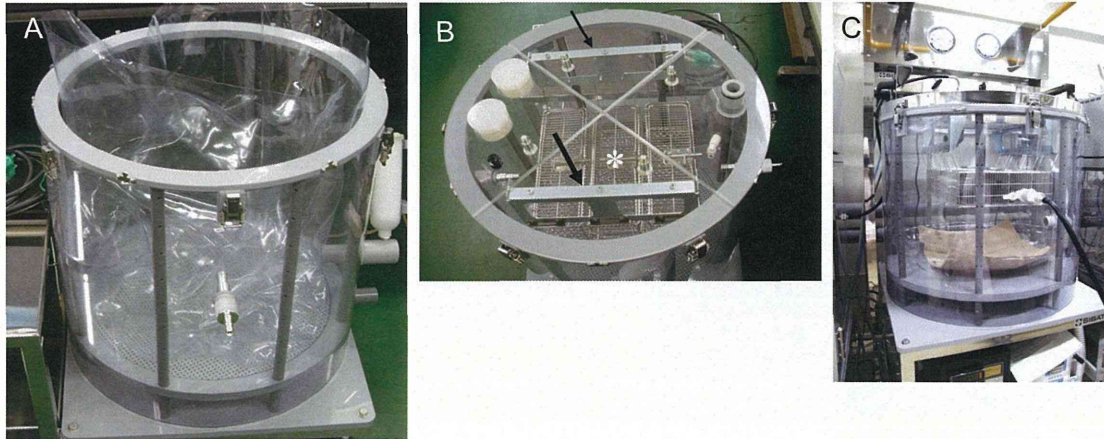


図7 暴露チャンバー

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1 音響式ダスト発生装置を使用した暴露チャンバー内の濃度測定結果

目標濃度: $2.00 \times 10^5 \text{cpm}(2.83\text{L})$		Test1	Test2	Test3	Test4
平均質量濃度	mg/m^3	0.33	0.27	0.27	0.22
OPC 平均相対濃度	cpm	1.9×10^5	1.9×10^5	1.9×10^5	1.9×10^5
(0-240min)	$\#/L/\text{min}$	6.8×10^4	6.8×10^4	6.6×10^4	6.8×10^4
SD	cpm	0.19×10^5	0.30×10^5	0.29×10^5	0.32×10^5
	$\#/L/\text{min}$	0.66×10^4	0.11×10^4	0.10×10^4	0.11×10^4
OPC 質量濃度変換係数(K)		4.81×10^{-9}	4.04×10^{-9}	4.18×10^{-9}	3.33×10^{-9}

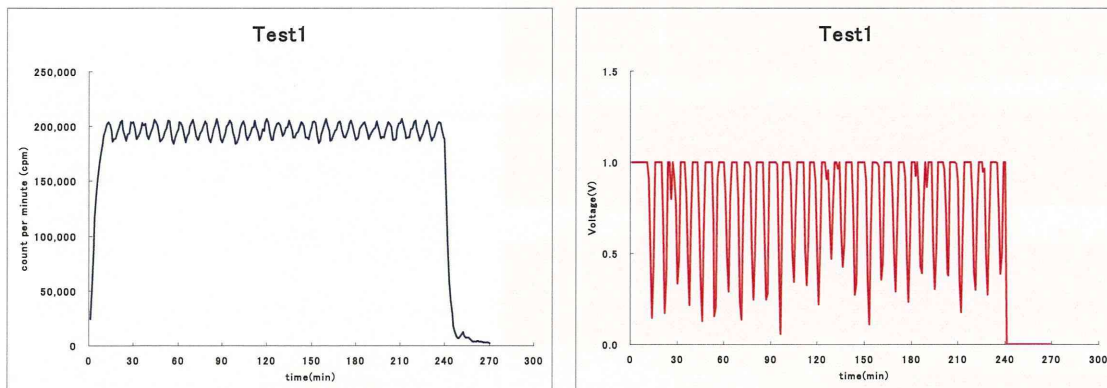


図8 音響式ダスト発生装置の暴露チャンバー内の相対濃度推移とスピーカー駆動電推移

目標濃度 2.0×10^5 cpm、4時間の暴露を行った実験の相対濃度推移の代表例（左図）とスピーカー駆動電推移（右図）の代表例。

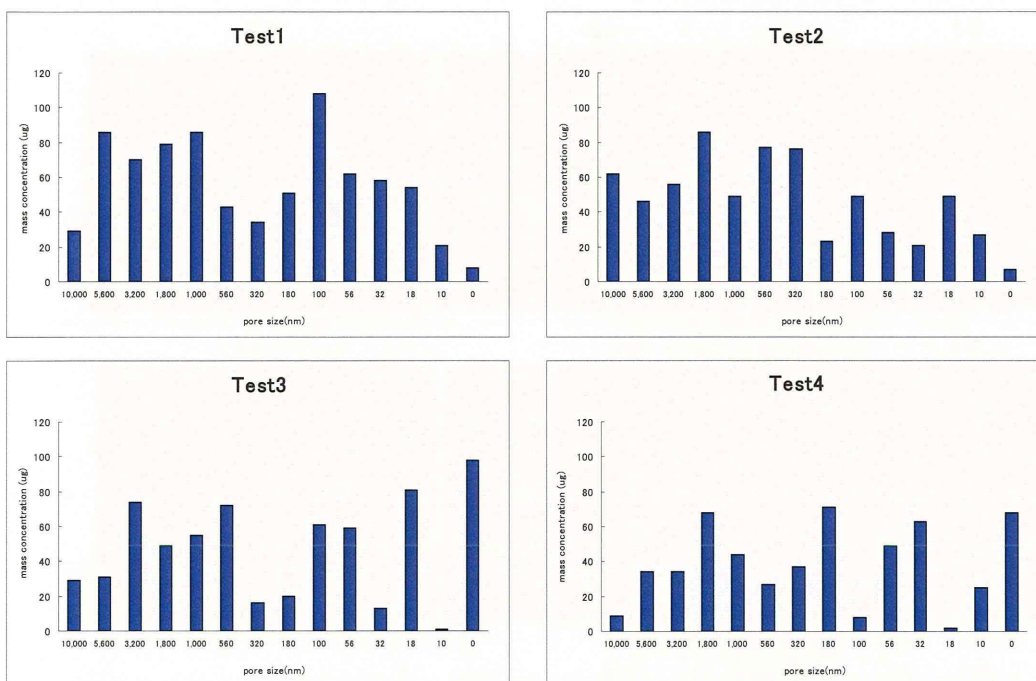


図9 音響式ダスト発生装置の暴露チャンバー内のMWCNTの粒度分布

目標濃度 2.0×10^5 cpm、4 時間の暴露を行った実験の分級装置（MODI）による粒度分布を示した。実験毎に異なった分布を示した。

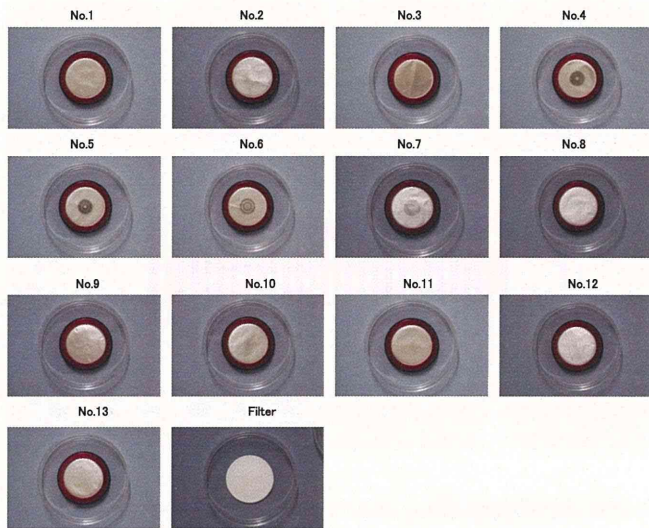


図 10 音響式ダスト発生装置の MOUDI の各分級ステージの様子 (肉眼)

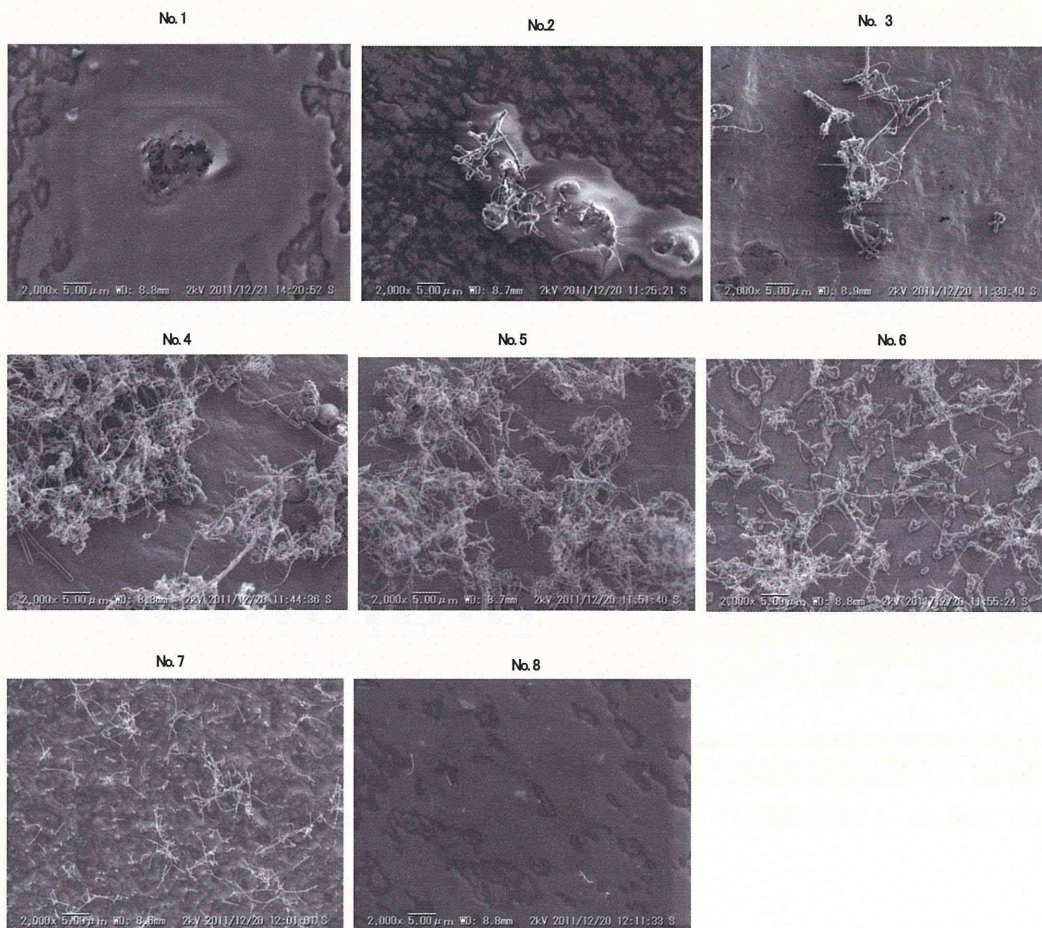


図 11 音響式ダスト発生装置の MOUDI の各分級ステージの様子 (走査型電子顕微鏡像)

No. 8以降の分級ステージではMWCNTは観察できなかった。

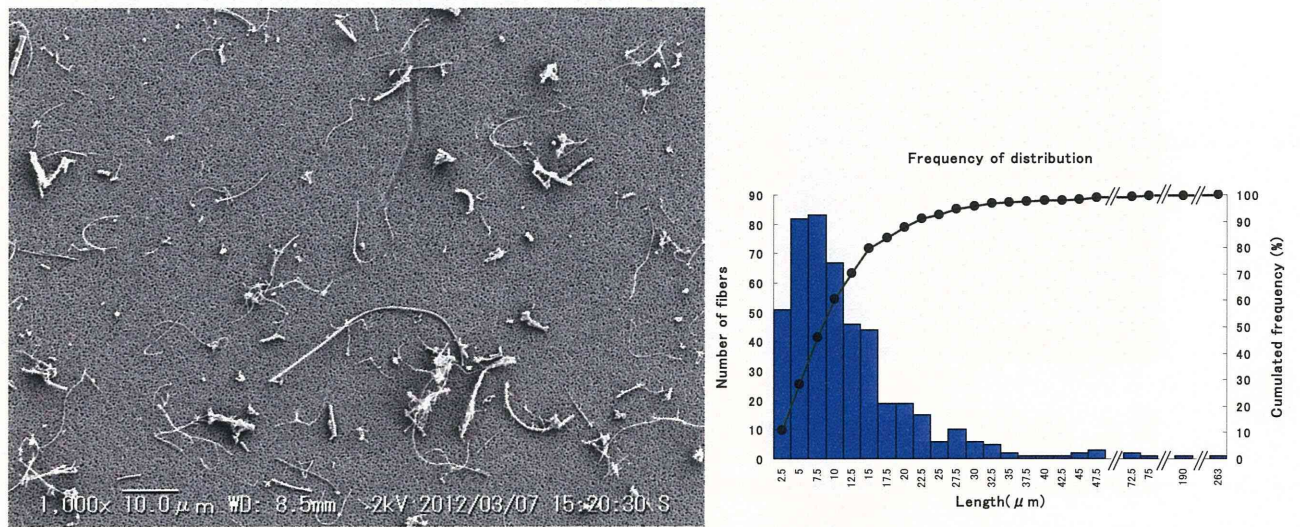


図 12 音響式ダスト発生装置の暴露チャンバー内のMWCNTの形態及び繊維の長さ

U-CNT を検体として、暴露チャンバー内のエアロゾル化したMWCNTをメンブレンフィルターに吸着させて回収し、走査型電子顕微鏡でその状態の観察と、繊維の長さを測定した。繊維の平均の長さは、 $11.420 \pm 17.059 \mu\text{m}$ (平均 \pm SD, $n=475$)であった。

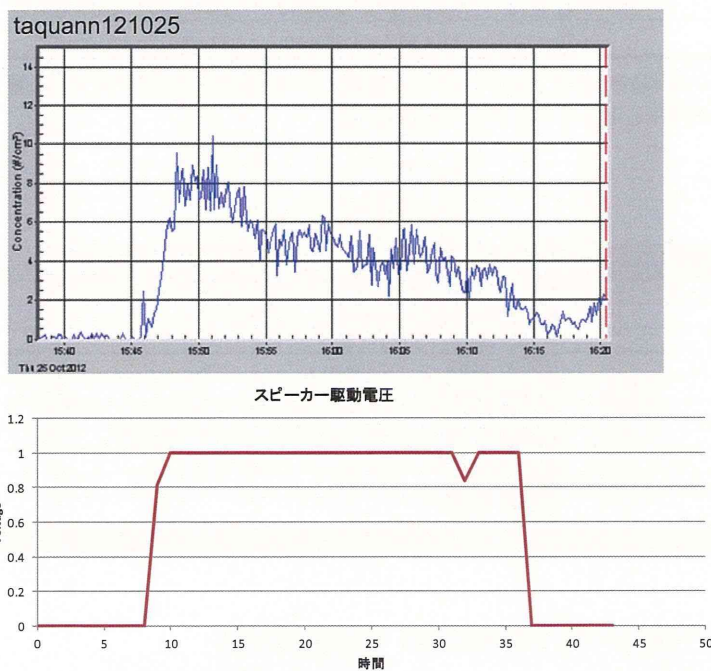


図 13 音響式ダスト発生装置によるT-CNTのアロゾル化条件の検討

CPCによる相対濃度推移(上図)を観察すると、ダスト発生量は最大でも10個/mL程度であった。スピーカーの駆動電圧(下図)は、最大出力の1Vで駆動し続けるが、ダスト発生量は時間とともに減少した。

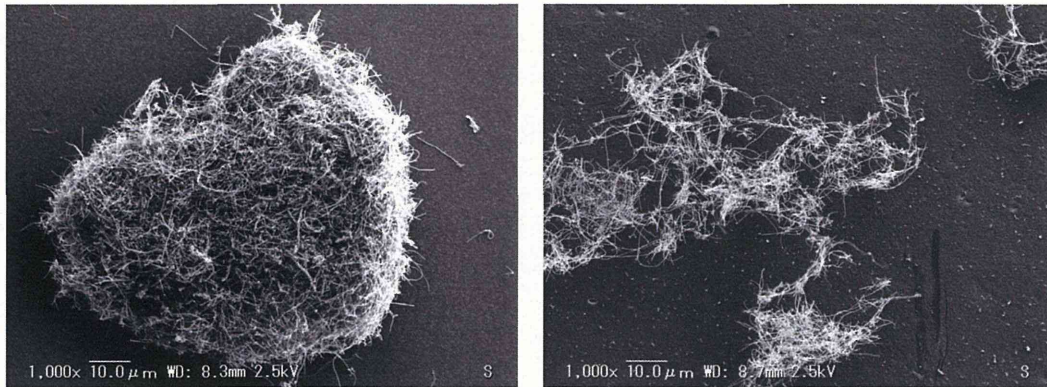


図14 音響式ダスト発生装置のカラム壁に付着したMWCNTの様子

U-CNTは硬くパッキングされた形態を示したが(左図)、T-CNTはゆるく繊維が絡まった状態であった(右図)。

表2 カートリッジ直噴式ダスト発生装置の暴露チャンバー内の濃度測定結果(性能評価実験)

目標濃度: 2mg/m ³		Day1	Day2	Day3	Day4	Day5
平均質量濃度	mg/m ³	1.46	1.54	1.84	1.28	3.46
CPC 平均相対濃度	0-120min, #/L/min	8.3×10^5	8.6×10^5	12.3×10^5	9.6×10^5	23.0×10^5
SD		2.5×10^5	3.2×10^5	2.7×10^5	2.9×10^5	6.6×10^5
CPC 質量濃度変換係数(K)		1.76×10^{-9}	1.81×10^{-9}	1.50×10^{-9}	1.33×10^{-9}	1.51×10^{-9}

T-CNT 0.5 mgをカートリッジに充填し、6分間隔で噴射し、マウスに一日2時間の全身暴露吸入を5日間行った。質量濃度測定は1.5 L/minの流量で2時間の暴露時間を通してサンプリングを行った。

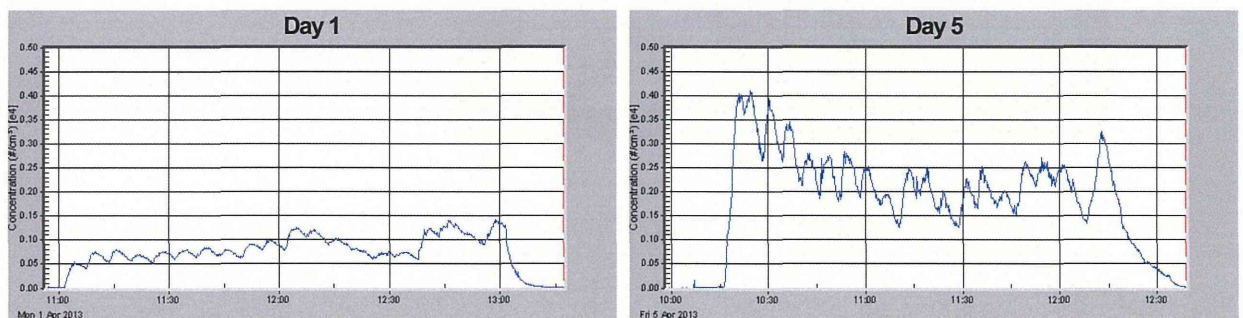


図15 カートリッジ直噴式ダスト発生装置のCPC相対濃度推移(性能評価実験)

T-CNT 0.5 mgをカートリッジに充填し、6分間隔で噴射し、マウスに一日2時間の全身暴露吸入を5日間行った。実験日により、発生するエアロゾルの量にバラツキが認められた。

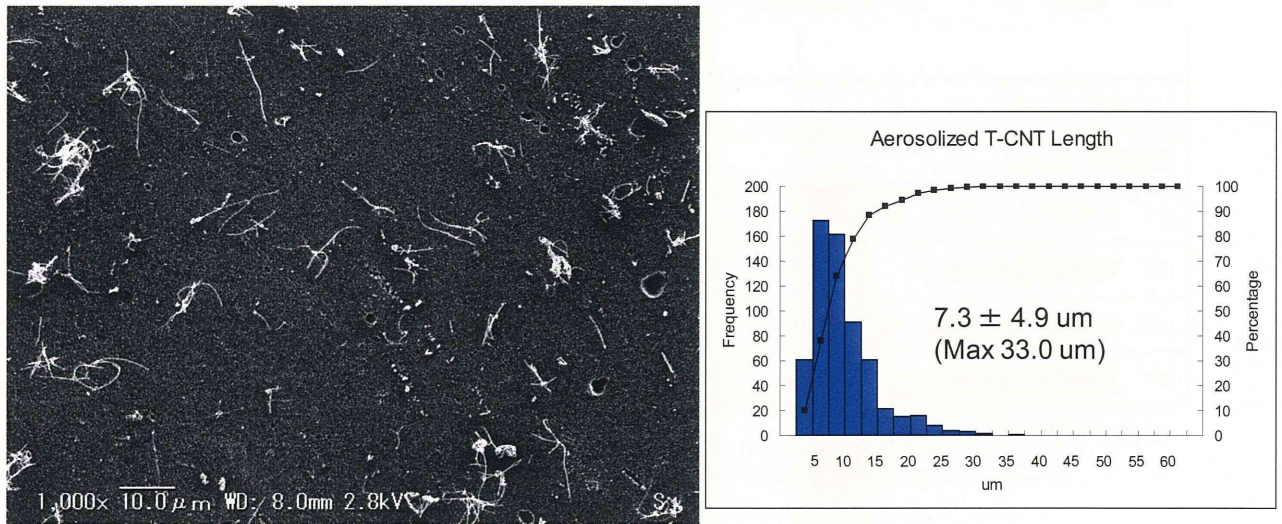


図 16 カートリッジ直噴式ダスト発生装置でエアロゾルにした T-CNT の形態 (性能評価実験)

暴露チャンバー内のエアロゾルを 5 L/min の流量で 3 分間吸引し、酸化アルミニウム製フィルター (孔径: 0.1 μm) に捕集し走査型電子顕微鏡で観察した。フィルターホルダーはステンレス製のオープンフェイス型を使用した。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)

表 3 p53+/-マウスの慢性影響評価実験の群構成

	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

表4 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 (mg/m ³)	1	2
質量濃度 (mg/m ³)	1.19±0.16 (N=15)	2.52±0.35 (N=15)
CPC 相対濃度 (0-120min, #/L/min)	8.2±2.7 ×10 ⁵ (N=14)	19.2±4.0 × 10 ⁵ (N=15)
CPC 質量濃度変換係数 (K)	1.56 ×10 ⁻⁹	1.35 ×10 ⁻⁹
OPC 相対濃度 (0-120min, #/L/min)	7.0±0.7 x10 ⁵ (N=10)	-
OPC 質量濃度変換係数 (K)	1.77 ×10 ⁻⁹	-

数値は平均値±SDで表記した。

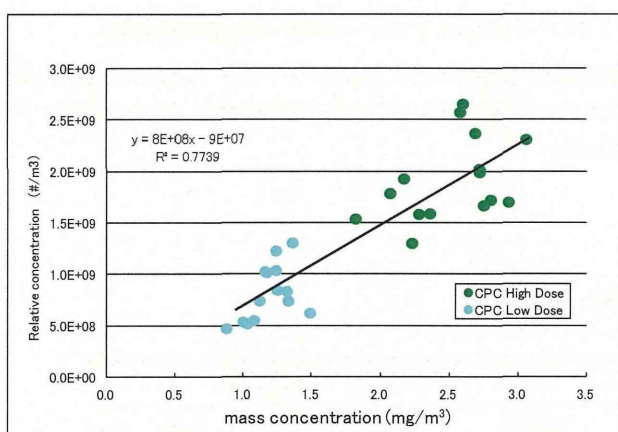


図17 相対濃度 (CPC) と質量濃度の関係

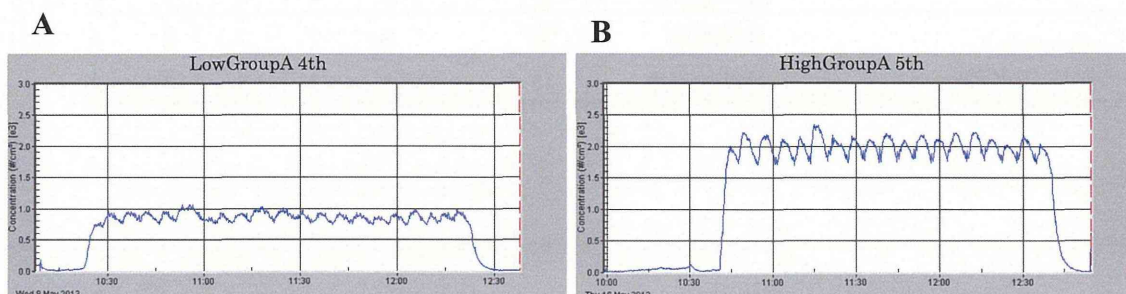


図18 相対濃度の推移 (CPC)

T-CNT を 0.25 mg (低用量)、0.5 mg (高用量) をカートリッジに充填した。マウスに一日 2 時間の全身暴露吸入を 5 日間行った。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が、噴射時間と回数を調節することで安定した濃度を維持できた。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。

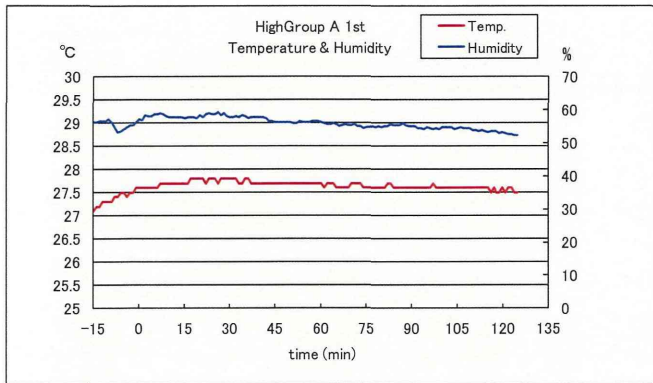


図 19 暴露チャンバー内の温度、湿度推移

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。

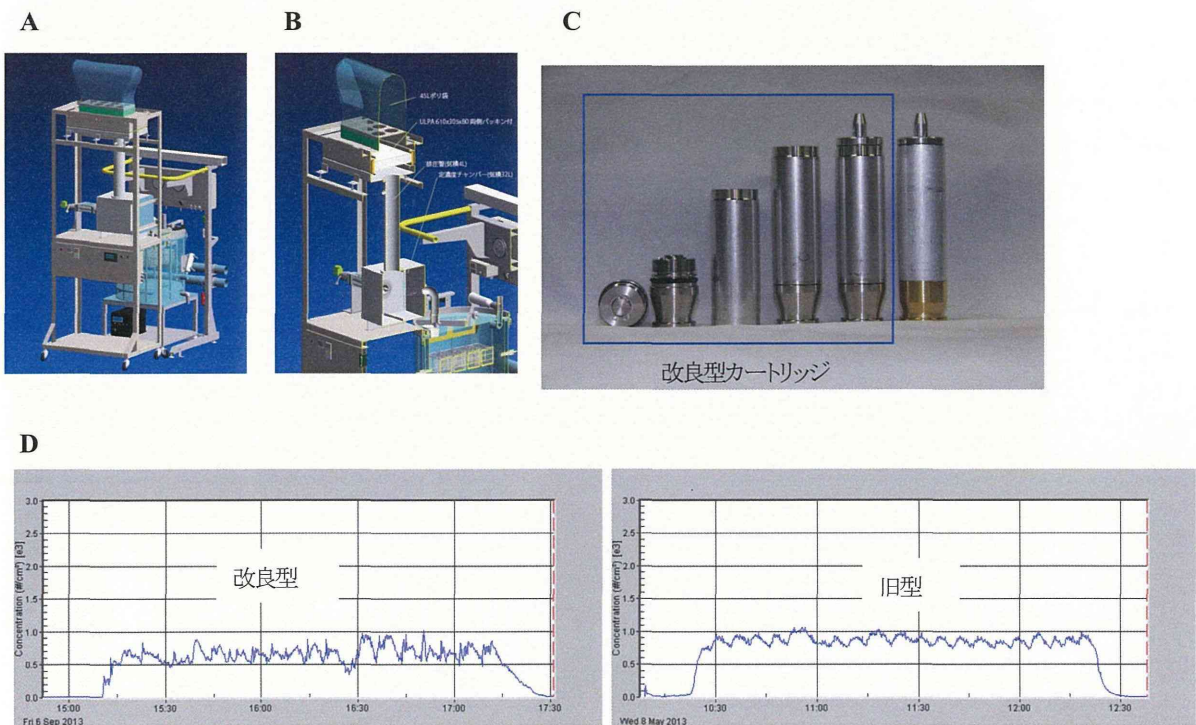


図 20 カートリッジ直噴式ダスト発生装置の改良

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等の推移を示すことを確認した。