

平成23-25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 -」は、肺に焦点を絞り、工業的ナノマテリアルのヒト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する。ヒトで想定される現実的な暴露経路である全身暴露吸入が実施可能な装置を用いてナノマテリアルの全身暴露吸入試験（以下、吸入試験）を実施し、用量作用関係を含む有害性情報を取得し、その詳細な病態解析を進めた。本分担研究では、ヒトへの外挿性の高いデータを得るための分散性に優れた検体を得る方法の開発、及び、生体影響の用量作用関係を明らかにするために必要な吸入検体の肺内及び体内動態に関する研究を行った。被験物質は腹腔内投与実験において中皮腫発がん性が認められた多層カーボンナノチューブ（MWCNT）を用いた。分散性の高い検体を得る方法として、H23年度に Taquann 法を独自に開発した（特許出願済、論文発表済）。本法は液相濾過及び走査型電子顕微鏡の試料作製に用いる「臨界点乾燥」に着想を得た技術で、MWCNT を第三級ブタノール（TB、凝固点；25.69℃）に分散、凝集体を濾過除去し、濾液を液体窒素で凝固、真空下に TB を昇華させ、表面張力による再凝集を回避しつつ乾燥する方法である。H24年度は、その工程を改良して量産体制を整え、H25年度には反復吸入実験に必要な検体量（約300mg）を供給した。Taquann 法処理 MWCNT（T-CNT）からは、MWCNT 原末（U-CNT）の重量の95%を占める凝集体が除去され、単離した繊維成分が殆どを占め、液相及び気相に高度に分散する性質を有している。T-CNT と U-CNT の繊維の平均長はそれぞれ $7.1 \pm 6.0 \mu\text{m}$ (max 48 μm)、 $7.1 \pm 5.7 \mu\text{m}$ (max 40 μm) と同等の値であった。1 μg 中に含まれる繊維数は 3×10^6 本/ μg と算出された。肺内に沈着した MWCNT の回収・測定に際して、全肺をアルカリ溶解し、走査型電子顕微鏡を用いる方法を開発した。H23年度は音響式ダスト発生装置により、U-CNT 及び T-CNT を吸入暴露したマウス肺を測定した。その結果、T-CNT を暴露した肺には U-CNT を暴露した肺よりも長い繊維が観察された。音響式ダスト発生装置では T-CNT を安定的にエアロゾル化することが困難であったため、T-CNT に適したカートリッジ直噴式ダスト発生装置を開発し、全身暴露吸入実験を進めた（小川研究分担者の報告）。H24年度にはカートリッジ直噴ダスト発生装置により1日2時間×5日間、平均質量濃度 1.8 mg/m^3 の暴露を行い、マウス肺内の MWCNT の繊維数と長さを測定（N=2）し、繊維数からの換算により約 3 μg /動物が肺に沈着し

たと推定された。病理組織学的に、末梢の肺胞にまで単離繊維が到達していることが確認された。H25年度は、p53+/-マウスにT-CNTを1群48匹、1mg/m³及び2mg/m³の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実施した。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の繊維数の測定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内のMWCNT繊維数は1.3×10⁷本/動物、繊維長の平均値は8.0±5.0 μm、最大長は33.1 μm (n=1)、質量に換算すると4.4 μg/動物であった。繊維長の値は暴露チャンバー内エアロゾルの平均値7.3±4.9 μm、最大33.0 μmと同等であり、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（少なくとも肺門まで）到達したと考えられた。病理組織学的に、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、及び単離線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週目の肺にも凝集体・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、顕微鏡的に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。

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 -」は、肺に焦点を絞り、工業的ナノマテリアルのヒト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する。ヒトで想定される現実的な暴露経路である全身暴露吸

入が実施可能な装置を用いてナノマテリアルの全身暴露吸入試験（以下、吸入試験）を、マウスを用いて実施し、用量作用関係を含む有害性情報を取得し、その詳細な病態解析を進めた。本分担研究では、ヒトへの外挿性の高いデータを得るための分散性に優れた検体を得る方法の開発、及び、生体影響の用量作用関係を明らかにするために

必要な、吸入検体の肺内及び体内動態に関する研究を行った。

気化可能な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¹⁾、Raman分光を使用する方法²⁾、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³⁾、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定量化する方法⁴⁾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質量に関する体内動態を把握するには優れた方法である。しかしながら、粒子状物質としての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、それを用いての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ているものの、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。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。ヒト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。ヒトに比較して細い気道

径を有するマウスを用いた吸入実験では、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あるいは肺胞病変を修飾する可能性がある。

そのため、実験動物から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⁵⁾。

本分担研究では、Taquann法処理検体の供給と、全身暴露吸入実験（音響式ダスト発生装置及びカートリッジ直噴式ダスト発生装置）で得られた肺サンプルを対象として、組織沈着量の測定を行った。

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)
長さ	1-19 μm (> 5 μm 27.5%)
繊維数	3.55 × 10 ¹¹ 本/g ^{a)}
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%) ^{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^{6,7)}

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」の概念と、液相での分散と濾過を組み合わせた技術であり、濾液の分散媒を除去する際に表面張力を生じないため、分散質の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℃、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25μm）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、分散性の保たれた乾燥状態のMWCNTを得る（図2）。Taquann法の開発当初のH23年度では、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。H25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な検体約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. マウス全身暴露吸入実験

(1) 音響式ダスト発生装置 (H23年度)

動物は雄性マウス (C57BL/6NCrSlc、SPF、SLC、19週齢、体重 29.3-35.0 g) を使用した。音響式ダスト発生装置を使用し、U-CNT及びT-CNTを2時間の単回全身暴露吸入を行った。質量濃度はそれぞれ、1.1 mg/m³及び、0.4 mg/m³であった。暴露終了後、マウスに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。肺を採取し実験に供した。

(2) カートリッジ直噴式ダスト発生装置

① 性能評価実験 (H24年度)

動物は雄性マウス (C57BL/6NCrSlc、SPF、SLC、10-11週齢、体重 23.8-30.8 g) を使用した。T-CNTをカートリッジ直噴式ダスト発生装置でエアロゾル化してマウスに全身暴露吸入し、その肺に含まれるT-CNTの測定を行った。T-CNTを1日2時間、5日間の反復全身暴露吸入を行った。5日間の平均質量濃度は1.8 mg/m³であった。暴露終了後、マウスにペントバルビタールナトリウムを腹腔内投与し麻酔下で放血致死後に解剖した。この動物から肺を採取し実験に供した。また、無処置の動物からも肺を取り出し、MWCNTの抽出効率を求めるために使用した。

② p53+/-マウス慢性影響評価実験 (H25年度)

動物は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±6.7g) 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±2.7 x10⁵個/L/min、高用量群; 19.2±4.0 x10⁵個/L/minであった。質量濃度は、低用量群1.2±0.16 mg/m³、高用量群2.5±0.35 mg/m³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±4.9 μm (Max. 33.0 μm) であった。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。マウスはペントバルビタールナトリウムを腹腔内投与し麻酔下で放血致死後に解剖した。

【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

H23年度に実施した音響式ダスト発生装置による暴露実験では、気管及び左右主気管を含んだ全肺をサンプルとした。H24及びH25に実施したカートリッジ直噴式ダスト発生装置による暴露実験では、気管及び左右主気管支を除く全肺をサンプルとした。

肺サンプル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 µLに沈渣を再分散してSEM観察に供した (図3)。

(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、φ 21 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、その中心上にメンブレンフィルター (孔径 0.025 µm VSWP、φ 12 mm、ミリポア) またはアルミナフィルター (孔径 0.02 µm、Anodisc、φ 12mm、ワットマン) 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 µLをメンブレンフィルターまたは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、φ 15×5 mm、日新EM) にカーボンシール (φ 12 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 (Ct)

は、MWCNT懸濁液の調製量(100 μL 、V)、1 μL 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_c)を基に以下の式で計算した。

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

計測した1視野当たりの面積は、1,818 μm^2 (49.23 \times 36.92 μm)、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

組織沈着量測定用の肺サンプルに並行して病理組織標本用の肺及び胸膜(横隔膜、胸郭)のサンプルを採取した。

肺は気道内の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ず、灌流固定した。具体的には、マウスを放血致死後に直ちに開腹して腹大動脈を切断し、次いで開胸して右心室心尖部に翼状針(21G \times 3/4”、SV-21CLK、テルモ)を刺入して、生理食塩液(大塚生食注、大塚製薬工場)を灌流して血液を除去した。4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液を灌流して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。

横隔膜は胸郭下口に付着させた状態で10%中性緩衝ホルマリン液浸漬して固定した。胸郭は10%中性緩衝ホルマリン液で浸漬固定した後、10%蟻酸を含む中性緩衝ホルマリン液で脱灰した。

評価のため、常法によりパラフィン包埋を行い、約3 μm の厚さで薄切しHE染色標本を作製した。

C. 研究結果

C-1. Taquann 法処理検体の性状

肉眼観察ではT-CNTはU-CNTに比較して嵩高い(図4a, 4e)。再懸濁性も良好であり、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ところ、T-CNTの懸濁状態は静置後2時間保たれた(図4b, 4f)。光学顕微鏡象では、U-CNTには大きな凝集体が認められるが、T-CNTは凝集体が少なくその大きさも小さい(図4c, 4d, 4g, 4h)。走査型電子顕微鏡による観察ではT-CNTは殆どが単離した繊維として観察された。凝集体も観察されるが、フィルターの目開きである25 μm を超えるものは観察されなかった(図5)。

T-CNTとU-CNTの繊維長を測定したところ、その平均長はそれぞれ7.1 \pm 6.0 μm (max 48 μm)、7.1 \pm 5.7 μm (max 40 μm)と同様の値であった。繊維径の平均は、T-CNTが115 \pm 74 nm、U-CNTが132 \pm 61 nmであり、T-CNTの繊維径はU-CNTに比較してわずかに細い値であった(図6)。

T-CNT 10 μg 、1 μg 、0.1 μg に含まれる繊維数を測定したところ、それぞれ、 2.3×10^7 本、 4.0×10^6 本、 3.2×10^5 本、繊維の平均長はそれぞれ7.5 \pm 4.7 μm 、8.7 \pm 6.4 μm 、7.0 \pm 5.4 μm であった。以上の結果から、T-CNTは有効数字一桁の精度で、大凡 3×10^6 本/ μg の繊維数、平均長が8 μm であると結論した(図7)。

C-2. 肺に沈着したMWCNT繊維

(1) 音響式ダスト発生装置による暴露実験 (H23年度)

U-CNT を音響式ダスト発生装置でエアロゾル化して全身暴露吸入させたマウスの肺から回収した繊維を測定した (N=1)。繊維の平均長は $3.5 \pm 3.2 \mu\text{m}$ (Max $27.4 \mu\text{m}$, N=415) であった。同様に T-CNT を全身暴露吸入させたマウスの肺から回収された繊維を測定したところ (N=1)、繊維の平均長は $4.4 \pm 5.3 \mu\text{m}$ (Max $66.4 \mu\text{m}$, N=420)、であった。T-CNT 暴露肺では U-CNT 暴露肺よりも最大長が長く、 $10 \mu\text{m}$ 以上の長さの繊維の割合も多かった (図8)。

(2) カートリッジ直噴式ダスト発生装置
① 性能評価実験 (H24年度)

T-CNT をカートリッジ直噴式ダスト発生装置でエアロゾル化して全身暴露吸入を行ったマウスの2例の肺について検討したところ、mouse #1 では繊維数が 5.1×10^6 本、平均長は $8.3 \pm 4.9 \mu\text{m}$ (Max $35 \mu\text{m}$, N=306)、mouse #2 では繊維数が 3.2×10^6 本、平均長は $8.4 \pm 5.0 \mu\text{m}$ (Max $39 \mu\text{m}$, N=198) であった。T-CNT $1 \mu\text{g}$ の添加回収実験で回収された繊維数は 1.6×10^6 本、平均長は $9.5 \pm 5.2 \mu\text{m}$ (Max $31 \mu\text{m}$) であった。以上の結果から、T-CNT のマウス吸入暴露肺 (2時間 \times 5日、平均質量濃度 1.8 mg/m^3) への沈着量は、約 $3 \mu\text{g}$ /動物と推測された (図9)。病理組織標本の観察では、末梢の肺泡レベルにまで単離した繊維が到達しマクロファージに貪食されている様子が観察された (図10)。

② p53+/-マウス慢性影響評価実験 (H25年度)

T-CNT をカートリッジ直噴式ダスト発生装置でエアロゾル化して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 1.3×10^7 本/動物であり、質量に換算すると $4.4 \mu\text{g}$ /動物であった。繊維の長さの平均値は $8.0 \pm 5.0 \mu\text{m}$ 、最大の長さは $33.1 \mu\text{m}$ であった。カートリッジ直噴式ダスト発生装置による吸入暴露実験では、肺内から回収した繊維の長さ (分布) は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 (図11)。

C-3. 肺及び胸膜の病理組織

p53+/-マウスから得られた肺及び胸膜 (横隔膜) の病理組織像を図12に示した。

吸入終了直後の肺内に、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、及び単離線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 週目の肺内に凝集体・凝固体及び異物肉芽腫の形成を認めず、肺泡洞 (肺泡管) 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⁸⁾と類似していた。

D. 考察及び結論

(1) Taquann 法処理

本分担研究では、H23 年度に Taquann 法を開発した。図 4~5 に示すように、T-CNT は凝集体が少なく、単離した繊維成分が多い。TB を除去して粉末となった後でも、液相での分散性を有しており、T-CNT の懸濁液の沈降は緩やかであった。カートリッジ直噴式ダスト発生装置によって、分散性の良好なエアロゾルとなることが示されている（小川分担研究者の報告）。CNT の凝集はファンデルワールス力によるものであるが、凝集体が含まれないことが分散性を確保するためには重要と考えられる。T-CNT の調製過程では、MWCNT に強力な超音波の照射や機械的な剪断力を与えないため、繊維長は U-CNT と同じである。線維状粒子の生体影響を評価するには、その性状を変化させないことが重要であるため、Taquann 法は優れた分散方法であると考えられる。

Taquann 法の開発当初は、1 回の操作（24 時間）で得られる検体量が約 1 mg 収率が低く、吸入暴露実験に使用する量を得ることが困難であった。そのため、H24 年度には工程の改良を行い、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。具体的には凍結・再融解により U-CNT の TB への分散性を高める工程、及び、フィルターに振動モーターを装着することで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。H25 年度には p53+/-マウスの反復全身暴露吸入実験に必要となる約 300 mg を約 300 時間で製造して供給した。

(2) 肺組織沈着量測定

組織沈着量の測定における技術的な課題は、肺組織の溶解方法であった。水酸化カリウムと SDS のみの溶解液では、生体由来と考えられる極微量の残渣が MWCNT を覆ってしまい観察に障害があった。この残渣は金属の酸化物で、主体は不溶性の水酸化鉄（III）と考えられた。ヘモグロビンや CYP など鉄を含むタンパク質由来の鉄がアルカリ条件で淡緑色の水酸化鉄（II）となり、酸化されることで難溶性の水酸化鉄（III）を生成したものと考えられる。組織溶解液への酸素の混入を避けるため、肺組織の脱気、窒素ガス雰囲気中での調製、アスコルビン酸添加による酸化抑制、EDTA・2Na によるキレート除去により残渣のない試料を得ることが可能となった（図 13）。

H23 年度に実施した、音響式ダスト発生装置による全身暴露吸入実験で肺に取り込まれた MWCNT は、U-CNT と T-CNT ではプロファイルが異なっていた。T-CNT を暴露した肺からは、U-CNT よりも長い繊維が観察された。T-CNT は凝集体が少ないため、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長い繊維が到達した可能性が考えられる。しかしながら、音響式ダスト発生装置では T-CNT を安定的にエアロゾル化する事ができないため、以降の検討は中止した。H24 年度からは、音響式ダスト発生装置に替わって、T-CNT を効率良くエアロゾル化するカートリッジ直噴式ダスト発生装置による全身暴露吸入実験が進められた。H24 年度に 5 日間反復暴露の性能評価実験を行い、H25 年度は p53+/-マウスを用いた慢性影響評

価実験を行った。

本分担研究では、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 μm 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 μm 、直径 0.2 μm 、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 μm である⁹⁾。MWNT-7 の比重は 2.1 と報告されていることから¹⁰⁾、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 μm 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 μm 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「1~5 μm 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⁸⁾を誘発することを示した。

(3) 結論

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。

【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) 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) 高橋祐次、高木篤也、菅野純、高度に分散性を高めた多層カーボンナノチューブのp53ヘテロ欠損マウス腹腔内投与による中皮腫発がん、第27回 発癌病理研究会(2012. 8. 28)
- (4) 高橋祐次、高木篤也、菅野純、多層カーボンナノチューブの慢性影響について、平成24年度公益社団法人日本実験動物学会 維持会員懇談会(2012. 11. 16)
- (5) 高橋祐次、高木篤也、菅野純、マウスを用いた多層カーボンナノチューブの中皮腫発がん評価、平成24年度「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ(2013.2.7)
- (6) 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)
- (7) 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)
- (8) 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)
- (9) 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)
- (10) 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.

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

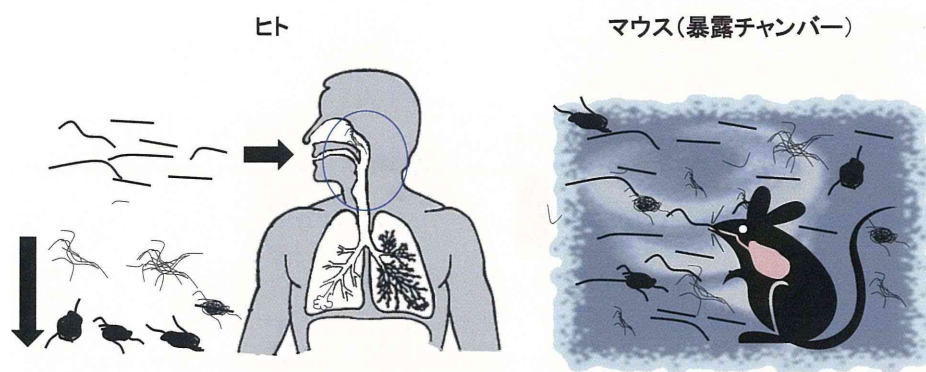


図1 ナノマテリアルのヒトとマウスの暴露状態

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。人の作業環境では、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位に捕捉され、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。

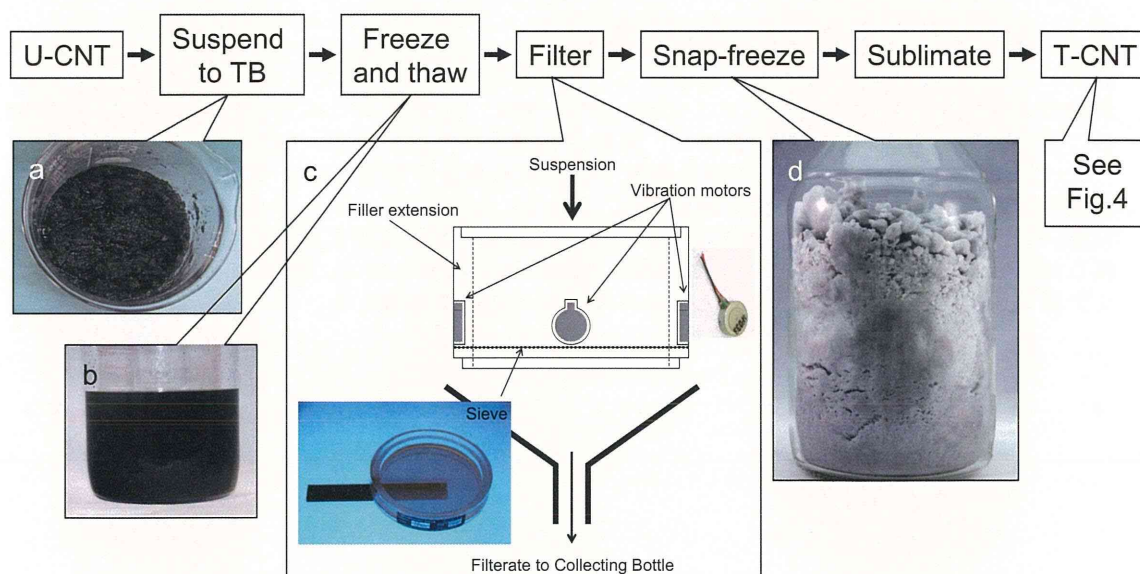


図2 Taquan 法の概要

(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°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 $25\ \mu\text{m}$) 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

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

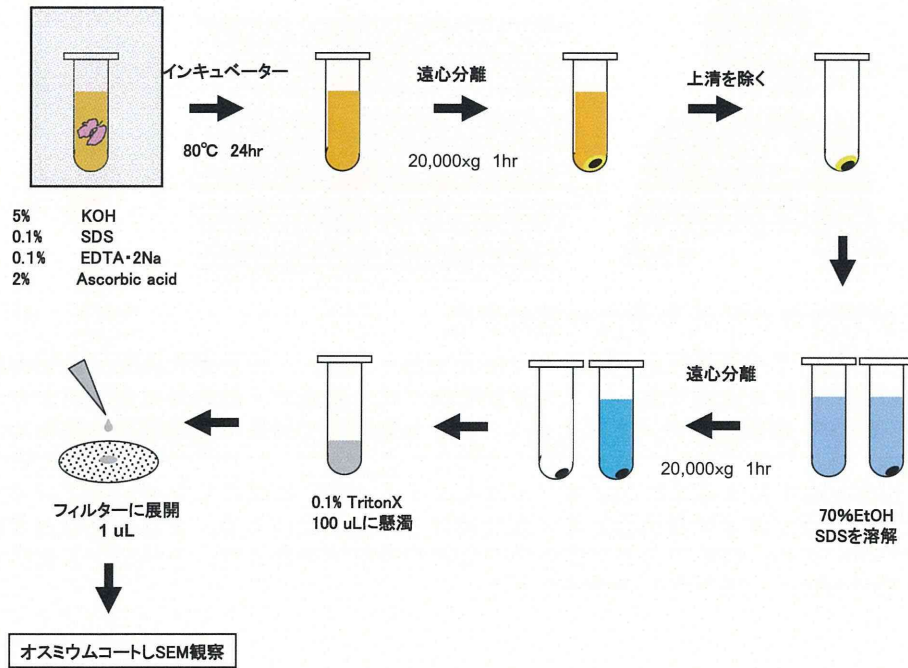


図 3 肺からの MWCNT 抽出方法の概略図

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 μL を添加し MWCNT の懸濁液を得る。懸濁液 1 μL 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。

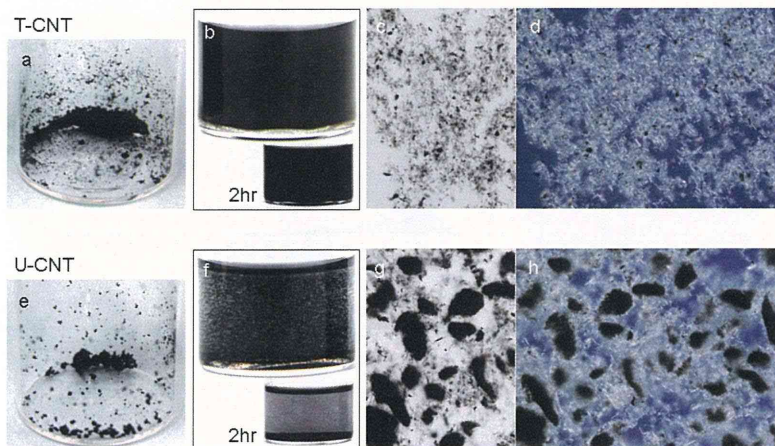


図 4 Taquann 法処理検体 (T-CNT) の光学顕微鏡像

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

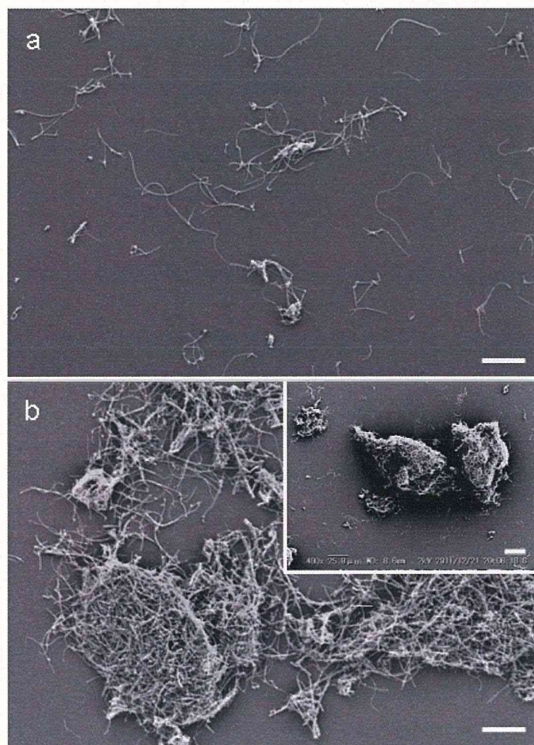


図 5 Taquann 法処理検体 (T-CNT) の走査型電子顕微鏡像

(a)T-CNT (1,000 倍)、(b)U-CNT (1,000 倍) と 400 倍の SEM 像。U-CNT には大きな凝集体があり、単離している繊維も少ない。一方、T-CNT はその殆どが単離した繊維として観察される。凝集体も観察されるが、フィルターの目開きである 25 μm を超えるものは観察されない。Taquahashi et al., JTS, 2013;38(4):619-28

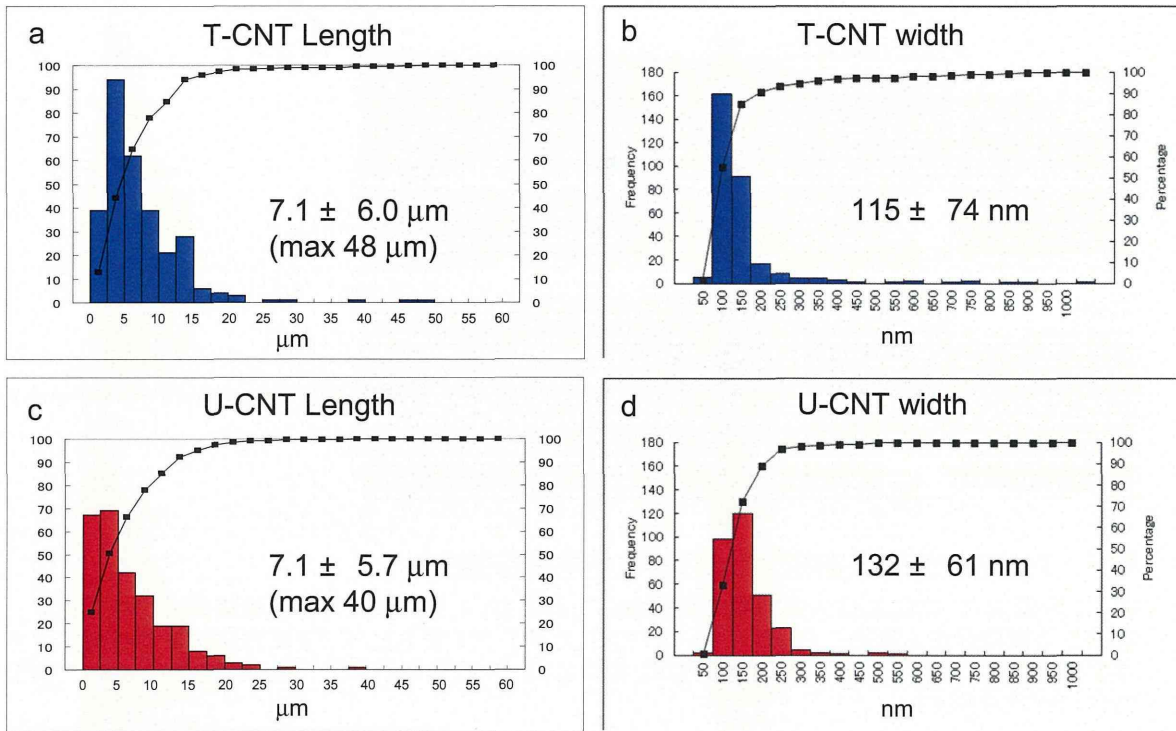


図6 Taquann 法処理検体 (T-CNT) と原末 (U-CNT) の長さ と直径の比較
 繊維の平均長はT-CNTとU-CNTは同様であった。繊維の直径はT-CNTがわずかに細い値であった。
 Taquahashi et al., JTS, 2013;38(4):619-28

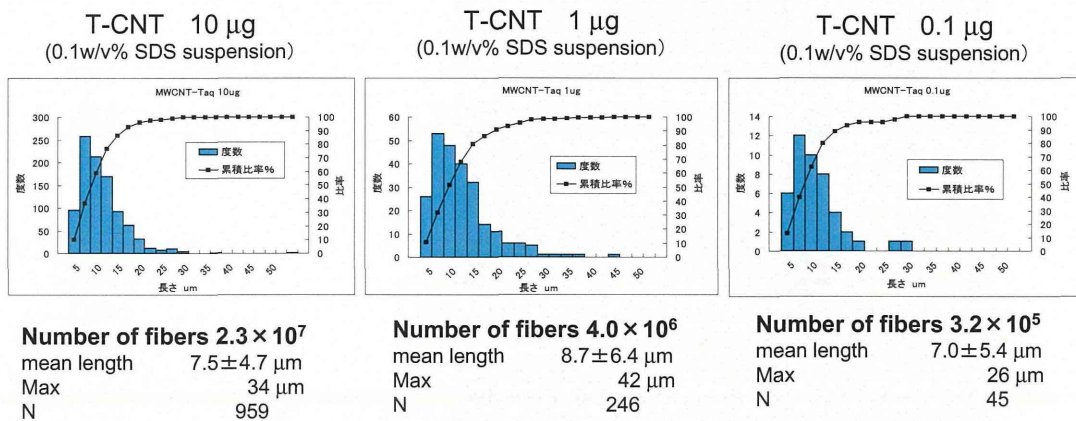
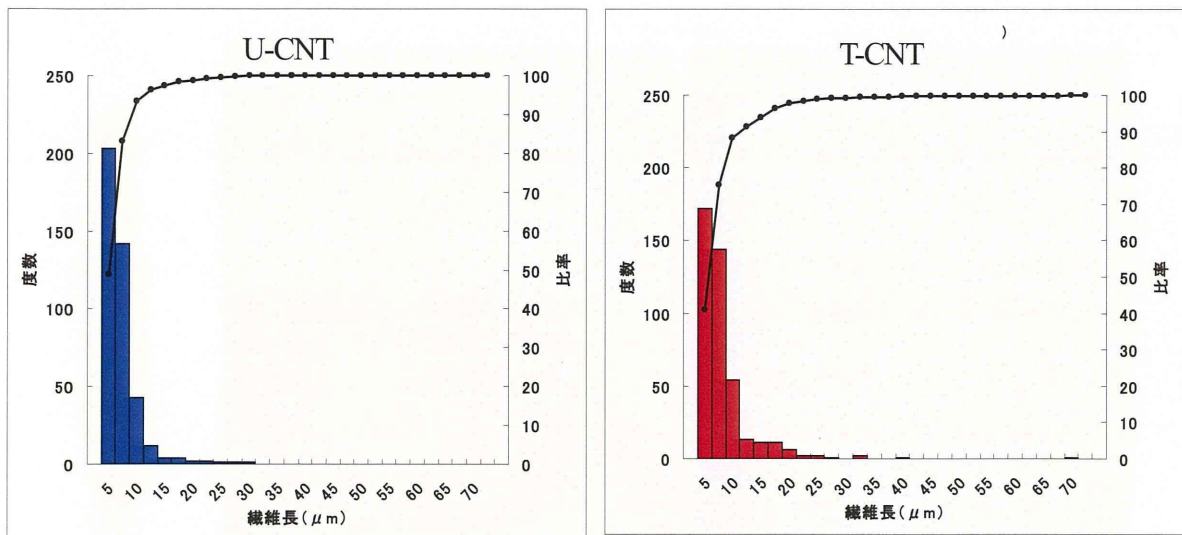


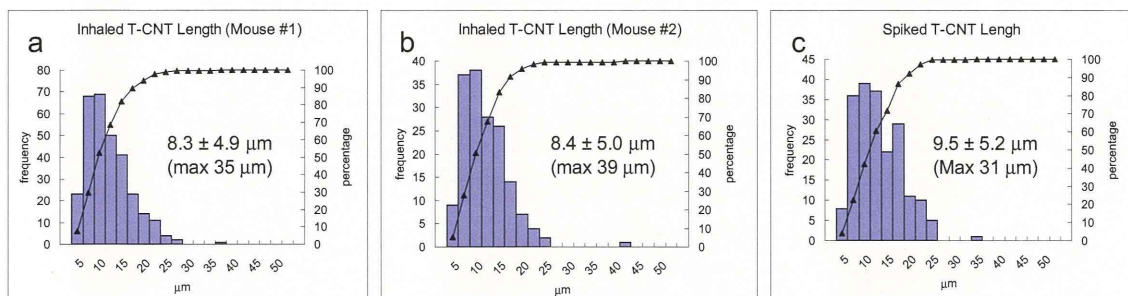
図7 T-CNTに含まれる繊維数と長さの分布
 T-CNTは有効数字一桁の精度で 3×10^6 本/μgの繊維数、平均長が平均8 μmであると結論した。



	N	平均繊維長 (μm)	Percentage >5μm	Percentage >10μm	最大繊維長(μm)
U-CNT	415	3.5 ± 3.2	16.9	0.04	27.4
T-CNT	421	4.4 ± 5.3	25.2	0.09	66.4

図 8 音響式ダスト発生装置で全身暴露吸入した肺に沈着した U-CNT と T-CNT 長さの分布

T-CNT 暴露肺では U-CNT 暴露肺よりも最大長が長い。5μm 以上の繊維の割合は 25.2%、10μm 以上の長さの繊維は 0.09%含まれており、U-CNT に比較して繊維長の長い繊維が肺に取り込まれていた。



繊維数 5.1×10^6

繊維数 3.2×10^6

繊維数 1.6×10^6

図 9 カートリッジ直噴式ダスト発生装置で全身暴露吸入した肺に沈着した T-CNT 長さの分布 (性能評価実験)

カートリッジ直噴式ダスト発生装置で T-CNT をマウスに全身暴露吸入させた (2 時間×5 日、平均質量濃度 1.8 mg/m^3) 2 例について暴露終了直後に肺をサンプリングして組織に沈着した繊維数を計測した。(a) mouse #1 では繊維数が 5.1×10^6 本、平均長は $8.3 \pm 4.9 \text{ } \mu\text{m}$ (Max $35 \text{ } \mu\text{m}$, N=306)、(b) mouse #2 では繊維数が 3.2×10^6 本、平均長は $8.4 \pm 5.0 \text{ } \mu\text{m}$ (Max $39 \text{ } \mu\text{m}$, N=198)であった。(c) T-CNT $1 \text{ } \mu\text{g}$ の添加回収実験で回収された繊維数は 1.6×10^6 本、平均長は $9.5 \pm 5.2 \text{ } \mu\text{m}$ (Max $31 \text{ } \mu\text{m}$)であった。吸入暴露肺に沈着した T-CNT は約 $3 \text{ } \mu\text{g}$ /動物と推測された。

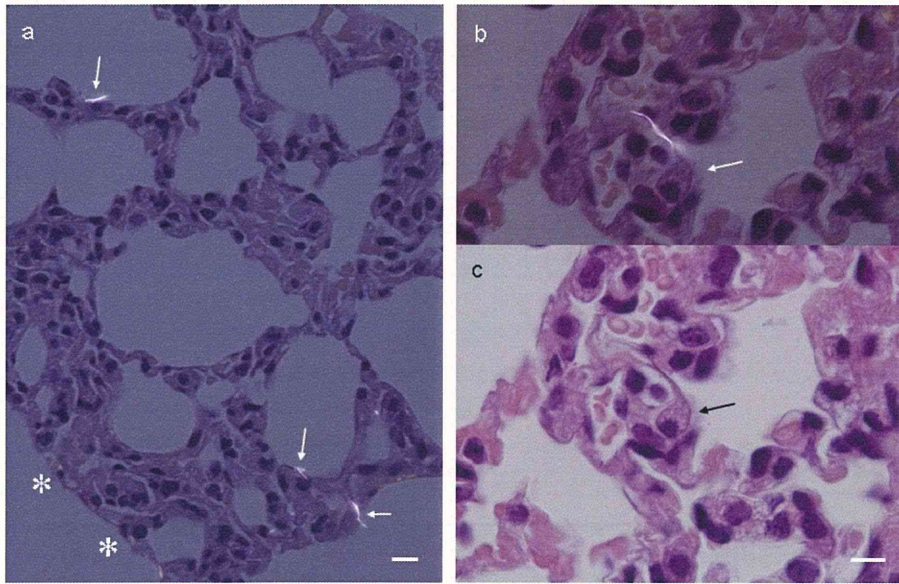
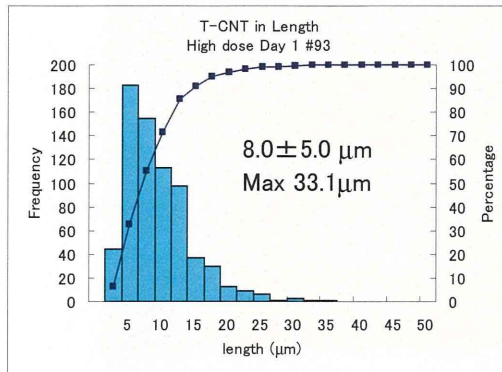


図 10 カートリッジ直噴式ダスト発生装置で全身暴露吸入した肺に沈着した T-CNT (性能評価実験)

(a) 末梢の肺泡レベルに単離線維が到達しているのが確認された(矢印は MWCNT を示す)。(b、c) 胞体を伸ばし MWCNT 繊維を食食しているマクロファージが観察された。

A



群	高用量群 (ID #93)
暴露濃度	2.52 ± 0.35 mg/m ³
暴露時間	2時間/日 1回/週 × 5週間
サンプリング時期	最終暴露終了直後
MWCNT繊維数	1.3 × 10 ⁷ 本/動物
MWCNT質量	4.4 μg

B

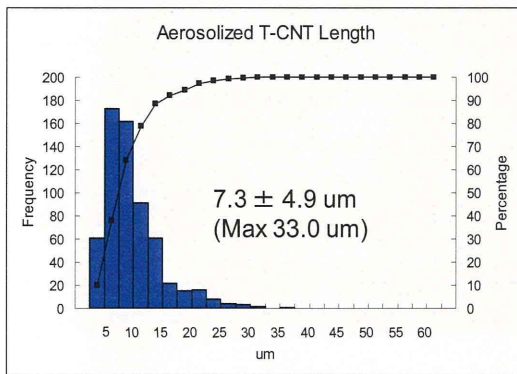
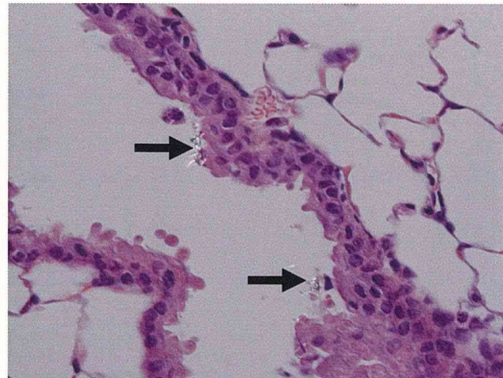
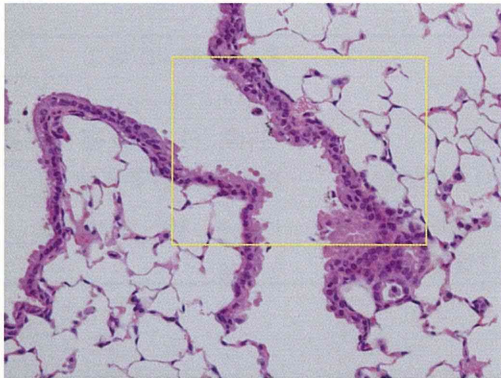


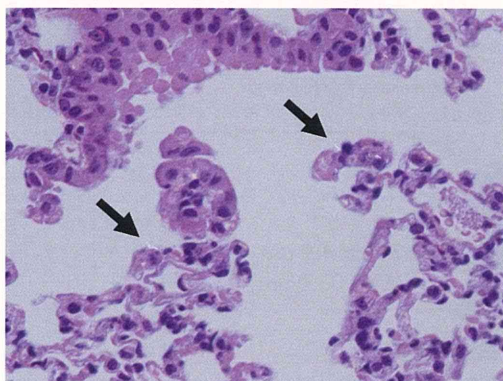
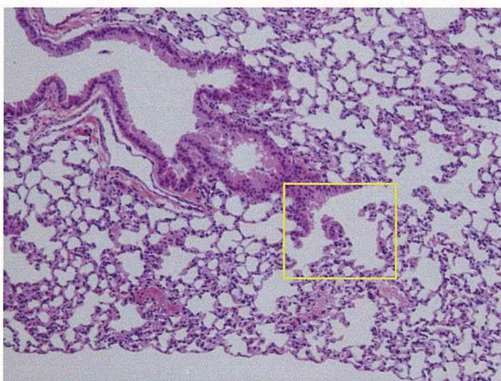
図 11 カートリッジ直噴式ダスト発生装置で全身暴露吸入したマウスの肺に含まれる T-CNT の繊維数と長さの分布 (p53+/-マウス 慢性影響評価実験)

(A) p53+/-マウスに T-CNT を 1 日 2 時間、週 1 回、5 週間の反復全身暴露吸入を行い、最終暴露終了後に肺を採取し、アルカリ溶解して MWCNT を回収して繊維数と長さを計測した (N=694)。(B) 暴露チャンバー内の T-CNT の長さを計測した (N=618)。暴露チャンバー内の T-CNT エアロゾルと肺から回収された T-CNT の長さの分布は同等であった。

【吸入終了直後 肺 (高用量群 ID #86)】



【吸入終了後 13 週目 肺 (高用量群 ID #162)】



【吸入終了後 13 週目 横隔膜 (低用量群 ID #249)】

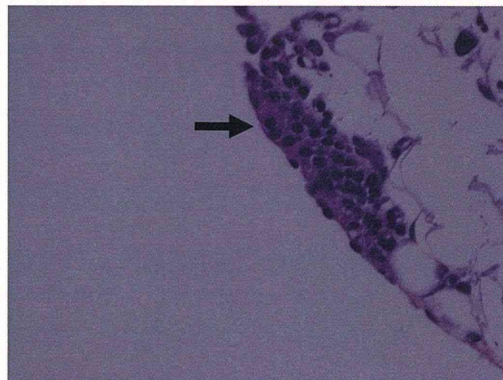


図 12 p53+/-マウス全身暴露吸入した肺、横隔膜の病理組織像

p53+/-マウスに T-CNT を 1 日 2 時間、週 1 回、5 週間の反復全身暴露吸入を行い、肺をパラホルムアルデヒド灌流固定し、常法に従って HE 標本を作製し光学顕微鏡で観察した。凝集体・凝固体は観察されず、吸入終了直後には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 (矢印)、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。吸入終了後 13 週目に軽微な好中球浸潤像を伴い、肺胞内マクロファージが単離 MWCNT 繊維を食食する像を認めた。尚、凝集体及び異物肉芽腫を認めない。壁側胸膜面 (横隔膜面) には、MWCNT を食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る。右図中の矢印は MWCNT を示す。