

ブロックのトリミング
 ↓
 ダイヤモンドナイフ (Nanotome
 Thick) で左肺の全割組織のセミシン
 切片を切削
 (厚さ 2 μ m)
 ↓
 トルイジンブルー (0.5%) で染色

図 8 セミシン切片の作製

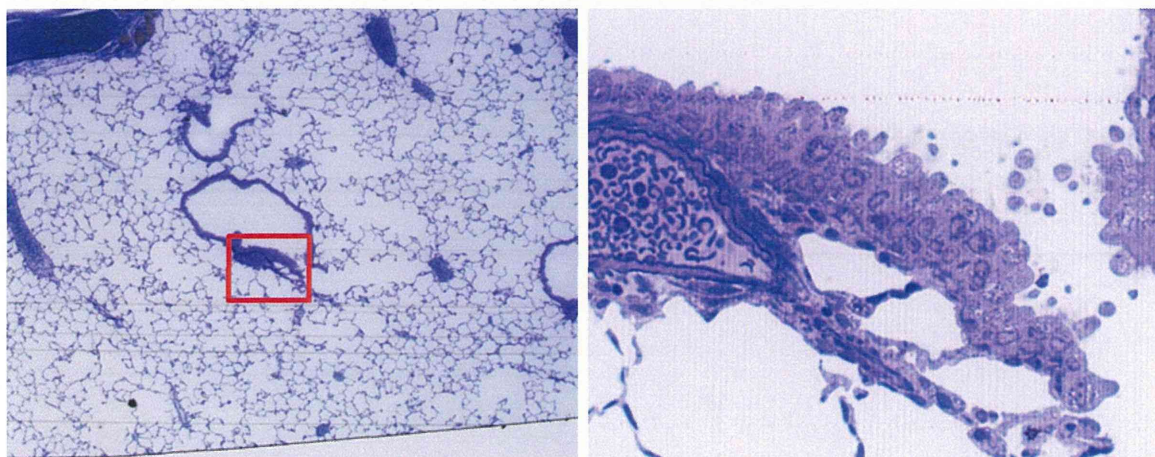


図 9 セミシン切片から電顕検索部位の選定 (左図の赤枠内を選定、右図は同部の拡大)

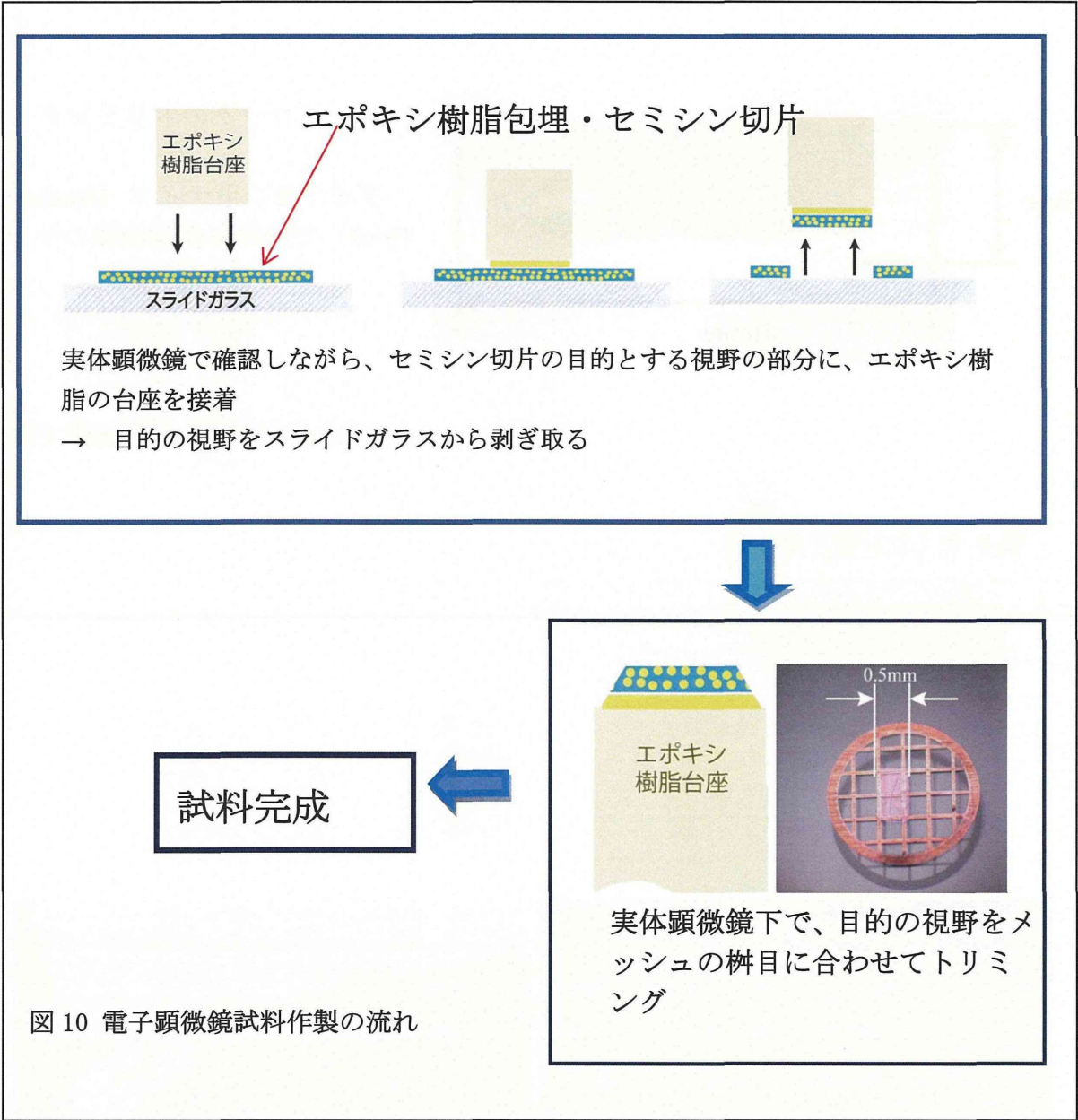


図 10 電子顕微鏡試料作製の流れ

C-1-(1) マウスへの気管内投与技術の確立に係わる基盤研究の実施

C-1- (1)-① 気管内投与器具の開発、投与量の検討、投与状態の確認

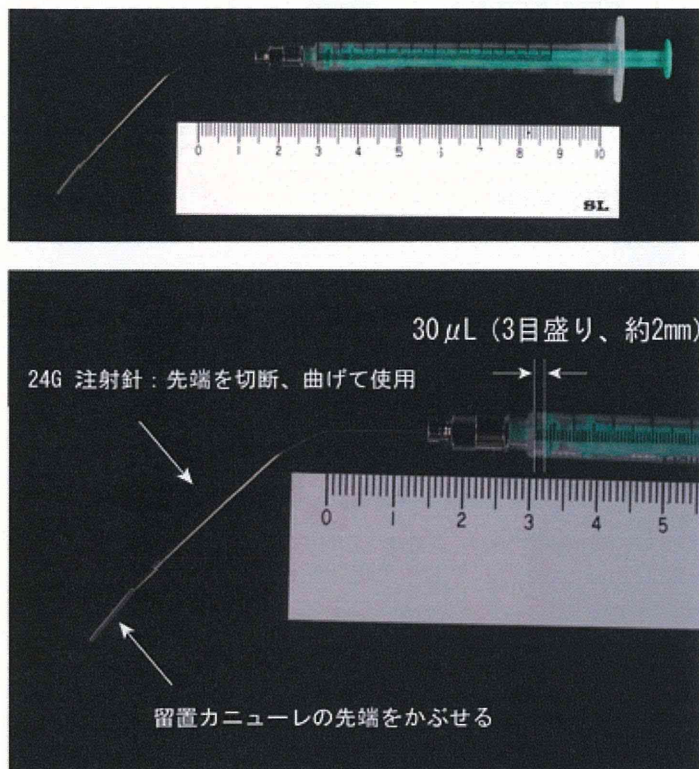


図 11. 気管内投与器具

	水 30 μ L	水 50 μ L
1	0.029	0.051
2	0.037	0.049
3	0.029	0.050
4	0.021	0.052
5	0.034	0.059
6	0.030	0.055
7	0.031	0.053
8	0.032	0.053
9	0.035	0.048
10	0.041	0.053
11	0.032	0.050
12	0.031	0.054
13	0.035	0.049
14	0.035	0.055
15	0.033	0.045
Ave	0.032	0.052
S.D.	0.004	0.005
MIN.	0.021	0.045
MAX.	0.041	0.059

蒸留水 30 μ L (左列)、50 μ L (左列) を気管内注入器のシリンジ内に吸い上げて、電子天秤の上に乗せた薬包紙にシリンジ内に吸い上げた蒸留水を吹き出して秤量した。15回の秤量した平均値と標準偏差は 32mg \pm 4 (左列)、52mg \pm 3 (右列) であった。本分担研究で開発した気管内投与器具を用いることで設定どおりの投与が可能であることが示された。

図 12. 気管内投与器具の検体吹き出し量の検証



図 13. 墨汁 50 μ L を気管内投与直後のマウスの肺

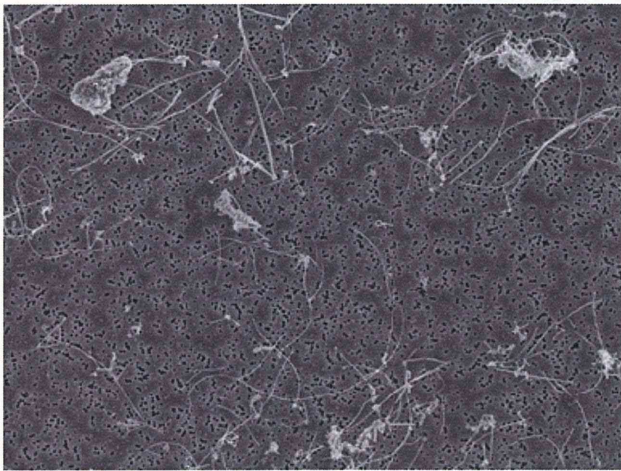


図 14. T-CNT 懸濁液の走査電顕像

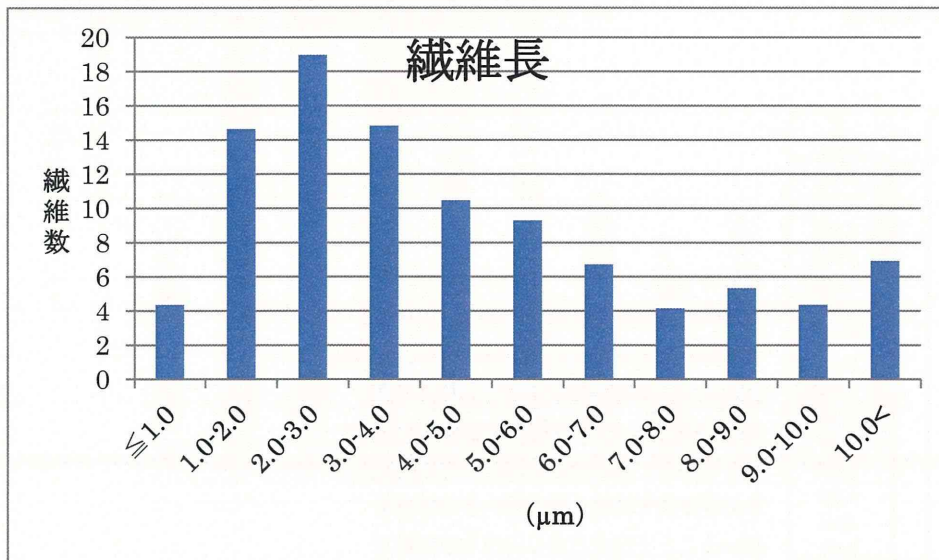


図 15. T -CNT の繊維長

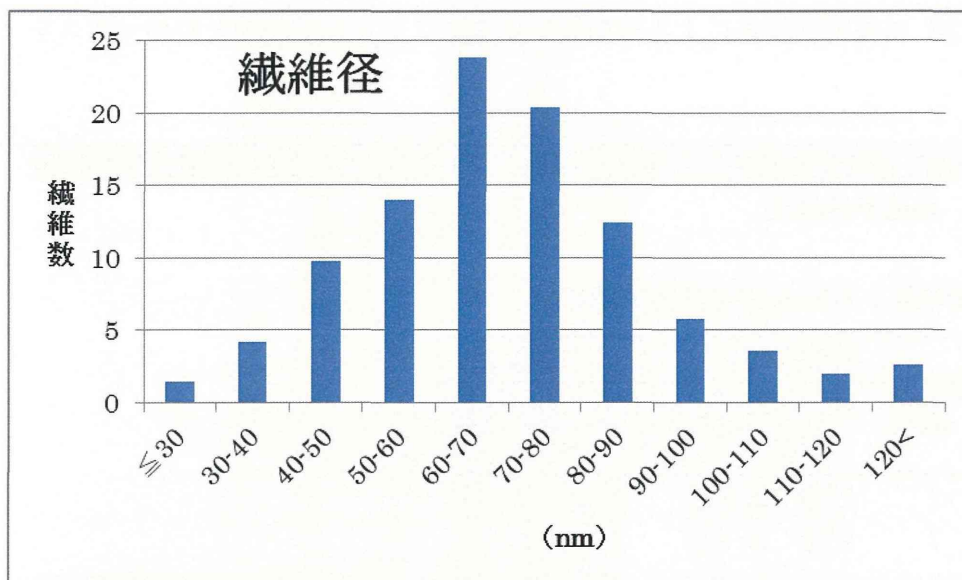


図 16. T-CNT の繊維径

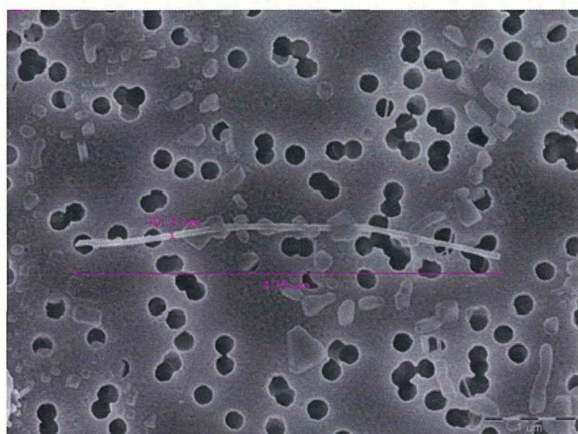


図 17. T-CNT 懸濁液の走査電顕像

写真中央: ゆるやかに湾曲した T-CNT 繊維 (繊維長 4.75 μ m、繊維幅 70.16nm)

T-CNT 繊維周囲の結晶は懸濁媒体 (生理食塩) に含まれる塩化ナトリウム。

C-1-(2) T-CNT の気管内投与による短期毒性のプロファイル把握のためのマウスを用いた 試験

C-1-(2)-① T-CNT の気管内投与による短期毒性のプロファイル把握：気管支肺胞洗浄液の生化学的、細胞学的検査

表 1. 気管内投与後 1 日に BALF 採取群の体重

投与用量 (/匹)	動物 数	平均体重(g) ± 標準偏差	
		投与前測定 (投与日)	投与後測定日 1日
Control	7	275 ± 1.6	273 ± 1.6
1.1 μg	7	273 ± 1.2	273 ± 1.9
3.3 μg	7	275 ± 1.9	274 ± 2.0
10 μg	7	275 ± 1.4	273 ± 1.3

表 2. 気管内投与後 3 日に BALF 採取群の体重

投与用量 (/匹)	動物 数	平均体重(g) ± 標準偏差		
		投与前測定 (投与日)	投与後測定日	
			1日	3日
Control	7	273 ± 1.7	272 ± 1.9	272 ± 1.6
1.1 μg	7	271 ± 1.1	270 ± 1.2	271 ± 0.9
3.3 μg	7	268 ± 1.2	265 ± 1.6	265 ± 1.4
10 μg	7	272 ± 1.7	271 ± 1.7	273 ± 1.7

表 3. 気管内投与後 4 週に BALF 採取群の体重

投与用量 (/匹)	動物 数	平均体重(g) ± 標準偏差					
		投与前測定 (投与日)	投与後測定 日/週				
			1日	1週	2週	3週	4週
Control	7	275 ± 1.5	271 ± 1.3	277 ± 1.8	282 ± 1.5	280 ± 1.1	287 ± 1.5
1.1 μg	7	267 ± 1.2	267 ± 1.1	269 ± 1.2	277 ± 1.0	276 ± 1.0	284 ± 0.6
3.3 μg	7	273 ± 1.3	273 ± 1.7	273 ± 1.5	281 ± 0.9	278 ± 1.1	285 ± 0.9
10 μg	7	274 ± 1.2	270 ± 1.2	276 ± 1.4	279 ± 1.1	277 ± 1.4	288 ± 1.1

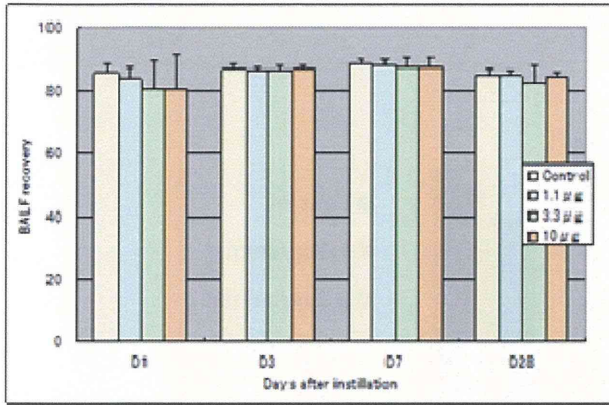


図 18. 気管支肺胞洗浄液の回収率

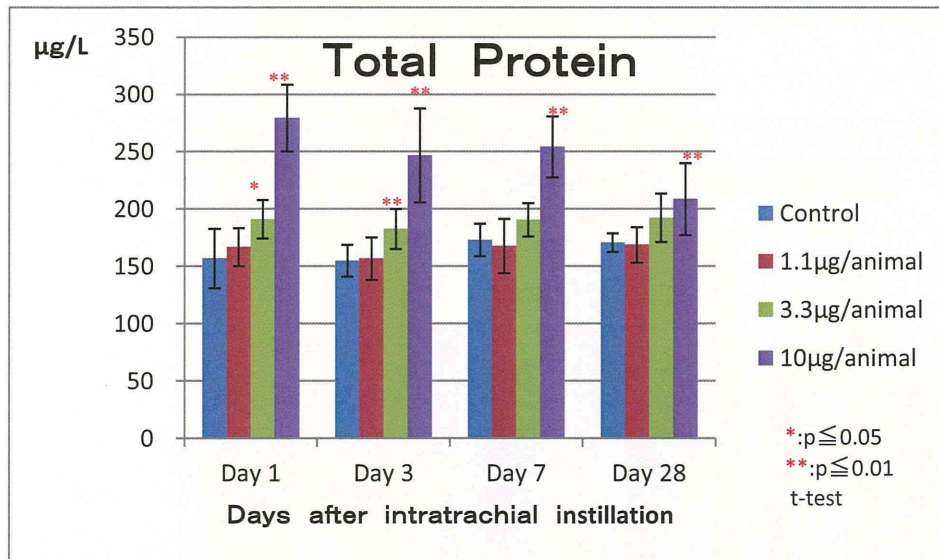


図 19. 気管支肺胞洗浄液の生化学検査：総蛋白

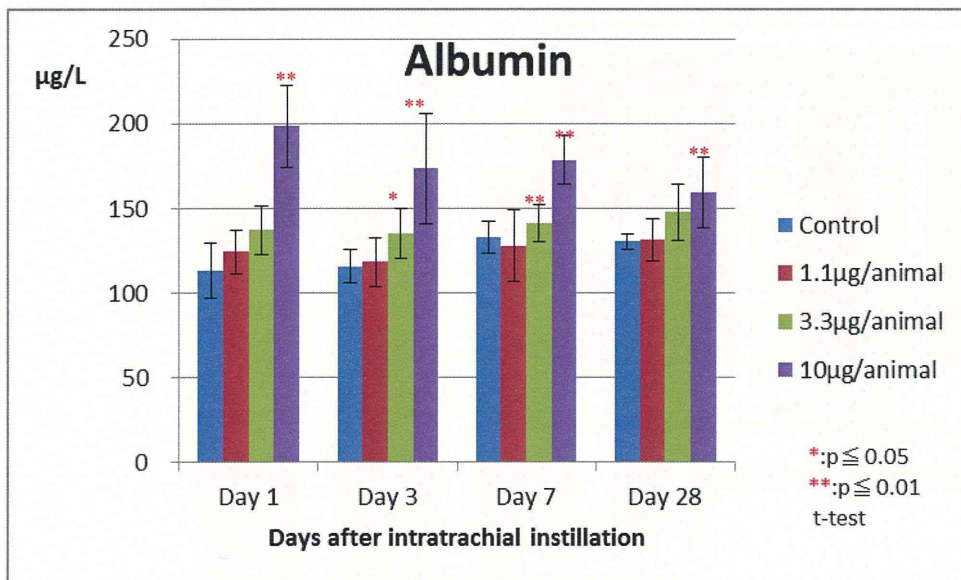


図 20. 気管支肺胞洗浄液の生化学検査：アルブミン

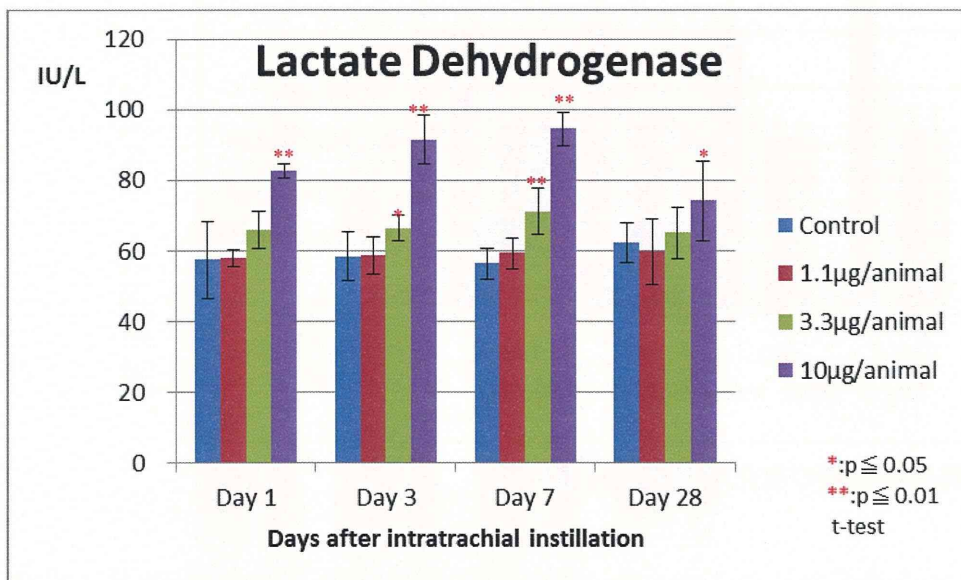


図 21. 気管支肺胞洗浄液の生化学検査：LDH

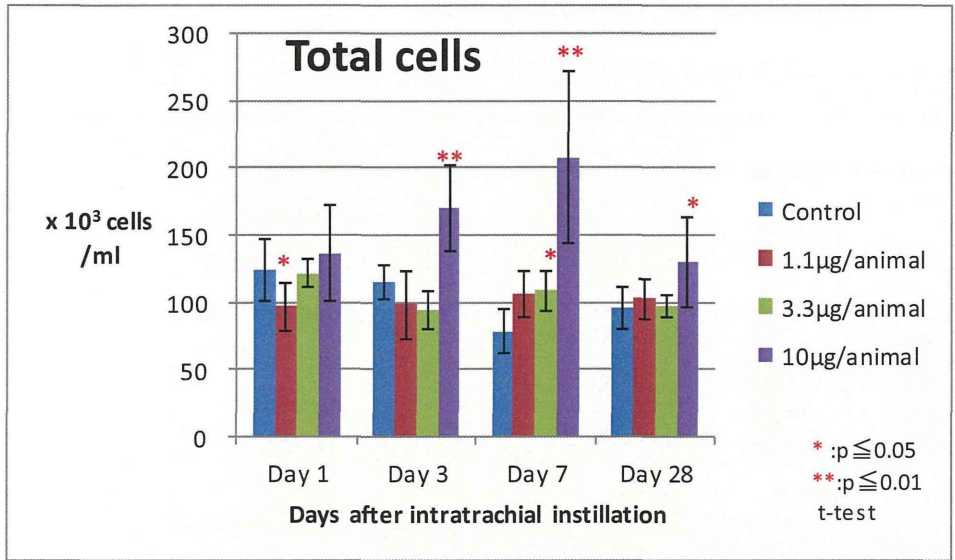


図 22. 気管支肺胞洗浄液の細胞検査：総細胞数

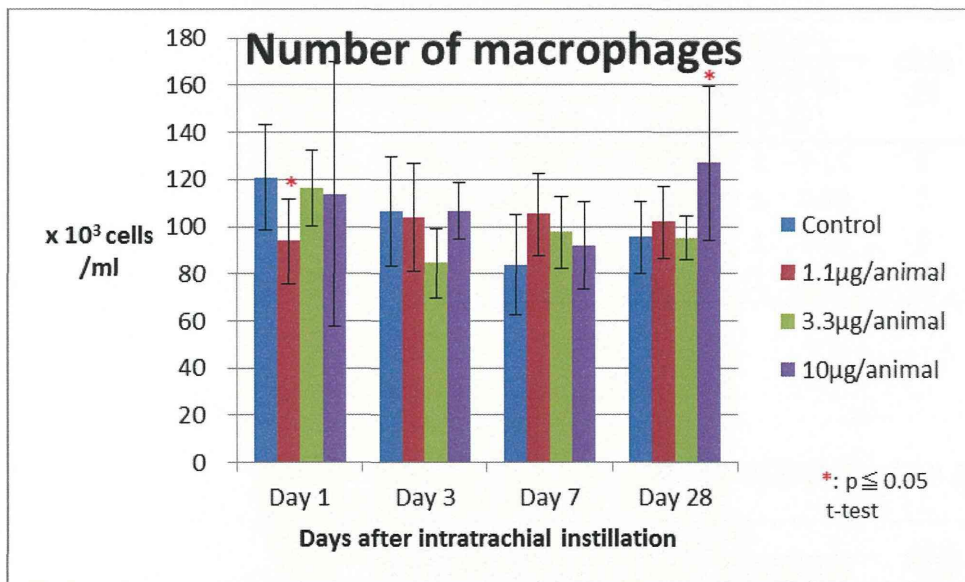


図 23. 気管支肺胞洗浄液の細胞検査：肺胞マクロファージ数

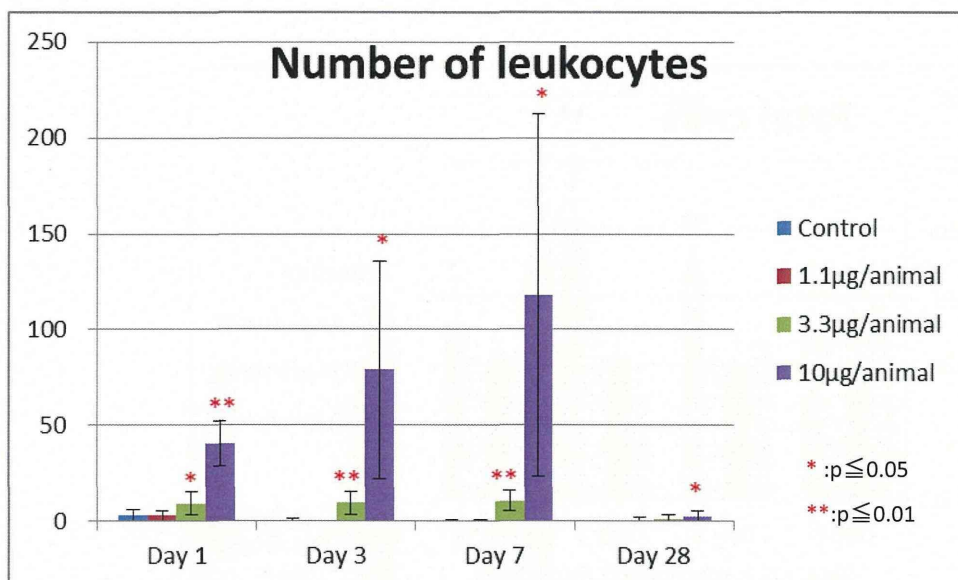


図 24. 気管支肺胞洗浄液の細胞検査：白血球数（好中球）

表 4. 気管内投与後 1 日解剖群の体重

投与用量 (匹)	動物 数	平均体重(g) ± 標準偏差	
		投与前測定 (投与日)	投与後測定日 1日
Control	5	27.3 ± 1.3	27.5 ± 1.6
1.1 µg	5	28.0 ± 1.4	28.3 ± 1.5
3.3 µg	5	27.4 ± 1.2	27.1 ± 0.9
10 µg	5	27.5 ± 1.7	27.2 ± 1.5

表 5. 気管内投与後 1 週解剖群の体重

投与用量 (匹)	動物 数	平均体重(g) ± 標準偏差		
		投与前測定 (投与日)	投与後測定日/週	
			1日	1週
Control	5	27.5 ± 0.8	27.3 ± 1.3	27.7 ± 1.0
1.1 µg	5	27.7 ± 0.8	27.6 ± 0.9	27.7 ± 1.0
3.3 µg	5	27.6 ± 1.2	27.4 ± 1.3	27.8 ± 1.8
10 µg	5	27.4 ± 0.6	27.2 ± 0.7	27.5 ± 1.0

表 6. 気管内投与後 4 週解剖群の体重

投与用量 (μ g)	動物 数	平均体重(g) \pm 標準偏差				
		投与前測定 (投与日)	投与後測定週			
			1週	2週	3週	4週
Control	5	27.2 \pm 1.4	27.5 \pm 1.5	27.8 \pm 1.7	28.0 \pm 1.5	28.7 \pm 1.8
1.1 μ g	5	27.7 \pm 1.4	27.0 \pm 1.1	27.1 \pm 1.4	27.4 \pm 1.2	28.2 \pm 1.8
3.3 μ g	5	27.3 \pm 0.6	27.6 \pm 0.6	27.7 \pm 0.4	28.5 \pm 1.0	29.6 \pm 0.7
10 μ g	5	27.8 \pm 1.2	27.9 \pm 0.9	27.6 \pm 1.6	28.1 \pm 1.7	29.0 \pm 1.6

表 7. 気管内投与後 13 週解剖群の体重

投与用量 (μ g)	動物 数	平均体重(g) \pm 標準偏差				
		投与前測定 (投与日)	投与後測定週			
			1週	2週	3週	4週
Control	5	27.8 \pm 1.5	27.6 \pm 1.9	28.2 \pm 1.7	28.9 \pm 1.2	29.5 \pm 0.9
1.1 μ g	5	27.3 \pm 0.9	27.6 \pm 1.0	28.1 \pm 0.9	29.1 \pm 1.1	29.8 \pm 1.1
3.3 μ g	5	26.9 \pm 1.6	27.0 \pm 1.1	27.6 \pm 1.1	28.2 \pm 1.4	28.6 \pm 1.4
10 μ g	5	27.1 \pm 1.4	26.7 \pm 1.1	26.9 \pm 1.1	27.3 \pm 1.0	28.2 \pm 1.2

(続)

投与用量 (μ g)	動物 数	平均体重(g) \pm 標準偏差				
		投与後測定週				
		5週	6週	7週	8週	9週
Control	5	29.7 \pm 1.0	29.7 \pm 1.2	30.1 \pm 0.9	30.4 \pm 0.9	31.3 \pm 0.8
1.1 μ g	5	30.6 \pm 1.0	30.9 \pm 1.2	30.8 \pm 1.1	31.1 \pm 1.1	32.3 \pm 0.8
3.3 μ g	5	29.3 \pm 1.3	29.8 \pm 1.7	29.8 \pm 2.1	29.7 \pm 1.8	30.5 \pm 1.4
10 μ g	5	29.0 \pm 1.0	29.1 \pm 0.9	28.7 \pm 1.2	29.0 \pm 1.0	29.8 \pm 1.0

(続)

投与用量 (μ g)	動物 数	平均体重(g) \pm 標準偏差			
		投与後測定週			
		10週	11週	12週	13週
Control	5	28.6 \pm 1.3	30.8 \pm 0.9	31.4 \pm 1.5	32.6 \pm 1.5
1.1 μ g	5	31.4 \pm 0.8	31.6 \pm 1.2	32.4 \pm 1.0	34.1 \pm 1.0
3.3 μ g	5	30.8 \pm 1.7	30.4 \pm 1.9	30.7 \pm 2.0	31.8 \pm 1.8
10 μ g	5	29.8 \pm 1.0	29.5 \pm 0.7	29.8 \pm 0.6	30.5 \pm 0.7

C-1-(2)-② T-CNT の気管内投与による短期毒性のプロファイル把握：病理組織学的検査

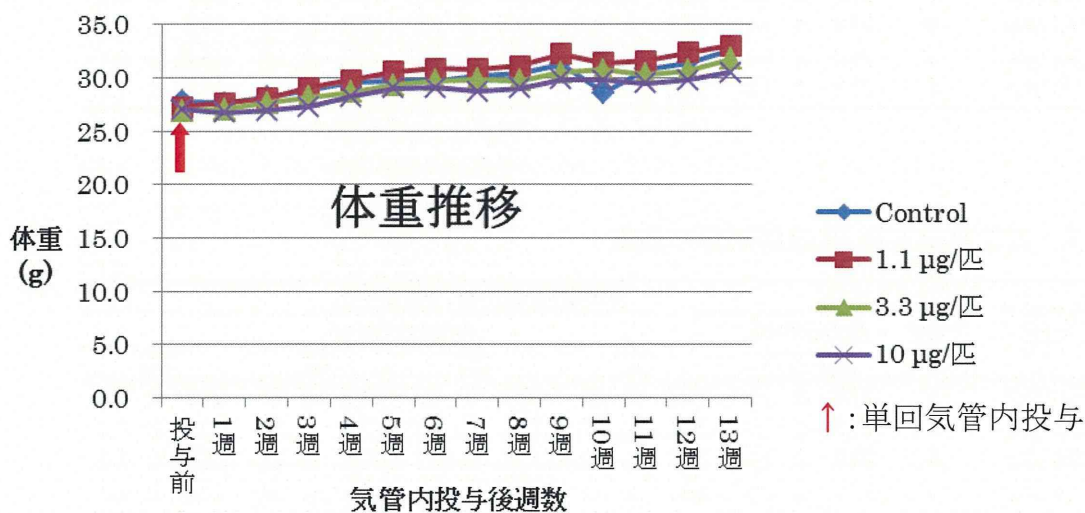


図 25. 気管内投与後 13 週解剖群の体重推移

表 8. 気管内投与後 1 日、1 週、4 週、13 週解剖群の肺重量

動物数	肺重量平均 (mg) ± 標準偏差									
	投与後測定 日/週									
	1 日		1 週		4 週		13 週			
Control	5	140.6 ± 6.9	144.8 ± 7.9	161.0 ± 8.5	159.2 ± 6.5					
1.1 µg	5	141.2 ± 3.3	145.6 ± 14.3	150.0 ± 10.7	153.8 ± 8.5					
3.3 µg	5	141.0 ± 7.9	150.4 ± 14.2	170.8 ± 21.5	161.6 ± 13.3					
10µg	5	140.4 ± 4.2	157.6 ± 6.5 *	177.0 ± 15.1	158.6 ± 13.0					

* : $p \leq 0.05$ t-test

表9 T-CNT 単回気管内投与マウスの下部気道における T-CNT の沈着

	Days after instillation			
	1	7	28	91
Control				
<Number of animals examined>	<5>	<5>	<5>	<5>
Bronchiole				
MWCNT, free form	-	-	-	-
MWCNT, phagocytosed	-	-	-	-
Alveoli				
MWCNT, free form	-	-	-	-
MWCNT, phagocytosed	-	-	-	-
1.1 μg				
<Number of animals examined>	<5>	<5>	<5>	<5>
Bronchiole				
MWCNT, free form	1	1	0	0
MWCNT, phagocytosed	5	1	2	0
Alveoli				
MWCNT, free form	1	0	0	0
MWCNT, phagocytosed	3	3	5	3
3.3 μg				
<Number of animals examined>	<5>	<5>	<5>	<5>
Bronchiole				
MWCNT, free form	1	0	0	0
MWCNT, phagocytosed	5	4	1	
Alveoli				
MWCNT, free form	2	0	0	0
MWCNT, phagocytosed	4	5	5	5
10 μg				
<Number of animals examined>	<5>	<5>	<5>	<5>
Bronchiole				
MWCNT, free form	4	1	0	0
MWCNT, phagocytosed	5	5	3	0
Alveoli				
MWCNT, free form	5	0	0	0
MWCNT, phagocytosed	5	5	5	5

表 10 T-CNT 単回気管内投与マウスの肺に認められた病理組織変化

	Days after instillation			
	1	7	28	91
Control				
<Number of animals examined>	<5>	<5>	<5>	<5>
Inflammation, facal	0	0	0	1+: 1
Accumulastion of alveolar macrophages	0	0	0	0
1.1 μg				
<Number of animals examined>	<5>	<5>	<5>	<5>
Inflammation, facal	1+: 1	0	1+: 1	1+: 2
Accumulastion of alveolar macrophages				
3.3 μg				
<Number of animals examined>	<5>	<5>	<5>	<5>
Inflammation, facal	1+: 4	1+: 2, 2+: 2, 3+: 1	1+: 1, 2+: 2	1+: 2, 3+: 1
Accumulastion of alveolar macrophages			1+: 1	0
10 μg				
<Number of animals examined>	<5>	<5>	<5>	<5>
Inflammation, facal	1+: 2, 2+: 2, 3+: 1	1+: 2, 2+: 3	1+: 3, 3+: 2	1+: 1, 2+: 3, 3+: 1
Accumulastion of alveolar macrophages	0	0	0	0

1+ : slight, 2+ : moderate, 3+ : severe

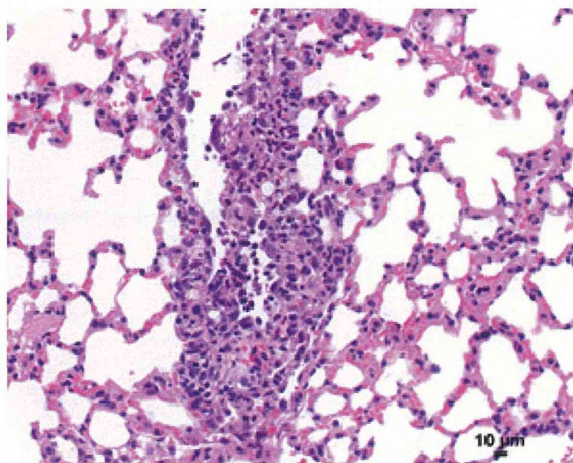


図 26 対照群、91日の肺、inflammation, focal

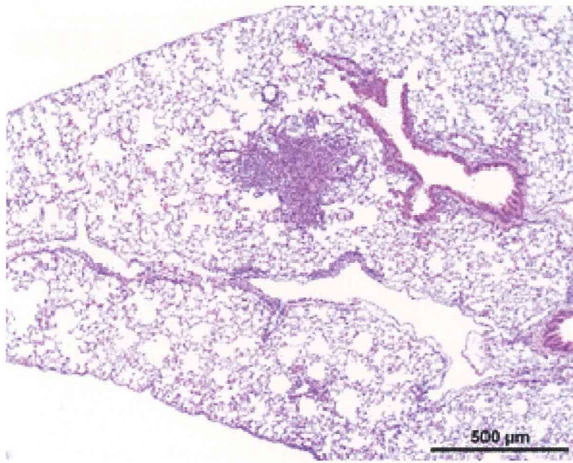


図 27 T-CNT 10 μg/匹投与群、91 日の肺、inflammation, focal

C-1- (3) T-CNTとMWCNT原体による呼吸器毒性発現の違い (確認実験)

B-1-(3)-① T-CNT と MWCNT 原体による呼吸器毒性発現の違い (確認実験) : 気管支肺胞洗淨液の生化学的、細胞学的検査

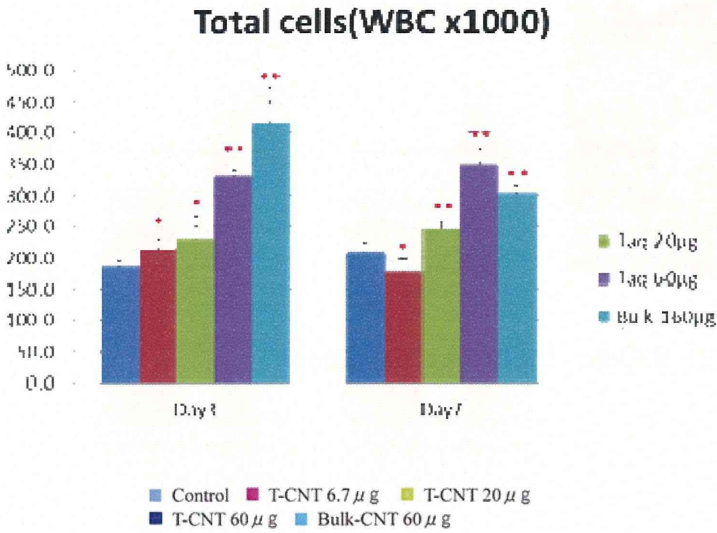


図 28 T-CNT 単回気管内投与ラットマウスから採取した気管支肺胞洗淨液 : 総細胞数

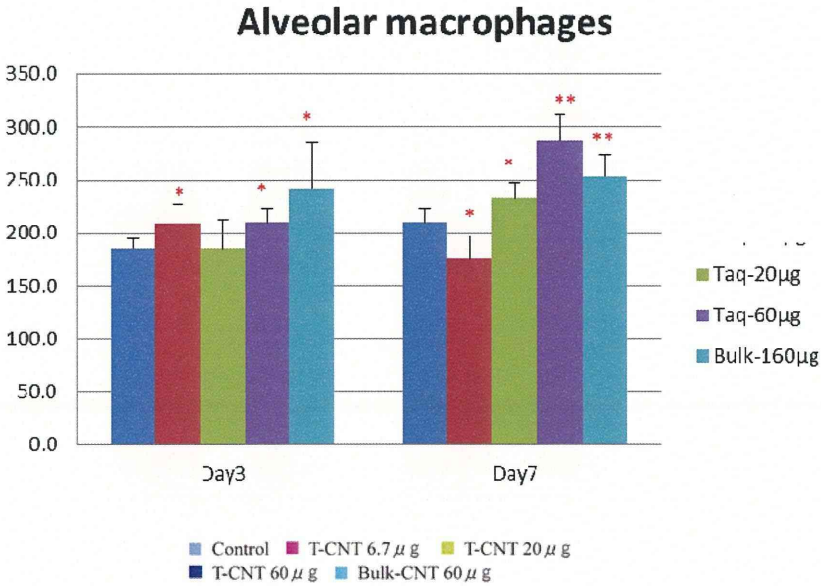


図 29 T-CNT 単回気管内投与ラットマウスから採取した気管支肺胞洗淨液 : 肺胞マクロファージ

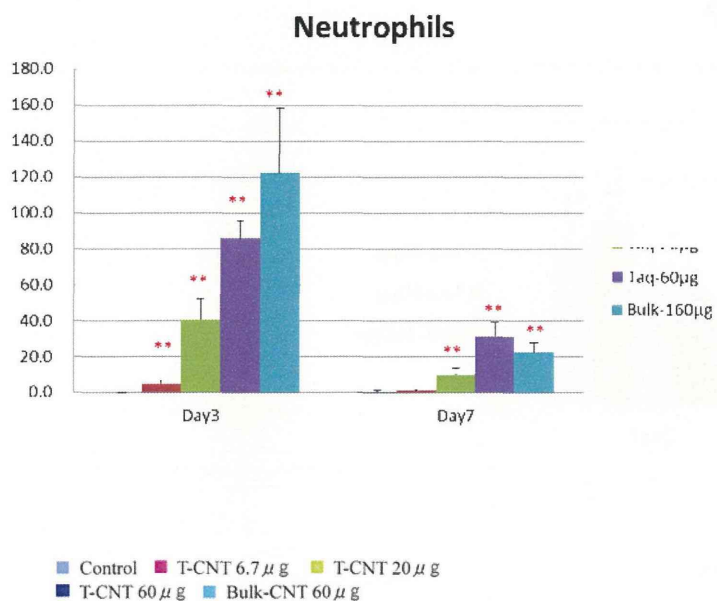


図 30 T-CNT 単回気管内投与ラットマウスから採取した気管支肺胞洗浄液：好中球

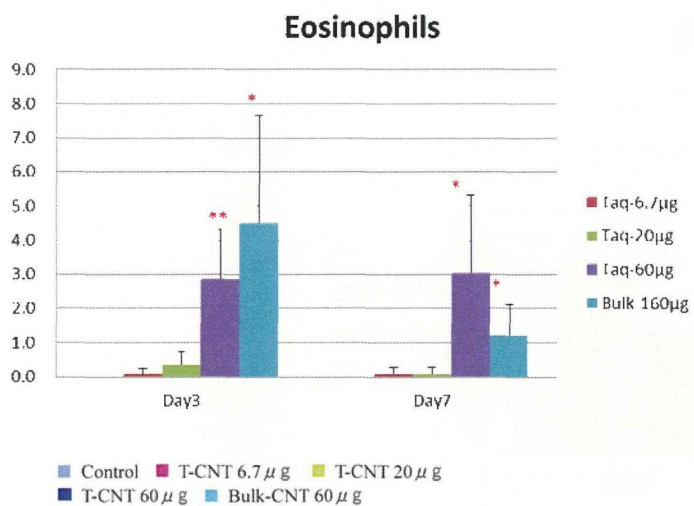


図 31 T-CNT 単回気管内投与ラットマウスから採取した気管支肺胞洗浄液：好酸球

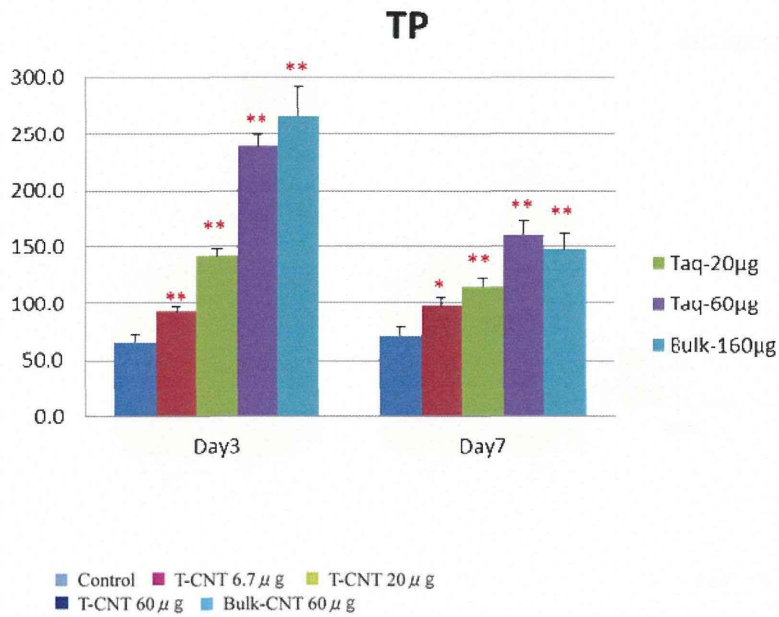


図 32 T-CNT 単回気管内投与ラットマウスから採取した気管支肺胞洗浄液：総蛋白

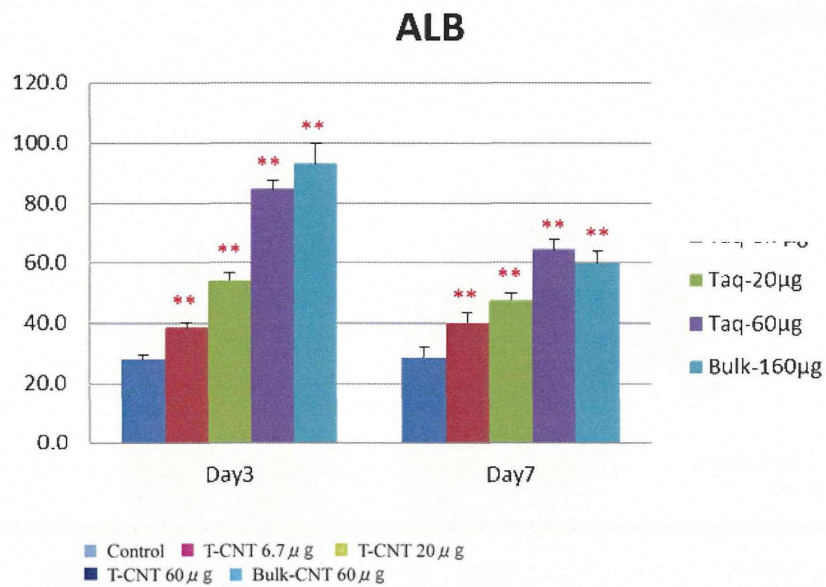


図 33 T-CNT 単回気管内投与ラットマウスから採取した気管支肺胞洗浄液：アルブミン

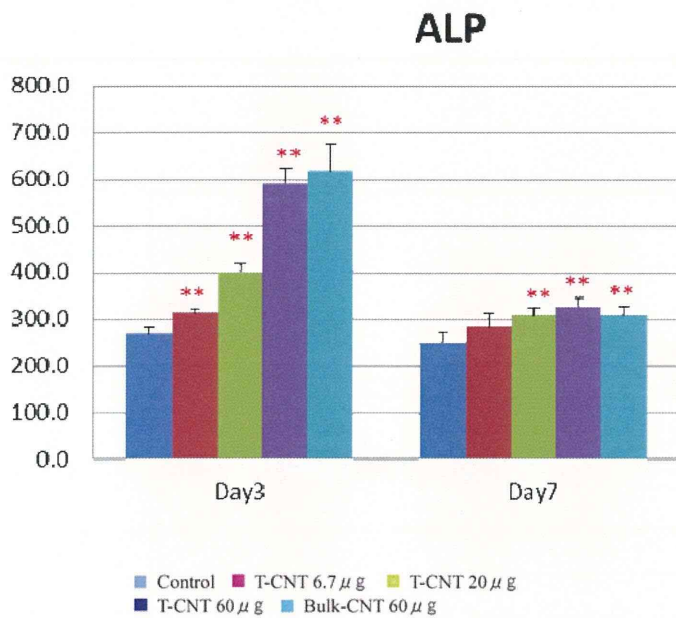


図 34 T-CNT 単回気管内投与ラットマウスから採取した気管支肺胞洗浄液：アルカリフォスファターゼ

C-1-(3)-② T-CNT と MWCNT 原体による呼吸器毒性発現の違い（確認実験）：
病理組織学的検索

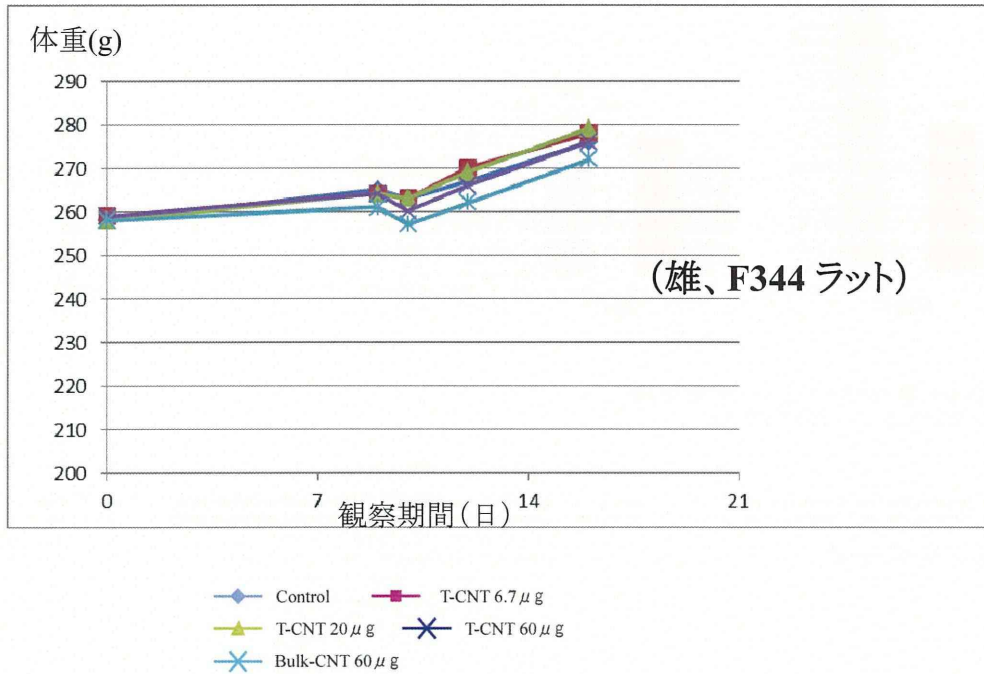


図 35 T-CNT 単回気管内投与ラットの体重推移

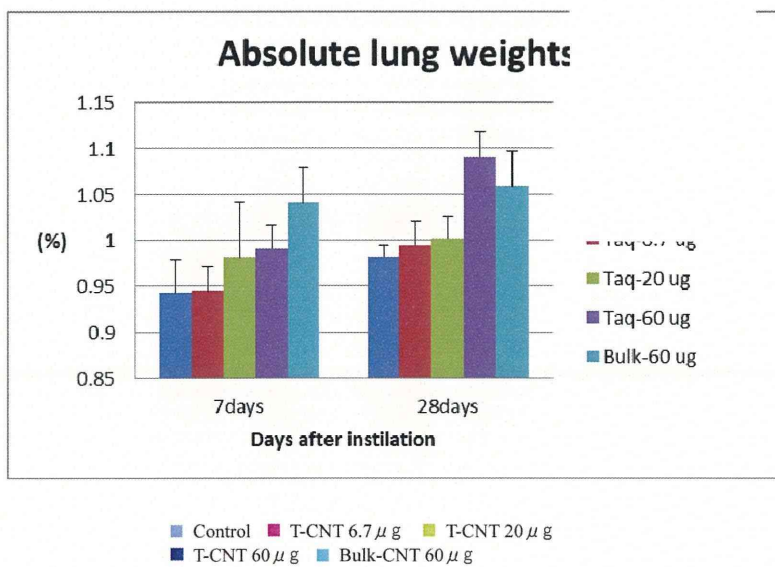


図 36 T-CNT 単回気管内投与ラットの肺実重量