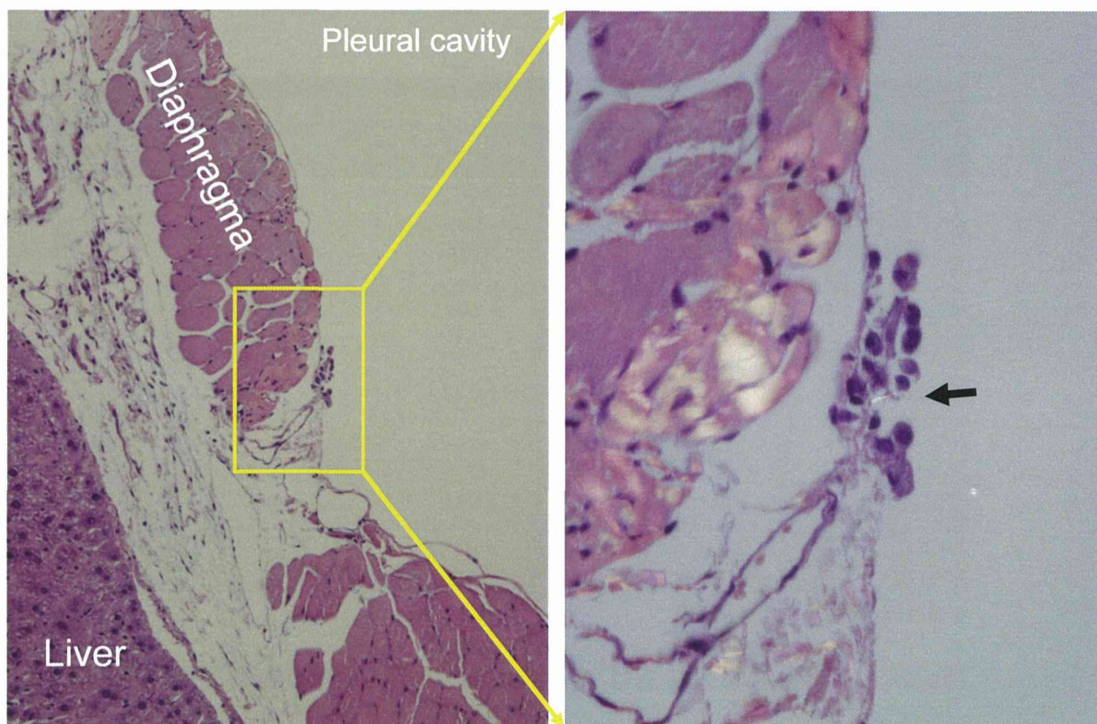
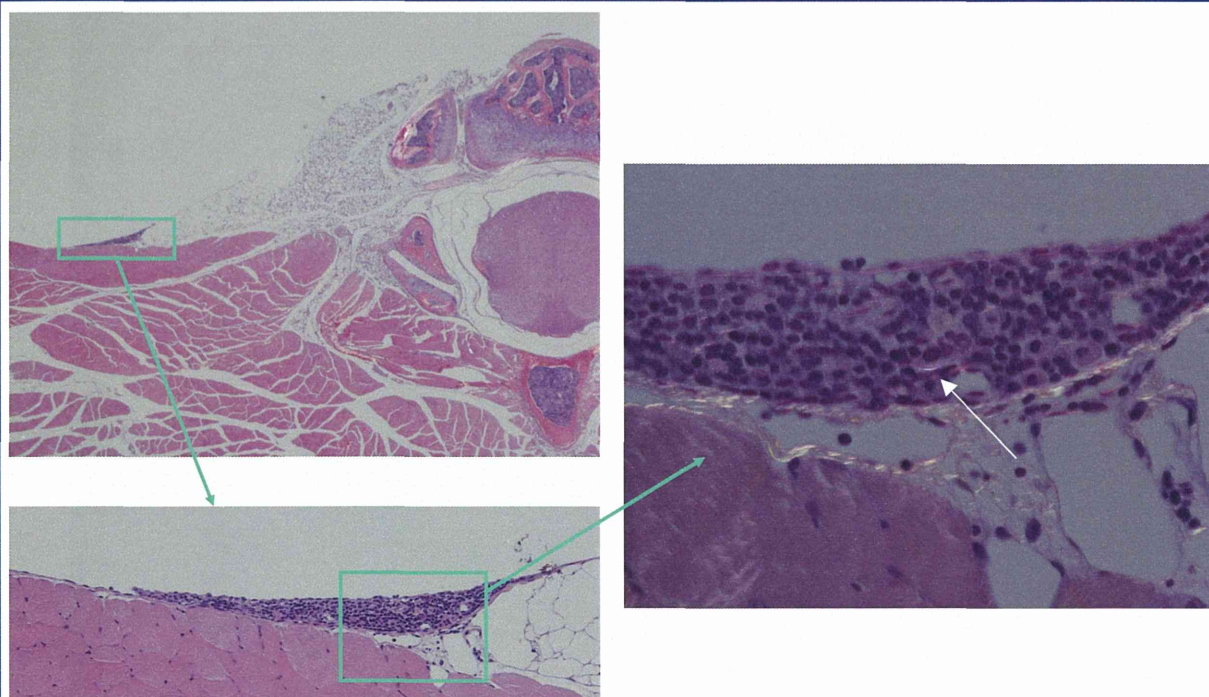


13W parietal pleura

Unpublished data



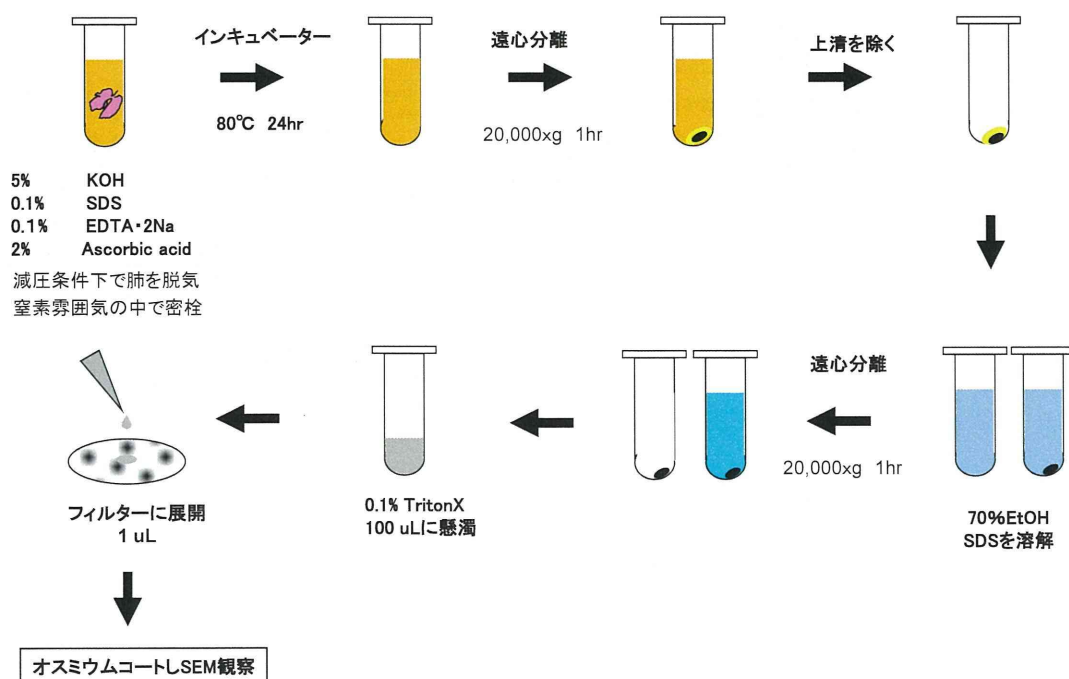
26 週後 壁側胸膜



肺に沈着したMWCNTの抽出方法、 性状の把握、定量化

13

吸入暴露肺からのMWCNT回収方法



14

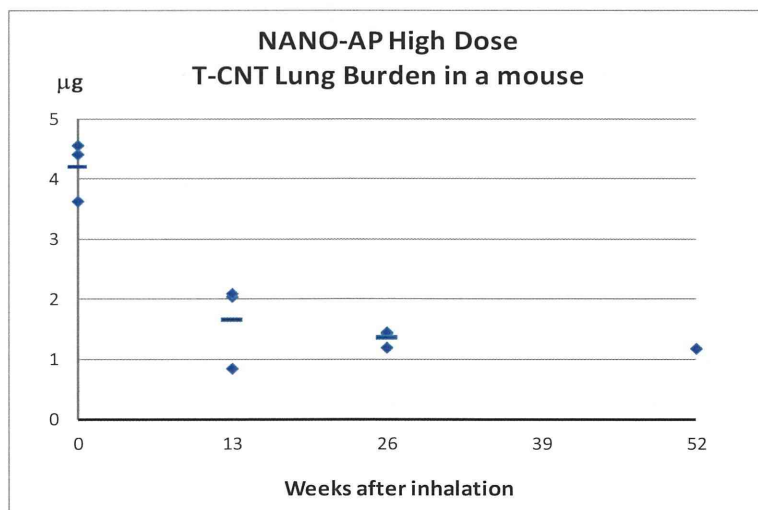
吸入暴露肺からのMWCNT回収と観察



肺を5%KOHで溶解して遠心分離 ($20,000 \times g$, 1時間)してMWCNTを回収し、100 μ LのTritonX(0.1%)に懸濁後、1 μ Lをフィルターに展開し、SEMで観察し繊維数を数えた。観察の障害となる残渣は鉄と考えられ、溶解液にアスコルビン酸とEDTA \cdot 2Naを添加することで除去できる。scale bars 10 μ m

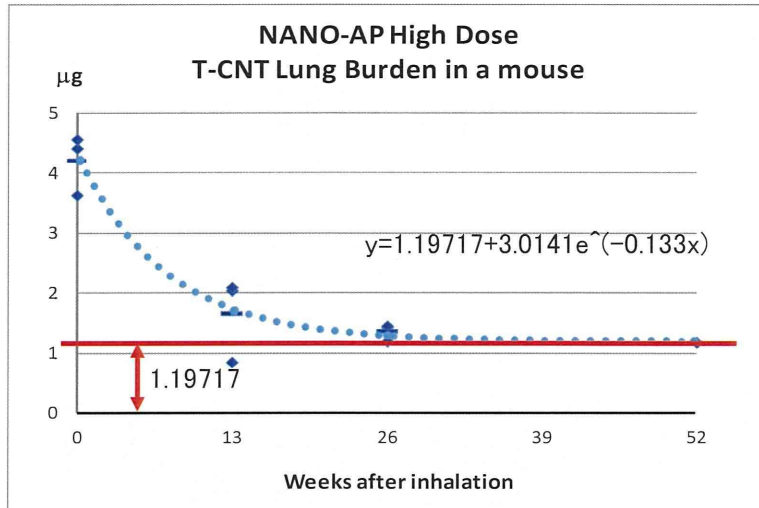
Taquahashi et al., JTS, 2013

肺沈着量の推移(高用量群)



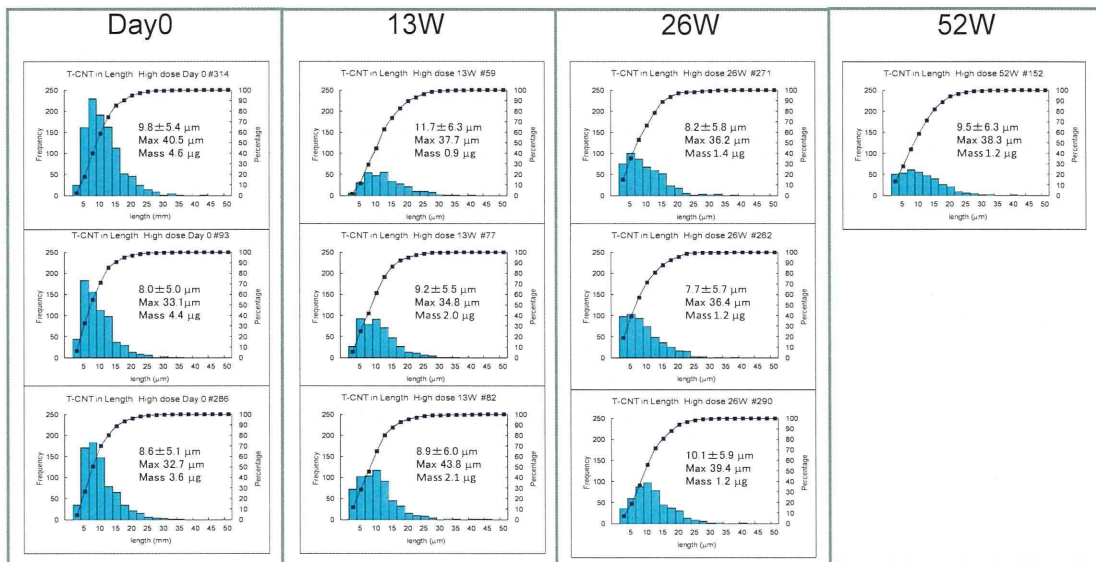
Sampling	ID	Number of Fibers	Mass (μ g)
Day 0	#93	1.3×10^7	4.4
	#286	1.1×10^7	3.6
	#314	1.4×10^7	4.6
	mean	1.3×10^7	4.2
3W	#59	2.6×10^6	0.9
	#77	6.1×10^6	2.0
	#82	6.3×10^6	2.1
	mean	5.0×10^6	1.7
6W	#271	4.3×10^6	1.4
	#262	3.6×10^6	1.2
	#290	3.7×10^6	1.2
	mean	4.0×10^6	1.3
2W	#152	3.6×10^6	1.2

肺沈着量の推移(高用量群)



Sampling	ID	Number of Fibers	Mass(µg)
Day0	#93	1.3×10^7	4.4
	#286	1.1×10^7	3.6
	#314	1.4×10^7	4.6
	mean	1.3×10^7	4.2
13W	#59	2.6×10^6	0.9
	#77	6.1×10^6	2.0
	#82	6.3×10^6	2.1
	mean	5.0×10^6	1.7
26W	#271	4.3×10^6	1.4
	#262	3.6×10^6	1.2
	#290	3.7×10^6	1.2
	mean	4.0×10^6	1.3
52W	#152	3.6×10^6	1.2

肺に沈着したMWCNTの長さ分布(高用量群)

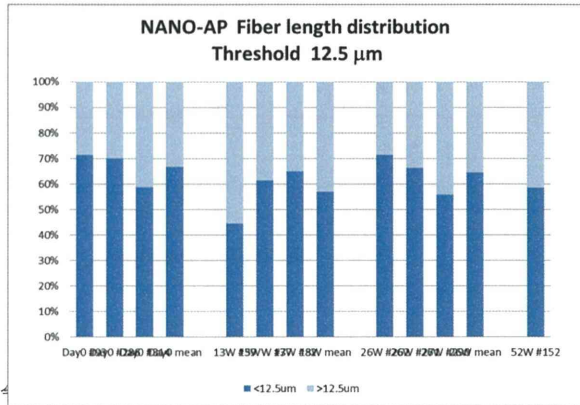
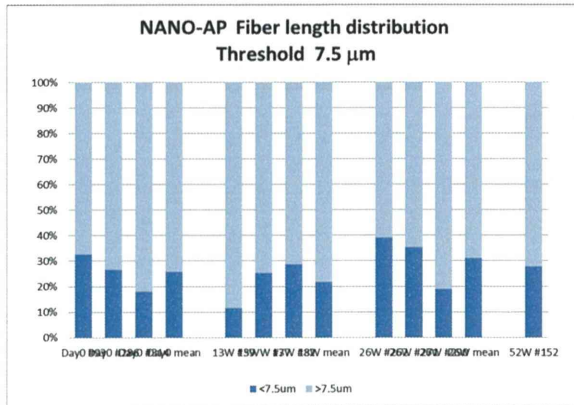
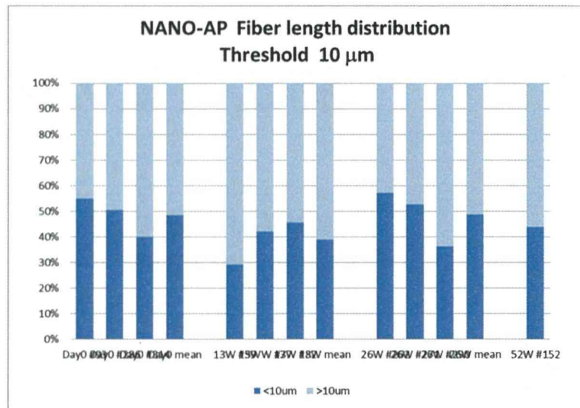
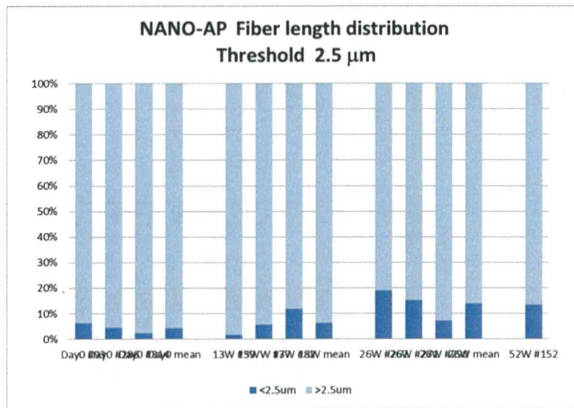


#93: 694/52 fields
#286: 764/55 fields
#314: 1031/59 fields

#59: 305/70 fields
#77: 471/53 fields
#82: 606/51 fields

#262: 516/78 fields
#271: 494/62 fields
#290: 500/74 fields

#152: 372/59 fields



H26年度 実験計画

- MWCNT
 - NANO-AS 野生型マウス反復吸入暴露実験(10月開始)
 - NANO-AT 野生型マウス免疫系への影響(10月開始、石丸先生)
- 酸化チタン
 - NANO-AR 野生型マウス単回吸入暴露実験(実施済み)
 - NANO-AV 野生型マウス反復吸入暴露実験(準備中)

NANO-AS 野生型マウスMWCNT暴露実験

1. 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	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	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	33	48	3	7	7	8	8
		組織沈着量	15		3	3	3	3	3

- ・使用動物 C57BL/6NcrSLC ♂ 144匹
- ・暴露開始週齢 12週齢

2. 実験条件

- ・暴露時間 10:00~12:00(2時間)

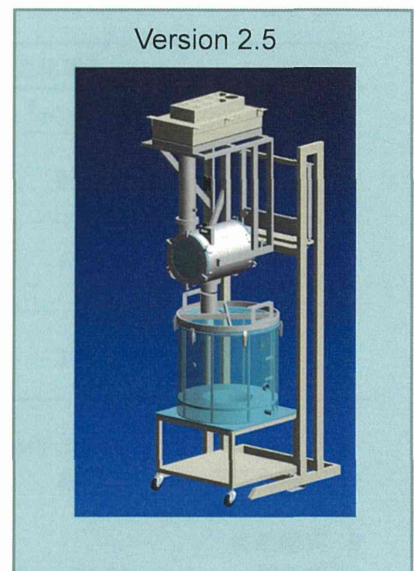
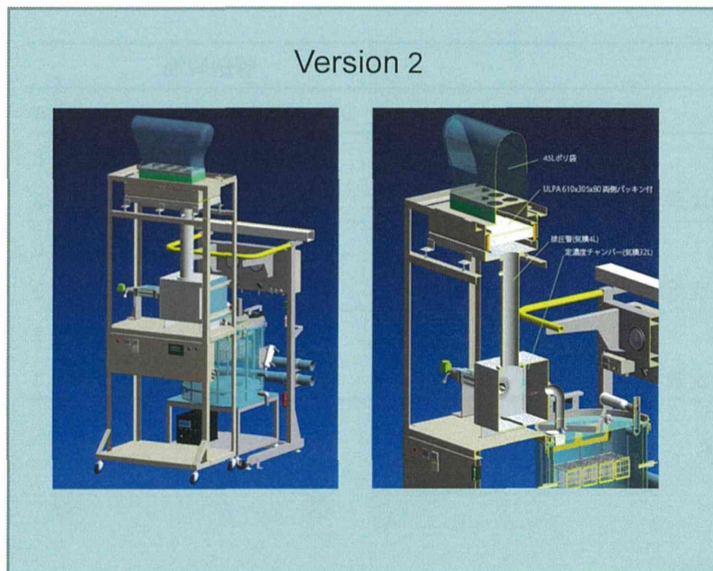
NANO-AT野生型マウスMWCNT暴露 免疫実験(石丸先生)

1. 群構成

	目標濃度		動物数	解剖時期	
	mg/m ³			1箇月	6箇月
Control 0ug/cartridge	0		16	5	11
Taquann L 250ug/cartridge	1		16	5	11
Taquann H 500ug/cartridge	2		16	5	11

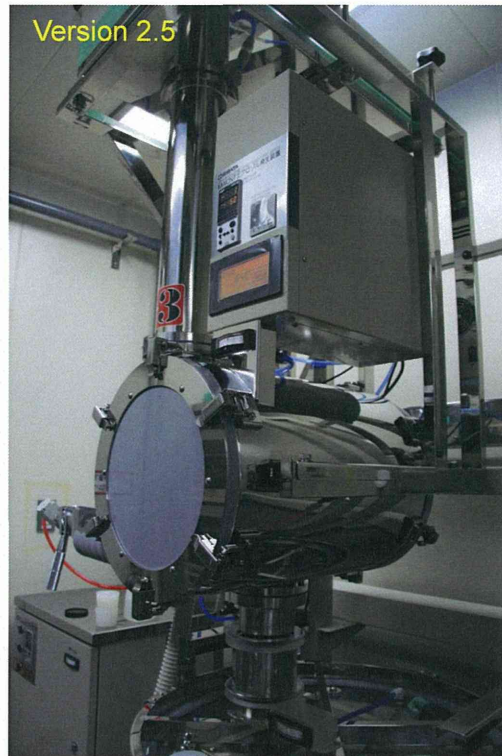
- ・使用動物 C57BL/6J ♀
- ・使用動物数 48匹
- ・暴露開始週齢 10週齢
- ・暴露時間 10:00~12:00(2時間)/日 1回/週 × 5週間 =10時間

カートリッジ直噴式ダスト発生装置の改良

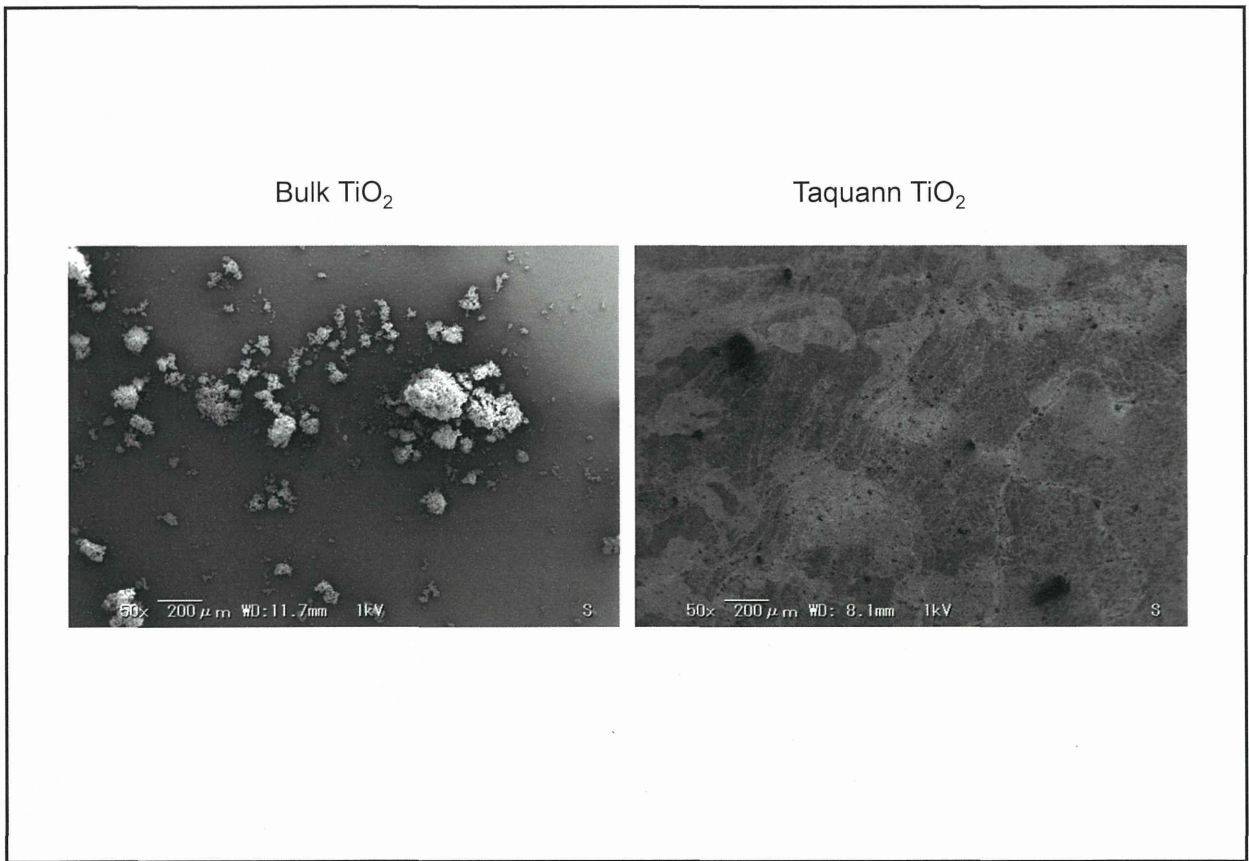


圧縮空気による暴露チャンバー内の圧力上昇を減弱させるため、サブチャンバーに煙突状の排圧管を装着し、その先にポリ袋で覆ったフィルターを装着した改良を行った。
定常状態: -30 Pa(室内に対して)、打ち込み直後; 0 Pa

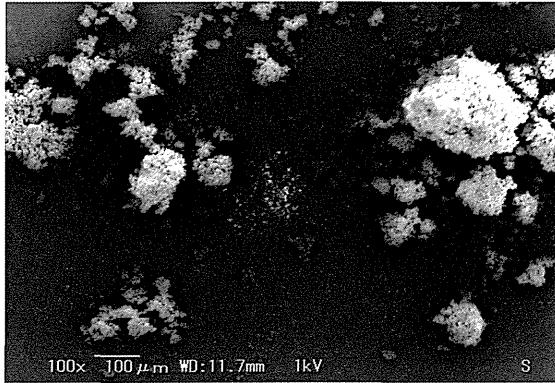




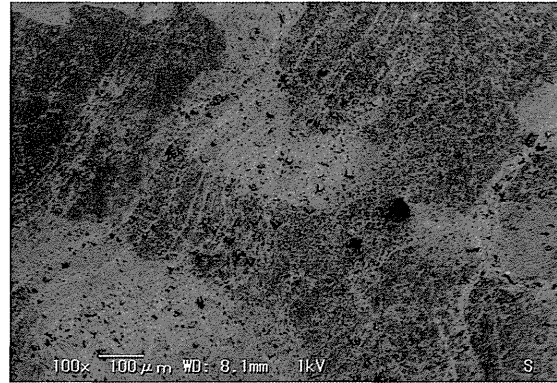
酸化チタンの吸入暴露実験



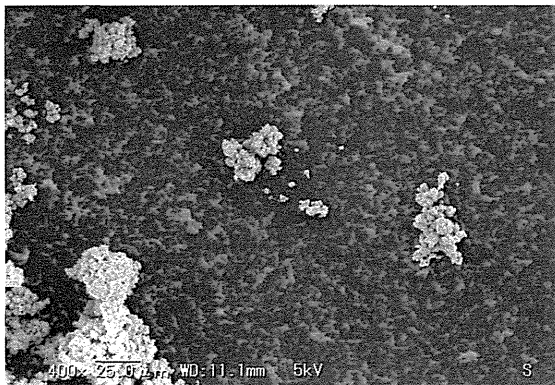
Bulk TiO₂



Taquann TiO₂



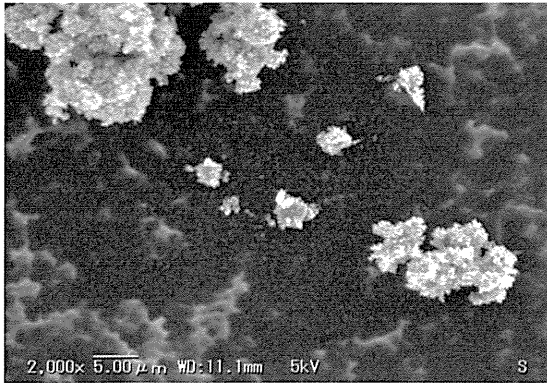
Bulk TiO₂



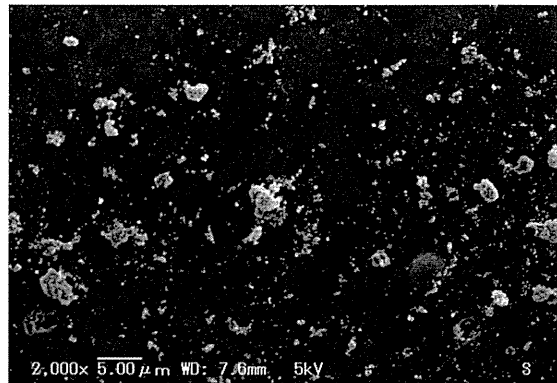
Taquann TiO₂



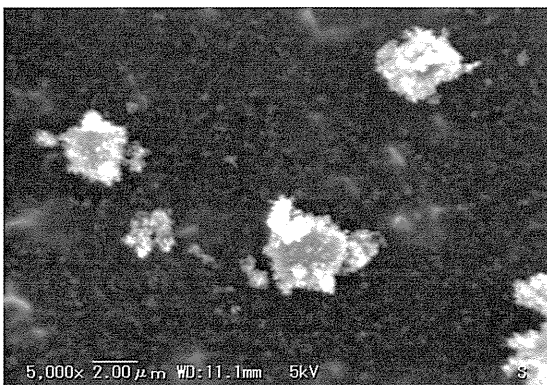
Bulk TiO₂



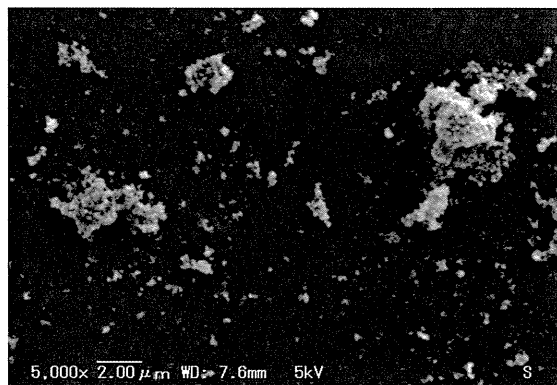
Taquann TiO₂

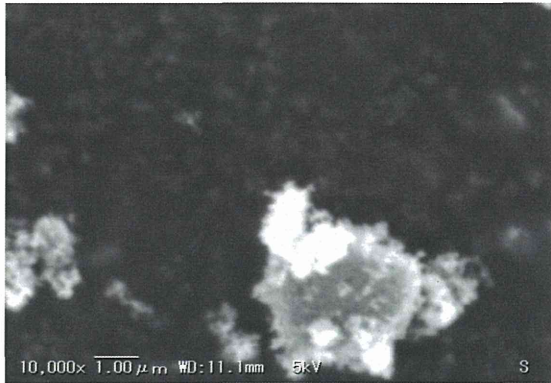
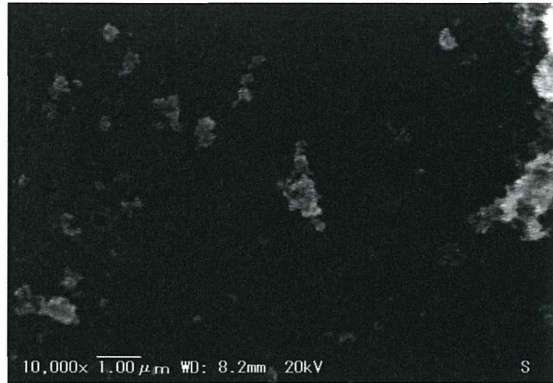


Bulk TiO₂



Taquann TiO₂



Bulk TiO₂Taquann TiO₂

酸化チタン吸入暴露実験 カートリッジ直噴式ダスト発生ver2.5

検体:酸化チタン MT-500B テイカ (35nm)

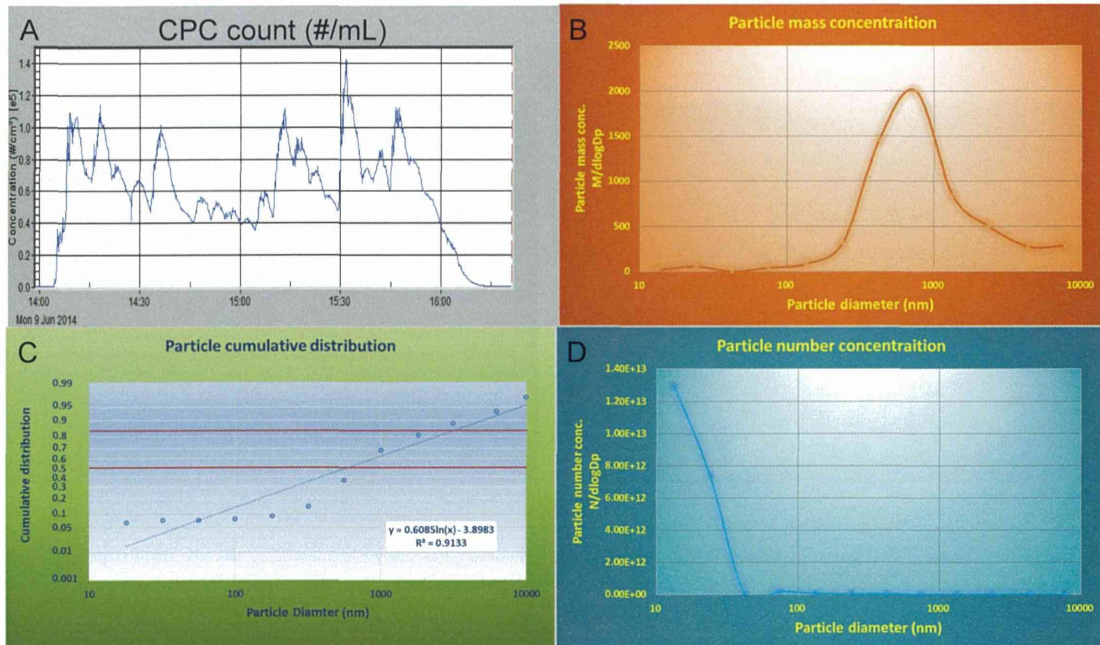
Test date	Total Mass (ug)	Concnetration (ug/m3)	MMAD (nm)	Standard Daviation (σg)
140508	4,830	4,025	989	3.382
140512	4,007	3,339	648	3.530
140514	2,792	2,327	761	3.314

メノウ乳鉢処理 {

MMAD: Mass Median Aerodynamic Diameter 空気動力学の中央粒子径

酸化チタン Maus 単回暴露吸入実験

検体: 酸化チタン MT-500B テイカ (35nm)

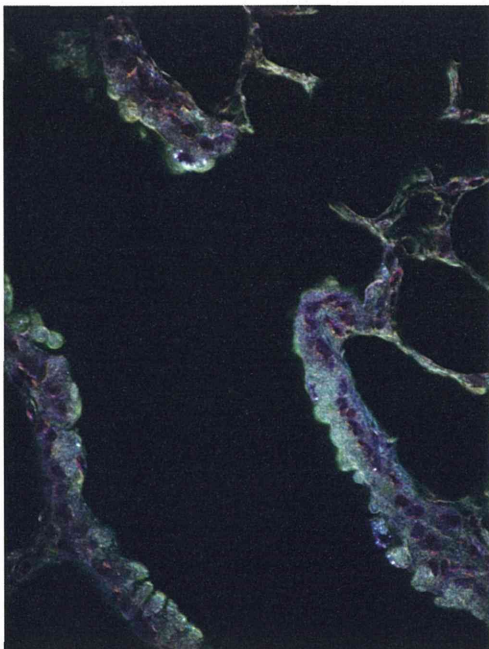


質量濃度: 1.6 mg/m³ MMAD: 606 nm GSC : 5.2

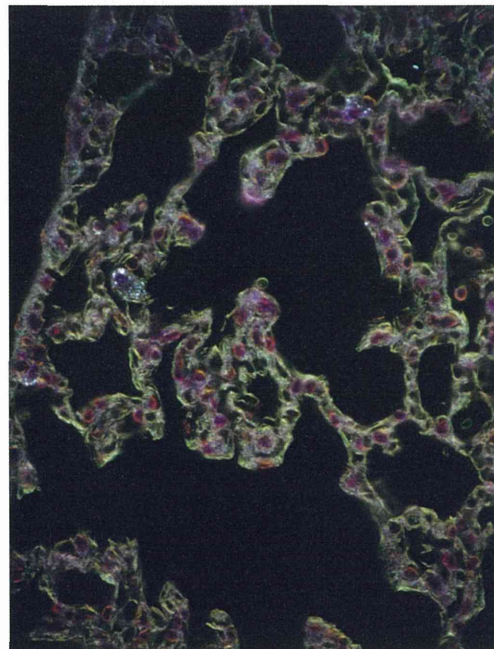
NANO-AR

酸化チタン Maus 単回吸入暴露肺 (CytoViva)

暴露直後



暴露7日後



まとめ

- Taquann直噴全身吸入装置は、実際にヒトが主に吸入することが想定される空力学的粒径が小さい単離繊維成分のみからなる分散性の高い検体で実験が可能となり、ヒトへの外挿性の高い毒性情報を得ることが期待される。
- Taquann直噴全身吸入装置により、MWCNTを全身暴露吸入したp53+/-マウスの肺では、MWCNTの凝集体による炎症像は認められなかった。一部は胸腔に達し、壁側胸膜面に中皮腫瘍がんを示唆する顕微鏡的病変を誘発することを確認した。
- MWCNTの肺沈着量は、高用量群で約4 μ g/動物であり、暴露終了後13週で半減した。
- Taquann直噴全身吸入装置により、酸化チタンもMWCNTと同様に暴露可能である。Taquann直噴全身吸入装置は多種類のナノマテリアルの吸入毒性評価の迅速化・効率化に貢献することが期待される。

文献情報 酸化チタンエアロゾル

Primary particle size	Aerosol generation	Concentration	Size distribution	Reference
25 nm	Jet mill	13 ± 1 mg/m ³ 33 ± 4 mg/m ³	MMAD 800 nm GSD 1.4 (MOUDI)	Baisch BL et al., 2014
14 to 90 nm	Brush dust generator	0.6 ± 0.1 mg/m ³ 2.0 ± 0.1 mg/m ³ 10.7 ± 1.2 mg/m ³	MMAD 0.4-0.8 μm GSD 3.0-4.4 (Cascade Impactor)	Landsiedel R et al. 2014
-	Nebulizer & heater 0.4w/w% suspension	11.39 ± 0.31 mg/m ³	GMD 79.19nm GSD 4.41 (SMPS)	Kwon S et al., 2012
10 x 40 nm	Rotating brush generator	6.9 × 10 ⁴ count/cm ³ 4.8 × 10 ⁴ count/cm ³ 3.1 × 10 ⁴ count/cm ³	GMD 87-707nm GSD 1.4-1.7 (SMPS)	Rossi EM et al., 2010
< 5μm	Rotating brush generator	2,100 count/cm ³ 5,000 count/cm ³ 3,000 count/cm ³ 8,000 count/cm ³	GMD 32-715nm GSD 1.3-1.7 (SMPS)	
< 1μm	Modified-rotating brush dust-feeder	9.5 ± 1.2 mg/m ³ 47.0 ± 4.6 mg/m ³ 240 ± 20.0 mg/m ³	MMAD 1.39 μm GSD 1.72 (MOUDI)	Bermudez E et al., 2002

MMAD: Mass Median Aerodynamic Diameter

MOUDI: Micro-Orifice Uniform Deposition Impactors

GMD: Geometric Mean Diameter

SMPS: Scanning mobility particle sizer

GSD: Geometric Standard Deviation

カートリッジ直噴方式ダスト発生装置 測定方法

<質量濃度測定> 1立方メートル中の粒子の質量 (mg/m³) 暴露終了後にデータが得られる

- 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)

<相対濃度測定> 1分間当たりの粒子の個数 (CPM ; Count per minute) 暴露実験中リアルタイムでデータが得られる 濃度コントロールの情報として使用

- 凝縮粒子カウンター (CPC、CPC3776、TSI)
粒径範囲 2.5 nm ~ 3μm、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 > 0.3μm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

<暴露チャンパー内の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)

ナノマテリアルの免疫制御システムへの影響評価研究

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部
石丸直澄、山田耕一、新垣理恵子

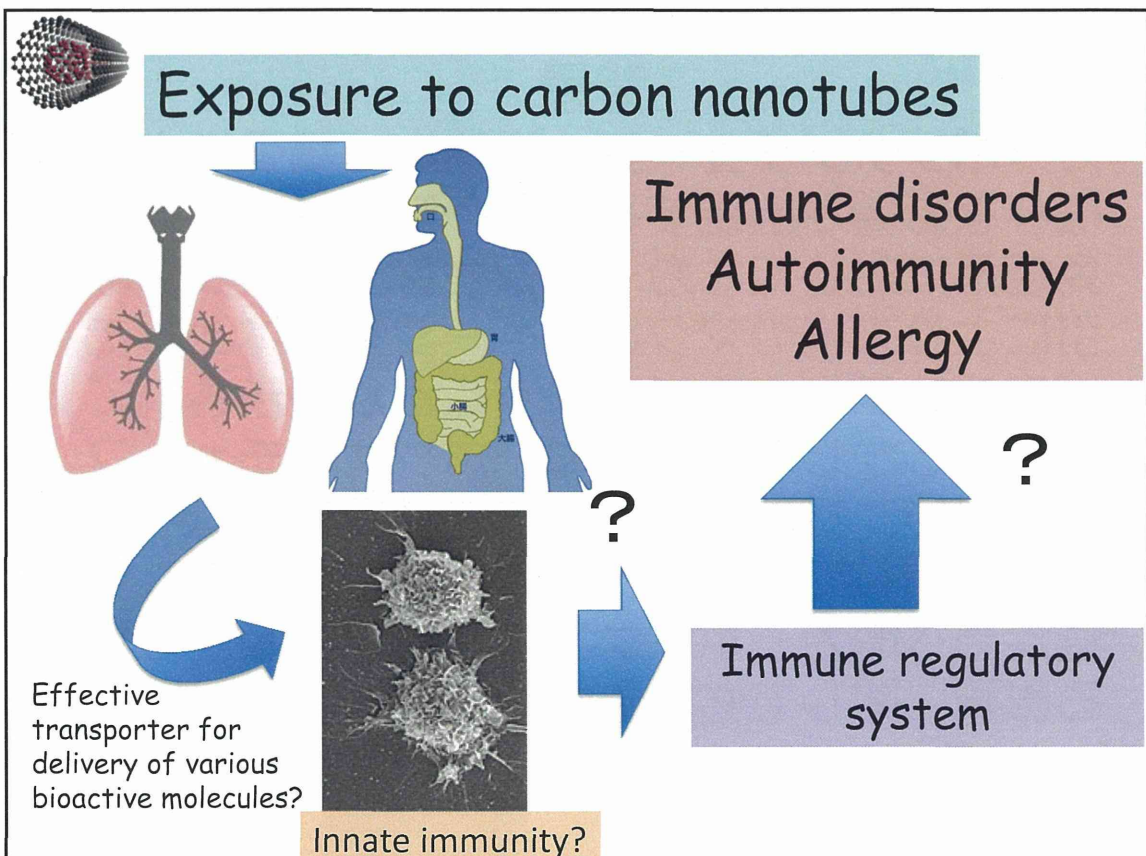
国立医薬品食品衛生研究所毒性部
高橋祐次、高木篤也、菅野純

背景

カーボンナノチューブの生体への暴露により様々な影響が出現することが知られている。免疫系に対してもカーボンナノチューブの吸引により末梢のマクロファージを主体とした網内システムの異常を来すことが報告されている。しかしながら、カーボンナノチューブの吸引後、長期間にわたる免疫システムへの影響に関しては知られていない。さらに、免疫疾患へのカーボンナノチューブの吸引による影響についても報告がない。

目的

カーボンナノチューブの全身吸入後の免疫システムへの長期間の影響を検討するために、正常マウスにカーボンナノチューブを吸入後の各種免疫担当細胞の分画の変化を経時的に観察するとともに、吸入後長期間での免疫システムへの影響を多角的なアプローチにより解析する。さらに、自己免疫疾患モデルを用いて、カーボンナノチューブの吸入暴露による自己免疫病態への影響についても検討を加える。ナノマテリアルの免疫制御システムへの影響について動物モデルを用いて詳細に検討する予定である。



Experiment 1

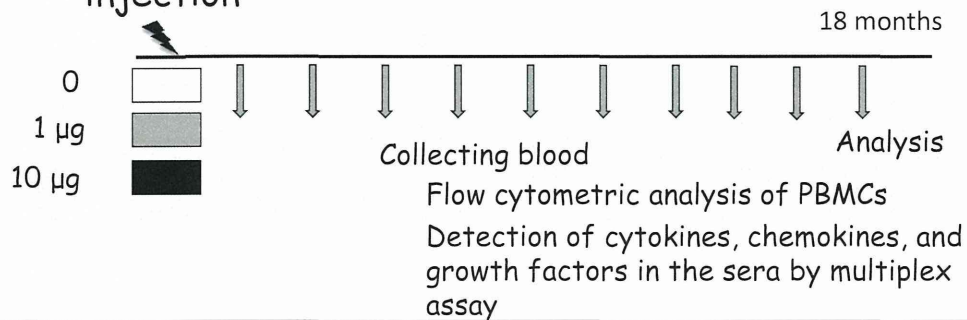
Mice : ♀ C57BL/6 (8 weeks of age)

Group (n=5): 0 $\mu\text{g}/\text{mouse}$, 1 $\mu\text{g}/\text{mouse}$, 10 $\mu\text{g}/\text{mouse}$

MWCNT: Taquann-treated MWCNT (MCNT-7, Mitsui)
was provided from Dr. Taquahashi and Dr. Kanno.

Vehicle: 0.1% Tween80/saline

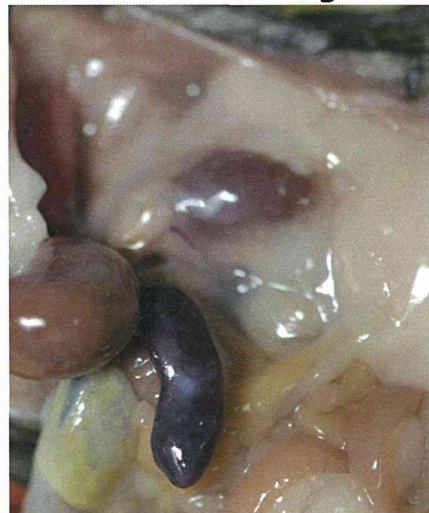
Intraperitoneal
injection



MWCNT 10 μg



MWCNT 10 μg



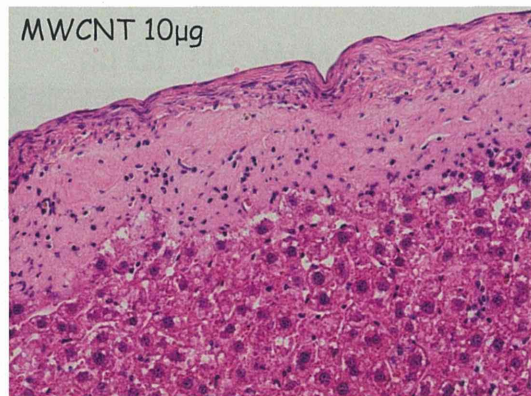
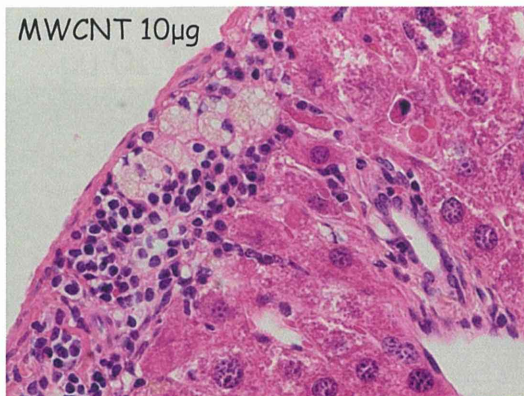
18 months after injection

MWCNT 10 μ g

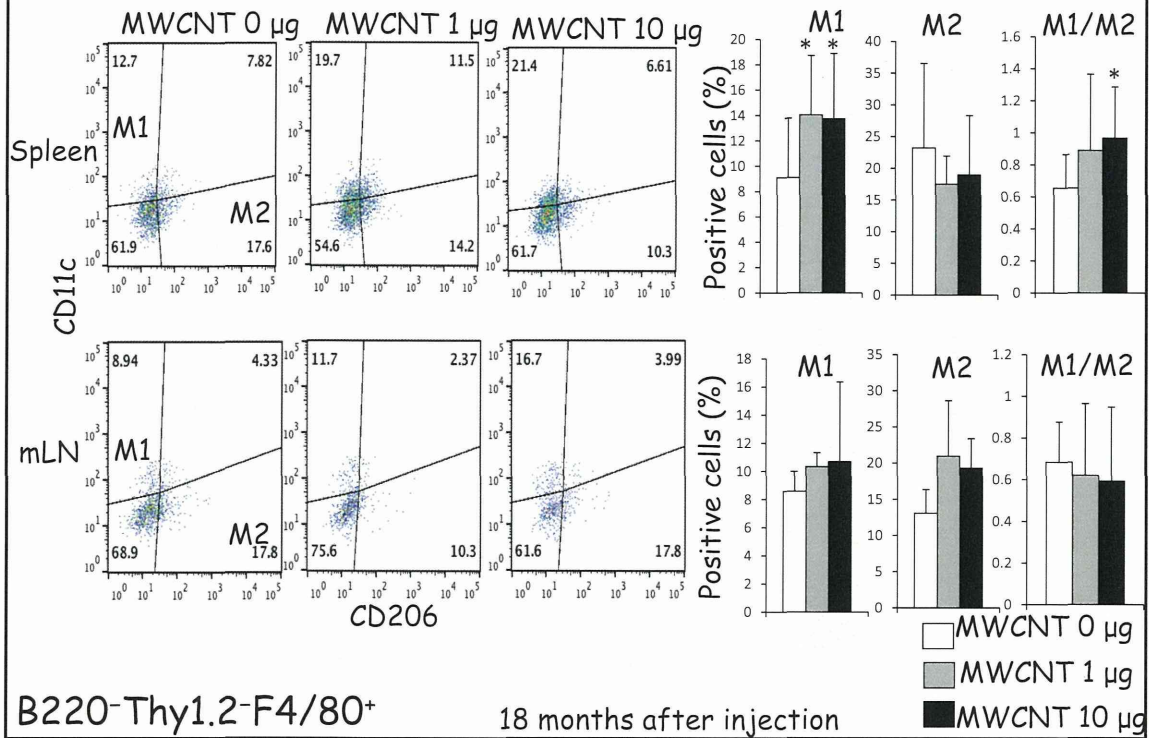


18 months after injection

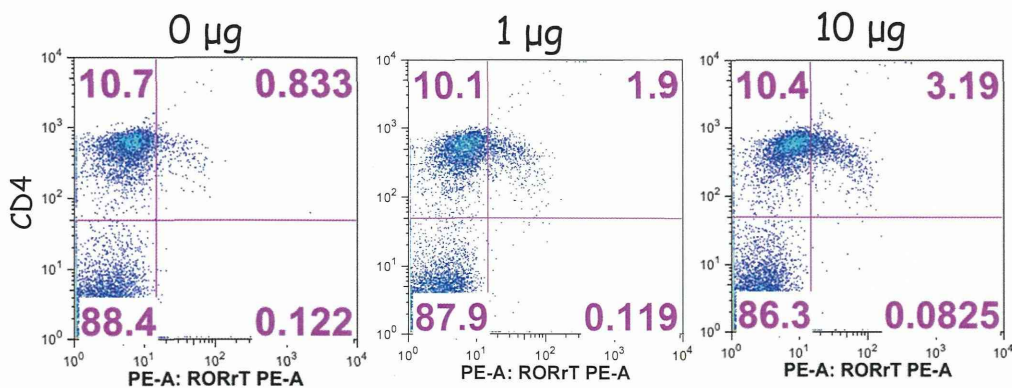
Liver lesions in MWCNT-injected B6 mice



Effect of MWCNT Administration on M1 and M2 Macrophage



Effect of MWCNT Exposure on the Differentiation of Th17 Cell



RAR-related orphan receptor γ t: ROR γ t ; A key transcription factor for Th17 cell

6 months after injection