

图 2

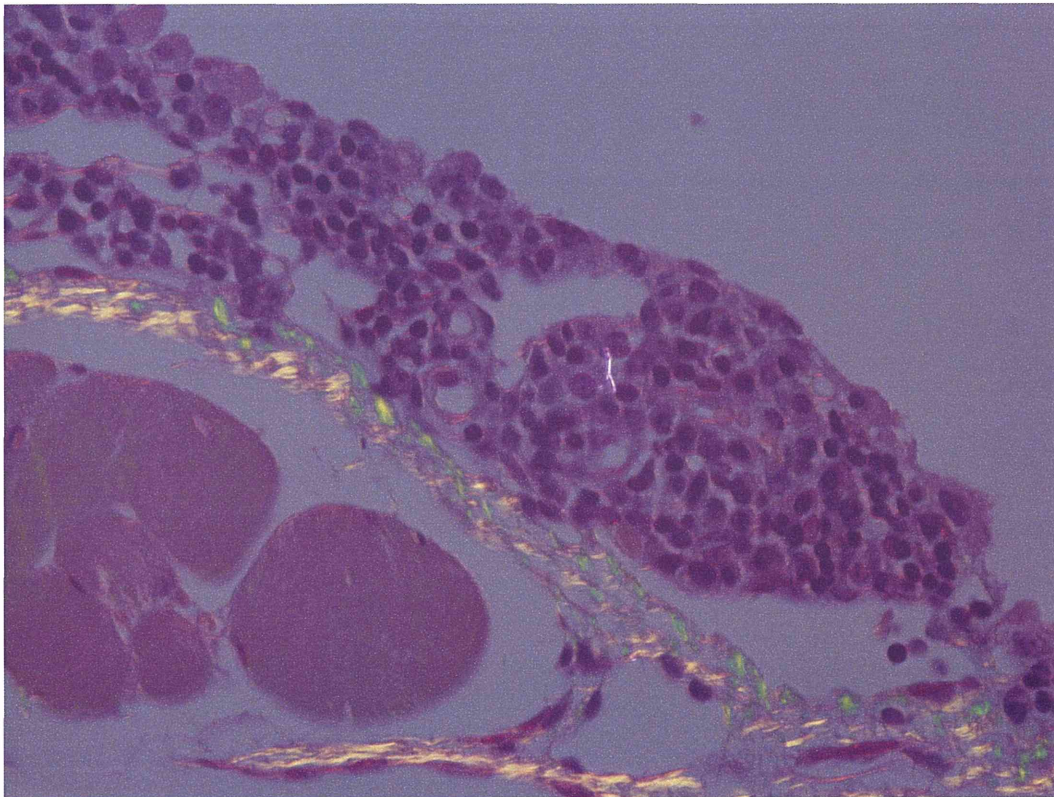


图 3



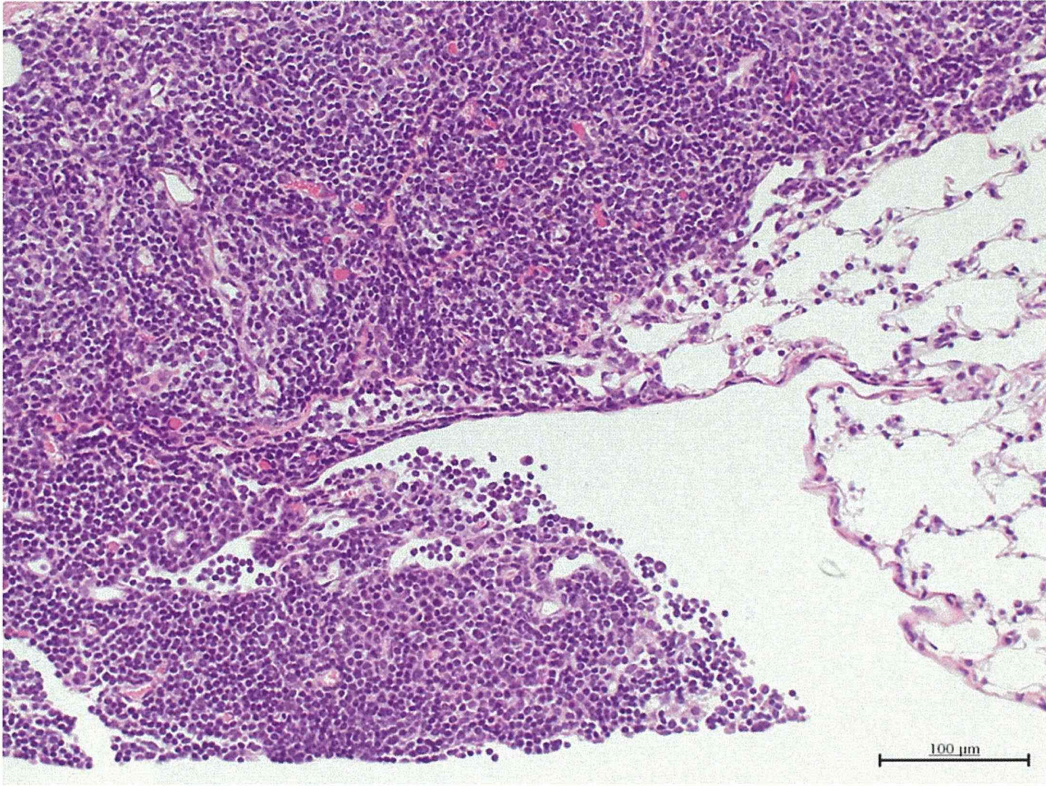


图 4

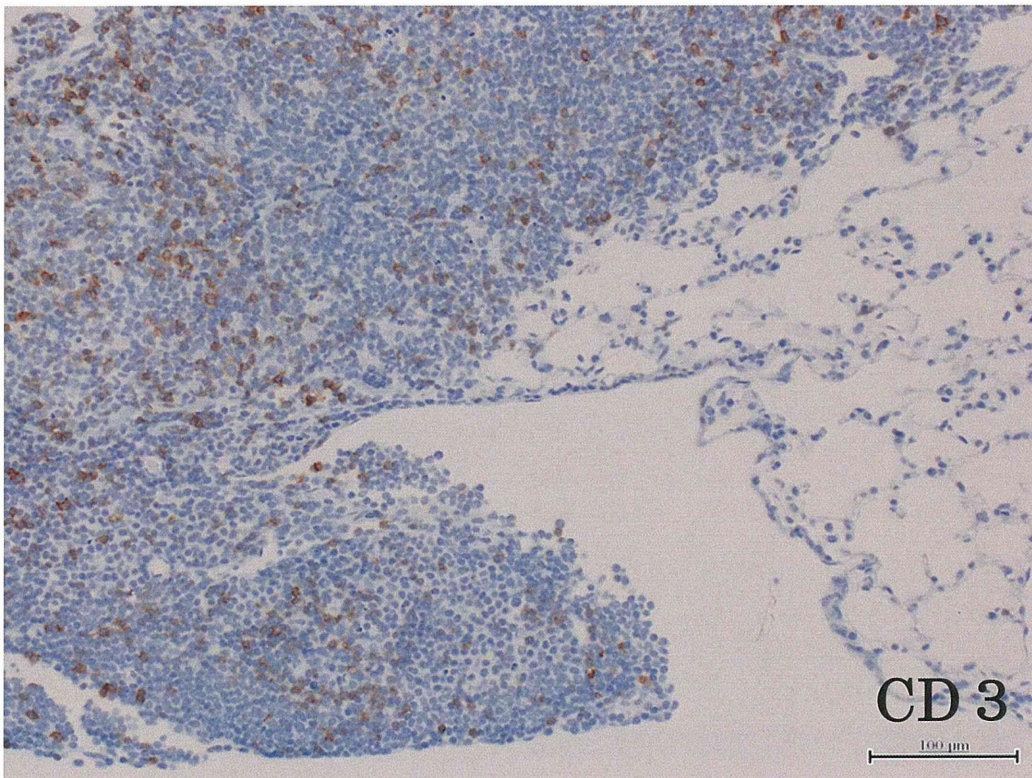


图 5



図 6

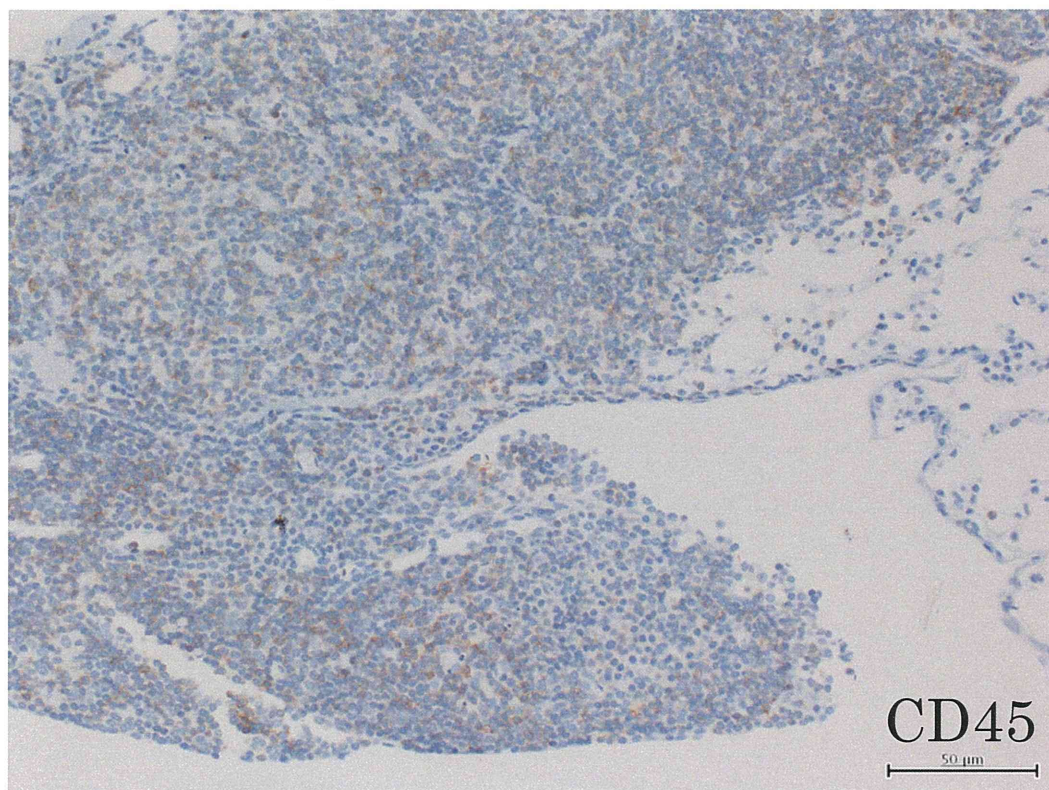
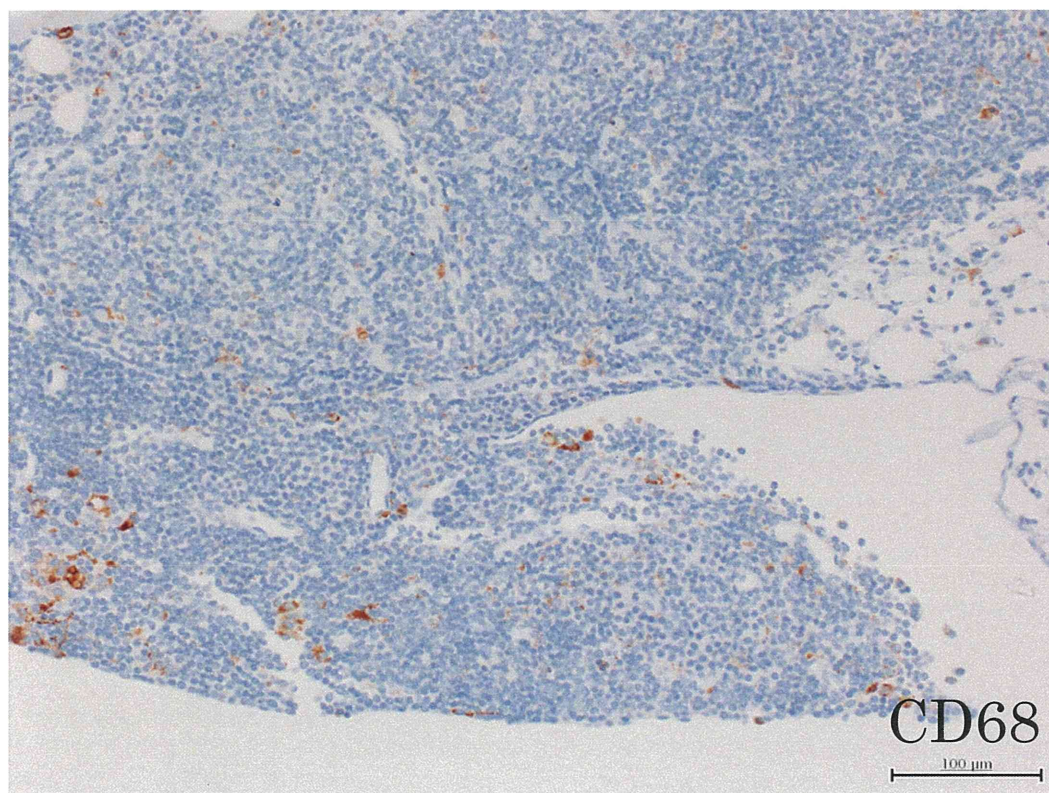


図 7





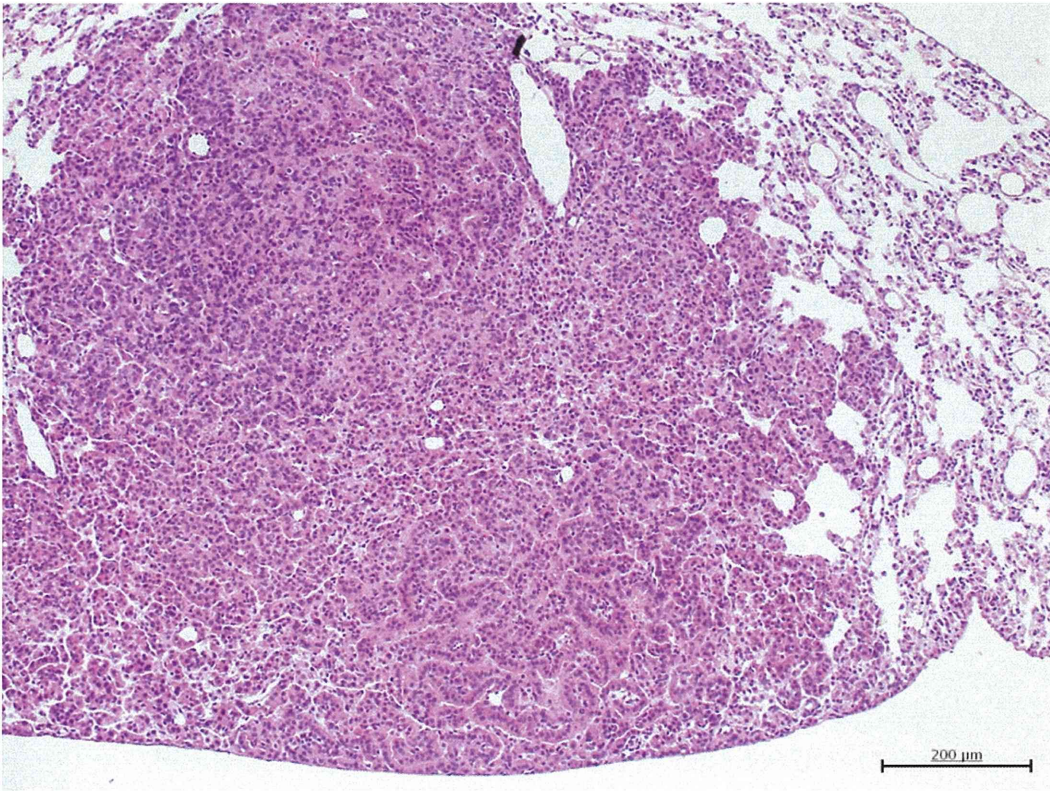


图 8

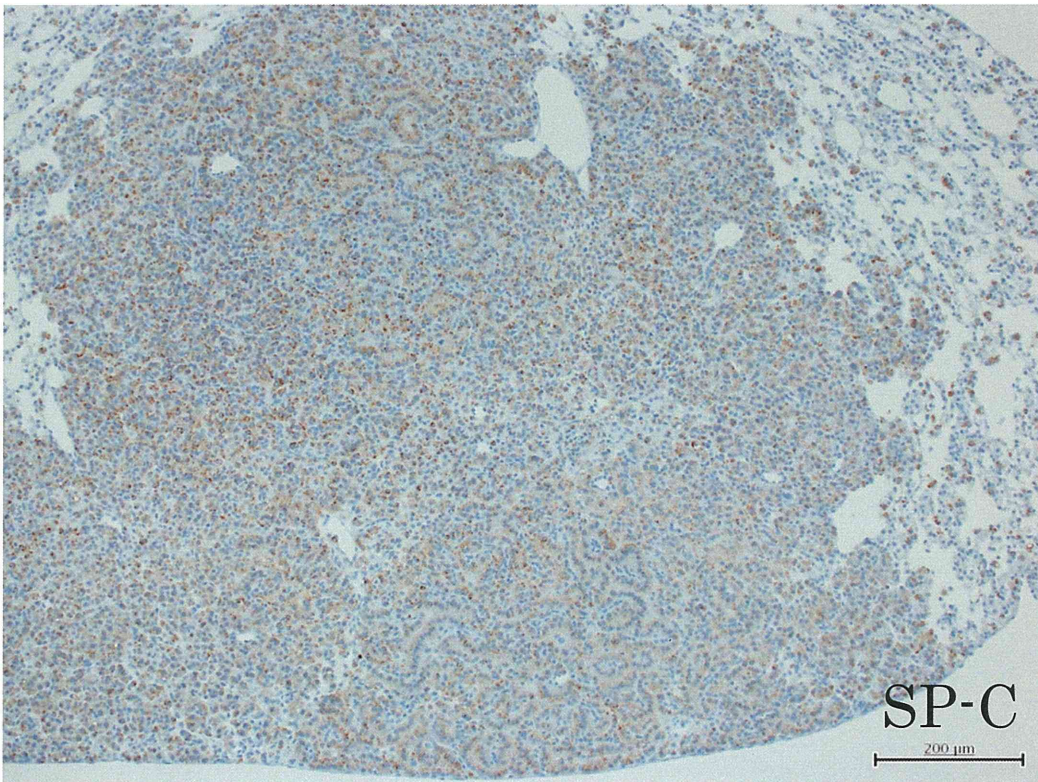


图 9



图 10

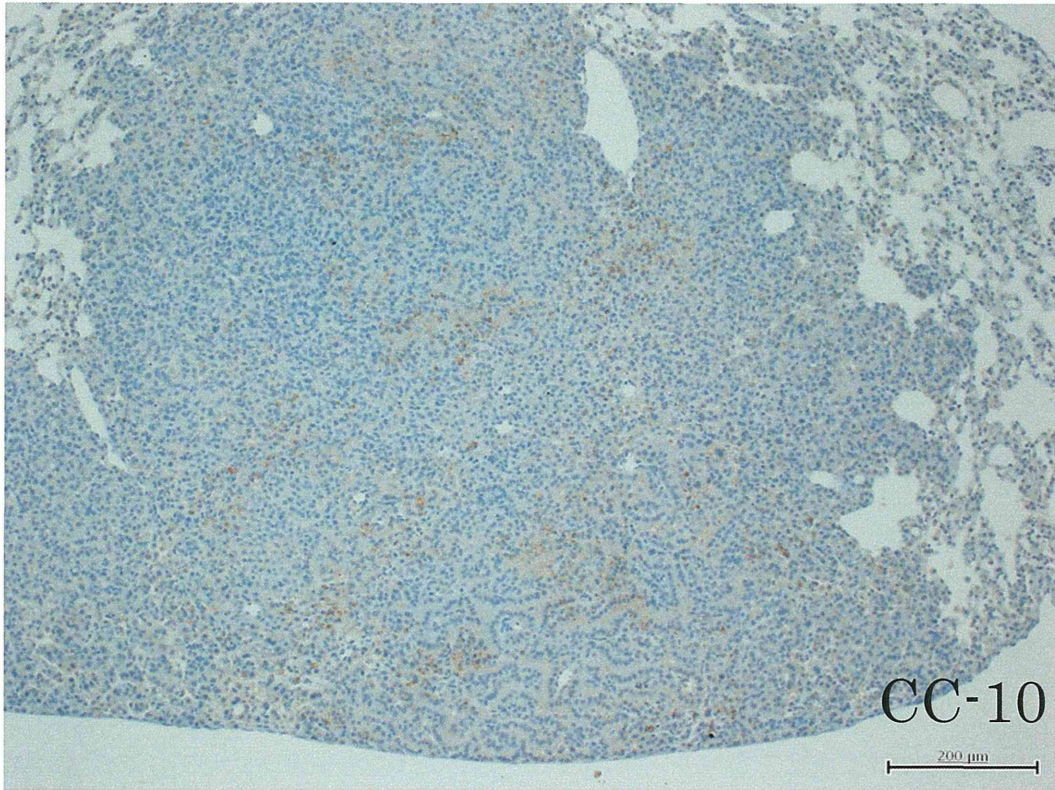
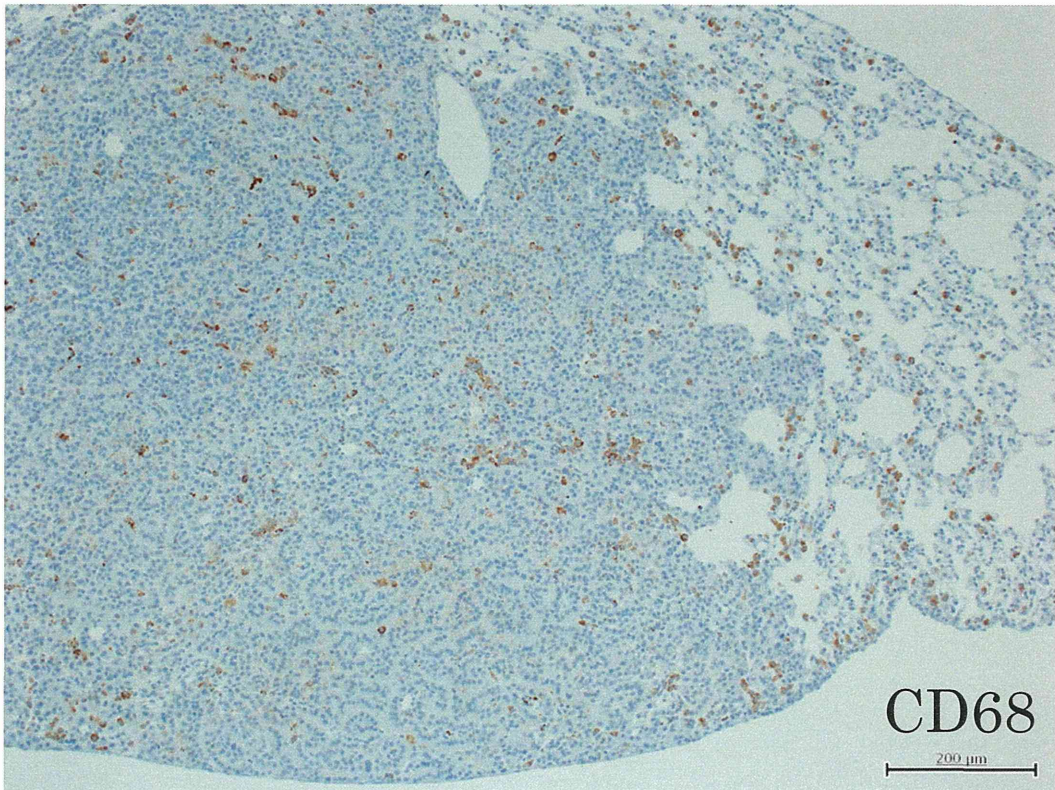


图 11



平成27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総合研究  
・ 全身暴露吸入による毒性評価研究 -  
分担研究報告

分担研究課題

「ナノマテリアルの吸入暴露実験及び組織負荷量の研究」

|       |      |                                     |
|-------|------|-------------------------------------|
| 研究分担者 | 高橋祐次 | 国立医薬品食品衛生研究所<br>安全性生物試験研究センター 毒性部室長 |
| 研究協力者 | 小川幸男 | 同 毒性部                               |
|       | 高木篤也 | 同 毒性部 室長                            |
|       | 菅野 純 | 同 毒性部 部長                            |

研究要旨

本研究の目的は、工業的に大量生産されるナノマテリアルの毒性評価を、人で想定される現実的な暴露経路である全身暴露吸入による毒性試験（以下、吸入試験）を実施し、吸入により惹起される病変の詳細分析により評価基準を策定することにある。

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。人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。多層カーボンナノチューブ（MWCNT）では、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。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する可能性がある。

本実験では、MWCNT の原末（U-CNT）と、Taquann 法により凝集体・凝固体を除去し高分散状態とした検体（T-CNT）をマウスに全身暴露吸入し、肺に沈着した繊維の量と長さを経時的に測定し比較した。質量濃度が約  $2\text{mg}/\text{m}^3$  の同等の条件で暴露を行ったが MWCNT の肺負荷量の平均値は、T-CNT 群では Day0、Day7 及び 13W においてそれぞれ、 $8.2\ \mu\text{g}/\text{動物}$ 、 $4.4\ \mu\text{g}/\text{動物}$ 、 $1.4\ \mu\text{g}/\text{動物}$ であるのに対し、U-CNT 群では  $4.3\ \mu\text{g}/\text{動物}$ 、 $1.6\ \mu\text{g}/\text{動物}$ 、 $1.2\ \mu\text{g}/\text{動物}$ と、肺に到達する量が U-CNT 吸入では半減していた。これに呼応し、鼻腔粘膜に実体顕微鏡で観察可能な黒色の凝集体・凝固体の沈着が U-CNT 吸入マウスに多く観察された。肺内の繊維長の平均は U-CNT、T-CNT 共に約  $7\ \mu\text{m}$ 、最大約  $40\ \mu\text{m}$  で差はなかった。肺負荷量が半減した原因の一つとして、U-CNT では鼻腔内に多く補足された可能性が考えられる。今後、鼻腔内に捕捉された MWCNT の定量的な解析及び形状の観察を行い、その原因を明らかにする。また、肺負荷量、吸入された MWCNT の形状が異なると肺の病変が異なる可能性が考えられることから、病理組織学的な変化について、詳細に評価

する計画である。

本研究では、吸入暴露試験においても、検体の分散状態、凝集体・凝固体の有無が、少なくとも肺負荷量に影響を与えることを示した。ヒトに比較して細い気道径を有するマウスを用いた動物実験では、凝集体・凝固体によるこの様な影響が大きいことが推察されるため、実験動物を使用して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。

#### A. 研究目的

本研究の目的は、工業的に大量生産されるナノマテリアルの毒性評価を、人で想定される現実的な暴露経路である全身暴露吸入による毒性試験（以下、吸入試験）を実施すること、及び、吸入により惹起される病変の詳細分析により評価基準を策定することにある。

従来、粉体の吸入試験の実施は大規模施設に限られていることから、多種に及ぶナノマテリアルの評価に気管内投与等の簡便法が多く用いられてきた。しかし、人が吸入すると想定されるナノマテリアルの分散状態と異なること、そのために惹起される肺病変の質が異なるとの指摘があった。

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。人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。多層カーボンナノチューブ（MWCNT）では、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。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する

可能性がある。ヒトに比較して細い気道径を有するマウスを用いた動物実験では、凝集体によるこの様な影響が大きいことが推察されるため、実験動物を使用して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）。

そこで、当研究部では先行研究[H23-化学-一般-005]においてMWCNTを事例対象として、凝集体・凝固体を除去し単繊維成分のみを高度に分散した乾燥検体を得る方法（Taquann法）及び、それをエアロゾル化するカートリッジ直噴式ダスト発生装置を用いたTaquann直噴全身吸入暴露システムを独自開発した。このシステムで吸入暴露したマウスの肺に凝集体・凝固体は観察されず、単繊維が肺胞内に到達して細気管支から肺胞レベルの瀰漫性病変を誘発すること、一部は胸腔に達し、壁側胸膜面に中皮腫発癌を示唆する顕微鏡的病変を誘発することを確認した。本システムは原理的に他のナノマテリアルに適応可能であり、かつ、少ない検体量で吸入試験の実施が可能である。

本年度は、吸入暴露における凝集



体・凝固体の影響を調べるため、凝集体・凝固体を除去し高分散状態とした Taquann 法処理検体 (T-CNT) と、MWCNT の原末 (U-CNT) をマウスに全身暴露吸入し、経時的な肺負荷量の推移と長さを比較した。

## B. 研究方法

### B-1. 検体の高分散化処理 (Taquann法)

凝集体・凝固体を含まない高度に分散した検体を得るため、先行研究で開発した Taquann法処理<sup>1)</sup>を行った。

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」の概念を、液相での分散と濾過に組み合わせた技術であり、濾液の乾燥時に表面張力を受けないため、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、検体を三級ブタノール (TB、融点; 25.69 °C、関東化学株式会社 特級) 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、金属製フィルターで濾過し大型の凝集体を除くとともに、分散を図り、濾液を直ちに液体窒素で凍結・固化させる。固相状態の濾液を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、TBを分離除去することで、分散性の高い乾燥状態の検体を得られる (図2)。

MWCNT は三井物産の MWNT-7 を使用した。以下の各測定値は先に共同研究を行った東京都健康安全研究センターによる測定値である<sup>2,3)</sup>。

繊維径 70-170 nm (平均 100 nm)  
長さ 1-19  $\mu\text{m}$  (> 5  $\mu\text{m}$  27.5%)  
繊維数  $3.55 \times 10^{11}$  本/g

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

硫黄: 470 ppm

塩素: 20 ppm

フッ素: <5 ppm

臭素: <40 ppm

MWCNT原末をガラス製ビーカーでTBに混合した。氷冷化でTBをシャーベット状にして金属製スパーテルで十分に混合した後、凍結融解による分散促進を一回行った。超音波洗浄器 (SU-3TH、出力 40W、発信周波数 34kHz、柴田科学株式会社) に15分静置して分散させ、金属製フィルター (セイシン企業、目開き 25  $\mu\text{m}$ ) で濾過し大型の凝集体を除くとともに、分散を図り、濾液を直ちに液体窒素で凍結・固化させ、溶媒回収型真空ポンプ (Vacuubrand、MD4C NT+AK+EK) により減圧してTBを昇華させて除去しMWCNTの乾燥検体を得た。

### B-2. マウスの全身暴露吸入実験

#### (1) 動物

C57BL/6NcrSLC (日本エスエルシー株式会社) 雄性マウス12週齢を使用した。このマウスは当研究部において、MWCNTの腹腔内投与試験に使用した実績がある。個体識別は耳パンチにより行った。

#### (2) 飼育条件

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。

### （3）群構成

対照群、Taquann法処理MWCNT群（T-CNT）、MWCNTの原末群（U-CNT）の3群構成とした。暴露量の目標濃度は $2\text{ mg/m}^3$ とした。各群16匹のマウスを使用し、1日2時間（10：00～12：00）の吸入暴露を5日間反復し、合計10時間の暴露を行った（表1）。

### （4）カートリッジ直噴式ダスト発生装置（Taquann直噴全身吸入装置）

全身暴露吸入は、先行研究で開発したTaquann直噴全身吸入装置装置Ver2.0を使用した（共同開発 柴田科学株式会社）<sup>1)</sup>（図3）。

この装置は、検体を充填する金属製カートリッジ、圧縮空気をカートリッジに噴射する噴射装置、及び、噴射した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。カートリッジ（容量：23.5 mL、内寸：直径22 mm 高さ65 mm）はステンレス製で、円筒状胴体、4つの噴出孔を有するキャップ部及び台座部から構成される。台座の中心には圧縮空気を注入するオリフィスと内容の流出を防ぐチェックバル

ブが装着されている。

カートリッジへの検体の充填は、Taquann分散処理を施した検体を所定の濃度（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、デシケーターに格納して溶媒回収型ポンプでTBを昇華除去することで達成した。MWCNTの原末暴露に際しては、原末をTBに懸濁後、濾過工程を行わずにカートリッジに充填した。何れも0.5 mg/カートリッジを充填した。

噴射装置は、サブチャンバー（容量：32 L）に接続されている。噴射に伴う圧力上昇を減じるため、サブチャンバーから上方に煙突状のダクトを設け、その上部にはポリエチレン製の袋で覆ったULPAフィルターを接続した。“煙突”上部から加湿したキャリアエアを一定の流量で送り込み、噴射された検体は煙突内に逆流した検体を含め、サブチャンバー内で効果的に分散された後、希釈されつつ接続パイプを通して暴露チャンバーに導く構造とした。

噴射装置からカートリッジへの圧縮空気の供給圧力は0.4 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13 L/min（基礎換気流量；10 L/min、相対濃度測定；1.5 L/min、質量濃度測定；1.5 L/min）と設定した。

目標濃度に速やかに到達させるため、暴露開始時に2本を1分間隔で噴射した。その後は濃度を監視しつつ約6分間隔で噴射し、設定濃度を維持した。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した。

#### (5) 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。(柴田科学株式会社との共同開発)。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ター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)。

#### (6) 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、相対濃度(CPM; count per minutes)と質量濃度(mg/m<sup>3</sup>)測定を並行して行った。

相対濃度測定は、対応濃度 $3 \times 10^5$ 個/mL、2.5 nmの粒径が測定可能な凝縮粒子計数装置(Condensation Particle Counter; CPC、CPC3776、サンプリング流量: 1.5 L/min、TSI、東京ダイレック株式会社)を用いた。この情報はリアルタイムに得られることからエアロゾルの濃度コントロールに使用した。CPCの前段には希釈装置(Dilution controller、柴田科学)を接続し、サン

プルを3倍希釈して測定した。

質量濃度測定は、ローボリウムサンプラー(080050-155、φ55 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、φ55mm、捕集効率(DOP 0.3 μm): 96.4%、東京ダイレック株式会社)を装着し、サンプリングポンプ(Asbestos sampling pump AIP-105、柴田科学株式会社)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。ろ過捕集後のフィルターの重量から予め秤量したフィルターの重量を差し引いた値を検体の重量とし、吸引空気量 $1.5 \text{ L/min} \times 120 \text{ min} = 180 \text{ L}$ から1 m<sup>3</sup>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。

暴露チャンバー内の温度、湿度を暴露時間の2時間を通してモニタリングした。

### B-3.解剖

解剖は、5日間連続暴露終了直後(Day 0)、7日後(Day 7)及び13週後(13W)に実施した。

マウスは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)と、鎮痛剤として酒石酸ブトルファノール(ベトルファール®; Meji Seika ファルマ株式会社)を腹腔内投与し、麻酔下で腋窩動脈より放血致死後に解剖した。被毛に付着したMWCNTによる汚染を防止するため、全身の皮膚を全て除去した後に解剖し



た。

MWCNTの負荷量測定に供する肺は、生理食塩水（大塚生食注、大塚製薬工場）で十分に洗浄し、気管を除去して湿重量を測定後、ガラス製バイアルで $-80^{\circ}\text{C}$ に管理された冷凍庫で保管した。

病理組織標本に供する肺は、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、点滴回路を用いた灌流装置により灌流固定した。具体的には、開胸前に気管を喉頭軟骨部で結紮して肺の虚脱を防止し、腹大動脈及び腹大静脈を切断して解放後、右心室に翼状針（21G、SV-21CLK-2、テルモ株式会社）を刺入して生理食塩水（大塚生食注、大塚製薬工場）を約40cm水柱の静水圧（流量は点滴調節器により適宜調節）により注入し血液を除去した。回路を切り替えて4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液（和光純薬工業、組織固定用、用時調製）を同静水圧にて約3分灌流して固定した後、同組成固定液に全肺を浸漬した。

鼻腔内に沈着したMWCNTを観察するため頭部は開頭して脳を取り出した後、10%中性緩衝ホルマリン液に浸漬して保存した。

#### B-4. 肺内のMWCNT負荷量測定

肺に沈着したMWCNTは、肺を溶解して回収し、負荷量と長さを測定した。

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）に、0.1w/v% SDS（和光純薬工業株式会社、試薬特級）0.1 w/v% EDTA・2Na（同仁化学研究所、試験研究用）、

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）を加えた組成である。各試薬は MilliQ 水に混合後、 $80^{\circ}\text{C}$ で加熱して完全に溶解した。EDTA・2Na は生体由来の金属イオン除去、アスコルビン酸ナトリウムは水酸化鉄（II）が酸化により不溶性の水酸化鉄（III）に変化してすることを防止する目的で添加した。

肺サンプル（気管及び左右主気管支を除く全肺約200 mg）をマイクロチューブ（Protein LoBind、2 mL、エッペンドルフ）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、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 $80^{\circ}\text{C}$ 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 $25^{\circ}\text{C}$ 、 $20,000\times\text{g}$ 、60分の条件で遠心分離を行い、沈渣を回収した。沈渣に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て再び  $20,000\times\text{g}$ 、 $25^{\circ}\text{C}$ 、60分の条件で遠心分離して沈渣を回収した。マイクロチューブをインキュベーター内で $50^{\circ}\text{C}$ の条件で加熱しエタノールを除去後、0.1w/v% TritonX（ICN）100  $\mu\text{L}$ 又は50 $\mu\text{L}$ に沈渣を分散しMWCNT懸濁液とした（図4）。

アルミナフィルター（Anodisc、孔径0.02  $\mu\text{m}$ 、 $\phi 12\text{mm}$ 、ワットマン）をロート型ガラス濾過器（51G-1、三商）に載せ、ピペッティングにより十



分に分散させたMWCNT懸濁液1 μLをアルミナフィルター上に滴下し吸引濾過した。フィルターを室温で乾燥し、真鍮製SEM観察台（S-GA、φ15×5 mm、日新EM）にカーボンシール（φ12 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秒間処理を行い走査型顕微鏡（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をImageJ（<http://rsbweb.nih.gov/ij/>）を用いて行った。

肺に含まれるMWCNT繊維の本数（ $C_t$ ）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（ $S_o$ ）を基に以下の式で計算した。

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

計測した1視野当たりの面積は、1,818 μm<sup>2</sup>（49.23×36.92 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（図5）。

#### B-5. 鼻腔内のMWCNT沈着状況の観察

ホルマリン固定した頭部を水平方向に切断し、デジタルマイクロスコープ（VHX, Keyence）を用いて 50倍または100倍で観察し、鼻粘膜に沈着したMWCNTを観察した。

#### 【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。

### **C. 研究結果**

#### C-1. 検体の高分散化処理（Taquann法）

##### (1) MWCNT

MWCNT は先行研究と同様に良好な分散検体を得られた。注意点として、良好な分散状態エアロゾルを得るために、吸湿していない TB を用いる必要がある。TB は吸湿性が高く、開封後長時間経った TB を用いた場合に良好な分散状態のエアロゾルが得られなかった。同様の理由で、カートリッジに充填した検体懸濁液を液体窒素で凍結後にデシケーターに格納する際には、カートリッジに霜が付着することを防止するため、予めデシケーター内の空気を窒素で置換してから移動を行った。

#### C-2. マウスの全身暴露吸入実験

##### (1) MWCNT

5 回の吸入暴露の平均質量濃度は、T-CNT 群  $2.3 \pm 0.2 \text{ mg/m}^3$ 、U-CNT 群  $2.2 \pm 0.6 \text{ mg/m}^3$  であった。CPC の平均値は T-CNT 群  $2,519 \pm 499 \text{ 個/mL}$ 、U-CNT 群  $2,198 \pm 517 \text{ 個/mL}$  であった。平均質量濃度はほぼ同じ値であったが、CPC のカウント数は分散性の高い T-CNT がやや高い値であった (図 6)。

### C-3. 肺内のMWCNT負荷量測定

先行研究により Taquann 処理した MWCNT は有効数字一桁の精度で  $3 \times 10^6$  本/ $\mu\text{g}$  の繊維数、平均長  $7 \mu\text{m}$  であることを明らかにしている。

MWCNT の肺負荷量の平均値は、T-CNT 群では Day0、Day7 及び 13W においてそれぞれ、 $8.2 \mu\text{g/動物}$ 、 $4.4 \mu\text{g/動物}$ 、 $1.4 \mu\text{g/動物}$ 、U-CNT 群では  $4.3 \mu\text{g/動物}$ 、 $1.6 \mu\text{g/動物}$ 、 $1.2 \mu\text{g/動物}$  であった (各群、各時点  $N=2$ )。Day0 における肺負荷量は、T-CNT が U-CNT の約 2 倍の値であった。13W の値を漸近線として減衰曲線を計算すると、T-CNT、U-CNT 共に半減期は約 7 日であった (図 7)。

繊維長の平均値は約  $7 \mu\text{m}$ 、最大値は共に約  $40 \mu\text{m}$  であり、T-CNT と U-CNT の間に差異は認められなかった。肺に沈着した繊維長の分布は暴露直後から 13 週後まで経時的変化はみられなかった。(図 8)。

### C-4. 鼻腔内MWCNT沈着状況の観察

鼻腔粘膜に実体顕微鏡で観察可能な黒色の凝集体・凝固体の沈着が U-CNT 吸入マウスに多く観察された。T-CNT では凝集体・凝固体は殆ど観察されなかった (図 9)。

## D. 考察及び結論

本実験では、MWCNT の原末 (U-CNT) と、Taquann 法により凝集体・凝固体を除去し高分散状態とした検体 (T-CNT) をマウスに全身暴露吸入し、肺に沈着した繊維の量と長さを比較した。

吸入暴露実験において、質量濃度が同等の条件で暴露を行ったが MWCNT の肺負荷量の平均値は、T-CNT 群では Day0、Day7 及び 13W においてそれぞれ、 $8.2 \mu\text{g/動物}$ 、 $4.4 \mu\text{g/動物}$ 、 $1.4 \mu\text{g/動物}$ 、U-CNT 群では  $4.3 \mu\text{g/動物}$ 、 $1.6 \mu\text{g/動物}$ 、 $1.2 \mu\text{g/動物}$  と、肺に到達する量が U-CNT 吸入では半減していた。これに呼応し、鼻腔粘膜に実体顕微鏡で観察可能な黒色の凝集体・凝固体の沈着が U-CNT 吸入マウスに多く観察された。肺内の繊維長の平均は U-CNT、T-CNT 共に約  $7 \mu\text{m}$ 、最大約  $40 \mu\text{m}$  で差はなかった。

以上より、吸入暴露実験においても検体の凝集体・凝固体及び分散性は肺沈着量に影響を与える事が示された。肺負荷量が半減した原因の一つとして、U-CNT では鼻腔内に多く補足された可能性が考えられる。今後、鼻腔内に捕捉された MWCNT の定量的な解析及び形状の観察を行い、その原因を明らかにする。また、肺負荷量、吸入された MWCNT の形状が異なると肺の病変が異なる可能性が考えられることから、病理組織学的な変化について、詳細に評価する計画である。

肺に沈着した繊維長の分布は吸入直後から 13 週後まで変化が見られなかったことから、肺からの除去に際して



MWCNT の長さによる選択が認められないという結果となった。胸腔内へ移行した MWCNT の長さの分布については、今後の検討が必要である。

本研究では、吸入暴露試験においても、検体の分散状態、凝集体・凝固体の有無が、少なくとも肺負荷量に影響を与えることを示した。ヒトに比較して細い気道径を有するマウスを用いた動物実験では、凝集体によるこのような影響が大きいことが推察されるため、ヒトへの外挿性の高い毒性評価を行うためには、留意すべき点であると考えられる。

謝辞：

本研究の遂行にあたり、技術的支援をしていただいた、辻昌貴氏、森田絃一氏、相原妃佐子氏に深く感謝する。

#### 【引用文献】

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.

#### E. 健康危機情報

なし

#### F. 研究発表

Jun Kanno, Important attributes of nanomaterials in predicting their long-term effects: In vivo studies, 7th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health (NanOEH 2015), (2015.10.21), South Africa, Symposium

Yuhji Taquahashi, Yukio Ogawa, Koichi Morita, Masaki Tsuji, Atsuya Takagi and Jun Kanno, Lung burden and length distributions of MWCNT following 5 times of 2 hours inhalation exposure to p53+/- mice and a 52 weeks post-exposure period, 7th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health (NanOEH 2015), (2015.10.21)South Africa, Oral

菅野 純、高橋祐次、高木篤也、小川幸男、広瀬明彦、石丸 直澄、今井田克己、Taquann 直噴全身暴露吸入法によるナノマテリアル有害性評価 (2015.6.29)、第 42 回日本毒性学会学術年会、金沢、シンポジウム

Hiroyuki Tsuda, Jiegou Xu, 2, David B. Alexander, William T. Alexander, Takamasa Numano, Masumi Suzui, Jun Kanno, Akihiko Hirose, Involvement of macrophage in inducing proliferative and neoplastic lesion development of the pleura of rats intrapulmonary treated with multi-walled carbon nanotubes, The 7th International Congress of Asian Society of Toxicology (ASIATOX 2015) (2015.6) Jeju, Korea, Oral

なし

Yuhji Taquahashi, Atsuya Takagi, Masaki Tsuji, Koichi Morita, Yukio Ogawa, Jun Kanno, Development of High Dispersion-Small Scale Whole Body Inhalation System for Nanomaterials (Taquann System): Application to Multi-wall Carbon Nanotube, The 7th International Congress of Asian Society of Toxicology (ASIATOX 2015) (2015.6) Jeju, Korea, Oral

## 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)

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



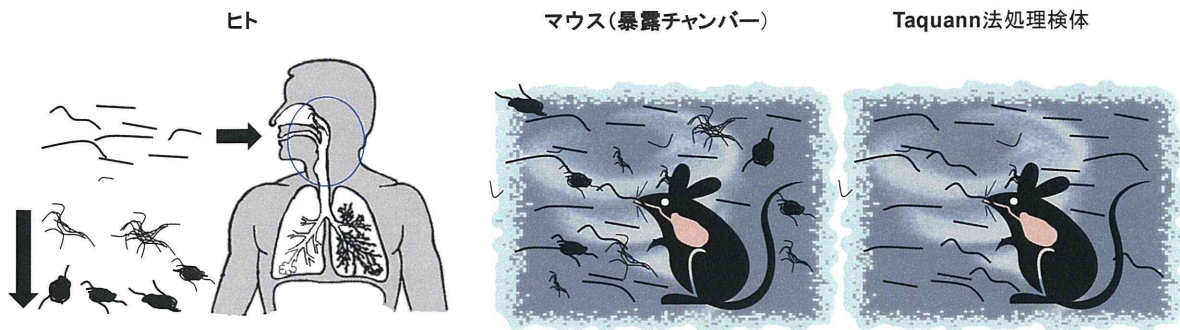


図1 ナノマテリアルのヒトとマウスの暴露状態の比較

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。ヒトの作業環境では、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。Taquann 法処理検体は凝集体・凝固体が除去されているため、実験動物においてもヒトと同様に単離繊維を肺胞レベルに到達させることが可能である。

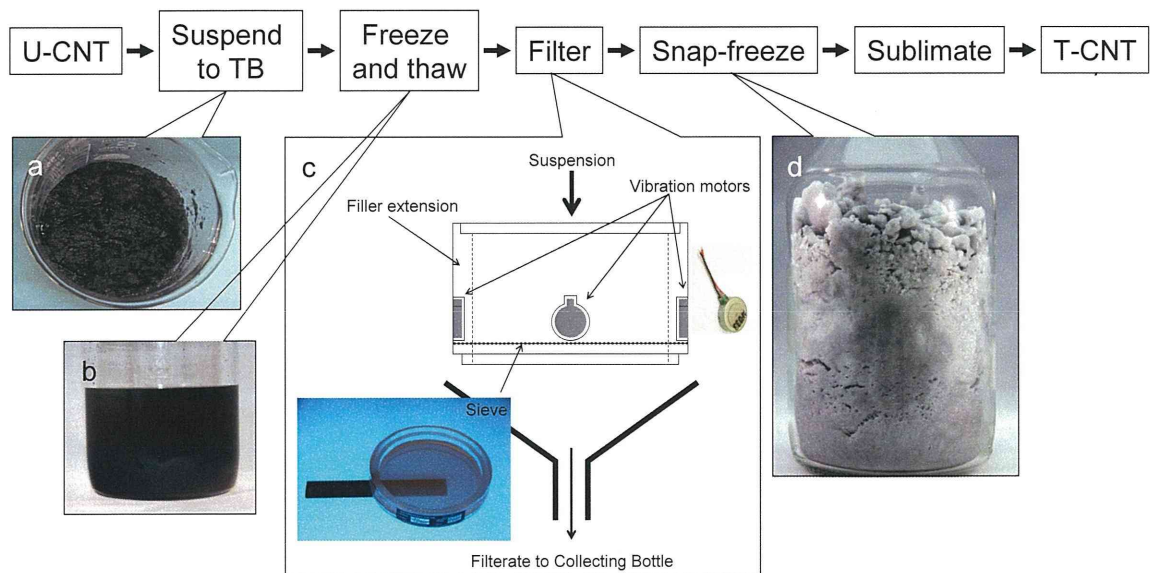


図2 Taquann 法の概要

(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)  $-25^{\circ}\text{C}$  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  $25\ \mu\text{m}$ ) で濾過し大型の凝集体を除く。濾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:  $17.6\ \text{m/s}^2$ ) をリムに4個装着し、フィルターを振動させる。(d) 濾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

表 1 MWCNT 暴露 群構成

| NANO-AW |                      |                |                |      |      |     |
|---------|----------------------|----------------|----------------|------|------|-----|
| Group   | Target Concentration | No. of animals |                | Day0 | Day7 | 13W |
| Control | 0                    | 10             | Histopathology | 3    | 3    | 4   |
|         |                      |                | Body Burden    |      |      |     |
| T-CNT   | 2                    | 16             | Histopathology | 3    | 3    | 4   |
|         |                      |                | Body Burden    | 2    | 2    | 2   |
| U-CNT   | 2                    | 16             | Histopathology | 3    | 3    | 4   |
|         |                      |                | Body Burden    | 2    | 2    | 2   |

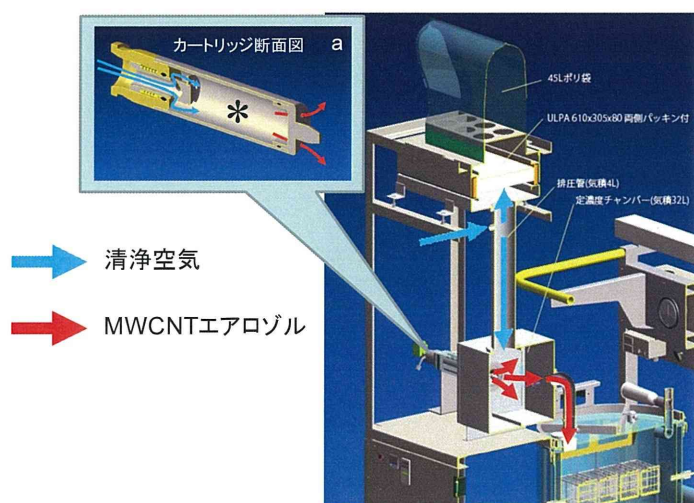


図 3 Taquann 直噴全身暴露吸入装置の模式図 (Ver 2.0)

噴射装置は、サブチャンバーに接続されている。噴射に伴う圧力上昇を減じるため、サブチャンバーに煙突を設け、その上部にはポリエチレン製の袋で覆った ULPA フィルターを接続した。煙突部分の上部から加湿したキャリアエアを一定の流量で送り込み、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、希釈されつつ接続パイプを通して暴露チャンバーに導く構造とした。



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

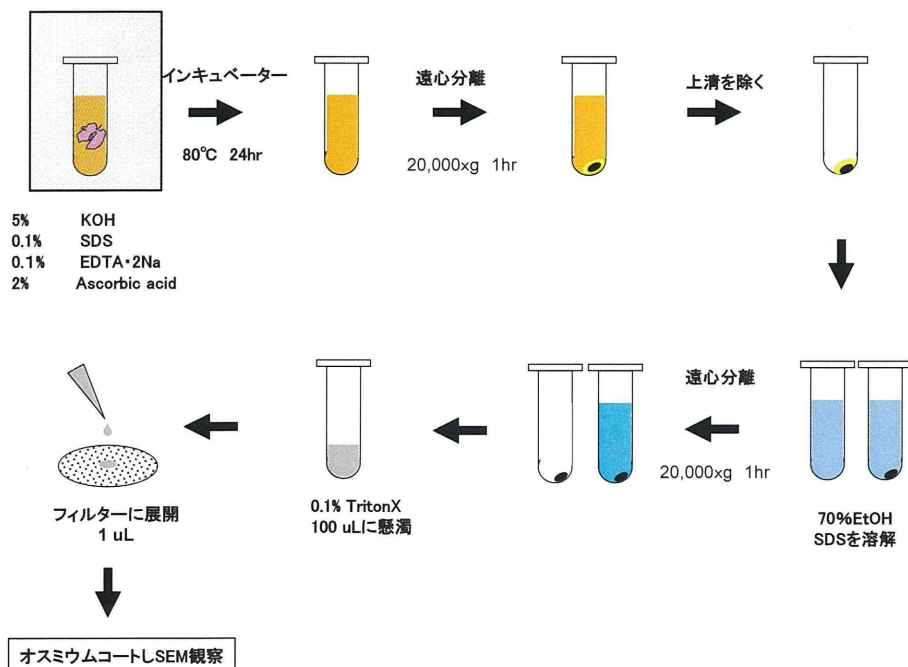


図 4 肺からの MWCNT 回収方法の概略図

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走査型顕微鏡で観察した。

- Osmium Metal Sputter Coating
- Observe More than 50 fields at 2,500x
- Measure length and count fibers
- Recover rate by spiking samples

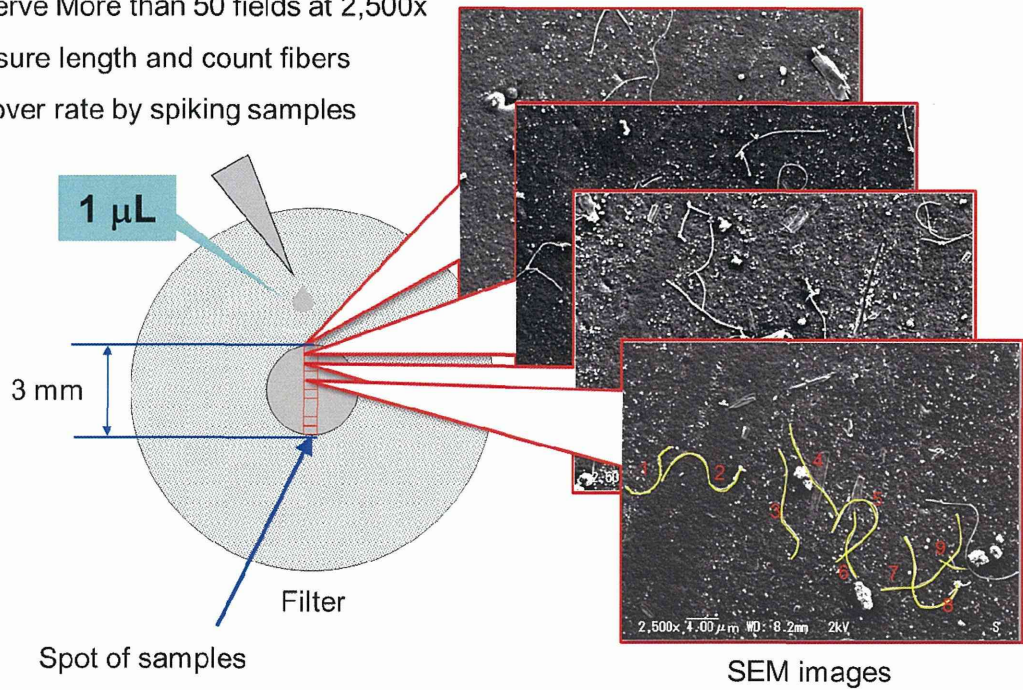


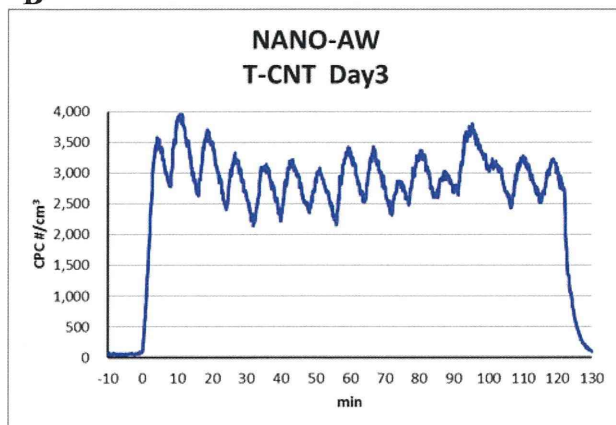
図5 肺から回収した MWCNT の測定方法

肺に含まれる MWCNT の繊維数及び繊維長は、MWCNT 懸濁液 1 μL をフィルターに展開し、走査型顕微鏡 (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を ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) を用いて行った。計測した 1 視野当たりの面積は、1,818 μm<sup>2</sup> (49.23×36.92 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

A

|       |   | 1st   | 2nd   | 3rd   | 4th   | 5th   | Average | SD  |
|-------|---|-------|-------|-------|-------|-------|---------|-----|
| T-CNT | Mass Concentration (mg/m <sup>3</sup> )   | 2.2   | 2.3   | 2.5   | 2.4   | 2.1   | 2.3     | 0.2 |
|       | CPC Average(0-120min. #/cm <sup>3</sup> ) | 1,816 | 2,588 | 2,930 | 3,021 | 2,240 | 2,519   | 499 |
|       | Max.                                      | 2,619 | 3,811 | 3,961 | 3,964 | 3,425 |         |     |
| U-CNT | Mass Concentration (mg/m <sup>3</sup> )   | 1.4   | 2.1   | 2.5   | 2.2   | 3.0   | 2.2     | 0.6 |
|       | CPC Average(0-120min. #/cm <sup>3</sup> ) | 1,400 | 2,016 | 2,432 | 2,388 | 2,754 | 2,198   | 517 |
|       | Max.                                      | 2,185 | 2,626 | 3,209 | 3,208 | 3,682 |         |     |

B



C

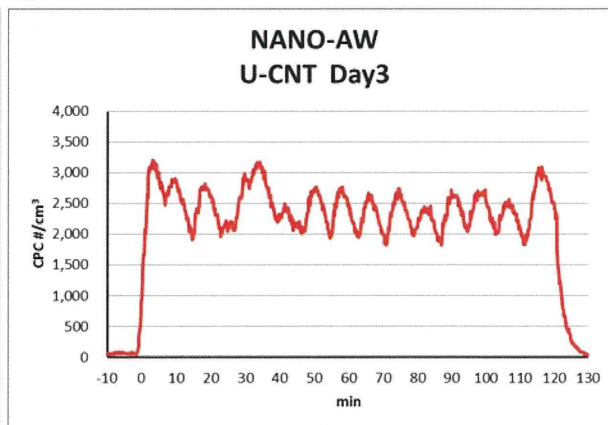


図 6 MWCNT 全身暴露吸入の質量濃度及び相対濃度 (CPC)

(A) 1日2時間、5日間の反復全身暴露吸入実験の質量濃度推移。(B) T-CNT 群の CPC データ。(C) U-CNT 群の CPC データ。5回の吸入暴露の平均質量濃度は、T-CNT 群  $2.3 \pm 0.2$  mg/m<sup>3</sup>、U-CNT 群  $2.2 \pm 0.6$  mg/m<sup>3</sup> であった。CPC の平均値は T-CNT 群  $2,519 \pm 499$  個/mL、U-CNT 群  $2,198 \pm 517$  個/mL であった。平均質量濃度はほぼ同じ値であったが、CPC のカウント数は分散性の高い T-CNT がやや高い値であった