

Ver2.5を使用した（共同開発 柴田科学株式会社）4）（図1）。

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。本研究では、0.05 mg/mLの濃度に再懸濁し、0.5 mg/カートリッジを用意した。

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回の噴射を行った。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、エアロゾルモニター用サンプリング（CPC）；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。

（2）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。（共同開発 柴田科学株式会社）。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、検体の変更に対応できるシステムとなっている（特許出願済）。

（3）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チタン酸カリウム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/m³）測定を並行して行った。

相対濃度測定は、対応濃度 3×10^5 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、MN、USA）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。

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）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。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^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。

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。

(4) 暴露チャンバー内のエアロゾル形状測定

暴露チャンバー内のエアロゾル化した粒子の形状を把握するため、

エアロゾルを酸化アルミニウム製の

フィルター（Anodisc 25、φ21 mm、孔径0.1 μm、ワットマン）に吸着させて採取し走査型電子顕微鏡で観察した。暴露チャンバー内の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（柴田科学特注品）を用いた。エアロゾルを吸着させたフィルターはオスミウムコーター（HPC-1SW、真空デバイス）で5秒間の処理を行って走査型電子顕微鏡（VE-9800、キーエンス）で観察して画像を取得し、繊維長、繊維径及び繊維数の計測をImageJ（<http://rsbweb.nih.gov/ij/>）を用いて行った。計測により得られた繊維長を繊維径で除しアスペクト比を算出した。

(5) 暴露チャンバー内のエアロゾルの空気力学的質量中央値測定

エアロゾル化したチタン酸カリウムの空気力学的質量中央値（Mass Median Aerodynamic Diameter；MMAD）を測定するため、MOUDI（Micro-Orifice Uniform-Deposit Impactor, Model125 NanoMOUDI, 日本KANOMAX）を使用して測定した。本装置の分級サイズは、10、5.6、3.2、1.8、1.0、0.56、0.32、0.18、0.10、0.056、0.032、0.018、0.01(μm)である。サンプリングは10 L/minの流量で暴露時間を通して行った。各分級ステージには専用のアルミ箔にシリコンオイルを塗布したものを装着し検体を回収した。アルミ箔は、シリコンオイル塗布後、測定に使用する前に50℃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た。捕集後のアルミ箔の重量から予め秤量したアルミ箔の重量を差し引いた値を検体の重量とし計算によりMMADを求めた。

(6) マウス単回全身暴露吸入実験

エアロゾル化の検討実験において、3匹のマウス（C57BL/6NCrSlc、雄、14週齢）を使用して2時間の全身暴露吸入を単回行い、肺に沈着したチタン酸カリウムを観察した。マウスは吸入暴露終了直後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、麻酔下で腋窩動脈より放血致死後に解剖した。肺は気道内のチタン酸カリウム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。固定後、常法によりパラフィン包埋を行い、約3 μm の厚さで薄切しヘマトキシリン・エオ

ジン染色標本を作製した。組織中のチタン酸カリウムの観察は、通常の光学顕微鏡観察、偏光顕微鏡及び、高分解能暗視野コンデンサを用いた散乱光によるナノ粒子の検出システム（High Resolution Adapter (HRA)、CytoViva[®]、CytoViva, Inc. AL, USA）を使用した。

B-4. 肺沈着量測定法の検討

当研究部では、マウスを用いたMWCNTの吸入暴露実験において肺に沈着したMWCNTの測定方法を確立している。本方法では、検体回収のための前処理として、暴露肺を水酸化カリウムを主体とした強アルカリ溶液中で24時間加熱して回収している。同様の方法で、凍結保存した無処置マウスの肺サンプルを用いてチタン酸カリウムの添加回収実験を行い、測定法としての妥当性を検討した。

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℃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。

マウス肺（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、SDSに懸濁した10 μg チタン酸カリウムを添加した。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°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×g、25°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°Cの条件で加熱しエタノールを除去後、0.1w/v% TritonX (ICN) 100 μL又は50μLに沈渣を分散しチタン酸カリウム懸濁液とした。

回収したチタン酸カリウムについて、B-1に記載した方法と同様に繊維長の計測を行った。

倫理面への配慮

本実験は動物愛護に関する法律、基準、指針を遵守し国立医薬品食品衛生研究所・動物実験委員会の承認のもとに人道的実施された。ナノマテリアルの実験に際しては、当研究所の専用特殊実験施設内で、その運用規則に従い実施しており、暴露・漏洩を防止する対策については万全を期して実験を行った。

C. 研究結果

C-1. 繊維長、繊維径及び単位重量当たりの繊維数の測定

チタン酸カリウムの繊維長の平均値は $4.5 \pm 3.9 \mu\text{m}$ 、最大長は $27.9 \mu\text{m}$ であった (N=346)。繊維径の平均値は $283 \pm 171 \text{ nm}$ 、最大径は $1,743 \text{ nm}$ であった (N=346)。単位重量当たりの繊維数は、 $1.2 \times 10^6 \text{ 本}/\mu\text{g}$ であった (図2)。

C-2. 吸入暴露実験用の検体調製法の検討

チタン酸カリウムの TB への分散性は良好であり、Taquann 法の適用は可能であった。懸濁したチタン酸カリウムのほぼ全量が金属製フィルターを通過し、フィルター上に残渣は殆ど認められなかった。TBを除去した乾燥検体は、肉眼的に原末に比較して嵩高い様相を呈し、分散性が高くなっていることが示唆された (図3)。

C-3. エアロゾル化の検討

Taquann 直噴全身吸入装置 Ver2.5 によりチタン酸カリウムのエアロゾル発生は可能であった。フィルターに回収したチタン酸カリウムは、単繊維の状態で一様に分散していた (図4)。CPCによる相対濃度の測定においては濃度の変動が大きかった。カートリッジから検体を噴射後、ピークに達してから約3分で濃度は半減した (図5)。

MMAD は $1,348 \text{ nm} (\sigma 4.633)$ であった (図6)。

エアロゾル化したチタン酸カリウムの繊維長の平均値は $4.5 \pm 3.9 \mu\text{m}$ 、最大長は $23.8 \mu\text{m}$ であった (N=323)。繊維径の平均値は $335.7 \pm 168 \text{ nm}$ 、最大径は 990 nm であった (N=323) (図7)。繊維長の平均値は原末と同様であるが、原末に比較してエアロゾルではわずかに短い繊維 ($< 3 \mu\text{m}$) の割合が増加した。原末のアスペクト比の平均値は 17 ± 10 、最大値は 66 に対し、エアロゾルの平均値は 16 ± 18 、最大値は 152 であった。

アスペクト比のヒストグラムでは5以下の頻度の増加と、75以上の階級値が観察されたため、分布全体としては右方へ尾を引く様相を示した(図8)。

マウス単回全身暴露吸入の肺病理組織標本を観察した結果、チタン酸カリウムの凝集体・凝固体は認められず、単離繊維が気管支から肺泡領域まで到達している様子が観察された(図9)。光学顕微鏡像では、灰色から黒色調を呈するチタン酸カリウム繊維が観察された(図9a)。チタン酸カリウムは複屈折性を呈し、偏光顕微鏡像では明るく輝いた像として観察された(図9b)。高分解能暗視野コンデンサを用いた散乱光によるナノ粒子の検出システム(CytoViva®)による観察では、チタン酸カリウム繊維は明るく輝いた像として観察された(図9d)。

C-4. 肺沈着量測定法の検討

添加回収実験の結果、チタン酸カリウムは強アルカリ溶液による加熱処理に耐性があり、回収が可能であった。回収したチタン酸カリウムの繊維長の平均値は $5.3 \pm 4.0 \mu\text{m}$ 、最大長は $28.6 \mu\text{m}$ (N=334) であり、原末と同様の繊維長の分布が得られた(図10)。

D. 考察

本年度は、チタン酸カリウムの全身暴露吸入実験のための準備として、①Taquann法によるチタン酸カリウムの分散処理、②チタン酸カリウムのエアロゾル化の検討、及び、③肺沈着量測定のためのチタン酸カリウムの回収方法の検討を実施した。

チタン酸カリウムは繊維状であり、本研究で使用した検体は、チタン酸カリウムの繊維長及び繊維径の平均値は、それぞれ $4.5 \pm 3.9 \mu\text{m}$ (最大長 $27.9 \mu\text{m}$)、 $283 \pm 171 \text{ nm}$ 、(最大径 $1,743 \text{ nm}$)、

単位重量当たりの繊維数は、 1.2×10^6 本/ μg であった。これらの値は、これまで当研究部で吸入暴露の検討を行ってきた MWCNT (MWNT-7、平均長約 $8 \mu\text{m}$ 、平均径約 100 nm 、 3×10^6 本/ μg) に比較すると、太く短い形状であり、単位重量当たりの繊維数は少ない。

チタン酸カリウムを高度に分散した乾燥検体を得るため、Taquann法処理を行った。チタン酸カリウムは低出力の超音波を1分間照射する簡便な方法によりTBに分散・懸濁することが可能であった。MWCNT (MWNT-7) ではろ過工程で約95%が除去されるが、チタン酸カリウムはろ過工程によって除去される量は非常に少なく、ほぼ全ての検体を高度に分散した単離繊維として回収することができた。チタン酸カリウムはMWCNTに比較して、凝集化しにくい性質を有すると考えられる。

Taquann直噴全身吸入装置 Ver2.5により高度に分散したチタン酸カリウムのエアロゾルが得られた。エアロゾルの繊維長の平均値、最大値は原末と同様の値を示した。繊維長の分布に関しては、ほぼ原末と同様の分布を示したが、わずかに短い繊維 (< $3 \mu\text{m}$) の割合がエアロゾルでは増加していた。エアロゾルの繊維径の平均値は、原末の約1/2の値であった。太い繊維は、重量の影響によりTaquann直噴全身吸入装置のサブチャンバー内で沈降してエアロゾルとして暴露チャンバー内に到達しなかった、もしくは暴露チャンバーに到達しても速やかに沈降した可能性が考えられる。アスペクト比の比較において、エアロゾルは5以下のアスペクト比の頻度が増加する一方で、高いアスペクト比側に尾を引く分布を示した。エアロゾルの挙動は、幾何学径、形状係数、密度から計算される空気動力学径によって決定される。すなわち重力、浮揚力及び抵抗のバランスにより成り立っている

ため、エアロゾルでは沈降しにくい粒子の割合が増加したものと考えられる。

チタン酸カリウムのエアロゾルの濃度変動はMWCNTに比較して大きく、6分間隔の噴射では安定した濃度推移が得られなかった(図11)。暴露チャンバーの気積と直径、換気流量から計算すると、エアロゾルは毎分4.2cmの緩慢な層流として暴露チャンバー内を上部から下部へ移動すると想定される。チタン酸カリウムはMWCNTに比較して太く短い形状であること、比重が大きく(MWNT-7; 1.9-2.1⁶⁾、チタン酸カリウム; 3.3~3.5⁷⁾、沈降が速いことが濃度を不安定にする原因と考えられる。より短い間隔で検体を噴射することでこれを解決することが可能であるが、現在保有しているカートリッジ数では対応できないため、設備の追加が必要である。

マウス単回全身暴露吸入の肺病理組織標本の観察から、本研究で検討した手法によりチタン酸カリウムを肺内に到達させる事が可能であることが示された。また、肺沈着量を測定するための、チタン酸カリウムの回収方法も確立したことから、暴露量と生体影響を定量的に評価することが可能である。

E. 結論

本研究では、MWCNTを事例対象として開発した全身暴露吸入試験の技術を基に、チタン酸カリウムに最適化した試験方法を確立した。次年度は、高用量(2mg/m³)、低用量(1mg/m³)の2用量でC57BL/6マウスに2時間/日の単回全身暴露吸入実験及び反復全身暴露吸入実験を行い、慢性影響を調べる計画である。

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、森田紘一氏、相原妃佐子氏

に深く感謝する。

F. 参考文献

1. 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.
2. 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. Aug;103(8):1440-4, 2012
3. Sakamoto Y, Dai N, Hagiwara Y, Satoh K, Ohashi N, Fukamachi K, Tsuda H, Hirose A, Nishimura T, Hino O, Ogata A. Serum level of expressed in renal carcinoma (ERC)/ mesothelin in rats with mesothelial proliferative lesions induced by multi-wall carbon nanotube (MWCNT). J Toxicol Sci. 2010 Apr;35(2):265-70.
4. 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.
5. Adachi S, Kawamura K, Takemoto K. A trial on the quantitative risk assessment of man-made mineral fibers by the rat intraperitoneal administration assay using the JFM standard fibrous samples. Ind Health. 2001 Apr;39(2):168-74.
6. 経済産業省、ナノマテリアル情報提供シート、平成24年3月時点、http://www.meti.go.jp/policy/chemical_management

/files/nanomaterial/120331CNT_5.pdf

7. 大塚化学株式会社
<https://www.otsukac.co.jp/products/chemical/tismo/>

G. 研究発表

論文発表

Xu J, Alexander DB, Iigo M, Hamano H, Takahashi S, Yokoyama T, Kato M, Usami I, Tokuyama T, Tsutsumi M, Tamura M, Oguri T, Niimi A, Hayashi Y, Yokoyama Y, Tonegawa K, Fukamachi K, Futakuchi M, Sakai Y, Suzui M, Kamijima M, Hisanaga N, Omori T, Nakae D, Hirose A, Kanno J, Tsuda H.(2015) Chemokine (C-C motif) ligand 3 detection in the serum of persons exposed to asbestos: A patient-based study. *Cancer Sci.*;106(7):825-32.

学会発表

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, Symposium

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, Symposium

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

特許出願：柴田真利、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
なし

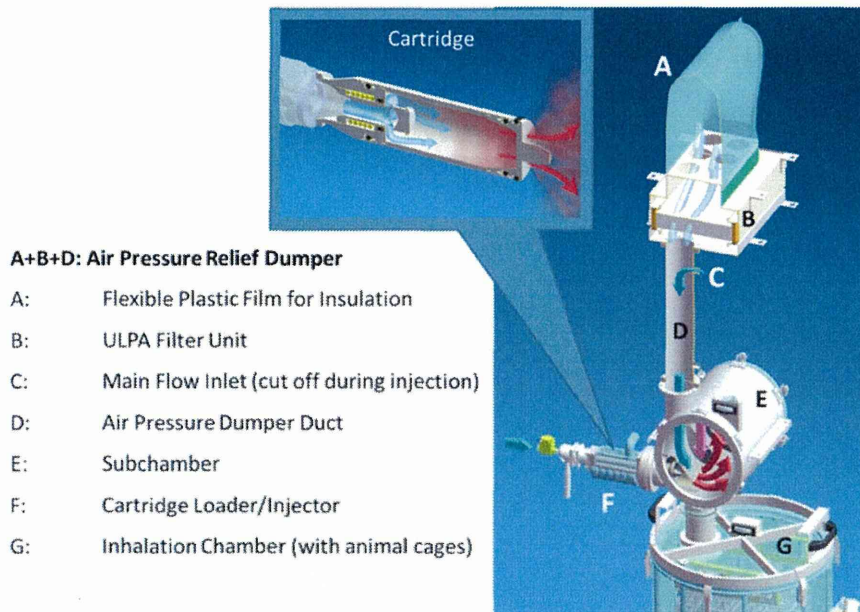


図1 Taquann Direct-Injection Whole Body Inhalation System version 2.5

Taquann 処理検体のエアロゾル化には、既設の Taquann 直噴全身吸入装置 Ver2.5 を使用した(共同開発 柴田科学株式会社)

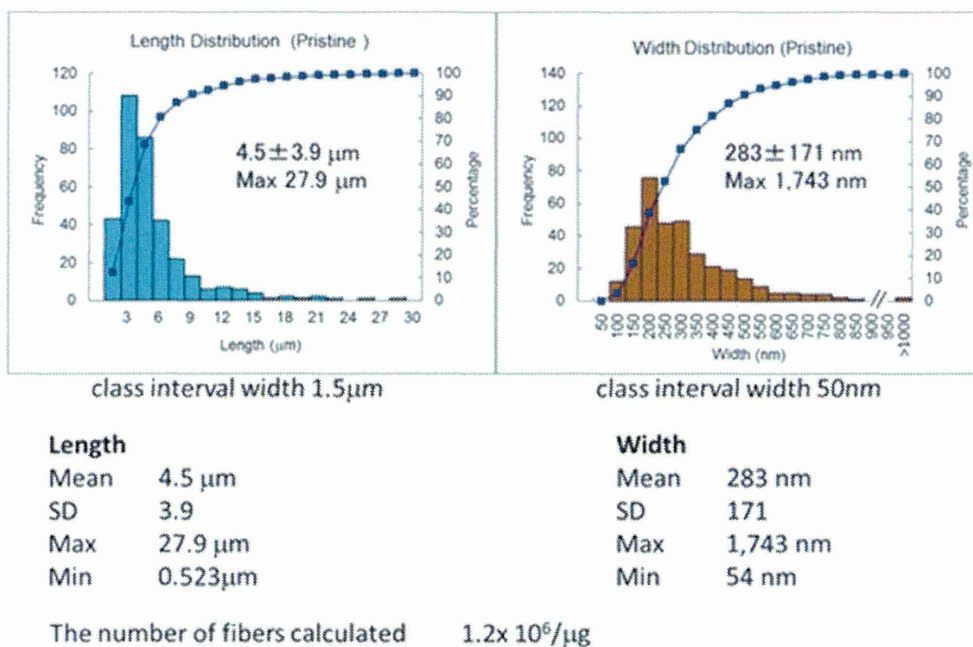


図2 繊維長、繊維径及び単位重量当たりの繊維数の測定

チタン酸カリウムの繊維長の平均値は $4.5 \pm 3.9 \mu\text{m}$ 、最大長は $27.9 \mu\text{m}$ であった(N=346)。繊維径の平均値は $283 \pm 171 \text{ nm}$ 、最大径は $1,743 \text{ nm}$ であった(N=346)。単位重量当たりの繊維数は、 1.2×10^6 本/ μg であった。



図3 吸入暴露実験用の検体調製法の検討(Taquann 処理検体)

Taquann 処理したチタン酸カリウムの乾燥検体は、原末に比較して嵩高い様相を呈し、分散性が高くなっていることが示唆された。

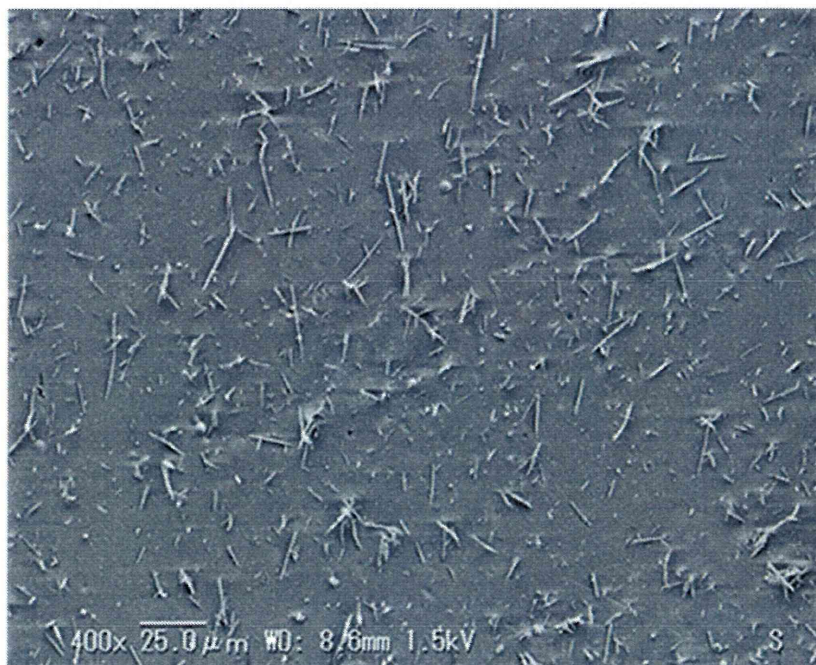


図4 チタン酸カリウムのエアロゾルの分散状態と形状

フィルターに吸着して回収したチタン酸カリウムは、単繊維として均一に分散していた。
サンプリング 5L/min for 3 minutes SEM x400 (scale bars 25 μm)

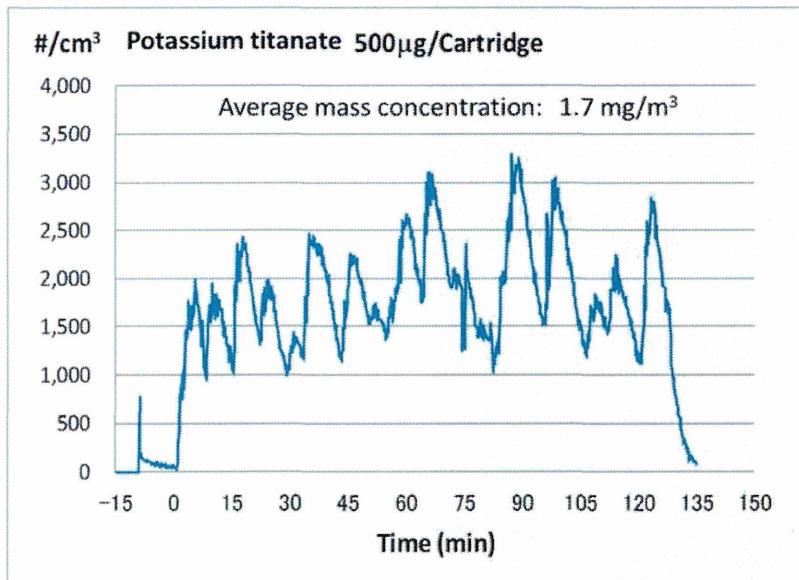
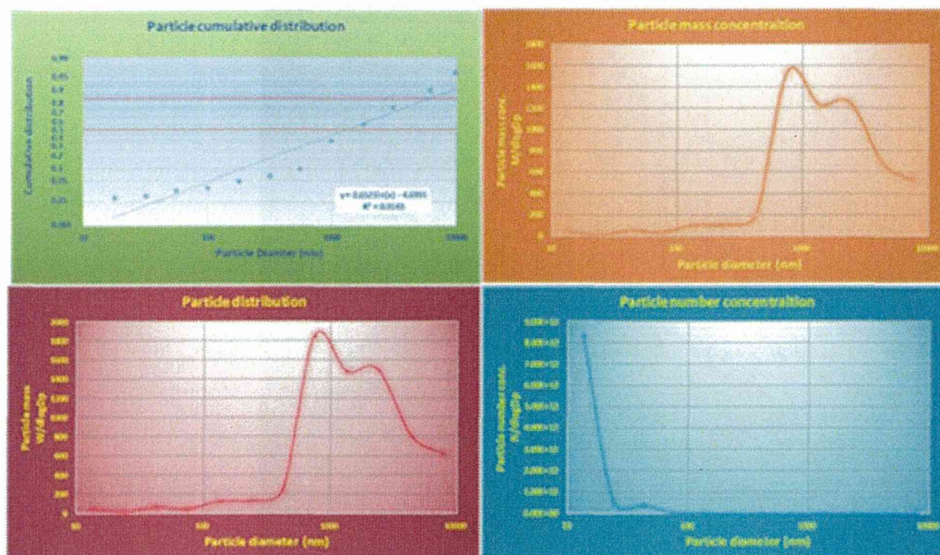


図 5. 暴露チャンバー内のチタン酸カリウムのエアロゾルの相対濃度推移

CPC による相対濃度の測定においてはチタン酸カリウムの濃度の変動は大きく、カートリッジから検体を噴射後、ピークに達してから約 3 分で濃度は半減した。



Mass Median Aerodynamic Diameter (MMAD) : 1,348 nm
 Deviation (σ) : 4.633

図 6. 暴露チャンバー内のチタン酸カリウムのエアロゾルの空気力学的質量中央値

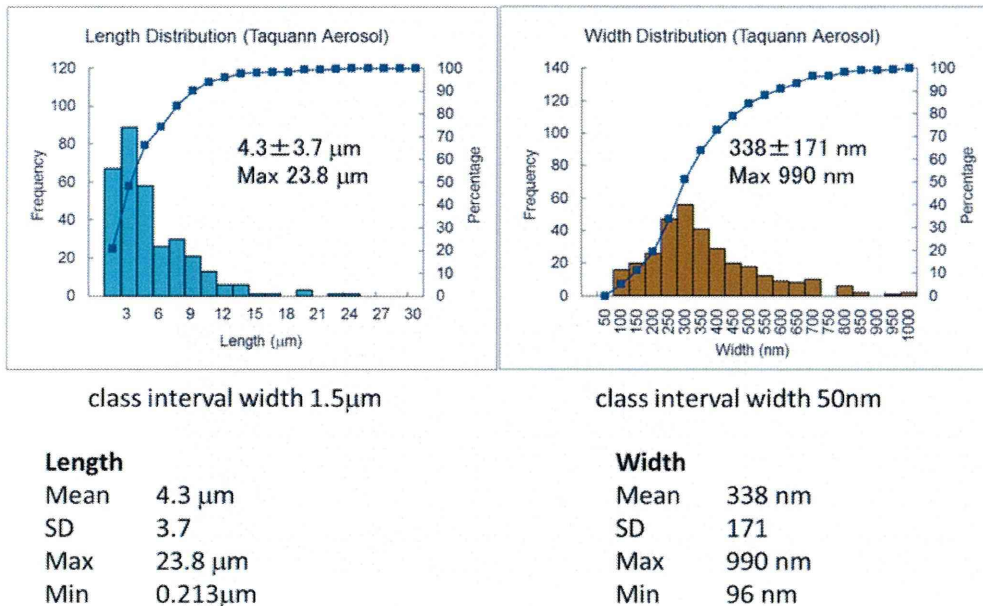


図7. 暴露チャンパー内のチタン酸カリウムエアロゾルの繊維長と繊維径の分布

エアロゾル化したチタン酸カリウムの繊維長の平均値は $4.5 \pm 3.9 \mu\text{m}$ 、最大長は $23.8 \mu\text{m}$ であった ($N=323$)。繊維径の平均値は $335.7 \pm 168 \text{ nm}$ 、最大径は 990 nm であった ($N=323$)。

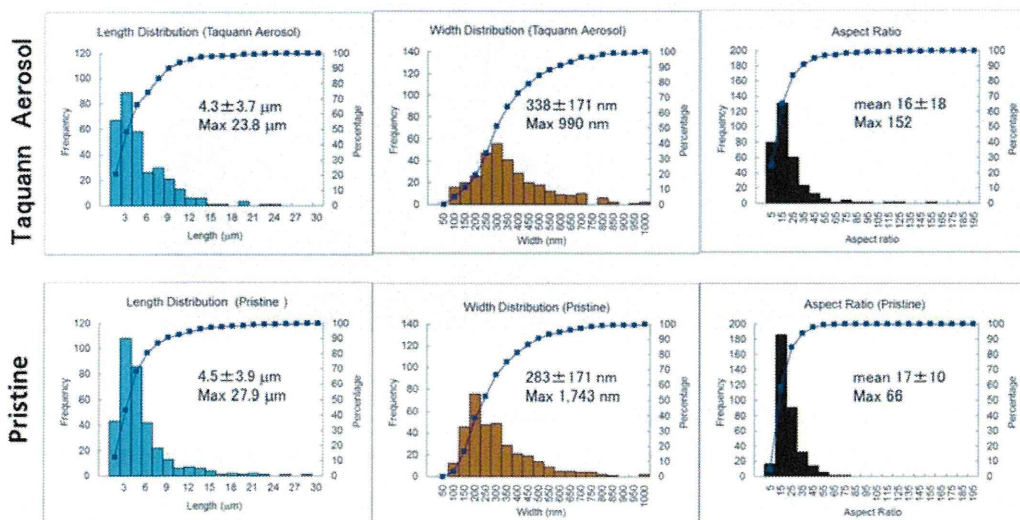


図8. チタン酸カリウムのエアロゾルと原末の繊維長と繊維径の分布

繊維長の平均値は原末と同様であるが、原末に比較してエアロゾルではわずかに短い繊維 ($< 3 \mu\text{m}$) の割合が増加した。原末のアスペクト比の平均値は 17 ± 10 、最大値は 66 に対し、エアロゾルの平均値は 16 ± 18 、最大値は 152 であった。アスペクト比のヒストグラムでは 5 以下の頻度の増加と、75 以上の階級値が観察されたため、分布全体としては右方へ尾を引く様相を示した。

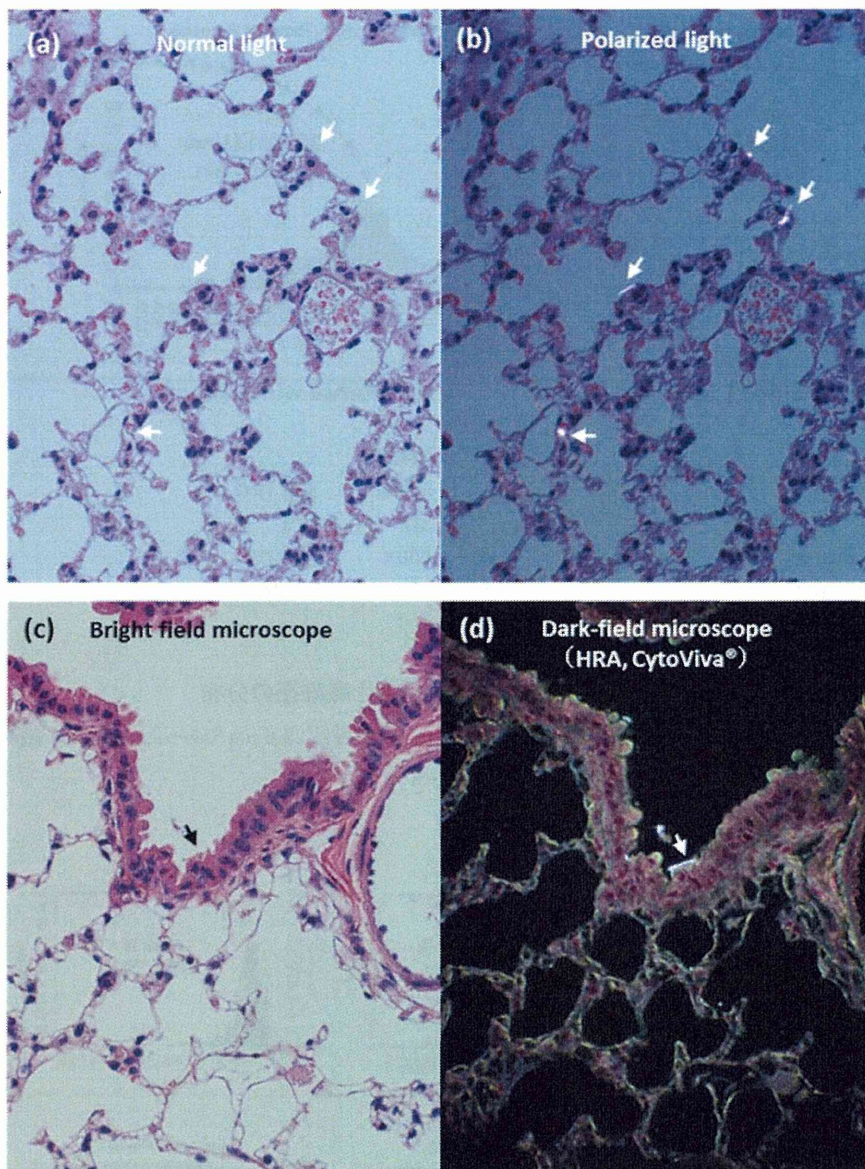


図9. マウスのチタン酸カリウム吸入暴露肺の病理組織

マウス単回全身暴露吸入の肺病理組織標本の観察では、チタン酸カリウムの凝集体・凝固体は観察されず、単離繊維が気管支から肺泡領域に到達している様子が観察された。(a)肺泡領域の光学顕微鏡像；矢印の箇所に灰色から黒色調を呈するチタン酸カリウム繊維が観察される。(b)同肺泡領域の偏光顕微鏡像；チタン酸カリウムは複屈折性を呈し、明るく輝いた像として観察される(矢印)。(c)気管支領域の明視野像；矢印の箇所に灰色の短繊維が観察される。(d) 同気管支領域の高分解能暗視野コンデンサを用いた散乱光によるナノ粒子の検出システム(CytoViva[®])による観察像；チタン酸カリウム繊維は明るく輝いた像として観察される(矢印)。

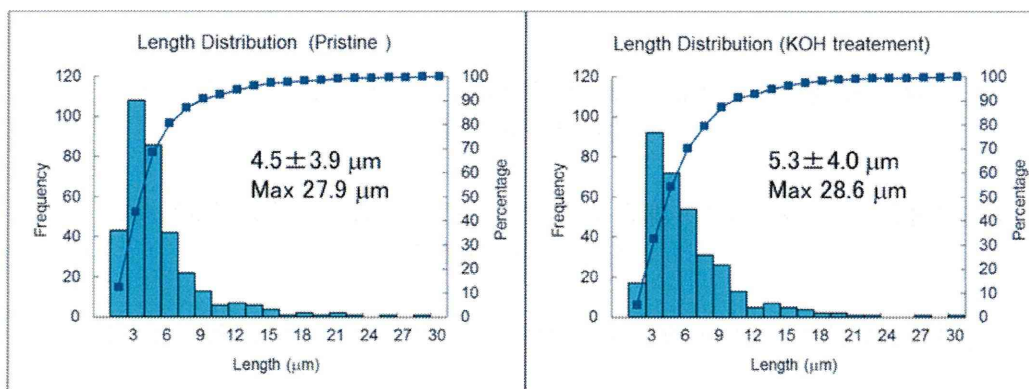


図 10. チタン酸カリウムの肺沈着量測定法の検討

凍結保存した無処置マウスの肺サンプルに、10 μg のチタン酸カリウムを添加し、水酸化カリウムを主体とし強アルカリ溶液で肺を溶解し、チタン酸カリウムの添加回収実験を行った。その結果、チタン酸カリウムは強アルカリ溶液による加熱処理に耐性があり、回収が可能であった。回収したチタン酸カリウムの繊維長の平均値は $5.3 \pm 4.0 \mu\text{m}$ 、最大長は $28.6 \mu\text{m}$ ($N=334$) であり、原末と同様の繊維長の分布が得られた。

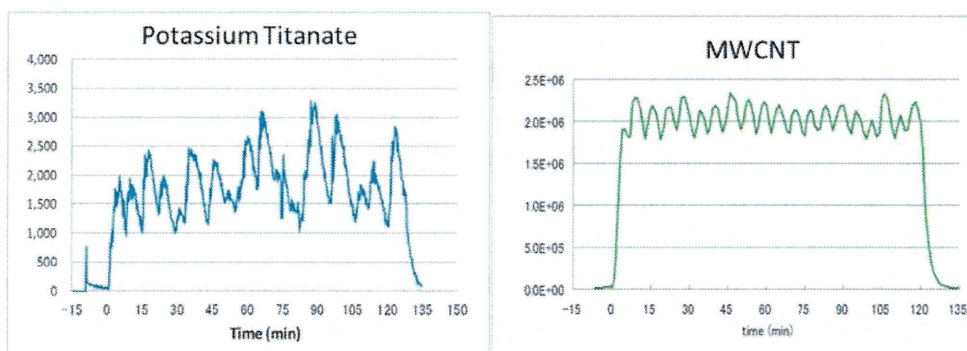


図 11. チタン酸カリウムとMWCNTの暴露チャンバー内エアロゾルの濃度推移の比較

チタン酸カリウムのエアロゾルの濃度変動はMWCNTに比較して大きく、6分間隔の噴射では安定した濃度推移が得られなかった。

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）
分担研究報告書

研究課題名：ナノマテリアル曝露による生体毒性の慢性移行及び遅発性に関わる
評価手法の開発研究

分担研究課題名：ナノマテリアルの発がん性評価手法の開発に関する研究

研究分担者：津田 洋幸 名古屋市立大学特任教授

徐 結苟 名古屋市立大学特任教授

David B. Alexander 名古屋市立大学特任教授

沼野 琢旬 名古屋市立大学津田特任教授研究室研究員

William T. Alexander 名古屋市立大学津田特任教授研究室研究員

Mohamed Ahmed Mahmoud Abd El-gied 名古屋市立大学大学院医学研究科
博士課程院生

研究要旨

目的：我々が開発したナノマテリアルの毒性短期評価法として、ラットで経気管肺内噴霧投与（TIPS 法）による *in vivo* 法を開発し、1）非コーティング球状二酸化チタニウム：直径 6nm アナターゼ型（6ana）と直径 15 nm ルチル型（15ru）、さらに 2）線維状チタン酸カリウム（ $K_2O \cdot 8TiO_2$ ）（PTF）：肺における貪食マクロファージ（ $M\phi$ ）を介する炎症と障害作用の解析を行った。

方法：F344 系雌ラットを用い TIPS 法にて 1）6ana と 15ru を 500 μ g/mL 濃度にて 0.5mL 生食懸濁液を 2 週間に 8 回投与し（1 回 250 μ g/ラット、計 2mg/ラット）最終投与 6 時間後に屠殺した。2）線維状チタン酸カリウム（長さ 10-20 μ m、直径 0.3-0.6 μ m）を予め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）にてエアロゾル分散後に tert-ブチルアルコールに溶解後氷結させ（Taquahashi, J Toxicol Sci., 2013）、使用直前に tert-ブチルアルコールを揮発させて生食に懸濁した。用量は 250 と 500 μ g/mL で 2 週間に 0.5mL を 8 回 TIPS 投与した（1 および 2 mg/ラット）。左肺は凍結保存してサイトカイン種の生化学解析を行った。右肺は 4%パラホルム固定後炎症像とマクロファージにおけるサイトカイン局在を解析した。対照は無処置、生食群とした。

結果：1） TiO_2 ：肺胞内 $M\phi$ の数は、無処置群と生食対照群間、生食群と 6ana および 15ru 両群間で有意の増加をみたが、両者間では差異はなかった。肺組織における炎症性サイトカイン mRNA 解析では、6ana,15ru において CCL3、CCL4、CCL5、CXCL2 は無処置/生食対照より有意に高値であったが、いずれのサイトカインも 6ana,15ru 間には差はなかった。蛋白レベルでも CCL3 の ELISA 値は両群間では差異はなかった。肺胞 $M\phi$ の免疫染色では、6an および 15ru 貪食 $M\phi$ 胞体内に様々な程度に CCL3 の局在が証明された。2）線維状チタン酸カリウム（PTF）：肺組織の CCL2、CCL3、CCL4、CCL5、CXCL2 の

mRNA レベルは、対照群より発現量の有意の高値を示した。CCL3 の免疫染色では PTF 食食 Mφ 胞体内に様々な程度に CCL3 の局在が証明され、さらに 6ana および 15ru と比較して染色性は強かった。

さらに、6ana、15ru および PTF の値について actin レベルの補正を行って 3 者を比較すると PTF は CCL2、CCL3、CCL4、CXCL2 においていずれの球状二酸化チタンよりも有意の高値を示し、CCL5 では逆に有意の低値を示した。

以上から、肺胞の炎症像とサイトカイン mRNA レベルでは球状 TiO₂ ではアナターゼとルチル型の差異はなく、また線維形 TiO₂ では球形 TiO₂ より炎症障害作用はより顕著であった。

A. 研究目的

二酸化チタン (TiO₂) 粒子は塗料・化粧品 の材料として広く利用されている。しかし、WHO 国際がん研究機関 (IARC) は、TiO₂ 粒子をラットに吸入曝露した場合に肺発がん性を示す (動物において発がん性を示す十分な証拠がある) ことから Group 2B (ヒトに対して発がんの可能性があると分類している。鉱物として製錬された TiO₂ 粒子は製造過程で熱処理によりアナターゼ型、ルチル型およびブルカイト型に分けられている。このうち、光触媒活性の強いアナターゼ型 (ana) は主として外壁塗料に、ルチル型 (ru) は化粧品等に用いられている。これまでに我々は、非コーティング ru にはラットにおいて肺発がんプロモーション作用がみられ、その機序には ru を食食した Mφ の産生するラジカルによる細胞障害、および分泌される炎症性タンパク (CCL3) の細胞増殖誘導作用が関与する事を明らかにしてきた。一方、ana 型には毒性学的影響について光・UV 照射下での有害作用/発癌リスク知見は乏しい。このために前年度に皮膚塗布と肺内 TIPS 投与にて実施してきた研究においては、アナターゼ型 (非コーティング、直径 25 nm) ルチル型 (非コーティング、直径 20 nm)

には有害作用に差異がなかった。

本研究では、1) さらにサイズの小さい球状で直径 6nm のアナターゼ型 TiO₂ (AMT-100) および直径 15nm のルチル型 TiO₂ (AMT-150A) の毒性について *in vivo* の系にて比較検討した。また、2) プラスチック等の補強材、自動車用ブレーキの摩擦調整剤、精密フィルターなど幅広く用いられている線維状の TiO₂ であるチタン酸カリウム (K₂O・8TiO₂) (PTF) についても同様の *in vivo* 系にて炎症の状態と有害作用について検討した。

B. 研究方法

3 種の TiO₂ は日本化粧品工業会より提供された (広瀬明彦主任研究者経由)。

1) 無コーティングのアナターゼ型 (直径 6nm、AMT-100) (6ana) およびルチル型 (直径 15nm、AMT-150A) (15ru) TiO₂: F344 雄ラットを用い、500 μg/ml の濃度にて 0.05% Tween20 含有生理食塩水に懸濁して 2 日に 1 回の割合で 0.5mL を合計 8 回肺内噴霧投与した (計 2mg/ラット)。14 日目の最終投与の 6 時間後に屠殺剖検した。対照群は 0.05% Tween20 含有生理食塩水のみを投与した。左肺は凍結しサイトカイン発現の mRNA 及び ELISA 解析、右肺はパラホルムア

ルデヒド固定後、肺胞Mφによる貪食の状態、炎症の程度とサイトカイン発現等を免疫染色にて観察した。

2) チタン酸カリウム線維 (PTF) :

F344雄ラットを用い、あらかじめエアロゾル分散させてから *tert*-ブチルアルコールに懸濁し凍結した状態を乾燥させて得られたものを250および500 μ g/mlの濃度にて生食に0.5%PF68

(non-ionic, biocompatible amphiphilic block copolymers; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 分散剤を加えた溶媒に加えて、0.5mLを2日に1回の割合で合計8回肺内噴霧投与した(計1および2mg/ラット)。14日目の最終投与の6時間後に屠殺剖検した。対照群は生食に0.5%PF68を加えたものを投与した。左肺は凍結し、右肺はパラホルムアルデヒド固定後、病理標本とし、球形のものと同じ解析をおこなった。

(倫理面への配慮)

動物の飼育は、名古屋市立大学大学院医学研究科 実験動物教育センターで行った。実験計画書は、動物の愛護と使用のガイドラインに則り、名古屋市立大学大学院医学研究科 動物運営委員会の承認を経て行った(承認番号H22-M19)。

C. 研究結果

14日間投与による肺毒性・肺発がん機序の検索

1) アナターゼ型(直径6nm) TiO₂ (6ana) およびルチル型(直径15nm) (15ru) TiO₂ : 病理標本における炎症巣の個数/標本面積では6ana, 15ru群間に有意の差異はなかった。肺胞内のCD68染色で認識されるMφの数/mm²は、無処置群と生食対照群間、生食群と6anaおよび15ru両群間で優位の増加

をみたが、6ana, 15ru間では差異はなかった。肺組織におけるCCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL2のmRNA解析では、CCL2は15ruで無処置、生食対照より有意に高値、CCL3, CCL4, CCL5, CXCL2は6ana, 15ruにおいて無処置、生食対照より有意に高値であったが、いずれにおいても6ana, 15ru間には差異はなかった。蛋白レベルでは肺組織および血清のELISAにおけるCCL3値は、無処置群と生食対照群間、生食群と6anaおよび15ru両群間では差異はなかった。免疫染色では6anaおよび15an両群で貪食した肺胞Mφ細胞の胞体内にCCL3の局在をみとめた。

2) 線維形チタン酸カリウム (PTF) :

病理標本における炎症の状態は、高用量群において無処置と生食対照群より明らかな増強が見られた(定量中)。また肺組織における炎症性サイトカインのCCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL2のmRNA解析では、CCL2, CCL3, CCL4, CXCL2において対照群より有意の高値を示した。これらの値について、6ana, 15ruと比べるとPTFはCCL2, CCL3, CCL4, CXCL2において6ana TiO₂, 15ru TiO₂のいずれよりも有意の高値を示し、CCL5では逆に有意の低値を示した。

D. 考察

すでにラットにおいて吸入暴露試験法によって肺発がん性が明らかにされている無コーティング ruTiO₂ (WHO/IARC Group 2B) について、我々の開発したナノ粒子TIPSによる短期毒性リスク評価法を用いてMφの分泌するCCL3を介する発がん促進作用を見出した(Xu et al., Carcinogenesis, 31, 927, 2010)。また、ルチル型TiO₂を表皮を剥離した皮膚に塗布しても障害作用は見られなかった(Xu et al., Food Chem Toxicol.

49:1298-302. 2011 および Sagawa et al., J Toxicol Sciences, 37, 317, 2012)。また、直径 25nm のアナターゼ型と直径 20nm のルチル型についても同様の *in vitro* および *in vivo* 試験で比較したが差異はなかった。以上の知見に基づき、光触媒活性がより顕著で、生物毒性がより強力である小さいサイズの 6nm アナターゼ型と 15nm のルチル型 TiO₂ について 2 週の短期試験で以前のデータと比較検討し、Mφ に対するストレスがより顕著と考えられているチタン酸カリウム線維についても同様の試験系にて検討した。その結果、肺における炎症の強さでは 6ana, 15ru 間で有意の差異はなかった。肺胞内における CD68 染色で認識される Mφ の数は、生食対照群と 6ana および 15ru 両群間で有意の増加をみたが、6ana, 15ru 間では差異はなかった。さらに肺における炎症性サイトカイン種の CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL2 の mRNA 解析でも差異はなかった。理由として、生体内では UVB 照射がないためにラジカルの発生がなかったためと考えられる。

また、チタン酸カリウム線維についても同様の試験系にて異なった時期に検討したが、肺炎症像は 6ana および 15ru より顕著であった。さらに肺炎症の指標でもある CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL (actin 値で修正値) は 6ana および 15ru より高値であった。したがって、本研究では、生体内では UV 励起がおこるとは考えられず、粒径を小さくしても毒性にはアナターゼとルチルの差異はないと考えられる。

E. 結論

in vivo におけるアナターゼ二酸化チタニウム (6an) とルチル型 (15ru) との比較

では炎症の誘導には差異はなかった。少なくとも強い光の当たらない条件下では生物・細胞毒性、細胞増殖作用は、アナターゼとルチル型の差異はないと考えられる。また線維形の二酸化チタニウム (PTF) は検索した 5 種の炎症性サイトカインの誘導能は球形のものよりも顕著である。この意味で、アスベストやカーボンナノチューブ等による有害作用と発癌性をについてさらに検索を進める必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Xu J., Alexander DB., Iigo M., Hamano H., Takahashi S., Yokoyama T., Kato M., Usami I., Tokuyama T., Tsutsumi M., Tamura M., Oguri T., Niimi A., Hayashi Y., Yokoyama Y., Tonegawa K., Fukamachi K., Futakuchi M., Sakai Y., Suzui M., Kamijima M., Hisanaga N., Omori T., Hirose A., Kanno J., Nakae D., and Tsuda H. Chemokine (C-C motif) ligand 3 detection in the serum of persons exposed to asbestos: A patient-based study. *Cancer Sci.*, 106(7): 825-832, 2015.

2. 学会発表

- 酒々井真澄、沼野琢旬、深町勝巳。二口充、津田洋幸 (2015) 多層カーボンナノチューブの腫瘍発生プロファイル; 第 31 回日本毒性病理学会総会 東京 1 月 29 日-30 日
- 津田洋幸、徐結旬、Alexander D. B., 酒々井真澄、二口充、深町勝巳、広瀬明彦、菅野純 (2015) 多層カーボンナノチュ

ープの発がん標的性組織;第14回分子予防環境医学研究会大会 大阪, 2月13日-2月14日.

3. 松本晴年、深町勝巳、二口充、津田洋幸、酒々井真澄 (2016) 多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の肺障害性と遺伝子発現への影響;第32回日本毒性病理学会総会 高松 1月28日-29日

H. 知的財産所有権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

平成 27 年度厚生労働科学研究補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

研究課題：ナノマテリアル暴露による慢性及び遅発毒性評価手法の開発に関する研究

分担研究課題：ナノマテリアルの発生活毒性評価手法に関する研究

研究分担者：小林 憲弘 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 第三室 室長

研究要旨

ナノマテリアル暴露によるヒトへの毒性を総合的に評価するためには、発がん性等の慢性毒性だけでなく、次世代への影響、すなわち生殖・発生活毒性に関するデータも必要である。近年、ナノマテリアルの暴露による生殖・発生活毒性に関する研究報告例がみられるようになったものの、既存の試験結果をヒトに外挿し、ヒト健康リスク評価を行うだけの十分なデータは得られておらず、より詳細な検討が必要である。

我々はこれまで、妊娠マウスおよびラットを用いて、MWCNT (MWNT-7) の発生活毒性を評価してきた。今年度は、これまでに実施したマウス反復気管内投与試験で得られた胎児の骨格・内臓検査を実施し、発生活毒性の無毒性量 (NOAEL) および最小毒性量 (LOAEL) を評価した。

その結果、胎児の発生および発育に対する NOAEL は、1 mg/kg (妊娠期間を通じて 4 mg/kg) の反復投与において、上後頭骨および胸骨分節の二分骨化の発生率増加による胎児の発育抑制が認められたことから 0.5 mg/kg/day [最小毒性量 (LOAEL) : 1 mg/kg/day] と判断された。

今回の検討によって、これまでの試験で認められた骨格異常および骨格変異よりも低用量から骨化遅延が認められることが明らかとなった。

A. 研究目的

ナノマテリアル暴露によるヒトへの毒性を総合的に評価するためには、発がん性等の慢性毒性だけでなく、次世代への影響、すなわち生殖・発生活毒性に関するデータも必要である。

近年、ナノマテリアルの暴露による生殖・発生活毒性に関する研究報告例がみられるようになった。例えば、二酸化チタン (TiO₂) ナノ粒子については、妊娠マウスへの皮下投与により、曝露後に胎児に移行して発達・機能障害を引き起こしたとの報告がある (Takeda et al., 2009; Shimizu et al., 2009)。また、カーボンナノチューブについては、単層カーボンナノチューブ (SWCNT)、

多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の妊娠マウスへの腹腔内・気管内投与により胎児の奇形がみられたとの報告 (Pietroiusti et al., 2011; Fujitani et al., 2012) や、SWCNT のマウス単回経口投与により、吸収胚の有意な増加および胎仔の骨格異常がみられたとの報告 (Philbrook et al., 2011) がある。一方、MWCNT を妊娠ラットに反復経口投与しても生殖・発生活毒性はみられなかったとの報告もある (Lim et al., 2011)。

しかし、これらの試験結果をヒトに外挿し、ヒト健康リスク評価を行うだけの十分なデータは得られておらず、より詳細な検討が必要である。

我々はこれまで、妊娠マウスおよびラッ