

平成28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
カーボンナノチューブ等の肺、胸腔及び全身臓器における有害性並びに発癌リス
クの新規高効率評価手法の開発 (H28-化学-一般-004)
分担研究報告

分担研究課題 「動物実験 遺伝子蛋白解析」

研究分担者 菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所 客員研究員
独立行政法人労働者健康安全機構
日本バイオアッセイ研究センター 所長
研究協力者 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 室長

研究要旨

本研究の目的は、ナノマテリアルの中でも生産量の最も多い多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の有害作用/発癌性評価の加速化を可能にする普遍性と信頼性のある新たな高効率評価手法の確立を行うことにある。具体的には、ラットを用いて吸入曝露実験の簡便法として経気管肺内噴霧 (TIPS) 投与方法により、有害作用/発癌性の発生機序に基づく高効率な評価方法の開発を行う。本分担研究では、ラットを用いた2週間の TIPS 投与試験に供する MWCNT 検体について、独自に開発した第三級ブチルアルコール (TB) を用いる Taquann 法により処理を行い、凝集体成分を除去し、単離繊維成分が豊富な分散性の高い検体を調製し調製し研究代表者に供給した。具体的には、MWCNT の一つである MWNT-7 (三井物産) を事例対象として、研究分担者が独自に開発した凝集体・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) により検体処理を行った。Taquann 法は汎用性が高く、これまで、各種二酸化チタン、チタン酸カリウムにおいて MWNT-7 と同様の方法により分散性の高い検体が得られることを確認している。本年度の分担研究では、MWNT-7 とは性状が異なる MWCNT-N への適用を試みた。MWCNT-N は MWNT-7 よりも繊維が長く細いため、原体は繊維が絡まった不織布状を呈し、従来のプロトコルを適用した場合の TB への懸濁性が極めて不良であった。そのため、分散条件の検討を行った結果、超音波処理の出力を増加させることで良好な分散検体得られることが判明した。以上より、本研究結果として、MWNT-7 と性状の異なる MWCNT にも、条件の微調整により Taquann 法処理が適用可能であることが示された。

なお、この検体の繊維長を走査型電子顕微鏡により測定した結果、2.5 μm 以下の繊維は 14.7%、5 μm 以上は 85.7%、10 μm 以上は 52.0%、平均繊維径は 70nm であ

り、中皮腫発癌に寄与する可能性のある繊維が高率に含まれていると考えられた。

A. 研究目的

本研究の目的は、ナノマテリアルの中でも生産量の最も多い多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の有害作用/発癌性評価の加速化を可能にする普遍性と信頼性のある新たな高効率評価手法の確立を行うことにある。具体的には、ラットを用いて吸入曝露実験の簡便法として経気管肺内噴霧 (TIPS) 投与方法により、有害作用/発癌性の発生機序に基づく高効率な評価方法の開発を行う。

本分担研究では、ラットを用いた2週間のTIPS投与試験に供するMWCNT検体について、独自に開発したTaquann法により処理を行い、凝集体成分を除去し、単離繊維成分が豊富な分散性の高い検体を調製し研究代表者に供給する。

MWCNT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進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げっ歯類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。

そこで、研究分担者らは、MWCNTの一つであるMWNT-7(三井物産)を対象に、凝集体・凝固体を除去し単

維成分のみを高度に分散した乾燥検体を得る方法(Taquann法)を独自開発した。Taquann法は走査型電子顕微鏡の試料作製方法である「臨界点乾燥」に着想を得た技術である。乾燥時に表面張力を受けないため再凝集せず、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、MWCNT原末を第三級ブチルアルコール(TB、融点; 25.69)に分散、懸濁させて、金属製フィルター(目開き 25 μm)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。固化した状態のMWCNT懸濁液を固相のまま溶媒回収型真空ポンプで液相を介さずに乾燥させ、TBを分離除去することで分散性の高い乾燥状態のMWCNTを得る方法である(図1)。

Taquann法は汎用性が高く、原理的にはTBに耐性のある検体に適応可能である。これまで、各種二酸化チタン、チタン酸カリウムにおいてMWNT-7と同様の方法により分散性の高い検体を得られることを確認している。本年度の分担研究では、MWNT-7とは性状が異なるNWCNT-Nへの適用を試みた。MWCNT-Nは、従来のプロトコルを適用した場合のTBへの懸濁性が極めて不良であったため、分散条件を再検討した。また、走査型電子顕微鏡観察により、Taquann法処理したMWCNT-Nの繊維長及び繊維径について測定を行った。

B. 研究方法

B-1 MWNT-7 Taquann 処理検体

MWNT-7の原末500 mgをビーカーに入れ、35℃に加熱して溶解したTB約250 mLを加えてステンレス製のスパテルで攪拌して混合した。次に、混合液を氷冷しながらスパテルで攪拌しTBがシャーベット状になった状態でMWNT-7とTBを十分に混和し、1,000 mL容量のメディウム瓶に移し、-25℃で一晩凍結した。約60℃に加熱したTBを添加し全量を1,000 mLとした（凍結再融解処理）。凍結再融解したMWNT-7のTB懸濁液を超音波洗浄器SU-3TH（柴田科学株式会社）にて、40Wの出力により15分間の処理を行い、高分散性の懸濁液を得た。

MWNT-7の懸濁液を約50℃に加熱し、金属製フィルター（セイシン企業、目開き25 μm）にてろ過し大型の凝集体を除去した。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：17.6m/s²）をリムに4個装着し、フィルターを振動させながらろ過を行った。得られたろ液を直ちに液体窒素で凍結・固化させた。固化した状態のMWCNT-N懸濁液を固相のまま溶媒回収型真空ポンプ（Vacuubrand、MD4CNT+AK+EK）で液相を介さずに乾燥させ、TBを分離除去し高分散性の乾燥検体を得た。

これまでの研究により、Taquann法処理を行ったMWNT-7の繊維長の平均は7.1 ± 6.0 μm、繊維径の平均は115 ± 74 nmであることが示されている¹⁾。

B-2 MWCNT-N Taquann 処理検体

(1) MWCNT-NのTBへの懸濁方法とTaquann法処理

MWCNT-Nの原末は、肉眼的にはフレーク状を呈し、走査型電子顕微鏡による観察では、繊維が絡みあって不織布状の様相を呈している（図2）。これは、粉末～繭状凝集体の外観を呈するMWNT-7とは大きく異なる。TBにMWNT-7と同様の方法で分散を試みたが分散性の高い懸濁液が得られなかったため、TBへの分散方法の検討を行った。幾つかの条件を試み、以下の方法で良好な懸濁液を得た。

MWCNT-Nの原末500 mgをビーカーに入れ、35℃に加熱して溶解したTB約250mLを加えてステンレス製の小型ホイッパーで攪拌して混合した。次に、混合液を氷冷しながらホイッパーで攪拌しTBがシャーベット状になった状態でMWCNT-NとTBを十分に混和し1,000 mL容量のメディウム瓶に移し、-25℃で一晩凍結した。約60℃に加熱したTBを添加し全量を1,000mLとした。

凍結再融解したMWCNT-NのTB懸濁液をサンプル密閉式超音波破碎装置BIORUPTOR®UCD-250HSA（コスモ・バイオ株式会社）にて、160Wの出力で30秒間の超音波照射を6回繰り返して、MWCNT-Nが十分に懸濁した混合液を得た（図3a）。以降は、MWNT-7と同様に濾過、凍結・固化、TBの分離を行い、分散性の高い乾燥検体を得た（図3b、図4）。

(2) MWCNT-Nの形態観察

アルミナフィルター（Anodisc、孔径0.02 μm、φ12mm、ワットマン）を口

ート型ガラス濾過器 (51G-1、三商) に載せ、ピペティングにより十分に分散させた Taquann 法処理 MWCNT-N 懸濁液 1 μ L を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、 ϕ 15 \times 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 秒間処理を行い走査型顕微鏡 (VE-9800、KEYENCE) によって 400~10,000 倍、加速電圧 2.5~5.0 kV の条件で観察した。MWCNT の繊維長の計測は ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) を用いて行った。

C. 研究結果

MWNT-7 と同様の方法では MWCNT-N は TB への分散性が不良であった。そのため分散工程において、

TB と MWCNT-N を混合する器具をスパーテルからホイッパーに変更、超音波処理を 40W \times 15 分から 160W \times 3 分処理に変更することで良好な懸濁液を得ることが可能となった。

走査型電子顕微鏡による観察の結果、Taquann 法処理を行った MWCNT-N の平均繊維長は $8.5 \pm 5.5 \mu\text{m}$ (N=279)、最大値 36.4 μm 、最小値 0.7 μm であった (図 5a)。繊維の平均直径は $69 \pm 22 \text{ nm}$ (N=100)、最大値 129 nm、最小値 29 nm であった (図 5b)。繊維長のヒストグラムから、2.5 μm 以下の繊維は 14.7%、5 μm 以上は 85.7%、10 μm 以上は 52.0% であった。

D. 考察及び結論

MWCNT-N の原末は、肉眼観察ではフレーク状を呈し、走査型電子顕微鏡による観察では、繊維が絡みあって不織布状の様相と呈している。繊維長の平均値は MWNT-7 よりも若干長く、また繊維径は細いため繊維が絡みやすいと考えられる。MWNT-7 の調製で使用していた超音波処理条件 (40W \times 15 分; 36,000J) では TB への懸濁性が不良であった。本研究では、より高出力が得られる超音波処理装置を用い、160W \times 3 分; 28,800J の条件において良好な懸濁液が得られた。総エネルギーは従来法が大きい、単位時間当たりのエネルギーは従来法の 20 倍である。超音波処理は溶液中に圧力差によるキャビテーションを発生させることで、溶液中の物質に激しい衝撃を与えて分散を図る方法である。そのため、強力な超音波処理では、MWCNT-N の繊維長に影響を与える可能性がある。走査型電子顕微鏡による繊維長の測定では、5 μm 以上の長さの繊維が約 85%、10 μm 以上は 52.0% であった。処置前の繊維長の正確な値は不明であるが、極端な断片化は生じていないと考えられた。なお、処理の検体に中皮腫発癌に寄与する可能性のある繊維が高率に含まれていると考えられた。繊維状物質の中皮腫発癌性はサイズに依存するため²⁾、繊維長の分布が処置後も保持される点は重要であると考えられる。

本研究結果から、MWNT-7 とは性状の異なる MWCNT にも Taquann 法処理が適用可能であることが示された。

【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) Roller M, Pott F, Kamino K, Althoff GH, Bellmann B. Dose-response relationship of fibrous dusts in intraperitoneal studies. Environ Health Perspect. 1997 Sep;105 Suppl 5:1253-6.
- E. 健康危機情報**
なし
- F. 研究発表**
1. **学会発表**
 1. 高橋祐次、小川幸男、高木篤也、辻 昌貴、森田 紘一、今井田 克己、菅野 純、MWCNT のマウス全身暴露吸入における原末と高分散処理検体 (Taquann 法) の肺沈着量の比較、第 34 回日本毒性学会、名古屋、(2016.7.1)、一般演題 (口演)
 2. 相磯成敏、梅田ゆみ、笠井辰也、妹尾英樹、高信健司、斎藤美佐江、福島昭治、菅野純、MWNT-7 吸入暴露で誘発されたラット肺病変の経時的解析、第 31 回発癌病理研究会(2016.8.23)、長野、口演
 3. Jun Kanno, Nanomaterials safety: Predicting their long-term effects by in vivo studies., The 14th International Nanotech Symposium & Nano-Convergence Expo (NANO KOREA 2016) (2016.7.14), Korea, 基調講演
 4. Yuhji Kanno J, Taquahashi Y, Introduction to Nanomaterials safety: Predicting the chronic effects. XIV International Congress of Toxicology (ICT2016) Merida-Mexico, (2016.10.3), Symposium
 5. Taquahashi1, Atsuya Takagi, Yukio Ogawa, Koichi Morita, Masaki Tsuji, Katsumi Imaida, Jun Kanno, Level of dispersion of MWCNT aerosol affects the lung burden and lung lesion in whole body inhalation study, XIV International Congress of Toxicology Merida-Mexico, (2016.10.5), Oral
 6. Jun Kanno, Yuhji Taquahashi1, Atsuya Takagi1, Masaki Tsuji1, Koichi Morita1, Yukio Ogawa, Shigetoshi Aiso, Yumi Umeda, Tatsuya Kasai, Hideki Senoh, Kenji Takanobu, Misae Saito, Shoji Fukushima, Nanomaterials safety: Predicting their long-term effects by in vivo studies., Inhalation Toxicity Test Advisory Council, Korea Occupational Safety and Health Agency (KOSHA). Seoul, Korea, Invited
 2. **論文発表**
 1. 菅野 純、ナノマテリアル毒性のとらえ方とその難しさ、医学のあゆみ、259 巻 3 号、217-222、2016

2. 高橋祐次、高分散型小型全身曝露吸入システムによるマウス吸入毒性-ヒトの現実的な曝露シナリオに基づいたナノ材料の吸入毒性評価の迅速化と効率化に向けて-、医学のあゆみ、259 巻 3 号、234-240、2016

G. 知的財産の出願・登録情報

1. 特許取得

菅野純、高橋祐次、「高分散性ナノ材料の調製方法」、特願 2012-158343、登録番号:第 6051427 号(2016.12.9)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

ISO TC 229/SC /WG 3

Nanotechnologies- Aerosol generation for NOAA (nano-objects and their aggregates and agglomerates) air exposure studies. 6.5 Liquid Phase Filtration/Dispersion – Critical Point Drying (Tertiary Butyl Alcohol Sublimation) and Direct Injection System for whole body inhalation studies

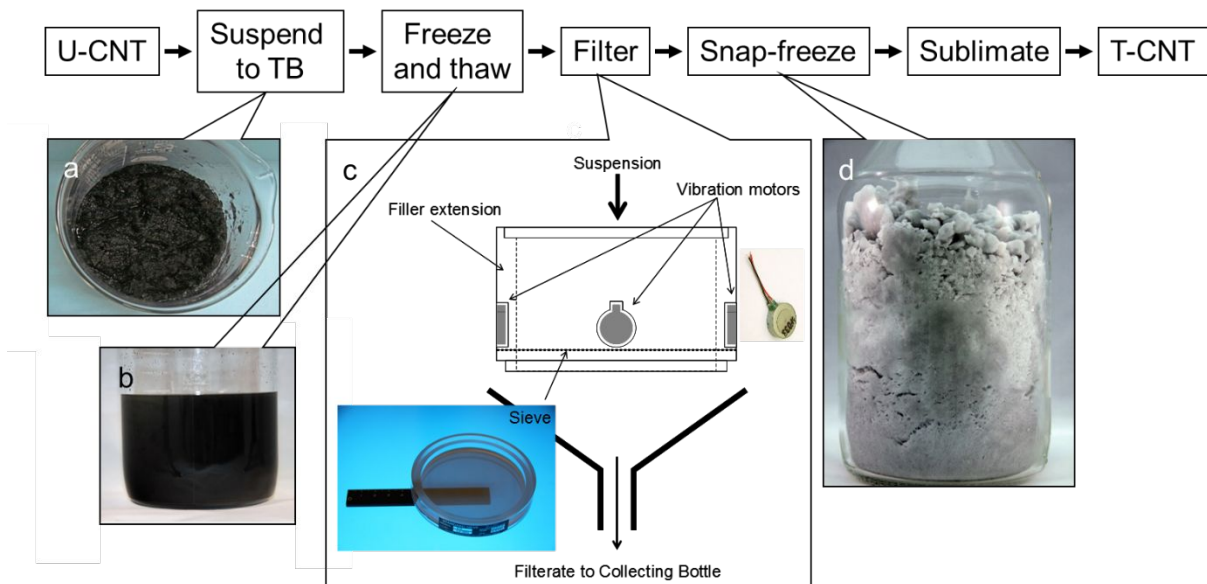


図 1 Taquann 法の概要

MWCNT 原末を 第三級ブチルアルコール (TB) に混合する。氷冷下でスパーテルを用いて攪拌し TB をシャーベット状にして十分に混和する (a)。TB への分散性を向上させることを目的として、 -25°C で一晩凍結したのち 60°C に加温した TB を加え凍結再融解を行う (b)。金属製フィルター (目開き $25\ \mu\text{m}$) でろ過し大型の凝集体を除く (c)。ろ液は直ちに液体窒素で凍結・固化させる (d)。固化した状態の MWCNT 懸濁液を固相のまま溶媒回収型真空ポンプで液相を介さずに乾燥させ、TB を分離除去することで、分散性の高い乾燥状態の MWCNT を得る (Taquahashi et al., JTS, 2013)。

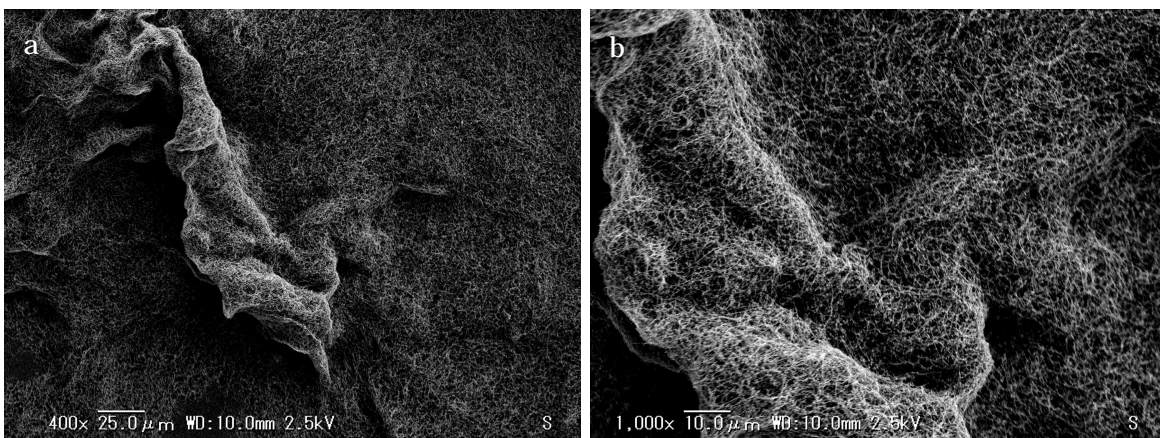
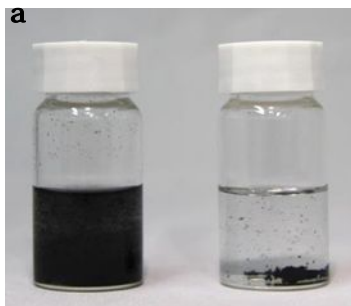
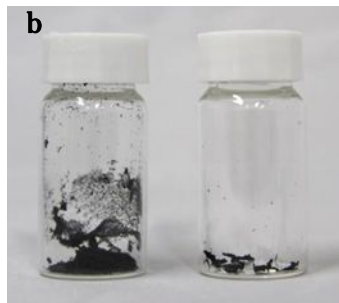


図 2 MWCNT-N 原末の走査型電子顕微鏡像

MWCNT-Nの原末は、肉眼観察ではフレーク状を呈し、走査型電子顕微鏡による観察では繊維が絡みあって不織布状の様相を呈している。本画像から繊維長の正確な値は計測できないが、10 μ mよりも長い繊維が高頻度に確認される。a: 400倍、b:1,000倍



a 左:160W x3分処理 超音波処理 (TB 懸濁液)
)



b 左:Taquann 処置 MWCNT-N (乾燥後)

図 3 MWCNT-N の Taquann 法処理検体 (懸濁液と乾燥後の肉眼像)

MWNT-7と同様の方法で分散処理ではMWCNT-NはTBに殆ど分散しない(a右)。高出力の超音波処理装置により分散し、良好な懸濁液が得られた(a左)。Taquann法処理検体(b左)は、粉末状の外観を呈し原末(b右)に比較して嵩高い(試料はいずれも5mg)。

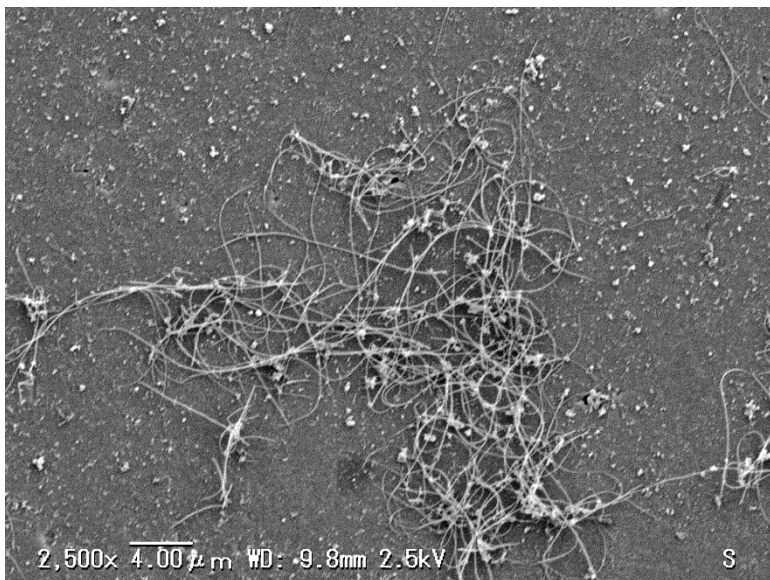
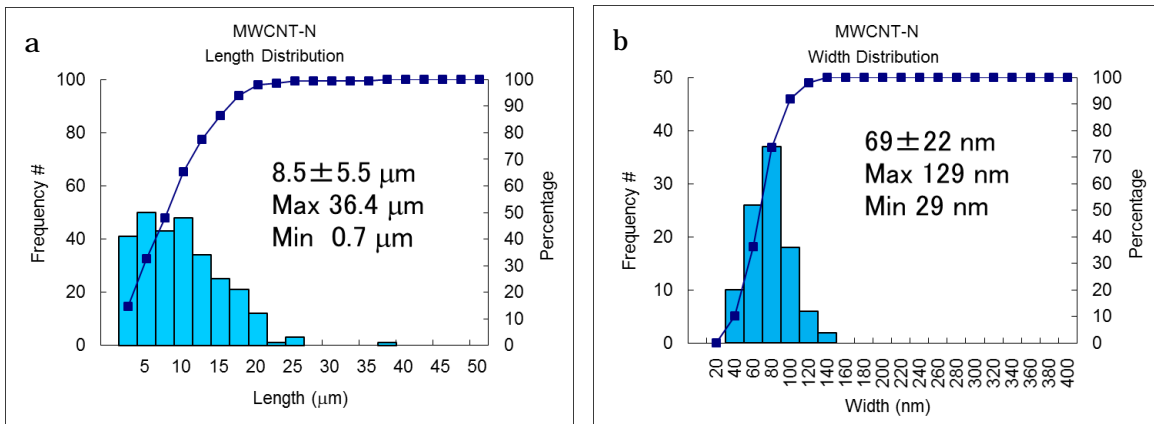


図 4 MWCNT-N の Taquann 法処理検体の SEM 像
原末に比し良く分散され、単離した繊維として観察される。



**図 5 MWCNT-N Taquann 法処理検体の
繊維長及び繊維径の分布**

走査型電子顕微鏡による観察の結果、Taquann 法処理を行った MWCNT-N の平均繊維長は $8.5 \pm 5.5 \mu\text{m}$ ($N=279$)、最大値 $36.4 \mu\text{m}$ 、最小値 $0.7 \mu\text{m}$ であった (a)。繊維の平均直径は $69 \pm 22 \text{ nm}$ ($N=100$)、最大値 129 nm 、最小値 29 nm であった (b)。繊維長のヒストグラムから $2.5 \mu\text{m}$ 以下の繊維は 14.7% 、 $5 \mu\text{m}$ 以上は 85.7% 、 $10 \mu\text{m}$ 以上は 52.0% であった。