

平成 28 年度 厚生労働行政推進調査事業費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

研究課題：ナノマテリアル曝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
(H27-化学-指定-004)

分担研究課題名：ナノマテリアルの慢性影響指標の開発に関する研究

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

研究分担者： 高橋 祐次 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 室長

研究協力者： 高木 篤也 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 室長

研究要旨

工業的に大量生産されるナノマテリアルの産業応用が急速進展する中、製造者及び製品利用者の健康被害の防止のための規制決定及び、業界における安全面からの国際競争力の保持の観点から、基礎的定量的な毒性情報を得る評価法の確立が急がれる。多層カーボンナノチューブ（MWCNT）の中皮腫誘発のポテンシャルに限っては、その粒子のサイズと形状が類似するアスベスト及び人工的繊維状代替物の発がん性評価に用いられた腹腔内投与試験系による比較的短期の試験により発がん性のハザード評価が可能であった。しかしながら、新規ナノマテリアルについては、たとえ原材料の毒性情報があったとしても、そのナノサイズによる毒性を評価し得る情報は一般的には存在せず、従って、ハザード評価や毒性発現メカニズムの想定は困難である。このような状況に於いては、毒性未知の物質を取り扱う基本的な戦略を適用する事で、見落としのない毒性評価を実施する必要がある。具体的には、ヒトで想定される暴露経路に即した動物実験によりハザード同定、メカニズム同定、及び用量作用情報の取得を行い、そこからヒトに対する毒性の推定と用量相関性の推定を行う必要がある。

研究分担者らは、上記の毒性試験を実施する際のナノマテリアル特有の問題点を解決する目的で、今までの諸研究からその物性や毒性の情報が利用可能な MWNT-7（Mitsui）をモデル物質として、高度分散法（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独自開発した（Taquann 直噴全身吸入装置）。本装置により、より一般的なナノマテリアルの高分散検体を比較的容易（従来の粉体吸入試験法の適用に比較して）に、マウス（ラットも原理的に可能である）に全身暴露吸入する目途が立った。

本研究では、サイズ、形状、組成が多彩で、異なった物理化学的特性を有する未検討の各種ナノマテリアル検体へ Taquann 法及び直噴全身吸入装置を

適用する際の具体的な微調整法を確立し、吸入毒性が評価可能であることを示すことを目的とする。本年度は、①マウスを用いたチタン酸カリウムの 5 日間反復全身曝露吸入実験、②Taquann 法による二層カーボンナノチューブ (DWCNT、岡山大学 林靖彦先生からの寄贈) のエアロゾル化の検討を行った。

昨年度の研究において、チタン酸カリウムは、MWNT-7 の条件で分散には問題はなかったが、MWNT-7 に比較して太く短く比重が大きいことから沈降速度が高く、同条件ではエアロゾル濃度を安定的に維持することが困難であることが判明した。本年度はより短間隔で直噴操作を行うプロトコルに変更し安定した濃度が得られた。5 日間反復全身曝露吸入実験を実施し、平均質量濃度は 4.1 mg/m^3 、平均 CPC カウントは $7,575/\text{cm}^3$ 、マウスの肺負荷量 (右肺) の平均値は $10.0 \mu\text{g}$ であった。DWCNT については、繊維長 $15 \mu\text{m}$ の検体についてエアロゾル化の検討を行い、Taquann 直噴全身吸入装置によりエアロゾル化が可能であったが、エアロゾルの粒子の中には束状の DWCNT が含まれており、分散化処理に更なる検討が必要であることが判明した。

A. 研究目的

工業的に大量生産されるナノマテリアルの産業応用が急速進展する中、製造者及び製品利用者の健康被害の防止のための規制決定及び、業界における安全面からの国際競争力の保持の観点から、基礎的定量的な毒性情報を得る評価法の確立が急がれる。多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の中皮腫誘発のポテンシャルに限っては、その粒子サイズから予測される毒性発現メカニズムにより、アスベスト及び人工的繊維状代替物の発がん性評価に用いられた腹腔内投与試験系によるハザード評価が可能であった¹⁻³⁾。しかしながら、新規ナノマテリアルの多くについては事前に毒性情報は存在せず、毒性発現メカニズムの予測も困難である。このような状況に対しては、ヒトの暴露経路に即した動物実験によりハザード及びメカニズム同定、用量作用関係を明らかにし、ヒトに対する毒性の推定と用量相関性の推定を行う手法

が有効である。ヒトがナノマテリアルに暴露される際の重要な侵入経路はそのエアロゾルの吸入である。従来、粉体の吸入曝露実験施設では、検体の特性に応じてエアロゾルを発生させる装置を新たに開発するか、大幅に改造する必要がある、時間と費用を要することが知られている。加えて、ナノマテリアルは容易に凝集する性質を有することから、ヒトが吸入可能な分散状態のエアロゾル化には、更なる技術開発や工夫が必要となることが多い。

研究分担者らは、MWCNT をモデル物質としながら、汎用性が高いシステムを目指して、高度分散法 (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独自開発した (Taquann 直噴全身吸入装置)⁴⁾。本装置により多層カーボンナノチューブ MWNT-7 の場合、凝集体・凝固体をほぼ除去した高分散検体をマウスに全身曝露吸入することが可能となった。この

システムの汎用性を確認するためにより広範な物理化学的特性を示すナノマテリアルへの適用を検討するため、本分担研究では、チタン酸カリウム及び二層カーボンナノチューブ（DWCNT）を対象に研究を進めている。

チタン酸カリウムは $K_2O \cdot 8TiO_2$ 、または $K_2O \cdot 6TiO_2$ で示される化合物でアスベスト代替繊維として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に産業応用されている。チタン酸カリウムはラット腹腔内投与実験により、中皮腫発癌を誘発することが報告されている⁵⁾。本研究では $K_2O \cdot 8TiO_2$ を検体として使用した。

DWCNT は岡山大学 林靖彦教授が開発したものを用いた。これは繊維長が極めて均一となる製法を用いたものである。

B. 研究方法

B-1. チタン酸カリウムのマウスを用いた5日間反復全身曝露吸入実験

(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を含めてナノマテリアルの吸入曝露実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； $25 \pm 1^\circ C$ 、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、および、チタン酸カリウム曝露群（目標濃度 5 mg/m^3 ）の2群構成とした。各群16匹のマウスを使用し、1日2時間（10:00～12:00）の吸入曝露を5日間連続で行い、合計10時間の曝露を行った。チタン酸カリウムの曝露濃度は、これまで実験を行ってきた 2 mg/m^3 の MWNT-7 と繊維数を合わせた濃度とした。Taquann 法処理した MWNT-7 の繊維数は、 3.0×10^6 本/ μg 、チタン酸カリウムは 1.2×10^6 本/ μg であり、単位重量当りの本数は MWNT-7 が 2.5 倍多いことから、本研究では、その 2.5 倍となる 5 mg/m^3 を目標濃度とした。

(4) チタン酸カリウムの高分散化処理

チタン酸カリウム ($K_2O \cdot 8TiO_2$)（大塚化学（株）より供与）は、高アスペクト比の繊維状粒子である。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¹⁾を行った（特許取得済み）。具体的には検体を第三級ブチルアルコール（TB、融点； $25.69^\circ C$ 、関東化学株式会社 特

級)に混合して、懸濁液を調製し、金属製フィルター(セイシン企業、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。固相状態のろ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、分散性の保たれた乾燥状態の検体を得られる。チタン酸カリウムは、超音波処理によって良好な懸濁液が得られるため、ろ過工程を省いた。ガラス製ボトルを用いて25 mgの検体を500 mLのTBと混合後、超音波浴槽(SU-3TH、出力40W、発振周波数34kHz、柴田科学)により超音波を5分間照射して懸濁液とし、後述する金属製カートリッジに分注し、直ちに液体窒素で凍結・固化させた。固相状態のろ液を溶媒回収型真空ポンプ(Vacuubrand、MD4CNT+AK+EK)により減圧してTBを昇華させて除去し乾燥検体を得た。

(5) ダスト発生装置

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)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4分間隔で噴射し、設定濃度を維持した。2時間の吸入曝露実験において、合計32本のカートリッジを使用した。

(6) 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り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(特許取得済)。

(7) 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/m^3)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、ローポリウムサンプラー(080050-155、 $\phi 55$ 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、 $\phi 55$ mm、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 $1.5 \text{ L}/\text{min} \times 120 \text{ min} = 180 \text{ L}$ 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。

(8) 解剖

5日間の反復吸入曝露終了後、各群3匹のマウスを解剖した。これらのマウスの右肺は肺に沈着したチタン酸カリウムの測定用とし、左肺は病理組織評価用とした。

マウスは吸入曝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分灌流して固定後、右肺を切り出し重量測定し凍結保存した。左肺は、同組成固定液に浸漬固定を行った。

(9) 肺沈着量測定

右肺をアルカリ溶解し、チタン酸カリウムを遠心分離により回収して肺沈着量の測定を行った。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°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。

マウス右肺（100～150 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°C に設定したインキュベーター内で48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。

アルミナフィルター（Anodisc、孔径0.02 μm、φ12mm、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_c ）を基に以下の式で計算した。

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

計測した1視野当たりの面積は、1,818 μm^2 （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。

並行して、無処置の肺にSDSに懸濁した1及び10 μg チタン酸カリウムを添加した検体を用意して同様に計測を行い、チタン酸カリウムの回収率を求めた。

B-2. DWCNTの分散化処理とエアロゾル化の検討

本研究に用いたDWCNTの性状は以下の通りである。本検体は、シリコン基板（20 mm×20 mm）の上に垂直に一定の長さでDWCNTが合成されている。

- Length : 5、10、15 μm
- Diameter : 1～3 nm
- Density : N/A
- Purity : >99wt% as CNTs
- Impurity: Iron
- Surface Morphology: High crystalline
- Substrate: Si with iron coating

本年度入手したサンプルは、5、10、及び15 μm の長さのDWCNTが乗った20 mm×20 mmの基板、各1枚ずつである。そのため、TB懸濁液は先行研究で用いた条件（40W×15分の超音波処理）で作成した。15 μm の検体についてのみ、Taquann直噴全身吸入装置Ver2.0を使用してエアロゾル化の検討を行った。

シリコン基板表面からDWCNTを剥離回収する方法として、剃刀を用いてそぎ取る方法を用いた。15 μm の検体については、得られた検体量は610 μg であった。この検体を30 mLのTBと混合し、超音波洗浄器（SU-3TH、出力40W、発振周波数34kHz、柴田科学株式会社）にて15分間の分散処理を行った。検体量が限られていることから、ろ過過程を省き、懸濁液を金属製カートリッジに10 mLの容量で分注した。エアロゾルの測定項目はCPCによる相対

濃度測定とエアロゾルの捕集による形状確認とした。

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、サンプリングポンプ（Asbestos sampling pump AIP-105、柴田科学）で3 L/minの流量で5分間吸引し、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。フィルターに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. チタン酸カリウムのマウスを用いた5日間反復全身曝露吸入実験

(1) チタン酸カリウムの吸入曝露実験
チタン酸カリウムの5日間反復全身曝露吸入実験の平均質量濃度は $4.1 \pm 0.8 \text{ mg/m}^3$ 、平均CPCカウントは $7,575 \pm 883/\text{cm}^3$ であった（表1）。直噴操作間隔を4分間にすることで、濃

度安定性が得られた（図2）。

(2) マウスの肺負荷量（右肺）

3匹のマウスから得られた右肺の平均肺沈着量は $10.0 \mu\text{g}$ であった。肺の湿重量から動物一匹当たりの沈着量に換算すると、 $15.0 \mu\text{g}/\text{動物}$ であり、繊維数に換算すると 18.0×10^6 本/動物であった。

肺に沈着した繊維長の平均値は $4.2 \pm 3.5 \mu\text{m}$ （ $N=1,563$ ）、最長は $36.8 \mu\text{m}$ であった（図3）。

C-2. DWCNTの分散化処理とエアロゾル化の検討

(1) TBへの分散化処理

DWCNTは20mm×20mmのシリコン基板表面に付着した状態で供給された（図4）。本研究で検討した条件において、DWCNTの懸濁液は微細な凝集体が目視できる状態であり、懸濁液が均一に黒色となる良好な懸濁液を得ることができなかった（図5）。懸濁液中のDWCNTを走査型顕微鏡で観察したところ、繊維が束となった状態の粒子が観察された（図6）。一部の繊維がほぐれている状態の像も観察されたが、複数の繊維が束になった状態であり、一次粒子まで分離はされていないものと考えられた。

(2) エアロゾル化の検討

Taquann直噴全身吸入装置 Ver2.0によりDWCNTのエアロゾル発生は可能であった。200 μg/カートリッジを3本噴射することによって、CPCのカウントは最大 $215/\text{cm}^3$ の値が得られた（図7）。

エアロゾル化したDWCNTの形状を

走査型電子顕微鏡で観察したところ、単離した繊維状のエアロゾルが観察されたが、100～300 nm 程度の繊維径であることから、100 本程度の DWCNT 単繊維が束状になったエアロゾルと考えられた (図 8)。

D. 考察

本年度は、マウスを用いたチタン酸カリウムの全身曝露吸入実験と、DWCNT の全身曝露吸入実験の準備として Taquann 法による DWCNT の分散処理とエアロゾル化の検討を実施した。

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、昨年度の研究結果により、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 である。これらの値はこれまで研究分担者らが吸入曝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。また、比重が大きく (MWNT-7 ; $1.9\text{-}2.1^{6)}$ 、チタン酸カリウム ; $3.3 \sim 3.5^{7)}$ 、沈降が速いことがエアロゾル濃度を不安定にする原因と考えられた。そのため、本年度は 4 分間隔と MWNT-7 より短い間隔で検体を噴射することでこれを解決した。しかしながら、現在保有しているカートリッジ数では 2 用量の曝露に対応できなかったため、チタン酸カリウム曝露群は 16 匹×1 用量のみとした。

チャンバー内の濃度は前年度の検討結果に比較して安定したが、日間変動は大きく、また、質量濃度に関しては $3.0 \sim 4.9 \text{ mg/m}^3$ と目標濃度の 5 mg/m^3 を下回った。CPC カ

ウントに関しては $6,355 \sim 8,523/\text{cm}^3$ の範囲で変動があった。現在のところ、この変動原因については不明である。

3 匹のマウスから得られた右肺の平均肺沈着量は $10.0 \mu\text{g}$ であった。これまでの検討結果及び本研究で並行して測定した無処置群の結果から、右肺の湿重量は全肺の約 67% を占める。この値から動物一匹当たりの沈着量に換算すると、 $15.0 \mu\text{g}$ /動物であり、繊維数に換算すると 18.0×10^6 本/動物であった。研究分担者らは Taquann 法処理した MWNT-7 を 2.3 mg/m^3 、CPC カウント $2,519/\text{cm}^3$ の条件でマウスに 5 日間曝露した際の肺負荷量は $8.2 \mu\text{g}$ /動物、繊維数としては 24.6×10^6 本/動物であることを報告している⁸⁾。本研究結果で得られたチタン酸カリウムの肺沈着量の繊維数は MWNT-7 とほぼ同様な値であり、MWNT-7 と同程度の繊維数を負荷するという目的は達成されたものと評価される。

肺に沈着した繊維長の平均値は $4.2 \pm 3.5 \mu\text{m}$ 、最長は $36.8 \mu\text{m}$ であり、原末と同様の繊維長分布であると考えられた。

今後は、このマウスの長期観察を行い、慢性影響を調べる計画である。

DWCNT については、繊維長 $15 \mu\text{m}$ の検体についてエアロゾル化の検討を行い、Taquann 直噴全身吸入装置 Ver2.0 によりエアロゾル化が可能であったが、エアロゾルの粒子の中には 100 本程度の単繊維が束状となった粒子が含まれていたため、これをさらに分散する処理方法の検討が必要である。本年度は、検体量が微量であったため、分散処理の十分な検討が行えなかった。今後の対応とし

ては、①触媒として用いられている鉄を塩酸により除去、②より強力な超音波処理の実施、が考えられる。来年度は量産化により動物実験に十分な量の DWCNT の入手が可能となる計画であるため、上記の条件検討を行い、マウスを用いた全身曝露吸入実験を実施する計画である。

E. 結論

チタン酸カリウムについては、Taquann 法及び直噴全身吸入装置を適用する際の具体的な微調整法を確立し、吸入毒性が評価可能であることを示した。今後、このマウスの長期間観察を行い、慢性影響を調べる計画である。DWCNT については、十分な検体が入手でき次第、吸入曝露実験方法の検討を行う。一方で、Taquann 直噴全身吸入装置は、1mg に満たない検体量であってもエアロゾル化が可能であり、本システムは少量新規の検体について効率的な有害性評価が可能であることが示された。

謝辞：

本研究の遂行にあたり、技術的支援をいただいた、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/>

8. Taquahashi Y, Takagi A, Ogawa Y, Morita K, Tsuji M, Imaida K, Jun Kanno, A comparison

of lung burden between pristine and highly-dispersed, aggregate/agglomerate-eliminated MWCNT (Taquann method) in whole body inhalation exposure to mice. J Toxicol Sci. (2016);41 Supplement, S201.

G. 研究発表

1. 論文発表

菅野 純、ナノマテリアル毒性のとりえ方とその難しさ、医学のあゆみ、259 巻 3 号、217-222、2016
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マテリアル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

2. 学会発表

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 のマウス全身曝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)
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 吸入曝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

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

Kanno J, Taquahashi Y, Introduction to Nanomaterials safety: Predicting the chronic effects. XIV International Congress of Toxicology (ICT2016) Merida-Mexico, (2016.10.3), Symposium

Yuhji Taquahashi, 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

Jun Kanno, Yuhji Taquahashi, Atsuya Takagi, Masaki Tsuji, Koichi Morita, 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

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

菅野純、高橋祐次、「高分散性ナノマ

「テリアル調製方法」の特願
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

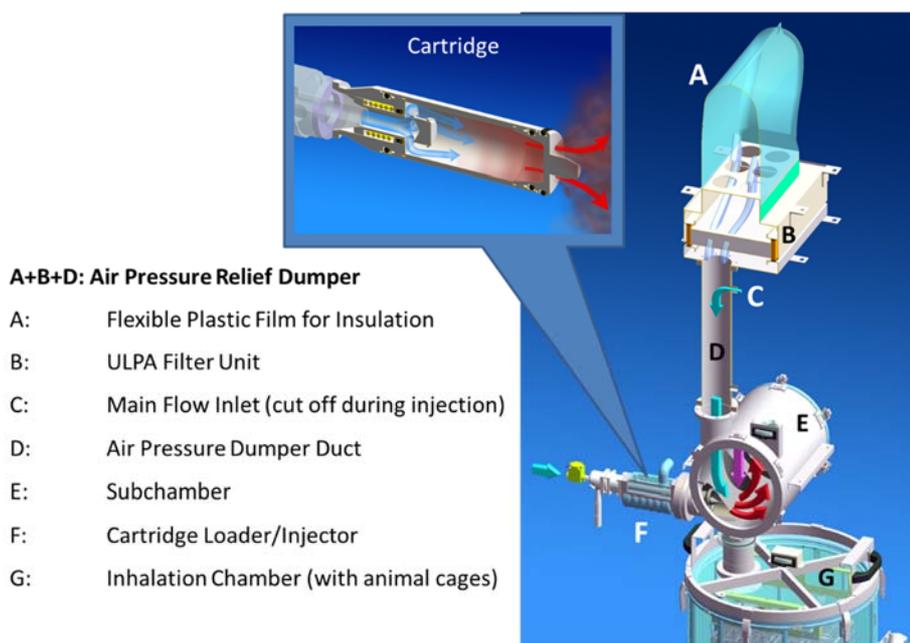


図1 Taquann Direct-Injection Whole Body Inhalation System version 2.5

チタン酸カリウムのアερο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)

表1. チタン酸カリウムの吸入曝露実験におけるチャンバー内のアεροゾル濃度

	1st	2nd	3rd	4th	5th	Average	SD
Mass Concentration (mg/m ³)	3.0	3.8	3.8	4.9	4.9	4.1	0.8
CPC Average(0-120min, #/cm ³)	8,523	7,048	8,232	6,355	7,718	7575	883
Max.	12,876	9,906	11,292	8,828	10,920		

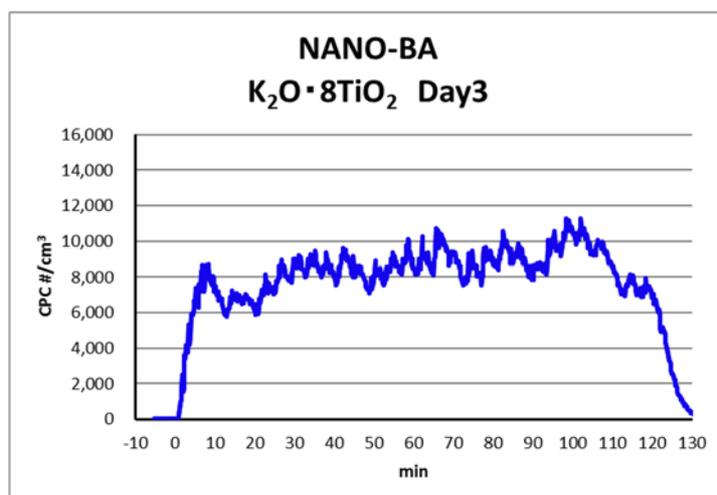
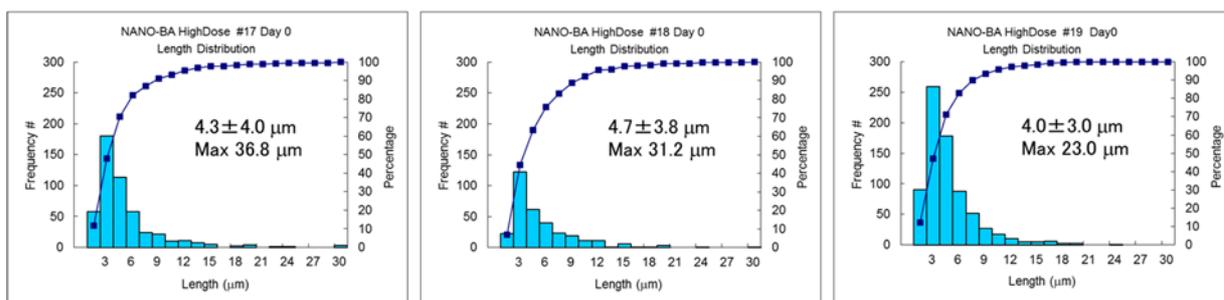


図 2 チタン酸カリウムのチャンバー内 CPC カウント推移

チタン酸カリウムのカートリッジからの直噴操作間隔を 4 分間にすることで、濃度安定性が得られた。



Lung Burden (Right) 9.8 μg
 Lung weight (Right) 152 mg
 Lung Burden (total, calculated) 14.7 μg
 N=498

Lung Burden (Right) 6.6 μg
 Lung weight (Right) 103 mg
 Lung Burden (total, calculated) 9.9 μg
 N= 323

Lung Burden (Right) 13.6 μg
 Lung weight (Right) 100 mg
 Lung Burden (total, calculated) 20.5 μg
 N=742

Mean Lung Burden (Right) 10.0 μg
Mean Lung Burden (total, calculated) 15.0 μg
Number of Fibers (total, calculated) 24.6 x 10⁶

図 3 チタン酸カリウムの肺負荷量

3匹のマウスから得られた右肺の平均肺沈着量は 10.0 μg であった。肺の湿重量から動物一匹当たりの沈着量に換算すると、15.0 μg/動物であり、繊維数に換算すると 18.0 × 10⁶ 本/動物であった。

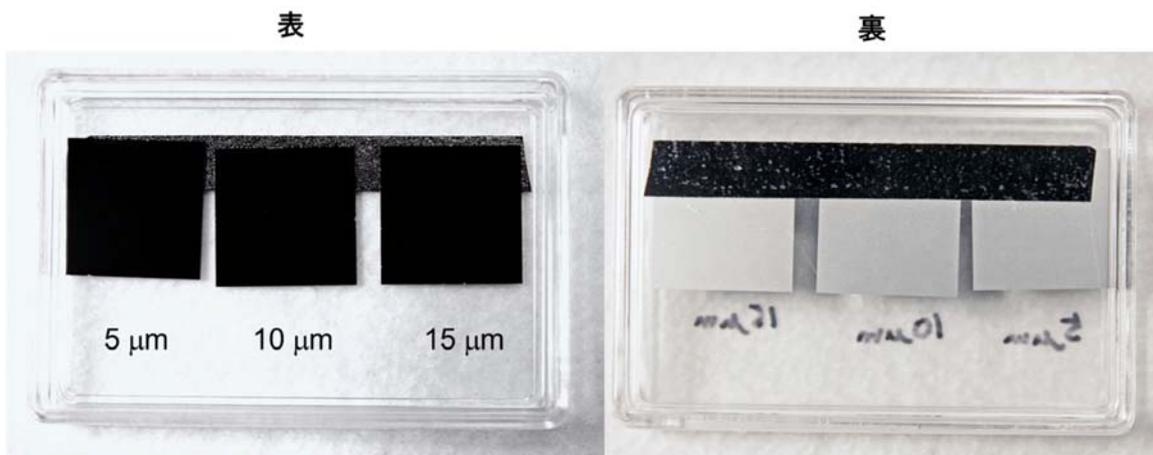


図4 DWCNT サンプルの外観



図5. DWCNT の懸濁液の外観

DWCNT を第三級ブチルアルコールに混合し、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た。本条件では、良好な懸濁状態が得られなかった。

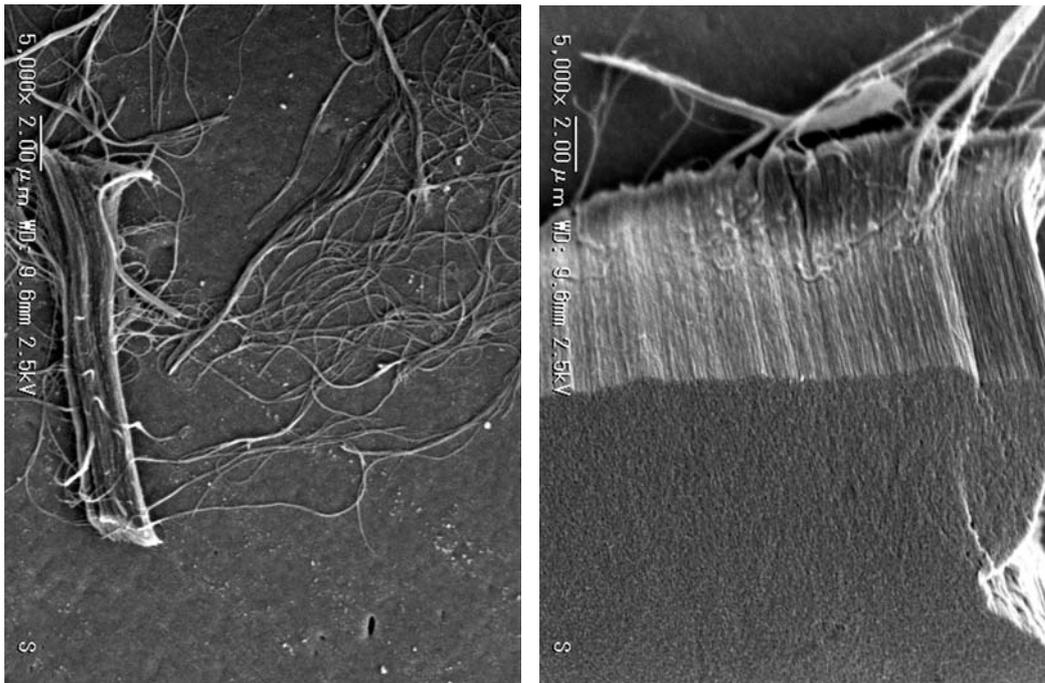
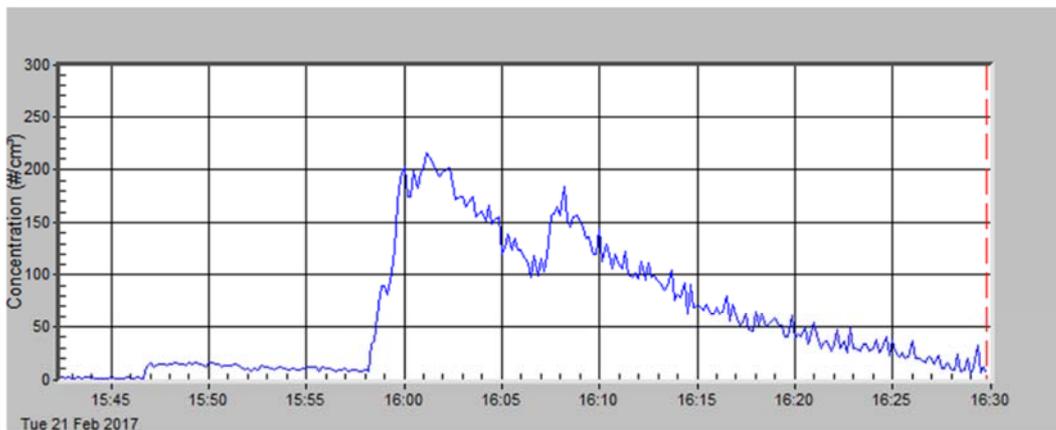


図 6. 懸濁液中の DWCNT の走査型電子顕微鏡像

懸濁液中の DWCNT を走査型顕微鏡で観察したところ、繊維が束となった状態の粒子が観察された。一部の繊維がほぐれている状態も観察されたが、複数の繊維が束になった状態であり、一次粒子まで分離はされていないものと考えられた。



CPC TSI Model 3778
 sampling: 1.5LPM
 Dilution: off
 CPC count Max: 215 /cm³

図 7. 暴露チャンバー内の DWCNT (15μm) CPC データ

Taquann 直噴全身吸入装置 Ver2.0 により DWCNT のエアロゾル発生は可能であった。200 μg/カートリッジを 3 本噴射することによって、CPC のカウントは最大 215/cm³ の値が得られた。

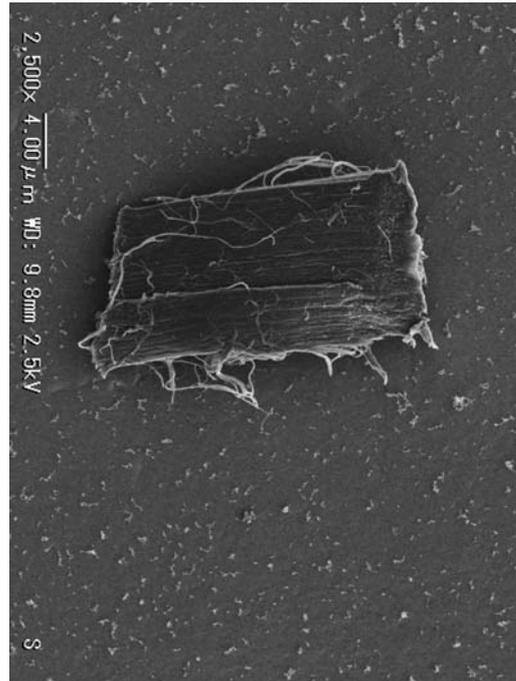


図 8.DWCNT のエアロゾルの形状

エアロゾル化したDWCNTの形状を走査型電子顕微鏡で観察したところ、単離した繊維状のエアロゾルが観察されたが、100～300 nm程度の繊維径であることから、100本程度のDWCNT単繊維が束状になった粒子と考えられた。