

平成 29 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

研究課題名: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	大西 誠	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 試験管理部分析室 技術専門役
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、単離繊維成分が豊富な分散性の高い検体を調製すること、及びMWCNTの肺負荷量の経時的変化の解析である。

高分散検体の供給では、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、MWNT-7及びMWCNT-Nについて処理を行い研究代表者に供給した。肺負荷量測定に関しては、測定のための準備を行った。TIPSでは投与した検体のほぼ全量が肺に負荷されるが、2週間の投与期間後に最長104週まで経過観察を行うため肺負荷量の減衰を把握する必要がある。研究分担者は、Benzo[ghi]peryleneをマーカーとしてMWCNTを定量する方法(大西法)を開発している。今年度は、Taquann法処理したMWCNTに適応可能であるかを検討した。その結果、MWNT-7とマーカーの面積値は、相関係数0.9997であり、MWNT-7を測定するために、良好な直線性を示した。これらのことから、MWNT-7は0.2~2.0 µg/mLの範囲内で、正確な定量が可能であることが示された。次年度は、TIPSにより検体を投与した肺サンプルを用いた測定を実施する計画である。

## 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こと、及びMWCNTの肺負荷量の経時変化の解析である。

MWCNTに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(以下、凝集成分)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、凝集成分によるこのよう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。

TIPSは吸入曝露とは異なり、投与した殆どが肺に負荷されるため初期負荷量の把握は容易であるが、投与後の2週間は休薬して経時的な観察を行うため、肺及び胸腔内の病変と肺負荷量の関係を明らかにするためには、その減衰を調べる必要がある。本分担研究では、Benzo[ghi]peryleneをマーカーとしてMWCNTを定量する方法(大西法)を用い、Taquann法処理したMWCNTに適応可能であるかを検討した。

## B. 研究方法

### B-1 MWNT-7 Taquann 処理検体(図1)

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ターシャルブタノール(以下、TB、融点; 25.69℃)約250 mLを加えてステンレス製のスパー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ーテルで攪拌し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、出力40W)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(FM34FT.P.C. DC MOTOR、振動量: 17.6m/s<sup>2</sup>)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MWNT-7懸濁液を固相のまま溶媒回収型真空ポンプ(Vacuubrand、MD4C NT+AK+EK)でTBを液相を介さずに蒸散(昇華)させ分離除去し、MWNT-7の高分散性の乾燥検体を得た。

### B-2 MWCNT-N Taquann 処理検体

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。粉末~繭状凝集体の外観を呈するMWNT-7とは大きく異なる。

MWCNT-Nの原末500 mgをビーカーに

とり、35℃ に加温して溶解した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懸濁した。次に、懸濁液を氷冷しながらホイッパーで攪拌しシャーベット状になった状態で均一な懸濁を得るまで十分に攪拌し1,000 mL容量のメディアウム瓶に移し、-25℃ で一晩、凍結状態で静置した。次いで、これに約60℃ に加温したTBを添加し融解して全量1,000mLの懸濁液とした。

この、凍結再融解したMWCNT-NのTB懸濁液に対しサンプル密閉式超音波破砕装置 BIORUPTOR®UCD-250HSA (コスモ・バイオ株式会社)にて、出力160W、30秒間の超音波照射を6回繰り返し、MWCNT-Nが十分に分散した懸濁液を得た。以降、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。

### B-3 MWNT-7 Taquann処理検体のマーカー法による測定方法の検討

低分子化合物の体内動態は、mass spectroscopyあるいはisotopeを用いて定量することが一般に行われている。カーボンナノチューブ(CNT)の体内動態の測定にもこれに準じた方法が適用され、isotopeとmass spectroscopyを使用する方法、Raman分光を使用する方法、組織を灰化して除去後更に高温でCNTをメタンとして定量する方法が報告されている。一方、研究分担者らはカーボンナノチューブの表面に存在するグラフェン構造面に対して、グラファイト積層と同様の選択制のある結合を示す、低分子吸着マーカー分子を用いた、MWCNTの極微量定量法を開発している(図2)。具体的には、マーカー分子としてBenzo[ghi]perylene (BgP)を用い、MWCNTと混合してBgPをMWCNTの表面に吸着させる。過剰なBgPを洗浄除去後、MWCNT表面からBgPを抽出しHPLCにて定量し、MWCNTの質量に換算する(個々のMWCNT検

体毎に、検量線が得られることを確認して実施する)。既に技術は確立済みであるが、Taquann法処理したMWCNTにはTBが重量比で0.0306%吸着することが明らかとなっており、これが測定系に影響を与えることが想定されることから、Taquann法処理検体について測定法の検討を行った。

#### (1) HPLC測定条件

HPLC：ウォータース Acquity UPLC

カラム：Acquity BEH C18 (ウォータース)

カラム粒径、長さ × 内径：1.7 μm、100 mm × 2.1 mm

カラム温度：40

検出器：蛍光検出器(励起波長：294 nm、蛍光波長：410 nm)

試料注入量：5 μL

移動相組成：アセトニトリル：メタノール：蒸留水 =75：20：5

移動相流量：0.5 mL/min

#### (2) Taquann法処理MWNT-7原液の調製

Taquann法処理MWNT-7(T-CNT) 約5 mgを10 mL容のフタ無しガラス試験管に精密に秤量し、アルカリ性次亜塩素酸洗浄剤(Clean 99-K200、以下C99、クリーンケミカル株式会社)を2 mL加えてタッチミキサーで分散させ、100 mL容のフタ・メモリ付のPPチューブへ移し、この操作を4回繰り返し、最後にC99で100 mLにメスアップした。その溶液を超音波分散機(VP-30S、タイテック)により、発振周波数20 kHz、出力300Wの条件で1分間超音波を照射し検体を分散させた。

#### (3) 検量線溶液の調製

所定量のT-CNT原液をPPチューブに採取し、C99にてメスアップし、1分間超音波を照射して分散させ、下記の検量線液C1～C6を調製した。

試料名	C5採取量 (mL)	C99添加量 (mL)	濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )
溶液C1	0.1	0.9	0.2
溶液C2	0.2	0.8	0.4
溶液C3	0.4	0.6	0.8
溶液C4	0.6	0.4	1.2
溶液C5	0.8	0.2	1.6
溶液C6	1.0	0.0	2.0

#### (4) マーカー溶液の調製

200mL 容 の メ ス フ ラ ス コ に Benzo[ghi]perylene(マーカー)約1mgを秤量し、アセトニトリルを加え十分に溶解し、アセトニトリルでメスアップしてBgPのマーカー原液(5.0  $\mu\text{g/mL}$ )とした(冷暗所に保存)。マーカー原液0.8 mLにアセトニトリル2 mL加え混合攪拌した溶液2.5 mLを9.6%PBS水溶液+ 0.1% Tween水溶液 (TW-mixture) 50 mLに加え混合攪拌し、マーカー溶液とした。

#### (4) 試料の前処理とHPLCによる測定

各検量線溶液1 mLに沈殿硬化液(バイオアッセイ研究センターにて開発)をそれぞれ60  $\mu\text{L}$ ずつ添加した。10秒間超音波を照射して分散し、遠心分離機 (Microfuge® 22R Centrifuge、ベックマンコールター)にて 12000 rpm、10分間の条件で遠心分離した。上清を除去し、TW-mixtureを1 mL加え、再度12000 rpmで10分間遠心分離した。上清を除去し、それぞれに濃硫酸(和光純薬工業株式会社)0.2mLを加え、残渣を分解し、タッチミキサーで10秒間攪拌した。その後、マーカー溶液1 mLをそれぞれに添加し、10秒間超音波分散し、振とう機 (TS-100、サーマル化学産業株式会社)で15分間攪拌させた後、0.8  $\mu\text{m}$ のフィルター(ワットマン: GE Healthcare UK Ltd)でろ過したフィルター上のMWNT-7をポンチ(8 mm $\phi$ )でくり抜き、PP試験管に入れ、アセトニトリル1 mLを加え、タッチミキサーで10秒間攪拌・抽出し、その溶

液をHPLCで測定した。

## C. 研究結果及び考察

### C-1 Taquann法処理検体の調製

Taquann法処理により、MWNT-7 210 mg、MWCNT-N 166mgを調製した。

### C-2 マーカー法によるT-CNTの検量線

Taquann処理されたT-CNTの検量線を図3に示した。T-CNTとマーカーの面積値は、相関係数0.9997であり、良好な直線性を示した。これらのことから、T-CNTは0.2~2.0  $\mu\text{g/mL}$ の範囲内で、正確な定量が可能であることが示された。尚、Taquann処理の有無は、少なくともMWNT-7の測定に対しては影響しなかった。

次年度は、TIPSにより検体を投与した肺サンプルを用いた測定を実施する計画である。

## D. 結論

Taquann法にて分散処理を施したMWNT-7、及びMWCNT-Nについては、マーカー法にて測定が可能であることが示された。また、Taquann処理が測定に影響する可能性は低いことが確認された。

## E. 健康危機情報

なし

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Take M, Takeuchi T, Hirai S, Takano K, Matsumoto M, Fukushima S, Kanno J., Distribution of 1,2-dichloropropane in blood and other tissues of rats after oral administration. J Toxicol Sci. 2017;42(2):121-128

### 2. 学会発表

大西誠、三角恭兵、笠井辰也、山本正弘、鈴木正明、佐々木俊明、浅倉眞澄、平井繁行、福島昭治、菅野純 N-SHOT Cyclone による多層カーボンナノ

チューブの浮遊係数の比較、第 44 回日本毒性学会学術年会(2017.7)

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Yuhji Taquahashi, Koichi Morita, Masaki Tsuji, Yoko Hirabayashi, Akihiko Hirose and Jun Kanno, A short-term whole-body inhalation study of potassium titanate whisker in mice with an improved dispersion and inhalation system, The 57th Society of Toxicology, Henry B. Gonzalez Convention Center, San Antonio, Texas, USA, 12 March, 2018., Poster

### G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

#### 1. 特許取得

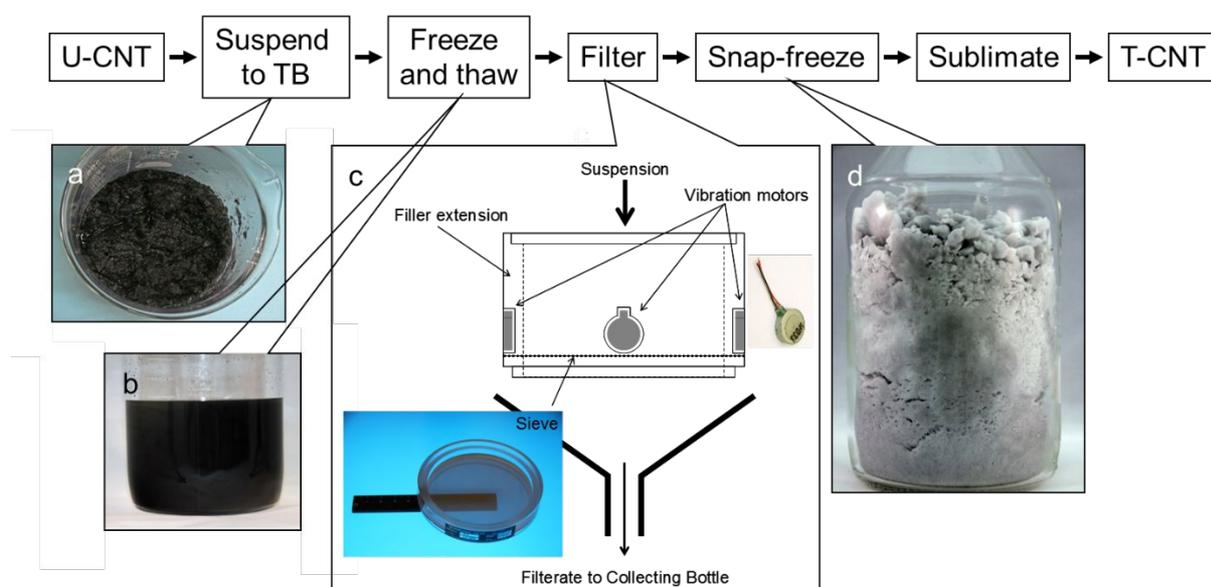


図 1 Taquann 法の概要

MWCNT 原末をターシャルブタノール (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、 $-25^{\circ}\text{C}$  で一晩凍結したのち  $60^{\circ}\text{C}$  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)。

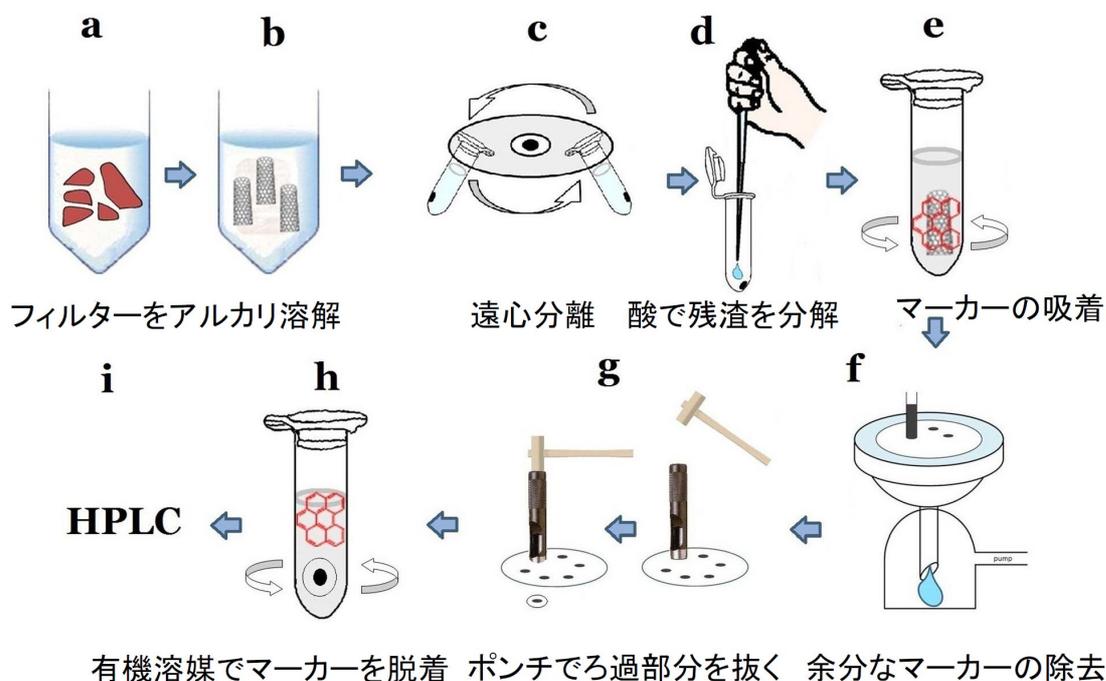


図 2 マーカーを用いた MWCNT 微量定量法（大西法）の概要

MWCNT の質量に比例して吸着するマーカーを用いた極微量定量法（大西法）。マーカーとして Benzo[ghi]perylene (BgP)を用い、MWCNT と混合して BgP を MWCNT の表面に吸着させる。過剰な BgP を洗浄して除去後、MWCNT 表面から BgP を抽出して HPLC にて定量し MWCNT の質量に換算する。

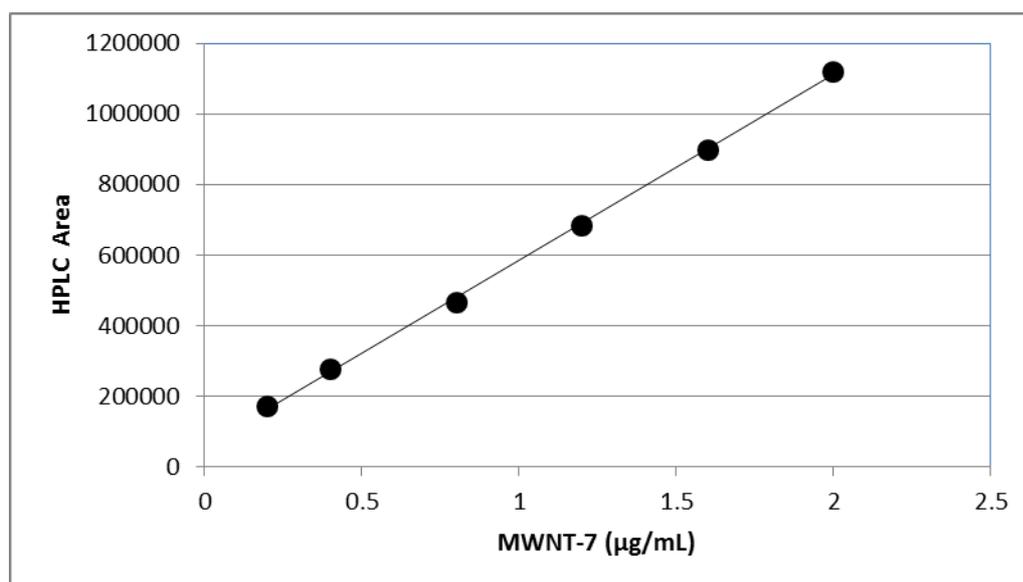


図 3 Taquann 処理 MWNT-7 (T-CNT) の大西法による検量線

T-CNT とマーカーの面積値は、相関係数 0.9997 であり、T-CNT を測定するために、良好な直線性を示した。これらのことから、MWNT-7 は 0.2~2.0 µg/mL の範囲内で、正確な定量が可能であることが示された。