

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)
分担研究報告書

研究課題名: ナノ材料の吸入曝露によるヒト健康影響の評価手法に関する研究
-生体内マクロファージの機能に着目した有害性カテゴリー評価基盤の構築-

分担研究課題: ナノ材料の組織負荷量の測定

研究分担者 大西 誠 労働者健康安全機構・日本バイオアッセイ研究センター

研究要旨

ナノ材料の曝露による肺内のナノ材料の負荷量の測定は、ナノ材料が肺内の沈着量を正確に把握する上で重要である。本研究では、Taquann 法にて分散処理を施した多層化カーボンナノチューブ(T-CNT7)を用い、全身吸入装置により一定期間曝露直後、1、4 および 8 週後における肺内の T-CNT7 の負荷量を測定することで、ナノ材料の曝露による生体影響評価を検討した。その結果、1 mg/m³ 曝露のマウスの肺当りの肺負荷量は、曝露直後では 6.30 µg/g、1 週目では 4.59 µg/g、4 週目では 5.42 µg/g、8 週目では 5.39 µg/g でやや減少傾向であった。また、3 mg/m³ 曝露のマウスの肺当りの肺負荷量は、曝露直後では 10.15 µg/g、1 週目では 9.98 µg/g、4 週目では 10.84 µg/g、8 週目では 10.25 µg/g で一定に推移した。Taquann 法にて分散処理を施した T-CNT7 を全身吸入装置により曝露後、1、4 および 8 週後における肺内の T-CNT7 の負荷量の時間に伴う曝露後の推移は、1 mg/m³ 曝露群の沈着量はやや減少傾向であったが、3 mg/m³ 曝露群の沈着量は、本測定法による沈着量はほぼ一定に推移する傾向を示した。

A. 研究目的

本研究事業は、工業的ナノ材料(NM)の非意図的曝露経路であり有害性発現が最も懸念される吸入曝露において、曝露したナノ材料の肺内における負荷量である沈着量を把握することにより、ナノ材料の生体影響を評価することである。

平成29年度の実験研究では分散処理を施した多層化カーボンナノチューブ(T-CNT7)を用い、全身吸入装置により一定期間曝露後、1、2、4 および8週後における肺組織における肺内の T-CNT7の負荷量を測定することで、ナノ材料の曝露による生体影響評価を検討した。

B. 研究方法

B-1: 試験材料

B-1-1: 多層カーボンナノチューブ(MWCNT)

試薬名: T-CNT7

前処理: Taquann処理

保管条件: 室温

B-2: 装置、器具及び試薬

B-2-1: HPLC

メーカー: ウォーターズ

形式: Acquity UPLC

B-2-2: 電子天秤

メーカー: (株)日本シイベルワーグナー

形式：AE163
B-2-3：振とう機
メーカー：サーマル化学産業株式会社
形式：TS-100
B-2-4：遠心分離機
メーカー：ベックマンコールター株式会社
形式：Microfuge® 22R Centrifuge
B-2-5：超音波分散機
メーカー：タイトック株式会社
形式：VP-30S

B-3：試薬
B-3-1：アセトニトリル
メーカー：富士フィルム和光純薬株式会社
形式：HPLC用
B-3-2：メタノール
メーカー：富士フィルム和光純薬株式会社
形式：HPLC用
B-3-3：Benzo[ghi]perylene(BgP)
メーカー：富士フィルム和光純薬株式会社
形式：試薬特級
B-3-4：Tween
メーカー：富士フィルム和光純薬株式会社
形式：TWEEN 80
B-3-5：PBS
メーカー：日水製薬株式会社
形式：タルベッコPBS(-)粉末
B-3-6：C99
メーカー：クリーンケミカル株式会社
形式：Clean99-K200

B-4：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

B-5：溶液調製

B-5-1：T-CNT7原液の調製

分析を実施する前日に、T-CNT7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、Clean 99-K200 (C99) 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にメスアップする。その溶液を超音波分散機により1分間、超音波分散する。(以下用いる周波数と強度は20 kHz、300 Wで共通)(T-CNT7原液：50 μg/mL) なお、分析を実施する当日に、この溶液は超音波分散機により1分間、超音波分散を行って下記の分析に用いる。

B-5-2：検量線溶液C6の調製

B-5-1項で調製したT-CNT7原液0.4 mLを15 mL容のフタ・メモリ付のPPチューブに採取し、C99により10 mLにメスアップし、1分間超音波分散する。(検量線溶液C6：2 μg/mL)

B-5-3：検量線溶液 (C1～C6)の調製

B-5-2項で調製した検量線溶液C6を採取し、2mL容の遠心分離用チューブに入れ、さらにC99をそれぞれの量を添加して検量線溶液 (C1～C6)を作成した(表1)。

B-5-4：マーカ溶液の調製

200mL容のメスフラスコにBenzo[ghi]perylene(マーカ)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のマーカ原液(5.0 μg/mL)とする(冷暗所に保存)。その溶液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、

マーカー溶液とする。

B-6：測定試料

B-6-1：測定試料

図 1 に本研究の実験デザインを示した。Taquann処理されたT-CNT7を吸入曝露したマウスの構成を対照群 (0 mg/m³) と低用量群 (1 mg/m³)、高用量群 (3 mg/m³) とし、各3検体の曝露直後、1、4、8週目 (合計36検体) とした。

曝露は1日に2時間 (10:00 ~ 12:00)、週に1日の曝露を5週間繰り返し、各群2時間 × 5回の計10時間の吸入曝露を行った。5回 (計10時間) の曝露を終了した日をday 0 (0W) とし、0Wの午後2:00 ~ 6:00に初回の解剖、その後、1週、4週、8週に各群3匹ずつをイソフルランによる吸入麻酔下で、T-CNT7のサンプリング材料への汚染を防ぐため局所の被毛を除去して開胸し、腋窩動脈の切断により放血して安楽死させてから肺を摘出した。その肺は、10%ホルムアルデヒド・リン酸緩衝液で浸漬したサンプルを日本バイオアッセイ研究センター (JBRC) に持ち帰り、組織負荷量の測定のために保管した。

B-7：試料の調製

10%中性リン酸緩衝ホルマリン液に1か月以上浸透した試料の肺を100 mLのC99で一晩かけて溶解する。溶解した溶液は60秒間超音波分散する。その溶液中のT-CNT7の量が検量線の範囲に入るようにC99で希釈し、60秒間超音波分散する。

B-8：試料の前処理とHPLCによる測定

図 2 にT-CNT7の前処理について示した。B-5-3及びB-7項で調製した各溶液1 mLに沈殿硬化液 (当センターの研究開発による溶液) をそれぞれ60 µLずつ添加する。10秒間超音波分散し、12000 rpmで10分間遠心分離する。その上澄み液を除去し、TW-mixtureを1 mL加え、12000 rpmで10分間遠心分離する。その上澄み液を除去し、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秒間攪拌する。その後、12.4 mLで調製したマーカー溶液1 mLをそれぞれに添加し、10秒間超音波分散し、振とう機で15分間攪拌させた後、0.8 µm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T-CNT7をポンチ (8 mmφ) 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で測定する。

B-9：肺内のT-CNT7の沈着量の計算方法

T-CNT7の検量線で設定された濃度と面積値から、最小自乗法により検量線の傾きと切片より直線回帰式を求める。肺試料のHPLCで測定した面積値を直線回帰式に代入し、T-CNT7の測定値を求め、希釈倍率を乗じることにより、T-CNT7の肺個体当りの肺内沈着量 (単位: µg) と、それらの3匹当りの平均値及び標準偏差を求める。また、試験委託者から通達された各肺の重量で除することにより肺当りの値 (単位: µg/g) とそれらの平均値及び標準偏差を求める。

C . 研究結果及び考察

C-1: 検量線

Taquann処理されたT-CNT7の検量線を図 3 に示した。その結果、T-CNT7とマーカーの面積値は、相関係数0.9997であり、T-CNT7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、T-CNT7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。

C-2: マウス肺内のT-CNT7の肺負荷量

表 2及び図 4に、Taquann処理されたT-CNT7を吸入曝露したマウス肺内のT-CNT7の肺負荷量の結果を示した。

その結果、1 mg/m³曝露のマウスの肺当りの肺負荷量は、曝露直後では6.30 µg/g、1週目では4.59 µg/g、4週目では5.42 µg/g、8週目では5.39 µg/gでやや減少傾向であった。また、3 mg/m³曝露の

マウスの肺当りの肺負荷量は、曝露直後では10.15 µg/g、1週目では9.98 µg/g、4週目では10.84 µg/g、8週目では10.25 µg/gで一定に推移した。なお、0 mg/m³ 曝露のマウスの肺当りの肺負荷量は認められなかった。以上のことから、Taquann法にて分散処理を施したT-CNT7を全身吸入装置により曝露後、1、4および8週後における肺内のT-CNT7の負荷量の時間に伴う曝露後の推移は、1 mg/m³曝露群の沈着量はやや減少傾向であったが、3 mg/m³曝露群の沈着量は、本測定法による沈着量はほぼ一定の傾向を示した。

D. 結論

Taquann法にて分散処理を施したT-CNT7の全身吸入曝露により、肺内のT-CNT7をBgPマーカーを用いて測定した結果、曝露直後、1、4および8週後における肺当りのT-CNT7の負荷量は1 mg/m³曝露では6.30 µg/g、4.59 µg/g、5.42 µg/g、及び5.39 µg/gであり、3 mg/m³曝露では10.15 µg/g、9.98 µg/g、10.84 µg/g及び8週目では10.25 µg/gであった。1 mg/m³曝露群の沈着量はやや減少傾向であったが、3 mg/m³曝露群の沈着量は、本測定法による沈着量はほぼ一定に推移する傾向を示した。

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

Ohnishi M, Suzuki M, Yamamoto M, Kasai T, Kano H, Senoh H, Higashikubo I, Araki A, Fukushima

S. Improved method for measurement of multi-walled carbon nanotubes in rat lung. J. Occup. Med. Toxicol. 11:44 2016.

Kasai T, Umeda Y, Ohnishi M, Mine T, Kondo H, Takeuchi T, Matsumoto M, Fukushima S. Particle and Fibre Toxicology 13:53 2016.

2. 学会発表

大西 誠、笠井辰也、東久保一郎、荒木明宏、福島昭治
新開発の粉塵発生装置(N-SH0t Cyclone)による多層の多層カーボンナノチューブのエアロゾルの観察及びマーカー法による微量定量の検討
第 89 回日本産業衛生学会学術年会(2016.5.27)

大西誠、笠井辰也、山本正弘、鈴木正明、平井繁行、福島昭治
N-SH0t Cyclone によるナノ酸化チタンの浮遊係数の提案
第 43 回日本毒性学会学術年会(2016.7.1)

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-SH0t 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)

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他

なし

表 1 検量線溶液の調製

試料名	C6採取量 (mL)	C99添加量 (mL)	濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
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

図 1 実験デザイン

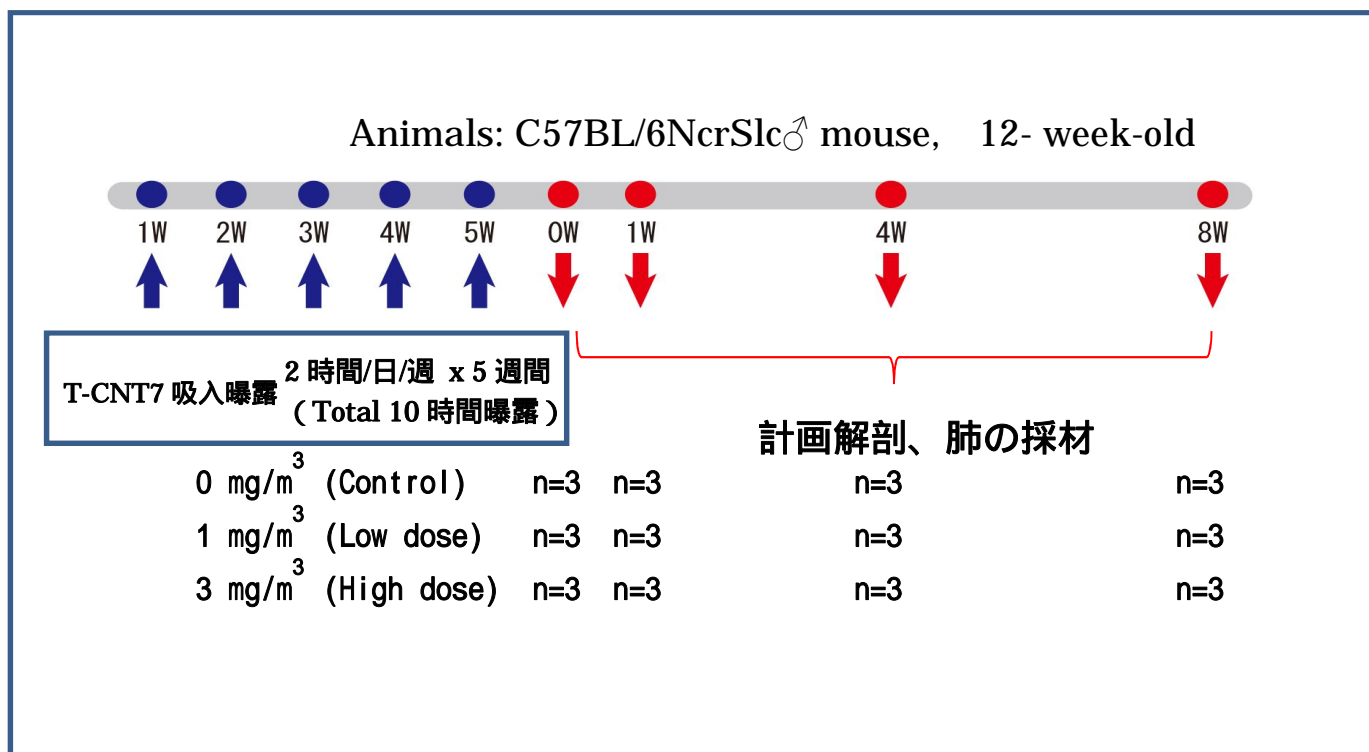


図 2 T-CNT7 の前処理

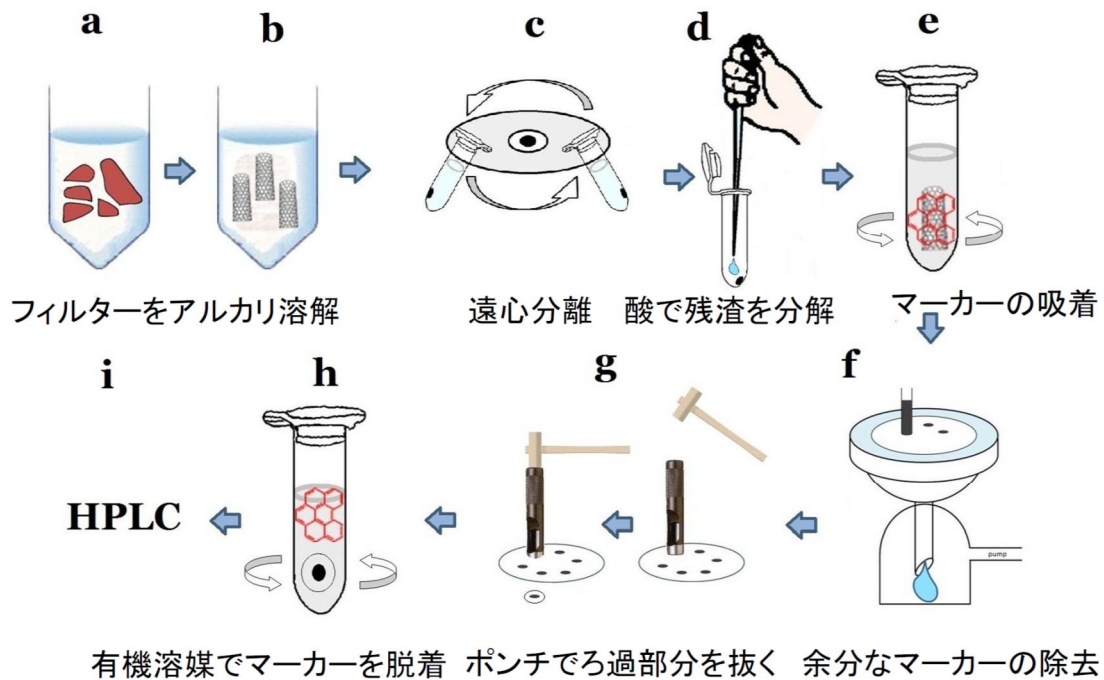


図 3 T-CNT7 の検量線

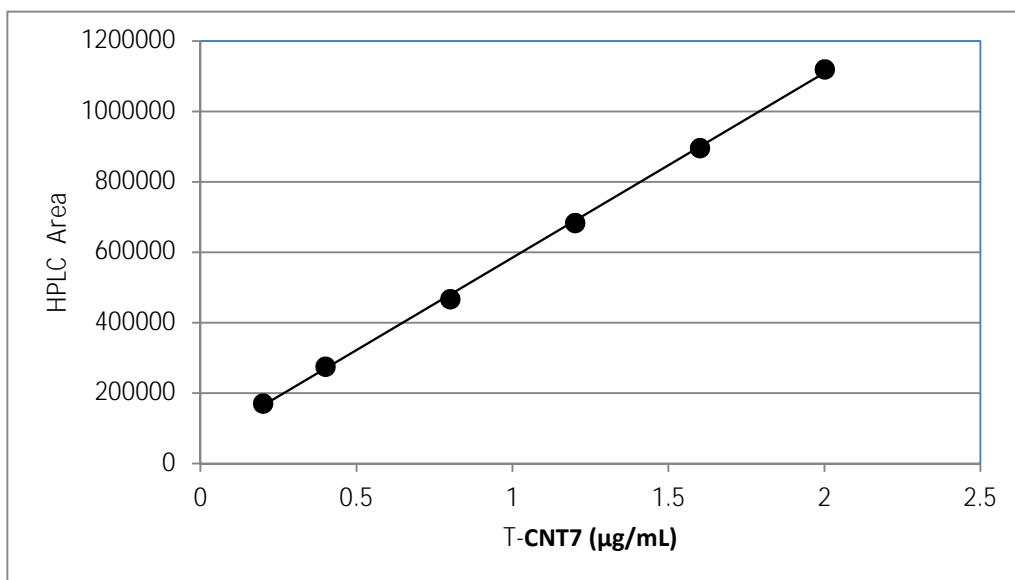


表 2 肺内 T-CNT7 の沈着量の分析結果

曝露濃度と曝露後期間	T-CNT7 肺内絶対量(μg)	SD(μg)	T-CNT7 肺当り(μg/g)	SD(μg/g)
0 mg/m ³ -0 週	0.00	0.00	0.00	0.00
0 mg/m ³ -1 週	0.00	0.00	0.00	0.00
0 mg/m ³ -4 週	0.00	0.00	0.00	0.00
0 mg/m ³ -8 週	0.00	0.00	0.00	0.00
1 mg/m ³ -0 週	0.96	0.29	6.30	2.00
1 mg/m ³ -1 週	0.73	0.18	4.59	1.11
1 mg/m ³ -4 週	0.89	0.27	5.42	1.62
1 mg/m ³ -8 週	0.81	0.12	5.39	1.01
3 mg/m ³ -0 週	1.61	0.47	10.15	3.22
3 mg/m ³ -1 週	1.66	0.47	9.98	2.60
3 mg/m ³ -4 週	1.65	0.33	10.84	2.42
3 mg/m ³ -8 週	1.74	0.66	10.25	3.60

図 4 肺内 T-CNT7 の沈着量の分析結果

