

平成30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-

分担研究課題名: ナノマテリアルの吸入曝露実験及び組織負荷量の研究

分担研究者	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
研究協力者	横田 理	同 主任研究官
研究協力者	高木篤也	同 動物管理室 室長
研究協力者	菅野 純	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

研究要旨

本研究の目的は、工業的ナノマテリアル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、異物除去に重要な役割を果たすマクロファージの *in vivo* 生体内反応に着目し生体影響を評価することにより、国際的に通用する高速で高効率な有害性スクリーニング評価手法を開発することである。具体的には、ナノマテリアルの肺胞マクロファージ胞体内の蓄積様式(長繊維貫通、毛玉状凝集、粒状凝集)と蓄積量を基に、Frustrated phagocytosis 誘発の程度に着目したカテゴリー評価を試みる。本分担研究は、モデルとなるナノマテリアルの全身曝露吸入実験を行い、定期解剖により試料をサンプリングし研究協力者に提供することを担当した。H30年度は、粒状凝集のモデルとして AMT-600 (一次粒径 30 nm、テイカ、T-TiO₂)と、多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の一つである MWNT-7(三井)を高分散処理(Taquann法)する際の濾過工程において、先行研究で使用してきた金属製フィルターよりも大きな目開き(53 μm)を使用することで粗大な成分の割合を多くした(T-CNT7#53)。吸入曝露実験には、先行研究において開発したカートリッジ直噴式全身曝露吸入装置(Taquann 直噴全身曝露吸入装置 ver.3.0)を用いた。動物は、C57BL/NcrSlc 雄性 12 週齢を使用し、2hr/day/week、5 週間(合計 10 時間)の全身曝露吸入を行い、曝露終了直後、1、4 および 8 週後に定期解剖を行ってサンプリングして病理組織学的評価、免疫機能評価用に供した。5 日間反復全身曝露吸入実験において、質量濃度は、T-TiO₂ 群、T-CNT7#53 群それぞれ 34.8 ± 3.1 mg/m³、3.0 ± 0.1 mg/m³、平均 CPC カウントは、T-TiO₂ 群、T-CNT7#53 群それぞれ 560,817 ± 56,441/cm³、1,449 ± 155/cm³であった。MMAD は T-TiO₂ 群、T-CNT7#53 群それぞれ 893 ~ 1,060nm(σg:3.5 ~ 4.2)、522 ~ 1,114 nm(σg:5.3 ~ 7.9)であった。実験期間を通して、目標濃度を達成し、安定した濃度推移による吸入曝露が達成された。

A. 研究目的

本研究の目的は、工業的ナノマテリアル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、異物除去に重要な役割を果たすマクロファージの *in vivo* 生体内反応に着目し生体影響を評価することにより、国際的に通用する高速で高効率な有害性スクリーニング評価手法を開発することである。具体的には、ナノマテリアルの肺胞マクロファージ胞体内の蓄積様式(長繊維貫通、毛玉状凝集、粒状凝集)と蓄積量を基に、Frustrated phagocytosis 誘発の程度に着目したカテゴリー評価を試みる。

H29年度の本分担研究では、マクロファージ胞体内に取り込まれたマクロファージの3種の蓄積様式のうち、「長繊維貫通型」のモデルとして多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の一つである MWNT-7(三井)を選択した。MWNT-7は、先行研究において開発した Taquann 法により 25 μm のメッシュを用いて濾過し高分散処理を行った(以下、T-CNT7#25)。

引き続き H30年度では、「粒状凝集」のモデルとして二酸化チタン(AMT-600、テイカ)と、粗大な成分が多いと想定される MWNT-7を 53 μm のメッシュで濾過した検体を使用した。

検体は、カートリッジ直噴式全身曝露吸入装置(Taquann 直噴全身曝露吸入装置 ver.3.0)を用いて吸入曝露を行った。動物は、C57BL/NcrSlc 雄性 12 週齢を使用し、目標濃度を、二酸化チタンは 30 mg/m^3 、設定し、2hr/day/week、5 週間(合計 10 時間)の全身曝露吸入を行い、曝露終了直後、1 週後、4 週後及び 8 週後に定期解剖を行ってサンプリングして病理組織学的評価、免疫機能評価用に供した。

B. 研究方法

B-1. 検体の高分散化処理(Taquann 法)

MWNT-7は、Taquann 法処理により、凝集体・凝固体を含まない高分散検体として実験に供した。

粒子状物質の吸入において、粒径分布は呼吸器系の部位への沈着量を決める重要なファクターである。微細な粒子は肺胞まで到達するが、大きな粒子は気道の上層部で効果的に除去される。一方、ナノマテリアルの全身曝露吸入実験において問題となるのが、検体の凝集である。また、検体に用いた 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が含まれている。ヒトが現実的に曝露される環境下では、凝集体は先に落下し、肺に到達するのは高度に分散されたものであることが想定される。ヒトと比較して細い気道径を有するマウスを用いた吸入実験では、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あるいは肺胞病変を修飾する可能性がある。そのため、実験動物から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(図1)。以上の点から、先行研究において、凝集成分による影響が少なく、実際にヒトに吸入されることが想定される単離繊維のみからなる分散性の高い検体を得る処理法(Taquann 法、特許取得済)を独自に開発した。

Taquann 法は、走査型電子顕微鏡(SEM)の試料作製方法である「臨界点乾燥」の概念を、液相での分散と濾過に組み合わせた技術であり、濾液の乾燥時に表面張力を受けないため、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、検体を三級ブタノール(TB、融点; 25.69 $^{\circ}\text{C}$ 、関東化学株式会社 特級)に分散、懸濁させて、凍結融解による分散促進を一回行った後、金属製フィルターで濾過し大型の凝集体を除くとともに、分散を図り、濾液を直ちに液体窒素で凍結・固化させる。固相状態の濾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、分散性の高い乾燥状態の検体が得られる(図2)。

本分担研究で使用した二酸化チタン及び MWNT-7ともに Taquann 法処理を行った。

(1) 二酸化チタン

二酸化チタンは AMT-600 を使用した。

以下の性状はテイカ株式会社のウェブサイトの情報である。

結晶形	アナターズ
TiO ₂ 含量	98%
一次粒径	30 nm
pH	弱酸性
比表面積	52 m ² /g

二酸化チタンは、ガラス製メディウム瓶内で TB と混合し 1 mg/mL の懸濁液とした。超音波洗浄器 (SU-3TH、出力 40W、発信周波数 34kHz) に 15 分静置して分散処理を行い、金属製フィルター (セイシン企業、目開き 25 μm) で濾過した。濾液を液体窒素で凍結・固化させ、溶媒回収型真空ポンプ (Vacubrand、MD4C NT+AK+EK) により減圧して TB を昇華させて乾燥検体を得た。以下、Taquann 法処理を行った二酸化チタンを T TiO₂ と記載する。

(2)MWCNT

MWCNT は三井物産の MWNT-7 を使用した。以下の各測定値は先に共同研究を行った東京都健康安全研究センターによる測定値である。

繊維径	70-170 nm (平均 100 nm)
長さ	1-19 μm (> 5 μm 27.5%)
繊維数	3.55×10 ¹¹ 本/g
形状	繭状凝集体を含む単離繊維
化学組成	炭素純度 99.5% 以上
鉄	:3500 ppm
硫黄	:470 ppm
塩素	:20 ppm
フッ素	:<5 ppm
臭素	:<40 ppm

MWCNT 原末をガラス製ビーカーで TB に混合した。氷冷化で TB をシャーベット状にして金属製スバ

ーテルで十分に混合した後、凍結融解による分散促進を一に行った。超音波洗浄器 (SU-3TH、出力 40W、発信周波数 34kHz) に 15 分静置して分散させ、金属製フィルター (セイシン企業、目開き 53 μm) で濾過し大型の凝集体を除くとともに、分散を図り、濾液を直ちに液体窒素で凍結・固化させ、溶媒回収型真空ポンプにより減圧して TB を昇華させて除去し MWCNT の乾燥検体を得た。

H29 年度では、目開き 25 μm の金属製フィルターを用いているが、H30 年度ではタングル状成分が多いと想定される目開き 53 μm の金属製フィルターを用いた。以下、目開き 25 μm 金属フィルターで Taquann 法処理を行った MWNT-7 を T-CNT7#25、目開き 53 μm 金属フィルターで Taquann 法処理を行った MWNT-7 を T-CNT7#53 と記載する。T-CNT7#25 と T-CNT7#53 のエアロゾルの性状については、予備試験において、曝露チャンバー内のエアロゾルをアルミナフィルター (ワットマン、孔径 0.02 μm、25mm, Anodisc) に吸着させてサンプリングし、オスミウムコーター (HPC-1 SW 型、真空デバイス) により 5 秒間オスミウムコートを行い走査型電子顕微鏡 (VE-9800、KEYENCE) で 2,500 倍、加速電圧 2~2.8kV の条件で観察した。

B-2.マウス全身曝露吸入実験

(1)動物

C57BL/6NcrSLC (日本エスエルシー株式会社) 雄性マウスを 10 週齢で購入し 2 週間の馴化期間を経たのち 12 週齢にて使用した。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

飼育ケージは、ポリカーボネイト製のアウトターケージと PET 製インナーケージを使用した。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 (RAIR HD SUPER MOUSE 750™

個別換気式飼育装置(特型)を使用した。飼育条件は、温度;25±1、湿度;55±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。

ケージ内の環境を改善する目的で、シェファードシヤック(Shepherd Specialty Papers社)をケージ内に設置した。

(3)群構成

対照群、T-TiO₂群(目標濃度30 mg/m³)、T-CNT7#53群(目標濃度3 mg/m³)の3群構成とした。各群48匹のマウスを使用し、病理組織用に16匹、組織沈着量測定用に12匹、免疫機能実験用に20匹を割り当てた。曝露チャンバーに収容できるマウスの匹数が25匹であることから、各群を25匹のサブグループ(Sub-group A、Sub-group B)に分け、1日2時間(10:00~12:00)の週1回の吸入曝露を5週間反復し、合計10時間の曝露を行った(表1)。

(4)ダスト発生装置

MWCNTのエアロゾル化は、既設のTaquann直噴全身吸入装置Ver3.0を使用した(共同開発 柴田科学株式会社)(図3)。

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。カートリッジはインナーカートリッジとアウターカートリッジから構成される。検体を収容するインナーカートリッジ(容量:25 mL、内寸:直径20 mm高さ80 mm)はステンレス製であり、これを樹脂製のアウターカートリッジに収容して使用する。カートリッジのキャップ部には圧縮空気を注入するセンターノズルと、エアロゾル噴出孔が設計されている(図4)。

カートリッジへの検体の充填は、T-TiO₂では1mg/mLの懸濁液13mLを各カートリッジに、T-CNT7#53では0.05 mg/mLの懸濁液を各カートリッジに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。すなわち、T-TiO₂は13 mg/カートリッジ、T-CNT7#53では0.5 mg/カートリッジを充填した。

噴射装置は、サブチャンバー(容量:43 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側方に煙突状のダクトを設け、その先端部にはポリエチレン製の袋で覆ったULPAフィルターが接続されている。煙突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、希釈されつつ曝露チャンバーに導く構造となっている。

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3回の噴射を行った。曝露チャンバーの総換気流量は32.5 L/min(基礎換気流量;29.5 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、曝露開始時に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30本のカートリッジを使用した。なお、Ver.2.5までは手動にてカートリッジの交換、噴射を行っていたが、Ver3.0からは完全自動化されている。

曝露チャンバー内の温度、湿度並びに圧力変動を曝露時間の2時間を通してモニタリングした。

(5)曝露チャンバー

動物を収容し検体を曝露する曝露チャンバーは、先行研究において独自に開発したものを、Ver3.0用に改変したものをを使用した。(共同開発 柴田科学株式会社、特許所得済)。動物は、メインチャンバー内に設置した円筒形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25匹収容が可能である。曝露チャンバーはアクリル製のアウターチャンバーとPET樹脂で作製したインナーチャンバー(直径660 mm、高さ477 mm)の二重構造となっており、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。メインチャンバーの上部は円錐状となってサブチャンバーに接続されており、メインチャンバーの気積 179 L である。

(6) 曝露チャンバー内のエアロゾル濃度測定

曝露チャンバー内のエアロゾル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。

曝露チャンバーと CPC を接続するチューブは、銅管を使用してサンプリングによる損失を最小限にした。

先行研究において、CPC による MWCNT の測定では 1×10^3 個/mL 程度の粒子数測定であっても、一時的に低値で推移することが散見されたことから、T-CNT7#53 群では 10 倍希釈して CPC による測定を行った。CPC の測定原理では、理論上、測定セル内で一つの粒子だけを検出する構造となっているが、MWCNT のように繊維径は 100 nm 程度であるが、繊維長は 10 μm を超える粒子が含まれているため、測定セル内で繊維が重なり、過小評価されると想定される。

T-TiO₂ 群では、目標濃度が CPC の測定上限を超えると想定されることから、15 倍希釈して測定を行った。

また、質量濃度測定は、ローボリウムサンプラー (080050-155、 $\phi 55$ mm ろ紙ホルダー、柴田科学) にフッ素樹脂バインダ - ガラス繊維フィルター (Model TX40HI20-WW、 $\phi 55$ mm、捕集効率 (DOP 0.3 μm): 99.9%、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

で曝露時間の 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。

(7) エアロゾルの粒度分布

エアロゾルの粒度分布は、二つの方法で実施した。一つは、T-TiO₂ と T-CNT7#53 とともに Micro-Orifice Uniform Deposit Impactors (MOUDI) を用いた Mass Median Aerodynamic Diameter (MMAD) である。10 L/min の流量で曝露チャンバー内のエアロゾルを吸引して MOUDI (Model 125 Nano MOUDI、KANOMAX、分級サイズ; No.1; 10 μm 、No.2; 5.6 μm 、No.3; 3.2 μm 、No.4; 1.8 μm 、No.5; 1.0 μm 、No.6; 0.56 μm 、No.7; 0.32 μm 、No.8; 0.1 μm 、No.9; 0.10 μm 、No.10; 0.056 μm 、No.11; 0.032 μm 、No.12; 0.018 μm 、No.13; 0.01 μm) に導いた。吸引時間は T-TiO₂ では 10 分、T-CNT7#53 は 20 分とした。各分級ステージには専用のアルミホイル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。尚、シリコンオイル塗布アルミホイルは、使用前に 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。マイクロ天秤 (XP26V、METTLER TOLEDO) を使用してアルミホイルの質量を、MOUDI 装着前と、MWCNT 回収後に測定し、その差分を検体質量とした。

もう一つの方法は、粒子の電気移動度によって測定する Scanning Mobility Particle Sizer (SMPS, Model 3034、サンプリング流量: 1.0 L/min、TSI、MN、USA) である。SMPS は粒子径の測定範囲が 10~500 μm であるため、T-TiO₂ のみを対象とした。エアロゾル濃度が SMPS の測定上限を超える濃度と想定されるため、25 倍希釈して測定を行った。

エアロゾルの粒度分布測定は、測定機器の数が限られること、曝露チャンバーの気積が約 180L と比

較的小さいため、測定機器のサンプリング流量を加味した流量調整が必要となることから、測定回数を限定して行った。具体的な曝露実験とエアロゾル測定スケジュールを表 2 に示した。

(8) 解剖

肺組織のサンプリングのため、曝露終了直後 (Day 0)、1 週間 (1W)、4 週間 (4W) 及び 8 週間 (8W) に定期解剖を行った。

マウスは吸入麻酔器 (TK-7、バイオマシナリー) を用いイソフルラン (DS ファーマアニマルヘルス) 麻酔下で、眼窩より採血を行い、腋窩動脈を切断して放血致死後に解剖した。被毛からコンタミを防止するため、開胸前に全ての被毛を除去した。

病理標本用の動物は、気道内の T-CNT7 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、喉頭部を絹糸で結紮して開胸時の肺の虚脱を防止した後、開胸し、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 水柱の静水圧により注入し、右心耳を切開して血液を除去した。その後、右心室から翼状針を引き抜いて左心室に刺入して血液を除去した後、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、同組成固定液に浸漬固定を行った。流量は点滴調節器により適宜調節した。組織沈着量測定用の動物は、開胸して肺を取り出し、肺門部で気管を除去して湿重量測定後ホルマリン固定した。免疫機能解析用の動物は、開胸後に留置針を気管に挿入し PBS を 1 mL 注入して BAL を採取した。

(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

実験施設内で実施しており、曝露・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

(1) T-CNT7#25 と T-CNT7#53 のエアロゾルの性状
アルミナフィルターに吸着させたエアロゾルを 2,500 倍の倍率で 50 視野 ($51 \mu\text{m} \times 38 \mu\text{m}$) を観察し、共有結合した状態のエアロゾル (Aggregates) と、複数の繊維が絡まったエアロゾル (Agglomerates) の数、およびその比率を比較した。その結果、Aggregates の数は、T-CNT7#25、T-CNT7#53 それぞれ 0.5 個/視野、1.4 個/視野、Agglomerates の数は、T-CNT7#25、T-CNT7#53 それぞれ 1.5 個/視野、4.1 個/視野であった。想定されたように、T-CNT7#53 は T-CNT7#25 よりも Aggregates および Agglomerates の数が多く観察された。一方、Aggregates と Agglomerates の比はフィルターのサイズに係らず、それぞれ 25% と 75% と同じ割合であった (図 5)。

(2) T-TiO₂ の吸入曝露実験

実験に供したマウスは、いずれも体重推移に異常は認められなかった (図 6)。一般状態観察においてファイティングによる咬傷、脱毛が散見されたが検体曝露との関係は認められなかった。

T-TiO₂ の 5 日間反復全身曝露吸入実験における全体の平均質量濃度 (Sub-Group A × 5 回、Sub-Group B × 5 回、計 10 回) は $34.8 \pm 3.1 \text{ mg/m}^3$ (平均値 ± SD) であった。平均 CPC カウント (同 10 回) は $560,817 \pm 56,441/\text{cm}^3$ (平均値 ± SD) であった (図 7、図 8)。

MMAD は $893 \sim 1,060 \text{ nm}$ ($\sigma_g: 3.5 \sim 4.2$) であり、全体の平均 (5 回) は、 975.3 nm であった (図 8)。

SMPS の測定では、1 回の吸入曝露実験で約 30 のデータが生成され、合計 150 程度のデータが得られたが、ほとんど同様の値を

示していた。代表例として、Sub-Group Bの三回目のデータを示した(図8)。粒子径の中央値は149.4 nm、平均値は177.6 nmであった。

2時間の吸入曝露実験において使用した総検体量は、390 mgである。2時間の曝露チャンバーの総換気量は3.9 m³であることから名目上の濃度は100 mg/m³と計算される。実際に測定した濃度の平均は34.8 mg/m³から、エアロゾル化効率を計算すると34.8%であった。

(3) T-CNT7の吸入曝露実験

実験に供したマウスは、いずれも体重推移に異常は認められなかった(図6)。一般状態観察においてファイティングによる咬傷、脱毛が散見されたが検体曝露との関係は認められなかった。

T-CNT7の5日間反復全身曝露吸入実験における全体の平均質量濃度(Sub-Group A×5回、Sub-Group B×5回、計10回)は3.0±0.1 mg/m³であった。平均CPCカウント(同10回)は1,449±155/cm³であった(図9、図10)。

MMADは522~1,114 nm(σg:5.3~7.9)であり、5回の平均は、788.2 nmであった(図10)。

2時間の吸入曝露実験において使用した総検体量は、15 mgである。2時間の曝露チャンバーの総換気量は3.9 m³であることから名目上のエアロゾル濃度は3.8 mg/m³と計算される。実際に測定した濃度の平均値3.0 mg/m³から、エアロゾル化効率を計算すると78.9%であった。

(4) 剖検所見

本実験において定期解剖した全ての個体に剖検所見に肉眼的異常は認められなかった。

D. 考察

ナノマテリアルの吸入曝露実験においては、検体の凝集が問題となるが、これまでの研究においてTaquann法とTaquann全身曝露吸入装置はこれを解決する手段として有効であることを示してきた。

Taquann法では、大型の凝集体を除去するため金属製フィルターにて濾過する工程がある。これまで、目開き25 μmのフィルターを用いてきたが、今年度の研究では、より荒い検体を目開き53 μmのフィルターを用いた。実際にエアロゾル化した粒子の形状を観察した結果、T-CNT7#53はT-CNT7#25に比較して、タングル状の成分が含まれていたが、その比率は同じであった。タングル状成分はマクロファージに貪食された際に、毛玉状に凝集することが想定されるため、T-CNT7#25とは異なった影響を示す可能性がある。

Taquann吸入曝露装置は、Ver3.0を使用した。Ver2.5からの主な改良点は、カートリッジの装填・噴射の自動化、カートリッジへの圧縮空気注入方向をカートリッジ後方から前方へ変更、カートリッジをインナーカートリッジとアウターカートリッジの二重構造に変更、マウスの収納匹数を16匹から25匹へ増加、メインチャンバーの昇降に空気圧と金属バネを用いたサポートシステムの導入、である。Ver2.5以前は実験者が時間を確認しながら手でカートリッジの装填・噴射を行っていたが、Ver3.0で完全に自動化されたことから、実験者の負担が減り、より多くのカートリッジを使用することが可能となった。そのため、酸化チタンのように比重の大きな検体でも噴射インターバルを短くすることにより安定したエアロゾルの発生が可能となった。

カートリッジの二重構造化は、コストダウンと検体調製の効率化に大きく寄与した。カートリッジへの検体充填作業のボトルネックは溶媒回収型真空ポンプを使用した乾燥過程である。多数のカートリッジを準備することができれば効率的な充填作業、短いインターバルでのエアロゾル発生、並びにより長い曝露時間を設定することが可能となる。Ver3.0のインナーカートリッジは検体の充填を担う部分であり、ステンレス製

の単純なチューブ構造である。そのため、大量生産が可能となりコストダウンが図れた。アウターカートリッジは噴射部分を担う。この部分は構造が複雑であるため高価であるが、噴射終了後にインナーカートリッジを交換することで使いまわしが可能である。

MWCNT に関しては、カートリッジへの圧縮空気噴射方向を見直しはエアロゾル発生効率の向上に寄与したと考えられる。Ver2.5までのカートリッジでは、MWNT-7 のエアロゾル化効率は 40%程度であるが、Ver3.0 では 80%程度とこれまでの 2 倍の効率が得られた。Ver2.5 までのカートリッジは、後方から圧縮空気を注入するため、圧縮空気が直接吹き付けられないスライドバルブの上部に検体の残存が散見されていた。Ver3.0 では前方からインナーカートリッジの底に向けて圧縮空気を注入するため、すべての検体に均等に圧縮空気を吹き付けることが可能となり、エアロゾル化の効率が向上したと考えられる。

酸化チタンに関しては、Ver2.5 でのエアロゾル化効率は 35%程度であり、Ver3.0 での向上は見られなかった。その理由には 2 つの理由が考えられる。一つは、酸化チタンは MWCNT に比較して金属面に付着しやすく、また微細な粒子であるため、加圧によって凝集しやすい。全ての検体に上方から均等に加圧空気が吹き付けられると、インナーカートリッジの中心に位置する検体はインナーカートリッジの底面に押し付けられることによって凝集し残存する可能性が考えられる。実際に、インナーカートリッジの底部に酸化チタンは検体の残存がみられた(MWCNT には残存が認められない)。そのため、乱流が生じるように圧縮空気の吹き出し口を非対称に加工することで改善できるかもしれない。もう一つの理由は、粒子の比重が大きいため、沈降速度が速く、サブチャンバー内でトラップされる割合が多い可能性がある。実際に、サブチャンバーの内面には多く検体が付着している様子が見られた。この粒子は、比較的、粒径が大きいと想定されることから、本研究の目的とする高分散検体を動物に曝露するという目的は達成されていると考えられる。

Ver3.0 におけるこれらの改良点は、実験者の負担

を減じ、効率的な吸入曝露実験の実施が可能となった。

E. 結論

一次粒径 30 nm の酸化チタンを 25 μm のフィルターで濾過し Taquann 法処理した検体 (T-TiO₂)、及び MWNT-7 を 53 μm のフィルターで濾過し Taquann 法処理した検体 (T-CNT7#53) をマウス 5 日間反復全身曝露吸入実験において、質量濃度は、T-TiO₂ 群、T-CNT7#53 群それぞれ $34.8 \pm 3.1 \text{ mg/m}^3$ 、 $3.0 \pm 0.1 \text{ mg/m}^3$ 、平均 CPC カウントは、T-TiO₂ 群、T-CNT7#53 群それぞれ $560,817 \pm 56,441/\text{cm}^3$ 、 $1,449 \pm 155/\text{cm}^3$ であり実験期間を通して安定した濃度推移が得られた。MMAD は T-TiO₂ 群、T-CNT7#53 群それぞれ $893 \sim 1,060 \text{ nm}$ ($\sigma_g: 3.5 \sim 4.2$)、 $522 \sim 1,114 \text{ nm}$ ($\sigma_g: 5.3 \sim 7.9$) であった。定期解剖を行い、病理組織評価、免疫機能評価及び肺負荷量測定に供した。

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、森田紘一氏に深く感謝する。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Abdelgied M, El-Gazzar AM, Alexander DB, Alexander WT, Numano T, Iigou M, Naiki-Ito A, Takase H, Abdou KA, Hirose A, Taquahashi Y, Kanno J, Abdelhamid M, Tsuda H, Takahashi S. Pulmonary and pleural toxicity of potassium octatitanate fibers, rutile titanium dioxide nanoparticles, and MWCNT-7 in male Fischer 344 rats. Arch Toxicol. 2019 Feb 13.

Otsuka K, Yamada K, Taquahashi Y, Arakaki R,

Ushio A, Saito M, Yamada A, Tsunematsu T, Kudo Y, Kanno J, Ishimaru N. Long-term polarization of alveolar macrophages to a profibrotic phenotype after inhalation exposure to multi-wall carbon nanotubes. PLoS One. 2018 Oct 29;13(10):e0205702.

Abdelgied M, El-Gazzar AM, Alexander DB, Alexander WT, Numano T, Iigou M, Naiki-Ito A, Takase H, Abdou KA, Hirose A, Taquahashi Y, Kanno J, Tsuda H, Takahashi S. Potassium octatitanate fibers induce persistent lung and pleural injury and are possibly carcinogenic in male Fischer 344 rats. Cancer Sci. 2018 Jul;109(7):2164-2177.

2. 学会発表

高橋祐次、トキシコロジスト・ブラッシュアップ
セミナー：肺・呼吸器の毒性変化を考えるナ
ノマテリアルの毒性：肺毒性を中心として、
第 19 回日本毒性学会生涯教育講習会、
2018.7.17（大阪）

菅野 純、ナノマテリアルの吸入曝露による発が
ん性研究第 45 回日本毒性学会学術年会、シン
ポジウム、2018.7.18（大阪）

高橋祐次、相磯 成敏、大西 誠、石丸 直澄、
菅野 純、マクロファージの機能に着目した
ナノマテリアルのマウス吸入ばく露による慢
性影響評価、第 45 回日本毒性学会学術年会、
シンポジウム、2018.7.18（大阪）

Jun Kanno, Chuen Jinn Tsai, Plenary Session
4: Improvement of Inhalation Toxicity
Testing for Nanomaterials and Compliance
Monitoring for Ambient PM., Plenary
Lectures, Xth International Aerosol
Conference (IAC 2018), Invited, 2019.9.6, St.
Louis.

Yuhji Taquahashi, Satoshi Yokota, Koichi
Morita, Masaki Tsuji, Yoko Hirabayashi,

Akihiko Hirose and Jun Kanno,
Development of Whole Body Inhalation
System for Well-Dispersed Nanomaterials
Toxicity Testing -Taquann Direct-Injection
Whole Body Inhalation System-, Poster,
58th Annual Meeting of the Society of
Toxicology, 2019.3.12., Baltimore

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

特許出願；柴田眞利、菅野 純、生田達也、鶴
田祐吾、高橋祐次：吸入曝露試験用カートリッジ、
試験物質供給装置及び吸入曝露試験装置 特願
2018-81836、2018.4.20

特許出願；柴田眞利、菅野 純、生田達也、鶴
田祐吾、高橋祐次：試験物質供給装置及び吸入曝露
試験装置 特願 2018-81837、2018.4.20

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

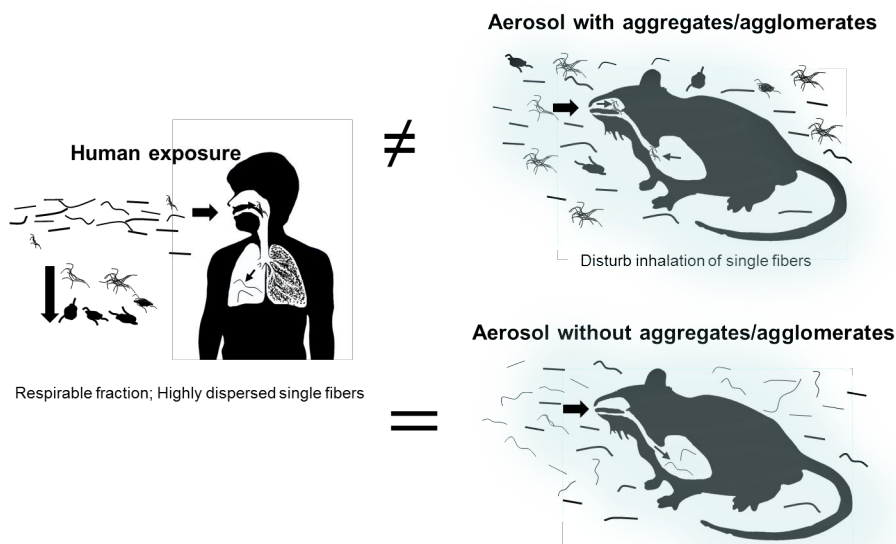


図1 ヒトの現実的な曝露シナリオに基づいたナノマテリアルの吸入毒性評価方法

粒子状物質の吸入において、粒径分布は内径が徐々に狭くなる鼻腔から肺胞に至る各部位への沈着量を決める重要な因子である。微細な粒子は肺胞まで到達するが、大きな粒子は気道の上層部で効果的に除去される。ヒトが現実的にナノマテリアルに曝露される環境下では、緩徐な風速であるため気相にナノマテリアルの凝集体/凝固体は速く沈降する。また、ヒトの上気道は長いため、凝集体/凝固体が効果的に取り除かれて肺胞レベルには高度に分散されたものが優先的に到達すると想定される。一方、実験動物を用いた粉体の吸入曝露試験では、エアロゾルの均一性を保つためチャンパー内の空気は強く攪拌されている。凝集体/凝固体を含む検体をエアロゾル化すると、ヒトに比較して細く短い気道を有するげっ歯類では、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あるいは肺胞病変を修飾する可能性がある。以上のことから、吸入曝露試験において実験動物からヒトへの外挿性の高いデータを得るためには、凝集体/凝固体を除去した上で分散性が高い検体を使用する必要がある。

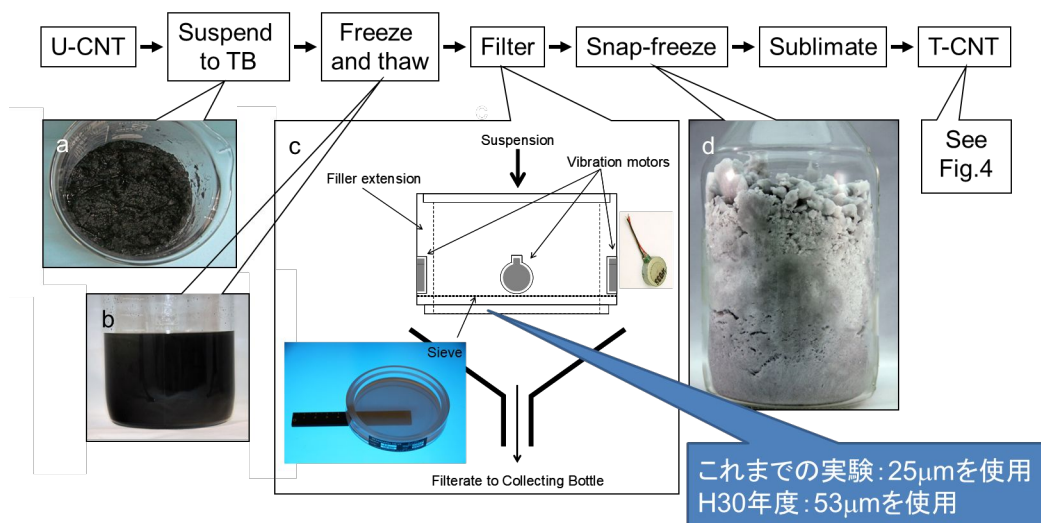


図 2 Taquann 法の概要

(a) MWCNT 原末 (U-CNT) を三級ブタノール (TB) に混合して氷冷して TB をシャーベット状にして金属性スパーテルで混ぜ十分に混和する。(b) -25°C で一晩凍結したのち再融解を行う。(c) 金属製フィルター (セイシン企業) で濾過し大型の凝集体を除く。濾過効率を向上させるため、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: 17.6 m/s^2) をリムに 4 個装着し、フィルターを振動させる。(d) 濾液は直ちに液体窒素で凍結・固化し固相のまま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、分散性の高い乾燥状態の MWCNT を得る。H30 年度は、目開き $53\text{ }\mu\text{m}$ の金属製フィルターを用いた。Taquahashi et al., JTS, 2013;38 (4) :619-28

表 1 群構成

Group	Examinations	Necropsy after inhalation exposure				
		N	Day 0	1W	4W	8W
Control 0 mg/m ³ 2hr/D/W×5W Total 10hr	- Lung Burden	12	3	3	3	3
	- Histopathology(perfusion)	12	3	3	3	3
	- Immune function					
	BALF(Cytospin, Flow cytometry, Multiplex)	24	6	6	6	6
	Pulmonary interstitium mRNA					
	Spleen, Lymph node					
	Subtotal	48	Consist of two sub-groups, A&B			
AMT-600 30 mg/m ³ 2hr/D/W×5W Total 10hr	- Lung Burden	12	3	3	3	3
	- Histopathology(perfusion)	12	3	3	3	3
	- Immune function					
	BALF(Cytospin, Flow cytometry, Multiplex)	24	6	6	6	6
	Pulmonary interstitium mRNA					
	Spleen, Lymph node					
	Subtotal	48	Consist of two sub-groups, A&B			
MWNT-7 #53um 3 mg/m ³ 2hr/D/W×5W Total 10hr	- Lung Burden	12	3	3	3	3
	- Histopathology(perfusion)	12	3	3	3	3
	- Immune function					
	BALF(Cytospin, Flow cytometry, Multiplex)	24	6	6	6	6
	Pulmonary interstitium mRNA					
	Spleen, Lymph node					
	Subtotal	48	Consist of two sub-groups, A&B			
Total number of animals		144				

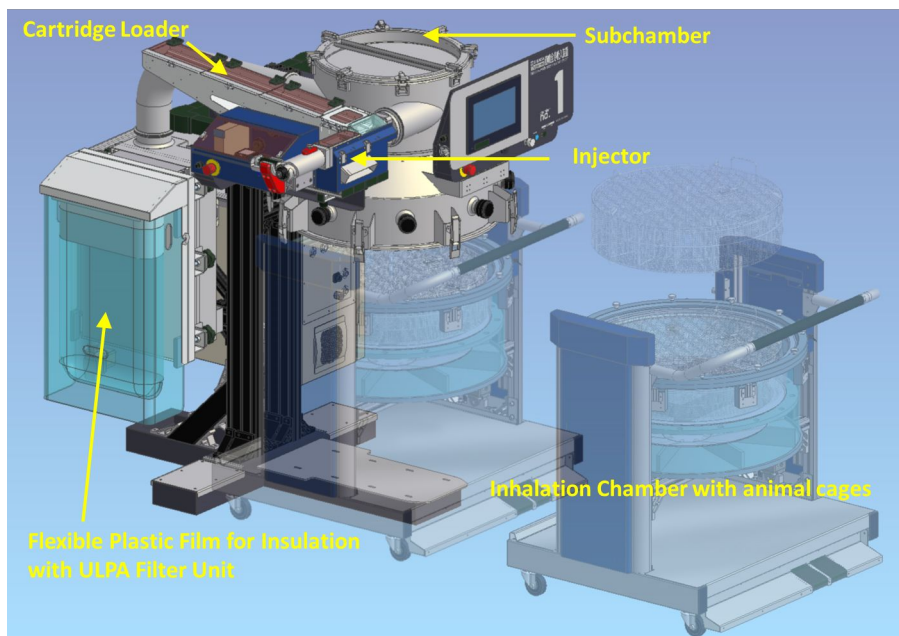


図3 Taquann 直噴全身曝露吸入装置の模式図 (Ver 3.0)

噴射装置は、サブチャンバー（容量：43 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側方に煙突状のダクトを設け、その先端部にはポリエチレン製の袋で覆った ULPA フィルターが接続されている。煙突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、希釈されつつ曝露チャンバーに導く構造となっている。



図4 Taquann 直噴全身曝露吸入装置のカートリッジ

検体を収容するインナーカートリッジ（容量：25 mL、内寸：直径 20 mm 高さ 80 mm）はステンレス製であり、これを樹脂製のアウトターカートリッジに収容して使用する。カートリッジのキャップ部には圧縮空気を注入するセンターノズ

ルと、エアロゾル噴出孔が設計されている。

表 2 曝露実験とエアロゾル測定スケジュール

Group	Sub-Group A	Sub-Group B
	Tuesday	Wednesday
Control	CPC	CPC
T-TiO ₂	Mass Concentration	Mass Concentration
	CPC	CPC
	MOUDI	SMPS
T-CNT7#53	Mass Concentration	Mass Concentration
	CPC	CPC
		MOUDI

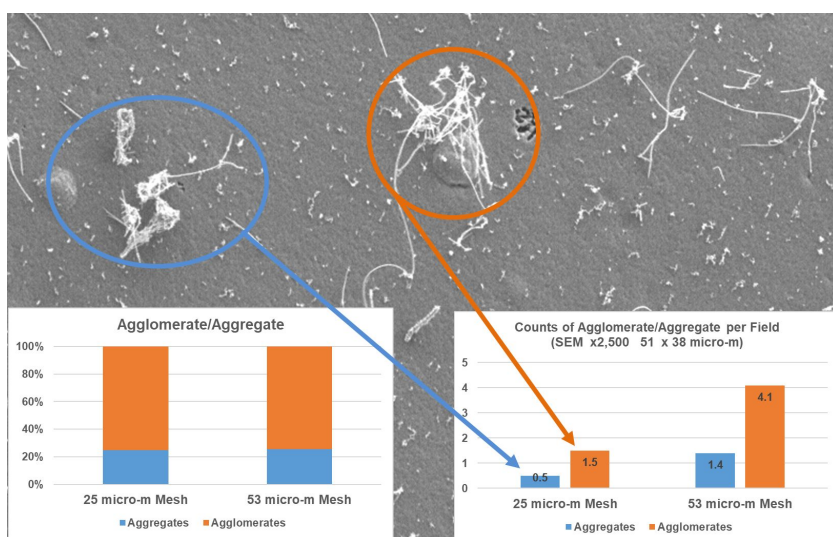


図 5 T-CNT7#25 と T-CNT7#53 のエアロゾルの性状比較

アルミナフィルターに吸着させたエアロゾルを 2,500 倍の倍率で 50 視野 (51 μm × 38 μm) を観察し、共有結合した状態のエアロゾル (Aggregates) と、複数の繊維が絡まったエアロゾル (Agglomerates) の数、およびその比率を比較した。

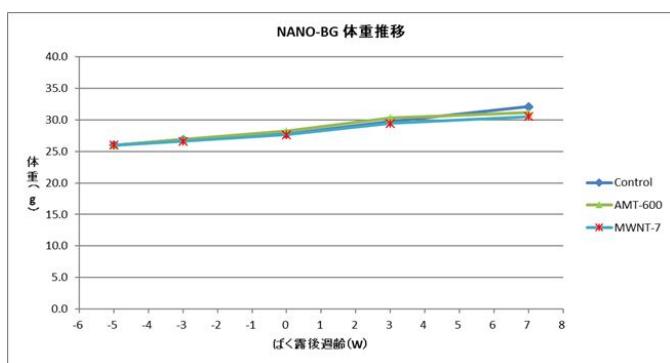


図 6 吸入曝露後の体重推移

体重推移に異常は認められなかった。一般状態では、ファイティングによる咬傷、脱毛が見られたが検体曝露との関係は認められなかった。

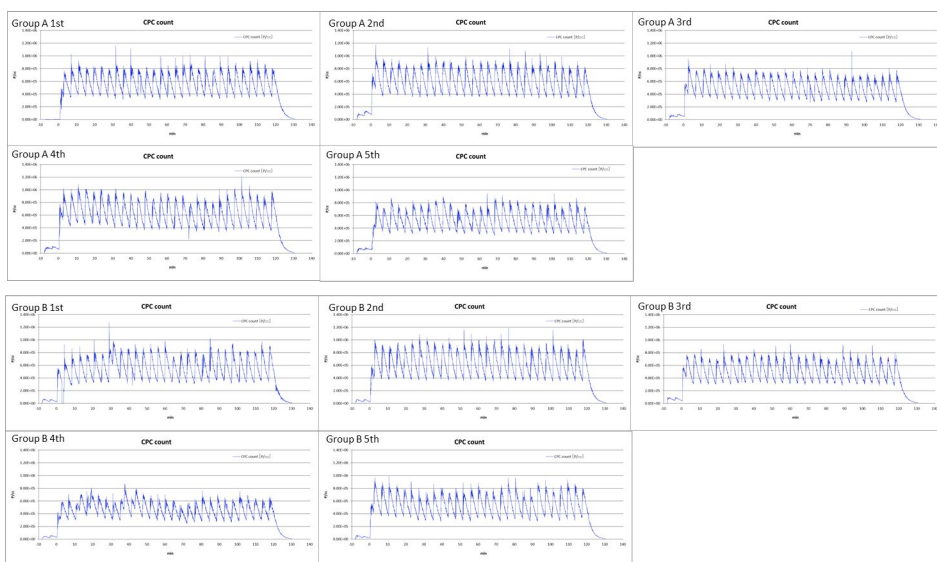


図7 T-TiO₂の吸入曝露実験におけるCPCカウントの経時的変化

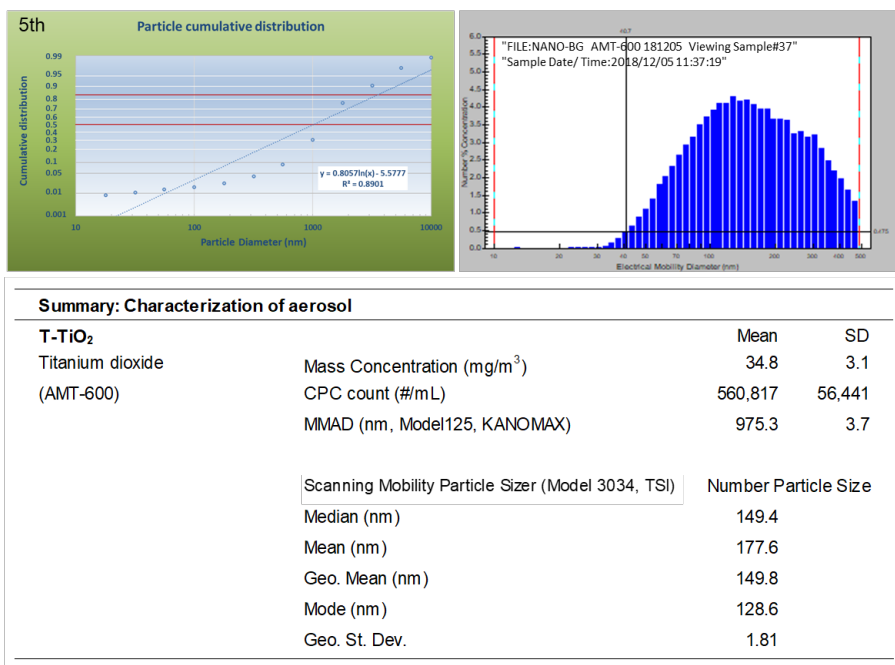


図8 T-TiO₂の吸入曝露実験におけるエアロゾル特性

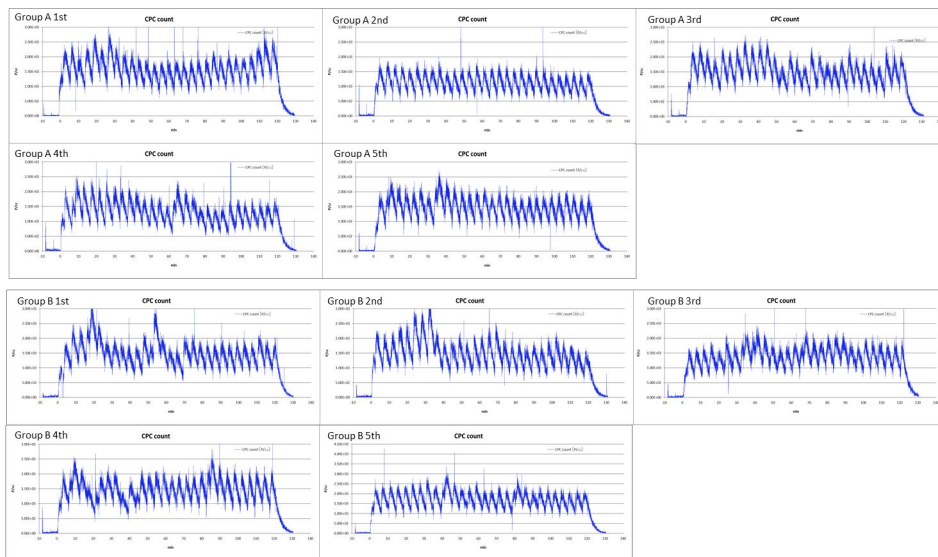
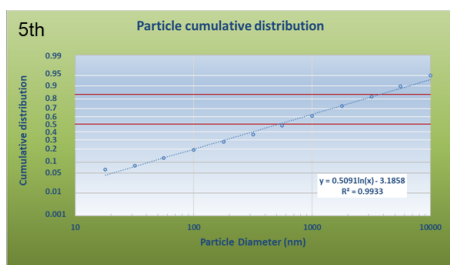


図9 T-CNT7#53の吸入曝露実験におけるCPCカウントの経時的変化



Summary: Characterization of aerosol			
T-CNT7#53		Mean	SD
MWCNT	Mass Concentration (mg/m ³)	3.0	0.1
(MWNT-7 53 μm Mesh Filtered)	CPC count (#/mL, Model3776,TSI)	1,449	155
	MMAD (nm, Model125, KANOMAX)	788.2	7.0

図10 T-CNT7#53の吸入曝露実験におけるエアロゾル特性