

平成30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)

Ⅱ. 分担研究報告書

平成 30 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影響の効率的評価手法開発に関する研究
(H30-化学-指定-004)

分担研究課題名:慢性影響を考慮した肺負荷量に基準を置く全身曝露吸入法の確立に関する研究

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 毒性部 室長

研究協力者: 横田 理 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 主任研究官

研究協力者: 高木 篤也 国立医薬品食品衛生研究所 動物管理室長

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。毒性未知の物質を取り扱う基本的な戦略は、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を同定し、メカニズムを同定し、用量作用関係の情報を取得し、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ことであるが、ナノマテリアルに関して最も重要な曝露経路である吸入曝露に関しては、動物実験を遂行する際の技術的障壁が高く、実施例は数少ない。

研究分担者らは、吸入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)。そして、本装置が、より一般的なナノマテリアルについても、従来法に比較して容易に、高分散状態でマウス或いはラットを用いた全身曝露吸入試験を実施する目途が立った。

本研究では、OECD TG451 により実施された先行試験 (Particle Fibre Tox 2016, 13:53) との比較、および、本事業において並行して実施される気管内投与実験との比較を目的として、MWNT-7 の 2 年間の間欠全身曝露吸入試験の方法を策定する基盤として、6 時間の

単回曝露による肺負荷量の測定を実施した。測定方法は Benzo[ghi]perylene を用いたマーカー法(大西法)と、走査型顕微鏡を用いて計測する SEM 法にて評価し、両者の比較を兼ねた実験計画とした。先行研究では、Taquann 法に目開き 25 μm の金属製フィルターを用いているが、本事業では、先行試験に合わせて目開き 53 μm の金属製フィルターを用いた(25 μm に比してタンゲル状成分が多いエアロゾルを得る)。動物は C57BL/6NcrSLC 雄性マウスを使用し、12 週齢時に吸入曝露を実施した。群構成は、対照群、低濃度群、高濃度群の 3 群構成とした。曝露装置は、Taquann 直噴全身吸入装置 ver.3.0 を使用した。本装置は、カートリッジ操作が自動化されており、以前のバージョンに比較して操作性に優れ、長時間の曝露が可能となっている。結果として、平均質量濃度は低濃度群 $2.7 \pm 0.2 \text{ mg/m}^3$ 、高濃度群は $5.1 \pm 0.8 \text{ mg/m}^3$ 、MMAD(高濃度群)は 510 nm($\sigma_g:8.2$)であった。マーカー法(大西法)によって測定した肺負荷量は、低濃度群の曝露終了直後(Day 0)が $3.98 \pm 0.83 \text{ }\mu\text{g/動物}$ 、7日後(Day 7)が $2.14 \pm 0.83 \text{ }\mu\text{g/動物}$ であった。高濃度群の Day 0 が $6.19 \pm 0.57 \text{ }\mu\text{g/動物}$ 、Day 7 が $2.88 \pm 0.23 \text{ }\mu\text{g/動物}$ であった。Day 0 における肺負荷量は、ほぼ濃度依存的であった。

カートリッジ噴射操作の自動化により、6 時間の吸入曝露実験が可能となり、ナノマテリアルの毒性評価の効率化と、OECD ガイドラインに準拠した吸入曝露実験への標準的な適用が期待される。

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。毒性未知の物質を取り扱う基本的な戦略は、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を同定し、メカニズムを同定し、用量作用関係を情報の取得し、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ことであるが、ナノマテリアルに関して最も重要な曝露経路である吸入曝露に関しては、動物実験を遂行する際の技術的障壁が高く、実施例は数少ない。

研究分担者らは、吸入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)¹⁾ 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)。そして、本装置により、一般的なナノマテリアルについても、従来法に比較して容易に、高分散状態の検体として、マウスやラットを用いた全身暴露吸入試験を実施する目途が立った。

本研究では、OECD TG451 により実施された先行試験 (Particle Fibre Tox 2016, 13:53)²⁾ との比較を目的として、MWNT-7 の 2 年間の間欠全身暴露吸入の試験の方法を策定する基盤として、6 時間の単回曝露による肺負荷量の測定を実施した。測定方法は Benzo[ghi]perylene (BgP) を用いたマーカー法 (大西法) と走査型顕微鏡を用いて計測する SEM 法にて評価し、両者の比較を兼ねた実験計画とした。

マーカー法は、カーボンナノチューブ

の表面に特異的に結合する BgP を用い、結合した BgP をカーボンナノチューブから脱着して定量することにより間接的にカーボンナノチューブを定量する方法である。短時間で測定が可能であり、ある程度凝集した検体であっても測定が可能であるが、カーボンナノチューブのエアロゾルのサイズに関する情報は得られない。一方、SEM 法は、カーボンナノチューブを走査型電子顕微鏡にて直接観察し、本数を計測することで定量する方法である。測定には相当な時間を要し、凝集体に適用できないことが欠点であるが、カーボンナノチューブのサイズ情報が得られるため、吸入されたカーボンナノチューブのサイズと誘発された肺病変とを関連させることが可能である。本年度の分担研究では、マーカー法による測定を実施した。

曝露装置は、Taquann 直噴全身吸入装置 ver.3.0 を使用した。本装置は、カートリッジ噴射操作が自動化されており、以前のバージョンに比較して操作性に優れ、長時間の曝露が可能となっている。

B. 研究方法

B-1. 検体の高分散化処理 (Taquann 法)

検体は多層カーボンナノチューブの一つである MWNT-7 (三井、lot No.: 060125-01k) 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: 3,500 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中で TB に懸濁した。氷冷化で TB をシャーベット状にして金属製スパ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回行った。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。

先行研究では、目開き 25 μm の金属製フィルターを用いているが、H30 年度からの事業では、2 年間の長期吸入曝露試験を計画しており、H30 年度では先行試験²⁾に合わせて、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 (図 1)。尚、T-CNT7#53 は T-CNT7#25 に比してタングル状成分の含量が多い。

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。

なお、本実験では「ナノマテリアル暴露による感染性免疫系への影響の効率的な評価系の確立に関する研究」に供する BALB/cCrSlc 雌性マウスを 4 週齢で導入し、

5週齢で並行して吸入曝露実験を行った。

2) 飼育条件

飼育ケージは、ポリカーボネイト製の OUTER ケージと PET 製 INNER 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、シェファードシャック (Shepherd Specialty Papers社)をケージ内に設置した。

3) 群構成

対照群、T-CNT7#53 低濃度群(目標濃度 3 mg/m³)、T-CNT7#53 高濃度群(目標濃度 6 mg/m³)の3群構成とした。対照群 6 匹、T-CNT7#53 低濃度群 12 匹、T-CNT7#53 高濃度群 12 匹のマウスを使用し、1日6時間(10:00~16:00)の単回吸入曝露を行った。曝露終了直後 (Day 0)、及び1週間後 (Day 7)に定期解剖を行い、肺サンプルを採取した(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、特許申請中)(図2)。

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INNERカートリッジとOUTERカートリッジから構成される。検体を収容するINNER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OUTER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3)。

カートリッジへの検体の充填は T-CNT7#53をTBに0.05 mg/mLの濃度で再度懸濁し、低濃度群では10 mL、高濃度群では20 mLの容量を各カートリッジに分注し、直ちに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真空ポンプで減圧し、TBを昇華除去することで達成した。これにより、T-CNT7#53を低濃度群では0.5 mg/カートリッジ、高濃度群では1 mg/カートリッジ、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、袋を隔てて外気へ圧を逃がす設計となっている。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

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0.48 Mpa、噴射時間は0.2秒、1カートリッジ当たり0.3秒間隔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。6時間の吸入曝露実験において、合計91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6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、アクリル製の OUTER チャンバーとPET樹脂で作製した INNER 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 INNER 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(共同開発 柴田科学株式会社、特許所得済)。メインチャンバーの気積は179 Lである。メインチャンバーの上部は円錐状となつて

サブチャンバーに接続されている。動物は、メインチャンバー内に設置した円形一段のステンレス金網製のケージを個別に仕切り収容する。マウスは最大25匹収容が可能である。ケージには給水・給餌装置がないため、6時間曝露時の動物への負荷軽減のため給水用寒天(日本エスエルシー株式会社)をケージ内に留置した。

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の測定において、 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、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。

質量濃度測定は、ローボリウムサンプラー(080050-155、φ55 mmろ紙ホルダー、柴田科学)にフッ素樹脂バインダーガラス繊維フィルター(Model TX40HI20-WW、φ55mm、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6時間において、0~1hr、2~3hrおよび5~6hrの3回実施した。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 L/min × 60min = 90 Lから1 m³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、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 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°C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。

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から、高濃度群のみを対象に実施した。

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 週間後(Day 7)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、腋窩動脈を切断して放血致死後に解剖した。被毛に付着している可能性のある MWCNT の混入を考慮し、開胸前に全ての被毛を剥皮により除去した。

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、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。

B-3. 肺負荷量測定

1) 肺サンプルからのMWCNTの抽出

肺サンプルを対象にしてMWCNT沈着量を測定した。

肺溶解液は 5w/v% 水酸化カリウム(富士フィルム和光純薬、試薬特級)に、0.1w/v% SDS(富士フィルム和光純薬、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(富士フィルム和光純薬、試薬特級)を加えた組成である。各試薬はMilliQ水に混和後、80°Cに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。

肺サンプル(気管及び左右主気管支を除く全肺約200 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。可能な限り肺内の空気を除去するため、デシケーター内で脱気を行った後、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50°Cに設定したインキュベーター内で24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(富士フィルム和光純薬)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。

2) MWCNTの測定

MWCNTの定量は、Benzo[ghi]perylene (BgP)をマーカーとして用いるマーカー法(大西法)を用いた。

(1) 装置、器具及び試薬

①高速液体クロマトグラフ(HPLC、Acquity

UPLC、ウォーターズ)

- ②電子天秤(AE163、日本シイベルワーグナー)
- ③振とう機(TS-100、サーマル化学産業株式会社)
- ④遠心分離機(Microfuge® 22R Centrifuge、ベックマンコールター)
- ⑤超音波分散機(VP-30S、タイテック)

(2) 試薬

- ①アセトニトリル(HPLC用、富士フィルム和光純薬)
- ②メタノール(HPLC用、富士フィルム和光純薬)
- ③Benzo[ghi]perylene(BgP、試薬特級、富士フィルム和光純薬)
- ④TWEEN 80(富士フィルム和光純薬)

(3) 測定条件

HPLC:ウォーターズ Acquity UPLC

カラム:Acquity BEH C18 (ウォーターズ)

カラム粒径、長さ × 内径:1.7 μm、100 mm × 2.1 mm φ

カラム温度: 40°C

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

(3) 検量線原液の調製

①T-CNT7#53を約5 mgを10 mL容のフタ無しガラス試験管に精密に秤量し、0.1% Tween水溶液(Tw-sol)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 Tw-sol で 100 mL にメスアップした。その溶液を超音波分散機により 1 分間、超音波分散した。(以下用いる周波数と強度は 20 kHz、300 W、MWCNT 各原液:50 µg/mL)

②検量線溶液 C5 の調製

(3)①項で調製した MWCNT の各原液 0.2 mL を 15 mL 容のフタ・メモリ付の PP チューブに採取し、Tw-sol により 10 mL にメスアップし、1 分間超音波分散した。(検量線溶液 C5: 1 µg/mL)

②検量線溶液 (C1~C5)の調製

(3)①項で調製した検量線溶液 C5 を採取し、2mL 容の遠心分離用チューブに入れ、さらに Tw-sol をそれぞれの量を添加して検量線溶液 (C1~C5)を作成した(表 2)。

③マーカー溶液の調製

200 mL 容のメスフラスコに Benzo[ghi]perylene(BgP)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 マーカー原液(5.0 µg/mL)とした(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 Tw-sol 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

検量線溶液 C5 及び肺から抽出した MWCNT を懸濁調製した各溶液 1 mL を 12,000 rpm で 10 分間遠心分離した。その上清を除去し、TW-mixture を 1 mL 加え、12000 rpm で 10 分間遠心分離した。再度、上清を除去し、それぞれに濃塩酸 0.2mL を加えタッチミキサーで 10 秒間攪拌し、12,000 rpm で 10 分間遠心

分離し、上澄み液を除去し濃硫酸 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、Benzo[ghi]perylene(BgP)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、0.4 µm のフィルター(ワットマン:GE Healthcare UK Ltd)を用いて、ろ過したフィルター上の MWCNT をポンチ(φ 8 mm)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。

(5) 肺内の MWCNT の沈着量の計算

MWCNT 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た。肺及び縦隔の HPLC で測定した面積値を直線回帰式に代入し、MWCNT の測定値を求め、希釈倍率を乗じることにより、MWCNT の個体当りの肺沈着量(単位:µg)を求めた。

C. 研究結果

(1) T-CNT7#53 の吸入曝露実験

T-CNT7#53 低濃度群の全身曝露吸入実験における全体の平均質量濃度は 2.7 ± 0.2 mg/m³、高濃度群では 5.1 ± 0.8 mg/m³ であり、目標濃度に対して低濃度群では 90%、高濃度群では 85% の値であった(図 4D、図 5E)。

CPC の測定において、測定後に希釈流量が設定値と異なった値であることが判明した。CPC カウントの絶対値表記ができないため、波形のみを図 4A 及び図 5A に示した。CPC の値はカートリッジから噴射直後に速やかに上昇し、次のカートリッジを噴射する 4 分後までの間に徐々に低下する鋸歯状を示した。CPC カウントは、低濃度群では 0 から 6 時間の

平均値に対して、25%～209%、高濃度群では26%～200%の範囲で変動した(図4D、図5E)。

MMADは高濃度群のみの測定であるが、510 nm(σ_g :8.2)であった(図5D、図5E)。

6時間の吸入曝露実験において使用した総検体量は、低濃度群では46 mg (0.5 mg/cartridge × 91 cartridges)、高濃度群では91 mg (1 mg/cartridge × 91 cartridges)である。6時間の曝露チャンバーの総換気量は11.7 m³ (32.5 L/min × 360 min)であることから名目上のエアロゾル濃度は低濃度群では3.9 mg/m³、高濃度群では7.8 mg/m³と計算される。実測値の濃度から、エアロゾル化効率を計算すると低濃度群、高濃度群それぞれ69.9%、66.0%であった。

6時間の曝露時間を通して、曝露チャンバー内の温度は25°C台に維持された。湿度は、約50%～80%の間であった。動物の一般状態に異常は認められなかった。

(2) マウスの肺病理組織検査

マーカ法(大西法)によって測定した、低濃度群におけるDay 0の肺負荷量平均値は3.98 ± 0.83 μg/動物、Day 7では2.14 ± 0.83 μg/動物であった。高濃度群におけるDay 0の肺負荷量平均値は6.19 ± 0.57 μg/動物、Day 7では2.88 ± 0.23 μg/動物であった。Day 0における肺負荷量は、ほぼ濃度依存的な値であった。

なお、SEM法用にサンプリングした肺については、現在、測定を進めている状況である。

D. 考察

本分担研究では、T-CNT7#53の2年間の間欠吸入曝露実験に向けて肺負荷量の基礎データを得る事、並びにマーカ法(大西法)

とSEM法でのMWCNT肺負荷量の相違を確認するため、T-CNT7#53のマウスに対する6時間の単回全身曝露吸入を行い、曝露終了直後及び曝露7日目の肺負荷量測定を実施した。

先行研究で独自に開発したカートリッジ直噴式全身曝露装置は、汎用性が高く、少量の検体で全身曝露吸入実験が可能である。これまで、MWCNT、DWCNT、酸化チタン、チタン酸カリウムなど物理化学的性状が異なる検体の吸入曝露実験を実施してきた実績がある。一方、カートリッジの装填、噴射、交換を手動で行っていたため、2時間の曝露実験が限度であった。カートリッジの一連の操作の自動化は技術的に非常に難易度が高く、新たな技術基盤の構築が必要であった。

本事業で使用したTaquann全身曝露吸入装置 ver 3.0は、カートリッジ操作を自動化する技術を導入し、OECDガイドラインで規定されている6時間の曝露実験を可能とした。カートリッジの構造も見直し、安価に製造可能なインナーカートリッジを導入したことで、大量のカートリッジを用意することのできるため、6時間の曝露実験に必要な検体調製が効率よく行えるようになった。また、カートリッジの噴射間隔をこれまでの6～7分間よりも短く設定することが可能となったため、エアロゾル濃度の変動範囲も最小限に抑えられるようになった。

曝露チャンバーは給餌・給水ができないが、動物輸送用の寒天を供給することにより、動物への負担を軽減することが可能であった。しかしながら、チャンバー内の湿度が最大80%程度にまで上昇することから、チャンバーに導入する清浄空気の加湿方法、寒天の供給量を最適化する必要がある。

肺負荷量は、測定の結果、曝露終了直後において低濃度群では約4 μg/動物、高濃度群

では約 6 μg /動物であった。先行研究では Taquann 法処理に 25 μm の金属製フィルターを用いた検体 (T-CNT7#25)、並びに、原末を用い 2.2 mg/m^3 の質量濃度、2 時間/日 \times 5 日間(合計 10 時間)の吸入曝露実験において、SEM 法による測定により Taquann 処理検体では約 8 μg /動物、原末では約 4 μg /動物という結果が得られている。

検体の調製方法、曝露条件および測定法が異なるため、本研究と直接比較はできないが、肺負荷量が曝露濃度と曝露時間の積に比例すると仮定すると(肺負荷量 = 曝露濃度 \times 曝露時間 $\times k$)、本研究における比例定数は低濃度では 0.25、高濃度では 0.20 と計算される。これは、先行研究において原末を曝露した場合の比例定数 (0.18) よりは大きく、T-CNT7#25 (0.36) よりは小さな値である。比例定数は、検体の微細さ、すなわち金属フィルターのサイズに依存的である可能性が考えられた。実務的な面からは、これまで 5 日間必要であった曝露時間を 1 日で実施する事が可能となるため、毒性評価の効率化が期待される。

E. 結論

Taquann 全身曝露吸入装置 Ver.3.0 を使用し、T-CNT7#53 をマウスに 6 時間、単回吸入曝露を行い、肺負荷量測定をマーカー法にて実施した。低濃度群における Day 0 の肺負荷量平均値は約 4 μg /動物、高濃度群は約 6 μg /動物であり、肺負荷量は、ほぼ濃度依存的な値であった。カートリッジ操作の自動化により、6 時間の吸入曝露実験が可能となり、ナノマテリアルの毒性評価の効率化と、OECD ガイドラインに準拠した標準的な吸入曝露実験への適用が期待された。

謝辞:

本研究の遂行にあたり、技術的支援をしていただいた、辻昌貴氏、森田紘一氏、相田麻子氏に深く感謝する。

F. 参考文献

1. 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.
2. Kasai T, Umeda Y, Ohnishi M, Mine T, Kondo H, Takeuchi T, Matsumoto M, Fukushima S. Lung carcinogenicity of inhaled multi-walled carbon nanotube in rats. *Part Fibre Toxicol.* 2016 Oct 13;13(1):53.

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. 知的所有権の取得状況

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

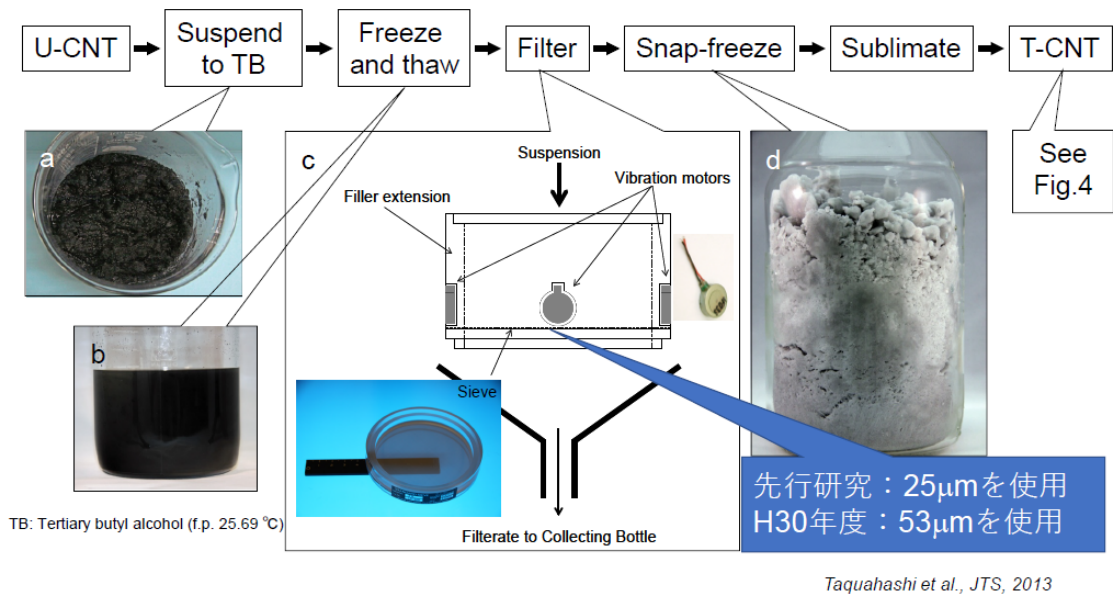


図1 Taquann法の概要

Taquann法はこれまで目開き25 μmの金属製フィルターを用いているが、H30年度からの事業では、2年間の長期吸入曝露試験を計画しており、先行試験(Particle Fibre Tox 2016)で用いられたものと同じ目開き53 μmの金属製フィルターを用いた。

表1 群構成

Group	N	Individual number	Sampling	Mesurement Technique
Control				
Clean air	6	#1, #2, #3	Day 7	Ohnishi method
		#4, #5, #6		SEM method
6 hrs./Day x 1 Day				
Low Concentration	12	#7, #8, #9	Day 0	Ohnishi method
T-CNT#53		#10, #11, #12	Day 0	SEM method
Target Concentratetion: 3 mg/m ³		#13, #14, #15	Day 7	Ohnishi method
6 hrs./Day x 1 Day		#16, #17, #18	Day 7	SEM method
High Concentration	12	#19, #20, #21	Day 0	Ohnishi method
T-CNT#53		#22, #23, #24	Day 0	SEM method
Target Concentratetion: 6 mg/m ³		#25, #26, #27	Day 7	Ohnishi method
6 hrs./Day x 1 Day		#28, #29, #30	Day 7	SEM method

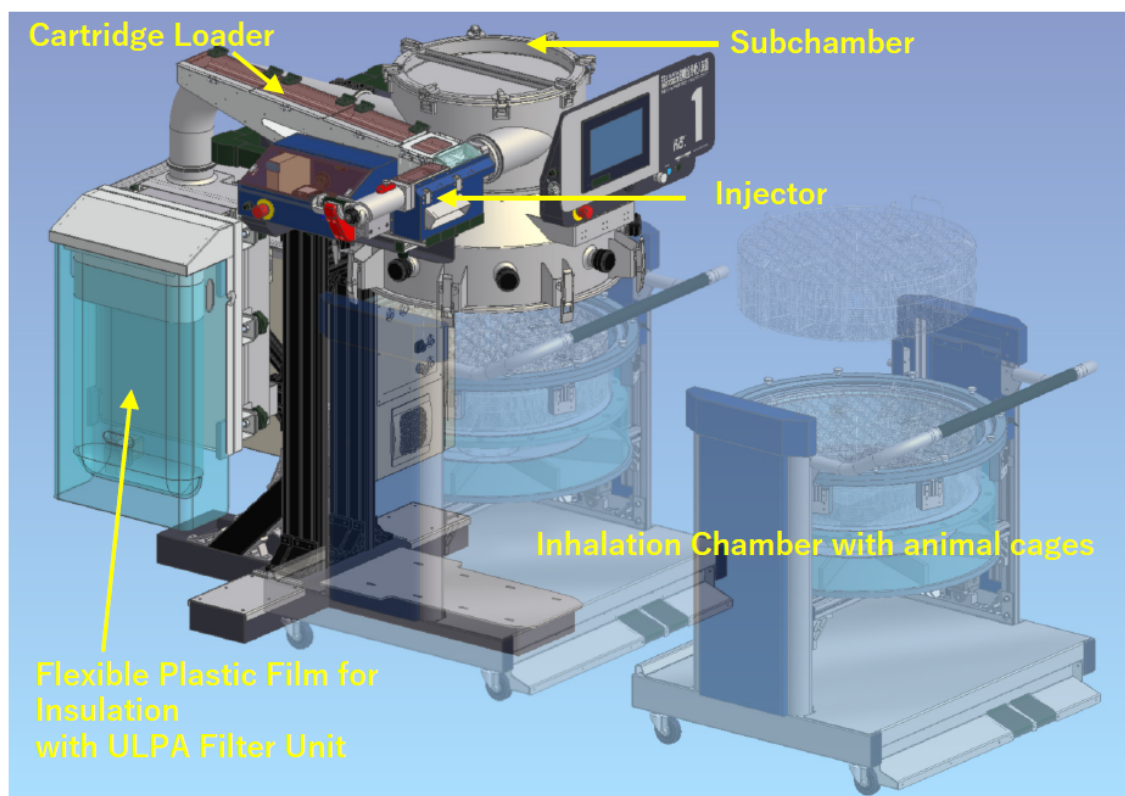


図2 Taquann 直噴全身曝露吸入装置 ver.3.0

マウスの全身曝露吸入実験には既設の 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)。カートリッジ操作が完全に自動化されている。



図3 カートリッジ

Ver3.0 では二重構造とし、圧縮空気の導入とエアゾルの噴射機構は共にキャップ部分に集約されている。

表 2 マーカー法測定の見量線調製

試料名	C5採取量 (mL)	Tw-sol添加量 (mL)	濃度 (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

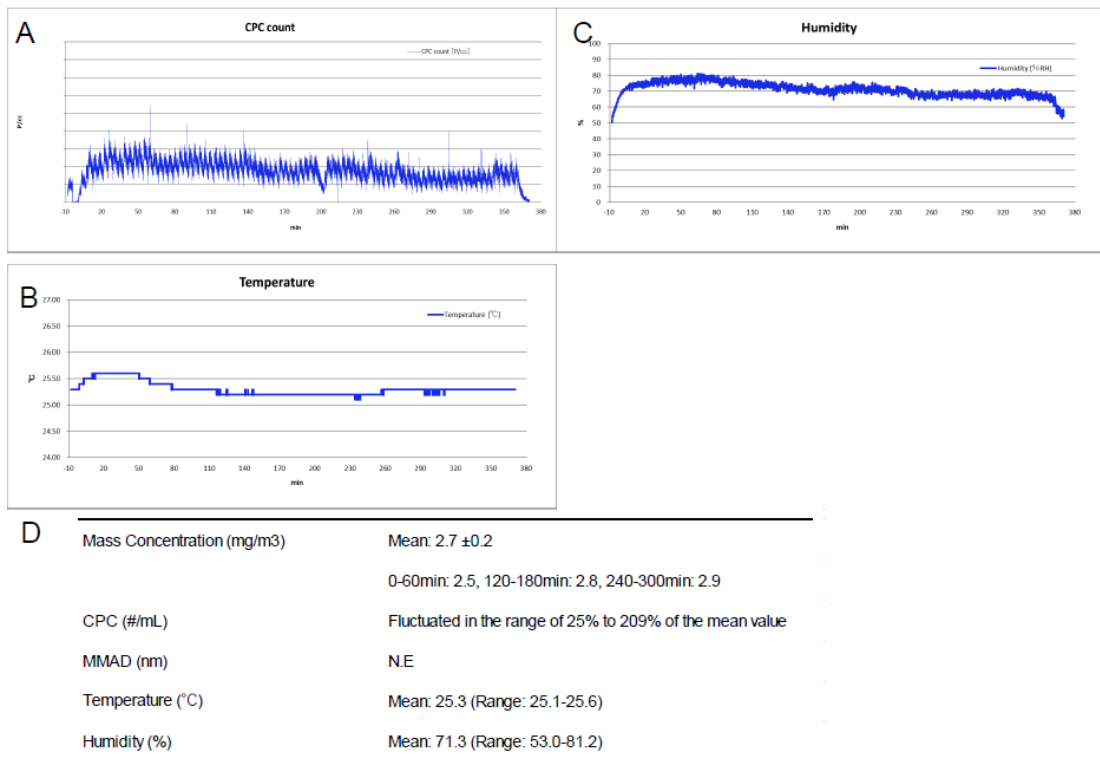


図 4 低濃度群の吸入曝露実験結果

A: CPC波形、B:曝露チャンバー内温度推移、C:曝露チャンバー内湿度推移、D:測定結果のまとめ。T-CNT7#53低濃度群の全身曝露吸入実験における全体の平均質量濃度は $2.7 \pm 0.2 \text{ mg/m}^3$ 、目標濃度に対して90%の値であった(D)。CPCの測定において、測定後に希釈流量が設定値と異なった値であることが判明した。CPCカウントの絶対値表記ができないため、波形のみをAに示した。CPCの値はカートリッジから噴射直後に速やかに上昇し、次のカートリッジを噴射する4分後までの間に徐々に低下する鋸歯状を示した。CPCカウントは、低濃度群では0から6時間の平均値に対して、25%~209%の範囲で変動した(D)。

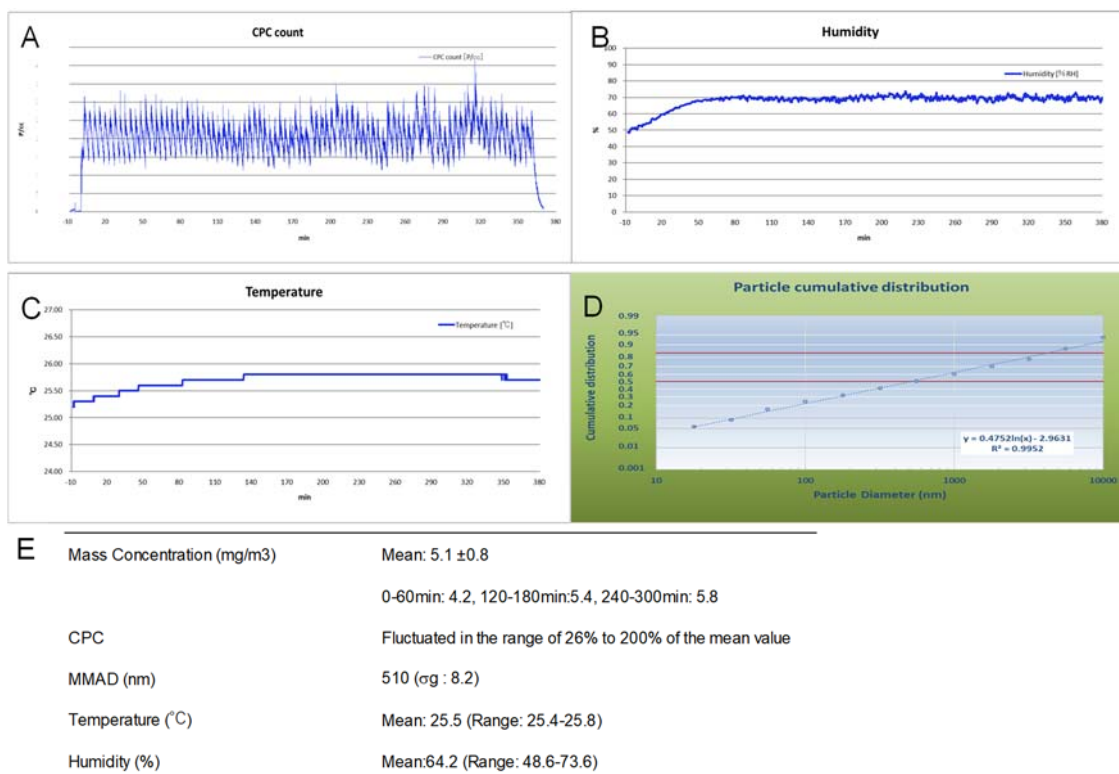


図 5. 高濃度群の吸入曝露実験結果

A: CPC波形、B: 曝露チャンバー内湿度推移、C: 曝露チャンバー内温度推移、D: 測定結果のまとめ。T-CNT7#53高濃度群の全身曝露吸入実験における全体の平均質量濃度は $5.1 \pm 0.8 \text{ mg/m}^3$ であり、目標濃度に対して85%の値であった(E)。

CPCの測定において、測定後に希釈流量が設定値と異なった値であることが判明した。CPCカウントの絶対値表記ができないため、波形のみをAに示した。CPCの値はカートリッジから噴射直後に速やかに上昇し、次のカートリッジを噴射する4分後までの間に徐々に低下する鋸歯状を示した。CPCカウントは、高濃度群では26%～200%の範囲で変動した(E)。MMADは510 nm($\sigma_g: 8.2$)であった(D、E)。

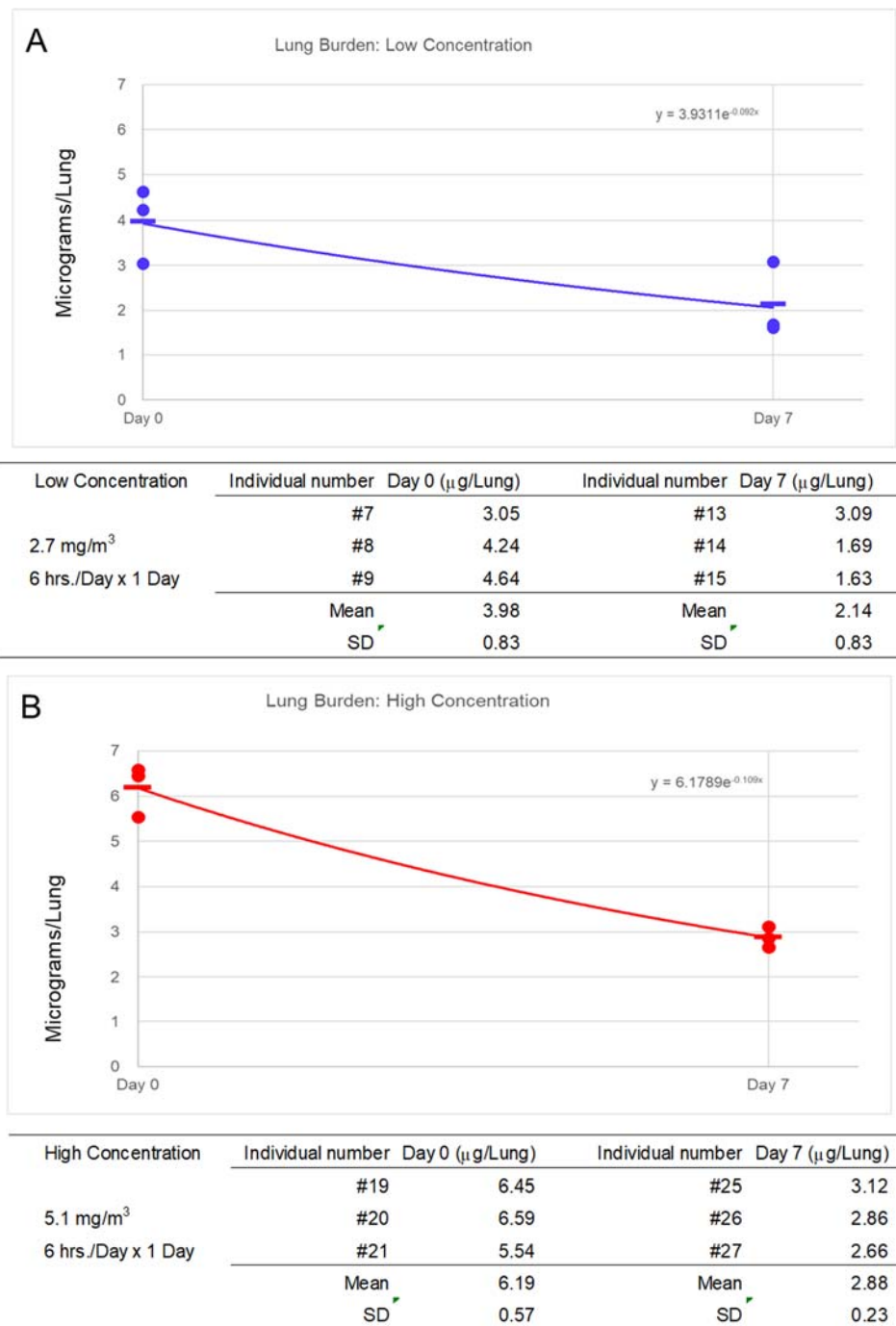


図6 肺負荷量測定結果

A: 低濃度群、B: 高濃度群

マーカー法(大西法)によって測定した、低濃度群における Day 0 の肺負荷量平均値は $3.98 \pm 0.83 \mu\text{g/動物}$ 、Day 7 では $2.14 \pm 0.83 \mu\text{g/動物}$ であった。高濃度群における Day 0 の肺負荷量平均値は $6.19 \pm 0.57 \mu\text{g/動物}$ 、Day 7 では $2.88 \pm 0.23 \mu\text{g/動物}$ であった。Day 0 における肺負荷量は、ほぼ濃度依存的な値であった。