

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: ナノマテリアルの吸入曝露手法の開発に関する研究
(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: 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

研究協力者: 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暴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) および本研究班に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を開始した。Taquann 法処理にはこれまで目開き 25 μm の金属製フィルターを用いているが、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。吸入曝露実験の結果、平均質量濃度は低濃度群 $2.7 \pm 0.1 \text{ mg/m}^3$ 、高濃度群は $5.1 \pm 0.2 \text{ mg/m}^3$ 、MMAD の平均値は低濃度群、高濃度群それぞれ 439 nm(σ : 7.8-8.1)、572 nm(σ : 6.4-9.3)、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、ヒトで想定される曝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) 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)¹⁾。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⁾、並びに気管内投与実験との比較を目的として、MWNT-7 の2年間の間欠全身暴露吸入の試験を開始した。

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。

D. 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。

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きたが、本事業では先行研究と同じ目開き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、目開き25 μmの金属製フィルターでは検体の回収率は約10%であるが目開き53 μmの金属製フィルターでは約80%の回収率である。T-CNT7#53はT-CNT7#25に比してタンゲ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。

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。

体重測定を週1回実施した。

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。各群50匹のマウスを使用し、1日6時間(10:00~16:00)の吸入曝露を4週間毎に実施した。(表1)。曝露チャンバーはマウスを25匹収容するデザインであるため、各群を二つのサブグループに分けて曝露を実施した。

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。

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。

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)暴露チャンバー

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(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っ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。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/m³)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 μ m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、ローボリュームサンプラー(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ーガラス繊維フィルター(Model TX40HI20-WW、 $\phi 55$ mm、捕集効率(DOP 0.3 μ m): 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 \times 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 μ m、No.2; 5.6 μ m、No.3; 3.2 μ m、No.4; 1.8 μ m、No.5; 1.0 μ m、No.6; 0.56 μ m、No.7; 0.32 μ m、No.8; 0.1 μ m、No.9; 0.10 μ m、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℃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、低濃度群と高濃度群を交互に実施した。

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。

E. 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 $2.7 \pm 0.1 \text{ mg/m}^3$ 、高濃度群では $5.1 \pm 0.2 \text{ mg/m}^3$ 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 2E、図 3E)。

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 2A 及び図 3A 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、21%～216%、高濃度群では 46%～182% の範囲で変動した (図 2E、図 3E)。

MMAD は低濃度群において平均 439 nm (σ : 7.8-8.1)、高濃度群において平均 572 nm (σ : 6.4-9.3)、であった (図 2D、2E、図 3D、2E)。

6 時間の吸入曝露実験において使用した総検体量と 6 時間の曝露チャンバーの総換気量 (11.7 m^3) と実測値の濃度から、エアロゾル化効率を計算すると低濃度群、高濃度群の平均値はそれぞれ $71.1 \pm 3.0\%$ 、 $66.7 \pm 2.8\%$ であった (図 2E、図 3E)。

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℃ 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ず、体重推移は対照群、低濃度群、高濃度群に差は認められなかった (図 4)

D. 考察

本分担研究では、MWCNT の慢性影響を気管内投与試験と全身曝露吸入試験との比較を行うため T-CNT7#53 の 2 年間の間欠吸入曝露実験を開始した。

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加湿方法、寒天の供給量を最適化する必要がある。

今後、4 週毎の曝露実験を進め、曝露開始 6 カ月後に最初の定期解剖を実施する計画である。

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 時間の全身曝露吸入を行った。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

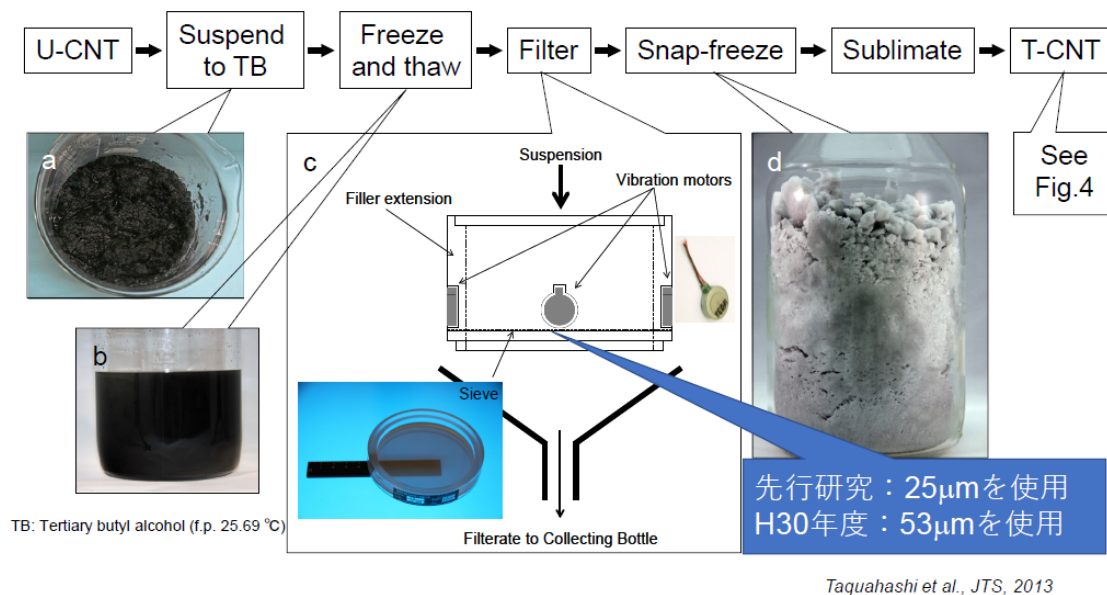


図1 Taquann法の概要

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、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	Examinations	Necropsy after inhalation exposure			
		N	6M	12M	24M
Control 0 mg/m ³ 6hr/D/4W×26times	・ Lung Burden	9	3	3	3
	・ Histopathology(perfusion)	23	3	3	17
	・ Immune function				
	BALF	18	6	6	6
	Pulmonary interstitium mRNA Spleen, Lymph node				
	Subtotal	50	Consist of two sub-groups, A&B		
MWNT-7 #53um Low Concentration Target Concentration: 3 mg/m ³ 6hr/D/4W×26times	・ Lung Burden	9	3	3	3
	・ Histopathology(perfusion)	23	3	3	17
	・ Immune function				
	BALF	18	6	6	6
	Pulmonary interstitium mRNA Spleen, Lymph node				
	Subtotal	50	Consist of two sub-groups, A&B		
MWNT-7 #53um H Target Concentration: 6mg/m ³ 6hr/D/4W×26times	・ Lung Burden	9	3	3	3
	・ Histopathology(perfusion)	23	3	3	17
	・ Immune function				
	BALF	18	6	6	6
	Pulmonary interstitium mRNA Spleen, Lymph node				
	Subtotal	50	Consist of two sub-groups, A&B		
Total number of animals		150			

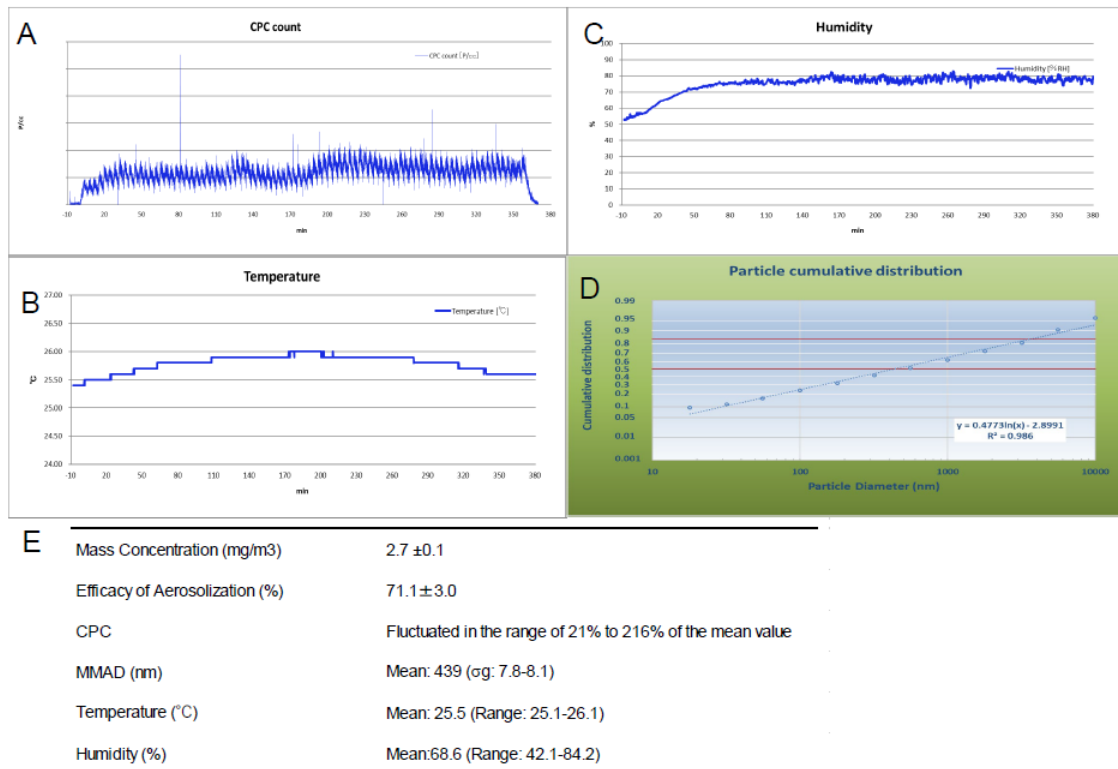


図 2 低濃度群の吸入曝露実験結果

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: MMAD、E: 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 $2.7 \pm 0.1 \text{ mg/m}^3$ 、目標濃度に対して90%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、低濃度群では0から6時間の平均値に対して、21%～216%の範囲で変動した(E)。MMADは平均439 nm(σ_g : 7.8-8.1)であった(D、E)。

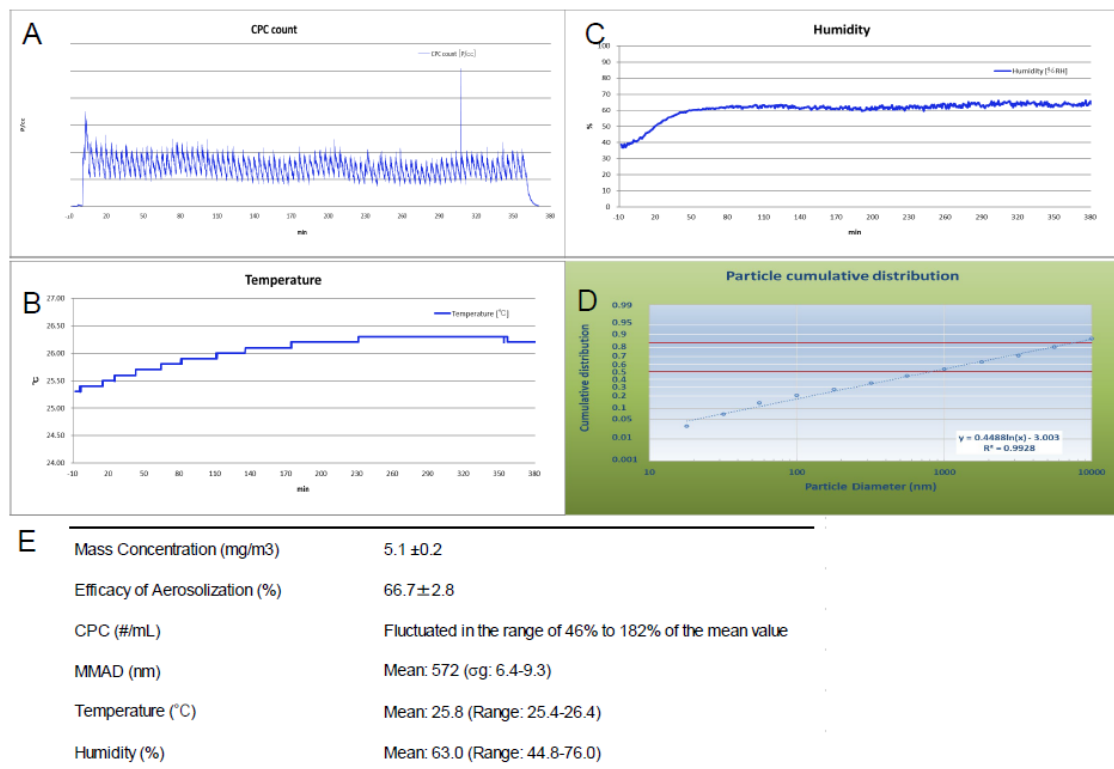


図 3. 高濃度群の吸入曝露実験結果

A: CPC波形、B: 曝露チャンバー内温度推移、C: 曝露チャンバー内湿度推移、D: MMAD、E: 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 $5.1 \pm 0.2 \text{ mg/m}^3$ 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46%～182%の範囲で変動した(E)。MMADは572 nm(σg: 6.4-9.3)であった(D、E)。

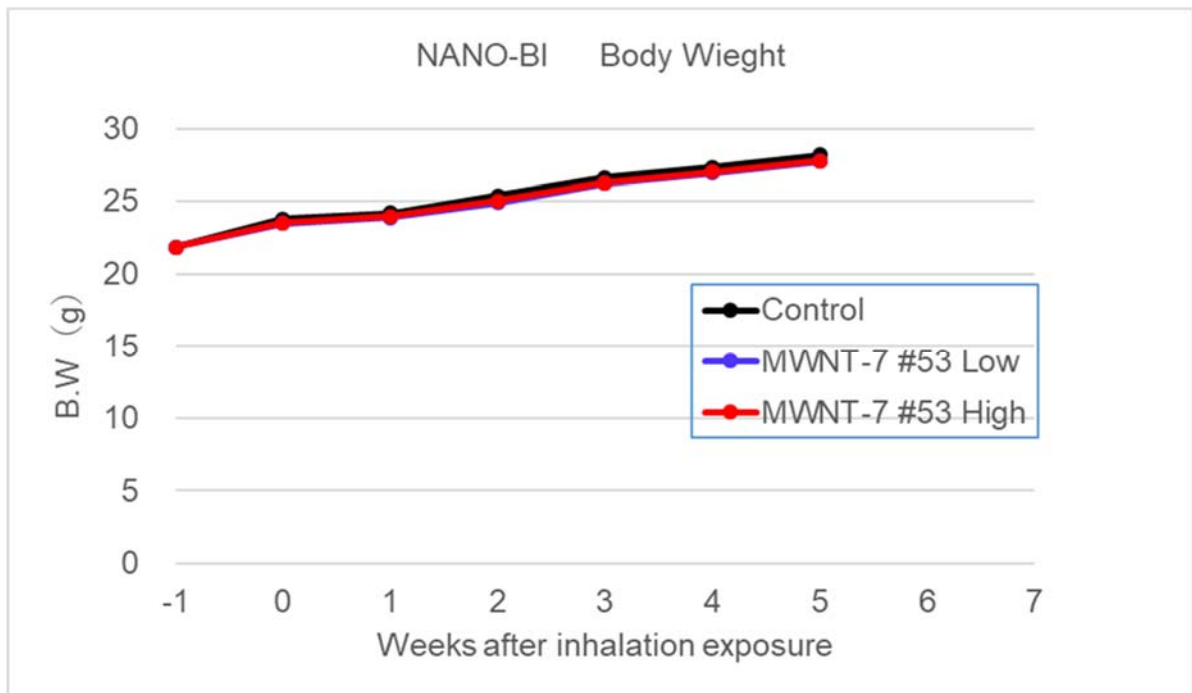


図 4. 体重推移

動物の一般状態に異常は認められず、体重推移は対照群、低濃度群、高濃度群に差は認められなかった。