

令和元年度 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。令和元年度の本分担研究では、肺胞マクロファージ胞体内で毛玉状凝集が想定される MWCNT の一つである MWCNT-N を検体とした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した。検体は先行研究で開発した高分散乾燥検体を得る Taquannh 法処理を行い、吸入曝露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試料を採取した。これらの試料は、組織(肺と縦隔)負荷量の測定、病理組織学的評価および免疫機能評価の分担研究者に提供した。曝露濃度は 1、3 mg/m<sup>3</sup> を目標としたが、実際の曝露濃度は目標濃度の約半分であった。吸入チャンバー内の Taquann 処理によって高分散した乾燥検体 MWCNT-N(T-CNTN)のエアロゾルの形状を確認したところ、細繊維が緩やかに絡み合い凝集している様子が確認された。MWCNT-N は MWNT-7 に比較して繊維径が細いため、前年度に吸入曝露実験を行った MWNT-7 とは異なり、吸入曝露装置内でエアロゾル化した状態から細繊維が絡み合って再凝集する可能性が考えられた。

## 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。

3ヵ年の研究班計画の最終年度となる令和元年度の本分担研究では、肺胞マクロファージ胞体内で毛玉状凝集が想定される MWCNT の一つである MWCNT-N を検体とした全身曝露吸入実験を行い、定期解剖により試料を採取し、肺と縦隔の組織負荷量の解析、病理組織学的評価および免疫機能評価用に分担研究者に提供した。

## B. 研究方法

### B-1. 検体の高分散化処理 (Taquann 法)

MWCNT-N 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定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 °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)。

### (3) MWCNT-N

MWCNT-N は NIKKISO CO.,LTD で生産されていた MWCNT である。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 (MITSUI & CO., LTD.) とは大きく異なり、分散性は極めて低い。そのため Taquann 法で分散溶媒として使用する tert-ブチルアルコールへの分散工程においては、より高出力の超音波を短時間照射することにより懸濁液を得た。

MWCNT-N の原末 500 mg をビーカーに入れ、35°C 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て混合した。次に、混合液を氷冷しながらホイッパーで攪拌し TB がシャーベット状になった状態で MWCNT-N 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°C で一晩凍結した。約 60°C に加温した TB を添加し全量を 1,000mL とした。

凍結再融解した MWCNT-N の TB 懸濁液をサンプル密閉式超音波破碎装置

BIORUPTOR®UCD-250HSA (コスモ・バイオ株式会社)にて、160W の出力で 30 秒間の超音波照射を 6 回繰り返す、MWCNT-N が十分に懸濁した混合液を得た。以降、T-CNT#53 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。以下、Taquann 法処理(目開き 53  $\mu\text{m}$  金属フィルターを使用)を行った MWCNT-N を T-CNTN と記載した。

## **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 5 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;  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度;  $55 \pm 5\%$ 、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、シェパードシヤック (Shepherd Specialty Papers 社)をケージ内に設置した。

### (3)群構成

HEPA フィルターを通した清浄空気のみを送気した群 (対照群)、T-MWCNTN 曝露群 (低濃度群、高濃度群)の 3 群構成とした。曝露目標濃度は低濃度群と高濃度群、それぞれ 1、3  $\text{mg}/\text{m}^3$  と設定した。T-CNTN を検体各群当たり 48 匹のマウスを使用、病

理組織用に 12 匹、組織沈着量測定用に 12 匹、免疫機能実験用に 24 匹を割り当てた (表 1)。曝露チャンパ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

検体のエアロゾル化は、既設の Taquann 直噴全身吸入装置 Ver 3.0 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パーから構成される。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、MWCNT-N の低濃度群は 0.025  $\text{mg}/\text{mL}$  の TB 懸濁液、高濃度群では 0.05  $\text{mg}/\text{mL}$  の TB 懸濁液を各カートリッジに 10 mL 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行った。

噴射装置は、サブチャンパー (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、サブチャンパ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、サブチャンパー内で効果的に分散された後、希釈されつつ曝露チャンパ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。曝露チャンパーの総換気流

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、カートリッジの交換、噴射は完全自動化で実施した。

曝露チャンパー内の温度、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) 曝露チャンパー

動物を収容し検体を曝露する曝露チャンパーは、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、メインチャンパ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。曝露チャンパーはアクリル製の OUTER チャンパーと PET 樹脂で作製した INNER チャンパー(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 チャンパーは交換可能であり、検体の変更に対応できるシステムとなっている。メインチャンパーの上部は円錐状となっておりサブチャンパーに接続されており、メインチャンパーの気積 179 L である。

#### (6) 曝露チャンパー内のエアロゾル濃度測定

曝露チャンパ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<sup>3</sup>)測定を並行して行った。

相対濃度測定は、対応濃度  $3 \times 10^5$  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。

曝露チャンパーと 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  $1 \times 10^3$  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、MWCNT-N では 10 倍希釈して CPC による測定を行った。

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 - 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 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  $1.5 \text{ L/min} \times 120 \text{ min} = 180 \text{ L}$  から  $1 \text{ m}^3$  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、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パ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、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。

#### (8) 解剖

肺と縦隔、顎下リンパ節のサンプリングのため、曝露終了直後(0W)、1 週後(1W)、4 週後(4W)及び 8 週後(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、気道内に吸引された検体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(フジフィルム和光純薬工業、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生理食塩水を 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) MWCNT-N (T-CNTN) の吸入曝露実験

5日間反復全身曝露吸入実験において、質量濃度は低濃度群、高濃度群それぞれ $0.6\pm 0.1$  mg/m<sup>3</sup>、 $1.3\pm 0.2$  mg/m<sup>3</sup>、平均CPCカウントは、低濃度群、高濃度群それぞれ $503\pm 150$ /cm<sup>3</sup>、 $1,107\pm 246$  /cm<sup>3</sup>であった。MMADは低濃度群、高濃度群それぞれ $640\sim 3,708$ nm( $\sigma$ :8.6 ~ 34.0)、 $1,617\sim 3,474$  nm( $\sigma$ :11.5 ~ 26.7)であった。実験期間を通して、質量濃度は目標濃度の約半分であり、エアロゾル化効率は30%未満であった(図5、図6)。

吸入曝露装置の曝露チャンバーからサンプリングしたMWCNT-Nのエアロゾルの形状を確認したところ、毛玉状に凝集している様子が確認され、その直径(長軸)は8~200 $\mu$ m程度の大きさであった(図7)。MWCNT-Nの繊維長はMWNT-7とほぼ同等であるが、繊維径は細く絡まりやすいため、エアロゾルの状態から再凝集する可能性が考えられた(図8)。

### (2) 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 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-N は、原末の形状からエアロゾル化は非常に困難と考えられたが、Taquann 法により高分散検体が得られ、また、Taquann 吸入曝露装置 Ver3.0 によりエアロゾル化が可能であった。質量濃度は低用量、高用量ともに目標濃度の半分程度であった。その理由として、MWCNT-N は繊維径が細く柔らかいため、エアロゾル化した段階においてチャンバー内で繊維が絡まりあい再凝集していることが想定された。

この性状のため、高分散化した乾燥検体 (T-CNTN) を得るための Taquann 法処理過程においても金属製フィルターにも絡まりやすく、濾過効率も低い。

## E. 結論

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ため、モデルとなるナノマテリアルの全身曝露吸入実験を実施した。MWCNT-N (T-CNTN) は目標濃度の約半分であった。その原因として MWCNT-N は繊維径が細いため、エアロゾルの状態から再凝集する可能性が考えられた。吸入曝露を行ったマウスの定期解剖を行い、病理組織評価および免疫機能評価及び肺と縦隔の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、相田麻子氏に深く感謝する。

## 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.

Abdelgied M, El-Gazzar AM, Alexander WT, Numano T, Iigou M, Naiki-Ito A, Takase H, Hirose A, Taquahashi Y, Kanno J, Abdelhamid M, Abdou KA, Takahashi S, Alexander DB, Tsuda H. Carcinogenic effect of potassium octatitanate (POT) fibers in the lung and pleura of male Fischer 344 rats after intrapulmonary administration. Part Fibre Toxicol. 2019 Sep 2;16(1):34.

## 2. 学会発表

Yuhji Taquahashi, Satoshi Yokota, Koichi Morita, Masaki Tsuji, Akihiko Hirose and Jun Kanno, Improved aerosol generation method and newly designed whole body rodent inhalation apparatus for the testing of nanomaterials in human-relevant exposure scenario, 15th IUTOX International Congress of Toxicology (ICTXV), Hawaii Convention Center, Honolulu, Hawaii, USA, July 16, 2019, Poster

高橋祐次、新素材の毒性評価-工業的ナノマテリアルの高分散性小規模全身ばく露吸入装置の開発、JST-CRDS 2019 年度 科学技術未来戦略 WS、2019.12.3 (東京)

Yuhji Taquahashi, Satoshi Yokota, Koichi Morita, Masaki Tsuji, Makiko Kuwagata, Akihiko Hirose and Jun Kanno, A long-term whole-body inhalation study of multi-walled carbon nanotube in mice with an improved dispersion and inhalation system, the 59th Annual Meeting of the Society of Toxicology, at the Anaheim Convention Center, Anaheim, California, USA, March 17, 2020, Abstract Number/Poster Board number: 2104/ P452, Poster (Cancelled due to COVID-19)

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

### 1. 特許取得

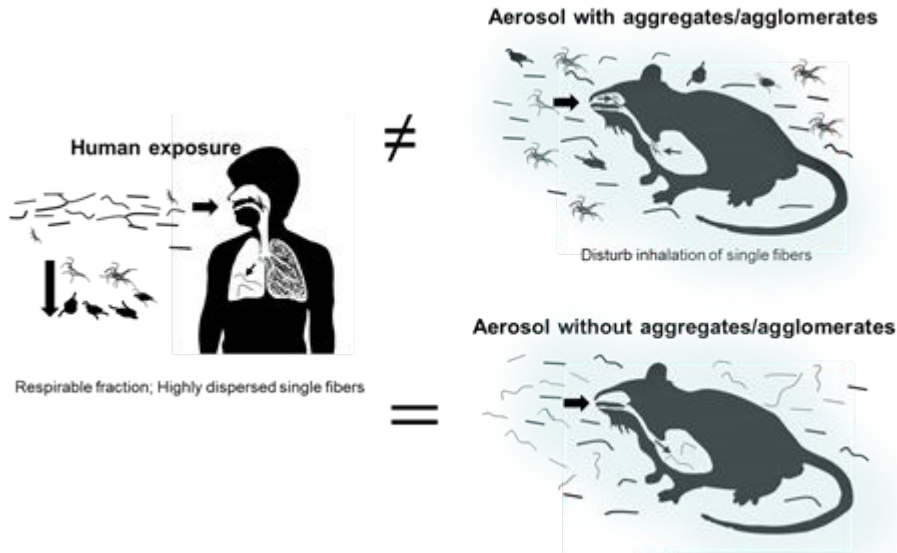
なし

### 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。



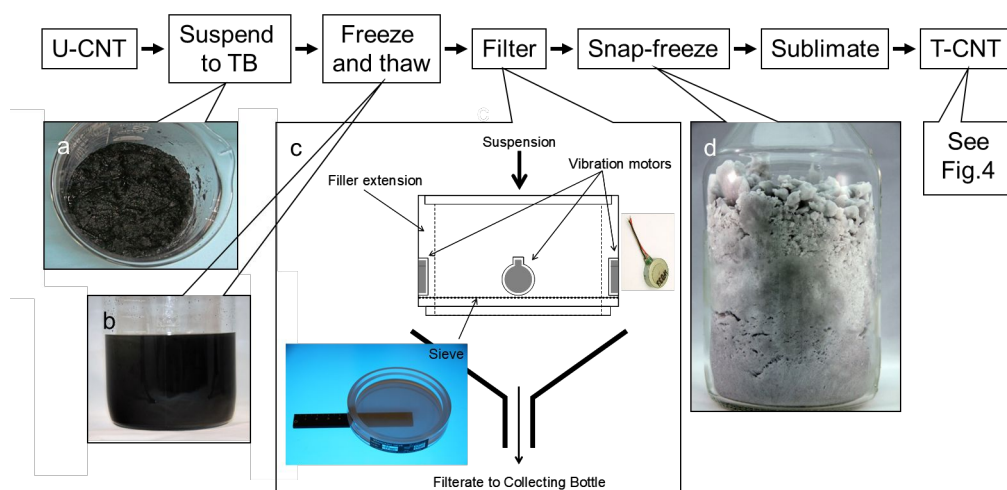


図 2 Taquann 法の概要

(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)  $-25^{\circ}\text{C}$  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:  $17.6\text{ m/s}^2$ ) 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。MWCNT-N の Taquann 法処理に使用した Sieve は目開き  $53\mu\text{m}$  のものを使用した。Taquahashi et al., JTS, 2013;38 (4) :619-28

表 1 群構成

Group	Examinations	Necropsy after inhalation exposure				
		N	0W	1W	4W	8W
<b>Control</b>	• Lung Burden	12	3	3	3	3
0 mg/m <sup>3</sup>	• Histopathology(perfusion)	16	4	4	4	4
2hr/D/W x 5W	• Immune function	20	5	5	5	5
Total 10 hr	BALF(Cytospin, Flow cytometry, Multiplex) Pulmonary mRNA Spleen, Lymph node					
	Subtotal	48	divide into two subgroups, A and B			
<b>MWCNT-N Low</b>	• Lung Burden	12	3	3	3	3
Target Conc. 1 mg/m <sup>3</sup>	• Histopathology(perfusion)	16	4	4	4	4
Actual Conc. 0.6mg/m <sup>3</sup>	• Immune function	20	5	5	5	5
2hr/D/W x 5W	BALF(Cytospin, Flow cytometry, Multiplex)					
Total 10 hr	Pulmonary mRNA Spleen, Lymph node					
	Subtotal	48	divide into two subgroups, A and B			
<b>MWCNT-N High</b>	• Lung Burden	12	3	3	3	3
Target Conc. 3 mg/m <sup>3</sup>	• Histopathology(perfusion)	16	4	4	4	4
Actual Conc. 1.3mg/m <sup>3</sup>	• Immune function	20	5	5	5	5
2hr/D/W x 5W	BALF(Cytospin, Flow cytometry, Multiplex)					
Total 10 hr	Pulmonary mRNA Spleen, Lymph node					
	Subtotal	48	divide into two subgroups, A and B			
<b>Total number of animals</b>		<b>144</b>				

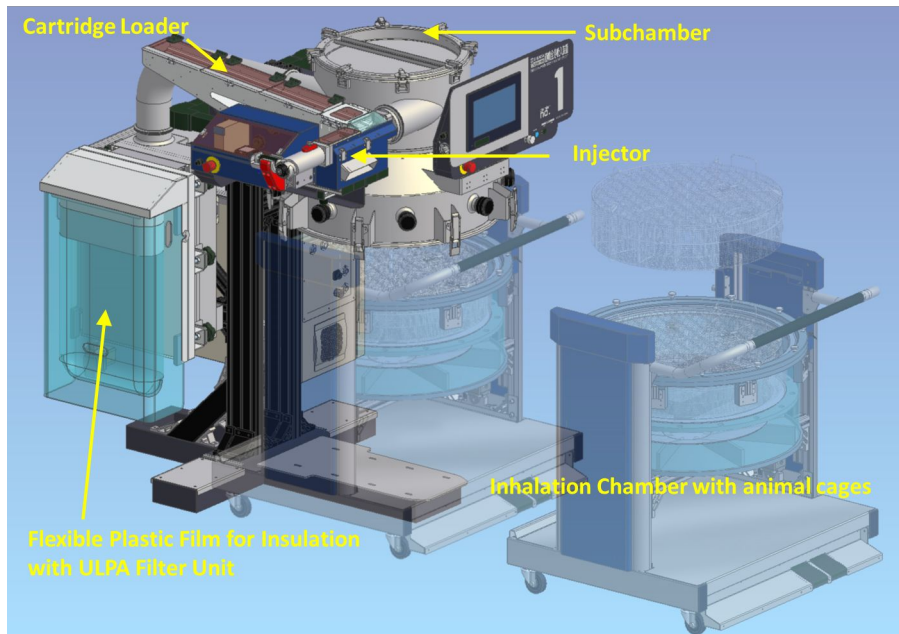


図3 Taquann 直噴全身曝露吸入装置の模式図 (Ver 3.0)

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erc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。

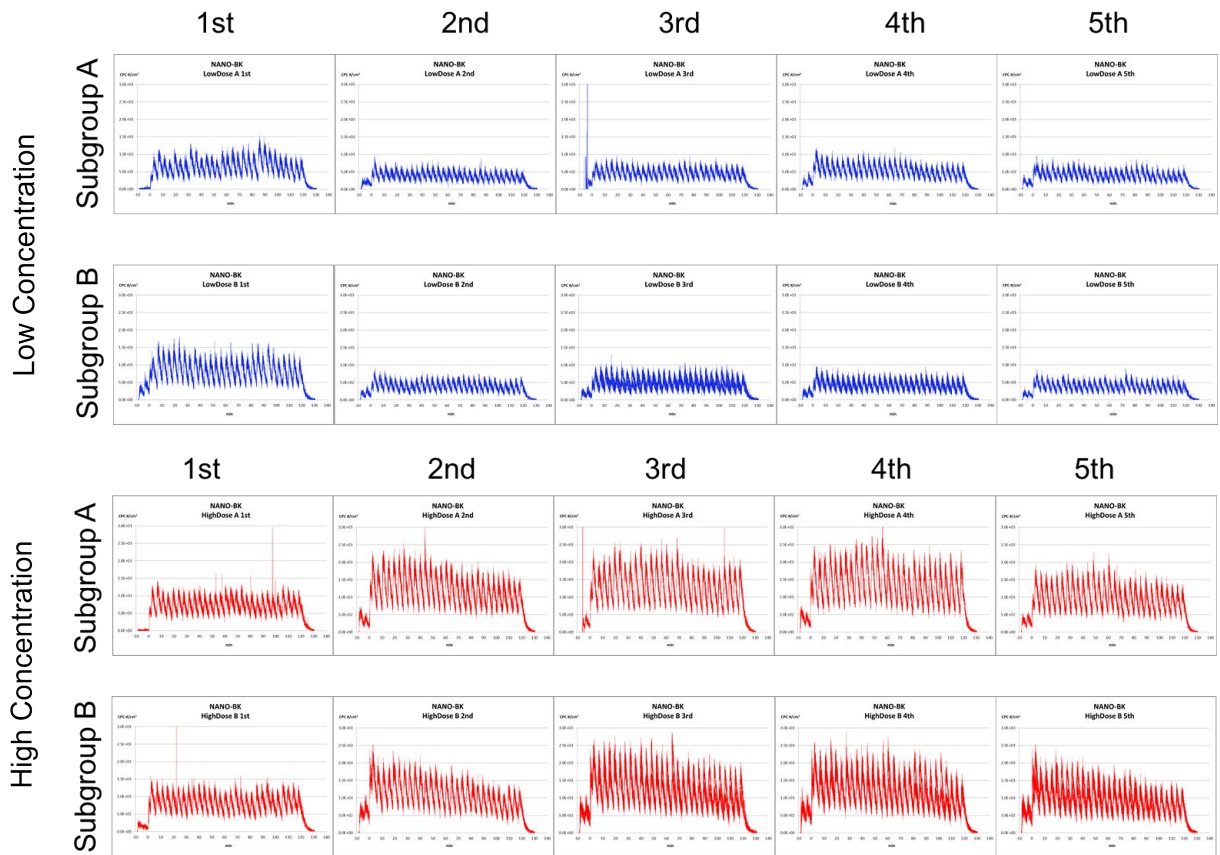
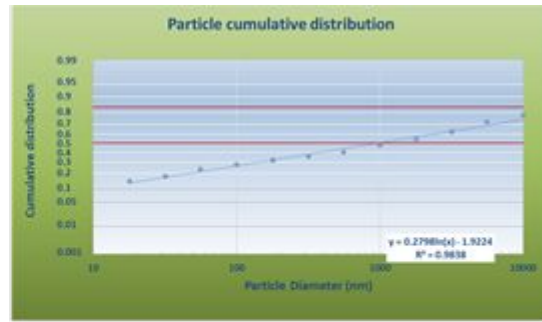
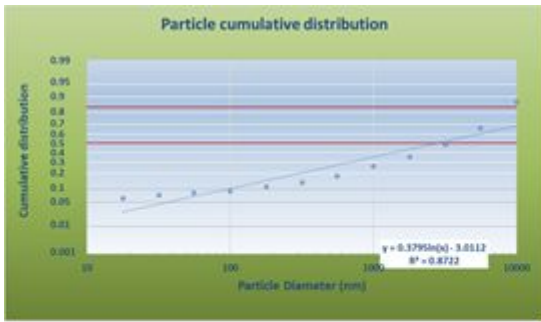


図5 T-CNTNの吸入曝露実験におけるCPCカウントの経時的変化



Total Mass (ug)	Concentration (ug/m3)	MMAD (nm)	Deviation (σg)
467	1564	2792	33.935

Total Mass (ug)	Concentration (ug/m3)	MMAD (nm)	Deviation (σg)
482	1610	964	35.649

MWCNT-N (T-CNTN)		1st	2nd	3rd	4th	5th	Average	SD
Low Dose	Mass Concentration (mg/m <sup>3</sup> )	0.5	0.7	0.8	0.7	0.5	0.6	0.1
	CPC Average(0-120min, #/cm <sup>3</sup> )	747	364	511	496	399	503	150
	MMAD (nm)	964	964	1,685	640	3,708	1,592	1,243
	σg	8.6	35.6	11.0	12.1	34.0	20.0	13.0
High Dose	Mass Concentration (mg/m <sup>3</sup> )	1.3	1.5	1.4	1.2	0.9	1.3	0.2
	CPC Average(0-120min, #/cm <sup>3</sup> )	787	1157	1332	1336	923	1,107	246
	MMAD(nm)	NA	1,617	2,504	2,792	3,474	2,597	770
	σg (nm)	NA	11.5	14.4	13.9	26.7	17.0	7.0

図6 T-CNTN の吸入曝露実験におけるエアロゾル特性

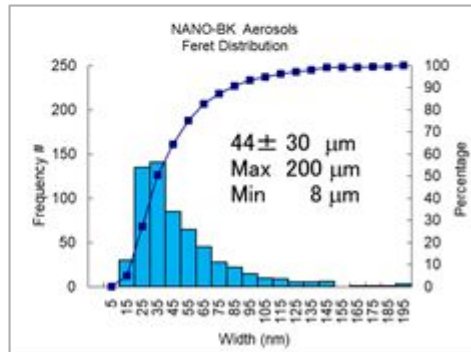
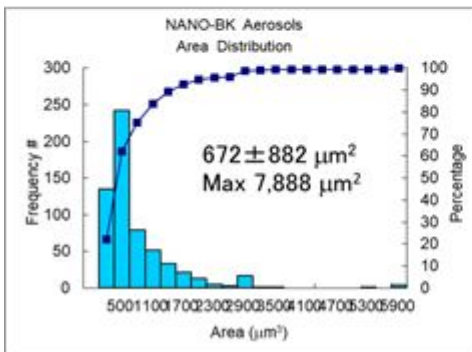
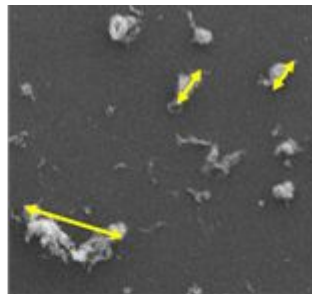
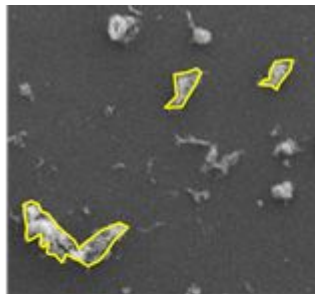
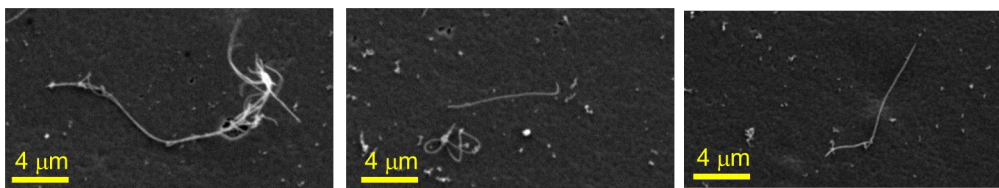
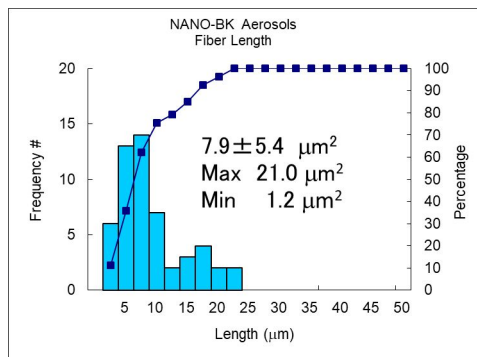


図7 MWCNT-N のエアロゾル形状 (凝集成分)

アルミナフィルターに吸着させたエアロゾルを 50 倍の倍率で観察し繊維が絡まったエアロゾル (Agglomerates) の面積及び直径 (長軸) を測定した。



**図 8 MWCNT-N のエアロゾル形状（繊維状成分）**

アルミナフィルターに吸着させたエアロゾルのうち、単離した繊維状のエアロゾルを 2500 倍の倍率で観察し、繊維長を測定した。