

平成 29-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: 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。本分担研究では、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、各分担研究に生体サンプルを提供した。検体は何れも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.2.0 及び 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 おび 8 週後の定期解剖で採取した試料を各分担研究に提供した。平成 29 年度は長繊維貫通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 25 $\mu\text{m}$  の金属性フィルターでろ過した検体を使用した。平成 30 年度は粒状凝集のモデルとして(AMT-600、一次粒径 30 nm TAYCA)と、MWNT-7(三井)を 53 $\mu\text{m}$  の金属性フィルターを使用することで粗大な成分の割合を多くした検体を使用した。令和元年度は毛玉状凝集のモデルとして MWCNT の一つである MWCNT-N を検体とした。MWCNT-N を除き、5 日間の反復全身曝露吸入実験でエアロゾル化した検体を目標濃度において安定した濃度推移で曝露することができた。MWCNT-N は目標濃度の約半分であった。MWCNT-N のエアロゾルの形状を確認すると、単離繊維とともに凝集体も多く認められた。MWCNT-N は MWNT-7 に比較して繊維径が細いため、吸入曝露装置内でエアロゾルの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、工業的ナノ材料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、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。本分担研究は肺胞マクロファージ胞体内で蓄積様式が異なる3種類のモデルナノ材料をエアロゾル化して吸入暴露実験を行い、肺と縦隔の組織負荷量の解析、病理学的評価及び免疫機能評価の各分担研究で解析に供試する肺、縦隔等の生体サンプルの提供を目的とした。

## B. 研究方法

年次計画として、平成 29 年度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 (MITSUI & Co.,LTD.) 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  $\mu\text{m}$  のメッシュを用いて濾過し高分散処理を行った。

平成 30 年度は「粒状凝集」のモデルとして二酸化チタン (AMT-600、TAYCA CO.,LTD.) と、凝集成分が多いと想定される MWNT-7 を 53  $\mu\text{m}$  のメッシュで濾過した検体を使用した。

令和元年度は、毛玉状凝集のモデルとして MWCNT のひとつである MWCNT-N を検体とした。検体は、Taquann 法により 53  $\mu\text{m}$  のメッシュを用いて濾過し高分散処理を行い、カートリッジ直噴式全身曝露吸入装置 (Taquann 直噴式全身曝露吸入装置 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、目標濃度は低濃度群 1  $\text{mg}/\text{m}^3$ 、高濃度群 3  $\text{mg}/\text{m}^3$

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-1. 検体の高分散化処理 (Taquann 法)

MWCNT 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、大きな粒子は上部気道で効果的に除去される。一方、ナノ材料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 MWNT-7 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。先行研究において、凝集成分による影響が少なく、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 1)。

#### (1) 二酸化チタン

二酸化チタンは AMT-600 を使用した。

結晶形                    アナターズ  
 TiO<sub>2</sub> 含量    98%  
 一次粒径    30 nm  
 pH                弱酸性  
 比表面積    52 m<sup>2</sup>/g  
 (テイカ株式会社のウェブサイトの情報)

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、発振周波数 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 (Vacuubrand、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 TiO<sub>2</sub> と表記する。

## (2)MWNT-7

多層カーボンナノチューブの一つである MWNT-7 を使用した。Taquann 法処理の際に使用する金属製フィルターの目開きを変えることで、粒子の粗さが異なる 2 種類の検体を調製した。

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<sup>11</sup> 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  
 (東京都健康安全研究センターによる測定値)

MWNT-7 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パ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、発振周波数 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。

MWNT-7 の吸入曝露実験は平成 29 と 30 年度に実施した。平成 29 年度では、目開き 25 μm の金属製フィルターを用い、より凝集状成分の少ない分散性の高い検体を得た。平成 30 年度は、目開き 53 μm の金属製フィルターを用い、凝集成分を多く含む比較的粗い粒子を含む検体を調製した。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 と表記した。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。

## (3)MWCNT-N

MWCNT-NはNIKKISO Co., LTD.で生産されていたMWCNTである。MWNT-7に比較して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(TB)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 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 で一晩凍結した。約 60 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。

## **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 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;  $25 \pm 1$ 、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

平成 29 年度物質の MWNT-7 (T-CNT7) は、対照群、T-CNT7#25 の低濃度と高濃度群の 3 群構成で吸入曝露実験を実施した。低濃度と高濃度群の目標濃度をそれぞれ  $1 \text{ mg/m}^3$ 、 $3 \text{ mg/m}^3$  に設定した。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。

平成 30 年度物質の  $\text{TiO}_2$  (T-TiO<sub>2</sub>) と MWNT-7 (T-CNT7) は、対照群、T-TiO<sub>2</sub>、T-CNT7#53 の 3 群構成で吸入曝露実験を実施した。T-TiO<sub>2</sub> と T-CNT7#53 の目標濃度をそれぞれ  $30 \text{ mg/m}^3$  と  $1 \text{ mg/m}^3$  に設定した。各群 48 匹のマウスを、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。

令和元年度物質の MWCNT-N (T-CNTN) は、対照群、T-CNTN の低濃度と高濃度群の 3 群構成で吸入曝露実験を実施した。低濃度と高濃度群の目標濃度をそれぞれ  $1 \text{ mg/m}^3$ 、 $3 \text{ mg/m}^3$  に設定した。各群 48 匹のマウスを、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。

各吸入曝露実験は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

検体のエアロゾル化は、既設の Taquann 直噴全身吸入装置 Ver2.0 及び 3.0 を使用した (共同開発 柴田科学株式会社) (図 2)。平成 29 年度は Ver2.0 を使用し MWNT-7 (T-CNT7#25) の実験を行った。国立医薬品食品衛生研究所の川崎市への移転に伴い、平成 30 年度に Ver3.0 を用いて  $\text{TiO}_2$  (T-TiO<sub>2</sub>) と MWNT-7 (T-CNT#53) 及び MWCNT-N (T-CNTN) の実験を行った。基本的

なダスト発生原理は同一であるため、以下、Ver3.0 について記載する。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 3)。

カートリッジへの検体の充填は、T-TiO<sub>2</sub> では 1mg/mL の懸濁液 13mL、MWCNT では低濃度群は 0.025 mg/mL の懸濁液、高濃度群では 0.05 mg/mL の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達成した。

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、マウスを最大 25 匹収容可能である。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気積 179 L で、上部は円錐状となって噴射装置から続くサブチャンバーに接続されている。

#### (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<sup>3</sup>)測定を並行して行った。

相対濃度測定は、対応濃度 3×10<sup>5</sup> 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<sup>3</sup> 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 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  $\mu\text{m}$  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。

T-TiO<sub>2</sub> 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。

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、 $\phi$ 55mm、捕集効率 (DOP 0.3  $\mu\text{m}$ ): 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 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 L/min  $\times$  120min = 180 L から 1 m<sup>3</sup> 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  $\mu\text{m}$ 、No.2; 5.6  $\mu\text{m}$ 、No.3; 3.2  $\mu\text{m}$ 、No.4; 1.8  $\mu\text{m}$ 、No.5; 1.0  $\mu\text{m}$ 、No.6; 0.56  $\mu\text{m}$ 、No.7; 0.32  $\mu\text{m}$ 、No.8; 0.1  $\mu\text{m}$ 、No.9; 0.10  $\mu\text{m}$ 、No.10; 0.056  $\mu\text{m}$ 、No.11; 0.032  $\mu\text{m}$ 、No.12; 0.018  $\mu\text{m}$ 、No.13; 0.01  $\mu\text{m}$ ) に導いた。吸引時間は TiO<sub>2</sub> では 10 分、MWCNT では 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  $\mu\text{m}$  であるため、T-TiO<sub>2</sub> 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。

#### (8) 解剖

肺組織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（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)TiO<sub>2</sub>(T-TiO<sub>2</sub>)の吸入曝露実験

T-TiO<sub>2</sub>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±3.1 mg/m<sup>3</sup>（平均値±SD）であった。平均CPCカウント（同10回）は560,817±56,441/cm<sup>3</sup>（平均値±SD）であった（図4、図5）。

MMADは893～1,060nm（σg:3.5～4.2）であり、全体の平均（5回）は、975.3 nmであった（図5、表2）。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5）。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 m<sup>3</sup>であることから名目上の濃度は100 mg/m<sup>3</sup>と計算される。実際に測定し

た濃度の平均は34.8 mg/m<sup>3</sup>から、エアロゾル化効率を計算すると34.8%であった。

#### (2)MWNT-7(T-CNT7)の吸入曝露実験

T-CNT7#25の5日間反復全身曝露吸入実験における平均質量濃度（平均値±SD）は、低用量群、高用量群それぞれ1.4±0.1 mg/m<sup>3</sup>、3.2±0.3 mg/m<sup>3</sup>であった。平均CPCカウント（平均値±SD）はそれぞれ、960±80/cm<sup>3</sup>、2340±238/cm<sup>3</sup>であった。実験期間を通して、目標濃度を達成し、安定した濃度推移が得られた（表2）。

T-CNT7#53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/m<sup>3</sup>であった。平均CPCカウント（同10回）は1,449±155/cm<sup>3</sup>であった（図8）。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7、表2）。

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 m<sup>3</sup>であることから名目上のエアロゾル濃度は3.8 mg/m<sup>3</sup>と計算される。実際に測定した濃度の平均値3.0 mg/m<sup>3</sup>から、エアロゾル化効率を計算すると78.9%であった。

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 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。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8)。

### (3) 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  $0.6 \pm 0.1 \text{ mg/m}^3$ 、 $1.3 \pm 0.2 \text{ mg/m}^3$ 、平均CPCカウントは、低濃度群、高濃度群それぞれ  $503 \pm 150/\text{cm}^3$ 、 $1,107 \pm 246/\text{cm}^3$ であった。MMADは低濃度群、高濃度群それぞれ  $640 \sim 3,708\text{nm}(\sigma_g:8.6 \sim 34.0)$ 、 $1,617 \sim 3,474 \text{ nm}(\sigma_g:11.5 \sim 26.7)$ 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9、図10、表2)。

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、単離繊維とともに毛玉状に凝集しているものも認められ、その直径(長軸)は  $8 \sim 200\mu\text{m}$  程度の大きさであった(図11、12)。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。

### (5) 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。Taquann法の開発における先行研究では、目開き  $25 \mu\text{m}$  のフィルターを用いてきたが、より荒い検体を得る事を目的として目開き  $53 \mu\text{m}$  のフィルターを使用した。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には粗大成

分として、共有結合した状態の凝固体(Aggregates)と複数の線維が絡まった凝集体(Agglomerates)が存在し、その比率はT-CNT7#25とT-CNT7#53ともに同じであったが、それぞれの単位面積当たりの個数はT-CNT7#25よりもT-CNT7#53の方が多いことが示された。粗大成分の増加によって末梢域まで入る凝集成分も増えるとしたら肺病変の形成にT-CNT7#25とT-CNT7#53は異なった影響を示す可能性が考えられた。

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動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となった。

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。その理由の一つは、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ことがあげられる。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の残存がみられた。この点については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うかがえた。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。

MWNT-7 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。

MWCNT-N に関しては、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を得られ、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、繊維径が細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り再凝集していることが想定された。MWCNT-N は繊維径が細く柔らかいため、Taquann 法処理における金属製フィルターにも絡まりやすく、濾過効率は低い。

## 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 を除き、5 日間の反復全身曝露吸入実験を、目標濃度においてエアロゾル化した検体を安定した濃度推移で曝露することができた。しかしながら、MWCNT-N は目標濃度の半分程度であった。MWCNT-N は MWNT-7 に比較して繊維径が細いため、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計画解剖・採材を行い、病理組織評価、免疫機能評価及び肺負荷量測定の各分担研究に供した。

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. 健康危機情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

○ 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.

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, Koichi Morita, Masaki Tsuji, Yoko Hirabayashi, Akihiko Hirose and Jun Kanno.: A short-term whole-body inhalation study of potassium titanate whisker in mice with an improved dispersion and inhalation system, The 57th Society of

Toxicology, Henry B. Gonzalez Convention Center, San Antonio, Texas, USA, 12 March, 2018, Poster

○ 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

○ 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

○ 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.

○ 高橋祐次: ナノ材料の安全性確保に関する生物試験の現状と課題、第58回澱粉研究懇談会、招待講演、2018年6月8日(静岡県伊東市)

○ 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年7月17日(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年7月  
18日(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年7月18日(大阪)

○ 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年12月3日(東京)

#### 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

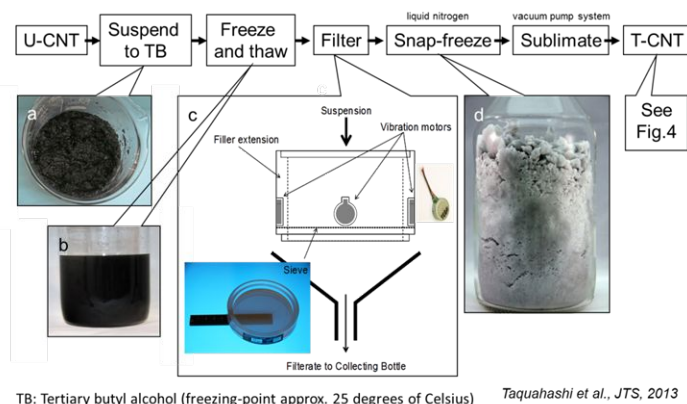
特許出願; 柴田眞利、菅野 純、生田達也、鶴田  
祐吾、高橋祐次: 試験物質供給装置及び吸入曝露  
試験装置 特願 2018-81837、2018.4.20

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし



**図 1 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 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<sup>2</sup>) 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。  
 Taquahashi et al., JTS, 2013;38 ( 4 ) :619-28

**表 1 群構成**

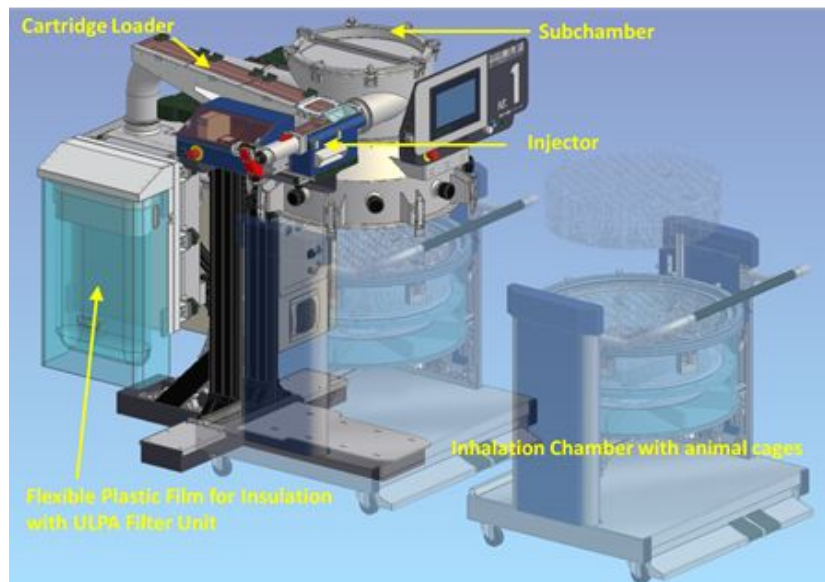
Examinations	N	Necropsy after inhalation exposure			
		Day 0	1W	4W	8W
• Lung Burden	12	3	3	3	3
• Histopathology(perfusion)	12	3	3	3	3
• Immune function					
BALF	24	6	6	6	6
Pulmonary interstitium mRNA					
Spleen, Lymph node					
48		Divided into two sub-groups, A&B			

**Target concentration**

- T-TiO<sub>2</sub> 30 mg/m<sup>3</sup>
- T-CNT7#25 Low concentration 1 mg/m<sup>3</sup>, High concentration 3 mg/m<sup>3</sup>
- T-CNT7#53 High concentration 3 mg/m<sup>3</sup>
- MWCNT-N Low concentration 1 mg/m<sup>3</sup>, High concentration 3 mg/m<sup>3</sup>
- Control Clean air (Filtered with HEPA filter)

**Exposure**

2hr/day/week for 5 weeks ( Total 10 hours )



**図 2 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 3 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。

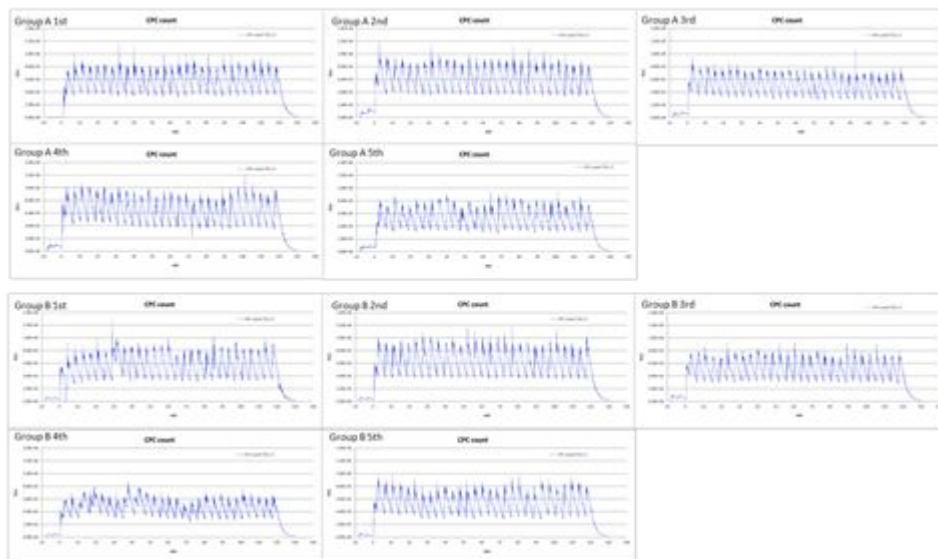


図4 T-TiO<sub>2</sub>の吸入曝露実験におけるCPCカウントの経時的変化

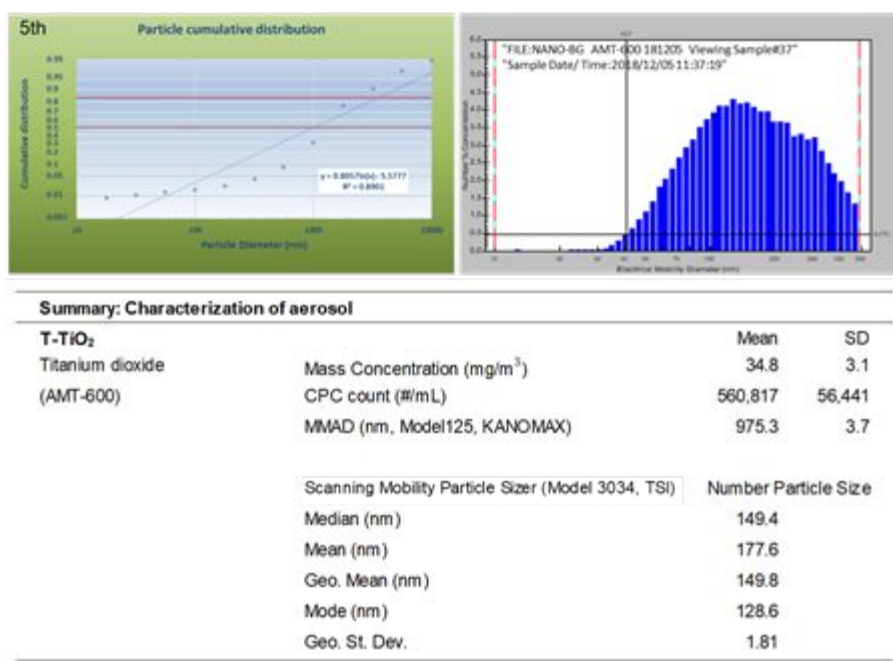


図5 T-TiO<sub>2</sub>の吸入曝露実験におけるエアロゾル特性

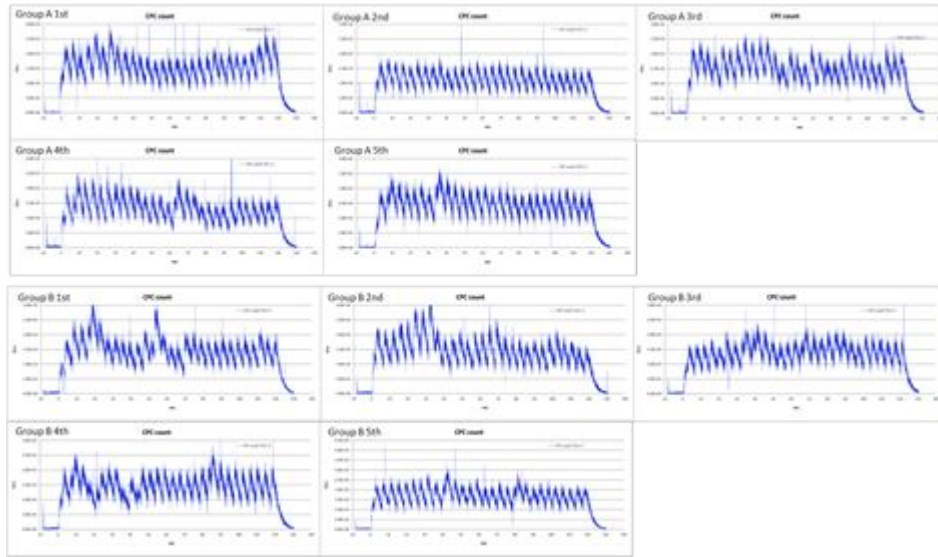
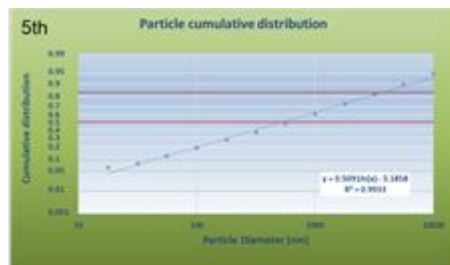


図6 T-CNT7#53の吸入曝露実験におけるCPCカウントの経時的変化



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

図7 T-CNT7#53の吸入曝露実験におけるエアロゾル特性

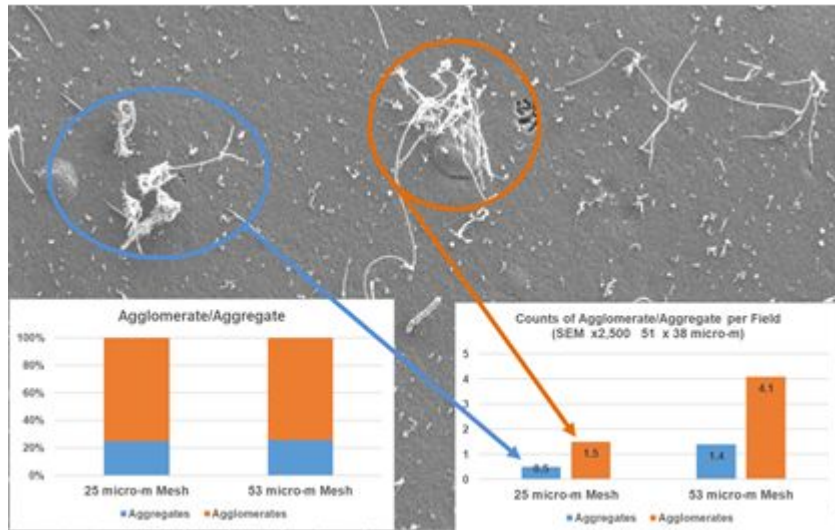


図8 T-CNT7#25 と T-CNT7#53 のエアロゾルの性状比較

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  $\mu\text{m}$   $\times$  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。

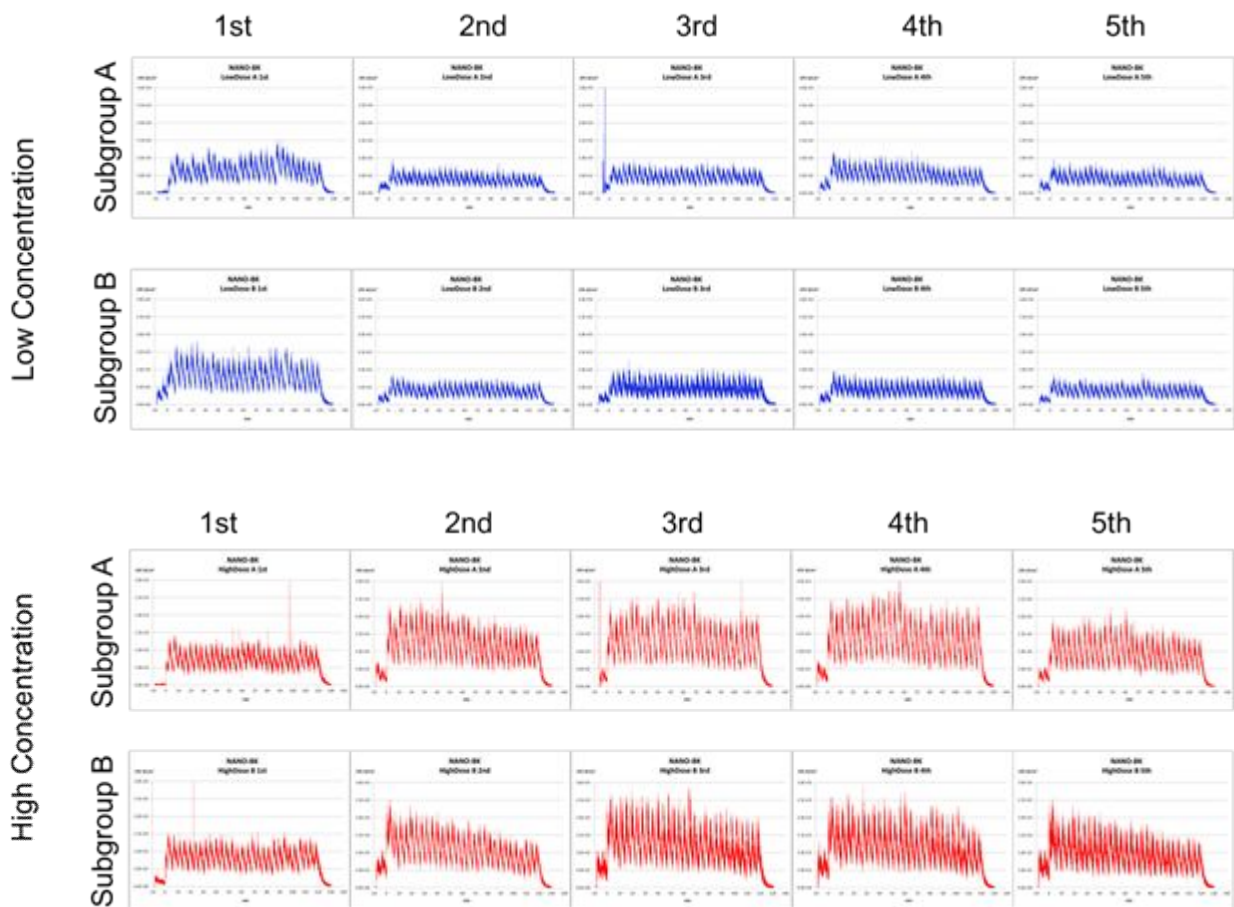
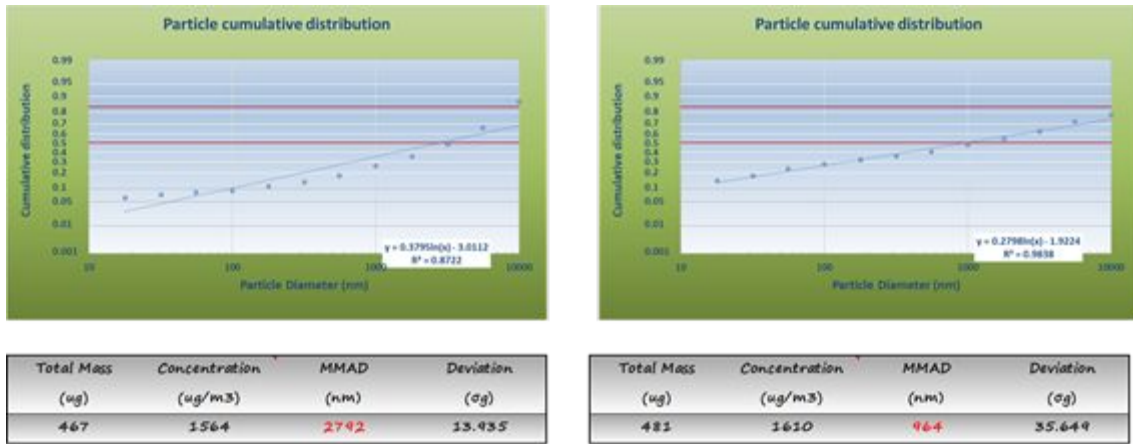


図9 MWCNT-N の吸入曝露実験における CPC カウントの経時的変化





		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
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)		1,617	2,504	2,792	3,474	2,597	770

図 10 MWCNT-N の吸入曝露実験におけるエアロゾル特性

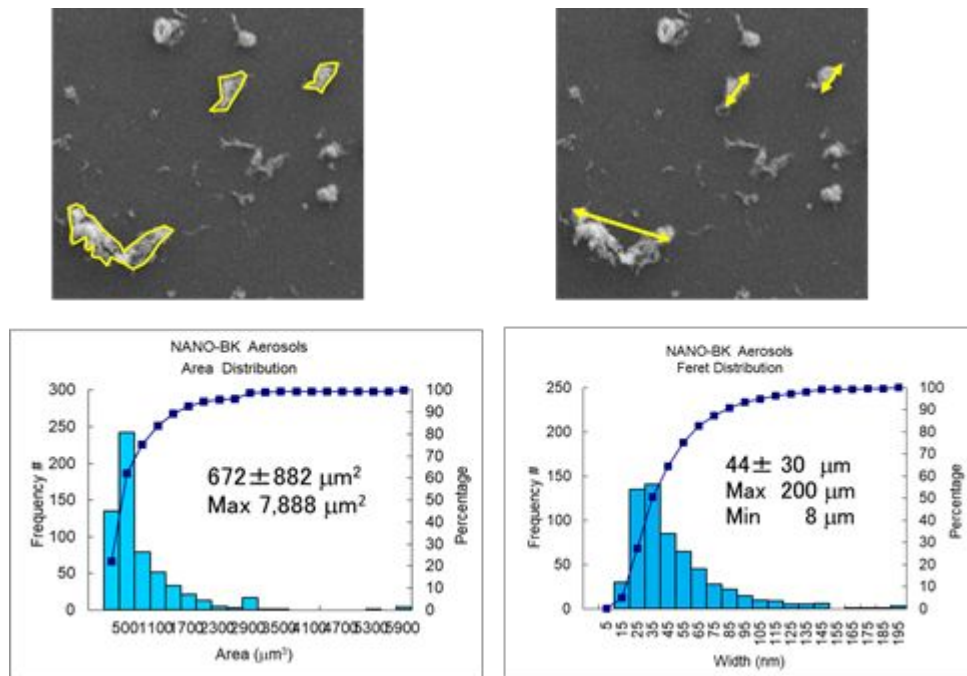


図 11 MWCNT-N のエアロゾル形状 (凝集成分)

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。

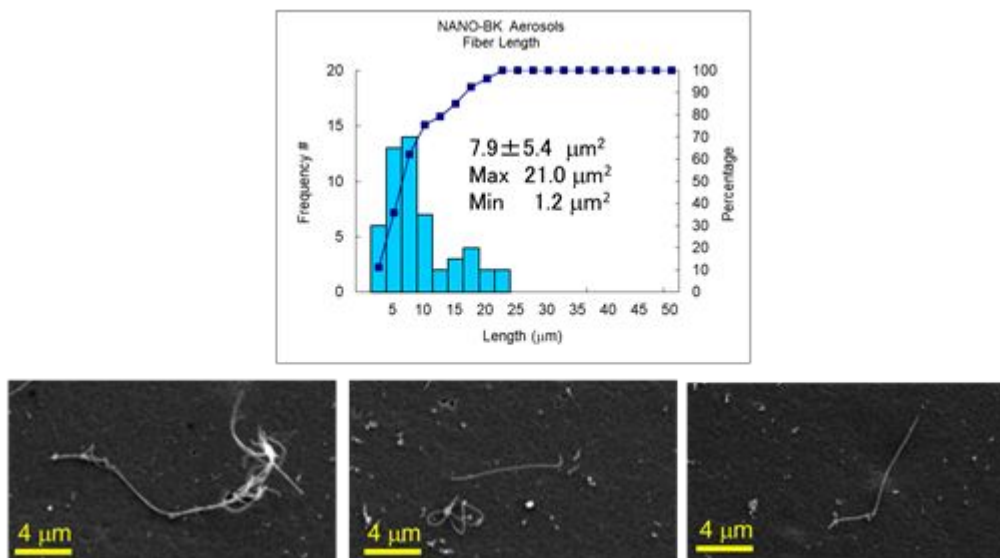


図 12 MWCNT-N のエアロゾル形状（繊維状成分）

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。

表 2 H29-R1 に実施した吸入曝露実験のエアロゾル特性のまとめ

Year	Test Substances	Mass Concentration ( mg/m <sup>3</sup> )	CPC <sup>1)</sup> (count per minutes)	MMAD <sup>2)</sup> (nm)
H29	MWNT-7 (T-CNT7#25,Low dose)	1.4	960	NA <sup>3)</sup>
	MWNT-7 (T-CNT7#25,High dose)	3.2	2,340	NA
H30	TiO <sub>2</sub> (T-TiO <sub>2</sub> )	34.8	560,817	975.3
	MWNT-7 (T-CNTN7#53,High dose)	3.0	1,449	788.2
R1	MWCNT-N (T-CNT,Low dose)	0.6	503	1,592
	MWCNT-N (T-CNT,High dose)	1.3	1,107	2,597

1) : Condensation Particle Counter; 2) : Mass Median Aerodynamic Diameter  
3) : Not Avail