

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: ナノマテリアルの組織負荷量の測定

研究分担者 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  
試験管理部技術専門役

### 研究要旨

本分担研究は、肺胞マクロファージの貪食・蓄積様式が異なると予想されたモデルナノマテリアルをマウスに吸入曝露して曝露後の休薬期間における肺内沈着量の推移を調べることによって、モデルナノマテリアルによる肺負荷量とクリアランスの違いを調べた。研究班として、モデルナノマテリアルに「細胞質貫通型\*」として多層カーボンナノチューブの MWNT-7、「粒状凝集型\*」として二酸化チタンの AMT600、「毛玉状凝集型\*」として多層カーボンナノチューブの MWCNT-N を選定し、それぞれ分散処理を行ったものをエアロゾル化して吸入曝露を行い、肺負荷量、免疫機能評価、病理学的評価の各分担研究に肺のサンプルを提供した(分担 高橋)。初年度に MWNT-7 を検体とした吸入曝露実験をおこなったが、曝露終了時の肺負荷量が十分でなかった。このため、中間年度に MWNT-7 (再実験) と二酸化チタン、最終年度に MWCNT-N を検体とした吸入曝露実験を実施した。それによって得た肺のサンプルを用いて検体の肺負荷量の推移を比較解析した。その結果、実施した吸入曝露条件下での肺負荷量の推移は、いずれのモデルナノマテリアルも半減期が約 3.5 週間であり、いずれの吸入曝露実験もマクロファージによる肺からのクリアランスの阻害が起きない曝露条件で実施されたことが示された。また 3 つのタイプのモデルナノマテリアル全体としてみると、曝露終了後 8W の休薬後には曝露終了時の負荷量のおおよそ 30% ~ 15% の検体が肺内に残存していることが示された。残存率は MWNT-7 が最も多く、肺からクリアランスされにくい状態で肺内に存在していることが示唆された。TiO<sub>2</sub> は MWCNT (MWNT-7、MWCNT-N) と比べてクリアランスされ易いが、曝露終了時の負荷量の約 1/6 が肺内に残存していることが示された。

-----  
(\* )「貫通」とは、繊維が比較的太く強直であり M $\phi$  の細胞径よりも長い場合、M $\phi$  が貪食した際に繊維の一端または両端が細胞膜を貫通して細胞外に突出した像を呈する状況を指す。「粒状凝集」とは、M $\phi$  に対して十分に小さな粒子が細胞質内に高密度に凝集して貪食される状況を指す。「毛玉状凝集」とは、柔軟性の高い細い繊維が細胞質内で丸まり絡まり、毛玉状に凝集する状況を指す。

## A. 研究目的

ヒトにおける主要な曝露経路となる吸入曝露で、高効率な有害性評価手法の基盤となる情報の整備を目的とした吸入曝露実験を、研究班として平成 29 年度から令和元年度の三ヵ年の研究期間で実施した。本分担研究は、その中で肺負荷量の解析を担当し、3 つのタイプのモデルナノマテリアルとして選定した  $\text{TiO}_2$  (T-TiO<sub>2</sub>)、MWNT-7 (T-CNT7)、MWCNT-N (T-CNTN) による呼吸器への影響について肺負荷量の観点から比較解析をおこなうことを目的とした。また、吸入曝露によって肺に入ったナノマテリアルのクリアランスを考える時、その移行先と想定される縦隔での検体の沈着量を調べることで、縦隔への移行状況を把握することも目的に加えた。

## B. 研究方法

平成 29 年度から 3 年間、毎年 1 物質ずつモデルナノマテリアルのマウスを用いた吸入曝露実験（分担 高橋）を行い検体の肺内沈着量を測定、肺負荷量のデータを収集した（図 1 A,B,C）。

平成 30 と令和元年度には縦隔の沈着量も併せて測定した。

### B-1：測定対象物質の各年度計画

#### H29 年度吸入曝露実験： MWNT-7

対照群、低用量群（ $1\text{mg}/\text{m}^3$ ）、高用量群（ $3\text{mg}/\text{m}^3$ ）の三群構成で曝露実験を実施し、肺負荷量を解析した。Tquann 法による分散処理の過程で  $25\mu\text{m}$  の金属性フィルターでろ過した検体（以下、T-CNT7（#25）と表示）を使用（図 1 A）。

この実験は曝露終了時の肺負荷量が不十分であったと判断し、翌年に高用量群の再実験を行った。

#### H30 年度吸入曝露実験： $\text{TiO}_2$ 、MWNT-7

対照群、 $\text{TiO}_2$   $30\text{mg}/\text{m}^3$  曝露群、MWNT-7  $3\text{mg}/\text{m}^3$  曝露群の 3 群構成で行い、それぞれ曝露終了後 0、1、4、8 週での解剖期に、各群 3 匹を割り当てた。MWNT-7 は Tquann 法による分散処理の過程で  $53\mu\text{m}$  の金属性フィルターを使用した再実験（以下、T-CNT7（#53）と表示）することで粗大な成分の割合を多くした検体をエアロゾル化してマウスに吸入曝露した（図 1 B）。

#### R1 年度吸入曝露実験： MWCNT-N

対照群、MWCNT-N 低用量群（ $1\text{mg}/\text{m}^3$ ）、高用量群（ $3\text{mg}/\text{m}^3$ ）の三群構成で曝露実験を実施し、そ

れぞれ曝露終了後 0、1、4、8 週での解剖期に、各群 3 匹を割り当てた（図 1 C）。

### B-2：肺内沈着量の測定

多層カーボンナノチューブの MWNT-7 と MWCNT-N については Benzo[ghi]perylene (BgP) をマーカーとした蛍光強度を高速液体クロマトグラフ (HPLC) で測定、検量線から求めた直線回帰式に HPLC 測定値を代入して検体の肺内沈着量を求めた。二酸化チタンは原子吸光の測定値を検量線から求めた直線回帰式に代入して検体の肺内沈着量を求めた。

#### B-2-(1) 多層カーボンナノチューブの測定

（MWNT-7 と MWCNT-N に共通）

以下の手順で実施した（図 2）。

##### 組織溶解液の調製

80 に加温した超純水 140mL に 10g の KOH を加え、その溶液に 1% SDS 水溶液を 20mL と 1% EDTA2Na 20mL を加えた。その後、アスコルビン酸 4g 添加し、超純水で 200mL にメスアップし、80 で加温することにより溶解状態として組織溶解液を調製した。

##### MWCNT 検量線溶液（C1～C5、C1～C6）の調製

平成 30 年度物質の MWNT-7 (T-CNT7#53) と令和元年度物質の MWCNT-N (T-CNT7N) の沈着量測定では、肺と縦隔組織中の MWCNT の沈着量を測定する前日に、検量線を得る為に必要な MWCNT の 5 段階希釈液の検量線溶液 (C1～C5) を以下の手順で調整した (表 1-C、D; 図 3-C、D)。平成 29 年度物質の MWNT-7 (T-CNT7#25) も同様に 6 段階希釈液の検量線溶液 (C1～C6) を調整した (表 1-A; 図 3-A)。

##### ) MWCNT の原液を調整

MWCNT-N 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 で共通) (MWCNT-N 原液 : 50 µg/mL) なお、分析を実施する当日に、この溶液は超音波分散機により 1 分間、超音波分散を行って下記の分析に用いた。

) 検量線溶液 C5 の調製

) で調製した MWCNT 原液 0.4 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 : 2 µg/mL)

) 検量線溶液 (C1 ~ C4) の調製

) で調製した検量線溶液 C5 を採取し、2 mL 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 C1 ~ C4 を作成した。C1 ~ C5 を検量線溶液とした。

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 1 mg 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 のマーカー原液 (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 加え混合撹拌した溶液 2.5 mL を Tw-sol 50 mL に加え混合撹拌し、マーカー溶液とした。

MWCNT 組織負荷量の測定

) 肺と縦隔のサンプルの採取と溶液調整

図 1 に国立医薬品食品衛生研究所毒性部・高橋室長の分担研究で実施した研究班共通の実験デザインを示した。Taquan 処理された MWCNT-N を吸入曝露したマウスの構成を対照群 (0 mg/m<sup>3</sup>) と 2 投与群 (0.6、1.3 mg/m<sup>3</sup>) とし、各 3 検体の曝露直後、1、4、8 週目 合計 60 検体) とした。曝露は 1 日に 2 時間 (10:00 ~ 12:00)

週に 1 日の曝露を 5 週間繰り返し、各群 2 時間 × 5 回の計 10 時間の吸入曝露を行った。5 回 (計 10 時間) の曝露を終了した日を day 0 (0W) とし、0W の午後 2:00 ~ 6:00 に初回の解剖、その後、1 週、4 週、8 週に各群 3 匹ずつをイソフルランによる吸入麻酔下で、MWCNT-N のサンプリング材料への汚染を防ぐため局所の被毛を除去して開胸し、腋窩動脈の切断により放血して安楽死させてから肺及び縦隔を摘出した。その肺は、10%ホルムアルデヒド・リン酸緩衝液で浸漬したサンプルを所属施設 (日本バイオアッセイ研究センター) に持ち帰り、組織負荷量の測定まで室温で保管した。

10%中性リン酸緩衝ホルマリン液に 1 か月以上浸透した試料の肺及び縦隔を 2 mL の組織溶解液 (B-2-(1)-) で 24 時間 60 に保って溶解した。なお、気相部分は窒素ガスで置換した。溶解した組織溶液は 60 秒間超音波分散した。その溶液中の MWCNT-N の量が検量線の範囲に入るように Tw-sol で希釈し、60 秒間超音波分散した。

) HPLC ( high performance liquid chromatography ) による MWCNT の測定

図 2 に肺および縦隔組織中の MWCNTN 測定手順の前処理を示した。

B-2-(1)- 項で調製した各溶液 1 mL を 12000 rpm で 10 分間遠心分離、その上澄み液を除去した沈渣に TW-mixture 1 mL を添加して 12000 rpm で 10 分間遠心分離した。その上澄み液を除去した沈渣に濃塩酸 0.2 mL を加えタッチミキサーで 10 秒間撹拌し、12000 rpm で 10 分間遠心分離した。上澄み液を除去した沈渣に濃硫酸 0.2 mL を加えて沈渣に含まれる T-CNTN 以外の肺組織を分解し、タッチミキサーで 10 秒間撹拌した。その後、B-2-(1)- 項で調製したマーカー溶液 1 mL を添加し、10 秒間超音波分散し、振とう機で 15 分間撹拌させた後、0.4 µm のフィルター (ワットマン : GE Healthcare UK Ltd) でろ過したフィルター上の MWCNT をポンチ ( 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、その溶液中の MWCNT を HPLC  
で測定した。

HPLC の測定条件(MWNT-7 と MWCNT-N の各  
測定で共通) を次に示した。

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

カラム温度 : 40

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

) 肺内及び縦隔の T-CNTN の沈着量計算方

MWCNT-N 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、T-CNTN の  
測定値を求め、希釈倍率を乗じることにより、  
T-CNTN の肺個体当りの沈着量 (単位 : μg) と、  
3 匹当りの平均値及び標準偏差を求めた。また、  
肺または縦隔の重量で除することにより g 当りの  
沈着量 (単位 : μg/g) と平均値及び標準偏差を求  
めた。

B-2-(2) チタン (Ti) の測定

以下の手順で実施した。

組織溶解液の調製

) チタン検量線溶液(C1 ~ C7)の調製

1000μg/mL のチタン標準溶液 0.1mL に 3 %硫  
酸水 0.9mL を加えて 10 倍希釈し、さらに、その  
溶液 0.1mL に 3 %硫酸水を 0.9 mL 加えチタン標  
準液の 100 倍希釈液とした。チタン標準液の 100  
倍希釈液 0.4mL に 3 %硫酸水で 9.6 mL を加え  
25 倍希釈した(検量線 C7 : 0.4 μg/mL)。その溶液

1 mL に 3 %硫酸水 1mL を加え 2 倍希釈した(検  
量線 C5 : 0.2 μg/mL)。その溶液 1 mL に 3 %硫酸  
水 1mL を加え 2 倍希釈した(検量線 C3 : 0.1  
μg/mL)。その溶液 1 mL に 3 %硫酸水 1mL を加  
え 2 倍希釈した(検量線 C2 : 0.05 μg/mL)。その  
溶液 1 mL に 3 %硫酸水 1mL を加え 2 倍希釈し  
た(検量線 C1 : 0.025 μg/mL)。さらに、チタン標  
準液の 100 倍希釈液 0.3 mL に 3 %硫酸水で 9.7  
mL を加え 33.3 倍希釈した(検量線 C6 : 0.3  
μg/mL)。その溶液 1 mL に 3 %硫酸水 1mL を加  
え 2 倍希釈した(検量線 C4 : 0.15μg/mL) (表  
1-B ; 図 3-B)。

TiO<sub>2</sub> 肺負荷量の測定

) 肺と縦隔のサンプルの採取と溶液調整

Taquann 処理された酸化チタンを吸入曝露し  
たマウスの構成を対照群(0 mg/m<sup>3</sup>)と投与群(30  
mg/m<sup>3</sup>)とし、各 3 検体の曝露直後、1、4、8 週  
目 (合計 24 検体)とした。曝露は 1 日に 2 時間  
(10:00 ~ 12:00) 週に 1 日の曝露を 5 週間繰り  
返し、各群 2 時間 × 5 回の計 10 時間の吸入曝露  
を行った。5 回(計 10 時間)の曝露を終了した日  
を day 0 (0W) とし、0W の午後 2:00 ~ 6:00 に  
初回の解剖、その後、1 週、4 週、8 週に各群 3  
匹ずつをイソフルランによる吸入麻酔下で、酸化  
チタンのサンプリング材料への汚染を防ぐため  
局所の被毛を除去して開胸し、腋窩動脈の切断に  
より放血して安楽死させてから肺及び縦隔を摘  
出した。その肺及び縦隔は、冷凍保存したサンプ  
ルを日本バイオアッセイ研究センター (JBRC)  
に持ち帰り、組織負荷量の測定のために保管した。

なお、平成 30 年度の吸入曝露実験では  
MWNT-7 (T-CNT7) 曝露群と TiO<sub>2</sub> (T-TiO<sub>2</sub>) 曝  
露群に共通の対照群を設置した。MWNT-7 と  
TiO<sub>2</sub> の沈着量の測定には、それぞれ HPLC と原  
子吸光で測定するため、サンプルの処理方法及び  
検量線を得るためるための溶液調整の手順が異  
なる。このため対照群のマウスの左肺を MWNT-7  
の測定用に、右肺を TiO<sub>2</sub> の測定用に用いた。

#### B-5-2-1：チタン検量線溶液(C1～C7)の調製

1000 µg/mL のチタン標準溶液 0.1mL に 3 %硫酸水 0.9mL を加えて 10 倍希釈し、さらに、その溶液 0.1mL に 3 %硫酸水を 0.9 mL 加えチタン標準液の 100 倍希釈液とした。チタン標準液の 100 倍希釈液 0.4mL に 3 %硫酸水で 9.6 mL を加え 25 倍希釈した(検量線 C7 : 0.4 µg/mL)。その溶液 1 mL に 3 %硫酸水 1mL を加え 2 倍希釈した(検量線 C5 : 0.2 µg/mL)。その溶液 1 mL に 3 %硫酸水 1mL を加え 2 倍希釈した(検量線 C3 : 0.1 µg/mL)。その溶液 1 mL に 3 %硫酸水 1mL を加え 2 倍希釈した(検量線 C2 : 0.05 µg/mL)。その溶液 1 mL に 3 %硫酸水 1mL を加え 2 倍希釈した(検量線 C1 : 0.025 µg/mL)。さらに、チタン標準液の 100 倍希釈液 0.3 mL に 3 %硫酸水で 9.7 mL を加え 33.3 倍希釈した(検量線 C6 : 0.3 µg/mL)。その溶液 1 mL に 3 %硫酸水 1mL を加え 2 倍希釈した(検量線 C4 : 0.15 µg/mL)。

）試料の前処理と原子吸光光度計による測定

100mL 容のガラス容器で冷凍保存した肺と縦隔のサンプルは、蒸留水、濃硫酸、硝酸を 3 : 3 : 1 の比率で加え攪拌し、270 に加熱したホットプレート上で 90 分間加熱した。加熱終了後、室温になるまで放置し、3 %硫酸水を加えメスアップし、希釈原液とした。その後、その希釈原液に 3 %硫酸水で希釈し、原子吸光光度計により測定した。

原子吸光光度計による測定条件を次に示した。

測定機器：日立製作所 Z-5010 原子吸光光度計

原子化法：グラファイトアトマイザー

使用ガス：アルゴン

吸収波長：チタン ; 364.3nm

原子化温度：2700

試料注入法：オートサンプラー

試料注入量：10 µL

）肺内及び縦隔の MWCNT の沈着量の計算方法  
チタン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。肺及び縦隔の原子吸光で測定した吸光度値を直線回帰式に代入し、チタンの測定値を求めた。酸化チタン中のチタンの含有率は 60%であることから、原子吸光で測定したチタン量から換算して酸化チタン量として計算した。この値に希釈倍率を乗じることにより、酸化チタンの個体当りの沈着量(単位：µg)と、それらの 3 匹当りの平均値及び標準偏差を求めた。また、各肺及び縦隔の重量で除することにより肺及び縦隔の g 当りの値(単位：µg/g)とそれらの平均値及び標準偏差を求めた。

## C . 研究結果及び考察

### C-1: 検量線

#### H29年度物質： T-CNT7 (#25)

Taquann処理されたT-CNT7の検量線を図 3-A に示した。T-CNT7とマーカの面積値は、相関係数0.9997であり、T-CNT7を測定するために、良好な直線性を示した。これらのことから、T-CNT7は0.2～2.0 µg/mLの範囲内で、正確な定量が可能であることが示された。

#### H30年度物質： T-TiO<sub>2</sub>

Taquann処理されたT-TiO<sub>2</sub>の検量線を図 3-B に示した。T-TiO<sub>2</sub>の濃度と吸光度は、相関係数0.9978であり、T-TiO<sub>2</sub>を測定するために、良好な直線性を示した。これらのことから、T-TiO<sub>2</sub>は0.025～0.4 µg/mLの範囲内で、正確な定量が可能であることが示された。

#### H30年度物質： T-CNT7 (#53)

Taquann処理されたT-CNT7 (#53) の検量線を図 3-Cに示した。T-CNT7の濃度とマーカの面積値は、相関係数0.9938であり、T-CNT7を測定するために、良好な直線性を示した。これらの

ことから、T-CNT7は0.2～1.0 µg/mLの範囲内で、正確な定量が可能であることが示された。

#### R1年度物質：T-CNTN

Taquann処理されたT-CNTNの検量線を図3-Dに示した。MWCNT-Nの濃度とマーカの面積値は、相関係数0.9965であり、MWCNT-Nを測定するために、良好な直線性を示した。これらのことから、MWCNT-Nは0.4～2.0 µg/mLの範囲内で、正確な定量が可能であることが示された。

#### C-2: マウス肺内の肺負荷量

##### H29年度物質：T-CNT7 (#25)

表2-Aと図4にTaquann処理されたT-CNT7 (#25)を吸入曝露したマウス肺内負荷量の測定結果を示した。

1 mg/m<sup>3</sup>曝露のマウスの肺1g当りの肺負荷量は、曝露直後では6.30 µg/g、1週目では4.59 µg/g、4週目では5.42 µg/g、8週目では5.39 µg/gでやや減少傾向であった。また、3 mg/m<sup>3</sup>曝露のマウスの肺1g当りの肺負荷量は、曝露直後では10.15 µg/g、1週目では9.98 µg/g、4週目では10.84 µg/g、8週目では10.25 µg/gで一定に推移した。対照群(0 mg/m<sup>3</sup>)の肺でのT-CNT7 (#25)測定値は0.00µg/gであった。以上のことから、Taquann法にて分散処理を施したT-CNT7 (#25)を全身吸入装置により曝露後、1、4および8週後における肺内のT-CNT7の負荷量の時間に伴う曝露後の推移は、1 mg/m<sup>3</sup>曝露群の沈着量はやや減少傾向であったが、3 mg/m<sup>3</sup>曝露群の沈着量は、本測定法による沈着量はほぼ一定の傾向を示した(図4)。先行研究(H26-化学-一般-003)の知見と照合して、この年度の吸入曝露実験は曝露終了直後(0W)の沈着の異常値と判断した。

##### H30年度物質：T-TiO<sub>2</sub>

表2-B及び図5にTaquann処理されたT-TiO<sub>2</sub>を吸入曝露したマウス肺内のT-TiO<sub>2</sub>の肺及び縦隔の負荷量の結果を示した。その結果、30 mg/m<sup>3</sup>曝露のマウスの肺1g当りの肺負荷量は、曝露直

後では150.11 ± 9.05 µg/g、1週目では112.47 ± 13.94 µg/g、4週目では63.05 ± 7.21 µg/g、8週目では25.85 ± 11.36 µg/gであり、曝露直後に比較して8週後の負荷量は約1/6の減衰傾向が認められた(表3)。半減期は曝露終了後約3.5週であった(図5)。縦隔でのT-TiO<sub>2</sub>測定値は0.00µg/gであった。対照群(0 mg/m<sup>3</sup>)の肺と縦隔でのT-TiO<sub>2</sub>の測定値は0.00µg/gであった。

##### H30年度物質：T-CNT7 (#53)

表2-Cと図5にTaquann処理されたT-CNT7 (#53)を吸入曝露したマウス肺内負荷量の測定結果を示した。3 mg/m<sup>3</sup>曝露のマウスの肺1g当りの肺負荷量は、曝露直後では29.04 ± 6.16 µg/g、1週目では21.33 ± 2.01 µg/g、4週目では13.68 ± 1.62 µg/g、8週目では9.15 ± 2.17 µg/gで減衰傾向が認められ、曝露直後に比較して8週後の負荷量は約1/3の減衰傾向であった(表3)。半減期は曝露終了後約3.5週であった(図5)。

縦隔でのT-CNT7 (#53)測定値と対照群(0 mg/m<sup>3</sup>)の肺でのT-CNT7 (#53)測定値は0.00µg/gであった。

##### R1年度物質：T-CNTN

表2-Dと図5にTaquann処理されたMWCNT-N(T-CNTN)を吸入曝露したマウス肺と縦隔のT-CNTNの負荷量を示した。1.3 mg/m<sup>3</sup>曝露のマウスの肺1g当りの肺負荷量は、曝露直後では14.38 µg/g、1週目では10.96 µg/g、4週目では5.73 µg/g、8週目では3.77 µg/gで曝露直後から曝露後8週に向かう減衰傾向が認められ、8週後の負荷量は曝露直後の約1/3の減衰が示された(表3)。半減期は曝露終了後約3.5週であった(図5)。

0.6 mg/m<sup>3</sup>曝露群のマウスの肺1g当りの肺負荷量は、曝露直後では8.84 µg/g、1週目では5.51 µg/g、4週目では2.69 µg/g、8週目では2.41 µg/gで曝露直後から曝露後8週に向かう減衰傾向が認められ、8週後の負荷量は曝露直後の約1/3の減衰が示された(表3)。半減期は曝露終了後

約3.5週であった(図5)。

なお、1.3 mg/m<sup>3</sup>と0.6 mg/m<sup>3</sup>曝露群の縦隔と対照群(キャリアーエア吸入)の肺と縦隔にT-CNTNは検出されなかった。

研究班で実施した吸入曝露の条件下での検体の肺負荷量の推移は、いずれのモデルナノマテリアルも半減期が約3.5週間であり、各吸入曝露実験はマクロファージによる肺からのクリアランスの障害が起きない曝露条件で実施されたことが示された。また、曝露終了後8Wの休薬期間を置いた時点での曝露終了直後(0W)に対する検体の残存率はMWNT-7:32%;MWCNT-N:27%;TiO<sub>2</sub>:17%で、曝露終了時の負荷量のおおよそ30%~15%の検体が肺内に残存していることが示された。残存率はMWNT-7が最も多く、肺からクリアランスされにくい状態で肺内に存在していることが示唆された。TiO<sub>2</sub>はMWCNT(MWNT-7、MWCNT-N)と比べてクリアランスされ易いが、曝露終了時の負荷量の1/6程度が肺内に残存していることが示された。

#### D. 結論

研究班で実施した吸入曝露実験は、実施した条件下での肺負荷量の推移は、いずれのモデルナノマテリアルも半減期が約3.5週間であり、各吸入曝露実験はマクロファージによる肺からのクリアランスの障害が起きない曝露条件で実施されたことが示された。また、曝露終了後8Wの休薬後には曝露終了時の負荷量のおおよそ30%~15%の検体が肺内に残存していることが示された。残存率はMWNT-7が最も多く、肺からクリアランスされにくい状態で肺内に存在していることが示唆された。TiO<sub>2</sub>はMWCNT(MWNT-7、MWCNT-N)と比べてクリアランスされ易いが、曝露終了時の負荷量の1/6程度が肺内に残存していることが示された。

#### E. 健康危機情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Fukushima S, Kasai T, Umeda Y, Ohnishi M, Sasaki T, Matsumoto M. Carcinogenicity of multi-walled carbon nanotubes: challenging issue on hazard assessment. Journal of Occupational Health, 60:10-30, 2018

##### 2. 学会発表

大西誠、三角恭兵、笠井辰也、山本正弘、鈴木正明、佐々木俊明、浅倉眞澄、平井繁行、福島昭治、菅野純：N-SHOt Cycloneによる多層カーボンナノチューブの浮遊係数の比較、第44回日本毒性学会学術年会、2017年7月

大西誠、後藤裕子、笠井辰也、山本正弘、鈴木正明、武田知起、東久保一郎、菅野純：フィルター捕集したカーボンブラックのHPLCを用いた微量定量法の開発、第92回日本産業衛生学会2019年5月

加納浩和、笠井辰也、齋藤新、平井繁行、鈴木正明、梅田ゆみ、妹尾英樹、大西誠、竹内哲也、三角恭兵、福島昭治、菅野純：メタクリル酸ブチルのラット及びマウスへの吸入ばく露による発がん性及び慢性毒性、第92回日本産業衛生学会、2019年5月

大西誠、東久保一郎、後藤裕子、川本俊弘、菅野純：HPLCを用いたカーボンブラック粉塵の微量定量法の開発、第59回日本労働衛生工学会、2019年11月

#### G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

##### 1. 特許取得

独立行政法人労働者健康安全機構、大西誠、笠井辰也、鈴木正明:粒子状物質の浮遊特性測定方法及び浮遊特性測定装置 特許第6362669号特許登録日:平成30年7月6日

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表 1 検量線溶液を調製するための溶液調製量

A H29 年度物質：T-CNT7 (#25)				D R1 年度物質：T-CNTN			
試料名	C6採取量 (mL)	C99添加量 (mL)	濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	試料名	C5採取量 (mL)	Tw-sol添加量 (mL)	濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )
溶液C1	0.1	0.9	0.2	溶液C1	0.1	0.9	0.4
溶液C2	0.2	0.8	0.4	溶液C2	0.2	0.8	0.8
溶液C3	0.4	0.6	0.8	溶液C3	0.4	0.6	1.2
溶液C4	0.6	0.4	1.2	溶液C4	0.6	0.4	1.6
溶液C5	0.8	0.2	1.6	溶液C5	0.8	0.2	2.0
溶液C6	1.0	0.0	2.0				

表 2 肺内沈着量の分析結果

A 平成29年度物質：T-CNT7 (#25)

曝露濃度	曝露後期間	T-CNT7		T-CNT7	
		肺当たり重量( $\mu\text{g}$ )	SD	1g 当たり重量 ( $\mu\text{g/g}$ )	SD
0 $\text{mg/m}^3$ -0 週		0.00	0.00	0.00	0.00
0 $\text{mg/m}^3$ -1 週		0.00	0.00	0.00	0.00
0 $\text{mg/m}^3$ -4 週		0.00	0.00	0.00	0.00
0 $\text{mg/m}^3$ -8 週		0.00	0.00	0.00	0.00
1 $\text{mg/m}^3$ -0 週		0.96	0.29	6.30	2.00
1 $\text{mg/m}^3$ -1 週		0.73	0.18	4.59	1.11
1 $\text{mg/m}^3$ -4 週		0.89	0.27	5.42	1.62
1 $\text{mg/m}^3$ -8 週		0.81	0.12	5.39	1.01
3 $\text{mg/m}^3$ -0 週		1.61	0.47	10.15	3.22
3 $\text{mg/m}^3$ -1 週		1.66	0.47	9.98	2.60
3 $\text{mg/m}^3$ -4 週		1.65	0.33	10.84	2.42
3 $\text{mg/m}^3$ -8 週		1.74	0.66	10.25	3.60

**B 平成30年度物質： T-TiO<sub>2</sub>**

曝露濃度 曝露後期間	T-TiO <sub>2</sub>		T-TiO <sub>2</sub>	
	肺当たり量(μg)	SD	1g 当たり重量(μg/g)	SD
肺 0 mg/m <sup>3</sup> -0 週	0.00	0.00	0.00	0.00
肺 0 mg/m <sup>3</sup> -1 週	0.00	0.00	0.00	0.00
肺 0 mg/m <sup>3</sup> -4 週	0.00	0.00	0.00	0.00
肺 0 mg/m <sup>3</sup> -8 週	0.00	0.00	0.00	0.00
肺 30 mg/m <sup>3</sup> -0 週	18.61	1.58	150.11	9.05
肺 30 mg/m <sup>3</sup> -1 週	14.11	1.62	112.47	13.94
肺 30 mg/m <sup>3</sup> -4 週	8.13	0.89	63.05	7.21
肺 30 mg/m <sup>3</sup> -8 週	3.48	1.82	25.85	11.36

曝露濃度 曝露後期間	T-TiO <sub>2</sub>		T-TiO <sub>2</sub>	
	縦隔当たり量(μg)	SD	1g 当たり重量(μg/g)	SD
縦隔 0 mg/m <sup>3</sup> -0 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 0 mg/m <sup>3</sup> -1 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 0 mg/m <sup>3</sup> -4 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 0 mg/m <sup>3</sup> -8 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 30 mg/m <sup>3</sup> -0 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 30 mg/m <sup>3</sup> -1 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 30 mg/m <sup>3</sup> -4 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 30 mg/m <sup>3</sup> -8 週	0.00	0.00	0.00	0.00

**C 平成30年度物質： T-CNT7 ( #53 )**

曝露濃度 曝露後期間	T-CNT7		T-CNT7	
	肺当たり量(μg)	SD	1g 当たり重量(μg/g)	SD
肺 0 mg/m <sup>3</sup> -0 週	0.00	0.00	0.00	0.00
肺 0 mg/m <sup>3</sup> -1 週	0.00	0.00	0.00	0.00
肺 0 mg/m <sup>3</sup> -4 週	0.00	0.00	0.00	0.00
肺 0 mg/m <sup>3</sup> -8 週	0.00	0.00	0.00	0.00
肺 3 mg/m <sup>3</sup> -0 週	3.98	0.67	29.04	6.16
肺 3 mg/m <sup>3</sup> -1 週	3.04	0.25	21.33	2.01
肺 3 mg/m <sup>3</sup> -4 週	2.12	0.18	13.68	1.62
肺 3 mg/m <sup>3</sup> -8 週	1.38	0.36	9.15	2.17

曝露濃度 曝露後期間	T-CNT7		T-CNT7	
	縦隔当たり量(μg)	SD	1g 当たり重量(μg/g)	SD
縦隔 0 mg/m <sup>3</sup> -0 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 0 mg/m <sup>3</sup> -1 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 0 mg/m <sup>3</sup> -4 週	0.00	0.00	0.00	0.00

縦隔 0 mg/m <sup>3</sup> -8 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 3 mg/m <sup>3</sup> -0 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 3 mg/m <sup>3</sup> -1 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 3 mg/m <sup>3</sup> -4 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 3 mg/m <sup>3</sup> -8 週	0.00	0.00	0.00	0.00

**D 令和元年度物質：T-CNTN**

曝露濃度 曝露後期間	MWCNT-N		MWCNT-N	
	肺当たり量 (μg)	SD	1g 当たり重量 (μg/g)	SD
肺 0 mg/m <sup>3</sup> -0 週	0.00	0.00	0.00	0.00
肺 0 mg/m <sup>3</sup> -1 週	0.00	0.00	0.00	0.00
肺 0 mg/m <sup>3</sup> -4 週	0.00	0.00	0.00	0.00
肺 0 mg/m <sup>3</sup> -8 週	0.00	0.00	0.00	0.00
肺 0.6 mg/m <sup>3</sup> -0 週	1.36	0.36	8.84	2.23
肺 0.6 mg/m <sup>3</sup> -1 週	0.88	0.38	5.51	2.19
肺 0.6 mg/m <sup>3</sup> -4 週	0.44	0.15	2.69	0.94
肺 0.6 mg/m <sup>3</sup> -8 週	0.37	0.15	2.41	0.89
肺 1.3 mg/m <sup>3</sup> -0 週	2.29	0.50	14.38	3.36
肺 1.3 mg/m <sup>3</sup> -1 週	1.82	0.15	10.96	1.27
肺 1.3 mg/m <sup>3</sup> -4 週	0.87	0.35	5.73	2.27
肺 1.3 mg/m <sup>3</sup> -8 週	0.64	0.18	3.77	1.01

( 続 )

曝露濃度 曝露後期間	MWCNT-N		MWCNT-N	
	縦隔当たり量 (μg)	SD	1g 当たり重量 (μg/g)	SD
縦隔 0 mg/m <sup>3</sup> -0 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 0 mg/m <sup>3</sup> -1 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 0 mg/m <sup>3</sup> -4 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 0 mg/m <sup>3</sup> -8 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 0.6 mg/m <sup>3</sup> -0 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 0.6 mg/m <sup>3</sup> -1 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 0.6 mg/m <sup>3</sup> -4 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 0.6 mg/m <sup>3</sup> -8 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 1.3 mg/m <sup>3</sup> -0 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 1.3 mg/m <sup>3</sup> -1 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 1.3 mg/m <sup>3</sup> -4 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 1.3 mg/m <sup>3</sup> -8 週	0.00	0.00	0.00	0.00

表 3 曝露終了後 8 週における肺内の検体残存率

検体名 (曝露量)	肺内沈着量 ( $\mu\text{g}/\text{肺 } 1\text{g}$ )		8W 残存率 ( $8\text{W}/0\text{W}\times 100$ )	実施年度
	0W	8W		
T-TiO <sub>2</sub> ( $30\text{mg}/\text{m}^3$ 、2 時間 x10 回)	150.11	25.85	32%	平成 30
T-CNT7 ( $3\text{mg}/\text{m}^3$ 、2 時間 x10 回)	29.04	9.15	17%	平成 30
T-CNTN ( $0.6\text{mg}/\text{m}^3$ 、2 時間 x10 回)	8.84	2.41	27%	令和 1
T-CNTN ( $1.3\text{mg}/\text{m}^3$ 、2 時間 x10 回)	14.38	3.77	27%	令和 1

T-CNT7(平成 29 年度実施)は 0W の値が異常と判断、データ不採用

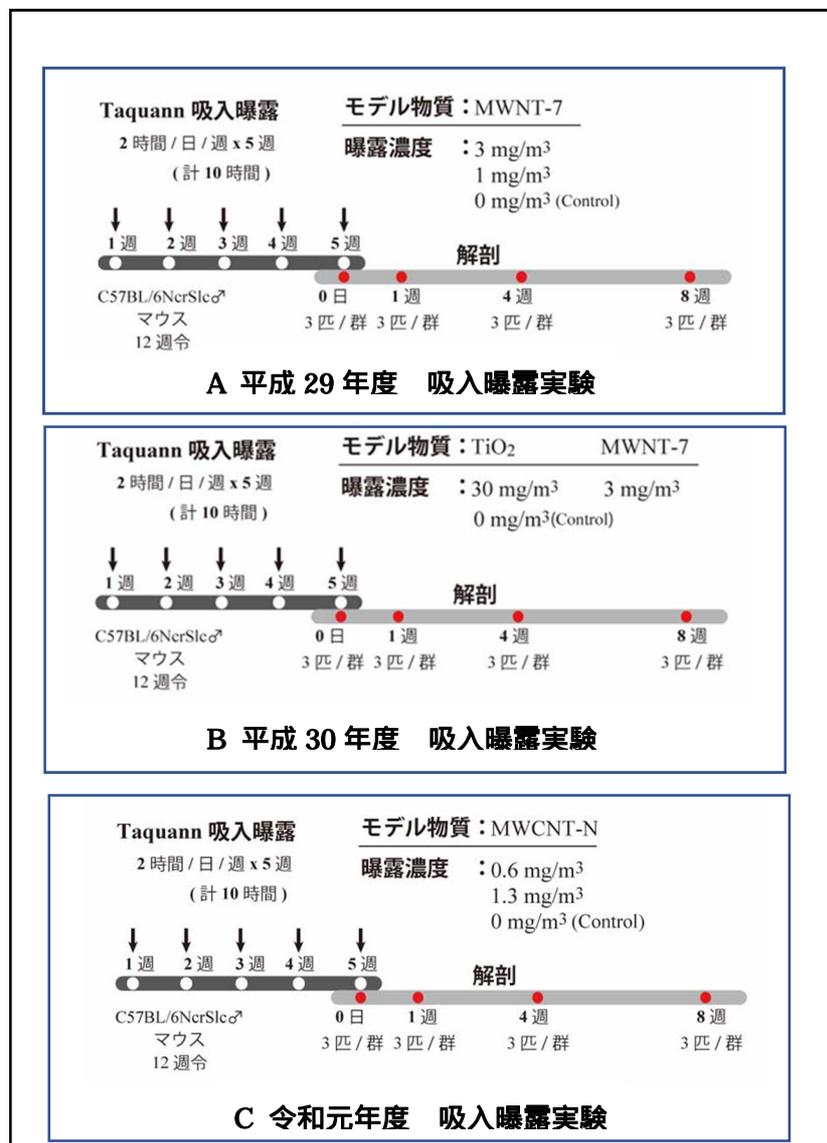


図 1 実験デザイン

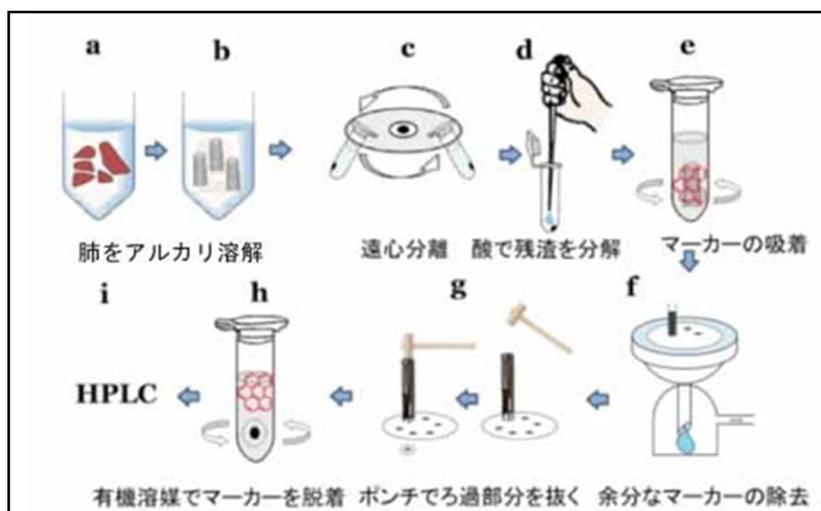


図 2 組織中の MWCNT 測定手順 (前処理)

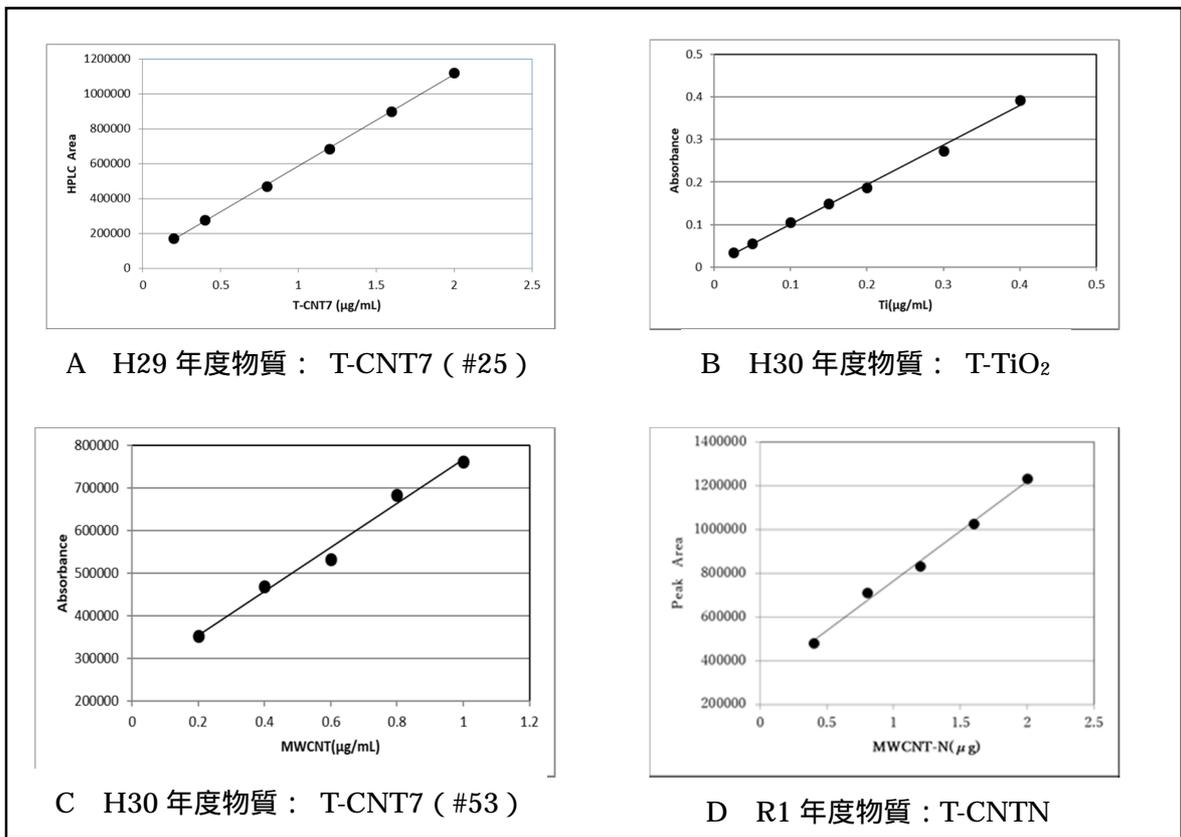


図 3 検量線

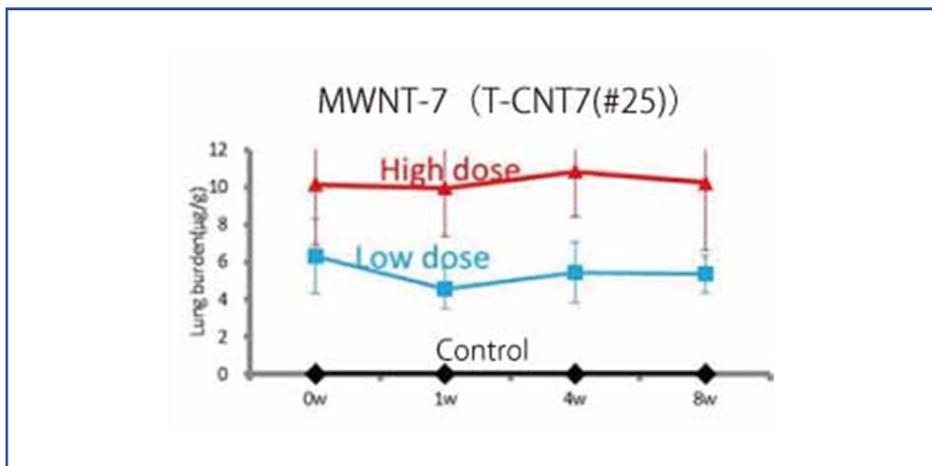


図 4 平成 29 年度物質 MWNT-7 (T-CNT7#25) の肺負荷量の経時的推移

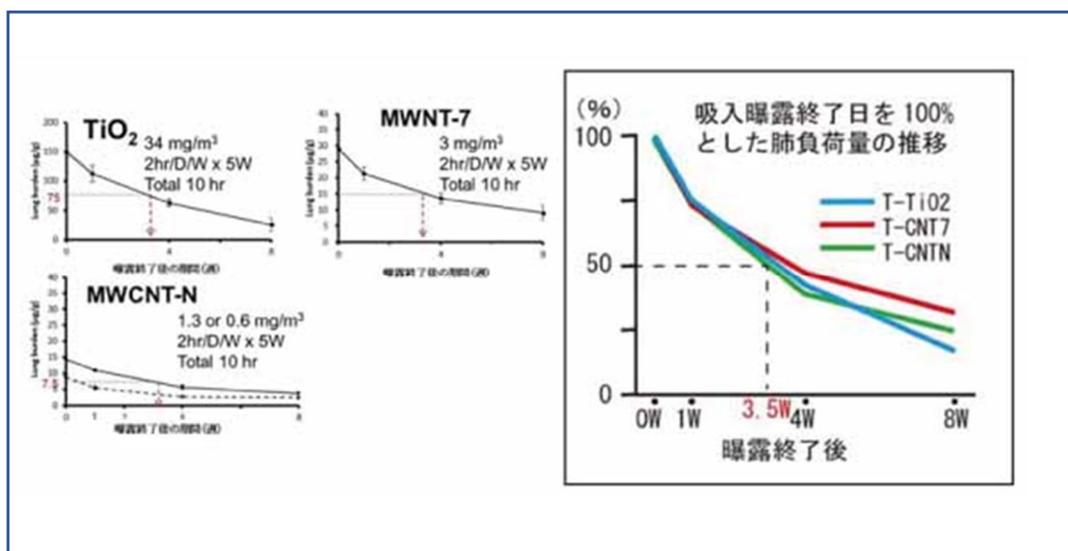


図 5 平成 30 ~ 令和元年度物質  
 TiO<sub>2</sub> (T-TiO<sub>2</sub>)、MWNT-7 (T-CNT7#53)、MWCNT-N (T-CNTN)  
 の肺負荷量の経時的推移