

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: 気管内投与による化学物質の有害作用とくに発癌性の効率的評価手法の開発に関する研究
研究: 迅速化かつ国際化に向けて

分担研究課題名: 吸入曝露の方法、吸入物質の代謝についての研究

分担研究者 大西 誠 労働者健康安全機構 日本バイオアッセイ研究センター 技術専門役

研究要旨

労働環境・生活環境の多様な化学物質は、経気道的に体内に取り込まれる物質は多く、吸入曝露による健康影響評価手法を開発することは極めて重要である。本研究の目的は、ナノマテリアルの繊維・粒子体の有害性試験法として開発された経気管肺内噴霧投与方法(TIPS 法)を用いて、有害性評価に適応することにある。令和2年度はTIPS法による毒性評価指標の確立を行うため、経気道的曝露による有害性、特に発がん性が未知であるフラーレンウィスカー(FLW)をF344ラットに2週間TIPS投与し、1週間の肺に対する沈着状態について検討した。また既に吸入曝露試験が実施された1,4-dioxane(dxn)をモデル物質として選択し、その肺内濃度の測定方法について検討した。その結果、FLWは顕微鏡所見において肺胞腔においてマクロファージに取り込まれ、一様に分布していた。また、電顕においてFLWはバルクと同様な表面が凹凸形状で観察された。

A. 研究目的

毒物及び劇物取締法(毒劇法)によって指定された化合物に対する吸入曝露の評価は、多くの事業場において、安全性試験は動物を用いた経口・皮膚塗布・腹腔内投与等で代替されている。その理由は、吸入曝露試験専用施設とその稼働に高額な費用が必要であることによる。本研究の目的は、吸入曝露試験の絶対的な不足を補う目的で、それに代わり得る気管内投与方法を開発してOECD等へ提示を目指すことにある。

申請者らはこれまでに、ナノサイズの繊維・粒子体の有害性試験法として、簡便な経気管肺内噴霧投与方法(TIPS法)において研究代表者と共同でカーボンナノマテリアルの沈着と肺毒性について研究してきた。

今年度は、フラーレンウィスカー(FLW)と発がん性を含めた有害性をTIPS投与にて短期に検索す

るモデルの開発のために肺内チンチャクと障害作用について、検討を進めてきた。

B. 研究方法

実験① FLWは、PFポリマー分散液(0.5% Pluronic F68 含有生理食塩水)に懸濁し、肺内噴霧ゾンデによりTIPS投与した。12週齢雄性F344ラットに、FLWを、イソフルラン深麻酔下にて、それぞれ62.5 µg/0.5ml/ラットの用量で2週間に8回(合計投与量0.5mg/ラット)気管内投与した。3週間目(投与終了後1週間)にイソフルラン深麻酔下に大動脈より採血屠殺した。肺はホルマリン固定後、一部を凍結切片を作成し、標本の観察を実施した。また、一部を5%硝酸液によりマイクロウェーブで60分、150℃で溶解しフィルター濾過し、SEMにより観察を行った。

実験 dxnを、11-12週齢雄ラット(330-350g)11日間に6回(合計投与量60、150、300、450、600、750、1050、1200mg/ラット)をTIPS投与し、解剖時に取り出

した肺を酵素(プロテイナーゼK)により37℃、一晚、溶解検討を行った。さらに難分解性である1,4-dioxane (dxn) について肺内沈着の計測について検討始めた。

C. 研究結果

実験① FLW の凍結切片の標本について顕微鏡で観察した結果、肺胞腔にマクロファージに取り込まれた FLW が確認された。FLW は、肺中で均等に分布していた。さらに、組織標本を作成し、標本の観察を実施した。また、SEM 観察において肺中から、太さは約 350nm、長さは約 3 μ m の FLW が認められた。表面状態は、バルクと同様に若干の凹凸が認められた。

実験 dxn 投与肺の溶解度に関して検討した結果、肺の茶褐色成分が残留しており、この成分中に dxn 成分が残留していることが考えられた。従って、次回は酵素の種類を変更して溶解する予定である。

D. 考察

FLW はフラーレン同士が分子間力により結合した結晶である。従って、フラーレン同様、FLW はキシレンに対する溶解度は高い。通常、パラフィン切片では、洗浄工程でキシレンを用いて洗浄するが、この工程では、FLW が溶解して、標本に残らない。従って、今回の FLW における標本は凍結切片を用いることにより、FLW の残留が肺中に認められた。このことから、肺内の FLW 等の特定の有機溶媒に溶解するナノマテリアルを観察するためには、肺処理溶媒について事前検討が必要である。また FLW の SEM 観察結果より、肺内に沈着した FLW の表面はバルクと同様であり、今後、肺内に 2 年間沈着した様子 FLW 構造変化を観察する必要がある。さらに、FLW の肺内の沈着量を定量的に評価する必要があり、今後実施する予定である。また、TIPS 投与した dxn、肺の溶解はさらに完全に溶解する条件検討が必要である。

E. 結論

ラット短期間気管内投与モデルを用いて、フラーレ

ンウィスカーの肺内の沈着状態について検討した。その結果、肺胞腔にマクロファージに取り込まれた FLW が確認され、肺中で均等に分布していた。SEM 観察において肺中から、表面が凹凸の、太さは約 350nm、長さは約 3 μ m の FLW が認められた。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
 1. 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、名古屋．2019 年 5 月
 2. 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、名古屋．2019 年 5 月
 3. 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、福島．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
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし