

令和元年度 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

研究課題名: ナノマテリアル曝露による慢性影響の効率的評価手法開発に関する研究

分担研究課題名: 短期曝露試験系の総合評価に関する研究

研究分担者: 小林 憲弘 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 室長
研究協力者: 北條 幹 東京都健康安全研究センター 薬事環境科学部 主任研究員
広瀬 明彦 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部 部長

研究要旨

ナノマテリアルの呼吸器毒性の評価として、これまでの研究により、MWCNT (MWNT-7) 分散液の調製方法 (分散状態) によって、毒性試験結果に差が見られる 1)~3) ことから、今年度は、東京都健康安全研究センターにおいて実施する長期の反復気管内投与試験の試料の分散状態を比較するためのひとつの指標として、動的光散乱法 (DLS) による二次粒子径を分析した。

一方、ナノマテリアルの毒性試験における試料の調製方法とその計測方法の標準化について、OECD のナノマテリアル作業部会 (WPMN) においても議論が続けられている。

WPMN において我が国は、短期間 *in vivo* 曝露試験の有用性検証の為の評価文書の作成プロジェクトを提案していることから、令和元年 12 月に OECD 会議センターにおいて開催された WPMN に参加して最新の国際動向を収集した。

DLS による MWCNT 分散液試料の測定の結果、1 回目の測定における散乱強度の平均は 720 nm であったが、3 回の DLS 測定および各測定内での 3 回のレコードの粒径分布は、測定毎に粒径分布が大きくなる側にシフトする傾向が見られた。

DLS により MWCNT 分散液試料の分散状態の特徴を定量的に明らかにすることは限界があるものの、分散液中での MWCNT の状態をある程度表すことができるのではないかと考えられる一方で、OECD においては、繊維の粒径分布の測定として DLS は推奨されておらず、粒子としての粒径分布の測定に DLS は有効であるとしている。また、測定にあたって、試料の安定性及び繰り返し測定の再現性が重視されている。本研究における測定は、測定毎に粒径分布の変化が見られたことから、OECD のテストガイドライン案で提案されている条件を満たすものではなかった。今後、粒径分布を測定する上では、より安定的な結果を得るために、測定中に沈殿が生じない媒体及び調製方法を検討する必要があると考えられる。

A. 研究目的

ナノマテリアルの呼吸器毒性の評価として、これまでの研究により、MWCNT (MWNT-7) 分散液の調製方法（分散状態）によって、毒性試験結果に差が見られる^{1)~3)}ことから、今年度は、東京都健康安全研究センターにおいて実施する長期の反復気管内投与試験の試料の分散状態を比較するためのひとつの指標として、動的光散乱法 (DLS) による二次粒子径を分析した。動的光散乱法 (Dynamic Light Scattering: DLS) は、溶液中のナノメートルオーダーの微粒子を計測する、かつ ISO にも記載 (ISO 22412:2017) された実用的かつ簡便な手法であり、溶液中におけるナノ粒子の「運動速度」を計測し、そのデータから各種の数値計算（吸収率、粘度等のパラメータを考慮）を利用して「大きさ=径」に換算する（図 1）。DLS によるサンプルの観察は、本研究班で実施するラット気管内投与実験で用いる試料の状態を把握するために重要と考えられる。

一方、ナノマテリアルの毒性試験における試料の調製方法とその計測方法の標準化について、OECD のナノマテリアル作業部会 (WPMN) においても議論が続けられている。

WPMN において我が国は、短期間 in vivo 曝露試験の有用性検証の為の評価文書の作成プロジェクトを提案していることから、令和元年 12 月に OECD 会議センターにおいて開催された WPMN に参加して最新の国際動向を収集した。

B. 研究方法

i) MWCNT 分散液の調製及び DLS の測定

MWCNT 試料を 0.1% Tween 80 含有 PBS 溶液で 30~60 分間、超音波処理をして分散液を調製し、調製当日にゼータサイザーナノ (Malvern 社) を用いて DLS モードで粒径分布を測定した。

測定に当たっては、MWCNT 濃度 0.5mg/mL の試料を PBS で 50 倍希釈 (0.01 mg/mL) し、超音波処理で再分散させてからすぐに測定した。各試料は 3 回測定し、1 回の測定につき、120 秒の安定後に 3 回のレコードを取った。

ii) 国際動向の調査

令和元年 12 月 15 日~令和元年 12 月 20 日にかけて OECD 会議センター (パリ、フランス) において開催された工業ナノ用材料の安全性評価に関するワーキンググループの各作業プログラムのロードマップ会議に参加し、ナノマテリアル評価の為のガイドライン作成及び改訂に関する各種プロジェクトの進捗状況について最新動向の情報収集を行った。

C. 研究結果

i) MWCNT 分散液の調製及び DLS の測定

MWCNT 分散液試料の DLS 測定結果を図 2 に示す。1 回目の測定における散乱強度の平均は 720 nm であったが、3 回の DLS 測定および各測定内での 3 回のレコードの粒径分布は、測定毎に粒径分布が大きくなる側にシフトする傾向が見られた。

ii) 国際動向の調査

令和元年 12 月に開催された WPMN に合わせて、粒径分布測定に関する専門家会合が併せて開催された (WPMN and Joint Expert Group Meetings, Meeting of the JOINT EXPERT GROUP WNT-WPMN on Physical Properties of NMs; WNT Project 1.4 - TG on Particle size distribution)。

この会合の中で、現在 WPMN において作成中である「ナノマテリアルの粒径及び粒径分布のテストガイドライン案」(TEST GUIDELINE ON PARTICLE SIZE AND PARTICLE

SIZE DISTRIBUTION OF MANUFACTURED NANOMATERIALS [DRAFT]) について議論が行われた。

このテストガイドライン案では、ナノマテリアルを「粒子」と「繊維」に分けて、それぞれに対して適切な粒径分布の測定手法とその手順について示している。

直径 1~1000 nm の範囲の「粒子」に関しては、以下の 8 つの計測手法が適用できると記載している。

- 電子顕微鏡 (EM)
- 動的光散乱法 (DLS)
- 遠心液体沈殿法 (CLS)
- 粒子トラッキング分析法 (PTA)
- 微分型電気移動度分級器 (DMAS)
- 原子間力顕微鏡 (AFM)
- 単一粒子誘導結合プラズマ-質量分析法 (sp ICP-MS)
- 小角 X 線散乱法 (SAXS)

一方、「繊維」に関しては、透過型電子顕微鏡 (TEM) と走査型電子顕微鏡 (SEM) のみが、粒径分布を測定できる唯一の方法であると結論している。

また、本研究で用いた DLS の測定およびデータ解析に当たっては、以下の注意点が記載された。

- 測定中に沈殿が生じない調製方法を検討すること
- 少なくとも 2 濃度で 3 試料を測定し、平均値を採用する
- 濃度により測定結果に違いみられた場合、変化が見られなくなるまで希釈して再測定する

- 測定中に沈殿がみられた場合、安定な状態で再測定する

D. 考察

昨年度の研究では、DLS により測定した未処理および熱処理 MWCNT 分散液試料の主要ピークの粒径は 1500~2000 nm 程度、Taquann 処理 MWCNT 試料分散液の主要ピークの粒径は 1 nm 程度であった。

未処理および熱処理 MWCNT 分散液試料では、ピークの分布の裾が測定上限 (16 μm) まで広がっていたが、Taquann 処理試料では粒径の大きいピークは見られなかった。

このことから、DLS により得られた測定結果 (主要ピーク) は、分散した MWCNT あるいはその凝集体ではなく、光顕の画像でもみられる MWCNT 周辺の細かい粒子に相当しているのではないかと考えられる。

DLS により MWCNT 分散液試料の分散状態の特徴を定量的に明らかにすることは限界があるものの、分散液中での MWCNT の状態をある程度表すことができるのではないかと考えられる。

一方、OECD においては、繊維の粒径分布の測定として DLS は推奨されておらず、粒子としての粒径分布の測定に DLS は有効であるとしている。また、測定にあたって、試料の安定性及び繰り返し測定の再現性が重視されている。本研究における測定は、測定毎に粒径分布の変化が見られたことから、OECD のテストガイドライン案で提案されている条件を満たすものではなかった。今後、粒径分布を測定する上では、より安定的な結果を得るために、測定中に沈殿が生じない媒体及び調製方法を検討する必要があると考えられる。

E. 結論

ナノマテリアルの粒子径をDLSで測定する場合には、現在、OECDにおいて作成中のガイドライン案に従い、以下の事項に留意して測定を行う必要があると考えられる。

- 測定中に沈殿が生じない調製方法を検討する
- 少なくとも2濃度で3試料を測定し、平均値を採用する
- 濃度により測定結果に違いみられた場合、変化が見られなくなるまで希釈して再測定する
- 測定中に沈殿がみられた場合、安定な状態で再測定する

F. 参考文献等

- 1) Hirose A., Hojo M., Kobayashi N., Impact of sample preparation of MWCNT for developmental toxicity by intratracheal instillation. The 10th Congress of Toxicology in Developing Countries (CTDC2018) (April 2018 Belgrade, Serbia)
- 2) 北條幹,小林憲弘,長谷川悠子,安藤弘,久保喜一,海鋒藤文,田中和良,五十嵐海,村上詩歩,多田幸恵,生嶋清美,湯澤勝廣,坂

本義光,前野愛,鈴木俊也,猪又明子,守安貴子,高橋祐次,広瀬明彦,中江大:多層カーボンナノチューブのマウス気管内投与による発生毒性と肺の炎症との関連性. 第45回日本毒性学会学術年会(2018年7月大阪)

- 3) Hojo M, Kobayashi N, Hasegawa Y, Sakamoto Y, Murakami S, Yamamoto Y, Tada Y, Maeno A, Kubo Y, Ando H, Shimizu M, Taquahashi Y, Suzuki T, Nakae D, Hirose A: Relationship between developmental toxicity of multi-wall carbon nanotubes (MWCNT) and lung inflammation in pregnant mice after repeated intratracheal instillation. 54th congress of the European societies of toxicology (EUROTOX2018) (September 2018 Brussels, Belgium)

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得 (該当なし)
2. 実用新案登録 (該当なし)
3. その他 (該当なし)

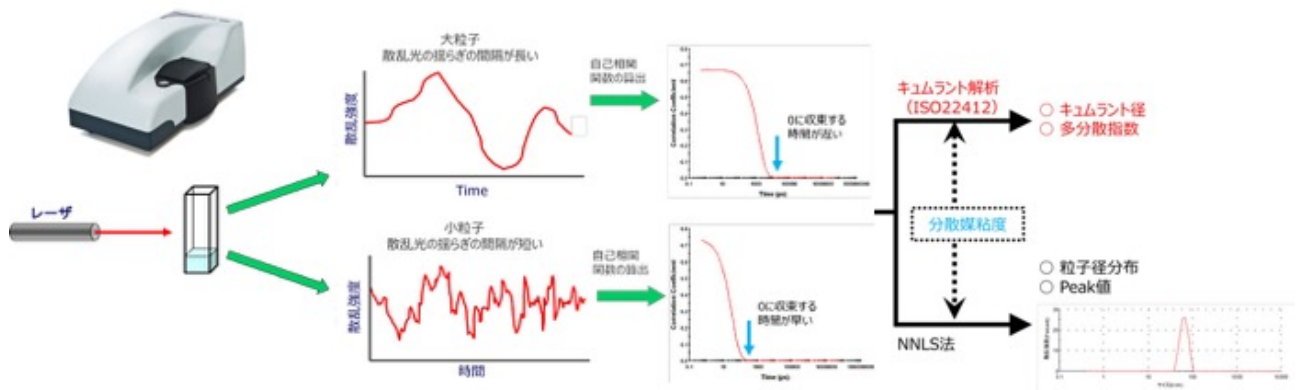


図 1 : 動的光散乱法の原理

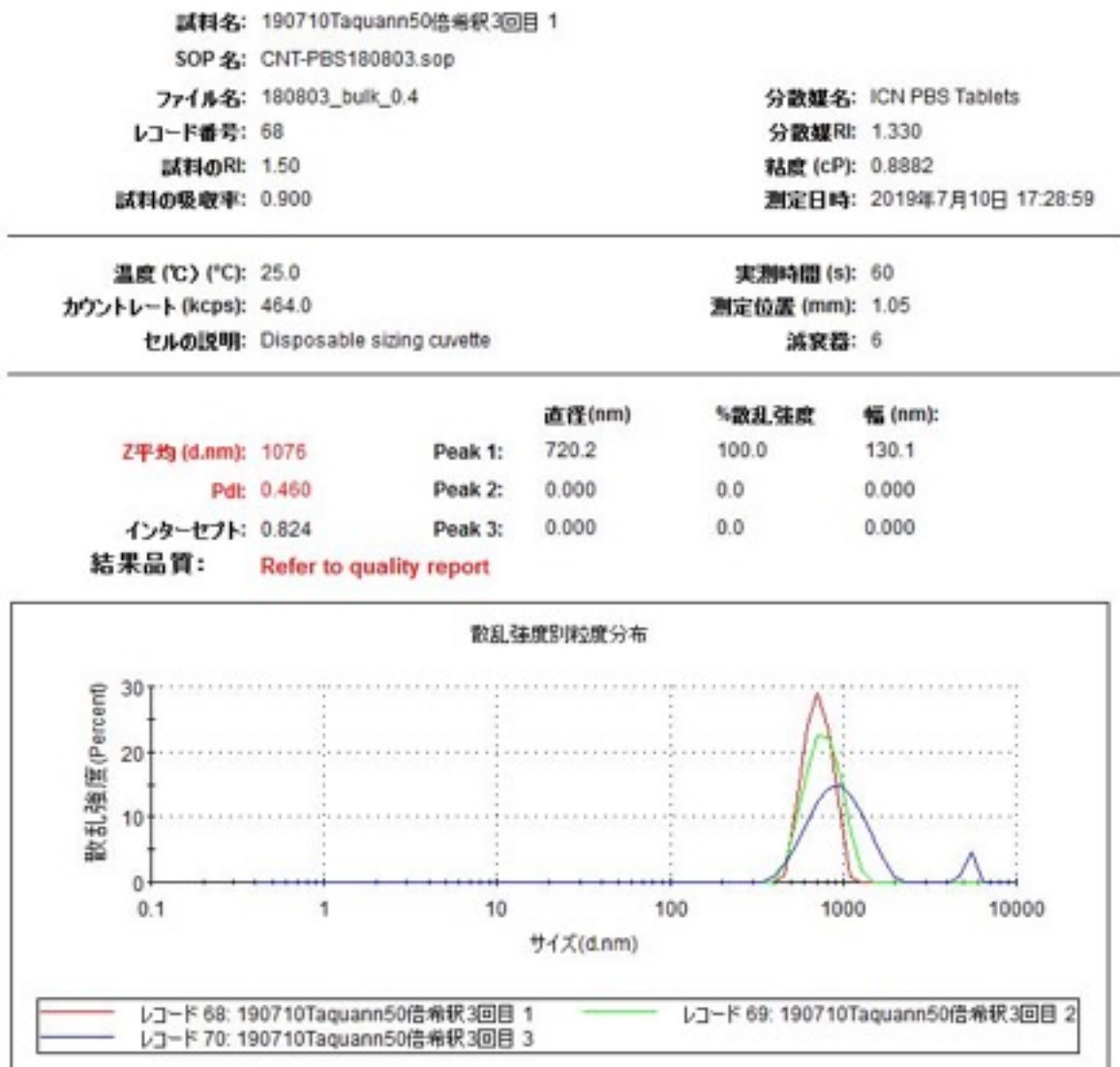


図 2 : DLS の測定結果