

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
ナノマテリアルの短期吸入曝露等による免疫毒性に関する  
in vitro/in vivo 評価手法開発のための研究

令和3年度 分担研究報告書

ナノマテリアルの吸入ばく露実験の実施と解析

研究分担者	高橋 祐次	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部 室長
研究協力者	横田 理	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部 主任研究官
	森田紘一	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部
	辻 昌貴	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部
	菅 康佑	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部
	相田麻子	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部

### 研究要旨

本研究の目的は、ナノマテリアル(NM)のマウス吸入ばく露による肺胞マクロファージの機能解析を実施した先行研究(H29-化学-一般-003)を基盤として、短期吸入ばく露された各種NMの免疫系に与える影響について in vitro/in vivo 試験の連携体制による毒性メカニズムの解明と評価系の開発を行うことである。最終的には、得られた知見を基に各種NMの短期吸入ばく露による毒性発現のAOP(毒性発現経路)および in vitro 試験法を確立する。本分担研究では、先行研究で開発した Taquann 法を用い、カートリッジ直噴式全身ばく露吸入装置(Taquann システム Ver3.0、国立衛研内に設置済)によりナノマテリアルを高分散エアロゾルとしてマウスに、6時間/日、5日間連続の全身ばく露吸入実験を行い、定期解剖により試料のサンプリングし研究協力者に提供した。今年度はナノシリカ(NM204、JRC)を検体として用いた。目標濃度は、低濃度群 10 mg/m<sup>3</sup>、高濃度群 30 mg/m<sup>3</sup>と設定した。動物はC57BL/NcrSlc 雄性マウス 12週齢を使用し、6hr/day、連続5日間(合計30時間)の全身ばく露吸入を行った。対照群はHEPAフィルターで濾過したクリーンエアを吸入させた。ばく露実験の結果、実際のばく露濃度の平均値は、低濃度群;10.3±1.1 mg/m<sup>3</sup>、高濃度群;25.6±2.5 mg/m<sup>3</sup>、MMAD は低濃度群;1,439 nm(og:3.2~4.2)、高濃度群;1,468 nm(og:3.5~4.0)であった。ばく露終了直後、4および8週後に定期解剖を行って試料を採取した。採取した組織(肺、BALF、リンパ節、脾臓)は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。ばく露終了直後の肺重量について、高濃度群では有意に増加していた。今後、肺負荷量、病理組織評価を行い、NM204の吸入ばく露による生体影響を明らかにする計画である。

## A. 研究目的

本研究の目的は、ナノマテリアル(NM)のマウス吸入ばく露による肺胞マクロファージの機能解析を実施した先行研究(H29-化学-一般-003)を基盤として、短期吸入ばく露された各種NMの免疫系に与える影響について *in vitro/in vivo* 試験の連携体制による毒性メカニズムの解明と評価系の開発を行うことである。得られた知見を基に各種NMの短期吸入ばく露による毒性発現のAOP(毒性発現経路)および *in vitro* 試験法を確立する。

本分担研究では、検体の分散方法として先行研究で開発した Taquann 法を用い、カートリッジ直噴式全身ばく露吸入装置(Taquann システム Ver3.0、国立衛研内に設置済)によりナノマテリアルを高分散エアロゾルとしてマウスに 5 日間の全身ばく露吸入を行った。今年度は被験物質として、ナノシリカを使用した。

## B. 研究方法

### B-1 被験物質

#### 1. 被験物質:

被験物質として、EU 共同研究センター(JRC: Joint Research Centre in Ispra, Italy)から寄付されたナノシリカ(SiO<sub>2</sub>-NM204-JRCNM02004)を使用した。

### B-2 マウス全身ばく露吸入実験

#### 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。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 750TM 個別換気式飼育装置 特型)を使用した。飼育条件は、温度;25±1℃、湿度;55±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)を自由摂取させた。飲水は滅菌水ディスポーザブルパウチ(Hydropa)を用いて自由摂取させた。ケージ内の環境を改善する目的で、シェファード ジャック(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)、NM204 ばく露群(低濃度、高濃度)の 3 群構成とした。目標濃度は、低濃度群 10 mg/m<sup>3</sup> 高濃度群 30 mg/m<sup>3</sup> と設定した。各群当たり 48 匹のマウスを使用し、肺沈着量測定用に 9 匹、病理組織用に 6 匹、免疫機能実験用に 10 匹を割り当てた(表 1)。1 日 6 時間(10:00~16:00)、5 日間の連続の全身ばく露吸入を行った。

#### 4. ダスト発生装置

検体のエアロゾル化は、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ト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トターカートリッジ

に收容して使用する。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。

NM204 の原末を 35°C に加温した tert-butyl alcohol (TBA) 加えて 2 mg/mL の懸濁液を調整した。TBA 懸濁液を超音波洗浄器 SU-3TH (柴田科学株式会社) にて、40W の出力により 2~15 分間の処理を行い、高分散性の懸濁液を得た。この懸濁液を Taquann システムで使用するカートリッジに充填した。低濃度群では 3.5 mL/cartridge、高濃度群では 10.5 mL/cartridge を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 (MD4C NT+AK+EK, Vacuubrand) で TBA を昇華除去することで行った。

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、希釈されつつばく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 0.48 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。ばく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、ばく露開始時に 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 時間の吸入ばく露実験において、合計 88 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。

ばく露チャンバー内の温度、湿度並びに圧力

変動をばく露時間の 6 時間を通してモニタリングした。

実験条件の詳細に関しては、表 2 に記載した。

## 5. ばく露チャンバー

動物を收容し検体をばく露するばく露チャンバーは、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收容する。マウスは最大 25 匹收容が可能である。ばく露チャンバーはアクリル製のアウトターチャンバーと 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上部は円錐状となってサブチャンバーに接続されており、メインチャンバーの気積 179 L である。

## 6. ばく露チャンバー内のエアロゾル濃度測定

ばく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、凝縮粒子計数装置 (Condensation Particle Counter: CPC、CPC-BL01、サンプリング流量: 1.5 L/min、柴田科学) 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。高濃度での測定は、CPC に負荷がかかるため、CPC の前段に希釈機 (柴田科学) を設置して 6 倍希釈し測定した。

ばく露チャンバーと 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。

質量濃度測定は、ローボリウムサンプラー (080050-155、φ 55 mm ろ紙ホルダー、柴田科学) にフッ素樹脂バインダーガラス繊維フィルター (Model TX40HI20-WW、φ 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 の流量でばく露時間の 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  $\text{m}^3$  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. エアロゾルの空気動力学的中位径測定 Mass Median Aerodynamic Diameter (MMAD)

エアロゾルの空気動力学的中位径測定は、Micro-Orifice Uniform Deposit Impactors (MOUDI)を用いた。10 L/min の流量でばく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 40 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 装着前と回収後に測定し、その差分を検体質量とした。

#### 8. 解剖とサンプリング

肺と縦隔、顎下リンパ節のサンプリングのため、ばく露終了直後(0W)、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(ゾエティス)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(サーフローフラッシュ 18G、テルモ)を気管に挿入し PBS を 1 mL 注入・吸引採取する操作を 2 回繰り返す、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は、国立医薬品食品衛生研究所・動物実験委員会の制定による「動物実験等の適正な実施に関する規程(平成 27 年 4 月版)」に則って実施した。

## C. 研究結果

### C-1 マウス全身ばく露吸入実験

NM204 の 5 日間反復全身ばく露吸入実験における平均質量濃度は、低濃度群;  $10.3 \pm 1.1$

mg/m<sup>3</sup>、高濃度群; 25.6 ± 2.5 mg/m<sup>3</sup> (平均値 ± SD) であった。3 回の測定を行った MMAD は低濃度群; 1,439 nm (og: 3.2 ~ 4.2)、高濃度群; 1,468 nm (og: 3.5 ~ 4.0) であった。(表 3)。

エアロゾルの累積分布から、粒子径 100 nm から急激に立ち上がる分布であった(図 1C 及び D)。6 時間の吸入ばく露実験において使用した総検体量は、低濃度群、高濃度群でそれぞれ 616 mg、1,848 mg であった。6 時間の曝露チャンバーの総換気量は 11.7 m<sup>3</sup> であることから名目上の濃度は低濃度群、高濃度群それぞれ 52.6 mg/m<sup>3</sup>、157.9 mg/m<sup>3</sup> と計算される。実際に測定した濃度の平均値から、エアロゾル化効率を計算すると低濃度群、高濃度群それぞれ 19.6%、16.2% であった(表 3)。

実験に供したマウスは定期解剖までの間、いずれも体重推移に異常は認められなかった(図 2、A、B 及び C)。ばく露終了直後 (Day0)、4 および 8 週後に定期解剖を行って試料を採取した。ばく露終了直後の肺重量は、対照群 121.6 ± 4.9mg、低濃度群 130.8 ± 3.4 mg、高濃度群 138.6 ± 9.2mg であり、高濃度群では対照群に比較して有意に増加した(図 2、D)。

採取した組織(肺、BALF、リンパ節、脾臓)は、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。

#### D. 考察

粒子状物質の吸入において、粒径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定める重要な因子であり、一般に MMAD を指標としている。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ばく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ばく露試験では、エアロゾルの均一性を保つためチャンバ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、吸入ばく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。

本分担研究で用いたナノシリカ NM204 は、分散性が良好であり Taquann 法および Taquann 直噴全身吸入装置 Ver 3.0 により容易にエアロゾル化することが可能であった。NM204 のエアロゾル特性として、MMAD は低濃度群、高濃度群ともに約 1,500 nm (1.5µm) であり肺胞領域まで到達可能とされる MMAD < 3µm を達成している。エアロゾルの粒径分布の指標となる og は 3.2 ~ 4.2 と TG413 で推奨される 1 ~ 3 と比較すると、若干広い範囲の粒度分布である。エアロゾルの累積分布において明らかであるように、NM204 エアロゾルは、累積粒子径が 100 nm から急激に立ち上がる分布であるため、MMAD がこのような値を示すと考えられる。一方、エアロゾル化効率は 20% 程度であり、先行研究にて使用した多層カーボンナノチューブの一つである MWNT-7 (三井) の約 60% から比較すると 1/3 程度の値である。CPC の濃度推移を比較すると、NM204 はカートリッジからエアロゾルが噴射された直後の CPC カウントの立ち上がりが MWNT-7 に比較して緩やかである。濃度低下は同様であることから、沈降速度は同じであるが、カートリッジから噴射された検体のうち、サブチャンバーでのトラップされる量が多いのかもしれない(図 3)。

NM204 ばく露によるマウスは、体重推移においては影響が認められていない。肺重量に関しては、ばく露終了直後である Day0 において、低濃

度群において増加傾向、高濃度群では有意に増加していた。4 週後及び 8 週後では有意な変化は認められなかった。NM204 の肺負荷量は 5 日間の連続ばく露で次第に増加するため、その影響と考えられるが、ばく露終了後は比較的速やかに肺から排泄されるのかもしれない。

今後、サンプリングした肺の病理組織と肺負荷量測定を行い、NM204 の影響を明らかにする計画である。

## E. 結論

NM204 の高分散乾燥検体を持ちいて、マウスに 1 日時 6 時間、5 日間連続全身ばく露吸入を実施した。その結果、低濃度群； $10.3 \pm 1.1 \text{ mg/m}^3$ 、高濃度群； $25.6 \pm 2.5 \text{ mg/m}^3$  を達成した。MMAD は低濃度群、高濃度群ともに  $1.5 \mu\text{m}$  以下であり十分に肺胞に到達するエアロゾル特性を有していた。肺重量に関して、5 日間ばく露終了直後の肺では、高濃度群で有意な増加がみられたが、4 及び 8 週後では変化はみとめられなかった。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Taquahashi Y, Tsuruoka S, Morita K, Tsuji M, Suga K, Aisaki K and Kitajima S, A novel high-purity carbon-nanotube yarn electrode used to obtain biopotential measurements in small animals: flexible, wearable, less invasive, and gel-free operation, *Fundam Toxicol, Sci.* 2022, 9(1),17-21, doi.org/10.2131/fts.9.17

Taquahashi Y, Saito H, Kuwagata M, Kitajima S, Development of an inhalation exposure system of a pressurized metered-dose inhaler (pMDI) formulation for small experimental animals, *Fundam Toxicol, Sci.* 2021,8(6),169-175, doi.:10.2131/fts.8.169

Hojo M, Yamamoto Y, Sakamoto Y, Maeno A, Ohnuki A, Suzuki J, Inomata A, Moriyasu T, Taquahashi Y, Kanno J, Hirose A, Nakae D. Histological sequence of the development of rat mesothelioma by MWCNT, with the involvement of apolipoproteins, *Cancer Sci.* 2021 Jun;112(6):2185-2198. doi: 10.1111/cas.14873. Epub 2021 May 2.

Yamamoto E, Taquahashi Y, Kuwagata M, Saito H, Matsushita K, Toyoda T, Sato F, Kitajima S, Ogawa K, Izutsu KI, Saito Y, Hirabayashi Y, Imura Y, Honma M, Okuda H, Goda Y. Visualizing the spatial localization of ciclesonide and its metabolites in rat lungs after inhalation of 1- $\mu\text{m}$  aerosol of ciclesonide by desorption electrospray ionization-time of flight mass spectrometry imaging, *Int J Pharm.* 2021 Feb 15;595:120241. doi: 10.1016/j.ijpharm.2021.120241. Epub 2021 Jan 21.

### 2. 学会発表

高橋 祐次:粉体の吸入剤研究開発を推進する非臨床安全性評価手法の開発、ラウンドテーブルセッション、日本薬剤学会第 36 年会、招待講演(2021.5.14)

山本 栄一、高橋 祐次:吸入剤に係る薬物動態の新規イメージング技術、第 48 回日本毒性学会学術年会、シンポジウム(2021.7.9)

Taquahashi Y, Yamamoto E, makiko Kuwagata M, Saito H and Kitajima S, Development of an inhalation exposure system of a pressurized metered-dose inhaler formulation for small experimental animal and visualizing the spatial localization of an inhalant in rat lungs by mass spectrometry imaging, The 37th Annual Meeting of KSOT/KEMS, Invited

## **G. 知的財産権の出願・登録状況**

### **1. 特許取得**

なし

### **2. 実用新案登録**

なし

### **3. その他**

なし

表 1 群構成

Group	Examinations	N	Necropsy after inhalation exposure		
			Day 0	4W	8W
Control Clean air 6hr/day for 5days	• Lung Burden	9	3	3	3
	• Histopathology(perfusion)	6	2	2	2
	• Immune function	10	0	5	5
	subtotal	25			
NM204 Low concentration Target conc. 10 mg/m <sup>3</sup> 6hr/day for 5days	• Lung Burden	9	3	3	3
	• Histopathology(perfusion)	6	2	2	2
	• Immune function	10	0	5	5
	subtotal	25			
NM204 High concentration Target conc. 30 mg/m <sup>3</sup> 6hr/day for 5days	• Lung Burden	9	3	3	3
	• Histopathology(perfusion)	6	2	2	2
	• Immune function	10	0	5	5
	subtotal	25			

表 2 吸入ばく露実験条件のまとめ

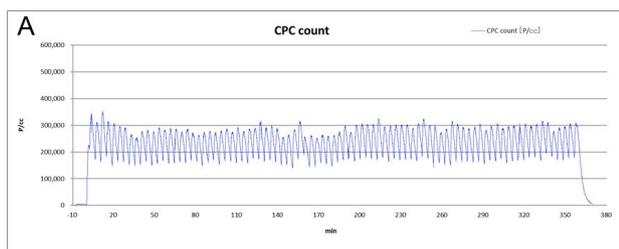
Concentration of NM204 in tert-butyl alcohol (NM204-TBA)	2 mg/mL
Aliquot of NM204-TBA per cartridge	
Low concentration	3.5 mL
High concentration	10.5 mL
Load of NM204 per cartridge as dry-powder	10 mg
Low concentration	7 mg
High concentration	21 mg
Exposure time	6 hr/day for cosecutive 5 days
Injection interval per cartridge	4 min
Number of cartridge used for 6hr exposure	88
Ventilation air volume in main chamber	32.5LPM
Sampling flow rate of CPC	1.5LPM
diration of sampling flow rate of CPC	6 times
Sampling time of MOUDI	40 min

表 3 吸入ばく露実験結果(エアロゾル特性)

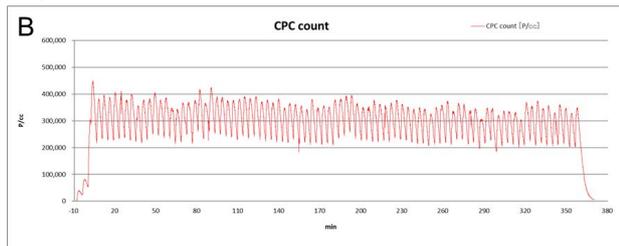
NM204 (6hr/day for consecutive 5 day)	Mean	SD
<b>Mass Concentration (mg/cubic meter)</b>		
Low concentration	10.3	1.1
High concentration	25.6	2.5
<b>Nominal Mass Concentration (mg/cubic meter)</b>		
Low concentration	52.6	
High concentration	157.9	
<b>Aerosolization efficiency (%)</b>		
Low concentration	19.6	2.1
High concentration	16.2	1.6
<b>MMAD (nm, Model125, KANOMAX, N=3)</b>		
Low concentration	1,439	$\sigma$ : 3.2~4.2
High concentration	1,468	$\sigma$ : 3.5~4.0

CPC count over time

Low Concentration

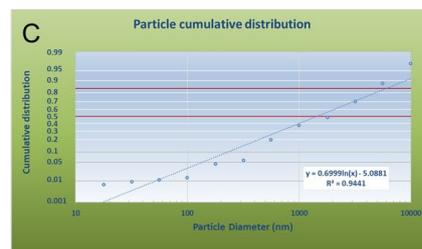


High concentration

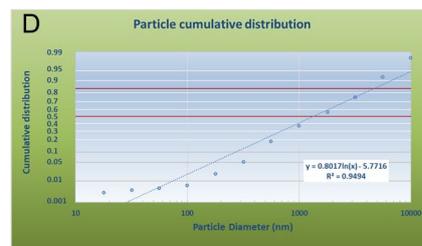


MMAD

Low Concentration

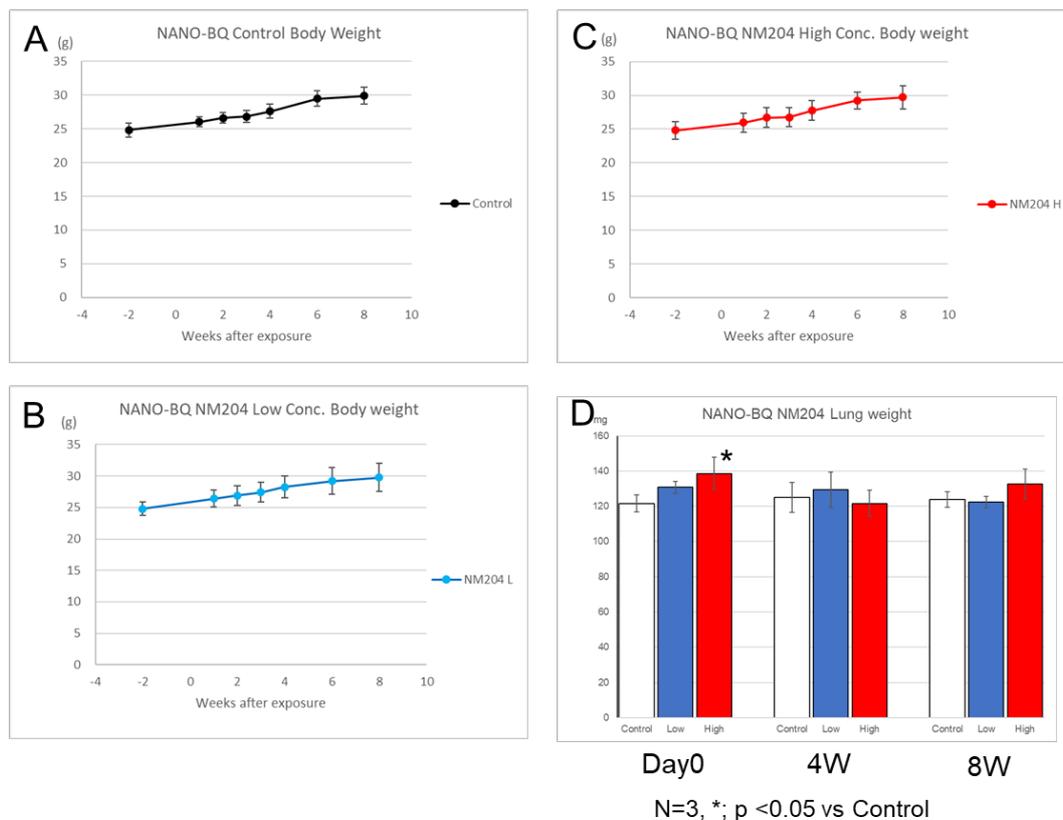


High Concentration



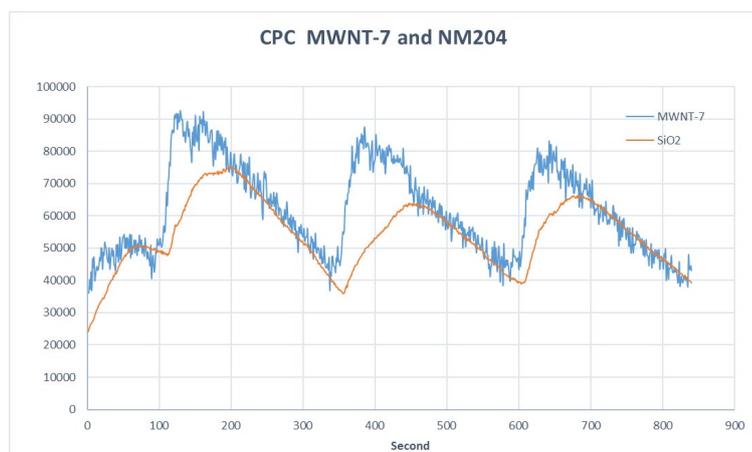
### 図 1 NM204 の CPC カウント及び MMAD 解析グラフ

NM204 の MMAD 解析グラフでは 100nm 付近から急激に立ち上がる傾向にあった。



### 図 2 NM204 ばく露マウスの体重推移及び肺重量

A: 対照群の体重推移、B: 低濃度群の体重推移、C: 高濃度群の体重推移。体重推移には NM204 ばく露の影響は認められなかった。D: 肺重量データ。ばく露終了直後である Day0 において、低濃度群において増加傾向、高濃度群では有意に増加していた。4 週後及び 8 週後では有意な変化は認められなかった。



### 図 3 MWNT-7 と NM204 の CPC データの比較

NM204 のエアロゾル化効率は 20%程度と MWNT-7 の 1/3 程度の値であった。MWNT-7 は、カートリッジから噴射された直後から速やかに CPC カウントが上昇するが、NM204 の濃度上昇は緩やかであった。減衰は同様の推移であった。