

令和3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：ナノマテリアル吸入曝露影響評価のための効率的慢性試験法の開発に関する研究
(21KD2004)

分担研究課題名：ナノマテリアルの慢性吸入曝露手法の改良に関する研究

研究分担者： 横田 理 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 主任研究官

研究協力者： 高橋 祐次 国立医薬品食品衛生研究所 動物管理室長

研究協力者： 菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 客員研究員

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

研究要旨

ナノテクノロジーは、環境、エレクトロニクス、エネルギー、ヘルスケア、情報通信等、様々な分野を切り拓く先端技術として、現代社会に大きな技術革新と利益をもたらしてきた。一方で、様々な種類のナノマテリアルに曝露される機会は増加するため、国民の健康被害防止の観点からナノマテリアルの安全性評価の実施が急務とされている。安全性評価を行う上では、ヒトで想定される曝露経路に即した動物実験によりハザードを同定し、用量作用関係の情報を取得し、そこからヒトに対する毒性の推定と用量相関性の推定を行うことが重要である。しかし、ナノマテリアルに関して最も重要な曝露経路である吸入曝露に関しては、動物実験を遂行する際の技術的障壁が高く、実施例は数少ないという現状にある。

研究分担者らは、吸入毒性試験を実施する際のナノマテリアル特有の問題点を解決する目的で、今までの諸研究からその物性や毒性の情報が利用可能な多層カーボンナノチューブをモデル物質として、高度分散法（Taquann 法）及びそれをエアロゾル化するカートリッジ直噴式ダスト発生装置を独自開発している（Taquann 直噴全身吸入装置）。本分担研究は、先行で実施した2年にわたる間欠吸入曝露試験の研究成果を踏まえ、慢性影響評価の精度を担保しつつ、より効率的な間欠吸入曝露プロトコルの開発を行い、一度に複数の吸入毒性試験を実施可能な基盤体制を整備するものである。今年度は、単回吸入曝露試験をマウスに対して行い、肺負荷量の経時変化を評価することで、間欠吸入曝露試験のプロトコル立案につながる基礎的定量的データの取得を目的とした。

10週齢時に雄マウスに対して、カーボンナノチューブの単回吸入曝露を行った。群構成は、対照群（C群）、低濃度群（L群）、高濃度群（H群）の3群構成とした。質量濃度はL群、H群それぞれ2.8 mg/m³、5.0 mg/m³、MMADは0.96～1.4 μmであった。今後、肺負荷量と体内動態に関する経時変化の基礎データと免疫応答に関するデータとを照合し、迅速かつ効率的な慢性影響評価に資する間欠吸入曝露プロトコルの改良に取り組む。

A. 研究目的

ナノマテリアルの産業応用が急速に進展する中、製造者及び消費者の健康被害の防止のための規制決定、及び、産業界における安全面からの国際競争力保持の観点から、工業的に大量生産される様々な種類のナノマテリアルの安全性評価の実施が急務とされる。

安全性評価を行う上では、ヒトで想定される曝露経路に即した動物実験によりハザードを同定し、用量作用関係の情報を取得し、そこからヒトに対する毒性の推定と用量相関性の推定を行うことが重要である。しかし、ナノマテリアルに関して最も重要な曝露経路である吸入曝露に関しては、動物実験を遂行する際の技術的障壁が高く、実施例は数少ない。

研究分担者らは、吸入毒性試験を実施する際のナノマテリアル特有の問題点を解決する目的で、今までの諸研究からその物性や毒性の情報が利用可能な Mitsui MWNT-7 をモデル物質として、高度分散法 (Taquann 法) 及び、それをエアロゾル化するカートリッジ直噴式ダスト発生装置を独自開発した (Taquann 直噴全身吸入装置 ver.3.0)¹⁾。本装置は、カートリッジ噴射操作が自動化されており、以前のバージョンに比較して操作性に優れ、長時間の曝露が可能となっている。

先行研究では、OECD TG451 により実施された 2 年間連続吸入曝露試験 (Particle Fibre Tox 2016, 13:53)、並びに気管内投与試験との比較を目的として、Taquann 直噴全身吸入装置を用い MWNT-7 の 2 年間の間欠全身曝露吸入試験を実施した。その結果、我々は 2 年間連続吸入曝露試験の結果を概ね間欠曝露試験法で代替可能であることを確

認した。しかし、曝露には依然 2 年間の期間を要することに加え、曝露設備の占有率も高いため、一度に複数のナノマテリアルを用いた吸入曝露による慢性影響評価の実施は困難という問題が残されていた。

本研究では、間欠曝露法の効率をさらに高める吸入曝露プロトコルを開発することを目的とし、今年度は、慢性影響評価に資する間欠吸入曝露プロトコルの立案のために、単回吸入曝露試験を実施し、肺負荷量と体内動態に関する経時的变化の基礎情報を得ることを目的とした。

B. 研究方法

B-1. NT-7 の高分散化処理 (Taquann 法)

これまで、多層カーボンナノチューブ (MWCNT) は三井物産から提供された MWNT-7 を使用して研究を進めてきたが、保有する検体をほぼ使い切った状況であること、また、三井物産では MWNT-7 の生産はすでに終了していることから、MWNT-7 と同様の製造法で生産された NT-7 をナノテクノロジービジネス推進協議会より入手し、今後の実験における MWCNT のベンチマーク物質として使用することとした。

NT-7 原末をガラス製ビーカー中で tert-butyl alcohol (TB) に懸濁した。氷冷化で TB をシャーベット状にして金属製スパー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、発信周波数 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 NT-7 の乾燥検体 (T-NT-7#53) を得た (図 1)。

B-2. マウス全身曝露吸入実験

1) 動物

(1) 単回吸入曝露試験 (Part1)

C57BL/6NcrSLC (日本エスエルシー株式会社) 雄性マウスを 9 週齢で購入し 1 週間の馴化期間を経たのち 10 週齢にて T-NT-7#53 を 1 日 6 時間、単回吸入曝露した。このマウスは当研究部において、これまでの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) 単回吸入曝露試験 (Part2)

NT-7 の体内動態を評価するため、遺伝学的にリンパ管内皮細胞と血管内皮細胞を蛍光標識したダブルトランスジェニックマウス (Prox1-GFP/Cdh5-BAC-CreERT2-ROSA-lox-stop-lox-tdTomato-SMA-GFP) に対して、T-NT-7#53 を 1 日 6 時間、単回吸入曝露した。このマウスは、リンパ管内皮細胞が GFP (緑) で、血管内皮細胞が tdTomato (赤) で蛍光標識されたマウスで、NT-7 の体内動態評価に資する研究リソースとして東京医科歯科大学の渡部徹郎の提供により当研究所に 8 週齢にて搬入され、2 週間の馴化期間を経て 10 週齢で単回吸入曝露試験に供した。(詳細は、研究分担者東京医科歯科大学・教授 渡部徹郎の項を参照)。

2) 飼育条件

飼育ケージは、ポリカーボネー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; $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、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、また、飲水は給水用寒天 (日本エスエルシー株式会社) を自由摂取させた。体重測定を週 1 回実施した。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

(1) 単回吸入曝露試験 (Part1)

対照群、T-NT-7#53 低濃度群 (目標濃度 2.5 mg/m^3)、T-NT-7#53 高濃度群 (目標濃度 5.0 mg/m^3) の 3 群構成とした。各群 50 匹のマウスを使用し、6 時間 (10:00 ~ 16:00) の吸入曝露を実施した (表 1)。曝露チャンバーはマウスを 25 匹収容するデザインであるため、各群を二つのサブグループ (Sub-Group A, B) に分けて曝露を実施した。

(2) 単回吸入曝露試験 (Part2)

対照群、T-NT-7#53 曝露群 (目標濃度 5.0 mg/m^3) の 2 群構成とした。対照群 5 匹、曝露群 25 匹のマウスを使用し、6 時間 (10:00 ~ 16:00) の吸入曝露を実施した (表 2)。

4) ダスト発生装置

NT-7 のエアロゾル化は、既設の Taquann 直噴全身吸入装置 Ver3.0 を使用した (図 2)。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。

カートリッジへの検体の充填はT-NT-7#53をTBに0.08 mg/mLの濃度で再度懸濁し、低濃度群では10 mL、高濃度群では20 mLの容量を各カートリッジに分注し、直ちに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真空ポンプで減圧し、TBを昇華除去することで達成した。これにより、T-NT-7#53を低濃度群では0.8 mg/カートリッジ、高濃度群では1.6 mg/カートリッジを充填した。

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、袋を隔て外気へ圧を逃がす設計となっている。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0.48 Mpa、噴射時

間は0.2秒、1カートリッジ当たり0.3秒間隔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2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。6時間の吸入曝露実験において、合計89本のカートリッジを使用した。

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6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(共同開発 柴田科学株式会社、特許所得済)。メインチャンバーの気積は179 Lである。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いる。動物は、メインチャンバー内に設置した円形一段のステンレス金網製のケージを個別に仕切り収容する。ケージには給水・給餌装置がないため、6時間曝露時の動物への負荷軽減のため給水用寒天(日本エスエルシー株式会社)をケージ内に留置した。

6) 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^3) 測定を並行して行った。

相対濃度測定は、対応濃度 3×10^5 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: $1.5 \text{ L}/\text{min}$ 、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の測定において、 1×10^3 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、6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 $10 \text{ }\mu\text{m}$ 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。

質量濃度測定は、ローボリウムサンプラー (080050-155、 $\phi 55 \text{ mm}$ 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、 $\phi 55 \text{ mm}$ 、捕集効率 (DOP $0.3 \text{ }\mu\text{m}$): 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 $1.5 \text{ L}/\text{min}$ の流量で曝露時間の6時間において、 $0 \sim 1 \text{ hr}$ 、 $2 \sim 3 \text{ hr}$ および $4 \sim 5 \text{ hr}$ の3回実施した。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 $1.5 \text{ L}/\text{min} \times 60 \text{ min} = 90 \text{ L}$ から 1 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) エアロゾルの粒度分布

エアロゾルの粒度分布は、Micro-Orifice Uniform Deposit Impactors (MOUDI) を用いた Mass Median Aerodynamic Diameter (MMAD) である。 $10 \text{ L}/\text{min}$ 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; $10 \text{ }\mu\text{m}$ 、No.2; $5.6 \text{ }\mu\text{m}$ 、No.3; $3.2 \text{ }\mu\text{m}$ 、No.4; $1.8 \text{ }\mu\text{m}$ 、No.5; $1.0 \text{ }\mu\text{m}$ 、No.6; $0.56 \text{ }\mu\text{m}$ 、No.7; $0.32 \text{ }\mu\text{m}$ 、No.8; $0.1 \text{ }\mu\text{m}$ 、No.9; $0.10 \text{ }\mu\text{m}$ 、No.10; $0.056 \text{ }\mu\text{m}$ 、No.11; $0.032 \text{ }\mu\text{m}$ 、No.12; $0.018 \text{ }\mu\text{m}$ 、No.13; $0.01 \text{ }\mu\text{m}$) に導いた。

吸引時間は30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、MWCNT回収後に測定し、その差分を検体質量とした (図3)。

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から、低濃度群と高濃度群を交互に実施した。

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、その運用規則に従い実施しており、暴露・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) T-NT-7#53 の単回吸入曝露試験 (Part1)

NT-7原末の外観はMWNT-7に比較して嵩が低く、また平均繊維長は $4.4 \pm 3.4 \mu\text{m}$ であり、MWNT-7 (平均繊維長約 $7 \mu\text{m}$) に比較して短かい値を示した (図4)。Taquann法処理したNT-7 (T-NT-7#53) の繊維長は $4.7 \pm 3.4 \mu\text{m}$ であり、平均繊維長にはTaquann処理による影響は認められなかった (図4)。Taquann全身曝露吸入装置 ver 3.0を用いたT-NT-7#53のエアロゾル濃度設定試験における質量濃度は、低濃度は 0.5 mg/カートリッジ で 1.5 mg/m^3 (エアロゾル効率40%)、高濃度は 1.0 mg/カートリッジ で 3.1 mg/m^3 (エアロゾル効率44%) となった。この結果を踏まえ、カートリッジあたりのT-NT-7の量を1.6倍量増やしたところ、低濃度は 2.8 mg/m^3 (エアロゾル効率46%)、高濃度は 6.2 mg/m^3 (エアロゾル効率47%) となった。MMADの2回のデータは、 $0.90 \mu\text{m}$ ($\sigma\text{g } 5.82$) と $1.11 \mu\text{m}$ ($\sigma\text{g } 5.64$) を示した。なお、エアロゾル化したT-NT7#53の繊維長は $5.6 \pm 3.5 \mu\text{m}$ であった (図4)。

次に、T-NT-7#53低濃度群の全身曝露吸入試験を実施した。Sub-group AとBで実施

した2回の平均質量濃度は 2.8 mg/m^3 (エアロゾル効率42%)、高濃度群では 5.0 mg/m^3 (エアロゾル効率42%) となった。MMADは低濃度群において $0.96 \mu\text{m}$ ($\sigma\text{g: } 7.4$) と $1.08 \mu\text{m}$ ($\sigma\text{g: } 6.8$)、高濃度群において $1.4 \mu\text{m}$ ($\sigma\text{g: } 5.0$) と $1.3 \mu\text{m}$ ($\sigma\text{g: } 5.1$) の値を示した。

一方、気管支肺胞洗浄液 (BALF) 細胞の観察を行った結果、曝露直後 day1 ではL群、H群ともに好中球が観察された。また、L群、H群とも曝露から時間が経過するにつれて、肺胞マクロファージの貪食割合が減少傾向にあることを明らかにした (図5)。

2) T-NT-7#53 の単回吸入曝露試験 (Part2)

T-NT-7#53曝露群の全身曝露吸入試験の質量濃度は 4.9 mg/m^3 (エアロゾル効率40%) となった。MMADは $1.2 \mu\text{m}$ ($\sigma\text{g: } 5.7$) の値を示した。

D. 考察

本分担研究で使用した Taquann 全身曝露吸入装置 ver 3.0 は、汎用性が高く、少量の検体で全身曝露吸入試験が可能であることが特徴である。実際に、カートリッジ操作を自動化する技術を導入し、OECD ガイドラインで規定されている 6 時間の曝露実験を可能とし、安定的なデータを取得した。

本分担研究は、先行研究で実施した MWCNT の間欠吸入曝露をより効率的に実施することを目的とし、肺への負荷量を考慮した間欠吸入曝露プロトコルを提案し、慢性影響評価を進める。今年度はまず、単回吸入曝露試験を実施し、肺への負荷量の経時変化に関する基礎データを取得し、また、肺組織の免疫応答や病理組織学的解析との結果とを合わせて、間欠曝露のプロトコルの立案を行う。肺負荷量の分析に先立ち、回収した

BALF 細胞から肺胞マクロファージへの取り込みについて観察した結果、吸入曝露から時間が経過するにつれて、NT-7 を貪食した肺胞マクロファージの数は減少傾向を示したため、今後実施予定の肺負荷量についても、曝露から時間経過するにつれて減少すると予想される。

単回吸入曝露試験における質量濃度測定の結果から、目標濃度を概ね達成し、エアロゾル効率も 40-42%とエアロゾル濃度設定試験(動物なし)におけるそれよりも低値を示したが、これは動物被毛への NT-7 の吸着によるロスが考えられた。この結果は、先行研究における MWNT-7 と同様の結果であり、Taquann 吸入曝露装置の精度の高さを示した。MMAD に関しては、OECD TG451 により実施された先行試験 (Particle Fibre Tox 2016) における MMAD (1.3~1.4 μm 、 σg 2.6~3.0) とほぼ同等の結果を示した。これらの結果からも Taquann 吸入曝露装置の有用性を確認した。

本分担研究の遂行により、ナノマテリアルの吸入曝露による慢性影響評価において課題とされていた「希少な検体」を「少量」で吸入曝露することを可能とし、今後、本成果をもとに間欠曝露プロトコルの効率化を提案することで「一度に複数検体」を吸入曝露することことも可能となる。

E. 結論

Taquann 全身曝露吸入装置 Ver.3.0 を使用し、T-NT-7#53 をマウスに 6 時間の単回全身曝露吸入を実施した。カートリッジ操作の自動化により、6 時間の吸入曝露実験が可能となり、ナノマテリアルの毒性評価の効率化と、OECD ガイドラインに準拠した標準的な吸入曝露実験への適用が期待される。今後、単回

吸入曝露による肺負荷量の時間経過を定量的に評価し、適切な間欠吸入曝露試験プロトコルを提案する。

謝辞: 本研究の遂行にあたり、技術的支援をいただいた、辻昌貴氏、森田絃一氏、菅康佑氏、相田麻子氏に深く感謝する。

F. 参考文献

1. Taquahashi Y, Ogawa Y, Takagi A, Tsuji M, Morita K, Kanno J. Improved dispersion method of multi-wall carbon nanotube for inhalation toxicity studies of experimental animals. *J Toxicol Sci.* 2013;38(4):619-28.
2. Kasai T, Umeda Y, Ohnishi M, Mine T, Kondo H, Takeuchi T, Matsumoto M, Fukushima S. Lung carcinogenicity of inhaled multi-walled carbon nanotube in rats. *Part Fibre Toxicol.* 2016 Oct 13;13(1):53.

G. 研究発表

1. 論文発表

Wakayama T, Yokota S, Noguchi K, Sugawara T, Sonoda K, Wanta A: Quantitative Evaluation of Spermatogenesis by Histochemistry, *Histochemistry and Cell Biology.* 157(3):287-295. (2022)
[doi.10.1007/s00418-022-02080-6](https://doi.org/10.1007/s00418-022-02080-6)

Yokota S: Evaluation of sperm epigenome as a molecular index of reproductive toxicity for elucidating the mechanisms of transgenerational inheritance, *BIO Clinica.* 37(1): 41-47. (2022) Invited

Sekine N, Yokota S (Co-First), Oshio S: Sperm morphology is different in two common mouse strains, *BPB Reports.* 4: 162-165. (2021) [doi. 10.1248/bpbreports.4.5_162](https://doi.org/10.1248/bpbreports.4.5_162)

Yokota S, Takeda K, Oshio S: Spatio-temporal small non-coding RNAs expressed in the germline as an early biomarker of testicular toxicity and transgenerational effects

caused by prenatal exposure to nanosized particles, *Front. Toxicol.* 3: 32. (2021)
doi.10.3389/ftox.2021.691070

Yokota S, Sekine N, Wakayama T, Oshio S: Impact of chronic vitamin A excess on sperm morphogenesis in mice, *Andrology.* 9(5):1579–1592. (2021)
doi.10.1111/andr.13013

2. 学会発表

Taquahashi Y, Yokota S, Morita K, Tsuji M, Suga K, Kuwagata M, Hojyo M, Hirose A, Kanno J: Preliminary report of the two-year, every 4-week-interval intermittent whole body inhalation study of the multi-walled carbon nanotube in male mice, the 61st Annual Meeting of the Society of Toxicology (2022.3.27–31), Poster Virtual.

横田理、河上強志、久保田領志、三浦伸彦、北嶋聡: In vivo 毒性試験のための二酸化チタン分散方法の検討、メタルバイオサイエンス研究会 2021 (2021.10.28)、Web 開催、ポスター

宮澤正幸、横田理、吉岡弘毅、三浦伸彦: 薬毒物の感受性時刻差、メタルバイオサイエンス研究会 2021 (2021.10.27)、Web 開催、ポスター

三浦伸彦、宮澤正幸、横田理、吉岡弘毅: 毒性発現強度の時刻差を利用した毒性発現機構解明、メタルバイオサイエンス研究会 2021 (2021.10.27)、Web 開催、シンポジウム、口演

Horibata K, Hojo M, Yokota S, Taquahashi Y, Kobayashi N, Takasawa H, Hamada S, Sugiyama K, Honma M: In Vivo Genotoxicity Assessment Of Multi-Walled Carbon Nanotubes Using The Optimized Lung Micronucleus Assay, The Environmental Mutagenesis and Genomics Society 2021 Annual meeting (2021.9.22–

25), Poster Virtual.

横田理、武田健: ディーゼル排気由来超微小粒子の胎児期曝露が児の海馬神経活動に影響を及ぼし、学習・記憶障害を引き起こす、第 61 回日本先天異常学会学術集会 (2021.8.7)、Web 開催、ポスター

横田理、関根尚、北嶋聡、押尾茂: マウス精子形態形成へのビタミン A 過剰の関与、第 48 回日本毒性学会学術年会 (2021.7.9)、Web 開催、口頭

宮澤正幸、照井楓香、桂川真一、香川(田中)聡子、河村伊久雄、横田理、吉岡弘毅、三浦伸彦: 6-メルカプトプリンに対するマウスの感受性時刻差、第 48 回日本毒性学会学術年会 (2021.7.9)、Web 開催、口頭

前野愛、北條幹、坂本義光、湯澤勝廣、長谷川悠子、長澤明道、生嶋清美、平松恭子、海鉦藤文、山本行男、安藤弘、田中和良、鈴木仁、猪又明子、守安貴子、高橋祐次、横田理、小林憲弘、広瀬明彦、中江大: 多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の2年間ラット気管内反復投与試験における投与器具の違いによる毒性の比較: 1年経過時点での報告、第 48 回日本毒性学会学術年会 (2021.7)、Web 開催、ポスター

横田理、若山友彦、押尾茂: レチノイド過剰により生じるマウス精子形成のステージ出現頻度の変化、第 40 回アンドロロジー学会 (2021.6.12)、Web 開催、口頭

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他

表1 単回吸入曝露実験 (Part1) の群構成

Group	Examinations	N	Necropsy after inhalation exposure				
			Day0	Day1	Day7	Day14	Day28
Control 0 mg/m ³ 6hr/D	•Lung Burden	18	6	3	3	3	3
	•Histopathology(perfusion)	10	0	3	2	2	3
	•Immune function						
	BALF	22	0	6	5	5	6
	Pulmonary interstitium mRNA Spleen, Lymph node						
Subtotal		50	Consist of two sub-groups, A&B				
T-NT-7 #53um L 2.5 mg/m ³ 6hr/D	•Lung Burden	18	6	3	3	3	3
	•Histopathology(perfusion)	10	0	3	2	2	3
	•Immune function						
	BALF	22	0	6	5	5	6
	Pulmonary interstitium mRNA Spleen, Lymph node						
Subtotal		50	Consist of two sub-groups, A&B				
T-NT-7 #53um H 5.0 mg/m ³ 6hr/D	•Lung Burden	18	6	3	3	3	3
	•Histopathology(perfusion)	10	0	3	2	2	3
	•Immune function						
	BALF	22	0	6	5	5	6
	Pulmonary interstitium mRNA Spleen, Lymph node						
Subtotal		50	Consist of two sub-groups, A&B				
Total number of animals		150					

表2 単回吸入曝露実験 (Part2) の群構成

Group	Examinations	N	Necropsy after inhalation exposure				
			Day0	Day1	Day3	Day6	Day14
Control 0 mg/m ³ 6hr/D	•Lung Burden	0	—	—	—	—	—
	•Histopathology(perfusion)	5	1	1	1	1	1
	•Immune function						
	BALF	0	—	—	—	—	—
	Pulmonary interstitium mRNA Spleen, Lymph node						
Subtotal		5					
T-NT-7 #53um H 5.0 mg/m ³ 6hr/D	•Lung Burden	0	—	—	—	—	—
	•Histopathology(perfusion)	25	5	5	5	5	5
	•Immune function						
	BALF	0	—	—	—	—	—
	Pulmonary interstitium mRNA Spleen, Lymph node						
Subtotal		25					
Total number of animals		30					

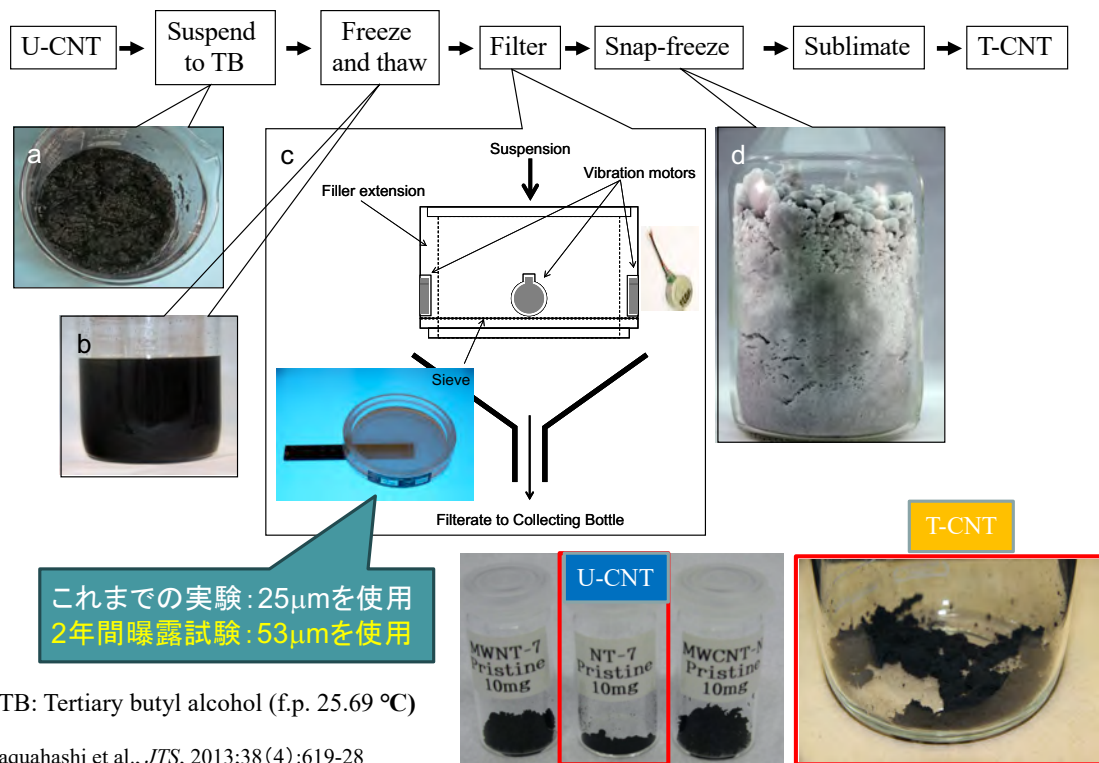


図1 Taquann法の概要

Taquann法はこれまで目開き 25 μ m の金属製フィルターを用いているが、H30年度からの事業では、先行試験(Particle Fibre Tox 2016)で用いられたものと同じ目開き 53 μ m の金属製フィルターを用いた。

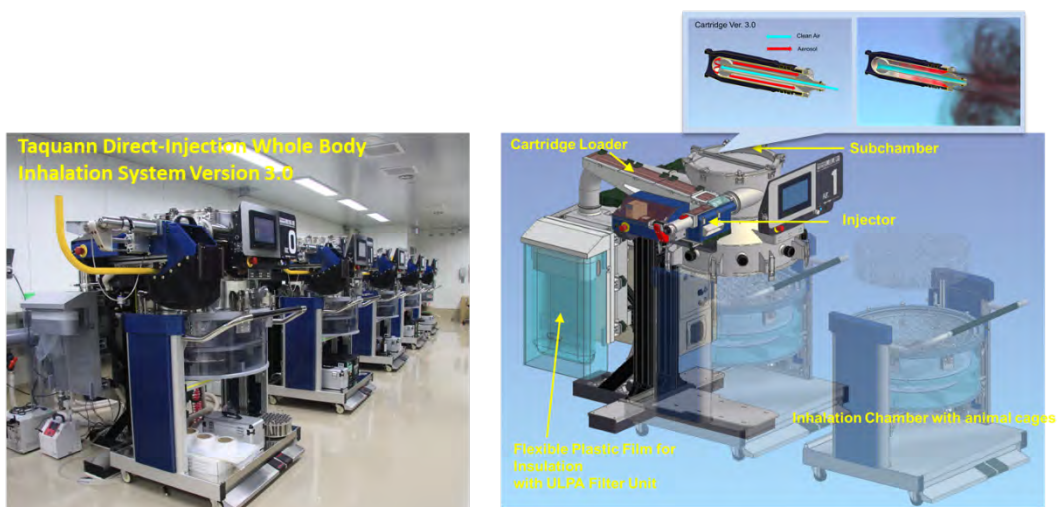


図2 Taquann 直噴全身吸入装置 Ver3.0

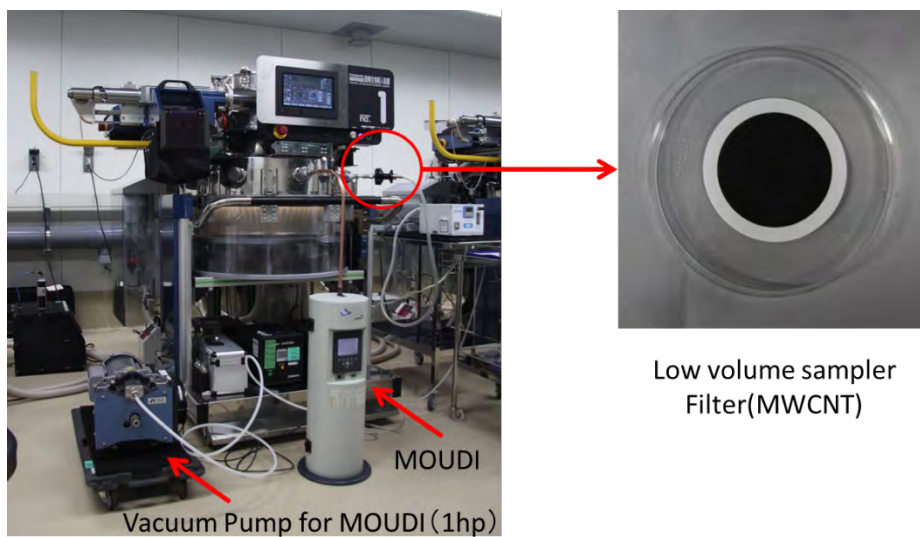


図3 エアロゾルモニタリングの概要

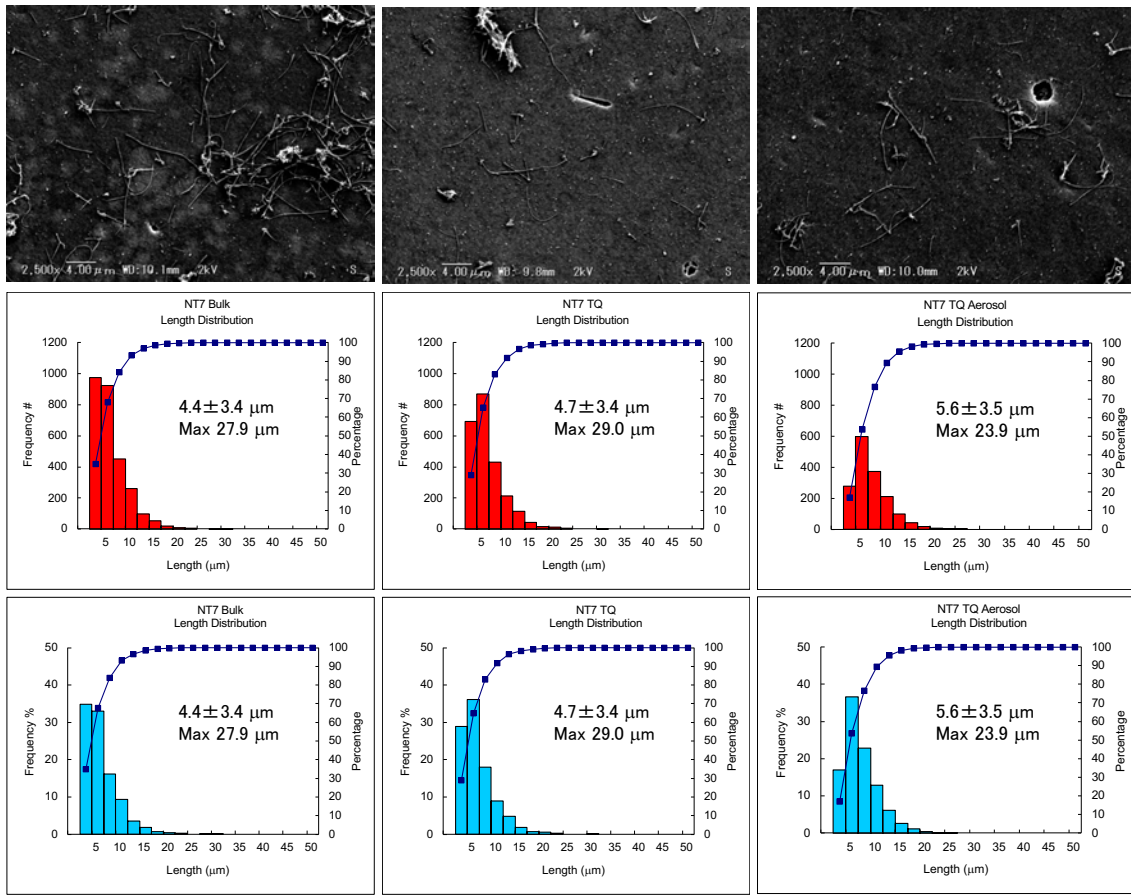


図4 NT-7の繊維長分布

走査型電子顕微鏡 (SEM) を用い、NT-7 の繊維長分布を評価した。(左)NT-7 原末 (NT-7 Bulk) の繊維長の平均長さは $4.4 \pm 3.4 \mu\text{m}$ 、(中央) Taquann 処理 NT-7 (NT-7 TQ) の繊維長の平均長さは $4.7 \pm 3.4 \mu\text{m}$ 、(右) Taquann 処理検体をエアロゾル化した T-NT7 (NT-7 TQ aerosol) の繊維長の平均長さは $5.6 \pm 3.5 \mu\text{m}$ となり、Taquann 処理を行っても NT-7 原末の繊維長に影響を及ぼさないことが示された。

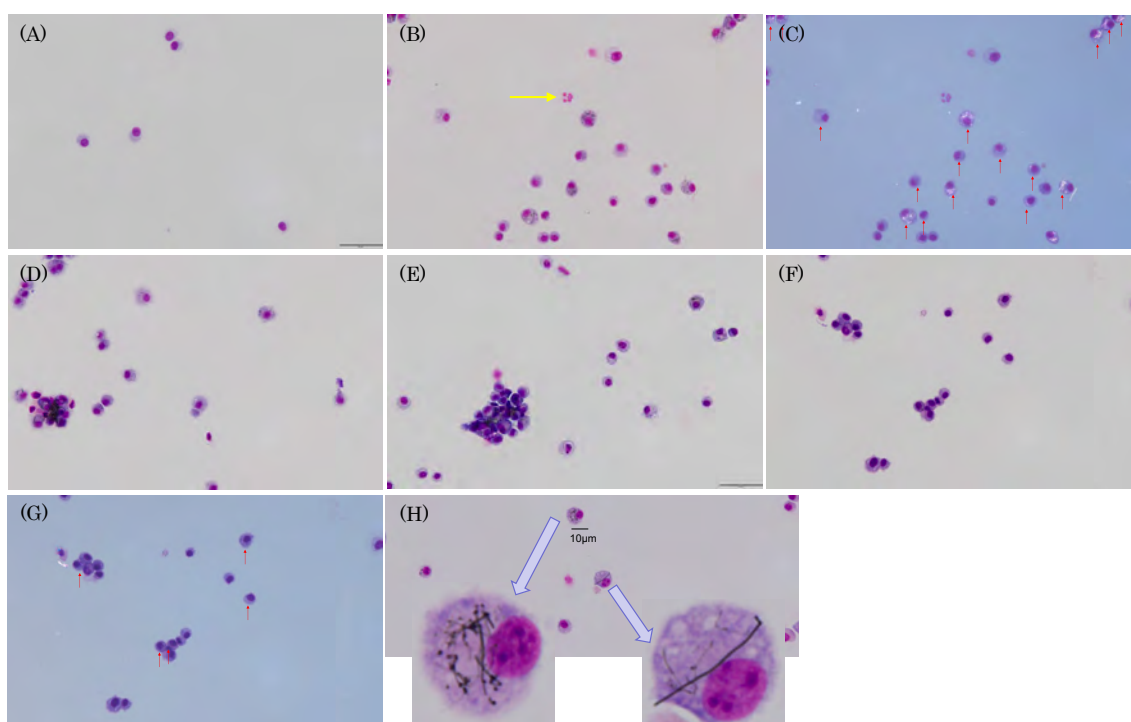


図5 気管支肺胞洗浄液(BALF)中に含まれる細胞へのNT-7の取り込み

回収したBALFは、Cytospin 3 (Thermo Fisher Scientific)を用いて、700 rpm、5分間の遠心を行い、細胞塗抹標本を作製した。冷風乾燥、メタノール固定した後、pH6.4リン酸緩衝液にて洗浄した。3%メイグリユンワルド染色液にて染色した後、5%ギムザ染色液にて染色し、pH6.4リン酸緩衝液で洗浄し、乾燥、封入を行った。(B-G)NT-7の吸入曝露から時間経過するにつれ、肺胞マクロファージの貪食割合が減少していることが明らかとなった。(C, G)NT-7の貪食像は偏光をかけることで確認することが可能である。(A)ControlのBALF細胞、(B)曝露後1日経過したBALF細胞、(C)曝露後1日経過したBALF細胞の偏光像、(D)曝露後7日経過したBALF細胞、(E)曝露後14日経過したBALF細胞、(F)曝露後28日経過したBALF細胞、(G)曝露後28日経過したBALF細胞の偏光像、(H)NT-7を貪食した肺胞マクロファージの拡大像、黄矢印:好中球、赤矢印:NT-7を貪食した肺胞マクロファージ