

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4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
研究協力者:	森田紘一	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部
研究協力者:	辻 昌貴	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部
研究協力者:	菅 康佑	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部
研究協力者:	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(NM201、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;7.8±1.8 mg/m<sup>3</sup>、高濃度群;33.6±2.4 mg/m<sup>3</sup>、MMAD は低濃度群;1,658 nm(σg:3.4~4.1)、高濃度群;2,030 nm(σg:3.4~4.6)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た。NM201 の目視観察による性状は、昨年度実施した NM204 に比較して、粒度が荒く嵩高い傾向にあるためエアロゾル化の難易度は高い検体であるが、Taquann システムを用いることにより NM204 と同様のエアロゾル特性にて動物に曝露することが可能であった。

## 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>-NM201-JRCNM02001)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°C、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、シェファードシヤック(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。

NM201 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 15.75

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

動物を収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収容する。マウスは最大 25 匹収容が可能である。ばく露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。メインチャンバーの上部は円錐状となっており、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( $\text{mg}/\text{m}^3$ )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、 $\phi 55$  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、 $\phi 55$ mm、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  $1.5 \text{ L}/\text{min} \times 120\text{min} = 180 \text{ L}$  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学的中位径測定 Mass Median Aerodynamic Diameter (MMAD)

エアロゾルの空気動学的中位径測定は、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回繰り返し、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 $\pm$ 2.5 mg/m<sup>3</sup>(平均値 $\pm$ SD)であった。3回の測定を行ったMMADは低濃度群;1,439 nm( $\sigma$ :3.2~4.2)、高濃度群;1,468 nm( $\sigma$ :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 $\pm$ 4.9mg、低濃度群130.8 $\pm$ 3.4 mg、高濃度群138.6 $\pm$ 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

本分担研究で用いたナノシリカ NM201 は、昨年度の実験で使用した NM204 に比較し、目視観察において粒度が荒く嵩高い性状を示す(図 3)。粒子が砂に近い性質であるため、エアロゾル化に際して沈降速度が速く濃度の維持が難しいことが想定される。しかしながら、Taquann 法による高分散処理と Taquann 直噴全身吸入装置 Ver 3.0 を組み合わせることにより NM204 と同様の曝露が可能であった。する分散性が良好であ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 は低濃度群では約 1.7  $\mu\text{m}$ 、高濃度群では約 2.0  $\mu\text{m}$  であり肺胞領域まで到達可能とされる MMAD < 3 $\mu\text{m}$  を達成している。エアロゾルの粒径分布の指標となる  $\sigma\text{g}$  は 3.4~4.6 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、NM201 も NM204 と同様に、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。エアロゾル化効率は、低濃度群では約 15%、高濃度群では約 21%であり、原因は不明であるが、高濃度群の方が効率よくエアロゾル化することが可能であった。

NM201 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 週間後及び 8 週間後では有意な変化は認められなかった。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、NM201 の影響を明らかにする計画である。

#### E. 結論

NM201 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; 7.8 $\pm$ 1.8 mg/m<sup>3</sup>、高濃度群; 33.6 $\pm$ 2.4 mg/m<sup>3</sup> を達成した。MMAD は低濃度群、高濃度群ともに 3  $\mu\text{m}$  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 週間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

1. Horibata K, Takasawa H, Hojo M, Taquahashi Y, Shigano M, Yokota S, Kobayashi N, Sugiyama KI, Honma M, Hamada S. In vivo genotoxicity assessment of a multiwalled carbon nanotube in a mouse ex vivo culture. Genes Environ. 2022 Oct 19;44(1):24.
2. 鶴岡秀志、高橋祐次、カーボンナノチューブのヘルスケア応用、2022, Nanofiber 13(1,2) 19-24
3. Tsunematsu T, Arakaki R, Sato M, Saito M, Otsuka K, Furukawa Y, Taquahashi Y, Kanno J, Ishimaru N., Exposure to Multiwall Carbon Nanotubes Promotes Fibrous Proliferation by Production of Matrix Metalloproteinase-12 via NF- $\kappa$ B Activation in Chronic Peritonitis., Am J Pathol. 2022 Aug 10:S0002-9440(22)00240-1.
4. 高橋祐次、齊藤洋克、栗形麻樹子、北嶋聡、加圧式定量噴霧式吸入器 (pMDI) 製剤のげっ歯類を対象とした鼻部ばく露装置の開発, Jpn. J. Clin.Toxicol. 2022 35(3) 255-259

##### 2. 学会発表

1. Taquahashi Y, Yokota S, Tsuji M, Morita K, Suga K, Hojyo M, Hirose A, Kanno J, Preliminary report on a two-year, 4-week-interval intermittent whole body inhalation study of the multi-walled carbon nanotube (MWNT-7) in male mice, SOT 2023 Poster (2023.3.22)
2. Taquahashi Y, Tsuruoka S, Okubo Y Tanemura K, Aisaki K, Kitajima S, Modernization of acute toxicity testing with integrated assessment of multiple vital signs as endpoints, 第 96 回日本薬理学会学術年会シンポジウム (2022.12.2)

3. 高橋祐次、DPI 製品化の課題：粉体の吸入剤研究開発における有効性・薬物動態・安全性の評価を推進する非臨床評価手法の開発、第 13 回粉末吸入剤研究会シンポジウム(2022.11.24)
4. Taquahashi Y, Non-clinical Safety Issue in Pediatric Drug Development: What issues are to be considered from now on? 第 49 回日本毒性学会学術年会 シンポジウム(2022.7.2)
5. 高橋 祐次、動物を用いない新たなリスク評価アプローチ法の開発：In vivo 毒性試験の経験に基づく NGRA による安全性評価手法に関する考察、日本動物実験代替法学会 第 35 回大会 (2022.11.20)
6. Taquahashi Y, Yokota S, Hirose A, Kanno J Streamline of chronic inhalation exposure study protocol for nanomaterial, 第 49 回日本毒性学会学術年会 シンポジウム(2022.6.30)
7. Taquahashi Y, Tsuruoka S, Aisaki K, Okubo Y Kitajima S, An approach to prediction of mortality in acute toxicity studies by integrated assessment of vital signs, 第 49 回日本毒性学会学術年会 シンポジウム(2022.6.30)

## 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

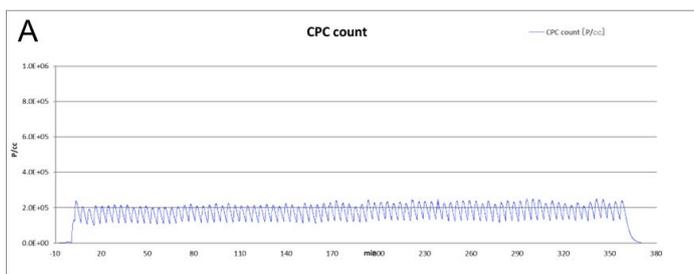
Concentration of NM201 in tert-butyl alcohol (NM201-TBA)	2 mg/mL
Aliquot of NM201-TBA per cartridge	
Low concentration	3.5 mL
High concentration	15.75 mL
Load of NM201 per cartridge as dry-powder	
Low concentration	7 mg
High concentration	31 mg
Exposure time	6 hr/day for cosecutive 5 days
Injection interval 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)

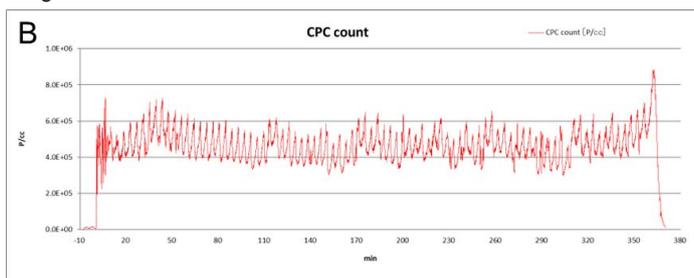
NM201 (6hr/day for consecutive 5 day)	Mean	SD
<b>Mass Concentration (mg/cubic meter)</b>		
Low concentration	7.8	1.8
High concentration	33.6	2.4
<b>Nominal Mass Concentration (mg/cubic meter)</b>		
Low concentration	52.6	
High concentration	157.9	
<b>Aerosolization efficiency (%)</b>		
Low concentration	14.8	3.5
High concentration	21.3	1.5
<b>MMAD (nm, Model125, KANOMAX, N=3)</b>		
Low concentration	1,658	$\sigma_g$ : 3.4~4.1
High concentration	2,030	$\sigma_g$ : 3.4~4.6

## NM201 CPC count over time

Low Concentration

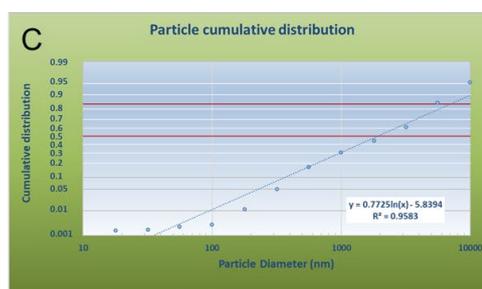


High concentration



## MMAD

Low Concentration



High Concentration

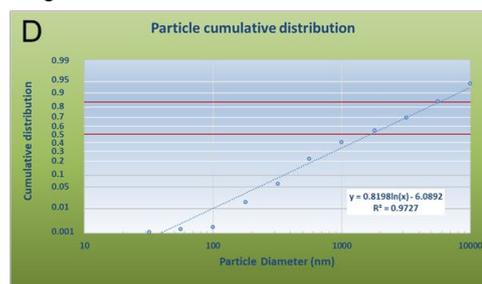
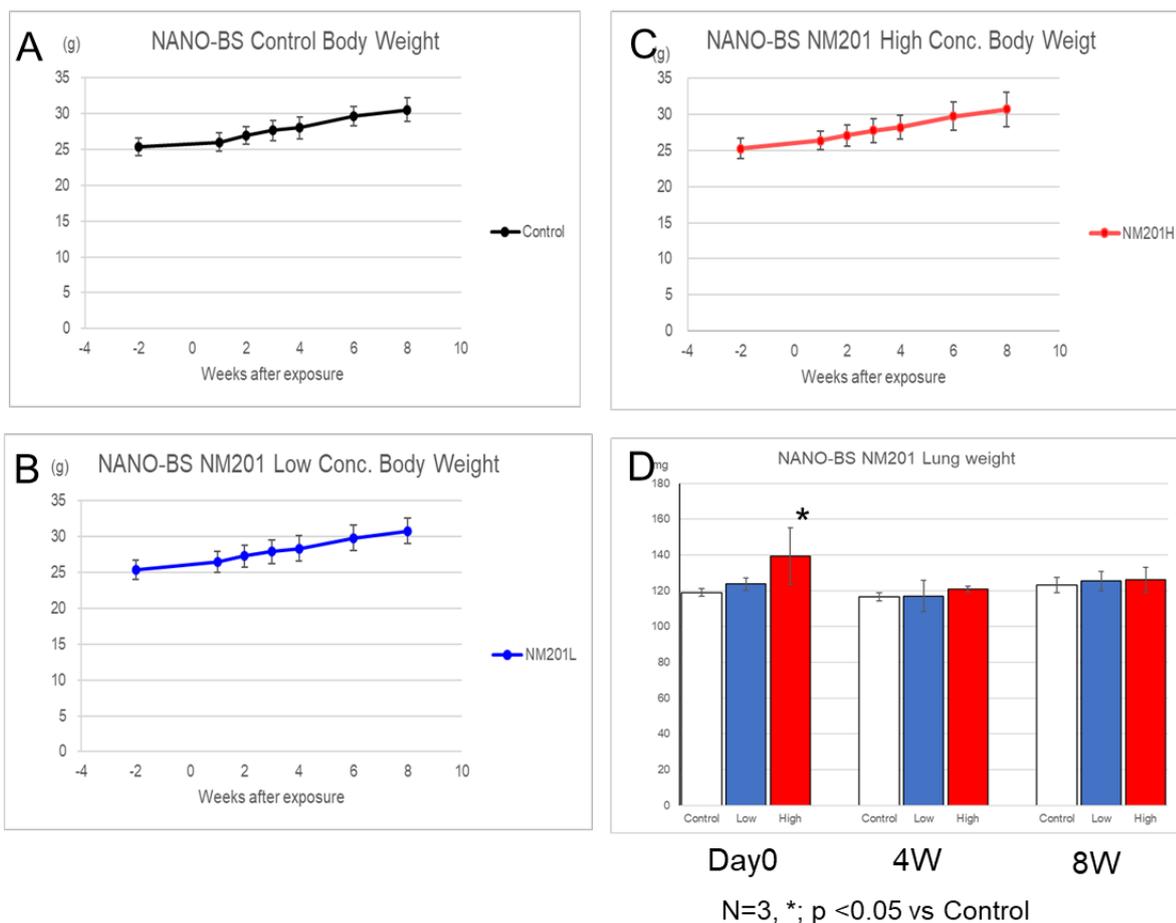


図 1 NM201 の CPC カウント及び MMAD 解析グラフ

NM201 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 NM201 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 NM201 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 NM201 と NM204 の目視による性状**

NM201 は NM204 に比較して粒度が荒く、嵩高い傾向にある(検体の量は両者ともに 20mg)。