

令和4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 毒性部 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）。本分担研究の目的は、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ことである。

今年度は、昨年度実施した単回吸入曝露試験の肺負荷量の経時変化に関する解析、ならびに、これらの結果をもとに間欠吸入曝露試験を実施した。7週齢時より、週に1回6時間、13週にわたって、雄マウスに対して、カーボンナノチューブの間欠吸入曝露を行った。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2.7 mg/m³、4.7 mg/m³、MMADはL、H群ともに1.1 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、昨年度実施した単回吸入曝露試験の肺負荷量と体内動態に関する経時的变化を明らかにすること、また、肺負荷量を考慮した間欠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と慢性影響評価に資する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) はナノテクノロジービジネス推進協議会より入手した NT-7 を MWCNT のベンチマーク物質として使用した。

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

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) 間欠吸入曝露試験

C57BL/6NcrSLC (日本エスエルシー株式会社) 雄性マウスを 5 週齢で購入し 2 週間の馴化期間を経たのち 7 週齢にて T-NT-7#53 を 1 週間に 1 回、1 日 6 時間、13 週にわたって合計 13 回の間欠吸入曝露を実施した。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。

(3) 間欠吸入曝露試験(リンパ管マウス用プレ試験)

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 週間に 1 回 (1 日 6 時間: 10:00~16:00)、3 週にわたって合計 3 回の間欠吸入曝露試験を実施した。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 週齢より吸入曝露試験を実施した。(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 OUTER ケージと PET 製 INNER 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; $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、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

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) 間欠吸入曝露試験

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、1 週間に 1 回、1 日 6 時間 (10:00~16:00)、13 週にわたって合計 13 回の間欠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/m³)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 L/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 μm 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、 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 μm): 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の流量で曝露時間の6時間において、0~1hr、2~3hrおよび4~5hr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 L/min \times 60min = 90 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 L/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 μm 、No.2; 5.6 μm 、No.3; 3.2 μm 、No.4; 1.8 μm 、No.5; 1.0 μm 、No.6; 0.56 μm 、No.7; 0.32 μm 、No.8; 0.1 μm 、No.9; 0.10 μm 、No.10; 0.056 μm 、No.11; 0.032 μm 、No.12; 0.018 μm 、No.13; 0.01 μm)に導いた。

吸引時間は30分(低濃度群)または40分(高濃度群)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 $^{\circ}\text{C}$ 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、曝露・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

単回吸入曝露試験において回収した BALF

細胞から肺胞マクロファージへの NT-7 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ていた。今年度、肺負荷量について測定したところ、顕微鏡下での BALF 細胞での取り込み結果と同様の結果を定量的に得た。これらの結果から半減期を算出した結果、高濃度群では $t_{1/2}=6.7$ 日という結果が得られた。

2) T-NT-7#53 の間欠吸入曝露試験

Taquann 全身曝露吸入装置 ver 3.0 を用いた T-NT-7#53 の間欠吸入曝露試験における質量濃度の平均結果は、低濃度は 0.8 mg/カートリッジ で 2.7 mg/m^3 (エアロゾル効率 45%)、高濃度は 1.6 mg/カートリッジ で高濃度は 4.7 mg/m^3 (エアロゾル効率 39%) となった (表3、図4)。MMAD のデータは、低濃度群で $1.1 \mu\text{m}$ ($\sigma_g 5.8$) と高濃度群で $1.2 \mu\text{m}$ ($\sigma_g 5.3$) を示した。

一方、肺負荷量については、単回吸入曝露試験日を day0 として、day0: 低用量群 $1.7 \mu\text{g}$ 、高用量群 $3.5 \mu\text{g}$ 、day1: 低用量群 $2.0 \mu\text{g}$ 、高用量群 $4.1 \mu\text{g}$ 、day7: 低用量群 $1.9 \mu\text{g}$ 、高用量群 $2.3 \mu\text{g}$ 、day14: 低用量群 $1.73 \mu\text{g}$ 、高用量群 $1.9 \mu\text{g}$ 、day28: 低用量群 $1.1 \mu\text{g}$ 、高用量群 $1.3 \mu\text{g}$ の値を示した (図 5)。間欠吸入曝露試験における肺負荷量については現在計測中である。

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実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。今年度は昨年度実施した単回吸入曝露試験の肺負荷量の結果について整理し、その結果もとに間欠吸入曝露プロトコルの提案と曝露実験を実際に開始した。

間欠吸入曝露試験プロトコルについて、隔週で 13 週にわたり吸入曝露実験をすることとした。間欠吸入曝露試験における質量濃度測定の結果から、目標濃度は概ね達成され、エアロゾル効率も 40% 程度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。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 ($1.3 \sim 1.4 \mu\text{m}$ 、 $\sigma_g 2.6 \sim 3.0$) とほぼ同等の結果を示した。また、低用量群と高用量群とで同一の MMAD が得られたことから、Taquann 法ならびに本吸入曝露装置の精度の高さが示された。

今後、間欠吸入曝露試験における肺負荷量の経時変化に関するデータを取得し、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、間欠曝露プロトコルの有用性を検証していく。

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、肺負荷量の経時変化を明らかにした。NT-7 の半減期はおおよそ 7 日と計算され、その結果をもとに 1 週間に 1 回 (1 日 6 時間)、13 週にわたる間欠吸入曝露実験を実施した。その結果、13 回にわたり安定した曝露濃度と MMAD の結果を得ることに成功した。

今後、間欠吸入曝露による肺負荷量の時間経過を定量的に評価し、組織学解析ならびに免疫応答解析の結果を踏まえ、適切な間欠吸入曝露試験プロトコルを提案したい。

謝辞: 本研究の遂行にあたり、技術的支援をいただいた、当研究所毒性部の辻昌貴氏、森田紘一氏、菅康佑氏、相田麻子氏、および、東京都健康安全研究センターの前野愛氏に深く感謝する。

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

- Kaneko S, Okada Y, Yokota S, Takamatsu K: Reactive Blue Dye: Highlights of Vacuoles in Human Sperm. *J Med Diagn Meth.* 12 (2) No. 1000400 (2023).
- Yoshioka H, Yokota S, Tominaga S, Tsukiboshi Y, Suzui M, Shinohara Y, Yoshikawa M, Sasaki H, Sasaki N, Maeda T, Miura N: Involvement of Bmal1 and Clock in bromobenzene metabolite-induced diurnal renal toxicity. *Biological Pharm Bull.* In press. (2023)
- Tsukiboshi Y, Ogata A, Noguchi A, Mikami Y, Yokota S, Ogata K, Yoshioka H: Sasa veitchii extracts protect phenytoin-induced cell

proliferation inhibition in human lip mesenchymal cells through modulation of miR-27b-5p. *Biomedical Research (Tokyo).* 44 (2) 73–80. (2023).

Yokota S*, Miyaso H, Hirai T, Suga K, Wakayama T, Taquahashi Y, Kitajima S: Development of a non-invasive method to evaluate testicular toxicity using a novel compact magnetic resonance imaging system. *J Toxicol Sci.* 48(2): 57-64. (2023)

Miyaso H, Takano K, Nagahori K, Li Z, Kawata S, Kuramasu M, Wu X, Ogawa Y, Yoshioka H, Matsuno Y, Yokota S, Itoh M: Neonatal corticosterone administration increases p27-positive Sertoli cell number and decreases Sertoli cell number in the testes of mice in prepuberty. *Sci Rep.* 12;12(1):19402. (2022)

Horibata K, Takasawa H, Hojo M, Taquahashi Y, Shigano M, Yokota S, Kobayashi N, Sugiyama K, Honma M, Hamada S: In vivo genotoxicity assessment of a multiwalled carbon nanotube in a mouse ex vivo culture. *Genes and Environment.* 44: 24. (2022)

Hojo M, Maeno A, Sakamoto Y, Ohnuki A, Tada Y, Yamamoto Y, Ikushima K, Inaba R, Suzuki J, Taquahashi Y, Yokota S, Kobayashi N, Ohnishi M, Goto Y, Numano T, Tsuda H, Alexander DB, Kanno J, Hirose A, Inomata A, Nakae D: Two-year intermittent exposure of a multiwalled carbon nanotube by intratracheal instillation induces lung tumors and pleural mesotheliomas in

F344 rats. Particle and Fibre Toxicology. 19(1): 38. (2022)

横田理、押尾茂: 化学物質曝露により生じる雄性生殖機能障害と発生・発達毒性、DOHaD 研究、第 11 巻、第 2 号、p103-8. (2023)

Wakayama T, Yokota S, Noguchi K, Sugawara T, Sonoda K, Wanta A: Quantitative Evaluation of Spermatogenesis by Histochemistry. Histochem Cell Biol. 157(3):287-295. (2022)

2. 学会発表

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, the 62st Annual

Meeting of the Society of Toxicology, Nashville, Tennessee, USA (2023.3.22)

高橋祐次、横田理、広瀬明彦、菅野純: ナノマテリアルの慢性吸入ばく露試験法の効率化、第 49 回日本毒性学会学術年会、北海道 (2022.6.30) シンポジウム

横田理、関根尚、市瀬孝道、藤ノ木政勝、若山友彦、北嶋聡、押尾茂: ナノ銀の妊娠期曝露により生じる、雄性生殖系列を介した継世代・多世代影響、第 41 回アンドロロジー学会、福島 (2022.6.3)

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

なし

表1 単回吸入曝露実験の群構成

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 間欠吸入曝露実験の群構成

Group	Examinations	N	Necropsy after inhalation exposure			
			5th	13th	12M	24M
Control 0 mg/m ³ 6hr/day/week x 13 times	•Lung Burden	12	3	3	3	3
	•Histopathology(perfusion)	26	0	0	6	20
	•Immune function					
	BALF	12	0	0	6	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/day/week x 13 times	•Lung Burden	12	3	3	3	3
	•Histopathology(perfusion)	26	0	0	6	20
	•Immune function					
	BALF	12	0	0	6	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/day/week x 13 times	•Lung Burden	12	3	3	3	3
	•Histopathology(perfusion)	26	0	0	6	20
	•Immune function					
	BALF	12	0	0	6	6
	Pulmonary interstitium mRNA Spleen, Lymph node					
	Subtotal	50	Consist of two sub-groups, A&B			
Total number of animals		150				

表 3 間欠吸入曝露実験:曝露濃度の結果

曝露濃度結果 (mg/m ³)															
1週目		2週目		3週目		4週目		5週目		6週目		7週目			
A		A		A		A		A		A		A			
Low	High	Low	High	Low	High	Low	High	Low	High	Low	High	Low	High		
1	2.30	4.20	1	2.16	4.10	1	2.57	4.42	1	2.40	4.48	1	2.79	4.53	
2	2.57	4.91	2	2.52	4.62	2	2.87	5.23	2	2.71	5.21	2	2.90	4.62	
3	2.93	5.61	3	2.79	4.53	3	3.01	5.62	3	2.78	5.84	3	3.04	4.94	
Ave	2.60	4.91	Ave	2.49	4.42	Ave	2.82	5.09	Ave	2.63	5.18	Ave	2.87	4.99	
SD	0.26	0.58	SD	0.26	0.23	SD	0.18	0.50	SD	0.17	0.56	SD	0.12	0.40	
B		B		B		B		B		B		B			
Low	High	Low	High	Low	High	Low	High	Low	High	Low	High	Low	High		
1	2.43	4.27	1	2.80	4.48	1	2.40	3.73	1	2.60	4.57	1	2.67	4.80	
2	2.63	5.59	2	2.89	5.03	2	2.50	4.62	2	2.98	5.22	2	2.66	5.09	
3	2.90	5.38	3	2.91	5.47	3	2.81	4.57	3	3.11	5.48	3	2.82	5.27	
Ave	2.65	5.08	Ave	2.87	4.99	Ave	2.57	4.31	Ave	2.90	5.09	Ave	2.72	5.05	
SD	0.19	0.58	SD	0.05	0.40	SD	0.17	0.41	SD	0.22	0.38	SD	0.07	0.19	
8週目		9週目		10週目		11週目		12週目		13週目					
A		A		A		A		A		A					
Low	High	Low	High	Low	High	Low	High	Low	High	Low	High				
1	2.51	4.29	1	2.47	4.34	1	2.44	3.68	1	2.51	3.62				
2	2.66	4.38	2	2.86	5.01	2	2.52	4.17	2	2.66	4.29				
3	2.92	5.00	3	2.66	4.66	3	2.79	4.80	3	2.76	4.50				
Ave	2.70	4.56	Ave	2.66	4.67	Ave	2.58	4.22	Ave	2.64	4.14				
SD	0.17	0.32	SD	0.16	0.27	SD	0.15	0.46	SD	0.10	0.38				
B		B		B		B		B		B					
Low	High	Low	High	Low	High	Low	High	Low	High	Low	High				
1	2.51	4.13	1	2.46	4.11	1	2.34	3.78	1	2.46	4.99				
2	2.84	4.63	2	2.71	4.58	2	2.72	4.97	2	2.76	4.77				
3	2.71	4.64	3	2.69	4.83	3	2.67	5.20	3	2.79	5.64				
Ave	2.69	4.47	Ave	2.62	4.51	Ave	2.58	4.65	Ave	2.67	5.21				
SD	0.14	0.24	SD	0.11	0.30	SD	0.17	0.62	SD	0.15	0.37				

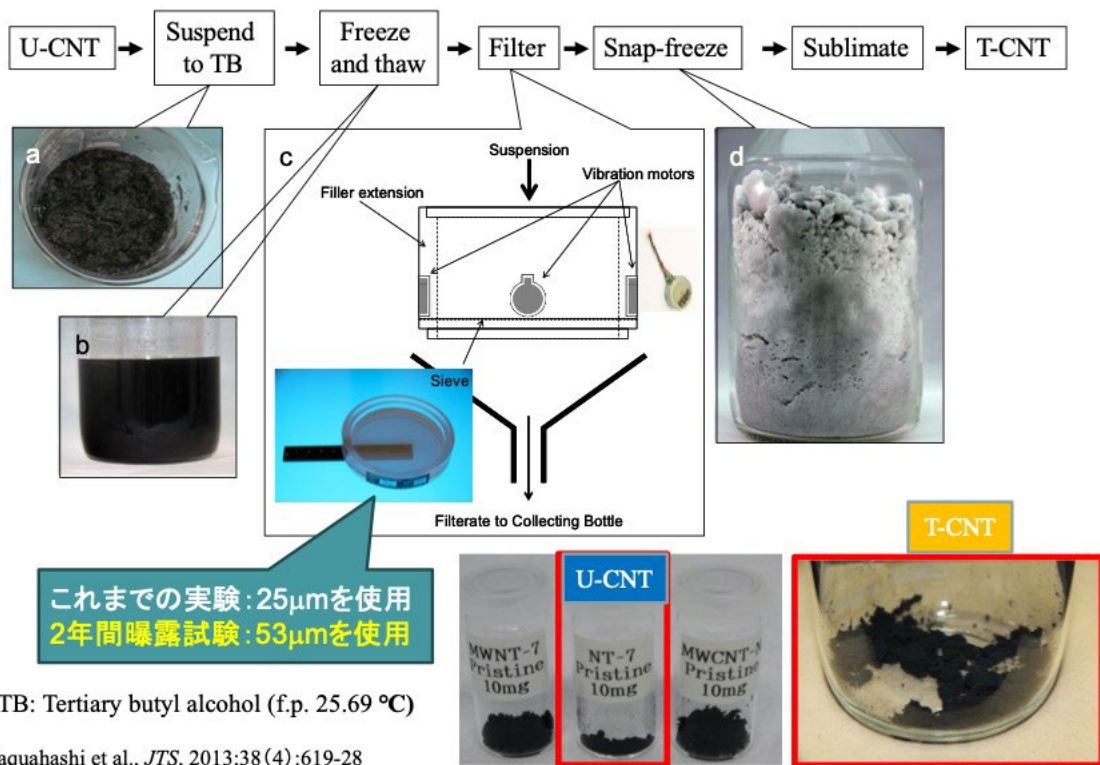


図1 Taquann法の概要

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。

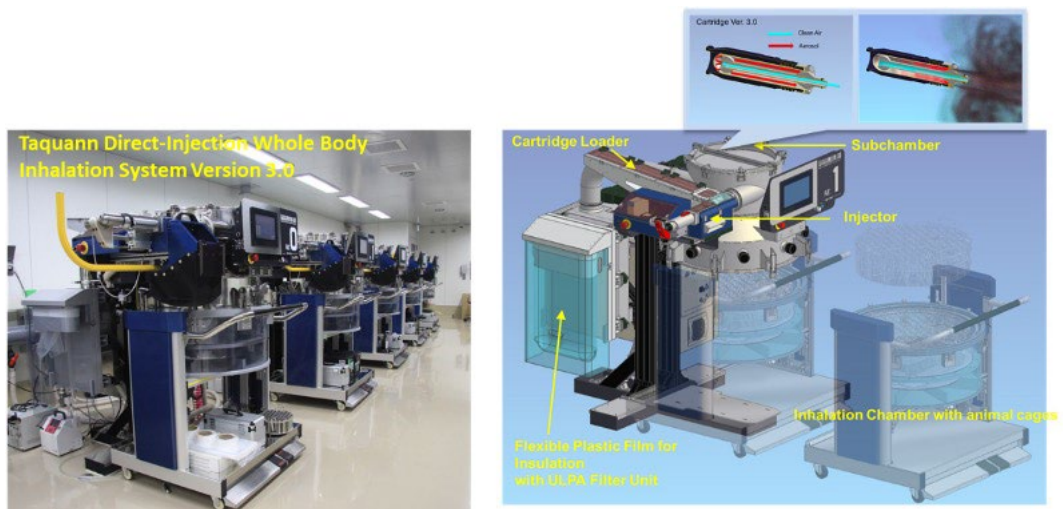


図2 Taquann 直噴全身吸入装置 Ver3.0

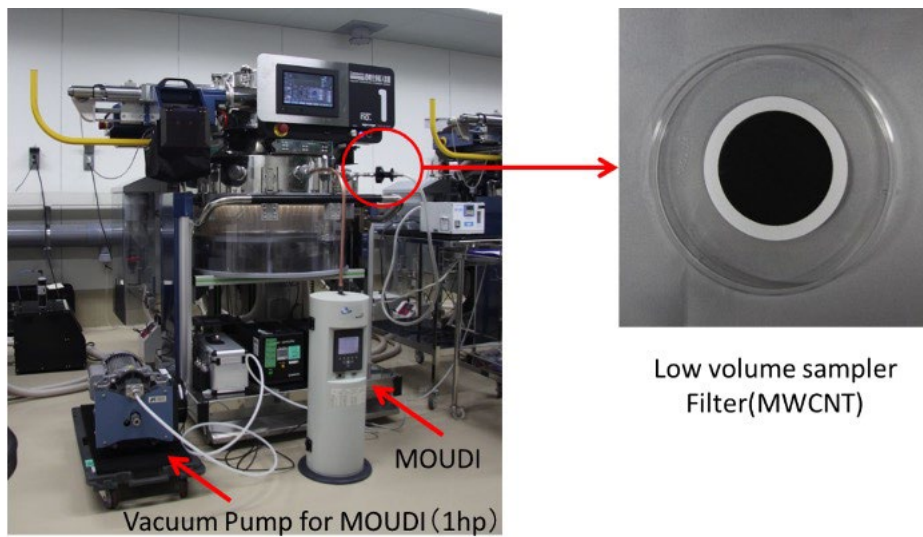
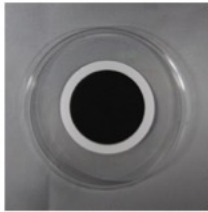


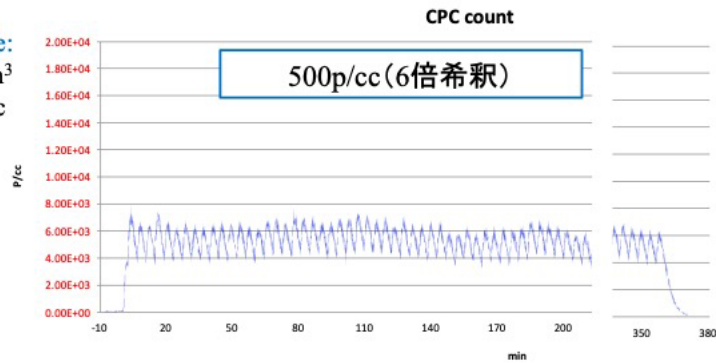
図3 エアロゾルモニタリングの概要

Low volume sampling (LVS)
 フィルターに捕集されたエアロゾルの質量(mg)を、吸引空気量 1.5L/min×60min=90Lから 1m³当りの質量濃度を算出。



mg/m ³	A		B	
	Low	High	Low	High
1	2.6	4.9	2.7	5.1
2	2.5	4.4	2.9	5.0
3	2.8	5.1	2.6	4.3
4	2.6	5.2	2.9	5.1
5	2.9	5.0	2.7	5.1
6	2.9	4.6	2.7	5.0
7	2.6	4.4	2.6	4.6
8	2.7	4.6	2.7	4.5
9	2.7	4.7	2.6	4.5
10	2.6	4.2	2.6	4.7
11	2.6	4.1	2.7	5.2
12	2.6	3.8	2.5	4.6
13	2.7	4.5	2.8	4.4
Ave	2.7	4.6	2.7	4.8
SD	0.1	0.4	0.1	0.3

Low dose:
 2.7 mg/m³
 3000 p/cc



High dose:
 4.7mg/m³
 4800 p/cc

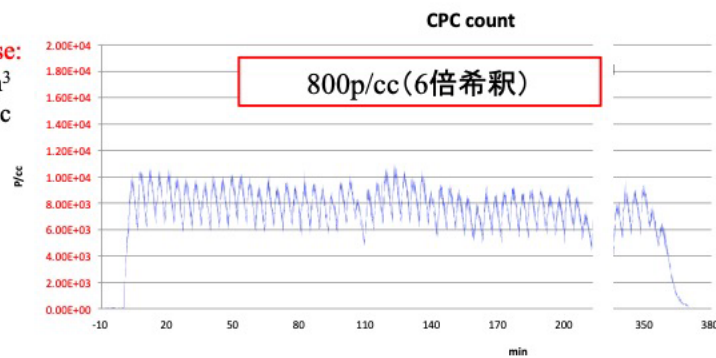


図4 間欠吸入曝露試験の結果

1週間に1回(6時間:10:00~16:00)、13週にわたりNT-7の間欠吸入曝露試験を実施した。
 (左図)Low volume sampler(LVS)を用い、フィルターに捕集されたNT-7の質量(mg)を、吸引空気量 1.5L/min x 60 min= 90Lから 1m³あたりの質量濃度を算出した。
 (右図)凝縮粒子計数装置(Condensation Particle Counter; CPC、CPC3776、サンプリング流量: 1.5 L/min、TSI、MN、USA)を用い、定量範囲に入るように6倍希釈し粒子数を測定した。低用量群は3000 p/cc、高用量群は4800 p/ccを示した。

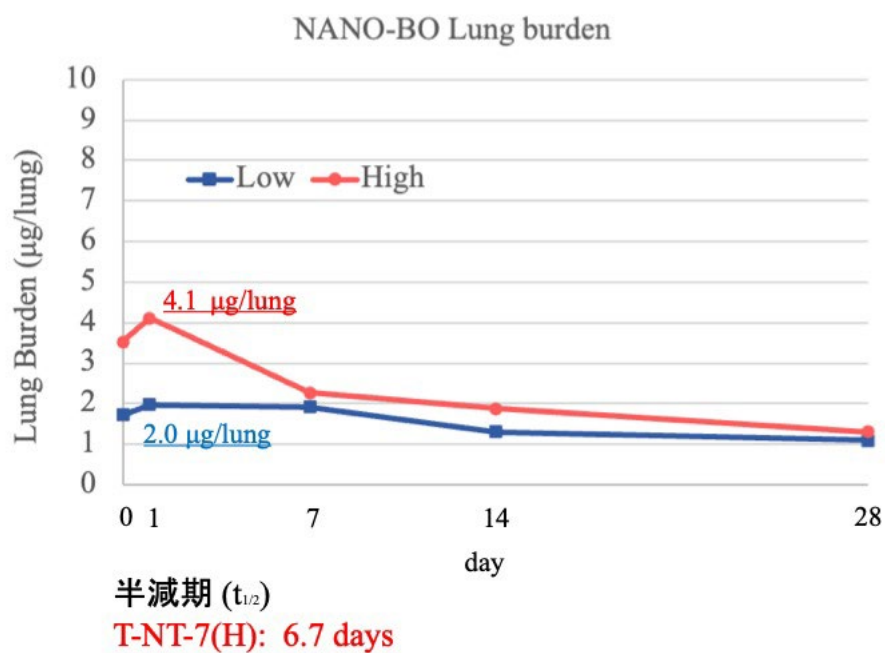


図5 肺負荷量(単回吸入曝露試験の結果)

単回吸入曝露試験日を day0 として、曝露直後(day0)、1 日後(day1)、7 日後(day7)、14 日後(day14)、28 日後(day28)の肺負荷量を定量した。得られた結果から NT-7 の半減期はおよそ 7 日であることが判明した。