

令和5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 第二室 室長
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 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

ナノテク産業の発展に伴い、ナノマテリアルの安全性評価の実施が国民の健康被害防止の観点から急務とされている。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、先行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用いている。本分担研究の目的は、先行で実施した2年にわたる長期間欠吸入曝露試験の研究成果を踏まえ、より効率的な短期間欠吸入曝露プロトコルの確立を目指し、一度に複数の吸入毒性試験を実施可能な基盤を整備することである。

今年度は、昨年度実施した野生型マウスの多層カーボンナノチューブ短期間欠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、その体内分布を把握するためのリンパ管マウスを用いた短期間欠吸入曝露試験を実施した。加えて、動物種差を考慮するため、ラットに対しても同様の曝露実験を実施した。

いずれの曝露実験においても、週に1回6時間、13週にわたって、多層カーボンナノチューブの短期間欠吸入曝露試験を行った。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 2.5 mg/m^3 、 4.4 mg/m^3 、MMADはL、H群ともに $1.1\text{-}1.6 \mu\text{m}$ を示した。今後、肺負荷量と体内動態に関する経時変化に関するデータと慢性影響に関するデータとを照合し、迅速かつ効率的な短期間欠吸入曝露プロトコルの確立に向けて研究を進めていく。

A. 研究目的

先行研究では、Taquann 直噴全身吸入装置を用い MWNT-7 の2年間の長期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短期間欠吸入曝露プロトコルを開発することを目的としている。

B. 研究方法

B-1. NT-7の高分散化処理(Taquann法)

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た後、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、分散を図りつつ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) 短期間欠吸入曝露試験(野生型マウス)

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回の短期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。

(2) 短期間欠吸入曝露試験(リンパ管マウス)

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を蛍光標識したトランスジェニックマウス(Prox1-GFP)に対して、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回の短期間欠吸入曝露を実施した。このマウスは、リンパ管内皮細胞がGFP(緑)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6週齢にて搬入され、1週間の馴化期間を経て7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)。

(3) 短期間欠吸入曝露試験(ラット)

F344/DuCrjCrlj(日本エスエルシー株式会社)雌性ラットを5週齢で購入し1週間の馴化期間を経たのち6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回の短期間欠吸入曝露を実施した。

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匹のマウスまたは1ケージ当り1匹のラットを収容した。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±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。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。ケージ内の飼育環境を改善する目的で、マウスにはシェファードシャック（Shepherd Specialty Papers社）を、ラットには積木（日本クレア株式会社）をケージ内に設置した。

3) 群構成

対照群、T-NT-7#53 低濃度群（目標濃度 2.5 mg/m³）、T-NT-7#53 高濃度群（目標濃度 5.0 mg/m³）の3群構成とした。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回の短期間欠吸入曝露を実施した。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、野生型マウスの実験においては、各群を二つのサブグループ（Sub-Group A, B）に分けて50匹に対し曝露を実施し（表1）、リンパ管マウスにおいては、25匹に曝露を実施した（表1, 2）。一方、ラットにおいては、曝露チャンバーに20匹収容するデザインであるため、20匹に曝露を実施した（表3）。

4) ダスト発生装置

T-NT-7#53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（0.8 mg）、高濃度群では20 mL（1.6 mg）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。

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。その後は濃度を維持するため4分間隔で噴射し、目標設定濃度での曝露を実施した。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 μ 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、 $\phi 55$ 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 μ 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 $1.5 \text{ L/min} \times 60 \text{ min} = 90 \text{ L}$ 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 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°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 の短期間欠吸入曝露試験

Taquann全身曝露吸入装置 ver 3.0を用いたT-NT-7#53の短期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 $2.5 \sim 2.7 \text{ mg/m}^3$ (エアロゾル効率45%)、高濃度は 1.6 mg/カートリッジ で $4.4 \sim 4.7 \text{ mg/m}^3$ (エアロゾル効率39%)となった (図4)。MMADのデータは、低濃度群で $1.1 \sim 1.4 \mu\text{m}$ ($\sigma_g 6.0$) と高濃度群で $1.2 \sim 1.6 \mu\text{m}$ ($\sigma_g 4.5$) を示した。

2) 野生型マウス肺負荷量の結果

肺負荷量については、間欠吸入曝露 5 回目 (5th): 低用量群 $6.4 \mu\text{g/Lung}$ 、高用量群 $13.4 \mu\text{g/Lung}$ 、13 回目 (13th): 低用量群 $18.4 \mu\text{g/Lung}$ 、高用量群 $40.6 \mu\text{g/Lung}$ 、曝露 1 年経過時: 低用量群 $4.6 \mu\text{g/Lung}$ 、高用量群 $22.3 \mu\text{g/Lung}$ の値を示した (図5)。曝露 2 年経過時のデータは今後の解剖にて、また、リンパ管マウスやラットの肺負荷量データに関しては現在測定中である。

D. 考察

本分担研究は、先行研究で実施したMWCNTの長期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短期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ものである。今年度は

短期間欠吸入曝露試験のマウス・ラットへの実施ならびに肺負荷量の解析を行った。

昨年度実施のマウス単回吸入曝露試験における肺への負荷量推移の結果から半減期を算出し、 $t_{1/2}=6.7$ 日(およそ1週間)という結果を得ている。この結果をもとに、短期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(1.3~1.4 μm , og 2.6~3.0) 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、本法の有用性が示された。

肺負荷量に関しては、野生型マウス間欠吸入曝露5回目(5th)と13回目(13th)、1年経過時(52週目)の肺負荷量を定量した。昨年度実施の、単回吸入曝露の時に得られたNT-7肺負荷量の半減期はおよそ1週間であったが、13回の短期間欠吸入曝露試験直後の肺負荷量が半減にするのにおよそ39週間を要した。このように、単回曝露の時と比べて短期間欠曝露においては、肺負荷量のクリアランスの低下が示唆されたものの、時間経過とともに、肺負荷量は減少したため、過負荷のない間欠吸入曝露プロトコルを提案できたものと考えている。

一方、今年度F344ラットにおける曝露実験を開始した。マウスの曝露実験結果と概ね同様の結果を示し、本装置はマウスのみならずラットにも適用可能であることを確認した。今回、

本システムを用いて初めてラット吸入曝露試験を実施し、今後、マウスの試験結果とを比較し、肺への負荷量および慢性影響に関する種差を明らかにしていく。さらに、先行のラット2年間連続吸入曝露試験の結果との相違を明らかにし、本研究で提案する短期間欠吸入曝露プロトコルの有用性について検証を進めていく。

以上、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していくことで「一度に複数検体」を吸入曝露する体制整備が見込まれる。

E. 結論

Taquann 全身曝露吸入装置 Ver.3.0 を使用し、T-NT-7#53 をマウスおよびラットに間欠全身曝露吸入を実施し、肺負荷量の経時的变化を明らかにした。

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、リンパ管マウスによるNT-7の体内動態評価とともに、病理組織学解析と免疫応答解析の結果を踏まえ、適切な短期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

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Miyaso H, Yokota S, Suga K, Hashimoto Y, Kouno C, Nagahori K, Itoh M, Kitajima S: Histological differences between the central and peripheral areas of the testes of busulfan-administrated mice. *J Toxicol Sci.* 49(4):139-149. (2024)
- Tsukiboshi Y, Noguchi A, Horita H, Mikami Y, Yokota S, Ogata K, Yoshioka H: Let-7c-5p associate with inhibition of phenobarbital-induced cell proliferation in human palate cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 696: 149516. (2024)
- Hashimoto K, Arakawa H, Imamura R, Nishimura T, Kitajima S, Sato T, Makiyama K, Ogawa T, Yokota S*: A novel alternative method for long-term evaluation of male reproductive toxicity and its recovery using a pre-pubertal mouse testis organ culture system. *J Appl Toxicol.* 44: 784-793. (2024)
- Tominaga S, Yoshioka H, Yokota S, Tsukiboshi Y, Suzui M, Nagai M, Hara H, Maeda T, Miura N: Copper-induced diurnal hepatic toxicity is associated with Cry2 and Per1 in mice. *Environ Health Prev Med.* 28: 78-86. (2023)
- Tsukiboshi Y, Horita H, Mikami Y, Yokota S, Ogata K, Yoshioka H: Involvement of microRNA-4680-3p against phenytoin-induced cell proliferation inhibition in human palate cells. *J Toxicol Sci.* 49(1): 1-8. (2024)
- Yokota S*, Wakayama T, Miyaso H, Suga K, Fujinoki M, Kaneko S, Kitajima S: Reactive blue 2 labels protamine in late-haploid spermatids and spermatozoa and can be used for toxicity evaluation. *Andrologia.* Volume 2023: 1-12.
- Yoshioka H, Wu S, Moriishi T, Tsukiboshi Y, Yokota S, Miura N, Yoshikawa M, Matsui N, Inagaki N, Matsushita Y, Nakao M: Sasa veitchii extract alleviates non-alcoholic steatohepatitis in methionine-choline deficient diet-induced mice by regulating peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Traditional and kanpo.* 10(3): 259-268. (2023)
- Miyauchi A, Akashi T, Yokota S, Taquahashi Y, Hirose A, Hojo M, Yoshida H, Kurokawa M, Watanabe W: Effects of inhalation of multi-walled carbon nanotube (MWCNT) on respiratory syncytial virus (RSV) infection in mice. *J Toxicol Sci.* 48(7): 411-20. (2023)
- Saito H, Yokota S*, Kitajima S: Immunohistochemical analysis of the vimentin filaments in Sertoli cells is a powerful tool for the prediction of spermatogenic dysfunction. *Acta Histochemica.* 125(5): 152046. (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.* 46: 824-829. (2023)
- 横田理: 小動物用コンパクト MRI を用いた非侵襲的画像解析の毒性評価への応用—動物からヒトへのトランスレーションリサーチを目指して—、中毒研究、第 37 巻第 1 号、p63-69. (2024.3.10)

2. 学会発表

Yokota S, Suga K, Taquahashi Y, Kitajima S:

Development of a non-invasive method for testicular toxicity evaluation using a novel compact magnetic resonance imaging system, the 48th Annual Conference of the American Society of Andrology, Boston, USA (2023.4.21)

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 野生型マウス:短期間欠吸入曝露実験の群構成

Group	Examinations	N	Necropsy after inhalation exposure			
			5th	13th	12M	24M
Control	• Lung Burden	12	3	3	3	3
0 mg/m ³	• Histopathology(perfusion)	26	0	0	6	20
6hr/day/week x 13 times	• 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	• Lung Burden	12	3	3	3	3
2.5 mg/m ³	• Histopathology(perfusion)	26	0	0	6	20
6hr/day/week x 13 times	• 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	• Lung Burden	12	3	3	3	3
5.0 mg/m ³	• Histopathology(perfusion)	26	0	0	6	20
6hr/day/week x 13 times	• 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2 リンパ管マウス:短期間欠吸入曝露実験の群構成

Group	Examinations	N	Necropsy after inhalation exposure		
			4M	12M	24M
Control	•① Total RNA、② Immunohistochemistry	9	3	3	3
0 mg/m ³	•③ 3D	9	3	3	3
6hr/D/W×13times	•④ Visum	3	1	1	1
	余剰	4			
Subtotal		25			
NT-7 #53um L	•① Total RNA、② Immunohistochemistry	9	3	3	3
3 mg/m ³	•③ 3D	9	3	3	3
6hr/D/W×13times	•④ Visum	3	1	1	1
	余剰	4			
Subtotal		25			
NT-7 #53um H	•① Total RNA、② Immunohistochemistry	9	3	3	3
6 mg/m ³	•③ 3D	9	3	3	3
6hr/D/W×13times	•④ Visum	3	1	1	1
	余剰	4			
Subtotal		25			
Total number of animals		75			

表 3 ラット:短期間欠吸入曝露実験の群構成

Group	Examinations	N	13th	12M	24M
Control 0 mg/m ³ 6hr/day/week x 13 times	•Lung Burden	20	3	5	12
	•Histopathology(perfusion)				
	•Immune function				
	BALF				
	Pulmonary interstitium mRNA				
Spleen, Lymph node					
	Subtotal	20			
T-NT-7 #53um L 2.5 mg/m ³ 6hr/day/week x 13 times	•Lung Burden	20	3	5	12
	•Histopathology(perfusion)				
	•Immune function				
	BALF				
	Pulmonary interstitium mRNA				
Spleen, Lymph node					
	Subtotal	20			
T-NT-7 #53um H 5.0 mg/m ³ 6hr/day/week x 13 times	•Lung Burden	20	3	5	12
	•Histopathology(perfusion)				
	•Immune function				
	BALF				
	Pulmonary interstitium mRNA				
Spleen, Lymph node					
	Subtotal	20			
Total number of animals		60			

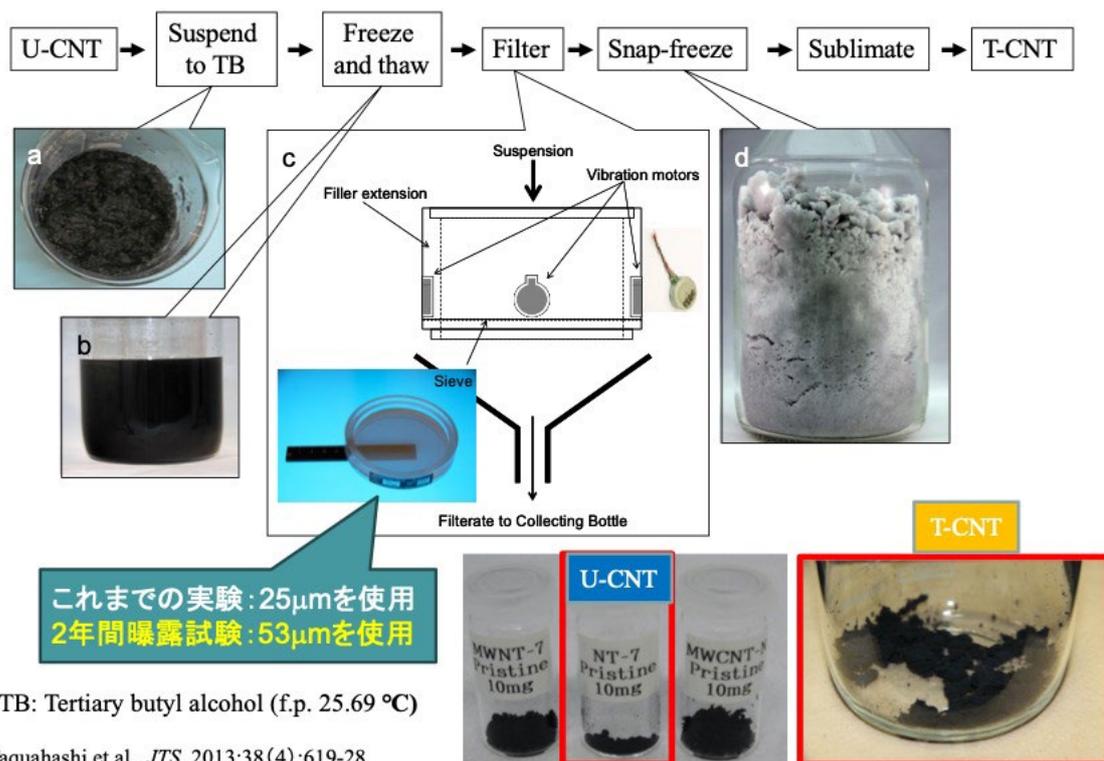


図1 Taquann法の概要

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。

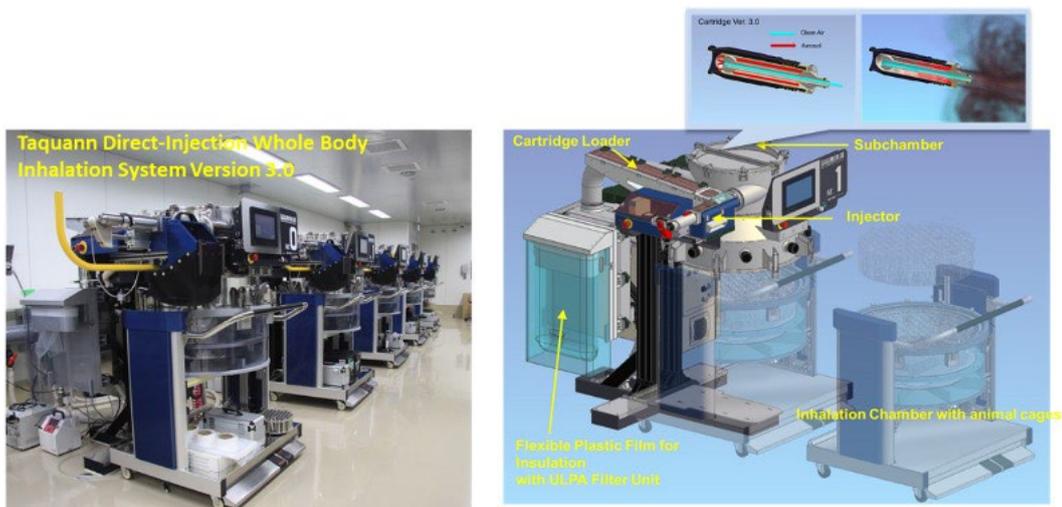


図2 Taquann 直噴全身吸入装置 Ver3.0

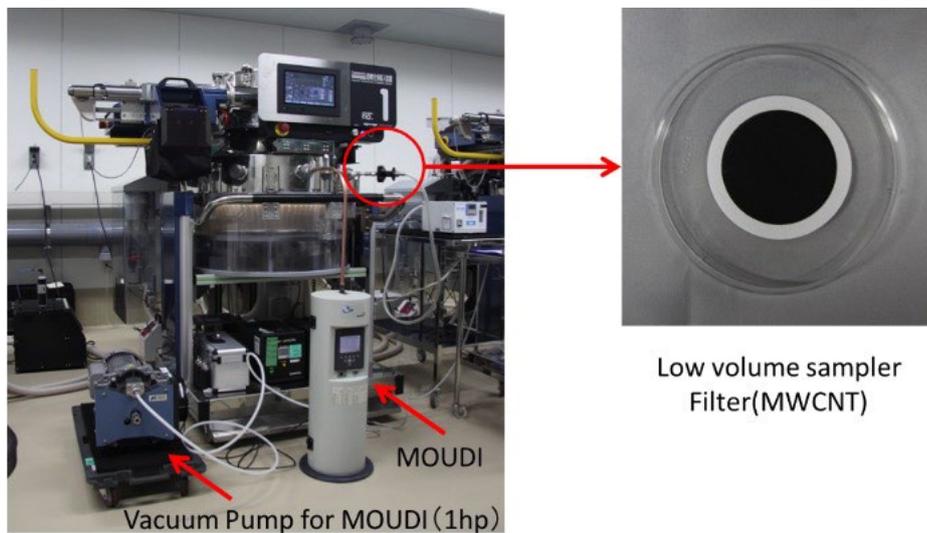
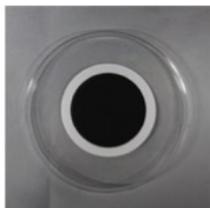


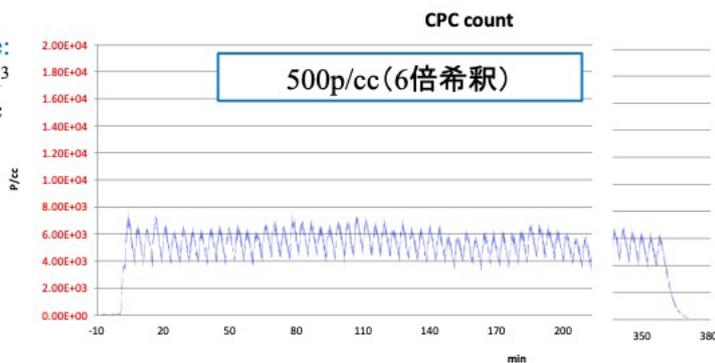
図3 エアロゾルモニタリングの概要

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。

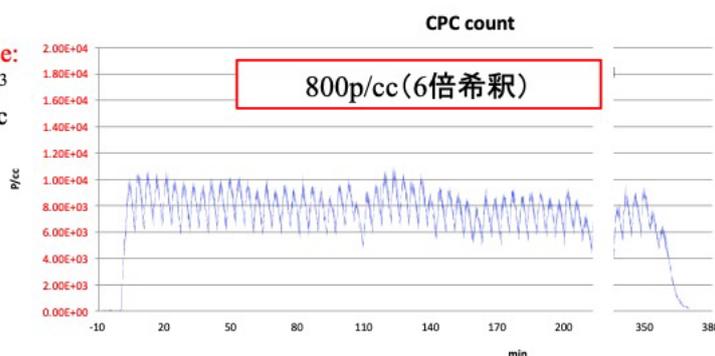


mg/m ³	A		B	
	Low	High	Low	High
1	2.6	4.9	2.7	5.1
2	2.5	4.4	2.9	5.0
3	2.8	5.1	2.6	4.3
4	2.6	5.2	2.9	5.1
5	2.9	5.0	2.7	5.1
6	2.9	4.6	2.7	5.0
7	2.6	4.4	2.6	4.6
8	2.7	4.6	2.7	4.5
9	2.7	4.7	2.6	4.5
10	2.6	4.2	2.6	4.7
11	2.6	4.1	2.7	5.2
12	2.6	3.8	2.5	4.6
13	2.7	4.5	2.8	4.4
Ave	2.7	4.8	2.7	4.8
SD	0.1	0.4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

Low dose:
 2.7 mg/m³
 3000 p/cc

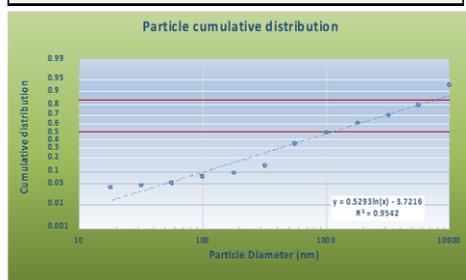


High dose:
 4.7mg/m³
 4800 p/cc



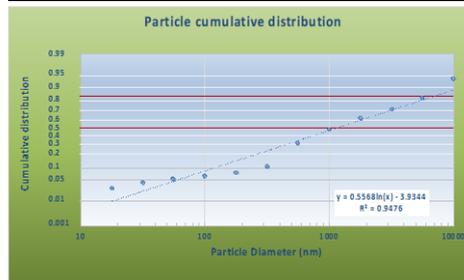
B-12 Low

Total Mass (ug)	Concentration (ug/m ³)	MMAD (nm)	Deviation (σg)
993	2494	1132	6.613



B-12 High

Total Mass (ug)	Concentration (ug/m ³)	MMAD (nm)	Deviation (σg)
1426	4556	1193	6.023



MOUDI	MMAD	A-1	B-2	A-3	B-4	A-5	B-6	A-7	B-8	A-9	B-10	A-11	B-12	平均
Low	nm	-	-	1106	1125	-	-	-	1082	-	1341	1193	1132	1128
	σg	-	-	5.7	5.1	-	-	-	5.1	-	5.4	6.6	6.6	5.8
High	nm	-	1120	1287	1388	-	1367	-	-	1401	1573	-	1172	1193
	σg	-	5.3	4.5	4.9	-	4.7	-	-	5	5.1	-	6	5.3

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。MMADは、低濃度群において1,128 nm (σg: 5.8)、高濃度群において1,193 nm (σg: 5.3)となり、同様の物理化学的特性を示した。

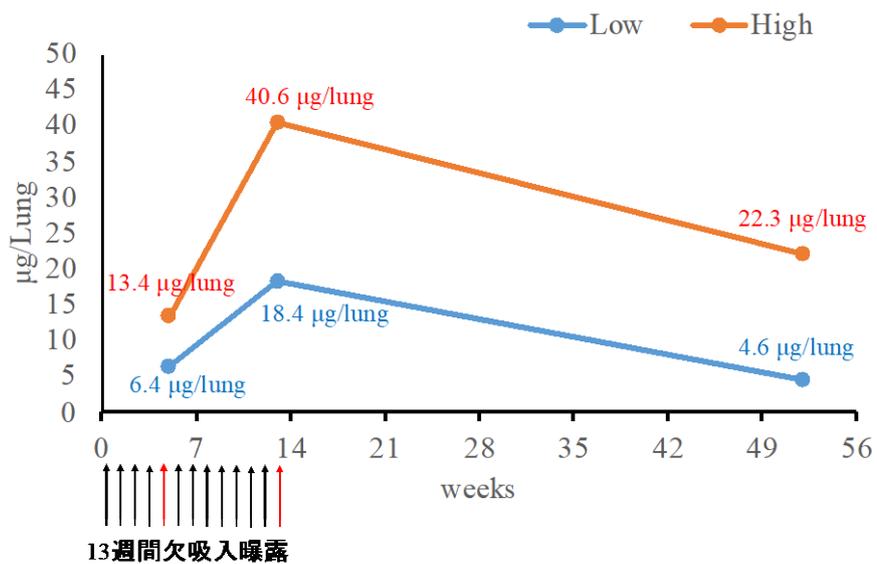


図5 肺負荷量(単回吸入曝露試験の結果)

間欠吸入曝露試験 5 回目(5th)と 13 回目(13th)、1 年(52 週目)経過時の肺負荷量を測定した結果、5th: 低用量群 6.4 µg/Lung、高用量群 13.4 µg/Lung、13th: 低用量群 18.4 µg/Lung、高用量群 40.6 µg/Lung、曝露 1 年経過時: 低用量群 4.6 µg/Lung、高用量群 22.3 µg/Lung の値を示した。単回吸入曝露の時に得られた NT-7 肺負荷量の半減期はおよそ 1 週間であったが、13 回の間欠吸入曝露直後の肺負荷量がおおよそ半減にするのに 39 週間を要した。