

ナノマテリアルを含む化学物質の短期吸入曝露等による免疫毒性評価手法開発のため研究(23KD0101)

令和6年度 分担研究報告書

分担研究課題 In vivo 吸入曝露実験方法の開発

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 室長
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

本研究は、短期吸入曝露されたナノマテリアル(NM)を含む化学物質の *in vitro* による免疫毒性評価手法の開発と将来的な OECD ガイドライン化を目指すための基盤的知見の収集を目的とする。本分担研究では、動物を用いた吸入ばく露方法の開発を行い、開発目標である *in vitro* 試験法の理論的根拠となる知見を得るとともに、化学物質が呼吸器感作性を成立させるメカニズム解明を行うことを目的としている。R6 年度は、ナノマテリアルの感染性免疫への影響を調べることを目的とした実験に供するため、先行研究で開発した全身ばく露吸入装置(Taquann システム Ver3.0)により、ナノシリカ(NM202、JRC)を高分散エアロゾルとして、C57BL/NcrSlc 雄性マウス 12 週齢に 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ーを吸入させた。

エアロゾルの目標濃度は、低濃度群 10 mg/m<sup>3</sup>、高濃度群 30 mg/m<sup>3</sup>とした。その結果、質量濃度の平均値は、低濃度群、高濃度群それぞれ 6.9 mg/m<sup>3</sup>、25.1 mg/m<sup>3</sup>、MMAD は低濃度群、高濃度群それぞれ 562 nm( $\sigma_g$ :2.7~2.9)、709 nm( $\sigma_g$ :2.4~2.5)であった。MMAD は低濃度群、高濃度群ともに 3  $\mu$ 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。しかしながら、NM202 は、これまで吸入ばく露実験を行ったナノシリカ検体に比較して微細で機器への吸着性が強く、エアロゾル化効率は約 5%程度と非常に低かった。NM202 を曝露したマウスはばく露後 8 週間までの観察期間中、体重推移に影響は見られなかった。肺重量に関して、5 日間のばく露終了直後およびばく露 4 週後の定期解剖において用量依存的に増加傾向にあり、高濃度群では統計学的に有意であったが、ばく露後 8 週後では影響は認められなかった。

なお、本分担研究では気道感作物質の *in vivo* 評価方法の開発も実施するため、現在、気管内投与方法による実験を計画中である。R6 年度は、陽性対象物質となる TDI 及び TMA の気管内投与に使用する検体の調製方法について検討を行った。TDI 及び TMA は水を含むと容易に加水分解される。そのため、油性溶媒を検討した結果、アマニオイルを用いメノウ乳鉢にて分散させることで良好な調整検体を得ることが可能となった。

## 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>-NM202-JRCNM02002)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、シェファードシャック(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21匹のマウスを使用し、1日6時間(10:00~16:00)の吸入ばく露を隔日3回実施した。

#### 4. 全身ばく露吸入装置

##### (1) エアロゾル発生装置

動物へのばく露は既設の Taquann 直噴全身吸入装置 Ver3.0を使用した(共同開発 柴田科学株式会社、特許所得済)。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。

NM202 の原末を35℃に加温した tert-butyl alcohol(TBA)加えて3 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。この懸濁液をインナーカートリッジに分注した。低濃度群では6.7

mL/cartridge、高濃度群では 20 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 1 に記載した。

## (2)ばく露チャンバー

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した。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。

## 5. 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)を設置して低濃度群では 5.09 倍、高濃度群では 6.54 倍希釈した。

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、φ55 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、φ55mm、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 1 時間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 90L(1.5 L/min × 60min)から 1 m<sup>3</sup> 当りの質量濃度を算出した。のフィルターの秤量にはマイクロ天秤(XP26V、METTLER TOLEDO)を使用した。サンプリングは、10 時～11 時、12 時～13 時及び 14 時～15 時に実施し、3 回の平均値を代表値とした。

## 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(μ

m); 10、5.6、3.2、1.8、1.0、0.56、0.32、0.10、0.18、0.056、0.032、0.018、0.01)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(令和 3 年 5 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

NM202 の 5 回の全身ばく露吸入実験における平均質量濃度は、低濃度群;  $6.9 \pm 0.4 \text{ mg/m}^3$ 、高濃度群;  $25.1 \pm 6.4 \text{ mg/m}^3$  (平均値  $\pm$  SD) であった。MMAD は 2 回測定を実施し、その平均値は低濃度群;  $562 \text{ nm}$  (og: 2.7~2.9)、高濃度群;  $709 \text{ nm}$  (og: 2.4~2.5) であった(表 1)。

6 時間の吸入ばく露実験において使用した検体の総量と 6 時間の曝露チャンバーの総換気量 ( $11.7 \text{ m}^3$ ) から計算される名目上の濃度は低濃度群、高濃度群それぞれ  $151.2 \text{ mg/m}^3$ 、 $451.3 \text{ mg/m}^3$  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 4.7%、5.4% であった。

ばく露開始前に実施した群分け時のマウスの体重の平均値は、対照群、低濃度群、高濃度群それぞれ  $24.8 \pm 1.1 \text{ g}$ 、 $24.8 \pm 1.3 \text{ g}$ 、 $24.7 \pm 1.2 \text{ g}$  であった。ばく露後 4 週では  $28.4 \pm 1.3 \text{ g}$ 、 $28.7 \pm 1.8 \text{ g}$ 、 $28.0 \pm 1.6 \text{ g}$ 、ばく露後 8 週では  $30.7 \pm 1.3 \text{ g}$ 、 $31.3 \pm 2.6 \text{ g}$ 、 $30.7 \pm 2.2 \text{ g}$  であり、ばく露の影響はみられなかった(図 1)。

ばく露終了直後の肺重量は、対照群、低濃度群、高濃度群それぞれ、 $118.8 \pm 0.8 \text{ mg}$ 、 $129.0 \pm 12.9 \text{ mg}$ 、 $139.1 \pm 3.1 \text{ mg}$ 、ばく露後 4 週では  $115.8 \pm 3.5 \text{ mg}$ 、 $122.4 \pm 4.1 \text{ mg}$ 、 $124.0 \pm 1.8 \text{ mg}$ 、ばく露後 8 週では、 $123.7 \pm 3.0 \text{ mg}$ 、 $127.8 \pm 4.9 \text{ mg}$ 、 $127.2 \pm 2.6 \text{ mg}$  であり、ばく露終了直後から 4 週目までは用量依存的に肺重量が増加傾向にあり、高濃度群では統計学的に有意であったが、8 週後ではばく露の

影響は見られなかった(図 2)。

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(東京科学大学、石丸直澄 教授)に提供した。

## D. 考察

これまで、*in vitro* 実験において影響が異なるナノシリカ三種類(NM201、NM202、NM204)について吸入曝露実験を実施した。目視観察において、NM202 は三種類のナノシリカの中で最も微細な粒子である。MMAD はこれを反映しており、NM201 と NM204 がそれぞれ 1,650~2,030nm、1,439~1,468nm であるが NM202 は 507~667nm であった。一方、エアロゾル化効率は、NM201、NM204 がそれぞれ 14.8~21.3%、16.2~19.6%であるのに対して NM202 は 4.7~5.4%と低値を示した。NM202 は機器への付着が認められており、微細な粒子であることからエアロゾル化後にトラップされる検体が多かったことが原因と推察される。

NM202 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が、肺重量に関しては、NM202 投与群において増加傾向が認められた。

## E. 結論

NM202 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;  $6.9 \pm 0.4$  mg/m<sup>3</sup>、高濃度群;  $25.1 \pm 6.4$  mg/m<sup>3</sup> を達成した。MMAD は低濃度群、高濃度群ともに 3  $\mu$ 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とばく露 4 週後の高濃度群で有意な増加がみられたが、8 週後では変化はみとめられなかった。

なお、本分担研究では気道感作物質の *in vivo* 評価方法の開発も実施する計画である。R5 年度には、油性溶媒に溶解して、ミスト発生供給装置 NB-2N 型(二流体式アトマイザー)による方法を検討したが、ミスト化に使用する圧縮空気に含まれる水蒸気の影響を除くことが難しく、また、実験環境への汚染防止

策も現状では十分な対策ができないため気管内投与法の検討を行った。R6 年度は、陽性対象物質となる TDI 及び TMA の気管内投与に使用する検体の調製方法について検討を行った。TDI 及び TMA は水を含むと容易に加水分解される。そのため、種々の油性溶媒を検討した結果、アマニオイルを用いメノウ乳鉢にて分散させることで良好な調整検体を得ることが可能となった。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Yuhji Taquahashi, Ken-ich Aisaki, Koichi Morita, Kousuke Suga, Satoshi Kitajima: Application of the matrix profile algorithm for detecting abnormalities in rat electrocardiograms. *Fundam. Toxicol. Sci.* 2024; 11(6): 289-296. [doi.org/10.2131/fts.11.289]

Makiko Kuwagata, Yuko Doi, Hirokatsu Saito, Mariko Tsurumoto, Toshime Igarashi, Takuya Nishimura, Yuhji Taquahashi, Yoko Hirabayashi, Satoshi Kitajima: A 90-day repeated oral dose toxicity study of p-cymene in rats. *Fundam. Toxicol. Sci.* 2024; 11(4): 169-181.[doi.org/10.2131/fts.11.169]

### 2. 学会発表

Taquahashi Y, Aisaki K, Morita K, Kousuke Suga K, Tsuji M, Kitajima S, Application of Matrix Profile Algorithm for Detecting Abnormalities in Waveform Data with Repetitive Patterns to Electrocardiograms, 第 51 回日本毒性学会学術年会(2024.7.4)福岡

北嶋 聡, 高橋 祐次, 相崎 健一, 菅野 純: フグ毒テトロドトキシンを単回経口投与した際のマウス肝及び海馬 Percellome トキシンコゲノミクス. 第 51 回日本毒性学会学術年会(2024.7.3)福岡

Yuhji Taquahashi, Koichi Morita, Kousuke Suga, Masaki Tsuji, Makiko Kuwagata, Ken-

ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Development of a telemetry unit for measuring rat biopotential: easy to attach, less invasive by using carbon nanotube yarn (CNT-Y) as a surface electrode, 64th Society of Toxicology Annual Meeting, , Abstract Number/Poster Board number 4246/P762, 2025.3.18,Orland

## **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 吸入ばく露実験条件のまとめ

NM202 (6hr/day for 5th consecutive day)		Mean	SD
Mass Concentration (mg/cubic meter)	Low Concentration	6.9	0.4
	High Concentration	25.1	6.4
Nominal Mass Concentration (mg/cubic meter)	Low Concentration	151.2	
	High Concentration	451.3	
Aerosolization efficiency (%)	Low Concentration	4.7	0.3
	High Concentration	5.4	1.5
MMAD (nm, Model125, KANOMAX, N=2)	Low Conc. Day 2nd	515	$\sigma$ : 2.9
	Low Conc. Day 4th	609	$\sigma$ : 2.7
	Low Conc. mean	562	
	High Conc. Day 2nd	709	$\sigma$ : 2.4
	High Conc. Day 4th	709	$\sigma$ : 2.5
	High Conc. mean	709	

**Experimental condition**

Load of NM202 per cartridge	Low	20 mg
	High	60 mg
Exposure time		6 hr/day
Injection interval		4 min
Number of cartridge used for 6hr exposure		88
Ventilation air volume in a main chamber		32.5LPM

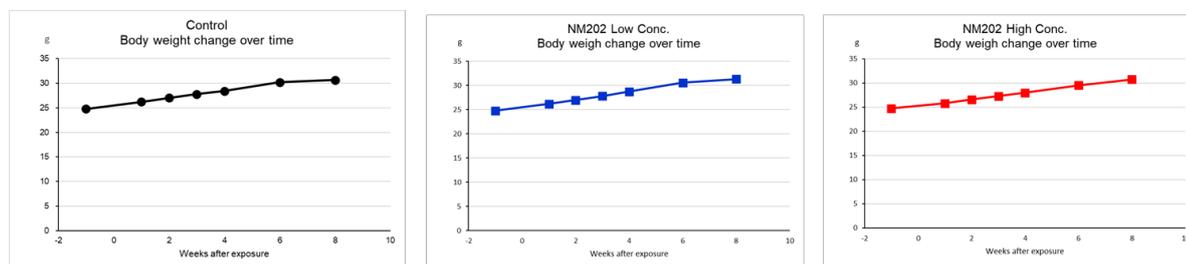
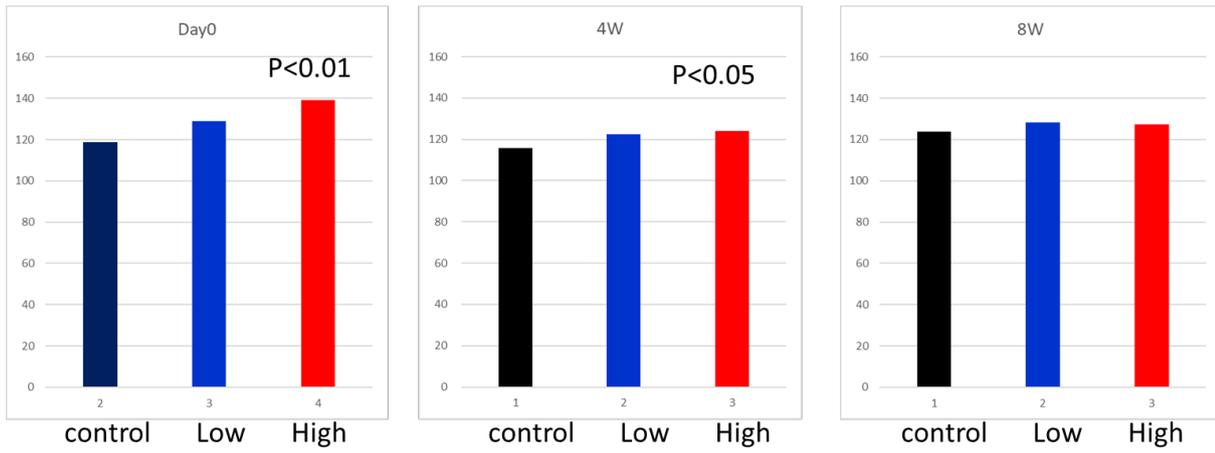


図 1 マウス体重推移

ばく露後 8 週までの間、吸入ばく露による影響はみられなかった。



## 図2 肺重量の変化

5日間ばく露終了直後の肺とばく露4週後の高濃度群で有意な増加がみられたが、8週後では変化はみとめられなかった。