

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2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
	森田 紘一	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部	
	辻 昌貴	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部	
	菅 康佑			
	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。最初に、今年度実験に用いる針状酸化チタンの検体（TiDW）の分散方法の検討を行った。Taquann 法は第三級ブチルアルコール（TBA）を分散媒として液相で検体を分散、効率的に濾過を行い、凍結乾燥により表面張力による検体の再凝集を防ぎ乾燥検体を得る。乾燥検体の収率を上げるためには検体と TBA の混合液を超音波処理により十分に分散させる必要があるが、過剰な超音波処理は検体を破壊し繊維長を短くする可能性がある。そのため、超音波処理時間の検討を行い、各処理検体の繊維長を走査型電子顕微鏡像により計測を行って比較した。TiDW は TBA と容易に混合し超音波処理（40W）により分散可能であった。TiDW の原末の繊維長 $6.9\pm 3.4\mu\text{m}$ 、直径は $361.3\pm 108.6\text{nm}$ であった。一方、2 分間、15 分間の超音波処理における繊維長は、それぞれ $7.0\pm 3.3\mu\text{m}$ 、 $7.0\pm 3.5\mu\text{m}$ であり、原末と同等の繊維長、分布が維持されていた。次に、TiDW を検体として、目標濃度 $30\text{mg}/\text{m}^3$ 、動物は C57BL/NcrSlc 雄性マウス 12 週齢を使用し、6hr/day、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。ばく露実験の結果、実際のばく露濃度は、 $25.0\pm 3.4\text{mg}/\text{m}^3$ 、MMAD は $2,251\text{nm}$ (σ : 3.2~3.9) 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（肺と縦隔）負荷量の測定、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。今後、肺負荷量、病理組織評価を行い、TiDW の吸入ばく露による生体影響を明らかにする計画である。

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。まず、今年度実験に用いる針状酸化チタンの検体 (TiDW) の分散方法の検討を行い、繊維長が原末と同等であることを確認し、5日間連続の全身ばく露吸入実験を行った。

B. 研究方法

B-1 検体の高分散化処理の条件検討

1. 被験物質:

被験物質として、針状酸化チタン TiDW を使用した。

2. 検体処理の条件検討:

TiDW の原末 500 mg をビーカーに入れ、35°Cに加熱して溶解した TBA500 mL を加えて懸濁液を調整した。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。超音波処理前の懸濁液 (0 分)、並びに超音波処理後

の懸濁液 (2 分、15 分) をそれぞれ 10 mL を分注し、形態観察に用いた。

3. TiDW の形態観察:

アルミナフィルター (Anodisc、孔径 0.02 μm 、 ϕ 12mm、ワットマン) をロート型ガラス濾過器 (51G-1、三商) に載せ、ピペッティングにより十分に分散させた Taquann 法処理 TiDW 懸濁液 1 mL を滴下し吸引濾過した。フィルターを室温で乾燥し、真鍮製 SEM 観察台 (S-GA、 ϕ 15 \times 5 mm、日新 EM) にカーボンシール (ϕ 12 mm、日新 EM) で固定した。オスミウムコーター (HPC-1SW 型、真空デバイス) により 5 秒間処理を行い走査型顕微鏡 (VE-9800、KEYENCE) によって 2500 倍、加速電圧 2~2.5 kV の条件で観察した。TiDW の繊維長の計測は ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) を用いて行った。

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。このマウスは当研究部において、MWCNT を含めてナノマテリアルの吸入ばく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. 飼育条件:

飼育ケージは、ポリカーボネイト製の 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°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、飲水は市水をフィルター濾過し自動給水装置により自由摂取させた。

ケージ内の環境を改善する目的で、シェパードシャック（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）、TiDW ばく露群の 2 群構成とした。目標濃度は 30 mg/m³ 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、既設の Taquann 直噴全身吸入装置 Ver 3.0 を使用した（共同開発 柴田科学株式会社）。

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、TiDW

の tert-butyl alcohol (TBA)懸濁液(1mg/mL)を調整し、TBA 懸濁液を各カートリッジに 10 mL 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。

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 (mg/m³) 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 10 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、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 L/min × 120min = 180 L から 1 m³ 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 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 20 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。

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(DSファーマアニマルヘルス)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1mL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 検体の高分散化処理の条件検討

TiDW 原末とTBAを混合し、超音波処理良好な懸濁液を得た。走査型電子顕微鏡による観察の結果、TiDWの原末の繊維長 $6.9\pm 3.4\mu\text{m}$ ($N=223$)、直径は $361.3\pm 108.6\text{nm}$ ($N=105$)であった(図1A、図2A、2B)。一方、超音波処理2分間、15分間における繊維長は、それぞれ $7.0\pm 3.3\mu\text{m}$ ($N=245$)、 $7.0\pm 3.5\mu\text{m}$ ($N=240$)であり、原末と同等の繊維長、分布が維持されていた(図1B、2C、2D)。

TiDWの繊維長のヒストグラムから、 $2.5\mu\text{m}$ 以下の繊維は5.4%、 $5\mu\text{m}$ 以上は94.6%、 $10\mu\text{m}$ 以上は17.9%であった。

C-2 マウス全身ばく露吸入実験

TiDW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 $25.0\pm 3.2\text{mg}/\text{m}^3$ (平均値 \pm SD)であった。3回の測定を行ったMMADは $2,251\text{nm}$ (σ :3.2~4.9)であった(表2、図3)。エアロゾルの累積分布から、粒子径 $1,000\text{nm}$ から急激に立ち上がる分布であった。6時間の吸入ばく露実験において使用した総検体量は、880mgである。6時間の曝露チャンバーの総換気量は 11.7m^3 であることから名目上の濃度は $75.4\text{mg}/\text{m}^3$ と計算される。実際に測定した濃度の平均は $25.0\text{mg}/\text{m}^3$ から、エアロゾル化効率を計算すると33.1%であった。

CPCのデータは、6時間のばく露実験の後半で値が低下する傾向にあった(図3)。

なお、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4)。

D. 考察

粒子状物質の吸入において、粒径は内径が徐々に狭くなる鼻腔から肺胞に至る各部位への沈着量を定める重要な因子であり、一般に MMAD を指標としている。微細な粒子は肺胞まで到達するが、大きな粒子は気道の上層部で効果的に除去される。ヒトが現実的にナノマテリアルにばく露される環境下では、緩徐な風速であるため気相にナノマテリアルの凝集体/凝固体は速く沈降する。また、ヒトの上気道は長いいため、凝集体/凝固体が効果的に取り除かれて肺胞レベルには高度に分散されたものが優先的に到達すると想定される。一方、実験動物を用いた粉体の吸入ばく露試験では、エアロゾルの均一性を保つためチャンバー内の空気は強く攪拌されている。凝集体/凝固体を含む検体をエアロゾル化すると、ヒトに比較して細く短い気道を有するげっ歯類では、この凝集成分が気道末梢の比較的近位に捕捉されるため、それよりも末梢の肺胞レベルへの単離繊維の吸入を阻害あるいは肺胞病変を修飾する可能性がある。以上のことから、吸入ばく露試験において実験動物からヒトへの外挿性の高いデータを得るためには、凝集体/凝固体を除去した上で分散性が高い検体を使用する必要がある。

本分担研究で用いた Taquann 法は TBA を用いて液相で検体を分散、効率的に濾過を行い、凍結乾燥により表面張力による検体の再凝集を防ぎ乾燥検体を得ることを特徴としている。検体の物理化学的性質に依存しない汎用性の高い方法である。濾過工程における検体の収率を上げるために

は検体と TBA の混合液を超音波処理により十分に分散させる必要があり、ナノマテリアルでは超音波処理が汎用されている。超音波処理は溶液中に圧力差によるキャビテーションを発生させることで、溶液中の物質に激しい衝撃を与えて分散を図る方法であるため、強力な超音波処理では、TiDW の繊維長に影響を与える可能性がある。繊維状物質は、粉体とは異なり、繊維長に依存した生体反応を有するため繊維長の分布が処置後も保持される点は重要であると考えられる。

その代表例がアスベストによる中皮腫発がんである。過去にアスベスト代替品が多数開発された際に、これらの中皮腫誘発性と繊維長、繊維径との関係がラット腹腔内投与により検討されている。その結果、繊維長が 10 μm 程度、直径が 100 nm 程度の線維の中皮腫誘発性が高いことが示されている (Stanton & Pott 仮説、1978)。一方、ナノマテリアルの生体影響評価の初期には、ナノマテリアルを分散することに注力した実験が行われ、その結果、過度な分散処理により原末の繊維長を短くするまで機械的分散処理を行い、多層カーボンナノチューブに中皮腫発がん性がないと結果された報告がある (Muller J et al., 2009)。

本分担研究では、原末の繊維長を維持した状態で高分散検体を得るため、分散条件のなかで最も影響の大きい超音波処理時間の検討を行い、各処理検体の繊維長を走査型電子顕微鏡像により測定して比較した。TiDW は TBA に比較的容易に分散し、少なくとも 15 分の超音波処理により繊維長が短縮することは認められなかったことから、原末の繊維長を維持した高分散検体を得ることが達成できた。

全身ばく露吸入実験では、既設の

Taquann 直噴全身吸入装置 Ver 3.0 を使用した。本装置では、以前のバージョンに改良を行い、カートリッジ装填を自動化することにより OECD 吸入毒性ガイドライン (TG413) で必要とされる 6 時間/日の吸入ばく露を可能とした装置であるが、連日稼働させる検討には至っていなかった。今年度、5 日間連続稼働を達成したことにより、より広い範囲の条件でばく露実験が可能であることが示された。一方、排気装置フィルターの負荷が大きくなり、HEPA フィルターの交換を頻繁に実施することが必要となるなど、連続稼働を行う際の課題も明らかになった。これは、粉体の吸入ばく露装置に共通の課題であるが、効率的に実験を進めるためには排気フィルターの大型化に加えて、容易に交換可能な排気フィルター装置の開発が必要かもしれない。

TiDW のエアロゾル特性のうち、MMAD_{2,251 nm} であり肺胞領域まで到達可能とされる MMAD_{2,251 nm} < 3 μm を達成している。エアロゾルの粒径分布の指標となる σ_g は 3.2~4.9 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ことが示唆される。エアロゾルの累積分布 (図 3) において明らかであるように、TiDW エアロゾルは、累積粒子径が 1000nm から急激に立ち上がる分布であるため、このような値を示すと考えられる。CPC はばく露の後半で値が低下する傾向にあった。この理由として、ばく露チャンバー内からのサンプリングに用いている管の目詰まりが考えられた。

TiDW 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。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、TiDW の影響を明らかにする計画である。

E. 結論

TiDW の高分散乾燥検体の調製方法を確立した。この検体を用いて、マウスに 1 日 6 時間、5 日間連続全身ばく露吸入を実施した。その結果、25.0mg/m³ の質量濃度で、MMAD_{2,251 nm} のエアロゾルを発生することが可能であった。

F. 研究発表

F-1. 論文発表

- 1) Hojo M, Yamamoto Y, Sakamoto Y, Maeno A, Ohnuki A, Suzuki J, Inomata A, Moriyasu T, Taquahashi Y, Kanno J, Hirose A, Nakae D, Histological sequence of the development of rat mesothelioma by MWCNT, with the involvement of apolipoproteins, *Cancer Sci*, 2021 Mar 4. doi: 10.1111/cas.14873.
- 2) Yamamoto E, Taquahashi Y, Kuwagata M, Saito H, Matsushita K, Toyoda T, Sato F, Kitajima S, Ogawa K, Izutsu KI, Saito Y, Hirabayashi Y, Imura Y, Honma M, Okuda H, Goda Y, Visualizing the spatial localization of ciclesonide and its metabolites in rat lungs after inhalation of 1-μm aerosol of ciclesonide by desorption electrospray ionization-time of flight mass spectrometry imaging. *Int J Pharm.* 2021 Feb 15;595:120241. doi: 10.1016/j.ijpharm.2021.120241. Epub 2021 Jan 21.
- 3) 高橋祐次、ナノサイズプラスチックの評価、*BioIndustry*, 37(9)、p59-67、2020

F-2. 学会発表

- 1) 高橋 祐次、種村 健太郎、相崎 健一、北嶋 聡、急性毒性試験の近代化によるテトロドトキシンの中枢影響評価、第

- 47 回日本毒性学会学術年会(2020.6.29.) Web 開催、シンポジウム、口演
- 2) 大久保 佑亮、嘉本 海大、高橋 祐次、北嶋 聡、太田 裕貴、覚醒下非拘束ラットから血中酸素飽和度・心拍数・呼吸数を計測可能なウェアラブルパルスオキシメーターの開発、第 47 回日本毒性学会学術年会(2020.6.30.) Web 開催、口演
- 3) Yuhji Taquahashi, Satoshi Yokota, Koichi Morita, Masaki Tsuji, Makiko Kuwagata, Motoki Hojyo, Akihiko Hirose, and Jun Kanno, Interim report of four-week interval intermittent inhalation study on multi-walled carbon nanotube in mice, 9th Nano Conference November 12th 2020 Virtual Meeting、Web 開催、ポスター
- 4) 高橋祐次、森田紘一、辻 昌貴、菅 康佑、相崎健一、大久保佑亮、種村健太郎、北嶋 聡、シンポジウム 4 『医薬品以外の毒性から学ぶ』、急性毒性試験の近代化による毒性機序研究、日本毒性学会医薬品毒性機序研究部会主催、第 3 回医薬品毒性機序研究会 (2021.1.15) Web 開催、口演
- 5) Yuhji Taquahashi, Satoshi Yokota, Koichi Morita, Masaki Tsuji, Makiko Kuwagata, Motoki Hojyo, Akihiko Hirose, and Jun Kanno, Interim report of the 4-week-interval intermittent whole body inhalation study on multi-walled carbon nanotube in mice, SOT 2021 Annual Meeting Virtual (2021.3.17) Web 開催、ポスター
3. その他
なし

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

表 1 群構成

Group	Examinations	Necropsy after inhalation exposure			
		N	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			
TiDW 25 mg/m ³ 6hr/day for 5days	• Lung Burden	9	3	3	3
	• Histopathology(perfusion)	6	2	2	2
	• Immune function	10	0	5	5
	subtotal	25			

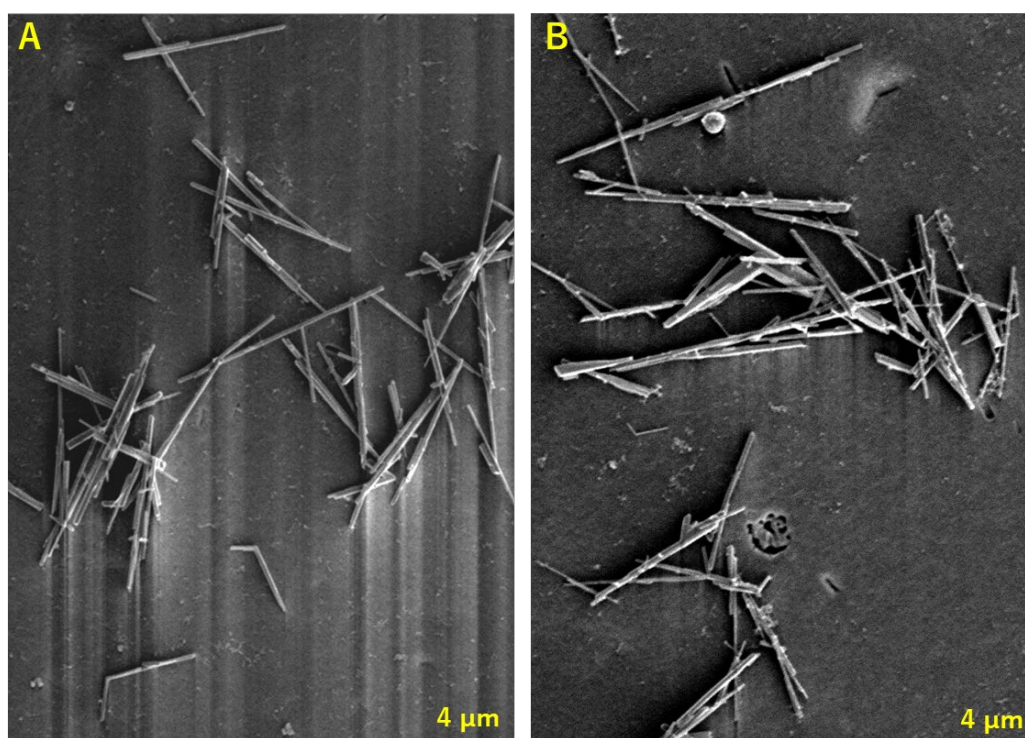


図 1 TiDW の走査型電子顕微鏡像

iDW 検体を TBA に懸濁し、超音波処理により分散処理した検体をアルミナフィルター (Anodisc、孔径 0.02 μm、φ12mm、ワットマン) に捕捉し、オスミウムコーター (HPC-1 SW 型、真空デバイス) により 5 秒間処理を行い走査型顕微鏡 (VE-9800、KEYENCE) によって 2500 倍、加速電圧 2~2.5 kV の条件で観察した。A : TiDW 原末、B : 15 分の超音波処理検体。

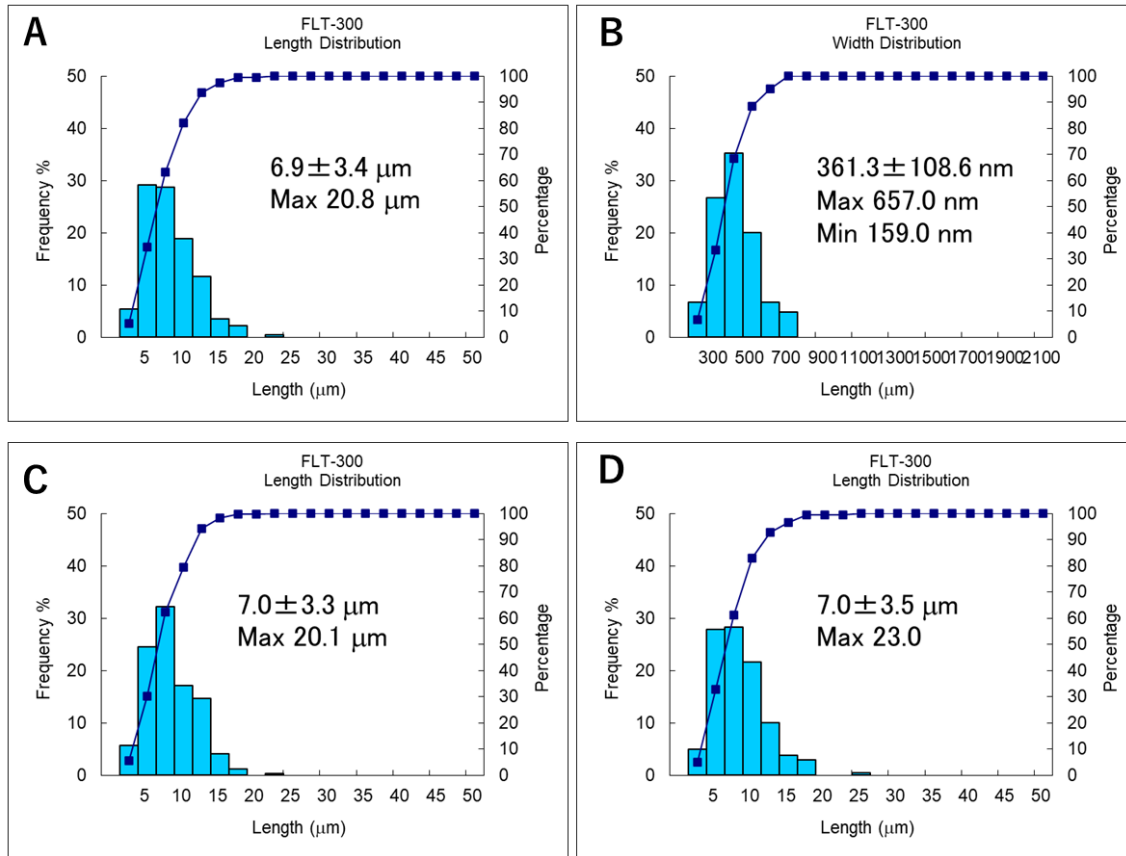


図2 TiDWの繊維長分布

走査型電子顕微鏡による観察の結果 TiDW の原末の繊維長 $6.9 \pm 3.4 \mu\text{m}$ (N=223)、直径は $361.3 \pm 108.6 \text{ nm}$ (N=105) であった (A, B)。一方、2分間、15分間の超音波処理における繊維長は、それぞれ $7.0 \pm 3.3 \mu\text{m}$ (N=245)、 $7.0 \pm 3.5 \mu\text{m}$ (N=240) であり、原末と同等の繊維長、分布が維持されていた (図 C, D)。TiDW の繊維長のヒストグラムから、 $2.5 \mu\text{m}$ 以下の繊維は 5.4%、 $5 \mu\text{m}$ 以上は 94.6%、 $10 \mu\text{m}$ 以上は 17.9% であった。

表2 吸入ばく露実験におけるエアロゾル特性のまとめ

TiDW (6hr/day for 5th consecutive day)	Mean	SD
Mass Concentration (mg/cubic meter)	25.0	3.2
Nominal Mass Concentration (mg/cubic meter)	75.4	0.4
Aerosolization efficiency (%)	33.1	4.1
MMAD (nm, Model125, KANOMAX, N=3)	2251	$\sigma: 3.2 \sim 3.9$
Experimental condition		
Load of TiDW per cartridge	10 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	

CPC count over time

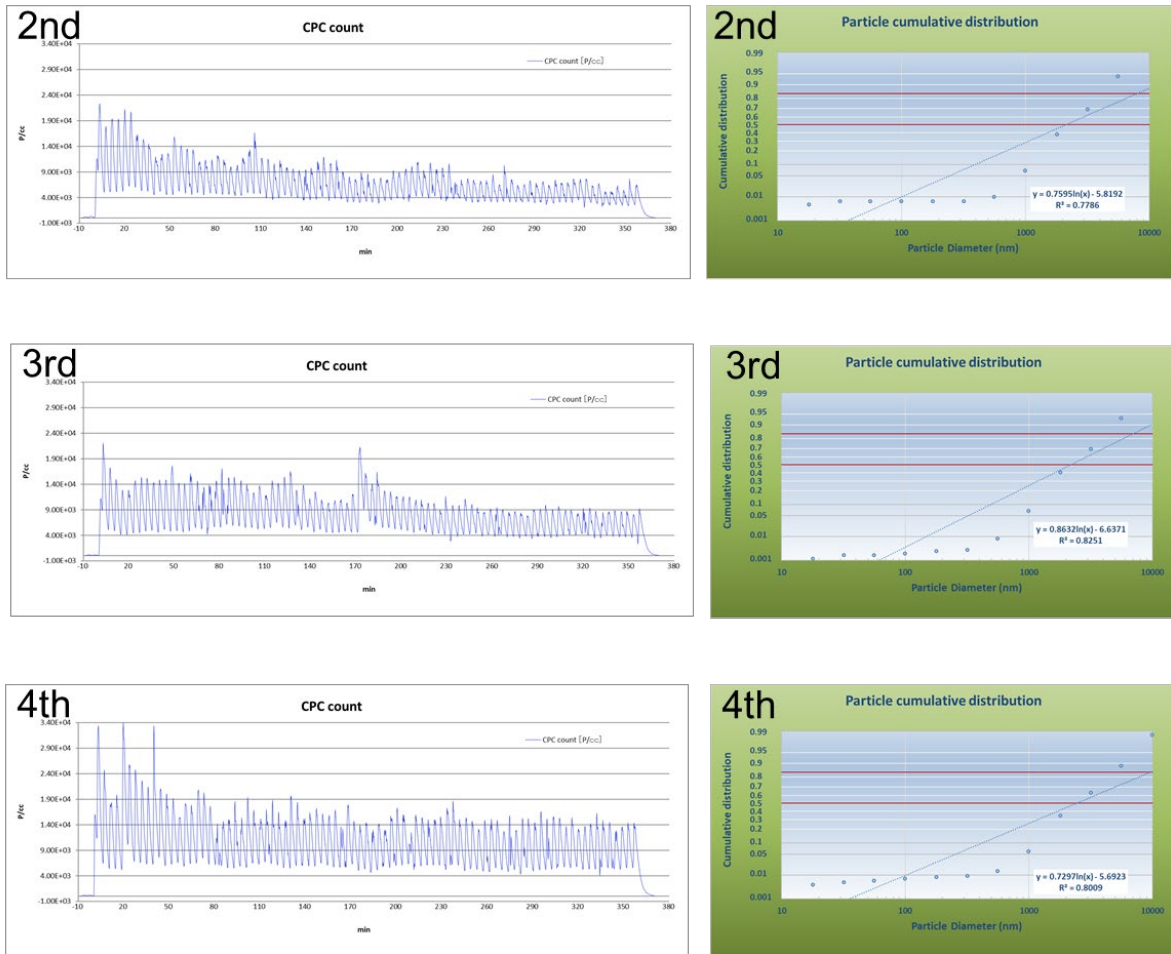


図3 吸入ばく露実験におけるエアロゾル特性 CPCデータとMMAD

CPCは5回のばく露実験全てにおいて、6時間のばく露時間を通して測定した。MMADは2回目、3回目、4回目のばく露実験において測定を行った。CPCはばく露の後半で値が低下する傾向にあった。

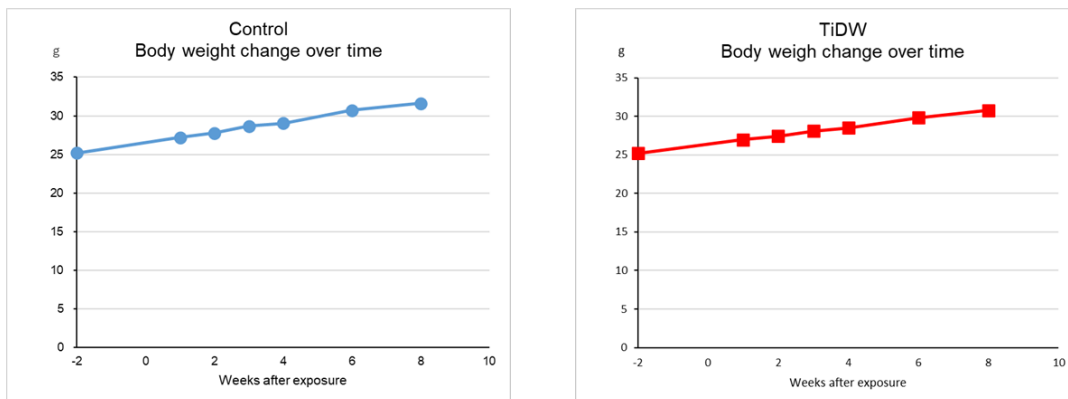


図5 吸入ばく露後のマウス体重推移

全身ばく露吸入後のマウスの体重推移には、対照群とTiDW群の間で有意な影響は見られなかった。