第1回 ナノ材料の安全・安心確保のための
 国際先導的安全性評価技術の開発
 終了時評価検討会
 参考資料5

ナノ材料の安全・安心確保のための

国際先導的安全性評価技術の開発

事業成果詳細

平成28年9月28日

経済産業省製造産業局化学物質管理課

研究実施機関:学校法人慶應義塾 慶応義塾大学、

国立研究開発法人産業技術総合研究所、

日本バイオアッセイ研究センター、学校法人産業医科大学、

一般財団法人化学物質評価研究機構、国立大学法人広島大学、

国立大学法人東京大学、国立大学法人信州大学

目次

用語集			
1. 研究開発目標			
1-1 全体の目標設定			
1-2 個別要素技術の目標設定21			
2. 成果、目標の達成度25			
2-1 成果			
2-1-1 全体成果			
2-1-2 個別要素技術成果 35			
研究開発項目①「ナノ材料の同等性判断のための評価技術の構築」			
(a) 気管内投与試験によるナノ材料の相互比較による			
同等性判断基準の構築			
(b) 同等性評価のための試料調製技術と			
キャラクタリゼーション			
研究開発項目②「初期有害性情報取得のための低コスト・簡便な			
有害性評価技術の構築」			
(a)吸入暴露試験と気管内投与試験の比較検討			
(b-1) 気管内投与試験の標準化に関する検討			
: 手技の標準化に関する検討			
(b-2) 気管内投与試験の標準化に関する検討			
: 単回投与と複数回投与の比較検討			
(c)エアロゾルの安定発生手法の構築			
(d)エアロゾルの液相捕集手法の構築			
研究開発項目③「ナノ材料の有害性試験・評価のための基盤技術の開発	J		
(a−1)ナノ材料の体内分布及び生体反応分布の			
定量化技術の開発			
(a-2)PEAPOD の体内動態計測技術開発			
(b) ナノ材料の体内動態と生体反応に関する			

数理モデルの構築358

(c)培養肺胞モデル評価系の開発と数理モデル化への			
利用方法に関する研究開発	406		
2-1-3 論文、外部発表等	440		
2-2 目標の達成度	463		

3. プロジェクト運営にかかる打合せ類、

	コミュニケーション活動の詳細	467
3 — 1	推進調整会議	467
3 – 2	推進調整会議以外の打合せ...............	463
3 — 3	国民との科学・技術対話などのコミュニケーション活動	471

用語集

8-ヒドロキシデオキシグアノシン(8-OHdG)

DNAの酸化損傷の一つ。DNAを構成する塩基の一つであるグアニンの酸化によって生じる。8-OHdGの生成によって細胞に突然変異が生じる事が報告されており、発がんとの関連性が指摘されている。また、酸化ストレスマーカーとしても用いられている。

ALP

アルカリ性条件下でリン酸エステル化合物を加水分解する酵素の一種で、主に 胆道から分泌される。逸脱酵素の一種で、細胞が傷害を受けると細胞外に流出 するため、BALF 検査において肺胞上皮細胞等の傷害の指標となる。

BALF (Broncho-alveolar lavage fluid、気管支肺胞洗浄液) 検査

呼吸器検査において、生理食塩水等を用いて肺内を洗浄し、回収した洗浄液を 検査する方法。BAL 検査または BAL 法ともいう。回収された液は BALF(気管支 肺胞洗浄液)または BAL 液と呼ばれる。肺胞内の細胞やサイトカインなどの分 泌タンパク質を含み、それを検査することにより肺の炎症反応や傷害等に関す る情報が得られる。

BALF 中総細胞数

BALF 中の好中球、リンパ球、好酸球、好塩基球及びマクロファージの総数。 肺の炎症により総細胞数が増えるため、BALF 検査において肺の炎症反応の指 標となる。

CT

Computed Tomographyの略。コンピュータ断層撮影法。

CT 値

CT における X 線吸収の指標。

DLS

動的光散乱法(Dynamic Light Scattering)により、分散液中の粒子径分布を 計測する装置である。異なる大きさの粒子では分散液中のブラウン運動の速度 が異なることを原理としている。ブラウン運動の速度は、レーザー光の散乱光 により計測する。ナノメートルから数ミクロンの粒子径に対応している。

Flash

Fast low-angle shot の略。MRI の高速撮影法の一つ。繰り返し時間(TR)・フ リップ角(FA)でコントラストを変化させることが可能。

FOV

Field of viewの略。MRI 測定における有効視野。

I SO

国際標準化機構(International Organization for Standardization)のこと。 世界最大の任意規格の作成機関である。ISO という略称は、ギリシア語で「同 等」を意味する「isos」に由来する。1947年に18か国で発足。各国を代表す る標準化機関をネットワークし、電気・電子技術分野を除く全産業分野(鉱工 業、農業、医薬品等)に関して、年に4000程度のプロジェクトを動かし、年 に1000以上の国際規格類を発行している。2012年末現在で、会員は164団体 (各国1団体)、発行した国際規格類は19573、スイス・ジュネーブの中央事 務局には154人の常勤職員が勤務し、3600万スイスフラン(34億円)の運営 経費を要している。日本は、日本工業標準調査会(JISC、工業標準化法第3 条第1項に基づき経済産業省に設置される審議会)が参加している。

LDH (Lactate Dehydrogenase、乳酸脱水素酵素)

ピルビン酸と乳酸との間の酸化還元反応を触媒する酵素の総称で、肝臓や腎臓、 心筋、骨格筋、赤血球等に多く含まれる。逸脱酵素の一種で、細胞が傷害を受 けると細胞外に流出するため、BALF 検査において肺胞上皮細胞等の傷害の指 標となる。

MRI

Magnetic resonance imagingの略。磁気共鳴影像法。

OECD

経済協力開発機構(Organisation for Economic Co-operation and Development) のこと。先進国間の自由な意見交換・情報交換を通じて、1)経済成長、2)貿易 自由化、3)途上国支援に貢献することを目的(「OECD の三大目的」)とする OECD 条約に基づく国際機関である。相互審査(ピア・レビュー)等を通じて「先進 国標準」が醸成されていくところに特色があり、加盟国は、こうした OECD の 活動への参加を通じて、自国の経済・社会政策や制度を調整・改善する機会を 得ている。1961 年9月に発足し、現在、加盟国は34か国。日本は、1964 年4 月に加盟。2012 年の予算額は347 百万ユーロ(345 億円)、事務局には2500 人の職員がいる。本部は、フランス・パリに置かれている。

OECD テストガイドライン

政府・産業界・試験機関によって化学品の安全性を決定するために用いられる、 最も妥当な国際的に合意された試験方法の集合体である。化学品評価のための データ相互受入れ(MAD)に関する 1981 年理事会決定文書[C(81)30]の附属書 Iに収録されている。MAD 制度では、OECD 加盟国や MAD 順守非加盟国でヒトや 環境の保護に関して行われた化学品評価試験の結果は、その試験が OECD テス トガイドラインと OECD 優良試験所基準(GLP)原則に従って行われたのであれ ば、他の加盟国や MAD 順守非加盟国によって受け入れられなければならない。

PBTK モデル

生理学的トキシコキネティック(毒物動力学)モデル(Physiologically Based Toxicokinetic Model)のこと。体内の化学物質濃度の時間変化をシミュレー トするために用いられるマルチ・コンパートメント・モデルの一種である。PBTK モデルでは、各コンパートメントは、臓器や臓器内組織に対応した形で記述さ れる。各コンパートメントにおける物質収支を表す一連の数式から成る。

PEAPOD

カーボンナノチューブの中空に原子・分子あるいは粒子を内包させたもの。 内包物質が規則的配置され透過型電子顕微鏡像があたかもサヤエンドウ内部 のように見えるためこの名称で呼ばれる。本来はえんどう豆の莢の意(PEA; えんどう豆、POD;莢)。

SPSF

標準プロジェクト提出様式 (Standard Project Submission Form) のこと。個別の OECD テストガイドライン又はガイドライン関連文書(ガイダンス文書等) の制定・改正のプロジェクトを WNT が統括する OECD テストガイドライン・プログラム (TGP) の作業計画に加えるために用いられる。制定・改正プロジェクトの詳細な説明及び提案国による作業予定を記述する。

TC229

ISO が 2005 年 6 月に設置したナノテクノロジー専門委員会のこと。TC 229 の

議長は、英国人サイモン・ホランド博士、事務局は、英国規格協会(BSI)、投 票権をもった P メンバが 34、投票権のない 0 メンバが 13 となっている。JWG1 用語・命名法、JWG2 計測・キャラクタリゼーション、WG3 健康安全環境及び WG4 材料規格の四つの作業グループ(WG) がある。JWG1 と JWG2 は、国際電気 標準会議(IEC) が 2006 年に設置した「電気電子製品・システムのナノテクノ ロジー標準化技術委員会」(TC 113) との合同 WG である。2013 年 8 月 1 日時 点で、34 点の標準化文書を発行している。日本の参加団体 JISC は、TC 229 の P メンバであり、JWG2 のコンビーナ(主査)とセクレタリ(幹事)を出し ている。発行済み標準化文書 34 点の提案国では、JISC が 9 点で最多である。

Toll 様受容体

Toll 様受容体は動物の細胞表面にある受容体タンパク質で、種々の病原体を 感知して自然免疫を作動させる機能がある。

WNT

テストガイドライン・プログラムのナショナル・コーディネーター作業部会 (Working Group of National Co-ordinators of the Test Guidelines Programme)のこと。化学品合同会合(JM)の下で、OECDの環境健康安全(EHS) プログラムのテストガイドライン・プログラム(TGP)を統括する組織であり、 加盟国や MAD 順守非加盟国の政府が指名するナショナル・コーディネーターを メンバとする。

WPMN

工業ナノ材料作業部会(Working Party on Manufactured Nanomaterials)の こと。OECD 化学品委員会に 2006 年設置した組織であり、OECD の環境健康安全 (EHS) プログラムの工業ナノ材料の安全性に関する活動を統括する。個別の 工業ナノ材料の有害性評価を確立することを目的としておらず、化学物質管理 法令に基づく工業ナノ材料の評価のツールとして、現行の OECD テストガイド ラインへの追加や修正が必要かどうかというのが主要な問題意識である。現在、 知見の集積のためのこれまでの活動から規制面を意識した活動へ転換してい くとの方針の下、プロジェクト及びその運営グループを「工業ナノ材料の試験 と評価」、「リスク評価と規制プログラム」、「暴露計測と暴露低減」及び「環境 上持続可能なナノテクノロジーの利用」の四つに再編する途上にある。

XRF(蛍光X線分析)

物質に一定以上のエネルギーをもつX線を照射すると、その物質を構成する原

子の内殻電子が励起されて空孔が生じ、そこに外殻の電子が遷移する際に X 線が放出される。これを蛍光 X 線と呼ぶ。蛍光 X 線は各元素に固有のエネルギ ーを有していることから、それを計測することにより、測定試料を構成する元 素の分析を行うことができる。

X線

電磁波のひとつ。波長が短く(0.01~100Å)、透過性が強い。医療診断や物質 構造の検査に広く利用される。レントゲン線。

アナターゼ

二酸化チタンの結晶構造の一種。アナターゼ型は光触媒活性が強く、光触媒の 他、工業用触媒担体塗料等に用いられる。

アルブミン

蛋白質の一種。100 種類以上知られている血清中蛋白の約 70%近くを占め、最 も単純量が多い蛋白質。BALF 検査において血管透過性の亢進等の炎症反応の 指標となる。

イソフルラン

ハロタンに代わる、安全性、調節性に優れた吸入麻酔薬

一次粒子

粉件系の最も基本となる粒子は、一定の比重と形態を持った単一結晶であり、 一次粒子といい、これらが凝集して形成された粒子を二次粒子という。しかし ながら、一般的な粉体系における粒子では、そうでもないものも多く、外見上 の幾何学的形態から判断して、単位粒子と考えられるものを一次粒子と称する こともある。

炎症反応

刺激や傷害等に対する一連の生体防衛反応。発赤、熱感、疼痛、腫脹、機能障 害等を伴い、好中球の浸潤を主体とする急性炎症(非特異的防衛反応)及びリ ンパ球の反応を主体とする慢性炎症(特異的防衛反応)がある。

オーバーロード

肺には、マクロファージなどの貪食細胞を介した粒子状物質の排泄機構が備わっているが、その能力には限りがある。過剰な量を肺に投与すると、通常機能

する排泄機構が働かず(肺からの消失の遅延として観察される)、持続性の炎 症等の重篤な影響が生じることがある。オーバーロードは、ナノ材料自体の有 害性というよりも、不溶性の粒子状物質にある程度共通の性質である。

カルチャーインサート

透過性メンブレン上に細胞を培養することにより、メンブレン上下を細胞で区 切り、より in vivo に近い条件で培養することが可能な培養器。三次元培養、 細胞遊走/浸潤アッセイ、薬物透過アッセイなどに用いられる。

慣性衝突

エアロゾル粒子は同伴ガスの流れに伴い移動する。しかし気流の向きが変わる と、十分な慣性を持つエアロゾル粒子はガスの流れから逸脱する。逸脱した粒 子の方向に壁が存在すると衝突する。これを慣性衝突と呼び、エアロゾルの損 失の原因の一つとなる。

灌流固定

生物試料に対する化学固定の一方法。仮死状態の動物の心臓に固定液を注射し 血流に乗せて固定する。固定液が瞬時に全身に行き渡り、組織が固定される時 点まで生きているため、形態保持の点で利点がある。

気液界面培養

実際の肺胞表面は薄い肺胞内腔液に覆われた上で気体にさらされ、気液界面を 形成しているが、それと同様に肺胞上皮細胞上部は気体、下部は液体になるよ うにカルチャーインサート上に培養することにより気液界面を形成した状態 で細胞を培養すること。

気管支関連リンパ組織 (BALT: bronchus-associated lymphoid tissue) 肺内にある気管支に随伴して認められるリンパ組織

気管支肺胞洗浄液 (BALF)

→「BALF 検査の項」を参照

気管内投与試験

ラットをはじめとする動物に、麻酔下で気管内にゾンデを挿入し、ナノ粒子などの化学物質を気道内に直接注入投与する暴露方法。

気中イオン

気中イオンとは大気中の電離作用(放射線による電離やコロナ放電など)によって生成される荷電粒子である。気中の分子(N₂、0₂、H₂0など)が電離されると、N₂⁺、0₂⁺、0₂⁻やH₃0⁺(H₂0)_nなどの電荷を持つクラスターイオンが生成される。正の電荷を持つものは「正イオン」、負の電荷を持つものは「負イオン」と呼ぶ。気中イオンがエアロゾル粒子に付着するとエアロゾル粒子を荷電させる。

輝度

露光操作で設定された光の量を定義するカメラのコントロール機能。輝度を大きくすると撮像された画像密度は減る。

吸入暴露試験

ナノ粒子などの化学物質をチャンバーなどの密閉された空間で気中に噴霧し、 その中に容れた動物の自然な呼吸によって吸入させる暴露方法。

凝集成長

大気中で雲が生成する過程と同様に、過飽和状態の気体分子が気中に浮遊する 粒子(エアロゾル粒子)を核として結露し、液滴へと成長する現象。

凝縮粒子カウンター

エアロゾル中の粒子数濃度(単位体積中に含まれる粒子の総個数)を測定する 装置。対象粒径域は約 10 nm~1 µm。サンプルされたエアロゾル粒子に、過 飽和状態の作動液蒸気を凝縮させ数マイクロメートルの液滴へと成長させ、光 散乱により一個一個計数する。粒子計数値をサンプルされたエアロゾルの体積 で割算することにより、粒子数濃度を算出する。

空間分解能

2つの物体が2つに分離して測定できる限界長さ、距離、または装置の能力。

空気力学径

空気などの粘性をもつ流体中にある、粉粒体の粒子の大きさ(粒径)を表す量の一つである。不規則な形をした粒子の直径を測ることは一般には難しいため、 その粒子と終末沈降速度が等しい密度 1 g/cm³の球の直径を空気動力学径と よび、粒子の大きさとして代用する。

空気力学径スペクトロメータ

粒径約0.5~20µmの範囲で粒子数濃度の粒径分布を測定する装置。サンプル された個々のエアロゾル粒子を装置内ノズルで加速し、この粒子が一定距離を 通過するために要した時間より空気力学粒径を求める。このプロセスを繰り返 し空気力学粒径の頻度分布を構築し、これを粒径分布とする。粒径の定義とな っている空気力学粒径とは、重力沈降と空気粘性抗力がバランスした状態での 粒子の沈降速度より、粒子の質量密度が1g/cm³であることを仮定して算出さ れる粒径。

クーロン爆発・レーリー限界

単極気中イオンとエアロゾル液滴が混在すると、液滴はイオンの付着によって 荷電される。すると、液滴内に電荷間の斥力が発生する。この斥力は液滴の荷 電量が増加するに連れて増大する。液滴の表面張力よりも電荷間斥力が強くな ると、液滴は破砕し、小さな液滴になる。この液滴破砕現象をクーロン爆発 (Coulomb explosion)と呼ぶ。またこの時の荷電量をレーリー限界 (Rayleigh limit)と呼ぶ。

クリアランス

全身や臓器から薬物等が消失すること。吸入暴露や気管内投与したナノ材料の 肺からのクリアランスは、マクロファージによる貪食、気道での繊毛運動、肺 以外の臓器への移行による。肺での残留量を経時的に測定することにより観察 される。

繰り返し時間

TR; repetition time。励起パルスから次の励起パルスまでの時間。 画像撮影におけるコントラスト調整に利用される設定のひとつ。

蛍光X線

→「XRFの項」を参照

血液学的検査

血液中の赤血球数、白血球数、血小板数の測定や血液細胞の形態観察、凝固・ 線溶系の測定等をする検査。貧血や炎症、血栓症等の有無及びその種類が推測 できる。

血液生化学的検査

血液中の酵素、脂質、糖質、無機質、ホルモン等を測定する検査。肝臓、腎臓、 内分泌系等の異常が推測できる。

抗原抗体反応

抗原(外から侵入した異物)と抗体(抗原に対抗するために体が作りだした物 質)との間でおこる反応。身体を外からの異質物(異物)から守るために、こ の異質物を異質と認識し、無毒化もしくは排泄等の生体反応。

好中球

好中球は白血球の種類の一つ。中性色素に染まる殺菌性特殊顆粒を持つ顆粒球 である。旺盛な食作用を示し、細菌などを貪食し、感染防御に機能する。貪食 された細菌はミエロペルオキシダーゼ(MPO)の働きなどによって強い酸化ス トレスにさらされ、殺菌される。

好中球比率

試料中に含まれる白血球数に対する好中球数の割合(%)。BALF 検査において 急性炎症反応の示標となる。

呼吸同期スキャン

呼吸の変動に同期してスキャンを行う。

コントラストノイズ比

- コントラスト雑音比とも言う。画像撮影信号に含まれる背景ノイズ(バックグ ラウンドノイズ)と目的の画像の明暗比(コントラスト)の強度差を示す指標。 生体構成物質は磁気共鳴測定時(MRI 撮影時)に雑音となる物質を含むため、 コントラストと雑音を区別するために使う数値であり分解能の指標となる。
- サイトカイン

細胞から放出され、体液を通じて細胞間の情報伝達に働くタンパク質性の細胞 間伝達因子。多くの種類が知られており、免疫、炎症反応、抗腫瘍作用、細胞 増殖、分化など様々な作用の媒介に働く。1種類のサイトカインはしばしば複 数の種類の細胞から分泌される。また、1種類のサイトカインが複数の機能を 示す、異なったサイトカインが同じ作用を示す事がある。特に炎症や免疫反応 において重要な役割を果たす。

細胞分画比率

好中球、リンパ球、マクロファージ、好酸球及び好塩基球の各細胞数の比率。 それぞれ異なる形態・性質があり、正常な状態ではそれぞれの比率は一定範囲 内に保たれる。各細胞の増減で感染症や炎症等の有無が推測できる。

静脈注射試験

医薬品等で多用される体内動態試験の一種。化学物質やナノ材料を尾静脈等に 注射し、経時的に、血液及び臓器を採取することによって、血液からの消失、 主要臓器への分配、体外への排泄などを確認する。

数理モデル

ー連の数式から構成され、推定やシミュレーションを行うもの。例えば、ナノ 材料を気管内投与したラットについて、肺からのクリアランスや他臓器への移 行に関する数理モデルは、各臓器中の存在量の時間変化を表す(連立)微分方 程式により記述される。

スプレー式ゾンデ

液体を微細粒子状のエアロゾルで投与することが可能な、気管内投与専用器具。

スポンサーシッププログラム

「工業ナノ材料の試験に関する OECD スポンサーシッププログラム」のこと。 普通は、WPMN が統括する第3 プロジェクト「工業ナノ材料の代表的セットの 安全性試験」運営グループ(SG3)によって運営され、2013 年3 月で公式終了 した第1期のことを指す。工業ナノ材料の代表的セット(当初14 材料、2010 年7月から13 材料)と試験データを収集すべきエンドポイント(物理化学性 状、環境運命、生態毒性及び哺乳類毒性の全59 項目)を決定した上で、2007 年11月に開始。各材料の主スポンサーは、各材料のドシエと呼ぶ文書の取り まとめに責任を負い、共同スポンサや貢献者と協力してドシエ作成計画(DDP) を立案した。ドシエは、ロバスト・スタディ・サマリと同様のものであり、収 録する試験データは、一般公開可能なものに限られる。

スライス厚

CT や MRI など二次元断層像を得る画像診断法における断層像の厚さ。スライ ス厚を薄くすると空間分解能は向上するが信号雑音比が低下するため画質は 劣化する。

ゼータ電位(く電位)

粒子の表面電位のことであり、液中の分散粒子の分散安定性の指標として用い られる。

なり、ゼロに近いと粒子は凝集しやすくなる。

なり、ゼロに近いと粒子は凝集しやすくなる。

く電位は、厳密には、粒子表面

から十分に離れた領域の電位を基準とした場合の、粒子表面に形成される拡散

電気二重層のすべり面(粒子に伴って移動する領域の境界)での電位である。

積算回数

MRI 撮影時に同一帯域から得られる信号出力を合計して積算した数値を収集 された信号の数で割る信号雑音比改善技法。

線維化病変

脱落した組織の再生が不完全な時などに、膠原線維からなる線維性結合組織に 置換えられた病変、障害が持続することや炎症反応が慢性化することにより線 維化病変は増強する

造影剤

各臓器や軟部組織のコントラストを人工的に高めるための薬剤。

走査型電子顕微鏡(SEM: Scanning Electron Microscope)

細く絞った電子線を試料に照射して走査させ、通常はその試料からの二次電子の強度を、電子線の走査と同期させて画像化させる電子顕微鏡。TEMとは同じ電子顕微鏡でも撮像原理が全く異なる。

総蛋白

試料中に含まれる種々の蛋白質(アルブミンを含む)の総称。BALF 検査において血管透過性の亢進等の炎症反応の指標となる。

ゾンデ

動物に液体等を投与するために用いるステンレスやテフロン等の細管。

体内動態

化学物質やナノ材料は、暴露や投与の後、一部は体内に取り込まれ、血流等を 介して主要臓器に分配されるとともに、代謝・排泄される。この一連の流れの ことを体内動態と呼ぶ。体内動態は、化学物質やナノ材料の性質によって異な り、各臓器で生じる可能性のある有害性を理解する上で重要な情報である。

中心静脈

肝小葉の中心を走る血管。門脈から流入した静脈血は類洞(洞用毛細血管)を 通過し、中心静脈へ流入し肝静脈へ流れる。

透過型電子顕微鏡(TEM:Transmission Electron Microscope)

観察対象に電子線をあて、それを透過してきた電子が作り出す干渉像を拡大して観察するタイプの電子顕微鏡。特徴として通常の光学顕微鏡にくらべ遥かに 高い分解能が得られる。

等電点

アニオンとカチオンになる官能基の両方を持つ化合物において、電離後の化合物全体の電荷平均が0となる pH のことをいう。ナノ粒子の場合は表面上の水酸基の過多によって粒子の表面電位が異なり、ナノ粒子の分散液中での表面電位(ゼータ電位)がゼロとなる pH のことをいう。等電点ではナノ粒子の表面電位がゼロになるため粒子が容易に凝集する。

同等性判断基準

ナノ材料は多種多様であり、同一組成であっても無限のバリエーションが存在 する。その中で、物理化学的特性に多少の違いがあっても、実質的に同等の有 害性を示すことが期待されるならば、それらを別個のナノ材料として評価・管 理する必要はない。そのような、有害性が変わらないと考えてよい物理化学特 性の範囲のことを、本プロジェクトでは、「同等性判断基準」と称している。

投与液量

動物に投与する液体の体積(液量)。通常、体重1 kg あたりの液量(ml/kg)、 あるいは体重1 g あたりの液量(ml/g)で表示される。

投与用量

動物に投与する物質の重量。通常、体重1kg あたりの物質重量(mg/kg)で表示される。

肉芽

マクロファージや類上皮細胞などの食作用を持つ炎症細胞が集まって形成した結節性の病変、肉芽は炎症の慢性化や病原菌や異物などの炎症起因物質に対

する反応で形成される

二酸化チタン粒子の pH 値

JISK5116の付則において、顔料試験方法 JIS K 5101-17-2 pH 値(常温抽出 法)に引用規定されている二酸化チタン粒子(懸濁液)の pH 値。ガラス容器 に、水を用いて試験する粉体の質量分率 10 %懸濁液を調製し、容器に栓をし て 1 分間激しく振とうして、5 分間静置した後に栓を取り外して測定した懸 濁液の pH 値。

肺関連リンパ節

肺に暴露された物質がリンパ流路により到達するリンパ節で、縦隔リンパ節の 肺門リンパ節や気管傍リンパ節等がこれに相当する

肺静脈

肺の毛細血管でガス交換を終えた血液(動脈血)を心臓に導く血管。

肺相対重量

動物の体重に対する肺重量(g)の相対値で、通常、体重100gあたりの肺重 量(g/100g)で表示する。肺の重量は動物の体重に依存して変動するため、 測定した肺重量(絶対重量)と併記される。

肺中濃度 - 時間曲線下面積(AUC)

本来は、血中濃度 - 時間曲線下面積(Area Under the blood concentration-time Curve)のことであり、血中濃度の曲線の積分値(面積: 血中濃度×時間)を指す。本成果まとめでは、肺中濃度の曲線の積分値(面積)として示した。

肺動脈

心臓から肺へ血液(静脈血)を送る血管。その先は肺の毛細血管へ繋がる。

肺胞マクロファージ

白血球の一種であり、吸入に伴い肺胞上皮に沈着した粒子状物質を貧食することにより、肺胞表面をきれいに保つための重要な役割を果たす。

パラメータ

ナノ材料の肺からのクリアランスや体内動態を数理モデル(一連の数式)で記述する際に、実験データを再現するように設定される係数のこと。ナノ材料の

特性の違いは、数理モデルを介して、パラメータの値の違いに反映される。

半減期

例えば、ナノ材料の肺での存在量が、暴露終了後に経時的に減衰して、初期の 半分の量になるために要する時間のこと。クリアランスが低下すると、半減期 は長くなる。

比表面積

比表面積とは、単位重量当たりもしくは、単位体積当たりの表面積のこと。ナ ノ材料などで、表面が寄与する影響が大きい現象においては、この物性値が重 要な指標となる。良く使われる測定法が、不活性ガスの等温吸着量から見積も る BET 法である。この比表面積の値から、球状粒子を仮定した場合の粒子径を 見積もることができ、一般的には、試料粉体の一次粒子径に近い値が得られる。

病理ピアレビュー

病理組織学的検査の信頼性確保、毒性評価の妥当性を向上するために行う、他の病理専門家による再鏡検。

物理化学的特性

本研究においては、ナノ材料の粒子径、比表面積、形状、結晶構造、表面処理 等のナノ材料が持つ物理的又は化学的性質を表す。

フリップ角

FA:Flip Angle。画像撮影におけるコントラスト調整に利用される設定のひとつ。

分散剤

分散剤とは、固体粒子(分散質)を溶媒(分散媒)に均一に分散させる添加剤 のこと。高分子系、界面活性剤(低分子)系、無機系に大別される。高分子系 は主に立体障害の効果で、界面活性剤系は主に溶媒との濡れ性で、無機系は主 に帯電効果で分散を高めている。

米国国家毒性プログラム (NTP: National Toxicology Program) 米国保健福祉省が中心となり、公衆衛生に関わる化学物質等の毒性学、分子生 物学の研究を行う、米国各省庁間の連携プログラム。

ヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1)

H0-1 は代表的なストレス応答タンパク質。活性酸素種等の酸化ストレスに応答し発現する酵素タンパク質で、しばしば酸化ストレスマーカーとして用いられる。

マクロファージ

マクロファージは白血球の一種。旺盛な貪食能と付着性、遊走性に富む食細胞 で、死んだ細胞やその破片、体内に生じた変性物質や侵入した細菌などの異物 を捕食して消化することで排除する。とくに、外傷や炎症の際に活発に活動す る。また抗原提示細胞でもあり、免疫機能の中心的役割を担っている。

門脈

腹腔の消化管と脾臓からの静脈血を集め、肝臓に運ぶ血管。 肝臓における機能血管であり、解毒作用や糖質貯蔵作用などがこの血管を介し て行われる。

リソソーム

真核生物が持つ細胞小器官の一つで、水解小体とも呼ばれる。生体膜につつま れた構造体で内部に加水分解酵素を持つ細胞内消化の場であり、エンドサイト ーシスやオートファジーによって膜内に取り込まれた生体高分子を加水分解 する。

リン酸水素ニナトリウム(Na₂HPO₄・12H₂O、Disodium Phosphate (DSP) 3種類あるナトリウムのリン酸塩の中の1つで、水溶性の白い粉末であり、無 水物は吸湿性がある。食品内では pH 調整剤や固化防止剤として用いられる。 ラットへの単回気管内投与で肺への有害性を示さないことを確認しており、気 管内投与試験に用いる二酸化チタンの投与液調製時の分散剤として用いてい る。

ルチル

二酸化チタンの結晶構造の一つ。ルチル型の二酸化チタンは、アナターゼ型と 比較して光触媒活性は弱い。白色顔料として化粧品、塗料、樹脂・繊維・紙等 への添加剤、トナー外添剤、ゴム充填剤、反射防止膜等に用いられる。

レーザー共焦点顕微鏡

光学顕微鏡の一種で,全面に焦点の合った画像を得られコントラスト比の高い

鮮明な像を観察できるという特徴を持つ。物体表面の微小な段差や表面粗さといった高さ方向の寸法を計測できる。

1. 研究開発目標

1-1 全体の目標設定

ナノ材料は、サイズが小さいゆえに、その有害性が懸念されているが、有害 性に影響する物理化学特性が、大きさ、形、表面処理、等々のどれなのかが明 らかになっていない。また、ナノ材料は同じ化学組成であっても、物理化学特 性の違いにより多数の種類があり、個々の材料に高額な吸入暴露試験(ナノ材 料のエアロゾルを動物に吸入させる)を行うことはコスト的に困難である。ま た、国内には吸入暴露試験が実施可能な試験機関は極めて限られている。その ため、本事業では、

・効率的な有害性評価技術を構築して公開すること

・それを支援するための基盤技術を開発して技術解説書等として公開すること
 を目標とした(表 1-1)。

なお、研究開発では、吸入経路の暴露(現在最も懸念される暴露経路)を対象とし、最近の OECD におけるテストガイドラインでの議論に準じて、肺での 炎症反応の観察と肺を中心とした体内動態(肺中残留量の経時変化等)の観察 に重点を置いて評価した。

目標・指標	目標・指標	設定理由・根拠等
(事後評価	(終了時評価時点)	
時点)		
効率的な有	研究開発開始時点で利用可能な	ナノ材料の有害性やリスク評
害性評価技	基盤技術の改良・工夫、及びプ	価は、メーカーや製法が異なる
術(同等性	ロジェクト期間中に開発した基	個々の材料について個別的に
判断基準、	盤技術等の適用により実施する	実施されている。今後開発され
気管内投与	試験結果に基づいて、効率的な	る多種多様なナノ材料につい
試験方法)	有害性評価技術(同等性判断基	て、国民の安全・安心が担保さ
の構築と公	準、気管内投与試験方法)とし	れかつ効率的で合理的な評価
開	てとりまとめて公開する。	の枠組みを、行政的観点からも
		構築する必要がある。
効率的な有	効率的な有害性評価技術(同等	有害性評価技術を改良し、効果
害性評価技	性判断基準、気管内投与試験方	的かつ効率的なものとするた
術(同等性	法)の構築のための試験の実施	め、幅広い基盤技術を整備する
判断基準、	の支援、及び有害性評価技術の	ことが必要である。具体的に
気管内投与	検証・改良の支援を行いつつ開	は、試料調製・キャラクタリゼ

表1-1 全体の目標

試験方法)	発を進め、個々の技術について、	ーション(気管内投与試験用懸
の構築を支	技術解説書等としてとりまとめ	濁液調製、吸入暴露試験のため
援するため	て公開する。	のエアロゾル安定発生技術構
の基盤技術		築等)、気管内投与試験の標準
の開発と公		化、ナノ材料の体内分布および
開		生体内反応分布の計測・定量化
		技術、培養肺胞モデル評価系の
		開発等を進める必要がある。

効率的な有害性評価技術の開発に際しては、有害性評価に段階的アプローチ (tiered approach)を導入した(図1-1)。すなわち、ゴールドスタンダー ドである吸入暴露試験(Tier 2)の前に二つの段階を設定し(Tier 0:同等性 判断基準、Tier 1:気管内投与試験)、それぞれに対応する評価技術の開発に 取り組んだ。

- <u>Tier 0</u>:同等性判断基準:有害性が変わらないと考えてよい物理化学特性の変化の範囲を規定するものである。対象ナノ材料の物理化学特性に基づいて、既に有害性評価済みのナノ材料と同等とみなされるかどうかを判断する。
- Tier 1:気管内投与試験:ナノ材料のエアロゾルを動物に吸入させる代わりに、 分散液を気管に投与する試験方法である。Tier 0 の同等性判断におい て既存のナノ材料と同等とは見なされない場合でも、まずスクリーニ ングとしてこの試験を実施して、吸入暴露試験が必要なナノ材料を絞 り込む。



図1-1 ナノ材料の効率的な有害性評価の枠組み

これら二つの効率的な有害性評価技術の開発のためには、試料調製、動物試 験、評価解析に至る一連のプロセスでの幅広い要素技術の構築、標準化が必要 である。そのため、3つの研究開発項目(個別要素技術開発としては11)を設 定した。すなわち、効率的な有害性評価技術の開発として、①同等性判断基準 (当該評価技術、及び関連する基盤技術)と②気管内投与試験方法(当該評価 技術、及び関連する基盤技術)の構築を行うこととし、また、それらの開発を 支援するため、③有害性試験・評価のための基盤技術の開発を行った。

図1-2に、本研究開発にかかる11の個別要素技術開発、及び成果発信活動の連携関係を示した。



AIST:産業技術総合研究所、CERI:化学物質評価研究機構、JBRC:日本バイオアッセイ研究センター

図1-2 研究開発の個別要素技術(担当機関)の連携*

※「①(a)」等の記号は、研究開発項目の番号①②③と個別要素技術開発としての枝 番号(a)(b)(c)等との組み合わせからなっている。

また、図1-3に、ナノ材料の有害性評価における「同等性判断基準」「気管 内投試験」の技術的位置付けを示した。ナノ材料の有害性評価では、本来であ れば、毒性学的に信頼性が高い吸入暴露試験を使いたいが、高コストの上、施 設が日本に極めて少ない。そのような状況で多様なナノ材料に対応するために は、in silico 手法(組成や物理化学特性から判断・推定する)の活用による 効率化が不可欠である。しかし現在のところ、有害性推定が可能な定量的構造 活性相関(QSAR)の構築は困難である。そこで、経験論的に類似ナノ材料を一 括りで評価する「同等性」の考え方を提案した。最近、OECD 等において、関連 する概念である「カテゴリー化」「Read-Across」の議論が活発化しているが、 本事業では、その構築に向けて先駆けとなる取り組みを行った。一方、in vitro 試験は機序の検討や社内的な材料比較ができるが、行政判断に必要な病理学的 ふるい分けのためには、動物を用いたスクリーニング試験の活用が必要となる。 動物を用いたスクリーニング試験として、「気管内投与試験」は、欧州で推進 される「5日間短期吸入試験」に比べて費用、設備の点で優れている。



図 1-3 「同等性判断基準」「気管内投与試験」の技術的位置付け

なお、本研究事業における全ての動物実験は、実施機関ごとに倫理審査を経 て、3R 精神(代替試験法の活用、動物数の削減、苦痛の軽減)に則って適正 に実施した。

<u>1-2 個別要素技術の目標設定</u>

	又示 以 的	(事後誣価時占)	設た 空田 依 だ 守	
TI 2				
כדעי		その向寺住刊町のための計画	山 21100 博楽」 「 梅田 41 単 4 世 4 の 田 4 2 土	
		体内分布の観祭や正重か	物理化学特性の異なるナ	
	によるナノ材料の	比較的容易な工業ナノ材	ノ材料の安全性を効果	
	相互比較による同	料に対する試験結果から	的・効率的に確保するた	
	等性判断基準の構	作成した、ナノ材料の同	めに、ナノ材料の同等性	
	築	等性に関する判断基準の	に関する判断基準(有害	
		暫定案を、追加的な試験	性が変わらないと考えて	
		及び国際機関での議論を	よい物理化学特性の変化	
		通じて改良し、とりまと	の範囲)を確立する必要	
		めて公開する。	があるため、本目標を設	
			定した。	
	(b)同等性評価のた	研究開発項目① (a) を始	同等性評価に使用するナ	
	めの試料調製技術	めとする有害性試験に対	ノ材料については、その	
	とキャラクタリゼ	してナノ材料分散液を供	物理化学特性が明らかで	
	ーション	給と試料のキャラクタリ	ある必要がある。また、	
		ゼーションを行い、気管	気管内投与試験ではその	
		内投与試験のための試料	性状が明らかなナノ材料	
		調製およびキャラクタリ	の分散液が必要である。	
		ガーションの方法や留音	また本技術の開発で得	
		と うううの方法や留志	るた、年役前の開光で将 られた知目を広く普及さ	
		点に りいて、 役 耐 府 記 音 た と し ま と め て 小 問 す	511に加売を広く自及さ	
		をこりまこの(公開) z		
7.11 -	ᆂᄜᇮᆂᇦᅌᆝᆋᄪᆂ		<u> </u>	
切り	究開発項日②「初期月† #5 の構築:	吉性情報取得のための低コ	スト・間便な有害性評価	
技1	〒の構染」			
	(a)吸入暴露試験と	吸入ばく露試験の結果と	信頼性のある有害性評価	
	気管内投与試験の	気管内投与試験の結果を	として気管内投与試験が	
	比較検討	との比較及び改良・検証	実施されていない現状	
		のための試験を追加して	で、ゴールドスタンダー	
		行い、初期有害性情報取	ドである吸入試験のデー	
		得の目的で気管内投与試	タと暫定的でも比較検討	
		験を用いるに当たっての	することが、気管内投与	

表1-2 個別要素技術の目標

	技術解説書をとりまとめ	試験の有用性を評価する
	て公開する。	上で重要と考えた。
(b-1) 気管内投与試	気管内投与の技能確認方	気管内投与試験を、行政
験の標準化に関す	法も併せた、気管内投与	上利用できる初期有害性
る検討:手技の標準	試験の標準的手順書の試	情報の取得を可能とする
化に関する検討	案をとりまとめて公開す	試験法として確立するた
	る。	め、標準的な手技を構築
		するため。また、投与操
		作は一定以上の技術レベ
		ルを要することから、投
		与の成否確認法を開発す
		る。
(b-2)気管内投与試	気管内投与試験の標準的	気管内投与試験につい
験の標準化に関す	手法として適切な投与回	て、初期有害性情報の取
る検討:単回投与と	数に関する見解をとりま	得を可能にする試験手法
複数回投与の比較	とめ、研究開発項目②	を確立する必要がある。
検討	(b-1)による標準的手順	その標準化のため、投与
	書の試案に含めて公開す	回数(単回及び複数回)
	る。	が結果に与える影響に違
		いがあるかどうかを検討
		が必要である。気管内投
		与試験の標準的手法とし
		て適切な投与回数を検討
		することを目標として設
		定した。
(c)エアロゾルの安	吸入暴露試験用エアロゾ	吸入暴露試験のためのエ
定発生手法の構築	ルを得る手法の指針をと	アロゾル発生技術を開発
	りまとめて公開する。	するためには、装置製作
		と性能評価を経て、技術
		の妥当性を評価する必要
		がある。最終的には、装
		指針を公開することが技
		術 世 次のために 有用であ
		る。

i i		-	
	(d)エアロゾルの液	気管内投与試験用試料作	気中粒子を効率よくかつ
	相捕集手法の構築	成のためのエアロゾルの	広い粒径範囲で均一に液
		液相捕集手法に関する標	相捕集する既存技術が存
		準的手順書の試案をとり	在しないことから、中間
		まとめて公開する。	段階ではプロトタイプを
			構築し、問題点の明確化
			を行う必要がある。また
			最終的には、確立技術を
			普及するために、手順書
			を広く公開することが有
			効である。
砑	F究開発項目③「ナノ材:	料の有害性試験・評価のた	めの基盤技術の開発」
	(a−1)ナノ材料の体	中間目標の時点で確立し	基盤技術である本技術開
	内分布及び生体反	たナノ材料の体内分布及	発は早急に確立して、動
	応分布の定量化技	び生体反応分布の定量化	物試験を課題に適用する
	術の開発	技術を研究開発項目①及	必要があるため、中間評
		び研究開発項目②の気管	価目標として設定した。
		内投与試験及び吸入暴露	中間評価後は動物試験に
		試験に適用する。開発し	適用しながらプロトコル
		た方法を整理し、技術解	の高度化を進める。
		説書としてまとめて公開	
		する。	
	(a-2) PEAPOD (ピー	CNT の体内動態試験のた	動態評価の手法として
	ポッド)の体内動態	めの PEAPOD の作製・評	CNT の表面修飾が行われ
	計測技術開発	価・応用に関する技術解	ているが、表面修飾によ
		説書をとりまとめて公開	り細胞反応性の変化が起
		する。	きることが知られてい
			る。そのため、表面修飾
			を行わない CNT の体内動
			態評価法を確立する必要
			がある。新規技術である
			本開発は、動物生体内の
			PEAPOD を画像装置で検
			出可能である事を示し、
			最終的に体内動態評価法
			のひとつとして技術を確

		立し、公開・普及させる
		ことを目標に設定した。
(b)ナノ材料の体内	研究開発項目①及び研究	体内動態と生体反応に関
動態と生体反応に	開発項目②で実施した吸	する数理モデルは、これ
関する数理モデル	入暴露試験や気管内投与	まで十分な研究事例がな
の構築	試験の結果を数理モデル	い。そこで、本プロジェ
	によって記述するととも	クトの他研究開発項目で
	に、ナノ材料の体内動態	の試験の結果に基づい
	と生体反応との関係を表	て、一般的な数理モデル
	す一般的な生理学的数理	を構築することが、ナノ
	モデルとして構築する。	材料の有害性の理解に貢
		献すると考えた。
(c)培養肺胞モデル	培養肺胞モデル評価系に	肺胞近傍における in
評価系の開発と数	よるナノ材料評価の標準	vitro 評価系による暴露
理モデル化への利	的手順書の試案をとりま	実験と数理モデルの組み
用方法に関する研	とめて公開する。	合わせによる肺吸収率予
究開発		測は新たな方法論であ
		り、研究成果としてその
		手順をとりまとめ、公開
		しておくことには高い意
		義があるため、この目標
		を設定した。

2. 成果、目標の達成度

2-1 成果

2-1-1 全体成果

本事業では、ナノ材料の有害性を効率的に評価する技術として、下記の二つの評価技術の開発に取り組んだ。

【同等性判断基準】有害性が変わらないと考えてよい物理化学特性の変化の範 囲を規定するものである。対象ナノ材料の物理化学特性に基づいて、既に有害 性評価済みのナノ材料と同等とみなされるかどうかを判断する。

【気管内投与試験】ナノ材料のエアロゾルを動物に吸入させる代わりに、分散 液を気管に投与する試験方法である。同等性の判断において既存のナノ材料と 同等とは見なされない場合でも、まずスクリーニングとしてこの試験を実施し て、吸入暴露試験が必要なナノ材料を絞り込む。

そのためには、試料調製、動物試験、評価解析に至る一連のプロセスでの幅 広い要素技術の構築、標準化が必要である。以下に、本事業で取り組んだ 11 の個別要素技術開発、及び成果発信活動について下記のような構成で概要を示 した。

- 気管内投与試験実施の前提となる要素技術開発の成果
- 気管内投与試験実施による成果
- III. ナノ材料の体内動態の観察と数理モデル化に関する成果
- IV. 研究成果の 0ECD 等への展開

I. 気管内投与試験実施の前提となる要素技術開発の成果

イン試料調製・キャラクリゼーション

サイズ、形状、結晶性、表面修飾等が異なる、メーカーから入手可能な二酸 化チタン、二酸化ケイ素、酸化ニッケル、二酸化セリウム、酸化亜鉛の計 23 種の試料について、有害性試験のための最適な試料調製技術、液中分散技術の 開発を行うと共に、有害性評価の有効な情報となるキャラクタリゼーションを 行った。試料調製技術に関しては、各ナノ材料の試料調製の基本となる標準的 な調製法を確立し、その上に個別材料に合わせた調製方法を追加した。キャラ クタリゼーションに関しては、二酸化シリコンの結晶性評価において、論文報 告されている先端的な手法を応用するなどの技術開発を行った。また、これら の技術を用いて調製した試料は、動物試験を実施する機関(産医大、CERI、JBRC) へ安定的に供給された。さらに、これらの試料調製及びキャラクタリゼーショ ン技術に関して、ナノ材料の気管内投与試験を実施したい事業者等が標準的な 試料調製手順として活用できるように、手法や留意点を技術解説書としてとり まとめて公開した。(個別要素①(b):AIST)

ロ)気管内投与試験の標準化にかかる成果

気管内投与試験については、手法が標準化されておらず、各施設で得られる 試験成績を比較することが困難であるとの課題が存在していることから、ナノ 粒子への適用を想定した気管内投与試験の標準的手法の検討を行った。ナノ材 料の初期有害性評価のための標準的な気管内投与試験手法を構築するため、気 管内投与試験の操作手技の中で、試験成績に影響を与える可能性が高いと考え られた投与器具、投与液量、解剖時麻酔薬等について、その手技の違いが試験 成績に影響を及ぼす影響を検討した。例えば、経ロゾンデとスプレーゾンデと いう2種類の投与器具では肺炎症及び沈着量に違いは見られなかった。また、 投与液量については 0.5~2.0 mL/kg の範囲であれば試験結果は同等であるこ とが確認された。(個別要素②(b-1): CERI)

また、気管内投与試験においては、投与回数(単回、複数回)が結果に与え る影響に違いがあるかどうかについても検討が必要である。そこで、投与回数 を単回から複数回に変えた気管内投与試験を実施し、気管内投与試験の標準的 手法として適切な投与回数を検討した。投与総量が同じ場合、反応の程度は材 料によって差がみられたものの、反応の質的変化においては同様であり、いず れの投与回数においても毒性影響をとらえることは可能であると考えられる。 複数回投与による動物への負荷や実験デザインの煩雑さを考慮すると、スクリ ーニング試験としての気管内投与回数は、単回投与で評価が十分可能である。 なお、被験材料の分散性等を考慮し、低濃度の分散液しか調製できない場合は、 複数回投与を取り入れることで評価が十分可能である。(個別要素②(b-2): JBRC)

得られた成果をまとめ、推奨する試験手技を、「ラットを用いたナノ材料の 気管内投与試験の標準的手順書(試案)」として公開した。また、気管内投与 試験の信頼性を担保するため、気管内投与技術者の技能レベルを確認する方法 を上記の手順書内に記載した。このような試験方法の標準的手順が示されるこ とにより、ナノ材料の肺毒性のスクリーニング試験として、気管内投与試験の 普及と活用が促進される。

なお、動物試験に用いるラットの系統の違いによって二酸化チタンの生体反応に差異があるかの検討を、3系統のラットを用いて実施し、本プロジェクト

で使用することとした F344 ラットが、他系統と比較して、試験結果を評価す る上で問題がないことが確認された。また、本プロジェクトの動物実験実施機 関(産業医科大学、化学物質評価研究機構、日本バイオアッセイ研究センター) が実施した病理検査での判断が妥当であるかを確認するため、病理組織診断検 討会(病理ピアレビュー)を実施した。病理組織所見の用語には各機関の間で 差違がみられたが、判断はいずれも適切であることが確認された。

II. 気管内投与実施による成果

 イ)同等性判断基準構築のための気管内投与試験によるナノ材料の相互比較 粒子径、形状、表面処理等の物理化学的特性の異なる二酸化チタン7材料、 酸化ニッケル4材料及び二酸化ケイ素9材料について、ラットを用いた単回気 管内投与試験を実施した。投与3日後、28日後、13週間後に肺炎症を評価す るためにBAL(気管支肺胞洗浄液)検査及び病理組織学検査を行い、各材料の 物理化学的特性と肺毒性の関連を調べた。急性期の肺炎症の強さは粒子径が小 さいほど強く発現する傾向がみられ、表面処理により処理無しの材料と比較し、 肺炎症の強度及び持続性が異なることが明らかとなった。また、逆に、例えば 二酸化チタンでの結晶型のように、肺炎症の強さと関連性が見られない物理化 学特性も明らかとなった。このような肺炎症の強さと関連性が見られない物理 化学特性のみが異なる材料であれば、それらは同等の有害性を有するものと考 えられる(=同等性判断基準の例)。得られた成果は、材料毎に「ナノ材料の 同等性判断基準」としてまとめて公開した。(個別要素①(a):CERI)

ロ)吸入暴露試験と気管内投与試験の比較検討

4 種類の金属ナノ粒子(二酸化チタン、酸化ニッケル、二酸化セリウム、酸 化亜鉛)を用いて、気管内投与試験と吸入ばく露試験を行い、両試験における 肺炎症を比較した。吸入ばく露試験において肺毒性の高いナノ粒子は好中球炎 症を示したが、肺毒性の低いナノ粒子は示さなかった。一方、気管内投与試験 では、肺毒性の高いナノ粒子は、持続性の炎症を認め、肺毒性の低いナノ粒子 は、一過性の炎症のみであった。両試験における肺反応の質的差異はあれ、吸 入ばく露試験で示した肺毒性によるナノ粒子の区別を気管内投与試験でも示 すことが可能であった。また、肺内保持量が同等の場合は、気管内投与試験の 肺内反応が、吸入ばく露試験の反応と比較して急性期において高いか同等であ った。時間の経過とともに両者の差異は減少した。これらのことから、気管内 投与試験は、吸入暴露試験のスクリーニング方法として用いることが可能であ ると考えられた。これらの成果に基づいて「気管内投与試験法を初期有害性情 報取得の目的で用いる際のデータ解釈上の留意点」を作成して公開した。気管 内投与試験と吸入暴露試験の条件や有害性の評価方法を示したものであり、今後、両試験を行う検査・研究機関の一助となる。(個別要素②(a):産医大)

 ハ)ナノ材料の吸入暴露試験の実施に必要なエアロゾルの安定発生技術の構築 本研究開発における吸入暴露試験の実施に際しては、ナノ材料の吸入暴露試 験の実施に必要なエアロゾルの安定発生技術の構築を目指し、噴霧乾燥法にも とづいたエアロゾル調製手法の開発を行った。本手法によるエアロゾル粒子の 濃度やサイズ、形状等の制御性を向上させるために、迅速蒸発法と液滴破砕法 を開発した。開発したエアロゾル発生手法を、様々なナノ粒子の吸入暴露試験 に適用し、エアロゾル粒子を長期間・高濃度かつ安定的に供給することに成功 した。さらに複数のナノ粒子の吸入暴露試験の結果を整理することによって、 エアロゾルの湿式発生に用いる粒子懸濁液中のナノ粒子の性状と発生したエ アロゾルの性状との相関を明らかにした。上記の成果に基づき、吸入暴露試験 の実施を検討する機関での活用を想定し、ナノ粒子全般に適用可能なエアロゾ ル発生装置の概要と操作方法を実施例とともに説明した「ナノ材料毒性評価の ための吸入暴露試験用エアロゾル発生に関する技術解説書」を作成して公開し た。(個別要素②(c):広島大)

これと合わせて、ナノ粉体材料を気中に乾式分散することで発生したエアロ ゾル粒子群を液中捕集することによる気管内投与試験用懸濁液の作成技術(エ アロゾル液相捕集法)を開発した。液相捕集では、過飽和水蒸気を利用し、エ アロゾル化したナノ材料粉体を凝縮核とする粒径数マイクロメートルの液滴 に凝縮成長させ大きな慣性(質量)を持たせた上で、液中に慣性捕集する。本 手法は、ナノ材料懸濁液を作成する従来手法のように、物理的・化学的処理に よりナノ材料を強制的に液中分散する手順を経ないため、これまで困難であっ た強疎水性粉体を分散剤なしで懸濁液とすることが可能であるとともに、吸入 暴露試験をより良く模擬すると考えられる気管内投与試験用懸濁液が作製可 能である。新たな技術であることから特許を出願するとともに(特願: 2015-199618)、本方法を用いて気管内投与試験用試料を作製するための標準的 手順書を作成して公開した。本方法は、ナノ材料の有害性試験用懸濁液作成の みならず、医薬品製造プロセス等においても将来的な活用が期待される。(個 別要素②(d):AIST)

III. ナノ材料の体内動態の観察と数理モデル化に関する成果

イ)ナノ材料の体内分布および生体内反応分布の定量化技術の開発

ナノ材料の気管内投与試験及び吸入暴露試験を行なったラット肺に関して、 光学顕微鏡と蛍光X線顕微鏡を用いたサブミリメートルの分解能での広範囲の 観察と、透過型電子顕微鏡を用いたサブナノメートルの高分解能での観察をす るための試料作製手法を確立した。これによりナノ材料の体内分布に関しては、 光学顕微鏡による形態観察と蛍光X線顕微鏡によるナノ材料元素マッピングに よる広視野の定量解析が可能となった。また透過型電子顕微鏡によるサブナノ メートルの分解能で細胞組織内でのナノ材料の局在観察や電子分光手法によ る定量的元素マッピングが可能となった。ナノ材料の生体反応分布に関しては、 レーザー共焦点顕微鏡と透過型電子顕微鏡を用いた免疫組織学的解析手法を 確立した。炎症性マクロファージ(M1)の表面レセプターである Toll 様受容 体4(TLR4)に関して、蛍光標識によるサブミリメートルの分解能でのレーザ ー共焦点顕微鏡観察と、金ナノ粒子標識によるナノメートルの分解能でのレーザ した、顕微鏡観察により TLR4 産生の定量的解析が可能となった。今後、ナノ 材料の有害性評価において体内分布及び生体内反応分布を比較検討する際に 広く活用されるよう、開発した手法の技術解説書を作成して公開した。(個別 要素③(a-1):AIST)

ロ)ナノ材料の体内動態と生体反応に関する数理モデルの構築

吸入曝露試験や気管内投与試験で得られた肺などの臓器中ナノ材料を分析 して数理モデルで記述することにより、肺クリアランス等に影響する物理化学 特性に関する知見を得た(二酸化チタン:表面コート、酸化ニッケル:溶解性、 二酸化ケイ素:結晶型)。静脈注射試験においては、投与したナノ材料はいず れも、速やかに血液中から消失し主に肝臓と脾臓に分配され、その後、溶解性 の高い材料(酸化ニッケル)を除いて、顕著な消失は見られなかった。また、 ナノ材料の肺内分析を定量化するためXRF(蛍光X線)分析による手法を開発 し、免疫染色により定量化された生体反応の肺内分布との関係を評価した。こ れらの知見を踏まえ、ナノ材料の体内動態の一般的な評価やモデル化に関する 技術解説書を作成して公開した。これは、ナノ材料の体内動態を評価・解析し たい行政・企業・研究者が参照することを想定し、評価の流れ・留意点・基礎 情報、プロジェクトでの実施例・既往研究をとりまとめたものである。(個別 要素③(b):AIST)

ハ)数理モデル精緻化を支える基盤技術の開発

肺胞に沈着したナノ材料の体内移行性を細胞試験系で評価するための手法 開発を目的として、ヒト細胞株およびラット初代培養細胞の膜上培養を用いる 肺胞上皮・マイクロファージ共培養系を確立した。共培養系ではマクロファー ジの貪食能のため、ナノ粒子の上皮障害性と血液側への透過性の両者が上皮単 独培養系の場合と比較して低減されることを in vitro (細胞試験系) で示すこ とに成功した。また、簡単な数理モデルにて、培養系での粒子の血液側移行性 を概ね記述することに成功した。さらに、このモデルを拡張利用することでヒ トの経肺吸収率を予測する手法を提案した。これらは、今後さらに詳細な検討 が必要であるが、前例のない初めての試みである。開発した手法については、 「ナノ粒子の肺障害性および透過性評価のための in vitro 培養肺胞モデル構 築と評価の手順」として取りまとめて公開した。とくに特に使いやすいヒト株 細胞系の標準手順は、事業者による評価にも広く役立つと期待される。(個別 要素③(a-2):東京大)

また、既存の計測技術では非破壊分析が困難な炭素材料である繊維状のカー ボンナノチューブ(以下、CNT)の体内動態計測技術として、CNTの形状を活か し中空に造影物質(金属塩類)を封入した PEAPODの開発も進めた。Peapod 技 術により、二層カーボンナノチューブの中空に重金属(塩化ガドリニウム・塩 化白金)を充填させることに成功した(Peapod-CNT)。作製した Peapod に対し、 MRI 装置・X線画像装置(CT・三次元X線顕微鏡)によって検出可能なことを 確認した。各装置において、Peapod-CNT が最も描出される条件及び撮影効率の 向上における検討を重ね、各装置での至適条件の調整を行い、その条件下に試 験動物に投与した Peapod-CNT の検出に成功した。これらの成果のうち「炭素 粒子の空間分布同定方法」については特許を出願した(特開:2015-99123)。 また、研究成果をとりまとめ、「Peapod を応用した体内動態評価方法に関する 技術解説書」として公開した。これにより、特殊な設備がない研究施設でも、 一般的な画像診断装置(CT, MRI 等)を使用して、CNT の体内動態評価が可能 になる。(個別要素③(c):信州大)

以上を踏まえ、成果発信の中心となる二つの評価手法についてまとめた。



IV. 研究成果の OECD 等への展開

0ECD テストガイドライン、GLP 原則等にみられるように、世界の化学物質管 理政策を先導してきたのは、経済協力開発機構(0ECD)の環境・健康・安全(EHS) プログラムであり、この活動が化学物質管理に係る国際標準化の舞台となって きた。工業ナノ材料の安全性への取り組みについても化学物質管理と同様であ ることから、本研究開発プロジェクトでは、プロジェクト実施期間中のできる だけ早期から、OECD WPMN(ナノ材料作業部会)を中心に積極的な意見表明や 成果発信を行った。(個別要素④:慶應大&AIST)

ナノ材料有害性の同等性判断基準の構築に関連して

本事業が開始された当初、OECD WPMN では、代表的な 13 のナノ材料に関する 物理化学特性データと有害性データを各国分担により取得するという「スポン サーシッププログラム」が終了しつつある時期であり、結果の取りまとめ方の 議論が中心であり、ナノ材料のカテゴリー化・グループ化・同等性に関する議 論は起こっていなかった。本研究事業では、下記のような活動を通じて、WPMN での議論を喚起しつつ、情報の発信を行った。

- ・OECD WPMN の運営グループの一つである SGAP (リスク評価規制制度プロジェ クト運営グループ)の第3パイロットプロジェクト「規制制度でのナノ材料 のヒト・生態系有害性評価のための物理化学的特性に基づいたグルーピン グ・同等性・類推の概念の使用・開発に関する調査」を提案し(2013 年 2 月)、これをリードして「同等性判断基準」の考え方や本事業の研究開発内 容を含む報告書を作成した。報告書は、2016 年 1 月、化学品合同会合で了 承され、ENV/JM/MON0(2016)3、OECD 工業ナノ材料安全性シリーズ(NanoSafety 文書)第64 号として公開された。
- ・2014 年 9 月米国ワシントン DC 開催のカテゴリー化ワークショップにて、
 「 Development of Equivalence Criteria for Nanomaterials by Intratracheal Administration Study」と題して 7 種のナノニ酸化チタンの 試験結果に基づく同等性判断基準の試案を紹介した。当該報告の内容を含め、
 同ワークショップの開催報告書が 2016 年 2 月 17 日付け ENV/JM/MONO (2016) 9、
 0ECD 工業ナノ材料安全性シリーズ (NanoSafety 文書) 第 66 号として公開された。
- その他、ISO/TC229 において、米国 NIOSH 主導で作業した技術報告書 ISO/TR 18637「ナノ物体及びその凝集体の作業暴露限界及び作業暴露バンドを策定 する利用可能な方法及び手法の概観」の「ナノ材料のカテゴリー作業暴露限 界」の項に「同等性判断基準」に関する記述を盛り込んだ。同技術報告書は、 2016年内に発行される見込みである。

気管内投与方法の確立に関連して

本事業が開始された当初、OECD WPMN においては、気管内投与方法は行政的 に利用する方法としてほとんど認知されていなかった。本研究事業は、下記の
ような活動を積極的に行い、WPMN に関係する専門家の間で、吸入毒性の動物を 用いたスクリーニング試験方法の一つとしての認識を勝ち取った。

- ・2014年2月韓国ソウル開催のトキシコキネティクス(体内動態)ワークショップにて「Intratracheal Administration Study for Initial Characterization of Toxicokinetics of Nanomaterials」と題して報告した。本会合の報告書では、発表概要のみならず、「まとめ」において、体内動態の評価における気管内投与試験の有用性が言及された。
- ・OECD WPMN の運営グループの一つである SGTA (試験評価プロジェクト運営グ ループ)のイベントとして、2015年9月に「in vivo 吸入毒性スクリーニン グ試験方法に関する情報共有セミナー」を提案・主導し、BASF との連携の もと、米国 EPA のサポートを受けつつ開催した。気管内投与試験に関するプ ロジェクト成果から3題と、BASF 社が中心となり進めている5日間短期吸 入暴露試験に関する3題が発表された。ここでの総括議論を踏まえ、後に開 催された第15回 WPMN 会合 (2015年11月)にて当該テーマに関するガイダ ンス文書の作成が、WPMN の新規プロジェクトの候補となった。

その他

研究成果を広く普及し、社会に活用してもらうため下記のような活動を実施 した。

- ・プロジェクトで得られた知見(BAL(気管支肺胞洗浄液)の評価方法、体内 動態の評価方法等)を踏まえて、OECDでのナノ材料の吸入毒性評価に関す るテストガイドライン(TG412とTG413)の改訂に貢献した。当該分野での 我が国のプレゼンスを向上させることができた。
- ・OECD WPMN のスポンサーシッププログラムでドイツ・フランスが取りまとめ 幹事国を務めているナノニ酸化チタンのドシエについて、本プロジェクトの 体内動態試験の結果を反映させた。
- ・2016年1月に開催された Nanotech2016にて「ナノ材料の効率的な有害性評価技術(経済産業省ナノ安全プロジェクト研究成果報告)」を開催し、気管内投与試験に関する内容を軸に、プロジェクトで取り組んできた研究の成果を織り交ぜて紹介した。
- ・論文成果となりづらい試料調製や標準的試験方法などに関する発信手段として、BASF 社の研究者と連携し、日本衛生学会の英文誌のスピンオフ企画である e-book(出版社:Springer 社)の企画を進めている。タイトルを「In vivo inhalation toxicity screening methods for manufactured nanomaterials (仮)」とし、本プロジェクトの気管内投与試験を中心とした成果に関する章、BASF 社が進めている5日吸入暴露試験に関する章から構成される予定

である。2017年度中の発行を目指している。

 ・プロジェクトのウェブサイト(日本語・英語)を作成公開した(日: https://metinanojp.aist-riss.jp、英:https://metinanoen.aist-riss.jp)。
そこでは、個別課題の成果物である技術解説書や手順書(日本語版のみ作成) を公開している。

2-1-2 個別要素技術成果

(1) ナノ材料の同等性判断のための評価技術の構築

研究開発項目①ナノ材料の同等性判断のための評価技術の構築

(a) 気管内投与試験によるナノ材料の相互比較による同等性判断基準の構築 一般財団法人化学物質評価研究機構

1. 目的

物理化学特性の異なるナノ材料の安全性を効果的・効率的に確保するために は、ナノ材料の同等性に関する判断基準(有害性が変わらないと考えてよい物 理化学特性の変化の範囲)を確立する必要がある。このため、本研究開発では、 体内分布の観察や定量が比較的容易で、異なる化学組成や物理化学的特性のナ ノ材料を選択して系統的な気管内投与試験により得られた有害性データを用 いて物性の違いによる有害性比較を行い、OECD 等の国際的な場への提案を想定 したナノ材料有害性の同等性の判定基準案を策定する。

2. 成果

雄の F344/DuCrICrIj ラット(12 週齡)に物理化学的特性(以下、物性)の異 なる7種類のナノニ酸化チタン、4種類のナノ酸化ニッケル、9種類のナノニ 酸化ケイ素を単回気管内投与し、投与3、28日後及び13週後に BAL 検査、病 理組織学的検査等を実施した。系統的な気管内投与試験により得られた有害性 データを用いて物性の違いによる有害性比較を行い、各材料についての同等性 判断基準をまとめた。なお、試験した材料にはナノの定義(1辺が100 nm 以 下)を満たさないものも含まれている。

また、アスペクト比の大きいナノ材料である針状の二酸化チタン及び繊維状の酸化ニッケルをラットに単回気管内投与して、投与後最長 104 週の観察を行い、観察期間終了後の腫瘍発生の有無について検討を行った。

2.1 ナノニ酸化チタンの同等性判断基準に関する検討

2.1.1 概要

粒子径、形状、表面処理等の物性が異なる二酸化チタンを用いて、系統的な気 管内投与試験による有害性データの取得を行い、物性の違いによる有害性比較 を行った。気管内投与試験は、ラットを用いて、投与3、28日後及び13週後に 気管支肺胞洗浄(Bronchoalveolar Lavage、以下 BAL)検査、病理組織学的検 査等を実施した。 その結果、二酸化チタン投与により投与3日後の急性期に肺の軽度な炎症を 引き起こすが、投与28日後以降の亜急性期以降では炎症は認められなかった。 一方、表面処理された二酸化チタンでは、亜急性期以降も炎症が継続してみら れた。また、急性期の肺有害性には粒子径が寄与し、形状、結晶型の寄与は少 ないことが示唆された。

2.1.2 試験材料

本研究において選択した7種類の二酸化チタンは、一次粒子径が7.5~996.6 nm、形状が球状、紡錘状及び針状、結晶型がルチル、アナターゼ及び混合型の 二酸化チタンを選択した。気管内投与に用いた7種の二酸化チタンの物理化学 的特性の情報を表①(a)-1 に示す。二酸化チタンの投与液は、国立研究開発法 人産業技術総合研究所(AIST)ナノ材料研究部門が調製した懸濁液を使用した。 媒体には2 mg/mLのリン酸水素ニナトリウムを使用した。

動物は雄のF344/DuCrICrIjラットを使用し、投与時の週齡は12週齡とした。

物哲夕	皆夕 メーカー	比表面積	一次粒子径	二次粒子径	ゼータ電位	笙雪位占	5 形状	丰而加田	幼旦刑
初貝石	×-11-	(m^2/g)	(nm) ^{a)}	(nm) ^{b)}	(mV)	守电位点	1218	衣面処理	心明生
AMT-100	テイカ	205.5	7.5	68.5	-22.4	pH=6.3	球状	無し	アナターゼ
MT-150AW	テイカ	121.2	25.3	54.6	-37.9	pH=5.9	紡錘状	無し	ルチル
TTO-S-3	丁 百 去 世	04.4	00 F	45 0	40.0		****	ánn 1	
(無修飾)	白原座耒	94. 4	20. 5	45.8	-40. Z	рп–5. 0	和7 亚王 1人	悪し	ルナル
TTO-S-3									
(AI (OH) ₃	石原産業	94. 4	27. 8	98.5	-41.3	pH=8.6	紡錘状	AI (0H) 3	ルチル
修飾)									
DOE	日本	E0 1	24.2	60.6	10 7		瑞井	ám. I	ルチル/
F20	エアロジル	59.1	24. Z	69.6	-43. /	рн=о. э	球扒	無し	アナターゼ
MP-100	テイカ	9. 3	467.7	289. 1	-47.2	pH=8.3	球状	無し	ルチル
FTL-100	石原産業	16. 7	996.6	231. 1	-51.0	pH=3.6	針状	無し	ルチル

表①(a)-1 気管内投与試験に用いた二酸化チタンの物性情報

a) 走査型電子顕微鏡 (SEM) 又は透過型電子顕微鏡 (TEM) 実測値

b) 投与液中動的光散乱法 (DLS) 個数平均

2.1.3 試験方法

2.1.3.1 群構成

二酸化チタンの投与用量は、6 mg/kg を高用量とし、中用量は2 mg/kg、低 用量は0.67 mg/kg を設定した。また、二酸化チタン投与群のほかに、媒体の みを投与する媒体対照群(対照群)を設置した。

各用量群について血液学的検査、血液生化学的検査及び病理学的検査を行う 病理検査群、更に BAL 検査及び体内動態検査を行う BAL・動態検査群を設置し た(表①(a)-2)。

田昌瑞		解剖日(投与後)の解剖動物数				
用里矸	快重矸	3日後	28 日後	13 週後		
対照群	病理検査群	5	5	5		
0 mg/kg	BAL·動態検査群	5	5	5		
低用量群	病理検査群	5	5	5		
0.67 mg/kg	BAL·動態検査群	5	5	5		
中用量群	病理検査群	5	5	5		
2 mg/kg	BAL·動態検査群	5	5	5		
高用量群	病理検査群	5	5	5		
6 mg/kg	BAL·動態検査群	5	5	5		

表①(a)-2 二酸化チタンの気管内投与試験の群構成

2.1.3.2 気管内投与

イソフルラン麻酔下で、二酸化チタン投与液を気管内に単回投与した。投与 器具は、AMT-100 及び FTL-100 では、投与液中に 1000 nm 以上の大型の粒子が 含まれ、粒度分布の分散性が不均一であったことから、金属製経ロゾンデ針を 用いた。他の二酸化チタンについては MicroSprayer®(IA-1B-R、PennCentury、 以下、スプレーゾンデ)を用いた。各投与器具を注射筒に取り付けて、体重当 たり1 mL/kgの液量を投与した。なお、FTL-100 については投与液の調製可能 濃度が3 mg/ml であったため、2 mL/kgの液量を投与した。

2.1.3.3 検査項目

全例について、気管内投与から解剖までの観察期間中に一般状態観察及び体 重測定を行った。解剖日には、ペントバルビタールの腹腔内投与による麻酔下 で腹部大動脈より採血後に放血して安楽致死させた後、次の検査を実施した。

BAL 検査は、生理食塩水による気管支肺胞洗浄(7 mL で 2 回洗浄)を行って BAL 液を採取し、総細胞数測定、細胞分画比率算定(好中球、マクロファージ、 好酸球及びリンパ球)及び生化学的検査(総蛋白、アルブミン、乳酸脱水素酵素(LDH)及びアルカリ性フォスファターゼ(ALP))を行った。

血液学的検査は、赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、平均赤 血球容積、平均赤血球ヘモグロビン量、平均赤血球ヘモグロビン濃度、血小板 数、網状赤血球数比率、白血球数、白血球百分率(好中球、好酸球、単球、リ ンパ球、好塩基球及び大型非染色球)、プロトロンビン時間及び活性化部分トロ ンボプラスチン時間を測定した。また、血液生化学的検査として、アスパラギ ン酸アミノトランスフェラーゼ、アラニンアミノトランスフェラーゼ、ALP、 アーグルタミルトランスペプチダーゼ、総コレステロール、トリグリセリド、尿 素窒素、クレアチニン、総蛋白、アルブミン、A/G 比、血糖、総ビリルビン、 総胆汁酸、無機リン、カルシウム、ナトリウム、カリウム及び塩素を測定した。

病理学的検査は、全例を剖検した後、肺、肝臓、腎臓、脳及び脾臓を採取し 重量を測定した。このほかに気管、傍胸腺リンパ節及び後縦隔リンパ節を採取 し、採取した全ての組織についてヘマトキシリン・エオジン染色による病理組 織学的検査を行った。

体内動態検査は、血液、BAL 液及び組織(肺、気管、傍胸腺リンパ節、後縦 隔リンパ節、肝臓、腎臓、脳及び脾臓)を採取し、AIST 安全科学研究部門にお いて動態解析を行った。

2.1.4 結果

2.1.4.1 ナノニ酸化チタンの気管内投与による肺有害性の概要

各二酸化チタンの投与3日後、28日後及び13週後の肺有害性のまとめを表① (a)-3に示す。また、各二酸化チタン6 mg/kg 群の投与3日後、28日後及び13 週後のBAL 検査及び肺相対重量の結果を図①(a)-1に示す。なお、好中球数を除 く各結果は各対照群の値との比率(%)で表した。BAL 液の好中球数については 対照群の値との比率ではばらつきが大きくなるため、実測値で表した。さらに、 各二酸化チタン6 mg/kg 群の投与3日後及び13週後の肺及び後縦隔リンパ節の 病理組織像をそれぞれ図①(a)-2及び3に示す。

各二酸化チタンの気管内投与により投与3日後のBAL検査、肺相対重量、剖 検及び病理組織学的検査において、肺の炎症を示す変化がみられた。AMT-100、 MT-150AW、TTO-S-3 (無修飾)、TTO-S-3 (AI (OH)₃修飾)、P25及びFTL-100では 肺の強い炎症がみられ、MP-100では軽度であった。

TT0-S-3 (AI (OH)₃修飾) では投与 28 日後及び 13 週後においても BAL 液の総 細胞数、好中球数、総蛋白、アルブミン、LDH、ALP、肺相対重量で高値がみられ、 投与 3 日後と同等あるいは 3 日後より高値を示しており、回復は認められなか った (図①(a)-1)。病理組織学的検査では、投与 3 日後に肺の肺胞マクロファー ジによる粒子の貪食、肺胞腔内の炎症細胞浸潤、肺胞上皮の過形成、後縦隔リンパ節の傍皮質の肥大がみられた。投与13週後では肺の肺胞マクロファージによる粒子の貪食、肺胞腔内の炎症細胞浸潤、泡沫細胞の集簇、後縦隔リンパ節の粒子の沈着がみられ、肺の炎症の回復、肺及びリンパ節の粒子の消失は認められなかった(図①(a)-2及び3)。

AMT-100、MT-150AW、TTO-S-3 (無修飾)、P25、MP-100 及び FTL-100 では投与 3 日後にみられた肺の炎症は 28 日後及び 13 週後では回復していた。このほか、 一般状態観察、体重、血液・血液生化学的検査では異常は認められなかった。

		0/ 0 PT - 0/ TT E	
物質名	投与3日後	投与 28 日後	投与 13 週後
AMT-100	軽度な肺の炎症有り	肺の炎症は消失	肺の炎症無し
MT-150AW	強い肺の炎症有り	肺の炎症は消失	肺の炎症無し
TTO-S-3	強い肺の炎症有り	肺の炎症は消失	肺の炎症無し
(無修飾)			
TTO-S-3	強い肺の炎症有り	肺の炎症は継続	肺の炎症は継続
(AI (OH)₃修飾)		(回復無し)	(回復無し)
P25	強い肺の炎症有り	肺の炎症は消失	肺の炎症無し
MP-100	軽度な肺の炎症有り	肺の炎症は消失	肺の炎症無し
FTL-100	強い肺の炎症有り	肺の炎症は消失	肺の炎症無し

表①(a)-3 各二酸化チタン6 mg/kg 群の肺有害性のまとめ





図①(a)-2 各二酸化チタン6 mg/kg 群の肺の病理組織像



図①(a)-3 各二酸化チタン6 mg/kg 群の後縦隔リンパ節の病理組織像

2.1.4.2 ナノニ酸化チタンの気管内投与による体内動態の評価

二酸化チタンの肺内保持量を計測した結果、全ての二酸化チタンで経時的 な減衰がみられ、用量が高くなるほど経時減衰は低下していたが、TTO-S-3

(Al (OH)₃修飾)の高用量群では経時的な減衰がみられず、肺からのクリアランス速度定数も遅かった。また、肺関連リンパ節への移行は全ての二酸化チタンで経時的な増加がみられ、用量が高くなるほど増加していたが、材料による差はほとんど認められなかった。

(詳細は研究開発項目③ナノ材料の有害性試験・評価のための基盤技術の開発(b)ナノ材料の体内動態と生体反応に関する数理モデルの構築を参照。)

2.1.4.3 ナノニ酸化チタンの気管内投与による肺有害性の結果と物理化学的特性との相関性比較

各二酸化チタンの気管内投与試験による肺有害性の結果について、物理化学 的特性を説明変数とし、説明変数間の相関について解析を行った。

- 方法
 - 1) 偏相関係数の確認

複数の変数があり、相互に相関している場合、その変数の真の影響を見るために、見かけの相関から他の変数の影響(他の変数を固定した場合の2変数の相関)を取り除いた。

2) 重回帰分析: ステップワイズ変数選択

変数なし(切片のみ)~全変数による重回帰まで、変数を増減させて最適な モデルを探した。データへのモデルの当てはまり度に対して、変数の数のペナ ルティを課すという考え方に基づき、モデルの良否は AIC (赤池情報量基準) によって判断した。複数の変数からなる重回帰モデルが選択される場合には、 多重共線性のチェックを行った。

3) データの補完

FTL-100 では二次粒子径が欠損しているため、単一代入法の一種として、他の物理化学的特性データからの重回帰式で推定した値で補完した。

上記について、フリー統計ソフトR (ver. 3.10) にて解析を行った。II) 説明変数と従属変数 (表①(a)-4)

説明変数である物理化学的特性のうち、明らかに相関の強い変数はそのうち1つに代表させた。すなわち、一次粒子径、比表面積は一次粒子径に代表させた。従属変数である BAL 検査結果は投与3日後の好中球数、総蛋白、LDH 及び ALP を検討した。なお、各検査結果は対照群との差を用いた。

説明変数	従属変数
ルチル割合: %	好中球数∶cell/µL
アスペクト比:対数値	総蛋白: mg/dL
ー次粒子径:nm の対数値	LDH: IU/L
二次粒子径:nm の対数値	ALP: IU/L

表①(a)-4 説明変数と従属変数

III) 結果

好中球数、総蛋白及び LDH では、他の変数の影響を除いても二次粒子径の 寄与が大きいと判断された。総蛋白及び LDH では一次粒子径の寄与も認めら れた。好中球数、総蛋白及び LDH では、二次粒子径を説明変数とした単回帰モ デルが支持された。ALP では、アスペクト比、一次粒子径、二次粒子径からな る重回帰モデルが支持された。

各二酸化チタンについて投与3日後の肺有害性と投与用量/二次粒子径の相 関関係を図①(a)-4 に示した。BAL 液の好中球数、総蛋白及びLDH で比較的高 い相関性が認められた。



図①(a)-4 二酸化チタンの投与3日後の肺有害性と投与用量/二次粒子径の相関

2.1.5 ナノニ酸化チタンの同等性判断基準

ナノニ酸化チタンは、急性期に肺の軽度な炎症を引き起こすが、亜急性期以降では炎症は認められなかった。一方、表面処理されたナノニ酸化チタンでは、 亜急性期以降も炎症が継続してみられ、肺クリアランスも低下傾向がみられた。 重回帰分析の結果、粒子径が肺有害性に寄与することが示唆された。

以上の結果から、二酸化チタンの同等性判断基準について表①(a)-5 にまとめる。

同等性判断基準				
まあ如理・たし	既存のナノニ酸化チタンと同等と判断できる。			
衣面処理:なし	→肺有害性の程度は粒子径に依存			
主云如田、本川	既存のナノニ酸化チタンと同等とは判断できない。			
衣面処理:のり	→全ての材料で有害性評価が必要			
形状、結晶型の肺有害性への寄与は少ない。				

表①(a)-5 ナノニ酸化チタンの同等性判断基準

2.2. ナノ酸化ニッケルの同等性判断基準に関する検討

2.2.1 概要

粒子径、形状、表面処理等の物性が異なる酸化ニッケルを用いて、系統的な気 管内投与試験による有害性データの取得を行い、物性の違いによる有害性比較 を行った。気管内投与試験は、ラットを用いて、投与3、28日後及び13週後に BAL 検査、病理組織学的検査等を実施した。

その結果、酸化ニッケル投与により投与3日後の急性期から亜慢性期にかけ て肺の炎症を引き起こすが、リソソーム液に対し高い溶解性を示す酸化ニッケ ルでは肺クリアランスも高く、亜急性期以降の肺の炎症反応に回復傾向がみら れた。また、急性期の肺有害性には粒子径が寄与することが示唆されたが、形状、 表面処理の寄与については未検討のため不明であった。

2.2.2 試験材料

本研究において選択した 4 種類の酸化ニッケルは、一次粒子径が 9.6~241 nm、形状が球状、不定形及び繊維状の酸化ニッケルを選択した。気管内投与に 用いた 4 種の酸化ニッケルの物理化学的特性の情報を表①(a)-6 に示す。酸化 ニッケルの投与液は、AIST ナノ材料研究部門が調製した懸濁液を使用した。媒体には精製水を使用した。

物质々	4 4	比表面積	一次粒子径	二次粒子径	ゼータ電位	笙電台占	파가	表面処理
初貝石	<u>х</u> —л—	(m^2/g)	(nm) ^{a)}	(nm) ^{b)}	(mV)	守电位点	<i>1</i> ≥1⊼	
Ni(II) Oxide	Sigmo Aldrich	02.7	(0,6)	20 F	27.0	m∐ \10 E	T : 사 나 나	á m . I
Nanopowder	Signa-Alurich	92.7	(9.0)	39.0	37.2	рп /12.5	环1人	無し
US3352	US Research	50 F	20.0	49.0	22 5	n∐ \10 5	不定形	無し
	Nanomaterials	50.5	20.0	40.9	52. 5	pii /12.5		
上小业公	日下レアメタル	6 6	100.0	1625		一 	不定形	á m . I
1 小粒径	研究所	0.0	139.0	1035)—9無U	ノーダ無し		悪し
NovaWireNi01	Novarials	170	短径: 29.0				繊維状	無し
	Corporation	1/9	長径: 241.0) — 9 無し) — 9 無し	ノーダ無し		

表①(a)-6 気管内投与試験に用いた酸化ニッケルの物性情報

a) SEM 又は TEM 実測値、() は比表面積換算粒径

b) 投与液中 DLS 個数平均 SEM

2.2.3 試験方法

2.2.3.1 群構成

酸化ニッケルの投与用量は、6 mg/kg を高用量とし、中用量は2 mg/kg、低 用量は 0.67 mg/kg を設定した。また、酸化ニッケル投与群のほかに、媒体の みを投与する対照群を設置した。

各用量群について血液学的検査、血液生化学的検査及び病理学的検査を行う病理検査群、更に BAL 検査及び体内動態検査を行う BAL・動態検査群を設置した(表①(a)-7)。

田昌瑞		解剖日(投与後)の解剖動物数				
用里矸	快重矸	3日後	28日後	13 週後		
対照群	病理検査群	5	5	5		
0 mg/kg	BAL·動態検査群	5	5	5		
低用量群	病理検査群	5	5	5		
0.67 mg/kg	BAL·動態検査群	5	5	5		
中用量群	病理検査群	5	5	5		
2 mg/kg	BAL·動態検査群	5	5	5		
高用量群	病理検査群	5	5	5		
6 mg/kg	BAL·動態検査群	5	5	5		

表①(a)-7 酸化ニッケルの気管内投与試験の群構成

2.2.3.2 気管内投与

イソフルラン麻酔下で、酸化ニッケル投与液を気管内に単回投与した。投与には、金属製経ロゾンデ針を注射筒に取り付けて、体重当たり1 mL/kg の液量を投与した。

2.2.3.3 検査項目

二酸化チタンの同等性判断基準に関する検討の2.1.3.3の検査項目に準じた。

- 2.2.4 結果
- 2.2.4.1 ナノ酸化ニッケルの気管内投与による肺有害性の概要

各酸化ニッケルの投与3日後、28日後及び13週後の肺有害性のまとめを表① (a)-8に示す。また、各酸化ニッケル6 mg/kg 群の投与3日後、28日後及び13 週後のBAL 検査及び肺相対重量の結果を図①(a)-5に示す。なお、好中球数を除 く各結果は各対照群の値との比率(%)で表した。BAL 液の好中球数については 対照群の値との比率ではばらつきが大きくなるため、実測値で表した。さらに、 各酸化ニッケル6 mg/kg 群の投与3日後及び13週後の肺及び後縦隔リンパ節の 病理組織像をそれぞれ図①(a)-6及び7に示す。

各酸化ニッケルの気管内投与により投与3日後のBAL検査、肺相対重量、剖 検及び病理組織学的検査において、肺の炎症を示す変化がみられた。Ni(II) Oxide Nanopowder、US3352及びNovaWireNiO1では肺の強い炎症がみられ、I小 粒径では軽度であった。

Ni (II) Oxide Nanopowder では投与28日後及び13週後においてもBAL液の 総細胞数、好中球数、総蛋白、アルブミン、LDH、ALP、肺相対重量で高値がみら れ、総細胞数、好中球数、LDH、肺相対重量で投与13週後まで継続的な増加がみ られた(図①(a)-5)。病理組織学的検査では、投与3日後に肺の肺胞マクロファ ージによる粒子の貪食、炎症細胞浸潤及び肺胞上皮の過形成、後縦隔リンパ節の 傍皮質の肥大がみられた。投与13週後では肺の肺胞マクロファージによる粒子 の貪食、肺胞腔内の炎症細胞浸潤、肺胞マクロファージの変性及び壊死、後縦隔 リンパ節の粒子の沈着がみられ、肺の炎症の回復、肺及びリンパ節の粒子の消失 は認められなかった(図①(a)-6及び7)。このほか、一般状態観察では投与20 日後までに自発運動低下、異常呼吸音等がみられ、投与13週後までに体重の低 値がみられたが、血液・血液生化学的検査では異常は認められなかった。

US3352 では投与 28 日後及び 13 週後においても BAL 液の総細胞数、好中球 総蛋白、アルブミン、LDH、ALP、肺相対重量で高値がみられ、総細胞数、好中球 数、肺相対重量で投与 13 週後まで継続的な増加がみられた(図①(a)-5)。病理 組織学的検査では、投与 3 日後に肺の肺胞マクロファージによる粒子の貪食、 炎症細胞浸潤及び肺胞上皮の過形成、後縦隔リンパ節の傍皮質の肥大がみられ た。投与 13 週後では肺の肺胞マクロファージによる粒子の貪食、肺胞腔内の炎 症細胞浸潤、肺胞マクロファージの変性及び壊死、線維増生、後縦隔リンパ節の 粒子の沈着がみられ、肺の炎症の回復、肺及びリンパ節の粒子の消失は認められ なかった(図①(a)-6 及び 7)。このほか、投与 7 日後に体重の低値がみられた が、一般状態観察、血液・血液生化学的検査では異常は認められなかった。

Ⅰ小粒径では投与 28 日後においても BAL 液の好中球数の軽度な高値がみられたが、投与 3 日後より回復していた。その他の項目についても対照群と同程度に回復していた(図①(a)-5)。病理組織学的検査では、投与 3 日後に肺の肺胞マクロファージによる粒子の貪食がみられたが、炎症は認められなかった。投与 13 週後では肺の肺胞マクロファージによる粒子の貪食、後縦隔リンパ節の粒子の沈着がみられ、肺及びリンパ節の粒子の消失は認められなかった(図①(a)-6 及び 7)。このほか、一般状態観察、体重、血液・血液生化学的検査では異常は認められなかった。

NovaWireNi01 では投与 28 日後及び 13 週後においても BAL 液の総細胞数、総

49

蛋白、肺相対重量等で高値がみられたが、投与13週後までに経時的な回復がみ られた(図①(a)-5)。病理組織学的検査では、投与3日後に肺の肺胞腔内及び血 管周囲の炎症細胞浸潤、肺胞マクロファージの変性及び壊死、後縦隔リンパ節の 傍皮質の肥大みられた。投与13週後では肺の肺胞マクロファージによる粒子の 貪食のみがみられ、肺の炎症の回復及びリンパ節の粒子の消失がみられた(図① (a)-6及び7)。このほか、投与28日後までに摂餌不良、自発運動低下等の一般 状態の悪化、体重の減少がみられ、各群80例中(2.4.気管内投与後2年間の観 察試験の動物を含む)、低用量で2例、中用量で2例、高用量で20例が死亡し た。死亡例では剖検において肺の暗赤色化及び水腫様変化、胸腺の小型化及び副 腎の腫大がみられたことから、NovaWireNiO1の気管内投与により肺で重度な急 性炎症が起こり、呼吸不全及び衰弱により死亡したものと考えた。生存例の血 液・血液生化学的検査では異常は認められなかった。

物質名	投与3日後	投与 28 日後	投与 13 週後
Ni(II) Oxide	おいはの火点をし	肺の炎症は継続又は	肺の炎症は継続又は
Nanopowder	強い肌の炎症有り	進行(回復無し)	進行(回復無し)
1163353	登い時の火庁左日	肺の炎症は継続又は	肺の炎症は継続又は
083352	強い肌の変症有り	進行(回復無し)	進行(回復無し)
I 小粒径	軽度な肺の炎症有り	肺の炎症は消失	肺の炎症無し
NovoWiroNi01	おい時の火庁左旦	肺の炎症は継続	肺の炎症は継続
NovaWireNiUl	強い肌の炎症有り	(3日後より回復)	(28 日後より回復)

表①(a)-8 各二酸化チタン2 mg/kg 群の肺有害性のまとめ





図①(a)-6 各酸化ニッケル6 mg/kg 群の肺病理組織像



図①(a)-7 各酸化ニッケル6 mg/kg 群の後縦隔リンパ節の病理組織像

2.2.4.2 ナノ酸化ニッケルの気管内投与による体内動態の評価

酸化ニッケルの肺内保持量を計測した結果、Ni(II) Oxide Nanopowder、 US3352、I小粒径では軽度な減衰であったが、NovaWireNiO1 で投与3日後24 ~34%、投与28日後0.51~1/0%と急速な減衰がみられ、肺からのクリアラン ス速度定数も速かった。また、肺関連リンパ節への移行はNi(II) Oxide Nanopowder、US3352、I小粒径では用量が高くなるほど移行速度定数が増加す る傾向がみられたが、NovaWireNiO1 では0.05%未満でほとんど移行は認めら れなかった。

生体内において酸化ニッケルの溶解の進行性を確認するため、生体液を模擬した液中での溶解速度を測定した。模擬生体液中は模擬リソソーム液、生理食塩水、純水、過酸化水素(200 µm、10 µm)、模擬間質液を用い、継続的に 200 rpm で振盪させた。その結果、模擬リソソーム液中で NovaWireNiO1 が 30 分後に 26.4%、24 時間後に 99.6%と急速な溶解進行がみられた。Ni(II) 0xide Nanopowder 及び US3352 でもわずかな溶解進行がみられたが、I 小粒径ではほとんど溶解は認められなかった。模擬リソソーム液中での急速な溶解進行から、組織中でマクロファージに取り込まれた後の溶解進行を示唆する可能性が考えられ、肺クリアランス速度定数の速さにも起因することが示唆された。

(詳細は研究開発項目③ナノ材料の有害性試験・評価のための基盤技術の開発(b)ナノ材料の体内動態と生体反応に関する数理モデルの構築を参照。)

2.2.4.3 ナノ酸化ニッケルの気管内投与による肺有害性の結果と物理化学的特性との相関性比較

各酸化ニッケルについて検討した材料数が 4 材料と少ないこと、またデータ が得られない物理化学的特性が多いことから、各酸化ニッケルの気管内投与試 験による肺有害性の結果と物理化学的特性の相関について、一次粒子径又は二 次粒子径を用いた単回帰分析を行った。BAL 検査結果は投与 3 日後の総細胞数、 好中球数、総蛋白、アルブミン、LDH 及び ALP を検討した。なお、好中球数は実 数値の対数値、他の検査結果は対照群との比の対数値を用いた。

各酸化ニッケルについて投与3日後の肺有害性と投与用量/一次粒子径又は投 与用量/二次粒子径の相関関係を図①(a)-8 に示した。BAL 液の総細胞数、総蛋 白、アルブミン及びLDH で比較的高い相関性が認められた。

54



又は用量/二次粒子径の相関

2.2.5 ナノ酸化ニッケルの同等性判断基準

ナノ酸化ニッケルは、急性期から亜慢性期にかけて肺の炎症を引き起こすが、 リソソーム液に対し高い溶解性を示すナノ酸化ニッケルでは肺クリアランスも 高く、亜急性期以降の肺の炎症反応に回復傾向がみられた。重回帰分析の結果、 粒子径が肺有害性に寄与することが示唆された。

以上の結果から、酸化ニッケルの同等性判断基準について表①(a)-9 にまとめる。

同等性判断基準				
リソソーム液溶解性:	既存のナノ酸化ニッケルと同等と判断できる。			
低い	→肺有害性の程度は粒子径に依存			
山、い二人流流の州、	既存のナノ酸化ニッケルと同等とは判断でき			
リノノーム液谷胜住	ない。			
同し、	→肺有害性が回復する可能性有り			
形状、表面処理の有害性への寄与については未検討のため不明。				

表①(a)-9 ナノ酸化ニッケルの同等性判断基準

2.3. ナノニ酸化ケイ素の同等性判断基準に関する検討

2.3.1 概要

粒子径、形状、表面処理等の物性が異なる二酸化ケイ素を用いて、系統的な 気管内投与試験による有害性データの取得を行い、物性の違いによる有害性比 較を行った。気管内投与試験は、ラットを用いて、投与3、28日後及び13週 後に気管支肺胞洗浄液(Bronchoalveolar Lavage Fluid、以下 BALF)検査、病 理組織学的検査等を実施した。

その結果、非晶質の二酸化ケイ素投与により、急性期に肺の軽度な炎症を引き起こすが、亜急性期以降では炎症は認められなかった。急性期の肺有害性には粒子径が寄与することが示唆された。一方、表面処理された二酸化ケイ素では、急性期炎症の程度の減弱がみられた。また、結晶質の二酸化ケイ素は、急性期に肺の軽度な炎症を引き起こすが、亜急性期以降では材料により様々な有害性パターンを示したことから、今回の検討による物理化学的特性の違いとの相関は不明であった。

2.3.2 試験材料

本研究において選択した9種類の二酸化ケイ素は、一次粒子径が13.5~264 nm、形状が球形及び不定形、結晶型が非晶質及び結晶質の二酸化ケイ素を選択 した。気管内投与に用いた9種の二酸化ケイ素の物理化学的特性の情報を表① (a)-10 に示す。二酸化ケイ素の投与液は、AIST ナノ材料研究部門が調製した 懸濁液を使用した。媒体には精製水を使用した。

動物は雄のF344/DuCrICrIjラットを使用し、投与時の週齡は12週齡とした。

		-								
物質名	メーカー	比表面積	一次粒子径	二次粒子径	ゼータ電位	等電位点	形状	表面処理	結晶型	結晶度
		(m²/g)	(nm) ^{a)}	(nm) ^{b)}	(mV)					(%)
Sicastar-Plain	Micromod	275, 4	13.5	9.9	-25.7	pH=3, 49	球形	無し	非晶質	データ
(10nm)							• •••			無し
Signator-Plain	Micromod	60 7	50 <i>J</i>	64	-26.2	n∐−2 75	ᆄᇝ	年1	非晶質	データ
Sicastar-Fiam	witer onioù	00.7	50.4	04	-30. Z	рп-з. 79	球形	無し		無し
Sigastar-COOH	Micromod	75.3	50.8	53.6	-45 1	pH=2. 34	球形	СООН	非晶質	データ
31085Lar -00011	MICTONIOU	75.5	59.0	53. 0	-45.1					無し
Sicastar-	Micromod	001 0	E0 0	66 9	27 4	mH /1 0	北い		北日府	データ
AI (OH) 3	WI Cr Ollou	231.2	52. 0	00.0	57.4	pii <1.0	*** 112		 于田貝	無し
SI007PB	高純度化学	10 0	210	222	07 4		天中形	ánn 1	ᇱᅮᆇ	0 דד
(分級) ^{。)}	研究所	10.0	210	222	-27.4	рп <1. V	个正形	無し	<i>α</i> 石央	11.0
SI007PB	高純度化学	33 Q	251	221	-55 6	nH−1 21	不完形	年 1	る万葉	50 1
(粉砕) ^{d)}	研究所	55.0	201	201	-55. 0	pn=1.31	不足形	<u>兼</u> し	άú共	59.1
S1007PB	高純度化学	152 6	(11,7)	E0 0	_11 0	n∐−1 02	不宁政	4777	ᇱᆮᆇ	60.0
(100 nm) ^{e)}	研究所	155.0	(14.7)	50.0	-44. 0	pn=1.23	个正形		α η χ	00.9
MIN-U SIL5		00.0	170	220	00.0		天中形	á m . I	ぃデ゙゙゙゙゙	70.2
(分級) ^{f)}	US SILIGA	۷۵. ک	170	220	-20. Z	μπ \1.0		無し	α 石央	70.3
MIN-U SIL5	US SILICA	6. 1	264	481	-32. 2	pH <1.0	不定形	無し	α石英	89. 0

表①(a)-10 気管内投与試験に用いた二酸化ケイ素の物性情報

a) SEM 又は TEM 実測値、() は比表面積換算粒径

b) 投与液中 DLS 個数平均

c) SI007PBの原料を遠心分離して粗大粒子を除去した材料

d) SI007PB(分級)をボールミル粉砕後、遠心分離で粗大粒子を除去した材料

e) SI007PB(粉砕)を NaOH 温水溶液中で非晶質成分を溶解除去した材料

f) MIN-U SIL5 を遠心分離して粗大粒子を除去した材料

2.3.3 試験方法

2.3.3.1 群構成

二酸化ケイ素の投与用量は、Sicastar-plain (10 nm) ~SI007PB (100nm) に ついては 2 mg/kg を高用量とし、中用量は 0.67 mg/kg、低用量は 0.22 mg/kg を設定した。MIN-U SIL5 (分級) 及び MIN-U SIL5 については 6 mg/kg を高用 量とし、中用量として 2 mg/kg、低用量として 0.67 mg/kg を設定した。また、 二酸化ケイ素投与群のほかに、媒体のみを投与する対照群を設置した。

各用量群について血液学的検査、血液生化学的検査及び病理学的検査を行う

病理検査群、更に BAL 検査及び体内動態検査を行う BAL・動態検査群を設置した(表①(a)-11 及び 12)。

表①(a)-11 二酸化ケイ素の気管内投与試験の群構成

田昌莊	检本理	解剖日(投与後)の解剖動物数				
用里什	化电杆	3日後	28 日後	13 週後		
対照群	病理検査群	5	5	5		
0 mg/kg	BAL·動態検査群	5	5	5		
低用量群	病理検査群	5	5	5		
0.22 mg/kg	BAL·動態検査群	5	5	5		
中用量群	病理検査群	5	5	5		
0.67 mg/kg	BAL·動態検査群	5	5	5		
高用量群	病理検査群	5	5	5		
2 mg/kg	BAL·動態検査群	5	5	5		

(Sicastar-plain (10 nm) ~SI007PB (100nm))

表①(a)-12 二酸化ケイ素の気管内投与試験の群構成

田昌瑞		解剖日(投与後)の解剖動物数			
用里杆	[3日後	28 日後	13 週後	
対照群	病理検査群	5	5	5	
0 mg/kg	BAL·動態検査群	5	5	5	
低用量群	病理検査群	5	5	5	
0.67 mg/kg	BAL·動態検査群	5	5	5	
中用量群	病理検査群	5	5	5	
2 mg/kg	BAL·動態検査群	5	5	5	
高用量群	病理検査群	5	5	5	
6 mg/kg	BAL·動態検査群	5	5	5	

(MIN-U SIL5 (分級) 及び MIN-U SIL5)

2.3.3.2 気管内投与

イソフルラン麻酔下で、二酸化ケイ素投与液を気管内に単回投与した。投与には、金属製経ロゾンデ針を注射筒に取り付けて、体重当たり1 mL/kg の液量を投与した。

2.3.3.3 検査項目

二酸化チタンの同等性判断基準に関する検討の2.1.3.3の検査項目に準じた。

2.3.4 結果

2.3.4.1 ナノニ酸化ケイ素の気管内投与による肺有害性の概要

各二酸化ケイ素の投与3日後、28日後及び13週後の肺有害性のまとめを表① (a)-13に示す。また、各二酸化ケイ素2mg/kg群の投与3日後、28日後及び13 週後のBAL 検査及び肺相対重量の結果を図①(a)-9に示す。なお、好中球数を除 く各結果は各対照群の値との比率(%)で表した。BAL 液の好中球数については 対照群の値との比率ではばらつきが大きくなるため、実測値で表した。さらに、 各二酸化ケイ素2又は6mg/kg群の投与3日後及び13週後の肺及び後縦隔リン パ節の病理組織像を図①(a)-10及び11に示す。

各二酸化ケイ素の気管内投与により投与3日後のBAL 検査、肺相対重量、剖 検及び病理組織学的検査において、肺の炎症を示す変化がみられた。肺の炎症は SI007PB(分級)で著しく強くみられ、次いでSicastar-Plain(10 nm)、Sicastar-Plain、SI007PB(100 nm)及び MIN-U-SIL5(分級)で比較的強くみられ、Sicastar-COOH、Sicastar-Al(OH)3、SI007PB(粉砕)及び MIN-U-SIL5 では軽度であった(図 ①(a)-9)。

Sicastar-Plain (10 nm) では投与 28 日後においても BAL 液の総細胞数、総蛋 白、アルブミンで高値がみられたが、投与 3 日後より減少していた (図①(a)-9)。病理組織学的検査では、投与 3 日後に肺の肺胞腔内の炎症細胞浸潤、肺胞上 皮の過形成、後縦隔リンパ節の傍皮質の肥大がみられたが、投与 13 週後ではこ れらの変化は消失していた (図①(a)-10 及び 11)。このほか、一般状態観察、体 重、血液・血液生化学的検査では異常は認められなかった。

SI007PB(分級)では投与28日後及び13週後においてもBAL液の総細胞数、 好中球数、総蛋白、アルブミン、LDH、肺相対重量で高値がみられ、投与3日後 と同等あるいは3日後より高値を示しており、回復は認められなかった(図① (a)-9)。病理組織学的検査では、投与3日後に肺の肺胞腔内及び血管周囲の炎 症細胞浸潤、肺胞上皮の過形成、肺胞マクロファージの変性及び壊死、後縦隔リ ンパ節の傍皮質の肥大がみられた。投与13週後では肺の肺胞腔内の炎症細胞浸 潤、肺胞マクロファージの変性及び壊死、肺胞上皮の過形成、後縦隔リンパ節の 肉芽組織がみられ、肺及びリンパ節の炎症の回復は認められなかった(図①(a)-10及び11)。このほか、一般状態観察、体重、血液・血液生化学的検査では異常 は認められなかった。

MIN-U-SIL5 では投与28 日後においても BAL 液の好中球数、LDH 等で高値がみ られたが、投与3 日後より減少していた(図①(a)-9)。病理組織学的検査では、 投与3 日後に肺の炎症細胞浸潤、肺胞上皮の過形成、後縦隔リンパ節の傍皮質 の肥大がみられたが、投与28 日後には肺の炎症は消失していた(図①(a)-10 及 び11)。しかしながら、投与13 週後では BAL 液の総細胞数、好中球数、リンパ

60

球数、総蛋白、アルブミン及び LDH で高値がみられ、病理組織学的検査では肺の 炎症細胞浸潤、泡沫細胞の集簇、肉芽組織、後縦隔リンパ節の肉芽組織がみられ、 肺及びリンパ節の炎症の回復は認められなかった。このほか、一般状態観察、体 重、血液・血液生化学的検査では異常は認められなかった。

Sicastar-Plain、Sicastar-COOH、Sicastar-Al (OH) 3、SI007PB (粉砕)、SI007PB (100 nm) 及び MIN-U-SIL5 (分級) では投与3日後にみられた肺の炎症は28日 後及び13週後では回復していた。このほか、一般状態観察、体重、血液・血液 生化学的検査では異常は認められなかった。

物質名	投与3日後	投与 28 日後	投与 13 週後
Sicastar-Plain	強い肺の炎症有り	肺の炎症は継続	肺の炎症は消失
(10 nm)		(投与3日後より	
		回復)	
Sicastar-Plain	強い肺の炎症有り	肺の炎症は消失	肺の炎症無し
Sicastar-COOH	軽度な肺の炎症有り	肺の炎症は消失	肺の炎症無し
Sicastar-Al (OH) ₃	軽度な肺の炎症有り	肺の炎症は消失	肺の炎症は消失
SI007PB	極めて強い肺の炎症	肺の炎症は継続又	肺の炎症は継続又
(分級)	有り	は進行(回復無し)	は進行(回復無し)
SI007PB	軽度な肺の炎症有り	肺の炎症は消失	肺の炎症無し
(粉砕)			
SI007PB	強い肺の炎症有り	肺の炎症は消失	肺の炎症は消失
(100 nm)			
MIN-U-SIL5	強い肺の炎症有り	肺の炎症は消失	肺の炎症無し
(分級)			
MIN-U-SIL5	軽度な肺の炎症有り	肺の炎症は消失	軽度な肺の炎症有り

表①(a)-13 各二酸化ケイ素 2 mg/kg 群の肺有害性のまとめ



図①(a)-9 各二酸化ケイ素 2 mg/kg 群の BAL 検査及び肺相対重量の結果



図①(a)-10 各二酸化ケイ素 6 mg/kg 群の肺の病理組織像





図①(a)-11 各二酸化ケイ素 6 mg/kg 群の後縦隔リンパ節の病理組織像



図①(a)-11 各二酸化ケイ素 6 mg/kg 群の後縦隔リンパ節の病理組織像(続き)

2.3.4.2 ナノニ酸化ケイ素の気管内投与による体内動態の評価

二酸化ケイ素の肺内保持量を計測した結果、ほとんどの二酸化ケイ素で経時 的な減衰がみられ、用量が高くなるほど経時減衰は低下していた。肺からのクリ アランス速度定数は非晶質の材料では比較的速く、結晶質の材料では遅かった が、いずれも顕著な差ではなかった。また、肺関連リンパ節への移行は非晶質の 材料では移行量は比較的少なかった。

(詳細は研究開発項目③ナノ材料の有害性試験・評価のための基盤技術の開発 (b)ナノ材料の体内動態と生体反応に関する数理モデルの構築を参照。)

2.3.4.3 ナノニ酸化ケイ素の気管内投与による肺有害性の結果と物理化学的特件との相関性比較

各二酸化ケイ素の気管内投与試験による肺有害性の結果について、物理化学 的特性を説明変数とし、説明変数間の相関について解析を行った。

- 方法
 - 1) 偏相関係数の確認

複数の変数があり、相互に相関している場合、その変数の真の影響を見るために、見かけの相関から他の変数の影響(他の変数を固定した場合の2変数の相関)を取り除いた。

2) 重回帰分析: ステップワイズ変数選択

変数なし(切片のみ)~全変数による重回帰まで、変数を増減させて最適な モデルを探した。データへのモデルの当てはまり度に対して、変数の数のペナ ルティを課すという考え方に基づき、モデルの良否は AIC (赤池情報量基準) によって判断する。複数の変数からなる重回帰モデルが選択される場合には、 多重共線性のチェックを行った。

3) データの除外

SI007PB(分級)は他の材料と比べて影響が突出しており、本解析からは除外した。

上記について、フリー統計ソフトR(ver. 3.10)にて解析を行った。 II)説明変数と従属変数(表①(a)-14)

説明変数である物理化学的特性のうち、明らかに相関の強い変数はそのうち1つに代表させた。すなわち、一次粒子径、比表面積は一次粒子径に代表させた。従属変数である BAL 検査結果は投与3日後の総細胞数、好中球数、総蛋白、アルブミン、LDH 及び ALP を検討した。なお、好中球数は実数値の対数値、他の検査結果は対照群との比の対数値を用いた。

説明変数	従属変数	
結晶度:%	総細胞数: cell/µL	
ー次粒子径:nm の対数値	好中球数∶cell/µL	
二次粒子径:nm の対数値	総蛋白: mg/dL	
ゼータ電位:mV	アルブミン: μg/mL	
	LDH: IU/L	
	ALP: IU/L	

表①(a)-14 説明変数と従属変数

III) 結果

偏相関係数では、総細胞数と総蛋白で行った結果、単純な相関係数では、結 晶度、一次粒子径、二次粒子径のいずれも負の相関があったが、他の変数を除 くと、二次粒子径は負の相関、結晶度は正の相関がみられた。重回帰分析では、 総細胞数と総蛋白で行った結果、二次粒子径のモデルが選択された。係数はい ずれの場合も有意であった。

SI007PB(分級)を除く各二酸化ケイ素について投与3日後の肺有害性と投 与用量/二次粒子径の相関関係を図①(a)-12に示した。BAL液の総細胞数及び 総蛋白で比較的高い相関性が認められた。




2.3.5 ナノニ酸化ケイ素の同等性判断基準

非晶質のナノニ酸化ケイ素は、急性期に肺の軽度な炎症を引き起こすが、亜急 性期以降では炎症は認められなかった。一方、表面処理されたナノニ酸化ケイ素 では、急性期炎症の程度の減弱がみられた。重回帰分析の結果、粒子径が肺有害 性に寄与することが示唆された。

また、結晶質の二酸化ケイ素は、急性期に肺の軽度な炎症を引き起こすが、亜 急性期以降では炎症はみられないもの、亜急性期以降にも継続した肺の炎症が みられたもの、急性期にはほとんど炎症がみられないが亜慢性期に炎症がみら れたもの等、材料により様々な有害性パターンを示したことから、今回の検討に よる物理化学的特性の違いとの相関は不明であった。

以上の結果から、二酸化ケイ素の同等性判断基準について表①(a)-15 にまと める。

同等性判断基準								
まあか理したし	既存の非晶質ナノニ酸化ケイ素と同等と判断できる。							
衣面処理こなし	→肺有害性の程度は粒子径に依存							
	既存の非晶質ナノニ酸化ケイ素と同等とは判断でき							
表面処理:あり	ない。							
	→全ての材料で有害性評価が必要							
形状の有害性への寄与については未検討のため不明。								
結晶質ニ酸化ケ	イ素の同等性判断基準は不明。							

表①(a)-15 ナノニ酸化ケイ素の同等性判断基準

2.4. 気管内投与後2年間の観察試験

2.4.1 概要

アスペクト比の大きいナノ材料の気管内投与による長期毒性影響を検討す るため、針状の二酸化チタンである FTL-100 及び繊維状の酸化ニッケルである NovaWireNi01 をラットに単回気管内投与し、投与後最長2年間(104週)の観 察を行った。

その結果、FTL-100 では投与1 年後(52 週後)及び 104 週後に肺の肺胞マク ロファージによる粒子の貪食、肺胞壁及び気管支関連リンパ節の粒子の沈着、後 縦隔リンパ節の粒子の沈着がみられ、投与 104 週後では対照群又は投与群で肺 の細気管支肺胞腺腫、細気管支肺胞腺癌がみられたが、気管内投与の影響による と考えられる腫瘍発生は認められなかった。NovaWireNi01 では投与 104 週後で 対照群又は投与群で肺の細気管支肺胞腺腫、細気管支肺胞腺癌、扁平上皮癌がみ られたが、気管内投与の影響によると考えられる腫瘍発生は認められなかった。

2.4.2 試験材料

本研究において選択したアスペクト比の大きいナノ材料の物理化学的特性 の情報を表①(a)-16 に示す。投与液は、AIST ナノ材料研究部門が調製した懸濁 液を使用した。媒体には FTL-100 は 2 mg/mL のリン酸水素ニナトリウム、 NovaWireNi01 は精製水を使用した。

動物は雄のF344/DuCr | Cr | j ラットを使用し、投与時の週齢は12週齢とした。

物質タ メーカー		比表面積	一次粒子径	二次粒子径	ゼータ電位	华雷侍占	파가	主西加田
初貝石	メーソー	(m^2/g)	(nm) ^{a)}	(nm) ^{b)}	(mV)	守电位点	<i>⊪</i> ≥1⊼	农面処埋
FTL-100	石原産業	16. 7	996.6	231.1	-51.0	pH=3.6	針状	無し
NovoWiroNiO1	Novarials	170	短径: 29.0	ゴーク毎日			(井)(十)	á m. 1
NovaWireNi01	Corporation	179	長径: 241.0	テーダ無し	テーダ無し	テーダ無し	市政市臣 1人	無し

表①(a)-16 気管内投与試験に用いた二酸化チタンの物性情報

a) 走査型電子顕微鏡 (SEM) 又は透過型電子顕微鏡 (TEM) 実測値

b)投与液中動的光散乱法(DLS)個数平均

2.4.3 試験方法

2.4.3.1 群構成

ナノ材料の投与用量は、6 mg/kg を高用量とし、中用量は 2 mg/kg、低用量 は 0.67 mg/kg を設定した。また、ナノ材料投与群のほかに、媒体のみを投与 する対照群を設置した。 各用量群について血液学的検査、血液生化学的検査及び病理学的検査を行う病理検査群、更に BAL 検査及び体内動態検査を行う BAL・動態検査群を設置した(表①(a)-17)。

田昌珙		解剖日(投与後)の解剖動物数	
□ □ 里 仰		52 週後	104 週後	
対照群	病理検査群	10	30	
0 mg/kg	BAL·動態検査群	5	5	
低用量群	病理検査群	10	30	
0.67 mg/kg	BAL·動態検査群	5	5	
中用量群	病理検査群	10	30	
2 mg/kg	BAL·動態検査群	5	5	
高用量群	病理検査群	10	30	
6 mg/kg	BAL·動態検査群	5	5	

表①(a)-17 104 週観察の気管内投与試験の群構成

2.4.3.2 気管内投与

ナノニ酸化チタン又はナノ酸化ニッケルの同等性判断基準に関する検討の 2.1.3.2 及び 2.2.3.2 の投与方法に準じた。

2.4.3.3 検査項目

ナノニ酸化チタンの同等性判断基準に関する検討の2.1.3.3の検査項目に準じた。

2.4.4 結果

2.4.4.1 FTL-100 の気管内投与による 104 週観察試験の結果概要

FTL-100の単回気管内投与後 52 週及び 104 週の観察期間中の死亡発生数、一 般状態観察及び体重測定、観察期間後の BALF 検査、血液学的検査及び血液生化 学的検査で気管内投与の影響と考えられる異常はみられなかった。病理組織学 的検査では、投与 52 週後及び 104 週後に肺の肺胞マクロファージによる粒子の 貪食、肺胞壁及び気管支関連リンパ節の粒子の沈着、後縦隔リンパ節の粒子の沈 着がみられた。

また、投与 104 週後では対照群の生存例で肺の細気管支・肺胞腺腫が 1 例、 0.67 mg/kg 群の生存例で肺の細気管支・肺胞腺癌が 1 例みられたが、腫瘍発生 部に粒子沈着は見られず、発生数が 1 例のみであること、用量依存的な発生数 の増加がみられないことから、気管内投与の影響による変化ではないと考えた (表①(a)-18)。このほか、投与 104 週後の生存例及び 104 週後までの死亡例 で肝臓、腎臓、膀胱、下垂体、甲状腺、副腎、膵臓、包皮腺、皮下組織、骨、 腹膜及び造血器で腫瘍発生がみられたが、用量依存的な発生数の増加がみられ ないことから、気管内投与の影響によるものではないと考えた(表①(a)-18)。 投与 52 週後では腫瘍発生はみられなかった。

投与用量 (mg/kg)	0	0. 67	2	6
检木動物粉	15	18	23	18
快宜到初致	(15) ^{a)}	(12)	(7)	(12)
肺/細気管支肺胞腺腫	1 ^{b)}	0	0	0
肺/細気管支肺胞腺癌	0	1	0	0
肝臓/肝細胞腺腫	1	0	0	0
腎臓/間葉性腫瘍	0	0	0	0 (1)
膀胱/移行上皮癌	0 (1)	0	0	0
膀胱/扁平上皮癌	0	0	0 (1)	0
下垂体/前葉腺腫	5 (5)	3 (1)	6 (2)	5
甲状腺/濾胞細胞腺腫	0 (1)	1 (1)	2	1
甲状腺/傍濾胞細胞腺癌	1 (1)	3	1	1
副腎/褐色細胞腫	0	0 (1)	3 (1)	2
膵臓/島細胞線腫	0	1	1	0
膵臓/島細胞癌	1	0	0	0
皮下組織/包皮腺癌	1 (2)	0 (1)	0	0
皮下組織/線維腫	2	2 (1)	2 (1)	0 (1)
皮下組織/線維肉腫	0 (2)	0	0	0 (1)
皮下組織/線維線腫	0	0	0	0 (1)
皮下組織/角化棘細胞腫	0	0	0 (1)	0 (1)
肋骨又は頭蓋骨/骨肉腫	0 (1)	0	0	0 (1)
腹膜/中皮腫	0 (1)	0	0	0
造血器/LGL 性白血病	1	0	0	0
造血器/悪性リンパ腫	0 (1)	1	0 (1)	0
造血器/骨髄性白血病	0 (1)	0 (2)	0	1 (2)

表①(a)-18 FTL-100の気管内投与 104 週後までの腫瘍発生数

a) (数字) は投与 104 週後までの死亡例の検査動物数

b) (数字) は投与 104 週後までの死亡例での腫瘍発生数

2.4.4.2 NovaWireNi01 の気管内投与による 104 週観察試験の結果概要

NovaWireNi01 の単回気管内投与後 52 週及び 104 週の観察期間中の一般状態 観察では摂餌不良、自発運動低下のほかに無便、削痩等のさらに重篤な一般状態 の悪化がみられ、投与 14 日目までに 0.67 mg/kg 群で 1 例、2 mg/kg 群で 2 例、 6 mg/kg 群で 11 例が死亡した。投与 14 日目までの急性期の生存率について比較 した結果、6 mg/kg 群で生存率の低下がみられたが、急性期の死亡例を除いた 52 週後及び 104 週後までの生存率については有意な差はみられなかった。体重で は、投与 3 日後及び 1 週後の 0.67 mg/kg 以上の群で有意な低値、3 か月後まで の 2 mg/kg 以上の群で有意な低値、投与 4 か月後の 6 mg/kg 群で有意な低値が みられた。52 週及び 104 週の観察期間後の BAL 検査、血液学的検査及び血液生 化学的検査では気管内投与の影響と考えられる異常はみられなかった。病理組 織学的検査では、投与 52 週後に気管内投与の影響と考えられる異常はみられな かった。

また、投与104 週後では、対照群の生存例で細気管支・肺胞腺腫が1例、生存例及び死亡例で細気管支・肺胞腺癌が各1例、0.67 mg/kg 群の生存例で細気 管支・肺胞腺腫が2例、2 mg/kg 群の生存例で細気管支・肺胞腺腫が1例、扁 平上皮癌が1例にみられたが、6 mg/kg 群では腫瘍発生はみられず、用量依存 的な発生数の増加もみられないことから、気管内投与の影響による変化ではな いと考えた(表①(a)-19)。さらに、投与104 週後では、肺胞上皮の過形成、 肉芽腫性変化がみられたが、用量依存的な発生数の増加やグレードの増加はみ られなかった。また、後縦隔リンパ節の肉芽腫性変化が投与52 週後では、2 mg/kg 群の生存例、投与104 週後では、0.67 mg/kg 群及び2 mg/kg 群の生存例 でみられた。このほか、投与104 週後の生存例及び104 週後までの死亡例で肝 臓、腺胃、小腸、下垂体、甲状腺、副腎、耳介、乳腺、皮膚、皮下組織、腹 膜、頭蓋骨及び造血器で腫瘍発生がみられたが、用量依存的な発生数の増加が みられないことから、気管内投与の影響によるものではないと考えた(表 ①(a)-19)。投与52 週後では0.67 mg/kg 群で甲状腺の濾胞細胞癌が1例でみ られたのみであった。

74

投与用量(mg/kg)	0	0.67	2	6
	19	15	15	8
快直動初致	(11)	(14)	(15)	(12)
肺/細気管支肺胞腺腫	1	2	1	0
肺/細気管支肺胞腺癌	1 (1)	0	0	0
肺/扁平上皮癌	0	0	1	0
腺胃/線維肉腫	1	0	0	0
小腸/腺癌	0 (1)	0	0	0
肝臓/肝細胞腺腫	1	0	2	0
肝臓/肝細胞腺癌	0	0	0	1
下垂体前葉/腺腫	5 (2)	4 (3)	2 (2)	2 (4)
甲状腺/濾胞細胞腺腫	1	0 (1)	0	0 (1)
甲状腺/傍濾胞細胞腺腫	2	1	3	0
副腎/褐色細胞腫	1	0 (1)	0 (1)	0 (2)
副腎/皮質腺癌	0	0 (1)	0	0
耳介/ジンバル腺癌	0	0	0	0 (1)
乳腺/腺癌	1	0	0	0
皮膚/扁平上皮癌	1	0	0	0
皮下組織/皮脂腺癌	0	0 (1)	0	0
皮下組織/ アポクリン腺癌	0	0	0	0 (1)
皮下組織/包皮腺癌	0	0	0 (2)	1
皮下組織/線維腫	1 (1)	0	3 (1)	0 (1)
皮下組織/線維肉腫	(2)	0	(1)	(2)
皮下組織/腺棘細胞癌	0	(1)	0	0
皮下組織/角化棘細胞腫	0 (1)	0	0	0
腹膜/中皮腫	0	0 (1)	0	0 (1)
頭蓋骨/骨肉腫	0	0	(1)	0
造血器/LGL 性白血病	0	1 (2)	1 (1)	0 (2)
造血器/骨髄性白血病	0 (1)	0 (2)	0	0 (1)

表①(a)-19 NovaWireNi01 の気管内投与 104 週後までの腫瘍発生数

a) (数字) は投与 104 週後までの死亡例の検査動物数

b) (数字) は投与 104 週後までの死亡例での腫瘍発生数

3. まとめ

雄の F344/DuCrICrIj ラット(12 週齡)に物性の異なる7種類のナノニ酸化 チタン、4種類のナノ酸化ニッケル、9種類のナノニ酸化チタンを気管内投与 し、投与3、28日後及び13週後にBAL 検査、病理組織学的検査等を実施して有 害性データの取得を行い、物性の違いによる有害性比較を行った。

その結果、ナノニ酸化チタンでは、投与3日後の急性期に肺の軽度な炎症を 引き起こすが、亜急性期以降では炎症は認められなかった。一方、表面処理さ れたナノニ酸化チタンでは、亜急性期以降も炎症が継続してみられた。また、 急性期の肺有害性には粒子径が寄与し、形状、結晶型の寄与は少ないことが示 唆された。

ナノ酸化ニッケルでは、投与3日後の急性期から亜慢性期にかけて肺の炎症 を引き起こすが、リソソーム液に対し高い溶解性を示すナノ酸化ニッケルでは 肺クリアランスも高く、亜急性期以降の肺の炎症反応に回復傾向がみられた。ま た、急性期の肺有害性には粒子径が寄与することが示唆されたが、形状、表面処 理の寄与については未検討のため不明であった。

非晶質のナノニ酸化ケイ素では、投与3日後の急性期に肺の軽度な炎症を引 き起こすが、亜急性期以降では炎症は認められなかった。一方、表面処理された ナノニ酸化ケイ素では、急性期炎症の程度の減弱がみられた。重回帰分析の結果、 粒子径が肺有害性に寄与することが示唆された。また、結晶質の二酸化ケイ素は、 急性期に肺の軽度な炎症を引き起こすが、亜急性期以降では材料により様々な 有害性パターンを示したことから、今回の検討による物理化学的特性の違いと の相関は不明であった。

また、アスペクト比の大きいナノ材料である針状のナノニ酸化チタン FTL-100及び繊維状のナノ酸化ニッケル NovaWireNi01 をラットに単回気管内投与し、 投与後最長 104 週の観察を行った結果、ナノ材料の気管内投与による影響と思 われる腫瘍発生の増加は認められなかった。

4. 参考文献

なし

研究開発項目①ナノ材料の同等性判断のための評価技術の構築

(b) 同等性評価のための試料調製技術とキャラクタリゼーション 国立研究開発法人産業技術総合研究所ナノ材料研究部門

1. 目的

本研究開発項目では、研究開発項目①(a)を始めとする有害性試験に対して ナノ材料分散液の供給ならびに試料の物理化学特性を明らかにするためのキャ ラクタリゼーションを行う。また、最終的には、気管内投与試験のための試料調 製およびキャラクタリゼーションの方法や留意点についてとりまとめることを 目的とする。

2. 成果

同等性評価のための試料として、サイズ、形状、結晶性、表面修飾等が異な る、メーカーから入手可能な二酸化チタン、二酸化シリコン、酸化ニッケル、 酸化セリウム、酸化亜鉛について、有害性試験のための最適な試料調製技術、 液中分散技術の開発を行うと共に、有害性評価の有効な情報となるキャラクタ リゼーションを行った。試料調製技術に関しては、各ナノ材料の試料調製の基 本となる標準的な調製法を確立し、その上に個別材料に合わせた調製方法を追 加した。キャラクタリゼーションに関しては、二酸化シリコンの結晶性評価に おいて、論文報告されている先端的な手法を応用するなどの技術開発を行った。 また、これらの試料調製及びキャラクタリゼーション技術に関して、手法や留 意点をとりまとめた技術解説書を作成した。

2.1 二酸化チタンナノ粒子

本プロジェクトにおいて、まず、比較的有害性が低いと予想され、且つ、多様な粒子形状及び粒子サイズの市販品ナノ粒子が入手可能な、二酸化チタン (TiO₂)を試験試料とした。試験に用いた二酸化チタンナノ粒子の SEM 写真を 図①(b)-1 に示す。

この二酸化チタンナノ粒子の調製で得られた技術を基に、その他のナノ材料 の調製技術の基本となる標準的な調製法を確立した。

2.1.1 分散剤の選択

本プロジェクトでは、試料分析や動物試験において検討要素を増やさない観 点などから、基本的には試料調製に対象ナノ材料と純水溶媒以外の添加物を加 えないようにしている。

しかし、二酸化チタンの場合、事前実験などで等電点が pH7 近傍であること

が分かっており、純水溶媒中での希薄濃度では等電点に近くなって安定分散が 難しいため、分散剤の使用を行った。

二酸化チタンナノ粒子を分散させるための分散剤は、分散剤自身を含む溶液 を動物に投与することから、分散剤の化学薬品としての動物への影響が比較的 少ない分散剤を選択する必要がある。そこで、今回、動物試験を実施する共同 研究機関での、これまでの実績ならびに NED0 「ナノ粒子特性評価手法の研究 開発」プロジェクトで得られた手順書に基づいて酸化チタンを安定に分散させ るための分散剤の候補として、リン酸水素ニナトリウム (Na₂HPO₄・12H₂O、 Disodium Phosphate (DSP))を候補とした。なお、本プロジェクトにおける DSP 濃度は全て、結晶水を含んだ固体 DSP 重量を基にした計算としている。

分散剤無し(純水)、DSP 1 mg/mL 溶液、DSP 10 mg/mL の各溶液を準備して、 そこへ試験用の二酸化チタンナノ粒子を1 mg/mL から 10 mg/mL の範囲の濃度 となるように、スクリューガラス管瓶(13.5 mL 容量)中に液量がおよそ 10 mL となるように懸濁させた。さらに、懸濁液の入ったスクリューガラス管瓶を超 音波洗浄機にて 3 時間分散処理を行い、ナノ粒子を分散させた。この間 30 分 ごとに、一部、瓶の底に沈降した粒子を瓶ごと手で振とうし、分散液の均一性 を保つことで超音波分散の効果を高めた。3 時間直後より、分散液の入った瓶 を静置して、粒子の沈降状況の経過観察を行った。図①(b)-2 に DSP 溶液中に 二酸化チタンナノ粒子を懸濁させた分散液の、超音波処理直後および 6 時間経 過後の経過観察写真を示す。

同様な観察を数時間おきに 72 時間後まで実施し、DSP 1 mg/mL の溶液を用いた懸濁液の分散安定性の方が優れていることが分かった。この結果は、NEDO「ナノ粒子特性評価手法の研究開発」プロジェクトで得られた TiO₂分散溶液の 手順書で使用されていた DSP 2 mg/mL の溶液の結果とも近かった。また、共同 研究機関である日本バイオアッセイ研究センターにおいて予備試験を行い、 DSP 溶液の動物に対する影響が低いことも合わせて確認し、最終的に DSP 2 mg/mL 溶液を二酸化チタン試料における標準溶媒とした。

78



図①(b)-1 二酸化チタンナノ粒子の SEM 写真



図①(b)-2 DSP 溶液中に二酸化チタンナノ粒子を懸濁させた分散液の 超音波処理後の経過観察写真

2.1.2 分散液中での凝集粒子の粒径分布

二酸化チタン粒子濃度 10 mg/mL で DSP 1 mg/mL の分散液について、超音波 分散処理を3時間行い調製した。またこの分散液を、2,000 xg、3分間遠心操 作して上澄みを得た。これらの遠心分離操作前後の分散液を DLS 法粒子径分析 装置を用いて分散液中の、粒径分布について評価を行い、図①(b)-3 にその結 果を示した。それぞれ、散乱強度分布、個数分布、体積分布の三種類の解析結 果を示した。

遠心分離操作を行わない場合、個数としては多くはないものの3 μm以上の 巨大な凝集粒子が含まれていることが分かる。一方、2,000 xg で3分間遠心分 離操作を行った場合は1 μm以上の巨大な凝集粒子が除去されていることが分 かる。



図①(b)-3 DSP 1 mg/mL 溶液中に二酸化チタンナノ粒子を 10 mg/mL 懸濁させた 分散液の遠心分離操作(2000 xg、3 分間)前(A)と後(B)の粒径分布

本プロジェクトの動物試験で使用した二酸化チタンナノ粒子分散溶液は、吸入暴露試験と気管内注入試験を比較するという点から、空気動力学径がラット 肺の沈着のピークとなる2または3µm以下となっていることが望ましいと考 えられ、遠心分離処理を行った後(B)の分散溶液には、実際に、この範囲の凝集 粒子だけが含まれている。また、遠心分離処理を行っていない分散液は、分散 剤である DSP が存在していても、巨大な凝集粒子は容易に沈降してしまうため に安定性が非常に悪い。一方、遠心分離処理を行った分散溶液は1か月程度に わたって安定であり、多少凝集粒子が沈降した場合も、10分程度の超音波処理 を行うことによって、ほぼ遠心分離操作後の分散状態に戻ることが分かった。

2.1.3標準的なナノ粒子分散液の調製法

本プロジェクトにおける試験液の調製は、通常の化学実験室で行っており、 厳密な生物実験用の無菌実験室にはなっていない。従って、作業に使う純水は 全て、バイオ対応の超純水製造装置であるミリポア社の Milli-Q-Integral3 バ イオタイプを使って製造した超純水を用い、試験液の製造や調製処理の溶媒に 利用する水については、さらに 121°C-20 分のオートクレーブ処理で重ねてエ ンドトキシンの不活性化処理を行った。また、消耗品については、可能な限り γ 線滅菌処理済みの市販品を利用し、それ以外のもので、加熱可能な器具類は オートクレーブ処理を、加熱不可能な器具類は消毒用アルコールで清拭し、使 い捨てのゴム手袋を利用した。これらの一連の作業手順を確立させてから、 0.03 EU (Endtoxin Unit)の感度を持つパイロテル試験薬を用いて、試験液の Limulus Amebocyte Lysate (LAL)試験を行い、エンドトキシンフリーであるこ とを確認した。なお、このように一度エンドトキシンフリーを確認した作業手順 については、極力手順の変更を避け、手順を変更した場合は、再度LAL試験を 行った。

前節に述べたように、遠心分離操作によって 3µm 以上の巨大な凝集粒子を 含まない安定性の高い分散液を調製できる。また、動物試験に供するためには、 分散液の安定性のみならず、エンドトキシンが入っていない、粒子濃度の比較 的高い分散液を調製することも重要である。そこで、動物実験に供する二酸化 チタンナノ粒子の分散液の超音波洗浄器を利用した標準的な調製法として以 下の手順を策定した。

①DSP 溶液の調製

- ・エンドトキシンフリーの超純水を用いて、メスフラスコに 2 mg/mL の DSP 溶液を調製。
- DSP には、例えば和光純薬工業株式会社リン酸ニナトリウム食品添加物 198-05955 を使用。
- ・DSP 溶液を調製する容器は必ずしも滅菌処理を行う必要は無いが、容器内側の付着物は事前に水洗いで取り除いておく。上記のメスフラスコも同様。

- DSP 溶液をフィルターで濾過滅菌する。使用するフィルターユニットの例としては NALGENE ボトルトップフィルター(ポアサイズ ;0.45 μm、適合ボトルロ径;45 mm、フィルター容器;500 mL)などを使用。
- ・フィルター滅菌後の DSP 溶液をオートクレーブで 120℃、20 分滅菌処理。

②超音波分散·遠心分離処理

- ・超音波洗浄機(ブランソン 5510J-MT)の洗浄浴槽の水からのコンタミネーションを避けるため、浴槽の内壁面を、70%エタノール水溶液を含ませたベンコットなどでクリーニングする。
- ・オートクレーブで 120℃、20 分滅菌処理した、エンドトキシンフリーの超
 純水を浴槽にはる。
- ・50 mLのガラス製スクリュー管瓶に原料粉体を秤量して、①の DSP 2 mg/mL
 溶液必要量を加えキャップをして、よく振とうさせて混合する。
- ・超音波洗浄器により2時間分散液を混合する。試料瓶内のナノ粒子の濃度 勾配が大きいと超音波分散が有効に働かないので、30分間隔を目安に試料 瓶を取り出して手で振とうを繰り返し、超音波分散処理を2時間行う。分 散処理後の分散液を、1,000 xg で 30分間遠心分離機にかけて、分散性の 悪い粗大粒子(二酸化チタン以外のナノ粒子では、2µm以上の粒子径とし た)を分離し、採取した上澄み液をDLS 粒径分析する。



図①(b)-4 手で振とう



図①(b)-5 超音波洗浄機で分散処理

③重量分析

試料液調製には遠心分離などの濃度変化を伴う処理を含むので、最終生成試 料液の濃度は重量分析によって確認する。

2.1.4 分散溶液の安定性 複数回数の気管内投与試験などいくつかの動物試験では、異なる希釈濃度の 酸化チタンナノ粒子分散溶液を一定の期間、間隔を空けて投与する場合がある。 そのため、投与に使用する分散液の長期安定性が非常に重要となってくる。そこ で、高濃度の酸化チタンナノ粒子の分散液を上述の手順で調製した後、DSP 溶液 にて希釈して、TiO₂粒子濃度の異なる5種類の分散液を用意した。分散液中の凝 集粒子の平均粒径を DLS 法粒子径分析装置によって計測し、その経時変化を調 べた。計測の際には、分散液をよく振とうさせた後、超音波洗浄器にて10分間 分散させた後、計測を行っている。また、分散液は、常温にて静置保管した。

得られた結果を図①(b)-6 に示す。最も薄い濃度の分散液以外は、2 か月近く にわたって、粒径が増加することはなく、若干の増減があるものの非常に安定し ていることが分かる。一方、最も薄い濃度の分散液(0.38 mg/mL)の場合、徐々 に粒径が増加する傾向にあり、およそ2か月後には、初期の粒径からおよそ15% 増大した。

以上のことから、2.1.3 に記載した標準的な試料調整手順を基に、DSP 分散剤 を用いることで、動物試験に求められる長期安定で多様な濃度の TiO₂ 分散液が 調製できることが分かった。なお、紡錘状や針状などの異方性が強い形状や、一 次粒子径が数百 nm 以上になる二酸化チタンについては、分散が難しく、通常の 水槽式超音波洗浄機では不十分で、超音波ホモジナイザーを使うなど、試料毎に 多少の手順の修正は必要である。



図①(b)-6 P25 粒子分散溶液中の凝集粒子の平均粒径(z-average) の経時変化

2.1.5 二酸化チタンのキャラクタリゼーション

本プロジェクトで提供した二酸化チタン原料及び試験試料のキャラクタリゼ ーションのリストを表①(b)-1、①(b)-2 に示す。

試料	一次粒	:子径 n)	比表面積	換算粒径	等電位占	ゼータ	その他 の測定	備考	DLS 代表値(nm)
or 原料	平均值	SEM/	(m²/g)	(nm)	(pH)	电应 平均值 (mV)	W /床1/上		個数平均
AMT-100		值(6nm)	、純度 93%、密	き度 3.9、アナ:	ターゼ、テイ:	力社			
原料			293.5	5.2			XRD		
試料	7.5	TEM	205.5	7.5	6.3	-22.4		DSP	68.5
原料			108.1	13.2			XRD		
試料	25.3 12x55	ТЕМ	121.2 (111)	11.8 (12.9)	5.9	-37.9		DSP、比表面 積のカッコは純 水溶媒の値	54.6
TTO-S-(3 (AI(OH)3	;修飾)、(10-20x50-100	、純度 85		H)3:8.8%、₹	密度 4.2、ル		
原料			94.9	15.1			XPS		
試料	27.8 64x13	ТЕМ	94.4	15.1	8.6	-41.3		DSP	98.5
TTO-S-:	 3(無修飾))、(10-20)	 x50−100nm)、∦	 純度 96%前後	AI(OH)3:8.8			、紡錘状、石原産業	 < 社
原料			101.1	14.1			XRD XPS		
試料	26.5 62×12	TEM	97.1	14.7	5	-40.2		DSP	45.8

表①(b)-1 二酸化チタンリスト-1

<u>=</u> -+ √/	一次粒子	·径		換算粒	等電位	ゼータ	その他	/# *	DLS 代表值			
記不升	(nm)		比 衣囬傾	径	点	電位	の測定	1佣-5	(nm)			
	亚均体	SEM/	(2 ()			平均值			周光五步			
		TEM	(m-/g)	(nm)	(рн)	(mV)			他致平均			
原料			50.0	30.3			XRD					
試料	24.2	TEM	59.1	25.7	6.5	-43.7		DSP	69.6			
FTL-100	、(130 径 x1680)長 nm)、	純度 99%前後	後、密度 4.2、	ルチル、針キ	犬、石原産	業社					
原料			12.2	116.9			XRD					
試料	996.6x68.8	TEM	16.7	85.5	3.6	-51.0			231.1			
MP-100、	MP-100、(1,000nm)、純度 96.5%、球形、密度 4.2、ルチル、テイカ社											
原料			6.5	221.2			XRD					
試料	467.7	TEM	9.3	154.2	8.3	-47.2		DSP	289.1			

表①(b)-2 二酸化チタンリスト-2

このキャラクタリゼーションにおいて、一次粒子径は、走査電子顕微鏡(SEM) もしくは透過電子顕微鏡(TEM)による観察像から求めている。この種の粒子径 分布を画像の自動解析で行ってくれるソフトウェアも市販されているが、いく つかの市販ソフトウェアを試用させてもらったが、粒子の重複が多い画像から は自動解析は難しいという結論が得られたため、本プロジェクトでは、手作業 で解析を行った。具体的な手順としては、十分な統計精度を得るための合計 500 個分の粒子解析が行える観察画像を、必要に応じて同一試料に対する異なる視 野で複数枚撮影し、一般的な画像解析ソフトウェア(ここでは、Adobe 社の Photoshop を使用)を用いて、図①(b)-7 に示されるような楕円の当てはめを 目視で行う。得られた当てはめ楕円画像のみを取りだして、フリーの科学画像 処理ソフトウェア(Image-J)を使って、2値化、粒子カウント処理を行った。



図①(b)-7 粒子画像への 楕円当てはめの例

2.2酸化ニッケルナノ粒子

前述の二酸化チタンとは対照的に、投与によって長期間の持続的な影響が予想される材料として、酸化ニッケル(NiO)を検討した。ただし、酸化ニッケル ナノ粒子の市販品は二酸化チタンほど多様では無く、工業用材料も含めた5種類の試料(うち、US3355とUS3352は、ほぼ同等材料)を調製した。

粒子形状が異なる4種のNi0粒子のSEM写真を図①(b)-8に示す。

2.2.1 微小 (~20nm) 球状 Ni0 ナノ粒子

同じUS Research Nanomaterials 社製のUS3352 とUS3355 は、共に球状で 20nm 程度の粒子径を持つナノ粒子である。しかしながら、US3355 は超純水へ の親和性が悪く、その結果として分散安定性も悪かった。一方、類似形状粒子 のUS3352 は超純水への親和性が良く、分散安定性に優れていたことから、動 物試験には主にUS3352 を用いた。US3352 の試料調製は、基本的に二酸化チタ ンナノ粒子(P25) で行った標準的な分散操作手順に準じた方法で行った。図 ①(b)-9 に、得られた分散液の動的光散乱(DLS) 粒径評価装置による粒径分布 (散乱強度基準(左)および個数基準(右))を示す。

86



US3352

NiO 小粒径

NovaWireNi01



アルドリッチ





図①(b)-9 US3352 分散液の DLS による粒径分布

2.2.2 サブミクロ粒子径 Ni0 ナノ粒子

NiO 有害性評価の粒子径依存性を検討する目的から、2.2.1 の NiO より一桁 粒子径が大きい、日下レアメタル社製の NiO-I 小粒径(カタログ値、300nm) の試料調製を試みた。この材料は工業用途の市販品であるために、粒子の凝集 を防ぐ目的でポリアクリル酸系高分子の分散剤が添加されている。この分散剤 は水溶性ポリマーであることから、本プロジェクトにおける動物試験への余計 な影響を除くために、純水洗浄を行った。

具体的な手順としては、

- 約6 mg/mL 濃度の試料液を1時間の超音波分散処理し、10,000 xg で 10分間の遠心分離により固液分離を行う。
- (2) 回収した粉体固形成分に再び同濃度になるように超純水を加え、10~ 20 分間の超音波分散処理によって回収粉体が十分に再分散したことを 確かめる。
- (3) 上記(1)(2)の操作を3回繰り返す。 分散剤の洗浄効果は、SEM 観察等によって有機物成分が見られないこと で確認した。

原料粉体においても長期分散安定性は良く無いが、分散剤が除去された洗浄 後の分散液の長期安定性は悪い。数十分程度で液内に濃度勾配が発生するので、 投与直前に超音波分散を行って速やかに投与することが望ましい。

しかしながら、調製後速やかに DLS 法粒子径分析装置で測定した粒径分布 図①(b)-10 では粗大粒子は見られず、調製直後の分散液では粗大凝集粒子が 発生していないことが確かめられた。



図①(b)-10 洗浄後の 300 nm 粒子径 Ni0 ナノ粒子 0.74 mg/mL 分散液の粒径分布 散乱強度基準(左)と個数基準(右)データ

2.2.3 中間粒子径 Ni0 ナノ粒子

カタログ値では、微小ナノ粒子(~20nm)と粒子径が大きなナノ粒子(~300nm)の中間の粒子径(~50nm)を示すアルドリッチ社 637130を検討した。 試料調製法に関しては、やや粗大粒子が発生しやすいものの、2.1で説明した 標準的な手順に準じた、超音波分散を3時間かけた後、1,000 xg で粗大粒子を 除去する処理で安定分散液が得られた。

図①(b)-11 に、本試験用に調製した同試料の、DLS 測定による粒子径分布を

示す。体積基準及び個数基準の分布に、複数ピークが見られるが、ゾンデ使用 で問題となる2μm以上の粗大粒子は検出されなかった。



図①(b)-11 アルドリッチ 637130 Ni0 ナノ粒子 DLS による粒子径分布測定 結果



図①(b)-12 アルドリッチ 637130 Ni0 ナノ粒子のゾンデ使用の影響 (6.0 mg/mL 濃度、体積基準)

また、本研究プロジェクトでの試験動物への気管内投与には、通常の経ロゾ ンデと投与液を霧状に噴霧するスプレーゾンデの2種のゾンデが用いられてい るが、本 Ni0 試験液を用いて、2種のゾンデ使用による粒子径分布への影響を 確かめた結果が、図①(b)-12 に示されている。両ゾンデ共に使用による顕著な 粒子径分布への影響は見られず、粗大粒子を除去することでゾンデの使用によ る試験液の変質がないことが確認された。

2.2.4 Ni0 ナノワイヤー粒子

有害性の形状効果を調べる目的で、Novarials 社製の繊維状の酸化ニッケル NovaWireNi01 を検討した。このナノワイヤー粒子は、カタログデータでは幅が およそ 20nm、長さは 20 μm の極端な異方形状を有しており、形状由来の凝集性 が高い粒子であるため、標準的な調製法で安定分散液を得ることは困難であった。また、図①(b)-13のような SEM と連動したエネルギー分散型蛍光 X 線分析装置(EDX)による分析によって、原粉末中に、硫黄(6.25 重量%)やナトリウム(0.4 重量%)などの不純物が含まれていることが判明したため、不純物低減と分散安定性向上の両目的から、マグネットスターラー、超音波分散による原粉末の入念な洗浄と、遠心分離による溶媒と粒子の分離を組み合わせた洗浄処理を6回繰り返した。この洗浄処理によって、不純物の低減(硫黄:4.55 重量%、ナトリウム:0.04 重量%)と分散安定性の向上を得た上で、最終的な分散液調製を行い、気管内投与試験用に提供した。

なお、本材料は購入ロットごとの粒子サイズの差が大きかったが、動物試験 に用いた最終調製試験液中の粒子に関しては、平均サイズとして太さが 30nm、 長さが 240nm であった。



図①(b)-13 EDX による Ni0 ナノワイヤー の不純物分析例 2.2.5 本プロジェクトで提供した酸化ニッケル原料及び試験試料のキャラク タリゼーションのリスト

	一次料	位子径	比表面	比表面積			その他の		DLS 代表		
試料	(n	m)	積	換算粒径	等電位点	ゼータ電位	測定	備考	值(nm)		
E NA		SEM/	(m²/		(11)	平均值			試料		
or 原料	平均個	TEM	g)	(nm)	(pH)	(mV)			個数平均		
US3352、	カタログ値(1	8nm)、純度 9	99.98+%、不	定形、US Rese	earch Nanom	aterials 社					
臣利			46.8	19.1	125 U F	35 5	XRD				
/示 个十			40.8	19.1	12.5 以上		XPS				
試料	20	TEM	50.5	17.7	12.5 以上	32.5			48.9		
US3355、	(15–35nm)	、純度 99.5%、 ·	球形、US	Research Nand	omaterials 社						
原料			43.5	20.5	12.1	16.5	XRD				
試料	19	TEM	57.0	15.7	12.6	33.7			42.5		
NiO-I 小粒径、(300nm)、不定形、日下レアメタル研究所											
原料	百判 6.0 120.7 天海 天海 XRD										
							XPS				
試料	139	SEM	6.6	135.3			XPS		1635.4		
NiO ナノ	フイヤー、(20)nmx20um)、∦	载維状、No	varials Corpora	ation 社						
原料			96.4	9.3	不適	不適	XRD				
	太さ:29										
<u>≣-</u> #:4	長さ 241	SEM	179.6	5.0			XRD				
司以个十	(測定困	3EIVI	178.0	5.0			XPS				
	難)										
NiO、(50)	าm)、球形、ア	アルドリッチ社									
原料	測定困難	ТЕМ	150.6	5.9	12.5 以上	32.5	XRD				
							XPS				
試料			92.68	9.6	12.5 以上	37.2			39.5		

表①(b)-3 酸化ニッケルリスト(密度 6.72g/cm³、NaCl 構造)

2.3 結晶性シリカナノ粒子

二酸化ケイ素(SiO₂、シリカ)は、結晶性によって有害性が異なることが知られており、ナノ材料の有害性を比較する上で、サイズや形状に加えて結晶性の同等性を検討することが重要となる。

世の中で利用されているシリカ材料は大半がアモルファス構造になってお り、アモルファスシリカナノ粒子についても、後述するように多様なサイズや 表面修飾された市販品が入手可能だったが、結晶性シリカナノ粒子については 市販品が限られていたため、粒子径依存性を調べるためには粉砕や分級などの 試料調製が必要となった。

2.3.1シリカナノ粒子の粉砕と分級による調製

結晶性シリカ(石英)にはいくつもの結晶構造が知られているが、本プロジェクトでは、その中でも最も世の中で良く利用されており、微粒子が入手しや すいα-石英(水晶:quartz)を選択した。

しかし、このα-石英についてもナノサイズの市販品粉末は見当たらず、有害 性評価の分野で標準的な試料とされている天然鉱物原料のMIN-U SIL-5(カタ ログ平均粒径:1,400 nm)と、合成結晶微粒子粉末 SI007PB(カタログ平均粒 径:800 nm)の2種類の結晶シリカについて、分級や粉砕処理を行って粒子径 が異なる試験試料を作製した。

市販材料では平均粒子径の大きいものしか得られなかったが、粒子径は分布 を持っており、両材料共に200nm程度の粒子であれば、遠心分離やフィルター 分離による粒径選別(分級)処理で必要量を得ることが可能で有った。

一方、遊星ボールミルを用いて物理的に粒子サイズを小さくする「粉砕」を 行う事で、分級による微細粒子の収率を上げることができる。しかしながら、 ナノサイズのシリカ粒子に関しては、X線回折の分析から、このような物理的 な衝撃によって結晶相がアモルファス化することが分かった。

2.3.2 で説明するように、ナノ粒子に対してX線回折法を用いて結晶度を定 量評価できる手法を開発し、表①(b)-4 に示されるように、得られたナノ粒子 の結晶度を求める事が可能になった。

表中で最も粒子径が小さいもの(DLS 代表値で約 60nm)については、粉砕と 分級後の状態では著しく結晶度が低くなったため、80℃の 1N-水酸化アルミニ ウム溶液に約 20 時間浸すことで、結晶質よりもアルカリ溶解されやすいアモル ファス成分を減少させ(図①(b)-14)、粉砕+分級処理による 200nm 粒子径シリ カとほぼ同等の結晶度 60%の結晶性粒子を調製することができた。

試験に用いた結晶性シリカの SEM 写真を図①(b)-15 に示す。

= + ₩1	一次粒	子径	いまあ種	比表面積	体雷什上	ギーク電告	その他	进业	DLS 代表值	
記不平	(nn	n)	比衣 囬傾	換算粒径	寺竜位京	セータ竜位	の測定	1佣-方	(nm)	
or 臣利	亚均值	SEM/	(m^2/r)	(nm)	(nH)	平均值			試料	
OF JT AT	十均恒	TEM	(m /g)		(рп)	(mV)			個数平均	
SIO07P	B、カタログ [・]	值(800 nn	n)、試験使月	月せず、結晶!	度 81.9%、 福	高純度化学研	究所			
原料			13.9	162.9	<1	-38.8	XRD			
SIO07P	B、分級、結	晶度 77.	.8%、高純度	化学研究所						
試料	218	SEM	18.8	120.4	<1	-27.4	XRD		222.1	
SIO07PB、粉砕+分級、結晶度 59.1%、高純度化学研究所										
試料	251	SEM	33.8	67.0	1.31	-55.6	XRD		230.6	
SIO07P	B、粉砕+ź	♪級+アル	レカリ溶解、	結晶度 60.99	%、高純度化	:学研究所				
試料	測定困難		153.6	14.7	1.23	-44.8	XRD		58.8	
MIN-U S	SIL5、カタロ	グ値(1,40	00nm)、結晶	b度 89.0%、U	S SILICA 社	È				
原料	264	SEM	6.1	371.2	<1	-32.2	XRD		480.7	
MIN-U S	SIL5、分級、	結晶度	70.3%、US S	SILICA 社	-	_	_		-	
試料	170	SEM	23.3	97.2	<1	-28.2	XRD		219.5	

表①(b)-4 結晶性シリカリスト (密度 2.65 g/cm³、α石英)



図①(b)-14 α-石英粒子のX線回折図形のアルカリ溶解処理による変化 黒線は粉砕直後の試料、赤線はアルカリによって 部分溶解させた後の試料を示す



Min-U-Sil5 (分級)



Min-U-Sil5 (原粉末)



SI007PB (粉砕+分級)



SI007PB (分級)



SI007PB (粉砕+分級+溶解)

図①(b)-15 結晶性シリカナノ粒子の SEM 写真

2.3.2 シリカナノ粒子の結晶度評価 前述のように、シリカナノ粒子においては、粉砕処理などによってアモルフ ァス化が起こり、また、粒子径によっても結晶度が異なるため、分級や粉砕処 理ごとに結晶度の定量評価が必要になる。このような結晶度評価を行う場合、 X線回折パターンにおいて、結晶由来のシャープなピークとアモルファス由来 のブロードなピークを、ピーク分離して積分強度比で見積もるのが通常の手法 だが、ナノ粒子の場合には結晶サイズが小さいために、アモルファスピークが バックグラウンドに埋もれてほとんど強度を見積もれなくなってしまう。

そこで、参考文献で紹介されている手法を基に、次のような2段階の内部標 準法を用いて、結晶性のシャープなピーク強度のみから結晶度評価を行った。

<評価手順>

- 1. 結晶性が高く結晶度が既知で、できるだけ粒子サイズが小さい NIST のア ルミナ標準試料とシリカ標準試料(結晶度 a)を用意する。
- 2. 両方の標準試料を同重量混合した試料の X 線回折測定を行い、その回折ピ 一クの積分強度を比較する。

アルミナ標準試料の積分強度: $I-1(A|_2O_3)$

- **シリカ標準試料の積分強度**: I(SiO₂)
- 3. 手順2で使用したアルミナ標準試料と試験試料を同重量混合した試料の X 線回折測定を行い、その回折ピークの積分強度を比較する。

アルミナ標準試料の積分強度: I-2(Al₂0₃)

試験試料の積分強度: I(sample)

 4. 上記2, 3の測定のアルミナ標準試料を共通内部標準と考え、シリカ標準 試料との強度比から次式のように結晶度を求める。

試料の結晶度 = $a \times [I-1(A|_2O_3) / I(SiO_2)] \times [I(sample) / I-2(A|_2O_3)]$

この評価手順において重要な点は、上記手順3における試験試料とアルミナ 標準試料の混合の部分である。標準試料と粒子径や粒子形状、密度に著しい違 いが有る試験試料の場合、標準試料と均一な混合粉が得られず、混合粉から測 定試料を採取した際に、組成がずれてしまう場合がある。また、試験試料に配 向性が有った場合も、積分強度の比較に影響を及ぼすので注意が必要である。

く参考文献>

I. C. Madsen, N. V. Y. Scarlett and A. Kern, "Description and survey of methodologies for the determination of amorphous content via X-ray powder diffraction", *Z. Kristallogr.* **226** (2011) 944-955 2.4 アモルファスシリカナノ粒子

2.4.1 アモルファスシリカナノ粒子の選択と試料調製

アモルファスシリカ(a-silica)については、種々の粒子サイズ及び表面修飾 された粒子の市販品が入手可能である。本プロジェクトでは、動物試験用途に 利用可能なエンドトキシンフリー純水の分散液として市販されている、 Micromod 社の Sicastar シリーズを購入し、試験目的に応じて濃度希釈して用 いた。標準的な試料調製法における分散処理のみで試料調製が行えるので、極 めて簡便な作業で済んだ。ただし、水酸化アルミニウム修飾の市販液に関して は、単純希釈液において DLS 測定によって粒子径 2μm 以上の粗大粒子が検出 され、そのままでは数日で固形物の沈殿が見られたので、遠心分離による粗大 粒子除去を行い、安定分散液が得られた。

図①(b)-16 に試験試料の SEM 観察像を示す。また、表①(b)-5 はその試験試 料のキャラクタリゼーションリストである。この中で、Sicastar-Al(OH)3表面 修飾の製品についてはレギュラー製品では無く特注品であったが、他の3製品 に比較して比表面積の換算粒径が一次粒子径(53 nm)よりも著しく小さい値 (13 nm)が得られている。これは、粒子が単純な球状より大きな表面積を有し ている事を意味しており、表面修飾によって起伏を持った表面もしくはポーラ スな構造に形状変化していることが示唆された。



a-silica plain 10 nm

a-silica plain 70 nm



a-silica COOH coated 70 nm a-silica Al(OH)₃ coated 70 nm

図①(b)-16 4種のアモルファスシリカ(a-silica) 試験試料の SEM 観察像(10 nm の像で、球形に見えるものは凝集粒子)

ارماد بالـــ	一次》	粒子径		比表面積	ᄷᆂᄮᅣ	ゼータ	その他の	/# *	DLS 代表		
試料	(n	ım)	比表面積	換算粒径	等電位点	電位	測定	備考	值(nm)		
		SEM/	(2 ()		(平均值			試料		
or 原料	平均値	TEM	(m²/g)	(nm)	(pH)	(mV)			個数平均		
Sicastar-	-Plain、カタ	ログ値(70n	m)、アモルフ	アス、Microm	od 社						
百汯	59 /	SEM	69.7	42.7			XRD,				
尿应	56.4	SEIVI	00.7	43.7			XPS				
試料					3.75	-36.2			63.9		
Sicastar-	Sicastar-COOH、カタログ値(70nm)、アモルファス、Micromod 社										
原液	59.8	SEM	75.3	39.8			XPS				
試料					2.34	-45.1			53.6		
Sicastar-	-Plain、カタ	ログ値(10n	m)、アモルフ	アス、Microm	od 社						
原液	13.5	TEM	275.4	10.9			XRD				
試料					3.49	-25.7			9.9		
Sicastar-	-AI(OH)3、ナ	」タログ値(フ	70nm)、アモル	レファス、Micr	omod 社						
百汯			222.0	12.0			XRD,				
尿应			232.9	12.9			XPS				
≣式 ¥礼	52.8	SEM	231.2	13.0	Z 1	-37 4		粗大粒子除	9 33		
በላሳተ	52.0	GLIWI	201.2	10.0		57.4		去が必要	00.0		

表①(b)-5 アモルファスシリカリスト (密度 2.0 g/cm³)

2.5 酸化セリウムナノ粒子

広島大で装置開発を進め、産業医科大学で動物試験を行う吸入暴露試験用に 安定分散液を調製した。有害性が低いと思われるTiO₂と有害性が高いと思われ るNiOの吸入暴露試験を行った結果を基に、比較的体内溶解性が低いと予想さ れ、有害性が両物質の中間で、その有害性の程度が未知な酸化セリウム(CeO₂、 セリア)を試験材料に選んだ。気管内投与試験に比べて、試験動物への投与効 率が悪く長期間の試験を要する吸入暴露試験には、高濃度で長期間安定な分散 液が大量に必要とされる。

試験原料粉に用いた和光純薬工業社製の酸 化セリウム(Ⅳ)ナノ粒子(10 nm)は、純水溶 媒への親和性が良好で、2時間程度の超音波分 散と30分間の20,000 xgの遠心分離後の上澄 み液採取によって、安定分散液が得られた。超 音波分散時に、間歇的な震とうもしくは定常的 な撹拌を併用することで(図①(b)-17)、10 mg/ml 程度の高濃度が達成できた。また、約1 ヶ月間にわたって試料調製を続けたが、各試料 ロット毎の、DLSによる粒子径分布や重量分析 による濃度測定の結果には大きなばらつきは 無かった。図①(b)-18に分散液のDLS測定結果 の典型例を示す。



図①(b)-17 超音波洗浄機 と撹拌器の組み合わせ



図①(b)-18 酸化セリウム(IV)ナノ粒子(10 nm)のDLSによる粒子径 分布測定例。(12.0 mg/ml 濃度)

また、図①(b)-19 に、試験液の酸化セリウムナノ粒子の SEM 画像と TEM 画像を 示す。表①(b)-6 にも記されているように、酸化セリウムナノ粒子の一次粒子 径は約 8nm と微細なので、SEM では凝集粒子としてしか観察できない。 表①(b)-6 は、酸化セリウムナノ粒子のキャラクタリゼーションリストである。



図①(b)-19 酸化セリウム試験液の SEM 画像(左)と TEM 画像(右)

表①(b)-6 酸化セリウムナノ粒子リスト

	酸化セリウム	(Ⅳ) ナ	-ノ粒子	(10 nm)、	密度 7.22、	純度 99.9%、	蛍石型構造、	和光純薬工業
--	--------	-------	------	----------	----------	-----------	--------	--------

試料	一次粒	子径	比表面積	比表面積	等電位点	ゼータ電位	その他の	備考	DLS 代表
	(nm)			換算粒径			測定		値(nm)
or 臣利	亚均值	SEM/	(m^2/σ)	(nm)	(nH)	平均値			試料
or 原料 平耳	一方道	TEM	(m /g)		(pri)	(mV)			個数平均
原料			100.8	8.2	8.99	33.6	XRD		
試料	7.8	TEM	100.8	8.2	9.61	38.1			5.6

2.6 酸化亜鉛ナノ粒子

吸入暴露用試験材料として、これまでに同試験で用いた3種のナノ粒子材料、 二酸化チタン、酸化ニッケル、酸化セリウムを肺毒性と溶解性の観点で整理した 上で、比較検討に有効な肺毒性が低く溶解性が高いと思われる酸化亜鉛(Zn0) を検討した。

酸化亜鉛ナノ粒子は、近年デバイス材料として注目されていることから、比較 的市販品の種類が多く、目的に応じた試薬が入手しやすい。いくつかの試薬の中 から、Aldrich 社の Zinc oxide, dispersion - nanoparticles、純水溶媒分散 液、51wt%、一次粒子径 35 nm 以下を選択した。

ナノ粒子の SEM 観察像を図①(b)-20 に 2 種の倍率で示す。



図①(b)-20 酸化亜鉛ナノ粒子の SEM 観察像

広島大学と産業医科大学による吸入暴露試験において、高濃度(10 mg/m³)と低 濃度(2 mg/m³)の気中噴霧を行うには、試験液濃度を 1~5 mg/mL で調製すること が望ましいが、低濃度分散液の長期安定性がやや悪い事が判明したため、試験液 は 10 mg/mL で送付し、試験時に所定の濃度に希釈することとした。



図①(b)-21 典型的な酸化亜鉛ナノ粒子分散液の DLS 法による粒

酸化亜鉛の調製は、ほぼ標準的な手順であるが、原料が分散性の良い高濃度水 溶液であり提供試験液濃度では粗大凝集粒子も見られなかったことから、遠心 分離による粗大粒子除去は不要であった。提供試験液の二次粒子径分布の例を 図①(b)-21 に示してあるが、ほぼ単一分散に近い良好な粒子径分布となってい る。

表①(b)-7にキャラクタリゼーション結果を示す。

表①(b)-7 酸化亜鉛ナノ粒子リスト

Zinc oxide, dispersion - nanoparticles、(<35nm) 51wt%、密度 5.6、ウル ツ鉱型、純度 99.94%(外注分析純度結果)

試料	一次粒子径 (nm)		比表面積	比表面積 換算粒径	等電位点	ゼータ電位	その他の 測定	備考	DLS 代表 値(nm)
or 原料	平均值	SEM/ TEM	(m²/g)	(nm)	(pH)	平均値 (mV)			試料 個数平均
原液、 試料	34.5	SEM	31	34.6	9.50	38.1	XRD, XPS	洗浄試料も XPS 測定	33.4

3. まとめ

同等性判断基準の評価を行う目的から、予測される有害性、体内溶解性、粒 子径、粒子形状、表面修飾の観点で、多様な市販品のナノ材料を試験試料とし て調製を行った。

有害性が低いと予測され、市販品として多様な粒子径、粒子形状、表面修飾 のナノ粒子が入手可能な二酸化チタンを、最初に試験試料として試み、その分 散試験液の調製手順を標準的な調製法として、個別試料調製のベースとした。 ただし、二酸化チタンに関しては等電点が pH=7 付近にあったため、安定分散 液を得るために純水溶媒に有害性評価に影響を与えない分散剤である DSP を加 えた。

有害性が低く体内溶解性も小さい二酸化チタンを7種、有害性が高く比較的 体内溶解性が小さい酸化ニッケルを5種、結晶性に依存して有害性が異なる二 酸化シリコンを9種、有害性が高く体内溶解性が低い酸化セリウムを1種、有 害性が比較的低く体内溶解性が高い酸化亜鉛を1種、をそれぞれの動物試験に 適した濃度で安定分散試験液として調製した。これらのナノ材料の大半は、世 の中で既に良く利用されており市販品として入手可能であったが、結晶性酸化 シリコンのみは、粒子径の小さいものが市販品になく、粉砕及び分級操作を行 って試験液を作製した。

また、これらの試験ナノ粒子ほぼ全てについて、一次粒子径、比表面積、等 電位点、ゼータ電位、二次粒子径、X線回折による結晶構造評価のキャラクタ リゼーションを行った。表面修飾を施されている試料などについては、必要に 応じて XPS 分析も行った。さらに、結晶性二酸化シリコンについては、粉砕分 級処理によって結晶度が異なるため、論文報告を参考にした内部標準法を用い て結晶度の定量評価を行った。

これらの、試料調製及びキャラクタリゼーションの手法については、今後の 研究開発の参考情報として活用できるように、「ナノ安全技術解説書」としてま とめ、ウェブ公開を行った。
(2) 初期有害性情報取得のための低コスト・簡便な有害性評価技術の構築

研究開発項目②初期有害性情報取得のための低コスト・簡便な有害性評価技術 の構築

(a) 吸入暴露試験と気管内投与試験の比較検討

学校法人産業医科大学 産業生態科学研究所

1. 目的

気管内投与試験は、比較的簡便な有害性試験手法であり、既知量投与による用 量反応関係や生体反応機序の解明を行うのに適しているが、毒性の十分な知見 がなく有害性評価は限定的である。よって、ナノ材料を含めた吸入性化学物質の 有害性評価試験のゴールドスタンダードである吸入暴露試験とともに気管内投 与試験を行い、データの解析を通して両者の関係を明らかにすることにより、気 管内投与試験法を初期有害性情報取得の目的で用いる際のデータ解釈上の留意 点を整備する。中間評価までは、吸入暴露との比較が可能となる(肺内保持量を 合わせる)気管内投与条件を確立する。これを基に気管内投与試験を初期有害性 情報取得の目的で用いる際のデータ解釈留意点についての暫定的な見解を策定 する。

2. 成果

2.1. 二酸化チタン (TiO₂) (P90)の気管内投与試験

試験の概要

二酸化チタン (TiO₂) ナノ粒子の気管内投与試験を行った。使用した二酸化チ タンナノ粒子は P90 (Aeroxide[®] TiO₂)であり、Evonik Degussa Corp から購 入した。P90 の 1 次粒径が 15 nm、比表面積が 102 m²/g であり、凝集径 DLS 径が 25 nm であった。この二酸化チタンナノ粒子 P90 0.2 mg/rat, 1.0 mg/rat,を Wistar Hannover/Roc ラット (11 週齡、雄) に単回気管内注入を行い、投与終了 から 3 日、1 週間、1 ヶ月、3 ヶ月、6 ヶ月、12 ヶ月、24 ヶ月目に解剖を行った。 陰性対照群、低用量群、高用量群の 3 群に分かれており、1 群 10 匹であった。 各群を 5 匹ずつの 2 つのサブグループに分けて、前半のグループでは気管支肺 胞洗浄 (broncho-alveolar lavage (BAL))を行った。開胸後、気管支にカニュ ーレを挿入し、20 cm 水中圧にて、生理食塩水を注入し、両肺が膨らんでいるこ とを確認後、開放し、生理食塩水を回収し、これをもう一度繰り返した。この 2 回の回収液 (およそ 15-18 mL)を気管支肺胞洗浄液 (broncho-alveolar lavage fluid (BALF)とした。後半のグループでは、開胸後、右肺(4 葉) から、蛋白や RNA 抽出、左肺は、10%ホルマリンにて定圧固定 (25 cm 水中圧)を行い病理用サ ンプルとした。また、肺以外の臓器(肺、脳、肝臓、腎臓、脾臓、精巣)は秤量 を行い、一部病理標本とした。検討項目に関しては、体重、臓器(肺、脳、肝臓、 腎臓、脾臓、精巣)重量、肺の病理学的検索、BALF および肺組織の生化学的解 析(BALF 中の細胞解析、肺障害関連因子(サイトカイン(cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC))等)、酸化ストレスマーカー(heme oxygenase-1(H0-1))、がん化関連酸化的ストレス(8-ヒドロキシデオキシグア ノシン(8-0HdG))、線維化および炎症関連遺伝子発現解析を行った。

解析方法

気管支肺胞洗浄液

回収した気管支肺胞洗浄液から 4~5 mL を採取後冷凍保存し、残りの溶液を 400 g で 15 分間遠心を行った。上清はサイトカイン等の測定用に冷凍保存し、 残ったペレットを PMN buffer にて再浮遊させ、細胞数や細胞分画を計測した。 上清中の CINC-1 濃度、CINC-2 濃度は ELISA kit (RCN100, RCN200 ; R & D systems Minneapolis)、HO-1 濃度は ELISA kit (ADI-EKS-810A Enzo Life Sciences, Framingdale, NY)を用いた。

肺組織

10%ホルマリン溶液を注入した肺組織はパラフィン包埋を行い、5 µm スライス 切片にして、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。

- 1)臓器および体重の変化:体重に関しては、1週間後に低用量群で低下したが、 それ以外は有意な差は認められず、一貫した差異は認められなかった。肺重 量に関しては、高用量群で3日後、1ヶ月後に有意な上昇を認めたが、それ 以外は有意な差は認められず、一貫した差異は認められなかった。肝臓、腎 臓、脾臓、精巣、脳に関しては、有意差を認めるタイムコースもあるが、一 貫した有意差は認められなかった。
- 2) BALF 中の細胞数および細胞分画: BALF 中の総細胞数、好中球数、マクロフ ァージ数は、投与後の急性期に有意に高かった。しかし、その後のタイムポ イントにおいては、一貫した有意差は認められなかった。
- BALF 中 CINC-1、MCP-1、MIP 濃度: BALF 中の CINC-1 濃度は、投与後の急性 期に一過性に濃度上昇を認めたが、その後のタイムポイントにおいては、有 意差は認められなかった。MCP-1、MIP 濃度に関しては、一貫した有意差は 認められなかった
- 4) BALF 中の H0-1 濃度: 投与後の急性期に一過性に濃度上昇を認めたが、慢性 期では、有意差は認められなかった。
- 5) 肺組織中の 8-0HdG 生成:高用量群において、3 日、1 週間、1 ヶ月後まで対 照群に比べて有意に高い 8-0HdG 値を示した。

- 6)肺病理間質炎症細胞の浸潤:投与直後に軽度の細胞浸潤を認めたが、慢性期では認められなかった。
- 7) 肺病理 線維化:著明な線維化は認められなかった。
- 8) 他臓器(肝臓、腎臓、脾臓、精巣、脳)の組織病理所見: TiO2の影響を示唆 する変化、特記すべき所見はいずれのタイムポイント、用量においても認め られなかった。

	低用量	高用量
	(0.2 mg)	(1.0 mg)
体重	\rightarrow	\rightarrow
肺重量	\rightarrow	\rightarrow
他臓器重量	\rightarrow	\rightarrow
BALF 細胞解析 総細胞数	\rightarrow	$\uparrow \rightarrow$
BALF 細胞解析 好中球数	\rightarrow	$\uparrow \rightarrow$
好中球ケモカイン(CINCs)	\rightarrow	$\uparrow \rightarrow$
単球系ケモカイン	\rightarrow	\rightarrow
BALF 傷害因子(LDH)	\rightarrow	\rightarrow
酸化ストレス応答蛋白(H0-1)	\rightarrow	$\uparrow \rightarrow$
がん化関連酸化ストレス(8-0HdG)	\rightarrow	$\uparrow \rightarrow$
肺病理組織学的所見 炎症	一過性炎症	一過性炎症
肺病理組織学的所見 線維化	なし	なし
肺病理組織学的所見 腫瘍	なし	なし
他臓器の病理組織学的解析	特記所見なし	特記所見なし

表②(a) −1 二酸化チタン(P90)気管内投与試験結果のまとめ

2.2 酸化ニッケル (Ni0) の気管内投与試験

試験の概要

酸化ニッケルナノ粒子の気管内投与試験を行った。使用した酸化ニッケルナ ノ粒子は、US-3355 US Research Nanomaterials 社製を用いた。1 次粒径が 19 nm、比表面積が 57 m²/g、懸濁液中の二次粒径が 59.7 nm 純度 99.5%以上で有り、 密度が 6.72 g/cm³であった。蒸留水に懸濁した酸化ニッケルナノ粒子を、動物 当たり 0.2 mg(低用量)および 1.0 mg(高用量)の用量でラット(Fisher 344、 投与時 12 週齡、雄)に単回気管内投与した。陰性対照群は蒸留水を同様に単回 気管内投与した。投与後、3 日、1 週間、1 ヶ月、3 ヶ月、6 ヶ月、12 ヶ月、24 ヶ 月後に解剖を行った。陰性対照群、低用量群、高用量群の 3 群に分かれており、 1 群 10 匹であった。各群を 5 匹ずつの 2 つのサブグループに分けて、前半のグ ループでは気管支肺胞洗浄(broncho-alveolar lavage (BAL))を行った。開胸 後、気管支にカニューレを挿入し、20 cm 水中圧にて、生理食塩水を注入し、両 肺が膨らんでいることを確認後、開放し、生理食塩水を回収し、これをもう一度 繰り返した。この2回の回収液(およそ15-18 mL)を気管支肺胞洗浄液(bronchoalveolar lavage fluid (BALF)とした。後半のグループでは、開胸後、右肺(4 葉)から、蛋白や RNA 抽出、左肺は、10%ホルマリンにて定圧固定 (25 cm 水中 圧)を行い病理用サンプルとした。また、肺以外の臓器(肺、脳、肝臓、腎臓、 脾臓、精巣)は秤量を行い、一部病理標本とした。検討項目に関しては、体重、 臓器(肺、脳、肝臓、腎臓、脾臓、精巣)重量、肺の病理学的検索、BALF および 肺組織の生化学的解析 (BALF 中の細胞解析、肺障害関連因子 (サイトカイン (cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC))等)、酸化ストレス マーカー (heme oxygenase-1 (HO-1))、傷害マーカー (lactate dehydrogenase (LDH))、がん化関連酸化的ストレス (8-ヒドロキシデオキシグアノシン(8-

OHdG))、線維化および炎症関連遺伝子発現解析を行った。

解析方法

気管支肺胞洗浄液

回収した気管支肺胞洗浄液から 4~5 mL を採取後冷凍保存し、残りの溶液を 400 g で 15 分間遠心を行った。上清はサイトカイン等の測定用に冷凍保存し、 残ったペレットを PMN buffer にて再浮遊させ、細胞数や細胞分画を計測した。 上清中の CINC-1 濃度、CINC-2 濃度は ELISA kit (RCN100, RCN200 ; R & D systems Minneapolis)、HO-1 濃度は ELISA kit (ADI-EKS-810A Enzo Life Sciences, Framingdale, NY)、LDH 放出量は、Cytotoxicity Detection Kit plus (Roche Diagnostics GmbH, Germany)を用いた。

肺組織

10%ホルマリン溶液を注入した肺組織はパラフィン包埋を行い、5 µm スライス 切片にして、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。

肺内保持量測定

保持量の測定は、気管支肺胞洗浄(BAL)後の肺と、気管支肺胞洗浄液中の酸化 ニッケル量の定量を行い、その総量を肺内保持量とした。

- 1) 臓器および体重の変化: 肺重量が、高用量(1.0 mg) 群において対照群に比 べ投与1年後まで、有意に高かったが2年目には差異が認められなかった。 他臓器の重量や体重は一貫した有意な差は認められなかった。
- 2) BALF 中の細胞数および細胞分画:総細胞数、好中球数は投与3日後から1 年後まで、NiO濃度依存的に有意に上昇した。2年目には差異が認められな かった。

- 3) BALF 中 CINC-1 濃度: CINC-1 に関して、低用量群では、投与3日後から1ヶ 月後まで、高用量群では3日から1年後まで有意な濃度上昇を示した。
- 4)傷害マーカーの測定(BALF 中の LDH 活性の測定):低用量群では、投与3日
 後から1ヶ月後まで、高用量群では3日から1年後まで有意な濃度上昇を
 示した。
- 5) BALF 中の HO-1 濃度:低用量群では、投与3日後から1ヶ月後まで、高用量 群では3日から1年後まで有意な濃度上昇を示した。mRNA に関しては、高 用量も低用量も発現亢進を認め、3ヶ月後にピークになり、その後低下傾向 を認めた。
- 6) 肺組織中の 8-0HdG 生成: 肺組織 DNA 中の 8-0HdG 生成量は、一貫した有意 な上昇を認めなかった。
- 7) 肺組織における Ni0 のクリアランス:高用量、低用量の半減期は、それぞれ 14.7ヶ月、4.5ヶ月であった。他臓器として、脳と肝臓の Ni0 の保持量を測 定したが、検出限界以下であった。
- 8)mRNA マイクロアレイ解析では、対照群に対して気管内投与試験の高用量(1.0 mg)群で発現が2倍以上に増加した mRNAは450種類あった。その中で4倍以上8倍未満が51種類、8倍以上が16種類であった。逆に、高用量(1.0 mg)群において発現が0.5倍以下に減少した mRNAは388種類あり、その中で0.25倍以下0.125倍超過が15種類、0.125倍以下が14種類であった。
- 9)肺病理間質炎症細胞の浸潤:投与直後に間質に細胞浸潤を認めたが、慢性期ではほとんど認められなかった。しかし、肺胞腔における炎症細胞浸潤は持続した。
- 10) 肺病理 線維化:1週間後に線維化は認められたが、その後は改善し、線 維化は認められなくなった。しかし、2年後には線維化を認めた。また、高 用量群では22匹中3匹に腺腫を認めた。低用量や陰性対照群では認められ なかった。
- 11)他臓器(肝臓、腎臓、脾臓、精巣、脳)の組織病理所見:3日から1年まではNi0の影響を示唆する変化、特記すべき所見はいずれのタイムポイント、用量においても認められなかった。しかし2年目において、高用量群で10匹中1匹に肝細胞癌、2匹に脾臓における白血病細胞浸潤、1匹に甲状腺に濾胞細胞癌、低用量群で10匹中1匹に脾臓における白血病細胞浸潤、1匹に精巣に中皮腫を認めた。但し、精巣の間細胞腫に関しては、高用量、低用量、陰性対照群とも複数認めた。

	低用量	高用量
	(0.2mg)	(1.Omg)
体重	\rightarrow	\rightarrow
肺重量	$\uparrow \rightarrow$	1
他臓器重量	\rightarrow	\rightarrow
BALF 細胞解析 総細胞数	$\uparrow \rightarrow$	1
BALF 細胞解析 好中球数	$\uparrow \rightarrow$	1
好中球ケモカイン(CINCs)	$\uparrow \rightarrow$	1
BALF 傷害因子(LDH)	$\uparrow \rightarrow$	1
酸化ストレス応答蛋白(H0-1)	$\uparrow \rightarrow$	1
がん化関連酸化ストレス(8-0HdG)	\rightarrow	\rightarrow
肺病理組織学的所見 炎症	一過性炎症	持続炎症
肺病理組織学的所見 線維化	なし	二相性
肺病理組織学的所見 腫瘍	有意差なし	有意差なし
他臓器の病理組織学的解析	有意差なし	有意差なし

表②(a) -2 酸化ニッケル気管内投与試験結果のまとめ

2.3. 酸化ニッケル (NiO) の吸入暴露試験

試験の概要

酸化ニッケルナノ粒子を、ラット(Fisher344、暴露開始時 10 週齡、雄) に 4 週間(6時間/日、5日/週)吸入暴露した。暴露の重量濃度は、低濃度が、0.32 ±0.07 mg/m³、高濃度が1.65±0.20 mg/m³であった。暴露終了後、3日、1ヶ 月、3ヶ月、6ヶ月後に解剖を行った。陰性対照群、低濃度群、高濃度群の3群 に分かれており、1 群 10 匹であった。各群を5 匹ずつの2 つのサブグループに 分けて、前半のグループでは気管支肺胞洗浄(broncho-alveolar lavage (BAL)) を行った。開胸後、気管支にカニューレを挿入し、20 cm 水中圧にて、生理食塩 水を注入し、両肺が膨らんでいることを確認後、開放し、生理食塩水を回収し、 これをもう一度繰り返した。この2回の回収液(およそ15-18 mL)を気管支肺 胞洗浄液(broncho-alveolar lavage fluid (BALF)とした。後半のグループで は、開胸後、右肺(4葉)から、蛋白や RNA 抽出、左肺は、10%ホルマリンにて 定圧固定 (25cm 水中圧) を行い病理用サンプルとした。また、肺以外の臓器 (肺、 脳、肝臓、腎臓、脾臓、精巣)は秤量を行い、一部病理標本とした。検討項目に 関しては、体重、臓器(肺、脳、肝臓、腎臓、脾臓、精巣)重量、肺の病理学的 検索、BALFおよび肺組織の生化学的解析(BALF中の細胞解析、肺障害関連因子 (サイトカイン(cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC))等)、

酸化ストレスマーカー(heme oxygenase-1 (H0-1)),傷害マーカー(lactate dehydrogenase (LDH))、がん化関連酸化的ストレス(8-ヒドロキシデオキシグアノシン(8-0HdG))、線維化および炎症関連遺伝子発現解析を行った。

解析方法

気管支肺胞洗浄液

回収した気管支肺胞洗浄液から 4~5 mL を採取後冷凍保存し、残りの溶液を 400 g で 15 分間遠心を行った。上清はサイトカイン等の測定用に冷凍保存し、 残ったペレットを PMN buffer にて再浮遊させ、細胞数や細胞分画を計測した。 上清中の CINC-1 濃度、CINC-2 濃度は ELISA kit (RCN100, RCN200 ; R & D systems Minneapolis)、HO-1 濃度は ELISA kit (ADI-EKS-810A Enzo Life Sciences, Framingdale, NY)、LDH 放出量は、Cytotoxicity Detection Kit plus (Roche Diagnostics GmbH, Germany)を用いた。

肺組織

10%ホルマリン溶液を注入した肺組織はパラフィン包埋を行い、5 µm スライス 切片にして、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。

酸化ニッケルの肺内保持量

保持量の測定は、気管支肺胞洗浄(BAL)後の肺と、気管支肺胞洗浄液中の酸 化ニッケル量の定量を行い、その総量を肺内保持量とした。

- 1) 臓器および体重の変化:体重、肺重量、他臓器の臓器重量とも、一過性の変化は認めるも、一貫した有意な変化は認められなかった。
- 2) BALF 中の細胞数および細胞分画:総細胞数は、3日後、3ヶ月後において低 濃度、高濃度群とも有意に高かった。好中球数は、高濃度において3日後の みで有意な増加を認めた。
- BALF 中 CINC-1: CINC-1 は、3 日後から1ヶ月後まで、高濃度群において有 意に高かった。
- 4) 傷害マーカーの測定 (BALF 中の LDH 活性の測定):3 日後から1ヶ月後まで、 高濃度群において有意に放出量が高かった。
- 5) BALF 中の H0-1 濃度:高濃度群において 3 日後から 6 ヶ月まで H0-1 は有意 に高かった。
- 6) 肺組織中の 8-0HdG 生成: 暴露 1 ヶ月後に高用量群において有意に高い 8-0HdG 生成を示したが、一貫した変化ではなかった。
- 7) 肺組織における Ni0 のクリアランス:高用量、低用量の半減期は、それぞれ
 4.5ヶ月、3.7ヶ月であった。他臓器として、脳と肝臓の Ni0 の保持量を測定したが、検出限界以下であった。
- 8) mRNA マイクロアレイ解析では、対照群に対して吸入暴露試験の高濃度群で

発現が2倍以上に増加した mRNA は244 種類あった。その中で4倍以上8倍 未満が13種類、8倍以上が2種類であった。逆に、高濃度群において0.5 倍以下に発現が減少した mRNA は171種類で、その中で0.25倍以下0.125 倍超過が26種類、0.125倍以下が16種類であった。

- 9) 肺病理 間質炎症細胞の浸潤:急性期においては高濃度群で軽度の細胞浸潤 を認めたが、一過性であった。
- 10)肺病理線維化:高濃度群も低濃度群も線維化は認められなかった。
- 11)他臓器(肝臓、腎臓、脾臓、精巣、脳)の組織病理所見:NiOの影響を示 唆する変化、特記すべき所見はいずれのタイムポイント、用量においても認 められなかった。

	低濃度	高濃度
体重	\rightarrow	\rightarrow
肺重量	\rightarrow	\rightarrow
他臓器重量	\rightarrow	\rightarrow
BALF 細胞解析 総細胞数	$\uparrow \rightarrow$	$\uparrow \rightarrow$
BALF 細胞解析 好中球数	\rightarrow	$\uparrow \rightarrow$
好中球ケモカイン(CINCs)	\rightarrow	$\uparrow \rightarrow$
BALF 傷害因子(LDH)	\rightarrow	$\uparrow \rightarrow$
酸化ストレス応答蛋白(H0-1)	\rightarrow	Î
がん化関連酸化ストレス(8-0HdG)	\rightarrow	\rightarrow
肺病理組織学的所見 炎症	なし	一過性炎症
肺病理組織学的所見 線維化	なし	なし
他臓器の病理組織学的解析	特記所見なし	特記所見なし

表②(a) -3 酸化ニッケル吸入暴露試験結果のまとめ

2.4. 酸化ニッケル(NiO)の気管内投与試験と吸入暴露試験の比較

試験の概要

肺内保持量が同等である、Ni0気管内投与低用量(0.2 mg)群(投与3日後の 肺内保持量:136.4±6.5 μg)と吸入暴露高濃度群(暴露終了3日後の肺内保持 量:132.5±9.9 μg)の結果を比較検討した。

- 1) 臓器および体重の変化:3日後の肺重量において吸入群が有意に高かったことを除き、体重や臓器重量に有意な差は認められなかった。
- 2) BALF 中の細胞数および細胞分画:吸入暴露試験の高濃度群では、総細胞数
 (3日後、3ヶ月後)、好中球数(3日後)に有意に上昇した。気管内投与試

験の低用量では、1週間後から3ヶ月後まで有意に上昇した。両者の総細胞 数の平均値の変動範囲は、ほぼ類似の傾向であった。

- 3) BALF 中の CINC-1 濃度:吸入暴露試験の高濃度、気管内投与試験の低用量に おいて急性期で一過性に上昇し、その後差を認めなかった。
- 4)傷害マーカーの測定(BALF中のLDH活性の測定):吸入暴露試験の高濃度、 気管内投与試験の低用量において急性期で一過性に上昇し、その後差を認 めなかった。
- 5) BALF 中の H0-1 濃度:吸入暴露試験の高濃度で持続性の上昇、気管内投与試験の低用量において一過性の上昇であった。両者の平均値の変動範囲は、慢性期は、ほぼ類似の傾向であった。
- 6) 肺組織中の 8-0HdG 生成:吸入暴露も気管内投与試験も、8-0HdG の有意な生成を認めなかった。
- 7) 吸入試験における高濃度群の半減期は 4.5 ヶ月,気管内投与試験における 低用量群の半減期は 4.5 ヶ月であった。
- 8)肺病理間質炎症細胞の浸潤:吸入暴露試験の高濃度、気管内投与試験の低用量において急性期で一過性に間質の炎症細胞浸潤を認めたが、その後改善した。
- 9) 肺病理 線維化:吸入暴露も気管内投与試験も、有意な線維化を認めなかった。
- 10)肺内酸化ニッケル保持量の定量:Ni0の気管内投与(低用量群)と吸入暴露(高濃度群)との肺内保持量を比較したとき、気管内投与136.4 µg、吸入暴露132.5 µgであり、Ni0の肺内保持量は同程度であった。その後の保持量の減少は、両試験とも類似の傾向を示した。

2.5. 鼻部吸入暴露試験

試験の概要

鼻部吸入暴露と全身吸入暴露にて肺内沈着量が異なるか検討するために、鼻 部エアロゾル発生装置と全身吸入暴露装置を用いてラットに二酸化チタンナノ 粒子を吸入暴露させ、肺内の沈着を検討した。ラット(Fisher344、暴露開始時 10週齡、雄)に6時間の吸入暴露(鼻部暴露、全身暴露)を行った。二酸化チ タンの重量濃度は、鼻部暴露で4.01±1.11 mg/m³、全身暴露で4.10±1.07 mg/m³、 粒径が各々180 nm、230 nm であった。なお1群5 匹とした。暴露終了直後に解 剖し、肺組織を採取した。

結果

1)体重と肺重量の変化:鼻部吸入暴露と全身暴露において体重に著明な差異は 認めなかったが、肺重量に関しては、鼻部暴露群で低かった。

- 2)肺内保持量 鼻部吸入暴露では46.0 ± 7.66 µg、全身吸入暴露では42.6
 ± 3.51 µgと両者の肺内保持量に差を認めなかった。
- 3)肺病理間質炎症細胞の浸潤:鼻部吸入暴露と全身暴露において間質における炎症細胞浸潤を認めなかった。

4) 肺病理 線維化:鼻部吸入暴露と全身暴露において線維化を認めなかった。 以上より短期間の二酸化チタンナノ粒子の吸入暴露試験において、鼻部吸入暴 露と全身吸入暴露の肺内保持量、肺病理所見など両者に著明な差異は認められ なかった。

2.6. 二酸化チタン (TiO₂) (MT-150AW)の気管内投与試験

試験の概要

二酸化チタンナノ粒子(ルチルタイプ)の気管内投与試験を行った。使用した 二酸化チタンナノ粒子は、MT-150AW で Tayca Co 製であり、幾何形状は、長径が 55 nm、短径が12 nm、比表面積が 111 m²/g、懸濁液中の凝集径 44.9 nm、結晶 構造はルチルタイプ、純度は 99.5%であった。二酸化チタン(TiO₂) MT-150AW ナ ノ粒子を 0.2 mg/rat. 1.0 mg/rat の用量で Fisher 344 ラット(投与時 1 2 週 齢、雄性)に気管内注入し、投与終了から3日、1 週間、1 ヶ月、3 ヶ月、6 ヶ 月、12 ヶ月、24 ヶ月に(但し、24 ヶ月は、重量、病理所見) 解剖した。陰性対 照群、低用量群、高用量群の3群に分かれており、1群10匹であった。各群を 5 匹ずつの 2 つのサブグループに分けて、前半のグループでは気管支肺胞洗浄 (broncho-alveolar lavage (BAL))を行った。開胸後、気管支にカニューレを 挿入し、20 cm 水中圧にて、生理食塩水を注入し、両肺が膨らんでいることを確 認後、開放し、生理食塩水を回収し、これをもう一度繰り返した。この2回の回 収液(およそ 15-18 mL)を気管支肺胞洗浄液(broncho-alveolar lavage fluid (BALF)とした。後半のグループでは、開胸後、右肺(4 葉)から、蛋白や RNA 抽 出、左肺は、10%ホルマリンにて定圧固定(25 cm 水中圧)を行い病理用サンプ ルとした。また、肺以外の臓器(肺、脳、肝臓、腎臓、脾臓、精巣)は秤量を行 い、一部病理標本とした。検討項目に関しては、体重、臓器(肺、脳、肝臓、腎 臓、脾臓、精巣)重量、肺の病理学的検索、BALF および肺組織の生化学的解析 (BALF 中の細胞解析、肺障害関連因子(サイトカイン(cytokine-induced) neutrophil chemoattractant (CINC))等)、酸化ストレスマーカー(heme oxygenase-1 (HO-1))、傷害マーカー (lactate dehydrogenase (LDH))、がん化 関連酸化的ストレス (8-ヒドロキシデオキシグアノシン(8-0HdG))、線維化およ

解析方法

気管支肺胞洗浄液

び炎症関連遺伝子発現解析を行った。

回収した気管支肺胞洗浄液から 4~5 mL を採取後冷凍保存し、残りの溶液を 400 g で 15 分間遠心を行った。上清はサイトカイン等の測定用に冷凍保存し、 残ったペレットを PMN buffer にて再浮遊させ、細胞数や細胞分画を計測した。 上清中の CINC-1 濃度、CINC-2 濃度は ELISA kit (RCN100, RCN200 ; R & D systems Minneapolis)、HO-1 濃度は ELISA kit (ADI-EKS-810A Enzo Life Sciences, Framingdale, NY)、LDH 放出量は、Cytotoxicity Detection Kit plus (Roche Diagnostics GmbH, Germany)を用いた。

肺組織

10%ホルマリン溶液を注入した肺組織はパラフィン包埋を行い、5 µm スライス 切片にして、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。

- 1) 臓器および体重の変化:体重、肺及び他臓器の重量において対照群と投与群 との間に一貫した有意差は認められなかった。
- 2) BALF 中の細胞数および細胞分画: BALF 中の総細胞数、好中球数とも3日後 から1週間まで有意な上昇を示した。1ヶ月後にはほぼ陰性対照の同等のレ ベルになった。
- BALF 中の CINC-1 濃度: CINC-1 は高用量群において1 週間後まで、低用量 群では1 週間後において上昇が認められた。
- 4) 傷害マーカーの測定(BALF 中の LDH 活性の測定): BALF 中の LDH 放出量は 高用量群において1週間後まで上昇が認められた。
- 5) BALF 中の H0-1 濃度: BALF 中の H0-1 濃度は、高用量群では3 日から1 週間、 mRNA レベルでは、1 ヶ月と3 ヶ月の高用量群でのみ有意な亢進を認めた。
- 6)肺組織中の 8-0HdG 生成:高用量群、低用量群とも有意な生成亢進を認めなかった。
- 7) 肺組織における TiO₂のクリアランス: TiO₂の 1.0 mg 投与では半減期が 2.2 ヶ月、0.2 mg 投与では 1.8 ヶ月であった。
- 8) 肺病理 間質炎症細胞の浸潤:高用量群で急性期に一過性に認められたが軽 微であった。
- 9) 肺病理 線維化:低用量、高用量ともに著明な線維化は認められなかった。
- 10)肺病理 腫瘍:高用量群で、腺がん1例、腺腫1例が認められたが、有意 差はなかった。
- 11)他臓器(肝臓、腎臓、脾臓、精巣、脳)の組織病理所見:肝細胞がんが陰
 性対照群で1例、3群ほぼ全例間細胞腫、中皮腫、甲状腺腫瘍が低用量群で
 1例ずつ認められた。但し、有意差は認められなかった。

	低用量	高用量
	(O.2 mg)	(1.0 mg)
体重	\rightarrow	\rightarrow
肺重量	\rightarrow	\rightarrow
他臓器重量	\rightarrow	\rightarrow
BALF 細胞解析 総細胞数	$\uparrow \rightarrow$	$\uparrow \rightarrow$
BALF 細胞解析 好中球数	$\uparrow \rightarrow$	$\uparrow \rightarrow$
好中球ケモカイン(CINCs)	$\uparrow \rightarrow$	$\uparrow \rightarrow$
BALF 傷害因子(LDH)	$\uparrow \rightarrow$	$\uparrow \rightarrow$
酸化ストレス応答蛋白(H0-1)	$\uparrow \rightarrow$	$\uparrow \rightarrow$
がん化関連酸化ストレス(8-0HdG)	\rightarrow	\rightarrow
肺病理組織学的所見 炎症	なし	一過性炎症
肺病理組織学的所見 線維化	なし	なし
肺病理組織学的所見 腫瘍	有意差なし	有意差なし
他臓器の病理組織学的解析	有意差なし	有意差なし

表②(a) -4 二酸化チタン気管内投与試験結果のまとめ

2.7. 二酸化チタン吸入ばく露試験

試験の概要

二酸化チタンナノ粒子を、ラット(Fisher344、暴露開始時10週齡、雄)に4 週間(6時間/日、5日/週)吸入暴露した。暴露の重量濃度は、低濃度が、0.50 ±0.26 mg/m³、高濃度が1.84±0.74 mg/m³であった。暴露終了後、3日、1ヶ 月、3ヶ月後に解剖を行った。陰性対照群、低濃度群、高濃度群の3群に分かれ ており、1 群 10 匹であった。各群を 5 匹ずつの 2 つのサブグループに分けて、 前半のグループでは気管支肺胞洗浄(broncho-alveolar lavage (BAL))を行っ た。開胸後、気管支にカニューレを挿入し、20 cm 水中圧にて、生理食塩水を注 入し、両肺が膨らんでいることを確認後、開放し、生理食塩水を回収し、これを もう一度繰り返した。この2回の回収液(およそ15-18 mL)を気管支肺胞洗浄 液(broncho-alveolar lavage fluid(BALF))とした。後半のグループでは、開 胸後、右肺(4葉)から、蛋白や RNA 抽出、左肺は、10%ホルマリンにて定圧固 定(25cm水中圧)を行い病理用サンプルとした。また、肺以外の臓器(肺、脳、 肝臓、腎臓、脾臓、精巣)は秤量を行い、一部病理標本とした。検討項目に関し ては、体重、臓器(肺、脳、肝臓、腎臓、脾臓、精巣)重量、肺の病理学的検索、 BALFおよび肺組織の生化学的解析(BALF中の細胞解析、肺障害関連因子(サイ トカイン (cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC)) 等)、酸化 ストレスマーカー(heme oxygenase-1 (HO-1))、傷害マーカー(lactate dehydrogenase (LDH))、がん化関連酸化的ストレス(8-ヒドロキシデオキシグア ノシン(8-OHdG))、線維化および炎症関連遺伝子発現解析を行った。

解析方法

気管支肺胞洗浄液

回収した気管支肺胞洗浄液から 4~5 mL を採取後冷凍保存し、残りの溶液を 400 g で 15 分間遠心を行った。上清はサイトカイン等の測定用に冷凍保存し、 残ったペレットを PMN buffer にて再浮遊させ、細胞数や細胞分画を計測した。 上清中の CINC-1 濃度、CINC-2 濃度は ELISA kit (RCN100, RCN200 ; R & D systems Minneapolis)、HO-1 濃度は ELISA kit (ADI-EKS-810A Enzo Life Sciences, Framingdale, NY)、LDH 放出量は、Cytotoxicity Detection Kit plus (Roche Diagnostics GmbH, Germany)を用いた。

肺組織

10%ホルマリン溶液を注入した肺組織はパラフィン包埋を行い、5 µm スライス 切片にして、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。

- 1)臓器および体重の変化:体重、肺及び各臓器の重量において、3日から3ヶ 月の観察期間において、陰性対照群と投与群との間に一貫した有意差は認 められなかった。
- 2) BALF 中の細胞数および細胞分画: BALF 中の総細胞数、好中球数は、暴露群 で有意な増加を認めなかった。
- BALF 中の CINC-1 濃度:3 日から3ヶ月の観察期間において暴露群で有意な 上昇を認めなかった。
- 4) 傷害マーカーの測定(BALF 中の LDH 活性の測定):3日から3ヶ月の観察期間において暴露群で有意な上昇は認めなかった。
- 5) BALF 中の H0-1 濃度:H0-1 濃度も mRNA においても暴露群で有意な上昇は認 めなかった。
- 6) 肺組織中の 8-0HdG 生成:3 日から3ヶ月の観察期間において暴露群で有意 な上昇は認めなかった。
- 7)低濃度、高濃度のチタンの半減期は各々2ヶ月、1.8ヶ月であった。
- 8) 肺病理 間質炎症細胞の浸潤:3日から3ヶ月の観察期間において間質の炎 症細胞浸潤を認めなかった。
- 9)肺病理線維化:3日から3ヶ月の観察期間において線維化を認めなかった。
- 10)他臓器(肝臓、腎臓、脾臓、精巣、脳)の組織病理所見:TiO2の影響を示 唆する変化、特記すべき所見はいずれのタイムポイント、濃度においても認 められなかった。

	低濃度	高濃度
体重	\rightarrow	\rightarrow
肺重量	\rightarrow	\rightarrow
他臓器重量	\rightarrow	\rightarrow
BALF 細胞解析 総細胞数	\rightarrow	\rightarrow
BALF 細胞解析 好中球数	\rightarrow	\rightarrow
好中球ケモカイン(CINCs)	\rightarrow	\rightarrow
BALF 傷害因子(LDH)	\rightarrow	\rightarrow
酸化ストレス応答蛋白(H0-1)	\rightarrow	\rightarrow
がん化関連酸化ストレス(8-0HdG)	\rightarrow	\rightarrow
肺病理組織学的所見 炎症	なし	なし
肺病理組織学的所見 線維化	なし	なし
他臓器の病理組織学的解析	特記所見なし	特記所見なし

表②(a) -5 二酸化チタン吸入暴露試験結果のまとめ

2.8. 二酸化チタン (MT-150AW) の気管内投与試験と吸入暴露試験の比較 試験の概要

吸入暴露試験に関しては、二酸化チタンナノ粒子を、ラット(Fisher344、暴 露開始時10週齢、雄)に4週間(6時間/日、5日/週)吸入暴露した。暴露の重 量濃度は、低濃度が、0.50±0.26 mg/m³、高濃度が1.84±0.74 mg/m³であっ た。暴露終了後、3日後に解剖を行った。各群10匹ずつとし、5匹をBALF採取 および5匹を肺病組織の採取に用いた。また、各々から臓器を採取した。この吸 入暴露高用量群と肺内保持量が同等レベルと考えられる二酸化チタン(MT-150AW)の気管内投与低用量(0.2 mg)群の結果を比較検討した。

- 1) 臓器および体重の変化:体重において吸入群が有意に高かったが、臓器重量 の一貫した変化は認められなかった。
- 2) BALF 中の総細胞数および細胞分画:吸入暴露試験では、高濃度群で有意な 上昇を認めなかった。一方、気管内投与試験の低用量では、総細胞数、好中 球数も急性期に一過性の上昇を示したが、1ヶ月後には陰性対照レベルにな った。
- 3) BALF 中の CINC-1 濃度: CINC-1 に関しては、気管内投与試験で急性期に一過 性の上昇を認めたが、吸入暴露試験では、有意な上昇を認めなかった。
- 4) 傷害マーカーの測定(BALF 中の LDH 活性の測定):気管内投与試験で急性期 に一過性の上昇を認めたが、吸入暴露試験では、有意な上昇を認めなかった。

LDH 放出量の平均値の変動範囲に関しては、両試験の陰性対照群で差のみられるところから、暴露群に差が認められるところもあった。

- 5) BALF 中の H0-1 濃度:気管内投与試験で急性期に一過性の上昇を認めたが、 吸入暴露試験では、有意な上昇を認めなかった。両者の H0-1 濃度の平均値 の変動範囲に関しては、両試験ともおおむね類似の数値であった。mRNA に 関しては、吸入暴露試験で初期に一過性の上昇を認めたが、気管内投与試験 ではほとんど差異を認めなかった。
- 6) 肺組織中の 8-0HdG 生成:気管内投与試験も吸入暴露試験においても、陰性対照と比較して有意な生成を認めなかった。但し、8-0HdG 生成の平均値の変動範囲に関しては、両試験の陰性対照群で差のみられるところから、暴露群に差が認められるところもあった。
- 7) 肺組織における TiO₂ のクリアランス:気管内投与試験も吸入暴露試験においても、半減期は1.8ヶ月であった。
- 8) 肺病理 間質炎症細胞の浸潤:気管内投与試験も吸入暴露試験においても著 明な間質における炎症細胞浸潤を認めなかった。
- 8) 肺病理線維化:気管内投与試験も吸入暴露試験においても線維化を認めなかった。

2.9. 酸化セリウムの気管内投与試験

試験の概要

酸化セリウムナノ粒子の気管内投与試験を行った。使用した酸化セリウムナ ノ粒子は、Cerium oxide (Ⅳ) nanoparticle Wako Chemical Ltd 社製であり、 一次粒径が 7.8 nm、比表面積が 101 m²/g、懸濁液の凝集径 DLS 径は 10.0 nm、 純度は 99.9%であった。この酸化セリウムナノ粒子 0.2 mg/rat, 1.0 mg/rat を Fisher344 ラット(投与時 12 週齡、雄)に気管内単回投与し、投与終了から 3 日、1週間、1ヶ月、3ヶ月、6ヶ月、12ヶ月までの解剖を終了した。陰性対照 群、低用量群、高用量群の3群に分かれており、1群10匹であった。各群を5 匹ずつの 2 つのサブグループに分けて、前半のグループでは気管支肺胞洗浄 (broncho-alveolar lavage (BAL))を行った。開胸後、気管支にカニューレを 挿入し、20 cm 水中圧にて、生理食塩水を注入し、両肺が膨らんでいることを確 認後、開放し、生理食塩水を回収し、これをもう一度繰り返した。この2回の回 収液(およそ 15-18 mL)を気管支肺胞洗浄液(broncho-alveolar lavage fluid (BALF)とした。後半のグループでは、開胸後、右肺(4葉)から、蛋白や RNA 抽 出、左肺は、10%ホルマリンにて定圧固定(25 cm 水中圧)を行い病理用サンプ ルとした。また、肺以外の臓器(肺、脳、肝臓、腎臓、脾臓、精巣)は秤量を行 い、一部病理標本とした。検討項目に関しては、体重、臓器(肺、脳、肝臓、腎 臓、脾臓、精巣)重量、肺の病理学的検索、BALF および肺組織の生化学的解析 (BALF 中の細胞解析、肺障害関連因子(サイトカイン (cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC)等)、酸化ストレスマーカー (heme oxygenase-1 (HO-1)),傷害マーカー (lactate dehydrogenase (LDH))、がん化 関連酸化的ストレス (8-ヒドロキシデオキシグアノシン(8-OHdG))、線維化およ び炎症関連遺伝子発現解析を行った。

解析方法

気管支肺胞洗浄液

回収した気管支肺胞洗浄液から 4~5 mL を採取後冷凍保存し、残りの溶液を 400 g で 15 分間遠心を行った。上清はサイトカイン等の測定用に冷凍保存し、 残ったペレットを PMN buffer にて再浮遊させ、細胞数や細胞分画を計測した。 上清中の CINC-1 濃度、CINC-2 濃度は ELISA kit (RCN100, RCN200 ; R & D systems Minneapolis)、HO-1 濃度は ELISA kit (ADI-EKS-810A Enzo Life Sciences, Framingdale, NY)、LDH 放出量は、Cytotoxicity Detection Kit plus (Roche Diagnostics GmbH, Germany)を用いた。

肺組織

10%ホルマリン溶液を注入した肺組織はパラフィン包埋を行い、5 µm スライス 切片にして、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。

- 1)臓器および体重の変化:体重、他臓器の重量において対照群と投与群との間 に一貫した有意差は認められなかった。しかし、肺重量に関しては、高用量 群で1ヶ月後まで有意な増加を認めた。
- 2) BALF 中の細胞数および細胞分画: BALF 中の総細胞数では、高用量群で1週 間から3ヶ月まで、好中球数では、高用量群は3日後から6ヶ月まで、低 用量群は3日から3ヶ月まで有意な上昇を示した。
- BALF 中 CINC-1 濃度: CINC-1 は高用量群では3日から6ヶ月、低用量群も3
 日から3ヶ月まで有意な上昇を示した。ピークは3日目であった。
- 4) 傷害マーカーの測定(BALF 中の LDH 活性の測定): LDH 放出量は高用量群では3日から6ヶ月、低用量群も3日から3ヶ月まで有意な上昇を示した。 ピークは3日目であった。
- 5) BALF 中の H0-1 濃度: BALF 中の H0-1 濃度は、高用量群、低用量群も3 日か ら3ヶ月後まで有意な上昇を示した。mRNA レベルでは、高用量で3 日目か ら亢進し、3ヶ月後がピークであった。
- 6) 肺組織中の 8-0HdG 生成:高用量群において、1 週間、1 ヶ月および6ヶ月、 12 か月で有意な生成を認めた。
- 7) 肺病理 間質炎症細胞の浸潤:高用量群も低用量群も3日目から6ヶ月まで

肺胞(実質)レベルでは炎症細胞浸潤を認めるが、間質細胞への浸潤はほとんど認められなかった。

- 8) 肺病理線維化:低用量、高用量ともに線維化は認められなかった。
- 9)他臓器(肝臓、腎臓、脾臓、精巣、脳)の組織病理所見:酸化セリウムの影響を示唆する変化、特記すべき所見はいずれのタイムポイント、用量においても認められなかった。

	低用量	高用量
	(O.2 mg)	(1.0 mg)
体重	\rightarrow	\rightarrow
肺重量	\rightarrow	$\uparrow \rightarrow$
他臓器重量	\rightarrow	\rightarrow
BALF 細胞解析 総細胞数	1	1
BALF 細胞解析 好中球数	1	1
好中球ケモカイン(CINCs)	1	1
BALF 傷害因子(LDH)	1	1
酸化ストレス応答蛋白(H0-1)	1	1
がん化関連酸化ストレス(8-0HdG)	\rightarrow	1
肺病理組織学的所見 炎症	±	±
肺病理組織学的所見 線維化	\rightarrow	\rightarrow
他臓器の病理組織学的解析	特記所見なし	特記所見なし

表②(a) -6 酸化セリウム気管内投与試験結果のまとめ

2.10. 酸化セリウムの吸入ばく露試験

試験の概要

酸化セリウムナノ粒子をラット(Fisher344、暴露開始時 10 週齡、雄)に 4 週 間(6時間/日、5日/週)の吸入暴露を行った。暴露の重量濃度は、低濃度が、 2.1±0.3 mg/m³、高濃度が 10.2±1.4 mg/m³であった。暴露終了後 3日、1 ヶ月、3ヶ月の解剖を終了した。陰性対照群、低濃度群、高濃度群の 3 群に分か れており、1 群 10 匹であった。各群を 5 匹ずつの 2 つのサブグループに分けて、 前半のグループでは気管支肺胞洗浄(broncho-alveolar lavage(BAL))を行っ た。開胸後、気管支にカニューレを挿入し、20 cm 水中圧にて、生理食塩水を注 入し、両肺が膨らんでいることを確認後、開放し、生理食塩水を回収し、これを もうー度繰り返した。この 2 回の回収液(およそ 15-18 mL)を気管支肺胞洗浄 液(broncho-alveolar lavage fluid (BALF))とした。後半のグループでは、開 胸後、右肺(4葉)から、蛋白や RNA 抽出、左肺は、10%ホルマリンにて定圧固 定 (25 cm 水中圧) を行い病理用サンプルとした。また、肺以外の臓器 (肺、脳、 肝臓、腎臓、脾臓、精巣) は秤量を行い、一部病理標本とした。検討項目に関し ては、体重、臓器 (肺、脳、肝臓、腎臓、脾臓、精巣) 重量、肺の病理学的検索、 BALF および肺組織の生化学的解析 (BALF 中の細胞解析、肺障害関連因子 (サイ トカイン (cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC)) 等)、酸化 ストレスマーカー (heme oxygenase-1 (H0-1))、傷害マーカー (lactate dehydrogenase (LDH))、がん化関連酸化的ストレス (8-ヒドロキシデオキシグア ノシン(8-OHdG))、線維化および炎症関連遺伝子発現解析を行った。

解析方法

気管支肺胞洗浄液

回収した気管支肺胞洗浄液から 4~5 mL を採取後冷凍保存し、残りの溶液を 400 g で 15 分間遠心を行った。上清はサイトカイン等の測定用に冷凍保存し、 残ったペレットを PMN buffer にて再浮遊させ、細胞数や細胞分画を計測した。 上清中の CINC-1 濃度、CINC-2 濃度は ELISA kit (RCN100, RCN200 ; R & D systems Minneapolis)、HO-1 濃度は ELISA kit (ADI-EKS-810A Enzo Life Sciences, Framingdale, NY)、LDH 放出量は、Cytotoxicity Detection Kit plus (Roche Diagnostics GmbH, Germany)を用いた。

肺組織

10%ホルマリン溶液を注入した肺組織はパラフィン包埋を行い、5 µm スライス 切片にして、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。

- 1)臓器および体重の変化:体重、他臓器の重量において対照群と暴露群との間 に一貫した有意差は認められなかった。しかし、肺重量に関しては、高濃度 群において持続的な有意な増加を認めた。
- 2) BALF 中の細胞数および細胞分画: BALF 中の総細胞数、好中球数とも、高濃 度群、低濃度群において有意な上昇を示した。
- 3) BALF 中 CINC-1 濃度:3 日後から濃度依存性の増加を認め、3 ヶ月まで持続 した。
- 4) 傷害マーカーの測定(BALF 中の LDH 活性の測定): LDH 放出量は3日後から 濃度依存性の増加を認め、3ヶ月まで持続した。但し、LDH 放出量のピーク は、3日後であった。
- 5) BALF 中の H0-1 濃度: BALF 中の H0-1 濃度は、高濃度群、低濃度群も濃度依 存性に有意な上昇を示し、3 ヶ月まで持続した。mRNA レベルでは、3 日後と 3 ヶ月後に 2 相性の亢進を認めた。
- 6) 肺組織中の 8-0HdG 生成:高濃度群において有意な生成を認めた。
- 7) 肺病理 間質炎症細胞の浸潤:高濃度群も低濃度群も、肺胞(実質) レベル

では、軽度の炎症細胞浸潤を認めるが、間質細胞への浸潤はほとんど認められなかった。

- 8) 肺病理 線維化:低濃度群、高濃度群ともに著明な線維化は認められなかった。
- 9)他臓器(肝臓、腎臓、脾臓、精巣、脳)の組織病理所見:酸化セリウムの影響を示唆する変化、特記すべき所見は認められなかった。

	低濃度	高濃度
体重	\rightarrow	\rightarrow
肺重量	$\uparrow \rightarrow$	1
他臓器重量	\rightarrow	\rightarrow
BALF 細胞解析 総細胞数	$\uparrow \rightarrow$	1
BALF 細胞解析 好中球数	1	1
好中球ケモカイン(CINCs)	1	1
BALF 傷害因子(LDH)	1	1
酸化ストレス応答蛋白(HO-1) mRNA レベル	$\uparrow \rightarrow$	$\uparrow \rightarrow$
酸化ストレス応答蛋白(HO-1) 蛋白レベル	↑ (t
がん化関連酸化ストレス(8-0HdG)	\rightarrow	1
肺病理組織学的所見 炎症	持続炎症	持続炎症
肺病理組織学的所見 線維化	なし	なし
他臓器の病理組織学的解析	特記所見なし	特記所見なし

表②(a) -7 酸化セリウム吸入暴露試験結果のまとめ

2.11. 酸化セリウムの気管内投与試験と吸入暴露試験の比較

試験の概要

酸化セリウムナノ粒子の吸入暴露試験では、ラット(Fisher344、暴露開始時 10週齡、雄)に4週間(6時間/日、5日/週)吸入暴露し、暴露の重量濃度は、 低濃度が、2.1±0.3 mg/m³、高濃度が10.2±1.4 mg/m³であった。一方、気 管内投与試験では、低用量0.2 mg/rat、高用量1.0 mg/ratを気管内注入した。 両試験とも暴露終了後3日目等に解剖を行った。今回は、吸入暴露濃度の増加 か可能であったので、吸入暴露試験の高濃度群と気管内投与試験の高用量群の 比較、吸入暴露試験の低濃度群と気管内投与試験の低用量群の比較を行った。 **結果**

1)肺重量の変化:高用量と高濃度群は、ともに陰性対照群から増加した。低用

量と低濃度、高用量と高濃度の比較において、一貫した著明な差異は認められなかった。

- 2) BALF 中の細胞数および細胞分画:細胞数や好中球数において、低用量と低 濃度、高用量と高濃度のいずれにおいても、陰性対照と比較して増加傾向を 示した。低用量と低濃度間、高用量と高濃度間に関しては、一貫した著明な 差異は認められなかった。
- 3)BALF 中 CINC-1 濃度:低用量と低濃度、高用量と高濃度のいずれにおいても、 陰性対照と比較して増加を示した。低用量と低濃度間、高用量と高濃度間の 比較に関しては、3日後を中心に気管内投与試験の CINC-1 濃度が、吸入ば く露試験よりも高い傾向にあった。
- 4)傷害マーカーの測定(BALF中のLDH活性の測定):低用量と低濃度、高用量 と高濃度のいずれにおいても、陰性対照と比較して増加を示した。低用量と 低濃度間、高用量と高濃度間の比較に関しては、3日後を中心に気管内投与 試験のLDH活性が、吸入ばく露試験よりも高かった。
- 5) BALF 中の H0-1 濃度:低用量と低濃度、高用量と高濃度のいずれにおいても、 陰性対照と比較して増加傾向を示した。低用量と低濃度間の比較、高用量と 高濃度間の比較では、一貫した差異は認められなかった。
- 6)肺組織中の 8-0HdG 生成:高用量と高濃度の比較では、投与1ヶ月後において、気管内投与試験よりも吸入ばく露試験が有意に高いが、一貫した差異は認められなかった。
- 7)肺病理間質炎症細胞の浸潤:高用量、低用量、高濃度群、低濃度群のいずれの群においても、肺胞(実質)レベルでは炎症細胞浸潤を認めた。間質細胞への浸潤は、気管内投与試験で軽度認められたが、両試験の著明な差異は認められなかった。
- 8) 肺病理 線維化:高用量、低用量、高濃度群、低濃度群のいずれの群におい ても、著明な線維化は認められなかった。

2.12.酸化亜鉛の気管内投与試験

試験の概要

酸化亜鉛ナノ粒子の気管内投与試験を行った。使用した酸化亜鉛ナノ粒子は、 Sigma-Aldrich Co. 社製で一次粒径が35 nm、比表面積が31 m²/g、球形、懸濁 液中の凝集径 DLS 径 33 nm、純度が99.94%であった。この酸化亜鉛ナノ粒子0.2 mg/rat, 1.0 mg/rat を Fisher 344 ラット(投与時12週齡、雄)に単回気管内 注入を行い、投与終了から3日、1週間等までの解剖を終了した。陰性対照群、 低用量群、高用量群の3群に分かれており、1群10匹であった。各群を5匹ず つの2 つのサブグループに分けて、前半のグループでは気管支肺胞洗浄 (broncho-alveolar lavage (BAL))を行った。開胸後、気管支にカニューレを 挿入し、20 cm 水中圧にて、生理食塩水を注入し、両肺が膨らんでいることを確 認後、開放し、生理食塩水を回収し、これをもう一度繰り返した。この2回の回 収液(およそ15-18 mL)を気管支肺胞洗浄液(broncho-alveolar lavage fluid (BALF))とした。後半のグループでは、開胸後、右肺(4葉)から、蛋白や RNA 抽出、左肺は、10%ホルマリンにて定圧固定(25 cm 水中圧)を行い病理用サン プルとした。また、肺以外の臓器(肺、脳、肝臓、腎臓、脾臓、精巣)は秤量を 行い、一部病理標本とした。検討項目に関しては、体重、臓器(肺、脳、肝臓、 腎臓、脾臓、精巣)重量、肺の病理学的検索、BALF および肺組織の生化学的解 析 (BALF 中の細胞解析、肺障害関連因子(サイトカイン(cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC))等)、酸化ストレスマーカー(heme oxygenase-1 (HO-1))、傷害マーカー(lactate dehydrogenase (LDH))、がん化 関連酸化的ストレス(8-ヒドロキシデオキシグアノシン(8-OHdG))、線維化およ び炎症関連遺伝子発現解析を行った。

解析方法

気管支肺胞洗浄液

回収した気管支肺胞洗浄液から 4~5 mL を採取後冷凍保存し、残りの溶液を 400 g で 15 分間遠心を行った。上清はサイトカイン等の測定用に冷凍保存し、 残ったペレットを PMN buffer にて再浮遊させ、細胞数や細胞分画を計測した。 上清中の CINC-1 濃度、CINC-2 濃度は ELISA kit (RCN100, RCN200 ; R & D systems Minneapolis)、HO-1 濃度は ELISA kit (ADI-EKS-810A Enzo Life Sciences, Framingdale, NY)、LDH 放出量は、Cytotoxicity Detection Kit plus (Roche Diagnostics GmbH, Germany)を用いた。

肺組織

10%ホルマリン溶液を注入した肺組織はパラフィン包埋を行い、5 µm スライス 切片にして、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。

- 1)臓器および体重の変化:6ヶ月後までにおいて体重、他臓器の重量において 対照群と投与群との間に一貫した有意差は認められなかった。しかし、肺重 量に関しては、有意な増加を3日から3ヶ月後まで認めた。
- 2) BALF 中の細胞数および細胞分画: BALF 中の総細胞数では、高用量群で3日 から3ヶ月まで、好中球数では、高用量群も低用量群も3日後から1週間 まで有意な上昇を示した。
- 3) BALF 中 CINC-1 濃度: CINC-1 は高用量群、低用量群ともに 3 日後のみ有意 な上昇を示した。
- 4) 傷害マーカーの測定(BALF 中の LDH 活性の測定): LDH 放出量は高用量群、

低用量群も3日から1週間まで有意な上昇を示した。ピークは3日目であった。

- 5) BALF 中の HO-1 濃度: BALF 中の HO-1 濃度は、高用量群、低用量群ともに3 日後のみ有意な上昇を示した。mRNA レベルでも、高用量群、低用量群とも に3日後のみ有意な亢進を認めた。
- 6) 肺組織中の 8-0HdG 生成:低用量群において、1ヶ月で有意な生成を認めた が一貫した有意差は認められなかった。
- 7)肺病理間質炎症細胞の浸潤:高用量群も低用量群も3日目に肺胞(実質) レベルでは著明な炎症細胞浸潤を認めるが、間質細胞への浸潤は軽度であった。これらの炎症細胞浸潤は軽快し、1ヶ月後には消失した。
- 8)肺病理線維化:3日後には軽度な線維化は認められたが、1ヶ月後にはほぼ 消失した。
- 9)他臓器(肝臓、腎臓、脾臓、精巣、脳)の組織病理所見:3日後も1週間後も、酸化亜鉛の影響を示唆する変化、特記すべき所見はいずれのタイムポイント、用量においても認められなかった。

	低用量	高用量
	(O.2 mg)	(1.0 mg)
体重	\rightarrow	→
肺重量	$\uparrow \rightarrow$	$\uparrow \rightarrow$
他臓器重量	\rightarrow	\rightarrow
BALF 細胞解析 総細胞数	$\uparrow \rightarrow$	$\uparrow \rightarrow$
BALF 細胞解析 好中球数	$\uparrow \rightarrow$	$\uparrow \rightarrow$
好中球ケモカイン(CINCs)	$\uparrow \rightarrow$	$\uparrow \rightarrow$
BALF 傷害因子(LDH)	$\uparrow \rightarrow$	$\uparrow \rightarrow$
酸化ストレス応答蛋白(H0-1)	$\uparrow \rightarrow$	$\uparrow \rightarrow$
がん化関連酸化ストレス(8-0HdG)	\rightarrow	\rightarrow
肺病理組織学的所見 炎症	一過性炎症	一過性炎症
肺病理組織学的所見 線維化	一過性炎症	一過性炎症
他臓器の病理組織学的解析	特記所見なし	特記所見なし

表②(a) -8 酸化亜鉛気管内投与試験結果のまとめ

2.13.酸化亜鉛の吸入暴露試験

試験の概要

酸化亜鉛ナノ粒子を、ラット(Fisher344、暴露開始時10週齢、雄)に4週間 (6時間/日、5日/週)吸入暴露した。暴露の重量濃度は、低濃度が、2.11±0.45 mg/m³、高濃度が 10.4±1.39 mg/m³ であった。暴露終了後、3 日後等に解剖を 行った。陰性対照群、低用量群、高用量群の3群に分かれており、1 群 10 匹で あった。各群を5匹ずつの2つのサブグループに分けて、前半のグループでは 気管支肺胞洗浄(broncho-alveolar lavage(BAL))を行った。開胸後、気管支 にカニューレを挿入し、20 cm 水中圧にて、生理食塩水を注入し、両肺が膨らん でいることを確認後、開放し、生理食塩水を回収し、これをもう一度繰り返した。 この2回の回収液(およそ15-18 mL)を気管支肺胞洗浄液(broncho-alveolar lavage fluid (BALF))とした。後半のグループでは、開胸後、右肺(4葉)か ら、蛋白や RNA 抽出、左肺は、10%ホルマリンにて定圧固定(25 cm 水中圧)を 行い病理用サンプルとした。また、肺以外の臓器(肺、脳、肝臓、腎臓、脾臓、 精巣)は秤量を行い、一部病理標本とした。検討項目に関しては、体重、臓器(肺、 脳、肝臓、腎臓、脾臓、精巣)重量、肺の病理学的検索、BALF および肺組織の生 化学的解析 (BALF 中の細胞解析、肺障害関連因子 (サイトカイン (cytokineinduced neutrophil chemoattractant (CINC))等)、酸化ストレスマーカー(heme oxygenase-1 (HO-1))、傷害マーカー (lactate dehydrogenase (LDH))、がん化 関連酸化的ストレス(8-ヒドロキシデオキシグアノシン(8-0HdG))、線維化およ び炎症関連遺伝子発現解析を行った。

解析方法

気管支肺胞洗浄液

回収した気管支肺胞洗浄液から 4~5 mL を採取後冷凍保存し、残りの溶液を 400 g で 15 分間遠心を行った。上清はサイトカイン等の測定用に冷凍保存し、 残ったペレットを PMN buffer にて再浮遊させ、細胞数や細胞分画を計測した。 上清中の CINC-1 濃度、CINC-2 濃度は ELISA kit (RCN100, RCN200 ; R & D systems Minneapolis)、HO-1 濃度は ELISA kit (ADI-EKS-810A Enzo Life Sciences, Framingdale, NY)、LDH 放出量は、Cytotoxicity Detection Kit plus (Roche Diagnostics GmbH, Germany)を用いた。

肺組織

10%ホルマリン溶液を注入した肺組織はパラフィン包埋を行い、5 μm スライス 切片にして、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。

- 1)臓器および体重の変化:体重、他臓器の重量において対照群と暴露群との間 に一貫した有意差は認められなかった。しかし、肺重量に関しては、高濃度 群において3日後から1ヶ月後まで有意な増加を認めた。
- 2) BALF 中の細胞数および細胞分画: BALF 中の総細胞数、好中球数とも、高濃 度群において3日後のみ有意な上昇を示した。
- 3) BALF 中 CINC-1 濃度:3 日後に高濃度群で著明な CINC-1 濃度の上昇を示し

たが、一過性であった。

- 4) 傷害マーカーの測定(BALF 中の LDH 活性の測定):3日後に高濃度群で著明な LDH 活性の上昇を示したが、一過性であった。
- 5) BALF 中の H0-1 濃度:3 日後に高濃度群で著明な H0-1 濃度の増加を示した が、一過性であった。
- 6) 肺組織中の 8-0HdG 生成: 高濃度群の3ヶ月後において有意な生成を認めた。
- 7) 肺病理炎症細胞の浸潤:高濃度群では、3日後に肺胞マクロファージを中心とした炎症細胞浸潤を肺胞腔に認めた。
- 8) 肺病理 線維化:低濃度群、高濃度群ともに著明な線維化は認められなかった。
- 9)他臓器(肝臓、腎臓、脾臓、精巣、脳)の組織病理所見:3日後において、 酸化亜鉛の影響を示唆する変化、特記すべき所見は認められなかった。

私で(d) 5 酸化量如极八级路矾欧和木の6との		
	低濃度	高濃度
体重	\rightarrow	\rightarrow
肺重量	\rightarrow	$\uparrow \rightarrow$
他臓器重量	\rightarrow	\rightarrow
BALF 細胞解析 総細胞数	\rightarrow	\rightarrow
BALF 細胞解析 好中球数	\rightarrow	\rightarrow
好中球ケモカイン(CINCs)	\rightarrow	\rightarrow
BALF 傷害因子(LDH)	\rightarrow	\rightarrow
酸化ストレス応答蛋白(HO-1) mRNA レベル	\rightarrow	\rightarrow
酸化ストレス応答蛋白(H0-1) 蛋白レベル	\rightarrow	$\uparrow \rightarrow$
がん化関連酸化ストレス(8-0HdG)	\rightarrow	1
肺病理組織学的所見 炎症	なし	一過性炎症
肺病理組織学的所見 線維化	なし	なし
他臓器の病理組織学的解析	特記所見なし	特記所見なし

表②(a) -9 酸化亜鉛吸入暴露試験結果のまとめ

2.14. 酸化亜鉛の気管内投与試験と吸入暴露試験の比較

試験の概要

酸化亜鉛の吸入暴露試験では、ラット(Fisher344、暴露開始時10週齢、雄) に4週間(6時間/日、5日/週)吸入暴露し、暴露の重量濃度は、低濃度が2.11 ±0.45 mg/m³、高濃度が10.4 ± 1.39 mg/m³であった。一方、気管内投与試験 では、低用量 0.2 mg/rat、高用量 1.0 mg/rat を気管内注入した。両試験とも暴 露終了後 3 日目等に解剖を行った。今回は、吸入暴露濃度の増加が可能であっ たので、吸入暴露試験の高濃度群と気管内投与試験の高用量群の比較、吸入暴露 試験の低濃度群と気管内投与試験の低用量群の比較を行った。

- 1)肺重量の変化:低用量と低濃度、高用量と高濃度のいずれにおいても、陰性 対照と比較して増加を示した。低用量と低濃度、高用量と高濃度の比較にお いて、初期において気管内注入による肺重量が、吸入ばく露試験による肺重 量より高かった。
- 2) BALF 中の細胞数および細胞分画:細胞数や好中球数において、低用量と低 濃度、高用量と高濃度のいずれにおいても、陰性対照と比較して増加を示し た。高用量と高濃度間の比較に関しては、3日後に気管内投与試験が吸入ば く露試験より高かった。
- 3) BALF 中 CINC-1 濃度:3日後に低用量、高用量と高濃度において、陰性対照 と比較して増加を示した。低用量と低濃度間、高用量と高濃度間の比較に関 しては、両試験に著明な差異はなかった。
- 4)傷害マーカーの測定(BALF中のLDH活性の測定):低用量と低濃度、高用量 と高濃度のいずれにおいても、3日後に陰性対照と比較して増加を示した。 高用量と高濃度間の比較に関しては、3日後を中心に気管内投与試験のLDH 活性が、吸入ばく露試験よりも高かった。
- 5) BALF 中の H0-1 濃度:3日後に低用量、高用量と高濃度において、陰性対照 と比較して増加を示した。低用量と低濃度間の比較、高用量と高濃度間の比 較とも、3日後に気管内投与試験の H0-1 濃度が、吸入ばく露試験の結果よ りも高かった。
- 6) 肺組織中の 8-0HdG 生成:投与3日後において、低用量に対する低濃度群、 高用量に対する高濃度群の比較では、いずれも有意な差を認めなかった。
- 7) 肺病理 間質炎症細胞の浸潤:高用量、低用量、高濃度群においても、肺胞 (実質) レベルでは炎症細胞浸潤を認めた。
- 8) 肺病理 線維化:高用量、低用量、高濃度群、低濃度群のいずれの群におい ても、著明な線維化は認められなかった。
- 9)粒子の存在:両試験とも粒子を貪食したマクロファージが少ない。酸化亜鉛 ナノ粒子は、滞留性が高い酸化セリウムナノ粒子と比べて、肺内や傍気管支 リンパ装置などに粒子を貪食したマクロファージの存在をほとんど認めな かった。酸化亜鉛ナノ粒子は、一般に溶解性があるため、肺から溶出し、肺 内に留まりにくいので、貪食細胞が少ないことが考えられる。

2.15. 表面積と指標とした有害性の有用性

試験の概要

表面積がナノ材料の炎症能の指標になることが報告されており、本試験結果 においても表面積の指標としての有用性を気管内投与試験や吸入ばく露試験に おいて検討した。気管内投与試験においては、二酸化チタン、酸化亜鉛、酸化セ リウム、酸化ニッケルの4種類のナノ材料を用いて投与後3日、1週間、1ヶ月、 3ヶ月後に、各々のタイムコースのBALFの好中球数や好中球比率にて評価した。 また、吸入ばく露試験においては、二酸化チタン、酸化セリウム、酸化ニッケル の3種類のナノ材料を用いてばく露終了後3日、1ヶ月、3ヶ月後に、気管内投 与試験と同様に各々のタイムコースのBALFの好中球数や好中球比率にて評価し た。

結果

- 1)気管内投与試験における BALF の好中球数:気管内投与試験では、表面積に 依存して、好中球数が増加する傾向にある観察時期もあるが、明確な傾向は 認めなかった。さらに、炎症性の高い酸化ニッケル、酸化セリウムの表面積 が、炎症性の低い酸化亜鉛や二酸化チタンの表面積よりも高いことを示さ なかった。よって、表面積がナノ材料の炎症能を指標として有用であること を示すことはできなかった。
- 2)吸入ばく露試験における BALF の好中球数:吸入ばく露試験では、炎症性の高い酸化セリウムは表面積に伴い好中球数が高い傾向を示したが、同じく炎症の高いニッケルでは同様の傾向が認められなかった。よって、表面積がナノ材料の炎症能を指標として有用であることを示すことはできなかった。
- 3)気管内投与試験における BALF の好中球比率:気管内投与試験では、表面積に依存して、好中球比率が増加する傾向にあるが、明確な傾向は認めなかった。炎症性の高い酸化ニッケル、酸化セリウムの表面積に伴う炎症比率が、炎症性の低い酸化亜鉛や二酸化チタンよりも高いことを示さなかった。よって、表面積がナノ材料の炎症能を指標として有用であることを示すことはできなかった。
- 4)吸入ばく露試験における BALF の好中球比率:吸入ばく露試験では、どのタ イムコースも表面積に依存して、好中球比率が増加した。炎症性の高い酸化 ニッケルの表面積が、炎症性の低い二酸化チタンナノ粒子よりも低く、表面 積とナノ材料の炎症能が相関しなかった。よって、表面積がナノ材料の炎症 能を指標として有用であることを示すことはできなかった。

2.16. 好中球・単球活性化関連因子である iNOS の免疫染色

試験の概要

好中球や単球の活性化に伴う因子として iNOS があり、iNOS について免疫染色 を行った。酸化ニッケルナノ粒子を気管内投与したラット肺における投与後1ヶ 月と3ヶ月について、染色度合いや染色箇所に変化があるかを比較した。

- 1) iNOS 抗体 DAB 免疫染色の方法は以下の通りである。
 - (ア)解剖後 10%ホルマリン固定された肺組織をパラフィン包埋し、4 µm の薄切切片として切り出した。
 - (イ)脱パラフィン・加水工程を経てペルオキシダーゼブロックを施した。
 - (ウ) 一次抗体 {抗 iNOS 抗体 (Thermo 社製、Cat. No. PA1-28206)} を滴下し、37°C にて 60 分間インキュベートした。
 - (エ)二次抗体 {HRP 付加抗ウサギ抗体 (Santa Cruz Biotechnology 社製、 Cat. No. sc-2004)} を 400 倍希釈して滴下し、37°C にて 30 分間イン キュベートした。
 - (オ) DAB 発色を施し、マイヤーヘマトキシリンにて対比染色後、脱水・透徹 して封入した。

結果

- iNOSの局在:1ヶ月、3ヶ月共に、投与群のマクロファージが陽性であった。対照群では陰性であった。
- 2) iNOS 染色の投与後期間における差:1ヶ月と3ヶ月とでマクロファージの数に差は見られたものの、マクロファージ自体の染色は同等であり、差は特に認められなかった。
- 2.17. 好中球活性酵素ミエロペルオキシダーゼの免疫染色

試験の概要

ミエロペルオキシダーゼは好中球に多く存在する酵素であり、好中球の活性 化によって表出するタンパクとして知られている。そこで、本研究では、炎症を 起こした肺組織内における好中球の活性化状況を検討するために、の肺胞腔内 における好中球のミエロペルオキシダーゼ染色を試みた。

はじめに、酸化ニッケルナノ粒子を気管内投与したラットにおける投与後3 ヶ月の肺組織を用いて、ミエロペルオキシダーゼが DAB 免疫染色において適切 に染色される方法を検討し、続いて、ミエロペルオキシダーゼの蛍光免疫染色に おいても適切に染色される方法を検討した。

- 方法1) 抗ミエロペルオキシダーゼ抗体による DAB 免疫染色の方法は以下 の通りであり、検討項目は、一次抗体の濃度と、DAB 発色の時間である。
 - (ア)解剖後10%ホルマリン固定された肺組織をパラフィン包埋し、4 µmの 薄切切片として切り出した。
 - (イ) 脱パラフィン・加水工程を経てペルオキシダーゼブロックを施した。

- (ウ)希釈した一次抗体をそれぞれ滴下し、37°Cにて 60 分間恒温静置した。
- (エ)二次抗体を400倍希釈して滴下し、37°Cにて30分間恒温静置した。
- (オ) DAB 発色を行い、マイヤーヘマトキシリンにて対比染色後、脱水・透 徹して封入し、明視野にて顕微鏡観察を行った。
- 方法2) 抗ミエロペルオキシダーゼ抗体による蛍光免疫染色の方法は以 下の通りであり、検討項目は、蛍光免疫染色に適切な抗体の選定とその 濃度である。
 - (ア) 解剖後 10%ホルマリン固定された肺組織をパラフィン包埋し、4 μm の 薄切切片として切り出した。
 - (イ)脱パラフィン・加水工程を経てペルオキシダーゼブロックを施した。
 - (ウ)希釈した各々の一次抗体を滴下し、37°Cにて60分間恒温静置した。
 - (エ) 二次抗体を 400 倍希釈して滴下し、37°C にて 30 分間恒温静置した。
 - (オ) 三次抗体を 400 倍希釈して滴下し、37°C にて 30 分間恒温静置した。
 - (カ) DAPI を含む封入剤にて封入し、蛍光顕微鏡にて観察を行った。

結果

- ミエロペルオキシダーゼが DAB 免疫染色で最も適切に染色された条件は、 抗ミエロペルオキシダーゼ抗体(Dako 社製、Cat. No. A0398)を100 倍希釈 したものを使用して DAB 発色を2分行ったものであった。
- ミエロペルオキシダーゼが蛍光免疫染色で最も適切に染色された条件 は、抗ミエロペルオキシダーゼ抗体(Dako 社製、Cat. No. A0398)を用いて 200 倍希釈したものと、抗ミエロペルオキシダーゼ heavy chain 抗体(Santa Cruz Biotechnology 社製; Cat. No. sc-34159)を用いて 50 倍希釈したも のの2条件であった。

これらの抗体を使用してミエロペルオキシダーゼ染色を最適条件下で行い、 好中球浸潤を認める酸化ニッケルナノ粒子高用量群(投与後3ヶ月)において、 ミエロペルオキシダーゼ陽性を認めた。このことから、酸化ニッケルナノ粒子投 与により好中球が活性化されていることが示唆された。

2.18. 気管内投与試験と吸入ばく露試験の結果の類似性と相違性

本プロジェクトにおいてに実施した気管内投与試験と吸入ばく露試験の結果、 以前、我々が行った試験や他の報告の結果をまとめ、気管内投与試験と吸入ばく 露試験の類似性と相違性を含めた特徴を以下のように総説にまとめた。

1) Bolus effect による気道内病変

気管内投与は、化学物質を一挙に肺内に注入することから、吸入ばく露試験

では認められない急性の局所的な炎症反応を引き起こしやすい。このような反 応を bolus effect という。特に注入する物質が凝集しやすい物質であれば、 bolus effect をおこしやすい。 分散処理を行わないで動物に注入試験を行うと、 気道内にナノ材料が凝集し、それに炎症細胞が集積し、非特異的な肉芽腫様病変 を形成し、肺胞には、炎症細胞や注入したナノ材料が認められないこともある。 つまり、凝集した物質が肺胞に到達できず、末梢気道内に滞留し炎症を形成して いる。これでは、肺胞への影響を観察することができない。一方、分散性が確保 されている物質であれば、気道内の凝集は形成しにくく、末梢気道から肺胞への 炎症細胞の浸潤を認める。従って、分散性を確保することは、bolus effectを 避けることにつながる。しかし、どのくらい分散性があると、bolus effectを 防げるか明確な基準はない。工業用ナノ材料の有害性評価を目的とした国家プ ロジェクトして、NEDO プロジェクトが行われたが、このプロジェクトで極力分 散したナノ材料を用いて動物ばく露試験を行っている。これによれば、動的光散 乱(DLS)径として、数百ナノなら 2 μm 以下であれば、粒子の凝集による bolus effect を極力防止することは可能と考える。一方、分散性が良好でも、大量に 物質を注入すれば、凝集塊を形成しやすい。 我々は以前の報告で、DLS 径が 26nm と分散性の良い二酸化チタンナノ粒子を、ラットに 0.1 mg、 0.2 mg、 1 mg、 3 mg の気管内注入を行い、3 日後の肺の粒子や炎症細胞の分布を観察した。0.1 mgから1mgまでは、粒子も炎症細胞も著明な凝集は認められなかったが、3mg では二酸化チタンナノ粒子の茶褐色の凝集塊が、末梢気道周囲に認められた。よ って、分散性を保持した粒子でも、大量投与を行うと凝集塊を形成する。凝集塊 を形成する明確な投与量は、不明ではあるが、上記の試験では、1 mg/rat から 3 mg/ratの間にあることが示唆された。本プロジェクトにおいても、分散性を 確保したナノ材料を使用したので、肺の小葉レベルまでは到達した。

2) 肺内分布の不均一性

気管内注入による粒子の肺内分布は、注入した懸濁液の広がる領域、つまり 末梢気道を中心とした周囲の肺胞領域である。これらの所見は、小葉中心性の粒 子や炎症細胞の浸潤として認められる。一方、吸入ばく露試験では、吸入性粒子 は、空気力学的挙動や拡散等により肺内に沈着するので、気管内注入した粉じん よりも肺胞の奥まで分布することが想定される。吸入ばく露試験におけるばく 露直後の粒子の主な肺内分布は、小葉中心性と記載されている論文が多く、一見 すると気管内注入による分布と、大差がないように思われる。Bermudez らの報 告では、ラットに二酸化チタンミクロン粒子を10、50、250 mg/m³の重量ばく露 濃度で13週間の吸入ばく露直後に肺病理組織の検討を行い、高濃度、中濃度で、 多くの粒子や粒子を貪食している多くの肺胞マクロファージは、小葉中心性に 認められた。さらに、Bermudez らは、二酸化チタンナノ粒子を2.0 mg/m³の重量 ばく露濃度で13週間ラットに吸入ばく露を行い、ばく露終了4週間後の肺組織 の病理学的検討を行い、小葉中心性に、凝集したナノ粒子を貪食した肺胞マクロ ファージを認めている。他の吸入ばく露試験で、肺の病理写真が掲載された論文 を見ても、小葉中心性の病変を呈している。このように病変の主座は、小葉中心 性ではあるが、胸膜直下の病変や高濃度になれば肺胞壁を全周性に広がる病変 を認めている。さらに本プロジェクトにおいても、良く分散した酸化ニッケルナ ノ粒子や二酸化チタンナノ粒子を気管内投与試験と吸入ばく露試験を行い、肺 内の病変を検討した。気管内投与試験では、肺胞マクロファージの浸潤が細気管 支から肺胞道と周囲が多く、分布も不均一な例がある一方、吸入ばく露試験では 末梢まで比較的均等に肺胞マクロファージが分布している。よって、気管内投与 試験と比較して吸入ばく露試験では、粒子や病変の分布は、病変の主座は変わら なくとも広く均一に分布する傾向が伺える。

3) 肺からのクリアランス

気管内投与試験も吸入ばく露試験とも大量ばく露を行うと、肺からクリアランスの遅延を認めるが、気管内投与試験では、この傾向が強い。

肺からの粉じんの排泄は、主に2つの経路があり、ひとつの経路は、肺内のマ クロファージが粉じんを貪食し、末梢気道まで輸送し、線毛粘液系により喀痰と して排泄される。もう一つは、粉じんを貪食したマクロファージが、間質に侵入 し、小葉内リンパ管、所属リンパ節、縦隔のリンパ節へと移行する経路がある。 これらの排泄機能が十分に機能していれば、粉じんのクリアランスは順調に行 われるが、大量投与を行うと、排泄機能が破綻してしまう。このように排泄機能 が遅延する負荷を over load と言っており、この量を超えてばく露すると、ラッ トでは特有の生体影響を引き起こす。つまり、過剰投与によりマクロファージの 排泄が遅延し、物質が肺内に滞留し、最終的には腫瘍を引き起こすと考えられて いる。これは、発がん作用の少ない低毒性物質でも同様である。よって、overload 以上のばく露量で認められた生体反応は、毒性によるものか、overload による ものか区別ができない。物質の本来の毒性を調べるためには、overload 以下の 用量で毒性を判断することが重要である。 基準としては、 肺胞マクロファージ1 個体あたり60 µm³の粉じん量(体積用量)、または肺1 g あたり1 µl を超える と、overload が始まると考えられている。気管内投与でも吸入ばく露でも動物 ばく露試験では、ばく露量は重量単位で示されていることが多く、overload を 重量ベースで示した報告では、Morrow らは、トナーの overload を引き起こす肺 内保持量は、肺1gあたり1mg前後としている。Pauluhnらの報告では、二酸 化チタン粒子の吸入ばく露試験や気管内投与試験において、二酸化チタンの肺 内保持量が 0.7 mg/rat 以上になると肺からのリンパ節へのクリアランスが著し く低下することを報告した。我々の先行研究では二酸化チタンナノ粒子の気管 内注入を低用量から高用量(0.1 mg、0.2 mg、1 mg、3 mg)まで行い、排泄機 能を検討した。0.1 mg、0.2 mgと比較して1 mg では軽度の遅延、3 mg で有意 な排泄能の遅延を引き起こした。以上より、気管内投与試験では、工業用ナノ材 料の最大投与量を1 mg/rat 以下とすれば、over load による生体影響を防ぐこと が可能であり、物質の本来の有害性評価につながると思われる。本プロジェクト において、最大投与量 1 mg/rat としてラットに気管内注入を行い、炎症能を有 する酸化ニッケルや酸化セリウムでは持続炎症を示し、炎症能が低い酸化チタ ンや酸化亜鉛は一過性の炎症であった。以上のことから気管内投与試験におい ても、過剰な投与を行わなければ、工業ナノ材料の炎症能のランク付けは可能で あることが示唆された。

4) 他臓器への移動

吸入ばく露試験、気管内投与試験とも、肝臓、腎臓、脾臓などへの沈着は、報 告されている。Kwonらの吸入ばく露試験の報告では、50 nm の蛍光磁性粒子を4 週間の吸入ばく露を行い、他の臓器への沈着を magnetic resonance imaging (MRI)と confocal laser scanning microscope を用いて解析し、肝臓、脾臓、 腎臓、脳、精巣などに沈着したことを認めた。一方、Zhu らの気管内投与試験の 報告では、1次粒径が22 nm の酸化鉄ナノ粒子 4 mg/rat を気管内注入し、他 臓器中の鉄の濃度を測定したところ、酸化鉄の肺内保持量は、1 日後から減少し た(肺からの排泄速度:3.06 µg/日)が、心臓、肝臓、精巣、腎臓などの保持量 は7日か21日にピークを示し、他臓器に移行したことが認められた。しかし、 脳の沈着は、代謝臓器に比べて、微量であった。気管内投与試験において脳への 移行沈着は、認めない(検出限界以下)か、または軽度であるとした報告もある。 これには、ナノ粒子の鼻部から嗅球を介した脳への移行や物質の blood brain barrier 透過性の相違などが関与することが考えられる。

他臓器への移行と物理化学的特性との関連として、Kreyling らの報告では、 1次粒子が2-4 nmのイリジウム粒子と5-10 nmのカーボンナノ粒子の凝集レベ ルの異なる凝集体(20-80 nm)を1時間、吸入ばく露試験を行い、他臓器への沈 着量を検討した。凝集レベルが小さな粒子(20 nm)が、大きな粒子(80 nm)よ り、肝臓、脾臓、腎臓、心臓、脳の沈着率が高いことが認められた。他臓器の移 行には、物質の特性として、凝集レベルが小さい粒子が移行しやすいことを示唆 している。

次世代への影響に関しては、Jacksonらは、妊娠マウスにカーボンブラックナノ粒子を気管内注入または吸入ばく露を行い、児動物への影響を検討した。吸入

ばく露試験では、40 mg/m³のカーボンブラックナノ粒子(printex 90)を1時間 妊娠8から18日に吸入ばく露し、母および児動物とも肝臓のDNA損傷を認めた。 一方、同じく妊娠中のマウスに、吸入ばく露試験のマウスの肺内保持量とほぼ同 じ用量を気管内注入しても、母動物および児動物における肝臓のDNA損傷を認 めていない。報告が少ないので、限定的ではあるが、気管内投与試験と吸入試験 おける反応性として、脳、児動物への影響に差異があるかもしれない。

5) 分散剤の影響

界面活性剤を含む分散剤は、工業用ナノ材料の懸濁液の分散性を高めるため に使用されるが、同時に高濃度になると細胞膜を可溶化し、細胞透過性を亢進さ せ生体に影響を与える。よって、ナノ粒子の分散性を保持するが細胞毒性を示さ ない濃度調整が必要である。先行研究である NEDO プロジェクトで、Triton や Tween を用いて分散剤自体の生体影響も検討した。Triton を 0.2%含んだ溶液を 0.4 ml ラットに注入すると、肺に好中球細胞浸潤が認められたが、一方 0.1%で は、炎症が認められなかった。また、Tween も 0.1%にて好中球細胞浸潤は認めら れなかった。よって Triron や Tween を用いる場合は、濃度を 0.1%以下に抑え ることが重要と考える。

6) その他

一般的に気管内投与試験は、一挙に物質を注入するので、吸入ばく露試験と比 較して肺の炎症を引き起こしやすいと考えられている。しかし、両者を比較する 場合、何かを統一して比較しなければならない。たとえば、物質の肺内保持量が 重量ベースで同一である、つまり気管内投与試験の注入量と吸入ばく露試験の 吸入ばく露終了直後の肺内保持量をそろえて比較すると、本プロジェクトでは、 気管内投与試験の反応が強いか同等であった。酸化ニッケルナノ粒子、酸化チタ ンナノ粒子、酸化セリウムナノ粒子を用いて気管内投与試験と吸入ばく露試験 の肺の炎症を検討した。まず、酸化ニッケルナノ粒子の両試験における 3 日後 の肺内保持量を比較すると、気管内投与試験の低用量(0.2 mg/rat)と吸入ばく 露試験の高濃度(約2mg/m³)がほぼ同等であったことから、両試験の比較をこの 両用量で行った。気管内投与試験における BALF の好中球数、好中球比率、LDH 放 出量、CINC濃度、HO−1濃度の反応量が吸入ばく露試験の反応量よりも同等か高 い傾向にあった。この傾向は、急性期に認められ、慢性期に従い両者の差は縮小 した。Baisch らの報告でも、二酸化チタンナノ粒子の肺内保持量を揃えた気管 内投与試験と吸入ばく露試験の比較では、気管内投与試験で肺の炎症反応が強 く、肺内クリアランスが遅延する傾向を認めている。他にも肺内保持量は揃えて いないが両試験を比較した報告があるが、だいたいこの傾向である。一方で、単

層カーボンナノチューブを用いて両試験を比較した Shvedova らの報告では、む しろ吸入ばく露試験の感度が高いことを示していた。全体的には、気管内投与試 験が bolus effect などにより炎症性が高い傾向ではあるが、報告数としては多 くないので、最終的に結論づけるには、更なる研究の集約が必要となる。

	気管内投与試験	吸入ばく露試験
Bolus effect による 人工的反応	分散性が低いときに認められる 分散性が保持されていても高用量 (1-3 mg/rat)投与で認める	なし
ᄜᆂᄭᆂᇗᆂᇉᆘ	ばく露直後の主病変は小葉中心性	ばく露直後の主病変は小葉中心性
肺内分布の不均一性	分散性が低いとき、気道に病変が集積	但し、一部胸膜付近、全周性の肺胞壁 病変を認める
時からのクリアランフ	高用量で遅延	高用量で遅延
	クリアランスの閾値不明(一部にあり)	クリアランスの閾値あり
	肝臓、腎臓、脾臓、精巣への移行あり	肝臓、腎臓、脾臓、精巣への移行あり
仏暁空。の我に	脳への沈着は軽度か認めない*	脳への沈着あり
「巴加以名子、「〇ノ本多1」	児動物への肝臓DNA損傷なし*	児動物への肝臓DNA損傷あり
	高用量でリンパ節移行遅延あり	高用量でリンパ節移行遅延あり
溶媒や分散剤の影響	0.2%以上の Triton 懸濁液で肺内に 好中球浸潤あり	なし

表②(a) -10 気管内投与試験と吸入ばく露試験の特徴

*:検討の余地あり

森本 泰夫 等 日本衛生学雑誌 (2013) の一部追加修正

気管内投与試験や吸入ばく露試験の特徴を踏まえ、両試験の炎症を中心とし たエンドポイントの類似性と相違性を以下の様にまとめた。

エンドポイント	類似性	相違性	
BALFの総細胞数	ナノ材料のばく露により増加 一部の毒性の高い粒子では増加 (一)	反応の強さ	
BALF の好中球数	ナノ材料のばく露により増加	反応の持続性	
BALF の好中球比率	ナノ材料のばく露により増加	気管内投与≧吸入ばく露	
BALF の 炎症性サイトカイン	ナノ材料のばく露により一過性に 増加	なし	
BALF の CINC 濃度	ナノ材料のばく露により増加	反応の強さ 気管内投与≧吸入ばく露	
BALFのH0−1 濃度	ナノ材料のばく露により増加	反応の持続性 気管内投与≧吸入ばく露	
肺組織の 酸化的 DNA 損傷	有害性の高い一部のナノ材料で 生成・亢進		
ナノ材料の肺からの クリアランス	過剰な投与による半減期の遅延	生物学的半減期 気管内投与≧吸入ばく露	
Morimoto et al.	International Journal of Molecul	ar Sciences(2016)の追加修正	

表②(a) -11 気管内投与試験と吸入ばく露試験の類似性と相違性

3. まとめ

強い炎症能をもつ酸化ニッケルナノ粒子の吸入ばく露試験と気管内投与試 験を行った。両試験において、酸化ニッケルナノ粒子は好中球を中心とした肺 の炎症を認め、特に気管内投与試験では持続炎症を認めた。同様に強い炎症能 を持つ酸化セリウムナノ粒子も同様に吸入ばく露試験と気管内投与試験と行 い、両試験において、持続性炎症を認めた。一方、炎症能の低い酸化チタンナ ノ粒子の吸入ばく露試験と気管内投与試験を行ったところ、吸入ばく露試験で は炎症を示さず、気管内投与試験でも一過性の炎症であった。炎症能の低い酸 化亜鉛ナノ粒子においても、両試験を行い、どちらの試験においても一過性の 炎症を認めるのみであった。気管内投与試験の投与量を過剰(1mg/rat 以下) に投与せず、ある一定の観察期間を設けること(現状では、3ヶ月から6ヶ月)、 肺の持続炎症をエンドポイントとするのであれば、吸入ばく露試験による有害 性ランキングと気管内投与試験の有害性ランキングを一致させることが可能 であることが示唆された。 研究開発項目②初期有害性情報取得のための低コスト・簡便な有害性評価技術 の構築

(b-1) 気管内投与試験の標準化に関する検討:手技の標準化に関する検討 一般財団法人化学物質評価研究機構

1. 目的

本研究開発項目では、ラットを用いた気管内投与試験における標準化が必要 な各手技について、様々な条件で気管内投与試験を実施し、結果を比較するこ とで標準的な投与手法を確立することを目的とした。また、検討結果をまとめ て標準的な気管内投与試験の実施方法を構築するとともに、投与実施者の技能 確認方法を確立し、気管内投与試験の標準的手順書(試案)をとりまとめるこ とを目的とした。

2. 成果

気管内投与試験の試験条件を標準化するため、様々な条件で気管内投与試験 を実施し、試験条件の違いが結果に及ぼす影響を検討した。

はじめに、試験成績に及ぼす影響を適切に比較するため、本研究開発項目で 実施する気管内投与試験の投与時麻酔、投与器具の至適な挿入位置(深度)、投 与器具選定時の留意点及び主要な有害性評価指標である気管支肺胞洗浄液 (BAL 液)の採取法を決定した。

次に、決定した手技を踏まえ、気管内投与試験に用いる媒体の最大投与許容 量を決定した。この許容液量の範囲内でナノ材料分散液の投与液量を変えて、 ナノ材料の肺内における分布及び誘発された炎症反応に及ぼす影響を定量的 に解析して、試験成績に影響しない試験条件範囲を明らかにした。併せて、気 管内投与に汎用される2種類の投与器具の違いが結果に及ぼす影響についても 比較した。また、解剖時に使用する麻酔薬の違いが BAL 液検査成績に及ぼす影 響を検討し、検査成績に影響しない麻酔薬を決定した。これらの検討成果及び 既存文献情報を参照し、気管内投与試験の標準的手順書の試案にとりまとめて 公開した。

気管内投与には一定以上の技術レベルの習得とその確認が不可欠である。そ こで、気管内投与操作における注意すべきポイントを念頭に、気管内投与の成 否を担保する技術レベル確認方法を作成し、気管内投与試験の標準的手順書 (試案)に盛り込んだ。 2.1 試験方法の共通化

2.1.1 投与時麻酔

既存文献において気管内投与時に使用されている麻酔の種類及びその麻酔 が試験成績に及ぼす影響について情報整理した。既存文献では、エーテル、ハ ロタン、イソフルランの吸入麻酔、メトヘキシタール及びケタミンとキシラジ ンの併用による腹腔内麻酔による報告が主流であった。このうち、動物への侵 襲性の低さ、麻酔深度の調節性、汎用性の高さを考慮し、イソフルランを使用 することとした。

2.1.2 投与器具の挿入位置

気管内投与試験に用いる投与器具として、強制経口投与用の一般的な金属製 経ロゾンデ(経ロゾンデ針、以下、経ロゾンデ)及び気管内投与専用ゾンデ (MicroSpraver®、以下、スプレーゾンデ)が使用されている(Sager *et al.*

2008, Lauten *et al.* 2010)。両器具の仕様を表②(b-1)-1に示す。

器具	経ロゾンデ	スプレーゾンデ
商品名及び	経ロゾンデ針、KN-348	MicroSprayer®、IA-1B-R
商品番号		And Allinon
メーカー	夏目製作所	PennCentury
サイズ	口径0.9 mm × 70 mm	口径0.032 mm × 75 mm
特徴	ラット及びマウスの強制経口	投与液は微細粒子状のエアロ
	投与に一般的に用いられる。	ゾルとして噴出される。
	投与液は液体のまま噴出され	
	る。	

表②(b-1)-1 気管内投与器具の仕様

気管内投与試験では、動物の気管内に投与器具を挿入して投与液を直接、肺内に投与し、主に肺における被験物質の有害性を評価する。ラットの肺は右肺と左肺に分かれ、さらに右肺は4つの肺(前葉、中葉、後葉及び副葉、図②(b-1)-1)に分かれており、投与時の投与器具の位置によって投与液の偏りが生じ
ることが懸念された。投与液の偏りは、被験物質の有害性評価指標に影響する 可能性も否定できないことから、最も安定した肺内分散が得られる器具挿入位 置について検討した。



図②(b-1)-1 ラット肺の分葉(原図 毒性病理組織学)

はじめに、ラットの体重と、口角から気管分岐部までの長さ(以下、気道長、 図②(b-1)-2)との関連について調査した。F344/DuCrlCrljラット(以下、F344 ラット、雄20例)を安楽死させた後、胸腔を開き、気管及び気管分岐部を露出 させて、気道長を計測した。その結果、計測したラットの体重は252.7 ± 11.6 g(平均±標準偏差)であり、気道長は6.4 ± 0.19 cm(平均±標準偏差)で あった。



図2(b-1)-2 気道長の計測

上記の結果を考慮し、体重が同等の SD ラット(雌各3例、8~11週齢、体重 235.3~266.5g)を用いて、投与器具先端が口角から4、6及び8 cm となるよ うに経ロゾンデを挿入し、墨汁を気管内投与した。投与直後に安楽死させ、肺 を採取し、肺葉ごとの墨汁の分散性について肉眼的に観察し、スコア化した。 分散スコア法を表②(b-1)-2 に示す。

分散スコア	分散の程度
0	ほとんど墨汁の分散なし
1	割面より中心に墨汁の分散が確認できる
2	割面より中心中枢~末端まで墨汁の分散が確認できる
3	割面より中心~末端まで墨汁の分散が確認できる
4	ほぼ全体へ墨汁の分散が確認できる
5	ほぼ全体が黒色化している

表②(b-1)-2 分散スコア法

その結果、墨汁の肺内分散性は6 cm 挿入時において最も安定し、4 cm 挿入 時及び8 cm 挿入時においては、肺内分散性にばらつきがみられた(図②(b-1)-3)。

以上から、体重約250gのラットを用いた気管内投与試験では、投与器具の 先端がほぼ気管分岐部に相当する位置で投与することにより、各肺葉へ安定し た分散状態が得られることを確認した。気管分岐部より深部で投与すると、投 与器具先端が左右気管支のどちらかに到達し、投与液が偏ってしまうことが懸 念される。また気管分岐部よりも喉頭側で投与すると、投与液が気管内に貯留し、 液滴が気管壁を伝って左右の肺に入る過程で偏りが生じることや、喉頭へ逆流 することが懸念される。気管分岐部で投与すると、吐出された投与液は気管内に とどまることなく、速やかに左右の気管支へ分布するものと考えられ、最も肺内 での分散性が安定するものと考えられる。



図②(b-1)-3 墨汁を気管内投与したときの肺内分散性

2.1.3 投与器具選定時の留意点

経ロゾンデの口径は 0.9 mm であるのに対し、スプレーゾンデの口径は 0.032 mm である (表②(b-1)-1 参照)。さらに、投与液がエアロゾルとして噴出され るよう先端部が加工されているため、スプレーゾンデ使用時には、投与液中の ナノ粒子の凝集状態の変化や目詰まり等によって、ナノ粒子の分散状態や濃度 が変化する可能性が危惧された。そこで、ナノ材料として二酸化チタンを例に、 両器具を通過後の粒径分布を比較した。検討に用いた二酸化チタン P25 の物理 化学特性を表②(b-1)-3 に示す。媒体は、二酸化チタンの分散性に優れるリン 酸ニナトリウム(Disodium phosphate、以下、DSP)2 mg/ml 水溶液を使用した。 また、器具通過が粒径分布に及ぼす影響をより顕著に観察するため、巨大な凝 集粒子を含む投与液(以下、P25 凝集粒子液)と、遠心により凝集粒子を取り 除いた投与液(以下、P25 微細粒子液)の2 種類を用いて検討を実施した。二酸化チタンの粒径分布は、国立研究開発法人産業技術総合研究所ナノ材料研究 部門において動的光散乱粒径評価装置(マルバーン社製 Zetasizer Nano ZS) を用いて測定した。

材料名 (メーカー)	一次 粒子径 ^{a)} (nm)	形状 ^{a)}	表面 処理 ^{a)}	結晶型。	比表面積 ^{a)} (m²/g)	二次 粒子径 ^{b)} (nm)
P25				ルチル/		
(日本アエロ	21	球状	なし	アナターゼ	50 ± 15	113–140 ^{c)}
ジル)				(20:80)		

表②(b-1)-3 検討に用いた二酸化チタンの物理化学特性

a)カタログ及びメーカーからの提供データ

b)国立研究開発法人産業技術総合研究所ナノ材料研究部門で計測した実測値

c) P25 微細粒子液の二次粒子径

両器具通過後のナノ粒子の分散状態を図②(b-1)-4 及び5 に示す。スプレー ゾンデ通過後のP25 凝集粒子液の散乱強度分布及び体積分布において、経ロゾ ンデ通過後に認められた500 nm 以上の粒子が消失することが明らかとなった (図②(b-1)-4)。一方で、P25 微細粒子液(図②(b-1)-5)では、両器具通過後 の粒径分布に顕著な違いは認められなかった。

以上より、P25 凝集粒子液のように大型の粒子を含む分散液では、スプレー ゾンデ使用時に粒径分布が変化する可能性があるため、事前に粒径分布への影響の有無を確認する必要があると考えられた。





2.1.4 BAL 液採取法の共通化

BAL 液検査は、肺毒性評価のための重要な指標である。しかし、BAL 液検査値 は BAL 液採取法による影響を受けやすく、採取法が異なる施設間における結果 の比較は難しい。そこで、作業者間でのばらつきを可能な限り低減させる観点か ら、BAL 液の採取法を規定した。

BAL 液は、肺内に洗浄液を注入し、その洗浄液を回収することにより得られる。 本研究開発項目では、洗浄液として最も一般的である生理食塩水を使用するこ ととした。洗浄方法は、ラットの肺の容積を考慮し、1回当たり7 mlの洗浄液 注入し、肺内の細胞及び非細胞成分を効率的に採取できるよう洗浄を 2 回(合 計 14 ml)実施することとした。洗浄液の注入は、作業者によるばらつきを低減 させるため、注入開始時の液面の高さを 30 cm として静水圧法で行った。標準 BAL 液の採取法を表②(b-1)-4 及び図②(b-1)-6 に示す。

工程	内容
1	放血により安楽死させた動物を仰臥位にし、気管を露出する。
2	気管腹側に切れ目を入れ、ゾンデを挿入し結紮する。
3	注入開始時の液面の高さが 30 cm となるようにシリンジを一定の高さ
	に設置し、シリンジ、工程2のゾンデ及び BAL 液回収用チューブを接
	続する。接続には三方活栓等を使用する。
4	1回目の洗浄としてシリンジから洗浄液7mlを肺に注入する。
5	BAL 液回収用チューブを通してコニカルチューブ等に BAL 液を回収す
	る。
6	工程 4~5 を繰り返して 2 回目の洗浄及び BAL 液回収を行う。

表②(b-1)-4 BAL 液の採取法の共通化

F344 ラット(12~16 週齡、雄 55 匹)を用いて、共通化した BAL 液採取法に従い BAL 液を回収したところ、平均 12.3 ml の BAL 液が得られ、回収率は 88.2%であった。また、共同研究機関である日本バイオアッセイ研究センターにおける回収率も約 90%であった。したがって、共通化した BAL 液採取法は、施設間における BAL 液回収率のばらつきが小さいことから、精度の高い BAL 液採取法であることを確認した。



図2(b-1)-6 BAL 液採取法の共通化

2.2 試験条件の検討

2.1において、本研究開発で実施する気管内投与試験の手技を共通化した。これらを踏まえて、試験条件を変えて気管内投与試験を実施し、試験条件を変えたときの有害性指標に及ぼす影響を検討した。

まず、汎用される二種類の投与器具について、媒体の投与可能な最大許容液量 を決定した。この成果を踏まえて両投与器具について、投与液量の違いが肺炎症 反応及びナノ材料の肺内分布に及ぼす影響を検討した。さらに、解剖時に使用す る麻酔薬の違いが有害性指標に及ぼす影響を比較した。

2.2.1 媒体の最大投与許容液量の検討

一般に気管内投与試験は、投与液は動物の体重1 kg あたり1.0~2.0 mL の液 量範囲で実施されている(Driscoll et al., 2000)。しかしながら、ナノ材料は 液中で徐々に凝集する(OECD 2012)ことが知られているため、目的とする濃度 の投与液の調製が困難であることが予想される。そのような場合は、投与液量を 増やすことにより十分な投与用量を確保することが妥当であるが、最大投与許 容液量を精緻に検討した報告はない。そこで、動物に過剰なストレスとならず、 かつ有害性評価のための検査項目に影響を与えない最大投与許容液量について 検討した。また、気管内投与に汎用される経ロゾンデ及びスプレーゾンデの器具 間では投与時の液の性状(液体及びエアロゾル)が異なることから、それぞれの 器具を用いて最大投与可能液量を検討した。

2.2.1.1 試験方法

二酸化チタンナノ粒子の分散媒として汎用されている DSP 及び精製水を、以下に示す投与液量でラット(F344/DuCrlCrlj、雄 12 週齡)に気管内投与し、投与3 日後に解剖して BAL 液検査を実施した。投与には経ロゾンデ及びスプレーソンデを用い、各液量段階について5 又は6 匹のラットを使用した。なお、投与直後に死亡がみられた液量では、その後の投与及び検査を中止した。

経ロゾンデ: 1.0、2.0、3.0 及び 3.5 mL/kg スプレーゾンデ: 1.0、2.0、2.5 及び 3.0 mL/kg

2.2.1.3 試験成績

経ロゾンデでは 3.5 mL/kg、スプレーゾンデでは 3.0 mL/kg の液量で、投与直後に死亡例がみられ、液量が過剰であると判断した。一方、経ロゾンデ使用時は 3.0 mL/kg まで、スプレーゾンデ使用時は 2.5 mL/kg まで、投与後の一般状態、体重変動及び投与 3 日後の BAL 液検査に著変は認められなかった。

したがって、気管内投与における最大投与許容液量は投与器具によってこと なり、経ロゾンデでは 3.0 mL/kg、スプレーゾンデでは 2.5 mL/kg であることが 明らかとなった。

2.2.2 投与器具、投与液量及び濃度の違いによる影響

2.2.1 において決定した媒体の最大投与許容液量の範囲内で、ナノ材料の投与 用量を固定し、投与液量を変えたときの有害性評価指標への影響を検討した。

2.2.2.1 試験方法

ナノ材料は二酸化チタン(P25)を使用し、投与用量は3.0 mg/kgとした。また、2.2.1の最少液量未満の液量の適用性を評価するため、0.5 mL/kgの液量から検討した。

(1) 肺炎症反応解析

各群5匹のラット(F344/DuCrlCrlj、雄12週齡)に、DSP 2 mg/mL 水溶液に 分散させた4種類の濃度の二酸化チタン P25 を、各群の投与用量が同じになる ように、投与液量を変えて単回気管内投与し、投与3日後に解剖した。各二酸化 チタン投与群には同液量の DSP 2 mg/mL 水溶液を投与する媒体対照群を設定した。二酸化チタンの投与用量は 3.0 mg/kg とし、経ロゾンデでは 0.5、1.0、2.0 及び 3.0 mL/kg、スプレーゾンデでは 0.5、1.0 及び 2.0 mL/kg の液量で投与した。投与 3 日後に、すべての動物をペントバルビタール麻酔下で放血し安楽死させた後、胸腔及び腹腔臓器の肉眼的観察及び BAL 液検査を行った。

(2) 肺葉間分布解析

投与直後及び3日後の肺内二酸化チタン沈着量及び肺葉間分布を検討するため、各群5匹のラットについて、上記と同様の試験群構成(ただし媒体対照群は除く)で気管内投与を行い、投与30分後及び3日後に、動物をイソフルラン麻酔下で腹部大動脈より放血して安楽死させ、肺を採取した。採取した肺を各肺葉

(図②(b-1)-2) に分離し重量を測定後、硝酸/硫酸(1:1(v/v)) 混液を加え、 120°C で 60 分間加熱して組織及び二酸化チタンを溶解させた。その後、高周波 誘導結合プラズマ発光分光分析法(ICP-AES)を用いてチタン量を測定し、各肺 葉における組織重量当たりのチタン濃度(μ g/g)を算出した。なお、各肺葉に おけるチタン量は、無処置動物から採取した肺ホモジネート 0.1 g に 60 μ g の P25 を添加して求めた回収率(平均±標準偏差: 79.5±8%)及び二酸化チタンの 分子量を用いて補正した。また、気管(甲状腺直下から左右肺葉への付着部まで) についても、肺と同様の方法でチタン濃度を測定した。

(1)炎症反応解析及び(2)肺内分布解析に使用した最高濃度(6.0 mg/mL)の P25 投与液の粒度分布を図②(b-1)-7 に示す。その他の濃度についても同様の 粒度分布であり、スプレーゾンデ通過による影響はないことを確認した。



2.2.2.2 試験成績

(1)肺炎症反応

①液量間比較(図2(b-1)-8)

いずれの投与液量においても、二酸化チタン投与による急性炎症反応が誘発 され、BAL 液中の各炎症関連項目である総細胞数、好中球数、総タンパク及び LDH で高値を示した。経ロゾンデでは、投与液量が 0.5~2.0 mL/kg の範囲では、い ずれの項目も同等の値を示したが、3.0 mL/kg では他の液量と比較して統計学的 に有意な低値を示した。スプレーゾンデ使用時は、0.5~2.0 mL/kg の液量範囲 において、BAL 液検査値はいずれの項目でも同等の値を示し、投与液量の違いに よる影響は認められなかった。

媒体対照群については、いずれの投与器具でも投与液量に関連した変化は認 められなかった。



投与3日後のBAL 液検査成績(液量間比較)



投与3日後のBAL 液検査成績(液量間比較)(続き)

②投与器具間比較(図②(b-1)-9)

両投与器具で投与液量が等しい3条件(0.5、1.0及び2.0 mL/kg)における BAL 液検査結果を比較した。

その結果、いずれの投与液量においても BAL 液検査値はほぼ同等であり、投 与器具による影響は明らかでなかった。なお、2.0 mL/kg の総細胞数においてス プレーゾンデ使用時に統計学的に有意な低値が認められたが、他の液量及び項 目では有意な変化は認められなかったため、偶発的な変動と考えられた。



投与3日後のBAL 液検査成績(器具間比較)

(1) 肺葉間分布

①二酸化チタン検出量及び検出率

投与 30 分後及び 3 日後の肺及び気管の二酸化チタン沈着量を表②(b-1)-5 に 示す。

投与 30 分後では、経ロゾンデ使用時に 683.1~787.7 μg(投与量の 92.0~ 104.2%)の二酸化チタンが、スプレーゾンデ使用時に 691.0~771.0 μg(投与 量の 92.1~103.0%)の二酸化チタンが検出された。投与液量及び投与器具に関 連した傾向はみられなかった。

投与3日後では、経ロゾンデでは532.2~584.6 μg(投与量の71.4~78.5%)、 スプレーゾンデでは569.1~598.2 μg(投与量の75.4~79.4%)の二酸化チタ ンが検出され、投与液量及び投与器具に関連した変化は認められなかった。

表②(b-1)-5 投与 30 分後及び 3 日後の 肺及び気管の二酸化チタン沈着量及び検出率

投与30分後							
投与器具		経口と	ノンデ		スプレーゾンデ		
投与液量[mL/kg]	0.5	1.0	2.0	3.0	0.5	1.0	2.0
検出量[μg]	783.7 ± 45.7	683.1 ± 25.7	688.4 ± 53.5	735.1 ± 46	771 ± 84.2	753.5 ± 36.4	691 ± 111.7
検出率[%]	104 ± 7.3	92 ± 2.6	93.4 ± 7.3	98.2 ± 6.9	103 ± 13.6	101 ± 3.5	92.1 ± 13.3
投与3日後							
投与器具		経口:	ノンデ			スプレーゾンデ	
投与液量[mL/kg]	0.5	1.0	2.0	3.0	0.5	1.0	2.0
検出量[μg]	584.6 ± 29.9	532.2 ± 32.2	547.9 ± 44.1	578.7 ± 27.9	582.9 ± 37.9	569.1 ± 11.2	598.2 ± 46
検出率[%]	78.5 ± 1.8	71.4 ± 4.7	73.6 ± 4.7	78.3 ± 2.9	78 ± 6.6	75.4 ± 2.4	79.4 ± 2.8

②液量間比較(図2(b-1)-10)

経ロゾンデ使用時における、投与30分度の肺葉内チタン濃度は、いずれの投 与液量においても顕著な違いはみられなかった。しかし、気管におけるチタン濃 度は0.5 mL/kg で他の液量と比較して有意な高値を示した。

スプレーゾンデ使用時は、投与 30 分後の後葉チタン濃度は 0.5 mL/kg において 2.0 mL/kg と比較して有意な高値を示した。しかし、他の葉では関連する変化は認められなかったため、偶発的変化と考えられた。

投与3日後では、各肺葉内チタン濃度に投与液量に関連した変動は認められ なかった。また、気管におけるチタン濃度も液量に関わらず同等であった。



図②(b-1)-10 投与 30 分後及び 3 日後の各投与器具における 肺葉及び気管内二酸化チタン濃度(液量間比較)

③器具間比較(図2(b-1)-11)

投与 30 分後の肺葉内チタン濃度について、投与器具間で顕著な差は認められ ず、投与器具特有の傾向も認められなかった。一方、気管濃度については、スプ レーゾンデ使用時に高値又は高値傾向を示した。

投与3日後では、1.0 mL/kg の副葉濃度を除き、すべての試験条件で肺葉内チ タン濃度に顕著な差は認められなかった。副葉濃度についても、0.5 及び 2.0 mL/kg の液量において同様の傾向が認められなかったため、偶発的な変動と考え られた。一方、気管濃度については、スプレーゾンデ使用時に高値又は高値傾向 を示した。



肺葉及び気管内二酸化チタン濃度(器具間比較)

2.2.2.3 まとめ

肺炎症解析結果より、投与器具に関わらず 0.5~2.0 mL/kg の液量範囲で は、同等の急性炎症反応を誘発することが可能であることが明らかとなった。 ただし、経ロゾンデを用いて 3.0 mL/kg の液量で投与すると、炎症反応が減弱 し、定量的評価に影響する可能性が示唆された。各試験条件における肺及び気 管の二酸化チタン沈着量は同等であったことから、本試験条件下では、投与液 の消化管への逆流による影響はほとんどなかったものと考えられる。

各試験条件における二酸化チタンの肺内分布はほぼ同等であり、投与液をエ アロゾル状に噴霧するスプレーゾンデを使用することで顕著な分布の変化は認 められなかった。なお、スプレーゾンデ使用時は気管におけるナノ材料の沈着 が増すことが示唆されたが、急性期の BAL 液検査結果には影響しなかったこと から、有害性評価における影響は不明であった。

以上より、いずれの投与器具を用いても、投与液量が 0.5~2.0 mL/kg の範囲であれば、定量的に同等の結果が得られることが明らかとなった。

2.2.3 解剖時麻酔の違いによる影響

BAL 液検査は肺内の細胞成分及び液性成分を解析することで、肺の炎症反応を 簡易かつ鋭敏に定量的な評価をすることが可能な検査法であり、特にナノ材料 の呼吸器毒性評価に広く活用されている(ENV/JM/MON0 14, 2012)。BAL 液は通 常、動物を麻酔下で安楽死させ、肺に洗浄液を注入して採取する。そのため、解 剖時麻酔は BAL 液検査結果に影響を及ぼさないものを選択する必要がある。

過去の動物実験ではペントバルビタールの腹腔内麻酔が汎用されていたが、 鎮痛作用が十分でなく、近年では動物愛護上、使用が控えられる傾向にある。そ こで鎮痛作用が強く、操作性に優れ、動物実験に汎用されているイソフルラン並 びに鎮静鎮痛薬のメデトミジン、催眠鎮静薬のミダゾラム及び鎮痛薬のブトル ファノールの併用による三種混合麻酔の適用性について検討した。なお、三種混 合麻酔は実験動物における使用実績が少ないため、適切な薬剤の用量が規格化 されておらず、ラットにおける推奨用量として複数の情報が存在した。そこで、 三種混合麻酔の用量の違いについて検討した。

2.2.3.1 試験方法

①麻酔薬

使用した麻酔薬の詳細を表②(b-1)-6 に示す。三種混合麻酔に使用する薬剤 の用量は国立大学法人東北大学動物実験センターの資料

(http://www.clar.med.tohoku.ac.jp/welfare-3R.html、以下「三種混合麻 酔①」という)及び国立国際医療研究センターの資料 (http://www.rincgm.jp/department/lab/08/、以下「三種混合麻酔②」という)を参照した。

麻酔薬		制件一	机片奴败	投与用量	
		表担儿	权子在的	又は濃度	
ペントバル	レビタール	共立製薬株式会社	腹腔内	50.0 mg/kg	
	- 	ᄀᆿᄼᆧᅠᄲᆠᅀᄮ	nT4 74	3.5%、	
1 7 7 10 7			吸入	約4分間	
		日本全薬工業		0.15 //	
- 15 10 A	メナトミンノ	株式会社		U. IU IIIg/Kg	
二性花石	ミダゾラム	サンド株式会社	腹腔内	2 mg/kg	
MARET U	ブトルファノール	Meiji Seika ファルマ		0 Г /І	
		株式会社		Z. J IIIg/Kg	
		日本全薬工業		0.075 //	
三種混合 麻酔②	メナトミンク	株式会社		0.375 mg/kg	
	ミダゾラム	サンド株式会社	腹腔内	2 mg/kg	
		Meiji Seika ファルマ			
	フトルファノール	株式会社		∠.၁ mg∕Kg	

表②(b-1)-6 麻酔薬の種類、製造元、投与経路及び用量・濃度

②ナノ材料及び媒体

ナノサイズ酸化ニッケル(US3352)を用いて、1.98 mg/mLの酸化ニッケル懸 濁液(媒体:精製水)を産業技術総合研究所ナノ材料研究部門にて調製した。 気管内投与試験に用いた酸化ニッケルの基本的情報を表②(b-1)-7 に、投与液 の粒度分布を図②(b-1)-12 に示す。

メーカー	一次 粒子径 (nm)	比表面積 (m²/g)	投与液中 粒子径 (nm)	形状	表面 修飾	結晶型
US Research	18	6 67	70 03	やや	1	NaCl
Nanomaterials	10	0.07	70.00	方形	m C	型

表②(b-1)-7 気管内投与試験に用いた US3352 の基本的情報

表中の情報は、メーカー又は産総研ナノ材料研究部門より提供



③動物、試験群構成及び試験方法

試験群構成を表②(b-1)-8 に示す。F344/DuCrICrIj ラット(雄、12 週齡)を 用いて、気管内投与を行った。投与にはスプレーゾンデを使用し、投与液量は1.0 mL/kg とした。投与3日後に各麻酔下にて腹部大動脈より放血して安楽死させ、 BAL 液検査を実施した。また、投与は実施せず、各麻酔下で放血して安楽死させ て BAL 液を採取する無処置群を設定した(三種混合麻酔②については無処置群 のみ)。

試験利	動物数	投与用量 (mg/kg)	
	無処置群	5	-
ハフトハルビダール	媒体対照群	5	0
が作用十	酸化ニッケル群	5	2.0
	無処置群	5	-
イソフルフノ	媒体対照群	5	0
が作用十	酸化ニッケル群	5	2. 0
	無処置群	5	-
三種混合麻酔①	媒体対照群	5	0
	酸化ニッケル群	5	2.0
三種混合麻酔②	無処置群	5	_

表2(b-1)-8 試験群構成

2.2.3.2 試験成績(図②(b-1)-13)

①無処置群

三種混合麻酔②の総蛋白がイソフルラン使用時と比較し有意な高値を示した。 また、三種混合麻酔②のアルブミンが他の全ての麻酔薬と比較して有意な高値 を示した。

②媒体対照群

三種混合麻酔①のアルブミンが、ペントバルビタール及びイソフルラン使用 時と比較して有意な高値を示した。また、三種混合麻酔①の総蛋白が高値傾向を 示した。

③酸化ニッケル投与群

いずれの項目にも統計学的有意差は認められなかった。



図②(b-1)-13 酸化ニッケル投与3日後のBAL 液の生化学検査結果

2.2.3.3 まとめ

解剖時麻酔薬の違いが BAL 液検査結果に及ぼす影響を検証するため、酸化ニッケルの気管内投与試験において、ペントバルビタールのほか、イソフルラン、2 用量の三種混合麻酔を用いて放血して安楽死させ、採取した BAL 液検査結果を 比較した。

その結果、媒体対照群において、三種混合麻酔①でアルブミンが有意な高値を 示し、アルブミンと同じく血管透過性の指標である総蛋白も高値傾向を示した。 三種混合麻酔①におけるアルブミンの媒体対照群との差はは 19~20 µg/mL で あり、総蛋白の媒体対照群との差とほぼ同等であったことから、総蛋白の増加傾 向はアルブミンの増加を反映したものであると考えられた。無処置群では、三種 混合麻酔①でアルブミンに有意な高値は認められなかったが、よりメデトミジ ン濃度が高い三種混合麻酔②において顕著なアルブミンの高値がみられた。メ デトミジンはアドレナリン α2 受容体作動薬であり、一過性に血圧を上昇させる ことが知られている(Ruskoaho H *et al*, 1989)。本検討では血圧を測定してい ないが、血圧が上昇したため、肺胞中に血中アルブミンが漏出した可能性が考え られる。

一方、酸化ニッケル投与群では三種混合麻酔によるアルブミンの変動は明ら かでなく、酸化ニッケル投与により誘発された炎症反応を反映していずれの麻 酔薬でも媒体対照群と比較して統計学的に有意な高値を示した(p<0.01, ttest)。しかしながら、三種混合麻酔①の媒体対照群と酸化ニッケル群との統計 学的解析の結果、アルブミンの p 値はペントバルビタール及びイソフルランと 比較して約 6.0×10³~1.0×10⁵ 倍程度となり、被験物質により誘発された炎症 反応を適切に評価できない可能性が示唆された。したがって、三種混合麻酔によ る BAL 液検査の評価については慎重な判断が必要であると考えられた。

2.3 気管内投与技能確認法

気管内投与試験における投与操作は、気管への投与器具の挿入、挿入深度の 調節など注意すべきポイントが複数あり、投与者の技能が未熟で、気管内投与 操作が不適切であれば、被験物質の肺有害性を適切に評価できないことが懸念 される。また、不適切な実験操作は動物愛護上望ましくない。そのため、各実 施施設において、一定の投与技能を有しているか否かの判定法が必要である。

表②(b-1)-9 に、気管内投与操作における投与過誤要因に着目した気管内投 与技術者の技能確認方法を示す。技能確認法は、可能な限り必要動物数を削 減することを念頭に、動物の解剖を必要とせず、投与器具の気管内への挿入 及び投与操作の習熟度を高めることを目的とした第一段階と、色素液や毒性 が既知のナノ材料を気管内投与し、解剖して投与の成否を目視や炎症反応を 指標に判断する第二段階で構成した。技能確認方法の各項目を達成できた技 術者は、安定した気管内投与技術を習得したと判断できる。

	技能項目	技能確認法
第一段階	喉頭鏡操作に関する技能	・ 喉頭の解剖学的構造を理解するととも
(解剖不要)		に、喉頭鏡を用いて器具挿入箇所(喉頭
		ロ)を視認できる。
	投与操作に関する技能	・ 喉頭鏡を用い、喉頭口及びその周囲から
		の出血を伴わずに投与器具を気管内に挿
		入できる。
		・ 投与器具を適切な深さまで挿入し、保持
		可能である。
		 ・ 投与器具により気管軟骨を触知できる。
		・ 媒体等を投与し、投与直後に一定時間の
		呼吸停止及びその後の湿性ラッセル音を
		聴取可能である。
		 ・投与後に投与器具への血液付着がない。
		・ 動物が麻酔から覚醒する前に、保定、投
		与器具挿入、投与及び抜去までの操作を
		速やかに実施できる。
第二段階	投与操作に関する技能	・ 喉頭への逆流なく投与液を投与可能で
(解剖必要)	(投与液分布)	ある。
		 ・ 色素液等を投与後に解剖し、投与液が左
		右の肺へ分布していることが確認でき
		る。
	投与操作に関する技能	・生体影響を誘発しないことが既知の媒
	(炎症反応)	体等を投与し、異常が認められないこと
		が BAL 液検査等により確認される。
		 有害性が既知の物質を投与し、同等の変
		化が誘発されていることが BAL 液検査等
		により確認される。

表②(b-1)-9 気管内投与技術者の技能確認方法

3. まとめ

本研究開発において、試験条件の違いが試験成績に及ぼす影響を明らかにす るため、様々な条件で気管内投与試験を実施し、基礎的情報を蓄積した。これら の成果及び他の文献情報、並びに研究開発項目②(b-2)気管内投与試験の標準化 に関する検討:単回投与と複数回投与の比較検討(日本バイオアッセイ研究セン ターにて実施)の成果を踏まえて、標準的な気管内投与試験の実施方法を構築す るとともに、手順書の試案にとりまとめて公開した。また、投与操作は、気管へ の投与器具の挿入、挿入深度の調節など注意すべきポイントが複数あり、投与者 の技能が未熟で、気管内投与操作が不適切であれば、被験物質の肺有害性を適切 に評価できないことが懸念される。そのため、各実施施設において、一定の投与 技能を有していることを検証する技能確認方法についても記載した。

手順書(試案)の構成は以下の通りである。

I. はじめに

本手順書(試案)の成り立ち、ナノ材料の有害性評価における気管内 投与試験の位置づけ及び課題並びに手順書(試案)の概要について記載 した。

- II. 気管内投与試験の概要及び考慮すべき事項 気管内投与試験の一般的な情報及び本手順書(試案)における前提条 件について記載した。
- III. 試験方法

試験の実施手順に沿って以下の項目の留意点、設定条件の範囲について記載した。また、既存文献情報、汎用性等を考慮し、各項目の推奨 条件について記載した。

- 1 動物の選択
- 2 飼育環境
- 3 投与液調製
- 4 用量
- 5 投与器具の選択
- 6 投与
- 7. 観察期間及び観察頻度
- 8. 観察項目
- 9. 解剖時麻酔法、BAL 液採取法及び病理組織学的検査

IV. 投与技能確認について

安定した試験成績を得るため、気管内投与技術者の技能習得要件の ポイント及び技能確認方法について記載した。

V. まとめ(推奨試験方法)

試験方法の各項目における留意点を踏まえ、推奨される試験条件についてまとめて記載した。

4. 参考文献

- Lauten EH, VerBerkmoes J, Choi J, Jin R, Edwards DA, Loscalzo J, Zhang YY (2010). Nanoglycan Complex Formulation Extends VEGF Retention Time in the Lung. Biomacromolecules 11: 1863-1872.
- Pritchard JN, Holmes A, Evans JC, Evans N, Evans RJ, Morgan A (1985). The distribution of dust in the rat lung fllowing administration by inhalation and by single intratracheal instillation. Enviom. Res. 36: 268-297.
- Sager TM, Kommineni C, Castranova V (2008). Pulmonary response to intratracheal instillation of ultrafine versus fine titanium dioxide: Role of particle surface area. Part. Fibre. Toxicol. 5: 17.
- Driscoll KE, Costa DL, Hatch G, Henderson R, Oberdörster G, Salem H, Schlesinger RB (2000). Intratracheal instillation as an exposure technique for the evaluation of respiratory tract toxicity: Uses and limitations. Toxicol. Sci. 55, 24-35.
- Ruskoaho H, Leppäluoto J (1989). The effect of medetomidine, an alpha 2-adrenoceptor agonist, on plasma atrial natriuretic peptide levels, haemodynamics and renal excretory function in spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. British journal of pharmacology 97 125-132.
- Organisation for Economic Co-operation and Development. (2012) GUIDANCE ON SAMPLE PREPARATION AND DOSIMETRY FOR THE SAFETY TESTING OF MANUFACTURED NANOMATERIALS. Series on the safety of manufactured nanomaterials No. 36. ENV/JM/MONO 40.
- 東北大学実験動物センター. 動物実験に用いられる代表的な麻酔薬と鎮痛薬 補遺 6 http://www.clar.med.tohoku.ac.jp/welfare-3R.html
- 独立行政法人国立国際医療センター動物実験施設. マウス・ラット推奨麻酔薬 (三種混合麻酔) http://www.rincgm.jp/department/lab/08/

研究開発項目②初期有害性情報取得のための低コスト・簡便な有害性評価技術 の構築

(b-2)気管内投与試験の標準化に関する検討:単回投与と複数回投与の比較 検討

日本バイオアッセイ研究センター

1. 目的

気管内投与試験の標準化のため、投与回数を単回から複数回に変えた気管内 投与試験を実施し、結果を比較検討することによって、気管内投与試験の標準 的手法として適切な投与回数を検討する。気管内投与試験の標準的手法として 適切な投与回数に関する見解をとりまとめ、研究開発項目②(b-1)による標 準的手順書の試案に含めて公開する。

2. 成果

成果 2.1 から 2.7 項は、平成 23~27 年度に実施した以下の検討試験につい てまとめた。

<気管内投与試験の標準的手法として適切な投与回数に関する検討>

- 2.1 二酸化チタンを用いた単回投与と複数回投与の比較検討
- ・二酸化チタンナノ粒子を用いた気管内投与試験の標準化に関する検討(単 回投与と複数回投与の比較検討)<試験-1>(H23年度)
- ・二酸化チタンナノ粒子を用いた単回投与と複数回投与後の観察期間の統一
 に関する検討<試験-2>(H24 年度)
- ・二酸化チタンナノ粒子を用いた気管内投与回数による各肺葉の分布の差異 に関する検討<試験-3>(H27 年度)
- 2.2 酸化ニッケルを用いた単回投与と複数回投与の比較検討
- ・酸化ニッケルナノ粒子を用いた気管内投与試験の標準化に関する検討(単 回投与と複数回投与の比較検討)<試験-4>(H25年度)
- ・酸化ニッケルナノ粒子を用いた気管内投与回数による各肺葉の分布の差異 に関する検討<試験-5>(H27 年度)

2.3 多層カーボンナノチューブを用いた単回投与と複数回投与の比較検討
 ・多層カーボンナノチューブを用いた単回投与と複数回投与による肺有害性の差異に関する検討及び肺沈着量と分布に関する検討<試験-6>(H26 年度)

<気管内投与試験と既存吸入暴露試験結果の比較>

2.4 多層カーボンナノチューブを用いた単回投与と複数回投与による肺有 害性の差異に関する検討及び肺沈着量と分布に関する検討<試験-7> (H27年度)

2.5 動物系統の違いによる生体反応の差異の検討<試験-8>(H24 年度)

2.6 肺組織標本作製方法の統一化の検討<試験-9>(H27年度)

2.7 病理組織診断検討会の実施(H27年度)

2.1 二酸化チタンを用いた単回投与と複数回投与の比較検討<試験-1、2、3> 雄F344 ラットに、二酸化チタン(TiO₂)ナノ粒子を単回から複数回に分けて 気管内投与した。気管支肺胞洗浄液(BALF)の検査、血液学的検査、血液生化 学的検査、病理学的検査(肉眼的観察、器官重量測定及び病理組織学検査)を 実施し、気管内投与回数の違いによる肺有害性の差異、及び観察期間の違いが 肺有害性に及ぼす影響について検討を行った。また、投与回数による各肺葉の 分布の差異を検討するために、各肺葉におけるTiO₂沈着量の測定を実施した。

2.1.1 試験材料

2.1.1.1 被験物質及び媒体

被験物質として、TiO₂ナノ粒子は P25(日本アエロジル(株))を使用した。
 TiO₂ 懸濁液(媒体:2 mg/ml リン酸ニナトリウム水溶液(DSP))は、産業技術総合研究所・ナノ材料研究部門で調製(10 mg/ml、5 mg/ml、3.3 mg/ml、2.5 mg/ml)
 し、日本バイオアッセイ研究センターに供給された。使用した TiO₂ナノ粒子の
 性状等を表②(b-2)-1に示す。

TiO2含有量	: < 99.5 %	比表面積(BET)	$: 50 \pm 15 \text{ m}^2/\text{g}$
性状	:白色粉末	融点	:約 1850 ℃
平均一次粒子径	: 21 nm	見かけ密度	:約130 g/L

表②(b-2)-1 使用した TiO₂ ナノ粒子(P25)の性状等

2.1.1.2 試験動物及び飼育条件

雄 F344 ラット(F344/DuCrlCrlj)(日本チャールス・リバー(株)、厚木飼育 センター)を生後 11 週齢で導入した。動物は、飼育期間を通して温度:23±2℃、 湿度:55±15%、明暗サイクル:12時間点灯(8:00~20:00) / 12時間消灯(20:00 ~8:00)の環境下のバリアシステム内で飼育した。飼料として CRF-1 固型飼料 (30 kGy-γ線照射滅菌、オリエンタル酵母工業(株))を自由摂取させた。ま た、飲水は市水をフィルターろ過した後、紫外線照射し、自動給水ノズルから 自由摂取させた。なお、ラットの投与時の週齢は 12 週齢とした。

2.1.2 試験方法

2.1.2.1 群構成及び投与

TiO₂を10 mg/kgの用量で1回投与、その1/2量(5 mg/kg)を2回投与、1/3 量(3.3 mg/kg)を3回投与、1/4量(2.5 mg/kg)を4回投与する群を設けた (各群の総投与量:10 mg/kg)。また、TiO₂の投与回数に合わせ、媒体のみを 投与する群(媒体対照群)を設けた。投与方法はイソフルランの吸入による麻 酔下(2~3%)で、TiO₂懸濁液をスプレー式ゾンデ(MicroSprayer、Penn-Century 社、IA-1B-R)を用いて、気管内に投与した。複数回投与は隔日投与(2日に1 回)とし、1匹当たりの投与液量は1 ml/kgとした。

2.1.2.2 観察及び検査

各検査及び測定項目を表②(b-2)-2 に示す。2.2 項以下の各検討試験においては、原則として同じ項目の検査及び測定を行った。 <試験-1>

投与開始後 91 日目(13 週)まで飼育し、一般状態の観察、体重測定を実施 した。最終投与後 3 日目と投与開始後 28 日目に、BALF 検査を実施した。また、 投与開始後 28 日目と 91 日目に、血液学的検査、血液生化学的検査、器官重量 測定及び呼吸器を中心とした病理組織学的検査を実施した(図②(b-2)-1)。 <試験-2>

28 日目解剖動物の最終投与から解剖までの観察期間の相違(最長6日間:4 回投与)が、検査結果に影響を及ぼすか否かを検証するために、最終投与から 解剖までの観察期間を各群とも最終投与後28日に揃え、試験-1の28日目と同 じ検査項目について結果を比較した(図②(b-2)-2)。

<試験-3>

気管内投与回数による各肺葉の分布の差異を検討するために、最終投与後4 時間目、1日目、7日目、及び28日目、並びに投与開始後91日目に各肺葉に おける TiO2 沈着量の測定を実施した (図②(b-2)-3)。

項目	検査・測定項目等
一般状態観察	一般状態の詳細観察及び体重測定を投与期間中は毎日、そ
体重測定	れ以降は週1回実施した。
	イソフルラン吸入麻酔(2~3%)下で腹大動脈より放血し、 安楽死させた。BALF 採取は、生理食塩水7mlを肺に注入 後自然落下により回収し、この操作を2回繰り返した(計
液(BALF)検査	 14 ml)。 <細胞検査> 総細胞数、細胞分類(マクロファージ、好中球、リンパ球、その他) <生化学検査> 総蛋白、アルブミン、LDH、ALP、γ-GTP
血液学的検査	腹大動脈より EDTA-2 カリウム入り採血管に採血した全血 及び 3.8 %クエン酸ナトリウム入り採血管に採血した血液 を遠心分離し、得られた血漿を用いて検査を実施した。 <検査項目> 赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリ ット値、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球ヘモグロビン 量(MCH)、平均赤血球ヘモグロビン濃度(MCHC)、血小 板数、網赤血球比、プロトロンビン時間(PT)、活性化部 分トロンボプラスチン時間(APTT)、白血球数、白血球分 類
血液生化学的 検査	ヘパリンリチウム入り採血管に採血した血液を遠心分離 し、得られた血漿を用いて検査を実施した。 <検査項目> 総蛋白、アルブミン、A/G 比、総ビリルビ ン、グルコース、総コレステロール、トリグリセライド、 リン脂質、AST、ALT、LDH、ALP、γ-GTP、CK、尿素窒素、 クレアチニン、ナトリウム、カリウム、クロール、カルシ ウム、無機リン、総胆汁酸
器官重量測定	肝臓、腎臓、肺、脾臓、脳(実重量及び比重量)

表②(b-2)-2 各検査及び測定項目

項目	検査・測定項目等
	10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定した臓器を、パ
	ラフィン包埋、薄切、ヘマトキシリン・エオジン染色を行
店 田組織学的	い、光学顕微鏡により検査した。肺についてはシリウスレ
	ッドまたはマッソン・トリクローム染色標本を作製し、線
	維化病変を精査した。
	<観察臓器・組織> 肝臓、腎臓、肺、脾臓、脳、肺関連
	リンパ節(後縦隔リンパ節、傍胸腺リンパ節)
	① サンプルの採取:イソフルラン吸入麻酔(2~3%)下で、
	放血(腹大動脈)し、安楽死させた。肺を摘出し、肺5葉
	(前葉、中葉、後葉、副葉、左葉)及び気管(気管支を含
	む)に切り分けて各重量を測定した。肺と気管は 10%中性
	リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定した。
	在 ② ●
	[₩] (3 (4) 5
	⑤左葉 ⑥気管
	 節中 Ti02 及び Ni0 沈着量の測定:肺5葉及び気管に酸
	(Ti:硫酸、硝酸 Ni:過塩素酸、フッ酸)を加えて加熱
	溶解し、試料中の Ti 及び Ni を定量することにより、各肺
师沉着重測定	葉における TiO2濃度及び NiO 濃度を算出した。測定は、原
	子吸光を用いて行った。
	③ 肺中の MWCNI 沈着量測定:日本バイオアッセイ研究セ
	ンター・大西ら(2013)の開発した方法を用いて実施した。
	すなわち、10%中性リン酸緩衝ホルマリン液で処理した谷
	サンブルを、Clean 99-K200(クリーンケミカル(株))に
	より溶解し、Iween 溶液(0.1 % Iween80 + 0.96 % PBS 水
	溶液)で洗浄後、濃硫酸により残倉を分解した。その試料
	に Iween 溶液を加え、マーカー溶液 (Benzo [gh I] per y lene)
	を添加して 15 分間撹拌した。その溶液をフィルターろ過
	し、残准の MWUNI から吸着したマーカーをアセトニトリル
	を用いて抽出し、その後高速液体クロマトクラフ(検出
	器:宙光検出器)にて MWCNI を測定した。

表②(b-2)-2 各検査及び測定項目(前頁続き)







2.1.3 結果

試験-1~3をまとめて記述する。

2.1.3.1 一般状態観察及び体重推移(試験-1, 2, 3)

一般状態の観察では、すべての投与群に著変は認められなかった。

体重は、媒体対照群及びTiO₂投与群とも、投与翌日にごく僅かな体重減少が みられたが一過性の変化であり、投与回数の違いによる顕著な差は認められな かった。

2.1.3.2 BALF 中の細胞検査(試験-1, 2)

試験-1の最終投与後3日目及び投与開始後28日目の総細胞数と好中球数の 結果を図②(b-2)-4に示す。総細胞数と好中球数では、最終投与後3日目に顕 著な反応が認められた。各投与回数とも媒体対照群に比べ増加を示し、反応の 程度は、概ね、単回と2回投与が最も強く、投与回数の増加に伴い減弱した(1 回投与≒2回投与>3回投与>4回投与)。また、マクロファージ数は1回投与 でのみ増加を示し、好酸球数は1回と2回投与で増加を示した。なお、リンパ 球数は各投与回数とも増加を示したが、投与回数には対応していなかった。投 与開始後28日目では、各測定項目とも3日目と比較して減少した。好中球数 は1回~4回投与で、総細胞数とマクロファージ数は2回投与のみ、リンパ球 数は2回~4回投与で有意な増加を示し、僅かに炎症反応が持続していること が示された。なお、試験-1と2の28日目の検査時期の比較では、顕著な差は 認められなかった。



図②(b-2)-4 BALF 中の細胞検査(総細胞数及び好中球数) (* p<0.05, ** p<0.01:対媒体対照群 # p<0.05, ## p<0.01:対1回投与群)

2.1.3.3 BALF の生化学検査

試験-1の最終投与後3日目及び投与開始後28日目の総蛋白とLDHの結果を 図②(b-2)-5に示す。総蛋白、アルブミン、LDH、ALP及びγ-GTPでは、最終投 与後3日目に顕著な反応が認められた。各投与回数とも媒体対照群に比べ増加 を示し、反応の程度は、概ね、単回投与が最も強く、投与回数の増加に伴い減 弱した(1回投与>2回投与>3回投与≒4回投与)。なお、ALPでは4回投与で の増加はみられなかった。投与開始後28日目では、各測定項目とも3日目と 比較して顕著に減少した。総蛋白は2回~4回投与で、LDHは2回投与と3回 投与で有意な増加を示し、僅かに炎症反応が持続していることが示された。な お、試験-1と2の28日目の検査時期の比較では、顕著な差は認められなかっ た。



図②(b-2)-5 BALF 中の生化学検査(総蛋白及びLDH) (* p<0.05, ** p<0.01:対媒体対照群 # p<0.05, ## p<0.01:対1回投与群)

2.1.3.4 血液学的検査及び血液生化学的検査

各試験(試験−1, 2)とも、TiO₂投与による毒性学的に意義があると考えられる変化は認められなかった。

2.1.3.5 肉眼的観察

各試験(試験−1, 2, 3)とも、TiO₂投与によると考えられる変化は認められ なかった。

2.1.3.6 器官重量(試験-1, 2)

試験-1の投与開始後28日目及び91日目の肺重量の結果を図②(b-2)-6に示 す。投与開始後28日目では、媒体対照群と比較して肺の実重量と比重量が高 値であったが、投与回数による差は認められなかった。試験-2の最終投与後 28 日目には、投与回数の増加により僅かに低下する傾向が認められたが、明確 な差ではなかった。

試験-1 において、91 日目では、肺の実重量と比重量とも媒体対照群及び投 与回数による差は認められなかった。なお、肺以外の臓器重量に変化は認めら れなかった。



(* p<0.05, ** p<0.01: 対媒体対照群)

2.1.3.7 病理組織学的検査

試験-1 と 2 における、TiO₂ 投与群の病理組織学的検査結果を表②(b-2)-3 に、 病理組織像を図②(b-2)-7 に示す。投与開始後 28 日目において、肺では肺胞腔 内に TiO₂ を貪食したマクロファージの出現、肺胞腔内、肺胞壁及び気管支関連 リンパ組織(BALT)に TiO₂粒子の沈着が認められ、軽度の肺胞 II 型上皮細胞の 過形成が認められる例もあった。また、肺関連リンパ節(後縦隔リンパ節、傍 胸腺リンパ節)においても TiO₂粒子の沈着が認められた。最終投与後 28 日目 は、投与開始後 28 日目とほぼ同様の変化が認められ、各所見の出現頻度は投 与回数による差はみられなかった。

試験-1の91日目では、28日目にみられた所見に加え、脾臓にわずかであるが TiO₂粒子の沈着が認められる例もみられ、時間経過とともに TiO₂の他臓器 への移行が示された。また、各所見の出現頻度は投与回数による差はみられず、 肺の線維化病変や肉芽性変化は認められなかった。

表②(b-2)-3 TiO2投与群の病理組織学的検査結果

<投与開始後28日目(試験-1)>

· 中学	所 見 / 〈検査動物数〉	1回投与	2回投与	3回投与	4回投与
加戰 石合		<10>	<10>	<10>	<10>
	TiO₂沈着(マクロファージ貪食)	10	10	10	10
	TiO2沈着(肺胞腔内)	10	10	10	9
肺	TiO2沈着(胞腔壁)	10	10	10	10
	TiO ₂ 沈着(BALT)	10	10	10	10
	肺胞Ⅱ型上皮細胞の過形成	3	3	3	4
肺関連	Tin 冲差	10	10	10	10
リンパ節	□ □ □ <u>2</u> <i>1/</i> L /目	10	10	10	10

<最終投与後28日目(試験-2)>

	〈検査動物数〉	<10>	<10>	<10>	<10>
肺	TiO₂沈着(マクロファージ貪食)	10	10	10	10
	TiO2沈着(肺胞腔内)	10	10	10	10
	TiO2沈着(胞腔壁)	10	10	10	10
	TiO ₂ 沈着(BALT)	10	10	10	10
	肺胞Ⅱ型上皮細胞の過形成	0	1	1	1
肺関連 リンパ [°] 節	TiO₂沈着	10	10	10	10

<投与開始後91日目(試験-1)>

	〈検査動物数〉	<5>	<5>	<5>	<5>
肺	TiO₂沈着(マクロファージ貪食)	5	5	5	5
	TiO2沈着(肺胞腔内)	5	5	5	5
	TiO2沈着(胞腔壁)	5	5	5	5
	TiO ₂ 沈着 (BALT)	5	5	5	5
	肺胞Ⅱ型上皮細胞の過形成	5	5	4	5
肺関連	Ti0 油美	5	5	5	5
リンパ節	I U <u>2</u> / 儿 / 目 				
脾臓	TiO ₂ 沈着	2	4	4	4



- 図②(b-2)-7 試験-1 における TiO₂ 投与群の病理組織像
- (a) 肺: TiO₂の沈着(1回投与,投与開始後28日目) マクロファージに貪食された TiO₂ H&E 染色 Bar:50μm
- (b)肺:TiO2の沈着(4回投与,投与開始後28日目) マクロファージに貪食されたTiO2 H&E 染色 Bar:50μm
- (c)縦隔リンパ節: Ti02の沈着(4回投与,投与開始後91日目) マクロファージに貪食された Ti02 H&E 染色 Bar:25μm
- (d) 脾臓: Ti 0₂ の沈着(白矢印)(4回投与,投与開始後91日目) H&E 染色
 Bar:25 μ m

2.1.3.8 肺中の TiO₂沈着量及び各肺葉の分布(試験-3)

試験-3 における、肺中 TiO₂ 沈着量とその推移を表②(b-2)-4、及び図② (b-2)-8 に示す。最終投与後 4 時間目の TiO₂ 沈着量は、1 匹当たりの平均総投 与量(1 回投与 2.60 mg、2 回投与 2.62 mg、3 回投与 2.62 mg、4 回投与 2.58 mg)
とほぼ一致した値を示した。各測定期の肺中 TiO2 沈着量及びその継時的推移は、 1回投与と複数回投与で顕著な差は認められなかった。

TiO₂の各肺葉及び気管内TiO₂沈着量分布を図②(b-2)-9に示す。各肺葉及び 気管内への分布は、各測定期とも後葉と左葉に多く分布した。各葉重量当たり に換算した濃度(mg/g)は、後葉、副葉及び左葉でほぼ同程度であり、各測定 期とも投与回数による明らかな差はみられなかった。なお、91日目にも気管内 に一定量のTiO₂が残存していた。

投与回数	4 時間目	1日目	7日目	28日目	91日目
(用量)	(mg/肺)	(mg/肺)	(mg/肺)	(mg/肺)	(mg/肺)
1回投与(10 mg/kg)	2. 73	2.37	2. 31	2.04	1.37
2回投与(5 mg/kg)	2. 75	2.44	2. 18	1.85	1. 27
3回投与(3.3 mg/kg)	2. 57	2.26	2. 27	1.88	1.49
4回投与(2.5 mg/kg)	2.60	2.29	2. 27	1.88	1.35

表②(b-2)-4 肺中 TiO2沈着量

TiO₂沈着量の4時間目の濃度に対する相対比

投与回数	4 時間目	1日目	7日目	28日目	91日目
(用量)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
1回投与(10 mg/kg)	100	87	85	75	50
2回投与(5 mg/kg)	100	89	79	67	46
3回投与(3.3mg/kg)	100	88	88	73	58
4回投与(2.5mg/kg)	100	88	87	72	52



図②(b-2)-8 肺中 TiO2沈着量の推移







(e)



図②(b-2)-9 各肺葉及び気管内 TiO₂沈着量分布

(a) 4時間目 (b) 1日目 (c) 7日目 (d) 28日目 (e) 91日目
1:1回投与 2:2回投与 3:3回投与 4:4回投与
沈着量:各肺葉(気管)重量当たりの濃度(mg/g)で表示

2.2 酸化ニッケルを用いた単回投与と複数回投与の比較検討<試験-4、5>

雄 F344 ラットに、酸化ニッケル(NiO)ナノ粒子を単回から複数回に分けて 気管内投与した。BALF 検査、血液学的検査、血液生化学的検査、病理学的検査 (肉眼的観察、器官重量測定及び病理組織学検査)を実施し、気管内投与回数 の違いによる肺有害性の差異、及び観察期間の違いが肺有害性に及ぼす影響に ついて検討を行った。また、投与回数による各肺葉の分布の差異を検討するた めに、各肺葉における NiO 沈着量の測定を実施した。

2.2.1 試験材料

2.2.1.1 被験物質及び媒体

被験物質として、Ni0 ナノ粒子は US3352 (US Research Nanomaterials 社) を使用した。Ni0 懸濁液(媒体:純水)は、産業技術総合研究所・ナノ材料研究 部門で調製(2 mg/ml、1 mg/ml、0.67 mg/ml、0.5 mg/ml)し、日本バイオア ッセイ研究センターに供給された。使用した Ni0 ナノ粒子の性状等を表② (b-2)-5 に示す。

表②(b-2)-5 使用した Ni0 ナノ粒子(US3352)の性状等

Ni0 含有量	:99.98%以上	比表面積(BET)	: 50-100 m²/g
性状	:黒灰色粉末	密度	: 6.67 g/cm ³
平均一次粒子径	: 18 nm		

2.2.1.2 試験動物及び飼育条件

試験動物及び飼育条件は、「2.1.1.2 試験動物及び飼育条件」と同様である。

2.2.2 試験方法

2.2.2.1 群構成及び投与

Ni0 を 2 mg/kg の用量で1回投与、その1/2 量(1 mg/kg)を2回投与、1/3 量(0.67 mg/kg)を3回投与、1/4 量(0.5 mg/kg)を4回投与する群を設けた (各群の総投与量: 2 mg/kg)。また、Ni0 の各投与群の投与回数に合わせ、媒 体対照群を設けた。なお、Ni0 の沈着量測定検討は、1回投与と4回投与のみ とした。投与方法、投与間隔、投与液量は、「2.1.2.1 群構成及び投与」と同 様である。 2.2.2.2 観察及び検査

<試験-4>

投与開始後 91 日目(13 週)まで飼育し、一般状態の観察、体重測定を実施 した。最終投与後 3 日目と投与開始後及び最終投与後 28 日目に、BALF 検査を 実施した。また、投与開始後及び最終投与後 28 日目と 91 日目に、血液学的検 査、血液生化学的検査、器官重量測定及び呼吸器を中心とした病理組織学的検 査を実施した(図②(b-2)-10)。

<試験-5>

気管内投与回数による各肺葉の分布の差異を検討するために、最終投与後4時間目、1日目、7日目、及び28日目、並びに投与開始後91日目に各肺葉におけるNi0沈着量の測定を実施した(図②(b-2)-11)。



2.2.3 結果

試験-4,5をまとめて記述する。

2.2.3.1 一般状態観察及び体重推移

一般状態の観察では、すべての投与群に著変は認められなかった。

体重は、媒体対照群との比較ではいずれの投与回数とも有意差は認められな かった。

2.2.3.2 BALF 性状

投与開始後及び最終投与後 28 日目の BAL 回収液は白濁しており、PAS 染色陽 性の蛋白様物質の貯留が認められ、肺胞蛋白症と診断した。

1回投与と比較して 2~4回投与で程度の増強が認められた。また、投与開始後 28日目と比較して、最終投与後 28日目では同程度かやや程度の増強がみられた。なお、3日目では、各群に肺胞蛋白症は認められなかった。BALFの光学顕微鏡像を図②(b-2)-12に示す。

(a)

(b)



図②(b-2)-12 BALF の光学顕微鏡像(肺胞蛋白症、投与開始後 28 日目) (a) Ni0 1 回投与(軽度) (b) Ni0 4 回投与(重度)

2.2.3.3 BALF 中の細胞検査

総細胞数、好中球数及びマクロファージ数の結果を図②(b-2)-13 に示す。3 日目では、媒体対照群と比べて総細胞数、好中球数、リンパ球数、好酸球数の 増加が認められた。また、マクロファージ数も増加した。最も顕著な増加を示 したのは好中球数とマクロファージ数であった。好中球数は1回投与に比較し て複数回投与で増加を示したが、投与回数に対応した傾向は認められなかった。 一方、マクロファージ数、好酸球数は投与回数に対応した増加を示した。

28 日目では、好酸球数以外の増加は継続しており、炎症反応が継続して認め られた。なお、1 回投与との比較では差は認められなかった。総細胞数、好中 球数及びマクロファージ数の増加は、28 日目の検査時期による差は認められな かった。







図②(b-2)-13 BALF 中の細胞検査(総細胞数、好中球数及びマクロファージ数) (** p<0.01:対媒体対照群 # p<0.05, ## p<0.01:対1回投与群)

2.2.3.4 BALF の生化学検査

総蛋白とLDHの結果を図②(b-2)-14 に示す。3 日目では、媒体対照群と比べ て総蛋白、アルブミン、LDH 及び γ-GTP の顕著な増加が認められた。これらの 変化も細胞検査と同様に、1 回投与に比較して複数回投与では投与回数に対応 していないものが多かった。

28 日目では、総蛋白、アルブミン、LDH 及び γ-GTP の増加は継続して認めら れた。1回投与との比較では、投与回数の増加に伴い、反応の程度は増加する 傾向がみられた。なお、ALP は媒体対照群との比較で各投与回数とも減少傾を 示した。



図②(b-2)-14 BALF 中の生化学検査(総蛋白及びLDH) (** p<0.01:対媒体対照群 # p<0.05, ## p<0.01:対1回投与群 + p<0.05:対投与開始後28日目の同投与回数群)

2.2.3.5 血液学的検査及び血液生化学的検査

各解剖期とも、NiO 投与による毒性学的に意義があると考えられる変化は認められなかった。

2.2.3.6 肉眼的観察

Ni0 投与群において、最終投与後28日目の3回投与と4回投与、及び91日 目の1回~4回投与で、肺表面に白色斑と赤色斑が多くみられた。

2.2.3.7 器官重量

肺重量の結果を図②(b-2)-15 に示す。投与開始後 28 日目では、媒体対照群 と比較して、肺の実重量と比重量が高値であったが、投与回数による差は認め られなかった。最終投与後 28 日目には、肺の実重量と比重量が高値であり、1 回投与との比較では、実重量は 4 回投与で、比重量は 3 回と 4 回投与で増加を 示したが、いずれも軽度な変化であった。なお、28 日目の検査時期による差は 認められなかった。

91 日目では、各投与回数とも肺の実重量と比重量が高値であったが、投与回数による差は認められなかった。





図②(b-2)-15 肺重量(実重量及び比重量) (** p<0.01:対媒体対照群 # p<0.05:対1回投与群)

2.2.3.8 病理組織学的検査

Ni0 投与群の病理組織学的検査結果を表②(b-2)-6(投与開始後 28 日目と最 終投与後 28 日目の1回投与は、同データ)に、病理組織像を図②(b-2)-16に 示す。投与開始後 28 日目において、肺胞腔内に Ni0 粒子と蛋白を貪食したマ クロファージの出現、肺胞腔内と BALT に Ni0 粒子の沈着が全例に認められ、 肺胞蛋白症と炎症細胞浸潤が全例に観察された。また、肺胞壁の極めて軽度な 線維増生が多くの例にみられ、肺胞 II 型上皮の過形成(軽度)が 1~3 回投与 の各1例に認められた。さらに、肺関連リンパ節においても Ni0 粒子の沈着が 多くの例に認められた。これらの所見において、投与回数による顕著な差は認 められなかった。最終投与後 28 日目の Ni0 投与群では、各所見の出現頻度あ るいは反応の程度は、投与開始後 28 日目とほとんど差がなく、投与回数によ る顕著な差は認められなかった。

91 日目では、28 日目とほぼ同様の変化がみられ、投与回数による顕著な差 は認められなかった。なお、肺胞 II 型上皮の過形成(軽度)は4回投与群でも 認められ、その発生率はやや増加した。

なお、肉眼的観察で 91 日目に認められた白色斑や赤色斑は、肺胞マクロフ ァージの浸潤、肺胞蛋白症、炎症性細胞浸潤あるいは肺胞 II 型上皮過形成など に対応する所見であった。28 日目と比べると、肺胞マクロファージの浸潤はい ずれも巣状にみられる傾向にあった。

表②(b-2)-6 Ni0 投与群の病理組織学的検査結果

<投与開始後28日目>

0+1% 8,8		1回投与	2回投与	3回投与	4回投与
顺	│ /// ////////////////////////////////	<10>	<10>	<10>	<10>
	Ni0沈着(マクロファージ貪食)	10	10	10	10
	Ni0沈着(肺胞腔内)	10	10	10	10
	肺胞マクロファージ(蛋白貪食)	10	10	10	10
n±	肺胞蛋白症	10	10	10	10
ዘመ	炎症性細胞浸潤	10	10	10	10
	肺胞壁の線維増生	6	8	10	7
	Ni0 沈着 (BALT)	4	10	7	5
	肺胞Ⅱ型上皮細胞の過形成	1	1	1	0
肺関連 リンハ [°] 節	Ni0 沈着	9	10	10	8
く最終投					
	〈検査動物数〉		<10>	<10>	<10>
	Ni0 沈着(マクロファージ貪食)		10	10	10
	Ni0沈着(肺胞腔内)		10	10	10
	肺胞マクロファージ(蛋白貪食)		10	10	10
n±	肺胞蛋白症		10	10	10
ዘመ	炎症性細胞浸潤		10	10	10
	肺胞壁の線維増生		8	10	7
	Ni0 沈着 (BALT)		6	7	6
	肺胞Ⅱ型上皮細胞の過形成		1	1	0
肺関連 リンハ [°] 節	Ni0 沈着		10	8	9
く投与開		*			
	〈検査動物数〉	<5>	<5>	<5>	<5>
	Ni0沈着(マクロファージ貪食)	5	5	5	5
	Ni0沈着(肺胞腔内)	5	5	5	5
	肺胞マクロファージ(蛋白貪食)	5	5	5	5
□ ±	肺胞蛋白症	5	5	5	5
ዘመ	炎症性細胞浸潤	5	5	5	5
	肺胞壁の線維増生	5	3	3	3
	Ni0 沈着 (BALT)	5	5	5	5
	肺胞Ⅱ型上皮細胞の過形成	2	2	1	3
肺関連	Ni0 沈着	5	5	5	5

28日目各所見のグレードはいずれも軽度

リンパ節



図②(b-2)-16 Ni0 投与群の病理組織像

(a)肺:肺胞蛋白症(1回投与,投与開始後28日目)
 矢印:マクロファージ(Ni0と蛋白を取込む) H&E 染色 Bar:50μm

(b)肺:肺胞蛋白症(4回投与,投与開始後28日目)

矢印:マクロファージ(Ni0と蛋白を取込む) H&E 染色 Bar∶50µm

 (c)肺胞蛋白症、肺胞Ⅱ型上皮細胞の過形成と線維増生(1回投与,投与開始後 91日目) 矢印:肺胞Ⅱ型上皮細胞の過形成 H&E 染色 Bar:25μm

(d)縦隔リンパ節:Ni0の沈着(1回投与,投与開始後91日)

H&E染色 Bar∶25µm

2.2.3.9 肺中の Ni0 沈着量及び各肺葉の分布

肺中 Ni0 沈着量とその推移を表②(b-2)-7、及び図②(b-2)-17 に示す。最終 投与後4時間目のNi0 沈着量は、1 匹当たりの平均総投与量(1 回投与 0.53 mg、 4 回投与 0.57 mg) とほぼ一致した値を示した。各測定期の肺中 Ni0 沈着量及 びその推移は、1 回投与と4 回投与で顕著な差は認められなかった。 各肺葉及び気管内 Ni0 沈着量分布を図②(b-2)-18 に示す。Ni0 の各肺葉及び 気管内への分布は、各測定期とも後葉と左葉に多く分布した。各葉重量当たり に換算した濃度(mg/g)は、後葉、副葉及び左葉でほぼ同程度であったが、28 日目の分布は左葉でやや高い傾向であった。各測定期とも、投与回数による明 らかな差はみられなかった。なお、91 日目にも気管内に一定量の Ni0 が残存し ていた。

		, Wile I	19 //0/日 王		
投与回数	4 時間目	1日目	7日目	28日目	91日目
(用量)	(mg/肺)	(mg/肺)	(mg/肺)	(mg/肺)	(mg/肺)
1回投与(2 mg/kg)	0. 48	0. 47	0.34	0.24	0.16
4回投与(0.5 mg/kg)	0.50	0. 47	0.39	0. 27	0. 20

表②(b-2)-7 肺中 Ni0 沈着量

Ni0 沈着量の4時間目の濃度に対する相対比

投与回数	4 時間目	1日目	7日目	28日目	91日目
(用量)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
1回投与(2 mg/kg)	100	98	70	50	33
4回投与(0.5mg/kg)	100	95	78	54	40



図②(b-2)-17 肺中 Ni0 沈着量の推移





0.0

0.2 0.0 1 4 1 4 4 4 1 4 4 1 1 1 ②中葉 ③後葉 ④副葉 ⑤左葉 **⑥**気管 ①前葉

図②(b-2)-18 各肺葉及び気管内 Ni0 沈着量分布

(a) 4 時間目 (b) 1 日目 (c) 7 日目 (d) 28 日目 (e) 91 日目 1:1回投与 4:4回投与

沈着量:各肺葉(気管)重量当たりの濃度(mg/g)で表示

2.3 多層カーボンナノチューブを用いた単回投与と複数回投与の比較検討 <試験-6>

雄F344 ラットに、多層カーボンナノチューブ(MWCNT)を単回から複数回に 分けて気管内投与した。BALF 検査、血液学的検査、血液生化学的検査、病理学 的検査(肉眼的観察、器官重量測定及び病理組織学検査)を実施し、気管内投 与回数の違いによる肺有害性の差異、及び観察期間の違いが肺有害性に及ぼす 影響について検討を行った。また、投与回数による各肺葉の分布の差異を検討 するために、各肺葉における MWCNT 沈着量の測定を実施した。

2.3.1 試験材料

2.3.1.1 被験物質及び媒体

被験物質として、MWCNT は MWNT-7(保土谷化学工業(株))を使用した。MWCNT 懸濁液(媒体:純水)は、産業技術総合研究所・ナノ材料研究部門で調製(320 μg/ml、160μg/ml、107μg/ml、80μg/ml)し、日本バイオアッセイ研究セン ターに供給された。使用した MWCNT の性状等を表②(b-2)-8 に示す。

純度	: 99.6 %	性状	:黒色、固体
平均直径	: 73 nm	比表面積(BET)	: 24 m ² /g
形状	:炭素による六員	環ネットワーク棒	構造を持ち、多層の同軸
	管状の針状型	(ストレートタイ	プ)を呈する

表②(b-2)-8 使用した MWCNT (MWNT-7) の性状等

走査型電子顕微鏡 (SEM) 写真より計測した MWCNT の繊維長及び繊維幅を表 ② (b-2)-9 に示す。MWCNT 原体は繊維長及び繊維幅とも 1000 本、MWCNT 懸濁液 は各 500 本の計測を行った。なお、320 μg/ml は、スプレーゾンデ通過前後、 それ以外は通過後のみの計測を行った。

	平均繊維長 [※] (µm)	平均繊維幅 [※] (nm)
MWCNT 原体(MWNT-7)	4.4 ± 1.9	79.1 ± 1.4
320μg/ml 懸濁液	00 17	50 5 ± 1 2
(スプレーゾンデ通過前)	2.2 ± 1.7	52.5 ± 1.5
320µg/ml 懸濁液	21 + 16	50 2 ± 1 <i>1</i>
(スプレーゾンデ通過後)	2. I ± I. 0	50.5 ± 1.4
160μg/ml 懸濁液	21 1 7	51.0 ± 1.4
(スプレーゾンデ通過後)	2.1 ± 1.7	51.0 ± 1.4
107μg/ml 懸濁液	2.1 ± 1.6	10 0 ± 1 1
(スプレーゾンデ通過後)	2.4 ± 1.0	40.0 ± 1.4
80µg/ml 懸濁液	2 2 1 7	51 7 ± 1 <i>1</i>
(スプレーゾンデ通過後)	2.2 ± 1.7	$JI. / \pm I.4$

表②(b-2)-9 MWCNTの平均繊維長及び平均繊維幅

※ 平均繊維長、平均繊維幅:幾何平均±幾何標準偏差

2.3.1.2 試験動物及び飼育条件

試験動物及び飼育条件は、「2.1.1.2 試験動物及び飼育条件」と同様である。

2.3.2 試験方法

2.3.2.1 群構成及び投与

MWCNT を 320 µ g/kg の用量で1回投与、その1/2量(160 µ g/kg)を2回投与、 1/3量(107 µ g/kg)を3回投与、1/4量(80 µ g/kg)を4回投与する群を設けた(各群の総投与量:320 µ g/kg)。また、MWCNTの各投与群の投与回数に合わせ、媒体対照群を設けた。投与方法、投与間隔、投与液量は、「2.1.2.1 群構成及び投与」と同様である。

2.3.2.2 観察及び検査

投与開始後 91 日目(13 週)まで飼育し、一般状態の観察、体重測定を実施 した。最終投与後 3 日目と投与開始後及び最終投与後 28 日目に、BALF 検査を 実施した。また、投与開始後及び最終投与後 28 日目と 91 日目に、血液学的検 査、血液生化学的検査、器官重量測定及び呼吸器を中心とした病理組織学的検 査を実施した。気管内投与回数による各肺葉の分布の差異を検討するために、 最終投与後 4 時間目、1 日目、7 日目、及び 28 日目、並びに投与開始後 91 日 目に各肺葉における MWCNT 沈着量の測定を実施した(図②(b-2)-19)。



図②(b-2)-19 試験デザイン(試験-6)

2.3.3 結果

2.3.3.1 一般状態観察及び体重推移

一般状態の観察では、すべての投与群に著変は認められなかった。

体重は、媒体対照群との比較では、いずれの投与回数とも有意差は認められ なかった。なお、媒体対照群、MWCNT 投与群とも、投与翌日には軽度の体重減 少がみられたが、一過性の減少であった。

2.3.3.2 BALF 中の細胞検査

総細胞数と好中球数の結果を図②(b-2)-20 に示す。3 日目に総細胞数、好中 球数、好酸球数、リンパ球数の増加が認められた。好中球数とリンパ球数の増 加は3 日目よりは減弱したものの、28 日目にも継続して認められ、軽度の炎症 性反応が持続していることが示唆された。MWCNT 投与による最も鋭敏な反応を 示したのは好中球数の増加であり、反応の程度は単回投与が最も強く、複数回 投与で減弱した。なお、投与開始及び最終投与後 28 日目では、投与回数によ る相違はほとんどみられなかった。また、リンパ球数の増加も好中球と類似し た傾向を示した。



図②(b-2)-20 BALF 中の細胞検査(総細胞数及び好中球数) (* p<0.05, ** p<0.01: 対媒体対照群 ## p<0.01: 対1回投与群)

2.3.3.3 BALF の生化学検査

総蛋白と LDH の結果を図② (b-2)-21 に示す。3 日目に LDH、総蛋白、アルブ ミン、ALP、γ-GTP の増加が認められた。これらの影響は単回投与が最も強い 反応を示し、ほぼ投与回数に対応して減弱した。LDH は 3 日目よりは減弱した ものの、28 日目でも影響がみられた。



図②(b-2)-21 BALF 中の生化学検査(総蛋白及びLDH) (** p<0.01:対媒体対照群 # p<0.05, ## p<0.01:対1回投与群 + p<0.05:対投与開始後28日目の同投与回数群)

2.3.3.4 血液学的検査及び血液生化学的検査

各解剖期とも、MWCNT 投与による毒性学的に意義があると考えられる変化は 認められなかった。

2.3.3.5 肉眼的観察

投与開始後及び最終投与後 28 日目の全動物に、肺の黒色斑が認められた。 91 日目では、肺の黒色斑は1回投与群の1匹にのみみられた。肺の黒色斑は、 投与した MWCNT 懸濁液が肉眼的に観察されたものである。

2.3.3.6 器官重量

肺重量の結果を図②(b-2)-22 に示す。肺重量は、各解剖期において、実重量、 比重量とも増加はほとんどみられず、投与回数による明らかな差も認められな かった。



図②(b-2)-22 肺重量(実重量及び比重量) (* p<0.05,** p<0.01:対媒体対照群 † p<0.05:対 投与開始後 28 日目の同投与回数群)

2.3.3.7 病理組織学的検査

WWCNT 投与群の病理組織学的検査結果を表②(b-2)-10 に(投与開始後 28 日 目と最終投与後 28 日目の1回投与は、同データ)、病理組織像を図②(b-2)-23 に示す。投与開始後 28 日目では、肺胞腔内に MWCNT を貪食したマクロファー ジの出現が認められたが、肺に炎症反応や肺胞への蛋白浸出等の変化はみられ なかった。また、これらの所見において、投与回数による顕著な差は認められ なかった。肺関連リンパ節においては、MWCNT の沈着が少数例に認められた。 最終投与後 28 日目の MWCNT 投与群では、各所見の出現頻度あるいは反応の程 度は、投与開始後 28 日目とほとんど差がなく、投与回数による顕著な差は認められなかった。なお、BALT において MWCNT の沈着が 4 回投与の 1 例にのみ認められた。

91 日目では、28 日目とほぼ同様の変化がみられ、投与回数による顕著な差は認められなかった。なお、BALT において MWCNT の沈着が1回投与の1例にのみ認められた。

表②(b-2)-10 MWCNT 投与群の病理組織学的検査結果

"""	正 目 / / / / / / / / / / / / / / / / / /	1回投与	2回投与	3回投与	4回投与
		<10>	<10>	<10>	<10>
時	MWCNT 沈着(マクロファージ貪食)	10	10	10	10
וווא	MWCNT 沈着 (BALT)	0	0	0	0
肺関連 リンハ [°] 節	MWCNT 沈着	4	1	4	1

<投与開始後28日目>

<最終投与後28日目>

	〈検査動物数〉	<10>	<10>	<10>
R±	MWCNT 沈着(マクロファージ貪食)	10	10	10
וווא	MWCNT 沈着(BALT)	0	0	1
肺関連 リンハ [°] 節	MWCNT 沈着	2	2	2

<投与開始後 91 日目>

	〈検査動物数〉	<5>	<5>	<5>	<5>
畦	MWCNT 沈着(マクロファージ貪食)	5	5	5	5
111	MWCNT 沈着 (BALT)	1	0	0	0
肺関連 リンハ [°] 節	MWCNT 沈着	2	2	3	3

各所見のグレードはいずれも軽度



図②(b-2)-23 MWCNT 投与群の病理組織像

- (a) 肺: MWCNT 沈着(1回投与,投与開始後28日目) マクロファージに貪食された MWCNT H&E 染色 Bar:25μm
- (b)肺: MWCNT 沈着(4回投与,投与開始後28日目) マクロファージに貪食された MWCNT H&E 染色 Bar:25μm
- (c)肺:気管支関連リンパ組織(BALT)の MWCNT 沈着(矢印)(1回投与,投与 開始後 91 日目) H&E 染色 Bar:25 µ m
- (d)縦隔リンパ節: MWCNT 沈着(矢印)(4回投与, 投与開始後 91 日) H&E 染色 Bar:25μm
- 2.3.3.8 肺中の MWCNT 沈着量及び各肺葉の分布

肺中 MWCNT 沈着量とその推移を表②(b-2)-11、及び図②(b-2)-24 に示す。最 終投与後4時間目の MWCNT 沈着量は、1匹当たりの平均総投与量(1回投与80.0 μg、2回投与80.6μg、3回投与80.7μg、4回投与80.6μg)とほぼ一致した 値を示した。各測定期の肺中 MWCNT 沈着量及びその継時的推移は、各投与回数 で顕著な差は認められなかった。

各肺葉及び気管内 MWCNT 沈着量分布を図②(b-2)-25 に示す。MWCNT の各肺葉 及び気管内への分布は、各測定期とも後葉と左葉に多く分布した。各葉重量当 たりに換算した濃度(µg/g)は、後葉、副葉及び左葉でほぼ同程度であり、 各測定期とも投与回数による明らかな差はみられなかった。また、投与直後か ら 28 日目までは個体間のバラツキはやや大きかったが、91 日目にはバラツキ は少なくなった。なお、91 日目にも気管内に一定量の MWCNT が残存していた。

表②(b-2)-11 肺中 MWCNT 沈着量

投与回数	4 時間目	1日目	7日目	28日目	91日目
(用量)	(µg/肺)	(µg/肺)	(µg/肺)	(µg/肺)	(µg/肺)
1回投与(320µg/kg)	88.7	87.7	72.0	60. 7	25.1
2回投与(160µg/kg)	82.0	81.7	72.6	56.9	21.0
3回投与(107µg/kg)	83.4	79.7	72.6	59.8	22.8
4回投与(80µg/kg)	84. 5	81.6	76.3	66.0	25.7
投与回数	4 時間目	1日目	7日目	28 日目	91日目
投与回数 (用量)	4 時間目 (%)	1日目 (%)	7日目 (%)	28 日目 (%)	91 日目 (%)
投与回数 (用量) 1回投与(320µg/kg)	4 時間目 (%) 100	1日目 (%) 99	7日目 (%) 81	28 日目 (%) 68	91 日目 (%) 28
投与回数 (用量) 1回投与(320µg/kg) 2回投与(160µg/kg)	4 時間目 (%) 100 100	1日目 (%) 99 100	7日目 (%) 81 89	28日目 (%) 68 69	91 日目 (%) 28 26
投与回数 (用量) 1回投与(320μg/kg) 2回投与(160μg/kg) 3回投与(107μg/kg)	4 時間目 (%) 100 100 100	1日目 (%) 99 100 96	7日日 (%) 81 89 87	28日目 (%) 68 69 72	91 日目 (%) 28 26 27

※ 4時間目の濃度に対する相対比











図②(b-2)-25 各肺葉及び気管内 MWCNT 沈着量分布 (a) 4 時間目 (b) 1 日目 (c) 7 日目 (d) 28 日目 (e) 91 日目 1:1 回投与 2:2 回投与 3:3 回投与 4:4 回投与 沈着量:各肺葉(気管)重量当たりの濃度(µg/g)で表示 2.4 多層カーボンナノチューブを用いた単回投与と複数回投与による肺有害性 の差異に関する検討及び肺沈着量と分布に関する検討(気管内投与試験と既存 吸入暴露試験結果の比較) <試験-7>

2.3 項では、MWCNT を用いて、単回投与と複数回投与による肺有害性の差異 に関する検討及び肺中沈着量と分布に関する検討を実施した。2.3 項で使用し た MWCNT 懸濁液中の繊維長と繊維幅は、MWCNT 原体と比較して繊維長が約半分、 繊維幅が約 2/3 であった。その結果、ラットに対する肺有害性影響に関して当 初の予想よりも低い影響が認められた。従って、2.4 節では、既存の吸入試験 報告による MWCNT 肺沈着量を考慮した用量設定を行い、単回あるいは複数回投 与と既存の吸入試験結果(Aiso et al., 2010)との比較を行った。また、MWCNT 懸濁液は、繊維長や繊維幅を考慮して調製した。

雄 F344 ラットに、MWCNT を単回から複数回に分けて気管内投与した。BALF 検査、血液学的検査、血液生化学的検査、病理学的検査(肉眼的観察、器官重 量測定及び病理組織学検査)を実施し、気管内投与回数の違いによる肺有害性 の差異、及び観察期間の違いが肺有害性に及ぼす影響について検討を行った。 また、投与回数による各肺葉の分布の差異を検討するために、各肺葉における MWCNT 沈着量の測定を実施した。

2.4.1 試験材料

2.4.1.1 被験物質及び媒体

使用した被験物質は、「2.3.1.1 被験物質及び媒体」と同様である。MWCNT 懸濁液の調製は、日本バイオアッセイ研究センターで実施した。調製濃度は、 1回投与用(240µg/ml 及び 480µg/ml)、4回投与用(60µg/ml 及び 120µg/ml) とした。調製方法は、秤量した MWCNT に媒体水溶液(Tween 80 を 0.1 %添加し た PBS 溶液)を各設定濃度になるように加え、超音波ホモジナイザー(VP-30S、 タイテック(株))を用いて 20 分間ソニケーションし、懸濁させた。MWCNT 懸濁 液は、投与直前に超音波槽で再分散させた。

SEM 写真より計測した MWCNT 懸濁液 (480 µ g/ml) のスプレーゾンデ通過前後 の繊維長及び繊維幅を表② (b-2)-12 に示す。なお、MWCNT 懸濁液は繊維長及び 繊維幅とも各 500 本の計測を行った。 表②(b-2)-12 MWCNT 懸濁液(480μg/ml)のスプレーゾンデ通過前後の 繊維長及び繊維幅

	平均繊維長 [※] (µm)	平均繊維幅 [※] (nm)				
480μg/ml 懸濁液	5.1 ± 1.8	75 8 ± 1 /				
(スプレーゾンデ通過前)	5.4 ± 1.0	75.0 ± 1.4				
480μg/ml 懸濁液	F 1 1 0	76 4 1 4				
(スプレーゾンデ通過後)	0.1 ± 1.0	/0.4 ± 1.4				
※ 平均繊維長、平均繊維幅:幾何平均±幾何標準偏差						

2.4.1.2 試験動物及び飼育条件

試験動物及び飼育条件は、「2.1.1.2 試験動物及び飼育条件」と同様である。

2.4.2 試験方法

2.4.2.1 群構成及び投与

投与用量は、日本バイオアッセイ研究センターで実施した MWCNT の 13 週間 吸入暴露試験(Kasai et al., 2015)の結果から、13 週間暴露後の MWCNT 肺沈 着量及び肺中濃度 - 時間曲線下面積(AUC)を参考にして決定した。MWCNT 懸濁 液を1回投与する群(低用量: $240 \mu g/kg$ 、高用量: $480 \mu g/kg$)、その 1/4 量 を4回投与する群(低用量: $60 \mu g/kg$ 、高用量: $120 \mu g/kg$)を設けた(各群 の総投与量:低用量 $240 \mu g/kg$ 、高用量 $480 \mu g/kg$)。また、MWCNT の各投与群 の投与回数に合わせ、媒体対照群を設けた。投与方法、投与間隔、投与液量は、 「2.1.2.1 群構成及び投与」と同様である。

2.4.2.2 観察及び検査

投与開始後 91 日目(13 週)まで飼育し、一般状態の観察、体重測定を実施 した。各検査は、最終投与 4 時間目(以下、4 時間目)に肺沈着量測定を、投 与開始後 14 日目(以下、14 日目)に BALF 検査、病理学的検査及び肺沈着量測 定を、投与開始後 28 日目及び 91 日目(以下、28 日目及び 91 日目)に病理学 的検査及び肺沈着量測定を実施した(図②(b-2)-26)。



図②(b-2)-26 試験デザイン(試験-7)

2.4.3 結果

2.4.3.1 一般状態観察及び体重推移

一般状態の観察では、すべての投与群に著変は認められなかった。

体重は、媒体対照群と同投与回数の MWCNT 投与群との比較、及び MWCNT 1回 投与群と MWCNT 4回投与群との比較でも、低用量群及び高用量群とも有意差は みられなかった。なお、媒体対照群、MWCNT 投与群とも、投与翌日には軽度の 体重減少がみられたが、一過性の減少であった。

2.4.3.2 BALF 中の細胞検査

統計検定は以下の組み合わせで実施し、検定結果を図中に記載した。

比較区分	検定対照群	検定比較群	検定法	有意差記号	
	年 加 罢 共 昭	媒体1回	,本中	_	
媒体	無処直対照	媒体 4 回	て快た		
	媒体1回	媒体 4 回	t 検定	† , † †	
1回投与	雄体 1 同	MWCNT 1 \square (240 μ g/kg)	Duppott	* **	
	朱14 世	MWCNT 1 \square (480 μ g/kg)	Dunnell	ጥ,	
	MWCNT 1 \square (240 μ g/kg)	MWCNT 1 \square (480 μ g/kg)	t 検定	#, ##	
4 回投与	雄体人同	MWCNT 4 \square (240 μ g/kg)	Duppott	de alude	
	妖 体 4 凹	MWCNT 4 \square (480 μ g/kg)	Dunnett	· • ,	
	MWCNT 4 \square (240 μ g/kg)	MWCNT 4 \square (480 μ g/kg)	t 検定	#, ##	

MWCNT	MWCNT 1 \square (240 μ g/kg)	MWCNT 4 \square (240 μ g/kg)	,按宁	+ + +
同用量	MWCNT 1 \square (480 μ g/kg)	MWCNT 4 \square (480 μ g/kg)	して沢に	1,11
	有意差:*, #, †	p<0.05 **, ##, ††	<0.01	

総細胞数と好中球数の結果を図②(b-2)-27 に示す。総細胞数、好中球数、マ クロファージ数、リンパ球数の増加が認められた。投与回数の比較では、低用 量と高用量とも4回投与での影響が強く現れ、低用量と高用量の比較では、概 ね用量に対応した増加がみられた。



図②(b-2)-27 BALF 中の細胞検査(総細胞数及び好中球数)

2.4.3.3 BALF の生化学検査

総蛋白と LDH の結果を図② (b-2) -28 に示す。総蛋白、アルブミン、LDH、ALP、 γ-GTP の増加が認められた。投与回数の比較では、総蛋白、アルブミン、LDH は低用量、高用量とも 4 回投与で増加を示し、ALP は低用量でのみ増加を示し た。また、低用量と高用量の比較では、概ね用量に対応した増加がみられた。



図②(b-2)-28 BALF 中の生化学検査(総蛋白及び LDH)

2.4.3.4 血液学的検査及び血液生化学的検査

各解剖期とも、MWCNT 投与による毒性学的に意義があると考えられる変化は 認められなかった。

2.4.3.5 肉眼的観察

MWCNT は黒色斑としてみられ、14 日目と 28 日目では投与群のほとんどの動物に認められたが、91 日目では、肺の黒色斑は全匹ともみられなかった。

2.4.3.6 器官重量

肺重量の結果を図②(b-2)-29 に示す。14 日目と 28 日目では、低用量、高用 量ともに実重量及び比重量の増加が認められたが、投与回数による差はみられ なかった。

91日目では、実重量は高用量の4回投与でのみ増加がみられたが、比重量は 低用量の1回投与で、高用量は1回と4回投与とも増加がみられた。



2.4.3.7 病理組織学的検査

WWCNT 投与群の病理組織学的検査結果を表②(b-2)-13 に、病理組織像を図② (b-2)-30 に示す。各解剖期(14 日目、28 日目、91 日目)で、肺では肺胞マク ロファージの増加、肺胞腔内にマクロファージに貪食または非貪食の MWCNT 沈 着、肺胞 II 型上皮細胞の増殖、肉芽腫様変化、BALT の MWCNT 沈着、また肺関連 リンパ節に MWCNT 沈着が認められた。91 日目には肺胞 II 型上皮細胞の過形成が 認められ、28 日目と 91 日目には少数例だが肺胞壁の線維化もみられた。投与 回数の比較で差がみられた変化は、肺の肉芽腫様変化で1回投与が4回投与と 同程度かやや多くみられる傾向にあった。また、BALT への MWCNT 沈着は1回投 与が多い傾向があった。これに対して、肺関連リンパ節では、4回投与で MWCNT の沈着が多く認められ、リンパ節への移行は4回投与で明らかに多かった。

<14 日日>		低月	月量	高用量	
		(240 μ	g/kg)	(480 μ	g/kg)
時 9 9	│	1回投与	4回投与	1回投与	4回投与
順	別 兄 / \快宜勤初致/ 	<5>	<5>	<5>	<5>
	肺胞マクロファージの増加	+:5	+:5	2+:5	2+:5
	MWCNT 沈着(マクロファージ貪食)	+:5	+:5	+:5	+:5
	MWCNT 沈着(肺胞腔内)	+:5	+:5	+:5	+:5
時	肺胞Ⅱ型上皮細胞の過形成	+:0	+:0	+:1	+:0
וות	肺胞Ⅱ型上皮細胞の増殖	+:5	+:4	+:5	+:5
	肉芽腫様変化	+:0	+:1	+:4	+:2
	肺胞壁の線維化	+:0	+:0	+:0	+:0
	MWCNT 沈着 (BALT)	+:0	+:0	+:4	+:0
肺関連 リンパ [°] 節	MWCNT 沈着	+:0	+:0	+:0	+:3
	<28 日目>	<5>	<5>	<5>	<5>
	肺胞マクロファージの増加	+:5	+:5	2+:5	2+:5
	MWCNT 沈着(マクロファージ貪食)	+:5	+:5	+:5	+:5
	MWCNT 沈着(肺胞腔内)	+:5	+:5	+:5	+:5
n+	肺胞Ⅱ型上皮細胞の過形成	+:0	+:0	+:0	+:1
用巾	肺胞Ⅱ型上皮細胞の増殖	+:5	+:5	+:5	+:4
	肉芽腫様変化	+:1	+:0	+:3	+:2
	肺胞壁の線維化	+:0	+:0	+:1	+:0
	MWCNT 沈着 (BALT)	+:4	+:3	+:5	+:2
肺関連 ^{リンハ°} 節	MWCNT 沈着	+:0	+:0	+:0	+:4
[(5)
	<91日目>	<5>	<5>	<5>	<5>
		+:5	+:5	+:5	+:5
	MWCNI 沈者(マクロファーシ 頁食)	+:5	+:5	+:5	+:5
	MWCNI 沈着(肺胞腔内)	+:5	+:5	+:5	+:5
肺	肺胞॥型上皮細胞の適形成	+:3	+:3	+:5	+:5
	肺胞Ⅱ型上皮細胞の増殖	+:5	+:5	+:5	+:5
	肉芽腫棣変化	+:3	+:1	+:5	+:5
		+:0	+:0	+:1	+:1
	MWGNI 沈看(BALI)	+:5	+:2	+:5	+:4
肺関連 リンパ [°] 節	MWCNT 沈着	+:0	+:4	+:3	+:5

表②(b-2)-13 病理組織学的検査結果

所見のグレード: +:軽度 2+:中等度



図②(b-2)-30 MWCNT 投与群の病理組織像

- (a)肺:肺胞マクロファージの増加(4回投与,高用量:480μg/kg、14日目)
 矢印:MWCNTを貪食したマクロファージ H&E 染色 Bar:30μm
- (b)肺:肺胞 II型上皮細胞過形成(4回投与,高用量:480μg/kg、91日目)
 矢印:肺胞 II型上皮細胞 矢頭:MWCNT を貪食したマクロファージ H&E 染色 Bar:30μm
- (c)肺:肉芽腫様変化(4回投与,高用量:480μg/kg、91日目) H&E 染色
 Bar:30μm
- (d) 肺関連リンパ節: MWCNT 沈着(4回投与,高用量:480μg/kg、91日目)
 H&E 染色 Bar:30μm

2.4.3.8 肺中の MWCNT 沈着量及び各肺葉の分布

肺中 MWCNT 沈着量及び肺中濃度 - 時間曲線下面積(AUC)を表②(b-2)-14 に、 肺中 MWCNT 沈着量の継時的推移を図②(b-2)-31 に示す。4 時間目の MWCNT 沈着 量は、1 匹当たりの平均総投与量(低用量:1回投与 63 µg、4回投与 63 µg、 高用量:1回投与 125 µg、4回投与 126 µg)とほぼ一致した値を示した。肺中 MWCNT 沈着量は、低用量、高用量とも1回投与と4回投与の沈着量とその推移 に顕著な差は認められなかった。また、AUC は、低用量と高用量でほぼ用量に 相関した値を示し、1回投与と4回投与で顕著な差はみられなかった。

各肺葉及び気管内 MWCNT 沈着量分布を図②(b-2)-32 に示す。MWCNT の各肺葉 及び気管内への分布は、各測定期とも後葉と左葉に多く分布した。各葉重量当 たりに換算した濃度(µg/g)は、4時間目、14日目及び 28日目では、低用量、 高用量とも、後葉、副葉及び左葉に多く分布したが、91日目では顕著な差はみ られなかった。1回投与と4回投与の比較では、4時間目ではやや個体間のバ ラツキが大きかったものの、いずれの測定期とも明らかな差は認められなかっ た。なお、91日目にも気管内に一定量の MWCNT が残存していた。

用量	机片同粉	4 時間目	14 日目	28日目	91 日目	AUC
(μ g/kg)	投子回致	(µg/肺)	(µg/肺)	(µg/肺)	(µg/肺)	$(\mu g \times day)$
低用量	1回	60.4	26.4	21.5	10. 7	1958
(240)	4 回	64. 4	24. 1	19.8	8. 2	1809
高用量	1 回	122. 3	48.9	37.9	15. 2	3479
(480)	4 回	127.6	48.3	39.1	21.0	3736

表②(b-2)-14 肺中 MWCNT 沈着量及び肺中濃度 - 時間曲線下面積(AUC)

用量	机片同粉	4 時間目	14 日目	28日目	91日目
$(\mu{ m g/kg})$	仅子回奴	(%)	(%)	(%)	(%)
低用量	1回	100	44	36	18
(240)	4 回	100	37	31	13
高用量	1回	100	40	31	12
(480)	4 回	100	38	31	16

※ 4時間目の濃度に対する相対比



図②(b-2)-31 肺中 MWCNT 沈着量の推移



図②(b-2)-32 各肺葉及び気管内 MWCNT 沈着量分布 (a)4時間目 (b)14日目 (c)28日目 (d)91日目 1:1回投与 4:4回投与 沈着量:各肺葉(気管)重量当たりの濃度(µg/g)で表示

2.4.4 本検討と既存吸入暴露試験結果との比較

日本バイオアッセイ研究センターでは、本検討と同じ MWNT-7 のラットを用 いた全身吸入暴露による 13 週間試験結果(0.2、1 及び 5 mg/m³、5 回暴露/週) を報告している(Kasai et al., 2015)。本検討における投与用量は、13 週間吸 入暴露後の MWCNT 肺沈着量から、AUC を算出し、2.3 項<試験-6>の MWCNT 肺 沈着量から吸入暴露濃度 1 mg/m³とその 2 倍の用量となるような推定 AUC を想 定し、低用量を 240 μg/kg、高用量を 480 μg/kg に設定した。

Kasai (2015) らの 13 週間吸入試験における、吸入暴露チャンバー内の MWCNT 平均繊維長と繊維幅及び算出した AUC と本検討の結果をまとめると下表のとお りである。本検討で投与した MWCNT は繊維幅がやや狭かったものの、繊維長は ほぼ同等であった。また、本検討の AUC を吸入暴露と比較すると、低用量 (240 μ g/kg) が吸入暴露の 0.2 と 1.0 mg/m³の中間に、高用量 (480 μ g/kg) が 1.0 mg/m³以上に相当した。本検討結果の 14 日目までの肺クリアランスは比較的高 く、結果として当初の想定よりも低い約 60%程度の AUC となった。

13 週間吸入暴露試験							
吸入暴露濃度 (mg/m ³)	平均減維長(µm)	平均繊維幅(nm)	AUC(μ g×day)				
0. 2	5.83	96.4	441				
1.0	6. 19	98.0	2894				
5.0	5. 53	94. 1	16421				
気管内投与試験 <	気管内投与試験 <試験-7>						
投与回数		亚均繊維茴 (pm)	AUC				
(総投与用量:μg/kg)			$(\mu g \times day)$				
低用量1回(240)			1958				
低用量4回(240)	Б 1	76. 4	1809				
高用量1回(480)	J. I		3479				
高用量4回(480)			3736				

13 週間吸入暴露試験と気管内投与試験の肺病変の発生率(%)を、算出した AUC 順に並べると下表のとおりである。なお、吸入暴露試験の病理組織所見は、 本検討結果の組織所見名との整合性を計る為に一部の所見について再鏡検し た。 吸入暴露試験でみられた肺の所見は、気管内投与試験でも認められた。しか し、肺胞 II 型上皮細胞の過形成は吸入暴露では認められないものの、気管内投 与では多くの動物にみられた。また、肺胞壁の線維化は、気管内投与に比べて 吸入暴露での発生率が高かった。気管内投与および吸入暴露の両方とも、ラッ トの肺上皮及び間質の変化を誘発し、生じた病変は質的に類似していた。しか し、気管内投与は、肺により重度の上皮病変を誘発する可能性を示した。

		気管	気管内		気管内		
投与法	吸入	低用量 4回	低用量 1回	吸入	高用量 1回	高用量 4回	吸入
AUC (μ g×day)	441	1809	1958	2894	3479	3736	16421
吸入(濃度: mg/m ³) 気管内(用量:μg/kg)	0. 2	240	240	1.0	480	480	5.0
肺胞 Ⅱ 型上皮細胞 の過形成	0	60	60	0	100	100	0
肺胞 Ⅱ 型上皮細胞 の増殖	0	100	100	0	100	100	100
肉芽腫様変化	10	20	60	80	100	100	100
肺胞壁の線維化	0	0	0	100	20	20	100

※ 数値は発生率(%)

2.5 動物系統の違いによる生体反応の差異の検討<試験-8>

本プロジェクトで実施する動物実験では、各実施機関で使用するラットの系 統を統一することとし、F344 ラットを使用することとした。F344 ラットの使 用が、他系統と比較して試験結果を評価する上で問題がないことを確認するた め、3 系統のラット(F344、Wistar Hannover、Harlan SD)を用いて、TiO₂を 単回気管内投与し、投与後 91 日目まで飼育し、一般状態の観察、体重測定を 実施した。投与後 3 日目と 28 日目に BALF 検査、28 日目と 91 日目に血液学的 検査、血液生化学的検査、器官重量測定及び病理組織学検査を実施し、動物系 統の違いによる生体反応の差異について検討した。

2.5.1 試験材料

2.5.1.1 被験物質及び媒体

使用した被験物質及び媒体は、「2.1.1.1 被験物質及び媒体」と同様とした。 なお、調製濃度は 10 mg/ml とした。

2.5.1.2 試験動物及び飼育条件

F344 ラット (F344/DuCrlCrlj; SPF、日本チャールス・リバー(株))、Wistar Hannover ラット (Crl:WI(Han); SPF、日本チャールス・リバー(株))、Harlan SD ラット (Hsd:SD; SPF、日本エスエルシー(株)) の3系統の雄ラットを生後11 週齢で導入した。動物の飼育条件は、「2.1.1.2 試験動物及び飼育条件」と同 様とした。

2.5.2 試験方法

2.5.2.1 群構成及び投与

TiO₂ 懸濁液 10 mg/kg を単回投与する群及び媒体対照群を設けた。投与方法、 投与液量は、「2.1.2.1 群構成及び投与」と同様とした。

2.5.2.2 観察及び検査

投与後 91 日目 (13 週) まで飼育し、一般状態の観察、体重測定を実施した。 BALF 検査は、投与後 3 日目と 28 日目に実施した。なお、BALF 採取方法は、F344 ラットでは、生理食塩水 7 ml を注入後、自然落下により BALF を回収し、この 操作を 2 回繰り返した (計 14 ml)。Wistar Hannover ラットと Harlan SD ラッ トでは、生理食塩水 9 ml × 2 回 (計 18 ml)の回収を行った。また、投与後 28 日目と 91 日目に、血液学的検査、血液生化学的検査、病理学的検査(肉眼的 観察・器官重量測定・呼吸器を中心とした病理組織学的検査)を実施した(図 ②(b-2)-33)。



2.5.3 結果

2.5.3.1 一般状態及び体重推移

一般状態の観察では、3系統ともすべての投与群に著変は認められなかった。 体重は、3系統とも、媒体投与及びTiO2投与とも、投与翌日にごく僅かな体 重減少がみられたが一過性の変化あり、各系統に顕著な差は認められなかった。

2.5.3.2 BALF 検査

細胞検査では、総細胞数、マクロファージ数、好中球数及びリンパ球数は、 各系統とも3日目に顕著な増加を示した。また、好酸球数も各系統で増加ある いは増加傾向がみられた。28日目には、各測定項目とも3日目と比較して顕著 に減少したが、F344 ラットでは、総細胞数、リンパ球数、好中球数の増加、Wistar Hannover ラットでは好中球数の増加が継続した。

生化学検査では、総蛋白、アルブミン、LDH、ALP 及びγ-GTP は、各系統と も3日目に顕著な増加を示した。28日目では、各測定項目とも3日目と比較し て顕著に減少したが、Harlan SD ラットでは総蛋白の増加が継続した。

2.5.3.3 血液学的検査及び血液生化学的検査

3系統ともTiO2投与による毒性学的に意義があると考えられる変化は認められなかった。

2.5.3.4 肉眼的観察

3系統ともTiO2投与によると考えられる変化は認められなかった。

2.5.3.5 器官重量

28 日目には、肺の実重量と比重量の増加が3系統とも認められた。91 日目では、実重量は3系統とも高値を示したが、比重量はWistar HannoverとHarlan SD ラットで高値が認められた。なお、肺以外の臓器に変化は認められなかった。

2.5.3.6 病理組織学的検查

28 日目と 91 日目では、F344、Wistar Hannover 及び Harlan SD ラットの 3 系統とも、肺胞腔に TiO₂ を貪食したマクロファージの出現、肺胞腔と肺胞壁に は非貪食の TiO₂ 粒子が認められた。気管支関連リンパ組織(BALT)と肺関連リ ンパ節においても TiO₂ 粒子が 3 系統とも確認された。また、91 日目には、3 系 統とも TiO₂ を貪食したマクロファージの集簇の周囲に、肺胞 II 型上皮細胞の過 形成が認められた。なお、3 系統とも肺の線維化病変は認められなかった。91 日目の Harlan SD ラットの脾臓では、貪食されていない TiO₂ 粒子のごく僅かな 沈着が認められる例がみられ、時間の経過とともに他臓器へ移行することが示 された。なお、28 日目及び 91 日目にみられた各所見の出現頻度や反応の程度 は、ラットの系統による差はほとんど認められなかった。 2.6 肺組織標本作製方法の統一化の検討<試験-9>

ナノ材料の気管内投与後に行う、肺の組織標本作製方法の適正化のための検 討を行うことを目的とした。TiO₂をラットに 4 回気管内投与し、公表文献 (Kittela et al., 2004)による手法と日本バイオアッセイ研究センターの手 法の両者で肺を切り出し、組織標本を作製した。肺組織標本における TiO₂の各 肺葉間の分布及び各葉内の分散性を比較した。また、左葉の異なる断面の比較 と葉内部位による比較を行った。

2.6.1 試験材料及び試験方法

2.6.1.1 被験物質及び媒体

使用した被験物質及び媒体は、「2.1.1.1 被験物質及び媒体」と同様である。 なお、調製濃度は 2.5 mg/ml とした。

2.6.1.2 試験動物及び飼育条件

試験動物及び飼育条件は、「2.1.1.2 試験動物及び飼育条件」と同様である。

2.6.1.3 投与

12 週齢の雄 F344 ラット(10 匹) に、TiO₂ 懸濁液を 4 回気管内投与した(総 投与用量: 10 mg/ml)。

2.6.1.4 肺サンプルの採取及び肺組織標本の作製

TiO₂ 最終投与翌日、イソフルラン吸入麻酔(2~3%)下で腹大動脈より放血 し、安楽死させた。肺を摘出し、10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定し た。病理組織標本の作製は、肺各葉からブロックを切り出し後、パラフィン包 埋、薄切し、特殊染色(ケルンエヒトロート染色)を行った。さらに、病理組 織学的検査用にヘマトキシリン・エオジン染色を行った。

2.6.1.5 Image Analyzer による解析

肺組織標本は、バーチャルスライドに取り込み、画像診断装置による各肺葉間の分布及び各葉内の分散性についての確認を行った。分布及び分散性の確認は、単位面積当たりの被験物質検出数と検出面積を測定した。また、併せてTiO2 肺組織標本については、光学顕微鏡による病理組織学的検査を行った。なお、 Image Analyzer による解析は以下の項目について行った。
(1) 切り出し方法の比較

文献による手法 (A 法、Kittela et al., 2004) と日本バイオアッセイ研究 センターの手法 (B 法) で切り出し、両手法による比較を行った (図②(b-2)-34)。

(2) 左肺の異なる断面の比較

左葉 3 断面を B 法により切り出し、異なる断面による比較を行った(図② (b-2)-35)。

(3) 左肺の葉内部位による比較

(2)のB法により切り出した左葉の中間断面(部位b)について、葉内部位 による比較(肺尖側と横隔膜側)を行った(図②(b-2)-36)。



図②(b-2)-34 切り出し方法の比較:肺組織標本の切り出し部位



図②(b-2)-35 左肺の異なる断面の比較:左肺組織標本の肺切り出し部位



図②(b-2)-36 左肺の葉内部位よる比較:解析部位

2.6.2 結果

2.6.2.1 切り出し方法の比較

Image Analyzer による左葉の解析画像の例を図②(b-2)-37 に示す。Image Analyzer による解析画像より、TiO₂粒子は各葉とも局在的に分散しており、葉 内での均一性はみられなかった。太い気管支が出ている切片では、その周囲で の分布が比較的高く、遠方部位での分布が低い傾向であった。

各肺葉の単位面積当たりのTiO2検出数及び検出面積を図②(b-2)-38に示す。 各葉での単位面積当たりのTiO2検出数は、両手法とも右後葉と左葉の検出率が 比較的高く、各葉による差が認められた。しかし、各葉での検出数の傾向は手 法による顕著な差は認められなかった。また、検出面積についても同様の傾向 がみられた。なお、病理組織学的検査では、観察された所見及びその発生頻度 とも両手法で差はみられなかった。

文献による手法(A法)

日本バイオアッセイ研究センター手法(B法)



図②(b-2)-37 Image Analyzer による左肺の解析画像の例 (TiO₂検出部位は緑色のドットで表示)



図②(b-2)-38 各肺葉の単位面積当たりの TiO₂検出数及び検出面積

2.6.2.2 左肺の異なる断面の比較

左葉各断面の単位面積当たりの TiO₂ 検出数及び検出面積を図②(b-2)-39 に 示す。単位面積当たりの TiO₂検出数及び検出面積とも、切り出し断面による差 が認められた。TiO₂検出数及び検出面積は、c 断面(上側面) ≧ b 断面(中間 面) > a 断面(下側面)であった。すなわち、a 断面と b 断面の差に比べて、 b 断面と c 断面の差は比較的少なかった。



図②(b-2)-39 左葉各断面の単位面積当たりの TiO2 検出数及び検出面積

2.6.2.3 左肺の葉内部位による比較

左葉内部位による単位面積当たりの TiO₂ 検出数及び検出面積を図② (b-2)-40 に示す。単位面積当たりの TiO₂ 検出数及び検出面積とも、横隔膜側 >肺尖側であり、葉内部位による差が認められた。





2.7 病理組織診断検討会の実施

本プロジェクトの動物実験実施機関(産業医科大学、化学物質評価研究機構、 日本バイオアッセイ研究センター)が実施した病理検査での所見が妥当である かを確認するため、病理組織診断検討会(病理ピアレビュー)を実施した。ナ ノ材料を気管内投与したラット肺の病理検査について、各機関から提出された 病理組織標本を2名の毒性病理専門家が検鏡し、各機関での病理診断の確認を 行った。これに加えて、プロジェクト参加の各機関の間における病理診断用語 の統一について検討した。

2.7.1 実施方法

各病理組織標本について、レクチャー用光学顕微鏡を用いて病理ピアレビュ ーの実施者が検鏡を行い、各機関から提出された病理組織診断の確認を行った。 また、レクチャー用光学顕微鏡とテレビ装置を用いて各機関の病理診断者を含 む担当者が病理ピアレビュー実施者と同じ画像を観察し、討議を行った。

実施標本:産業医科大学からの提出標本(計10枚)、化学物質評価研究機構 からの提出標本(計26枚)、及び日本バイオアッセイ研究センターからの提出 標本(計9枚)

2.7.2 実施結果

使用している病理組織所見の用語については、各機関の間に差異があった。 炎症を記載する際に、炎症だけを記載する機関、炎症の経過(急性炎症あるい は慢性炎症を記載)を記載する機関、炎症の部位(気管支周囲、肺胞内等)を 記載する機関があった。レビュー実施者からは、部位を特定して病理組織所見 を記載することがより好ましいというアドバイスがあった。

また、提出された病理組織標本の中に肺胞蛋白症と推定される例があり、肺 胞蛋白症の確認には PAS 染色による診断が標準的に用いられており、提出され た PAS 染色を実施した標本から、肺胞蛋白症であると確認できた。ただし、よ り精度の高い診断のためには、サーファクタント蛋白の免疫組織化学的染色等 により確認することが望ましいとの意見があり、後日これを確認した。 3. まとめ

3.1 気管内投与試験の標準的手法として適切な投与回数に関する検討

(成果 2.1 から 2.3)

二酸化チタン(TiO₂)、酸化ニッケル(NiO)、多層カーボンナノチューブ(MWCNT) を用いた単回投与と複数回投与の比較検討では、投与総量が同じ場合、投与回 数の違いによる反応は質的には同等であった。

TiO₂では、反応の程度は、3日目の BALF 検査では、概ね単回投与が最も強く、 投与回数の増加に伴い減弱した。また、病理組織学的検査では、投与回数によ る顕著な差は認められなかった。

Ni0 では、反応の程度は、3 日目の BALF 検査では、単回投与より複数回投与 で程度が増強した。28 日目の BALF 検査では、単回投与と複数回投与で同程度 か複数回投与でやや増強したが、臓器重量と病理組織学的検査ではほぼ同程度 であった。また、91 日目の臓器重量と病理組織学的検査では、単回投与と複数 回投与でほぼ同程度であった。

MWCNT では、反応の程度は、3 日目の BALF 検査では、単回投与より複数回投 与で程度が減弱した。28 日目の BALF 検査及び病理組織学的検査では、単回投 与と複数回投与で同程度であった。また、91 日目の病理組織学的検査では、単 回投与と複数回投与でほぼ同程度であった。

肺沈着量を最終投与後4時間目から91日目まで測定した結果、各測定期に おける全肺葉中のTiO₂、MWCNT、NiO沈着量及びその継時的推移に、単回投与と 複数回投与で顕著な差は認められなかった。また、各肺葉の分布は、各測定期 とも後葉と左葉に多く分布したが、各葉重量当たりに換算した濃度(mg/g, μ g/g)では、後葉、副葉及び左葉でほぼ同程度であり、投与回数による明らか な差はみられなかった。

以上のように、投与総量を同じにして、単回投与と最大4回までの複数回投 与のデータを比較すると、反応の程度は3材料によって差がみられたものの、 反応の質的変化においては同様であり、いずれの投与回数においても毒性影響 をとらえることは可能であると考えられる。従って、複数回投与による動物へ の負荷や実験デザインの煩雑さを考慮すると、スクリーニング試験としての気 管内投与の回数は、単回投与で評価が十分可能である。なお、被験ナノ材料の 物性等によっては、投与媒体中での分散性等を考慮し、低濃度の分散液しか調 製できない場合は、複数回投与を取り入れることで評価が十分可能である。

気管内投与試験の標準的手法として適切な投与回数に関する見解は、研究開 発項目②(b-1)による「ラットを用いたナノ材料の気管内投与試験の標準的 手順書(試案)」に含めて公開した。 3.2 気管内投与試験と既存吸入暴露試験結果の比較(成果 2.4)

多層カーボンナノチューブの既存の吸入暴露試験報告による肺沈着量を考 慮した用量設定を行い、気管内投与試験(単回及び4回投与)と既存の吸入暴 露試験結果との比較を行った。

気管内投与試験と既存の吸入暴露試験との比較では、吸入暴露試験でみられ た肺の所見は、気管内投与試験でも認められた。しかし、肺胞 I 型上皮細胞の 過形成は吸入暴露では認められないものの、気管内投与では多くの動物にみら れた。また、肺胞壁の線維化は、気管内投与に比べて吸入暴露での発生率が高 かった。気管内投与および吸入暴露の両方とも、ラットの肺上皮及び間質の変 化を誘発し、生じた病変は質的に同じであった。しかし、気管内投与は、肺に より重度の上皮病変を誘発する可能性があった。

3.3 動物系統の違いによる生体反応の差異の検討(成果 2.5)

F344、Wistar Hannover、Harlan SD ラットの3系統間で、二酸化チタン投与 による生体反応は、肺所見において質的に同等の変化であり、その反応の程度 に系統間でほとんど差はみられなかった。したがって、本プロジェクトで使用 することとした F344 ラットは、他系統と比較して、試験結果を評価する上で 問題がないことを確認した。

3.4 肺組織標本作製方法の統一化の検討(成果 2.6)

二酸化チタンをラットに気管内投与し、公表文献による手法と日本バイオア ッセイ研究センターの手法の両者で組織標本を作製した。肺組織標本における Ti02の各肺葉間の分布及び各葉内の分散性を比較した。また、左葉の異なる断 面の比較と葉内部位よる比較を行った。その結果、2種類の組織標本作製法に より、単位面積当たりのTi02の検出数と検出面積は、両手法で顕著な差はみら れなかった。また、病理組織学的検査では、観察された所見及びその発生頻度 とも両手法で差はみられなかった。従って、両手法とも同様の病理組織学的評 価が十分可能であると考えられる。左肺の異なる断面の比較では、切り出し部 位及び葉内部位により、検出数と検出面積に差が認められることから、切り出 しの際には、病変と気管支との関連が把握しやすい太い気管支断面が出るよう な肺葉の切り出しによる切片が適切であると考えられる。気管内投与による各 肺葉間の分布や葉内の分散性には差が認められることから、病理組織学的検査 では肺全葉の検索が望ましいと考えられる。 3.5 病理組織診断検討会の実施(成果 2.7)

ナノ材料を気管内投与したラット肺の病理検査について、本プロジェクトの 動物実験実施機関(産業医科大学、化学物質評価研究機構、日本バイオアッセ イ研究センター)の病理組織標本を2名の毒性病理専門家が検鏡し、各機関か ら提出された病理診断の確認を行った。これに加えて、プロジェクト参加の各 機関の間における病理診断用語の統一について検討した。その結果、病理組織 所見の用語には各機関の間で差異が存在したが、各機関の病理検査の結果の判 断はいずれも適切であることが確認された。

4. 参考文献

- Aiso S, Yamazaki K, Umeda Y et al. (2010). Pulmonary toxicity of intratracheally instilled multi-wall carbon nanotubes in male Fischer 344 rats. Ind Health 48: 783-795.
- Kasai T, Umeda Y, Ohnishi M et al. (2015). Thirteen-week study of toxicity of fiber-like multi-walled carbon nanotubes with whole-body inhalation exposure in rats. Nanotoxicology 4: 413-422.
- Kittela B, Ruehl-Fehlertb C, Morawietzc G et al. (2004). Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice - Part 2: A joint publication of the RITA and NACAD groups. Exp Toxic Pathol 55: 413-431.
- Ohnishi M, Yajima H, Kasai T et al. (2013). Novel method using hybrid markers: development of an approach for pulmonary measurement of multi-walled carbon nanotubes. Journal of Occupational Medicine and Toxicology 8: 30.

研究開発項目②初期有害性情報取得のための低コスト・簡便な有害性評価技術 の構築

(c) エアロゾルの安定発生手法の構築

国立研究開発法人産業技術総合研究所

-再委託・国立大学法人広島大学大学院工学研究院

1. 目的

研究開発項目②「初期有害性情報取得のための低コスト・簡便な有害性評価 技術の構築」では、気管内注入試験の有害性評価手法としての位置付けを吸入 暴露試験との比較検討により明らかにすること、および、両試験法の比較検討 をより合理的に行うためのエアロゾルを作成する技術を開発することが目指 されている。このため、吸入暴露試験に適したエアロゾル試料の発生技術と、 このエアロゾル試料を用いて吸入暴露試験を実施するための技術が不可欠で あり、本研究ではこのための研究開発を行う。

エアロゾル試料の発生のためには、既製ナノ材料のエアロゾル化手法として 種々の利点を有する噴霧乾燥法を検討する。図②(c)-1 に、噴霧乾燥法にもと づくエアロゾル発生とその吸入暴露試験への適用の概念を、本研究の期間にわ たって検討する事項および目指す成果と併せて、模式的に示した。試験材料の 懸濁液より出発してエアロゾル粒子を得る工程において、液材料の供給、液滴 制御・乾燥のプロセスに工夫を加え、それらの有効性を検証することで、エア ロゾル粒子の濃度やサイズ、形状等の制御性の改善と制御範囲の拡張、および 吸入暴露試験時に供給するエアロゾルの性状の経時安定性の向上を図る。これ により、気管内注入試験との比較の観点から考察される、吸入暴露用エアロゾ ルとして適する性状を実現することを目指す。さらに、エアロゾル粒子を暴露 試験用容器へと供給するための輸送系も構築する。以上の知見、技術を総合し て、研究開発項目②課題(a)の吸入暴露試験の実施に寄与する。

研究の過程では、発生特性の検討実験および吸入暴露試験でのエアロゾル性 状を詳細に評価し、試験ナノ材料の性状との相関を整理することで、上記吸入 暴露試験で用いる試験材料以外の材料についても、エアロゾル化する方法を考 察する。最終目標として、平成27年度末までに、吸入暴露試験用エアロゾル を得る手法の指針をとりまとめて公開する。

220



図②(c)-1 噴霧乾燥法によるエアロゾル発生・吸入暴露試験への適用の概念 と研究事項、目指す成果

以上の目標をふまえて、エアロゾル発生系を構築・使用して、エアロゾルの 生成プロセスに関わる操作因子と、発生したエアロゾル粒子の性状の関係を実 験的に調べ、吸入暴露試験に供し得るエアロゾルを発生させるための適切な条 件を探索した。具体的には、酸化ニッケル(NiO)ナノ粒子、二酸化チタン(TiO₂) ナノ粒子、二酸化セリウム(CeO₂)ナノ粒子、酸化亜鉛(ZnO)ナノ粒子の懸濁液を 対象として、マイクロゾル発生装置等を用いてエアロゾル粒子を噴霧乾燥法で 連続発生させる実験により、懸濁液ならびに発生操作に関わる条件とエアロゾ ル粒子のサイズや形態との関係を調べた。また慣性力と静電気力による液滴・ エアロゾル処理技術の適用によって粒子のサイズや濃度を制御する方法の検 討を行った。

次に、項目②(a)の担当者が管理する吸入暴露システムにエアロゾル発生系 を接続して、各ナノ粒子の吸入暴露試験を実施した。この試験では、試験粒子 の気中濃度に目標値が設定された。この試験の結果を、同じナノ粒子材料の気 管内投与試験の結果と比較できるようにするために、粒子の肺内保持量への着 目、および肺内保持量と気中濃度の相関より、目標値は、質量濃度として1~ 2 mg/m³または10 mg/m³程度と設定された。この値は、(独)新エネルギー・産 業技術総合開発研究機構の「ナノ粒子特性評価手法の研究開発」プロジェクト

(H18~22 年度) で行われた Ni0 ナノ粒子の吸入暴露試験における質量濃度の 値のおよそ 10~50 倍である。本研究開発の吸入暴露試験では、この高濃度化 を実現すべく、液滴・エアロゾルの処理における条件を探索した。さらに、以 上の結果、成果に対する考察を行って、エアロゾルの発生・制御・輸送系の性 能の評価を行い、その結果を整理した。

- 2 エアロゾル粒子の発生手法の検討
- 2.1 用いたナノ粒子について
- 2.1.1 Ni0 ナノ粒子

研究開発項目①課題(b)「同等性評価のための試料調製技術とキャラクタリゼ ーション」を担当する国立研究開発法人産業技術総合研究所ナノ材料研究部門 の研究者グループ(以下、AIST-NRI Gr)により調製された懸濁液試料を用いて、 エアロゾルの発生条件について調べた。この懸濁液は公称平均径が15-35 nm の NiO 粒子を含むものであり、超音波と遠心分離処理が施されたものである。また、 質量濃度は1.8 mg/ml である。この懸濁液を基板(シリコンウェハの小片)に滴 下して乾燥させたものを走査型電子顕微鏡(SEM)で撮った写真を図②(c)-2 に 示す。粒子サイズは公称径に近く、形はほぼ球形である。



図②(c)-2 Ni0ナノ粒子の懸濁液乾燥物の写真

2.1.2 TiO₂ナノ粒子

吸入暴露試験では、AIST-NRI Gr により調製された、公称平均径が約28.8 nm の TiO₂ 粒子(MT-150AW)を含む懸濁液を使用した。この懸濁液を平滑基板に滴 下して乾燥させたものの SEM 写真を図②(c)-3 に示す。粒子サイズは公称径に近 く、形は紡錘状であることがわかる。



図②(c)-3 TiO₂ナノ粒子の懸濁液乾燥物の写真

2.1.3 CeO₂ナノ粒子

AIST-NRI Gr により調製された、公称平均径が約 10 nm の CeO₂粒子(和光)を 含む懸濁液を使用することとした。

2.1.4 Zn0 ナノ粒子

AIST-NRI Gr により調製された、公称平均径が約 35 nm の Zn0 粒子 (Aldrich) を含む懸濁液を使用することとした。

2.2 エアロゾルの発生装置と方法

エアロゾルの発生実験のために用いた実験系を図②(c)-4に示す。マイクロゾ ル発生装置では、ナノ粒子の懸濁液をステンレス製細管を経由して 2 流体ノズ ルに送り、加圧空気で噴霧して液滴化した。気流に同伴させた液滴を、壁を 100 ℃に加熱した金属配管を通して乾燥させることで固体粒子のエアロゾルを 得た。ここで、ノズルから液滴が噴出する空間である噴霧チャンバーも、外壁加 熱できるように電気ヒーターで覆い、液滴の蒸発を迅速化する場合には、壁温が 150 ℃となるようにした。発生させたエアロゾル粒子の粒子径分布は、走査型移 動度粒子径測定器(SMPS; 微分型静電分級器(DMA)と凝縮粒子計数器(CPC)の 組み合わせ)により、インライン測定した。また、ナノ粒子モニターによるエア ロゾル粒子の表面積の計測、およびエレクトロメーターによる粒子の帯電状態 の計測も行った。さらに、粒子を走査型電子顕微鏡(SEM)により観察するため に、静電捕集器を用いて平滑基板(シリコンウエハの小片)表面に捕集した。



図②(c)-4 エアロゾル発生のための実験系

2.3 エアロゾルの発生条件の検討

Ni0 懸濁液試料からエアロゾルを発生させる際の最適な実験条件を検討した。 吸入暴露試験に適用する様態を考慮して、懸濁液を超純水で希釈した。質量濃度 を1.2 mg/ml に調整し、撹拌と超音波処理を行ったうえで使用に供した。

2.3.1 液流量の調整

マイクロゾル発生装置では、懸濁液が入っているコンテナを加圧することで 液を2 流体ノズルに供給している。コンテナの圧力と懸濁液の供給流量の関係 を計測した結果を、図②(c)-5 に示す。圧力を上げることで液流量が概ね直線的 に増加していることがわかった。



図②(c)-5 コンテナに加えた圧力と懸濁液供給液流量の関係

2 流体ノズルに供給する加圧ガスの流量を一定にした条件で、懸濁液の液流量 を変化させたときの、発生エアロゾルの粒子径分布の例を図②(c)-6 に示す。コ ンテナの圧力(図中の0.2, 0.3 MPa)を上げても、すなわち液流量を増加させ てもピーク粒子径はほぼ変わらず、一方で粒子の個数濃度は増加していること がわかった。これは液流量が多くなると、発生液滴の数が増すためだと考えられ る。



図②(c)-6 液流量の違いによる粒子径分布の変化

吸入暴露試験の連続試験時間、エアロゾル発生系に一度に仕込める懸濁液の 体積、さらに懸濁液の調製可能量を勘案すると、流量すなわち液の消費速度には 制約があり、図②(c)-5中に線で示した値が現実的な上限と見積もられた。図② (c)-6の粒子径分布を得た実験の結果から、コンテナの圧力が 0.2 MPa の場合で もエアロゾルの発生量が十分であると考え、以下の実験・試験ではこの条件を採 用した。

2.3.2 加圧ガス流量の調整

次に、懸濁液流量を一定にしたうえで、2 流体ノズルに供給する加圧ガスの流 量を変化させた。粒子径分布の例を図②(c)-7 に示す。ガス流量が増加すると個 数濃度が増加していることがわかる。質量濃度も、流量の増大にともない増加し た。これはガス流量の増加により液滴が破砕されやすくなり、液滴の個数が増え たためだと思われる。そのため液滴径が小さくなり、特に粒子径が小さいエアロ ゾルが多く生成したと考えられる。



図②(c)-7 ガス流量の違いによる粒子径分布の変化

2.3.3 エアロゾル粒子の性状

以上の実験で発生したエアロゾル粒子を静電捕集器によって捕集し、SEM によって観察を行った。図②(c)-8 に示した SEM 像より、エアロゾル粒子は良好な分散状態で発生していることがわかる。図②(c)-8 のエアロゾル粒子はマイクロゾル発生装置で得られたものであるが、エアロゾルジェネレーター、ならびに液滴粒子発生器でも、図②(c)-8 と同様の分散状態、形態をもつ粒子が発生されたことが確認され、別の2 流体ノズルおよび液滴発生法も、粒子の気中分散に有効であることがわかった。



図②(c)-8 発生エアロゾル粒子の SEM 像

2.4 迅速蒸発による慣性損失抑制

2.4.1 液滴損失の発生エアロゾルへの影響

乾燥粉体に何らかの外力を与えて気流に同伴させる乾式のエアロゾル発生法 は、工業材料粒子の吸入暴露試験用に多く用いられてきているが、気中分散され る粒子の多くはマイクロメートル~サブミクロンオーダーのサイズとなる。湿 式のエアロゾル発生法は、乾式法に比べて発生エアロゾル粒子のサイズをナノ 粒子レベルまで小さくできるメリットを有するが、エアロゾル粒子の個数・質量 濃度が低いことが課題である。ところで、近年の吸入試験は数週間にわたること が多いこと、およびエアロゾル粒子の一次粒子径に加え、凝集体を含めた濃度が 有害性に及ぼす影響にも興味が高まっていることをふまえると、試験用の工業 材料試料の使用量を抑えつつ、吸入可能なサイズの粒子として、高濃度のエアロ ゾルを効率的に生成することの重要性が増しているといえる。

湿式法におけるエアロゾルの低濃度の主因は、大きな粒子を生成する確率の 高い大きな液滴が、気流の流路で慣性衝突によって損失してしまうことにある。 とくに質量濃度の観点からは、大きな粒子の数が減ることは、エアロゾルの総濃 度を大きく低下させることにつながる。そこで本項目では、大きな液滴の慣性衝 突損失を抑制することで、エアロゾルの生成効率を上げ、濃度を上昇させること が可能かどうかを検討する。

図②(c)-9に損失抑制のための方法の概念を示す。流路中で気流によって移動 する液滴のうち、大きなサイズのものは慣性によって気流から逸脱し、流路内壁 に衝突した液滴中の粒子はエアロゾル粒子化することなく壁面に付着してしま う。ここで流路内の空気を加熱して液滴を迅速に蒸発させれば、液滴サイズがす ばやく減少することから、慣性衝突する液滴の割合を減らせると考えた。そこで、 液滴が噴出される容器(噴霧チャンバー)にヒーターを巻いて加熱し、エアロゾ ル粒子の発生実験を行った。



図②(c)-9 液滴の慣性衝突損失とその抑制方法の概念

2.4.2 実験結果

図②(c)-9 に示した方法の効果を確かめるために、噴霧チャンバーの壁面の加熱・非加熱がエアロゾル粒子に及ぼす影響を調べる実験を行った。図②(c)-10 に Zn0 ナノ粒子懸濁液を用いたエアロゾル発生時に迅速蒸発を行った場合、行わなかった場合の粒子径分布を示す。図②(c)-10 に示す通り、迅速蒸発を行うと粒子の個数濃度が増加した。その際の質量濃度の関係を図②(c)-11 に示す。 図②(c)-11 から質量濃度がおよそ2 倍に増加したことが分かった。これは噴霧 直後の液滴を加熱することで迅速に蒸発させ、配管との衝突を低減し、粒子の損 失が低減されたためであると考えられる。迅速蒸発による損失抑制は他の粒子 でも効果的であることが確認できた。







図②(c)-11 迅速蒸発を行うことによる質量濃度の変化

2.5 液滴荷電による液滴サイズの調整

2.5.1 クーロン爆発による液滴の破砕

粗大液滴の存在は、それらが衝突損失することによりエアロゾル粒子の個数・ 質量濃度の低下につながるが、液滴損失が起こらない場合でも、大きな凝集体エ アロゾル粒子の生成の原因となる。2 流体ノズルから放出される液滴のサイズ分 布は、液の物性や噴霧条件に依存することは知られているが、これらを変化させ て分布を制御し、粗大液滴を減らすことは容易ではない。そこで、噴霧直後の液 滴を破砕して、より小さい液滴に変換することを試みた。

図②(c)-12 に、液滴の破砕プロセスの概念図を示す。液滴が大きいほど、よ り多数個のナノ粒子が含まれる確率が高いため、乾燥後のエアロゾル粒子のサ イズは大きくなる傾向にある。ここで、乾燥前の液滴粒子に正負いずれかの極性 の(単極の)電荷を十分に与えると、サイズが蒸発によってある程度小さくなっ た時点で、破砕してより小さい複数の液滴に分かれることが期待される。これは、 液滴内の正味電荷が保たれたままで液滴サイズが減少すると、サイズに依存す るレーリー限界(保持できる最大の電荷量)を超え、いわゆるクーロン爆発が生 じることによる。小さな液滴からは、より小さなエアロゾル粒子が乾燥後に生成 すると考えられる。



2.5.2 液滴破砕の効果の確認実験

2.5.2.1 粒子発生の実験系

液滴破砕によるエアロゾル粒子発生実験系を図②(c)-13 に示す。まず粒子懸 濁液から二流体ノズルによりチャンバー内へ液滴が供給される。一方チャンバ ー側面に設置した放電部よりイオンは供給される。放電部では放電電極に電圧 を印加することでイオンが生成され、キャリアガスによってチャンバーに送ら れる。これらの液滴とイオンがチャンバー内で混合し、液滴は荷電される。荷電 液滴は気流に同伴され、チャンバー出口の加熱した配管を通ることで固体粒子 となる。生成した固体粒子は、走査型移動度粒子径測定器(SMPS; 微分型静電分 級器 (DMA) と凝縮粒子計数器 (CPC) の組み合わせ) により粒子径分布の測定を行った。本実験では、NiO 粒子 (US3355) 懸濁液からエアロゾルを発生させた。



図②(c)-13 液滴破砕によるエアロゾル粒子発生実験系

2.5.2.2 印加電圧を変化させたときの粒子径分布

放電電極へ印加する電圧を変えた時の粒子径分布を図②(c)-14 に示す。印加 電圧が0kV、すなわち無荷電の場合、80 nm 付近にピークが現れた。この大きさ の粒子は、粒子径が15-30 nm である一次粒子の凝集体である。印加電圧が約5 kV の場合、無荷電時と粒子径分布の変化はなかった。約10 kV の場合、非凝集 粒子の個数濃度が大幅に増加した。印加電圧は電極から生成されるイオンの量 に大きく関わるため、液滴破砕には液滴荷電部でのイオン濃度が大きく寄与し ていると考えられる。



2.5.3 迅速蒸発と液滴荷電の質量濃度への影響

迅速蒸発と液滴荷電がエアロゾル粒子の気中質量濃度に与える影響を調べた。 エアロゾル粒子にはNi0懸濁液を用いて発生させた。図②(c)-15の縦軸の値は、 吸入暴露試験でのエアロゾルの輸送、希釈条件を想定して、質量濃度の実測値を 換算したものである。迅速蒸発も液滴荷電も行わなかったとき(図中の通常噴霧) に比べ、迅速蒸発では質量濃度が増大する。ただし、上述したように、粒子径は 大きくなってしまう。液滴荷電のみ行ったとき(図中、放電)には、質量濃度は 減少した。ここで迅速蒸発を併用すると、最も質量濃度は高くなった。迅速蒸発 が液滴破砕を加速し、したがって液滴の壁面損失が抑制されたことが原因のひ とつとして考えられる。原因を詳細に検討することで、最適な条件群が見いだせ ると考えられ、このことは今後検討すべき課題である。



図②(c)-15 迅速蒸発と液滴荷電が質量濃度に与える影響

2.5.4 液滴破砕におけるイオン濃度の測定

ナノ粒子懸濁液の噴霧乾燥にこの液滴破砕を組み合わせることで、ナノ粒子 を非凝集状態で気中分散することに成功した。しかし液滴が破砕されずに発生 した凝集粒子も存在した。さらにどのような条件で破砕が起こるのかを検討す るため、実験的および理論的な検討を行った。評価方法としては、実際にイオン 濃度を測定し、その結果を理論式に適用することで、実験から得られた粒子径分 布と比較した。

2.5.4.1 間接的なイオン濃度測定実験

電圧の違いすなわちイオン濃度の違いが液滴破砕に対してどのような影響を 与えるかを検討するため、放電によって生成されたイオン濃度の測定実験を行 った。まずチャンバー内でのイオン濃度を測定するため、図②(c)-13 の放電部 を取り外し、図②(c)-16 のようにエレクトロメーターに直接接続することでイ オン濃度の測定を試みた。



図②(c)-16 イオン濃度測定のための実験系 I

しかしこの方法では低電圧の場合は測定可能であったが、高電圧ではイオン 濃度が高く、当グループ所有のエレクトロメーターの測定限界を超えてしまっ た。しかし放電部とエレクトロメーターの間に配管を接続することで、低電圧 の放電ではイオン濃度の減少が確認された。これは放電によって発生した気中 イオンは配管に接触すると損失してしまうためである。そこで配管でのイオン 損失率を測定することで、あえてイオンを損失させてイオン濃度を測定すれ ば、高電圧の放電で生成するイオンの濃度が測定できると考えた。そこで図② (c)-17に示す実験系を構築した。ここで測定したいイオン濃度は図②(c)-17 中位置①での濃度である。エレクトロメーターの測定値から、位置①でのイオ ン濃度を求めるには、この測定用流路、すなわち位置①からエレクトロメータ ーに至る流路をイオンがどの程度通過するかという「イオン通過率」を求める 必要がある。そこでまず直管部のみについて管長を変えたときのイオン通過率 を測定した。その結果を図②(c)-18に示す。グラフから管長と通過率の対数値 が直線関係となり、したがって直管では管が長くなるにつれ指数的にイオン濃 度が減少していくことが分かった。同様にしてチャンバー・曲がり管・希釈装 置での通過率をそれぞれ求めた。



図②(c)-17 イオン濃度測定のための実験系Ⅱ



図②(c)-18 直管でのイオン通過率

これらの通過率を掛け合わせることで、測定系全体の通過率を求めた。その 後、エレクトロメーターの測定値を系全体の通過率で除することで、位置①で のイオン濃度を推定した。その結果を表1に示す。印加電圧が5 kV を超える とイオン濃度は大幅に増加し、5 kV 以下に比べ10 kV の場合はおよそ5 桁高く なることが分かった。

表②(c)-1 位置①での推定イオン濃度

印加電圧 [kV]	3	5	7	10
 イオン濃度 [個/cm³]	3×10^{6}	3×10^{6}	5 × 10 ¹⁰	1 × 10 ¹¹

2.5.4.2 直接的なイオン濃度測定実験

実験装置の概略図を図②(c)-19 に示す。放電部に設置した放電電極に電圧を 印加することで正イオンが生成される。発生したイオンをファラデーカップで 捕捉、流れた電流値をエレクトロメータで測定した。その電流値より以下の式を 用いてイオン濃度 Nを算出した。

$$N = \frac{I}{en_{\rm p}q_{\rm e}}$$

ここで eは電気素量(1.602×10⁻¹⁹ C)、 n_{μ} は気中イオンの持つ電荷の量(=1)、 q_{μ} は流量[cm³/s]、/は測定電流値[C/s]である。



図②(c)-19 イオン濃度測定実験の概略図

また放電部には以下の4種類を用いた。



図②(c)-20 放電部の種類

放電部 A はエアロゾル発生に用いた放電部である。放電部 B は A の放電電極 近傍の管径を太くすることによって、火花放電の抑制を試みた。放電部 C では 放電部 B の電極を変え、電極を針とし、また近傍の気流出口を非常に補足する ことで、放電電極から発生したイオンを高速で放出できるようにしたものである。

放電部 A を用いて、予備実験装置で測定あるいは推定したイオン濃度と、新 たに製作したイオン濃度計測器で測定したイオン濃度との比較を図②(c)-21 に 示す。印加電圧が2 kV までは放電が起こらず、印加電圧が4 kV の場合はコロ ナ放電が起こり、さらに印加電圧を6 kV 以上にすると火花放電が起こることが 分かっている。コロナ放電が起こることで急激にイオン濃度が上昇し 1.8×10⁶ 個/cm³のイオンが発生したことがわかった。このイオン濃度は 2.5.4.1.で用い た計測器でも直接測定することが可能であり、またほぼ同程度のイオン濃度と なったため、製作したイオン濃度計測器の測定は可能であることが分かった。6 kV 以上の電圧を印加することで火花放電が起こると、イオン濃度は更に 4 桁程 高くなった。このイオン濃度も 2.5.4.1 で推定したイオン濃度と同程度であっ た。



図②(c)-21 印加電圧を変化させた時のイオン濃度

製作したイオン濃度計測器の性能評価が出来たため、放電部 C を用いた 10 kV 以上の高電圧を印加したイオン濃度測定実験を行った。結果を図②(c)-22 に示 す。4 kV からコロナ放電が起こり、2.3×10⁶ 個/cm³程度のイオンが発生した。 さらに電圧を上げていくと、発生イオン濃度が上昇したが、オーダーが変わるほ どの変化は見られなかった。



図②(c)-22 放電部Cを用いて印加電圧を変化させた時のイオン濃度

2.5.4.3 液滴荷電チャンバー内でのイオン濃度測定

図②(c)-23 に示す実験系に図②(c)-20 の放電部 B[~]D を接続し印加電圧を変 化させることで、チャンバー内でのイオン濃度を測定した。



図②(c)-23 チャンバー内のイオン濃度測定実験系

放電部 B はチャンバーに直接取り付ける必要があり、液滴と混合する部分で のイオン濃度が測定できない問題があった。そこで放電部 A, C をもちいてチャ ンバーに接続・未接続の場合それぞれのイオン濃度を測定し、チャンバーのイオ ン通過率を測定した。図②(c)-24 に各放電部でのイオン濃度を示す。チャンバ 一内のイオン通過率を

チャンバーのイオン通過率=<u>チャンバー</u>接続時のイオン濃度 チャンバー未接続時のイオン濃度

とするとどちらの放電部の場合でもイオン通過率は2.3%となった。



図②(c)-24 各放電部でのイオン濃度

この通過率を用いて算出した、全ての放電部でのチャンバー内のイオン濃度 を図②(c)-25 に示す。放電部 C が最も高いイオン濃度を示した。



図②(c)-25 各放電部を用いたチャンバー内のイオン濃度

次に推定したイオン濃度を用いた理論的な考察を行った。単極イオンと粒子

^{2.5.4.4} 理論との比較

(液滴を含む)が混在する場合、粒子とイオンはブラウン運動によって衝突し荷 電される。これは拡散荷電と呼ばれる。ここで荷電開始時の液滴径が d, である 液滴が、t 秒間に拡散荷電によって荷電された時の荷電数 n は以下の(1)式で表 される¹⁾。

$$n = \frac{d_{\rm p}kT}{2e^2} \ln \left[1 + \frac{\pi d_{\rm p}c_{\rm i}e^2 N_{\rm i}t}{2kT} \right]$$
(1)

(ただし、e: 電気素量、k: Boltzmanm 定数、T: 温度、ci: イオンの平均速度、
№: イオン濃度、t: 滞留時間; cgs 単位系)

しかし、液滴はその粒子径に応じて限界荷電数 n があり、これをレーリー限 界と呼ぶ。液滴の荷電数がこの n に達すると、液滴内の電荷間の反発力が表面 張力の限界を超え、液滴が破砕される。この n は次式で与えられる¹⁾。

無荷電時での粒子径分布から初期液滴径は 3.5 μ m と仮定して、表②(c)-1の 推定イオン濃度を用いて拡散荷電による液滴の荷電数 $n \in (1)$ 式から求めた。し かしこの値は(2)式で得られる nよりもはるかに小さかった。実際の液滴破砕を 用いたエアロゾル発生では液滴からの水の蒸発が起こる。蒸発すると液滴径は 小さくなるため、限界荷電量 nも減少する。そこで(2)式を変形し、荷電数 nで 荷電された液滴が蒸発によって縮小し、破砕が開始されるときの液滴径 d_{μ} の式 を導いた。それを(3)式に示す。

$$d_{\rm pL} = \left(\frac{e^2 n^2}{2\pi\gamma}\right)^{1/3} \tag{3}$$

その結果から考えられる液滴破砕現象の概略図を図②(c)-26 に示す。印加電 圧が5 kV の場合、理論計算上は3.5 μm の液滴が乾燥して25 nm になると破砕 される。しかし本研究で用いた NiO 粒子の一次粒子径は15~30 nm であるので、 25 nm では液滴が既にほぼ乾燥しきっているため破砕は起こらないと考えられ る。一方10 kV の場合は、液滴は60 nm になると破砕される。60 nm では液滴と して存在しているものもあるので液滴破砕が起こり、その結果非凝集粒子を発 生できたと考えられる。

以上より、図②(c)-14 の粒子径分布で 10 kV のときのみ非凝集粒子の個数濃度が増加したのは、荷電数が多く液滴破砕が起こったためであると説明できた。

$$n_{\rm L} = \frac{(2\pi)d_{\rm p}^{3})^{1/2}}{e}$$
(2)

(ただし、 r: 液滴の表面張力; cgs 単位系)



図②(c)-26 計算結果から考えられる液滴破砕現象の概略図

2.6 液滴破砕が促進される条件の探索

上記の理論的検討より、噴霧液の初期液滴径を変えれば荷電数も変わり、した がって液滴破砕の効果に影響が現れると考えた。流体制御機器によりキャリア ガスを含むエアロゾルの流れ系の流動状態を制御し、二流体ノズル噴霧装置に 加えてスプレー式粒子発生器も用いて、異なる初期径の液滴を発生させた。この 液滴に気中イオンによる荷電を行い、エアロゾル粒子を得た。結果の例を図② (c)-27 に示す。大液滴でのエアロゾル発生では、小液滴の場合に比べ、非凝集 粒子の個数濃度が大幅に増加し、かつ 100 nm 付近の凝集粒子も減少した。これ は液滴の荷電数が多くなり液滴破砕が促進された結果であると考えられる。



図②(c)-27 初期液滴径を変化させたときの粒径分布

3 吸入暴露試験

3.1 吸入暴露試験の実験系

ナノ粒子懸濁液を用いて全身暴露吸入試験のためのエアロゾル発生・供給を 行った。吸入暴露試験の実験系を図②(c)-28 に示す。エアロゾル発生系で生成 させた液滴エアロゾルは、粒子の管路輸送過程での壁面損失の抑制を図るため に、加熱管の上流側でイオナイザーから供給される両極気中イオンと混合され、 中和された。このエアロゾルに希釈空気を加えて、流量 100 L/min で全身暴露 チャンバーに供給した。懸濁液の希釈には、エンドトキシンフリーの純水を用い た。エアロゾル粒子は各日 6 時間供給し続け、その間、エアロゾルをフィルター 捕集と静電捕集で適宜採取し、それぞれ質量濃度測定と電子顕微鏡観察に用い た。また、暴露チャンバー内エアロゾルの粒子径分布を SMPS で 30 分毎に測定 した。試験は週 5 日、4 週にわたって行った。



図②(c)-28 全身暴露吸入試験系

3.2 Ni0 ナノ粒子エアロゾルを供給した吸入暴露試験

3.2.1.1 実施条件

AIST-NRI Gr により提供された NiO 粒子懸濁液を、エンドトキシンフリーの純水を用いて希釈調整しエアロゾル発生に用いた。高濃度暴露群用と低濃度暴露 群用の2つの暴露チャンバーに対して、図②(c)-28のエアロゾル発生・輸送系 をそれぞれ構築した。高濃度暴露群と低濃度暴露群の暴露エアロゾルの質量濃 度比は、およそ5:1とすることを目指した。高濃度暴露群用の発生系では迅速 蒸発と液滴荷電を行い、低濃度暴露群用では通常噴霧とした。

3.2.2 実験結果

暴露チャンバー内の Ni0 エアロゾル粒子の粒子径分布の、経時変化の例を図 ②(c)-29(高濃度暴露群用)と図②(c)-30(低濃度暴露群用)に示す。両暴露群 用ともに、1 日の中では安定な粒子径分布でエアロゾルが供給できたといえる。 また、低濃度暴露群用チャンバーでは、約 100 nm にピークがある単峰性の粒子 径分布であったのに対し、高濃度暴露群用チャンバーでは、ピークサイズは約 20 nm と小さかった。液滴荷電操作を行わない場合には、この分布は現れなかった ので、吸入暴露試験においても、液滴荷電によってエアロゾル粒子径を小さくで きる効果が検証されたといえる。ただし、図②(c)-29 にみられるように、液滴 荷電を行っても 100 nm 付近に第 2 のピークが残っている。これは液滴の一部は 破砕されていないことを意味している。液滴がより破砕され、したがって小粒子 のエアロゾルがより供給される条件を見出すことが今後の課題である。



図②(c)-29 高濃度暴露チャンバー内でのNi0 エアロゾル粒子の粒子径分布の 経時変化の例



図②(c)-30 低濃度暴露チャンバー内でのNi0 エアロゾル粒子の粒子径分布の 経時変化の例

両チャンバーから採取したエアロゾル粒子の SEM 写真を図②(c)-31 に示す。 複数の SEM 写真から多数個の粒子のサイズを測ったところ、両チャンバーそれ ぞれで、SMPS で求められた分布(図②(c)-29,30)とよく一致する粒子径分布が 得られた。



図②(c)-31 チャンバーから採取された Ni0 エアロゾル粒子の SEM 写真 (左:高濃度暴露群用;右:低濃度暴露群用)

暴露チャンバー内のエアロゾル粒子を透過型電子顕微鏡(TEM)用のグリッド 上に捕集し、観察・分析を行った。写真と電子線回折パターンを図②(c)-32 に 示す。写真から、エアロゾル粒子が比較的密に詰まった凝集体構造を有している こと、一次粒子の形態は懸濁液中のそれと違わないことがわかる。回折パターン には、エアロゾル粒子になっても粒子の結晶性が保たれていることが示されて いる。



図②(c)-32 NiO エアロゾル粒子の TEM 写真(左)と電子線回折パターン (右)(産業技術総合研究所 山本和弘氏による)

図②(c)-33, 34 は、チャンバー内エアロゾルの質量濃度の経日変化を示す。 質量濃度は、両チャンバーとも、各日複数回測定した。エアロゾル発生条件とチ ャンバー内濃度の関係を探索した 1 日目を除けば、試験期間にわたって安定し た質量濃度のエアロゾルを供給できたといえる。高濃度暴露群用チャンバーの 質量濃度の平均値と標準偏差は 1.65±0.20 mg/m³であった。低濃度暴露群用チ ャンバーでは 0.32 ±0.07 mg/m³であり、当初目指したとおり、高濃度暴露群用 チャンバーのおよそ 1/5 の濃度とできた。



図②(c)-33 高濃度暴露群チャンバー内の Ni0 エアロゾル粒子の質量濃度の 経日変化



図②(c)-34 低濃度暴露群チャンバー内の Ni0 エアロゾル粒子の質量濃度の 経日変化

3.3 TiO₂ ナノ粒子エアロゾルを供給した吸入暴露試験

3.3.1 実施条件

AIST-NRI Gr により提供された TiO₂粒子懸濁液を、エンドトキシンフリーの純水を用いて希釈調整しエアロゾル発生に用いた。高濃度暴露群用と低濃度暴露 群用の 2 つの暴露チャンバーに対して、図②(c)-28 のエアロゾル発生・輸送系 をそれぞれ構築した。高濃度暴露群と低濃度暴露群の暴露エアロゾルの質量濃 度比は、およそ 5:1 とすることを目指した。高濃度暴露群用の発生系では迅速 蒸発と液滴荷電を行い、低濃度暴露群用では通常噴霧とした。

3.3.2 実験結果

高濃度チャンバーおよび低濃度チャンバー内でのエアロゾル粒子径分布をそれぞれ図②(c)-35,36 に示す。高濃度チャンバーでは、液滴破砕の影響で約20 nm のところにピークが現れた。また低濃度チャンバーでは約100 nm のところに ピークができた。両チャンバーにおいて6時間にわたり、安定した粒子径分布 を持つエアロゾルを供給できた。しかし個数濃度については時間によりややば らつきが生じた。これは懸濁液の安定性に起因すると考えられる。



図②(c)-35 高濃度暴露チャンバー内での TiO₂ エアロゾル粒子の粒子径分布の 経時変化の例



図②(c)-36 低濃度暴露チャンバー内での TiO₂ エアロゾル粒子の粒子径分布 の経時変化の例

両チャンバーから採取したエアロゾル粒子の SEM 写真を図②(c)-37 に示す。 複数の SEM 写真から多数個の粒子のサイズを測ったところ、両チャンバーそれ ぞれで、SMPS で求められた分布(図②(c)-35,36)とよく一致する粒子径分布が 得られた。



図②(c)-37 チャンバーから採取された TiO₂ エアロゾル粒子の SEM 写真 (左:高濃度暴露群用;右:低濃度暴露群用)

図②(c)-38 にそれぞれのチャンバーでの質量濃度を示す。この図では、縦軸 が質量濃度、横軸が暴露時間を示しており、質量濃度1日に2~4回測定してい る。高濃度用チャンバー内の質量濃度では、懸濁液が不安定なために質量濃度に ばらつきが生じたが、吸入試験全体での平均質量濃度は1.84±0.74 mg/m³であ り、目標値である1~2 mg/m³を達成した。一方、低濃度用チャンバーでも同じ 理由で質量濃度がばらついていたが、吸入試験全体での平均質量濃度は 0.50±0.26 mg/m³であり、目標値である高濃度要チャンバーの 1/5~1/3 倍を達 成した。



図②(c)-38 チャンバー内のTiO₂エアロゾル粒子の質量濃度の時間変化
(左:高濃度暴露群用;右:低濃度暴露群用)

3.3.3 鼻部暴露吸入試験

3.3.3.1 試験系

TiO₂粒子についてはは全身暴露吸入試験に加え、1 日間の鼻部暴露吸入試験も 行った。その実験系を図②(c)-39 に示す。エアロゾル発生系は全身暴露吸入試 験と同様である。供給系には乾燥用加熱管に加え、水蒸気を除去するための Diffusion dryer を組み込んだ。発生したエアロゾル粒子は 6 時間連続供給し た。その間、エアロゾルをフィルター捕集と静電捕集で適宜採取し、それぞれ質 量濃度測定と電子顕微鏡観察に供した。また、暴露チャンバー内エアロゾルの粒 子径分布を SMPS で 30 分毎に測定した。

対照実験のため、全身暴露吸入試験も同時に行った。その実験系は図②(c)-28 と同様である。これら2試験では高濃度かつ同程度の質量濃度のエアロゾルを 発生する必要があり、そのためにTiO2粒子の懸濁液濃度を状況に応じて1.0~ 2.2 mg/mlとして1時間毎に試料液の交換を行いつつ、試験を行った。



図②(c)-39 鼻部暴露吸入試験系

3.3.3.2 実験結果

図②(c)-40 に鼻部暴露チャンバー内、全身暴露チャンバー内で測定したエア ロゾル粒子径分布を示す。3.2項で行った全身暴露チャンバー内の粒子径分布 よりも大きな粒子が計測された。これは前項よりも濃度の高い懸濁液を用いた ためである。また全身暴露チャンバーのほうが鼻部暴露チャンバーよりも大き い粒子径の割合が増えた。これはチャンバー内に供給される際に、粒子同士が凝 集し、より大きな粒子となったためであると考えられる。しかし、両方のチャン バーとも試験時間内では安定な粒子径のエアロゾル粒子を供給することができ た。



(左)鼻部暴露チャンバー (右)全身暴露チャンバー

図②(c)-41 にそれぞれのチャンバー内の質量濃度の経時変化を示す。鼻部暴 露チャンバーでの最初の1時間においては、事前検討を踏まえて全身暴露チャ ンバーと同程度の質量濃度のエアロゾルが供給できると予測した懸濁液濃度で 行ったが、予測よりも高い質量濃度となった。そこで2時間目以降では懸濁液 濃度を低くして実験を行ったところ、それ以降は安定した質量濃度のエアロゾ ルを供給することが出来た。一方、全身暴露チャンバーでも最後の1時間を除 き、安定的にかつ鼻部暴露チャンバー内の質量濃度と同程度の濃度でエアロゾ ル粒子を発生できた。最後の1時間は、1日の試験時間内での質量濃度を鼻部暴 露チャンバーと同程度にするため、より高い質量濃度のエアロゾル粒子を発生 させるべく、それまでの結果を踏まえて、懸濁液濃度を予測し、より高濃度な懸 濁液を用いて行った。その結果、両チャンバーでの1日の中での平均質量濃度 は鼻部暴露チャンバーでは4.01±1.11 mg/m³、全身暴露チャンバーでは 4.10±1.07 mg/m³となり、目標とした両チャンバーで同程度の質量濃度を達成 することができた。

以上のことから、本年度までに開発したエアロゾル発生・供給系は、全身暴露 または鼻部暴露の吸入試験に対して目的質量濃度のエアロゾルを発生すること が出来たため、試験用エアロゾル発生・供給装置のプロトタイプとなることがわ かった。



図②(c)-41 鼻部暴露チャンバーと全身暴露チャンバー内の TiO₂ エアロゾル粒 子の質量濃度の経時変化
3.4 CeO2 ナノ粒子エアロゾルを供給した吸入暴露試験

3.4.1 実施条件

AIST-NRI Gr により提供された CeO₂粒子懸濁液を、エンドトキシンフリーの純水を用いて希釈調整しエアロゾル発生に用いた。高濃度暴露群用と低濃度暴露 群用の 2 つの暴露チャンバーに対して、図②(c)-28 のエアロゾル発生・輸送系 をそれぞれ構築した。高濃度暴露群と低濃度暴露群の暴露エアロゾルの質量濃 度比は、およそ 5:1 とすることを目指した。高濃度暴露群用、低濃度暴露群用と もに迅速蒸発を行った。

3.4.2 実験結果

高濃度・低濃度側の暴露チャンバー内のエアロゾル粒子径分布をそれぞれ図 ②(c)-42, 43 に示す。高濃度側・低濃度側でどちらも安定な粒子径分布のエア ロゾル粒子を供給できた。個数基準の幾何平均粒子径は、高濃度側で110±13 nm、 低濃度側で88±8 nm であった。またその際の体積基準の幾何平均粒子径は、高 濃度側で362±23 nm、低濃度側で353±34 nm となった。



図②(c)-42 高濃度暴露チャンバー内での CeO₂ エアロゾル粒子の粒子径分布の 経時変化の例



図②(c)-43 低濃度暴露チャンバー内での CeO₂ エアロゾル粒子の粒子径分布の 経時変化の例

両チャンバーから採取したエアロゾル粒子の SEM 写真を図②(c)-44 に示す。 複数の SEM 写真から多数個の粒子のサイズを測ったところ、両チャンバーそれ ぞれで、SMPS で求められた分布(図②(c)-42, 43)とよく一致する粒子径分布 が得られた。



図②(c)-44 チャンバーから採取された CeO₂ エアロゾル粒子の SEM 写真 (左:高濃度暴露群用;右:低濃度暴露群用)

図②(c)-45 にそれぞれのチャンバーでの質量濃度を示す。この図②(c)-45 で は、縦軸が質量濃度、横軸が暴露日数を示しており、1 日に 4-6 回測定している。 高濃度側・低濃度側どちらの質量濃度も、目標質量濃度のエアロゾル粒子を長期 間安定的に供給できたことが分かる。吸入試験全日の平均質量濃度は高濃度側で、10.2±1.4 mg/m³、低濃度側で2.1±0.2mg/m³であった。



図②(c)-45 チャンバー内の CeO₂エアロゾル粒子の質量濃度の時間変化

3.5 Zn0 ナノ粒子エアロゾルを供給した吸入暴露試験

3.5.1 実施条件

AIST-NRI Gr により提供された ZnO 粒子懸濁液を、エンドトキシンフリーの純水を用いて希釈調整しエアロゾル発生に用いた。高濃度暴露群用と低濃度暴露 群用の2つの暴露チャンバーに対して、図②(c)-28のエアロゾル発生・輸送系 をそれぞれ構築した。高濃度暴露群と低濃度暴露群の暴露エアロゾルの質量濃 度比は、およそ5:1とすることを目指した。高濃度暴露群用、低濃度暴露群用と もに迅速蒸発を行った。

3.5.2 実験結果

高濃度・低濃度側の暴露チャンバー内のエアロゾル粒子径分布の経時変化を それぞれ図②(c)-46, 47 に示す。高濃度側・低濃度側でどちらも安定な粒子径 分布のエアロゾル粒子を供給できた。個数基準の幾何平均粒子径は、高濃度側で 148±14 nm、低濃度側で126±11 nm であった。



図②(c)-46 高濃度暴露チャンバー内での Zn0 エアロゾル粒子の粒子径分布の 経時変化の例



図②(c)-47 低濃度暴露チャンバー内での Zn0 エアロゾル粒子の粒子径分布の 経時変化の例

両チャンバーから採取したエアロゾル粒子の SEM 写真を図②(c)-48 に示す。 複数の SEM 写真から多数個の粒子のサイズを測ったところ、両チャンバーそれ ぞれで、SMPS で求められた分布(図②(c)-46,47)とよく一致する粒子径分布 が得られた。



図②(c)-48 チャンバーから採取された ZnO エアロゾル粒子の SEM 写真 (左:高濃度暴露群用;右:低濃度暴露群用)

図②(c)-49 にそれぞれのチャンバーでの質量濃度を示す。この図②(c)-49 で は、縦軸が質量濃度、横軸が暴露日数を示しており、1日に3[~]6回測定している。 高濃度側・低濃度側どちらの質量濃度も、目標質量濃度のエアロゾル粒子を長期 間安定的に供給できたことが分かる。吸入試験全日にわたる平均質量濃度は、高 濃度側で10.4±1.4 mg/m³、低濃度側で2.1±0.5 mg/m³であった。



図②(c)-49 チャンバー内の Zn0 エアロゾル粒子の質量濃度の時間変化

4 様々なナノ材料を用いた吸入暴露試験の総括

本プロジェクトではこれまでに様々なナノ材料、条件を変え、吸入暴露試験を 実施してきた。そこで過去の吸入暴露試験(本プロジェクトおよび NEDO プロジ ェクト「ナノ粒子特性評価手法の研究開発」(2006-2011))の結果を整理し、発 生エアロゾル粒子の質量濃度や粒子径などの性状と懸濁液中のナノ材料の性 状・発生諸条件との相関を検討した。

その結果から図②(c)-50 に示すように、噴霧した液滴中に含まれる粒子のう ち、どの程度がエアロゾル粒子として生成したか(エアロゾル生成率)、さらに 生成したエアロゾル粒子のうち、どの程度ラットの体内に沈着しているか(肺内 沈着率)を評価した。そして、噴霧した液滴中に含まれる粒子のうち、どの程度 ラットの肺内に沈着しているかという有効沈着率(エアロゾル生成率×肺内沈 着率)についても評価した。



図②(c)-50 懸濁液からラットの肺内に粒子が到達するまでの流れ

4.1 SiO₂ナノ粒子懸濁液から発生させたエアロゾル

4.1.1 単分散シリカナノ粒子懸濁液の調製

単分散シリカナノ粒子懸濁液は、まずシードとなるシリカナノ粒子(一次粒子 径 15 nm)を合成後、シード粒子を成長させることによって、20,40,…,100 nm の一次粒子径を有するシリカナノ粒子を合成した。シードナノ粒子は、1 mmol/Lの $_{-}$ lysine 水溶液 36 mLにテトラエトキシシラン(TEOS)を 2.6 g 加え、 60°Cで 24 時間撹拌し合成した。そのシードナノ粒子懸濁液を所定量、同濃度の $_{-}$ lysine 水溶液に加え、任意の量の TEOS を加え 60°Cで 24~120 時間撹拌し、 20~100 nm の一次粒子径を有する単分散シリカナノ粒子懸濁液を得た。図②(c)-51 に粒子の SEM 写真の例を示す。図②(c)-51 を見てわかるように、同じ大きさ をもつ単分散なシリカナノ粒子を合成できた。



図②(c)-51 シリカナノ粒子の SEM 像: a) 60 nm、b) 100 nm

4.1.2 懸濁液濃度・一次粒子径のエアロゾル平均径に与える影響

4.1.1 で合成した SiO₂ナノ粒子懸濁液を 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg/mL の懸濁液 濃度に調製し、噴霧空気流量 40 L/min、送液速度 0.6 mg/mL、迅速蒸発ありの条 件でエアロゾル発生実験を行った。得られたエアロゾルの粒子径分布を図② (c)-52 に示す。粒子径分布は濃度が高くなるほど、ピークが大きくなり、また 個数濃度も増加した。粒子径分布から得られた個数基準幾何平均径(Geometric mean diameter、以下 GMD)を図②(c)-53 に示す。濃度が高くなるほど、またー 次粒子径が大きくなるほど、GMD が大きくなった。これの関係は、

$$GMD = ASC^B D_{pp}^{\ C} = 29.1SC^{0.35} D_{pp}^{\ 0.15}$$
(1)

でよくフィッティングできた。ここで *SC*は[mg/mL]の単位で表した懸濁液濃度、 *Q*_pは[nm]の単位で表した一次粒子径である。GMD は懸濁液濃度の 1/3 乗、*D*_pの 0.15 乗に比例することがわかった。濃度が増加すると、一つの液滴中に含まれ る粒子の数が濃度に比例して多くなるため、GMD は懸濁液濃度の 1/3 乗に比例す ると考えられる。実際に、SC に対して GMD はほぼ 1/3 乗に比例した。一方、粒 子径に対して、GMD は 0.15 乗に比例した。



図②(c)-53 一次粒子径の違いによる GMD への影響

4.1.3 エアロゾル粒子の細孔構造評価

懸濁液を乾燥・焼成した粉体と、4.0 mg/mLの懸濁液で発生させたエアロゾル 粒子の窒素吸着により測定した窒素吸着等温線とその等温線からケルビン式を 応用した BJH (Barrett, Joyner, Hallender) 法で求めた BJH 細孔径分布を図② (c)-54, 55 に示す。一次粒子が 20 nm と小さいと、エアロゾル粒子の細孔径は 乾燥粒子と同じ大きさの細孔を持つことがわかる。一方、一次粒子径が大きくな ると、細孔径分布は広くなり、またピーク細孔径も大きくなった。以上より、一次粒子径が大きいと液滴中の粒子が凝集する際に密に充填せず、隙間が大きくなってしまい、GMDが大きくなったと考えられる。



図②(c)-54 SiO₂ナノ粒子懸濁液から得られたエアロゾルの窒素吸着等温線 $D_{pp} = a$) 20, b) 40, c) 60, d) 80, e) 100 nm



図②(c)-55 SiO₂ナノ粒子懸濁液から得られたエアロゾルの BJH 細孔径分布 $D_{op} = a$) 20, b) 40, c) 60, d) 80, e) 100 nm

4.1.4 懸濁液濃度・一次粒子径の気中質量濃度に与える影響

各粒子径、各懸濁液濃度での気中質量濃度を図②(c)-56 に示す。GMD とは異な り、気中質量濃度は一次粒子径に依らず、一定となった。これはエアロゾル発生 条件が同一であれば、どのような一次粒子径をもつナノ材料懸濁液であっても、 気中質量濃度は懸濁液濃度に比例することを示す。



4.2 平均粒子径に対するナノ材料懸濁液の性状の影響

エアロゾルの平均粒子径は一次粒子径と濃度に依存することがわかった。実際の吸入暴露試験の懸濁液濃度と暴露容器内の平均粒子径の関係を図②(c)-57 に示す。SiO2ナノ粒子のときと同形の式でフィッティングすると

$$GMD = 54.1SC^{0.27} D_{\rm pp}^{0.27}$$
 (2)

となった。式(1)と係数が異なるのは、SiO₂ナノ粒子と比べ、懸濁液中でのナノ 粒子の粒子径分布が広いため、またはチャンバー内での凝集による粒子径の増 大を考慮していないためだと考えられる。式(2)より、平均粒子径はやはり一次 粒子径と懸濁液濃度に依存することがわかった。



図②(c)-57 懸濁液濃度と平均粒子径の関係

平均粒子径と同様に懸濁液濃度と気中質量濃度の関係を整理した。図②(c)-58 に懸濁液濃度と気中質量濃度の関係を示す。ここで迅速と書かれたプロット は、昨年度までに開発した迅速蒸発による気中質量濃度の向上手法を用いた吸 入暴露試験での気中質量濃度を示す。Si02ナノ粒子と同様、気中質量濃度はナノ 材料の種類にかかわらず、液中濃度に比例することがわかる。どんな粒子でも懸 濁液濃度に応じて、1 つの液滴の中に入る粒子の数が変化すると考えられる。そ の傾きは迅速蒸発を行わなかった場合、0.92 であり、迅速蒸発を行った場合、 2.63 となった。つまり、迅速蒸発を行うことで気中質量濃度が約3倍となる。 これは配管での損失が低減され、粒子の発生個数が増加したためと考えられる。 またエアロゾル生成率が 100%としたときの直線と比較すると、標準条件は約 1/8 倍の傾きとなった。したがって標準条件・迅速蒸発条件のエアロゾル生成率 はそれぞれ、11%、33%程度であることが分かった。

^{4.3} 気中質量濃度に対するナノ材料懸濁液の性状の影響



図2(c)-58 懸濁液濃度と気中質量濃度の関係

4.4 肺内沈着率の計算

生体評価試験では肺内の沈着量が重要となる。そこでヒトの沈着モデル(図② (c)-59: ICRP(1994)より)を用い、実際に気中分散したエアロゾル粒子がどれだ け肺内まで到達したかを 2013 年に行った TiO₂ ナノ粒子を用いた全身暴露試験 および鼻部暴露試験の結果を用い、検討した。平均粒子径が 220 nm (A: 2013 年 最終日全身ばく試験)、155 nm (B: 2013 年最終日鼻部暴露試験)の2 種類の TiO₂ 粒子(どちらも標準条件)について推定した。気中に分散された粒子と肺内に沈 着したと考えられる粒子の粒子径分布をそれぞれ図②(c)-60、61 に示す。肺胞 沈着率(沈着量)の情報を表2に示す。予想肺内沈着率は粒子の質量基準でそれ ぞれ 17%、19%となった。肺内沈着率の違いは平均粒子径の違いが影響してい ると考えられる。一方、実際に解剖して求めた実際の肺内沈着率はそれぞれ 13%、 15%であった。予想の方が高くなったのはラットではなくヒトの沈着モデルを 用いたことが一因であると考えられる。しかし傾向は同じで、近い値を予想でき たと考える。



図②(c)-59 ヒトの肺内沈着率モデル ICRP(1994)



図②(c)-60 気中に分散された粒子と肺内に沈着したと考えられる粒子の粒子 径分布(2013年全身暴露試験)



図②(c)-61 気中に分散された粒子と肺内に沈着したと考えられる粒子の粒子 径分布(2013 年鼻部暴露試験)

TiO ₂ (標準条件)		A(全身ばく露)	B(鼻部ばく露)
一次粒子径	nm	28	28
懸濁液濃度	mg/mL	5	1.8
平均粒子径	nm	220	155
気中質量濃度	mg/m ³	4.1	4.0
推定肺内沈着率	%	17	19
実際の肺内沈着率	%	22	27

表②(c)-2 肺胞沈着率(沈着量)の情報(TiO₂粒子)

また別の試験粒子についても肺内沈着率を比較した。Ni0(2012年低濃度チャンバー)、TiO₂(2013年低濃度チャンバー)、CeO₂(2014年低濃度チャンバー)粒子の平均粒子径はそれぞれ110、140、88 nmである。気中に分散された粒子と肺内に沈着したと考えられる粒子の粒子径分布をそれぞれ図②(c)-62~64 に示す。肺胞沈着率(沈着量)の情報を表3に示す。予想肺内沈着率はそれぞれ20%、19%、18%となった。予想肺内沈着率の大きさは平均粒子径にあまり依存しなかった。異なる平均粒子径でも、肺内沈着率がほぼ変わらなかったのは、単位体積当たりの粒子全体積(全質量)を考えた際に、小粒子よりも大粒子の影響が大きいことが原因であると考えられる。先ほどの2つのTiO₂粒子と比較しても沈着率はほとんど同じ値となったことから、平均粒子径が100 nm 付近の粒子の肺内

沈着率は20%程度になることが推定された。ちなみに平均粒子径が1µm程度の 粒子であれば、肺内沈着率は10%程度あると推定された。一方、解剖して求め た実際の肺内沈着率は14%、9%、10%であった。推定の方が低くなったのは、 ここでもラットではなくヒトの沈着モデルを用いたことが一因であると考えら れる。また先ほどのTiO2粒子より予想との差が大きくなったのはラットを解剖 した日の違いが影響していると考えられる。TiO2粒子は試験終了後すぐに解剖 したのに対しこの3条件はいずれも試験終了後3日後に解剖した。肺内に沈着 した粒子は試験終了後が最も多くなるが、時間が経つにつれ体外に排出されて いく。これが予想と実際の沈着量の違いの原因の一つであると考えられる。



図②(c)-62 気中に分散された粒子と肺内に沈着したと考えられる粒子の 粒子径分布(NiO 粒子、低濃度チャンバー)



図②(c)-63 気中に分散された粒子と肺内に沈着したと考えられる粒子の 粒子径分布(TiO₂ 粒子、低濃度チャンバー)



図②(c)-64 気中に分散された粒子と肺内に沈着したと考えられる粒子の 粒子径分布(CeO₂ 粒子、低濃度チャンバー)

퀸	長②(c)-3 肺胞沈着率	≤(沈着	量)の情報	(NiO, TiO	2、CeO2粒子)
			NiO	TiO ₂	CeO ₂
	一次粒子径	nm	15-35	28	∼10
	平均粒子径	nm	110	140	88
	気中質量濃度	mg/m ³	0.32	0.5	2.1
	推定肺内沈着率	wt%	20	19	18
	実際の沈着率 (ばく露終了3日後)	wt%	14	9	10

4.5 懸濁液中の粒子の有効使用率

4.3、4.4 で求めたエアロゾル生成率と肺内沈着率の積から懸濁液中に含まれ る粒子の有効使用率を求めた。まず TiO₂ 粒子の全身暴露、鼻部暴露試験の結果 を表 4 に示す。どちらも標準条件での噴霧であり、粒子の有効使用率はそれぞ れ 2%、3%となった。次に NiO、TiO₂、CeO₂粒子の結果を表 5 に示す。CeO₂粒子 のみ迅速蒸発条件である。したがってエアロゾル生成率が他の条件より高くな ったと考えられる。粒子の有効使用率はそれぞれ 2%、2%、7%となった。肺内 沈着率がほとんど同じ値なので、粒子の有効使用率はエアロゾル生成率に大き く依存している。したがって、迅速蒸発によってエアロゾル生成率を高めること は粒子の有効使用率の向上に大きく寄与することが分かった。

TiO ₂ (2012年)		A(全身ばく露)	B(鼻部ばく露)
一次粒子径	nm	28	28
懸濁液濃度	mg/mL	5	1.8
平均粒子径	nm	220	155
質量濃度	mg/m^3	4.1	4.0
エアロゾル生成率	%	10	15
肺内沈着率	%	17	19
粒子の有効使用率	%	2	3

表②(c)-4 粒子の有効使用率(TiO,粒子)

表②(c)-5 粒子の有効使用率(Ni0、Ti02、CeO2粒子)

		NiO	TiO ₂	CeO2
一次粒子径	nm	15-35	28	∼10
懸濁液濃度	mg/mL	0.4	0.7	0.7
平均粒子径	nm	110	140	88
気中質量濃度	mg/m ³	0.32	0.5	2.1
エアロゾル生成率	%	10	9	38
肺内沈着率	%	20	19	19
粒子の有効使用率	%	2	2	7

5 まとめ

吸入暴露試験に適したエアロゾル試料の発生技術と、このエアロゾル試料を 用いて吸入暴露試験を実施するための技術の構築を目指し、既製ナノ材料のエ アロゾル化手法として種々の利点を有する噴霧乾燥法を検討した。噴霧乾燥法 によるエアロゾル発生に対して、液滴を噴霧直後に加熱する迅速蒸発法と、単 極イオンにより荷電することで生じるクーロン爆発を利用した液滴破砕法を 新たに開発した。迅速蒸発法により、発生エアロゾル粒子の質量濃度が向上す ることを確認した。液滴破砕法により、非凝集粒子のエアロゾルを発生させる ことが可能となり、またそのメカニズムを明らかにした。

本プロジェクトで開発したエアロゾル発生手法を用いて、Ni0ナノ粒子、TiO₂ ナノ粒子、CeO₂ナノ粒子、ZnOナノ粒子の吸入暴露試験に適用し、エアロゾル粒 子を目的の濃度、粒子径で長期間・高濃度かつ安定的に供給することに成功した。 これまでの吸入暴露実験の結果の整理に加え、様々な粒子径の単分散シリカナ ノ粒子懸濁液のエアロゾル発生実験を行うことで、発生エアロゾル粒子の気中 質量濃度や粒子径などの性状と懸濁液中のナノ材料の性状・発生諸条件との関 係を検討した。その結果、エアロゾルの粒子径は、その懸濁液中に含まれるナノ 材料の一次粒子径および懸濁液濃度の両方に依存することがわかった。一方気 中質量濃度は、ナノ材料の一次粒子径によらず、懸濁液濃度に比例することがわ かった。また、噴霧した液滴中に含まれる粒子のうち、どの程度ラットの肺内に 沈着しているかという有効沈着率(エアロゾル生成率×肺内沈着率)について、 粒子径分布と質量濃度から評価し、噴霧懸濁液中に含まれるナノ材料の2~7%程 を肺内に沈着させられると推定された。

上記の吸入暴露試験用エアロゾル発生手法の装置概要や操作方法を、期間中 に実施した実際の吸入暴露試験の結果とともにとりまとめ、「ナノ材料毒性評価 のための吸入暴露試験用エアロゾル発生に関する技術解説書」としてプロジェ クト HP に公開した。 研究開発項目②初期有害性情報取得のための低コスト・簡便な有害性評価技術 の構築

(d) エアロゾルの液相捕集手法の構築

国立研究開発法人産業技術総合研究所物質計測標準研究部門

1. 目的

エアロゾル液相捕集法は、乾式気中分散した工業ナノ材料を捕集し懸濁液を 作製する手法である。作製したナノ材料懸濁液は、工業ナノ材料の有害性評価に おけるスクリーニング技術の一つである気管内投与試験で使用する。図②(d)-1 に吸入暴露試験および従来の気管内投与試験とエアロゾル液相捕集法の関係を 示す。



図②(d)-1 吸入暴露試験および従来の気管内投与試験とエアロゾル液相捕 集法の関係

一般的な吸入暴露試験では、ナノ材料を気中に乾式で分散し、ナノ材料を含ん だエアロゾルに検体を暴露する。一方で、従来の気管内投与試験では、ナノ材料 の原粉体を水に分散した懸濁液を作成し、検体に投与する。水に分散したナノ材 料を投与することと、定常状態ではなく短時間に多くの量を投与する以外は、気 管内投与試験は吸引暴露試験と異なるべきでない。しかし、原粉体表面が疎水性 であるため容易に水に分散しない場合は分散剤を添加する。また、粉体状ナノ材 料を分離・粉砕し、繊維状の材料であれば切断も行われている。このように物理 化学的に強制分散したナノ材料の懸濁液を使用した場合、ナノ材料の検体内で の輸送メカニズムや最終的な健康影響が吸引暴露試験と大きく異なる可能性が ある。

本手法の目的は、図②(d)-1 に示す従来法より吸入暴露試験をより良く模擬す

る気管内投与試験用懸濁液を作製することである。気中に乾式分散したナノ粉体材料のエアロゾル粒子群を捕集し、粉砕や分散剤添加をせずに、ナノ材料が水 に分散した懸濁液を作製する。そして、気管内投与試験用試料を作製するための 標準的手順書の試案をとりまとめて公開する。

2. 成果

2.1. 工業ナノ材料粉体の乾式気中分散

ナノ材料のエアロゾル化は湿式もしくは乾式で通常行われる。湿式とはナノ 材料を液体中に一旦懸濁し、この懸濁液を噴霧する方式である。乾式とはナノ材 料の原粉体を直接気中に分散する手法である。湿式ではナノ材料の懸濁液を作 製するための前処理が必要である。例えば、ナノ材料粉体を粉砕・分級し、液中 に長時間分散させるために界面活性剤を添加する。乾式では、これらの前処理を 行わずに直接ナノ材料を気中に分散させるため、懸濁液作製のための前処理は ない。また、これら前処理がナノ材料の有害性評価の結果にどのように伝播する かを考慮する必要もない。しかし一方で、気中に直接放出したナノ材料粉体が解 離と凝集を繰り返す過程は、湿式で噴霧したナノ材料を含んだ液滴が乾燥する 過程に比べて複雑である。このため、乾式は湿式よりもエアロゾル粒子の発生量 や粒径分布を制御することが難しい。本研究では振動膜式粉体分散装置を使っ た乾式気中分散技術を適用し、乾式でエアロゾル化したナノ材料粉体の質量濃 度と粒子数濃度の粒径分布を測定した。本サブテーマで乾式気中分散したナノ 材料および工業用粉体を表②(d)-1にまとめる。

JIS Z 8901 試験用粉体 8 種(以下 JIS Z 8901 試験用粉体と略)は、流動性 のよい親水性の粉体であり、乾式気中分散と液相中への捕集技術の開発を安全 に進めるために使用した。気管内投与試験で使用するための懸濁液を作製する ためのナノ材料として、本サブテーマでは二酸化チタン(TiO₂)を使用した。表 面が親水性のTiO₂として、日本エアロジル社の AEROXIDE® P25(以下、P25 と略) を使用した。表面が疎水性に修飾されたTiO₂として、テイカ社の JMT-150 IB を 使用した。

	JIS Z 8901 試験用粉体 8 種 (関東ローム焼成品)	AEROXIDE® P25	JMT-150 IB
化学組成	SiO₂, Fe₂O₃, Al₂O₃ その他	TiO ₂	TiO ₂ , surface-coated with Isobutyl functional group
一次粒子径	D _{pg} 7.8 mm † σ _g 2.9 †	21 nm §	15 nm §
水との親和性	親水性	親水性	強疎水性
製造メーカ	APPIE*	日本エアロジル	テイカ

表②(d)-1 本サブテーマで使用した工業用粉体

+ 仕様書の累積質量分布より算出した幾何平均粒径 D_{pg} および幾何標準偏差σ_g

§ メーカカタログ記載の値

* 日本粉体工業技術協会

2.1.1 乾式気中分散システム

図②(d)-2 にエアロゾル液相捕集法で使用した乾式気中分散システムの模式 図を示す。本サブテーマでは、工業ナノ材料を乾式気中分散させる手法として、 米国 NIOSH (National Institute for Occupational Safety and Health)が開発 した、振動膜式粉体分散装置 (Vibrating membrane powder disperser, 以下 VMPD, (McKinney et al. 2009)に改良を加え使用した。



図②(d)-2 エアロゾル液相捕集法で使用する乾式気中分散システムの模式図



図②(d)-3 振動膜式粉体分散装置(VMPD)に、ネジ式微量粉体フィーダーより ステンレス管を通じて太鼓型の発生チャンバーへと原粉体を落下するシステム の写真、および、交換用の天然ゴムラテックス膜

図②(d)-3 に VMPD の構造を写真で示す。直径約 230 mm 長さ約 445 mm のアク リル製配管の両端を、取外し可能な厚さ 0.5 mm のラテックス膜で覆った太鼓の ような構造である。内部の体積は約 18.5 L である。このラテックス膜の下側よ り音波振動を与え、工業ナノ材料の粉体を気中に分散する。McKinney et al. (2009)の論文には、図②(d)-3 が示す微量粉体フィーダーは含まれておらず、粉 体を太鼓内部のラテックス膜上に置く構造となっている。しかし凝集しやすい 粉体は、音波振動のみで気中分散することが難しい。そのため、粉体を微量供給 できるネジ式フィーダー(日清エンジニアリング FC-uM-030F)を設置し、この フィーダーより 30 秒-60 秒の頻度で 1 秒-2 秒間、直径 25.4 mm のステンレス管 を通じて膜上に原粉体を落下させた。表②(d)-2 に P25 二酸化チタンおよび日機 装多層カーボンナノチューブ(MWCNT)に対し測定したネジ式粉体フィーダーの 最小投下速度を示す。

	P25 TiO ₂	日機装 MWCNT
平均值	54 mg/s	6.8 mg/s
標準偏差	4.0 mg/s	1.2 mg/s

表②(d)-2 ネジ式粉体フィーダーの最小投下速度

ラテックス膜は VMPD で使い続けると劣化する。週3日1日7時間使用したと 仮定すると、約 1.5-2 年程度で膜が摩耗し漏れが生じ、ナノ材料粉体が太鼓外

側の空間に付着する。交換用の膜として、厚さ 0.5 mm の天然ゴムラテックス膜 を、適当な大きさへと切り抜き使用した(図②(d)-3 参照)。

2.1.2 エアロゾル化したナノ材料粉体の分級・除電・撹拌

VMPDの下流にサイクロンを設置し、鼻部で捕集される空気力学径 4 µm 以上の 非吸入分のエアロゾル粒子を捕集した。設計は、(Kenny and Gussman 1997)の 流量とサイクロン内部寸法の関係に従い、流量は VMPD のエアロゾル流量 6 L/min とした。サイクロン底部に捕集した粉体を清掃する作業の頻度を少なくするた め、サイクロン底部の体積を 55 cm³と比較的大きくし、また、捕集した粉体の 量を目視確認できる構造にした。このサイクロンの写真と、粒子透過効率の粒径 依存性を図②(d)-4 に示す。乾式気中分散させた多分散の JIS Z 8901 試験用粉 体をテスト粒子とし、粒子数濃度の粒径分布をサイクロンの上流と下流とで空 気力学スペクトロメータで測定した。各粒径区分での下流濃度を上流濃度で割 算することにより、粒子透過効率を算出した。粒子透過効率が約 50%の粒径は 4 µm であり、非吸入分を除去する特性を有している。



Aerodynamic diameter (µm)

図②(d)-4 振動膜式粉体分散装置の出口で非吸入分のエアロゾル粒子を捕集 するサイクロン(左写真)および、サイクロンの粒子透過効率

乾式気中分散したエアロゾル粒子群は過度に帯電しているため、サイクロン 通過後のエアロゾル粒子群を、エアロゾル中和器で除電した。図②(d)-5 に本サ ブテーマで使用したエアロゾル中和器を示す。容器はステンレス製であり、内部 に両極イオン発生源として、アメリシウム 241 を核種とするアルファ線源(3 MBq、 日本アイソトープ協会、AM162CE)を貼付けた。粉体を乾式気中分散すると、マ イクロメートル粒径域の凝集体が多く発生する。エアロゾル中和器内部の線源 部に粉体が蓄積し、アルファ線が遮へいされると中和器の除電能力が低下する。 これを防ぐため容器を定期的に洗浄し、内部に堆積した粉体を除去した。



図②(d)-5 エアロゾル中和器の例。(a)容器の外観、(b)内部へと金属用接着 剤で貼付けた線源

電気的に中和したエアロゾル粒子群を、体積45Lのステンレス製容器(CTH-39、 日東金属工業)の内部で一旦撹拌した。こうすることで、濃度の時間変動を抑制 し、捕集装置を含む各計測器がサンプルするエアロゾル粒子群の濃度を一様に した。図②(d)-6 中央は撹拌容器内部の写真である。下側の中心よりエアロゾル を導入する。DCファン(山洋電気 9WS0924H402)を2台内部で稼働させ、容器内 部のエアロゾルを常時撹拌し濃度を一様にし、容器の深さ39 cm に対し約30 cm の高さより各計測器へとエアロゾルをサンプルした。容器の蓋に内径(外径)が 4.8 (6.35) mm、7.1 (9.52) mm、10.4 (12.7) mm、および15.8 (19.0) mm のサ ンプル配管を合計12本取り付け可能にした。



図②(d)-6 乾式気中分散でエアロゾル化したナノ材料粉体を撹拌するための 容器

2.1.3 エアロゾル化したナノ材料の質量濃度測定

2.1.3.1. VMPD 制御とエアロゾル質量モニター

撹拌容器内のエアロゾル粒子の質量濃度を、エアロゾル質量モニターおよび フィルタ捕集を使用して測定した。エアロゾル質量モニターが測定した濃度は VMPD の制御プログラムにフィードバックされ、プログラムが振動膜の振幅を調 節し目標値へと発生濃度を維持する仕組みとなっている。

制御プログラムは National Instruments の LabView で構築されている。この VMPD の製造元である Inhalation Exposure Systems, LLC の提供する制御プロ グラムに、ネジ式粉体フィーダーの動作時間と頻度を入力する機能を付加した。 フィーダーの動作時間は 2 秒、動作頻度は 30 秒から 60 秒に設定した。エアロ ゾル質量モニターとして、Thermo Scientific 社製の DataRAM4 を使用した。こ の装置は、サンプルしたエアロゾル粒子群に単色光を照射し、粒子群からの消散 (散乱と遮へい)の量を質量濃度として測定する。

2.1.3.2. フィルタ捕集法

エアロゾル質量モニターが測定するエアロゾル質量濃度は、フィルタ捕集法 で測定した値と比較し、実験で発生させるエアロゾル粒子種毎に校正した。図② (d)-7 に撹拌容器内のエアロゾル質量濃度を測定するためのフィルタ捕集設備 の写真および概要図を示す。





図②(d)-7 撹拌容器内のエアロゾル質量濃度を測定するためのフィルタ捕集 設備の写真と概要図(左)、および、電子天秤でフィルタの質量を測定する様子 (右)

吸湿性が低いフィルタを使用することが好ましいため、直径 47 mm または 25 mm の PTFE メンブレンフィルター (孔径 2 μm, Pall Life Sciences)を使用した。フィルタ捕集開始前はバルブ1と2を閉めた状態にしておき、バルブ3を開けた状態にしておく。捕集開始時は1⇒2⇒3の順にバルブの開閉を行い、捕集終了時は3⇒2⇒1の順にバルブの開閉した。フィルタホルダ内の上流側の気圧を撹拌容器内と同じ状態を保つことにより、配管の内壁に付着した粉体が離脱し捕集開始時にフィルタに付着することを防ぎ、また、フィルタを取り除く際にフィルタに捕集した粉体が飛散することを防ぐ。フィルタ上に粉体が堆積するに従い、最大約 10 kPa の圧力損失が生じた。フィルタ上流の体積流量を一定に保つため、フィルタ下流で気体質量制御装置(mass flow controller、以下MFC、HORIBA STEC SEC-N100 シリーズ)をフィルタ下流に設置し、流量を制御した。MFC 下流での気圧は約-100 kPa の負圧を維持した。フィルタ捕集法による撹拌容器内のエアロゾル質量濃度, *C_{Filter}*, を以下の式で算出した。

$$C_{Filter} = \frac{\Delta m_{Filter}}{\Delta t \cdot Q_{MFC}} \qquad [\vec{\pi} (2) (d) - 1]$$

ここに、 Δm_{Filter} は捕集時間 Δt の間にフィルタへと捕集した粒子質量であり、 Q_{MFC} はMFCに設定する気体質量流量である。図②(d)-8に、捕集後フィルタの質量測定中の写真を示す。フィルタ質量の測定には、最大秤量が数g、最小表示が 0.1 μ g の電子天秤(Mettler Toledo UMX2)を使用した。静電気により生じる測 定質量のばらつきを減らすため、フィルタを保持できる大きさの受け皿をアル ミ箔で作成した。

フィルタに吸着した水分の損失や吸着が、捕集質量に与える誤差を評価した。 フィルタを保管する環境は実験室大気であるが、撹拌チャンバー内の空気は乾 燥している。捕集実験前にフィルタに吸着していた水分が損失する量を評価し た結果、平均値と95%信頼区間はそれぞれ13.4 μg ± 40.5 μg であった。また、 乾燥したフィルタを天秤に放置しておくことによる質量の増加を評価した。そ の結果、平均値とその95%信頼区間は0.78 μg/min ± 0.11 μg/min であった。 これらの不確かさ要因による捕集質量の誤差を数%以下にするためには数 mg 以 上の捕集質量が必要と結論した。

フィルタ上流で使用する配管の径、および、フィルタ捕集のサンプル流量は、 それぞれ、2.2節で説明する Growth Tube Collector (以下、GTC)で使用する配 管とサンプル流量と同じにした。これは、サンプリング配管の内壁への慣性沈着 による粒子損失の量を、GTC とフィルタ捕集の間で同じに保つためである。図② (d)-8 (a)で示す様に、粒径が数マイクロメートル以上のエアロゾル粒子を大気 圧下で配管へとサンプルする場合、吸引されるエアロゾル粒子が持つ慣性の効 果により、粒子が気流の流線より逸脱し、これにより、吸引されたエアロゾル粒 子の濃度に偏りが生じる。図②(d)-8 (b)の写真は、JIS Z 8901 試験用粉体を乾 式気中分散した際に、撹拌容器内部からのサンプリングに使用した配管の、吸引 口側と出口側での粒子の付着状況を比較した例である。入口側の内壁に付着し た粉体の量が多いことを確認できる。



図②(d)-8 (a) 配管にサンプルしたエアロゾル粒子が慣性により気流より逸脱 するしくみ。(b)サンプル吸引用配管の内側に、乾式気中分散した JIS Z 8901 試 験用粉体が付着した様子を、管の入口と出口とで比較した。

2.1.4. エアロゾル化したナノ材料の粒子数濃度の粒径分布測定

2.1.4.1. エアロゾル粒子のための粒径分布測定装置

乾式気中分散によりエアロゾル化したナノ材料の粒径分布を測定した。測定 する粒径範囲は、ナノ材料の一次粒子の粒径域である粒径 10 nm から、乾式気 中分散で発生したナノ材料凝集体の粒径域を含んだマイクロメートルの粒径域 を測定した。図②(d)-9 に粒径 14 nm から 20 μm の粒径範囲のエアロゾル粒子の 粒径分布の測定に用いた装置と、各装置の測定対象粒径範囲を示す。粒径 14 nm から 670 nm のナノ粒径域は scanning electrical mobility particle sizer (以 下 SMPS, TSI 社製) で測定した。粒径 0.3 μm から 10 μm の範囲は光散乱式気中 パーティクルカウンタ (airborne optical particle counter, RION KC-01E, 気中 0PC)で測定した。粒径 0.55 μm から 20 μm の範囲は aerodynamic particles sizer spectrometer (以下 APS, TSI-3321) で測定した。



図②(d)-9 乾式気中分散したナノ材料凝集体の粒径分布測定のエアロゾル計 測器

2.1.4.2. エアロゾルの希釈

本サブテーマでは、ナノ材料の粉体を乾式気中分散し、マイクロメートル粒径 域のエアロゾル粒子を約10 mg/m³の質量濃度、約1000 cm⁻³の粒子数濃度で発生 した。この状態のエアロゾル粒子群を直接エアロゾル計測器へとサンプルする と、計測器内部にナノ材料の粉体が蓄積し、計測器内部を清掃するためのメンテ ナンス作業が頻繁に生じる。したがって、メンテナンスの発生頻度を最小限にす るため、各エアロゾル計測器の上流に希釈器を設置した。各エアロゾル計測器の 上流に設置する希釈器の流路構造と写真を図②(d)-10 に示す。



図②(d)-10 各エアロゾル計測器の上流に設置する希釈器の流路構造と写真

キャピラリー管を通過するエアロゾル流の圧力損失を流量の関数として予め校 正した。希釈器下流に接続されるエアロゾル計測器の吸引流量に対する不足分 は、外気より HEPA フィルタを通し供給した。ニードルバルブを調節し、キャピ ラリー管を通過する流量を制御した。表②(d)-3 に、エアロゾル液相捕集法で使 用する各エアロゾル計測器に対して使用するエアロゾル希釈器の設計をまとめ る。

用するエノ				
	DataRAM	APS	OPC	SMPS
Sampling flowrate (L/min)	0.5	1	0.3	0.3
Sizes of Swagelok fittings (inch)	1/4	3/8	1/4	1/4
Outer diameter of capillary tube (mm)	1.588	3.175	1.588	1.588
Inner diameter of capillary tube (mm)	1.15	0.7875	0.7875	1.753
Length of capillary tube (mm)	200	300	350	350
Readings on differential pressure gauge (Pa)	150	100	200	500
Flowrate through capillary (L/min)	0.098	0.230	0.017	0.059
Dilution factor (-)	5.1	4.4	17.3	5.1

表②(d)-3 エアロゾル液相捕集法で使用する各エアロゾル計測器に対して使 用するエアロゾル希釈器の設計

2.1.5. 測定結果

2.1.5.1. エアロゾル質量濃度

図②(d)-11 に VMPD で発生した P25 二酸化チタンのエアロゾル粒子群の質量 濃度をエアロゾル質量モニター(Thermo Scientific、DataRAM4)で測定した結 果を示す。濃度が安定するまでに発生開始から 30 分以上を要することが確認さ れた。これは、プログラムが制御し、エアロゾル質量モニターの値が目標値に収 束するまでに要する時間である。



図②(d)-11 VMPD で発生させた P25 二酸化チタンのエアロゾル粒子群の質量濃 度をエアロゾル質量モニターで測定。濃度を目標値を 10 mg/m³と 25 mg/m³に設 定し制御した。

エアロゾル質量モニター (DataRAM4) の測定値をフィルタ捕集法で校正した結

果を表②(d)-4 に示す。エアロゾル質量モニターの校正係数は、フィルタ捕集法 とエアロゾル質量モニターの値の比として定義した。校正係数の値は粉体の種 類によって異なった。また、エアロゾル液相捕集法では、捕集時間を短縮するた め、エアロゾル質量濃度を比較的高くする。このため、エアロゾル質量モニター 検出部の内壁およびレンズ表面に付着した粉体を取り除くための清掃が定期的 に必要となる。清掃実施前後では、校正係数が変動することが確認された。

		JIS Z 8901 試 験用粉体	P25 TiO ₂	P25 TiO ₂	JMT-150IB TiO ₂
エアロゾル質量モニタの表示値		10	25	25	10
校正を実施した時期		2013/08	2013/10 (清掃前)	2013/11 (清掃後)	2015/05
エアロゾル質量モニタ	平均值	1.7 (n=10)	1.3 (n=13)	0. 64 (n=10)	0. 63 (n=5)
レーフィルタ 抽集法	標準偏差	0. 20	0. 057	0.067	0.064

表②(d)-4 エアロゾル質量モニターの校正結果

2.1.5.2. エアロゾル化したナノ材料の粒子数濃度の粒径分布

図②(d)-12 に、乾式気中分散した JIS Z 8901 試験用粉体、および、疎水表面 修飾二酸化チタン(テイカ社、JMT-150IB)の粒径分布を示す。



図②(d)-12 乾式気中分散したナノ材料粉体の粒子数濃度の粒径分布。 (a) JIS Z 8901 試験用粉体、(b) テイカ社 JMT-150IB.

2.1.5.2.1. JIS Z 8901 試験用粉体

SMPS と気中 OPC の測定粒径域が重なる部分では、測定結果が比較的良く一致 した。一方で、APS と気中 OPC で測定した粒径分布の粒径に対する傾向は一致し ているが、APS が測定した粒子数濃度は OPC に比べて顕著に低い。この理由とし て、JIS Z 8901 試験用粉体のエアロゾル粒子に対しては APS による計数損失割 合が高い可能性が挙げられる。また、APS 上流に設置した希釈器内部に粉体が蓄 積し流量が低下していた可能性がある。

2. 1. 5. 2. 2. JMT-150IB

SMPS の測定結果が示す粒径 0.3 µm-0.67 µm の範囲での比較的高い粒子数濃度が、気中 OPC および APS では確認できない。JMT-150IB のエアロゾル粒子群が 部分的に多価に帯電していることが、SMPS の結果が気中 OPC と一致しない原因 の一つである。SMPS は荷電した個々のエアロゾル粒子を電気移動度により分級 する。そして、分級された粒子が 1 価に帯電していることを想定し電気移動分 布を粒径分布に変換する。そのため、1 価より多く帯電した粒径の異なる粒子も、 1 価帯電の粒子と電気移動度が同じであれば、1 価帯電の粒子と同じ粒径区分で 分級・計数し、1 価帯電粒子の濃度とする。これによる濃度測定の誤差は、より 多価に帯電する粒径サブマイクロメートル以上の粒子数の割合が多いと大きく なる。これら多価帯電粒子の効果による補正は、粒径 0.3 µm-0.67 µm の範囲 の SMPS と気中 OPC との濃度の違いを部分的に説明できる。

2.2. エアロゾル粒子の捕集による懸濁液の作製

2.2.1. 原理:凝縮成長と慣性沈着

図②(d)-13 にナノ材料のエアロゾル粒子を凝縮成長し平面や液面に捕集する 仕組みを示す。



図②(d)-13 ナノ材料のエアロゾル粒子を凝縮成長し平面や液面に捕集する仕 組み

凝縮成長管にナノ材料を含んだエアロゾルを層流管に吸引したのち、エアロゾ ルを水蒸気で過飽和状態にする。すると、水蒸気はナノ材料のエアロゾル粒子群 を核として凝縮する。水蒸気の凝縮による粒径の成長は漸近的であり、この粒径 の漸近値は水蒸気の過飽和度に依存する。本サブテーマで使用した Growth Tube Collector (GTC)の場合、凝縮成長後の液滴群の粒径分布の最頻粒径は約3 μm である。図②(d)-14 に GTC 出口で測定した、凝縮成長後のエアロゾル粒子群の 粒径分布を示す。



図②(d)-14 凝縮成長後の液滴群の粒径分布の測定例

これらの凝縮成長した液滴群を平面もしくは液面に捕集する。液滴群を含んだ エアロゾル流の速度をノズルで加速し、速度10 m/s-20 m/sのエアロゾルジェ ットにし、このジェットを捕集面へと近づける。捕集面が液体であると、気流に より液面は歪む。壁に投げた野球ボールが慣性により空気中を通過し壁に衝突 するように、気流と共に加速した液滴は、液面付近で約90度に曲がる気体の動 きに追随できないため、気流の流線より逸脱し面に衝突し付着する。

2.2.2. Growth Tube Collector (GTC)

図②(d)-15(a)にエアロゾル化したナノ材料粉体を捕集するために使用した Growth tube collector (以下 GTC)の外観と構造を示す。



図②(d)-15 (a) Growth tube collector(GTC)の外観と構造、(b) 流路概要図

GTC は米国カルフォルニア州の Aerosol Dynamics 社が製造する装置である (Hering et al. 2014)。内部は conditioner、initiator、moderator、そして加 速ノズルの4部分に分かれている。Conditioner はサンプルしたエアロゾルの温 度を設定値に調節し、同時にエアロゾルの湿度を100%にする。Initiator はエア ロゾルの湿度を過飽和状態にし、エアロゾル粒子に水蒸気を核凝縮させ、図② (d)-14で示した粒径約3 µmを最頻径とした液滴へと凝縮成長させる。Moderator はエアロゾル中の湿度を飽和状態よりに維持しつつ、エアロゾル中から蒸気を 壁へと回収する。Moderator の設定温度はサンプルしたエアロゾルの温度以下に 設定する。これは、エアロゾル中の蒸気が moderator 下流の粒子捕集部で過飽和 になり結露することを防ぐためである。出口ノズルでエアロゾル流を加速し、エ アロゾル中の液滴群を図②(d)-13 の概念図で示したように液面もしくは平面に 慣性捕集した。図②(d)-15 (b)に GTC の流路概要図を示す。GTC のサンプル流量, *Q_{GTC}*, は 3.1 から 5.1 L/min の値に設定した。このうち 3.0 から 5.0 L/min が実 効サンプル流量であり、残りの 0.1 L/min は moderator の壁で結露した水をト ラップに吸引する。

2.2.3. 捕集容器

GTCの加速ノズルの下へと取り付けた3タイプの捕集容器について説明する。

捕集懸濁液の液相側である水と、ナノ材料粉体の表面との親和性が良い場合は、 図②(d)-16(a)の小型捕集カップに3 mlの純水を入れ捕集した。図②(d)-16(b) のように容器を GTC に取り付け、長さ7 mmの撹拌子を捕集液中で回しながら捕 集した。図②(d)-16(c)は P25 二酸化チタン(親水性)を使い作製した懸濁液の 例である。



図②(d)-16(a)ナノ材料粉体の表面が親水性の場合に使用した小型捕集容器、 (b) GTC との接続、(c) P25 二酸化チタンの捕集懸濁液。

ナノ材料の表面が疎水処理されているため、ナノ材料表面と水との親和性が 悪い場合は、図②(d)-17(a)の比較的大き目の捕集容器に、分散剤を添加した純 水を約15 ml入れ捕集した。図②(d)-17(b)のように容器をGTCへと取り付け、 長さ10 mmの撹拌子を使用する。図②(d)-17(c)に、表面疎水修飾二酸化チタ ン(テイカ、JMT-150IB)の懸濁液を作製するため、Tween® 80を100 ppmの体積 濃度で超純水に添加し捕集し作製した懸濁液を示す。



図②(d)-17 (a)ナノ材料粉体の表面が疎水性であるため分散剤を添加し使用した大型捕集容器、(b) GTC との接続、(c) 体積濃度 100 ppm の Tween80®を水に添加し作製した表面疎水修飾二酸化チタン(テイカ、JMT-150IB)の捕集懸濁液。

本サブテーマの目標は分散剤を添加せずに懸濁液を作製することである。ここ ではエアロゾル液相捕集法の応用法の一つとして、分散剤を捕集液に添加した 例を紹介した。

表面が疎水性のナノ材料粉体の懸濁液を、分散剤を添加せずに作製するため には、図②(d)-18(a)で示すプリプロピレン製の基板を使用した。GTC 出ロノズ ル先端から基板表面までの距離は 5 mm である。図②(d)-18(c)に捕集後の表面 疎水修飾二酸化チタン (JMT-150IB)を示す。図②(d)-18(d)に、捕集した JMT-150IB を基板から純水中に移し超音波を加え作製した懸濁液を示す。



図②(d)-18(a) 表面が疎水性のナノ材料粉体を、分散剤を添加せず捕集するためのポリプロピレン基板、(b) GTC との接続、(c) 捕集後の JMT-150IB、(d) 捕集した JMT-150IB を基板から純水中に移し超音波を加え作製した懸濁液。

2.2.4.GTC の粒子捕集効率の評価

2.2.4.1. 評価手順

本サブテーマでは、GTC でサンプルしたエアロゾル粒子を液面・基板上に捕集 できる割合を粒子捕集効率と定義した。図②(d)-12 で示したように、乾式気中 分散でエアロゾル化したナノ材料粉体は、ナノ材料の一次粒子が凝集した粒子 群である。これらの凝集体が液中に懸濁すると、凝集体が解離するかさらに凝集 が進行するかで、粒子数が変化する可能性がある。凝集体が液中に懸濁する前後 でも変化しないと想定できる量は、一次粒子の総粒子数もしくは粒子群全体の 質量である。したがって、本手法では粒子捕集効率を粒子質量基準で評価した。

エアロゾル液相捕集法で気管内投与懸濁液を作製する際には、予め評価した 質量基準の GTC の粒子捕集効率, η_{GTC}, と、捕集時に測定した撹拌チャンバー内 のエアロゾル質量濃度より、GTC で捕集したナノ材料粉体の質量を算出する。GTC の粒子捕集効率を、GTC とフィルタ捕集法で評価した撹拌チャンバー内のエアロ ゾル質量濃度の比と定義した。

$$\eta_{GTC} = \frac{C_{GTC}}{C_{Filter}}$$

[式②(d)-2]

ここに、*C_{Filter}*は 2.1.3 節で説明したフィルタ捕集法で評価した値である。*C_{GTC}* は GTC で評価した撹拌チャンバー内のエアロゾル質量濃度である。この評価で 作製した懸濁液中の粒子質量は、捕集懸濁液を吸引ろ過し求めた。図②(d)-19(a)に捕集質量測定までの手順、図②(d)-19(b)は吸引ろ過中の JMT-150IB の 捕集懸濁液である。







図2(d)-19(a) 捕集質量測定までの手順、

懸濁液のろ過には、親水性メンブレンフィルタ(Whatmann 50)を使用した。使用 前のフィルタの質量を予め測定し、捕集懸濁液を吸引ろ過した。約-1 気圧程度 の真空ラインにニードルバルブを接続し、徐々にバルブを開き捕集液の急激な 吸引を防いた。そして、ろ過後の捕集液が目視で透明になるまで、ろ過後の捕集 液を数回繰り返し吸引ろ過した。ろ過後のフィルタは、温度 80℃に設定したオ ーブンで 8 時間乾燥させ、その後自然冷却した。

ろ過乾燥後、フィルタの質量を再度測定し、ろ過前質量との差分より、捕集懸

⁽b)は吸引ろ過中の JMT-150IB の捕集懸濁液。
濁液中の粒子質量 Δm_{susp} の値を得た。そして、GTC で評価した撹拌チャンバー内の濃度を算出した。

$$C_{GTC} = \frac{\Delta m_{susp}}{Q_{GTC} \cdot \Delta t} \qquad [\exists (2) (d) - 3]$$

ここにQ_{crc}は、GTC 入口でのサンプル流量であり、Δtは捕集時間である。

2.2.5. 測定結果

2.2.5.1. GTC の粒子捕集効率

表②(d)-5 に、本サブテーマで乾式気中分散した3種類の工業用粉体に対する 粒子捕集効率を示す。

		単位	JIS Z 8901	P25	テイカ JMT-150IB	
			試験用粉体	二酸化チタン	二酸化チタン	
評価実験の繰り返し回数			5	5	5	
粒子捕集	平均值		89%	82%	35%	
効率	標準偏差		7.9%	1.0%	3.1%	
評価実験時の		mg m ⁻³	6 0+0 67	21+11	15 6+1 5	
気中粒子質量濃度			0.0±0.07	01-11	10. 0±1. 0	
評価実験時の		cm ⁻³ 10	101+6 /	1200-2200	1750±390	
気中粒子数濃度			101±0.4	1200-2200		

表②(d)-5 GTC の粒子質量基準での粒子捕集効率の評価結果

粒子表面が親水性の材料である JIS Z 8901 試験用粉体および P25 の粒子捕集効率は、それぞれ 89%と 82%と比較的高く再現性も良好であった。一方で、疎水表面修飾二酸化チタン(JMT-150IB)の捕集効率は約 35%程度と比較的低いが、再現性は良好であった。捕集効率が低い理由は、GTC 内部の過飽和状態の蒸気が、JMT-150IB の凝集体に結露し慣性沈着できる大きさに成長する効率が低下しているためと思われる。

2.2.4 節の粒子捕集効率の評価では、エアロゾル液相捕集法で作製した懸濁液 中の粒子質量, Δm_{susp},を直接測定した。しかし、気管内投与試験用に作製した 懸濁液はすべて提供するためΔm_{susp}の値は直接測定しない。捕集懸濁液中の粒 子質量の値は以下の式により求める。

 $\Delta m_{susp} = \eta_{GTC} \cdot C_m \cdot Q_{GTC} \cdot \Delta t \qquad [式②(d)-4]$ ここに C_m は気中エアロゾル粒子の質量濃度であり、エアロゾル液相捕集法で捕

集懸濁液の作製と同時にフィルタ捕集法(2.1.3.2.節)で測定することが好ましい。2.1.3.1.節で述べたエアロゾル質量モニターで測定した値を*C_mと*する場合は、同じ時期にフィルタ捕集法でエアロゾル質量モニターの校正を実施する。また、エアロゾル質量モニターの校正係数の変化を防ぐため、この時期にエアロゾル質量モニター内部の清掃をしないことが好ましい。

エアロゾル液相捕集法で作製した気管内投与試験用懸濁液の仕様を表②(d)-6に示す。エアロゾル液相捕集法により日常的に作成可能な懸濁液を、P25 および JMT-150IB 二酸化チタンを用いて作製した。

		P25 AEROXIDE® 二酸化チタン	テイカ JMT-150IB 二酸化チタン
Maga	Average value	0.31 mg/ml	0.16 mg/ml
concentration	Standard uncertainty	0.10 mg/ml	0.017 mg/ml
Dortiala number	Average value	1.9×10 ¹¹ ml	2.3×10 ¹¹ ml
concentration	Standard uncertainty	0.44 $\times 10^{11}$ ml	0.54 ×10 ¹¹ ml
Particle size distribution	Number mean diameter	91 nm	58 nm
	Geometric standard deviation	1.8	1. 7

表②(d)-6 エアロゾル液相捕集法により日常的に作成可能な懸濁液の仕様

標準捕集時間 6.0 時間とし、輸送用バイアルへと移した後での懸濁液の体積 を 40 ml と想定した。懸濁液中の粒子数濃度およびその粒径分布の測定法は 2.3 節で説明する。本手法で開発した懸濁液は、気管内投与試料としての条件を満た し得るかについて検討した。表に示した粒子質量濃度は 0.15-0.30 mg/ml の範 囲であり、値は捕集懸濁液の体積を 40 ml と想定した値である。この質量濃度 は、気管内投与試験で通常使用される質量濃度である 1-3 mg/ml よりも約一桁 低い値であるが、使用可能な範囲内である。

2.3. 捕集懸濁液中の粒径分布測定

2.1.6.節で示したように、乾式気中分散でエアロゾル化するとナノ材料は一次粒子の凝集体となる傾向がある。そして、これら凝集体を液相中に捕集すると、より小さな単位の凝集体に解離することがある。これは、粒子表面が水分子と作用し電荷を持った結果生まれる反発力によるものと考えられる。したがって、エアロゾル液相捕集法で作製した懸濁液中の粒子数を、気中で測定した粒子数濃度より求めることはできない。本サブテーマでは、エアロゾル液相捕集法で作製したナノ材料懸濁液中の粒子数濃度、およびその粒径分布を測定した。

本サブテーマでは、粒子数濃度を正確に測定するため、懸濁液中よりサンプル した粒子の群に含まれる個々の粒子を、直接計数する手法を選択した。図②(d)-20 に、粒径 12 nm から 10 µm の粒径範囲の捕集懸濁液中の粒径分布測定に使用 した装置の組み合わせを示す。粒径 0.21 µm-20 µm の範囲での粒径分布測定 は、光散乱式液中パーティクルカウンタ(liquid-borne optical particle counter, 以下 LOPC または液中 OPC)で測定し、粒径約 0.012 µm-0.28 µm の 範囲ではエアロゾル計測技術を応用した。具体的には、捕集懸濁液を気中に再分 散させ懸濁液中の粒子をエアロゾル化した後、scanning mobility particle sizer (以下 SMPS)で測定した。



図②(d)-20 粒径 12 nm から 10 μm の粒径範囲の捕集懸濁液中の粒径分布を測 定する装置と、各装置の測定粒径範囲

2.3.1. 液中 OPC を使った粒径分布測定

2.3.1.1. 捕集懸濁液の希釈

液中 OPC で精度よく粒子数濃度を測定するため、懸濁液中の粒子数濃度を約 1000 個/ml 以下に希釈する。また、気中の汚染微粒子が混入し懸濁液が汚染されることを防ぐため、空気清浄度の管理を行った。懸濁液の希釈は、低発塵のテ フロン製のボトルを使用した。超純水で捕集懸濁液を段階的に希釈する。各ステ ップの希釈倍率は電子天秤を使い質量基準で行うことで濃度の不確かさを低減 した。

液中 0PC で測定する前に、エアロゾル液相捕集法で作製した懸濁液の原液を約 10⁴倍に2段階で希釈した。①定量ピペットで 0.2 ml を採取し、超純水を 200

ml 加え 10³倍に希釈した。②「①」で作成した希釈液 20 ml に超純水を加え、総体積約 200 ml に希釈した。超純水を加える際は、ボトルの壁伝いに超純水を静かに注入し、注入時の気泡発生を防いだ。また、希釈後の試料を撹拌においても、 気泡発生を防ぐため、ボトルをゆっくりと手で回転させ攪拌した。

2.3.1.2. 液中 OPC システムの構成

図②(d)-21 に液中 0PC による粒径分布測定の流路図、および、懸濁液試料の 吸引ライン、懸濁液試料用の微粒子センサ、微粒子カウンタおよびそれと連動す る定量シリンジサンプラの写真を示す。



図②(d)-21 液中 OPC による粒径分布測定の流路図、および、試料を吸引させる 状態、懸濁液試料用の微粒子センサ (RION KS-28B)、微粒子カウンタ (例: RION KL-11A)、およびそれと連動する定量シリンジサンプラ (RION KZ-30W1)。

クリーンブース内に設置したテフロン管を、試料ボトル内のに挿入し、試料ラインの最下流に設置した定量シリンジサンプラ(RION KZ-30W1)で液中微粒子用センサ(RION KS-28B)に吸引した。吸引速度は10 ml/minに設定した。吸引開始30 秒後より、微粒子カウンタ(RION KL-11A)が自動で粒子数濃度の粒径分布測定を60 秒間行う。約2桁の粒径範囲を液中0PCで測定するため、ダイナミックレンジの異なる二つのセンサを準備した。それぞれの可測粒径範囲を、0.21 μm-2.0 μm および0.5 μm-20 μm とした。そして、捕集懸濁液を10⁴倍で希釈した試料の粒径分布測定を行った。もし、液中0PC が高濃度による測定エラーを報告した場合、このエラーが解消されるまで、2 倍から 10 倍の範囲にさらに試料を希釈し測定した。

2.3.1.3. 液中 OPC が測定する粒径の校正

微粒子カウンタ(RION KL-11A) はセンサからの個々の光散乱信号の高さが、 ユーザーが設定したしきい値以上であった粒子検出イベントの数を積算し、ヒ ストグラムを構築する。光散乱信号の高さを粒径の関数として校正する必要が あり、この校正作業を製造メーカに依頼した。この校正では粒径標準ポリスチレ ンラテックス球(polystyrene latex sphere, 以下 PSL 球)が使われる。図② (d)-22 に製造メーカにより提供された、PSL 球の粒径と光散乱信号強度の例を 示す。



図②(d)-22 RION KS-28B 液中微粒子センサの光散乱信号と PSL 球の粒径の関係。KS-28Bの可測粒径粒径範囲は(a) 0.25 µm -2.0 µm、(b) 0.5 µm -20 µm

メーカが PSL 球を使用し校正した結果を、各粒径区分の光散乱信号のしきい値 電圧に設定した。図②(d)-23 に液中 OPC を使った粒径分布測定に使用した粒径 区分の境界粒径を示す。



図②(d)-23 液中 OPC での粒径分布測定に使用した粒径区分の例

図②(d)23 に赤矢印で示した値は、特定の粒径区分の幅を他に比べ過度に広くし ないため、人為的に粒径点を設定した。これらの粒径点での光散乱信号の値は、 メーカの校正データに経験式を当てはめ算出した。 粒径 0.5 µm から 1 µm の範 囲に二つのセンサがオーバーラップする領域を設け、二台のセンサで測定した 粒径分布を比較した。

2.3.2. エアロゾル計測技術を応用した粒径分布測定

2.3.2.1. 測定手法の概要

粒径約 0.012 μm-0.28 μm の 範囲ではエアロゾル計測技術を応用した。この 評価手順の概要を図②(d)-24 に示す。



図②(d)-24 校正用データおよび捕集懸濁液中の粒子数濃度の粒径分布を測定 するための、エアロゾル計測技術を応用した手法の模式図

粒径と粒子数濃度 N_{susp} が既知の単分散粒子懸濁液を、 $10^5 \sim 10^6$ 程度の倍率で 希釈し(濃度 N'_{susp})、これを気中分散し、 N'_{susp} に対する気中での濃度 $N_{aerosol}$ との比, $N'_{susp}/N_{aerosol}$, を粒径の関数として評価した(校正係数)。一方、エアロ ゾル液相捕集法で作製した捕集懸濁液中の粒子数濃度 \hat{N}_{susp} は未知である。捕集 懸濁液を気中分散し粒子数濃度の粒径分布を測定し、校正係数を用いて、捕集懸 濁液中の粒子数濃度の粒径分布へと変換した。捕集懸濁液は容量が少ないため、 加圧噴霧に必要な容量(約 100 ml)に超純水で希釈した。希釈後の捕集懸濁液 の(未知である)粒子数濃度を \hat{N}'_{susp} とし、この懸濁液をエアロゾル化し測定し た粒子数濃度を $\hat{N}_{aerosol}$ とした。そして、 $\hat{N}_{aerosol}$ にステップ1で得られた校正係 数を掛算し、捕集懸濁液中の粒子数濃度 \hat{N}'_{susp} を算出し、さらに希釈前の粒子数 濃度 \hat{N}_{susp} を求めた。図②(d)-24 中のステップ1 で使用する粒径と粒子数濃度が 既知の懸濁液は、現状では市販されていない。そのため、JSR 社が製造し販売す る粒径標準 PSL 球の懸濁液 STADEX シリーズを使用した。図②(d)-25 に作製の原 理を示す。



図②(d)-25 JSR STADEX シリーズ・(粒径標準 PSL 球)より、粒子数濃度が既 知の懸濁液を作製する原理

STADEX シリーズの利点は、分散剤が含まれていない点である。そのため、STADEX 乾燥後の質量は、PSL 球群と仮定できる。STADEX 懸濁液中の PSL 球群の質量濃 度 M_{susp} を、乾燥後質量を乾燥前質量で割算し算出した。そして、この質量濃度 を PSL 球 1 個あたりの質量 m_p で割算し、PSL 球群の粒子数濃度 N_{susp} に変換した。 PSL 球ー個あたりの質量は、STADEX の校正証明書より粒径 D_p と PSL 球の質量密 度 ρ_p より $m_p = \rho_p \cdot \pi \cdot D_p^3/6$ の式で算出した。

2.3.2.2. STADEX 中 PSL 球の粒子数濃度の評価

STADEX を乾燥させるため、ポリプロピレン製のバイアル(容量約0.6 ml、質量約140 mg)を5本準備した。バイアルを設置するスタンドはアルミ箔で作成した。導電性のスタンドを使うことで、バイアル表面の静電気による測定質量の誤差を緩和した。バイアルおよびアルミ箔の表面に付着している半揮発性の不純物が、STADEX 乾燥後の質量の誤差となることを防ぐため、バイアルおよびアルミ箔を過熱した。STADEX 乾燥には簡易型真空乾燥器(アズワン KVO-300)を使用した。バイアルをアルミスタンドへと設置し、温度 60°Cに設定し 2 時間乾燥する。イオナイザーでバイアル表面の静電気を十分に除電し質量測定を行う。電子天秤は、フィルタ質量の測定と同様に最大秤量が数g、最小表示が 0.1 μgを満たす機種(Mettler Toledo UMX2)を使用した。バイアル質量の個体差、および乾燥処理後の質量差の測定結果は 2.3.3.1節で示す。

STADEX を超音波で撹拌したのち、STADEX を体積 200 µl を変量ピペット(例: Eppendorf 20-200 µl, 1261028)で採取し、バイアルに注入した。乾燥器内ホ ットプレートにバイアルとスタンドー式を乗せ、バイアルの蓋を開けたまま乾 燥させた。ホットプレートの温度は 60°Cに設定した。真空チャンバーの蓋を閉 め、真空ポンプに接続したニードルバルブを徐々に開き、乾燥器内の気圧をマイ ナス 80 kPa 程度にまで減圧した。約 2 時間で STADEX 内の水分は揮発した。チ ャンバー内気圧を大気圧に徐々に戻したのち室温まで冷ました。乾燥器内より バイアルおよびスタンドー式をバイアルの蓋を空けたままで取り出し、イオナ イザーで除電した後、乾燥後質量を電子天秤で測定した。上述手法で評価した STADEX 粒径標準 PSL 球懸濁液中の PSL 球の質量割合の評価結果および、図②(d)-25 で示した手順で算出した STADEX の粒子数濃度は 2.3.3.1.節の測定結果で示 す。

2.3.2.3. 校正係数N'susp/Ngerosolの取得

図②(d)-24 で示した粒径と粒子数濃度*N_{susp}*が既知の STADEX 懸濁液を 10⁵~ 10⁶程度の倍率で希釈し作製した、粒子数濃度*N'_{susp}*の PSL 球懸濁液、および、粒子数濃度*Ñ'_{susp}*が未知である希釈後捕集懸濁液をエアロゾル化する装置の模式図および写真を図②(d)-26 に示す。



図②(d)-26 希釈した STADEX 懸濁液および捕集懸濁液をエアロゾル化する装 置の模式図および写真

体積約200 ml に希釈した STADEX 懸濁液、もしくは捕集懸濁液を容量1 Lの ガラスボトルに入れ、加圧噴霧式アトマイザー(Constant output atomizer, TSI 社 Model 3076)で気中に噴霧する。噴霧液滴を壁温度110°Cに設定した配管を通 し蒸発させ、その下流で水蒸気を拡散エアロゾル乾燥器で回収した。拡散エアロ ゾル乾燥器(司測研製)の内部構造を図②(d)-27 に示す。壁が網状の配管の外 側の空間がシリカゲルで充てんされている。拡散エアロゾル乾燥器を使用する ことで、下流でSMPS が吸引する1 L/minのサンプル流量のエアロゾルの湿度を、 10%程度にまで下げることができた。



図②(d)-27 拡散エアロゾル乾燥器の構造

そして、SMPS により測定した粒子数濃度の粒径分布の解析より、校正係数 N_{susp}/N_{aerosol},を取得した。

粒径 0.05 μm, 0.07 μm, 0.1 μm, および 0.25 μm の PSL 球懸濁液を使い、 SMPS で測定した粒径分布より、エアロゾル中での PSL 球群の粒子数濃度*N_{aerosol}* を解析した結果を 2.3.3.2 節で示す。また、*N_{aerosol}*の値と、既知である希釈後 STADEX 懸濁液中の PSL 球の粒子数濃度*N'_{sus}より*校正係数*N'_{susp}/N_{aerosol}*を取得す る。そして、2.2.3.2 節で上述の粒径四種を使い評価した、*N'_{susp}/N_{aerosol}*の結果 も示す。各 PSL 球の粒径で校正係数*N'_{susp}/N_{aerosol}*の値を 5 回以上繰り返し評価 し、各粒径での平均値を平均し、捕集懸濁液の粒子数濃度の粒径分布の解析で使 用する*N'_{susp}/N_{aerosol}*とした。

2.3.2.4. 捕集懸濁液中の粒子数濃度測定の評価

捕集懸濁液を気中に再分散し SMPS で測定し、エアロゾル化したナノ材料の粒子数濃度 $\hat{N}_{aerosol}$ の粒径分布関数を、 $\Delta \hat{N}_{aerosol} / \Delta \log D_p$ を得た。そして、この粒径分布関数と校正係数で掛け算し、噴霧用ボトル内での捕集懸濁液の粒子数濃度の粒径分布 $\Delta \hat{N}'_{susp} / \Delta \log D_p$ を求め、捕集懸濁液の原液を希釈した倍率 D.F.でさらに掛け算し、捕集懸濁液中の粒子数濃度の粒径分布 $\Delta \hat{N}_{susp} / \Delta \log D_p$ を求めた。

$$\frac{\Delta N_{susp}'}{\Delta \log D_p}\Big|_{i} = \frac{\Delta \overline{N}_{aerosol}}{\Delta \log D_p}\Big|_{i} \cdot \left(\frac{N_{susp}'}{N_{aerosol}}\right) \qquad [\exists (2) (d) - 5a]$$

$$\frac{\Delta \overline{N}_{susp}}{\Delta \log D_p}\Big|_{i} = \frac{\Delta N_{susp}'}{\Delta \log D_p}\Big|_{i} \cdot (D.F.) \qquad [\exists (2) (d) - 5b]$$

ここに i は粒径区分の通し番号であり i の範囲は $1 \le i \le imax$ である。捕集懸濁 液の再分散と SMPS 測定で得た粒径 0.28 μ m 以下の粒径分布と、液中 0PC で測定 した粒径 0.21 μ m 以上の粒径分布を統合する。統合後の粒径分布関数を以下の 式で粒径に対し積分し、捕集懸濁液中の粒子数濃度 \hat{N}_{susp} を算出した。

$$\widehat{N}_{susp} = \sum_{i=1}^{imax} \frac{\Delta \widehat{N}_{susp}}{\Delta \log D_p} \Big|_{i} \cdot \Delta \log D_p \Big|_{i} \qquad [\exists (2) (d) - 6]$$

ここに $\Delta \log D_p |_i$ は、SMPS もしくは液中 OPC に設定した各粒径区分幅である。各

粒径区分中の粒子数濃度 $\hat{N}_{susp}|_i = \frac{\Delta \hat{N}_{susp}}{\Delta \log D_p}|_i \cdot \Delta \log D_p|_i を積分し<math>\hat{N}_{susp}$ を算出した。 2.3.3.3.節に、P25 と JMT-150IB を使い作製し、エアロゾル技術および液中 0PC で測定した捕集懸濁液中の粒径分布関数を $\Delta \hat{N}_{susp}/\Delta \log D_p$ 示す。 2.3.3. 測定結果: 捕集懸濁液中の粒径分布測定

2.3.3.1. STADEX 中 PSL 球の粒子数濃度の評価

表②(d)-7 に、STADEX 懸濁液の乾燥質量測定に使用したバイアルの質量の個体差、および、アルミスタンド付きバイアルの乾燥前後での質量差を示す。

表②(d)-7 STADEX 懸濁液の乾燥質量測定に使用したバイアル、および、バイ アルとアルミスタンド付きバイアルの乾燥前後での質量差

	average (n=19)	141.51 mg	
Mass of vial after drying at 60 °C	Coefficient of 0.0045		
	varations	0.0045	
Change in the mass of an assembly	average (n=19)	−3.6 µg	
consisting of vial and aluminum	Coefficient of	0.02	
stand after drying at 60 °C.	varations	0.92	

乾燥後のバイアル質量の変動係数は0.45%であり、個体差は比較的小さい。一方で、アルミスタンド付きバイアルの質量は、過熱により数マイクログラム減少する傾向がある。この減少量は、本手順書でのSTADEX乾燥質量約2mgの数10分の1%であり比較的小さい。

本手法で評価した STADEX 粒径標準 PSL 球懸濁液中の PSL 球の質量割合の評価 結果および、図②(d)-25 で示した手順で算出した STADEX の粒子数濃度を表② (d)-8 にまとめる。STADEX 中の PSL 球の質量割合は STADEX の校正証明書の値 1% に近く、変動係数も最大 1.5%と比較的小さく、良好な結果が得られた。

表②(d)-8 JSR STADEX 中の PSL 球の質量割合の評価結果、および算出した粒 子数濃度のまとめ

Nominal Size of PSL spheres	0.048 µm	0.070 µm	0.100 µm	0.254 μm
Lot number	110531	Unknown	110120	090205
Number of replicates	5	5	5	5
Average mass fraction of PSL spheres in STADEX	0. 0101	0. 0107	0. 0102	0. 0113
Coefficient of variations	0. 0097	0.0010	0. 015	0. 0041
Average mass of a PSL sphere, kg	6.59×10 ⁻²⁰	1.94×10 ⁻¹⁹	5.56×10 ⁻¹⁹	9. 17×10 ⁻¹⁸
Number concentration of PSL spheres in STADEX (particles/kg)	1.53×10 ¹⁷	5. 51×10 ¹⁶	1.84×10 ¹⁶	1. 23×10 ¹⁵

2.3.3.2. 校正係数N'susp/Naerosolの評価

粒径 0.05 μm, 0.07 μm, 0.1 μm, および 0.25 μm の PSL 球懸濁液を使い、

SMPS で測定した粒径分布より、エアロゾル中での PSL 球群の粒子数濃度 N_{aerosol} を解析した結果を示す。図②(d)-28 に SMPS で測定した PSL 球の粒子数濃度の粒 径分布を示す。



図②(d)-28 粒径標準 PSL 球懸濁液を加圧噴霧し、SMPS で測定した粒子数濃度 の粒径分布。粒径(a) 0.05 μm, (b) 0.07 μm, (c) 0.1 μm, および(d) 0.25 μm の PSL 球の粒径分布

SMPS は粒子を電気移動度で分級する。大きさが異なる1価に帯電した粒子群 では、小さい粒子ほど電気移動度が大きい。SMPS は1価帯電の粒子の大きさは 正しく測定するが、複数帯電の粒子の大きさを正しく測定できない。同一粒径で 2価帯電の粒子は電気移動度が2倍になるため、SMPS が報告する粒径は、青線 で示す同じ電気移動度の1価帯電粒子の粒径となる。また、加圧噴霧した液滴群 に PSL 球が複数個含まれると、図の緑線で示す体積が約2倍の2量体粒子が発 生する。これら2量体粒子の発生確率は、懸濁液中の粒子数濃度と伴に増加する。 粒径分布を解析し、図内の赤線が示す1価帯電粒子群の粒径分布を求め、この粒 径分布を積分しエアロゾル中での PSL 球群の粒子数濃度*Naerosol*とする。

粒子数濃度*N_{sus}*が既知である上述 4 粒径の PSL 球懸濁液を使い評価した、 *N_{susp}*/*N_{aerosol}*を図②(d)-29 に示す。日間再現性を評価するため、各粒径で 4 日 分のデータを取得した。



図②(d)-29 校正係数N[´]_{susp}/N_{aerosol}(希釈後 STADEX 懸濁液中とエアロゾル中の粒子数濃度の比)の例

これら校正係数の平均値は 1.57×10⁵ (ml⁻¹ of liquid) / (cm⁻³ of gas)であった。粒径と日間再現性を変数とした分散分析を行った結果、測定日および粒径の違いによる校正係数の標準偏差は、相対標準偏差としてそれぞれ 13%と 19%であった。合成後の相対標準偏差は約 23%であった。

2.3.3.3. 捕集懸濁液中の粒子数濃度測定の粒径分布

粒径 0.05 μ m, 0.07 μ m, 0.1 μ m, および 0.25 μ m の PSL 球懸濁液を使い評価 した校正係数 $N'_{susp}/N_{aerosol}$ の平均値を使用し、捕集懸濁液を気中に再分散し SMPS で測定した粒径分布より評価した、P25 と JMT-150IB を使い作製した捕集 懸濁液中の粒子数濃度 \hat{N}_{susp} の粒径分布関数 $\Delta \hat{N}_{susp}/\Delta \log D_p$ を図②(d)-30 に示す。 粒径 0.015 μ m-0.28 μ m および 0.21 μ m-10 μ m の範囲を、それぞれエアロゾル 計測技術と液中 0PC で測定した。

エアロゾル計測技術と液中 OPC の測定範囲がオーバーラップしている粒径域 での粒子数濃度は、不確かさの範囲内で一致している。これより、これら二つの 手法で測定した粒径 0.15 µm-10 µm の範囲での粒径分布の測定結果の信頼性は 高いと考えられる。図②(d)-12 の粒径分布で示したように、乾式分散したナノ 材料はマイクロメートル粒径域の凝集体である。一方で、捕集懸濁液中の粒子群 はナノメートルからサブマイクロメートル粒径域の凝集体である。乾式気中分 散した二酸化チタンの凝集体を液相中に捕集すると、より小さな単位の凝集体 に解離する。図②(d)-30 で示した P25 と JMT-150IB の粒径分布の最頻粒径域に 属する粒子を透過電子顕微鏡観察用グリットに捕集した。図②(d)-31(a)と、図 ②(d)-31(b)にこれらの捕集懸濁液中の凝集体を透過電子顕微鏡で観察した画

像を示す。



図②(d)-30 P25 および JMT-150IB 二酸化チタンを使い作製した、捕集懸濁液 中の粒子数濃度の粒径分布Δ*Ñ_{susp}*/Δ logD_pの測定結果。



図②(d)-31 捕集懸濁液中の粒径分布の最頻粒径域に属する粒子の透過電子顕 微鏡画像(a) JMT-1501B, (b) P25 AEROXIDE

3. まとめ

本サブテーマでは、任意のエアロゾル試料に適用可能な気管内投与試験用ナ ノ材料懸濁液作成技術として、気中ナノ粒子を液中に直接捕集することで、液中 での力学的及び物理化学的な強制分散過程を経ない気管内投与試験用懸濁液の 作成技術を構築した。そして、気管内投与試験用試料作成のためのエアロゾルの 液相捕集手法に関する標準的手順書の試案をとりまとめて公開した。 エアロゾル化したナノ材料を核とした過飽和水蒸気の核凝縮を誘発し、エア ロゾル粒子を含んだ約3µmの液滴に成長させる。そして、これら液滴群を含ん だエアロゾルを加速し、液滴の持つ慣性を利用して、液面もしくは平面基板上に 捕集する。エアロゾル化したナノ材料の表面が親水性であれば、直接液面に捕集 することができるが、ナノ材料の表面が疎水性である場合は、一旦平面基板上に 捕集する。そして、捕集中に平面基板上に堆積するナノ材料の粒子群を乾燥させ ない注意が必要である。

本サブテーマでは、表面が親水性と疎水性の2種類の二酸化チタン(TiO₂)ナノ 材料を試験ナノ材料として手法を開発した。表面が親水性および疎水性の TiO₂ として、それぞれ P25 AEROXIDE®および Tayca JMT-150IB を使用した。そして、 これらの TiO₂ の原粉体を乾式気中分散しエアロゾル化した。乾式気中分散した TiO₂ エアロゾル粒子群の粒径分布を測定した結果、これらの粒子群は粒径 1-2 μm に最頻粒径を持つ凝集体であった。

核凝縮を誘発し慣性捕集するための装置として、Aerosol Dynamics 社の Growth Tube Collector (GTC)を使用した。上述2種類の二酸化チタン(TiO₂)を 用いて、GTC の粒子捕集効率を質量基準で評価した結果、親水性 TiO₂ の場合は 82±1.0%、疎水表面修飾 TiO₂の場合は 35±3.1%であった。疎水性の TiO₂ 捕集効率 粒子捕集効率が低い理由は、GTC 内部の過飽和状態の蒸気が、疎水性 TiO₂の凝集 体を慣性沈着できる大きさにまで凝縮成長させる効率が低下しているためと思 われる。

また、捕集懸濁液中の粒子数濃度の粒径分布を測定した。ナノ粒径域からサブ マイクロメートル粒径域ではエアロゾル計測技術を応用した。具体的には、捕集 懸濁液を気中に再分散し懸濁液中の粒子をエアロゾル化した後、粒径分布を測 定した。サブマイクロメートルからマイクロメートル粒径域では、液中 OPC を 使用した。親水性および疎水性のどちらの TiO₂ においても、捕集懸濁液中の粒 子群の最頻粒径は約 50 nm から数 100 nm に属していた。これらの結果より、乾 式分散したマイクロメートル粒径域の TiO₂ の凝集体が液相中に捕集されると、 より小さな単位の凝集体に解離することが分かった。

気管内投与試験で用いる懸濁液試料として、本手法で作製した懸濁液を使用 する場合の仕様を検討した結果、質量濃度は通常使用される試料よりも約1桁 低めであるが、気管内投与試験で使用されている範囲の濃度であった。本手法で 作製した懸濁液試料の特長の一つは、通常ナノ材料と同等の濃度で添加される 分散剤を含んでいないことである。ナノ材料の健康影響の評価では、分散剤自体 に毒性がないことを実証したのみでは不十分と考えられている(Jones and Grainger 2009)。分散剤は細部壁を通過するなど、ナノ材料と共に生体内部へと 輸送される。これより、同等の濃度で添加されているナノ材料と分散剤が互いに 独立して生体に作用すると実証することが難しい (Monteiro-Riviere et al. 2005)。これより、本手法で開発した懸濁液は、気管内投与試験に望まれている 条件を満たしている。

4. 参考文献

- Hering, S. V., S. R. Spielman and G. S. Lewis (2014). "Moderated, Water-Based, Condensational Particle Growth in a Laminar Flow." Aerosol Science and Technology 48(4): 401-408.
- Jones, C. F. and D. W. Grainger (2009). "In vitro assessments of nanomaterial toxicity." <u>Advanced Drug Delivery Reviews</u> **61**(6): 438-456.
- Kenny, L. C. and R. A. Gussman (1997). "Characterization and modelling of a family of cyclone aerosol preseparators." <u>Journal of</u> Aerosol Science 28(4): 677-688.
- McKinney, W., B. Chen and D. Frazer (2009). "Computer controlled multi-walled carbon nanotube inhalation exposure system." <u>Inhalation Toxicology</u> 21 (12-14): 1053-1061.
- Monteiro-Riviere, N. A., A. O. Inman, Y. Y. Wang and R. J. Nemanich (2005). "Surfactant effects on carbon nanotube interactions with human keratinocytes." <u>Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine</u> 1(4): 293-299.

研究開発項目③ナノ材料の有害性試験・評価のための基盤技術の開発 (a-1)ナノ材料の体内分布及び生体反応分布の定量化技術の開発

国立研究開発法人産業技術総合研究所分析計測標準研究部門

1. 目的

本課題の最終目標は『動物試験における組織レベルの広視野の観察と細胞レベルの高解像度な観察とを組み合わせたナノ材料の体内分布および生体反応の 分布の定量化技術の計測手法の開発』を行い、技術解説書として公開すること である。動物試験におけるエンドポイントとして、肺組織の病変観察が重要で ある。数センチメートルの大きさがある試験動物の肺組織において、サブミリ メートルの分解能で広視野の観察を行うには、光学顕微鏡やレーザー共焦点顕 微鏡といった光を用いた顕微鏡法が有用である。通常の病理診断は光学顕微鏡 を用いた数十ミクロンメートルオーダーの観察により行なわれる。一方、ナノ 材料の肺組織への影響を調べるには、通常の病理診断に加えてナノ材料の局在 を調べることが重要であるが、ナノ材料の局在を観察するためには光学顕微鏡 では分解能が不十分であり、サブナノメートルの分解能を有する透過型電子顕 微鏡(Transmission electron microscope; TEM)が有効である。TEMを用いれ ば細胞の微細構造に至る高解像度な観察が可能であり、肺組織中に取り込まれ たナノ材料を直接可視化できる。

さらに肺組織中に取り込まれたナノ材料の生体影響を調べるためには、生体 反応のイメージングが有効な手法となる。抗原抗体反応を利用した標識化を行 うことでタンパク質の分布をイメージングすることによりナノ材料に起因し た生体反応分布の定量化が可能となる。抗原抗体反応を利用した標識化には、 蛍光色素を標識とした蛍光顕微鏡を用いた広視野の観察と金粒子を標識とし たTEMを用いた細胞レベルの高解像度な観察があるが、これらの手法はこれま で個別に実施されることが多く、ナノ材料の生体反応分布を適切に定量化する ための統合的手法としては確立していない。

本課題では肺組織の切片に対してミリメートルオーダーの広視野の観察とナ ノメートルオーダーの高解像度による細胞組織の観察とを組み合わせて、肺組 織内におけるナノ材料の分布および生体反応の分布を定量化する方法を確立す る。

2. 成果

本研究において観察試料作製は特に重要な開発課題である。生物組織は解剖 による生命活動の停止とともにタンパクや脂質の流失等により微細構造が変 化してしまう。透過型電子顕微鏡観察ではサブナノメートルオーダーで細胞の 微細構造を維持した観察試料を作製することが必要である。一方で、広範囲の 光学顕微鏡観察のためには袋状の柔らかい臓器である肺全体を薄切化する必 要がある。さらに生体反応分布の可視化のためには免疫染色を行うために抗原



図③(a-1)-1 本開発技術のポイント

抗体反応を失活させないプロ セスであることが必要である。 以上の要求を満たす観察試料 作製プロトコルを開発し、ミリ メートルオーダーの広視野の肺 組織においてナノ材料の分布状 態を観察する技術、細胞中に取 り込まれたナノ材料のナノメー トルオーダーの分析観察技術の 開発を行なった。さらに抗原抗

体反応を失活させない観察試料作製プロトコルを開発し、ナノ材料の取り込み による生体反応分布に関してミリメートルオーダーの広視野で肺組織を観察す る技術、またナノメートルオーダーで肺組織を細胞レベルで観察する技術の開 発を行なった。開発する技術のポイントと流れを図③(a-1)-1 に示す。図中の肺 組織の試料調整は肺組織の微細構造を維持し、かつ免疫染色を行うために抗原 抗体反応を失活させないことが重要であるため、動物の解剖時のプロトコルと して技術解説書に記載した。

これらの手法を研究開発項目②(a)「吸入暴露試験と気管内投与試験の比較検 討」において実施する動物試験に適用して、観察手法のブラッシュアップを行 い、最終的に技術解説書としてまとめて公開した。

2.1. 全体の流れ

ナノ材料の吸入暴露試験および気管内投与試験を行なったラットの肺組織を 対象として、動物個体の有効利用を鑑み、ミリメートルオーダーの広視野計測 からサブナノメートルオーダーの高分解能計測まで広く対応できる試料調製方 法を開発した。本試料調製方法により、解剖後の肺組織において抗原抗体反応 を失活させずに微細構造を保持するマイルドな処理が可能となった。

全体の流れとして、ナノ材料の吸入暴露試験および気管内投与試験後のラットの『解剖における手順』に従い肺組織を処理した後、『ミリメートルオーダー のナノ材料分布の観察の手順』、『ナノメートルオーダーのナノ材料分布の観察 の手順』、『ミリメートルオーダーの生体反応分布の定量化の手順』、『ナノメー トルオーダーの生体反応分布の定量化の手順』に従い必要な解析を行なう。解 剖後の肺組織の連続切片を用いる事により、肺のほぼ同一の部位に関してナノ 材料分布や生体反応分布の定量化を行なう事が可能となる。



図③(a-1)-2 全体の流れ

- 2.2. 解剖
- 2.2.1. 適用範囲

ここに示す解剖手順は、ラットを用いたナノ粒子の吸入暴露や気管内投与に よる動物試験において、ナノ粒子を吸入又は投与された肺組織の顕微鏡試料の 調製に適用する。

2.2.2.用語、定義及び記号

(a) 固定

生命活動の停止によるタンパク質の変性を停止させて、生きている状態に近 い形態に保つ処理。化学的固定と物理的固定に大別される。

(b) 化学的固定

化学反応によって、細胞内のタンパク質や脂質を安定化することによって構 造形態を保持する方法。アルデヒド基による蛋白間の架橋構造により変性凝集 させるアルデヒド系固定剤や酸化還元反応により蛋白凝集をさせる重金属系固 定剤などを用いる。

(c) 物理的固定

物理的に組織の生体活動や細胞内の水の移動を瞬時に凝固させることによって、生きている状態に近い形態を保持する方法。急速に極低温にする急速凍結 法と加圧下で水の凝固速度を遅延しながら凍結する高圧凍結法がある。

(d) 緩衝液

生物組織は pH に敏感なため、酸や塩基を加えたり濃度が変化しても pH が大

きく変化しないようにした溶液。生物組織の電子顕微鏡試料調製では、リン酸 緩衝液やカコジル酸緩衝液が一般的。

2.2.3.装置及び材料

(a) 解剖道具一式

ラットの解剖に用いる道具として、はさみ、ピンセット、鉗子等を用いる。

(b) チューブポンプ

シリコンなどの軟質チューブをローラーでしごいて液体を送液するポンプ。 代表的な製品としてアトー社のペリスタポンプがある。

(c) 加圧シリンジ

肺胞等の細胞の内外に空気を含む組織では固定液などの液を組織に浸透させ るために固定環境を加圧または減圧することが有効である。肺組織では肺胞腔 をつぶさないため加圧法が有効であり、一定時間シリンジを加圧するために用 いる。

2.2.4. 試薬

リン酸緩衝液(以下, PBと表記) 0.1mol に濃度調製する。

パラフォルムアルデヒド(以下, PFAと表記)固定液 0.1mol リン酸緩衝液を 溶媒として 4%に濃度調製する。

(注釈)

電子顕微鏡試料調整のための PFA 固定液はパラフォルムアルデヒド粉末から 出来るだけ解剖直前に調整する。粉末の PFA を蒸留水に溶かして調整する場合、 PFA は室温では 溶けにくいので約 70°Cに温め、1 規定 水酸化ナトリウム水溶 液をすこしずつ入れて粉末 PFA が溶け残るか溶け残らないか位の所で水酸化ナ トリウム水溶液を入れるのをやめる(あまり入れ過ぎると pH が アルカリ性にな りすぎるため)解け残った PFA 粒子を除去するため、ろ紙でろ過する。その後蒸 留水を加えて8%PFA 溶液を調整。8%PFA 溶液と同量の 0.2 mol PB を混合し て、4%PFA/0.1 mol PB 400mL を作製する。これらの作業は局所排気設備で行 う。

- 2.2.5. 手順
- (a) ラットの麻酔
- ・ラットに麻酔をかける。
- (b)開胸
- ・ラットを開胸する。

(c) 肺の膨張

・4% PFA/0.1 mol PB パックを、肺から約 50cm の高さにセットする。

・気管に 4%PFA/0.1 mol PB パックにつながったチューブをつなぎ、その水圧 で徐々に気道から 4% PFA /0.1 mol PB 固定液を注入する。

・十分に肺が膨らんだら気道を結さくする。

(d) 灌流固定

・肺動脈の中に針が出るように、右心房に注射針を刺して保持する。

・チューブポンプを用いて 0.1 mol PB を 10mL/分の流速で灌流させる。右心耳 を切り心臓から血液を排出させる。

・右心耳からの液が透明になってきたら(およそ 100mL(10分)、チューブポン プの灌流液を 0.1 mol PB から 4%PFA/0.1 mol PB に切り替える。4% PFA /0.1 mol PB の灌流作業は局所排気設備で行い、右心耳から排出された 4% PFA /0.1 mol PB は廃液として回収する。

・100mL(10分)灌流したら、灌流固定をやめる。

(e) 肺の摘出

気管を結さくし、肺胞内を固定液で満たした状態のまま、食道、血管等を切断し、肺を摘出する。

(f) 浸漬固定

・4% PFA /0.1 mol PB 固定液を満たしたシリンジに肺を入れ、加圧しながら浸 漬固定をする(4℃、2時間)。シリンジ先端は封止して、シリンジには空気抜き 穴を開けておく。加圧器の写真を図③(a-1)-3 に示す。またシリンジを加圧して いない状態を図③(a-1)-4(左)に、加圧した状態を図③(a-1)-4(右)に示す。加 圧することにより肺中に固定液が浸透し、沈んでいる事がわかる。

(g) 組織洗浄

・固定後2時間経過したら、4℃の0.1 mol PB液で組織の洗浄を行う。この際、
 肺を各葉に切り分け、洗浄液と固定液が置換されやすくする。10分ごとに交換

を4回、15分ごとに交換を2回、1時間ごとの交換を2回行なう。



図③(a-1)-3 加圧シリンジ



図③(a-1)-4 加圧していない状態の肺(左)と加圧状態の肺(右)

2.3. ミリメートルオーダーのナノ材料分布の観察技術

ミリメートルオーダーの肺組織の広視野の観察からナノ材料の分布を分析す るため、肺組織の通常の光学顕微鏡切片プレパラートを用いた分析手法を検討 した。光学顕微鏡切片プレパラートを用いた分析が可能になれば、光学顕微鏡 で病理診断した切片をそのまま用いてナノ材料の分布計測が可能となるため、 病理との直接的な比較ができる。二酸化チタンや酸化ニッケル等の金属酸化物 ナノ粒子を対象とし、金属の元素マッピング手法を検討した。分析手法として、 電子線をプローブとした手法とX線をプローブとした手法が考えられるが、生物 組織切片も絶縁性であるために電子線照射によるチャージアップ現象が問題と なる。チャージアップを防止するためには、金属やカーボン薄膜をコーティン グする事により表面に導電性を付与する必要がある。チャージアップ防止のた めの金薄膜コーティングを行なったところ、十分なチャージアップ防止のため には金薄膜膜厚を厚くする必要が有り光学顕微鏡観察に支障があった。そこでX 線プローブによる試料との相互作用により発生した蛍光X線のエネルギー分析 を行う手法分析を選択した。X線をコリメーターで収束する事により分析の空間 分解能を向上させる事が可能である。現状技術で最小径である10μm径のコリメ ーターを用いてX線を収束して光学顕微鏡切片プレパラートに照射して、蛍光X 線分析および元素マッピングを行なう。

2.3.1. 適用範囲

ここに示す手順は、ラットを用いたナノ粒子の吸入暴露試験もしくは気管内 投与試験において、ナノ粒子を吸入又は投与された肺組織の光学顕微鏡切片試 料の蛍光 X 線分析に適用する。

2.3.2. 用語、定義及び記号

(a) 蛍光 X 線分析

X線を試料に照射した時に発生する蛍光X線のエネルギーと強度から、物質 の成分元素や組成を分析する手法。蛍光X線は元素毎にそのエネルギーが固有 のため元素分析が可能となる。X線は物質を透過する能力が高く、固体、液体、 粉体を非破壊で分析することが可能。

(b) **氷晶防止処**理

凍結時、組織中での氷の結晶化の防止効果、さらに組織と包埋剤の間にでき る亀裂防止のための処理。

(c) 凍結包埋

生物試料の包埋の際に加熱や有機溶媒による脱水を行わないため、抗原の反応性が失われにくいという利点がある。 凍結の際に氷晶が生じるのを防ぐための処理後に凍結用コンパウンドに組織片を包埋し、-90℃に冷却したイソペンタン-ヘキサン混合液中で凍結する。

(d) 凍結切削

凍結した組織標本を低温状態で薄切する手法。

2.3.3. 装置及び材料

(a) 蛍光X線分析装置

収束したX線を試料に照射して試料より発生した蛍光X線のエネルギーと強 度を分析する装置。X線の収束径が小さいほど空間分解能が高い分析が可能と なる。実施例で用いた蛍光 X 線分析装置(堀場製作所製モデル XGT-7200V)は X 線を 10 μm 径まで収束できる。

(b) 凍結包埋装置

イソペンタン等の有機溶剤を-90℃に保持するための装置。(例えば Leica 社 UT2000F)

(c) 凍結切削装置

凍結包埋した組織ブロックを冷温状態で薄切りする装置。(例えばLeica 社クリオスタット、Thermo 社クリオスタット)

2.3.4. 試薬

- 0.1mol リン酸緩衝液(PB)
- ・ショ糖

 ・凍結用コンパウンド(例えばサクラファインテック社 0.C.T.コンパウンド、
 Thermo 社 NEG50)

2.3.5. 手順

観察試料を通常のガラスプレパラート上に保持した光学顕微鏡切片を用いる。 ガラスプレパラートは表面処理無しのものを用い、肺試料切片にカバーガラス はかけない。

解剖後の肺試料から観察試料を調製する場合は、パラフォルムアルデヒドで 固定した肺は柔らかいために、そのままでは光学顕微鏡切片に切削することは 困難である。そこで肺組織を凍結して切片を調製する手法を用いた。以下に手 順を示す。

(a) 試料トリミング

・カミソリを用いて組織を冠状断に約5mm厚にスライスする。

(b) 洗浄

• 0. 1mol PB で撹拌、20 分保持。これを3 回繰り返す。

(c) 氷晶防止処理

- ・10%ショ糖-0.1mol PB 混合液で撹拌、2 時間保持。
- ・20%ショ糖-0.1mol PB 混合液で撹拌、2 時間保持。
- ・30%ショ糖-0.1mol PB 混合液で撹拌、一晩保持。(試料が沈むまで)

(d) 置換

・凍結用コンパウンド 室温 浸漬 30 分~2 時間保持する。

(e) 脱気

・真空中で脱気、凍結用コンパウンド室温 浸漬 30 分~2 時間保持。

(f) 凍結包埋

・新しい凍結用コンパウンドを治具に充填し、-90°Cに冷却したイソペンタン-ヘキサン混合液(混合比 3:8)中に浸漬して凍結する。

(g) 凍結切削

- ・クリオスタットにて-20℃、8µm厚にて切削
- ・表面処理(MAS コーティング等)したスライドグラスに貼り付け
- ・風乾

2.3.6. 実施例

二酸化チタンナノ粒子分散液を気管内投与して3日後のラット肺組織の光学 顕微鏡切片を調製した。包埋剤であるパラフィンは除去し、光学顕微鏡観察の ための染色は行っていない。図③(a-1)-5に左肺切片の光学顕微鏡像を示す。光 学顕微鏡像より気管支から細気管支、末端の肺胞にいたるまでの様子がわかり、 また一部に炎症が生じていることがわかる。この光学顕微鏡切片プレパラート に10µmに収束したX線を照射して発生したチタンのL線(526eV)の蛍光X線強度 をマッピングし、図③(a-1)-6に示す。マッピングにおけるX線スポットピッチ は60µmとした。図③(a-1)-5および図③(a-1)-6の比較から、二酸化チタンナノ 粒子が気管支に留まるのではなく周辺の肺胞まで侵入すること、二酸化チタン ナノ粒子が肺内の局部的に多く取り込まれていることがわかる。さらに詳細な 二酸化チタンナノ粒子の局在分布を調べるために、光学顕微鏡観察において炎 症が見られた部位についてチタンのマッピングを行った。図③(a-1)-7にチタン のマッピングを行った炎症部位の光学顕微鏡像を、図③(a-1)-8にチタンのL線

(526eV)の蛍光X線強度マッピング像を示す。X線の収束径は10µm、X線走査ピ ッチは10µmである。二酸化チタンは炎症部分に多く分布していることがわかる。 これより、気管内投与された二酸化チタンナノ粒子は肺胞マクロファージによ り貪食され、貪食したマクロファージが集簇して炎症を形成していることが推 測される。また各測定点での蛍光X線スペクトルの相対強度から二酸化チタンの 定量分布を知ることができる。この計測手法を用いて光学顕微鏡観察と組み合 わせることにより、肺組織における二酸化チタンナノ粒子の局在部位を詳細に 調べることができる。



図③(a-1)-5ラット肺の光学顕微鏡像



図③(a-1)-6 チタンのマッピング像



図③(a-1)-7 ラット肺の光学顕微鏡像



図③(a-1)-8 チタンのマッピング像

2.4. ナノメートルオーダーのナノ材料分布の観察技術

細胞や生体組織へのナノ粒子の取り込み、組織細胞の形態観察によるダメージの有無、他の組織への移行及び体外への排出を調べることは、安全性試験の結果を判断する上で重要である。透過型電子顕微鏡(Transmission electron microscope; TEM)は空間分解能が高く、形態や組成分析、結晶構造解析等が可能であるために、ナノ粒子の計測において最も有効な計測手法である。また試

料を透過した電子の電子線エネルギー損失分光 (Electron energy loss spectroscopy; EELS) により試料の元素分析や元素マッピングも可能である。

ここでは、ナノ粒子の吸入暴露試験もしくは気管内投与試験を行なったラット肺組織を透過型電子顕微鏡で観察するための試料調製手順を示す。生体組織は、生命活動が停止した直後から刻々と変化するので、いかに生きている状態の組織の微細構造を維持して透過型電子顕微鏡試料として調製するかが重要な ポイントとなる。

2.4.1. 適用範囲

ここに示す手順は、ラットを用いたナノ粒子の吸入暴露試験もしくは気管内 投与試験において、解剖直後にパラフォルムアルデヒドによる固定を行なった 後、0.1molリン酸緩衝液で洗浄したラット肺組織に適用する。

2.4.2. 用語、定義及び記号

(a) 固定

生命活動の停止によるタンパク質の変性を停止させて、生きている状態に近 い形態に保つ処理。化学的固定と物理的固定に大別される。

(b) 化学的固定

化学反応によって、細胞内のタンパク質や脂質を安定化することによって構造形態を保持する方法。アルデヒド基による蛋白間の架橋構造により変性凝集 させるアルデヒド系固定剤や酸化還元反応により蛋白凝集をさせる重金属系固 定剤などを用いる。

(c)物理的固定

物理的に組織の生体活動や細胞内の水の移動を瞬時に凝固させることによって、生きている状態に近い形態を保持する方法。急速に極低温にする急速凍結 法と加圧下で水の凝固速度を遅延しながら凍結する高圧凍結法がある。

(d) 緩衝液

生物組織は pH に敏感なため、酸や塩基を加えたり濃度が変化しても pH が大 きく変化しないようにした溶液。生物組織の電子顕微鏡試料調製では、リン酸 緩衝液やカコジル酸緩衝液が一般的。

(e) トリミング

樹脂包埋した生物試料ブロックの切削面を整形して薄切しやすくする作業。

2.4.3.装置及び材料

(a) ウルトラミクロトーム

樹脂に包埋した生物組織をダイヤモンドナイフによって、厚さ100 nm 以下の 薄さに切削する装置。

(b) 恒温槽

60 ℃の一定温度に保持することができるもの。

2.4.4. 試薬

- 0.1 mol リン酸緩衝液 (PB)
- ・1% 四酸化オスミウム 0.1 mol リン酸緩衝液
- ・エタノール -水混合液
- ・n-ブチルグリシジルエーテル
- ・n-ブチルグリシジルエーテル -エポキシ樹脂混合液
- ・エポキシ樹脂

2.4.5. 手順

生物細胞や組織を透過型電子顕微鏡で観察するためには、生きている組織を そのままの状態に保存しなければならない。この処理を固定という。固定には 化学的処理による方法と物理的固定法があるが、ここでは、化学的固定法によ る手順を示す。固定した生物細胞や組織は水分を含有するために、透過型電子 顕微鏡の真空環境下に導入できない。さらに、透過型電子顕微鏡で組織を観察 するためには、100 nm 以下の切片にしなければならないため、組織を樹脂に包 埋する必要があるが、樹脂は水との親和性が低いことから、直接樹脂を組織内 に浸透させることは困難である。以上から、一旦水からアルコールに置換した 後に、樹脂に置換するのが一般的である。

(a) 肺組織の後固定

4℃の1% 四酸化オスミウム - 0.1 mol リン酸緩衝液に浸し、2時間保持。

(b) 肺組織の洗浄

蒸留水で洗浄する。10分後に交換を2回行う。

(c) 肺組織の脱水処理

・50%エタノール - 50%水混合液中で撹拌、4℃で5分間保持。これを3回繰

り返す。

・70%エタノール - 30%水混合液中で撹拌、4℃で 5 分間保持。液を交換後に 撹拌、10 分保持。

・80%エタノール - 20%水混合液中で撹拌、4℃で 5 分間保持。液を交換後に 撹拌、10 分保持。

・90%エタノール - 10%水混合液中で撹拌、4℃で 15 分間保持。これを 2 回繰 り返す。

95%エタノール - 5%水混合液中で撹拌、15分間保持。これを2回繰り返す。

・100%エタノール中で撹拌、30分間保持。これを2回繰り返す。

(d) 肺組織の樹脂包埋

・n-ブチルグリシジルエーテルで撹拌、15分間保持。これを2回繰り返す。

・50% n-ブチルグリシジルエーテル - 50%エポキシ樹脂混合液中で撹拌、2 時 間保持。

・33% n-ブチルグリシジルエーテル - 67%エポキシ樹脂混合液中で撹拌、1 晩 保持。

・エポキシ樹脂液中で撹拌、7時間保持。

・真空中で脱気処理。

・60 ℃恒温槽で48時間以上保持し、エポキシ樹脂を硬化。

(e) 超薄切片の調製

切削する試料が0.5 mm角となるようにトリミング。

・ウルトラミクロトームでダイヤモンドナイフによって 50~100 nm 厚さに切片 を調製。

・親水化処理した透過型電子顕微鏡用グリッドに切片を載せる。

(f) 超薄切片の染色及び補強

・必要に応じて、2%酢酸ウラン水溶液及び鉛染色液で染色する。

・必要に応じて、カーボン薄膜を蒸着して補強する。

2.4.6. 実施例

通常の病理診断は光学顕微鏡像により広範囲な視野を観察して行なわれる。 光学顕微鏡で観察した同一の組織試料から電子顕微鏡観察が可能になれば、病 理診断により特定した部位のナノレベルの解析によりナノ材料との相関を知る ことができる。そこで光学顕微鏡観察後に電子顕微鏡用試料を観察した。

光学顕微鏡観察には樹脂包埋した肺試料をダイヤモンドナイフで広範囲を薄

片化して作製した。図③(a-1)-9 に酸化ニッケルナノ粒子の吸入暴露試験1ヶ月 後のラット左肺の光学顕微鏡像を示す。さらに図③(a-1)-9 中の黒線で囲った部 分を切り出して、ウルトラミクロトームにより超薄切片に切削し、銅メッシュ (200 メッシュ)上に保持した。薄片化した試料は必要に応じて酢酸ウラニル溶 液および鉛溶液による染色を行った。



図③(a-1)-9 酸化ニッケルナノ粒子吸入暴露1ヶ月後のラット肺の 光学顕微鏡像

図③(a-1)-10 に肺胞マクロファージの透過型電子顕微鏡像を示す。マクロフ ァージの核、ミトコンドリアや小胞等の細胞内小器官が見られる。また矢印で 示した箇所に酸化ニッケルナノ粒子がわかる。本手法を用いることにより、光 学顕微鏡によるミリオーダーの観察と透過型電子顕微鏡によるナノオーダーの 観察を組み合わせた観察が可能となる。



図③(a-1)-10 光学顕微鏡試料から切り出した部位の透過型電子顕微鏡像

図③(a-1)-11(a)に酸化ニッケルナノ粒子を気管内投与したラットの肺胞マ クロファージの透過型電子顕微鏡像を示す。細胞の微細構造は明瞭に保持され ており、黒色粒子が存在していることがわかる。電子線エネルギー損失分光法 によるニッケルのマッピング像を図③(a-1)-11(b)示す。黒色粒子とニッケルの マッピング像は良く一致することから、肺胞マクロファージに取り込まれた黒 色粒子は酸化ニッケルであると判定される。



図③(a-1)-11 マクロファージに取り込まれた酸化ニッケルナノ粒子(a)と ニッケルの元素マッピング像(b)

2.5. ミリメートルオーダーの生体反応分布の定量化技術

ミリメートルオーダーの肺組織全体の広視野の観察から、炎症部位を特定し て免疫組織学的な生体反応解析との対応を調べるため、肺組織の光学顕微鏡切 片プレパラートを用いた免疫組織学的解析手法を検討した。光学顕微鏡切片プ レパラートを用いた分析が可能になれば、光学顕微鏡で病理診断した切片をそ のまま用いてナノ材料の生体反応解析が可能となるため、病理との直接的な比 較ができる。

従来の研究から、肺に取り込まれたナノ粒子は肺胞マクロファージに貪食されることが知られている。近年、マクロファージは炎症性マクロファージ(M1) と抗炎症性マクロファージ(M2)に分類されている。これらマクロファージの 活性化状態を知ることができれば、そのマクロファージが炎症の進行状態なの か終熄状態であるのかが明らかになる。そこでM1マクロファージの炎症性メデ ィエーターに注目して、免疫組織学的解析手法を開発した。M1マクロファージ の表面レセプターの一つである Toll 様受容体 4 (Toll like receptor; TLR4) の産生がナノ粒子投与量と相関がある、との報告があるため TLR4 に注目した。 TLR4 はリポ多糖をリガンドとする受容体である。

抗原抗体反応を失活させないために組織の固定はパラフォルムアルデヒドに よる灌流固定を行なった。詳細は解剖手順に記載する。

2.5.1. 適用範囲

ここに示す手順は、ラットを用いたナノ粒子の吸入暴露試験もしくは気管内投 与試験において、解剖直後にパラフォルムアルデヒドによる固定を行なった後、 0.1mol リン酸緩衝液で洗浄したラット肺組織に適用する。

2.5.2. 用語、定義及び記号

(a) 氷晶防止処理

凍結時、組織中での氷の結晶化の防止効果、さらに組織と包埋剤の間にでき る亀裂防止のための処理。

(b) 凍結包埋

生物試料の包埋の際に加熱や有機溶媒による脱水を行わないため、抗原の反応性が失われにくいという利点がある。 凍結の際に氷晶が生じるのを防ぐための処理後に凍結用コンパウンドに組織片を包埋し、-90℃に冷却したイソペンタン-ヘキサン混合液中で凍結する。

(c) 凍結切削

凍結した組織標本を低温状態で薄切する手法。

(d) ブロッキング

抗原抗体反応の前に、他種の血清を切片にかけて、標的タンパク質以外のタンパク質をブロックして、非特異的反応を防ぐ処理。

(e) 免疫染色

抗体を用いて、組織標本中の抗原を検出する組織学(組織化学)的手法。標 識された一次抗体を用いる直接法と一次抗体に対し標識された二次抗体を反応 させる間接法がある。

(f) 一次抗体染色

組織標本中の抗原に対して抗体を含む液を一定時間反応させることによって 抗原と抗体を結合させるための処理。 (g) 二次抗体染色

3.6の抗体を抗原として、色素や蛍光色素、金コロイド等のマーカーで標識された抗体を結合させる処理。

- 2.5.3. 装置及び材料
- (a) 凍結包埋装置

イソペンタン等の有機溶剤を-90℃に保持するための装置。(例えば Leica 社 UT2000F)

(b) 凍結切削装置

凍結包埋した組織ブロックを冷温状態で薄切りする装置。(例えばLeica 社クリオスタット、Thermo 社クリオスタット)

- 2.5.4. 試薬
- ・0.1mol リン酸緩衝液(PB)
- ・ショ糖

 ・凍結用コンパウンド(例えばサクラファインテック社 0.C.T.コンパウンド、 Thermo 社 NEG50)

- ・2%ウシ血清アルブミン-10%正常ヤギ血清-0.01%TritonX-0.1mol PB水溶液
 (ブロッキング溶液)
- ・抗 TLR4-ウサギ ポリクロナール抗体ブロッキング溶液
- ・ FITC 標識-抗ウサギ IgG ヤギ抗体ブロッキング溶液
- ・封入剤(例えば Thermo 社 PermaFluor、Merck 社 Entellan® new)
- 2.5.5. 手順

解剖後にパラフォルムアルデヒドで固定した肺は柔らかいために、そのままでは光学顕微鏡切片に切削することは困難である。そこで肺組織を凍結して切 片を調整する手法を用いた。以下に手順を示す。

(a) 試料トリミング

・カミソリを用いて組織を冠状断に約5mm厚にスライスする。

(b) 洗浄

• 0.1mol PB で撹拌、20 分保持。これを3 回繰り返す。

(c) 氷晶防止処理

- ・10%ショ糖-0.1 mol PB 混合液で撹拌、2 時間保持。
- ・20%ショ糖-0.1 mol PB 混合液で撹拌、2 時間保持。
- ・30%ショ糖-0.1 mol PB 混合液で撹拌、一晩保持。(試料が沈むまで)

(d) 置換

・凍結用コンパウンド 室温 浸漬 30 分~2 時間保持する。

(e) 脱気

・真空中で脱気、凍結用コンパウンド室温 浸漬 30 分~2 時間保持。

(f) 凍結包埋

・新しい凍結用コンパウンドを治具に充填し、-90℃に冷却したイソペンタン-ヘキサン混合液(混合比 3:8)中に浸漬して凍結する。

(g) 凍結切削

- ・クリオスタットにて-20℃、8µm厚にて切削
- ・表面処理(MASコーティング等)したスライドグラスに貼り付け
- ・風乾

(h) ブロッキング

・2%ウシ血清アルブミン-10%正常ヤギ血清-0.01%TritonX-0.1mol PB水溶液
 に浸し、室温 30 分保持。

(i)一次抗体染色

・抗 TLR4-ウサギ ポリクロナール抗体ブロッキング溶液 (200 倍希釈) に浸し、 4℃で一晩保持。

(j) 二次抗体染色

・FITC 標識-抗ウサギ IgG ヤギ抗体ブロッキング溶液 (500 倍希釈) に浸し、室 温で 2 時間保持する。

(k) 洗浄

・0.1 mol PB で 20 分浸漬保持。これを 3 回繰り返す。

(1) 封入

・封入剤にて封入、乾燥させる。

2.5.6. 実施例

ラットを用いて酸化ニッケルナノ粒子の気管内投与試験を行った。気管内投 与試験終了1ヶ月後に解剖して肺を摘出し、顕微鏡観察試料を調整した。酸化 ニッケルナノ粒子0.2mg を気管内投与して1ヶ月後のラットの肺組織のトルイ ジンブルー(TB)染色した切片の光学顕微鏡像、および光学顕微鏡像中のA お よびB領域(気管支近く)のTLR4蛍光標識した蛍光顕微鏡像を図③(a-1)-12に 示す。気管内投与した肺組織では気管支近傍において、肺胞マクロファージが 明瞭に蛍光染色されており、肺胞上皮細胞と肺胞マクロファージの蛍光強度比 を比較すると、気管内投与した肺組織の肺胞マクロファージが強い蛍光を発し ていることがわかる。

蛍光強度から TLR4 産生を定量評価する事ができる。そのためには入射光(水 銀ランプやレーザー光)の強度を一定に揃える必要がある。標準発光ビーズ等 を用いて入射光強度を同じにして測定を行なう。





図③(a-1)-12 酸化ニッケルナノ粒子を気管内投与して 1 ヶ月後のラットの肺 組織の光学顕微鏡像、および光学顕微鏡像中の A および B 領域の TLR4 蛍光標識 した蛍光顕微鏡像

2.6. ナノメートルオーダーの生体反応分布の定量化技術

透過型電子顕微鏡を用いてナノレベルの生命反応の定量化技術を開発するた めに、光学顕微鏡による免疫組織学的解析による生体反応解析と同様の手法を 検討した。対象は前述のようにM1マクロファージの表面レセプターであるTLR4 である。光学顕微鏡観察ではFITC 蛍光色素を標識として用いたが、透過型電子 顕微鏡観察では金コロイド標識を用いる。金コロイドは真空中で電子線照射に よっても安定であるため、肺胞マクロファージに付着した金コロイドの解析を 行なう事でTLR4産生部位の解析が可能となる。

試料調整方法は前述の光学顕微鏡による免疫組織学的解析手法の1次抗体染 色まで同一であり、2次抗体染色から透過型電子顕微鏡用に手順が変わる。グル タルアルデヒドおよび四酸化オスミウム水溶液による後固定を行い、肺組織の 微細構造を維持した後、電子線照射に強いエポキシ樹脂に置換する。

2.6.1. 適用範囲

ここに示す手順は、ラットを用いたナノ粒子の吸入暴露試験もしくは気管内投 与試験において、解剖直後にパラフォルムアルデヒドによる固定を行なった後、 0.1mol リン酸緩衝液で洗浄したラット肺組織に適用する。

2.6.2. 用語、定義及び記号

(a) 氷晶防止処理

凍結時、組織中での氷の結晶化の防止効果、さらに組織と包埋剤の間にでき る亀裂防止のための処理。

(b) 凍結包埋

生物試料の包埋の際に加熱や有機溶媒による脱水を行わないため、抗原の反応性が失われにくいという利点がある。 凍結の際に氷晶が生じるのを防ぐための処理後に凍結用コンパウンドに組織片を包埋し、-90°Cに冷却したイソペンタン-ヘキサン混合液中で凍結する。

(c) 凍結切削

凍結した組織標本を低温状態で薄切する手法。

(d) ブロッキング

抗原抗体反応の前に、他種の血清を切片にかけて、標的タンパク質以外のタンパク質をブロックして、非特異的反応を防ぐ処理。

(e) 免疫染色

抗体を用いて、組織標本中の抗原を検出する組織学(組織化学)的手法。標 識された一次抗体を用いる直接法と一次抗体に対し標識された二次抗体を反応 させる間接法がある。光学顕微鏡と電子顕微鏡の相関を調べるため間接法を用 いた。

(f) 一次抗体染色

組織標本中の抗原に対して抗体を含む液を一定時間反応させることによって 抗原と抗体を結合させるための処理。

(g) 二次抗体染色

(f)の抗体を抗原として、色素や蛍光色素、金コロイド等のマーカーで標識された抗体を結合させる処理。

2.6.3. 装置及び材料

(a)凍結包埋装置

イソペンタン等の有機溶剤を-90℃に保持するための装置。(例えば Leica 社 UT2000F)

(b) 凍結切削装置

凍結包埋した組織ブロックを冷温状態で薄切りする装置。(例えば Leica 社クリ オスタット、Thermo 社クリオスタット)

- 2.6.4. 試薬
- ・0.1mol リン酸緩衝液(PB)
- ・ショ糖

 ・凍結用コンパウンド(例えばサクラファインテック社 0.C.T.コンパウンド、 Thermo 社 NEG50)

・2%ウシ血清アルブミン-10%正常ヤギ血清-0.01%TritonX-0.1mol PB 水溶液
 (ブロッキング溶液)

- ・抗 TLR4-ウサギ ポリクロナール抗体ブロッキング溶液
- ・ FITC 標識-抗ウサギ IgG ヤギ抗体ブロッキング溶液
- 5nm 金コロイド標識-抗ウサギ IgG ヤギ抗体
- 1% 四酸化オスミウム 0.1 mol リン酸緩衝液
- ・ エタノール −水混合液
エポキシ樹脂

2.6.5. 手順

解剖後にパラフォルムアルデヒドで固定した肺は柔らかいために、そのままでは光学顕微鏡切片に切削することは困難である。そこで肺組織を凍結して切 片を調整する手法を用いた。以下に手順を示す。

- (a) 試料トリミング
- ・カミソリを用いて組織を冠状断に約5mm厚にスライスする。
- (b) 洗浄

• 0. 1mol PB で 撹拌、20 分保持。これを3 回繰り返す。

- (c) 氷晶防止処理
- ・10%ショ糖-0.1mol PB で撹拌、2 時間保持。
- ・20%ショ糖-0.1mol PB で撹拌、2 時間保持。
- 30%ショ糖-0.1mol PBで撹拌、一晩保持。(試料が沈むまで)
- (d) 置換
- ・凍結用コンパウンド室温 浸漬 30 分~2 時間保持

(e) 脱気

・真空中で脱気、凍結用コンパウンド室温 浸漬 30 分~2 時間保持

(f) 凍結包埋

・新しい凍結用コンパウンドを治具に充填し、-90℃に冷却したでイソペンタン -ヘキサン混合液(混合比3:8)中に浸漬して凍結する。

(g) 凍結切削

- ・クリオスタットにて-20℃、8µm厚にて切削
- ・表面処理(MASコーティング等)したスライドグラスに貼り付け
- ・風乾

(h) ブロッキング

・2%ウシ血清アルブミン-10%正常ヤギ血清-0.01%TritonX-0.1molPB 水溶液に
浸し、室温 30 分保持。

(i) 一次抗体染色

・抗 TLR4-ウサギ ポリクロナール抗体ブロッキング溶液(20 倍希釈)に浸し、 4°Cで一晩保持。

(j) 二次抗体染色

・5nm 金コロイド標識ー抗ウサギ IgG ヤギ抗体 (20 倍希釈) に浸し、室温 2 時間保持。

(k)後固定

・2.5% グルタルアルデヒド水溶液に浸し、15分保持

(1) 後後固定

・1%四酸化オスミウム水溶液に浸し、30分保持。

(m)脱水

- ・50%エタノール 50%水混合液中で撹拌、10分間保持。
- ・70%エタノール 30%水混合液中で撹拌、10分間保持。
- ・80%エタノール 20%水混合液中で撹拌、10分間保持。
- ・90%エタノール 10%水混合液中で撹拌、10分間保持。これを2回繰り返す。
- ・95%エタノール 5%水混合液中で撹拌、10分間保持。これを2回繰り返す。
- ・100%エタノール中で撹拌、10分間保持。これを3回繰り返す。

(n) 包埋

・EPON812 混合樹脂を充てんしたビームカプセルを試料上に被せて包埋する。

・60 ℃恒温槽で48時間以上保持し、エポキシ樹脂を硬化させる。

(o) 超薄切片の調整

切削する試料が2mm角となるようにトリミング。

・ウルトラミクロトームでダイヤモンドナイフによって 50~100 nm 厚さに切片 を調製。

・親水化処理した透過型電子顕微鏡用グリッドに切片を載せる。

(p) 超薄切片の染色及び補強

- ・必要に応じて、2%酢酸ウラン水溶液及び鉛染色液で染色する。
- ・必要に応じて、カーボン薄膜を蒸着して補強する。

2.6.6. 実施例

ラットを用いて酸化ニッケルナノ粒子の吸入暴露試験を行った。吸入暴露試 験終了1ヶ月後に解剖して肺を摘出し、顕微鏡観察試料を調製した。図③ (a-1)-13(a)にラット左肺の肺胞マクロファージ像を示す。凝集物近傍の拡大 像を図③(a-1)-13(b)に示す。写真中矢印部分に粒径20nm程度の粒子が凝集し ており、酸化ニッケルナノ粒子が貪食されている事がわかる。吸入暴露試験チャンバー中の酸化ニッケルエアロゾルは100nm程度に凝集していることがわか っており、この肺胞マクロファージに貪食された粒子は形態から酸化ニッケル ナノ粒子であると判断できる。図③(a-1)-13(a)に示した肺胞マクロファージ の端部の拡大像を図③(a-1)-13(c)に示す。マクロファージ端部には矢印で示 すように黒いナノ粒子が観察される。これは2次抗体の金コロイド標識であり、 表面レセプターであるTLR4の産生量を定量的に評価することができる。



図③(a-1)-13酸化ニッケルナノ粒子吸入暴露1ヶ月後のラット左肺の肺胞マク ロファージ(a)と(a)拡大像(b)、マクロファージ端部の拡大像(c)

3.まとめ

生物組織を顕微鏡観察する場合、細胞組織の形態や微細構造を保持した試料 作製が非常に重要である。ナノ材料の気管内投与試験及び吸入暴露試験を行な ったラット肺に関して、光学顕微鏡と蛍光 X 線顕微鏡を用いたサブミリメート ルの分解能での広範囲の観察と、透過型電子顕微鏡を用いたサブナノメートル の高分解能での観察をするための試料作製手法を確立した。これによりナノ材 料の体内分布に関しては、光学顕微鏡による形態観察と蛍光 X 線顕微鏡による ナノ材料元素マッピングによる広視野の定量解析が可能となった。また透過型 電子顕微鏡によるサブナノメートルの分解能で細胞組織内でのナノ材料の局在 観察や電子分光手法による定量的元素マッピングが可能となった。

ナノ材料の生体反応分布に関しては、レーザー共焦点顕微鏡と透過型電子顕 微鏡を用いた免疫組織学的解析手法を確立した。炎症性マクロファージ(M1) の表面レセプターである Toll 様受容体 4 (TLR4) に関して、蛍光標識によるサ ブミリメートルの分解能でのレーザー共焦点顕微鏡観察と、金ナノ粒子標識に よるナノメートルの分解能での透過型電子顕微鏡観察により TLR4 産生の定量的 解析が可能となった。開発した手法の技術解説書を公開し、本課題の最終目標 を達成できた。 研究開発項目③ナノ材料の有害性試験・評価のための基盤技術の開発

(a-2) Peapod の体内動態計測技術開発

国立大学法人信州大学

1. 目的

現在発表されている CNT の体内動態評価方法の多くは、炭素の同位体を含む CNT を使用する、CNT の外表面上にマーカーとなる物質を付加する等で評価を行 うものである。しかし、同位体を含む CNT は、CNT 作製段階から介入し、また放 射性物質を扱える特殊な施設が必要である。外表面上にマーカーを付加する場合 には、CNT そのものの生体動態や生体反応性が変化すること、他の表面修飾物質 と反応すること等により、正確な評価を行うことができない。さらに、表面につ けたマーカーが脱落してしまう可能性もある。この問題を解決するために本研究 開発項目では「Peapod*」技術を用いて、既存の MRI や X 線装置を使用した CNT の検出技術の開発を行う。内包物質として、現在の医療現場で MRI やX線装置で の撮影における造影剤として一般的に使用されているガドリニウム(以下 GdCl₃)、 X 線装置において I₀よりも X 線吸収率が高く、検出感度の向上に期待が出来る重 金属の白金(以下 PtCl2)を使用した。各装置で Peapod 検出における至適条件 を模索し、検出感度の向上を図る。最終目標は、複数の Peapod を作製し、動物 を用いた体内分布解析に有効であることを示し、最終的にげっ歯類におけるナノ 材料の体内動態における Peapod を用いて計測する技術を確立し、技術解説書と して取りまとめることを目的とする。

注*)Peapod とはカーボンナノチューブ(CNT)の中心部の中空部分 (Hollow tube) に原子、分子あるいは粒子を導入して内包させたも のをいう。原子、分子、粒子が秩序を持って整列配置され、あたか もさやえんどうのように見えるのでこの呼称が用いられる。皮(外 表面)の物性を大幅に変えることなく、埋め込まれた種(中空導入 物質)の機能を活用できるので、動態評価などに用いることができ れば、きわめて有効である。

2. 成果

GdCl₃、PtCl₂を使用して、Peapod を作製した。MRI 装置での評価のため、Gd 造影効果の検出限界の評価、MRI 装置の検出感度を向上させるための撮影条件 の設定を行った。本研究における MRI 装置の至適条件を決定した後に最終的な 生体内評価として、GdCl₃内包型 Peapod を尾静脈注射したラットの臓器・組織 の評価を進めた。その結果、MRI 画像上、ラットの臓器では肺に強く信号変化 を認め、他臓器での信号変化は認めなかった。組織評価の検討においても肺野 全体の毛細血管内で CNT 集積を多く認め、他臓器には低倍率で確認できるよう な CNT の集積は見られなかった。以上の結果から、MRI 装置による検出が可能 であることを立証した。X 線装置について、PtCl₂内包型 Peapod を固体・液体 (分散液)の状態にして撮影を行い、検出能の検討を進めた。また、Pt-Peapod の気管内投与後臓器内分布の評価検討を行い、画像における結果と組織評価の

結果との相関性について検討を行った。

これらの成果について、確立した技術を『Peapod を応用した体内動態評価方法 に関する技術解説書』として本プロジェクトのホームページ上で公開した。

2.1 Peapod 作製

2.1.1 Peapod の作製

元素周期表 10、11 族内包粒子として三塩化金(AuCl₃)及び塩化白金(PtCl₂)を 選択した。表③(a-2)-1 にそれぞれの物性を示す。

塩化物	塩化金(III) (AuCl ₃)	塩化白金(II) (PtCl ₂)
モル質量[g/mol]	303. 3	365.99
密度[g/cm³]	3. 9	6.05
融点[K]	527	854
水への溶解度[g/100ml]	68.8	不溶
サプライヤー	和光純薬	和光純薬

表③(a-2)-1 塩化金(III)および塩化白金(II)の基本物性

〔作製方法〕

Peapod 作製装置の概略を図③(a-2)-1 に示す。なお、内包粒子が異なっても 金属塩類、金属酸化物の場合は基本的に同じ操作である。CNT の種類は特に指定 はないが、CNT 両端が解放されていることと CNT 中空部分に「節」が存在しない ことが良質の Peapod 作製を行う上で重要である。

まず、CNT 約 100 mg を電子天秤で秤量し、図③(a-2)-1 に示す二股ガラスチ ューブの主管10に入れた。一方、ターゲットとなる内包粒子 100 mg を 秤量 し、ガラスチューブの枝管12に入れた(図③(a-2)-1-(a))。次いで、主管1 0をマントルヒーター18内に置き(図③(a-2)-1-(b))、コック14を開き、 真空ポンプ16により、主管10と枝管12内が乾燥して真空になるまで脱気 操作を行った。この際、マントルヒーター18の加熱温度を150℃に設定し、余 分な水分を蒸発させた。その後、コック14を閉じ、ガラスチューブの細径に 形成したネック部15をバーナーで溶融封函した。次いで、主管10を覆って いるマントルヒーター18をはずし、ガラスチューブ全体を別のマントルヒー ター内に置き、200℃で48時間放置した。なお、加熱温度は内包粒子の気化温 度より高い温度に設定するが、ガラスチューブ材質の耐熱温度を確認してガラ ス成分が気化したりせず破裂しない温度に設定した。ガラスチューブをマント ルヒーターより取り出し、放置冷却後、ネック部15部分をやすりで傷を付け、 誘導切りでカットして主管10からCNTを取り出した。

こうして、目的金属粒子を内包する Peapod が得られた。なお、加熱温度と放置時間は2層カーボンナノチューブ(DWCNT)を用いて三塩化ガドリニウムをタ ーゲット粒子とする場合を例として示した。使用した DWCNT の物性を表②に示 す。

こうして得られた Peapod を、紙フィルターでろ過した後、フィルター上に残 留した DWCNT をメタノールで洗浄及び再度ろ過、さらに純水で5回洗浄ろ過を 繰り返した後、室温で乾燥させ、洗浄精製した。この手法により、GdCl₃内包型 Peapod (以下 Gd-Peapod)、PtCl₂内包型 Peapod (以下 Pt-Peapod) を作製した。



図③(a-2)-1 Peapod 合成装置の概略図

Material	Ave.	Ave.	Purity	Making	Make
	Diameter	Length	[%]	Methods	
	[nm]	[µm]			
DWCNT	< 1.5	N/A	> 95	CVD	Toray DWCNT

表③(a-2)-2 DWCNT の物性

2.1.2 Peapod の評価

2.1.2.1 TEM 像による評価

図③(a-2)-2にPeapodのTEM写真を示す。Gd-Peapod、Pt-Peapodの何れもDWCNT 全体に渡り粒子が内包されていることが確認された。



図③(a-2)-2 微細粒子を内包した Peapod の透過電子顕微鏡写真 (左) Gd-Peapod (右) Pt-Peapod DWCNT の中心に各封入物質が配列していることが確認できる

2.1.2.2 蛍光 X 線計測

図③ (a-2)-3 に蛍光 X 線スペクトル分析 (XPS) の結果を示す。計測した Gd-Peapod、Pt-Peapod は、XPS 簡易原子量計測機能より約2 wt%と推定され、計 算値から予想される充填量との対比では 100 %近くになると考えられた。



内包物質の蛍光 X 線スペクトルが明瞭に検出された。

2.1.2.3 Bioavailabilityの検討

CNT の表面化学反応性についての報告は少なく、主に安全性評価の一環とし て不純物による Bioavailability およびラジカル反応について報告されている。 これらの研究報告から Bioavailability を考えた場合、CNT 表面での重要な反応 はラジカルの生成と消失と結論した。CNT は水酸基ラジカルを生成せず、消失す る性質のあることが報告されている。

従って本研究においては、Bioavailabilityの観点から CNT の表面化学反応性 を議論する場合には、水酸基ラジカルの消失反応が重要な指標になると考えた。 CNT を水中に分散する際に用いる分散剤の影響が報告されていることから、CNT の水酸基ラジカル消失能を厳密に測定する方法を考案した。CNT を担持体にコ ーティングしたものを純水中で超音波撹拌分散することで、界面活性剤の添加 量を Nominal 計算において従来に比べて約2桁減少させることにより、界面活 性剤の影響を誤差範囲に収めることが可能になった。

2.2 測定装置の検出感度の評価と向上

2.2.1 MRI による Peapod 評価

MRI による計測評価は小動物用 MRI 装置(MRMiniSA: DS ファーマバイオメディカル株式会社)(図③(a-2)-4)を使用して、輝度の計測から Peapod の生体内 投与後の臓器評価を行った。



図③(a-2)-4 MRI 装置(MRMiniSA: DS ファーマバイオメディカル株式会社)

2.2.1.1. コントラストノイズ比による検討

MRI 撮影において、同一サンプルを撮影しているにも関わらず、輝度値の上 下変動を認めるケースがあり、この原因としてサンプルの温度、室温、装置の 起動時間等により変動していることが判明した。そのため、平成24年度まで評 価に使用していた輝度値に替えて、平成25年度以降は画像評価において広く行 われているコントラストノイズ比(contrast-to-noise ratio; CNR)を用いた (図③(a-2)-5)。



CNR; contrast-to-noise ratio SI (X);Average signal intensity in the region of interest of X SDair;Standard deviation in the region of interest in the air

SI(sample) - SI(control) $CNR = \frac{1}{2}$ SDair

図③(a-2)-5 ゲルキューブの MRI 撮影画像と CNR の算出方法

2.2.1.2. Peapod 入りアガロースゲルによる検出限界評価

規定した撮影条件(3D-Flash、FOV 40 mm、積算回数 2、TR 50ms、FA 8dB、slice 厚 1.25 mm)で撮影を行う場合、一回の撮影に約 6 分 50 秒の撮影時間を要し、 液体である分散液のままでは撮影中に CNT の沈降等の影響により撮影条件にば らつきが生じる可能性があった。また、今回の想定している測定部位は肺や肝 臓などを対象臓器として検討していたため、模擬臓器としてアガロースゲルを 使用して検出限界の検討を行った。

〔試験方法〕

アガロースゲルは条件設定で使用したゲルキューブと同様の方法で生理食塩 水に対し、アガロースが1%(w/v)となるように CNT 分散液を混ぜ、CNT 入りの アガロースゲルを作製した。Peapod 濃度による影響を評価するために CNT 濃度 がキューブ内で最大250 µg/cm³、最小1 µg/cm³となるように順次希釈した分散 液を作製し、各分散液をアガロースに混入した(図③(a-2)-6-1)。作製したゲ ルは一辺が1 cm となるようにカットして、1 cm³のキューブにした。

サイズによる影響を評価するためにキューブを一辺の長さが10mm・5mm・ 2.5mm・1mmとなるように成型した(図③(a-2)-6-2)。同様の方法でコントロー ルとして、生理食塩水のみを使用したアガロースゲルのキューブを作製し、そ れぞれのキューブを並べ、MRIで撮像を行った。撮像画像よりデータを抽出し、 CNRの算出を行った。



図③(a-2)-6-1 希釈系列で作製した cube



図③(a-2)-6-2 10~1 mm角の cube

〔検討結果〕

画像データから算出した CNR を元に図③(a-2)-6-3 の検量線を作製した。この結果から計算上 CNR が0 を示すのは約4 µg であり、キューブによる MRI 評価における検出感度の限界と考えた。また、キューブサイズを縮小させた場合では、MRI のスライス厚である 1.25 mm 以上のキューブサンプルは 10 mm 角のものと比較して、同等の検出レベルを示した。





2.2.1.3. 繰り返し時間・フリップ角の調整

本装置における撮影条件において画像の描出に影響を与える変更可能な条件 として繰り返し時間(TR)・フリップ角(FA)がある。これらの至適条件の検討 のため、その他の撮影条件は一定とした(3D-Flash、FOV40 mm、積算回数 2、slice 厚 1.25 mm)。Peapod(250 µg/cm³)を含むゲルキューブと生理食塩水のゲルキ ューブを並べ、MRIで撮影した(図③(a-2)-7-1)。ゲルキューブは生理食塩水ま たは CNT 分散剤に対し、アガロースが 1%(w/v)となるように作製した。



図③(a-2)-7-1 評価に使用したゲルキューブ

TR 評価のため、TR の設定を 10ms・30ms・50ms・70ms・100ms に順次変更し、

撮影を繰り返し行った。FAの評価のため、FAをMRIに付属されているATTENUATOR により変換し、0 dBから 10 dBまで評価を繰り返し、それぞれ得られた画像か ら組織間測定法(空間雑音)によりCNRを算出して、至適条件の検討を行った。

この結果、TR は 50 ms が至適条件であることを実証した(図③(a-2)-7-2)。 FA は 8 dB (35.7°) で CNR が高値を示した(図③(a-2)-7-3)。これらの結果を 本実験における至適条件と設定した。



0 90 80.2 71.5 63.6 56.7 50.6 45 40.1 35.7 31.8 28.3 Flip angle(degree)

図③(a-2)-7-3 FAの計測結果

2.2.2. X線画像装置よる Peapod 評価

CT 装置はリガクの R_mCT、三次元X線顕微鏡は同社の Nano3Dx を使用した。 仕様は以下の通りである(図③(a-2)-8-1、2)。



管電圧	≦90kV
管電流	\leq 200mA
Field of View	Ф10mm, 25mm, 50mm,
	65mm
ボアサイズ	Φ18mm(最大)
ピクセル数	481 × 481 × 483
ボクセルサイ	20~133µm³
ズ	

図③(a-2)-8-1 小動物用 CT

(R_mCT;株式会社リガク(仕様はカタログより 引用))



管電圧	20~50kV
管電流	~30mA
Field of View	0. 9mm×0. 7mm∼
	14mm $ imes$ 10 mm
ピクセル数	3300 × 2500
ピクセルサイ	0.27~4µm/pixel
ズ	

図③(a-2)-8-2 三次元X線顕微鏡 (Nano3Dx;株式会社リガク (カタログより 引用))

2.2.2.1. CT 装置の至適電圧・電流の調整

管電圧・管電流によって、得られる画像の詳細が異なるため、粒子状物質の 検出における至適条件の検討を行った。

〔検討方法〕

二塩化白金の粉体を入れた分散液を作製し、凝集体が形成された状態で撮影

を行った。装置の撮影条件は、ラットを生体で評価することを想定し、FOV (Field of View) は直径 48 mm×全長 48 mm、拡大率 2.0 倍で撮影解析を行った。管電 圧は 40 kV~90 kV、管電流は 20 μ A~140 μ A の間で条件をクロスさせて撮影を 繰り返し行った。得られた画像の同ースライスのコントラスト評価を、凝集体 の確認に適した骨条件での視覚的評価及びコントラスト差の出やすい軟部条件 での CNR 評価を行い、至適条件について検討した(図③ (a-2)-9-1)。



図③(a-2)-9-1 撮影条件による微小粒子の視覚的検出の差

(結果)視覚的評価において、管電圧の低下につれて粒子(約100~200 µm) の検出が困難であることが確認され、管電流の上昇においてはハレーションに より液体の境界が不明瞭になった(図③(a-2)-9-2)。電圧は80 kV 以上、電流 は60~80 µA が最適と考えられた。CNR の検討を行った結果、管電圧は80 kV、 管電流は80 µA でどの条件においても安定して CNR が高く検出された。以上か ら、撮影条件として電圧80 kV・電流80 µA を至適条件として設定した。



図③(a-2)-9-2 管電流・管電圧調整による CT 撮影画像

2.2.2.2. CT 及び三次元 X 線顕微鏡による Pt-Peapod の撮影

X線吸収係数の高い Pt-Peapod 分散液の濃度調節を行い (Peapod 量:4 mg/ml、 0.6 mg/ml)、模擬生体臓器であるメラミンフォームスポンジに吸収・乾燥させ たサンプルを作製し、CT 及び三次元 X線顕微鏡で撮影した。

CT 画像上、スポンジのみのサンプルは X 線吸収係数が低く、画像上認識できなかったが、Pt-Peapod を吸収させたサンプルは認識可能であった(図③(a-2)-10-1)。また Pt-Peapod の濃度が高くなると、凝集体形状の検出感度も高くなった。

同じサンプルを三次元顕微鏡で撮影した結果、検出された凝集体の量やサイズ、分布に不均一性が認められたが Pt-Peapod 濃度に比例して信号強度が増加した(図③(a-2)-10-2)。



図③(a-2)-10-1 Pt-Peapod スポンジの CT 撮影画像 Control ではスポンジの検出はされないが、Pt-Peapod を添加したスポンジは検

出可能であった。



図③(a-2)-10-2 三次元 X 線顕微鏡で撮影された Pt-Peapod スポンジ
上段:検出感度を上げた画像
下段:グレースケール(バックグラウンド)を統一した画像
Peapod の濃度が高くなると、CT 値が上昇した。

2.2.2.3. 高分解能三次元X線顕微鏡における撮影評価の最適化・簡略化の検討

〔検討方法〕

生体サンプルの評価を簡易かつ最適な方法を検討するため、三次元X線顕微 鏡での撮影画像の検討を行った。本研究でいくつか生体サンプルの試作を作製 し、撮影を行ってきたが、問題点として臓器内部の赤血球が撮影時にコントラ ストを上昇させてしまう原因となっていた。この点を解決する目的で還流固定 の方法を応用した。吸入麻酔で仮死状態になったラットの肺の虚脱を防ぐため、 気管をあらかじめ結紮してから胸郭を展開して生理食塩水(300 ml/匹)で還流 洗浄を行い、肺を摘出した。摘出した肺をホルマリン固定の後、乾燥させた場 合とパラフィン包埋した場合で観察・検討を行った。

〔検討結果〕

赤血球を除去することで肉眼的にも肺表面の色調は白色に変化した(図③(a-2)-11-1)。この状況からも、肺内の赤血球は除去され、X線撮影における影響の軽減になったと考えられた。乾燥させることでは内部にある Peapod の確認は可能なものの、管腔構造について虚脱により確認は困難となった(図③(a-2)-11-2)。



図③(a-2)-11-1 還流洗浄後の肺(左)と放血後の肺(右)



図③(a-2)-11-2 乾燥させた肺サンプルの三次元X線顕微鏡画像 左:Pt-Peapod の気管内投与後、還流洗浄して赤血球を極力除去、乾燥した肺 右:還流固定してホルマリンで充填固定し、乾燥した肺

ー方で、パラフィン包埋を行った場合では、管腔構造の観察が可能であった(図 ③(a-2)-11-3)。



図③(a-2)-11-3 還流固定後パラフィン包埋を行った肺の撮影像 左: Pt - Peapod の気管内投与を行った肺 右: 未加工 CNT の気管内投与を行った肺

以上の結果から、摘出サンプルの乾燥処理はサンプルサイズの縮小により、 撮影効率は上昇するものの、肺の管腔構造の確認が困難となる。一方、パラフ ィン包埋ではパラフィンの存在がX線吸収に影響を及ぼすものの、赤血球の除 去を行うことで、サンプルとしての条件の最適化が見込め、管腔構造の評価を 行うことが可能なことから、サンプルの固定方法としてパラフィン包埋が推奨 された。

2.2.2.4. 撮影サンプルの撮影条件の検討

Peapod を投与した臓器サンプルの撮影状況において、臓器サンプルのスライ ス厚及び使用するX線の検討を行い、臓器内に沈着した1µm サイズの CNT 凝集 体の検出を目指した。

〔検討結果〕

サンプルは図③ (a-2)-11-3 で使用した Peapod 投与肺を 2 mm 角にカットした サンプルを使用して撮影を行った。これまでの検討においてX線源においては Cu を使用し、260 nm/pixel で撮影を行うことが、本サンプルを使用した場合に 最も性能を発揮できるものと判断した。撮影を行った画像を確認した結果、針 状に伸びるX線吸収像が確認でき、拡大した計測評価では高吸収体は 1.3 μ m 幅 ×7 μ m 長であり、X線を高吸収しているものであれば、1 μ m 大でも確認可能で あった(図③ (a-2)-12)。



図③(a-2)-12 図③(a-2)-11-3 で使用したサンプル画像と拡大画像

これまでの結果から、画像評価として1 µm 大の凝集体を検出することは可能 であることを証明した。しかし、生体内試験を行うにあたり、組織評価との比 較、肺内分布を評価するには撮影サンプルが小さく、全体の検討を行うことに は煩雑であるため、実用的ではない。その結果、現状の評価方法としては個体 全体の定量化を行うことは困難であるが、肺内分布を評価すること・組織評価 との比較を行うことを目的とした場合、組織の薄切切片をX線撮影することが 本評価方法に最適であると判断した。

2.3 動物試験

2.3.1. Peapod が尾静脈投与後の臓器に及ぼす MRI の信号変化

〔試験方法〕

尾静脈投与に使用する試料のために調製した分散液(Gd-Peapod 濃度 250、125、 25 µg/ml)を作製した。未加工 CNT も同様に 0.1% PS-80 を含む生理食塩水に分 散させ、250 µg/ml となるように懸濁液を作製した。コントロールとして生理食 塩水を用意した。被験動物は6週齡の雄の Wistar rat を購入して、馴化のため 1週間飼育した。

ラットが7週齢の時点で、小動物用麻酔装置を使用し、イソフルレンによる 吸入麻酔を行った。麻酔したラットの尾部をエタノールで清拭した後、尾静脈 から各試料1mlを投与した(n=20)。投与後、麻酔から覚醒したことを確認し、 飼育を継続した。投与後1時間、24時間、1週、3週の各時期に5匹ずつ臓器の 摘出を行った。

肺の摘出方法はラットの胸郭を切除し、気管から胸腔内を露出させた。気管 から21G 針を刺入し、20%中性緩衝ホルマリン液を6 cc 注入して肺胞内を満た し、肺の虚脱を予防した。ホルマリン液注入後、気管を結紮してホルマリンの 漏出を防ぎ、肺を摘出した。摘出した肺は 20%中性緩衝ホルマリン液内で一晩 浸漬固定した。その他、肝臓、脾臓、腎臓の摘出を行った。摘出後、20%中性 緩衝ホルマリン液に1日浸漬固定し、MRI による画像評価を行った。

〔摘出臓器の評価方法〕

MRI 撮影は本装置の造影撮影に使用される 3D-Flash(FOV40mm、積算回数 2 回、 slice 厚 1.25mm)を用い、前述の試験によって規定した至適条件(TR 50ms、FA 8db)で撮影する。臓器撮影の際、生理食塩水で満たされたチューブを輝度値評 価のコントロールとして画像評価範囲内に入れて MRI 撮影を行い、撮影によっ て得られた画像から CNR を算出する(図③(a-2)-13-1)。



Lung image of MRI (Axial image)

図③(a-2)-13-1 摘出肺の MRI 撮影像

撮影後、臓器サンプルの病理組織学的評価を行った。肺は左右の肺を主気管 支に沿って切り出し、パラフィン包埋による組織切片を作製した。ヘマトキシ リン&エオジン染色(HE 染色)を行ったものを光学顕微鏡及び偏光顕微鏡で観 察し、画像評価との比較検討を行った。その他の臓器についても同様の手技で 包埋して HE 染色標本を作製し光学顕微鏡・偏光顕微鏡による評価を行った。

〔肉眼所見結果〕

肺の肉眼所見を以下に示す。



図③(a-2)-13-2 摘出肺の肉眼所見

CNT 投与後1時間で摘出された肺の肉眼的観察では未加工 CNT 投与群と Peapod 投与群の両群共に均一な黒色変化を認めていた。Peapod 投与群は濃度依 存性に濃淡の変化を認めた。投与後1時間から3週間経過時まで同等の黒色変 化の継続が観察された(図③(a-2)-13-2)。その他の臓器においては肉眼所見上 の黒色変化は認めなかった。

〔臓器の MRI 評価結果〕

Peapod 投与群の肺は濃度依存性に CNR の上昇を認めたが、その他の臓器については CNR の変化は認められなかった(図③(a-2)-13-3)。また継時的評価においては 1 週から 3 週にかけて明らかな CNR の減衰は認められなかった。このことから、Peapod-CNT が血管内で強い凝集傾向を示し、これが CNR の高値を継続して起こしていることが考えられた。



■ Cont ■ Pristine CNT ■ Peapod 25µg ■ Peapod 125µg ■ Peapod 250µg

図③(a-2)-13-3 各臓器における CNR 評価

〔組織学的評価〕

Peapod 250 µg 投与後のラット肺を主に示す。1時間後の時点から3週経過時 点のいずれにおいても血管に沿って肺内に均一に CNT が分布していた(図③ (a-2)-13-4)。血管内については肺動脈末梢から毛細血管に塞栓を形成するよう に凝集して存在していたが、毛細血管から先、すなわち肺静脈内には CNT を認 めなった。尾静脈肺内投与1時間から投与後3週間後までの肺内沈着は同程度 で、血液循環による CNTs の沈着量の増加や血流による washout の影響は少ない と考えられた。



図③(a-2)-13-4 ラット肺の組織所見と偏光顕微鏡評価

1週間後と3週間後の肺の病理所見では、投与後1時間・24時間に認められていた塞栓の所見に加え、周囲に肉芽腫性病変を形成していた(図③(a-2)-13-5)。いずれの摘出時期においても、好中球を主体とした炎症反応は認められなかった。



図③(a-2)-13-5 病理組織の強拡大所見

光学顕微鏡による検索で尾静脈投与の肺野及び門脈内投与の肝臓に認められ た肉芽腫性微小病変について、走査型電子顕微鏡による観察をおこなった。 22,000 倍の写真から凝集塊は幅 22.3 nm 程度の繊維状物質が凝集したもので、 肺胞壁の毛細血管内で凝集した Peapod-CNT 凝集体と考えられた(図③ (a-2)-13-6)。15,000 倍の写真から凝集塊は幅 24.4 nm 程度の繊維状物質が凝集 したもので、肺胞壁の毛細血管内で塞栓を起こした Peapod-CNT 凝集物と考えら れた(図③(a-2)-13-7)。



図③(a-2)-13-6 肺の肉芽腫性病変の走査型電子顕微鏡所見 左の拡大所見で確認された 22.3 nmの繊維状物質(画像中央やや右) (左;500倍 右;赤矢印部分の 22000 倍)



図③(a-2)-13-7 肝臓の肉芽腫性病変の走査型電子顕微鏡所見 (左;500倍 右;赤矢印部分の15000倍)

2.3.2. マイクロCT・三次元X線顕微鏡による気管内投与後の肺内分布評価

気管内投与における肺内分布の観察に重点を置き、画像装置を用いた各肺葉の分布評価を行った。CNT の投与量は生体が生存可能な状態であることを考慮して 120 µg/匹(600 µg/kg)に設定した(250 µg の Pt-Peapod を 2 ml 以上使用して気管内投与を行ったところ、ラットが投与後に死亡する事例が生じた。また、CNT 濃度を上昇させたときには凝集が強くシリンジから押出が不可能となったため 120 µg/ml の投与量に設定した)。評価の方法は以下の通りである。

〔試験方法〕

Wistar ラット7週齢(雄)をイソフルレンによる吸収麻酔をかけ、気管内投与 用保定台に乗せて、Pt-Peapod 分散液の気管内投与を行った。投与後1週・4週・ 13 週に屠殺した。生理食塩水の還流を行った後に、肺を摘出した。摘出肺はホ ルマリン固定を行った後、マイクロ CT で各肺葉を撮影した。

肺内における Peapod の空間的な分布を評価した。三次元 X 線顕微鏡では三次 元再構成による体積ヒストグラムによる Peapod の定量化を目指したが、2.2.2.4. で検討を行った結果の通り、三次元構成によるヒストグラムでの評価が困難で、 切片の追加撮影を行うことが現時点において妥当と判断した。その結果、マイ クロ CT の撮影結果から各肺葉の粒子の計測を行い、肺内分布を評価した(図③ (a-2)-14-1・図③(a-2)-14-2)。

〔肺葉の画像検討結果〕

各葉の撮影結果と画像は以下の通りである。



図③(a-2)-14-1 ImageJによる右葉のマイクロ CT 計測画像例(赤点;計測点)



図③(a-2)-14-2 肺内投与1週後の各肺葉計測例

図③(a-2)-14-2 の結果から、計測で検出された粒子は左肺での分布が多かった。特に左上葉には粒子径の大きいものが認められ、下葉に下がるにつれて粒子径が小さくなっている傾向が確認できた。同様の評価を4週・13週と行ったが、分布量に差はあるものの明らかな粒子数の減少傾向は認めなかった。

〔病理組織学的検索・組織評価〕

X線装置で評価した肺について病理組織学的検索と組織評価を、日本バイオ アッセイ研究センターに外注した。気管内投与を行った下記 15 サンプルの肺を 各葉について、図に示した規定スライス(図③(a-2)-14-3)の病理組織標本を 作製した(引用文献:Kittel et al., Experimental and Toxicologic Pathology 2004, 55(6), 420)。





作製した病理組織標本を光学顕鏡による通常観察及び偏光観察を行い、各臓 器における CNT の沈着と病理組織学的変化を評価した。

また、三次元X線顕微鏡画像と組織評価の結果との比較を信州大学で行った。

〔結果〕

気管内投与実験: 1週時点での検索を行った1匹に誤投与、13週時点での観察を行った1匹に気管内投与の影響が認められたものの、CNTの影響と判断される変化は認められなかった。これら2匹以外については、病理組織学的評価が可能であった。 CNTの分布は、1、4週及び13週の時点での沈着量は各葉とも"1+"と"2+"グレードの沈着が認められ、特に前葉では1週から13週まで"2+"グレードの安定した沈着が認められた。沈着量の経時的推移については、13週時点でも"2+"グレードであり、経時的な減少は示されなかった(表③(a-2)-3、4、5)。組織所見と三次元X線顕微鏡との比較では偏光顕微鏡で確認できた輝点の様な所見は三次元X線顕微鏡の所見には認められないものの、X線吸収をきたす凝集体と肺の構造を確認することは可能であった(図③(a-2)-14-4、5)。

CNT に対する組織反応としてマクロファージが小結節状に集蔟した、いわゆ る肉芽腫に類似した組織像が認められ、その内部に CNT の瀰慢性茶黒色沈着を 包含していた。この肉芽腫類様組織は 13 週時点での検索に供した全個体で線維 化が認められ、1 週時点のものと比較して大きさの縮小が認められた。肉芽腫類 似組織の縮小に伴って肉芽腫類似組織中に沈着した CNT の濃縮も進んだものと 考えられた。少数例ではあるが、細気管支肺胞上皮過形成が 13 週に認められた。

CNT を投与した肺では、CNT に対する異物処理として、CNT 貪食マクロファージがいわゆる肉芽腫に類似した組織像を呈すると考えられており、本実験においても肉芽腫に類似した病理組織学的変化が認められた。肉芽腫様組織を詳細に観察すると、肉芽様組織内での CNT の沈着状態と配列している細胞の形態学的特徴等から、肉芽腫様組織を構成する細胞はマクロファージではなく上皮性細胞である可能性が示唆された。このため、本実験で認められた肉芽腫様の組織が肺胞上皮である可能性について解析を行った結果、主としてII型肺胞上皮細胞が増生していることが判明した(未発表のため非公開)。肺内に投与されたCNT の多くは、肉芽腫様病変が線維化、器質化した組織の中に封じ込められ、肺内に長く留まると考えられた。また、肺胞壁面に辿り付いた CNT 貪食マクロファージは崩壊(恐らくアポトーシス)して、組織に吸収されること、線維化は、線維芽細胞ではなく肺の上皮細胞(主としてII型/I型肺胞上皮細胞) が直接関わっている可能性が示唆された。

右 肺 左肺 中葉 前葉 後葉 副葉 1W <検索動物数> <5> <5> <5> <5> <5> 1* 1* 1* 1* 1* 変化なし(投与ミス) CNT沈着 4 4 4 4 4 (2+:4)(2 + : 4)(2+:4)(1 + : 2, 2 + : 2)(2+:4)マクロファージ集蔟 З 4 4 4 4 (2 + : 4)(1 + : 4)(1+:4) (1 + : 3)(1+:4) 肉芽腫様変化 4 4 4 4 4 (2+:4)(2 + : 4)(2+:4)(1 + : 2, 2 + : 2)(2 + : 4)線維化 1 1 1 1

表③(a-2)-3 気管内投与後1週後の組織評価結果

✔: 当該所見なし

*:4週で解剖した動物"d"の肺には病理組織学的変化が全く認められず、気管内投与での挿管ミスが強く疑われた。

表③(a-2)-4 気管内投与後4週後の組織評価結果

		石 肺				七日
		前葉	中葉	後葉	副葉	「五三
4W	<検索動物数> 肺に変化なし(投与ミス)	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>
	CNT沈着	5 (2+: 5)	5 (1+: 2, 2+: 3)	5 (1+: 1, 2+: 4)	5 (1+: 2, 2+: 3)	5 (1+: 2, 2+: 3)
	マクロファージ集蔟	1 (2+: 1)	2 (1+: 2)	1	1	1 (1+: 1)
	肉芽腫様変化	5 (2+:5)	5 (1+: 2, 2+: 3)	4 (1+: 1, 2+: 4)	5 (1+: 2, 2+: 3)	5 (1+: 2, 2+: 3)
	線維化	(1+:1)	1	1	1	1
	BALT 拡大	2	\checkmark	1	1	1

✓:当該所見なし

BALT (bronchus-associated lymphoid tissue); 気管支関連リンパ系組織

		右肺				七時
		前葉	中葉	後葉	副葉	て加り
13W	<検索動物数>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>
	肺に変化なし(投与ミス)					
	CNT沈着	4***	4***	4***	4**	4**
		(2+:4)	(2+:4)	(2+:4)	(2+:4)	(2+:4)
	マクロファージ集蔟	3	5	3	1	1
		(1+: 1, 2+: 2)	(1+:4,2+:1)	(1+:3)	(1+:1)	
	肉芽腫様変化	5	4	4	4	4
		(1+: 1, 2+: 4)	(2+:4)	(2+:4)	(2+:4)	(2+:4)
	線維化	4	4	4	4	4
		(1+:4)	(1+:4)	(1+:4)	(1+:4)	(1+:4)
	細気管支−肺胞上皮過形成	1	1	1	1	1
		(2 +: 1)	(2+:1)	(3+:1)	(2+:1)	(2+:1)
	細胞浸潤:血管周囲性	4	5	5	5	5
		(1+:1,2+:3)	(1+:2,2+:3)	(1+: 1, 2+: 4)	(1+:2,2+:3)	(1+:3,2+:2)
	浮腫∶間質、血管周囲	3	4	3	2	5
		(2 +: 3)	(1+:3,2+:1)	(1+:3)	(1+:1,2+:1)	(1+:3,2+:2)
	BALT 拡大	1	1	3	1	1
		(2 +: 1)		(1+:3)		

表③(a-2)-5 気管内投与後13週後の組織評価結果

✔:当該所見なし

*: 13週で解剖した動物"c"の肺には、光学顕微鏡を用いた通常観察でも、偏光観察でもDWCNTの存在を確認できなかった。



図③(a-2)-14-4 Pt-Peapod 気管内投与後、パラフィン包埋を行った肺 肺胞構造の確認と肺内の輝点が確認できる。



図③(a-2)-14-5 CNT の沈着状態(HE 染色) 左:通常の光顕観察,右:偏光観察

尾静脈投与実験: 肺では、各動物に古い塞栓と、塞栓に一致した CNT 着沈が 数多く認められた。肝臓、腎臓及び脾臓の観察では、各動物の各臓器で認識で きた CNT 沈着箇所は極めて少数であるが、1 箇所以上に CNT の沈着が認められた。 各動物に CNT の尾静脈投与による病理組織学的変化は認められなかった。 2.4 細胞試験

2.4.1. 細胞毒性試験

〔方法〕

MESO-1 細胞(ヒト由来胸膜悪性中皮腫細胞)と A549 細胞(ヒト肺胞基底上皮 腺癌細胞)を 96 ウェルプレートに 10⁴ 細胞/ウェル播種した。播種翌日に昨年 度と同じサンプル(Untreated、Heated、Gd-Peapod、Pt-Peapod)を3 種類の濃 度(25, 2.5, 0.25 µg/ml)で暴露し、24 時間培養を行った。分散剤のみを添加 した培地をコントロールとした。培養後、アラマーブルー試薬を培地の 1/10 量 加え、1.5 時間後、蛍光プレートリーダーで蛍光輝度を測定した(Ex/Em=530/590 nm)。細胞毒性評価はコントロールの輝度を 100%とした時の各サンプルの蛍光 輝度の割合で表示し、各濃度でのサンプル間の有意差検定を Tukey-Kramer 法で 行った。

〔結果〕

MESO-1中皮腫細胞とA549 肺胞上皮腺癌細胞ともuntreated 群の一部に他の群 と有意に異なる変化を示す濃度があった(図③(a-2)-15)。その一方で Peapod 処理を行った群では両方の細胞で sham 群である Heated 群も含めて1カ所を除 いて各濃度間での細胞毒性に差はなかった。一方で細胞種による cell viability には差があり、MESO-1 細胞の方が A549 細胞より低い値を示した。また、このそ れぞれの細胞の cell viability は CNT 濃度との相関性は見られなかった。



図③(a-2)-15 細胞毒性試験。 a. MESO-1 細胞。b. A549 細胞。Mean±S.E. (n = 6), *p<0.05, **P<0.01

2.4.1. サイトカイン測定

〔方法〕

MESO-1 細胞と A549 細胞を 24 ウェルプレートに 5×10⁴/ウェル播種した。播種 翌日に分散剤のみを添加した培地をネガティブコントロールとして、5.1 と同じ サンプル群を 25 と 2.5 µg/ml の濃度系列で暴露し、24 時間培養を行った。分泌 されたサイトカインはプレートを遠心後、培養上清を回収して測定まで-80 ℃ で保存した。

サイトカインの測定はフローサイトメーターを用いた Cytometric beads assay 法である Human chemokine kit と Human inflammation kit (BD) を使って IL-8、 RANTES、MIG、MCP-1、IP-10、IL-1β、IL-6、IL-10、IL-12p70、TNF の 10 項目 をそれぞれのプロトコルに従って測定した。

〔結果〕

MESO-1 細胞では IL-8、RANTES、MCP-1 の分泌が検出でき、A549 細胞では IL-8 と MCP-1 の分泌が検出できた(図③(a-2)-16(a)~(e))。MESO-1 細胞では IL-8 は CNT による分泌量への差が見られなかったが、RANTES と MCP-1 ではコントロ ールと比較して RANTES では CNT 暴露によってすべて有意に減少し、MCP-1 では ほとんどの処理群で有意に減少していた。さらに RANTES では高濃度暴露での比 較で Untreated と比較し、Gd-と Pt-Peapod とも有意に減少していた。一方、A549 細胞では IL-8 ではコントロールと比較し、Untreated 群以外が有意に減少して おり、低濃度暴露群での比較では Untreated 群と他の処理群とで有意に差が見 られ、これは MCP-1 も同様であった。しかし、MCP-1 のコントロールと他の群の 比較では Untreated 群も含め、低濃度暴露群でのみ、MCP-1 分泌の低下が見られ た。これら以外のサイトカイン、ケモカインはコントロールと暴露群とも検出 限界以下であった。



図③(a-2)-16 サイトカイン分泌。a, d) IL-8。b, e) MCP-1。c) RANTES。 Mean±S.E. (n = 4), *p<0.05, **P<0.01 (Compared to control)、[#]p<0.05, ^{##}P<0.01 (Compared to each concentration)。

2.4.2. 取り込み試験

〔方法〕

2.4.1 で CNT に 24 時間暴露し、培養上清が除去された MESO-1 細胞と A549 細胞をトリプシンで剥離し、洗浄・牛胎児血清入 DPBS で浮遊した。67 µm のメッシュを通した後、フローサイトメーターで細胞内に取り込まれた CNT による側

方散乱光量(SSC)を測定し、CNT を暴露していないコントロール細胞との SSC 比で比較した。

〔結果〕

MESO-1 細胞では高濃度暴露では Untreated 群以外がコントロールと比較して 有意に SSC 比が増加しており、低濃度暴露では Untreated だけが有意に低下し ていた。一方、A549 細胞では高濃度暴露では MESO-1 細胞度同様に Untreated 群 以外がコントロールと比較して有意に増加していたが、低濃度暴露ではすべて の群でコントロールより有意に低下していた(図③(a-2)-17)。



図③(a-2)-17 相対的 CNT 細胞内取り込み量。a) MESO-1 細胞、b) A549 細胞。 Mean±S.E. (n = 4), *p<0.05, **P<0.01 (Compared to control)。

以上の結果から、Untreated は他の処理群(Heated、Gd-Peapod、Pt-Peapod) と異なる細胞応答を示す場合があり、Peapod 処理による CNT の表面が化学修飾 を受けた可能性がある。しかし、熱処理のみの CNT と Peapod は差がなく、Peapod の中空に入れた Gd や Pt の影響、Peapod の構造による影響はないと考えられた。

3. まとめ

CNT の体内動態評価を行うために、Peapod 技術を応用して CNT 中空部に MRI や X 線装置で造影効果のある物質(塩化ガドリニウム、塩化白金)を封入する ことに成功した。封入した物質の中で、塩化ガドリニウムまたは塩化白金を内 包した Peapod を本技術開発に応用することが可能であった。

封入した物質は既存の MRI で輝度値の上昇、X 線装置で透過性の低下が認められ、画像評価に応用が可能であることが確認された。これまでの研究では、主に Gd-Peapod を用いて MRI による評価を行い、生体内においても組織内に集積 することで輝度が上昇することを確認した。MRI では静脈注射により肺に集積した Gd-Peapod の存在を評価することが可能であった。三次元 X 線顕微鏡と Peapod

技術を組み合わせて、分解能はマクロファージを検出可能な 10 µm 以下、検出 限界値は現在 MRI で達成している限界値(4 µg/ml)を上回る成果を達成した。 一方で、X線装置では臓器の厚さに依存して放射線の透過量が変化するため、 詳細な分布を評価するには切片を作製せざるを得ない状態である。しかし、本 来の組織評価に使用するような切片と比較すると厚くても評価が可能であるこ とが確認できている。この結果からX線装置を応用することで組織切片と相関 したデータが取得でき、スクリーニング検査としても応用が可能と考えた。以 上の結果を元に Peapod による CNT の体内動態評価のための技術解説書を作成し、 公開することの目標を達成した。

4. 参考文献

- 1. Endo, M., Strano, M. S. & Ajayan, P. M. Potential applications of carbon nanotubes. *Top. Appl. Phys.* 111, 13-61 (2008).
- Deng, X., Jia, G., Wang, H., Sun, H. & Wang, X. X. Translocation and fate of multi-walled carbon nanotubes in vivo. *Carbon NY* 45, 1419-1424 (2007).
- Yang, S. T., Guo, W., Lin, Y., Deng, X. Y., Wang, H. F., Sun, H. F., Liu, Y. F., Wang, X., Wang, W., Chen, M., Huang, Y. P. & Sun, Y. P. Biodistribution of pristine single-walled carbon nanotubes in vivo. *J. Phys. Chem. C* 111, 17761-17764 (2007).
- Liu, Z., Davis, C., Cai, W., He, L., Chen, X. & Dai, H. Circulation and long-term fate of functionalized, biocompatible single-walled carbon nanotubes in mice probed by Raman spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 1410-1415 (2008).
- Al Faraj, A., Cieslar, K., Lacroix, G., Gaillard, S., Canet-Soulas, E. & Crémillieux, Y. A. In vivo imaging of carbon nanotube biodistribution using magnetic resonance imaging. *Nano Lett.* 9, 1023-1027 (2009).
- Georgin, D., Czarny, B., Botquin, Magali., Mayne-L'Hermite, M., Pinault, M., Bouchet-Fabre, B., Carriere, M., Poncy, J. L., Chau, Quang., Maximilien, R., Dive, V. & Taran F. Preparation of ¹⁴C-Labeled Multiwalled Carbon Nanotubes for Biodistribution Investigations. *J. Am. Chem. Soc.* 131, 14658-14659 (2009),
- Al Faraj, A., Fauvelle, F., Luciani, N., Lacroix, G., Levy, M., Crémillieux, Y. & Canet-Soulas, E. In vivo biodistribution and biological impact of injected carbon nanotubes using magnetic resonance techniques. *Int. J. Nanomed.* 6, 351-361 (2011).
- Wu, H., Liu, G., Zhuang, Y., Wu, D., Zhang, H., Yang, H., Hu, H. & Yang, S. The behavior after intravenous injection in mice of multiwalled carbon nanotube / Fe304 hybrid MRI contrast agents. *Biomaterials* 32, 4867-4876 (2011).
- Al-Jamal, K. T., Nunes, A., Methven, L., Ali-Boucetta, H., Li, S., Toma, F. M., Herrero, M. A., Al-Jamal, W. T., ten Eikelder, H. M., Foster, J., Mather, S., Prato, M., Bianco, A. & Kostarelos, K. Degree of chemical functionalization of carbon nanotubes determines tissue distribution and excretion profile. *Chem. Int. Ed. Engl.* 51, 6389-6393 (2012).
- Doan, B. T., Seguin, J., Breton, M., Le Beherec, R., Bessodes, M., Rodríguez-Manzo, J. A., Banhart, F., Beloeil, J. C., Scherman, D. & Richard, C. Functionalized single-walled carbon nanotubes containing traces of iron as new negative MRI contrast agents for in vivo imaging. *Contrast Media Mol. Imaging* 7, 153-159 (2012).
- 11. Yin, M., Wang, M., Miao, F., Ji, Y., Tian, Z., Shen, H. & Jia, N. Water-dispersible multiwalled carbon nanotube/iron oxide hybrids as contrast agents for cellular magnetic resonance imaging. *Carbon NY* 50, 2162-2070 (2012).
- 12. Czarny, B. Georgin, D., Berthon, F., Plastow, G., Pinault, M., Patriarche, G., Thuleau, A., L'Hermite, M.M., Taran, F. & Dive, V. Carbon nanotube translocation to distant organs after pulmonary exposure: insights from in situ (14)C-radiolabeling and tissue radioimaging. *ACS Nano* 8, 5715-24 (2014).
- 13. Smith, B. W., Monthioux, M. & Luzzi, D. E. Encapsulated C60 in carbon nanotubes. *Nature* 396, 323-324 (1998).
- 14. Kobayashi S, Tsuruoka S, Usui Y, Haniu H, Aoki K, Takanashi S, Okamoto M, Nomura H, Tanaka M, Aiso S, Saito M, Kato H, Saito N. An advanced in-situ imaging method using heavy metal doped hollow tubes to evaluate the biokinetics of carbon nanotubes *in vivo*, *NPG Asia Materials* 7, e203 (2015)

研究開発項目③ナノ材料の有害性試験・評価のための基盤技術の開発

(b) ナノ材料の体内動態と生体反応に関する数理モデルの構築

国立研究開発法人産業技術総合研究所安全科学研究部門

1. 目的

ナノ材料の同等性判断基準を構築したり(研究開発項目①)、吸入暴露試験 と気管内投与試験の関係を理解したり(研究開発項目②)するためには、肺に 沈着したナノ材料がどのような体内動態を示し、どのような生体反応を示すか を定量的に把握することが重要である。このための手段として、本研究では、 動物試験結果を記述する数理モデルを構築し、体内動態や生体反応の違いを、 数理モデルのパラメータの違いとして得ることを目的とした。

具体的には、研究開発項目①及び研究開発項目②で実施した吸入暴露試験や 気管内投与試験の結果を数理モデルによって記述するとともに、ナノ材料の体 内動態と生体反応との関係を表す一般的な生理学的数理モデルとして構築す ることを最終目標とした。

2. 成果

本プロジェクトで主に対象とした3種のナノ材料(二酸化チタン TiO₂、酸化 ニッケル NiO、二酸化ケイ素 SiO₂)の体内動態について検討するために、気管 内投与後の肺や主要臓器中のナノ材料の分析を行い、肺からのクリアランス、 リンパ節への移行、他臓器への移行を把握するとともに、それらの数理モデル 化を行った(2.1節)。また、補完的にそれらのナノ材料が血流に乗った場合の 全身での体内動態を把握するため、静脈注射試験を実施し、臓器間の分配と経 時変化を把握するとともにモデル化を試みた(2.2節)。また、TiO₂ナノ材料を 気管内投与したラットの肺組織切片を対象として、肺の局所での Ti 分布と生 体反応の分布を定量的に把握して用量反応関係を導く手法の検討(2.3節)を 行った。

これらの知見を踏まえ、吸入経路で暴露したナノ材料の体内動態に関する一般的な評価やモデル化の方法について解説した技術解説書「ナノ材料の体内動 態の評価と数理モデル化」を作成して公開した。

2.1 気管内投与後のナノ材料の体内動態とモデル化

2.1.1 二酸化チタン TiO₂

① TiO₂ナノ材料 P25 を用いたオーバーロード用量の確認

【目的】P25 の吸入曝露後の体内動態やクリアランスについての知見を得るために、気管内投与試験及びその後の臓器中 Ti 分析を行い、投与量と肺クリア

ランス速度の関係を調べた。ラットの肺では、肺中のナノ材料が一定量を超えるとクリアランス能が低下する、いわゆるオーバーロードが起きるとされており、その用量について把握することを目的とした。

【方法】投与試料は産総研ナノ材料研究部門で調製し、CERI(化学物質評価研 究機構)で気管内投与を行ったラットの臓器中のTiO2存在量をICP-SFMS

(Inductively Coupled Plasma Sector Field Mass Spectroscopy) による分 析で明らかにした。投与量は、 0 (溶媒)、0.375、0.75、1.5、3.0、6.0 mg/kg とし、投与後1日、3日、7日、28日、13週、26週の時点で BALF (気管支肺 胞洗浄液)採取の後解剖を行った。分析のために解剖した器官・臓器としては、 肺、肝臓、傍胸腺リンパ節、右後縦隔リンパ節、左後縦隔リンパ節、気管であ る。また、BALF についても分析を行った。

各臓器での Ti 濃度の分析では、高感度な高分解能 ICP-SFMS を用いて行った。 分析の前処理として、各サンプルは、 HNO_3 (68%)や H_2O_2 (35%)、 H_2SO_4 (98%)などを 加えた上で、マイクロ波分解装置により 180°C で 20 分間分解を行った。加え た酸の割合や量はサンプルによって異なっており、ホモジナイズした組織サン プル(1 g)には 1 mL の $HNO_3 \ge 0.2$ mL の H_2SO_4 、リンパ節に対しては 0.5 mL の $HNO3 \ge 0.1$ mL の H_2SO_4 を加えた。

ICP-SFMS による Ti の分析は、⁴⁸Ti (質量数: 47.9479)は⁴⁸Ca (質量数: 47.9525)と分離できず、⁴⁷Ti (質量数: 46.9518) は³¹P¹⁶O (質量数: 46.9687) と 分離できなかったため、他のピークと分離ができた⁴⁹Ti (質量数 48.9479)を対 象とした。内部標準物質としては、⁵⁹Co (質量数: 58.9332)を用いた。

【結果と考察】結果を図③(b)-1に示した。投与1日後には、投与した80%以上のTiO₂がBALF後の肺中に存在しており、4週間後には70%以上が存在していたが、26週間後には0.375 mg/kg 群では7.6%まで減少していたのに対し、3.0 mg/kg 群では16%、6.0 mg/kg 群では38%が残存していた。BALF中に検出されたTiO₂量は、投与1日および3日後では4.1%~6.2%であり、4週間後には1.2%~2.6%、26週間後には0.3%~0.5%に減少していた。肝臓には、投与3日後に0.003%~0.03%が、26週間後にも0.009%~0.027%が存在しており、微量ながら肺からの移行があることが確認された。傍胸腺リンパ節では、投与3日後に0.001%~0.006%、26週間後には0.047%~2.0%が存在しており、肺から経時的に移行し蓄積していることが確認された。気管では、投与1日後には1%~2%が検出され、4週間後に掛けて0.2%~0.4%に減少したが、13、26週間後でも0.4%~2.2%が検出された。



図③(b)-1 用量ごとの気管内投与後の各臓器における TiO2存在量

2コンパートメントモデルを用いて肺クリアランス速度定数を求めた。2コ ンパートメントモデルとしては、肺に入ったナノ材料がそのままクリアランス される早い肺クリアランス経路と間質を介する遅い肺クリアランス経路が存 在するものと想定して、図③(b)-2 に示すようなモデルとして表現した。肺ク リアランスに関わる速度定数 k₁, k₂, k₁₂や投与直後の肺胞到達率が、用量に応 じてどのように変化するかを求めた。

2コンパートメントモデルを用いて求めた肺クリアランス速度定数を表③ (b)-3 に示す。肺クリアランス速度定数は、1.5 mg/kg 以上で、低下がみられ た。ちなみに、1コンパートメントモデルで解析した場合には、3.0 mg/kg 以 上でクリアランス速度定数が低下するという結果が得られた。

肺中存在量と BALF 中存在量の比は、投与1日後で4.6%~7.5%であった。既存の報告では、BALF 中に出てくるナノ粒子の比率が本研究の結果より高いものが多いが、BALF 採取法の違いが原因と考えられる。本研究における BALF 採取は高い圧をかけずにマイルドな条件で行っているため、肺胞表面に付着しているもののみを取り出しているが、多くの既報の研究では高い圧をかけて BALF 採取をしている場合には、肺胞上皮細胞などが剥離し、それらに取り込まれているナノ材料の BALF 中の存在量として測定されている可能性がある。

気管で検出された TiO₂はマクロファージに貪食された後に気管支繊毛運動 で排出される過程にあるナノ粒子を示している可能性がある。気管で検出され た TiO₂の肺中 TiO₂に対する割合は、低用量ほど大きい傾向があり、高用量ほ どクリアランスに遅延が見られていることと矛盾しない結果である。しかし、 特に低用量の群で、クリアランス量が非常に小さくなった 13 週間後や 26 週間 後においても、気管における TiO₂存在量が投与1日後や3日後と違いがなく、 気管支繊毛運動でクリアランスされている途中の TiO₂のみではないことが示 唆され、今後検討する必要があると思われる。







図③(b)-3 投与量別の肺からのクリアランス

② 7種の TiO2 ナノ材料の肺クリアランスと体内動態

【目的】性状の異なる複数のTiO2ナノ材料の気管内投与後の肺クリアランスと 他臓器への移行についての知見を得るために、気管内投与試験後の臓器中Ti の分析を行い、肺クリアランス速度定数やリンパ節への移行速度定数を算出し た。

【方法】投与試料は産総研ナノ材料研究部門で調製し、CERI で気管内投与を行ったラットの臓器中の TiO₂の存在量を ICP-SFMS による分析で明らかにした。 対象の TiO₂ としては、球形粒子 (P25、AMT-100、MP-100、 TTO-S-3 (コート無)、 TTO-S-3 (AI (OH)₃ コート有))、紡錘状粒子 (MT-150AW)、繊維状粒子 (FTL-100) 分散液の調製及びキャラクタリゼーションは産総研ナノ材料研究部門で実施 した。

投与量は、P25 に関してのみ、0(溶媒)、0.375、0.75、1.5、3.0、6.0 mg/kg とし、他の材料については、0.67、2.0、6.0 mg/kg とした。

投与後3日、28日、13週の時点で、BALF 採取後に解剖を行った結果を解析 した。分析のために解剖した器官・臓器としては、肺、肝臓、傍胸腺リンパ節、 右後縦隔リンパ節、左後縦隔リンパ節、気管、脾臓、腎臓、脳(P25を除く) である。脾臓、脳、腎臓については、最高用量群(6.0 mg/kg 投与群)につい てのみ分析を行なった。 各臓器での Ti 濃度の分析は、①の評価と同様にして行った。ただし、FTL-100 及び AMT-100 を投与したラットの組織サンプル及び分散液 (20 μ L)に対して は、十分な分解を行うため、0.5 mL の H₂SO₄ と 0.5 mL の HF (38%) を加えて TiO₂ の分解を行った。

【結果と考察】P25 については、投与1日後には、投与した 62%~83%が BALF 及び肺中に存在していたが、26 週間後には0.375~1.5 mg/kg 群では6.6%~8.9% まで減少していたのに対し、3.0 mg/kg 群では13%、6.0 mg/kg 群では31%が残 存していた。リンパ節(左右の縦隔リンパ節と傍胸腺リンパ節の合計)では、 投与1日後に0.0089%~0.040%であったのが、26 週間後には0.10%~3.4%が存 在しており、肺から経時的に移行し蓄積していることが確認された。他臓器で は、6.0 mg/kg 群では肝臓への移行が投与1日後~26 週後に確認されたが、そ れ以外の用量・臓器では有意な移行は確認されなかった。

MT-150AW では、投与1日後には、投与した74%~86%がBALF 及び肺中に存在 していたが、13週間後には0.67 mg/kg 群及び2.0 mg/kg 群では14%及び18% まで減少していたのに対し、6.0 mg/kg 群では31%が残存していた。リンパ節 (傍胸腺リンパ節)では、投与1日後に0.00077%~0.023%であったのが、13 週間後には0.0047%~0.017%が存在していた。

FTL-100 では、投与1日後には、投与した71%~82%がBALF 及び肺中に存在 していたが、13 週間後には0.67 mg/kg 群及び2.0 mg/kg 群では14%及び16% まで減少していたのに対し、6.0 mg/kg 群では37%が残存していた。リンパ節 (傍胸腺リンパ節)では、投与1日後に0.00047%~0.0010%であったのが、13 週間後には0.0019%~0.28%が存在していた。

AMT-100 では、投与3日後には、投与した64%~75%がBALF及び肺中に存在 していたが、13週間後には0.67 mg/kg 群及び2.0 mg/kg 群では14%まで減少 していたのに対し、6.0 mg/kg 群では21%が残存していた。リンパ節(傍胸腺 リンパ節)では、投与3日後に0.0013%~0.0047%であったのが、13週間後に は0.0012%~0.018%が存在していた。

MP-100 では、投与3日後には、投与した59%~71%がBALF 及び肺中に存在していたが、13週間後には0.67 mg/kg 群及び2.0 mg/kg 群では13%及び15%まで減少していたのに対し、6.0 mg/kg 群では29%が残存していた。リンパ節(傍胸腺リンパ節)では、投与3日後に0.0017%~0.010%であったのが、13週間後には0.0013%~0.0085%が存在していた。

TTO-S-3 (コート無)では、投与3日後には、投与した55%~79%がBALF及び 肺中に存在していたが、13週間後には0.67 mg/kg 群及び2.0 mg/kg 群では9.0% 及び14%まで減少していたのに対し、6.0 mg/kg 群では29%が残存していた。リ ンパ節(傍胸腺リンパ節)では、投与3日後に0.0016%~0.042%であったのが、 13週間後には0.00052%~0.018%が存在していた。

TTO-S-3 (コート有)では、投与3日後には、投与した64%~78%がBALF及び 肺中に存在おり、13週間後には0.67 mg/kg 群、2.0 mg/kg 群、6.0 mg/kg 群で 29%、47%、60%が残存していた。リンパ節(傍胸腺リンパ節)では、投与3日 後に0.00079%~0.0042%であったのが、13週間後には0.0092%~0.20%が存在し ていた。

肺からのクリアランス速度定数を求める1ボックスモデル及びリンパ節へ の移行速度定数を求める2ボックスモデルを図③(b)-4に示す。肺からのクリ アランス速度定数 kは、肺からのクリアランスが肺中存在量に比例して起こる と仮定して、肺中存在量の実測値にフィッティングさせて導出した。リンパ節 への移行速度定数 kLung→Lym は、前述の肺クリアランス速度定数 kを固定した上 で、リンパ節中存在量の実測値にフィッティングして導出した。



図③(b)-4 肺からのクリアランス速度定数を求める1ボックスモデル(左図) リンパ節への移行速度定数を求める2ボックスモデル(右図)

得られた結果を図③(b)-5 に示した。どの材料も、6.0 mg/kg ではクリアランス速度定数が大きく減少し、クリアランスの遅延、いわゆるオーバーロードが起こっていることが分かる。TiO2粒子の粒径や形状はクリアランス速度定数に大きくは影響していなかったが、Al(OH)3をコーティングした TTOS-3(コート有)のみが、クリアランス速度定数が非常に遅く、クリアランスの違いが示唆される結果となった。また、推定された肺胞沈着率は、55%~87%で、材料間や用量間に特徴的な違いは見られなかった。



図③(b)-5 1コンパートメントモデルによる肺クリアランス速度定数(左図) 及びリンパ節への移行速度定数(右図)。

黒破線は、オーバーロードの目安として、半減期=2ヶ月に相当する 0.0115 /day を示している。

2.1.2 酸化ニッケル NiO (溶解性の議論、追加試験等含む)

①4種のNi0ナノ材料の肺クリアランスと体内動態

【目的】性状の異なる複数のNi0ナノ材料の気管内投与後の肺クリアランスと 他臓器への移行についての知見を得るために、気管内投与試験後の臓器中Ni の分析を行い、肺クリアランス速度定数やリンパ節への移行速度定数を算出し た。

【方法】対象としては、サイズ、形状の異なる4種類のNi0ナノ粒子(US3352 (球形,一次粒径18 nm,二次粒径73~112 nm),NovaWireNi01(繊維状,径~ 20 nm 長さ~20 µm),I小粒径(球形,一次粒径300 nm,二次粒径1.8~2.0 µm),Ni(II) Oxide Nanopowder(球形,一次粒径50 nm,二次粒径73~75 nm)) を用いた。分散液の調製及びキャラクタリゼーションは産総研ナノ材料研究部 門で実施し、CERIでF344 ラットに対して気管内投与を行った。設定投与量は、 0.67、2.0、6.0 mg/kgとした。

投与後3日、28日、13週の時点で、BALF 採取後に解剖を行った。分析のために解剖した器官・臓器は、肺、肝臓、傍胸腺リンパ節、右後縦隔リンパ節、 左後縦隔リンパ節、気管、脾臓、腎臓、脳である。

分析前の酸処理として、US3352 及び NovaWireNi01 については灰化処理、I 小粒径及び Ni(II) Oxide Nanopowder についてはマイクロ波処理を行った。灰 化処理は、磁性るつぼに約 0.1 g を測り取ったホモジナイズ後のサンプル(リ ンパ節及び気管はホモジナイズせずに全量)を電気炉にて 550℃で完全に灰化 し、硝酸1 mL を加えて溶解させたのち、超純水で 5mL に定容した。マイクロ 波処理は、PFA チューブに約0.1g を測り取ったホモジナイズ後のサンプル(リ ンパ節及び気管はホモジナイズせずに全量)に硝酸0.5 mL 及び過酸化水素0.2 mL を追加後に、マイクロ波分解装置にて 180℃で 20 分間加熱し、超純水で5 mL に定容した。これらの溶液を、ICP-MS もしくは ICP-SFMS を用いて Ni を分析し た。

【結果と考察】肺、リンパ節、肝臓、気管における Ni0 保持量を図③(b)-6 に 示す。肺からのクリアランス速度定数は、NovaWireNi01 >> I小粒径 > Nanopowder > US3352 であった(図③(b)-7 左図)。I小粒径では、用量依存 的に肺クリアランス速度定数が減衰するオーバーロードが観察されたが、他の 3 材料では用量依存性は見られなかった。リンパ節への移行速度定数は、 Nanopowder > US3352 > I小粒径 >> NovaWireNi01 であった(図③(b)-7 右 図)。NovaWireNi01 以外の 3 材料では用量依存的にリンパ節への移行速度定数 が増加していたが、NovaWireNi01 では用量依存性は見られず、投与 28 日後及 び 91 日後の肺内保持量が 1%以下であった。

NovaWireNi01は、次項②③で体内での溶解性が高いことが示されたことから、 溶解性の高い粒子は、肺からのクリアランスが速く、また、リンパ節への移行 が小さいもしくはリンパ節へ移行してもリンパ節への蓄積が見られないこと が確認された。粒径については、二次粒径が小さいほどリンパ節への移行が大 きくなる傾向が見られたが、肺からのクリアランスに対して明らかな傾向は見 られなかった。TiO₂粒子と比較すると、溶解性の材料を除き、肺クリアランス は遅く、リンパ節への移行は速いという傾向が見られ、物質の違いによるもの と考えられる。





図③(b)-7 Ni0 粒子の肺クリアランス速度定数(左図) 及びリンパ節への移行速度定数(右図)

② 4 種の Ni0 ナノ材料の糞尿中への排泄

【目的】上記①の試験結果において、肺クリアランスが極めて早い材料があったため、性状の異なる Ni0 ナノ材料の糞尿への排泄や胃腸管への移行を確認することを目的とした。

【方法】Ni0 ナノ材料 4 種(US3352, NovaWireNi01, I小粒径, Nanopowder) を純水中に分散させた液(1 mL/kg; 2.0 mg/kg bw)を1 群 5 匹のラットに気管 内投与し、0-6 時間後及び 6-24 時間後の糞・尿をそれぞれ分けて採取した。ま た、6 時間後、24 時間後のラットを解剖し、肺、BALF、リンパ節、気管、肝臓、 腎臓、脾臓、脳、胃、食道、腸、血液の分析を行った。分散液の調製及びキャ ラクタリゼーションは産総研ナノ材料研究部門で実施し、CERI で F344 ラット に対して気管内投与を行った。

リンパ節・気管・食道・嗅球はホモジナイズせずに全量を PFA チューブに移 した。それ以外の臓器、胃腸内容物、糞には、それぞれ約3倍量、約10倍量、 おおよそ等量の純水を加えてホモジナイズした。尿は、約15 mL に純水で希釈 した。ホモジナイズしたサンプルや希釈した尿、血液、BALF を PFA チューブに 約0.2g を測り取り、硝酸1.0 mL 及び硫酸0.2 mL を追加した。マイクロ波分 解装置にて 220℃で 20 分間加熱し、超純水で 10 mL に定容した。これらの溶液 を、ICP-SFMS を用いて Ni を分析した。

【結果と考察】結果を図③(b)-8、図③(b)-9に示す。図③(b)-8は、各臓器中の存在量の投与量に対する割合を示したものである。図③(b)-9は、6時間後

の排泄量と全臓器中の存在量の合計を 100%としたときの各臓器への分配と排 泄の割合を示したものである。投与量に対して、US3352 と Nanopowder は 90% 以上を説明できているが、NovaWireNi01 は 80%程度、I 小粒径は 50%程度しか 説明できていない。NovaWireNi01 については、溶解して脊髄などの今回測定し ていない臓器へ移行している可能性もある。I 小粒径については、非常に吸着 しやすい材料であるため、投与器具等への吸着により実際の投与量がこの程度 に低かった可能性が高い。肺からのクリアランスが非常に速い NovaWireNi01 については、6 時間後及び 24 時間後の尿中排泄量は 6.5%及び 26%であり、腎臓 や血液においても、NovaWireNi01 のみが 1%程度存在しており、他の 3 材料よ り明らかに高いことから、NovaWireNi01 は血中→腎臓→尿へと移行して排泄さ れていることが確認された。胃腸内容物中の Ni はいずれの材料でも 6 時間後 から 24 時間後にかけてわずかに増加しており、肺からクリアランスされた Ni0 が気管支繊毛運動でクリアランスされて胃腸管に移行していることが推察さ れる。糞中の排泄量は、24 時間後までに 0.6%~4%程度であり、サイズの大き な I 小粒径以外は、尿中の排泄量の方が高かった。



図③(b)-8 Ni0ナノ材料の気管内投与後の各臓器中存在量と排泄量



図③(b)-9 Ni0ナノ材料の気管内投与後の各臓器への分配と排泄の割合 *6時間後の臓器中存在量と累積排泄量の合計を100%としたときのそれぞれの割合

③4種のNi0ナノ材料の模擬生体液中における溶解性

【目的】NovaWire01のクリアランスが非常に速く、尿中へ排泄されている原因 として、体内での溶解が考えられる。そのため、模擬生体液を用いて、体内で の溶解性を評価し、肺クリアランスのメカニズムを検討することを目的とした。

【方法】5種の模擬生体液と純水中でのNi0ナノ材料の溶解速度の測定を行った。5種の模擬生体液としては、生理食塩水、過酸化水素水(266.7 μ mol/L and 13.3 μ mol/L)、模擬間質液(Gamble solution)、模擬リソソーム液とした。 模擬間質液及び模擬リソソーム液の組成を表③(b)-1 に示した。これら6種類の液とNi0分散液を3:1で混合した後、200 rpmで振とうしながら、0,0.5, 1,2,4,6,8,24,32,48,120,216時間後に2.5 mL ずつ採取した。採取した液は、直ちに分子分画量 50,000MWのフィルターを用いて 6000 g で 30 分間 限外濾過した。更に、1 mL の純水を追加して 6000 g で 15 分間の限外濾過を 2 回繰り返した。得られた濾液 0.5 mL を PFA チューブに測り取り、硝酸 1 mL を 追加して、マイクロ波分解装置にて 220℃で 20 分間加熱し、超純水で 10 mL に定容した。更に、5%硝酸により 10 倍希釈した液を ICP-MS により分析して、 溶解した Ni イオン量を求めた。分散液の調製及びキャラクタリゼーションは 産総研ナノ材料研究部門で実施した。

表③(b)-1 模擬間質液及び模擬リソソーム液の組成

問	「皆え	9
18		£ .

	500mL	500mL×4/3	
	lung interstitial fluid	lung interstitial fluid	
рН	7.4	7.4	
化合物(g)			
塩化マグネシウム六水和物	0.10165	0.13553	
塩化ナトリウム	3.00965	4.01287	
塩化カリウム	0.1491	0.19880	
リン酸水素ナトリウム	0.071	0.09467	
硫酸ナトリウム	0.0355	0.04733	
塩化カルシウムニ水和物	0.1838	0.24507	
酢酸ナトリウム三水和物	0.4763	0.63507	
重炭酸ナトリウム	1.30215	1.73620	
クエン酸ナトリウムニ水和物	0.0485	0.06467	

リソソーム液

	500mL	500mL×4/3	
	Artificial lysosomal fluid	Artificial lysosomal fluid	
pH 化合物(g)	4.5	4.5	
塩化ナトリウム	1.605	2.14000	
水酸化ナトリウム	3	4.00000	
クエン酸	10.4	13.86667	
塩化カルシウム	0.0485	0.06467	
リン酸水素ナトリウム七水和物	0.0895	0.11933	
硫酸ナトリウム	0.0195	0.02600	
塩化マグネシウム六水和物	0.053	0.07067	
グリセリン	0.0295	0.03933	
クエン酸ナトリウムニ水和物	0.0385	0.05133	
酒石酸ナトリウムニ水和物	0.045	0.06000	
乳酸ナトリウム	0.085	0.11333	
ピルビン酸ナトリウム	0.043	0.05733	
ホルムアルデヒド	1.39	1.85333	

【結果と考察】Ni イオン濃度は、全てのNi0ナノ材料に対して経時的な増加を 示した(図③(b)-10)。模擬リソソーム液中では、他の模擬生体液と比べて、 どのNi0ナノ材料も最も溶解していた。模擬リソソーム液中のNovaWire01は8 時間後及び24時間後に76%及び100%が溶解していたのに対し、他の5種類の 模擬生体液中では216時間後でも3.7%-6.7%しか溶解していなかった。US3352、 I 小粒径、Nanopowderの3種のNi0では、リソソーム液中で216時間後に12%、 0.70%、35%が溶解していた。

粒子濃度に比例した溶解とイオン濃度に比例した析出を考慮した速度式に よりフィッティングして、溶解速度定数 k と析出速度定数 k'を求めた。その 結果を表③(b)-2に示す。リソソーム中の NovaWireNi01 は、US3352 や NanoPowder より2桁、I小粒径より4桁近く溶解が速いことが示された。模擬 間質液を除いて、k'はほぼ全ての材料に対して1 × 10⁻²/hour 程度と一定に なった。模擬間質液は、NiOの溶解量が非常に小さいことから、k や k'がうま く計算できないものと考えられる。ほとんど溶解しないI小粒径を除いて、模 擬間質液や過酸化水素液中での溶解と比べて、模擬リソソーム液中では1桁か ら2桁溶解が速いことから、肺胞内に入った NiO 粒子は、マクロファージに貪 食されない限りは間質や肺胞表面では溶解はあまり進まないことが示された。



図③(b)-10 模擬生体液中のNi0からのNiの溶出濃度の経時変化

NiOナノ材料	模擬生体液	k	k'
US3352	生理食塩水	3.4×10^{-4}	8.8×10^{-3}
	超純水	$5.8 imes 10^{-4}$	1.7×10^{-2}
	過酸化水素溶液(200 μmol/L)	$5.0 imes 10^{-4}$	1.4×10^{-2}
	過酸化水素溶液(10 μmol/L)	5.7×10^{-4}	$1.5 imes 10^{-2}$
	リソソーム液	1.4×10^{-3}	1.1×10^{-2}
	間質模擬液	6.2×10^{-4}	2.6×10^{-2}
NovaWireNi01	生理食塩水	6.5×10^{-4}	1.0×10^{-2}
	超純水	$8.0 imes 10^{-4}$	1.6×10^{-2}
	過酸化水素溶液(200 μmol/L)	1.2×10^{-3}	2.3×10^{-2}
	過酸化水素溶液(10 μmol/L)	9.3×10^{-3}	1.9×10^{-2}
	リソソーム液	0.18	9.2×10^{-3}
	間質模擬液	3.6×10^{-3}	9.8×10^{-2}
I小粒径	生理食塩水	5.4×10^{-5}	1.7×10^{-2}
	超純水	5.5×10^{-5}	1.0×10^{-2}
	過酸化水素溶液(200 μmol/L)	2.0×10^{-5}	1.4×10^{-2}
	過酸化水素溶液(10 μmol/L)	4.7×10^{-5}	1.4×10^{-2}
	リソソーム液	7.8×10^{-5}	1.0×10^{-2}
	間質模擬液	1.5×10^{-4}	9.5×10^{-2}
Nanopowder	生理食塩水	3.7×10^{-4}	4.4×10^{-3}
	超純水	5.4×10^{-4}	7.3×10^{-3}
	過酸化水素溶液(200 μmol/L)	1.0×10^{-3}	1.5×10^{-2}
	過酸化水素溶液(10 μmol/L)	1.1×10^{-3}	1.5×10^{-2}
	リソソーム液	4.9×10^{-3}	$9.3\times10^{\text{-}3}$
	間質模擬液	4.3×10^{-3}	9.4×10^{-2}

表③(b)-2 模擬生体液中の Ni0 ナノ材料の溶解速度定数 k と析出速度定数 k'

2.1.3 二酸化ケイ素 SiO₂

① 9種の SiO₂ナノ粒子の肺クリアランスと体内動態

【目的】性状の異なる複数のSiO₂ナノ材料の気管内投与後の肺クリアランスと 他臓器への移行についての知見を得るために、気管内投与試験後の臓器中Si の分析を行い、肺クリアランス速度定数やリンパ節への移行速度定数を算出し た。

【方法】対象としては、サイズ、形状の異なる5種類のSiO₂ナノ粒子(Sicastar plain (球形, 一次粒径70 nm, 非晶質), Sicastar-COOH (Sicastar plain (球形, 一次粒径70 nm, 非晶質), Min-U-Sil5 (不定形, 一次粒径1.4 μ m, α 石 英), SI007PB分 (不定形, 一次粒径0.3 μ m, α 石英), SI007PB粉 (不定形, 一次粒径0.2 μ m, α 石英))を用いた。分散液の調製及びキャラクタリゼーションは産総研ナノ材料研究部門で実施し、CERI でF344 ラットに対して気管内 投与を行った。設定投与量は、Min-U-Sil5 については0.67、2.0、6.0 mg/kg、

それ以外については 0.22、0.67、2.0 mg/kg とした。

投与後3日、28日、13週の時点で、BALF 採取後に解剖を行った。分析のために解剖した器官・臓器としては、肺、肝臓、傍胸腺リンパ節、右後縦隔リンパ節、左後縦隔リンパ節、気管、脾臓、腎臓、脳である。

分析の前処理としては、PFA チューブに約1gを測り取ったホモジナイズ後のサンプル(リンパ節及び気管はホモジナイズせずに全量)に硝酸0.5 mL及び過酸化水素0.1 mL及び硫酸0.1 mLを追加後に、マイクロ波分解装置にて180℃で20分間加熱した。冷却後、PFA ジャーにふっ化水素酸(HF)を加え、再び蓋をして一晩室温で放置した。その後、超純水で5 mL に定容した。これらの溶液をICP-SFMS を用いて Si を分析した。

【結果と考察】肺、リンパ節中存在量の結果を、図③(b)-11、図③(b)-12 に示 す。肺中存在量は、用量に比例して多く、経時的に減衰していた。リンパ節中 の Si 存在量は、MinUSil や MinUSil (分級) や SI007PB (分級) などで用量依 存的・経時的に増加していたが、増加の見られない材料もあった。

COOH 基の表面修飾の有無の違いによって、肺からのクリアランスはほとんど 違いがなかった。粉砕した2種では、粒径の小さい粒子の方がクリアランスは 速く、リンパへの移行は遅かった。

結晶形の違いでは、非晶質の粒子がα石英よりも肺クリアランスは速かった が、非晶質粒子では粒径も小さかったことから、結晶形と粒径のどちらがきい ているのかは現状では判断できない。

肺クリアランス速度定数は、非晶質で高く結晶質で遅い傾向が見られ、用量 依存的に減衰していた。リンパ節への移行速度定数は、一部の材料で用量依存 的に増加していたが、用量依存性の見られない材料もあった(図③(b)-13)。



図③(b)-11 SiO₂粒子投与後の肺中保持量(BALF 中の存在量を含む値)



図③(b)-12 SiO₂ナノ材料気管内投与後のリンパ節中保持量 (傍胸腺、右縦隔、左縦隔リンパ節の合計値)



及びリンパ節への移行速度定数(右図)

③9種のSiO₂ナノ材料の模擬生体液中における溶解性

【目的】模擬生体液を用いて、体内でのSiO₂ナノ粒子の溶解性を評価し、肺ク リアランスのメカニズムを検討することを目的とした。

【方法】SiO₂ナノ材料9種(結晶質:MinUSi15、Min-U-Si15(分級)、SIO07PB(分 級)、SIO07PB(粉砕)、SIO07PBナノ粒子;非晶質:Sicastar、Sicastar-COOH、 Sicastar-10nm、SiO-Al(OH)3)を純水中に分散させた液を1群5匹のラットに 1 mL/kg 投与した。用量は、MinUSi15, Min-U-Si15(分級)は0.67,2.0,6.0 mg/kg、 それ以外の7種は0.22,0.67,2.0 mg/kgとした。投与3,28,91日後にラッ トを解剖し、肺、BALF、リンパ節、肝臓、腎臓、脾臓、脳の分析を行った。分 散液の調製及びキャラクタリゼーションは産総研ナノ材料研究部門で実施し、 CERI でF344 ラットに対して気管内投与を行った。

リンパ節は、ホモジナイズせずに全量を PFA チューブに移した。それ以外の 臓器については、ほぼ等量の純水を加えてホモジナイズした。ホモジナイズし たサンプル約 0.75g もしくはリンパ節全量もしくは BALFO.35 g を PFA チュー ブに測り取り、硝酸 0.5 mL 及び過酸化水素 0.1 mL を追加し、マイクロ波分解 装置にて 150°Cで加熱した。冷却後、フッ化水素酸 0.05 mL を追加して 6 時間 放置後に超純水で 10 mL に定容した。これらの溶液を、ICP-MS を用いて Si を 分析した。また、分散液は、0.1 g を秤取後に硝酸 0.5 mL 及びフッ化水素酸 0.05 mL を追加して 6 時間放置し、適宜希釈して分析を行った。

【結果と考察】模擬生体液中のSiO₂ナノ材料からの溶出濃度の経時変化を図③ (b)-14 に示す。生理食塩水中や模擬リソソーム中と比べて、模擬間質液中で溶 出が進んでいることが確認された。ただし、混合後48時間もしくは1週間で、



図③(b)-14 模擬生体液中の SiO2からの Siの溶出濃度の経時変化

2.1.4 3 種のナノ材料(TiO₂, NiO, SiO₂)の肺クリアランスとリンパ節への移 行の比較とまとめ

肺クリアランス速度は、NovaWireNi01 は極端に高かったが、TiO₂ナノ材料よ りNi0ナノ材料の方が概ね低かった。ただし、AI(OH)₃コートのTiO₂ナノ材料 は、Ni0と同程度の肺クリアランス速度だった。非結晶質のSiO₂ナノ材料は、 TiO₂ナノ材料やNi0ナノ材料より肺クリアランス速度が高かったが、非結晶質 のSiO₂ナノ材料は、TiO₂ナノ材料と同程度もしくはNi0ナノ材料と同程度の肺 クリアランス速度であった。また、リンパへの移行速度は、NovaWireNi01を除 いて、TiO₂よりNi0で概ね高かった。SiO₂ナノ材料では、SIO07PB(分級)のみ がリンパへの移行速度が高かったが、それ以外の材料は他材料と比べて概ね低 かった。

2.2 静脈注射後のナノ材料の体内動態とモデル化

2.2.1 二酸化チタン TiO₂

① 静脈注射後の体内動態

【目的】吸入暴露や気管内投与により呼吸器に対して暴露した TiO₂ナノ粒子の 体内動態に関する情報を補完するため、性状の異なる複数の TiO₂ナノ材料につ いて、静脈注射後のラットの血液や各臓器中の Ti 濃度の分析を行い、血液中・ 臓器中濃度と経時変化について、材料間比較を行った。

【方法】表③(b)-3 に示す TiO₂ナノ材料を 1,000 µg/mL の DSP 水溶液で希釈 した上でラットへ投与し、血中からの減衰や他臓器への移行について調べた。 生体内のバックグラウンド濃度の把握のため、無処置群も設定した。動物種と しては、12 週齢程度の F344 雄性ラットとし、投与時の体重が 250-300 g 程度 であるものを用いた。投与は、尾静脈に無麻酔下で 1 mL/kg-体重で単回注射し た。投与後,計画解剖日まで,各動物の一般状態観察および体重測定を行った。 ただし、投与に際しては、MP-100 および FTL-100 については、比較的短時間で 粒子の沈降が見られたため、スターラーで攪拌しながら投与操作を行うことで 投与液の均一性を担保した。また、静脈注射試験は 2 回に分けて実施されたが、 それぞれに溶媒対照群を設定した。

血液の採取は、静脈注射後、5,15,30分,1,2,4,6,8,24,48時間後 まで計10時点で行った。一時点における採血は5匹ずつとし、1匹当たり2 回の交互採血を行った。採血に用いた動物群は、5分後・4時間後採血群(N=5)、 15分後・6時間後採血群(N=5)、30分後・12時間後採血群(N=5)、1時間後・ 24時間後採血群(N=5)、2時間後・48時間後採血群(N=5)の計5群である。1 回当たりの採血量は、0.5 mL/rat とし、頸動脈から無麻酔下で行った。 主要臓器の採取は、静脈注射後、6 時間、1 日、3 日、7 日、1 ヶ月の計5 時点 で行った。対象の臓器は、肺,傍胸腺リンパ節、右縦隔リンパ節、左縦隔リン パ節、腎臓,肝臓,脾臓,心臓,脳とし、解剖時に血液の採取も行った。また、 これらの臓器は、採取後に重量を計測・記録した上で、前処理・分析まで-80 ℃ で超低温冷蔵庫内に保存した。リンパ節と血液以外は、超純水を加えてホモジ ナイズを行い、分析用の試料とした。

糞と尿の採取は、静脈注射後、~6時間、6~24時間、1~2、2~3、3~4、4 ~5、5~6、6~7日目の各24時間、投与後1ヶ月の直前3日間の計9期間内の 全量を採取した。糞と尿の採取に際しては代謝ケージを用い、糞と尿を分取す るとともに、餌・水給与について糞・尿と相互に汚染しないようにした。また、 糞尿の重量・容量を計測・記録した上で、前処理・分析まで-80℃で保存した。 また、エサ、水、投与液についての分析も行った。

分析は、試料(ホモジナイズ後の試料、リンパ節、エサ)をPFA ジャーに正確に秤かり取り、硝酸及び過酸化水素もしくは硝酸及び硫酸を追加し、マイクロ波試料前処理装置で180 ℃で20分間加熱分解を行った後、分析した。投与液については、超音波を10分以上掛けた後、PFA ジャーに正確に秤かり取り、硝酸及びフッ酸を追加し、マイクロ波試料前処理装置で180 ℃で20分間加熱分解を行った後、硫酸で加熱分解し、10 mL に定容後、分析した。水については、10%硝酸で10 倍希釈した上で分析した。投与液の分析は ICP-AES で行い、その他の分析は ICP-SFMS で行った。

投与量との比較を容易にするため、血液・臓器試料において計測された Ti 濃度は、TiO₂濃度に換算するとともに、血液量や臓器重量を考慮することで、 TiO₂存在量 [ng as TiO₂]とした。

材料名	P25	MT-150AW	TTO-S-3 (非コート)	MP-100	FTL-100
メーカー	日本アエロジル	テイカ	石原産業	テイカ	石原産業
一次粒子径 [nm]	21	15	120-150/10-20	1000 ³⁾	1680/130
形状	球状	短冊状	紡錘状	球状	針状
投与量 ¹⁾ [mg/kg rat]	0.95	0.94	0.96	0.97	1.1
二次粒子径 ²⁾ [nm]	65	39	28	257	902

表③(b)-3 静脈注射による体内動態試験に用いた TiO₂ナノ材料

1) 投与量は、分散液をICP-MSで分析したチタン濃度をもとに、二酸化チタン濃度に換算し、1 mL/kgの投与液量あることを考慮した。投与時のラット(F344、雄、12週齢)の体重は約250 gであった。

2) 二次粒子径は、DLS(動的光散乱光度計)による体積基準の平均粒子径である。

3)メーカー公称値。二次粒子径<一次粒子径の理由は、試料調製過程での微細化のためと考えられた。

【結果と考察】血液中の TiO₂存在量の時間変化を図③(b)-15 に示す。血液中 に存在している量は、投与後5分後には投与量の約0.26%(MP-100)から約 4.99%(FTL-100)と小さく、いずれの材料も投与直後に急速に血液から消失 することが分かった。溶媒対照群は、ほぼ定量下限値未満の Ti 濃度(定量下 限値の 1/2の値として扱った)であった。二次粒子径(DLS による体積基準平 均粒子径)が数十 nm の範囲にある3材料(P25、MT-150AW、TTO-S-3(非コー ト))においては、ほぼ同様の経時変化傾向を示した。また、比較的大きな一 次粒子径、二次粒子径を有している MP-100 は投与後5分の時点から他の材料 に比べて低値を示し、針状の形状を有する FTL-100 は、サイズという観点から は比較的大きいと考えられるものの、投与後5分では日本アエロジル P25等と ほぼ同等、その後の減衰は最も緩やかであった。48時間後には、血液中存在量 は、FTL-100 で 0.1%であったことを除くと、投与量の 0.01%かそれ未満であ った。



図③(b)-15 5種の TiO₂ナノ材料及び溶媒対照の血液中 TiO₂存在量 (各群 5 匹の算術平均値)

臓器中の TiO₂存在量の時間変化を図③(b)-16 に示す。二次粒子径(DLS によ る体積基準平均粒子径)が数十 nm の範囲にある3材料(P25、MT-150AW、TTO-S-3 (非コート))においては、臓器間の分配や経時的な変化の傾向が類似してい た。すなわち、主に肝臓に分配され(投与量の90%以上)、脾臓は、次に存在量 の多い臓器であったが、30日の間、ほとんど減衰傾向が見られなかった。一方、 肺その他の臓器での存在量は小さかったが、若干の減衰傾向が見られたまた、 粒子径の大きい MP-100 や、形状が針状である FTL-100 については、肝臓での 存在割合が上記3材料よりも小さく、とくに FTL-100 では、肝臓、脾臓以外の 臓器での存在量が、他の材料に比べて多いなど、材料によって異なる傾向が見 られた。





図③(b)-16 5種の TiO₂ナノ材料及び溶媒対照の臓器中 TiO₂存在量 (各群 5 匹の算術平均値)

② PBTK(薬物動力学的トキシコキネティック)モデルの構築

【目的】TiO₂ナノ材料の静脈注射試験(1ヶ月までの観察)の結果に基づいて、 PBTK モデルを構築することを目的とした。

【方法】臓器中の Ti の存在量を測定した臓器(血液、肺、肝臓、脾臓、腎臓、 心臓、脳)のうち、定量下限未満が多く含まれる脳を除いた臓器を対象とした。 また、糞・尿への排泄も、有意な計測結果ではなかったため、これらの経路に よる排泄は考慮しないことにした。

Mager et al. (2012)を参考にして、各臓器は、血管部と組織部の2つのコ

ンパートメントからなると見なし、臓器内のコンパートメント相互の物質移動 (図③(b)-17)及び、血流による全身の物質移動(図③(b)-18)をモデル化し た。臓器間の分配やその経時変化は、各臓器での物質収支を記述する連立微分 方程式により記述される。臓器の重量や血流量については、ILSI/RSI(1999) に基づいて設定した。

Q * Cb(t)	_ 血液_Cb(t)=Bb(t)/Vb_Bb(t) * Ts
	$\begin{aligned} Bb'(t) &= (Cb_{bl}\text{-}Cb_{k}) \ Q - Bb(t) \ ^* Ts + Bt(t) \ ^* Tr \\ Bt'(t) &= Bb(t) \ ^* Ts - Bt(t) \ ^* Tr \end{aligned}$
<i>たた</i> こし、 Q Cbl(t) Cb(t) Bb(t), Bt(t) Vb, Vt Ts、Tr	: 当該臓器への血流 [ml/h] : 時間 t における全血中の濃度 [ng/ml] : 時間 t における当該臓器の血液中濃度 [ng/ml] : 時間 t における当該臓器の血液中、及び、組織中存在量 [ng] : 当該臓器の血液、及び、組織の体積 [ml] : 血液→組織、及び、組織→血液の移行係数 [per h]

血液	—————————————————————————————————————	^ħ ---- 血液 ---- ↓-- ↓ -- ↓ -- ↓ --	
投与 ———>		<u>hem</u> <u>a</u> 	
	←	¥ 〒	
	← _ Ţ	³ 職 	
	< 牌 	^{卑臓} 血液 	

図③(b)-17 各臓器の物質収支の記述

図③(b)-18 想定した PBTK モデルの構造

上記のモデルは、Mathematica 9.0上で構築し、モデルによる各臓器中濃度の推定値が実測値との差(次式)を最小化するように、各臓器の T_s (血液→組織)と T_r (組織→血液)の移行係数を推定した。

 Σ_i (推定値の対数 $i = 実測値の対数 i)^2$ ただし、i: 臓器の種類

【結果と考察】図③(b)-19 に示すように、各臓器の TiO2 濃度や全体的な傾向 を記述することができた。ただし、現状では、肺や血液で観察された1ヶ月に 至るまでの減衰傾向を再現することができていない。また、投与直後(~6 時 間)については、血液中濃度のデータのみが得られていて、推定された臓器間 の分配と時間変化は検証できない。もともと時定数が大きく異なり、機構も異 なると考えられることから、初期(~6 時間)の臓器間の分配と、それ以降の 再分配・減衰とを分けてモデル化することが適切であると考えられた。



図③(b)-19 P25の静脈注射後の血液、肝臓、肺濃度の測定値(図中のプロット) と PBTK モデルによる予測値(図中の曲線)

2.2.2 酸化ニッケル NiO

① 静脈注射後の体内動態

【目的】吸入暴露や気管内投与により呼吸器に対して暴露した Ni0 ナノ粒子の 体内動態に関する情報を補完するため、性状の異なる複数の Ni0 ナノ材料につ いて、静脈注射後のラットの血液や各臓器中の Ni 濃度の分析を行い、血液中・ 臓器中濃度と経時変化について、材料間比較を行った。

【方法】体重1kg あたり1 mL の分散液を尾静脈から投与した。用いた Ni0 ナ ノ材料は、同等性判断基準の構築で用いられた4種類(US3352, Novawire, 日 下, Aldrich)である。分散液は、気管内投与用の試料に準じた方法により、 純水を溶媒として、約1 mg/mL に調製した。濃度は、投与後、ICP-MS の分析に より定量した(表③(b)-4)。行った試験は、48 時間までの血中濃度(US3352, Novawire, 日下, Aldrich)、1ヶ月までの血液及び主要臓器中濃度(US3352, Novawire, 日下, Aldrich)、6 ヶ月までの血液及び主要臓器中濃度(US3352, Novawire)である。

表③(b)-4 静脈注射試験に用いた Ni0 ナノ材料分散液の概要

試験の種類	1ヶ月観察			6ヶ月観察		
材料名称	US3352	Novawire	日下	Aldrich	US3352	Novawire
一次粒子径	23.7	~30 × ~240	300	< 50	23.7	
電:電試顕微鏡観察	(電)	(電)	(カ)	(カ)	(電)	~30×~240(電)
カ:カタログデータ						
씨는 또 사 빠 겨 수 한 아 빠 며 ※)	950 ± 45	590±18				
授与用分散液中のNIO濃度 [ug/ml](N=5)	900 ± 36	610±16	600 ± 21	860 ± 47	960 ± 28	750 ± 10
[µg/mL] (N=3)		640 ± 90				
DLSによる粒径 [nm]						
上段: Z-average	No Data	No Data	2130	83.8	72	668
中段:体積平均	No Data	No Data	1376	60.3	56	829
下段:個数平均			1313	41.4	38.5	168
投与シリンジ通過後のNiO濃度 [µg/mL] (N=5)	No Data	No Data	No Data	No Data	940±34	600±69

※)複数の値があるものは、調整後に分取した異なる容器からのサンプリング

【結果と考察】図③(b)-20 に、48 時間までの血液中存在量の投与液中の量に 対する比を示した。材料によって違いはあるが、0.001-0.01 (=0.1%-1%) 程 度の比率となった。

図③(b)-21 に、30 日までの血液及び主要臓器中存在量の投与液中の量に対 する比を示した。最も多く分配されるのは肝臓であった。US3352 では、30 日 後までほとんど減衰が見られなかった。日下と Aldrich では、僅かに減衰が見 られた。Novawire は、著しい減衰が見られた。これらは、各材料の溶解性と関 係しているものと推察された。

図③(b)-22 に、US3352 と Novawire を対象に、90 日までの血液及び主要臓器 中存在量の投与液の量に対する比を示した。US3352 は、90 日目まで減衰が見 られなかった。一方、Novawire は 30 日目までに著しい減衰が見られたが、そ の後の減衰は見られなかった。

数理モデルのパラメータとして、投与初期の臓器への分配について検討した。 図③(b)-23に、投与後6時間時点での主要臓器(腎臓、肝臓、脾臓、心臓、肺) 中存在量の投与量に対する比[-]について、各臓器血流量[mL/min]に対する比 をとったものを示した。静脈注射されたナノ材料は血流に乗って各臓器に分配 されるため、臓臓器・ナノ材料による取り込みが同じであれば、算出した比も 一定になると期待される。結果としては、肝臓・脾臓と腎臓・心臓・肺の二つ のグループに大別され、両グループへのナノ材料の分配は大きく異なっており、 各グループの中では臓器によって大きな違いはなかった。また、材料による違 いは大きくなかった。



図③(b)-20 48時間までの血液中存在量(投与液中Ni量に対する比)



(投与液中の量に対する比)





図③(b)-23 主要臓器での血流量 [mL/min] に対する ナノ材料の臓器中存在量の投与量に対する比[-]の比

2.2.3 二酸化ケイ素 SiO₂

【目的】吸入暴露や気管内投与により呼吸器に対して暴露した SiO₂ ナノ材料の 体内動態に関する情報を補完するため、性状の異なる複数の SiO₂ ナノ材料につ いて、静脈注射後のラットの血液や各臓器中の Si 濃度の分析を行い、血液中・ 臓器中濃度と経時変化について、材料間比較を行った。

【方法】Si02についての同等性判断基準を構築するために CERI で実施した一 連の気管内投与試験に用いた Si02ナノ材料のうち、材料間比較の観点からサイ ズや表面処理が特徴的な5つの材料を用いることにした; Sicastar_10 nm、 Sicastar_70 nm、Sicastar_70_Al (OH)₃、SiO7PB_粉砕、SiO7PB_分級である。 試料調製は、同等性判断基準のために実施した気管内投与試験に準じ、純水 を溶媒として、約1 mg/mL に調製した。表③(b)-5 は、投与した試料の濃度、 2次粒子径、ゼータ電位である。

表③(b)-5 静脈注射試験に用いた SiO₂ナノ材料の濃度、 2 次粒子径、ゼータ 電位

材料	濃度(mg/mL)	2次粒子径 (nm: DLS:個数平均)	ゼータ電位(mV)
Sicastar_10 nm	1.1	10.6	-22.4
Sicastar_70 nm	1.1	76	-28.3
Sicastar_70_Al(OH) ₃	1	71.1	-39.2
Si07PB_粉砕	1.1	211	-22.2
Si07PB_分級	1.1	263	-17.1

各分散液は、ラット(12週齡、雄、N=5/群)に1mLの液量で尾静脈注射し、 各 SiO₂ナノ材料と溶媒対象のそれぞれについて、48時間までの血液中濃度の 減衰を評価するための5群、1ヶ月まで(6時間、1日、3日、7日、30日)の 5群を設定した。

臓器試料は、ペントバルビタールナトリウムを腹腔内投与後に、血液、肺、 リンパ節(傍胸腺リンパ説、右縦隔リンパ節、左縦隔リンパ節のコンポジット)、 腎臓、肝臓、脾臓、心臓、肺を採した。血液試料は、頸静脈から0.5 mL 採取 した。各試料は必要に応じて適宜前処理を行った後に、ICP 発光分光分析法 (ICP- AES) により定量した。Sicastar_70_Al (OH)₃の投与動物については、 臓器中の Al 濃度についても分析を実施し、Si 分析に基づく結果とほぼ同等で あることを確認した。

【結果と考察】血液中の Si 濃度の推移を図③(b)-24 に示す。Sicastar_10 nm を除き、投与5分後で約1 μ g/mL かそれ以下の濃度となり、溶媒(純水)対 照群との違いは大きくなかった。これは生体中のバックグラウンド及び分析の 定量下限値の影響であると考えられる。Sicastar_10 は、投与後 2 時間くらい まで 5~8 μ g/mL 程度であったが、4 時間後には 2 μ g/mL 程度に、また、24 時間以降は他試料と同程度(1 μ g/mL かそれ以下)に減衰した。投与直後の血 液中濃度 5~8 μ g/mL は、血液量を約 13.5 mL/rat とすると、血液中存在量と して 70 から 110 μ g/rat となり、SiO₂ナノ材料の投与量=約1 mg (Si 量とし て約 470 μ g)の約 15%から 23%に相当する。



図③(b)-24 5種のSiO₂ナノ材料の静脈注射後の血液中濃度の推移

図③(b)-25 は、投与後6時間時点での主要臓器(血液、能、心臓、脾臓、肝 臓、腎臓、リンパ、肺)中の存在量の内訳を示した。これら主要8臓器の合計 を100%とした値である。Sicastar_10 nm では血液中存在量が39%であるのに 対して、他の材料では1%未満となっている。肝臓での分配が大きく、 Sicastar_10 nm で57%であることを除くと、90%前後の分配となっている。 また、次に分配の大きいのは脾臓であり0.5~3%程度が存在していた。



図③(b)-25 5種の SiO₂ナノ材料の静脈注射後の主要臓器中存在量の内訳

図③(b)-26は、臓器中存在量が大きかった肝臓、脾臓、腎臓について、臓器 中Si量の経時変化を示したものである。肝臓では、投与直後のSi存在量に対 して、1ヶ月後まで、僅かな減衰が見られるのみであった。また、脾臓ではほ とんど減衰は見られなかった。



(投与後1ヶ月後まで)

2.2.4 3 種のナノ材料 (TiO₂, NiO, SiO₂) の静脈注射試験による体内分布と動 態の比較とまとめ

48時間までの血液中存在量の投与液中の量に対する比は、Ni0ナノ材料では

TiO₂ナノ材料と比べて1桁ほど高い値となった。SiO₂ナノ材料のSicastar_10 nmは、他の材料と比較して、長く血液にとどまる傾向を有していることが示さ れた。Novawireを除くと、NiOナノ材料の主要臓器への分配や経時的な減衰は、 TiO₂ナノ材料と類似していた。90日までの血液及び主要臓器中存在量の投与液 の量に対する比は、NiOナノ材料のUS3352は、90日目まで減衰が見られず、 TiO₂ナノ材料の挙動と類似していた。一方、NiOナノ材料のNovawireは30日 目までに著しい減衰が見られたが、その後の減衰は見られなかった。数理モデ ルのパラメータとして、投与初期の臓器への分配について検討した。投与後6 時間時点での主要臓器(腎臓、肝臓、脾臓、心臓、肺)中存在量の投与量に対 する比と、各臓器血流量に対する比は、FTL-100TiO₂ナノ材料を除くと、TiO₂、 NiO、SiO₂ナノ材料間の違いは、臓器間の違いに比べると大きくなかった。

2.3 肺の局所での用量反応関係を導く手法の開発

2.3.1 XRF(蛍光X線分析)による臓器中のTi分布の定量化方法の確立
① XRFによる検量線の作成

【目的】臓器中のナノ材料の分布を定量的に把握するために、XRF による Ti 分析法の確立を目指し、検量線の直線性、肺組織による干渉、検出下限につい ての検討を行った。XRF は非破壊の分析手法であるため、同一の組織切片を用 いて、生体反応の分布の観察が可能となり、両者の厳密な比較により局所の用 量反応関係を導くことができる。

【方法】タートラジンで着色した Ti 標準液(0.008~0.2 mg/mL)を 0.8 µL スライドガラス上に滴下、乾固させ、液の痕跡箇所に対して、100 µm のビー ム径で 100 µm 間隔で一点当たり 60 秒の照射時間で XRF 分析を行った。ブラ ンクを差し引いた応答値の合計値を縦軸に、総 Ti 量を横軸に取り、検量線を 作成した。未投与の肺切片に対して、同様に標準液の滴下、乾固、XRF 分析を 行い、肺切片のない場合の結果と比較した。また、スライドガラスの肺切片上 でのバックグラウンド値の変動を繰り返し測定した。

【結果と考察】検量線の一例を図③(b)-27 に示す。応答値の合計値は、液中の 総 Ti 量と線形の関係であり、この検量線を用いることで、単位面積当たりの Ti 量を得ることができることが確認された。検量線を繰り返し作成したところ、 決定係数は常に 0.99 以上と良い相関が得られた。肺切片の有無よって、検量 線の傾きが変わらなかったことから、肺切片自体が測定に影響を与えないこと が確認された。また、3ヶ月での連続使用で数%、光源の交換で 20%程度変動し うることが分かったため、最低一ヶ月に一度は一点検量線を作成することにし
た。スライドガラスの肺切片上でのバックグラウンド値の3σを検出限界とすることにしたため、検出限界は約0.06 ng/meshとなった。



図③(b)-27 XRF 分析における Ti の検量線

② 複数回気管内投与試験における肺中 Ti存在量の局在の把握 【目的】気管内投与による肺へのナノ材料の沈着が、複数回投与によってどの ように異なるかを明らかにすることを目的として、気管内投与による複数回投 与後のラットの肺切片における Ti分布を計測した。

【方法】バイオアッセイセンターで実施した P25 の複数回投与試験(10 mg/kg×1回, 5.0 mg/kg×2回, 3.3 mg/kg×3回, 2.5 mg/kg×4回)の最終投与1 日後のラットの肺切片(厚さ3 µm)を XRF により分析した。それぞれの投与 量で、ラットは5匹ずつ試験した。

【結果と考察】XRF 分析結果に基づく複数回投与での Ti 存在量の分布の一例を 図③(b)-28 に示し、結果のまとめを表③(b)-6 に示す。検出率については、検 出限界を 0.063 ng/mesh として求めた。左肺、右肺後葉、右肺副葉で濃度が高 く、右肺中葉で濃度が低い結果となった。また、投与回数ごとに異なる明らか な傾向は見られなかった。



図③(b)-28 複数回投与後の肺切片の XRF による分析結果と光学顕微鏡写真

表③(b)-6	複数回投与後の肺内 TiO2分布

			肺内	内二酸化チタン存在量・検出	出率	
	-	左肺	右肺前葉	右肺中葉	右肺後葉	右肺副葉
1 回投与	平均值 [ng/mesh]	0.065 ± 0.066	0.073 ± 0.039	0.045 ± 0.049	0.10 ± 0.051	0.086 ± 0.075
	検出率	$22\%\pm9.0\%$	$22\% \pm 5.2\%$	13% ± 5.2%	29% ± 9.4%	$24\%\pm15\%$
2回投与	平均值 [ng/mesh]	0.11 ± 0.041	0.047 ± 0.016	0.015 ± 0.013	0.077 ± 0.014	0.087 ± 0.084
	検出率	$40\% \pm 4.8\%$	$21\% \pm 6.6\%$	$13\% \pm 6.1\%$	$32\% \pm 4.6\%$	$31\% \pm 22\%$
3回投与	平均值 [ng/mesh]	0.063 ± 0.019	0.043 ± 0.0099	0.032 ± 0.0088	0.062 ± 0.016	0.10 ± 0.030
	検出率	$30\% \pm 6.0\%$	$19\% \pm 2.7\%$	$15\% \pm 4.3\%$	29% ± 6.6%	38% ± 5.1%
4回投与	平均值 [ng/mesh]	0.089 ± 0.031	0.042 ± 0.020	0.024 ± 0.013	0.061 ± 0.017	0.088 ± 0.024
	検出率	$35\% \pm 9.3\%$	$20\% \pm 6.3\%$	13% ± 5.7%	29% ± 4.3%	$36\% \pm 6.7\%$

検出限界(N.D.: 0.063 ng/mesh)以下は0 ng/meshとして平均値を計算

③ 吸入器具の違いによる肺中 Ti 存在量の局在の把握

【目的】気管内投与による肺へのナノ材料の沈着が、吸入器具の違いによって どのように異なるかを明らかにすることを目的として、気管内投与による複数 回投与後のラットの肺切片における Ti 分布を計測した。

【方法】CERIにおいて実施した、経ロゾンデ及びスプレーゾンデによる気管内 投与1 日後のラットの肺切片(厚さ3 µm)をXRF により分析した。それぞれ の投与量で、ラットは3匹ずつ試験した。

【結果と考察】どちらの器具による投与でも、明らかな違いは見られなかった (表③(b)-7)。右肺中葉では濃度は低く、右肺後葉・副葉では濃度が高かった。

表③(b)-7 経ロゾンデ及びスプレーゾンデによる気管内投与後の肺内分布

	_	肺内二酸化チタン存在量・検出率				
	_	左肺	右肺前葉	右肺中葉	右肺後葉	右肺副葉
経口ゾンデ	平均值 [ng/mesh]	0.034 ± 0.012	0.065 ± 0.065	0.016 ± 0.0012	0.060 ± 0.024	0.052 ± 0.026
	検出率	$22\% \pm 6.4\%$	$28\%\pm21\%$	$11\% \pm 1.4\%$	$36\% \pm 14\%$	$28\%\pm13\%$
スプレーゾンデ	平均值 [ng/mesh]	0.035 ± 0.0035	0.050 ± 0.031	0.017 ± 0.0050	0.098 ± 0.030	0.073 ± 0.023
	検出率	$20\% \pm 1.0\%$	$25\% \pm 8.6\%$	$12\% \pm 4.4\%$	$41\%\pm7.0\%$	$33\% \pm 5.8\%$

Mean \pm SD

 ④ 吸入暴露と気管内投与の違いによる肺中 Ti 存在量の局在の把握 【目的】吸入暴露と気管内投与で、投与時の肺中のナノ材料の分布に違いがあ るかどうかを確認することを目的とした。

【方法】TiO₂ナノ材料を、肺保持量が同程度になるように気管内投与及び吸入 暴露したラットの左肺切片を XRF により測定した。 気管内投与及び吸入暴露終 了の3日、1ヶ月、3ヶ月後に各群5匹で切片を気道が入る部位と入らない部 位に対して作成した(厚さ 30 μ m)。XRF のビーム径は 100 μ m とし、200 μ m 間隔で切片全体に対して測定を行った。気管内投与は分散液の調製及びキャラ クタリゼーションは産総研ナノ材料研究部門で実施し、産業医科大学でF344 ラットに対して気管内投与及び吸入暴露を行った。

【結果と考察】結果を図③(b)-29に示す。投与3日後及び1ヶ月後は、吸入3 日後及び1ヶ月後と比べて、平均値が高かった。また、局所的に少し高濃度の 部位が見受けられた。また、吸入暴露では、気道ありと比べて気道なしの切片 で高い傾向が見られた。それに対して、気管内投与では、気道なしと比べて気 道ありの切片で高い傾向が見られた。切片内でも、吸入暴露では肺全体に分布 しているのに対し、気管内投与では気道周辺で高濃度に分布している傾向が見 られた。このことは、吸入暴露では気道から離れた肺胞まで広く入り込んでい るのに対し、気管内投与では気道から遠い肺胞にはあまり届かないことを示唆 していると考えられる。ただし、平均値も最大濃度も、気管内投与と吸入暴露 では、せいぜい2倍程度の違いしかなく、大きな違いではないと考えられる。 3ヶ月後では、気管内投与でも吸入暴露でもクリアランスが進み、肺中存在量 は非常に低くなっている傾向が確認されたが、気管内投与したラットの肺切片 の方が気管内投与したラットの肺切片より高くなっており、気管内投与の方で 速くクリアランスが進んでいることが示唆された。これは、マクロファージが **貪食してからクリアランスするのに気道までの距離が関係しているからかも** しれない。



図③(b)-29 TiO₂ナノ材料の吸入暴露及び気管内投与後の肺内Ti分布

⑤ 生体反応の分布の定量化方法の検討

【目的】XRF による肺組織中の Ti 分布と比較するため、同一組織標本を用いて 生体反応の分布を定量的に把握することを目的とした。生体反応としては肺の 炎症を念頭に、マクロファージ、好中球、酸化ストレスを指標とすることとし た。組織標本に適当な免疫染色を施し、関心のある生体反応の強さの分布を画 像解析により定量化する。

【方法】免疫染色のため次の抗体を検討した;マクロファージ:抗 ED-1 抗体 及び抗 MAC-2 抗体、好中球:抗 MPO (Myeloperoxidase) 抗体、酸化ストレス (HO-1 (Heme oxygenase-1)):抗 HO-1 抗体。投与されたナノ材料との判別が可能な ように、ヒストグリーンにより緑色に染色した。顕微鏡像を画像解析ソフトに 取り込み、単位面積(約100 μm 四方)あたりの染色領域の面積を求めた。

TiO₂ナノ粒子 (P25、TTOS-3 (コート無)、TTOS-3 (コート有)) を 6 mg/kg bw で投与したラット肺切片に対して、抗 ED-1 抗体を用いてマクロファージの免 疫染色を行い、投与されたナノ材料との判別が可能なように、ヒストグリーン により緑色に染色した。顕微鏡像を画像解析ソフトに取り込み、HSB (色相 (Hue)、彩度 (Saturation)、明度 (Value)) で細胞膜が外れるように閾値設定 (色相 passMinH = 95; passMaxH = 143, 彩度 passMinS = 25; passMaxS = 255, 明度 passMinV = 0; passMaxV = 220) をして、単位面積 (100 μ m 四方) あた りの染色領域の面積を求めた。さらに、それらの免染切片を用いて、マクロファージを 100 μ m 四方メッシュごとに計数し (1 切片 2 ヶ所 20 メッシュ×20 メッシュ×36 切片)、染色領域の面積値とマクロファージ数との関係について も導き出した。

【結果と考察】図③(b)-30に示すように、免疫染色部位面積の二値化結果を得るための条件を設定できた。XRF による厚さ3 μ mの肺切片上の Ti 濃度を横軸に、免疫染色された面積部分のカウント値を縦軸にとったものを図③(b)-31に示す。光学顕微鏡によるマクロファージの計数値と免疫染色された面積部分のカウント値の関係を図③(b)-32に示す。表③(b)-8には、マクロファージ数と抗 ED-1 抗体面積染色部位面積の回帰直線の傾きを示した。これらの結果から、TiO2 投与3 日後には、厚さ3 μ mの肺切片中の Ti 1 ng 当たり 18~43 cellsのマクロファージが存在していることが分かった。



図③(b)-30 抗 ED-1 免疫染色した肺切片の光学顕微鏡画像(左:全体像、右: 拡大像)



図③(b)-31 Ti濃度とマクロファージの免疫染色結果の相関



図③(b)-32 マクロファージ数と抗 ED-1 免疫染色部位の二値化面積値の相関 (P25 6 mg/kg, 3 日後)

表③(b)-8 マクロファージ数と抗 ED-1 免疫染色部位の二値化面積値の回帰直 線の傾き

傾き (マクロファージ1細胞 あたりの面積値)		
平均	SD	
226.5	9.3	
369.5	71.6	
366.1	55.6	
285.7	51.4	
355.2	56.3	
180.3	14.3	
512.2	55.2	
259.5	59.9	
271.2	28.6	
	傾き (マクロファ- あたりの配 平均 226.5 369.5 366.1 285.7 355.2 180.3 512.2 259.5 271.2	

3. 技術解説書の概要

本研究課題内容を踏まえ、吸入経路で暴露したナノ材料の体内動態に関する 一般的な評価やモデル化の方法について解説した技術解説書「ナノ材料の体内 動態の評価と数理モデル化」を作成して公開した。

吸入経路で暴露したナノ材料は、まずは肺に沈着し、その後、肺から気道を 経由したクリアランス、肝臓等の他臓器への移行と分配、他臓器でのクリアラ ンスが生じる。このことから、これらの各プロセスを対象として、評価やモデ ル化の方法に関する既往研究の紹介、留意点、基礎となる情報、プロジェクト での実施例をまとめた。 3.1 技術解説書の目次

第1章:はじめに:本技術解説書の成り立ちを示した。

- 第2章:体内動態の評価:試験とモデル化の流れ:吸入経路で暴露したナノ材 料の評価の流れを整理して示した。
- 第3章:動物試験の概要:ナノ材料の体内動態の評価を行うための動物試験の 概要を示した。
- 第4章:分析方法:動物試験で得られた臓器等の試料の分析方法を示した。
- 第5章:ナノ材料の体内動態のモデル化:分析により得られた各臓器のナノ材 料存在量についてのモデル化の方法を示した。
- 第6章:in vitro 系との連携:in vitro 系の試験を活用して、ナノ材料の体 内動態に示唆を得る方法を示した。
- 第7章:用量反応関係との連携:把握された体内動態と有害性発現との関連性 について論じた。
- 3.2 一般的な生理学的数理モデルの構築

プロジェクトを通じて実施した吸入暴露試験、気管内投与試験、静脈注射試 験により取得された体内動態に関するデータの特徴として、単調な臓器間の分 配と臓器中濃度の減衰が観察されるのみであり、臓器間濃度が連動して大きく 変動するようなことはなかった。すなわち、生理学的モデルの構築や、それを 用いた解析が有効であるとは考えられなかった。そこで、プロジェクトで取得 したデータに基づいて一般的な生理学的モデルを構築することはせず、生理学 的モデルに関する既往の文献情報の整理を行うにとどめ、合わせて、数理モデ ル構築を含めたナノ材料の体内動態評価に関する一般的な評価やモデル化の 流れ(データ取得から解析まで)をまとめることにした。これらの情報は、技 術解説書「ナノ材料の体内動態の評価と数理モデル化」に記載した。

- 3.3 生理学的数理モデルに関する情報
- 3.3.1 肺クリアランスに関する既往研究

Stöber et al. (1989) や Stöber (1999) は、肺に入った粒子の挙動を複数 のコンパートメントを用いた POCK (Physiology or iented compartment kinetic) モデルとして記述している。この中で、気管・気管支とリンパ節以外は全て肺 胞内を複数のコンパートメントに分けて表現したもので、肺胞表面やマクロフ ァージや間質や肉芽などを示している。この肺胞内のコンパートメントに対し ては、それぞれのコンパートメントを分けて存在量を分析することはできない。 そのため、これらのパラメータ(それぞれの間の速度定数など)は、物理化学 特性などから推定したり、細胞試験を用いて推定したりされることが多い。 ICRP のモデルでは、粒子の沈着からクリアランスまでをモデル化しており、肺 胞や気管支の各部位に沈着した粒子がそれぞれ一定の速度定数で移行してい くことが記述されている(ICRP 1994)。

一方、実験で得られた肺中存在量に対してフィッティングしてクリアランスの 速度定数を求めるためには、これらの肺胞内を簡潔に表現した少ないコンパー トメントによるモデルが用いられている。例えば、Kuempel(2001)によるナノ 粒子の肺クリアランスモデルでは、肺内を2コンパートメントで表した3コン パートメントモデルとして記述されている。また、気管・気管支へ行くコンパ ートメントとリンパへ行くコンパートメントを分けて記述したモデルも見ら れる。

3.3.2 全身の体内動態に関する既往研究

Li et al. (2013)は、PEG (polyethylene glicol) コートしたポリアクリル アミドのナノ粒子をラットに静脈注射し、投与後 120 時間までの動態を解析し ている。対象臓器を、肝臓、脾臓、腎臓、肺、心臓、脳、骨髄、その他と分け、 それぞれの臓器に、毛細血管、組織、貪食細胞というサブコンパートメントを 設定した解析を行った。

Bachler et al. (2013)は、銀(ナノ粒子とイオン態)の体内動態を PBTK モ デルにより解析した。モデルの骨格は静脈注射試験から得られた知見に基づい て構築され、動物の経口(28日間暴露)、吸入(6時間暴露の暴露後7日まで、 または28日間暴露)、気管内投与(投与後7日まで)による試験結果、及び、 人モニタリングデータについて、暴露のシミュレーションと実験値との比較に よって検証した。対象臓器は、脳、脾臓、肺、骨髄、肝臓、精巣、皮膚、筋肉、 腎臓、肝臓、消化管とされた。各臓器について、洞様毛細血管の有無、血管の 細孔の有無やサイズを想定して、血液から組織への取り込み速度が規定された。 肝臓、脾臓、肺については貪食細胞の存在を考慮した。また、ナノ粒子につい ては溶解、イオン態については硫化銀への変換を考慮している。

Li et al. (2012)は、mPEG の含有率の異なる複数の PLGA ナノ粒子について の PBPK モデルを構築した。静脈注射後、6時間までの動態が解析された。対 象臓器は、肺、消化管、消化管内腔、肝臓、腎臓、脾臓、尿、その他臓器とさ れた。各臓器は、血液と組織のサブコンパートメントから構成され、分配係数、 拡散係数、排泄速度(該当臓器のみ)のパラメータが求められた。血流律速(臓 器内の血液と組織とが速やかに平衡に達するため、組織への移行は臓器の血流 量により決定される)のモデルと、膜律速(血液と組織の移行が、毛細血管や 組細胞の膜の透過性により規定される)の二つのモデルが比較されたが、結果 的には、膜律速のモデルが採用された。 Mager et al. (2012)は、金とデンドリマーからなる複合ナノデバイスにつ いて、静脈注射後の120時間までの動態のPBTK モデル解析を行った。肺、心 臓、腎臓、筋肉、脳、脾臓、肝臓、その他を対象臓器とした。各臓器は、毛細 血管と間質のサブコンパートメントから構成され、受動的な透過や双方向の取 り込み、糞尿への排泄がモデル化された。その際、臓器の特徴によって、「肝 臓」「腎臓」「脳と筋肉」「肺及びその他」の4種類のモデルのタイプが設定さ れた。

Lankveld et al. (2010) は、異なるサイズの銀ナノ粒子の体内動態を検討 するために、PBTK モデルを構築した。5日間にわたり毎日1回の静脈注射を行 い、投与後1時間までの血液中濃度、及び、最初の投与から17日までの主要 臓器中の銀濃度を経時的に測定してモデル化した。銀濃度の測定は、血液、肺、 脳、腎臓、肝臓、脾臓、心臓、精巣が対象とされたが、PBTK モデルとしては、 血液とその他から成る単純な2コンパートメントモデルからスタートして、肝 臓、脾臓、腎臓、その他からなる5コンパートメントモデルまで、順次モデル を複雑化(「その他」を「肝臓」等に切り分けていく) させつつ、パラメータ を決定するというアプローチが取られた。5コンパートメントモデルにおける 各臓器は、血液と組織との二つのコンパートメントとされた。

3.3.3 体内動態評価の一般的な流れ

ナノ材料への吸入暴露の体内動態に関する評価方法については、対象を二つ に分けて記述することとした。一つは、吸入暴露時に直接ナノ材料が入る肺ク リアランスに関する体内動態、一つは肺から全身の臓器への移行した場合の体 内動態である。流れ全体を図③(b)-33 に示した。

動物試験	⇒ 分析 🛁	解析
<u>投与</u> 吸入暴露試験 気管内投与試験 静脈注射試験等 <u>飼育</u> 体重測定 糞・尿の採取等 <u>解剖</u> (非破壊測定を除く BALF採取 (気管支肺胞洗浄液) 血液採取 各種臓器採取等	<u>前処理</u> (非破壊測定を除く) ホモジネート (試料の均質化) 酸/アルカリ/酵素処理 等 (臓器/金属等の分解) <u>分析</u> < 分析法のないものは開発が必要> ICP-MS 等⇒ 金属類 HPLC 等⇒ C ₆₀ 炭素分析 等⇒ CNT [非破壊分析法] X線分析 (レントゲン 等) MRI (核磁気共鳴)	<u>クリアランス</u> コンパートメント モデル ⇒ 速度定数 <u>全身の動態</u> PBPKモデル ⇒ 移行/蓄積量 <u>In vitro試験</u> 透過性 貪食量 溶解性 メカニズム 等 の把握

図③(b)-33 体内動態評価の一般的な流れ

3.3.4 肺クリアランスに関する評価の流れ

肺は、吸入暴露の際に最初に沈着し、最も高濃度のナノ材料が存在しうる臓 器である。そのため、最も有害影響の発現する可能性が大きいと考えられる臓 器であり、肺への保持量が経時的にどう変化するのかを評価することは、その 毒性を考える上で非常に重要である。評価の流れとしては、①動物試験の実施、 ②肺関連臓器の分析、③肺からのクリアランスのモデル化という流れになる。 動物試験としては、一定の気中濃度のナノ材料をラットやマウスなどに吸入さ せる吸入暴露試験と、ゾンデやスプレイヤーを用いてナノ材料の分散液を気管 内に注入もしくは噴霧する気管内投与試験とがある。肺関連臓器の分析として は、肺保持量や直接の移行先である肺関連リンパ節中のナノ材料の化学分析を 行うことや、肺中の局在を顕微鏡観察や XRF 測定により評価することが含まれ る。肺からのクリアランスのモデル化は、上記分析で得られた結果に対して、 コンパートメントモデルをフィッティングして、クリアランス速度やクリアラ ンスの傾向、長期的な保持量の予測などを行うことである。技術解説書では、 各ステップについての具体的な内容や実施例を記述した。

3.3.5 全身の体内動態に関する評価の流れ

肺からクリアランスされたナノ材料は、血流やリンパ流などを介して他臓器 へ移行し、他臓器において毒性を発現する可能性がある。そこで、他臓器への 移行・蓄積を評価することが重要である。全身毒性に関する評価の流れも、肺 毒性と同様に、①動物試験の実施、②各種臓器の分析、③各臓器への分配とク リアランス・蓄積のモデル化という流れになる。動物試験としては、前述の吸 入暴露試験と気管内投与試験に加えて、肺から血中へ移行した後の動態を把握 するために静脈中にナノ材料の分散液を注射する静脈注射試験が用いられて いる。各種臓器の分析としては、血液、肝臓、脾臓、腎臓、脳などの中に存在 しているナノ材料の化学分析が行われる。また、マスバランスを把握するため に、糞尿中のナノ材料の存在量の測定をして、排泄量を把握することも行われ る。これらの分析結果を用いて、PBPK モデルにフィッティングすることで、各 臓器への移行・蓄積やクリアランスがどの程度の量・速度で起こるのかを解析 することになる。全身毒性で重要となるのは、どの臓器に移行・蓄積する可能 性があり、毒性を注意して観察すべき肺以外の臓器があるかどうかについて把 握することにある。技術解説書では、各ステップについての具体的な内容や実 施例を記述した。

4. まとめ

本プロジェクトで主に検討した3種のナノ材料(TiO₂、NiO、SiO₂)について、 吸入曝露試験、気管内投与試験の結果を数理モデルで記述した。ナノ材料の体 内動態に影響する要因に関する知見を得ることができた。試験したナノ材料の 多くでは、用量の増加とともに、肺クリアランス速度の低下とリンパ節への移 行速度の増加が観察され、いわゆるオーバーロードが観察された。TiO₂ナノ材 料では、表面コートされた材料において肺クリアランスの遅延が観察されたこ とを除くと、粒子径や形状による違いは顕著ではなかった。NiOナノ材料では、 溶解性の違いがクリアランスに影響を与えていると考えられた。とくに、リソ ソーム模擬液において速やかに溶解する材料は、肺からのクリアランスが著し く速く、尿中への排泄の割合も大きかった。SiO₂ナノ材料では、結晶型、粒子 径、表面コートの異なる材料を比較した中で、非晶質の材料で速いクリアラン スが観察された。

呼吸器を経由して暴露したナノ材料が血流に入った後の体内動態を把握す るため、静脈注射試験による体内動態の評価を行った。多くの材料で、投与し たナノ材料は速やかに血液中から消失し、主に肝臓、脾臓に分配され、その後、 Ni0ナノ材料のうち溶解性が高いと考えられたものを除いては、1ヶ月や6ヶ 月の観察では顕著な消失は見られず、材料による違いは小さかった。

また、ナノ材料と生体反応の肺内分布を定量化し、両者の関係を明らかにした。ナノ材料の肺内分析の定量化のためには、XRF(蛍光X線分析)による手法を開発し、単回の気管内投与、複数回の気管内投与、異なる器具での気管内投与、吸入暴露において得られた肺組織切片についてTiO₂ナノ材料の肺内分布を定量化して相互に比較した。生体反応の肺内分布は、マクロファージ、好中球、酸化ストレスを指標とした免疫染色部位の面積を定量化することを行い、ナノ材料の肺内分布との関係を得ることができた。

生理学的モデルに関する既往の文献情報と、数理モデル構築を含めたナノ材 料の体内動態評価に関する一般的な評価やモデル化の流れ(データ取得から解 析まで)をまとめ、ナノ材料の体内動態の評価・解析に関する一般的な技術解 説書技術解説書「ナノ材料の体内動態の評価と数理モデル化」として作成して 公開した。

5. 参考文献

Bachler et al. (2013) A physiologically based pharmacokinetic model for ionic silver and silver nanoparticles, International Journal of Nanomedicine 8, 3365-3382.

- ICRP (1994) Human Respiratory Tract Model for Radiological Protection. A Report of a TaskGroup of the International Commission on Radiological Protection (ICRP Publication 66), Edinburgh, Pergamon, International Commission on Radiological Protection.
- ILSI/RSI (1994) Physiological parameter values for PBPK models, A Report Prepared by the International Life Science Institute, Risk Science Institute.
- Kuempel (2001) A Biomathematical Model of Particle Clearance and Retention in the Lungs of Coal Miners I. Model Development, Regulatory Toxicology and Pharmacology 34, 69-87.
- Lankveld et al. (2010) The kinetics of the tissue distribution of silver nanoparticles of different sizes, Biomaterials 31, 8350-8361.
- Li et al. (2012) Physiologically based pharmacokinetic modeling of PLGA nanoparticles with varied mPEG content, International Journal of Nanomedicine 7, 1345-1356.
- Li et al. (2013) Physiologically based pharmacokinetic modeling of polyethylene glycol-coated polyacrylamide nanoparticles in rats, Nanotoxicology, DOI: 10.3109/17435390.2013.863406
- Mager et al. (2012) Physiologically based pharmacokinetic model for composite nanodevices: effect of charge and size on in vivo disposition, Pharmaceutical Research 29, 2534-2542.
- Stöber et al. (1989) Compartmental Modeling of the Long-Term Retention of Insoluble Particles Deposited in the Alveolar Region of the Lung, Fundamental and Applied Toxicology 13, 823-842.
- Stöber (1999) Pock model simulations of pulmonary quartz dust retention data in extended inhalation exposures of rats, Inhalation Toxicology 11, 269-292.

研究開発項目③ナノ材料の有害性試験・評価のための基盤技術の開発

(c) 培養肺胞モデル評価系の開発と数理モデル化への利用方法に関する研究 開発

国立研究開発法人産業技術総合研究所

–再委託・国立大学法人東京大学生産技術研究所

1. 目的

経肺暴露にて最初の標的臓器である肺を構成し、ナノ粒子の重要な標的組織 であると共に、体内取り込みを行う肺胞上皮組織に着目し、培養細胞を用いた in vitro 肺胞傷害・取り込み評価系を開発と培養系での粒子の傷害性・取り込 みを記述する数理モデルをそれぞれ構築、この構築した数理モデルを用いて、 様々な暴露シナリオにおけるナノ粒子の体内移行性を予測するという統合的 な手法を開発する。

始めに、膜型培養器を用いて培養した肺胞上皮細胞とマクロファージを共培 養することで肺胞内環境を再現する。第一には、取扱いが容易な培養系である ヒト由来の肺胞上皮株細胞とマクロファージからなる評価系の確立を行う。第 ニには、ラット初代培養の肺胞上皮細胞とマクロファージとからなる評価系の 確立を行う。特に後者は、本プロジェクトにて開発を進めるラットの気管内投 与試験の in vitro 版であるとみなせるが、ナノ材料の評価にはほとんど用い られていない。これらに加えて、サーファクタントを多量に含む肺胞内腔液の 培養条件下での再現も試みる。

上記2つの評価系の確立においては、極力実際の in vivo の肺胞内環境の再 現を試み、ナノ材料の傷害性・取り込みに与える影響を明らかとする。In vivo 肺胞内腔環境を模倣した評価系確立の後は、4つのコンパートメント(肺胞内 腔液、マクロファージ、肺胞上皮細胞、血液)から構成される細胞評価系にお いて、傷害性・取り込みに関わる一連の反応を数理モデル化、モデル蛍光ナノ 粒子や実際に使用されているナノ材料に適用してそのパラメーターを決定、体 内動態や生体反応に関する数理モデルの肺胞近傍におけるパラメーターを補 完する。最終的には様々な粒子種、様々な暴露シナリオにおける数理モデルの パラメーターを取得し、培養肺胞モデル評価系を用いたナノ材料評価の標準的 手順書の試案とともにとりまとめる。

2. 成果

2.1 文献調査

2.1.1 肺胞内腔の実環境 – 肺胞上皮細胞と肺サーファクタント

大気中に分散しているナノ粒子は、呼吸を介して気管を通り肺へ送られる。 気管は気管支、細気管支へと枝分かれし、それぞれ両肺で 3-5 億個に及ぶと言 われる直径 0.2-0.4 mmの球状の肺胞につながっている。肺胞表面は 95%を I 型 肺胞上皮細胞(または扁平肺胞上皮細胞)で、残り5%をⅡ型肺胞上皮細胞(ま たは大肺胞上皮細胞) で覆われており、一部を除き 0.05 - 0.2 µm の厚みの薄 い膜のようになって肺胞表面に広がる(図③(c)-1)。Ⅱ型細胞の核上部には層 板小体・ラメラ体 lamellar body (LB)と呼ばれる特有な小体があり(図③(c)-1, 2)、これより表面活性物質(肺サーファクタント pulmonary surfactant)が産 生されている(図③(c)-1)。肺胞内の肺サーファクタントの電子顕微鏡写真(図 ③(c)-2) (Goerke, 1998)を見ると、毛糸玉のような球状の小体であるラメラ体 の他に、肺サーファクタントに特徴的な格子様の膜構造(tubular myelin structure; TM)が見られるが、これら LB、TM は共に脂質二重膜により構成さ れている。一方で肺胞表面を覆っている薄い水(組織間液)と空気の界面を隔て ているのは脂質単層膜である。Ⅱ型細胞で産生された LB 中の脂質二重膜が単 層膜へ変化する過程には諸説ある。また、気液界面の単層膜はいずれ肺胞マク ロファージにより貪食されクリアランスされる以外に、II型細胞に戻ってリサ イクルされ、肺サーファクタントとして再産生されるという報告もある (Perez-Gil and Weaver, 2010).

肺サーファクタントは 90%の脂質と 10%のタンパク質から構成されている。 脂質のうち 80%がリン脂質である。リン脂質は疎水性部と親水性部を持つ両親 媒性で、これはナノ粒子を水溶液中に分散させるために用いる合成界面活性剤 と同様の性質である。よって、実際の暴露条件ではナノ粒子の分散・凝集に肺 サーファクタントが大きく影響している可能性が高い。

これらのすべてのタンパク質・脂質の混合による肺サーファクタントの人工的 再構成は、個別のサーファクタントタンパク質が販売されていないことや、脂 質類も高価なものがあることなどから、困難でありあまり現実的ではない。臨 床の現場においては、ウシ肺抽出物に脂質などを混合して調製される人工調製 肺サーファクタントであるサーファクテン(田辺三菱製薬)が新生児呼吸窮迫 症候群治療剤として用いられている。このサーファクテンは健康的なウシ肺抽 出物・一定比率のリン脂質・遊離脂肪酸・トリグリセライドを1ビン中に120 mg 含有するものである。本プロジェクトにおいて、本薬を肺サーファクタント代 用として用いることにした。



図③(c)-1. in vivo の肺胞内環境の模式図



Biochim Biophys Acta. 1998 Nov 19;1408(2-3):79-89.



以上文献等の調査の結果により、肺サーファクタントは気液界面を隔てたり、 肺胞表面の表面張力を緩和させたりすることで肺胞が虚脱するのを防ぐとい う重量な役割はもとより、ナノ粒子についはその肺胞内での凝集性に大きな影 響を与えると考えられ、肺胞内環境の再現を目指す場合、肺胞内腔液の再現が 重要であると考えられることが示された。

2.1.2 肺胞上皮細胞とマクロファージの共培養評価系の重要性

呼吸器系のマクロファージは肺胞内、間質、血液内に存在し、肺胞内には若 い小型のマクロファージが多く、成熟すると大型化して、気道系に移動する。 肺胞マクロファージは、肺胞内や気道内の細菌、異物、劣化した肺サーファク タント、壊れた細胞成分などを貪食し除去する。また、外部刺激に対して炎症 性サイトカイン類を分泌するなど、経肺暴露を考える上で無視できない存在で ある。肺胞上皮細胞との共培養は既に少数報告されている。たとえば、ヘマタ イトと silicasol の暴露により単培養の A549 中のインターロイキン 6 とイン ターロイキン8が放出されるが、 A549 と THP-1 の共培養によりサイトカイン 放出の感度が上昇するという報告がある(Wottrich. Diabaté. et al., 2004)。 また、3 種共培養(A549 : THP-1 : ヒト肥満細胞株(HMC-1)= 10 : 2 : 1) では顆粒球コロニー刺激因子 (granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF)、マクロファージ炎症性タンパク質(macrophage inflammatory protein. イキン 6、腫瘍壊死因子が上昇していると報告されている(Alfaro-Moreno. Nawrot, et al., 2008)。以上より、炎症性サイトカインの分泌を通じて、肺胞 上皮細胞への傷害性を高めるという結果が示されているが、その評価法導入の 具体的な手法やその意義・必要性については明確にされているとは言い難い。

2.2 ナノ粒子混合培養液の検討と粒子の存在状態

ーナノ粒子暴露方法と in vivo 環境の模倣ー

本課題では、より忠実に肺胞表面を模倣した in vitro 評価系を培養株細胞 もしくはラットの初代培養細胞を用いて再現する。実際の肺胞表面は面積の 95%を扁平な形状を持つ I型肺胞上皮細胞が、残り 5%を立方体状の形状を持つ II型肺胞上皮細胞が占め、その上を肺サーファクタントを含む肺胞内腔液が覆 っている。実際に人がナノ粒子に暴露された場合、気中にエアロゾル化して分 散しているナノ粒子は、呼吸により肺胞に到着する。到着したナノ粒子は肺胞 内腔液表面で何らかの形で内腔液内に移行し、肺胞マクロファージに貪食され るか肺胞上皮細胞に至ると考えられる(図③(c)-3A)。気中に完全に分散してい るナノ粒子を模倣するために、プロジェクトでの in vivo 気管内投与試験では ナノ粒子を完全に分散させたリン酸二ナトリウム溶液(DSP)や milli-Q 水を用 いている(図③(c)-3B)。In vitro 試験では細胞を培養する際に用いる培養液ベ ースの分散液使用の必要性から、A549 細胞を培養する際に使用する DMEM 培地 に 10% 仔牛血清 (Fetal Bovine Serum) と 1% の抗生物質を添加した培養液等にナ ノ粒子を、動的光散乱解析装置 DLS を用いて粒径を測定しながら混合・分散し た。しかし塩濃度・pH・含まれるタンパク質などから粒子は均一に分散されな い(詳細は後述)。そこで実際の in vivo 環境では粒子は分散されずに凝集し て存在すると考え、in vitroの系での暴露方法としては、肺胞内腔液を模倣し た再現内腔液に覆われた細胞の上に、粒子を分散させた DSP を添加するか(図 ③(c)-3C)、粒子を再現内腔液もしくは培養液に混合させて暴露させるか(図③ (c)-3D)の、2種の方法を採用することとした。また粒子を混合して暴露に用い る、肺サーファクタント成分を含む培養液の検討を行った。リン酸緩衝生理食 塩水(PBS)にグルコース・アルブミン・ジパルミトイルホスファチジルコリ ン(DPPC)を添加した溶液や、培養液中にサーファクテンを混合した溶液などに 粒子を混合したが、いずれにおいても脂質類と水溶液が分離する。より実肺胞 空間に近い条件でと考えると、肺サーファクタントプロテイン類が保持されて いるサーファクテンを培養液中に混合した溶液を、再現する肺胞内腔液として 用いるのが現実的である。このサーファクテンを含有する培養液にナノ粒子を 混合して細胞に暴露したところ、サーファクテン及び粒子を含む培養液を暴露



図③(c)-3. 実暴露環境、in vivo 気管内投与試験、in vitro 暴露試験の投与 形態の模式図

マクロファージ 肺胞上皮



図③(c)-4. 本課題において確立する in vitro 評価系(左)と数理モデル(右)

した場合、サーファクテンのみを含む培養液と比較して有意に細胞傷害が観察 され、生細胞数が減少した(詳細は次項)。すなわち、粒子の影響を調査する上 で肺胞内腔液共存の重要性が示された。

今後は図③(c)-4 に示すようなカルチャーインサート内に、肺胞上皮細胞・ マクロファージ・肺胞内腔液が共存する評価系を確立し、肺胞内腔液コンパー トメントを含む、同じく図③(c)-4 に示すようなコンパートメントモデルをベ ースにした数理モデルを確立することを目的に進めていくこととした。

2.3 ヒト株細胞を用いた評価系の確立に向けてのアプローチ

2.3.1 培養液中の粒子の凝集体形成

ナノ粒子類はそのサイズ、表面電位や表面修飾により分散状態が異なる。本研究で有害性の評価を行った TiO₂粒子の一つである P25 (日本アエロジル) は一次粒径が 21 nm ほどで 2 mg/ml DSP の溶液に混合し超音波分散を行うことで均一に分散する。その溶液中での粒径を動的光散乱光度計 (DLS) により測定すると図③(c)-5の上グラフのような結果となり、数十 nm の粒径で存在していることがわかる。しかし、通常の株細胞を培養する培養液 (DMEM) に 10%仔牛血清 (Fetal Bovine Serum) と 1%の抗生物質を混合した通常培養液に P25 を混合して 3 時間超音波処理を施し、1 時間ごとにその平均粒径を DLS により測定すると、図③(c)-5 の下グラフのように超音波分散により多少粒径は小さくなるものの、数百 nm オーダーの大きな凝集体を形成していることがわかる。本傾向は培養 液の pH や塩濃度、タンパク質濃度に依存するもので、何も添加していない DMEM、また PBS においても同様であった。このことより、実際の vivo 空間においては、粒子は溶液中に分散せず、凝集体を形成して存在すると考えられる。



図③(c)-5.2 mg/ml DSP 中と培養液中の TiO₂(P25)の DLS による粒径測定結果



図③(c)-6. 2種の TiO₂粒子(P25, MP-100)の培養液中における凝集体サイズ と濃度依存性

さらに P25 に加えて、一次粒径 1 µm の MP-100 (テイカ) という TiO₂粒子を 同様の培養液中に 0.002, 0.02, 0.2 mg/ml の濃度に混合し、3 時間超音波分散 処理を行ったものを DLS により粒径測定を行った結果を図③(c)-6 に示す。粒子 は高濃度になるほど大きい凝集体を形成していることがわかった。これらが、 後述する粒子暴露後の細胞生存率測定の再現性が安定して取れないこと、一貫 した用量作用性が見られないことなどの理由であると考えられる。

2.3.2 肺胞内腔液を用いた粒子の混合と暴露

サーファクテンを、処方に従い 120 mg を 4 ml の生理的食塩水に溶解分散し てサーファクタント溶液を得た。 委託元である独立行政法人産業技術総合研 究所安全科学研究部門から譲渡された、TiO₂ナノ粒子を DSP に分散した溶液と 培養液、及びサーファクテン溶液を混合した培養液を様々な量で混合し、分散 と混合の様子を観察した。また得られた混合液を、マルチウェルプレートで単 層培養した A549 細胞の飽和層にある濃度で暴露し、72 時間後の細胞形状の観



図③(c)-7. TiO₂ナノ粒子による細胞傷害性の観察

察と生存率(細胞数)の測定を行った。

前述のように、肺サーファクタントを含む肺胞内腔液はナノ粒子の凝集性に 大きな影響を与えると考えられるため、肺胞内環境のより忠実な再現のために は、従来からの気液界面培養および肺胞マクロファージの導入に加えて、肺胞 内腔液の再現が重要であると考えられるが、in vitro 培養系において肺胞内腔 液の再現を目指した例は皆無であった。

まず処方に従って、前述のサーファクテン 120 mg を 4 ml の PBS に溶解分散 した濃厚液・サーファクテン溶液を調製した。次に、このサーファクテン溶液 が 10%になるように培養液に添加してサーファクテン入り培養液を得た。サー ファクテン入りとサーファクテン無の培養液のそれぞれ TiO₂ ナノ粒子が 0, 0.065, 0.65 mg/ml になるように混合し、A549 細胞層に暴露した。暴露 72h 後に細胞の形状等を観察した結果を図③(c)-7 に、細胞数カウントにより生存 率を測定した結果を図③(c)-8に示す。まず、TiO2ナノ粒子 0 mg/mlの100%DMEM と 10%サーファクテン-DMEM で比較したところ、サーファクテンを含む場合や や生存率の低下がみられるものの顕著ではなく、in vitro 培養においても使用 可能との結果を得た。極めて高濃度である 0.65 mg/ml の TiO2粒子を 72h 暴露 したものでは、細胞は激しく傷害され、生存率が著しく低下しているのが確認 され、その傷害率はいずれもサーファクタントが混合されている場合の方が著 しかった。0.065 mg/ml では生存率の低下は十数パーセント程度であったが、 本濃度においてもサーファクタント入りの培養液で暴露した時の方がより生 存率が低下していた。また細胞の形状、TiOpの取り込み具合もサーファクタン トを含むものと含まないもので差があり、サーファクテン無しで暴露したもの では暴露後の細胞内にナノ粒子を含むと思われる黒い粒状体が多く観察され たが、サーファクテンを含まないものではほとんど見られなかった。これは培 養液中の TiO2 の分散状態がサーファクテンにより大きく変化したことが原因 と考えられる (図③(c)-7, 8)。以上より、サーファクテンを含む場合、生存 率と細胞質への取り込みに変化が見られたことから、サーファクテンを含む検 討の重要性が示唆されたが、同時に今回、培養液との混合時に多くの不溶性物 質が観察されたことと細胞形態がやや変化したことから、濃度やその分散状態 も含めて添加方法を最適化する必要があると考えられる。



図③(c)-8. TiO₂ナノ粒子暴露 72h 後の A549 肺胞上皮細胞の生存率

2.3.3 肺胞上皮株細胞 A549 の細胞培養密度と TiO₂粒子暴露時の生存率の関係 培養ヒト肺胞上皮細胞を用いて、肺胞表面モノレイヤーを形成させ(高密度 培養)、一方では通常の有害性アッセイに用いるような低密度培養条件での細胞を用意し、両者のナノ粒子経気道暴露におけるミトコンドリア活性、細胞生 存率や肺傷害性を調べ、スクリーニング法としての有用性の検討を行った。
A549 細胞を 96 well または 24 well プレートに低密度に培養したもの(1.6 x 10⁴ cells/cm²)と継代後 5 日間培養して高密度に培養し、隙間ない A549 細胞のモノレイヤーを形成させたものの2 種を用意し、一次粒子径 21 nm の P25 と一次粒子径 1000 nm の MP-100 の 2 種の TiO₂粒子の混合培養液を 0.002, 0.02, 0.2 mg/ml の 3 種の濃度で暴露し、暴露後 24, 48, 72h 後の細胞生存率を WST-8 法により測定し、粒子の粒径と傷害性の比較を行った。

WST-8 アッセイによる細胞生存率の測定の結果、両者生存率にばらつきが多 く、大きな生存率変化の傾向は見られなかった。しかし、図③(c)-9 に示す細 胞観察によると、低密度培養の場合、まばらな細胞は粒子を多く貪食している のが観察されるのに対し、細胞密度が高くモノレイヤーが形成されている場合 は、粒子は細胞のモノレイヤー上に凝集体を形成しながら漂うように存在する のが観察され、粒子を貪食している細胞は低密度培養と比較してはるかに少量 であった。低密度の場合、高密度の状態と異なり細胞は活発に増殖しながら粒 子を貪食しており、一方で増殖フェーズにない高密度な細胞モノレイヤーにお いては粒子は取り込まれていないことから、in vivo の肺でも健康な単層を形 成している肺胞表面にはほとんど取り込まれることがなく、傷害を受けた肺表 面においては、修復増殖する際に粒子の取り込みが生じる可能性が示唆された。 ただし、本実験に用いた A549 はそもそもガン化した細胞であることなどから、



図③(c)-9. 低密度培養及び高密度培養した A549 に TiO₂粒子を暴露約 15 時間後の 観察像。低密度播種(1.6 x 10⁴ cells/cm²)(上)と継代後 5 日間培養して高密度に培 養した密な A549 細胞単層(下)の 2 種に、ナノオーダーサイズの TiO₂ とミクロンオ ーダーサイズ TiO₂を暴露し細胞の形状観察を行った結果。

初代培養細胞との比較にて明らかにする。いずれにせよ、in vitro において粒子類の有害性を評価する際、細胞の培養密度により細胞のナノ粒子に対する反応が異なるため、培養密度の制御が非常に重要であることが示された。

2.3.4 肺胞上皮 A549 とマクロファージ THP-1 の単培養及び共培養と生存率

A549 および THP-1 の単培養、また A549 モノレイヤーと THP-1 の共培養にお いても同様に粒子暴露後の生存率測定を行った。A549 細胞を 96 well または 24 well プレートに継代後 5 日間培養して高密度に培養し、隙間ない A549 細胞 のモノレイヤーを形成させたものに、細胞数 A549 : THP-1 = 10 : 1 になるよ うに THP-1 を共存させた。THP-1 は事前に 24h PMA を培養液中に添加すること によりマクロファージ様に分化させておいたものである。これらに粒子混合培 養液を 0.002, 0.02, 0.2 mg/ml の 3 種の濃度で暴露し、暴露後 24, 48, 72h 後の細胞生存率を WST-8 法により測定し、粒子の粒径と傷害性の比較を行った。

WST-8 アッセイによる細胞生存率の測定の結果を図③(c)-10 に示す。共培養 は A549 と THP-1 細胞を合わせた生存率である。A549 上に TiO2粒子・結晶質シ リカ粒子を暴露した場合、生存率にほとんど変化は見られなかったが、結晶質 シリカにおいてのみ生存率の低下が見られた。



図③(c)-10. A549 モノレイヤーと A549 と THP の共培養での粒子暴露実験。5 日間培養して高密度に A549 を培養し密な単層形成させたもの(上)と単層上に A549 : THP-1 = 10 : 1 になるように播種した 24h 後の細胞(下段)に 2 種の TiO₂ 粒子および結晶質シリカ粒子を暴露し、24, 48, 72h 後の細胞生存率を WST-8 で測定した結果。右図はφ 21nm の TiO₂粒子に暴露した際の細胞の観察画像。

しかし、THP-1 と共培養させた場合はほとんど生存率の変化、すなわち細胞 の傷害は見られない。ここで、A549 単培養と A549・THP-1 共培養の細胞に一次 粒径約 21 nm の TiO₂粒子を暴露した際の細胞の観察写真も同時に 図③(c)-10 に示す。黒く見える粒子すなわち TiO₂粒子は、A549 モノレイヤー上では細胞 の上に乗った状態で細胞の運動によって緩やかに動く状態だが、THP-1 との共 培養では THP-1 が粒子を貪食し、時間経過に伴い丸く大きくなっていく様子が 観察された。これより、共培養において生存率の変化が見られないのは、A549 モノレイヤー上のナノ粒子を THP-1 が優先的に貪食することにより A549 が傷 害されないからであると考えられる。

2.3.5 気液界面培養(ALIC: Air-Liquid Interface Culture)の確立

カルチャーインサート(Costar 3460 12 mm Transwell® with 0.4 µm Pore Polyester Membrane Insert)中に A549 のモノレイヤーを形成させ、気液界面 培養状態の確立に向けての検討を行った。コラーゲンコート処理したカルチャ ーインサート上に A549 を 1.0 x 10⁵ cells/cm² になるように調整し播種する。 カルチャーインサート内、外に通常培養の所定量、すなわち 2 mm 厚みになる ような量の培養液を入れた状態で、培養液の交換を行いながら培養を行う。そ の間、膜の上下間の経上皮電気抵抗値 (Trans Epithelial Electric Resistance: TEER)を測定しモノレイヤー形成を確認した(図③(c)-11)。TEER の値は播種時から徐々に上昇し、播種7日後には抵抗値が安定していることか ら7日間の培養によって均一なモノレイヤーが形成されていると判断できる。

そこで播種後7日目のモノレイヤーを用いて、まず、カルチャーインサート 内の培養液を厚み約10 µm になるように調整、1日インキュベーター内に保持 したが、培養液はカルチャーインサート内に漏れ出すことはなかった。インサ ート外部、すなわちウェル内の培養液を抜いた状態で保持しても同様であった。 さらに、インサート外部の培養液を抜いた状態でプレート全体を2000 rpm で 10 分遠心しても液はほとんど落ちることが無く培養液はインサート内に保た れた。これより、培養7日後のモノレイヤーは隙間なくしっかりと形成されて おり、細胞間のタイトジャンクションが形成され、また肺胞外部への水排出能 が保持されていることがわかる。A549 細胞は、インサート内の培養液を抜いた 状態、すなわち気液界面培養環境に3日間保持したが、細胞は形状の変化や表 面の乾燥等を生じることなく通常に培養が可能であることを確認した。

このカルチャーインサート内に培養された細胞上に TiO₂ 粒子 (P25) を混合し た培養液を添加、細胞の形状観察と TEER 測定を行った。暴露 7 日間で、細胞 の中に多く TiO₂ 粒子が取り込まれている以外、細胞の形状に大きな変化は見ら れず、TEER の値は暴露 3 日後に 10 Ω・cm² 程度の低下が生じたが、7 日後には 元の値に戻っていた。またカルチャーインサート下部への粒子の透過量は非常 に少量であることが判明した。



図③(c)-11. 経上皮電気抵抗値 (Trans Epithelial Electric Resistance: TEER) と A549 モノレイヤー形成。コラーゲンコート済みのカルチャーインサート(Costar 3460 12 mm Transwell® with 0.4 µm Pore Polyester Membrane Insert)に 1.0 x 10⁵ cells/cm²の濃度で細胞を播種し(day0)、その後の経上皮電気抵抗値の測定を行っ た結果。値は徐々に上昇し、7 日目には安定した。

2.4 ラット初代培養細胞を用いた評価系確立に向けてのアプローチ

2.4.1 ラットからの II 型肺胞上皮細胞抽出法

新規導入にあたり、主に II 型肺胞上皮細胞から産生される肺サーファクタ ントを専門に研究され、II型肺胞上皮細胞をラットから抽出して用いられてい る岩手医科大学 医学部 臨床検査医学講座 諏訪部章教授、小笠原理恵助教の 下、ラットからの II 型肺胞上皮細胞の抽出法を習得した。肺サーファクタン トは、肺胞表面を覆う界面活性物質で、肺胞表面の表面張力を減少させ、肺胞 が虚脱するのを防いでいる。製剤は特に新生児呼吸窮迫症候群に対する補充療 法で重宝されているが、ウシ肺由来抽出物から調製されていることから懸念さ れるアレルギーや感染症の問題、非常に高価であるという問題を解決するため に、ヒト由来の肺サーファクタントの作製や肺サーファクタント産生促進機序 の解明を目的として、動物から抽出された II 型肺胞上皮細胞を用いた実験が 行われている。Ⅱ型肺胞上皮細胞の抽出法にはメトリザマイド比重遠心法と IgG パニング法の2つがこれまで提唱されているが、今回は前者の方法を導入 した。まず麻酔をかけた Sprague-Dawley ラット(SD ラット)を開腹して気管 を露出させる。次に心臓を露出し肺動脈還流後、肺・心臓を摘出し緩衝液等で 肺内洗浄後エラスターゼ処理を施す。そして肺組織をミンスして重層遠心する ことにより肺胞Ⅱ型細胞を得る。得られた細胞は培養ディッシュに播種した。

2.4.2 ラット II 型肺胞上皮細胞の形状観察

抽出後、通常の組織培養用ディッシュに播種した2日後と10日後の細胞の 形状を図③(c)-12に示す。播種時の細胞密度は3.0 x 10⁴, 3.0 x 10⁵ cells/cm² の2種である。3.0 x 10⁵ cells/cm²の密度で培養した場合は2日後には細胞は II 型特有の Cuboidal な形状を保ちつつコンフルエントに達しており、またそ れぞれの細胞内に、これもまた II 型特有のオルガネラである Lamellar body が観察された(図③(c)-12(c))。よって抽出は成功しており、ほぼ全細胞が II 型維持していることが確認された。しかし、10日後になると、Lamellar body が消失したり、細胞がはがれたり一部線維化している様子が観察された(図③ (c)-12(d))。したがって II 型細胞を高率に得るためには3.0 x 10⁵ cells/cm² 程度の細胞密度で播種した2日後以降が適当であることがわかった。一方で、 3.0 x 10⁴cells/cm²の低密度で播種すると、2日後にはまばらに細胞が点在し ている状態であるが(図③(c)-12(a))、10日後に観察すると細胞の一つ一つ が完全に扁平化し、Lamellar body もほとんど消失して I 型様細胞に形態変換 していることが確認された(図③(c)-12(b))。

II型肺胞上皮細胞が、低密度培養及び培養日数が経過するに従いII型細胞の特性を失い I型細胞へ形質転換することは既に報告されている(Cheek,

Evans, et al., 1989)。そして II 型細胞から形質転換した I 型様細胞は、I 型細胞の機能的特性も維持されており、I 型細胞のモデルとして用いられている (Steimer, Haltner, et al., 2005),(Williams, 2003)。肺胞上皮 I 型細胞の抽 出法も提案されてはいるが、II 型の抽出と比較すると煩雑で収量が II 型細胞 の1割以下と効率が悪く、一般的でない。In vivoの肺胞上皮は面積の 95%を I 型細胞が占め、残りが II 型細胞で構成されている。本課題においては、まず 細胞密度と培養日数の制御、および気液界面培養環境に保つことにより I 型分 化を促進することとした。



図③(c)-12. ラットからの抽出した肺胞 II 型細胞の形状。(a) 抽出後培養 ディッシュに播種時の細胞密度 3.0 x 10⁴ cells/cm²で培養 2 日後。(b) 同じ く 3.0 x 10⁴ cells/cm²で播種し 10 日間培養したもの。扁平な I 型様細胞に 形質転換している。(c) 3.0 x 10⁵ cells/cm²で播種した 2 日後。ほぼ全部が Lamellar body を伴う II 型細胞を維持。(d) 3.0 x 10⁵ cells/cm²で播種 10 日後。一部ラメラボディの消失が見られ、形状も変化している。

2.4.3 ラット肺胞モデルの確立---薄い肺胞上皮モノレイヤーの形成---

理想的な I 型モノレイヤーを、ラット初代は培養細胞を用いた肺胞モデルの 確立をめざし、図③(c).2 に示すような二重底培養器の半透膜上に培養する。本 培養器では2つの空間が半透膜で仕切られており、その半透膜上に肺胞上皮細 胞層を形成することにより、上皮層上部を肺胞空間、細胞層下部・すなわち半 透膜下部を血液相として肺胞上皮近傍を模倣したモデルを得ることができる。

前節で確立した理想的形成条件でカルチャーインサート上に肺胞上皮細胞を 播種する。細胞がモノレイヤーを形成し、さらに強いタイトジャンクション形 成をして安定なモノレイヤーを形成する過程を見るために、播種後12日間にわ たり、細胞上皮間のTEERを測定した。比較対象として、ヒト肺胞上皮株細胞A549 を同様にカルチャーインサート上にモノレイヤー形成させて用いた。その結果 を図③(c)-13.に示す。ラット初代培養の肺胞上皮細胞播種後、4 日目辺りから TEER 値は急上昇し、7 日目以降安定して約 500 Ω・cm²程度の高い値を示す。一 方、A549 細胞の場合は早めに上昇し、50 Ω・cm²程度で安定している。A549 細 胞は肺胞 II 型上皮細胞由来の立方体状の非常に厚みのある細胞で、形成される A549 モノレイヤーは非常に厚い。それと比較するとラット I 型細胞のモノレイ ヤーははるかに薄い単層を形成しているにも関わらず、TEER は A549 の 10 倍ほ どの非常に高い値を示した。これより、ラット初代培養細胞はカルチャーイン サート上でも強いタイトジャンクションを形成した、非常に薄い単層となって いることが確認された。

単層を形成した上で、細胞層上部の培養液を除去して気液界面を形成して培 養を行ったところ、培養液量の変化、移動も見られず、培養液の移動はしっか り制限されていることも確認された。細胞間にタイトな密着結合が形成された 正常なバリア機能を有する細胞層が形成されており、細胞層透過による血中移 行性を含めたナノ粒子の有害性評価に適用可能であることが確認された。



図③(c)-13. ラット初代培養細胞とヒト肺胞株細胞(A549)の経上皮電気 抵抗値(TEER)値の経時変化と得られた単層の観察像

2.4.4 ラット肺胞モデルの確立

―ラット初代培養細胞の肺胞上皮とマクロファージの共培養―

1回の抽出で Spraque-Dawley ラット(約7週齡前後)2匹を用い、肺動脈灌流 後気管ごと肺・心臓を摘出。肺胞腔内洗浄を行った洗浄液を集め、遠心するこ とでマクロファージを得る。2.2.の方法で得られた I 型様肺胞上皮細胞層 上に、単離した肺胞マクロファージを播種してラット初代培養細胞を用いた共 培養系を構築した。A549 ヒト肺胞上皮細胞のモノレイヤー上に THP-1 ヒトマク ロファージ様細胞を共培養すると、THP-1 は仮足を伸ばして強く A549 細胞と接 着するが、ラット初代培養マクロファージは、図③(c)-14 に示すように生体内 と同様に薄い肺胞上皮細胞層の上に仮足を伸ばさずに球体の形状維持したまま 肺胞上皮に付着している様子が観察された。図③(c)-14 左図に位相差顕微鏡で の観察像を示す。この共培養組織を、細胞膜を CellMask[™]Plasma Membrane Stains (life technologies)により赤色に、細胞核を DAPI で青色に、マクロファージ を CD11b 抗体で緑色に染色し、蛍光顕微鏡にて観察した結果は図③(c)-14 中央 と右図に示す。これより、上皮細胞は非常に一つ一つが非常に薄く広がってお り、またマクロファージはその上皮層の上に存在しているのがわかる。このよ うな観察像を複数取得し、それぞれの像におけるマクロファージの存在密度を 測定し、平均値を算出した結果、マクロファージは 4.8×10³ cells/cm²の密度 で存在していた。実肺胞においては、肺胞マクロファージは肺内の状況によっ て変動があるものの、約 3.0-6.0×10³ cells/cm² で存在していると報告されて おり、in vivoと同程度の共培養系を構築することができたと言えることを確認 した。また、蛍光色素を標識した粒子を暴露すると、粒子による蛍光シグナル はマクロファージ内に局在し、マクロファージが積極的に粒子を貪食すること が確認された。



図③(c)-14. ラット初代培養モデルの最終系の組織観察像。(左)ラット初代上皮 細胞とマクロファージの共培養の位相差顕微鏡観察像。矢印はマクロファージ。 (中) 同組織の染色像。細胞膜を赤色で、核を青色で、マクロファージは CD11b 抗体を用いて免疫染色し、緑色で示す。(右)CD11b 抗体によるマクロファージ染色。 2.4.5 ナノ粒子の暴露と細胞生存率

ラット初代培養細胞に粒子を暴露した際の影響を株細胞と比較するため、粒 子暴露後の生存率測定を行った。96 穴プレートの各ウェル内にラット肺胞上皮 細胞または肺胞マクロファージを培養し、21 nm TiO₂ 粒子または 1600 nm SiO₂ 粒子を 0.002, 0.02, 0.2 mg/ml の 3 濃度で暴露し、暴露開始 24 時間後と 48 時 間後の細胞生存率を測定した。測定には WST-8 法を用いた。

図③(c)-15 に結果を示す。肺胞上皮細胞に注目すると、ヒト細胞株では両粒 子で有意な生存率低下が見られたのに対し、ラット初代培養では大きな生存率 低下が見られなかった。また、マクロファージ細胞では、ヒト細胞株ではシリ カ粒子暴露後 48 時間で生存率低下が見られるのみであったが、ラット初代培養 では顕著な生存率低下が見られた。生存率測定と並行して、同サンプルにおけ る細胞の運動をインキュベーター内に設置して細胞像を観察・撮影できる顕微 鏡により観察を行った。肺胞上皮細胞においては、A549 細胞は積極的に貪食し ながら遊走し、A549 細胞内の粒子量は増加するが、ラット初代培養細胞の肺胞 上皮細胞ではそれらの挙動は観察されない。一方、マクロファージにおいては、 THP-1 と比較すると初代培養のマクロファージははるかに積極的に仮足を伸ば して粒子を貪食している様子が観察される。これら、貪食能の違いが生存率に



図③(c)-15. ラット初代培養細胞とヒト株細胞への暴露時の細胞生存率変化

423

も影響している可能性が示唆された。そして、マクロファージが積極的に暴露 粒子を貪食し、上皮層への取り込みは少ないという生体内での挙動を、ラット 初代培養の系がより忠実に再現していることを確認することができた。

2.5 ヒト肺胞モデルにおける粒子透過実験と数理モデル

2.5.1 コンパートメントモデル

in vivo 肺胞内腔環境を模倣した評価系確立の過程で、肺胞上皮細胞とマク ロファージの共培養が必要であることが確認された。そこで、カルチャーイン サートを用い、図③(c)-16 に示すような4つのコンパートメント(肺胞内腔液、 マクロファージ、肺胞上皮細胞、血液)から構成される細胞評価系を構成した。 これら4つのコンパートメントの間に動的平衡が成立すると仮定した簡単な 数理モデルを構築し、透過予測モデルを仮定した。それぞれの物理学的・生物 学的差異から異なった濃度にて平衡に達する(分配平衡へ移行関係にある)と すると、順および逆輸送のフラックスが存在することとなり、その大きさは6 つの速度定数で示される。そして、それぞれのコンパートメントにおける粒子 のマスバランスを記述する物質収支式を図③(c)-13 に示す。上記2つの評価系 において、傷害性・取り込みに関わる一連の反応を数理モデルで記述し、その パラメーターを決定する。

細胞をカルチャーインサート上に培養して単層細胞層を形成させて、粒子の 暴露実験を行い、細胞内腔側・上皮細胞・血液相それぞれにおける濃度の経時 変化を求める。そのグラフの t = 0 近傍では GL, GL, GL, GL, がゼロであるというこ とと、t=0 切片の傾きの値、また十分時間がたち、コンパートメント間が平衡 に達した状況では dGp/dt=0 となるなどの条件を用いて各物質移動係数 k を導 き出す。得られた簡単な数理モデルにより暴露後 2・3 日後の挙動を概ね記述 することができる。





2.5.2 粒子の移行・透過実験とパラメーター計算

まず、図③(c)-17に示すような、マクロファージを除く3コンパートメント モデルにおける粒子の移行・透過実験を行う。コラーゲンコート処理したカル チャーインサート上に A549 を 1.0 x 10⁵ cells/cm² になるように濃度調整して から播種する。そこに培養液中に混合した TiO2粒子を暴露し、粒子の細胞相お よび血液相への移行・透過量を経時的に定量する。その結果より k₁, k₂, k₅, k₆ を決定する。次に、A549 細胞の単層細胞層に培養液中に 24 時間 PMA を添加す ることでマクロファージ様に分化させた THP-1 を A549:THP-1 が 10:1 となるよ うに共培養させ、図③(c)-16のような4コンパートメントモデルを構築し、そ の上で、培養液中に混合したTiO2粒子を暴露し、粒子の細胞相および血液相へ の移行・透過量を定量する。その結果を数理モデル式にフィッティングするこ とで k₃, k₄のパラメーターの値を算出する。以上より求められた式において in vivoと異なる条件パラメーターの値を置き換えることで、より in vivo環境に 近い状況においての粒子の移行量・透過量を導出する。さらに、粒径・形状の 異なる粒子や可溶・不可溶粒子、異なった暴露方法(気管内投与、吸入暴露)な ど、様々な暴露シナリオにおける数理モデルパラメーターを決定し、肺胞近傍 における粒子の移行のしやすさなどを定量的にとらえて情報として提供する。 以上が本プロジェクトにおいて数理モデルに関わる進行の流れである。

その予備実験として、図③(c)-17に示すマクロファージを除く3コンパート メントにおける移行・透過実験と数理モデルパラメーター算出を行った。A549 のモノレイヤーを形成させたカルチャーインサート上に TiO₂ 粒子(P25) 0.2 mg/ml で暴露し、6,12,24,48,72時間後の肺胞内腔側・細胞・血液相をサン プリングし、ICP-MS により各相における TiO₂ 濃度を測定した。(測定は委託元 である産業技術総合研究所 安全科学部門により行われた。)その結果を図③ (c)-15 に示す。図③(c)-14 の式にフィッティングしてパラメーター計算を行 った結果、 k_1 , k_2 , k_5 , k_6 の値はそれぞれ、0.5,8.0 x 10⁻⁵, 1.9 x 10⁻⁵,54 となり、それらを代入することにより得られる値を図③(c)-18 中に実線で示す。



図③(c)-17. 3-コンパートメントの数理モデルと各コンパートメントにおけ る物質収支式



図③(c)-18. TiO₂(P25)暴露後の内腔液側・血液相側の濃度の経時変化と数理 モデルへのフィッティング

内腔液中と血液相中の TiO2 粒子濃度は暴露後 10 時間後にはほぼ平衡に達して おり暴露数時間は短時間にサンプリングを行う必要があることがわかった。

2.6 ラット初代培養肺胞モデルにおける粒子透過実験と数理モデル

ラット初代培養細胞の肺胞上皮細胞とマクロファージを共培養させて肺胞上 皮近傍を模倣した培養モデルを確立し、肺胞内腔を模倣した細胞上部の培養液 中に粒子を混合することで暴露し、血液相側、すなわち細胞層下部のコンパー トメントへの粒子の移行量を測定することで、粒子の透過性を定量した。

まずは肺胞上皮細胞のみの肺胞上皮モノレイヤー(Monolayer)と、肺胞上皮モ ノレイヤーにマクロファージを共培養した共培養系(Coculture)に、粒径 10 nm, 30 nm, 100 nm の赤色蛍光色素で標識した酸化ケイ素粒子 Sicastar-RedF (micromods 社製)を細胞上部から暴露し、24 時間後の内腔側、細胞層、血液相 の各粒子濃度を定量した。定量は、溶液中の赤色蛍光の光度を測定することにより 行った。その結果を図③(c)-19 に示す。肺胞上皮モノレイヤーのみの単培養 (Monoculture)では、血液相(Basolateral 相)への粒子透過量は18.2 - 3.41 %であ るが、共培養系では2.68 - 0.78 %に抑制されている。これは、初代マクロファー ジの積極的貪食による細胞層通過粒子量の抑制への寄与を示しているが、この抑制 率は10 nm よりも 30 nm の粒子の方が大きい。これは、数 nm の非常に微小な粒子 はマクロファージに貪食されないという報告と一致した傾向である。

また、粒子移行量の粒径依存性を表すグラフを図③(c)-20 に示す。これより、 粒径が大きくなるほど細胞層への移行量が増大し、逆に粒径が大きくなるほど肺胞 上皮層の透過量、すなわち血液相への移行量は減少することがわかる。ナノオーダ 一の領域において粒径と血中移行性に負の相関が見られることは金ナノ粒子を用 いたラット動物実験でも報告されているが、それらとも定性的な一致が見られた。 ただし、粒子種は蛍光シリカ粒子と金ナノ粒子では粒子種および表面修飾等の特性 も異なるため、直接比較しての議論は現段階では尚早であり、今後同粒子のラット への暴露実験の結果との比較検討を行っていきたい。

上記と同様の実験において、24 時間後のみではなく、粒子移行量を粒子暴露後 1, 2, 3, 6, 12, 24 h と速度論的に定量した。図③(c)-16 に示すような肺胞内腔・ マクロファージ・上皮細胞・血液の4 コンパートメントから成るモデルを構成し、



図③(c)-19. ラット初代培養の肺 胞上皮単層及びマクロファージ共培 養への蛍光標識Si0₂粒子暴露24時間 後の各コンパートメントにおける粒 子の移行量

図③(c)-20. ラット初代培 養の肺胞上皮単層及びマクロ ファージ共培養への蛍光標識 Si0₂粒子暴露24時間後の各コ ンパートメントにおける粒子 移行量の粒径依存性

同様に各コンパートメントが動的平衡にあると仮定した式を用いた。物質移行量

の経時変化を本モデル式にフィッティングを行うことで各コンパートメントに おける粒子変化量をモデルにより描写する。結果を図③(c)-21 に示す。また、 算出されたパラメーターを表③(c).1に示す。この結果と実際の移行量はいずれ の粒子においても良好にフィッティングされており、少なくとも暴露から短期間 の粒子移行を本手法で簡便に記述できることが示された。



2.7 ヒトおよびラットの系間のパラメーター比較

図③(c)-21. ラット初代培養モデルへの粒径 10 nmの蛍光シリカ粒子透過実験。各線は粒子暴露後 24 時間の各コンパートメントにおける粒子濃度の経時 変化を数理モデルで表したもの。縦軸の値は暴露総量に対する比率。

ヒト株細胞系およびラット初代培養系に対する数理モデルフィッティング で得られたパラメーターについて、特に両系でのマクロファージの貪食能の違 いに着目して実験と解析を行った。

ラット初代培養マクロファージは細胞径が 10~20 μm で丸みを帯びているの に対し, THP-1 分化させたマクロファージ様細胞はいびつな形状をしておりー 部紡錘状の細胞も観察され,生体内のマクロファージとは少し異なる形態を取 っていた.それぞれのマクロファージに毒性の低い 1 μm の TiO₂粒子を暴露し, その挙動を顕微鏡及びタイムラプスにより観察したところ, THP-1 由来のもの に比べ, ラット初代培養マクロファージの方が,明らかに貪食活性が高いこと が確認された.特に、ラット初代マクロファージはより仮足を広げ,遊走をし ながら広範囲の粒子を積極的に貪食する様子が確認された (図③(c)-22).


図③(c)-22. マクロファージによる酸化チタン粒子の貪食(bar = 100 µm)。

このようなマクロファージの貪食能の違いを、数理モデル(図③(c)-16)の パラメータで比較したものが表③(c)-1 である。内腔液からマクロファージへ の移行性指標となる C(M) /C(AP) = k3/k4 については、ヒト株細胞系の 4.0E+01 に対して初代培養系では1.1E+04 と3桁弱高い値を示したことから、初代培養 肺胞マクロファージの極めて高い貪食能が定量的に裏付けられた。このことは、 初代培養系—in vivo の状況をより良く再現している—では投与されたナノ粒 子は、ヒト株細胞系で予測されるよりもはるかにマクロファージに貪食される 可能性が高くなることを示している。ちなみに、肺胞内腔液と上皮との移行性 指標である C(CL) / C(AP) = k1/k2 では、初代培養マクロファージの高い貪食能 もあって、ヒト株系の 1.9E-02 に対して 4.1E-04 と2桁程度低い値を示した。 24 時間後での最終的な血液側への移行量は、ヒト株細胞系で 0.60%に対し、初 代培養系で 1.60%と、タイトジャンクションが発達してはいるが薄い後者が高 かった。これに対して、上皮細胞層から血液側への移行性を示す C(BL)/C(CL) = k5/k6 については、ヒト株細胞系の方が高い値を示した。これは速度定数が濃 度基準でヒト株細胞系が厚く体積が大きいためであろう。このことは、より確 からしい予測のためには、前年度までで提案したように、ヒト株細胞系での上 皮細胞層の厚みの補正が少なくとも必須であることを示している。

表③(c)-1. ヒト株細胞系(A549+THP-1)とラット初代共培養系における 数理モデル速度定数

	A549+THP-1	Epi+Macrophage
k1 (cm/hr)	9.3E-02	4.0E-02
k2 (cm/hr)	1.8E-03	1.7E-05
k3 (cm/hr)	8.6E-01	2.9E-01
k4 (cm/hr)	2.1E-02	2.7E-05
k5 (cm/hr)	1.7E-04	6.8E-06
k6 (cm/hr)	2.3E+00	9.0E-01
C(CL)/C(AP) = k1/k2	1.9E-02	4.1E-04
C(M)/C(AP) = k3/k4	4.0E+01	1.1E+04
C(BL)/C(CL) = k5/k6	7.1E-05	7.6E-06
BL (% initial dose)	0.60%	1.52%

2.8 構築した数理モデルを利用した in vivo 経肺吸収予測

数理モデルのパラメーターが得られると、各コンパートメントの濃度やその 他パラメーターを置き換えることによる補正が簡便になる。評価系の確立にお いては、in vivoの肺胞表面のより忠実な再現を目指すが、物理的な装置の限 界や使用する細胞の特性から、やむを得ず再現が不可能な部分が生じる。そこ で、数理モデルのパラメーターを補正することで、得られた数理モデルをより in vivo環境に近づけることにより、in vivoへの外挿を行う。

まず、内腔側の粒子総量と血液側へ移行した粒子の総量を算出した結果を図 ③(c)-23(a)に示す。本評価系においては A549 細胞のモノレイヤーの厚みは約 10 μm であるが in vivo の肺胞上皮細胞の厚さは 0.5 μm である。そこでまずそ の厚さを補正した(図③(c)-23(b))。また、実際の肺胞近傍においては、毛 細血管中の血液は常に循環していて血中の粒子の濃度はつねに0になっていっ ている。そこで、血液相中の濃度が常に0になるよう補正を行った(図③(c)-23(c))。血液相への総透過量は、これらの補正していない場合では 4.5 x 10⁻⁵ mg であるが、細胞の厚みを補正することで 3.9 x 10⁻⁴ mg に増加する。さらに 血液循環を考慮すると暴露後 30 時間後には粒子のほぼ総量が血液側に移行す ることになる。しかし本実験はマクロファージ無しの条件で行っており、マク ロファージとの共培養で同様の実験を行った場合、粒子がマクロファージに貪 食されることにより、移行量は大幅に減少する可能性が高い。以上のように、 血液循環および細胞層厚みの 2 つの条件を補正することにより、より in vivo 環境に近づけることが可能であった。



一方、ラット初代培養モデルでの結果に関しても、同様の補正を行った。ラットの初代培養を用いた系では、A549 細胞を用いた系とは異なり、実際の肺胞上 皮に近い、なるべく薄い肺胞上皮単層を得ることができたため、厚みに関する補正 はせず、上記の血液相の循環に関わる補正のみ行った。その結果を図③(c)-24 に 示す。数理モデル内で、血液循環により血液コンパートメントの粒子濃度が常 に Gu=0 であるとしてシミュレーションを行うと、実際に透過するより多い粒子が 血液相へ移行するということが示された。この結果は動物実験の結果との乖離が広 がるものであり、マクロファージの貪食後の排泄メカニズムなど、より詳細の生理 学的生体内現象を数理モデルに反映させる必要性を示唆するものであった。



図③(c)-24. 数理モデルにお ける血液相循環に関わる補正前 と補正後の粒子透過量

2.9 培養肺胞モデルの更なる生理学性向上への試み

2.9.1 血管内皮細胞との共培養

以上で開発した培養系では、肺胞上皮とマクロファージのみに着目しており、 血管内皮細胞は含んではいなかった。そこで更なる生理学的状況を模倣した実 験系を作製すべく、まずはヒト株の系についてカルチャーインサートの半透膜 の下側(血液側)にヒト臍帯静脈由来の血管内皮細胞(HUVEC)との共培養を行 い(図③(c).2)、肺胞モデルの生理学性向上への可能性を調べた。



図③(c)-25. 肺胞上皮・血 管内皮・マクロファージから なる培養肺胞モデル

3 µm pore size polyester semi-permeable membrane

各種共培養および後半で示すラット初代培養肺胞上皮細胞の培養は、図③ (c)-26 に示すスケジュールと播種条件で行った。カルチャーインサートは、共 培養された細胞同士の接触を高めるため、ポリカーボネート製の細孔径 3 µm の ものを用いた。この膜の両側をコラーゲンコートして培養に用いた。血管内皮 細胞 HUVEC との共培養では、カルチャーインサートを裏返して付着の早い HUVEC をまず播種・付着させ、インサートを順方向にしてマイクロプレートに着装、 肺胞上皮細胞を播種した。またマクロファージの肺胞上皮上への添加は、予め THP-1 を PMA でマクロファージ様細胞へと誘導し、肺胞上皮・血管内皮の培養4 日目に行った。図③(c)-27 に培養4日目の位相差顕微鏡像を示す。この播種条 件で肺胞上皮 A549 および膜裏面の HEVEC 共に良好な単層を形成した。またマク ロファージは A549 の単層の上に、強固に付着した。A549 と HEVEC を播種した群 では、両細胞は播種された膜のそれぞれの面に安定的に存在することが確認で きた(図③(c)-28)。



図③(c)-26. 各種共培養およびラット初代培養のスケジュール

(A) A549 cells	(B) primary epithelial	(C) Huvec	(D) A549&Huvec	(E) A549&THP-1
Eat Kinne	cells ··			The states
100μm	100µm	. 100μm	100 µm	100 µm

図③(c)-27. 各種培養の4日目の位相差顕微鏡像



図③(c)-28. 蛍光色素でラベルした A549+HUVEC の共焦点レーザー顕微鏡像

同じ播種培養条件で 14 日間の経上皮電気抵抗値(TEER)の変化を見た(図③ (c)-29)。A549 や HUVEC の単層および A549+HUVEC や A549+THP-1 の 2 種細胞の共 培養では、TEER の変化はほぼ同様であったが、A549+HUVEC+THP-1 の共培養で、 高い TEER が安定的に維持された。この生物学的メカニズムは現在検討中である が、生体において肺胞上皮は、極めて薄い構造を持ちながらも極めて高い経上 皮電気抵抗値を示すことが報告されており、現にラット初代培養ではそのよう な結果が得られている(図③(c)-30 および図③(c)-31)。これは肺胞上皮細胞間 において血液側からのタンパクや水分の肺胞内腔への漏出を防ぐために、タイ トジャンクションが高度に発達しているためである、従って、ヒト培養細胞株 でも三種の共培養のみで見られた TEER の向上と安定化は、非常に不十分ではあ るものの、生理学性のより高い状態が再現されたと考えている。



図③(c)-29. 各種共培養における TEER 値の変化



図③(c)-30. 初代培養ラット肺胞上皮細胞とヒト細胞株系との TEER 変化



図③(c)-31. 初代培養ラット肺胞上皮細胞と A549 層の縦切片の HE 染色像。

2.9.2 【型及び】】型の共存を目指した微小空間制御

In vivo 肺胞では、ガス交換に与る I 型上皮細胞は内腔面積の 95%を覆い、II 型細胞は隣り合った肺胞壁との連結部位に存在することが示されている。つま り、II 型細胞は幾何学的に角となった部分に安定して存在している。もし、こ の特性を利用して、扁平状の I 型細胞層と部分的な II 型細胞をバランスよく培 養系で共存させることができれば、II 型細胞が産生する各種肺サーファクタン トで覆われた生理学的な肺胞内腔を in vitro で再構築することができるかもし れない。そこで、それに向けた初期検討として、肺胞とほぼ同じ大きさ(326 µm) を持ったシリコンゴムの一種である PDMS (ポリジメティルシロキサン) マイク ロウェル構造を持つシートを作成、まずは通常のマイクロプレート底面に着装 し(図③(c)-32)、ラット初代培養肺胞上皮細胞を低密度播種して培養した。



図③(c)-32. 肺胞と同じ大きさのマイクロウェル構造による I 型・II 型肺胞上 皮細胞の培養。左、第一段階としての膜構造を使わない底面でのマイクウェル 培養;右、マイクロウェルシートをプレート底面に着装した様子。 マイクロウェルで培養した細胞の形態を確認すると共に、I型・II型を同定 するために免疫染色を行った。平成26年度で確立した播種条件を用いることで、 まずマイクロウェル底面では、I型様の薄く扁平な細胞層が得られた(図③ (c)-32)。この状態の培養について、I型は水の肺胞からのくみ出しに関わる aquaporin-5で(緑)、II型はサーファクタントプロテイン前駆体のpro-SPCで (紫)、DAPIによる核染色と共に、免疫染色を行った(図③(c)-33)。おおよそ の傾向として、中央底面部の扁平な細胞は薄く緑に染まっており、マイクロウ ェル近縁部と側面とで形成される角の部分に紫で染まる細胞が、角に沿って培

養されていることが分かる。すなわち、マイクロウェル構造で I型・II 型のバ ランスの取れた高度な培養肺胞モデルを構築できる可能性が示されたといえる。

しかしながら、中央部の細胞も紫で薄く染まっているものも依然としてあり、 播種条件や培養日数等の条件の最適化がまずは必要である。また、膜上に同様 のマイクロウェル構造を作り、背面で血管内皮細胞との共培養も行う必要があ るかもしれない。平行して、サーファクタントの産生等機能面での評価を進め る必要もある。また、これらの条件設定で分化が不十分な場合には、マイクロ ウェル構造を持つ膜全体をエラスティックな材質で作成し、適度な伸縮運動を 与える必要があるかもしれない。このようにまだまだ培養系の格段の改善が必 要ではあるものの、1型・11型のバランスの取れた同時培養の可能性を示すこ とができた意義は極めて大きい。



図③(c)-32. 位相差顕微鏡像



図③(c)-33. I型およびII型の免疫染色結果。左、II型マーカーのプロサー ファクタントプロテインC (pro-SPC)とDAPI核染色;右、I型マーカーの aquaporin-5 染色とDAPI核染色。

3. まとめ

ナノ粒子の影響予測の上で重要な肺胞上皮組織について、培養細胞を用いた in vitro 評価系の開発と培養系での粒子の傷害性・取り込みを記述する数理モ デルをそれぞれ構築、両者を統合利用することで、ナノ粒子の体内移行性を予 測するという新たな手法の提案を行うと共に、培養肺胞系を基礎としたナノ材 料評価の標準的手順書の試案を取りまとめて公開することを目的として研究開 発を行った。

ヒト細胞株を用いる評価系については、肺胞上皮由来株細胞 A549 とマクロフ アージ様の分化を施した THP-1 からなる共培養系を構築した。まず、A549 につ いては、増殖が可能な低密度播種時には粒子の積極的な取り込みを介した毒性 が高く現れる一方で、増殖飽和状態では取り込みがほとんど起こらず、毒性も 低いことを見出し、目的に応じた条件選定が必要であることを示した。また、 膜上に A549 の高密度単層を形成し THP-1 を付着させた共培養系では、マクロフ アージの貪食のために、毒性はさらに低くなった。更なる生理学性の向上を意 図、共培養系への血管内皮細胞の追加を行い、ナノ粒子の透過にはあまり影響 を与えないこと、細胞層の安定化には顕著な効果があることを見出した。

初代培養ラット肺胞上皮細胞および肺胞マクロファージを用いる共培養系については、まず、動物の週齢によらず24時間後の付着細胞密度を適切な領域内に留めることで、採取されるII型上皮から扁平なI型上皮細胞からなる単層の

形成に成功した。ナノ粒子暴露時の毒性は、取り込み能が非常に旺盛なマクロ ファージに専ら観測された。また、肺胞と同程度のサイズのマイクロ空間内で 初代培養細胞を培養すると、I型とII型が安定して共存する状態を in vitro で 実現可能であることも示唆した。

構築したヒトおよびラットの共培養系にナノ粒子を暴露、その膜下側(血液 側)への透過を経時的に計測し、肺胞内空側・上皮層・マクロファージ・血液 の4つのコンパートメント間に動的平衡を仮定する数理モデルにて、その透過 挙動を概ね記述することに成功した。さらに、構築した数理モデル上で、ヒト 個体への暴露を模倣するべくパラメーターの補正を行うことで、経肺吸収率を 予測する手法を提案した。

以上のように開発した2つの培養系と数理モデル構築・統合利用等について は、「ナノ粒子の肺障害性および透過性評価のための in vitro 培養肺胞モデル 構築と評価の手順」としての取り纏め、公開した。

4. 参考文献

Alfaro-Moreno, E., Nawrot, T. S., Vanaudenaerde, B. M., Hoylaerts, M. F., Vanoirbeek, J. A., Nemery, B., and Hoet, P. H. M. (2008) Co-cultures of multiple cell types mimic pulmonary cell communication in response to urban PM10. The European respiratory journal: official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology, **32**(5), 1184–1194.

Cheek, J. M., Evans, M. J., and Crandall, E. D. (1989) Type I cell-like morphology in tight alveolar epithelial monolayers. Experimental cell research, **184**(2), 375–387.

Goerke, J. (1998) Pulmonary surfactant: functions and molecular composition. Biochimica Et Biophysica Acta, **1408**(2-3), 79–89.

Perez-Gil, J. and Weaver, T. E. (2010) Pulmonary surfactant pathophysiology: current models and open questions. Physiology (Bethesda, Md.), **25**(3), 132–141.

Steimer, A., Haltner, E., and Lehr, C.-M. (2005) Cell culture models of the respiratory tract relevant to pulmonary drug delivery. Journal of aerosol medicine: the official journal of the International Society for Aerosols in Medicine, **18**(2), 137–182.

Williams, M. C. (2003) Alveolar type I cells: molecular phenotype and development. Annual review of physiology, **65**, 669–695.

Wottrich, R., Diabaté, S., and Krug, H. F. (2004) Biological effects of ultrafine model particles in human macrophages and epithelial cells in mono- and co-culture. International journal of hygiene and environmental health, **207**(4), 353–361.

Geys, J., Coenegrachts, L., Vercammen, J. et al. (2006) In vitro study of the pulmonary translocation of nanoparticles: A preliminary study. Toxicol. Lett. **160**(3), 218–226.

Wallace, W. A. H., Gillooly, M, Lamb, D. (1992) Intra-alveolar macrophage numbers in current smokers and non-smokers: a morphometric study of tissue sections, Thorax **47**, 437-440.

Kreyling, W. G., Hirn, S., Möller W (2014) Air-Blood-Barrier Translocation of Tracheally Instilled Gold Nanoparticles Inversely Depends on Particle Size, ACS nano **8** (1): 222-233.

<u>2-1-3 論文、外部発表等</u>

表 2 一 1 論文、学会発表等、特許出願(2016 年 8 月 31 日時点)

石 次問条百日	論文		尚合改主体	ᄲᆂᆕᄯᄔᄧ
	査読付き	その他	子云光衣守	村計山限
研究開発項目① 「同等性判断基準」の構築	3 うち2件は投稿準備中	1	12	0
研究開発項目② 「気管内投与試験方法」の構築	22 うち4件は投稿中、 5件は投稿準備中	3	57	1
研究開発項目③ 有害性試験・評価のための基盤 技術の開発	16 うち2件は投稿準備中	5	52	1
≣†	41 うち4件は投稿中、 9件は投稿準備中	9	121	2

表2-2 論文、投稿、発表、特許リスト(2016年8月31日時点)

	題目・メディア等	時期
論文		
	Iida K, Ehara K, Sakurai H, Nakanishi H, Yamamoto K, Gamo	投稿準
	M. A Method for Making Nanomaterial Liquid Suspension	備中
	using Aerosol Technique.	
	Kano H, Senoh H, Suzuki H Kondo H, Saito M, Takanobu K, Umeda Y, Fukushima S. Comparison of single or multiple intratracheal administration on pulmonary toxic	投稿準 備中
	Kobayashi T, Oshima Y, Tsubokura Y, Hashizume N, Kayashima T, Nakai M, Ajimi S and Imatanaka N (2016). Pulmonary toxicity by intratracheal administration of Silicon Dioxide.	投稿準 備中
	Kubo M., Shimada M., Morimoto Y., Izumi H., Yoshiura Y., Yamamoto K., Kawaguchi K. Effect of properties of	投稿準 備中

nanoparticle suspension on the mass concentration and particle size of aerosol particles for inhalation test generated by spray-drying method.	
 Kubo M., Shimada M. Investigation of spray-drying of monodispersed SiO $_{\rm 2}$ nanoparticles.	投稿準 備中
Oshima Y, Kobayashi T, Tsubokura Y, Hashizume N, Kayashima T, Nakai M, Ajimi S and Imatanaka N (2016). Comparative pulmonary toxicity study of different size of nano-NiO following intratracheal administration in rats.	投稿準 備中
Suzuki M, Kano H, Senoh H, Ohnishi M, Fukushima S. Comparison of single or multiple intratracheal administration of MWCNT on pulmonary distribution and time-dependent changes in rats.	投稿準 備中
Gamo M, Fukui H, Shinohara N, Comparative Study of Tissue Distribution of Intravenously Administered Metal Oxide Nanoparticles: Titanium Dioxides, Nickel Oxide and Silicon Dioxides.	投稿準 備中
Shinohara N, Zhang G, Oshma Y, Kobayashi T, Imatanaka N, Nakai M, Sasaki T, Kawaguchi K, Gamo M, Kinetics and Dissolution of Intratracheally Administered Nickel Oxide Nanomaterials in Rats.	投稿準 備中
Kobayashi T, Oshima Y, Tsubokura Y, Hashizume N, Ajimi S, Kayashima T, Nakai M, Sasaki T, Kawaguchi K, Imatanaka N (2016). Effects of dose volume and delivery device on bronchoalveolar lavage parameters of intratracheally administered nano-sized TiO ₂ in rats. Regulatory Toxicology and Pharmacology.	投稿中
Onishi M, Suzuki M, Yamamoto M, Kasai T, Senoh H, Kano H, Higashikubo I, Araki A, Fukushima S (2016). Improved method using marker sample for measurement of multi-walled carbon nanotubes in the rat lung. Journal of Occupational Medicine and Toxicology.	投稿中
Oyabu T, Morimoto Y, Myojo T, Izumi H, Yoshiura Y, Tomonaga T, Lee BW, Okada T, Kawai K, Shimada M, Kubo M, Yamamoto K, Horie M, Kawaguchi K, Sasaki T. Comparison	投稿中

of biopersistence between inhalation and intratracheal instillation of NiO and TiO_2 nanoparticles.	
Senoh H, Kano H, Suzuki M, Ohnishi M, Kondo H, Takanobu K, Umeda Y, Aiso S, Fukushima S (2016). Comparison of single or multiple intratracheal administration for pulmonary toxic responses of nickel oxide nanoparticles in rats. Journal of Occupational Health.	投稿中
Zhang G, Shinohara N, Oshima Y, Kobayashi T, Imatanaka N, Kawaguchi K, Gamo M (in print). Comparison of the local pulmonary distribution of nanoparticles administered intratracheally to rats via gavage needle or microsprayer delivery devices. Journal of Applied Toxicology.	印刷中
Tsubokura Y, Kobayashi T, Oshima Y, Hashizume N, Nakai M, Ajimi S and Imatanaka N (2016). Effects of pentobarbital, isoflurane, or medetomidine-midazolam-butorphanol anesthesia on bronchoalveolar lavage fluid and blood chemistry in rats. The Journal of Toxicological Sciences. 41.	H28. 10
Morimoto Y, Izumi H, Yoshiura Y, Tomonaga T, Oyabu T, Myojo T, Kawai K, Yatera K, Shimada M, Kubo M, Yamamoto K, Kitajima S, Kuroda E, Kawaguchi K, Sasaki T. Evaluation of pulmonary toxicity of well-dispersed zinc oxide nanoparticles following intratracheal instillation and inhalation. Int J Mol Sci 2016 Aug 1:17(8).	H28. 8
Ema M, Gamo M, Honda K. (2016) Developmental toxicity of engineered nanomaterials in rodents. Toxicol Appl Pharmacol 299, 47-52.	H28. 5
Hashizume N, Oshima Y, Nakai M, Kobayashi T, Sasaki T, Kawaguchi K, Honda K, Gamo M, Yamamoto K, Tsubokura Y, Ajimi S, Inoue Y, Imatanaka N (2016). Categorization of nano-structured titanium dioxide according to physicochemical characteristics and pulmonary toxicity. Toxicology Reports. 3, 490-500.	H28. 5
Ema M, Gamo M, Honda K. (2016) A review of toxicity	H28. 2

studies of single-walled carbon nanotubes in laboratory animals. Regul Toxicol Pharmacol. 74, 42-63.	
Ema M, Hougaard KS, Kishimoto A, Honda K. (2016) Reproductive and developmental toxicity of carbon-based nanomaterials: A literature review. Nanotoxicology 10, 391-412.	H28. 2
Zhang G, Shinohara N, Kano H, Senoh H, Suzuki M, Sasaki T, Fukushima S, Gamo M (2016). Quantitative evaluation of local pulmonary distribution of TiO ₂ in rats following single or multiple intratracheal administrations of TiO ₂ nanoparticles using X-ray fluorescence microscopy. Journal of Applied Toxicology, DOI:10.1002/jat.3287.	H28. 2
妹尾 英樹,加納 浩和,鈴木 正明,近藤 ひとみ,高信 健司,梅田 ゆみ,相磯 成敏,福島 昭治 (2016).気管支 肺胞洗浄液検査における三種混合麻酔の問題点.産業衛生 学雑誌 58(1),21-24.	H28. 1
Horie M, Yoshiura Y, Izumi H, Oyabu T, Tomonaga T, Okada T, Lee BW, Myojo T, Kubo M, Shimada M, Morimoto Y. Comparison of the Pulmonary Oxidative Stress Caused by Intratracheal Instillation and Inhalation of NiO Nanoparticles when Equivalent Amounts of NiO Are Retained in the Lung. Antioxidants (Basel). 2016 Jan 18;5(1).	H28. 1
Morimoto Y, Izumi H, Yoshiura Y, Fujishima K, Yatera K, Yamamoto K. Usefulness of Intratracheal Instillation Studies for Estimating Nanoparticle-Induced Pulmonary Toxicity. Int J Mol Sci. 2016 Jan 27;17(2).	H28. 1
Morimoto Y, Izumi H, Yoshiura Y, Tomonaga T, Lee BW, Okada T, Oyabu T, Myojo T, Kawai K, Yatera K, Shimada M, Kubo M, Yamamoto K, Kitajima S, Kuroda E, Horie M, Kawaguchi K, Sasaki T. Comparison of pulmonary inflammatory responses following intratracheal instillation and inhalation of nanoparticles. Nanotoxicology. 2016 10(5) 607-618.	H28. 1
Oyabu T, Morimoto Y, Izumi H, Yoshiura Y, Tomonaga T, Lee BW, Okada T, Myojo T, Shimada M, Kubo M, Yamamoto	H28. 1

K, Kawaguchi K, Sasaki T. Comparison between whole-body inhalation and nose-only inhalation on the deposition and health effects of nanoparticles. Environ Health Prev Med 2016 Jan21(1) 42-48.	
Takuya Igarashi (2016). Approaches on nano grouping/equivalence/read-across concepts based on physical- chemical properties (GERA-PC) for regulatory regimes - Results from the Survey. OECD. Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 64, ENV/JM/MONO(2016)3.	H28. 1
Tsuruoka S, Matsumoto H, Castranovai V Porter, D.W, Yanagisawa T, Saito N, Kobayashi S, Endo M. Differential of chemical reaction activity of various carbon nanotubes using redox potential : Classification by physical and chemical structures. Carbon 95, 302-308 (2015).	H27. 12
五十嵐 卓也 (2015). 特集 ナノマテリアルとナノテクノ ロジー: ナノマテリアルの安全性に関する規制の国際動 向. 自動車技術. 69(11), 11-15.	H27. 11
江馬 眞(2015). ナノマテリアルの健康影響評価, 自動車 技術, 69(11), 16-21.	H27.11
Kobayashi S, Tsuruoka S, Usui Y, Haniu H, Aoki K, Shimizu M, Takanashi S, Okamoto M, Kato H, Saito N. An advanced In-situ imaging method using heavy metal doped hollow tubes to evaluate the biokinetics of carbon nanotubes in vivo. NPG Asia Materials 7, e203(2015).	H27.7
Morimoto Y, Izumi H, Yoshiura Y, Tomonaga T, Oyabu T, Myojo T, Kawai K, Yatera K, Shimada M, Kubo M, Yamamoto K, Kitajima S, Kuroda E, Kawaguchi K, Sasaki T. Pulmonary toxicity of well-dispersed cerium oxide nanoparticles following intratracheal instillation and inhalation. J Nanopart Res 2015;17(11):442.	H27.6
Yoshiura Y, Izumi H, Oyabu T, Hashiba M, Kambara T, Mizuguchi Y, Lee BW, Okada T, Tomonaga T, Myojo T, Yamamoto K, Kitajima S, Horie M, Kuroda E, Morimoto Y. Pulmonary toxicity of well-dispersed titanium dioxide nanoparticles following intratracheal instillation. J	H27.6

Nanopart Res. 2015;17(6):241.	
Zhang G, Shinohara N, Kano H, Senoh H, Suzuki M, Sasaki T, Fukushima S, Gamo M (2015). Quantitative evaluation of the pulmonary microdistribution of TiO ₂ nanoparticles using XRF microscopy after intratracheal administration with a microsprayer in rats. Journal of Applied Toxicology, 35:623-630.	H27.6
Shinohara N, Oshima Y, Kobayashi T, Imatanaka N, Nakai M, Ichinose T, Sasaki T, Kawaguchi K, Zhang G, Gamo M (2015). Pulmonary clearance kinetics and extrapulmonary translocation of seven titanium dioxide nano and submicron materials following intratracheal administration in rats. Nanotoxicology, 9:1050-1058.	H27.5
Tsuruoka S, Matsumoto H, Koyama K, Akibac E, Yanagisawa T, Cassee F.R, Saito N, Usui Y, Kobayashi S, Porterh, D.W., Castranovai V, Endo M. Radical scavenging reaction kinetics with multiwalled carbon nanotubes. Carbon 83, 232-239 (2015).	H27.3
Horie M., Komaba K., Kato H., Endo S., Fujita K., Nishio K., Nakamura A., Yamamoto K., Kinugasa S., Hagiwara Y., Yoshida Y., Iwahashi H., Cellular effects of industrial metal nanoparticles and hydrophilic carbon black dispersion, JOURNAL OF TOXICOLOGICAL SCIENCES, 39, 6(2014)897-907.	H26. 11
Shinohara N, Oshima Y, Kobayashi T, Imatanaka N, Nakai M, Ichinose T, Sasaki T, Zhang G, Fukui H, Gamo M (2014). Dose-dependent clearance kinetics of intratracheally administered titanium dioxide nanoparticles in rat lung. Toxicology, 325:1-11.	H26. 11
島田 学,久保 優 (2014). 「第4章 薬剤の経肺デリバリ ーのメカニズムとデバイス開発第2節 経肺デバイス/吸入 療法の性能評価及び安全性 [4]吸入試験のための粒子分 散法」.注射剤・経口製剤に代わる新しい薬剤投与デバイ スの開発.技術情報協会.	H26. 7
Morimoto Y, Izumi H, Kuroda E (2014). Significance of persistent inflammation in respiratory disorder induced	H26. 7

by nanoparticles. J Immunol Res. 2014, ID 962871.	
Kubo M, Nakaoka A, Morimoto K, Shimada M, Horie M, Morimoto Y, Sasaki T (2014), Aerosol Generation by a Spray-Drying Technique Under Coulomb Explosion and Rapid Evaporation for the Preparation of Aerosol Particles for Inhalation Tests. Aerosol Science and Technology. 48(7), 698-705.	H26. 4
 右次 こころ, 酒井 康行 (2013). 培養师胞モテル評価系 の開発と数理モデル化. In vitro 毒性・動態評価の最前線 (シーエムシー出版) 第5編, 第2章, pp. 153-158.	П25. 9
森本 泰夫, 堀江 祐範 (2013). 「5.4.12 粉じんによる障害」 小木和孝編. 産業安全保健ハンドブック. 労働科学研究所 出版. 860-863.	H25. 5
森本 泰夫, 堀江 祐範 (2013).「アスベストおよびアスベス ト曝露の現状」胸膜全書. 中野孝司編. 医薬ジャーナル社出 版.	H25. 5
Iwasawa K, Tanaka G, Aoyama T, Chowdhury MM, Shinohara M, Komori K, Tanaka-Kagawa T, Jinno H, Sakai Y (2013). Prediction of phthalate permeation through pulmonary alveoli using a cultured A549 cell-based in vitro alveolus model and a numerical simulation. AATEX, AATEX, 18, 19-31.	H25.5
森本 泰夫, 堀江 祐範, 北島 信一, 福島 昭治, 武林 亨 (2013). 工業用ナノ材料の有害性評価に向けた気管内投与 試験と吸入暴露試験の所見の比較. 日本衛生学雑誌. 68(3), 161-167.	H25. 3
五十嵐 卓也 (2013). 8 安全性に関する規制の動向. 最新 ナノテクノロジーの国際標準化 — 市場展開から規制動向 まで. 日本規格協会. 159-184.	H25. 1
Shinohara N, Danno N, Ichinose T, Sasaki T, Fukui H, Honda K, Gamo M (2014). Tissue distribution and clearance of intravenously administered titanium dioxide (TiO ₂) nanoparticles, Nanotoxicology, 8:132-141, DOI: 10.3109/17435390.2012.763001.	H25. 1
堀江 祐範, 森本 泰夫(2012). 工業ナノ粒子の有害性評価 -In Vitroと In Vivoの接点 産業医科大学雑誌 34(1),	H24. 3

	57–64.	
	酒井 康行,小森 喜久夫 (2011). ヒトハザード評価におけ る新しい流れと課題、自動車研究 33(5) 9-14	H23. 5
発表		
	飯田 健次郎, 榎原 研正, 桜井 博, 山本 和弘, 蒲生 昌 志. エアロゾル技術を使った疎水性粉体懸濁水の作製、第 33回 エアロゾル科学・技術研究討論会. (大阪, 2016年8 月31日-8月2日).	H28. 8
	加納 浩和, 鈴木 正明, 妹尾 英樹, 近藤 ひとみ, 戸谷 忠雄, 齋藤 美佐江, 大西 誠, 福島 昭治. 多層カーボン ナノチューブの気管内投与による生体影響:単回投与と複 数回投与の比較. 第43回日本毒性学会学術年会.(名古屋, 2016年6月29日-7月1日).	H28. 7
	鈴木 正明,加納 浩和,妹尾 英樹,大西 誠,福島 昭治. 投与回数が酸化チタンナノ粒子及び酸化ニッケルナノ粒子 の気管内投与後肺負荷量に及ぼす影響.第43回日本毒性学 会学術年会.(名古屋,2016年6月29日-7月1日).	H28. 7
	久保 優,小紫 真友子,島田 学.噴霧乾燥法で調製した単 分散ナノ粒子凝集体の性状に与える一次粒子径の影響. 0206. 化学工学会第81年会.(大阪,2016年3月14日).	H28. 3
	蒲生 昌志. ナノマテリアルのリスク管理のための評価手 法, 俯瞰ワークショップ ナノテクロジー・材料分野 領域 別分科会 「ナノテクロジーの ELSI/EHS」. (東京, 2016 年2月6日).	H28. 2
	五十嵐 卓也. ナノ材料に関する国際規制動向. nano tech 2016 第 15 回 国際ナノテクノロジー総合展・技術会議 ナ ノ材料の効率的な有害性評価技術(経済産業省ナノ安全プ ロジェクト研究成果報告会). (東京, 2016 年 1 月 27 日).	H28. 1
	大嶋 浩. 気管内投与試験による材料間比較に基づく同等性 判断基準の検討. nano tech 2016 第 15 回 国際ナノテクノ ロジー総合展・技術会議 ナノ材料の効率的な有害性評価技 術(経済産業省ナノ安全プロジェクト研究成果報告会).(東 京, 2016 年 1 月 27 日).	H28. 1
	加納 浩和. 気管内投与試験の標準的手法. nano tech 2016 第 15 回 国際ナノテクノロジー総合展・技術会議 ナノ材料 の効率的な有害性評価技術(経済産業省ナノ安全プロジェ	H28. 1

クト研究成果報告会). (東京, 2016 年 1 月 27 日).	
 川口 建二.気管内投与試験のための試料調製技術.nano tech 2016 第15回 国際ナノテクノロジー総合展・技術会 議 ナノ材料の効率的な有害性評価技術(経済産業省ナノ安 全プロジェクト研究成果報告会).(東京,2016年1月27日). 	H28. 1
篠原 直秀. ナノ材料の体内動態の評価. nano tech 2016 第 15 回 国際ナノテクノロジー総合展・技術会議 ナノ材料の 効率的な有害性評価技術(経済産業省ナノ安全プロジェク ト研究成果報告会). (東京, 2016 年 1 月 27 日).	H28. 1
 森本 泰夫.吸入暴露試験と気管内投与試験の比較.nano tech 2016 第15回 国際ナノテクノロジー総合展・技術会 議 ナノ材料の効率的な有害性評価技術(経済産業省ナノ安 全プロジェクト研究成果報告会).(東京,2016年1月27日). 	H28. 1
Xu X, Uemura A, Komori K, Sakai Y. Formation of in Vitro Co-culture Model of Pulmonary Alveolus Using human epithelial cell line A549, human monocytic cell line THP-1, and human umbilical vein cells HUVEC for Prediction Study of Nanoparticle Permeation. 第28回 日本動物代替法学会(横浜, 2015年12月10-12日).	H27. 12
李 云善, 大津山 祐子, 川崎 祐也, 森本 泰夫, 河井 一 明. ナノ粒子によるラット肺組織の酸化的 DNA 損傷 日本環 境変異原学会第 44 回大会. 日本環境変異原学会(JEMS).(福 岡, 2015 年 11 月 27 日~28 日).	H27. 11
Saito N, Carbon Nanotube Toxicity: In-Situ Imaging Method Using Peapods to Evaluate the Biokinetics of Carbon Nanotubes 、5th International Conference on Nanotek & Expo. (San Antonio, U.S.A, November 16-18, 2015).	H27. 11
蒲生 昌志. ナノ材料のイノベーションを支えるリスク評 価技術. 産総研テクノブリッジフェア in つくば. (茨城, 2015 年 10 月 22 日-23 日).	H27. 10
小林 俊夫. ナノマテリアルのリスク評価. 一般財団法人 化学物質評価研究機構(CERI)寄付講座(第4講). (福岡, 2015 年 10 月 17 日).	H27. 10

Shinohara N, Oshima H, Kobayashi T, Imatanaka N, Nakai M, Inoue Y, Sasaki T, Kawaguchi K, Guihua Z, Gamo M. Pulmonary Clearance Kinetics and Lymph Nodes Translocation Kinetics of Intratracheally Administered NiO and SiO ₂ Nanoparticles. The 7th International Symposium on Nanotechnology Occupational and Environmental Health. (Limpopo Province, South Africa, October 18-22, 2015).	H27. 10
小紫 真友子,久保 優,島田 学.噴霧乾燥法におけるナノ 粒子懸濁液と生成エアロゾル粒子の性状の関係.BO3.化学 工学会中国四国支部・関西支部合同支部大会 大学院生発表 会.(岡山,2015年12月12日).	H27.9
Fukushima S, Kano H, Senoh H, Suzuki M, Aiso S, Kasai T, Umeda Y, Ohnishi M. Lung Lesions Induced by Intratracheal Administration of Nanomaterials in Rats: Their Differences in Treatment Frequencies and Comparison with Inhalation Exposure. OECD WPMN information sharing seminar on in vivo inhalation toxicity screening methods for manufactured nanomaterials. (ワシントン DC; アメリカ, 2015 年 9 月).	H27.9
Kawai K, Li Y, Kawasaki Y, Morimoto Y . Oxidative DNA damage in rat lung after exposure to cerium oxide nanoparticles Amsterdam RAI にて、ERS INTERNATIONAL CONGRESS 2015. (アムステルダム:オランダ, 2015 年 9 月 6 日~10 日).	H27.9
Morimoto Y, Izumi H, Yoshiura Y, Tomonaga T, Oyabu T, Myojo T, Shimada M, Kubo M, Yamamoto M,Kitajima S. Pulmonary toxicity of cerium oxide nanoparticle following intratracheal instillation and inhalation of nanoparticles ERS INTERNATIONAL CONGRESS 2015. (アム ステルダム:オランダ, 2015 年 9 月 6 日~10 日).	H27.9
Morimoto Y. Pulmonary inflammatory responses following intratracheal administration and inhalation exposure of nanoparticles OECD WPMN information sharing seminar on in vivo inhalation toxicity screening methods for manufactured nanomaterials. $(\neg \diamond \nu \wedge \nu)$ DC; $\neg \checkmark \neg \lambda$,	H27.9

2015 年 9 月)	
Oshima Y, Kobayashi T, Nakai M, Ajimi S, Kayashima T, Shimogawa Y, Imatanaka N. Recent development in application of Intratracheal Administration Study (ITAS) - Standardization of protocol OECD WPMN information sharing seminar on in vivo inhalation toxicity screening methods for manufactured nanomaterials. (Washington, D.C., USA, September 21, 2015).	H27.9
Oyabu T, Morimoto Y, Shimada M, Kubo M, Lee B, Okada T, Izumi H, Yoshiura Y, Myojo T. Deposition and pulmonary effect of nanoparticle in whole body inhalation study and in nose only inhalation study ERS INTERNATIONAL CONGRESS 2015. (アムステルダム:オランダ, 2015 年 9 月 6 日~10 日).	H27.9
Yamamoto K., Yoshida T., Hayashida T., Shimada M., Izumi H., Morimoto Y., TEM study on nano-toxicology of metal oxide nanoparticles intratracheally instilled in rat lung. Microscopy Conference 2015. (Gottingen, Germany, 8 Sep 2015)	H27.9
篠原 直秀, 大嶋 浩, 小林 俊夫, 今田中 伸哉, 中井 誠, 佐々木 毅, 川口 建二, 張 貴華, 蒲生 昌志. 4種の酸化 ニッケルナノ粒子の肺クリアランス及びリンパ節への移行 の評価. 日本毒性学会. (金沢, 2015 年 7 月 1 日).	H27. 7
吉浦 由貴子, 和泉 弘人, 友永 泰介, 岡田 崇顧, 李 秉 雨, 藤嶋 けい, 大藪 貴子, 明星 敏彦, 森本 泰夫. 工業 用ナノ材料の有害性評価における LDH の有用性 平成 27 年 度日本産業衛生学会 九州地方会学会. (鹿児島, 2015 年 7 月 11 日~12 日).	H27. 7
 丸山 佳与,羽二生 久夫,小林 伸輔,鶴岡 秀志,松田 佳和,青木 薫,岡本 正則,高梨 誠司,野村 博紀,田中学,滝沢 崇,大石 歩,薄井 雄企,齋藤 直人. in vitroでの Peapod-CNT の生体応答 第42回日本毒性学会学術年会.(石川,2015年6月29日~7月1日). 	H27.6
鈴木 正明, 加納 浩和, 妹尾 英樹, 近藤 ひとみ, 戸谷 忠雄, 齋藤 美佐江, 大西 誠, 相磯 成敏, 福島 昭治. 多	H27.6

層カーボンナノチューブの気管内投与による生体影響:投	
与回数の違いによる比較. 第42回日本毒性学会学術年会.	
 (金沢,2015 年 6 月 29 日-7 月 1 日).	
森本 泰夫,和泉 弘人,吉浦 由貴子,友永 泰介,大藪	H27.6
貴子,明星 敏彦,島田 学,久保 優,山本 和弘,北島	
信一. 気管内注入試験と吸入暴露試験による酸化セリウム	
ナノ粒子の炎症能の検討 第 42 回 日本毒性学会学術年	
 会. (金沢, 2015 年 6 月 29 日, 30 日, 7 月 1 日).	
Oyabu T, Morimoto Y, Izumi H, Tomonaga T,Yoshiura Y,	H27.6
Shimada M, Kubo M, Myojo T. Comparison of	
biopersistences of NiO nanoparticles between in	
inhalation and intratracheal instillation studies	
2015 Asian Aerosol Conference. (金沢, 2015 年 6 月 24	
 日~27日).	
Saito N, Kobayashi S, Tsuruoka S, Usui Y, Haniu H. An	H27.6
advanced in-situ imaging method using heavy metal doped	
hollow tubes to evaluate the biokinetics of carbon	
nanotubes in vivo. 2015 TechConnect World Innovation	
 Conferenc. (Washington DC, U.S.A. june 14-17, 2015).	
和泉 弘人,吉浦 由貴子,友永 泰介,大藪 貴子,明星	H27.5
敏彦, 岡田 崇顧, 森本 泰夫. 酸化ニッケルの肺有害性を	
評価する遺伝子の探索 第88回 日本産業衛生学会. (大	
 阪, 2015 年 5 月 13 日~16 日).	
大藪 貴子,森本 泰夫,和泉 弘人,岡田 崇顧,友永 泰	H27.5
介, 吉浦 由貴子, 明星 敏彦. 吸入曝露試験および気管内	
注入試験におけるナノ粒子の肺内滞留性 第88回 日本産	
業衛生学会. (大阪,2015年5月13日~16日).	
妹尾 英樹, 加納 浩和, 近藤 ひとみ, 高信 健司, 梅田	H27.5
ゆみ, 相磯 成敏, 福島 昭治. BALF 検査における麻酔法の	
検討-3 種混合麻酔の問題点.第 88 回日本産業衛生学会.	
 (大阪,2015 年 5 月 13 日-15 日).	
森本 泰夫,和泉 弘人,吉浦 由貴子,友永 泰介,大藪 貴子,	H27.5
岡田 崇顧,明星 敏彦. 工業用ナノ材料の有害性評価気管	
内投与試験が吸入毒性評価のスクリーニング試験として有	
用性 第88回 日本産業衛生学会. (大阪,2015年5月13	
日~16日).	

吉浦 由貴子・和泉 弘人・友永 泰介・大藪 貴子・岡田 崇 顧・明星 敏彦・森本 泰夫.気管内注入試験による二酸化 チタンナノ粒子の有害性評価 第88回 日本産業衛生学 会.(大阪,2015年5月13日~16日).	H27.5
小紫 真友子, 森本 和希, 久保 優, 島田 学. 液滴破砕に よるナノ粒子エアロゾル発生におけるイオン濃度の影響. 第 17 回化学工学会学生発表会(徳島大会). I12. (徳島, 2015 年 3 月 7 日).	H27. 3
原納 弘大, 岩沢 こころ, 小笠原 理恵, 諏訪部 章, 酒井 康行. ナノ粒子の毒性評価のためのラット初代培養肺胞組 織モデルの開発, 化学工学会第80年会(東京, 2015年3 月 19-21日).	H27. 3
 G. Zhang, N. Shinohara, H. Kano, H. Senoh, M. Suzuki, T. Sasaki, S. Fukushima, M. Gamo. Pulmonary microdistribution of TiO₂ nanoparticles in rats following single and multiple intratracheal administrations using XRF microscopy. SOT 2015. (San Diego, USA, March 23, 2015). 	H27.3
小林 俊夫, 大嶋 浩, 坪倉 靖祐, 菊池 純一, 橋爪 直樹, 井上 義之, 中井 誠, 安心院 祥三, 古川 浩太郎, 今田中 伸哉. ナノ材料の気管内投与試験における投与器具及び投 与液量の影響. 第 31 回日本毒性病理学会学術集会. (東京, 2015 年 1 月 29 日-1 月 30 日)	H27. 1
岩沢 こころ, 原納 弘大, 小笠原 理恵, 篠原 直秀, 張 貴華, 蒲生 昌志, 諏訪部 章, 酒井 康行, ラット初代培 養細胞及びヒト培養細胞を用いた肺胞モデルの開発とナノ 粒子の毒性評価のための数理モデル利用. 日本動物実験代 替法学会第 27 回大会(横浜, 2014 年 12 月 5-7 日).	H26. 12
小林 俊夫. ナノマテリアルのリスク評価. 一般財団法人 化学物質評価研究機構(CERI)寄付講座(第4講). (福岡, 2014年11月8日).	H26. 11
蒲生 昌志. ナノ材料のイノベーションを支えるリスク評 価技術. 産総研テクノブリッジフェア. (茨城, 2014 年 10 月 23 日-24 日).	H26. 10
小林 伸輔, 鶴岡 秀志, 薄井 雄企, 羽二生 久夫, 青木 薫, 清水政幸, 高梨誠司, 岡本正則, 加藤博之, 齋藤直人. Peapod	H26. 10

ージンク 第 29 回日本整形外科字会基礎字術集会.(鹿児島	
 県, 2014 年 10 月 9 日-10 日).	
和泉 弘人, 森本 泰夫. ナノ粒子を用いた気管内注入試	H26.9
験と吸入暴露試験による肺炎症の比較 第73回日本癌学	
会学術総会.(横浜, 2014 年 9 月 25 日~27 日).	
Gamo M. Development of Equivalence Criteria by	H26.9
Intratracheal Administration Studies, OECD Expert	
Meeting on Categorization of Manufactured	
Nanomaterials. (ワシントン DC,米国,2014 年 9 月 17 日	
-19 日).	
 Igarashi T. Approaches to Develop or Use Concepts of	H26.9
Grouping, Equivalence and Read-Across Based on	
Physical-Chemical Properties (GERA-PC) of	
Nanomaterials for their Hazard Assessment in Regulatory	
Regimes. OECD Expert Meeting on Categorization of	
Manufactured Nanomaterials.(ワシントン DC. 米国. 2014	
年9月17日-19日).	
 Izumi H. Morimoto Y. Horie M. Yoshiura Y. Tomonaga T.	H26.9
Lee B Okada T Ovabu T Myojo T Shimada M Kubo M	
Yamamoto K Kitajima S Comparison of pulmonary	
inflammatory responses between intratracheal	
instillation and inhalation of nanonarticles FRS	
International Congress 2014 (Salvavi Kan 2014	
 Kawai K li Y Kawasaki Y Morimoto Y Ovidative stress	H26 Q
in rat lung after exposure to titanium dioxide and nickel	1120.0
ovide nanoparticles ERS International Congress 2014	
(< < < < < < < < < < < < < < < < < < <	
 Li Y Song M Morimoto Y Kawai K Titanium dioxide and	H26 9
nickel oxide nanoparticles induce oxidative DNA damage	120.0
in the rat lung. The 21st Asian Conference on	
$\Omega_{counstional Health}$ (垣岡 2014年0日 2日~4日)	
 Over T Maximate V Lee P Over T True: U Terrerere	<u>ПОС 0</u>
Uyabu I, Morilliolo I, Lee D, Ukada I, Izumi H, Iomonaga	п∠0.9
I, TOSNIURA M, SNIMADA M, KUDO I, MYOJO I.	
Biopersistence of nanoparticle in inhalation and	

intratracheal instillation studies for hazard assessment. ERS International Congress 2014. (ミュン ヘン;ドイツ,2014年9月6日~10日).	
Yamamoto K., Yoshida T., Hayashida T., Shimada M., Oogami A., Morimoto Y., Inhalation tests of carbon nanotubes using rats. 18th International Microscopy Congress. (Prague, Chez, 8 Sep 2014).	H26. 9
Iida, K., Sakurai, H., and Ehara, K. (2014). Aerosol-to-Liquid Phase Collection: A Method for Making Liquid Suspension Containing Dry-Dispersed Nanomaterials, International Aerosol Conference 2014, (Busan, Korea, August 28 - September 2, 2014).	H26. 8
飯田 健次郎, 桜井 博, 榎原研正. エアロゾル液相捕集 法:乾式気中分散されたナノ材料が既知の質量濃度で含ま れている懸濁液を作製する方法、第31回 エアロゾル科学・ 技術研究討論会. (茨城つくば, 2014 年 8 月 6 日-8 月 8 日).	H26. 8
小林 俊夫, 大嶋 浩, 坪倉 靖祐, 菊池 純一, 橋爪 直樹, 井上 義之, 中井 誠, 安心院 祥三, 古川 浩太郎, 今田中 伸哉. ナノ材料の気管内投与試験の試験法標準化に向けた 検討~投与器具及び投与液量の影響~. 第41回日本毒性学 会学術年会. (兵庫, 2014 年 7 月 2 日-7 月 4 日).	H26. 7
篠原 直秀, 大嶋 浩, 小林 俊夫, 今田中 伸哉, 中井 誠, ーノ瀬 尊之, 佐々木 毅, 川口 建二, 張 貴華, 福井 浩 子, 柳橋 智子, 本田 一匡, 蒲生 昌志. 7種の TiO ₂ ナノ 粒子の肺クリアランス速度の比較. 日本毒性学会.(神戸, 2014 年 7 月 3 日).	H26. 7
鈴木 正明,加納 浩和,妹尾 英樹,近藤 ひとみ,戸谷 忠雄,齋藤 美佐江,相磯 成敏,福島 昭治.酸化ニッケ ルナノ粒子の気管内投与による生体影響:投与回数の違い による比較.第41回日本毒性学会学術年回.(神戸,2014 年7月2日-4日).	H26. 7
 坪倉靖祐,大嶋浩,小林俊夫,菊池純一,橋爪直樹,井上義之,中井誠,安心院祥三,古川浩太郎,今田中伸哉.ナノ材料の気管内投与試験の試験法標準化に向けた検討~解剖時麻酔法の違いがBALF検査結果に与える影響 ~.第41回日本毒性学会学術年会.(兵庫,2014年7月2) 	H26. 7

	日-7月4日).	
;	岩沢 こころ, 青山 拓矢, 原納弘大, 酒井 康行. 培養ヒト 肺胞上皮モデルと数理モデルによるナノ粒子のヒト影響予 測. 東京大学 駒場リサーチキャンパス公開(生研公開 2014). (東京, 2014年6月6日-6月6日).	H26. 6
; ; ;	大藪 貴子, 森本 泰夫, 吉浦 由貴子, 李 秉雨, 岡田 崇 顧, 堀江 祐範, 和泉 弘人, 友永 泰介, 明星 敏彦. ナノ 粒子の有害性評価のための吸入曝露試験と気管内注入試験 の同時試行 第87回 日本産業衛生学会.(岡山,2014年5 月21日~24日).	H26. 5
;	妹尾 英樹, 加納 浩和, 鈴木 正明, 高信 健司, 梅田 ゆ み, 相磯 成敏, 福島 昭治. 酸化ニッケルナノ粒子のラッ トへの気管内投与による肺毒性: 投与回数の違いによる検 討 (病理組織学的検索). 第 87 回日本産業衛生学会. (岡 山, 2014 年 5 月 21 日-24 日).	H26. 5
;	近藤 ひとみ, 戸谷 忠雄, 加納 浩和, 鈴木 正明, 妹尾 英樹, 相磯 成敏, 福島 昭治. 酸化ニッケルナノ粒子のラ ットへの気管内投与による肺毒性: 投与回数の違いによる 検討 (BALF 検索). 第 87 回日本産業衛生学会(岡山, 2014 年 5 月 21 日-24 日).	H26. 5
;	森本 泰夫,和泉 弘人,吉浦 由貴子,友永 泰介,大藪 貴子, 明星 敏彦,岡田 崇顧,李 秉雨,北島 信一. 工業用ナノ材 料の有害性評価-吸入暴露試験の代替試験として気管内投 与試験の有用性 第87回 日本産業衛生学会.(岡山,2014 年5月21日~25日).	H26. 5
	久保 優, 森本 和希, 中岡 亮, 島田 学, 堀江 祐範, 森本 泰夫, 佐々木 毅. 噴霧乾燥法による吸入暴露試験用ナノ粒 子エアロゾルの調製. 化学工学会第 79 年会. R201 (岐阜, 2014 年 3 月 18~20 日).	H26. 3
(Iwasawa K, Aoyama T, Harano K, Shinohara N, Zhang G, Gamo G, Sakai Y. Prediction of particle permeation through pulmonary alveolus using a cultured cell-based in vitro model and a numerical simulation. Society of Toxicology 53rd Annual Meeting (Phenix, Arizona, USA, 2014年3 月 23-27 日).	H26. 3
د ا	青山 拓矢,岩沢 こころ,篠原 直秀,張 貴華,蒲生 昌	H26.3

志, 酒井 康行, 培養ヒト) たナノ粒子の体内移行性の 阜, 2014 年 3 月 18-20 日)	肺胞モデルと数理モデルとを用い)評価.化学工学会第 79 年会(岐 .	
Gamo M. Intratracheal Ad Characterization of Tox OECD Expert Meeting on To (韓国ソウル, 2014年2月	ministration Study for Initial icokinetics of Nanomaterials, oxicokinetics of Nanomaterials. 26 日-28 日).	H26. 2
Yamamoto K., TEM study or materials. Seminar on na Materials Engineering, (Kentucky, US, 25 Feb 2	n nanotoxicology of nano-carbon ano toxicology. Chemical & University of Kentucky. 014).	H26. 2
山本和弘. 電子顕微鏡によ フロンティア研究部門 第 2014 年 1 月 23 日).	<るナノ材料の安全性評価. 計測 31 回公開セミナー.(つくば	H26. 1
酒井 康行. 培養肺胞上皮 への利用. 第26回日本動 年12月19日-21日).	の開発とナノ粒子ヒト影響評価 物実験代替法学会. (京都, 2013	H25. 12
森本 和希,中岡 亮,久侍 ける液滴破砕現象に及ぼす 中国四国支部大会 宇部プ 13日).	₹ 優, 島田 学. 噴霧乾燥法にお 「イオン濃度の影響. 化学工学会 <会. B10. (山口, 2013 年 12 月	H25. 12
森本 泰夫.ナノ物質の安 入試験の役割 第 26 回 物実験代替法学会第 26 回 21 日).	全評価−吸入暴露試験と気管内注 日本動物実験代替法学会.日本動 大会.(京都, 2013 年 12 月 19 日~	H25. 12
Kawai K, Li Y, Kasai H, M nickel oxide nanoparticl in the rat lung 第8回 ー;オーストラリア,2013名	orimoto Y. Titanium dioxide and es induced oxidative DNA damage アジアエアロゾル会議. (シドニ 年 12 月 2 日~5 日).	H25. 12
Shimada M, Kubo M, Hori Spray-drying Technique Preparing Test Aerosol Experiments. 8th Asian Australia, December 2-5	e M, Morimoto Y, Sasaki T. with Droplet Breakup for Particles for Inhalation Aerosol Conference. (Sydney, , 2013).	H25. 12
青山 拓矢, 岩沢 こころ, ト肺胞モデルと数理モデル	原納 弘大, 酒井 康行. 培養ヒ レを用いたナノ粒子の移行評価,	H25. 11

シンポジウム:細胞アッセイ技術の現状と将来(東京, 2013 年11月25日).	
大嶋 浩. ナノマテリアルのリスク評価. 一般財団法人化 学物質評価研究機構(CERI)寄付講座(第4講).(福岡, 2013 年 11 月 9 日).	H25. 11
蒲生 昌志. ナノ材料のイノベーションを支えるリスク評 価技術. 産総研オープンラボ 2013. (茨城, 2013 年 10 月 30 日-11 月 1 日).	H25. 10
小林 伸輔, 鶴岡 秀志, 薄井 雄企, 羽二生 久夫, 青木 薫, 清水政幸, 高梨誠司, 岡本正則, 加藤博之, 齋藤直人. Peapod-CNT によるカーボンナノチューブの体内動態評価方 法の開発—第2報—. 第28回日本整形外科学会基礎学術集 会. (千葉, 2013年10月17日-18日).	H25. 10
<pre>Iida, K., Sakurai, H., Nakanishi, J., and Ehara, K. Making the particle number concentration standard liquid suspension using aerosol technique, American Association for Aerosol Research 32nd Annual Conference, (Portland Oregon, USA, September 30 - October 4, 2013).</pre>	H25. 10
Iwasawa K, Aoyama T, Sakai Y. In vitro cytotoxicity assay of TiO2 nanoparticles in pulmonary epithelial and macrophage-like cells. 6th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health. (愛知, 2013 年 10 月 28 日-31 日).	H25. 10
Gamo M, Danno N, Kouno M, Ichinose T, Sasaki T, Fukui H, Honda K, Shinohara N. Comparative Study of Distribution of Intravenously Administered TiO ₂ Nanomaterials in Rats. 6th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health. (愛知, 2013 年 10 月 28 日-31 日).	H25. 10
Kobayashi K, Tsuruoka S, Usui Y, Haniu H, Aoki K, Shimizu M, Takanashi S, Okamoto M, Kato H, Saito N. An innovative method to evaluate biodistribution and kinetics of carbon nanotubes using CNT peapods. 6th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health. (愛知, 2013 年 10 月 28 日-31 日).	H25. 10

Kobayashi T, Oshima Y, Kikuchi J, Tsubokura Y, Hashizum N, Nakai M, Ajimi S, Imatanaka N, Furukawa K. Effect o study conditions on the toxicity by intratracheal administration of nano TiO ₂ in rats. 6th Internationa Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health. (愛知, 2013 年 10 月 28 日-31 日)	e H25.10 f I
Kubo M, Shimada M, Horie M, Morimoto Y, Sasaki T. Preparation of nano-sized aerosol particles by a spray-drying technique with breaking up of droplets.6t International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health. (愛知, 2013年 10月28日-31日).	H25. 10 h
Shinohara N, Oshima Y, Kobayashi T, Imatanaka N, Naka M, Ichinose T, Sasaki T, Zhang G, Fukui H, Honda K, Gam M. Dose-dependent Clearance Kinetics of Intratracheall Administered TiO ₂ Nanoparticles. 6th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health. (愛知, 2013年10月28日-31日)	i H25.10 o y
Tsubokura Y, Oshima Y, Kobayashi T, Kikuchi J, Hashizum N, Nakai M, Ajimi S, Imatanaka N, Furukawa K. Pulmonar toxicity of several nano TiO ₂ by intratracheal administration in rats. 6th International Symposium o Nanotechnology, Occupational and Environmental Health (愛知, 2013 年 10 月 28 日-31 日).	e H25.10 y n
Zhang G, Shinohara N, Kano H, Senoh H, Suzuki M, Sasak T, Fukui H, Fukushima S, Honda K, Gamo M. Evaluation o pulmonary localization of TiO ₂ nanoparticles in rats 6th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health. (愛知, 2013年 10月28日-31日).	i H25. 10 f
五十嵐 卓也(2013). 第10章 粉体に関する規制とその対応実務 第1節 ナノマテリアルのリスクと安全性評価. 粉 粒体の構造制御, 表面処理とプロセス設計. 技術情報協 会. 833-845.	H25.9
Oyabu T, Morimoto Y, Horie M, Yoshiura Y, Shimada M Kubo M, Lee B, Okada T, Myojo T. Coincidentalstud	, H25.9 y

of inhalation and intratracheal instillation for hazard assessment of nanoparticles. EAC 2013 European Aerosol Conference. (チェコ,2013年9月1日~6日).	
飯田 健次郎, 桜井 博, 中西 準子, 榎原 研正, エアロゾ ル技術を使った粒子数濃度標準懸濁液の作成法, in 第 30 回 エアロゾル科学・技術研究討論会, (京都, 2013 年 8 月 27 日-8 月 29 日)	H25. 8
佐々木 毅. 液滴破砕を伴う噴霧乾燥法によるナノ粒子の エアロゾル化. 第30回エアロゾル科学・技術討論会. (京 都, 8月27日-29日).	H25. 8
妹尾 英樹,加納 浩和,鈴木 正明,大西 誠, 笠井 辰也, 高信 健司,梅田 ゆみ,相磯 成敏,福島 昭治.ナノマテ リアルの生体影響評価における気管内投与法の有用性と活 用方法.第28回発癌病理研究会.(沖縄,2013年8月26 日-28日).	H25. 8
中岡 亮, 森本 和希, 久保 優, 島田 学, 堀江 祐範, 森本 泰夫, 佐々木毅「液滴破砕を伴う噴霧乾燥法によるナノ粒子 のエアロゾル化」第 30 回エアロゾル科学・技術討論会.(京 都, 8月 27 日-29 日).	H25. 8
堀江 祐範, 吉浦 由貴子, 李 秉雨, 岡田 崇顧, 大藪 貴 子, 明星 敏彦, 森本 泰夫, 久保 優, 島田 学. ナノ粒子 の気管内注入と吸入暴露による肺内酸化ストレスの比較 第 30 回 エアロゾル科学・技術研究討論会. (京都, 2013 年 8 月 27 日~29 日).	H25. 8
大嶋 浩. 気管内投与試験を用いた物性の異なるナノニ酸 化チタンの有害性比較. 第18回化学物質評価研究機構研究 発表会. (東京, 2013 年 6 月 7 日).	H25. 6
鈴木 正明,加納 浩和,妹尾 英樹,近藤 ひとみ,戸谷 忠 雄,齋藤 美佐江,相磯 成敏,福島 昭治.二酸化チタンの 気管内投与による生体影響:動物の系統の違いによる比較. 第40回日本毒性学会学術年会.(千葉,2013年6月17日-19 日).	H25.6
堀江 祐範, 吉浦 由貴子, 李 秉雨, 岡田 崇顧, 大藪 貴子, 明星 敏彦, 島田 学, 久保 優, 山本 和弘, 森本 泰夫. ナ ノ粒子の気管内注入試験と吸入曝露試験による肺反応の比 較-同等の肺内保持量による肺傷害・炎症の検討 第40	H25. 6

回日本毒性学会学術年会. (千葉, 2013 年 6 月 17 日-19 日).	
岩沢 こころ,田中 玄弥,青山 拓矢,小森 喜久夫,香川(田 中) 聡子,神野 透人,酒井 康行. 培養ヒト肺胞上皮モデ ルと数理モデルによるフタル酸エステルのヒト影響予測. 東京大学 駒場リサーチキャンパス公開(生研公開2013). (東京, 2013年5月31日-6月1日).	H25. 5
小林 伸輔, 鶴岡 秀志, 薄井 雄企, 羽二生 久夫, 青木 薫, 清水 政幸, 高梨 誠司, 岡本 正則, 加藤 博之, 齋藤 直人. Peapod-CNT によるカーボンナノチューブの体内動態評価方 法の開発. 松本ボーンフォーラム. (長野, 2013 年 5 月 17 日-18 日).	H25. 5
森本 泰夫, 堀江 祐範, 大藪 貴子, 李 秉雨, 岡田 崇顧, 明星 敏彦. 二酸化チタンナノ粒子の肺内炎症能 第86回 日本産業衛生学会. (愛媛,2013年5月14日~17日).	H25. 5
 吉田 智子,林田 津安子,山本 和弘,堀江 祐範,森本 泰 夫.肺胞マクロファージの動態によるナノ粒子の生体影響の顕微鏡観察技術.日本顕微鏡学会第68回学術講演会. (大阪,2013年5月14日). 	H25. 5
Iwasawa K, Tomita A, Aoyama T, Sakai Y. In vitro cytotoxicity assay of TiO ₂ nanoparticles in pulmonary epithelial cells. 東京大学 駒場リサーチキャンパス公開 (生研公開 2013). (東京, 2013 年 5 月 31 日-6 月 1 日).	H25. 5
佐々木 毅, 古賀 健司, 清水 禎樹. ナノ材料リスク評価の ための試料調製技術の開発. 第5回産総研ナノシステム連 携促進フォーラム. (東京, 2013年2月21日).	H25. 2
蒲生 昌志. パネル討論 (発表: Risk assessment of manufactured nanomaterials - development of methodologies for rational and efficient management -). ナノテクノロジー国際標準化ワークショップ~ナノテクノ ロジーの開発と標準化). (東京, 2013 年 2 月 1 日).	H25. 2
Gamo M, Honda K, Yamamoto K. Fukushima S, Takebayashi T. Development of Innovative methodology for Safety Assessment of Manufactured Nanomaterials: Overview of Research Framework. Society for Risk Analysis 2012 Annual Meeting. (San Francisco, USA, December 12, 2012).	H24. 12
Iida K. Recent progresses in airborne and liquid-borne	H24. 12

particle generation techniques at AIST. The 21st Nisshin Engineering Particle Technology International Seminar: Aerosol Process and its Application to Energy and Environment. (石川, 2012年12月2日-5日).	
Iwasawa K, Tomita A, Aoyama T, Sakai Y. In vitro cytotoxicity assay of TiO ₂ nanoparticles in pulmonary epithelial cells. Symposium on New Technology for Cell-based Drug Assay. (東京, 2012年12月10日).	H24. 12
岩沢 こころ, 富田 篤弘, 青山 拓矢, 酒井 康行. 肺胞上 皮培養細胞を用いたチタン酸化物ナノ粒子の in vitro 有害 性評価. 日本動物実験代替法学会第25回大会.(東京, 2012 年 12 月 08 日).	H24. 12
武林 亨. ナノ物質の安全性評価と管理に関する動向. ナ ノ物質の安全な取り扱いに関するセミナー(国際粉体工業 展東京 2012). (東京, 2012 年 11 月 29 日).	H24. 11
Shinohara N, Fukui H, Danno N, Ichinose T, Honda K, Gamo M. Tissue Distribution and Clearance of Titanium Dioxide Nanoparticles after Intravenous Administration and Intratracheal Instillation. Nanosafe 2012. (Grenoble, France, November 15, 2012).	H24. 11
小林 伸輔, 高梨 誠司, 羽二生 久夫, 岡本 正則, 清水 政 幸, 荻原 伸英, 石垣 範雄, 中村 恒一, 加藤 博之, 薄井 雄 企, 齋藤 直人. Peapod-CNT によるカーボンナノチューブの 体内動態評価方法の開発. 第27回日本整形外科学会基礎学 術集会. (愛知, 2012 年 10 月 26 日-27 日).	H24. 10
岸本 充生. ナノ材料のイノベーションを支えるリスク評 価技術. 産総研オープンラボ 2012. (茨城, 2012 年 10 月 25 日-26 日).	H24. 10
 佐々木 毅. ナノ材料およびナノリスク・安全の現状.第17 回 WORKSHOP 成膜. (東京, 2012年9月5日).	H24. 9
Sakai Y, Iwasawa K, Tanaka G, Komori K, Fujii T, Okuyama K, Hatanaka K, Sakoda Y, Tanaka-Kagawa T, Jinno H. Problems in the integrated uses of a cultured alveolus models and a numerical simulation to predict accumulation/permeation of toxic chemicals in the lung. 1st Annual Meeting of the American Society for Cellular	H24. 9

	& Computational Toxicology. (Bethesda, USA, September 21, 2012).	
	鈴木 正明,加納 浩和,山崎 一法,近藤 ひとみ,戸谷 忠雄,齋藤 美佐江,妹尾 英樹,相磯 成敏,福島 昭治. 二酸化チタンの気管内投与による生体影響:投与回数の違 いによる比較.第39回日本毒性学会学術年会.(宮城,2012 年7月17日-19日).	H24. 7
	吉田 智子,後藤 理恵,山本 和弘,大嶋 浩,中井 誠.ナ ノ粒子の有害性評価における顕微鏡観察技術.日本顕微鏡 学会第68回学術講演会.(茨城,2012年5月14日).	H24. 5
	岸本 充生. ナノ材料の安全性確保に向けた国内外の法規 制と研究開発の動向. インテレクチャルカフェ「ナノ材料 の利用に向けた安全性確保のための戦略~評価手法の開発 と標準化~」. (東京, 2012 年 4 月 13 日).	H24. 4
	蒲生 昌志. ナノマテリアルのリスク評価:管理のための評 価手法の展開. 化学物質の安全管理に関するシンポジウ ム. (東京, 2012 年 2 月 17 日).	H24. 2
	岩沢 こころ,田中 玄弥,小森 喜久夫,藤井隆夫,奥山 光作,畑中 研一,迫田 章義,香川(田中) 聡子,神野 透 人,酒井 康行.培養ヒト肺胞上皮モデルと数理モデルに よるフタル酸エステルのヒト影響予測.日本動物実験代替 法学会第 24 回大会.(宮城,2011 年 11 月 10 日-12 日).	H23. 11
	蒲生 昌志. 工業ナノ材料のリスク評価. 産総研オープン ラボ 2011. (茨城, 2011 年 10 月 13 日-14 日).	H23. 10
特許		
	出願番号: 特願 2013-239814 出願日: 2013/11/20 公開番号: 2015-99123 発明の名称:炭素粒子の空間分布同定方法 出願者: 鶴岡 秀志、齋藤 直人、薄井 雄企、小林 伸輔、 武田 佳彦、表 和彦	H27. 5
	出願番号:特願2015-199618 出願日:2015/10/07 発明の名称:疎水性粉体懸濁液製造方法 出願者:飯田 健次郎、榎原 研正、山本 和弘、蒲生 昌志	H25. 10

<u> 2 – 2 目標の達成度</u>

要素技術		目標・指標	成果	達成度		
研究開発項目①「ナノ材料の同等性判断のための評価技術の構築」						
	(a) 気管内	最終目標として、異なる	物理化学的特性の異なる			
	投与試験に	化学組成や物理化学的特	二酸化チタン7種類、酸			
	よるナノ材	性のナノ材料を選択して	化ニッケル 4 種類、二酸			
	料の相互比	追加・検討試験を実施し、	化ケイ素9種類について			
	較による同	暫定案の改良及び検証を	気管内投与試験を実施	法式		
	等性判断基	行い、OECD等の国際	し、結果を比較検討した。	连风		
	準の構築	的な場への提案を想定し	また研究開発①(b)、③			
		たナノ材料有害性の同等	(a-1)の結果と合わせて			
		性の判定基準案を策定す	ナノ材料の同等性判断基			
		る。	準を作成した。			
	(b) 同等性	研究開発項目① (a) を始	合計 23 種のナノ材料に	達成		
	評価のため	めとする有害性試験に対	ついて、試験用分散液の			
	の試料調製	してナノ材料分散液を供	調製と供給を行い、その			
	技術とキャ	給と試料のキャラクタリ	キャラクタリゼーション			
	ラクタリゼ	ゼーションを行い、気管	を行った。また、試料調			
	ーション	内投与試験のための試料	製及びキャラクタリゼー			
		調製およびキャラクタリ	ションに関する手順、手			
		ゼーションの方法や留意	法、留意点などをまとめ			
		点について、技術解説書	た技術解説書を作成し、			
		をとりまとめて公開す	HP 上に公開した。			
		る。				
矿	F究開発項目②	「初期有害性情報取得のた	めの低コスト・簡便な有害	皆性評価技		
徘	「の構築」					
	(a) 吸入暴	吸入ばく露試験の結果と	吸入ばく露試験の結果と	達成		
	露試験と気	気管内投与試験の結果を	気管内投与試験の結果を			
	管内投与試	との比較及び改良・検証	論文掲載し、両試験の比			
	験の比較検	のための試験を追加して	較をとおして、両試験の			
	討	行い、初期有害性情報取	反応の類似性や相違性を			
		得の目的で気管内投与試	論文掲載した。これらの			
		験を用いるに当たっての	見解をまとめて、初期有			

表2-3 目標に対する成果・達成度の一覧表

	技術解説書をとりまとめ	害性情報取得の目的で気		
	て公開する。	管内投与試験を用いるに		
		当たっての技術解説書を		
		とりまとめて公開した。		
(b-1) 気管	最終目標として、気管内	様々な試験条件の違いが		
内投与試験	投与の技能確認法も合わ	結果に及ぼす影響につい		
の標準化に	せた気管内投与試験のテ	て検討し、結果に影響し		
関する検	ストガイドラインの試案	ない標準的な試験条件の		
討:手技の	を作成する。そのために、	範囲を明らかにするとと		
標準化に関	中間目標で作成されたプ	もに、気管内投与試験の		
する検討	ロトタイプ案について.	標準的手順書(試案)と		
	必要に応じて改良や検証	してまとめた。	達成	
	のための追加実験を実施	また、気管内投与技術確		
	する。	認法のプロトタイプに基		
		づき新規技術者の教育を		
		行うとともに、技能確認		
		法を改良し、気管内投与		
		試験の標準的手順書(試		
		案)に盛り込んだ。		
(b-2) 気管	気管内投与試験の標準的	投与回数を単回から複数	達成	
内投与試験	手法として適切な投与回	回に変えた気管内投与試		
の標準化に	数に関する見解をとりま	験を実施し、気管内投与		
関する検	とめ、研究開発項目②	試験の標準的手法として		
討:単回投	(b-1)による標準的手順	適切な投与回数に関する		
与と複数回	書の試案に含めて公開す	見解をまとめた。結果は、		
投与の比較	る。	「ラットを用いたナノ材		
検討		料の気管内投与試験の標		
		準的手順書(試案)」に		
		含めて公開した。		
(c) エアロ	吸入暴露試験用エアロゾ	本プロジェクトで開発し	達成	
ゾルの安定	ルを得る手法の指針をと	た吸入暴露試験用エアロ		
発生手法の	りまとめて公開する。	ゾル発生手法の装置概要		
構築		や操作方法を、期間中に		
		実施した実際の吸入暴露		
		試験の結果とともにとり		
		まとめ、「ナノ材料毒性		
			評価のための吸入暴露試	
---	----------	-----------------	--------------------	----
			験用エアロゾル発生に関	
			する技術解説書」として	
			プロジェクト HP に公開	
			した。	
	(d) エアロ	気管内投与試験用試料作	任意のエアロゾル試料に	達成
	ゾルの液相	成のためのエアロゾルの	適用可能な気管内投与試	
	捕集手法の	液相捕集手法に関する標	験用ナノ材料懸濁液作成	
	構築	準的手順書の試案をとり	技術として、気中ナノ粒	
		まとめて公開する。	子を液中に捕集する技術	
			(エアロゾルの液相捕集	
			法)を構築した。そして	
			この手法に関する手順書	
			を作成し公開した。	
矷	「究開発項目③)「ナノ材料の有害性試験・	評価のための基盤技術の開	発」
	(a-1) ナノ	中間目標の時点で確立し	光学顕微鏡と蛍光 X 線顕	達成
	材料の体内	たナノ材料の体内分布及	微鏡を用いたサブミリメ	
	分布及び生	び生体反応分布の定量化	ートルの分解能での広範	
	体反応分布	技術を研究開発項目①	囲の観察と、透過型電子	
	の定量化技	「ナノ材料の同等性判断	顕微鏡を用いたサブナノ	
	術の開発	のための評価技術の構	メートルの高分解能での	
		築」及び研究開発項目②	観察をするための手法を	
		「初期有害性情報取得の	確立した。ナノ材料の生	
		ための低コスト・簡便な	体反応分布に関しては、	
		有害性評価技術の構築」	レーザー共焦点顕微鏡と	
		の気管内投与試験及び吸	透過型電子顕微鏡を用い	
		入暴露試験に適用する。	た免疫組織学的解析手法	
		開発した方法を整理し、	を確立した。開発した手	
		技術解説書としてまとめ	法を技術解説書技術解	
		て公開する。	説書としてまとめて公開	
			した。	
	(a-2)	CNT の体内動態試験のた	Peapod 技術による CNT 内	達成
	PEAPOD(ピ	めの PEAPOD の作製・評	部への重金属の充填に成	
	ーポッド)	価・応用に関する技術解	功し、画像装置による検出	
	の体内動態	説書をとりまとめて公開	に成功した。試験動物の臓	
	計測技術開	する。	器内に集積した Peapod が	

発		画像装置で検出可能であ	
		る事を示した。最終的には	
		体内動態評価法の一つと	
		して確立した技術をとり	
		まとめ、本プロジェクトの	
		ホームページ上で技術解	
		説書として公開した。	
(b) ナノ材	研究開発項目①及び研究	吸入曝露試験、気管内投	達成
料の体内動	開発項目②で実施した吸	与試験の結果を数理モデ	
態と生体反	入暴露試験や気管内投与	ルで記述するとともに、	
応に関する	試験の結果を数理モデル	ナノ材料と生体反応の肺	
数理モデル	によって記述するととも	内分布を定量化し、両者	
の構築	に、ナノ材料の体内動態	の関係を明らかにした。	
	と生体反応との関係を表	また、静脈注射試験によ	
	すー般的な生理学的数理	る体内動態の評価を行っ	
	モデルとして構築する。	た。これらのデータの特	
		徴から、詳細な生理学的	
		数理モデルの構築は行わ	
		なかったが、ナノ材料の	
		体内動態の一般的な評価	
		やモデル化に関する技術	
		解説書を作成して公開し	
		た。	
(c) 培養肺	培養肺胞モデル評価系に	研究の結果得られた肺胞	達成
胞モデル評	よるナノ材料評価の標準	近傍における in vitro	
価系の開発	的手順書の試案をとりま	評価系による暴露実験と	
と数理モデ	とめて公開する。	数理モデルの組み合わせ	
ル化への利		による肺吸収率予測の手	
用方法に関		順・方法論について、「ナ	
する研究開		ノ粒子の肺障害性および	
発		透過性評価のための in	
		vitro 培養肺胞モデル構	
		築と評価の手順」として	
		とりまとめ、公開した。	

3. プロジェクト運営にかかる打合せ類、コミュニケーション活動の詳細

3-1 推進調整会議

本事業に参加している機関間の研究連携を強化して研究開発を推進するために、推進調整会議(平成23年度及び24年度の名称は調査報告会)を以下のとおり開催した。基本的に毎月開催し、事業期間中に合計45回開催した。

具体的な開催日は以下のようであった。

- 平成 23 年度: (4回) 11 月 7 日、12 月 26 日、1 月 30 日、3 月 5 日 平成 24 年度: (9回) 5 月 7 日、6 月 25 日、7 月 2 日、9 月 3 日、10 月 1 日、 11 月 5 日、12 月 3 日、2 月 4 日、3 月 4 日
- 平成 25 年度: (11 回) 4 月 22 日、5 月 27 日、6 月 24 日、7 月 8 日、8 月 5 日、 9 月 9 日、10 月 7 日、11 月 25 日、12 月 16 日、2 月 24 日、 3 月 24 日
- 平成 26 年度: (11 回) 4月 28 日、5月 19 日、6月 16 日、7月 14 日、 8月 25 日、9月 29 日、10月 27 日、12月 22 日、1月 19 日、 2月 16 日、3月 16 日
- 平成 27 年度:(10 回)4月13日、5月25日、6月22日、7月13日、 8月17日、9月14日、10月26日、12月21日、1月18日、 3月14日

3-2 推進調整会議以外の打合せ

個別の案件については、案件ごとに関係機関の間の打合せを持つことを推奨 した。その際、通常の面談式会議の開催と併せ、情報交換と議論を円滑化する 手段としてインターネットを利用したテレビ会議と電話会議を頻繁に活用し た。事業期間中、面談式会議116回、テレビ電話・電話会議122回にのぼった。 具体的には次の表3-1のような打合せを実施した。

日付	際確大	産医大	CEPI本部	CERIE	バイオ	信刷大	産総研	広島大	市市 大	形式	打合计概率
2011/8/9	ISC NOT V	庄直八			0	山川八	/£ IND II/I	山西八	米水八	が式 対面会議(於バイオ)	
2011/9/26			0	0	0		0			対面会議(於バイオ)	動物試験について打合せ
2011/10/27	0	0	0	0	0		0			対面会議(於CERI本部)	動物試験について打合せ
2011/11/13	Ŭ	0	Ŭ	Ŭ	0		0			対面会議(於東京)	ラット系統に関する議論
2012/1/26					0	0				対面会議(於信州大)	PEAPOD投与職器の組織評価に対する打ち合わせ
2012/1/31							0	0		対面会議(於広島大)	エアロゾル発生法についての相談
2012/4/18		0					0			対面会議	動物試験内容と結果
2012/4/25		-	0	0			-			TV会議	同等性について
2012/4/26			0	0						TV会議	同等性について
2012/5/8			0	0	0					対面会議(於CERI日田)	試験手技について打合せ
2012/5/15			-	0	_		0			TV会議	同等性について
2012/5/24			0	0			0			TV会議	同等性について
2012/6/5			0	0						TV会議	同等性について
2012/6/6			0	0						TV会議	同等性について
2012/6/13			0	0						TV会議	同等性について
2012/6/14			0	0						TV会議	標準化について
2012/6/15				0			0			TV会議	同等性について
2012/6/18		0					0			対面会議	動物試験内容と結果
2012/6/20	0						0			電話会議	研究計画調整
2012/6/21			0	0						TV会議	同等性について
2012/6/22			0	0						TV会議	標準化について
2012/6/28			0	0						TV会議	同等性試験について
2012/7/10		0					0			対面会議	動物試験内容と結果
2012/7/19				0	0					対面会議(於バイオ)	病理組織所見について打合せ
2012/8/8			0	0						TV会議	慶応大学との打合せについて
2012/8/14	0						0			対面会議(於慶應大)	進捗管理調整
2012/8/24					0		0			電話会議	有害性試験内容調整
2012/8/28		0						0		対面会議(於産医大)	暴露試験の準備状況と実施計画の検討
2012/8/29		0						0		対面会議(於産医大)	暴露試験の準備状況と実施計画の検討
2012/8/30		0						0		対面会議(於産医大)	暴露試験の準備状況と実施計画の検討
2012/8/31		0						0		対面会議(於産医大)	暴露試験の準備状況と実施計画の検討
2012/9/3		0						0		対面会議(於産医大)	暴露試験実施状況の検討
2012/9/4		0						0		対面会議(於産医大)	暴露試験実施状況の検討
2012/9/5		0						0		対面会議(於産医大)	暴露試験実施状況の検討
2012/9/6		0						0		対面会議(於産医大)	暴露試験実施状況の検討
2012/9/10		0						0		対面会議(於産医大)	暴露試験実施状況の検討
2012/9/11		0						0		対面会議(於産医大)	暴露試験実施状況の検討
2012/9/12		0					0			対面会議	動物試験内容と結果
2012/9/13			0	0						TV会議	材料選択について
2012/9/14			0	0			0			TV会議	材料選択、実験日程調整
2012/9/27		0					0	0		TV会議	材料選択、実験日程調整
2012/10/1					0		0			対面会議(於経産省)	動物試験について打合せ
2012/10/2		0						0		対面会議(於産医大)	暴露試験実施状況の検討
2012/10/3		0						0		対面会議(於産医大)	暴露試験実施結果の検討
2012/10/5		0					0			対面会議	動物試験内容と結果
2012/10/11					0	0				対面会議(於バイオ)	気管内投与方法、組織評価内容の確認
2012/10/29			0	0						TV会議	AISTとの打合せについて
2012/10/31			0	0			0			TV会議	材料選択、実験日程調整
2012/10/31		0					0			対面会議	動物試験内容と結果
2012/11/5					0	0	0			対面会議(於経産省)	体内分布研究計画調整
2012/11/9							0		0	TV会議	再委託研究報告·調整
2012/11/19							0		0	TV会議	再委託研究報告·調整
2012/12/3			0	0	0					対面会議(於信州大)	第2回推進会議資料打合せ
2012/12/12		0					0			対面会議	動物試験内容と結果
2012/12/17							0		0	TV会議	再委託研究報告・調整
2012/12/19			0	0			0			TV会議	同等性について
2012/12/21			0	0	0					TV·対面会議(於CERI本部)	第2回推進会議資料打合せ
2012/12/25							0		0	TV会議	再委託研究報告·調整
2012/12/26		0					0			対面会議	動物試験内容と結果
2013/1/7							0		0	TV会議	再委託研究報告·調整
2013/1/10			0	0	-		0			TV会議	材料選択、実験日程調整
2013/1/15			0	0						TV会議	第2回推進会議資料打合せ
2013/1/21							0		0	TV会議	再委託研究報告·調整
2013/1/23		0					0			対面会議	動物試験内容と結果
2013/1/28							0		0	TV会議	再委託研究報告・調整
2013/2/12							0		0	TV会議	再委託研究報告 調整
2013/2/25							0		0	TV会議	再委託研究報告·調整
2013/3/3					0	0				対面会議(於バイオ)	組織評価結果の確認
2013/3/11							0		0	TV会議	再委託研究報告·調整
2013/3/18		0					0			対面会議	動物試験内容と結果
2013/3/21					0		0			電話会議	有害性試験内容調製
2013/3/25							0		0	TV会議	再委託研究報告·調整
2013/4/9							0		0	TV会議	再委託研究報告·調整
2013/4/12	0				0		0			対面会議(於慶應大)	進捗管理調整

各研究機関の打ち合わせ記録 表 3 一 1

0

0

0 0

0

0

0

0

2013/4/22 2013/4/23 対面会議(於バイオ)

対面会議(於バイオ)

病理組織所見について打合せ

動物試験について打合せ

日付	慶應大	産医大	CERI本部	CERI日田	バイオ	信州大	産総研	広島大	東京大	形式	打合せ概要
2013/4/23							0		0	TV会議	再委託研究報告·調整
2013/5/1			0	0			0			TV会議	材料選択、実験日程調整
2013/5/7							0		0	TV会議	再委託研究報告·調整
2013/5/21							0		0	TV会議	再委託研究報告·調整
2013/6/4							0		0	TV会議	再委託研究報告·調整
2013/6/6		0					0			対面会議	動物試験内容と結果
2013/6/7			0	0	0					対面会議(於経団連会館)	中間評価資料作成打合せ
2013/6/10		0					0			対面会議	動物試験内容と結果
2013/6/18							0		0	TV会議	再委託研究報告·調整
2013/6/24					0		0			対面会議(於DESK@東京)	動物試験について打合せ
2013/7/1		0					0			対面会議	動物試験内容と結果
2013/7/2							0		0	TV会議	再委託研究報告·調整
2013/7/8			0	0	0					対面会議(於博多)	中間評価資料作成打合せ
2013/7/9			0	0						TV会議	中間評価の対応iについて打合せ
2013/7/16							0		0	TV会議	再委託研究報告·調整
2013/7/16			0	0						TV会議	中間評価、国際シンポジウムについて打合せ
2013/7/23			0	0						TV会議	試験の進捗、中間評価について打合せ
2013/7/25			0	0			0			TV会議	2年間試験の被験物質についての打合せ
2013/7/30							0		0	TV会議	再委託研究報告·調整
2013/8/20							0		0	TV会議	再委託研究報告·調整
2013/8/26		0						0		対面会議(於産医大)	暴露試験の準備状況と実施計画の検討
2013/8/27		0						0		対面会議(於産医大)	暴露試験の準備状況と実施計画の検討
2013/8/29		0						0		対面会議(於産医大)	暴露試験の準備状況と実施計画の検討
2013/8/30		0						0		対面会議(於産医大)	暴露試験の準備状況と実施計画の検討
2013/9/2		0						0		対面会議(於産医大)	暴露試験実施状況の検討
2013/9/3		0						0		対面会議(於産医大)	暴露試験実施状況の検討
2013/9/4		0						0		対面会議(於産医大)	暴露試験実施状況の検討
2013/9/5		0						0		対面会議(於産医大)	暴露試験実施状況の検討
2013/9/6		0						0		対面会議(於産医大)	暴露試験実施状況の検討
2013/9/10							0		0	TV会議	再委託研究報告·調整
2013/9/10		0						0		対面会議(於産医大)	暴露試験実施状況の検討
2013/9/24							0		0	TV会議	再委託研究報告·調整
2013/9/26		0						0		対面会議(於産医大)	暴露試験実施状況の検討
2013/9/27		0						0		対面会議(於産医大)	暴露試験実施状況の検討
2013/9/29		0						0		対面会議(於産医大)	暴露試験実施状況の検討
2013/9/30		0						0		対面会議(於産医大)	暴露試験実施状況の検討
2013/10/1		0						0		対面会議(於産医大)	暴露試験実施状況の検討
2013/10/1			0	0						TV会議	試験の進捗状況について
2013/10/2			-				0		0	対面会議(於東京大)	再委託研究報告·調整
2013/10/2		0					-	0	-	対面会議(於産医大)	暴露試験実施結果の検討
2013/10/8							0	-	0	TV会議	再季託研究報告·調整
2013/10/22							0		0	TV会議	再委託研究報告・調整
2013/10/28			0	0			-		-	TV会議	試験の進捗状況、中間評価ヨメントに対する回答について
2013/11/5			-		-		0	-	0	TV会議	再委託研究報告·調整
2013/11/19							0		0	TV会議	再委託研究報告 調整
2013/12/3							0		0	TV会議	再委託研究報告 調整
2013/12/17			1				0		0	TV会議	再委託研究報告 · 調整
2014/1/14							0		0	TV会議	再委託研究報告 · 調整
2014/1/15			0	0			-		-	TV会議	推進会議での協議内容、試験の進め方について
2014/1/17					0	0				対面会議(於バイオアッセイ)	PEAPOD投与臓器の組織評価に対する打ち合わせ
2014/1/28			1		-	_	0		0	TV会議	再委託研究報告 · 調整
2014/2/10							0		0	TV会議	再委託研究報告·調整
2014/2/25							0		0	TV会議	再委託研究報告 調整
2014/2/26			0	0						TV会議	年度末報告書の作成について
2014/3/5			0	0						TV会議	年度末報告書の作成について
2014/3/11			-	Ū			0		0	TV会議	国本計研究報告·調整
2014/3/18			0	0						TV会議	年度末報告書の作成、実施する候補物質について
2014/3/26			0	0			0			TV会議	同等性にかかる材料選択
2014/3/26			0	0			0			TV会議	実施する候補物質について
2014/3/26			0	0						TV会議	実施する候補物質について
2014/4/8	1	l	Ť				0		0	TV会議	再委託研究報告·調整
2014/4/17			0	0	0		0		Ŭ	対面会議(於CERI本部)	由金融 (1) (1) (1) (1) (1) (1) (1) (1) (1) (1)
2014/4/17			0	0	0					対面会議(於CERI東京)	標準化に関する打合せ
2014/4/22	1		Ť	- Ŭ	Ŭ		0		0	TV会議	再委託研究報告,調整
2014/5/13							0		0	TV/全議	再委託研究報告 調整
2014/5/19	1		0	0	0		0		<u> </u>	····································	標準化に関する打合せ
2014/5/20			0	0	5					対面会議(於CERI車百)	標準化に関する打合せ
2014/5/27	1		- Ŭ				0		0		国泰託研究報告·調整
2014/6/4	-	<u> </u>	0	0			0			···云赋 TV会議	標準化に関わる打合せ
2014/6/17	1						0		0	··· Ama TV全議	10
2014/0/17		<u> </u>					0		0	TV会議	〒2010の元和口 - 両正 国委託研究報告・調整
2014/7/15			<u> </u>				0			··· Ama TV全議	T 天 1000 2010 日 2012 雨 天 計研 空 翻 生 。 細 数
2014/1/10	1	0	-				0	0	- ⁻	···	日本のションサローの正 星震討論の准備が没と実施計画の会計
2014/0/20	1						0	0		ハ山云峨\小庄区入) T\/全議	************************************
2014/0/20	1	0	<u> </u>				0	0			ロンロレック 100 元 100 元 星雲討論の准備が没と実施計画の会計
2014/0/20		0	-					0		パース碼()////////////////////////////////////	*************************************
2014/0/21	+							0		内山云砥(水庄区八) 対面会議(松在医士)	*************************************
2014/8/28	+	0			-			0		内山云蔵(水性広人) 対面会議(状态医士)	森路内駅の半浦久流C天旭計画の快計 星雲計除宝坂中泊のや計
2014/9/2		0						0		ハ山云張(応圧広人) T)(今詳	※路四歌天肥仏ボリ快討 □ 室供会計あげ 汚進ルに 服ナΣ れるユ
2014/9/2				<u> </u>				0		···조哦 상조会詳(公在医士)	回ってはためないホキレに用する打ちで 星の計論中佐藤泊の検討
2014/9/3	1	0	1	1		1		0	I	内国安議(応産医天)	楽路码映夫肥祆沈の快討

日付	慶應大	産医大	CERI本部	CERI日田	バイオ	信州大	産総研	広島大	東京大	形式	打合せ概要
2014/9/9							0		0	TV会議	再委託研究報告·調整
2014/9/10		0						0		対面会議(於産医大)	暴露試験実施状況の検討
2014/9/16		0						0		対面会議(於産医大)	暴露試験実施状況の検討
2014/9/22		0						0		対面会議(於産医大)	暴露試験実施状況の検討
2014/9/24		-					0	-	0		雨季轩研突報告, 調教
2014/0/24		0						0	<u> </u>	計算機	
2014/ 9/ 24		0						0		対面去職(に座区大)	楽路は秋天心がため
2014/9/29		0						0		対面会議(於座広人)	泰路試験夫施状況の快討
2014/9/30		0					_	0	_	対面会議(於座医天)	泰蕗試験美他結果の検討
2014/10/6							0		0	TV会議	再委託研究報告・調整
2014/10/10	0						0			対面会議(於経産省会議室)	成果物の方針検討
2014/10/14			0	0						TV会議	同等性検討及び標準化に関する打合せ
2014/10/15			0	0			0			TV会議	成果物の方針検討
2014/10/15			0	0						TV会議	同等性検討に関する打合せ
2014/10/20		0					0			TV会議	成果物の方針検討
2014/10/21							0		0	TV会議	再委託研究報告·調整
2014/11/4							0		0	TV会議	再委託研究報告·調整
2014/11/25							0		0	TV会議	重季託研究報告·調整
2014/12/2							0		0	TV全議	雨季轩研空報告, 調整
2014/12/16			1				0		0	114公戒	市长江區內部生, 调敕
2014/12/10	0	~	0	0	0		0		0	「マム成	件变乱则九和口·测定 左回检索点件制始社
2014/12/16	0	0	0	0	0		0			1 V 会議	病理快堂の体制快討
2014/12/16		0	0	0						TV会議	病理組織検査の体制に関する打合せ
2014/12/22	0	0	0	0	0		0			対面会議(於CERI東京)	病理組織ビアレビューに関する打ち合わせ
2015/1/19					0	0				対面会議(於バイオアッセイ)	PEAPOD投与臓器の組織評価に対する打ち合わせ
2015/1/20							0		0	TV会議	再委託研究報告·調整
2015/2/3							0		0	TV会議	再委託研究報告·調整
2015/2/16							0			対面会議(産総研)	2015年度に使用するナノ材料種についての相談
2015/2/17							0		0	TV会議	再委託研究報告·調整
2015/3/3							0		0	TV会議	再委託研究報告·調整
2015/3/16	1	0	0	0	0	1	0	l	i	対面会議(於METI)	病理組織ピアレビューに関する打ち合わせ
2015/3/17				-	-	1	0		0	TV会議	再委託研究報告・調整
2015/2/21							0		0	11(会議	五禾江理办報生,调敕
2015/3/31							0		0	」▼云成	行变乱则九秋日·阿正 玉禾江江灾起生。细数
2013/ 4/ 28			0	0			0		0	「マム成	特要記明九和日、詞正
2015/5/15			0	0						1 V 云藏	標準的手順書楽についての打合で
2015/6/16							0		0	1 V会議	用安託研究報告 調整
2015/6/19			0	0			0			TV会議	進捗状況及び今後の研究の進め方についての打合せ
2015/7/7							0		0	TV会議	再委託研究報告·調整
2015/7/23	0		0	0			0			対面会議(慶應大学)	論文作成に関する打ち合わせ
2015/7/23	0		0	0						対面会議(於慶應大)	論文打合せ
2015/8/3		0						0		対面会議(於産医大)	暴露試験の準備状況と実施計画の検討
2015/8/4							0		0	TV会議	再委託研究報告·調整
2015/8/4		0						0		対面会議(於産医大)	暴露試験の準備状況と実施計画の検討
2015/8/5		0						0		対面会議(於産医大)	暴露試験の準備状況と実施計画の検討
2015/8/6		0						0		対面会議(於産医大)	暴露試験の準備状況と実施計画の検討
2015/8/7		0						0		対面会議(於産医大)	暴露試験の準備状況と実施計画の検討
2015/8/17		0						0		対面会議(於産医大)	暴霧試験の準備状況と実施計画の検討
2015/8/18		0						0		対面会議(於産医大)	暴露試験実施状況の検討
2015/8/19		0						0		対面会議(於産医士)	黒漆対験実施状況の検討
2015/8/20		0	1					0		対面会議(於産医士)	果需試験実施状況の検討
2013/8/20		0						0		対面云職(に座広人)	業路武駅夫旭仏の快討
2015/8/21		0					-	0		> 刈回会職(応進広人)	泰路試験夫他状況の快討
2015/8/25			-				0		0	TV会議	冉委託研究報告・調整
2015/8/27		0						0		対面会議(於産医大)	暴露試験実施状況の検討
2015/9/2		0						0		対面会議(於産医大)	暴露試験実施状況の検討
2015/9/7		0						0		対面会議(於産医大)	暴露試験実施状況の検討
2015/9/14			0	0			0			対面会議(於CERI本部)	同等性判断基準に関する打ち合わせ
2015/9/14		0	<u> </u>					0		対面会議(於産医大)	暴露試験実施状況の検討
2015/9/14			0	0			0			対面会議(於CERI東京)	同等性判断基準に関する打合せ
2015/9/15		0						0		対面会議(於産医大)	暴露試験実施結果の検討
2015/10/6							0		0	TV会議	再委託研究報告·調整
2015/10/7			0	0						対面会議(於CERI日田)	進捗委員会の対応、論文の打合せ
2015/10/8			0	0						対面会議(於CFRI日田)	進捗委員会の対応、論文の打合せ
2015/10/13	1	1	Õ	õ			0			TV·対面会議(於CFRI本部)	同等性判断基準に関する打ち合わせ
2015/10/13			- C	- Č			- C				同等性判断基準に関する打会サ
2015/10/13			0	0			0			「マム成	
2010/10/19							~			・* 本職	
2015/10/26			0	0			0			対面会議(於サンスカイルーム)	
2015/10/27	I		0	0			-		-	対面会議(於CERI東京)	進歩調整会議での問題点及び今後の検討項目について
2015/11/10			-				0		0	TV会議	冉委託研究報告·調整
2015/11/18	I		0	0	L		0			TV·対面会議(於CERI本部)	同等性判断基準に関する打ち合わせ
2015/12/3	L		0	0						対面会議(於CERI日田)	進捗委員会でのコメント対応、論文に関する打合せ
2015/12/4			0	0						対面会議(於CERI日田)	進捗委員会でのコメント対応、論文に関する打合せ
2015/12/15							0		0	TV会議	再委託研究報告·調整
2015/12/17			0	0						TV会議	進捗委員会でのコメント対応に関する打合せ
2015/12/21			0	0			0			対面会議(於経産省会議室)	同等性判断基準に関する打ち合わせ
2016/1/18			0	0		[0			対面会議(於経産省会議室)	同等性判断基準に関する打ち合わせ
2016/1/19	1		-	-		1	0		0	TV会議	再委託研究報告·調整
2016/2/2							0		0	TV会議	再委託研究報告·調整
2016/2/15	1		0	0		1	°		L _		同等性判断基準に関する打ち合わせ
2016/2/10	-						0		0	7) 四五賊(小时庄百五賊王)	西京1111月12年15月77010日12 西禾江西の起生,調教
2010/3/8	 									· ▼ 云 哦 T\/ 今詳	ryz 11 別の11 同ご 成用 報告書についての tr 会共
2010/3/11			0	0		ł	6			17 太張	成本報言書についての打合で
2016/3/14	1	I I			1	I.	0	1	I	刈回会議(ポサンスカイルーム)	回寺は判断基準に関する打ち合わせ

3-3 国民との科学・技術対話などのコミュニケーション活動

研究活動の内容や成果を社会・国民に対して分かりやすく説明するため、一般向け講演会、展示会で発表を積極的に行った。事業期間中で、計 22 件となった(イベント数として)。

具体的なイベントの情報は下記の通りである。

- 平成 23 年 10 月 13 日~14 日 産総研オープンラボ 2011(主催:独立行政法人 産業技術総合研究所)
- 平成24年2月17日 化学物質の安全管理に関するシンポジウム~新しい化学 物質等のリスク問題へのアプローチ~(主催:内閣府/独立行政法人国立 環境研究所)
- 平成24年4月22日 インテレクチャルカフェ「ナノ材料の利用に向けた安全 性確保のための戦略~評価手法の開発と標準化~(主催:独立行政法人産 業技術総合研究所/日本を元気にする産業技術会議)
- 平成24年6月1日~6月2日 東京大学 駒場リサーチキャンパス公開(生研 公開2012)(主催: 東京大学 生産技術研究所・先端科学技術研究センタ ー)
- 平成 24 年 10 月 25 日~26 日 産総研オープンラボ 2012(主催:独立行政法人 産業技術総合研究所)
- 平成24年11月28日~11月30日 ナノ物質の安全な取り扱いに関するセミナ ー(於:国際粉体工業展東京2012)(主催:一般社団法人日本粉体工業技 術協会)
- 平成25年2月1日 ナノテクノロジー国際標準化ワークショップ~ナノテク ノロジーの開発と標準化(主催:独立行政法人産業技術総合研究所/ナノ テクノロジー標準化国内審議委員会)
- 平成 25 年 5 月 31 日~6 月 1 日 東京大学 駒場リサーチキャンパス公開(生研 公開 2013)(主催: 東京大学 生産技術研究所・先端科学技術研究センタ 一)
- 平成 25 年 6 月 7 日 第 18 回化学物質評価研究機構研究発表会(主催:一般社 団法人化学物質評価研究機構)
- 平成 25 年 10 月 31 日~11 月 1 日 産総研オープンラボ 2013(主催:独立行政 法人産業技術総合研究所)
- 平成25年11月9日 一般財団法人化学物質評価研究機構(CERI)寄付講座「第 4講 ナノマテリアルのリスク評価」(主催:一般財団法人化学物質評価研 究機構(CERI)、九州大学大学院工学研究院 応用化学部門)

平成26年6月6日~6月7日 東京大学 駒場リサーチキャンパス公開(生研 公開2014)(主催: 東京大学 生産技術研究所・先端科学技術研究センタ ー)

- 平成26年11月8日 一般財団法人化学物質評価研究機構(CERI)寄付講座「第 4講 ナノマテリアルのリスク評価」(主催:一般財団法人化学物質評価研 究機構(CERI)、九州大学大学院工学研究院 応用化学部門)
- 平成 27 年 6 月 5 日~6 月 6 日 東京大学 駒場リサーチキャンパス公開(生研 公開 2015)(主催: 東京大学 生産技術研究所・先端科学技術研究センタ 一)
- 平成 27 年 10 月 17 日 一般財団法人化学物質評価研究機構(CERI)寄付講座 「第 4 講 ナノマテリアルのリスク評価」(主催:一般財団法人化学物質評 価研究機構(CERI)、九州大学大学院工学研究院 応用化学部門)
- 平成 27 年 10 月 22 日~23 日 産総研テクノブリッジフェア in つくば (主催: 国立研究開発法人産業技術総合研究所)
- 平成 28 年 1 月 27 日 ナノ材料の効率的な有害性評価技術(経済産業省ナノ安 全プロジェクト研究成果報告)(主催:ナノ安全プロジェクト研究実施機関、 nano tech 2016 に併催)
- 平成 28 年 2 月 6 日 俯瞰ワークショップ ナノテクロジー・材料分野 領域別 分科会「ナノテクロジーの ELSI/EHS」(主催: JST 研究開発戦略センター)

平成28年2月29日 平成27年度 産総研エネルギー・環境シンポジウムシリ

- ーズ 安全科学研究部門講演会 (主催 : 国立研究開発法人産業技術総合研究 所 安全科学研究部門)
- 平成28年6月3日~6月4日 東京大学 駒場リサーチキャンパス公開(生研 公開2016)(主催: 東京大学 生産技術研究所・先端科学技術研究センタ 一)
- 平成 28 年 9 月 5 日 第 23 回日本免疫毒性学会学術年会市民公開講座(主催: 日本免疫毒性学会)[予定]
- 平成 28 年 9 月 5 日 公開シンポジウム 工業用ナノ材料の有害性評価手法の 開発と労働衛生管理(主催 日本免疫毒性学会 産業医科大学)[予定]