

経済産業省受託研究「低炭素社会を実現する超軽量・高強度革新的融合材料プロジェクト：  
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」  
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-1) 吸入暴露試験と気管内投与試験の比較検討

## 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

学校法人 産業医科大学 産業生態科学研究所

平成 28 年 3 月

## 序

ナノテクノロジーの飛躍的進歩に伴い、新たな素材として金属メタルやカーボンなどによる工業用ナノ材料の開発が進んでいる。しかしながら、これらのナノ材料の有害性が不明であるばかりか、有害性評価システムが確立していない。よって、ナノ材料の有害性評価システムを構築するのが喫緊の課題である。

吸入性化学物質の有害性評価試験法のゴールドスタンダードは吸入ばく露試験である。ヒトのばく露形態と同様な生理的投与であるが故にヒトの生体影響に関わる極めて重要な有害性情報提供を行うが、その反面、高額なコスト、大型機器の設備、取扱者の熟練等が必要である。しかし、数多くの化学物質が存在するためにすべての化学物質に対して有害性評価を行うのは、困難である。一方、対象物質を直接注入する気管内投与試験は、既知量投与による用量反応関係や生体反応機序の解明に適しており、経費も廉価で、大型の設備等も不要であり、有害性評価試験法への活用が有望視されているが、有害性に対して十分な知見がなく、評価も限定的である。

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。

## 1. 試験の概要

試験物質である工業ナノ粒子の懸濁液をエアロゾル化して実験動物に4週間吸入させ、又はその懸濁液を実験動物の気管内に注入し、ヒトの急性から亜慢性の生体反応を外挿し得る生体影響のエンドポイントを類似点と相違点を明らかにし、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。

## 2. 試験法

### 2. 1 気管内投与試験

#### 2. 1. 1 目的

これは、経気道経由にて試験物質を肺に直接注入する暴露方法である。この方法は、吸入暴露と比べて比較的容易にかつ低コストで実施でき、また、投与量を規定できるので、投与量と反応の量反応関係を明らかにすることも可能である。ただし、強制注入するため、懸濁溶液中の粒子径分布には十分な注意が必要である。

この試験方法は、工業ナノ材料の初期有害性情報取得のためのデータ解釈上の留意点を整備することを目的とし、気管内注入によって、炎症を中心としたエンドポイントを計測する。

#### 2. 1. 2 方法

##### (1) 試験物質

粉体状の試験物質、試料懸濁液について、以下に示す項目を測定した。

##### ① 粉体状の試験物質

粒径分布、形状・形態、結晶性、比表面積、不純物を含む化学組成、

##### ② 試料懸濁液

粒径分布 (DLS 径) \*、粒子分散剤の種類と濃度、分散性を走査型電子顕微鏡で確認\*\*

\* : DLS 平均径がほぼ 100 nm 以下であった。

\*\* : 工業用ナノ材料の凝集体が 2, 3 ミクロン以下になっていることを確認した。

これらの物理化学的特性の測定において、各項目が投与試料として不適切な場合は、再度原粉からの試料調製を行い、投与試料の条件を十分満たすように努める。

##### (2) 実験動物

実験動物には、試験開始時に 12 週齢の Fischer344 雄性ラット (ウイルス抗体 free (SPF)) を用いる。

##### ① 投与開始前

実験動物は、ランダムに平均体重がほぼ同程度になるように分けた。一群の体重のばらつきは、 $\pm 20\%$ 以内とした。環境馴化のために、投与前5日間以上、投与後の観察環境で飼育した。

## ② 投与

分散溶媒中の試験物質の投与量は、低用量、高用量の2用量を用意した。低用量と高用量の投与用量は、各々0.8 mg/kg (0.2mg/rat), 4mg/kg (1.0mg/rat) とした。陰性対照群は、分散溶媒のみを同容量投与した。

イソフルレンまたはエンフルレン蒸気を吸入させ十分麻酔を浸透させた後、喉頭鏡にてラットを開口させ、カニューレを気道に挿入し、シリンジ内の試料溶液を単回注入した。すべての器具は、使用前に滅菌を行った。

## ③ 投与後の観察期間中

ラットは、温度 $20\pm 5^\circ\text{C}$ 、湿度 $50\pm 20\%$ の滅菌ケージ中で飼育した。投与ラットについては、2日に一回以上全身的な変化がないか目視による確認を行った。

## ④ 解剖

低用量群、高用量群、陰性対照群の3群とも、投与後3日後、1週後、1ヶ月、3ヶ月、6ヶ月、12ヶ月、24ヶ月後に解剖した。各解剖時期において一群当たり10匹とした。

# 3. 評価項目と評価方法

## 3. 1 評価の概略

同一のナノ材料を用いて、気管内投与試験と吸入暴露試験を行い、両者のエンドポイントの類似点と相違点を検討した。

- ① 炎症・線維化に関する各エンドポイントに関して、陰性対照群（又は非暴露群）と比較し、質的及び量的反応及び反応の持続性を検討した。気管内注入後3ヶ月または6ヶ月まで反応が見られる場合は、持続性と判断した。
- ② 各エンドポイント間の整合性を検討し、エンドポイントの有用性に関しても、併せて検討する。

## 3. 2 評価項目

以下の項目を評価する。

### (1) 肺組織

まず、末梢気道内にナノ材料の凝集塊の有無を確認した。ただし、凝集塊が認められた場合は、肺組織標本として不適当とみなすが、今回、実施した試験では認めらなかった。経時的な病理組織検査として炎症性変化・線維性変化の有無及びその持続的变化を検討した。

### (2) 気管支肺胞洗浄液 Broncho-alveolar lavage fluid (BALF)

BALFの細胞成分に関して、BALFの総細胞数、好中球数、好中球比率、肺胞マクロフ

ァージ数を指標として用いた。一方、非細胞成分に関して、BALF のタンパク濃度は、肺胞—血管関門の透過性の指標、lactate dehydrogenase (LDH)放出量や alkaline phosphatase (ALP)放出量は細胞傷害性の指標、サイトカイン濃度 (tumor necrosis factor (TNF), interleukin-1 (IL-1)) やケモカイン濃度 (cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 (CINC-1)(CXCL(ligand)1), CINC-2(CXCL3), CINC-3(MIP-2)(CXCL2), macrophage inflammatory protein-1 (MIP-1)(CCL2), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)(CCL2)) は炎症の指標、肺組織の蛋白抽出液と BALF の heme oxygenase-1 (HO-1)濃度は、酸化ストレスの指標として用いた。

(3) 工業用ナノ材料の肺内滞留性：半減期

3 日後から 3 ヶ月ないしは 6 ヶ月までの肺内保持量から、工業用ナノ材料の生物学的半減期 (肺内に沈着した物質が半分に減少するまでに要する時間) を算定した。低用量と高用量とも半減期を計測した。

(4) 他臓器組織

重量測定及び病理組織学的検査として、以下の臓器を対象とした。

重量測定：肺、肝臓、脾臓、腎臓、精巣、脳

病理組織学的検査：縦隔リンパ節、肝臓、脾臓、腎臓、精巣、脳

### 3. 3 検査の実施

検査は、2 群にわけ、1 群 5 匹以上とする。最初の群は肺重量測定 → BALF 採取 → 肺以外の臓器摘出及び重量測定、の順で行う。もう一群は肺重量測定 → 片肺を切除 → 片肺の肺組織固定 → 肺以外の臓器摘出及び重量測定、の順で行う。以下に各項目を述べる。

最初の群

(1) 肺重量測定

両肺を摘出し、湿重量を測定する。

(2) 気管支肺胞洗浄液 (BALF) 採取

BALF 採取は、気道にカテーテルを挿入する。25cm 水柱圧の高さから生理食塩水をカテーテルを通して滴下し全肺に注入する。完全に肺を膨らました後に、自然落下にて気管支肺胞洗浄液を採取する。これを 1 から 3 回行う。回収した洗浄液は、遠心し、上清を冷凍保存した。この上清より、BALF のタンパク濃度、LDH 放出量、ALP 放出量、TNF 濃度、IL-1 濃度、CINC-1 濃度、CINC-2 濃度、CINC-3 濃度、MIP-1 濃度、MCP-1 濃度、HO-1 濃度を計測した。残ったペレットは再浮遊させ、BALF の総細胞数、好中球数、好中球比率、肺胞マクロファージ数を測定した。

(3) 各臓器採取及び重量測定

各組織は、摘出後、臓器に付着した脂肪組織等を除去した後で重量を測定し、その後、ホルマリン等の固定液にて固定した。精巣を病理検査する場合は、固定液としてブアン液も用いた。固定時間は、ホルマリンと同様に 24 時間とした。

次の群

(1) 片肺切除

右の4葉（前葉、中葉、後葉、副葉）を糸で結紮し、蛋白や RNA 用に凍結保存する。但し、RNA には、RNA 保護剤を加えて保存した。

(2) 肺組織の固定

残りの左肺（前葉）に対して10%中性ホルマリンを、25cm水柱程度の高さから滴下し、定圧固定する。この低圧固定によって、肺組織を肺胞が自然と広がった状態で観察することができる。固定液を注入後、気管を結紮し、24時間固定液中に置き浸透させる。肺病理組織標本を作製した。

(3) 各臓器採取及び重量測定

各組織は、摘出後、臓器に付着した脂肪組織等を除去した後で重量を測定し、その後、ホルマリン等の固定液にて固定した。精巣を病理検査する場合は、固定液としてブアン液も用いた。固定時間は、ホルマリンと同様に24時間とした。

### 3. 4 肺の病理組織標本の作製と評価

固定された標本は、固定液を洗い流した後、エタノール等で脱水・脱脂を行う。その後パラフィン浸透のため、媒介剤（キシレン、クロロホルム等）で脱アルコールを行い、パラフィン浸透（融点58～60℃）し、ブロックとして包埋した。

パラフィン包埋された肺組織から、3μm厚切片をプレパラートに載せ、キシレン・アルコールを用いて脱パラフィンを行った後に染色した。炎症度を評価するために、ヘマトキシリン・エオジン染色（HE染色）、線維化を評価するために、エラスチカ・マッソン・トリクローム染色またはシリウスレッド染色を行った。

肺病理所見に関して、炎症細胞浸潤、線維化（コラーゲン沈着）、腫瘍発生等の所見について観察ポイント（解剖ポイント）ごとに記述し、4段階のスコアリング（-、±、+、++）を行った。

### 3. 4 気管内投与試験における吸入暴露試験の結果に近づけるための留意点

気管内投与試験と吸入ばく露試験の各々の結果は、ここでは省略する。これらの結果と以前に行われた試験結果を踏まえて、以下のように留意点として提示する。

#### 投与量

気管内投与試験の最大投与量は、低毒性のナノ材料が、軽度の持続炎症を示す最小用量とした。この値は4mg/kgまたは1mg/ratであった(Morimoto et al. 2015b, 2016, Yoshiura et al. 2015)。我々は、同一のナノ材料を用いて吸入暴露試験と気管内投与試験を行い、二酸化チタンナノ粒子は、吸入暴露試験では肺の炎症を示さなかったが、一方、気管内投与試験では、1mg/ratの用量で、急性期における一過性の好中球炎症を示した。これ以上の高用量は、吸入ばく露試験との結果の差異が拡大することが考えられる。我々が以前に行った試験においても、肺毒性の低いナノ材料であるフラーレンを、ラットに0.1mg、0.2 mg、1mg/rat 気管内注入したところ、高用量の

1mg のみに軽度の好中球浸潤が持続した (Morimoto et al. 2010)。Oyabu ら(2013)は、肺毒性が低い二酸化チタンナノ粒子(p90)の気管内注入を 0.1mg, 0.2mg, 1mg, 3mg までの排泄機能を検討し、0.1mg、0.2mg と比較して 1mg では軽度の遅延、3mg で有意な排泄能の遅延を引き起こした。このように肺毒性の低いナノ材料でも 1mg/rat の注入によりクリアランスの遅延とともに軽度の持続炎症をきたしたので、1mg/rat の用量は、気管内投与試験における最大投与量と考えた。また、分散性が確保されていない場合、投与用量が少なくとも気道や末梢気道にナノ材料の凝集塊がみられることがある。これを防ぐためには、分散性を確保(走査型電子顕微鏡で確認した凝集径が 2,3 ミクロン以下)することも必要と思われる。我々が気管内投与試験前に行った工業用ナノ材料の懸濁液の DLS 平均径は概ね 100nm 以下であった。

## 観察期間

急性期の観察(主に 1 ヶ月までの観察)は、多くの論文で行われており、肺の急性炎症が評価されている。1 ヶ月未満の観察期間では、肺毒性の低いナノ粒子でも炎症を認めることがある。我々が行った二酸化チタンナノ粒子の気管内投与試験でも 1 週間までは、好中球の高度な炎症を認めた。我々は、これらの急性期の評価だけでなく、慢性期の評価が必要と考える。具体的には気管内注入後 3 ヶ月、または 6 ヶ月まで観察する。我々のエンドポイントが肺の持続炎症であり、持続性を確認するためには、上記の観察期間が必要と考える。高い肺毒性をもつ吸入性化学物質は、炎症の発症は曝露直後に著明ではないものも存在する。特に結晶質シリカなどは、BALF の好中球数の増加、肺病理所見における泡沫かマクロファージの浸潤やけい肺結節は、3 ヶ月以降に著明に認められた。また、持続炎症が有害性を評価するための重要なエンドポイントではあるが、線維化も一過性でないことも確認することが重要である。

## 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。これらの病理所見は、小葉中心性の粒子や炎症細胞の浸潤として認められる (Morimoto et al. 2012a, 2012b)。本試験で行った気管内投与試験においても、好中球を中心とした炎症細胞浸潤は、小葉中心性であった。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が、実際の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 (centriacinar) と記載されている論文が多い (Bermudez et al. 2002, 2004; Shvedova et al. 2008; Norgaard et al. 2010, Morimoto et al. 2016)。本試験における吸入曝露試験でも、肺の炎症細胞浸潤の分布は、小葉中心性の分布であった。但し、病変の主座は、小葉中心性ではあるが、胸膜直下の病変や炎症細胞が肺胞壁を全周性に広がる病変も認めている (Bermudez et al. 2004; Shvedova et al. 2008;)。ヒトの影響に関して、ナノ粒子単独曝露による報告はないが、ナノ粒子を含む粉じん曝露によるじん肺が発症したことは報告されている。これは、新しい疾患ではなく、じん肺の中で多くを占める溶接工肺がそれにあたる。溶接工肺の発症原因である溶接ヒュームは、鉄など

の金属により構成されており、作業現場で発生したヒューム中の重量として最大 11%、個数としては最大 80%がナノ粒子という報告もある。この溶接工肺における病変分布は、小葉中心性の分布をしている (Akira et al. 1995)。肺病変は、粒子の沈着部位を中心に形成されていることから、ヒトのナノ材料の曝露においても、吸入性粒子の沈着部位は、小葉中心となることが考えられる。従って、気管内投与試験のナノ粒子の分布は、吸入曝露試験やヒトの曝露と多少の分布の差はあれ、概ね大差はないと考えられる。

### **分散剤の使用**

分散剤は、高濃度になるとそれ自体で肺の炎症を誘発した。我々は、Triton0.2%の懸濁液をラットに気管内投与したところ、肺内に炎症細胞浸潤を認めた。その後濃度を低減化、Triton、Tweenとも0.1%以下にすることにより分散剤の炎症誘発性は認められなかった。よって、懸濁液中の分散剤は低濃度(0.1%以下)にすることが妥当と考える。また、分散剤の中には、炎症抑制作用を有するものもあることは報告されているが、我々が使用した分散剤には、炎症抑制作用は、認められなかった。

### **肺炎症 (Morimoto et al. 2015a, 2015b, 2016, Horie et al. 2016)**

BALFの総細胞数、好中球数、好中球比率、LDH放出量、CINC-1濃度、CINC-2濃度、HO-1濃度は、炎症能を有する工業用ナノ材料(NiO, CeO<sub>2</sub>)を曝露した吸入曝露試験では発現が上昇し、気管内投与試験では持続性炎症を示した。一方、炎症能が低いナノ材料(TiO<sub>2</sub>)を曝露した吸入曝露試験では、発現の上昇がなく、気管内投与試験でも、一過性の発現上昇のみであった。また、BALFのALP濃度は、炎症能を有する工業用ナノ材料を気管内投与すると上昇したが、持続性はなかった。炎症能が低い工業用ナノ材料を注入しても濃度上昇は示さなかった。肺の病理組織標本に関しては、肺胞におけるマクロファージや好中球の炎症細胞が、炎症能が高い工業用ナノ材料では、持続性の浸潤を認め、炎症能が低いナノ材料では、一過性の炎症を認めた。なお、線維化に関しては、炎症性の高い工業用ナノ材料においてのみ一過性に認められた。

### **ナノ材料の半減期**

気管内投与試験による半減期は、吸入ばく露の半減期と同等かまたは長いことが報告されており、我々の試験においても吸入試験と気管内投与試験で肺内保持量をそろえた比較でも、同様の結果であった。吸入された粒子と強制的に注入された粒子は必ずしも同じものではないこと、また気管内注入では bolus effect がおこるので、両試験における半減期の差は避けられないと思われる。

### **他臓器への移行**

気管内投与試験や吸入ばく露試験では、他臓器への沈着に関して、肝臓、腎臓などの代謝臓器や免疫組織である脾臓、生殖臓器である精巣への移行もともに報告されている。我々の試験では、著明な他臓器への沈着は認められなかったが、酸化ニッケルを気管内投与し



た2年後の病理所見では、有意ではないが複数の臓器で腫瘍を認めている。他の報告とあわせると脳以外の沈着に関しては、量的な問題は検証する必要はあるが、移行には差異はないように思われる。

脳への沈着は、鼻腔から嗅球を介して脳へ移行することが考えられるので、気管内投与試験では吸入暴露試験より移行しにくいかもしれない。Hopkins らの報告では、吸入暴露試験で、鼻腔にある嗅神経の軸索に分散したクオンタムドットナノ粒子が存在し、脳内の嗅球の糸球体層にクラスター状に蓄積していたことを認めている。気管内投与試験において、鼻腔から脳への移行はほとんどないと考えられるので、気管内投与試験では、脳への移行は、過小評価する可能性があるので注意を要する。

### 気管内投与試験と吸入ばく露試験の結果の類似と相違について

気管内投与試験と吸入暴露試験の結果の相違として、気管内投与試験では、1) bolus effect による人工的反応、2) 肺内分布の不均一性、3) 肺からのクリアランスに閾値がないこと、4) 他臓器のうち、脳や胎児への沈着が少ないこと、5) 高濃度の分散剤 (Triton、Tween) は肺の炎症を誘発することなどが我々の知見および論文の報告から認められた。よって、対象物質の分散性を確保すること、過剰投与を避けること、分散剤 (Triton、Tween) を低濃度 (0.1%以下) にすること、他臓器への影響において、脳以外の他臓器の影響を総合的に評価することが、気管内投与試験の結果が、吸入ばく露試験の結果に近づけるアプローチであると推測した (森本ら、2013年)。

また、両試験の類似点として、肺毒性評価に炎症を中心としたエンドポイントが有効であること、ともに過剰投与により半減期が遅延し、それに伴い炎症反応が亢進することが考えられる。両試験とも半減期が著明な遅延を起こさない程度の曝露状況で炎症を中心としたエンドポイントを評価し、気管内試験では、持続性炎症、吸入暴露試験では、炎症の亢進または持続性を判断基準とするならば、吸入ばく露試験で炎症所見を示したナノ材料のランク付けは、気管内投与試験での炎症のランク付けと一致する傾向にあることから、工業用ナノ材料の有害性評価に気管内投与試験が有用であることが示唆された (Morimoto et al. 2016)。

### 3.5 気管内投与試験による工業用ナノ材料の肺毒性評価

工業用ナノ材料の肺毒性の評価に関して、気管内注入する懸濁液集の工業ナノ材料の分散性を確保すること、分散剤は低濃度にする、用量は低用量、高用量の2用量を用いること、最大用量は4mg/kgまでとすること、急性期 (3日、1週間のうちいずれかのタイムポイント) と慢性期 (3ヶ月か6か月のいずれかのタイムポイント) にて観察すること、エンドポイントとして BALF の好中球比率、好中球数、LDH 濃度、CINC-1 濃度、CINC-2 濃度、HO-1 濃度を用いて、持続性変化 (急性期のみならず慢性期にも持続変化) を認めるか検討する。以上、これらの実験条件の基、気管内投与試験を行うことにより、吸入ばく露試験で炎症所見を示したナノ材料のランク付けは、気管内投与試験での炎症のランク付けと一致する傾向にあることが示唆された。よって、肺の炎症が慢性期において消失している場合は

ナノ材料の有害性は低いことが考えられる、一方、肺の炎症が慢性期において持続または進行する場合（BALFの好中球比率や好中球数の持続または増加）、肺の慢性期に新たな病理所見（泡沫化マクロファージの浸潤、けい肺結節などの結節像など（但し粒子の貪食像した肺胞マクロファージの軽度の肺胞内集簇は除く））を認める場合、吸入暴露試験で検討する必要があると考える。

#### 4. 参考文献

Akira M. 1995. Uncommon pneumoconiosis: CT and pathological findings. *Radiology*. 197:403-409.

Bermudez E, Mangum JB, Asgharian B, Wong BA, Reverdy EE, Janszen DB, Hext PM, Warheit DB, Everitt JI. (2002) Long-term pulmonary responses of three laboratory rodent species to subchronic inhalation of pigmentary titanium dioxide particles. *Toxicol. Sci.* 70: 86-97.

Bermudez E, Mangum JB, Wong BA, Asgharian B, Hext PM, Warheit DB, Everitt JI. (2004) Pulmonary responses of mice, rats, and hamsters to subchronic inhalation of ultrafine titanium dioxide particles. *Toxicol Sci.* 77(2): 347-357

Hopkins LE, Patchin ES, Chiu PL, Brandenberger C, Smiley-Jewell S, Pinkerton KE. Nose-to-brain transport of aerosolized quantum dots following acute exposure. *Nanotoxicol.* 8(8): 885-893. 2014.

Morimoto Y, Hirohashi M, Ogami A, Oyabu T, Myojo T, Nishi K, Kadoya C, Todoroki M, Yamamoto M, Murakami M, Shimada M, Wang WN, Yamamoto K, Fujita K, Endoh S, Uchida K, Shinohara N, Nakanishi J, Tanaka I. (2010a) Inflammogenic effect of well-characterized fullerenes in inhalation and intratracheal instillation studies. Part Fibre Toxicol. 14;7:4

Morimoto Y, Hirohashi M, Ogami A, Oyabu T, Myojo T, Todoroki M, Yamamoto M, Hashiba M, Mizuguchi Y, Lee BW, Kuroda E, Shimada M, Wang WN, Yamamoto K, Fujita K, Endoh S, Uchida K, Kobayashi N, Mizuno K, Inada M, Tao H, Nakazato T, Nakanishi J, Tanaka I. (2012a) Pulmonary toxicity of well-dispersed multi-wall carbon nanotubes following inhalation and intratracheal instillation. *Nanotoxicology* 6(6): 587-599

Morimoto Y, Hirohashi M, Horie M, Ogami A, Oyabu T, Myojo T, Hashiba M, Mizuguchi Y, Kambara T, Lee BW, Kuroda E, Yamamoto K, Kobayashi N, Endoh S, Uchida K, Nakazato T, Fujita K, Nakanishi J, Tanaka I. (2012b) Pulmonary toxicity of well-dispersed single-wall carbon nanotubes following intratracheal instillation. *J. Nano Research* (18-19): 9-25

森本 泰夫, 堀江 祐範, 北島 信一, 福島 昭治, 武林 亭「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 68 161-167(2013)

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* 2015a;17(11):442

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*. 2015b Nov 11:1-12.

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 Nanopart Res*. 2015;17(6):241.

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).

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).

Norgaard AW, Larsen ST, Hammer M, Poulsen SS, Jensen KA, Nielsen GD, Wolkoff P. (2010). Lung damage in mice after inhalation of nanofilm spray products: the role of perfluorination and free hydroxyl groups. *Toxicol. Sci*. 116(1): 216-224

Oyabu T, Morimoto Y, Hirohashi M, Horie M, Kambara T, Lee BW, Hashiba M, Mizuguchi Y, Myojo T, Kuroda E (2013) Dose-dependent pulmonary response of well-dispersed titanium dioxide nanoparticles following intratracheal instillation. *J Nanopart Res* 15: 1600.

Shvedova AA, Kisin E, Murray AR, Johnson VJ, Gorelik O, Arepalli S, Hubbs AF, Mercer RR, Keohavong P, Sussman N, Jin J, Yin J, Stone S, Chen BT, Deye G, Maynard A, Castranova V,

Baron PA, Kagan VE. (2008) Inhalation vs. aspiration of single-walled carbon nanotubes in C57BL/6 mice: inflammation, fibrosis, oxidative stress, and mutagenesis. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol Physiol.* 295(4): L552-565

吸入ばく露試験と比較した気管内投与試験の結果の類似点と相違点 (Morimoto et al. 2013, 2016)

	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 (1-3mg/rat)で認める。	なし
炎症に関するエンドポイント BALF 総細胞数、好中球数、 好中球比率等	有用 評価: 持続性	有用 評価: 炎症亢進または持続性
肺内分布の不均一性	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。 但し、一部胸膜付近、全周性の肺胞 壁病変を認める
	分散性が低いと、気道に病変が集積	
肺からのクリアランス	高用量で半減期が遅延	高用量で半減期が遅延
他臓器への移行	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
	脳への沈着は軽度か認めない*	脳への沈着あり
	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 懸濁液で肺内好中 球浸潤あり	一般的にはなし