

経済産業省受託研究「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（基本計画:研究開発項目②）

(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

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） ver. 3.0

一般財団法人化学物質評価研究機構（CERI）

日本バイオアッセイ研究センター（JBRC）

学校法人産業医科大学（UOEH）

平成 30 年 2 月

<目 次>

I.	はじめに	3
II.	気管内投与試験の概要及び考慮すべき事項	4
III.	試験方法	4
1.	動物の選択	4
2.	飼育環境	4
3.	投与液調製	4
4.	用量	5
5.	投与器具の選択	5
6.	投与	6
7.	観察期間及び観察頻度	9
8.	観察項目	9
9.	解剖時麻酔法、BAL 液採取法、病理組織学的検査及び肺負荷量（肺内沈着量）	10
IV.	投与技能確認について	13
V.	まとめ（推奨試験方法）	15
VI.	参考文献	17

I. はじめに

本手順書は、平成 23 年度から 5 か年計画で実施された「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（NEDO 交付金以外分）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」（以下、プロジェクト）の成果及び関連研究を参照し作成したものである。

プロジェクトでは、多様なナノ材料のリスクを合理的かつ効率的に評価・管理するための枠組みを構築するため、その基盤となる有害性評価手法の開発を目標に掲げている。この目標を達成するため、気管内投与試験を吸入毒性のスクリーニング試験として位置づけ、ナノ材料の有害性評価に段階的アプローチ（tiered approach）を導入することを想定している。

ナノ材料をはじめとする呼吸器経路でのばく露が想定される物質の有害性評価手法としては、吸入ばく露が最も現実のばく露状況を模した方法であり、吸入毒性試験が第一選択である。しかし、吸入毒性試験の実施には、大規模な設備及び多量の被験物質を必要とすることから、莫大な費用がかかることに加え、被験物質の気中分散のための高度な技術を要する。そのため、多様なナノ材料の有害性評価に適用するのは現実的でない。一方、気管内投与試験は、一般的な動物実験施設において、簡易な器具と少量の被験物質で実施可能であり、特に肺への投与量を厳密に設定可能であることから、数多くのナノ材料の毒性研究に活用されている(1)。しかしながら、気管内投与試験の標準的なガイドラインは整備されておらず、既存報告の気管内投与試験における投与器具、投与液量、投与操作等は様々な条件で実施されている。これらの試験条件の違いが試験成績に及ぼす影響は明らかにされていないことから、系統的な有害性評価へ適用することは困難である。そこで、プロジェクトでは、様々な試験条件で気管内投与試験を実施し、その結果を比較することで試験条件の違いが試験成績に及ぼす影響を調査した。本手順書では、プロジェクトの成果及び関連する既存の報告をまとめ、再現性の高い手技で気管内投与試験を実施するための留意点及び投与技術者の技能確認法も含めた推奨される標準的な試験実施手順を記載した。

本手順書をもとに、一定の手法で気管内投与試験が実施され、普及することを期待する。

なお、本手順書は平成 28 年 3 月に公開し、平成 29 年 2 月に改訂したものを、「平成 29 年度化学物質安全対策（ナノ材料気管内投与試験法等の国際標準化に関する調査）」でのラボ間比較の検討結果を踏まえ、得られた知見を基に一部改訂したものである。

II. 気管内投与試験の概要及び考慮すべき事項

気管内投与試験は、実験動物の気管内に被験物質を液体中に分散させて投与し、主に被験物質の肺有害性を評価する試験法である。投与後は、一般的な毒性エンドポイントに加え、気管支肺胞洗浄（Bronchoalveolar Lavage、以下、BAL）検査を実施する。気管内投与試験でよく露形態は実環境とは異なり、上部気道への毒性影響を評価できないため、吸入毒性試験の完全な代替試験とはなり難い。しかし、被験物質の相対的な毒性比較評価（comparative toxicity）に有用であることは広く認知されている（2）。

本手順書では、吸入毒性試験の OECD テストガイドライン（3,4）と同様に、ラットの使用を想定している。また、気管を頸部で切開して気管内投与する手法や、粉体の被験物質を直接投与するための器具が市販されているが、侵襲度及び汎用性を考慮し、本手順書では液中に分散した被験物質を経口的に気管内に投与することを想定している。観察期間としては急性期～亜慢性期におけるナノ材料の肺有害性のスクリーニング評価を念頭においている。

III. 試験方法

1. 動物の選択

一般的な毒性試験に汎用される SPF（Specific Pathogen Free）動物を選択する。動物の性別、週齢等は目的に応じて決定されるべきである。ラットを用いた既存の報告における投与時の動物は、平均体重 185～420 g（5-7）であり、体重を基準に動物の系統、性別及び週齢を決定することも考えられる。その他、生存率や背景病変等を考慮して選択される。

2. 飼育環境

一般的な毒性試験と同様の飼育環境を維持する。すなわち、動物飼育室の温度は $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ とする。相対湿度は理想的には 30～70%に維持する。飼料は通常の実験動物用飼料を用い、飲料水は水道水を自由に摂取させる。照明は人工照明で 12 時間明期、12 時間暗期とする。

3. 投与液調製

実環境と同等の物理化学特性を保ち、かつ投与時まで安定な分散状態の投与液を調製することが理想的である。しかし、ナノ材料は液体中で凝集（agglomerate）することが知られており、一般に実環境と同等の分散状態を達成することは困難である（8）。一方で、投与液中で高度に凝集したナノ材料を気管内投与すると、凝集塊が細気管支を物理的に閉塞する等の人工的な反応が起こり（9-11）、誤った有害性解釈につながるおそれがある。また、吸入毒性試験のスクリーニング的な観点からも、投与液中のナノ材料の粒子サイズは、吸入後に下部気道まで達するサイズ（空気動学的径 $3\ \mu\text{m}$ 以下）であることが望ましい。したが

って、ナノ材料の気管内投与試験においては、投与液の物理化学的特性を明らかにすることが非常に重要である(1)。液中に分散したナノ材料の有害性評価においては、少なくともナノ材料の分散状態、粒径分布及び濃度を測定することが推奨されており、粒径分布については複数の計測手法(DLS及び電子顕微鏡等)を用いて測定することが望ましい(8)。

調製に使用する媒体はナノ材料の性状によって異なる。一般に、生理食塩液、リン酸緩衝液、精製水等が使用されており、界面活性剤の添加も考慮される(7,12-14)。媒体の選択時は、媒体自体が動物に影響を与えないこと、又は動物に及ぼす影響を明らかにする必要がある。もし影響を与える媒体を使用する場合は、最小限にとどめるよう注意を払う。無処置群、操作対照群等の適切な対照群の設置により、媒体自体の影響を明らかにすることが可能である。

4. 用量

一般的な毒性試験と同様に、用量依存性を確認するため複数用量群を設定する。用量は、被験物質又は関連物質に関する毒性情報や、必要に応じて実施する用量設定試験の結果を考慮して設定する。最高用量としては、毒性兆候を誘発するが死亡又は重篤な毒性症状を示さない用量を設定する。

ナノ材料の有害性評価における最適な用量単位についての見解は得られていないが、一般毒性試験と同様、重量基準単位(例:mg/kg体重、mg/animal)での報告が中心である。その他、粒子数、表面積等様々な基準による報告がある(15,16)。

5. 投与器具の選択

気管内投与では、投与器具として金属製経ロゾンデ針(以下、経ロゾンデ)のほか、投与液をエアロゾル状に噴出するタイプのゾンデ(以下、スプレーゾンデ)があり(図1)、いずれもディスポーザブルシリンジに取り付けて使用されている。経ロゾンデは、一般の強制経口投与に用いられる器具であり、投与液は液体のまま直接噴出される。一方、代表的なスプレーゾンデであるMicroSprayer[®](例:Aerosolizer-Model IA-1B(Penn-Century, Inc., Wyndmoor, PA):2016年3月現在製造終了)は、先端の微細構造によって、投与液を加圧噴霧しエアロゾル化(液滴径25~30µm)する。経ロゾンデ使用時には、投与液が気管支及び周囲肺胞に多く分布する傾向がある(17)が、誘発される急性炎症反応については両投与器具間で顕著な差はない(18)ため、いずれを用いても同等に評価可能である。なお、スプレーゾンデでは、特に粗大粒子を含む投与液の場合、粒子が器具内に目詰まりして粒径分布の変化や投与液濃度の減少が生じる可能性がある。したがって、投与液の性状によって投与器具を選択する必要があり、スプレーゾンデを使用する場合は、事前に器具通過後の粒径分布や投与液濃度を確認する必要がある。


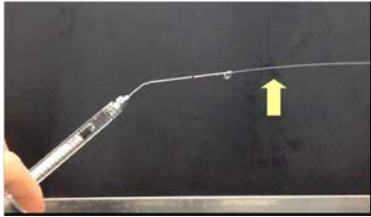


経口ゾンデ	スプレーゾンデ
<p data-bbox="295 324 550 353">金属製経口ゾンデ針</p>  	<p data-bbox="809 324 981 353">MicroSprayer®</p>   <p data-bbox="831 898 1300 974">Photo of MicroSprayer® Aerosolizer of Penn-Century, Inc.</p>

図1 気管内投与に用いられる投与器具

6. 投与

気管内投与時に注意を要する事項として、a) 投与時麻酔法、b) 投与時体位（保定）、c) 投与器具挿入方法及び位置、d) 投与液量、e) 投与速度、及び f) 投与回数についての留意点を以下に示す。さらに具体例として、g) 操作手順の一例を記載する。

a) 投与時麻酔法

麻酔の使用は動物愛護の観点から必須であり、また、操作性を高め気管内投与の再現性を高める。鎮痛効果、低刺激性に加え、麻酔導入と覚醒の速さ、深度の調節性、汎用性等を考慮し、イソフルランあるいはセボフルランの吸入麻酔の使用が推奨される。その他、ジエチルエーテルの吸入麻酔、ケタミン-キシラジン混合、メトヘキシタールの腹腔内麻酔等が使用される（16, 19-21）。しかし、ジエチルエーテルは強い気道刺激性を有するため、近年使用は避けられている。また、ケタミンは国内では麻薬指定されており、日常業務のなかでの取り扱いは困難である。

b) 投与時体位（保定）

気管内に投与された投与液は肺内で重力に従って分布・移動することが知られている（17, 22）ため、気管内投与の再現性を高めるためには、投与時の動物の体位（角度）を一定にすることが重要である。動物の体位が45～90度の仰臥位で保定することが望ましい。水平位では投与液が気道を閉塞し窒息死したり、投与液が逆流して消化管へ流入したりする（17）ため、水平位での投与は避ける。また、投与直後に動物を飼育ケージに戻すと、動物の行動、姿勢に応じて投与液が肺から逆流し、肺のばく露量に変化する懸念がある。投与直後は一定

時間動物を保定状態のまま維持する等の配慮が必要である。

c) 投与器具挿入方法及び位置

喉頭鏡等により喉頭部を視覚化し、目視下で投与することが最も容易である (2, 23, 24)。投与の成功率に加え、動物への過度な負担を避けるという点でも喉頭鏡の使用が推奨される。また、投与器具先端が食道へ誤挿入された場合も、目視で判別可能である (図 2)。なお、投与器具や喉頭鏡等で周囲粘膜を過度に刺激すると、出血することがあるため、投与者は一定の技術訓練が必要である (IV. 参照)。

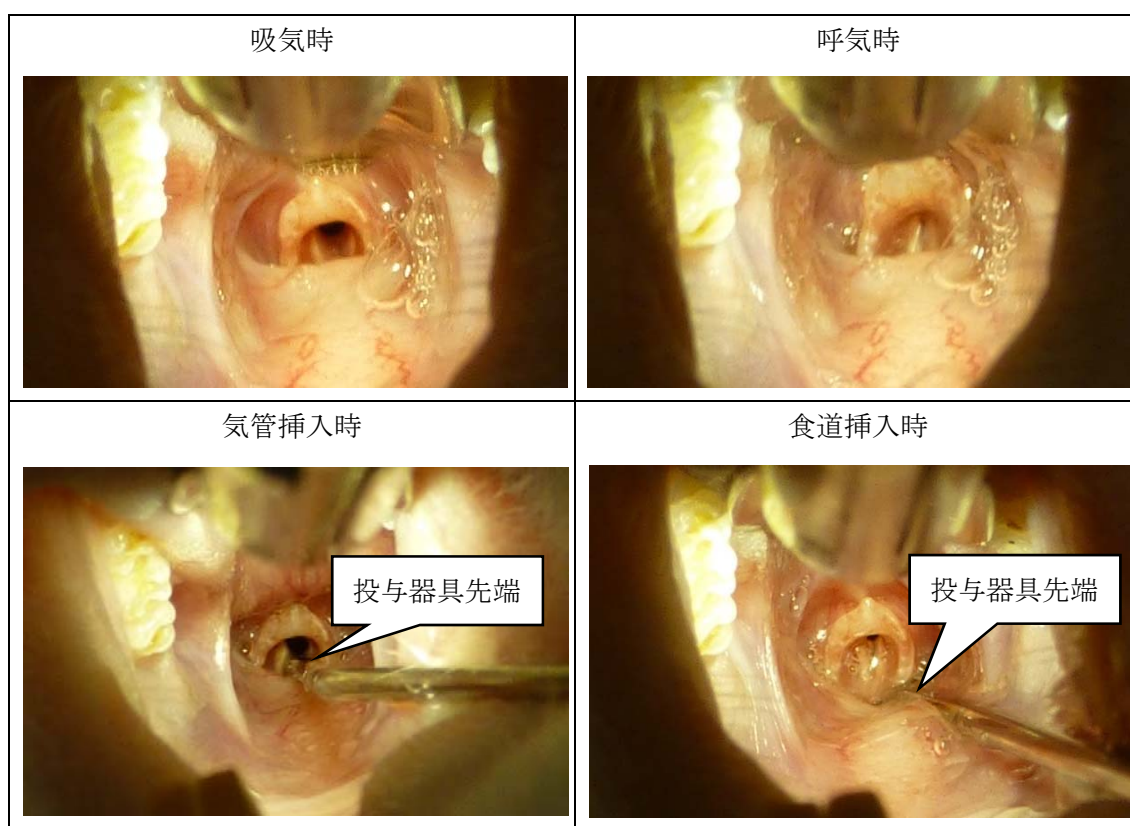


図 2 上段：喉頭鏡使用時のラット喉頭、下段：投与器具挿入時

MicroSprayer[®]のマニュアルによると、投与器具先端が気管支分岐部付近に相当する深度で投与することが最適であるとされている (<http://penncentury.com/wp-content/uploads/InstructionsForUse-PennCentury-MicroSprayerAerosolizer-IA-1B.pdf>)。体重約 250 g の F344/DuCr1Cr1j ラット (雄、12 週齢) では、口角から気管分岐部までの距離 (図 3、以下気道長という) は 6.4 ± 0.19 cm (平均 \pm 標準偏差) であり、約 6 cm の位置で投与することにより逆流なく投与可能である (18)。気管分岐部よりも深部まで挿入すると、投与液が片肺に著しく限局することが懸念される。一方、挿入位置が浅すぎると、投与液が消化管へ逆流し、肺のばく露量が減少して誤った毒性解釈につながる懸念がある。

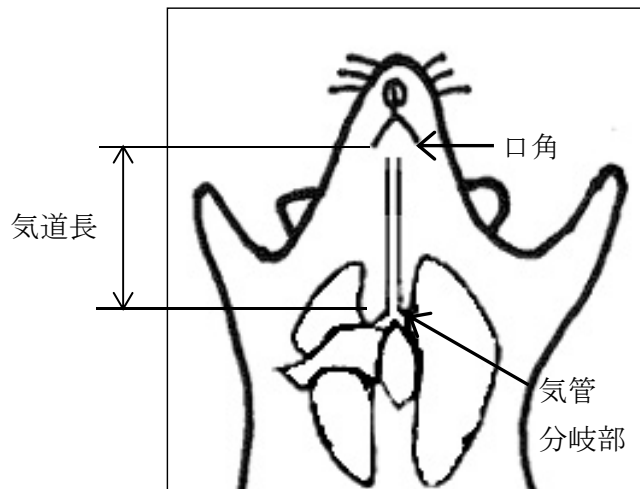


図3 ラットの気道長

d) 投与液量

既存の報告において使用されている投与液量は、おおむね 0.5~2.0 mL/kg の範囲であり (2, 18)、この範囲では一定用量のナノサイズ二酸化チタン投与により同等の急性炎症が誘発されることが報告されている (18)。

e) 投与速度

いずれのゾンデでも、投与液が液滴状にしたたるような低速度では、投与液が肺内で局在する懸念がある (17)。しかしながら、用手による投与時に投与速度を厳密にコントロールすることは現実的でない。そのため、経口ゾンデでは投与液が液滴にならないことを、スプレーゾンデではエアロゾル状に噴出されることを事前に確認する必要がある。なお、MicroSprayer®のマニュアルによると、器具内の微細構造のため、投与液を十分に微粒化するためには 700 psi 以上の圧力をかける必要がある。

f) 投与回数

単回~4回までの複数回投与において、投与総量が一定であれば同質の反応が誘発される (25-28)。動物への負荷や手技の簡略化を考慮すると、単回投与が推奨される。しかしながら、試験の目的、被験物質の調製限界濃度や目的とするばく露量に応じて決定可能である。

g) 投与手順の一例

事前に気管内投与に必要な器具等 (例: 表 1) を準備する。具体的な気管内投与手順の一例を表 2 に示す。

表 1 気管内投与に必要な器具等の例

経口ゾンデ又はスプレーゾンデ	ディスポーザブルシリンジ
保定台	喉頭鏡
ピンセット	麻酔薬及び麻酔装置

表 2 気管内投与手順

① 麻酔下のラットを仰向けの状態で保定台に乗せ、切歯を保定台のフック等に引っ掛けて固定する。
② あらかじめ算出した投与液量よりやや多めにシリンジに投与液を採取し、ゾンデを装着して通液し、ゾンデ内まで投与液を満たすとともにシリンジ内の投与液量を調節する。投与液採取の際は、必要に応じて攪拌等を行う。
③ 投与者は仰臥位に保定されたラットの頭側に構え、ピンセットを用いてラットの舌を引き出し、片手の指で把持する。
④ 喉頭鏡をラットの口腔内に挿入し、喉頭を視認する（図 2 参照）。この際、喉頭鏡のブレードで舌根部を抑えて視野を可能な限り広く確保する。喉頭鏡はシリンジを持たない方の手で保持する。
⑤ シリンジに取り付けた投与器具先端を口腔に入れ、喉頭口に向けてまっすぐ進めていき、気管内に挿入する。喉頭口及び周囲組織、粘膜を過度に刺激しないように注意する。また、麻酔深度によっては喉頭接触時に咽頭反射が起こるので注意する。
⑥ 投与器具が気管内に適切に挿入されたことを目視で確認する（図 2 参照）。また、投与器具により気管の輪状軟骨を触知することで、挿入の成否を確認できる。ただし、気管内壁を過度に刺激しないよう注意する。
⑦ 投与器具を適切な深度まで挿入し、一定の速度でシリンジ内の投与液を投与する。
⑧ 投与後は静かにゾンデを引き出す。投与後は一定時間（呼吸が安定する程度）保定を継続し、投与液が気管から流出しないよう注意する。この際、投与後に動物を片手で垂直位に保持し、ピペット用のスポイトゴム等で鼻から肺へ送気することにより、自発呼吸の回帰を促すことが可能である。

7. 観察期間及び観察頻度

観察期間の長さ及び観察頻度は実験の目的に応じて設定される。有害性スクリーニングを目的とした気管内投与試験では、投与後 4 週間から 3 か月程度の期間で、複数回解剖・検査を実施し、気管内投与による炎症反応を経時的に評価する (2)。ナノ材料を想定した有害性研究では、投与 24 時間後、3、7 及び 28 日後、3 か月後等で設定されていることが多い (29, 30) が、結晶質シリカのように気管内投与 3 か月後以降に肺で病変を形成することが想定される (31) 場合、亜慢性期の観察も検討すべきである。

8. 観察項目

一般的な毒性試験で実施される観察項目として、a) 一般状態観察及び b) 体重がある。その他、気管内投与試験では、被験物質の肺有害性を定量的かつ鋭敏に検出可能な BAL 検査が汎用される。また、気管内投与試験における病理組織学的検査の留意点について後述する。

a) 一般状態観察

気管内投与試験では、麻酔や投与操作による動物の反応と、被験物質の影響による毒性兆候との判別が重要となる。瀕死動物や、明瞭な苦悶状態、強く持続的な苦痛の兆候を示している動物は、人道的エンドポイントに関するガイダンス文書に要約された原則及び基準を考慮し、動物愛護の理由から速やかに安楽死させる。

b) 体重

全ての動物について、投与直前、死亡時又は安楽致死時のほか、必要に応じて体重を測定する。体重は毒性の重要な指標となる。

9. 解剖時麻酔法、BAL 液採取法、病理組織学的検査及び肺負荷量（肺内沈着量）

所定の観察期間経過後、ラットを麻酔下で放血して安楽死させ、血液検査、臓器重量測定等の一般的な毒性エンドポイントのための採材のほか、BAL 液を採取する。BAL 検査では、肺内を生理食塩液等で洗浄し、回収した洗浄液中の細胞成分及び可溶性成分を分析することにより、肺炎症関連指標を定量的に評価することが可能である。

2017 年に改訂された吸入毒性試験の OECD テストガイドラインでは BAL 検査が追加されており、特に表 3 に示す項目については測定が必須とされている (32)。同様に、気管内投与試験においても表 3 に示す項目は有害性評価の重要な指標となることから、測定すべきである。その他、実験の目的に応じて任意項目について測定可能である。なお、細胞分画では分類項目として肺胞マクロファージ、リンパ球、好中球、好酸球が挙げられ、その計測には塗抹標本の鏡検による計測又は機器を用いた計測がある (33)。本項では、肺有害性評価のための BAL 検査結果に影響する可能性がある解剖時麻酔法、BAL 液採取法及び病理組織学的検査法について記載した。

表 3 必須 BAL 検査項目及び関連指標

検査項目	関連指標
総細胞数及び細胞分画	炎症細胞浸潤
総蛋白又はアルブミン	肺血管透過性
乳酸脱水素酵素	肺構成細胞の細胞傷害性

a) 解剖時麻酔法

現在、様々な実験処置に広く使用されている吸入麻酔であるイソフルランは、BAL 検査値に影響せず (34-36)、鎮痛作用の強さ、操作性の高さから、主要な解剖時麻酔法として推奨される。一方、近年実験動物への適用が検討されている腹腔内麻酔として、メドトミジン・ミダゾラム・ブトルファノールの三種混合麻酔法（腹腔内麻酔）があるが、BAL 液中血管透過性マーカー（総蛋白及びアルブミン）の値に影響する (34, 35) ことから、使用は避けるべきである。従来は、腹腔内麻酔であるペントバルビタール及びケタミン・キシラジンの混合麻酔のほか、動物実験で汎用されていた吸入麻酔であるジエチルエーテルが中心に使

用されていた。しかしながら、ケタミン及びジエチルエーテルについては、前述 (III.6 a) 投与時麻酔) のとおり、使用を避けるべきであり、ペントバルビタールについても動物愛護の観点から、使用が控えられる傾向にある (35, 37)。

b) BAL 液採取法

目的とする測定項目に応じて、既存研究では多様な BAL 液採取法が用いられているが、両肺あるいは片肺から採取する方法に大別される。なお、同一個体の片肺を用いて BAL 液採取、他方の肺を用いて病理組織学的検査を行うことで動物数を削減可能である (例: 右肺を BAL 液採取、左肺を病理組織学的検査に使用)。作業者間や施設間でばらつきの少ない採取法の一例を以下に記載する。BAL 液採取に必要な器具等の例を表 4 に、採取操作の例を表 5 及び図 4 に示す。なお、洗浄液の一回の注入量は、少なくとも肺全体に十分に行き渡る量が必要である。洗浄を複数回行うことにより、細胞成分を効率よく回収することが可能である (38)。

表 4 BAL 液採取に必要な器具等の例

ディスポーザブルゾンデ	結紮用糸
滅菌生理食塩液 (洗浄液)	ディスポーザブルシリンジ外筒
延長チューブ	三方活栓
実験用アーム	BAL 液回収容器

表 5 BAL 液採取操作の例

① 麻酔下で放血して安楽死させた動物の頸部気管を露出させ、背側の食道を分離する。右葉から採取する場合は、左肺につながる気管支を結紮する。
② 気管腹側に割を入れ、ディスポーザブルゾンデを挿入し、気管支側で気管と結紮してゾンデを固定する。
③ 延長チューブを介してディスポーザブルシリンジ外筒と三方活栓を接続する。
④ シリンジ外筒に必要な量の生理食塩液を添加し、チューブ内及び三方活栓の凸コネクタ先端まで生理食塩液を満たす。
⑤ 一定の圧力で洗浄液を注入するため、シリンジ外筒は実験台上に置いた実験クランプで保持し、各個体で注入開始時の水面の高さが一定 (例: 30 cm) となるようにする。
⑥ 気管に結紮したゾンデと三方活栓を接続し、三方活栓のコックを操作して肺内へ自然落下により生理食塩液を注入・洗浄する (図 4 洗浄液注入時)。この際、肺葉の位置を変える、横隔膜を軽く引っ張る等により、全葉に生理食塩液をいきわたらせることが可能である。
⑦ 一定量の生理食塩液を注入後に三方活栓のコックを操作し、注入を止める (図 4 BAL 液回収時)。同時にもう一方の三方活栓の凹コネクタから BAL 液が得られるので、これを回収容器に回収する。

- ⑧ 検査に必要な量を考慮し、洗浄・回収操作を繰り返す。
- ⑨ 所定回数の BAL 液回収後、ゾンデに接続した三方活栓の凸コネクタをはずして三方活栓（及び延長チューブ）内に残った BAL 液を全て回収する。
- ⑩ 生理食塩液の注入量に対する BAL 液の回収率を算出する。

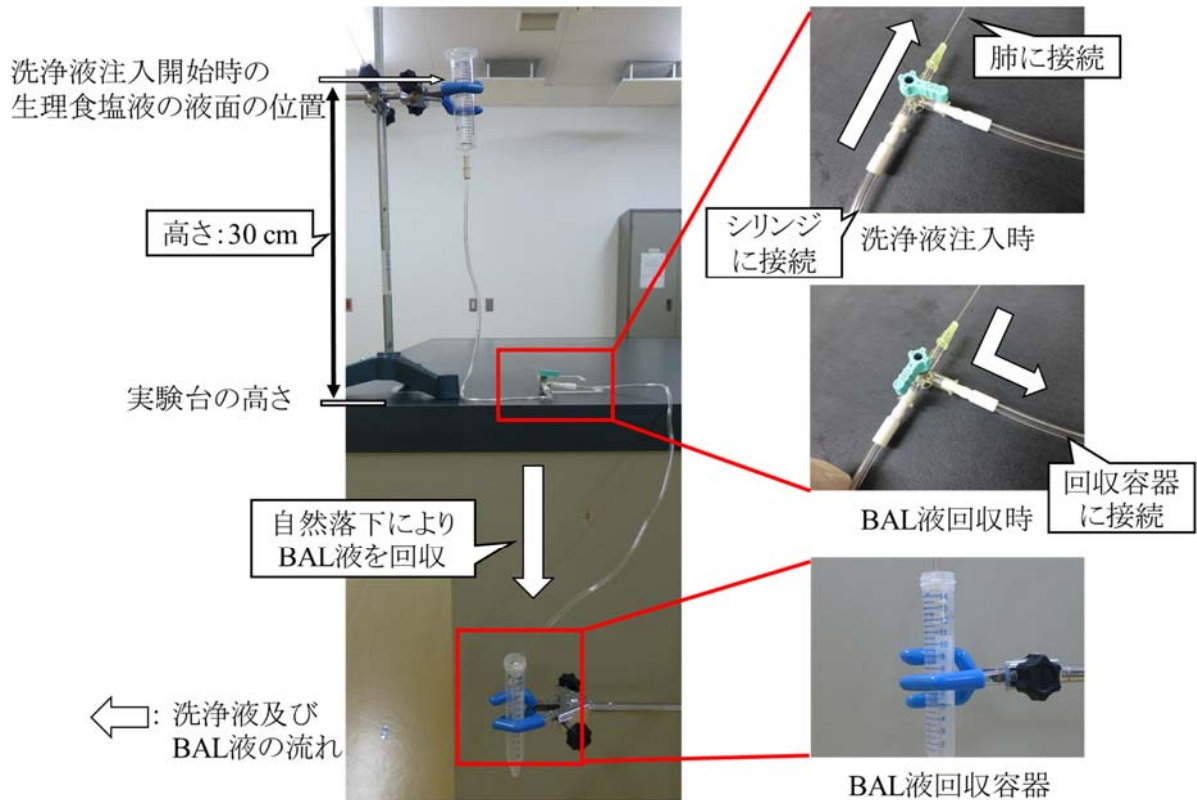


図4 BAL 液回収手順の例

c) 病理組織学的検査

吸入毒性試験のような呼吸器を主対象とした試験法では、全肺葉について病理組織学的検査を実施することが推奨されている (39)。気管内投与試験では、吸入毒性試験と比較し、被験物質の肺内での分布の偏りが生じやすい (17, 18, 22) ことから、同様に全肺葉について組織学的検査を行うことが望ましいが、同一個体の片肺を用いて BAL 液採取、他方の肺を用いて病理組織学的検査を行うことにより動物数の削減が可能である (例：右肺を BAL 液採取、左肺を病理組織学的検査に使用)。

d) 肺負荷量測定

2017 年に改訂された吸入毒性試験の OECD テストガイドラインでは、難溶性のエアロゾルが肺に保持されることが想定される場合は、肺負荷量測定を推奨している (32)。気管内投与試験においても、肺中の被験物質を測定可能な場合は、オプションとして肺負荷量測定を実施することが推奨される。肺負荷量測定を実施する場合は、分時換気量の大きい雄を使

用することが推奨される。また、クリアランス動態の情報を得るためには暴露後3時点での肺負荷量測定が望ましいが、クリアランスが非常に遅いかどうかの情報を得ることが主目的である場合は2時点での測定でも良い(32)。なお、肺負荷量はBAL液採取後の肺内及びBAL液中の被験物質量を定量、合算することで推定可能である(40、41、42)。したがって、右肺負荷量測定に限定するとサテライト群の設置が不要となり、動物数の削減が可能である(後述の気管内投与試験プロトコル案参照)。

IV. 投与技能確認について

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6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の例を示す。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。

表 6 気管内投与技術者の技能確認方法の例

	技能項目	技能確認法
第一段階 (解剖不要)	喉頭鏡操作に関する技能	<ul style="list-style-type: none"> ・ 喉頭の解剖学的構造を理解するとともに、喉頭鏡を用いて器具挿入箇所（喉頭口）を視認できる。
	投与操作に関する技能	<ul style="list-style-type: none"> ・ 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 (解剖必要)	投与操作に関する技能（投与液分布）	<ul style="list-style-type: none"> ・ 喉頭への逆流なく投与液を投与可能である。 ・ 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を確認できる。
	投与操作に関する技能（炎症反応）	<ul style="list-style-type: none"> ・ 媒体等を投与し、異常が認められないことを BAL 検査等により確認できる。 ・ 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を BAL 検査等により確認できる。

V. まとめ（推奨試験方法）

本手順書では、プロジェクトの成果及び関連する既存の報告をまとめ、再現性の高い手技で気管内投与試験を実施するための留意点及び投与技術者の技能確認法を記載した。これらを踏まえ、推奨される標準的な試験実施手順のフローを次に示す。いずれの試験条件についても、各実施施設で一定の手技で実施することが最も重要である。

調製法の決定及び媒体の選択

- ・ 被験物質（ナノ材料を含む）の物理化学特性を踏まえ、分散状態の優れた媒体及び調製法を決定する。
- ・ 投与液の分散状態、粒径分布及び濃度を測定する。
- ・ 媒体の動物への影響を明らかにする。

投与器具の選択

- ・ 入手及び利用可能な投与器具を用いる。ただし、スプレーゾンデを使用する場合は、ゾンデ通過によって投与液の濃度、粒径分布等に変化がないことを事前に確認する。

投与用量及び対照群の設定

- ・ 複数の用量段階を設定する。
- ・ 目的に応じて適切な対照群を設定する。

投与回数

- ・ 基本的には単回投与とする。
- ・ 投与液の調製限界濃度等を考慮し、複数回投与を実施することも可能である。

投与操作

- ・ イソフルラン等の適切な麻酔下で気管内投与を行う。
- ・ 投与器具先端が気管分岐部付近（ただし気管支に到達してはならない）にあることに留意する。
- ・ 経ロゾンデ使用時は投与液が液滴状にならない速度で、スプレーゾンデ使用時は投与液が十分にエアロゾル化される速度で押し込むことを留意する。
- ・ 投与液量は 0.5～2.0 mL/kg の範囲で設定する。
- ・ 投与直後は一定時間保定を継続し、投与液の逆流予防に努める。

解剖時麻酔

- ・ イソフルラン等の適切な麻酔下で放血し、安楽死させる。

BAL 液採取

- ・ 一定の手技で BAL 液を採取する。
- ・ 両肺又は片肺（右肺）から採取する。

病理組織学的検査

- ・ 主要な気管支を含む面で病理組織標本を作製する。

- ・ 全肺葉又は片肺（左肺）について組織学的検査を行う。

肺負荷量測定

- ・ サテライト群を設置して全肺葉又は片肺の BAL 液採取を行った後の肺（右肺）を用いて肺負荷量を測定する。
- ・ BAL 液採取後の肺を用いる場合は、BAL 液採取後の肺内及び BAL 液中の被験物質（BAL 液回収量から算出）を定量、合算することで右肺の総負荷量を推定可能である。
- ・ 暴露後 3 時点での肺負荷量を測定する。なお、クリアランスが非常に遅いかどうかの情報を得ることが主目的である場合は 2 時点での測定でも良い。

気管内投与試験プロトコール案

本プロジェクトの検討を踏まえて、28 日間反復吸入毒性試験を想定したスクリーニングとしての気管内投与試験のプロトコールの一例を以下及び表 7 に示す。各手順、検査項目等は、前述の手順書に記載した各項目を参照すること。

- ①使用動物：雄ラット
- ②投与方法：単回気管内投与
- ③観察（飼育）期間：28 日間
- ④試験群数：媒体対照群及び 3 用量群（計 4 群）
- ⑤使用動物数：各解剖期 5 匹（各群 10 匹）、計 40 匹
- ⑥検査項目：各検査は同一の動物及び項目について、以下の観察、検査を実施する。
 - a) 一般状態観察（毎日）
 - b) 体重測定（1 回/週以上）
 - c) BAL 検査：右肺より BAL 液採取
 - d) 剖検観察
 - e) 臓器重量測定：肺重量（その他の主要臓器は必要に応じて実施）
 - f) 病理組織学的検査：肺（左肺）、気管支及び肺関連リンパ節（その他の主要臓器は必要に応じて実施）
 - g) 被験物質の肺負荷量（肺内沈着量）測定：測定可能な被験物質についてはオプションで実施
 - ・ BAL 液採取を行った後の右肺を用いてから肺負荷量を測定する。
 - ・ BAL 液中の被験物質濃度を測定し、BAL 液回収量から算出する。
 - ・ BAL 液採取後の右肺と BAL 液の負荷量の計測から、右肺の総負荷量を算定する。
 - h) その他必要に応じて、血液学的検査、血液生化学的検査及び摂餌量測定等、同一動物を用いて実施可能である。

表 7 気管内投与試験プロトコール案

群	動物数	Day1	Day2	Day3	Day4	Day5-28	Day29
媒体対照	10 匹	投与			<投与後 3 日> ・BAL 検査 ・剖検観察 ・臓器重量測定 ・病理組織学的検査 ・肺負荷量測定 ^{a)} ・血液・生化学的検査 ^{a)} ・摂餌量測定 ^{a)}		<投与後 28 日> ・BAL 検査 ・剖検観察 ・臓器重量測定 ・病理組織学的検査 ・肺負荷量測定 ^{a)} ・血液・生化学的検査 ^{a)} ・摂餌量測定 ^{a)}
低用量	10 匹						
中用量	10 匹						
高用量	10 匹						

一般状態観察（毎日）、体重測定（1 回/週以上）を実施

a) 必要に応じて追加実施

VI. 参考文献

- 1) Krug H. F. (2014). Nanosafety Research—Are We on the Right Track? *Angew Chem* 53 12304-19. doi 10.1002/anie.201403367.
- 2) Driscoll K. E., Costa D. L., Hatch G., Henderson R., Oberdorster G., Salem H., Schlesinger R. B. (2000). Intratracheal instillation as an exposure technique for the evaluation of respiratory tract toxicity: uses and limitations. *Toxicol Sci.* 55(1): 24-35.
- 3) OECD (2009). Test Guideline 403. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute Inhalation Toxicity Testing.
- 4) OECD (2009). Test Guideline 412. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Subacute Inhalation Toxicity: 28-Day Study.
- 5) Baisch B. L., Corson N. M., Wade-Mercer P., Gelein R., Kennell A. J., Oberdörster G., Elder A. (2014). Equivalent titanium dioxide nanoparticle deposition by intratracheal instillation and whole body inhalation: the effect of dose rate on acute respiratory tract inflammation. Part. Fibre. *Toxicol.* 11(18).
- 6) Rehn B., Seiler F., Rehn S., Bruch J., Maier M. (2003). Investigation on the inflammatory and genotoxic lung effects of two types of titanium dioxide: untreated and surface treated. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 189: 84-95.
- 7) Renwick L.C., Brown D., Clouter A., Donaldson K. (2004). Increased inflammation and altered macrophage chemotactic responses caused by two ultrafine particle types. *Occup. Environ. Med.* 61: 442-447.
- 8) OECD (2012). Guidance on Sample Preparation and Dosimetry for the Safety Testing of

Manufactured Nanomaterials. ENV/JM/MONO(2012) 40.

- 9) Oberdorster G. (2000). Determinants of the pathogenicity of manmade vitreous fibers (MMVF). *Int Arch Occup Environ Health* 73 (Suppl): 60–68.
- 10) Morimoto Y., Horie Y., Kitajima S., Fukushima S., Takebayashi T. (2013). Comparison of data between intratracheal instillation and inhalation studies for Estimation of Harmful Effects of Manufactured Nanomaterials (in Japanese). *Jpn. j. Hyg.* 68: 161-167. doi 10.1265/jjh.68.161.
- 11) Oyabu T., Morimoto Y., Hirohashi M., Horie M., Kambara T., Lee B. W., Hashiba M., Mizuguchi Y., Myojo T., Kuroda E. (2013). Dose-dependent pulmonary response of well-dispersed titanium dioxide nanoparticles following intratracheal instillation. *J. Nanoparticle Research* 15: 1600.
- 12) Sayes C. M., Reed K.L., Warheit D.B. (2007). Assessing toxicity of fine and nanoparticles: comparing in vitro Measurements to in vivo pulmonary toxicity profiles. *Toxicol. Sci.* 97(1): 163-180.
- 13) Gosens I., Post J. A., Fonteyne L. J., Jansen E. H., Geus J. W., Cassee F. R., Jong W. H. (2010). Impact of agglomeration state of nano- and submicron sized gold particles on pulmonary inflammation. *Part. Fibre. Toxicol.* 7 (37).
- 14) Morimoto Y., Hirohashi M., Ogami A., Oyabu T., Myojo T., Nishi K., Kadoya C., Todoroki M., Yamamoto M., Murakami M., Shimada M., Wang W., Yamamoto K., Fujita K., Endoh S., Uchida K., Shinohara N., Nakanishi J., Tanaka I. (2010). Inflammogenic effect of well-characterized fullerenes in inhalation and intratracheal instillation studies. *Part. Fibre. Toxicol.* 7: 4
- 15) Höhr D., Steinfartz Y., Schins R. P., Knaapen A. M., Martra G., Fubini B., Borm P. J. (2002). The surface area rather than the surface coating determines the acute inflammatory response after instillation of fine and ultrafine TiO₂ in the rat. *Int J Hyg Environ Health.* 3: 239-44.
- 16) Sager T. M., 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).
- 17) Hasegawa-Baba Y., Kubota H., Takata A., Miyagawa M. (2014). Intratracheal instillation methods and the distribution of administered material in the lung of the rat. *J. Toxicol Pathol.* 3-4: 197-204.
- 18) Kobayashi T., Oshima Y., Tsubokura Y., Hashizume N., Ajimi S., Kayashima T., Nakai N., Sasaki T., Kawaguchi K., Imatanaka N. (2016). Effects of dose volume and delivery device on bronchoalveolar lavage parameters of intratracheally administered nano-sized TiO₂ in rats *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 81: 233-241.
- 19) Kobayashi N., Naya M., Endoh S., Maru J., Yamamoto K., Nakanishi J. (2009). Comparative pulmonary toxicity study of nano-TiO₂ particles of different sizes and agglomerations in rats: Different short- and long-term post-instillation results. *Toxicology.* 264: 110
- 20) Silva R. M., Teesy C., Franzi L., Weir A., Westerhoff P., Evans J. E., Pinkerton K. E. (2013).

- Biological response to nano-scale titanium dioxide (TiO₂): role of particle dose, shape, and retention. *J Toxicol Environ Health A*. 76 (16): 953-72.
- 21) Lauten E. H., VerBerkmoes J., Choi J., Jin R., Edwards D. A., Loscalzo J., Zhang Y. Y. (2010). Nanoglycan Complex Formulation Extends VEGF Retention Time in the Lung. *Biomacromolecules* 11: 1863–1872.
 - 22) Brain J. D., Knudson D. E., Sorokin S. P., Davis M. A. (1976). Pulmonary distribution of particles given by intratracheal instillation or by aerosol inhalation. *Environ Res*. 11: 13–33.
 - 23) Costa D. L., Lehmann J. R., Harold W. M., Drew R. T. (1986). Transoral tracheal intubation of rodents using a fiberoptic laryngoscope. *Lab Anim Sci*. 36 (3): 256-61.
 - 24) Oka Y., Mitsui M., Kitahashi T., Sakamoto A., Kusuoka O., Tsunoda T., Mori T., Tsutsumi M. (2006). A reliable method for intratracheal instillation of materials to the entire lung in rats. *J. Toxicol Pathol*. 19: 107–109.
 - 25) 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 responses of titanium dioxide nanoparticles in rats (in submission).
 - 26) 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. *J. Occup. Health*. Doi: 10.1539/joh. 16-0184-OA
 - 27) Suzuki M., Kano H., Senoh H., Ohnishi M., Fukushima S. Comparison of single and multiple intratracheal administrations of MWNT-7 on pulmonary distribution and time-dependent changes in rats (in submission).
 - 28) Reasor M. J., Antonini J. M. (2001). Pulmonary responses to single versus multiple intratracheal instillations of silica in rats. *J. Toxicol. Environ. Health A* 62: 9–21.
 - 29) Oberdörster G., Maynard A., Donaldson K., Castranova V., Fitzpatrick J., Ausman K., Carter J., Karn B., Kreyling W., Lai D., Olin S., Monteiro-Riviere N., Warheit D., Yang H. (2005). A report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute Nanomaterial Toxicity Screening Working Group. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. Part. *Fibre. Toxicol*. 2 (8).
 - 30) Bonner J. C., Silva R. M., Taylor A. J., Brown J. M., Hilderbrand S. C., Castranova V., Porter D., Elder A., Oberdörster G., Harkema J. R., Bramble L. A., Kavanagh T. J., Botta D., Nel A., Pinkerton K. E. (2013). Interlaboratory Evaluation of Rodent Pulmonary Responses to Engineered Nanomaterials: The NIEHS Nano GO Consortium. *Environ. Health. Perspect*. 121 (6).
 - 31) Kajiwara T., Ogami A., Yamato H., Oyabu T., Morimoto Y., (2007). Tanaka, Isamu Effect of Particle Size of Intratracheally Instilled Crystalline Silica on Pulmonary Inflammation. *J. Occup.*

- Health. 49: 88-94.
- 32) OECD. (2017). Guideline for the Testing of Chemicals, No.412, October 9, 2017, “28-Day (Subacute) Inhalation Toxicity Study”
 - 33) Mathers R.A., Evans G.O., Bleby J., Tornow T., (2007). Total and differential leucocyte counts in rat and mouse bronchoalveolar lavage fluids using the Sysmex XT-2000iV. *Comp. Clin. Pathol.* 16: 29-39.
 - 34) Senoh H., Kano H., Suzuki M., Kondo H., Takanobu K., Umeda Y., Aiso S., Fukushima S., (2015). Limited application of the three drug-mixed anesthesia for bronchoalveolar lavage fluid sampling (in Japanese). *Sangyo Eiseigaku Zasshi.* 58 (1): 21-24. doi: 10.1539/sangyoeisei.C15004
 - 35) Tsubokura Y., Kobayashi T., Oshima Y., Hashizume N., Nakai M., Ajimi S., Imatanaka N., (2016). Effects of pentobarbital, isoflurane, or medetomidine-midazolam-butorphanol anesthesia on bronchoalveolar lavage fluid and blood chemistry in rats. *J. Toxicol. Sci.* 41 (5) : 595-604.
 - 36) Takehara H., Makita M., Tanaka R., Tsuchiya M., Naya M., Hayashi M. (2014). Lung toxicity assessment using bronchoalveolar lavage fluid and pleural lavage fluid cytology by intratracheal treatment in rats. *J. Toxicol. Sci.* 39: 141-145.
 - 37) Richardson, C., A., and Flecknell, P., A., 2005. Anaesthesia and post-operative analgesia following experimental surgery in laboratory rodents: are we making progress? *Altern. Lab. Anim.* 33: 119-127.
 - 38) OECD. (2010). Guidance Document on Histopathology for Inhalation Toxicity Studies, Supporting TG 412 (Subacute Inhalation Toxicity: 28-day Study) and TG 413 (Subchronic Inhalation Toxicity: 90-day Study), ENV/JM/MONO (2010) 20.
 - 39) Ruehl-Fehlert C., Kittel B., Morawietz G., Deslex P., Keenan C., Mahrt C. R., Nolte T., Robinson M., Stuart B. P., Deschl U. (2003). Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice – Part 1. A joint publication of the RITA and NACAD groups. *Exp. Toxic. Pathol.* 55: 91–106.
 - 40) 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* 5 (325): 1-11.
 - 41) 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 (8): 1050-1058.
 - 42) Shinohara N., Zhang G., Oshima Y., Kobayashi T., Imatanaka N., Nakai M., Sasaki T., Kawaguchi K., Gamo M., (2017). Kinetics and dissolution of intratracheally administered nickel oxide nanomaterials in rats. *Part. Fibre. Toxicol.* 14 (1): 48.