

# 工業ナノ材料の経気道的動物暴露による有害性評価試験方法のガイドライン

## 序

工業ナノ材料の有害性評価は、施設間で結果が異なることがあるが、これは、実験動物に投与される試料の物理化学的特性に差異があることが一因と考えられる。特に、工業ナノ材料を構成するナノ粒子は凝集性が非常に強いため、たとえ分散したとしても、すぐに巨大粒子塊を形成し、暴露された生体反応に質的量的差異を生じる。よって、工業ナノ材料の有害性評価においては、試料の分散の安定性を確保し、物理化学的特性を評価して動物暴露試験を行うことが重要である。

経気道的動物暴露試験には、主なものとして、吸入暴露試験や気管内注入試験がある。本書は、試料の分散の安定性の確保を実現するために必要な手順を含んだ吸入暴露試験方法、そして、吸入暴露試験方法より容易にかつ低コストで実施できる気管内注入試験方法のガイドラインを示すものである。

## 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計測し、評価する。

## 2. 暴露の方法

### 2. 1 4週間吸入暴露

#### 2. 1. 1 目的

これは、凝集しやすいナノ粒子の分散性を確保して、呼吸による暴露を再現する、実現可能で信頼性の高い工業ナノ材料の有害性評価試験方法であり、一般化学物質を対象とした実験動物の吸入暴露による有害性評価試験方法の既存のものを基礎として、開発された。

この試験方法は、工業ナノ材料についてヒトの急性から亜慢性の生体反応を外挿し得る結果を得ることを目的とし、4週間の動物吸入暴露によって、それに対応した生体影響のエンドポイントを計測するものである。

#### 2. 1. 2 試験方法

工業ナノ材料の試験物質について、懸濁液を噴霧分散法で気中に分散し、これを実験動物に吸入暴露させる。はじめに、粉体状の試験物質を水中に分散し試料懸濁液を作成する。この懸濁液を加圧噴霧してエアロゾルとする。

微小粒子を気中に分散する方法には、この湿式分散法の他に、試験物質を直接分散させる乾式分散法がある。湿式分散法の利点は、1) ナノサイズのエアロゾルにまで分散できること、2) 試験物質が暴露直前まで溶液状態にあり、取扱い者が誤って暴露する可能性

が少ないことである。湿式分散法の欠点は、乾式分散法のように質量濃度を高くできないことである。ただし、乾式分散法ではミクロンサイズの凝集体粒子も多く含んでいる。

以下、試験物質、実験動物、吸入暴露装置及び測定装置について、方法及び記録すべき項目を示す。

### (1) 試験物質

粉体状の試験物質、試料懸濁液、吸入するエアロゾルについて、以下に示す項目を可能な限り測定する。吸入するエアロゾルについては、暴露期間中、定期的に測定し、その測定方法、測定条件、測定結果を記録する。

- 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、形状・形態、ゼータ電位、粒子分散剤の種類と濃度、分散媒の種類と組成純度、懸濁液の分散安定性、懸濁液のエンドトキシン量
- ③ 吸入するエアロゾル  
粒径分布、形状・形態、粒子のアスペクト比等の形状計測、質量及び個数濃度とその安定性

### (2) 実験動物

実験動物には、試験開始時に8～10週齢のWistar系雄性ラット（ウイルス抗体free（SPF））を用いる。

- ① 吸入暴露前  
ランダムに低用量暴露群、高用量暴露群、陰性対照群の3群に、平均体重がほぼ同程度になるように分ける。一群の体重のばらつきは、±20%以内とする。環境馴化のために、開始前に5日間以上、暴露環境で飼育する。飼料はラット用飼料（GLP対応で低タンパク質のものが望ましい）を用い、水・飼料とも自由摂取させる。
- ② 吸入暴露中  
ラットを収容したケージを暴露チャンバー内に置き、各群についてそれぞれ1日6時間、週5日の4週間の吸入暴露を行う。暴露中は給水、給餌は行わない。毎日の暴露終了後は、水・飼料とも自由摂取させる。
- ③ 暴露終了後の観察期間中  
ラットは、温度 $20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 20\%$ で飼育する。水・飼料とも自由摂取をする。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い、毎週一回以上、体重測定を行う。陰性対照群と試料投与群の体重間に有意差が認められた場合には、ペアフィーディングを行い、体重を合わせるようにする。  
観察期間中に死亡したラットは、できる限り早急に解剖を行い、肉眼的観察とともに病理組織学的検査を行い、死因について明らかにするように努める。  
瀕死のラットは、回復が期待できない場合は安楽死させ、全身状態や各臓器に肉眼

的变化があれば記録し、病理組織学的検査を行う。

#### ④ 解剖

解剖は、暴露終了から3日後、1か月（4週間）後、3か月（12週間）後に各群からランダムに採取したラットについて行う。各タイムポイントでの解剖匹数は、各群とも5匹以上が望ましい。

### (3) 吸入暴露装置

吸入暴露装置は、エアロゾル発生装置、暴露チャンバー、エアロゾル測定装置から成る。図に吸入暴露装置の構成の例を示す。

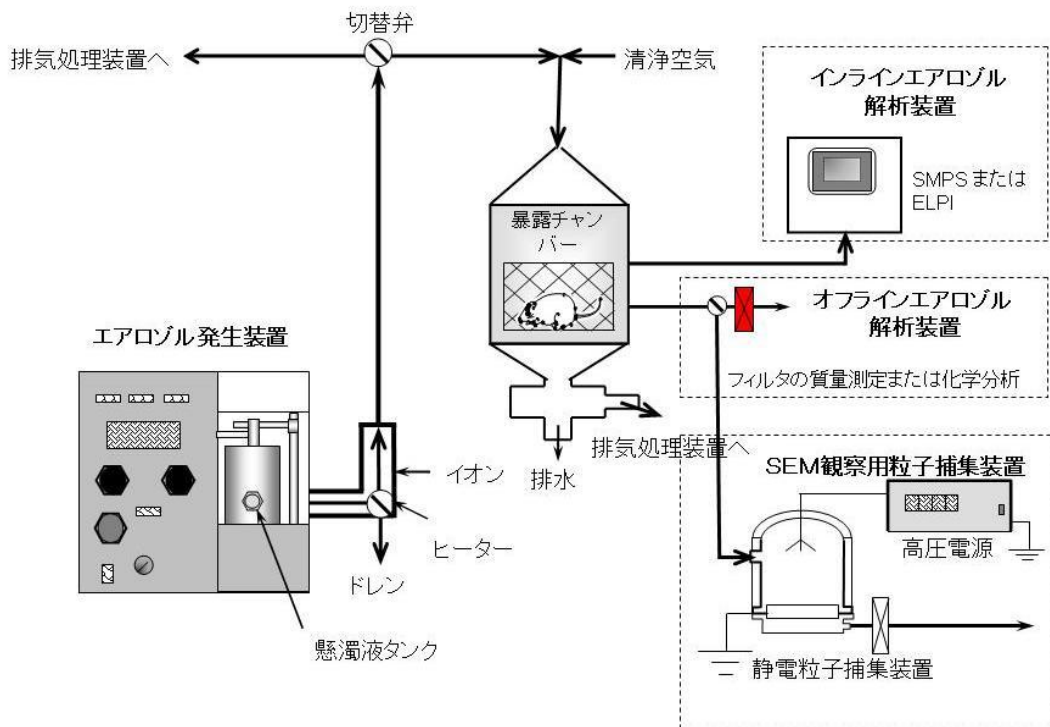


図 装置の構成例

#### ① エアロゾル発生装置

試験物質のエアロゾル発生には、懸濁液を加圧噴霧の後、乾燥してエアロゾルとする装置を用いる。

エアロゾル発生装置は、1回の試料投入で連続6時間以上、試験エアロゾルを供給できるものが望ましい。

発生装置の設定された運転条件における懸濁液の消費量を求めて、暴露期間に必要な懸濁液を確保する。

試料懸濁液について、事前に粒子が分散していることを目視で確認する。

懸濁液の分散剤についても影響のないことを確認するため、陰性対照として、分散剤のみをエアロゾル化して供給する。

## ② 暴露チャンバー

40匹のラットを収容できる大型全身暴露チャンバー（有効容積約350リットル）を用いる。高濃度と低濃度用の試験物質エアロゾル用と、陰性対照として分散剤のエアロゾルを供給する暴露チャンバーの3種類を用意する。

換気回数は毎時20回以上とする（換気流量で約120リットル/分）。チャンバー内は、温度 $20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 20\%$ に維持する。暴露チャンバーの排気は、HEPAフィルタや活性炭を用いて有害物を除去する。

## ③ エアロゾル測定装置

（4）に示す測定装置を用いて、吸入暴露時の粒度分布等の確認と濃度の安定性の評価はリアルタイムエアロゾル計測装置を用いる。試験物質の質量濃度は、フィルタサンプラを用いて測定を行う。

## （4）測定装置

暴露チャンバー内のエアロゾルの測定は、リアルタイム・エアロゾル計測装置及びフィルタサンプラによって行う。

### ① リアルタイム・エアロゾル計測装置

走査型電気移動度粒子分析装置（Scanning mobility particle sizer）、電気式減圧インパクト（Electrical low pressure impactor）等によって、エアロゾルの粒度分布を暴露日に数回計測する。粉じん計や凝縮式粒子計測器（Condensation particle counter）によって、相対濃度や個数濃度の連続計測を暴露中に行うことが望ましい。

### ② フィルタサンプラ

暴露期間中、暴露チャンバーから一定量の空気をろ過吸引し、フィルタから粒子を捕集する。採取した試料について質量濃度、化学分析を行う。また、フィルタ又は静電気粒子捕集装置を用いて電子顕微鏡観察用サンプルを採取し、試料の粒子の形態と粒度分布を計測する。

## （5）暴露装置運転条件

事前に設定した以下の暴露装置運転条件に基づいて、条件を確認・記録しながら暴露を行う。

### ① 時間

暴露開始時刻、暴露終了時刻

### ② 作動している暴露チャンバー空気質の条件

温度、湿度、換気量、内圧、

### ③ 作動している粒子発生装置

供給空気圧、発生装置からの空気流量、乾燥用加熱装置の温度、懸濁液消費量

### ④ 質量濃度測定用サンプラ

サンプリング空気量、サンプリング開始時刻・終了時刻

## 2. 2 気管内注入投与

### 2. 2. 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、工業ナノ材料についてヒトの急性から亜慢性の生体反応を外挿し得る結果を得ることを目的とし、気管内注入投与によって、それに対応した生体影響のエンドポイントを計測するものである。

### 2. 2. 2 試験方法

#### (1) 試験物質

粉体状の試験物質、試料懸濁液について、以下に示す項目を可能な限り測定する。

##### 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、形状・形態、ゼータ電位、pH、粒子分散剤の種類と濃度、分散媒の種類と組成純度、懸濁液の分散安定性、懸濁液のエンドトキシン量

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8～10週齢のWistar系雄性ラット（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る。できれば、試験物質の2用量以上の群を用意することが望ましい。その際、分散溶媒のみの陰性対照群も用意する。一群の体重のばらつきは、±20%以内とする。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する。

##### 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用量以上が望ましい。陰性対照群は、分散溶媒のみを同容量投与する。

ジエチルエーテル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する。すべての器具は、使用前に滅菌を行う。

##### 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する。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い、毎週一回以上、体重測定を行う。陰性対照群と試料投与群の体重間に有意差が認められた場合には、ペアフィーディングを行い、体重を合わせるようにする。

観察期間中に死亡したラットは、できる限り早急に解剖を行い、肉眼的観察とともに病理組織学的検査を行い、死因について明らかにするように努める。

瀕死のラットは、回復が期待できない場合は安楽死させ、全身状態や各臓器に肉眼的変化があれば記録し、病理組織学的検査を行う。

#### ④解剖

低用量試料投与群、高用量試料投与群、陰性対照群の3群とも、投与後3日後、1週間後、1、3、6か月後に解剖を行い、可能であれば12、24か月目にも解剖を行うことが望ましい。各解剖時期において一群当たり5匹以上が望ましい。

### 3. 評価項目と評価方法

#### 3.1 評価の概略

経気道的動物暴露による有害性評価試験では、以下の検討の結果を総合的に勘案することによって、試験物質の有害性評価を決定する。

- ① 試験物質によって発生する生体反応のうち、ヒトの病態を外挿し得る反応、又は、その病態を把握する信頼性の高いサロゲートマーカー等の複数のエンドポイントを設定すること
- ② 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、質的及び量的反応を把握し、その反応と暴露物質濃度、投与期間との関連、「量-影響関係」を見いだすこと
- ③ エンドポイント間の整合性を検討すること

#### 3.2 評価項目

以下の項目を評価する。

##### (1) 肺組織

経時的な病理組織検査、つまり、炎症性変化・線維性変化、腫瘍の発生の有無等を評価する。

##### (2) 気管支肺胞洗浄液（BALF）

BALFによって回収される成分は、細胞成分と非細胞成分とから成る。細胞成分に関して、BALFの好中球数は、炎症性細胞の浸潤の指標となる。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、LDH放出量は細胞障害性の指標であり、サイトカイン濃度の定量も炎症性の指標として有用である。

##### (3) 他臓器組織

重量測定及び病理組織学的検査の対象として、通例以下の器官・組織が選択されるが、

肉眼的所見等からの判断によって、適宜削減又は追加する。

重量測定：肺、肝臓、脾臓、腎臓、精巣、脳

病理組織学的検査：肺門・縦隔リンパ節、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、精巣、脳

投与期間中の死亡例は、すみやかに剖検し、器官・組織の肉眼的観察のほか、必要に応じ、器官重量の測定、病理組織学的検査を行い、死因とその時点での毒性変化の程度とを明らかにするよう努める。

### 3. 3 検査の実施

検査は、肺重量測定 → BALF採取 → 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。

#### (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後、気管支を鉗子等にてクランプする。シリンジ内の生理食塩水をカテーテルを通して右肺に注入する。

ラットの場合、1回の片肺注入量は、約5～10mlでほぼ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。気管支肺胞洗浄液中のタンパク分析等を行う場合は、採取開始後初めの15mlの上清液を用いる。細胞数の解析を行う際には、計50ml回収し、以下、細胞数や細胞分画の計測を行う。

#### (3) 肺組織の固定

BALF採取終了後、気管支のクランプを外し、カニューレから固定液、10%中性ホルマリン又は4%パラホルムアルデヒドを、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。

なお、病理組織標本としては、左肺を用いる。

また、分子生物学的検査を行う場合は、BALFを採取せず、湿重量測定後、ホモジナイズし、RNAやタンパクを抽出する。

#### (4) 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する。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ることができる。固定時間は、ホルマリンと同様に24時間とする。

### 3. 4 肺の病理組織学的評価

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する。

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する。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、マッソン・トリクローム染色やエラスチカ・ワンギーゾン染色を行う。

肺病理所見に関して、炎症細胞浸潤、間質や胸膜のコラーゲン沈着、腫瘍又は気道上皮細胞や肺胞上皮細胞の過形成、気腫様変化等の所見について観察ポイント（解剖ポイント）ごとに記述する。

炎症性変化と線維性変化については、定量的な評価を行う目的で、附属書に示すポイントカウンティング法を用いることができる。

#### 4. 参考文献

1) OECD (2009), Subacute Inhalation Toxicity: 28-Day Study, Revised Test Guideline No 412, Environment Directorate, OECD, Paris.

2) Note Q, Commission Directive 97/69/EC of 5 December 1997 adapting to technical progress for the 23rd time Council Directive 67/548/EEC on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labelling of dangerous substances. substances. Official Journal of the European Communities, 13 December 1997,

3) 吸入毒性（毒性試験講座9）, 和田攻、内田巖雄、香川順ほか編 1992 地人書館 ISBN-10: 4805203293

4) Shimada M, Wang WN, Okuyama K, Myojo T, Oyabu T, Morimoto Y, Tanaka I, Endoh S, Uchida K, Ehara K, Sakurai H, Yamamoto K, Nakanishi J. 2009. Development and Evaluation of an Aerosol Generation and Supplying System for Inhalation Experiments of Manufactured Nanoparticles. *Environ. Sci Tech* 43(14): 5529–5534.

5) 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. 2010. Inflammogenic effect of well-characterized fullerenes in inhalation and intratracheal instillation studies. Part. *Fibre Toxicol.* Mar 14;7:4

6) Driscoll, K. E., D. L. Costa, G. Hatch, R. Henderson, G. Oberdorster, H. Salem, and R. B. Schlesinger. "Intratracheal Instillation as an Exposure Technique for the Evaluation of Respiratory Tract Toxicity: Uses and Limitations." *Toxicol Sci* 55, no. 1 (2000): 24-35.

7) Ogami, A., Y. Morimoto, T. Myojo, T. Oyabu, M. Murakami, M. Todoroki, K. Nishi, C. Kadoya, M. Yamamoto, and I. Tanaka. "Pathological Features of Different Sizes of Nickel Oxide Following Intratracheal Instillation in Rats." *Inhal Toxicol* 21, no. 10 (2009): 812-8.

8) Ogami, A., Y. Morimoto, T. Myojo, T. Oyabu, M. Murakami, K. Nishi, C. Kadoya, and I. Tanaka. "Histopathological Changes in Rat Lung Following Intratracheal Instillation of Silicon Carbide Whiskers and Potassium Octatitanate Whiskers." *Inhal Toxicol* 19, no. 9 (2007): 753-8.

9) Kajiwara, T., A. Ogami, H. Yamato, T. Oyabu, Y. Morimoto, and I. Tanaka. "Effect of Particle Size of Intratracheally Instilled Crystalline Silica on Pulmonary Inflammation." *J Occup Health* 49, no. 2 (2007): 88-94.



10) Ogami, A., Y. Morimoto, H. Yamato, T. Oyabu, T. Kajiwara, and I. Tanaka. "Patterns of Histopathological Change Determined by the Point Counting Method and Its Application for the Hazard Assessment of Respirable Dust." *Inhal Toxicol* 16, no. 11-12 (2004): 793-800.

## 附属書 ポイントカウンティング法

### 1. 肺組織の炎症度の定量化の例

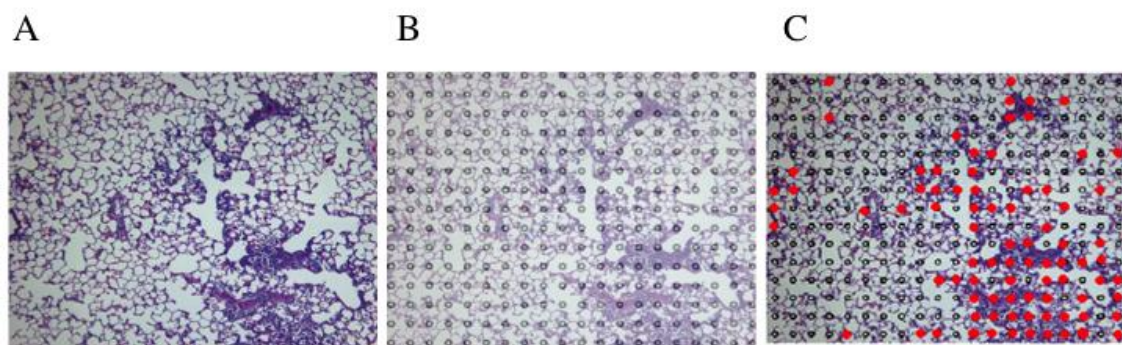
デジタルカメラとパソコンが併結された光学顕微鏡を用いて、組織標本の画像を取り込み、解析する。ヘマトキシリン・エオジン染色を行った肺標本を光学顕微鏡倍率100倍下で6画像以上を無作為的に取り込むことが望ましい（附属書図1A）。

画像を取り込む際には、比較的大きな血管腔や気管支腔等のデッドスペースを可能な限り除外する視野を取り、肺胞だけの領域を肺野全体にわたり選択的かつランダムに撮影することが望ましい。

コンピュータ画面上で、取り込んだ各組織画像の上にグリッドを300ポイント置き（附属書図1B）、グリッドに重なった炎症領域をカウントする（附属書図1C）。炎症領域とは、具体例として以下のような領域が含まれる。

- ① 炎症細胞（好中球、好酸球、リンパ球、単球等）浸潤
- ② 肺胞マクロファージ集簇巣（貪食マクロファージを含む）
- ③ *g r a n u l o m a*

炎症領域ポイント数を、全グリッド数である300で除した数値を肺組織の炎症度とする。タイムポイントごとに、複数の判定者によってスコア評価されることが望ましい。



附属書図1 ポイントカウンティング法による肺組織の炎症度の定量化（例）

### 2. ポイントカウンティング法による線維化度（コラーゲン沈着度）の定量化の例

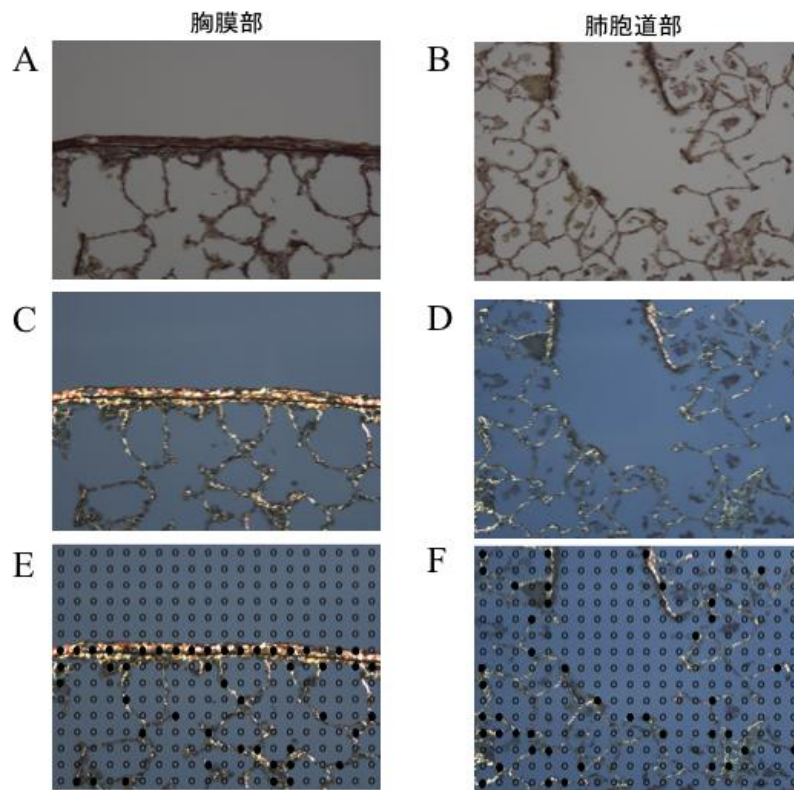
エラスチカ・ワンギーゾン染色を行った肺組織を胸膜部と肺胞道部に分け、光学顕微鏡倍率400倍下で2画像以上を取り込むことが望ましい（附属書図2A・B）。

各取込み部位において顕微鏡上で偏光をかけ、コラーゲン陽性部位を強調した画像を再取込みする（附属書図2C・D）。

コンピュータ画面上で、各部位のコラーゲン強調取込み画像の上にグリッドを置く。グリッドに重なったコラーゲン陽性部位及び肺間質部位をカウントする。グリッドの総数は

1200ポイントである（附属書図2 E・F）。

コラーゲン陽性部位ポイント数を肺間質部位ポイント数で除した数値を、胸膜部と肺胞道部の線維化評価度（コラーゲン沈着度）とする。タイムポイントごとに複数の判定者によってスコア評価されることが望ましい。



附属書図2 ポイントカウンティング法による肺組織の線維化度の定量化（例）