

平成 18～19 年度研究成果の概要

各年度の 研究成果目標	各年度の研究成果（成果の活用状況を含む）
<p>平成 18 年度</p> <p>課題 1</p> <p>①ディーゼルエンジン由来ナノ粒子の曝露条件を検討する。</p> <p>②曝露しているディーゼルナノ粒子のキャラクタリゼーションを行う。</p> <p>③自動車排ガスナノ粒子、模擬ナノ粒子を用いて、環境ナノ粒子の体内動態を明らかにする</p> <p>④環境ナノ粒子の生体影響に関する研究。</p>	<p>平成 18 年度</p> <p>①ナノ粒子が高濃度で発生し、かつ排気中のガス濃度が極力低濃度になる条件を探索し、無負荷の高回転域が該当することが分った。</p> <p>②20-30nm に個数モード径を持つ粒子を曝露することができ、ナノ粒子の凝集成長を極力防ぐ曝露手法を提言できた。ナノ粒子の主成分はエンジンオイルおよび未燃の軽油で構成されていると言われており、エンジンの運転条件により、それぞれの寄与が変化することがこれまでの研究で示唆されている。本研究ではエンジンオイルの添加剤に含まれている元素を指標として、曝露粒子の 3-4 割がエンジンオイルの寄与があることが分かった。</p> <p>③Au パーティクルジェネレータ（APG-200）を用いて放電により発生させた粒径約 11nm 金粒子を BALB/c マウスに鼻部曝露装置にて吸入曝露し、血液中を含めて肝臓、腎臓などの肺外臓器へ金粒子が移行することを確認した。蛍光標識ポリスチレンナノ粒子の実験動物への点鼻投与を行い、200nm 粒子は鼻腔表面に留まり、20nm 粒子は嗅神経経由で鼻粘膜の下組織まで移行することを確認した。</p> <p>④ラットにアイドリング状態での実車由来ナノ粒子の全身曝露を 3 ヶ月間、毎日連続して行ない（ナノ粒子の平均粒径は 20～50nm の予定）、心電図の変化及び心拍数の変化を記録し、心機能の変化を示す SDNN などの心拍変動指標（HRV）について解析した。実車由来ナノ粒子は濃度依存的に体重の増加抑制を起こしたほか、心室性期外性収縮を含む心電図の異常も実車由来ナノ粒子の濃度依存的に観察された。実車排気ナノ粒子の曝露は、エンドトキシンで惹起した肺の炎症を濃度依存的に増悪させた。アイドリング状態で発生したディーゼル排気ナノ粒子の亜急性曝露を行ったマウスの解析では、約 30μg/m³ と 100μg/m³ の曝露で特に曝露直後（1 日後）にごく軽度の炎症惹起が認められた。</p>

課題 2

① カーボンナノチューブの細胞障害性を調べる

② カーボンナノチューブの胸腔内投与による長期曝露実験を行う。

③ カーボンナノチューブの吸入曝露試験

①_r 水に不溶性のカーボンナノチューブを細胞へ添加する方法を改良し、細胞毒性を調べた。カーボンナノチューブは MARCO を介して貪食され、高い細胞障害性を示すことを明らかにした。

② 多層カーボンナノチューブをマウス胸腔内に投与して、マウスの生存率と中皮腫発生率をみることで、毒性評価を行った。投与後 18 ヶ月の経過観察中であるが、多層カーボンナノチューブ 2 μ g、10 μ g 投与群でともにマウスの生存率が低くなっていた。

⑤ 二重にシールドしたアイソレーター内でカーボンナノチューブを発生させる装置を作製した。

課題 3

① 熱分解処理後のアスベストの毒性評価クリソタイルとクロシドライトの熱処理物の *in vitro* 毒性評価とクリソタイル熱処理物腹腔内投与による *in vivo* 毒性評価を行う。

① クリソタイル標準試料 ((社) 日本作業環境測定協会、X線回折分析用、JAWE111) を 100 $^{\circ}$ C おきに 400 \sim 1100 $^{\circ}$ C で 2 時間熱処理したものとクロシドライト標準試料 (UICC) を 100 $^{\circ}$ C おきに 400 \sim 800 $^{\circ}$ C で熱処理したものを用いた。*In vitro* 毒性評価は繊維曝露後の細胞生存率で評価し、毒性試験に適した細胞の選択を行うために肺の様々な細胞で検討した結果、取り扱い安さと感受性から、マウス肺胞マクロファージ細胞株 (J774.1) とヒト中皮細胞株 (MeT-5A) を選択した。クリソタイル、クロシドライトともに 800 $^{\circ}$ C 以上の熱処理で細胞毒性では無害化されることを明らかにした。*In vivo* 毒性評価はクリソタイル熱処理物をマウス腹腔内に投与し、白血球浸潤とサイトカインの増加を測定して急性炎症反応の誘導能を検討することで毒性を評価した。*In vivo* においても 800 $^{\circ}$ C 以上の熱処理でクリソタイルの毒性は激減すること、腹腔内投与評価法が大変感度がよいことを明らかにした。以上の結果は、クリソタイル、クロシドライトを含む廃棄物の処理は 800 $^{\circ}$ C 以上の熱処理を行えばほぼ安全であることを示している。

平成 19 年度

課題 1

① 過渡運転による排出粒子のナノ粒子の曝露条件を検討する。

② 過渡運転による排出粒子のナノ粒子のキャラクタリゼーションを行う。

③ 自動車排ガスナノ粒子自動車排ガスナノ粒子を曝露して、環境ナノ粒子の呼吸器内沈着を明らかにする

④ 環境ナノ粒子の吸入曝露実験を行い、環境ナノ粒子が呼吸器の免疫・炎症応答に及ぼす影響、ならびに循環器や生殖器など、呼吸器以外の臓器の機能に及ぼす影響を明らかにする。

① 過渡運転による排出粒子のナノ粒子の曝露条件の検討を行い、曝露実験に供する準備ができた。

② 一般的に過渡運転では、ナノ粒子より大きな粒子（いわゆるスス粒子）が発生しやすく、重量ベースで見ると、ナノ粒子の寄与がほとんど無い。また、過渡運転の排出粒子による吸入曝露実験はほとんど行われていない。従って、吸入実験の為のナノ粒子のみの発生を念頭においた過渡運転の条件設定はこれまで行われていない。本研究では、比較的大きな粒径の粒子の発生を抑え、ナノ粒子のみが発生する過渡運転条件を見いだした。平成 18 年度と同様の手法を用いて、ほぼエンジンオイル由来のナノ粒子が発生していることを確認した。

③ マウスにアイドリング状態で発生したディーゼル排気ナノ粒子とナノ粒子を HEPA フィルターで除去した除粒子排気の亜急性曝露を行い、STEMを用いて呼吸器内に沈着した粒子の元素分析と形態解析を行った。20~30nm のディーゼル排気ナノ粒子は高沸点炭化水素、塩、元素状炭素から成るが、100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ のディーゼル排気ナノ粒子曝露で認められた呼吸器内沈着粒子は鉄を含む元素状炭素のみであることをあきらかにした。

④ 19 年度は、モード走行時の実車由来ナノ粒子の吸入曝露を行う予定であったが、モード走行時のナノ粒子の安定した発生が難しいこと、およびこれまで行ってきたアイドルリング運転時のナノ粒子の影響を確実に把握することが優先される事項と考え、昨年に引き続き、アイドルリング運転を行い、除粒子群(ガス成分曝露)と全成分曝露群(ガス成分+粒子成分)の比較検討を行った。3ヶ月曝露では、異常心電図の発現率は除粒子群より全成分曝露群で大きく、正常心電図の心拍変動から計算したHFの増加やSDNNの減少は除粒子群より全成分曝露群で大きかった。発現する異常心電図の種類でそれぞれの異常心電図の出現率を比較すると、ナノ DEP 曝露では心房と心室間の電気伝導障害を示唆する A-V ブロック等の異常心電図が観察されなかったことから、心臓内の電気刺激伝播障害は発生しないと考えられ、ナノ DEP の異常心電図の発現のメカニズムは、これまでの DEP 曝露と異なる事が示唆された。除粒子群のガス濃度は全粒子曝露群とほぼ同じ濃度にしたので、異常心電図の発現や自律神経系の緊張の変化、そして心拍変動の変化は、全成分曝露、特に、発生粒子の影響に起因するものと推察された。即ち、ディーゼル排気

<p>課題2</p> <p>① カーボンナノチューブの毒性評価胸腔内投与と気管内投与による急性 <i>in vivo</i> 曝露実験を行う。</p> <p>課題3</p> <p>① 熱分解処理後のアスベストの毒性評価アモサイトとトレモライトの熱処理物の <i>in vitro</i> 毒性評価とクロシドライト熱処理物の胸腔内投与と気管内投与による <i>in vivo</i> 毒性評価の比較を行う。</p>	<p>由来の粒子成分、特に、ナノ粒子成分が循環機能に影響すると考えられ、暴露影響評価には長期暴露が必要と考えられた。また、実車排気ナノ粒子曝露により、エンドトキシンで惹起した肺での炎症性サイトカイン発現が増強する傾向があったが、アレルギー性気道炎症を有意には増悪させなかった。</p> <p>①マウスにカーボンナノチューブを腹腔内投与あるいは気管内投与後、白血球浸潤とサイトカインの増加を測定して急性炎症反応の誘導能を検討することで毒性を評価した。カーボンナノチューブは炎症誘導能が高く、同量のアスベスト（クロシドライト）より炎症誘導能が強いことを明らかにした。平成18年度からの多層カーボンナノチューブをマウス胸腔内投与実験は経過観察中であるが、多層カーボンナノチューブ 2μg、10μg 投与群とともにマウスの生存率が低かった。</p> <p>①アモサイト標準試料（UICC）とトレモライト標準試料（（社）日本作業環境測定協会）を100$^{\circ}$Cおきに400–1300$^{\circ}$Cで2時間熱処理したものをを用い、<i>in vitro</i> 毒性評価を行った。繊維曝露後の細胞生存率での評価では、アモサイトは1100$^{\circ}$C以上、トレモライトは1200$^{\circ}$C以上の熱処理で無害化されることを明らかにした。市販フォルステライト（クリソタイル熱処理物）の <i>in vitro</i> 毒性評価と腹腔内投与による <i>in vivo</i> 毒性評価を行い、市販フォルステライトはほぼ毒性がないことを明らかにした。</p> <p><i>In vivo</i> 毒性評価は、マウスにクロシドライト熱処理物を腹腔内投与あるいは気管内投与後、白血球浸潤とサイトカインの増加を測定して急性炎症反応の誘導能を検討することで毒性を評価した。<i>In vivo</i> においても800$^{\circ}$C以上の熱処理でクロシドライトの毒性は激減すること、急性毒性では腹腔内投与評価法が大変感度がよいこと、気管内投与法では亜急性毒性以上の炎症の持続を検出できることを明らかにした。</p> <p>以上の結果は、アモサイトやトレモライトを含む廃棄物の処理は溶融温度に近い熱処理（1200$^{\circ}$C以上）が必要であることを示している。</p>
--	---