

令和3年度厚生労働行政推進調査事業費補助金
(化学物質リスク研究事業)

Ⅱ. 分担研究報告書

令和3年度 厚生労働行政推進調査事業費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

研究課題：ナノマテリアル吸入曝露影響評価のための効率的慢性試験法
の開発に関する研究(21KD2004)

分担研究課題名：ナノマテリアル吸入曝露システムの効率化に関する研究

研究分担者： 高橋 祐次 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 室長
研究協力者： 菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所客員研究員
公益財団法人 日産厚生会 玉川病院 病理診断科 部長

研究要旨

工業的に大量生産されるナノマテリアルの産業応用が急速進展する中、製造者及び製品利用者の健康被害の防止のための規制決定、及び、業界における安全面からの国際競争力の保持の観点から、基礎的定量的な毒性情報を得る評価法の確立が急がれる。毒性が不明である物質を取り扱う基本的な戦略は、ヒトで想定されるばく露経路に即した動物実験によりハザード同定、メカニズム同定、用量作用関係の情報の取得を行い、これらの情報からヒトに対する毒性の推定と用量相関性の推定を行うことである。しかしながら、ナノマテリアルに関して最も重要なばく露経路である吸入に関しては、動物実験を遂行する際の技術的障壁が高く、実施例は数少ない。

研究分担者らは、吸入毒性試験を実施する際のナノマテリアル特有の問題点を解決する目的で、高度分散法（Taquann 法）及びそれをエアロゾル化するカートリッジ直噴式ダスト発生装置を独自開発した（Taquann 直噴全身吸入装置）。本装置により、多層カーボンナノチューブの2年間のマウス間欠ばく露吸入実験が実施可能となった。しかしながら、より効率的な吸入ばく露実験を行なうためには、ボトルネックとなる工程の Taquann 法による高分散処理を自動化する必要がある。Taquann 法は、tert-ブチルアルコール（TBA）に懸濁した検体を金属シープでろ過して凝集体・凝固体を除去、液体窒素によってろ液を急速凍結、その後、溶媒回収型真空ポンプにて表面張力による再凝集を防ぎながら乾燥検体を得る手法である。本分担研究では、Taquann 法を効率化ならびに自動化するため、①ろ過に用いるシープの大型化、②シープの洗浄方法の検討、③ろ液の瞬間凍結方法の検討を行なった。その結果、大型化したシープでは、シープの振動とろ液の攪拌が十分ではなく、現行の手法よりろ過効率が低かった。シープの洗浄方法については、逆洗することにより自動化の目処が立った。ろ液の凍結方法については、滴下掻き取り凍結法と1流体噴霧ノズルを用いた噴霧凍結法を試みた。滴下掻き取り凍結は大量の検体処理は困難であり、噴霧凍結法は、大量のろ液を瞬時に凍結可能あるが、作業環境中に微細な凍結検体が漏れ出すこと、凍結検体を回収する際に空気中の水分を吸収し溶け出すことが課題となった。今後、これらの点を改良した方法により、Taquann 法の工程の自動化処理を進める計画である。

A. 研究目的

工業的に大量生産されるナノマテリアルの産業応用が急速進展する中、製造者及び製品利用者の健康被害の防止のための規制決定及び、業界における安全面からの国際競争力の保持の観点から、基礎的定量的な毒性情報を得る評価法の確立が急がれる。毒性未知の物質を取り扱う基本的な戦略は、ヒトで想定される暴露経路に即した動物実験によりハザードを同定し、メカニズムを同定し、用量作用関係を情報の取得し、そこからヒトに対する毒性の推定と用量相関性の推定を行うことであるが、ナノマテリアルに関して最も重要な暴露経路である吸入曝露に関しては、動物実験を遂行する際の技術的障壁が高く、実施例は数少ない。

研究分担者らは、吸入毒性試験を実施する際のナノマテリアル特有の問題点を解決する目的で、今までの諸研究からその物性や毒性の情報が利用可能な MWNT-7 (Mitsui) をモデル物質として、高度分散法 (Taquann 法) 及び、それをエアロゾル化するカートリッジ直噴式ダスト発生装置を独自開発した (Taquann 直噴全身吸入装置)。そして、本装置により、一般的なナノマテリアルについても、従来法に比較して容易に、高分散状態の検体として、マウスやラットを用いた全身暴露吸入試験を実施する目途が立った。

現在は、より効率的な吸入ばく露実験方法の開発を進めているが、その際に最も時間を要するのが Taquann 法による高分散乾燥検体を得る工程である。tert-ブチルアルコール (TBA) に懸濁した検体を金属シーブでろ過して凝集体・凝固体を除去、液体窒素によってろ液を急速凍結、その後、溶

媒回収型真空ポンプにて表面張力による再凝集を防ぎながら乾燥検体を得る手法である。この手法により吸入ばく露に適した高分散性の乾燥検体を得られるが、人手で行なう煩雑な作業であり、工程を自動化する必要がある。最も手間のかかる工程がろ過工程であり、ろ過・ろ液の瞬間凍結、フィルターの洗浄工程に 6 時間程度を要している (図 1)。この工程を改善するため、①ろ過に用いるシーブの大型化、②シーブの洗浄方法の検討、③ろ液の瞬間凍結方法の検討を行なった。

検体は、装置の組み立てろ過条件を決定する際には扱いが容易な米澱粉を使用し、ろ過効率を検討する際には、Taquann 法の開発時に用いた多層カーボンナノチューブのひとつである MWNT-7 (三井) を使用した。

B. 研究方法

B-1. シーブの改良(大型化)

これまで、シーブは直径 750 mm、容器の高さ 50 mm を使用している (セイシン企業、目開き 53 μ 、特注品)。シーブのフレームにはろ過効率を上げるため、円形の振動モータを取り付ける加工を施してある (図 2)。MWNT-7 (三井) を検体として使用した場合、目開き 53 μ m の金属製フィルターでは約 80% の回収率である。

本検討では、大量の検体をろ過するため、シーブサイズを 100 mm に拡大し、加振機 (CLF-25WX01、ミネベアミツミ) を 2 個装着した。シーブの枠はアクリル材で作製し、パッキンは PTFE を使用した。加振機による振動波形は 58Hz のサイン波を使用した。

B-2. 逆洗によるシーブの洗浄方法の検討

検体をろ過したシーブには多くの検体が残

る。TBA を含んだ残渣は、TBA の凝固点 (25.69℃) より温度が高い状態では泥状、温度が低下すると堅くメッシュに固着するため、除去することが難しく、時間を要する工程である。シーブの清浄度はろ過率を上げるために重要であるため、短時間で効率よく洗浄できることが望まれる。

今回は、使用したシーブからある程度残渣を除去したのち、シーブの上下を反転させ、ろ過方向とは逆向きに 2-プロパノールを噴霧して洗浄を行なった。噴霧は圧縮空気を送液タンクに 0.3MPa で供給し、3Hz で駆動させた (図 3)。

B-3. ろ液の凍結方法の検討

ろ液に含まれる検体の凝集をさけるため、これまでは液体窒素をろ液内に投入して瞬間的に凍結させている。液体窒素を用いた自動化は、液体窒素が輸送するラインを通過する際にその殆どが気化してしまうこと、液体窒素を保管場所から実験室に輸送するまで時間を要し、かつ、長期保存が難しいことから、これに替わる方法が望まれる。本件等では、氷冷したステンレス板にろ液を吹き付けて凍結させる方法 (滴下凍結掻き取法) と、1 流体ノズルを用い氷冷下でタンク内に噴霧して凍結する方法 (噴霧凍結) の方法を試みた。

(1) 滴下凍結掻き取法

特注品の掻き取装置を冷凍庫 (MF-300、アズワン) 内に設置し -20℃ の温度条件で検討を行なった。掻き取装置のステンレス製凍結板の有効寸法は 150 × 100mm (伝熱面積 150cm²)、掻き取板は PTFE 製とした。TBA のみを送液ポンプ (PB1011A-01-N、SMC) 及び滴下ノズル (KKBP 100 S303、いけうち) を用いて滴下 (0.15MP/3Hz で駆動) し、掻き取の様子をファイバースコープ (NTS500、

TESLONG)、掻き取面の温度変化をサーモグラフィ (F50B-STD 、 NPPON AVIONICS) にて観察した。なお、ノズル部は TBA が凍結しないように 40℃ に保温して機能を維持した。

(2) 噴霧凍結

特注品の噴霧装置を作製し冷凍庫 (MF-300、アズワン) 内にノズルと噴霧タンク (ステンレス製 φ270 mm × H440 mm の円柱容器) を設置し -20℃ の温度条件で検討を行なった。TBA のみを送液ポンプ (PB1011A-01-N、SMC) を用いて 0.3MP/5Hz で駆動し、噴霧凍結を行なった。なお、ノズル部は TBA が凍結しないように 40℃ に保温して機能を維持した。温度変化をサーモグラフィ (F50B-STD、NPPON AVIONICS) にて観察した。

C. 研究結果

C-1. シーブの改良 (大型化)

TBA に 200µg/mL 濃度で MWNT-7 を懸濁した液を約 1,000mL ろ過した。懸濁した。その結果、ろ過効率は 28% という結果が得られた。手動による方法では約 80% のろ過効率であるため、現行法に比較してろ過効率は低下した (図 4)。

C-2. 逆洗によるシーブの洗浄方法の検討

2-プロパノールによる逆洗によるシーブの洗浄は手動方法に比較して効率良く洗浄が可能であった。しかしながら、辺縁部分には若干の残渣が残留した。 (図 5)。

C-3. ろ液の凍結方法の検討

(1) 滴下凍結掻き取法

凍結板に噴霧された TBA は速やかに固化した。しかしながら、10 回以上の操作では、固化

した TBA の掻き取りが十分にできなくなり、板に付着した TBA が次第に厚く堆積した。それに伴い、冷却板からの冷却効果が低下し TBA の固化が緩慢となり継続困難となった(図 6)。

(2) 噴霧凍結

送液ポンプから約 500mL の TBA を 120 秒間で噴霧した。ポンプの吐出動作回数は 500 回で処理した。ステンレス製の容器内部一面には固化した TBA が付着した状態となった。スクレイパーを用いて TBA の回収作業を行なったところ、冷凍庫と室内との温度差による結露が発生した。そのため、TBA が水分を含み、凍結乾燥に理想的な状態の TBA が得られなかった。また、TBA を噴霧した際には凍結した微細な TBA がステンレスタンクから漏れ出し庫内に充満した。

D. 考察

検体調整自動化装置に求められる条件は、①TBA が凝固しない温度帯(37°C程度)を維持した環境にてろ過を行えること。②液体窒素を用いないろ液の瞬間凍結方法、③ろ過工程におけるケーキの生成抑制ができること、④フィルターの自動洗浄が可能であること、⑤装置のサイズは一般的な冷蔵庫程度のサイズであること、である。本分担研究では、ナノマテリアルの高分散検体を得る手法である Taquann 法の効率化を目指し、シーブの大型化、洗浄方法の効率化、ろ液の凍結方法の効率化を検討した。

シーブの大型化は、結果的にろ過効率が従来の方法よりも低下したため、十分な性能が得られなかった。この原因は、シーブに加振機からの振動が十分に伝わっていないこと、シーブ上の懸濁液の攪拌が十分ではないことであり、MWNT-7 がシーブ面にすぐに堆積することに

よってろ過が妨げられている。この対応のため、シーブを装着する枠をアクリル製からより振動が伝わりやすい硬質の材料(金属、ガラス等)に変更すること、より高い振動エネルギーを発生させることが可能な超音波振動を用いることを計画している。

逆洗によるシーブの洗浄は手動方法に比較して効率良く洗浄が可能であった。洗浄ノズルから噴射する角度を適切な角度にすることにより辺縁部に残留した残渣も除去が可能と考えられる。

ろ液の凍結方法として、滴下凍結掻き取り及び噴霧凍結法を検討した。滴下凍結掻き取り法は 10 回程度の処理(約 150 mL)の処理が可能であったが、大量の検体処理には不向きな手法と考えられた。噴霧凍結方法は 1 流体ノズルを採用し実験を行なった。1 流体ノズルは、液体を微細化するために空気を必要とする 2 流体ノズルとは異なり、液体のみで微細化が可能である。そのため、閉鎖空間内に噴霧しても圧力上昇が生じない。しかしながら、今回の実験では微細な TBA がステンレスタンク内か漏れ出る様子が観察された。蒸気圧が水よりも低い TBA であるため、気化した TBA が凍結したものである可能性があるが、作業者の安全性の観点から改良が必要と考えられる。また、凍結検体を回収する際に空気中の水分を吸収し溶け出すことが課題となった。水分を含んだ TBA の凍結乾燥では高分散検体を得ることができないため、この手法を選択する際には凍結乾燥用の容器内に噴霧し、その状態を維持したまま乾燥工程に入る必要がある。

E. 結論

ナノマテリアル吸入曝露システムの効率化するため、現在ボトルネックとなっているナノマテリアルの高分散検体を得る方法である

Taquann 法の自動化について検討した。その結果、大型化したシーブでは、十分なろ過効率が得られなかった。シーブの洗浄方法については、逆洗することにより自動化の目処が立った。ろ液の凍結方法については、滴下掻き取り凍結法と 1 流体噴霧ノズルを用いた噴霧凍結方法を試みた。滴下掻き取り凍結は大量の検体処理は困難であり、噴霧凍結法は、大量のろ液を瞬時に凍結可能あるが、作業環境中に微細な凍結検体が漏れ出すこと、凍結検体を回収する際に空気中の水分を吸収し溶け出すことが課題となった。今後、これらの点を改良した方法により、Taquann 法の工程の自動化処理を進める計画である。

謝辞:

本研究の遂行にあたり、技術的支援をしていただいた、鶴田祐吾氏、生田達也氏、寺門真吾氏に深く感謝する。

F. 研究発表

1. 論文発表

Taquahashi Y, Tsuruoka S, Morita K, Tsuji M, Suga K, Aisaki K and Kitajima S, A novel high-purity carbon-nanotube yarn electrode used to obtain biopotential measurements in small animals: flexible, wearable, less invasive, and gel-free operation, *Fundam Toxicol, Sci.* 2022, 9(1),17-21
doi.org/10.2131/fts.9.17

Taquahashi Y, Saito H, Kuwagata M, Kitajima S, Development of an inhalation exposure system of a pressurized metered-dose inhaler (pMDI) formulation for small experimental animals, *Fundam Toxicol, Sci.* 2021,8(6),169-175

doi.:10.2131/fts.8.169

Hojo M, Yamamoto Y, Sakamoto Y, Maeno A, Ohnuki A, Suzuki J, Inomata A, Moriyasu T, Taquahashi Y, Kanno J, Hirose A, Nakae D. Histological sequence of the development of rat mesothelioma by MWCNT, with the involvement of apolipoproteins, *Cancer Sci.* 2021 Jun;112(6):2185-2198. doi: 10.1111/cas.14873. Epub 2021 May 2.

Yamamoto E, Taquahashi Y, Kuwagata M, Saito H, Matsushita K, Toyoda T, Sato F, Kitajima S, Ogawa K, Izutsu KI, Saito Y, Hirabayashi Y, Imura Y, Honma M, Okuda H, Goda Y. Visualizing the spatial localization of ciclesonide and its metabolites in rat lungs after inhalation of 1- μ m aerosol of ciclesonide by desorption electrospray ionization-time of flight mass spectrometry imaging, *Int J Pharm.* 2021 Feb 15;595:120241. doi: 10.1016/j.ijpharm.2021.120241. Epub 2021 Jan 21.

2. 学会発表

高橋 祐次:粉体の吸入剤研究開発を推進する非臨床安全性評価手法の開発、ラウンドテーブルセッション、日本薬剤学会第 36 年会、招待講演 (2021.5.14)

山本 栄一、高橋 祐次:吸入剤に係る薬物動態の新規イメージング技術、第 48 回日本毒性学会学術年会、シンポジウム (2021.7.9)

Taquahashi Y, Yamamoto E, Kuwagata M, Saito H and Kitajima S, Development of an inhalation exposure system of a

pressurized metered-dose inhaler formulation for small experimental animal and visualizing the spatial localization of an inhalant in rat lungs by mass spectrometry imaging, The 37th Annual Meeting of KSOT/KEMS, invited (2021.11.2)

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

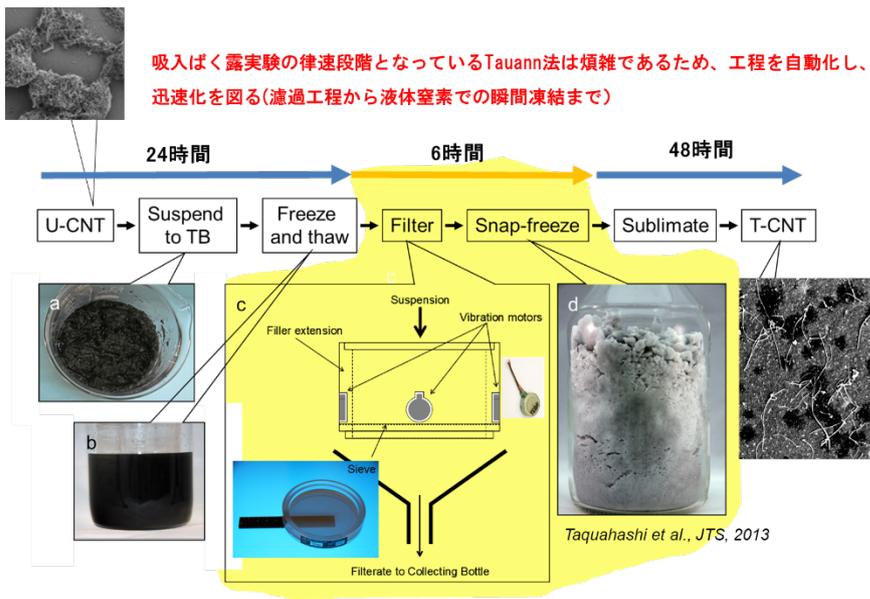


図1 Taquann 法の概要と律速段階

Taquann 法の工程において、律速段階となっているのはろ過工程である(黄色でハイライト)。この工程の前は、凍結融解および超音波処理による分散化、後工程は凍結乾燥であり時間を要するが人手はかからない。

株式会社セイシン企業特注品

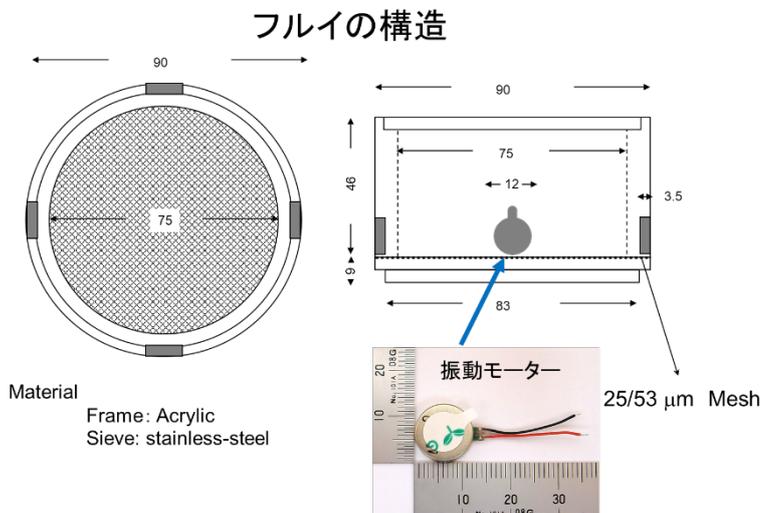


図2 Taquann にて使用するシーブ(フルイ)の構造

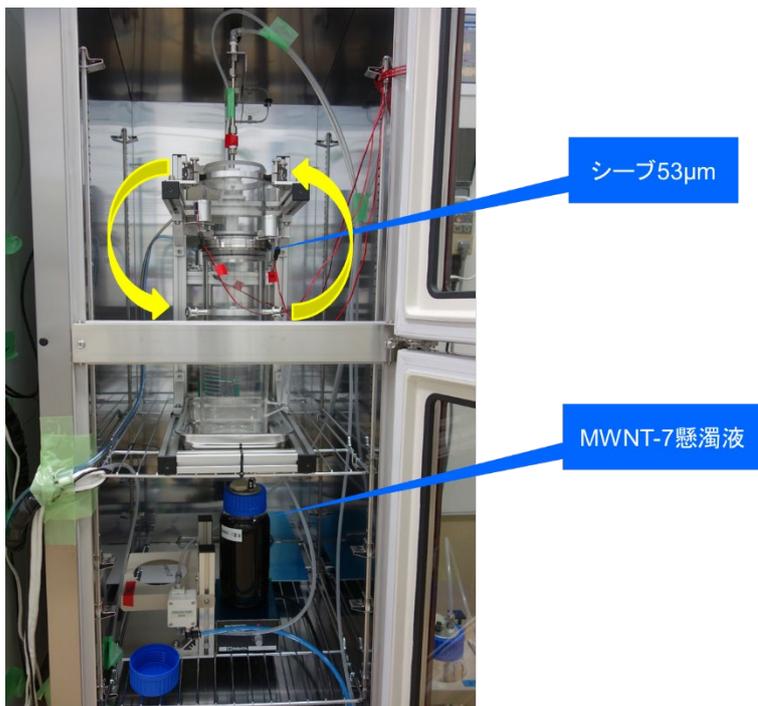


図 3 今年度検討したシープの概要

MWNT-7 のろ過では、加振機を 2 個使用し、直径 100mm のシープを振盪させろ過を行なった。
 入力電圧: 1.2V (Rms)、振動波形: サイン波 58Hz、パッキン: PTFE、シープ目開き: 53 μ m



図 4. MWNT-7 を検体とした場合のろ過効率

多くの検体がシープに残り、ろ過効率は28%であった。従来の方法(約80%)に比較して低値であった。

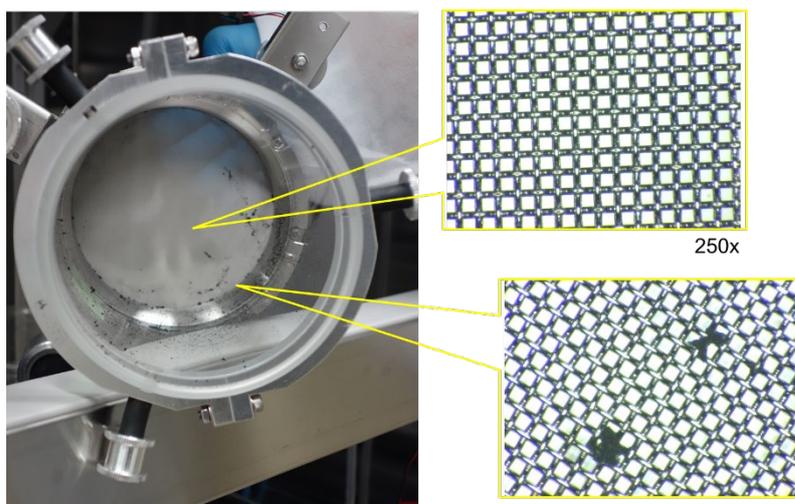


図 5. 洗浄後のシープ

2-プロパノールを用いて逆洗により洗浄を行なった。洗浄液が十分に散布されない辺縁部分には若干の検体が残存していた。

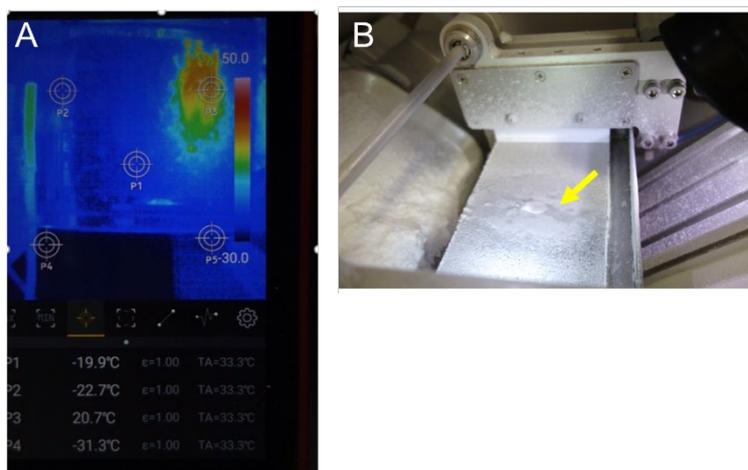


図 6. 滴下凍結掻き取法

40°Cに加温したTBAをポンプで氷冷したステンレス板(-20°Cの冷凍庫内に設置)に噴射した。A:サーモグラフィーによる観察の結果、噴射直後のステンレス板の温度は約20°Cであるが、すぐに-20°C程度まで低下した。B:凍結したTBAは10回程度の掻き取りが可能であるが、やがて冷却板にTBAの結晶が堆積し始め、掻き取りができなくなった(矢印)

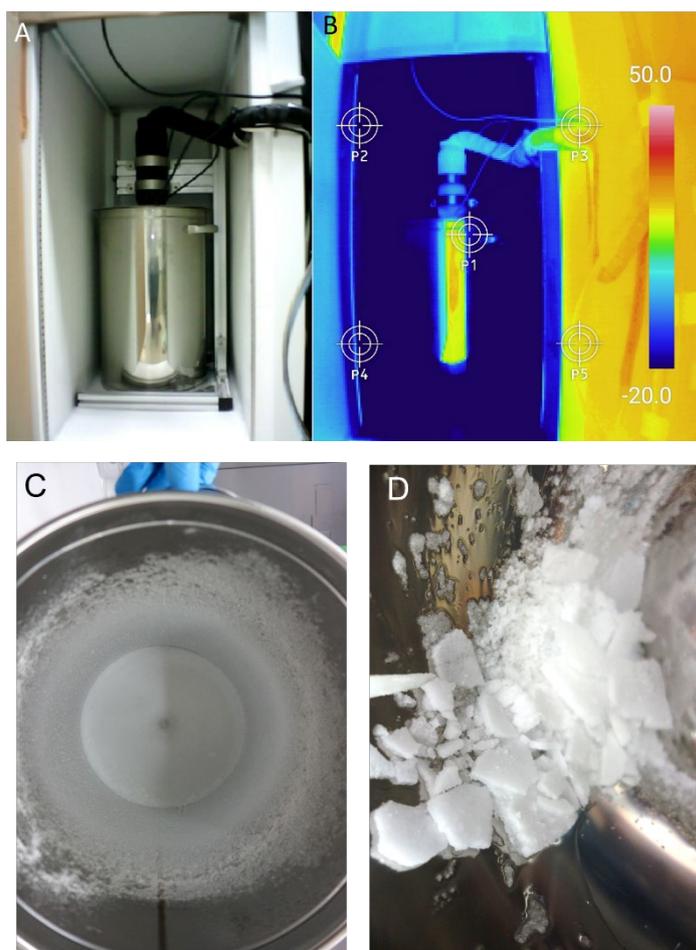


図 7. 噴霧凍結

-20℃の冷凍庫内に設置した1流体噴射ポンプとステンレス容器にTBAを噴射した。A:噴霧凍結装置の外観、B:サーモグラフィによる外観像。ポンプ内でTBAが凝固しないように加温した。C:ステンレス容器の内部にTBAが凍結して付着している様子。D:凍結したTBAはスクレイパーにて容易に掻き取りが可能であるが、結露によって生じた水分をTBA結晶が吸収し溶解する。