

令和4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4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 毒性部 客員研究員

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濾過工程の際のケーキの生成抑制のため、攪拌装置の開発、②効率的なろ液の瞬間凍結法としてドライアイスを用いる方法を開発した。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曝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。Taquann 報は 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。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ることが可能となった。

その一方で、時間を要する工程があり、特に濾過工程は煩雑であるため連続作業が難しい (図 1)。本分担研究では、検体調製を自動化し、ナノマテリアルの吸入曝露実験の効率化を目的とした。

B. 研究方法

B-1. 攪拌装置の開発

これまで、シープは直径 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)。シープ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。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。

昨年度の検討では、大量の検体をろ過することを目的として、シープサイズを 100 mm に拡大し、加振機を装着し 58Hz のサイン波にて振動しつつ濾過を行ったが、濾過効率は 28% と手動に比較して大幅に低下した。この原因は、シープに加振機からの振動が十分に伝わっていないこと、シープ上の懸濁液の攪拌が十分ではないことであり、MWNT-7 がシープ面にすぐに堆積 (ケーキ生成) することによってろ過が妨げられていることが考えられた。

本年度は、攪拌工程を自動的に行える装置の開発をおこなった。具体的には、攪拌子をモータによって動作させる方法とした。シープ面に攪拌子が衝突しない方法、攪拌子の形状も検討した。

B-1. 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、これまでに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。

昨年度は、氷冷したステンレス板に TBA を吹き付けて凍結させる方法 (滴下凍結掻き取法) と、一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。滴下凍結掻き取り法は 10 回程度(約 150 mL)の処理が可能であったが、それ以上は熱容量が不足し大量の検体処理には不向きな手法と考えられた。噴霧凍結方法は微細な TBA がステンレスタンク内から漏れ出るため作業者の安全性確保に難があること、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。

本年度は、ドライアイス冷媒として用いた方法を検討した。液体窒素はデュワー瓶での長期保存が難しく、自動化処理における冷媒としては使いにくい。ドライアイスは比較的保存が容易である。1000mL の広口瓶に 500g のドライアイス投入し、TBA500mL を投入して固化の程度を観察した。またその際の温度変化をサーモグラフィー (F50B-STD、NPPON AVIONICS) にて観察した。

C. 研究結果

C-1. 攪拌装置の開発

攪拌子は、熱可塑性の Polyoxymethylene 樹脂 (POM 樹脂) を素材とした。POM 樹脂は耐摩耗性・耐薬品性・低吸水性・高機械的強度を有しており、本装置の目的に適した素材であることから選択した。攪拌子の上下運動によって攪拌子がシープ面と衝突しないようにする方法には、装置内でのシープ面の位置を固定し、シープ面から 5 mm 上までを攪拌子の可動範囲とすることにした。実際に作製した装置を図 2 に示した。

C-2. ろ液の凍結方法の検討

Taquann 法処理のため、TBA は 35°C に設定した恒温槽内に保管し液体状態として保存している。ドライアイス 500g 投入した広口瓶は約 10 分後には 0°C 以下となった。ドライアイスの昇華に伴い広口瓶内が二酸化炭素雰囲気

気になったところで、TBA500 mL を投入したところ、約 22 分後に TBA は固化し凍結乾燥可能な状態となった (図 3)。

D. 考察

検体調整自動化装置に求められる条件は、① TBA 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。

本年度は、ケーキの生成抑制を目的として、攪拌子を組み込んだ装置の開発を行った。現在、攪拌を行いながらシープを振動させる方法の開発に着手している。

ドライアイス冷媒として用いる TBA の固化方法は凍結乾燥に十分な性能を有していることが示された。

ドライアイスの潜熱は 573.5 KJ/Kg、比熱は 835.8 J/kgK、相転換温度は -78.5°C である。これらの値から、質量 500g を冷媒として用い、相転換温度から TBA が十分に凍結すると考えられる 20°C に到達するまでの吸熱量を計算すると 500g のドライアイスは 41,450kJ を吸熱する。一方、TBA500 mL と広口ガラス瓶 (質量 750g) が 33°C から 20°C まで温度低下する際に放熱する熱量は 6,876 kJ と計算されることから、ドライアイス 500g を冷媒として 500mL の TBA を固化するには十分な吸熱量であると考えられた。また、ドライアイス投入後、しばらく放置することで広口瓶内は二酸化炭素のみに置換されるため、広口瓶と空気の温度差による結露の発生を抑制することが可能であった。TBA は吸湿すると凝固しなくなるため、この点からも優れた性質であると考えら

れる。

同様の計算で、液体窒素 500g(約 625mL)が相転換温度の-196°Cから 20°Cまでに吸収する熱は 113,046 kJと計算されるが、実際に TBA 500 mLを固化させるための液体窒素量は約 1L である。液体窒素の相転換温度は-196°Cと低く、TBA と液体窒素の境界面は気体の窒素となるため、熱交換の効率が低いと考えられる。

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、ろ過効率に大きく影響するケーキの生成抑制を攪拌子を導入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、ドライアイス冷媒として用いることで、同重量の TBAを固化することが可能であることが示された。今後、これらの点を組み込んだ方法により、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、ニイガタ株式会社 橋本 真氏、浅野敏行氏に深く感謝する。

F. 研究発表

1. 論文発表

鶴岡秀志、高橋祐次、カーボンナノチューブのヘルスケア応用、2022, Nanofiber 13(1,2) 19-244.

高橋祐次、齊藤洋克、栗形麻樹子、北嶋聡、加圧式定量噴霧式吸入器(pMDI)製剤の

げっ歯類を対象とした鼻部ばく露装置の開発、Jpn. J. Clin.Toxicol. 2022 35(3) 255-259

高橋祐次、鶴岡秀志、相崎健一、大久保佑亮、北嶋聡、バイタルサインをモニタリングするための最先端技術の基礎と臨床;バイタルサインの統合的評価による急性毒性試験の致死性予測 Jpn. J. Clin.Toxicol. 36, 73-77, 2023

Hojo M, Maeno A, Sakamoto Y, Ohnuki A, Tada Y, Yamamoto Y, Ikushima K, Inaba R, Suzuki J, Taquahashi Y, Yokota S, Kobayashi N, Ohnishi M, Goto Y, Numano T, Tsuda H, Alexander DB, Kanno J, Hirose A, Inomata A, Nakae D. Two-year intermittent exposure of a multiwalled carbon nanotube by intratracheal instillation induces lung tumors and pleural mesotheliomas in F344 rats. Part Fibre Toxicol. 2022 May 19;19(1):38.

Tsunematsu T, Arakaki R, Sato M, Saito M, Otsuka K, Furukawa Y, Taquahashi Y, Kanno J, Ishimaru N. Exposure to Multiwall Carbon Nanotubes Promotes Fibrous Proliferation by Production of Matrix Metalloproteinase-12 via NF- κ B Activation in Chronic Peritonitis. Am J Pathol. 2022 Aug 10;S0002-9440(22)00240-1. doi: 10.1016/j.ajpath.2022.07.009.

Horibata K, Takasawa H, Hojo M, Taquahashi Y, Shigano M, Yokota S, Kobayashi N, Sugiyama KI, Honma M, Hamada S. In vivo genotoxicity assessment of a multiwalled carbon nanotube in a mouse ex vivo culture. Genes Environ. 2022 Oct 19;44(1):24.

Yokota S, Miyaso H, Hirai T, Suga K, Wakayama T, Taquahashi Y, Kitajima S. Development of a non-invasive method for testicular toxicity evaluation using a novel compact magnetic resonance imaging system. *J Toxicol Sci.* 2023;48(2):57-64.

Makiko Kuwagata, Masaru Tsuboi, Toshime Igarashi, Mariko Tsurumoto, Takuya Nishimura, Yuhji Taquahashi, Satoshi Kitajima, A 90-day repeated oral dose toxicity study of 2-Butylbenzo[d]isothiazol-3(2H)-one in rats, *Fundam. Toxicol. Sci.* 10(2) March 02, 2023 p.69-82

Makiko Kuwagata, Masaru Tsuboi, Toshime Igarashi, Mariko Tsurumoto, Takuya Nishimura, Yuhji Taquahashi, Satoshi Kitajima, A 90-day dose toxicity study of 2-(2H-benzotriazol-2-yl)-6-dodecyl-4-methylphenol in rats, *Fundam. Toxicol. Sci.* 10 (2) March 02, 2023 p.59-68 [doi.org/10.2131/fts.10.59]

2. 学会発表

Taquahashi Y, Yokota S, Hirose A, Kanno J Streamline of chronic inhalation exposure study protocol for nanomaterial, 第 49 回日本毒性学会学術年会 シンポジウム (2022.6.30)

Taquahashi Y, Tsuruoka S, Aisaki K, Okubo Y Kitajima S, An approach to prediction of mortality in acute toxicity studies by integrated assessment of vital signs, 第 49 回日本毒性学会学術年会 シンポジウム(2022.6.30)

Taquahashi Y, Non-clinical Safety Issue in Pediatric Drug Development: What

issues are to be considered from now on? 第 49 回日本毒性学会学術年会 シンポジウム (2022.7.2)

高橋祐次, 動物を用いない新たなリスク評価アプローチ法の開発: In vivo 毒性試験の経験に基づく NGRA による安全性評価手法に関する考察, 日本動物実験代替法学会シンポジウム 第 35 回大会 (2022.11.20)

高橋祐次, DPI 製品化の課題: 粉体の吸入剤研究開発における有効性・薬物動態・安全性の評価を推進する非臨床評価手法の開発, 第 13 回 粉末吸入剤研究会シンポジウム (2022.11.24)

Taquahashi Y, Tsuruoka S, Okubo Y Tanemura K, Aisaki K, Kitajima S, Modernization of acute toxicity testing with integrated assessment of multiple vital signs as endpoints, 第 96 回日本薬理学会学術年会シンポジウム (2022.12.2)

Taquahashi Y, Yokota S, Tsuji M, Morita K, Suga K, Hojyo M, Hirose A, Kanno J, Preliminary report on a two-year, 4-week-interval intermittent whole body inhalation study of the multi-walled carbon nanotube (MWNT-7) in male mice, SOT 2023 Poster (2023.3.22)

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

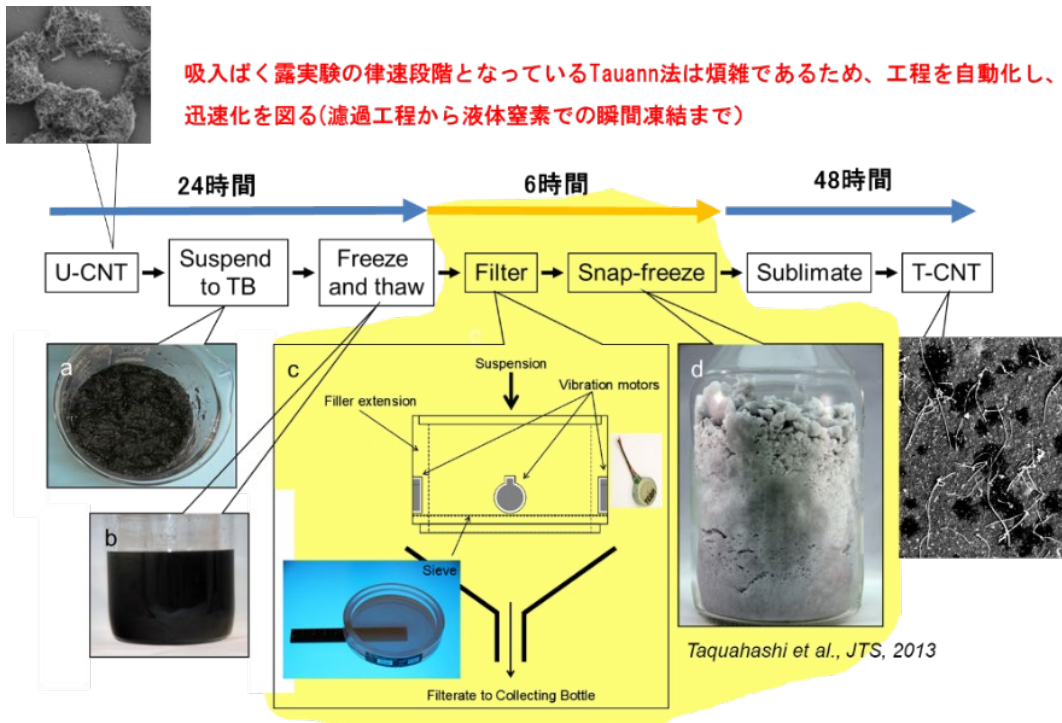


図1 Taquann法の概要と律速段階

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。

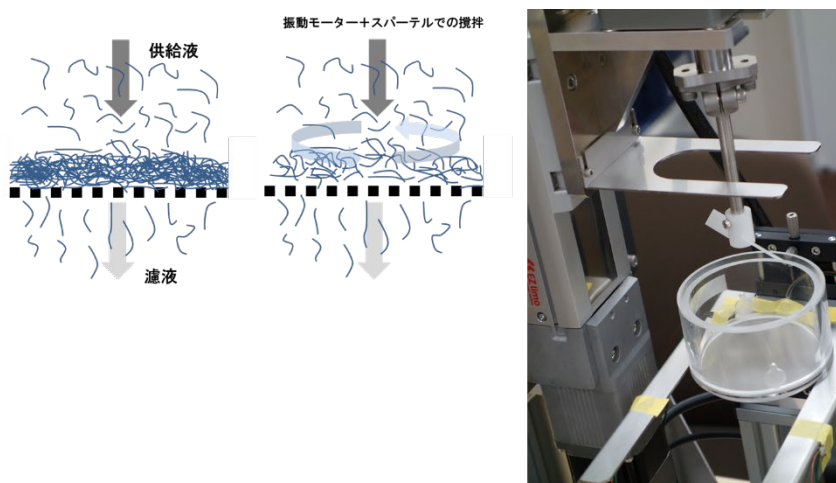


図2 攪拌装置を組み込んだ濾過装置の開発

ケーキの生成抑制が濾過効率を向上させるためには、ケーキ生成抑制が必要である。現在、実験

者が手動で行っているが、自動化のためにさせるには必須である。種々の検討の結果、Polyoxymethylene 樹脂製の攪拌子をシープ面から約 5mm 上部で回転させる装置を開発した。

ドライアイス500g + TBA500mL

TBA投入後約22分後の温度分布



tert-butyl alcohol,
melting point: 25.6°C

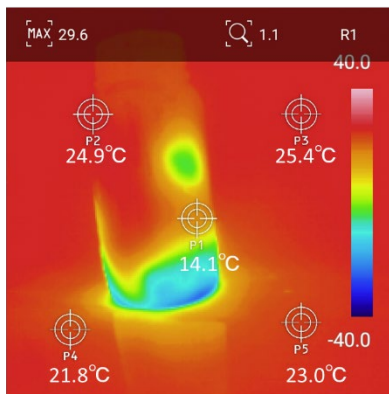


図 3 ドライアイスによる TBA の固化

ドライアイス500gを1000mLの広口瓶に投入後約10分程度放置し、広口瓶内が二酸化炭素雰囲気になったところでTBA500mLを投入した。TBA投入後、約20分程度で完全に固化した。