

令和 5 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5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、ヒトで想定される曝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曝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年間のマウス間欠曝露吸入実験をはじめとして、複数のナノマテリアルの吸入曝露実験を実施可能となった。しかしながら、より効率的な吸入曝露実験を行なうためには、ボトルネックとなる工程のTaquan法による高分散処理を自動化する必要がある。Taquan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濾過して凝集体・凝固体を除去、液体窒素によってる液を急速凍結、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、Taquan法において、最も時間と人手を要している工程を効率に自動化するための方法を検討した。最終的に、安全キャビネット内に収まるサイズの自動化装置が完成した。これにより、効率的な吸入曝露実験が可能となり、また、作業者の労働安全にも貢献することが期待される。

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暴露に関しては、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曝露吸入試験を実施することが可能となり、MWNT-7 以外の多層カーボンナノチューブ、複数種類の二酸化チタン及びナノシリカの曝露実験を進めてきた。

その一方で高分散乾燥検体を得るための Taquann 法は、人手、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

現在まで、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濾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、約 80% の回収率であるが、MWNT-7 がシーブ面に堆積 (ケーキ生成) することを防止することが必要である。手動ではセルスクレイパーでろ液を攪拌してケーキ生成を抑制している。自動化に際しては、攪拌子をモータによって動作させる方法とした。シーブ面に攪拌子が衝突しない方法、攪拌子の形状も検討した。

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。昨年度の検討により、ドライアイス冷媒として用いた方法が有効であることが示されたことから、この手法を採用した。

Taquann 法ではターシャルブチルアルコールを溶媒としている。ターシャルブチルアルコールは約 25°C で凝固するため、室温条件での凍結乾燥には都合が良いが、濾過するには凝固を防止する措置が必要となる。この手法についても検討を行った。また、ターシャルブチルアルコールは非常に吸湿しやすい。先行研究では、吸湿したターシャルブチルアルコールは凝固しにくく、また、検体の分散性も低下する。これを防止するための手法についても検討を行った。

C. 研究結果

自動化装置は、低湿度状態と、濾過条件に最適な温度管理を行うため、全体を風防で覆う設計とした。低湿度の条件を実現させるため風防上部に除湿した圧縮空気の導入部を設

けた。

攪拌子は、耐摩耗性・耐薬品性・低吸水性・高機械的強度を有している熱可塑性の Polyoxymethylene 樹脂 (POM 樹脂) を素材を使用し、十字状の形状とした。シーブ面への衝突をさけるため、攪拌子の位置は固定し、シーブ面を上下に±70mm 稼働させるダンパーを組み込んだシステムを採用した。

シーブに検体の懸濁液を輸送する方法は、ナノマテリアルの懸濁状態が良好な状態であることが望まれる。そのため、耐圧容器に懸濁液を入れ、圧縮空気を持ちいて圧送する方式とした。

濾過後のシーブの洗浄は、洗浄用のチャンネルにシーブを移動してイソプロピルアルコールを噴霧する仕様とした。

ろ液の凍結にはドライアイスを使用するため濾過装置近傍の温度低下によりろ液が凝固することが想定される。そのため、シーブ及び漏斗を電熱線ヒータにて被覆して加温する方法を採用した。また、濾過装置上層部に温風ヒータを設置した。

最終的に、これらの装置をすべて組み込み自動化装置を完成させた(図 2)。

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濾過を行えること。②液体窒素を用いないろ液の瞬間凍結方法、③濾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。

ナノマテリアルは溶媒中でも凝集する性質が強く、また、Taquann 法で使用する溶媒のターシャルブチルアルコールは室温で凝固す

るため、作業者はこの二つに注意しながら作業をする必要があった。本分担研究は、良好な懸濁状態を維持しつつ、濾過工程を簡便に実施することに注力して自動化装置の開発に取り組んだ。これらの条件を個別に検討し、自動化装置に実装した結果、濾過工程を実施する装置は安全キャビネット内に収まるサイズとし、コントローラ部分は安全キャビネットの外部に設置する仕様となった。これにより、効率的な検体調製並びに吸入曝露実験が可能となる。また、濾過工程における作業者の労働安全にも貢献が期待される。

E. 結論

ナノマテリアル吸入曝露方法を効率化するため、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種々の条件を検討した。その結果、最終的には安全キャビネット内に収まるサイズの自動化装置として完成させた。

謝辞:

本研究の遂行にあたり、技術的支援をいただいた、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

Hojjo M, Maeno A, Sakamoto Y, Yamamoto Y, Taquahashi Y, Hirose A, Suzuki J, Akiko Inomata A, Dai Nakae D, Time-Course of Transcriptomic Change in the Lungs of F344 Rats Repeatedly Exposed to a Multiwalled Carbon Nanotube in a 2-Year Test, Nanomaterials (Basel).

2023 Jul 19;13(14):2105. doi:
10.3390/nano13142105.

Shimizu M, Hojo M, Ikushima K,
Yamamoto Y, Maeno A, Sakamoto Y,
Ishimaru N, Taquahashi Y, Kanno J,
Hirose A, Suzuki J, Inomata A, Nakae
D, Continuous infiltration of small
peritoneal macrophages in the mouse
peritoneum through CCR2-dependent
and -independent routes during
fibrosis and mesothelioma
development induced by a multiwalled
carbon nanotube, MWNT-7, J Toxicol
Sci 2023;48(12):617-639. doi:
10.2131/jts.48.617.

Miyauchi A, Akashi T, Yokota S,
Taquahashi Y, Hirose A, Hojo M,
Yoshida H, Kurokawa M, Watanabe
W., Effects of inhalation of multi-
walled carbon nanotube (MWCNT) on
respiratory syncytial virus (RSV)
infection in mice. J Toxicol Sci.
2023;48(7):411-420. doi:
10.2131/jts.48.411.

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. doi:
10.2131/jts.48.57.

Kuwagata M, Tsuboi M, Igarashi T,
Tsurumoto M, Nishimura T,
Taquahashi Y, Satoshi Kitajima: A 90-
day repeated oral dose toxicity study

of 2-Butylbenzo[d]isothiazol-3(2H)-
one in rats Fundam. Toxicol. Sci.
2023; 10: 69-82.

Kuwagata M, Tsuboi M, Igarashi T,
Tsurumoto M, Nishimura T,
Taquahashi Y, Satoshi Kitajima: A 90-
day dose toxicity study of 2-(2H-
benzotriazol-2-yl)-6-dodecyl-4-
methylphenol in rats Fundam. Toxicol.
Sci. 2023; 10: 59-68.

2. 学会発表

Yuhji Taquahashi, Koichi Morita,
Kousuke Suga, Masaki Tsuji, Yusuke
Okubo, Ken-ich Aisaki, Satoshi
Kitajima, New approach for assessment
of acute oral toxicity by multiple
parameters of vital signs: development
of a less invasive method for measuring
biopotential in small laboratory animal
using carbon-nanotube yarn as surface
electrodes, 63rd Society of Toxicology
Annual Meeting, (Accepted), Abstract
Number/Poster Board number
3077/P180, 2024.3.11

高橋祐次、森田紘一、辻昌貴、菅康佑、相
崎健一、北嶋聡、平林容子、先端素材カー
ボンナノチューブヤーンを使用した実験用
小動物における低侵襲な生体電位測定法
の開発、第 70 回 日本実験動物学会総
会、2023.5.24

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

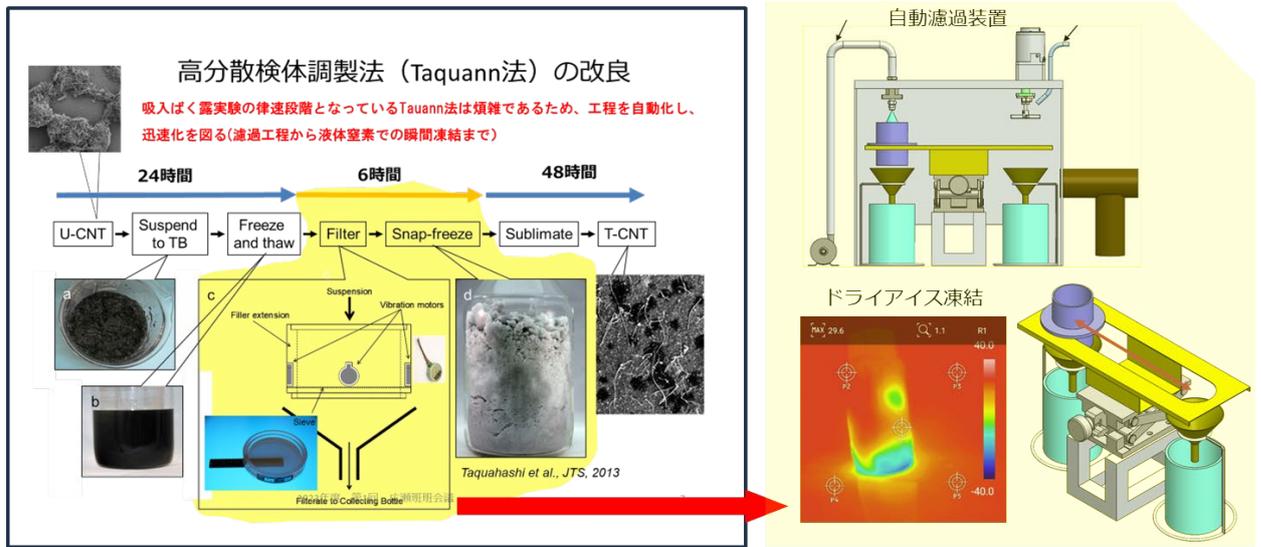


図 1 Taquann 法の律速段階を自動化する構想図

Taquann 法の工程において、律速段階となっているのは濾過工程(左図 黄色でハイライト)であるため、この工程を自動化するための装置を開発し、凍結するための冷媒は液体窒素から、管理が容易なドライアイスに変更する。



図 2 一連の装置を組み込んだ濾過装置の全体像

濾過効率を向上させるケーキ生成抑制のための攪拌子、振動子を装着したシーブ、溶媒として使用するターシャルブチルアルコールの凝固を防ぐ加温装置等を組み込みこんだ自動化装置を開発した。