

フィルター重量(W2: mg)を測定し、以下の式により暴露濃度を算出した。

$$\text{暴露濃度(mg/m}^3\text{)} = \frac{W2 - W1}{R \times T} \times 1,000$$

R: 吸引速度(L/min)

T: 吸引時間(min)

B-5. 粒度分布測定

暴露チャンバー内の MWNT 粒子は、暴露操作時の動物の呼吸域(ノズル先端部)付近から走査式パーティクルサイザー(Scanning Mobility Particle Sizer, SMPS)(Model-3034, 測定範囲: 10~487 nm、TSI Incorporated)を用いてサンプリングし、空気力学的個数中位径(Count Median Aero-dynamic diameter, CMAD)、幾何標準偏差(Geometric Standard Deviation, GSD)、単位体積あたりの粒子数(Total concentration: count/cm³)等を測定した。暴露チャンバー内の MWNT 粒子は、ダスト状態及びミスト状態ともに約 1 L/min の吸引速度で SMPS によりサンプリングし、1 サンプルあたりのサンプリング時間は 3 分間とした。

(倫理面への配慮)

吸入実験操作に携わる作業者は、実験中、常時防塵マスク(6000F/2091-RL3、アスベスト対策作業 Level 1~3 用全面防塵マスク、3M)、ディスポーズブルの防護服(プロテック III 型、Tyvek softwear、Dupont)及びオーバースューズ(Shoe Cover Elastic、アズワン)を着用することにより、人体への安全性を確保した。また、暴露チャンバーは専用のドラフト内に設置し、被験物質の実験室内への拡散を防ぐとともに、実験室の床に水を噴霧し、実験室内での被験物質の飛散を防止した。

C. 研究結果

C-1. ダスト状態による MWNT の発生

事前検討として、通常のダストによる吸入暴露実験に使用しているダストフィーダー(DF-3、柴田科学株式会社)を用いた MWNT の発生を検討した。ダストフィーダーは回転するテーブル(ターンテーブル)上の

溝に検体を落とし、それを吸引・暴露することを原理としているが、MWNT は飛散性及び凝集性があり、ターンテーブル上の溝に落とすことが出来ず、発生が不可能であった。(図4)

上記結果から、B-3 1)項に記載した発生法を構築した。MWNT の暴露濃度は発生流量により調節し、4 時間の連続発生を行った。発生流量は 5、10 及び 15 L/min (それぞれ希釈流量 15、10 及び 5 L/min)とし、サンプリング時間はそれぞれ 120、60 及び 60 分間とした。また、発生流量 5 及び 15 L/min については 3 日間にかけて 3 回の発生を行い、日間変動を確認した。発生暴露濃度の測定結果を図5~7、表1~3に示す。発生流量 5、10 及び 15 L/min のときの平均暴露濃度(Mean ± S.D.)は、それぞれ 0.486 ± 0.232、2.71 ± 0.372 及び 6.11 ± 1.71 mg/m³であった。発生流量 5 及び 15 L/min について、3 回の発生を行ったときの平均暴露濃度は、5 L/min が 0.708、0.417 及び 0.334 mg/m³であり、15 L/min が 4.87、7.13 及び 6.33 mg/m³であった。

また、発生流量 5 L/min の 0-120 及び 120-240 分における平均暴露濃度は 0.556 及び 0.417 mg/m³であり、10 L/min の 0-60、60-120、120-180 及び 180-240 分における暴露濃度はそれぞれ 2.83、3.17、2.50 及び 2.33 であり、15 L/min の 0-60、60-120、120-180 及び 180-240 分における平均暴露濃度はそれぞれ 7.95、6.61、5.17 及び 4.72 mg/m³であった。

粒度分布は、発生流量 5、10 及び 15 L/min につき、それぞれ 2、1 及び 3 回発生させたときに測定し、1 回の測定につき 30~60 回のサンプリングを行った。発生流量 5 L/min の 1 及び 2 回目目の発生における CMAD の平均値はそれぞれ 251.0 及び 260.0 nm であり、それぞれ GSD の範囲は 1.61~2.52 及び 1.60~2.39 であった(図8)。発生流量 10 L/min の CMAD の平均値は 216.2 nm であり、GSD の範囲は 1.70~1.82 であった(図9)。発生流量 15 L/min の 1、2 及び 3 回目目の発生における CMAD の平均値はそれぞれ 169.4、160.0 及び 219.9 nm であり、それぞれ GSD の範囲は 1.73~1.90、1.76~2.24 及び 1.68~1.96 であった(図10)。また、発生流量 5 L/min の 1 及び 2 回目目の発生における単位体積あたりの粒子数の平均

値(mean ± S.D.)はそれぞれ 674.6 ± 266.9 及び 499.8 ± 142.8 個/cm³であった(図11)。発生流量 10 L/min における単位体積あたりの粒子数の平均値は 2,498.5 ± 315.8 個/cm³であった(図12)。発生流量 15 L/min の 1、2 及び 3 回目の発生における単位体積あたりの粒子数の平均値(mean ± S.D.)はそれぞれ 4,850 ± 3,230、4,550 ± 3,260 及び 7,350 ± 2,160 個/cm³であった(図13)。各発生条件における粒度分布ヒストグラムの代表例を図14～16に示す。

C-2. ミスト状態による MWNT の発生

ミスト状態での MWNT の発生では、懸濁液中の MWNT 濃度による暴露濃度の変動を検討した。Tween 20 0.2 g を含む水 400 mL に対して、添加する MWNT 量 0 g (0%)(媒体のみ)、0.2 g (0.05%)、0.4 g (0.1%)、0.8 g (0.2%)、1.6 g (0.4%)及び3.2 g (0.8%)についてミスト状態での発生を試みた。しかしながら、0.8% については、MWNT 粒子によりネブライザー内で流路が詰まったため、0%～0.4%について暴露濃度及び粒度分布を測定した。

暴露濃度のサンプリング時間は、いずれの懸濁液も 30 分間とした。0%、0.05%、0.1%、0.2%及び0.4%懸濁液を発生させたときの暴露濃度は、それぞれ 1.0、0.16、0.50、0.50 及び 1.0 mg/m³であった。暴露濃度測定時の捕集フィルター写真を図17に示す。

粒度分布は各懸濁液につき、12 回のサンプリングを行った。0%、0.05%、0.1%、0.2%及び 0.4%懸濁液の CMAD の平均値はそれぞれ 55.8、55.9、58.3、58.2 及び 59.1 nm であり、GSD の範囲はそれぞれ 1.86～2.02、1.84～2.23、1.82～1.90、1.81～1.86 及び 1.54～1.87 であった。同様に、単位体積あたりの粒子数の平均値(mean ± S.D.)はそれぞれ 788,000 ± 56,900、757,000 ± 28,700、748,000 ± 17,500、716,000 ± 12,100 及び 489,000 ± 64,000 個/cm³であった。ミスト発生については、いずれの懸濁液とも粒度分布のヒストグラム及び発生された粒子数の顕著な経時的変動は認められなかった。各濃度及び水のみを発生させたときのヒストグラムを図 18～23 に示す。

D. 考察

D-1. ダスト状態での発生に関する考察

今回、従来法に変わる発生法を考案し、MWNT のダストによる 4 時間の連続発生が可能であった。本法においては、供給する空気量の調節により暴露濃度の制御が可能であり、今回、約 0.5～6 mg/m³の濃度範囲における MWNT 発生が確認できた。今回設定した低用量(発生流量: 5 L/min)及び高用量(発生流量: 15 L/min)において 3 日間の再現性を確認したところ、暴露濃度の逆転などは認められなかったが、良好な再現性は得られなかった。また、時間経過ごとの暴露濃度推移については、今回実験を行ったすべての発生条件において、経時的に濃度が低下していく傾向がみられた。このことは、粒度分布測定時の粒子数の経時的な減少と同様な推移であり、時間経過ごとの発生粒子数の減少に依存した暴露濃度の低下と推測された。また、粒度分布測定において、CMAD は時間経過ごとにわずかに低い値へシフトするか、もしくはほとんど変化がみられず、その平均値は約 160～260 nm であった。ただし、低用量(発生流量: 5 L/min)について、他の発生条件より CMAD が高い推移を示しており、MWNT 粒子の分散にはある程度の空気量が必要であることが示唆された。また、いずれの発生条件においても測定器(Model 3034)の測定範囲(10-487 nm)を超えて巨大粒子が存在することが明らかなヒストグラムが得られた。MWNT をはじめとする CNT は、通常直径約 1 nm、長さ約 1 μm とされている。このことから、測定機器の測定上の問題も考えられたが、数 nm から数十 nm 付近にほとんど粒子が検出されていないことから、MWNT が凝集した状態で発生されている可能性が高いものと思われた。

D-2. ミスト状態での発生に関する考察

MWNT は水とほとんど混和しないことから、今回、界面活性剤の Tween 20 を用い、MWNT 懸濁液を調製して発生を行った。

暴露濃度測定においては、媒体のみの発生も含め、いずれの濃度の懸濁液においても明確な差は見出せなかった。しかし、濃度測定時の捕集フィルター

については、濃度依存的に MWNT 由来の着色(黒色)が認められ、懸濁液濃度に依存した MWNT の発生が行われていることが明らかであった。粒度分布測定においては、媒体を含むすべての懸濁液において同様のヒストグラムが得られ、水のみヒストグラムと比較した場合、CMAD(約 60 nm)は高値側にシフトしていた。さらに粒子数についても MWNT 濃度に依存した変化は認められなかったことから、得られたヒストグラムは界面活性剤として添加した Tween 20 に由来したものと考えられた。しかしながら、媒体と MWNT 含有懸濁液のヒストグラムがほぼ同様の形状であることから、本懸濁液中での MWNT の分散性は良好であったと推察される。

E. 結論

E-1. ダスト状態での発生に関する結論

ダスト状態での MWNT 発生法の検討を行った結果、粒子の凝集が疑われるものの、MWNT の有り姿での発生方法についての技術基盤が構築できたと考える。

今後の課題として、時間経過ごとの安定な発生法の確立、あるいは日間での再現性の向上を図る必要がある。今回の結果から、500 nm 以上の粒子の存在も示唆されており、発生された MWNT 粒子の全体像を捕らえることも必要と考える。また、粒子の凝集が疑われることから、MWNT の分散性については今後も検討の必要があると思われる。

E-2. ミスト状態での発生に関する結論

ミスト状態での MWNT 発生法の検討を行った結果、暴露濃度の実測定には至らなかったものの、MWNT がナノ粒子として発生できる可能性が見出された。しかし、今回、界面活性剤として動物への毒性影響が明らかな Tween 20 を用いており、動物への暴露実験には、界面活性剤の選択など改善の余地がある。また、濃度測定においても、重量法以外の方法を検討する必要があると思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし。

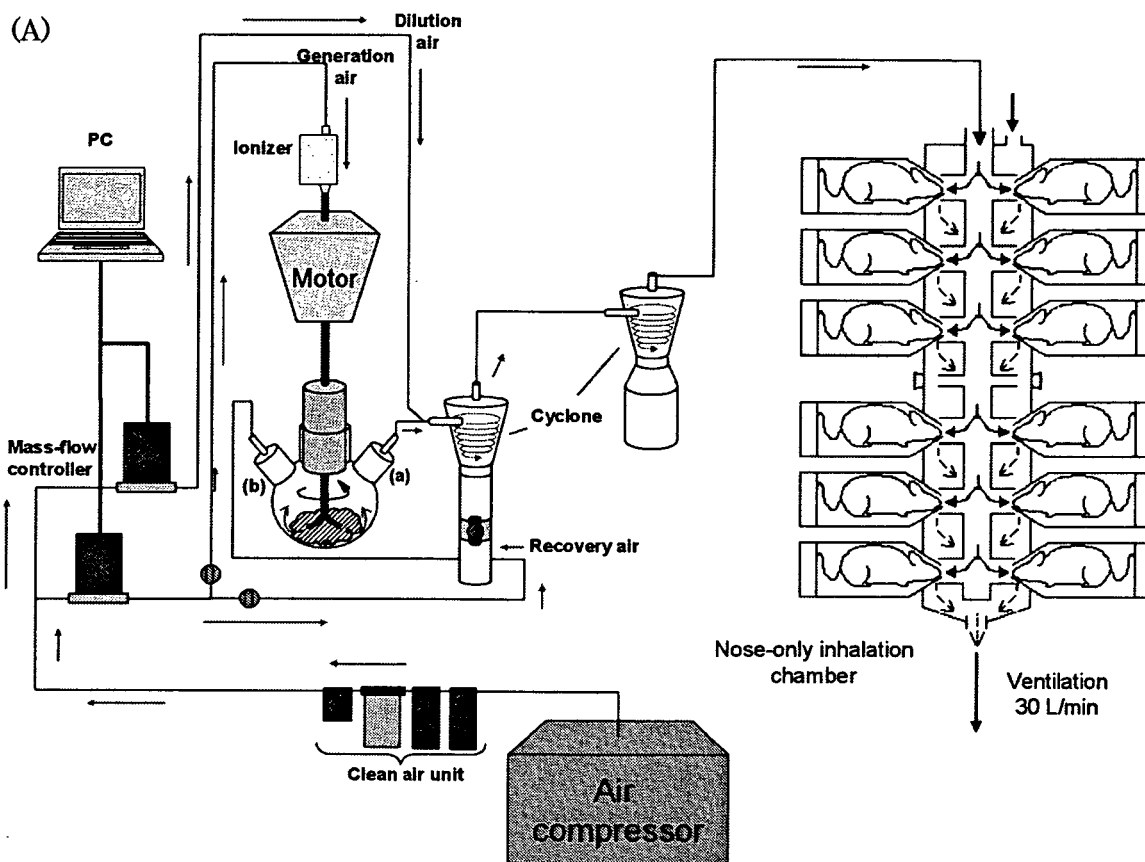
2. 学会発表

なし。

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

・特許取得・実用新案登録

なし。



(B)

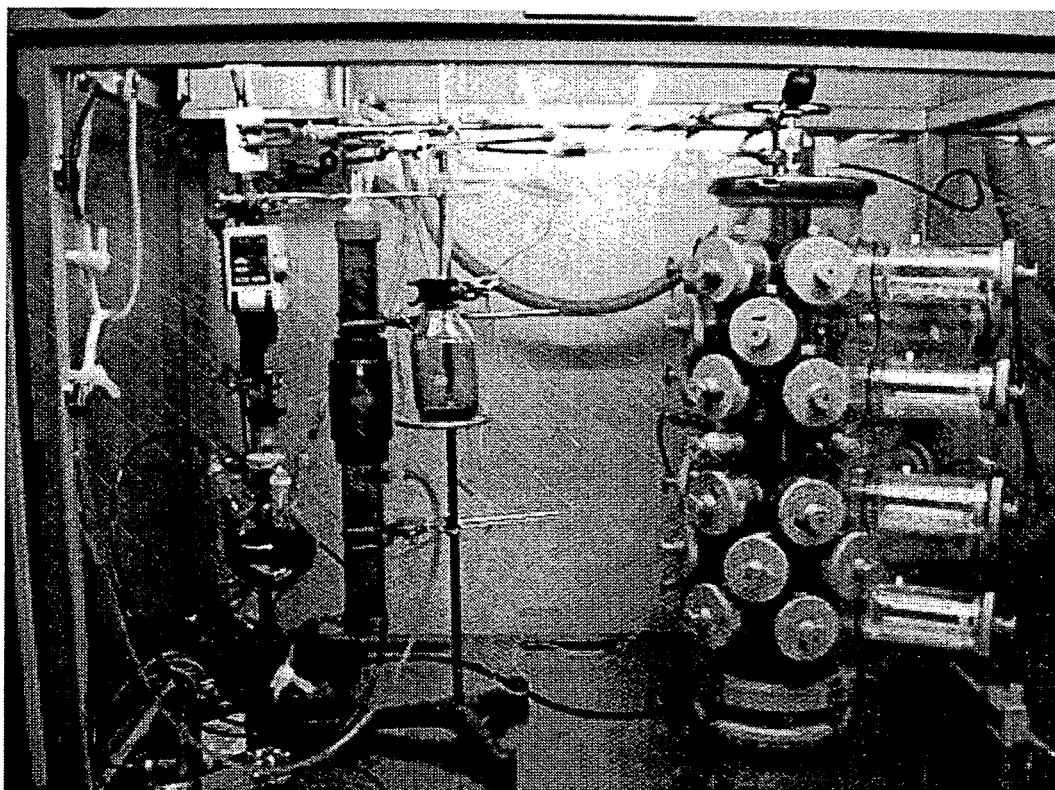
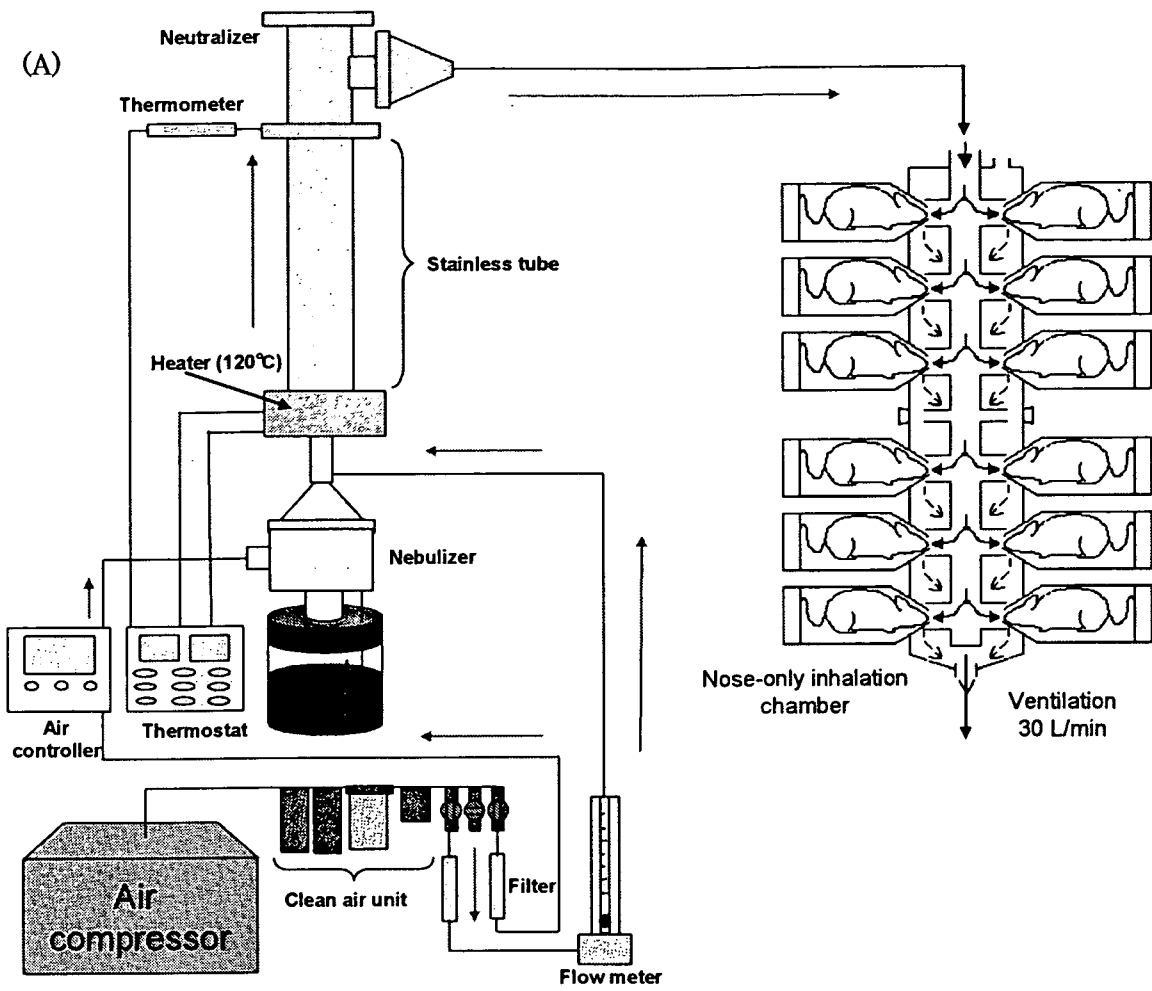


図2 ダスト状態での MWNT の発生(A: 概略図、B: 写真)



(B)

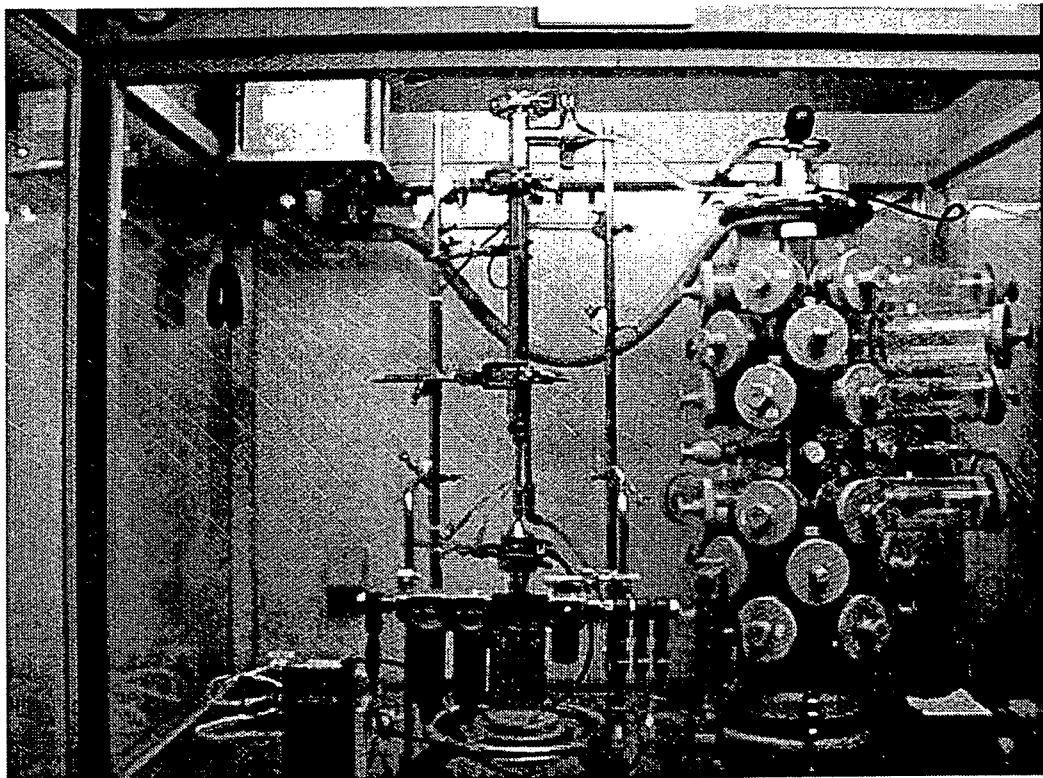


図3 ミスト状態での MWNT の発生(A: 概略図、B: 写真)

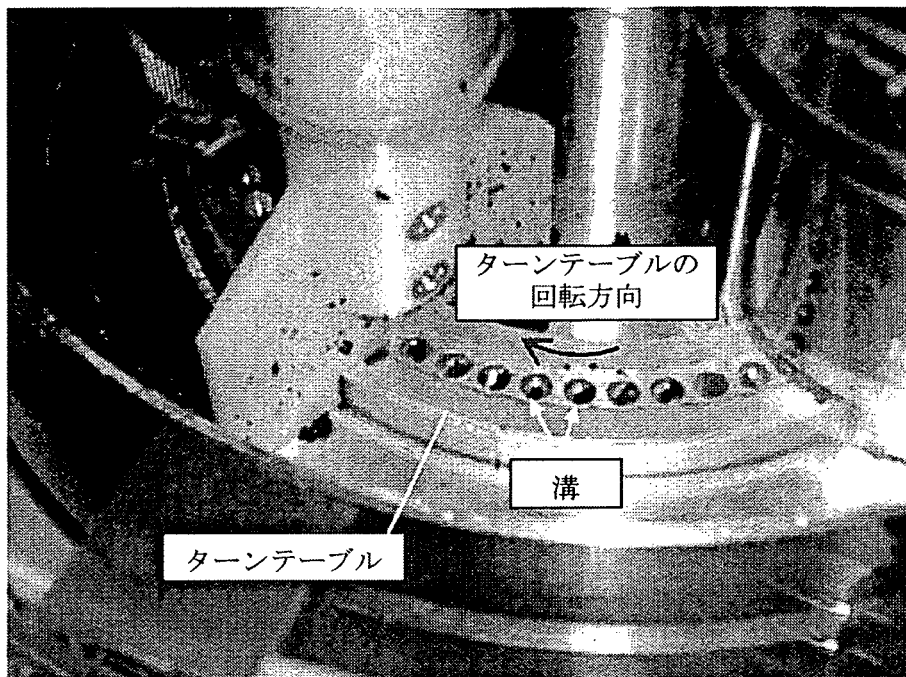


図4 ダストフィーダーを使用した MWNT の発生

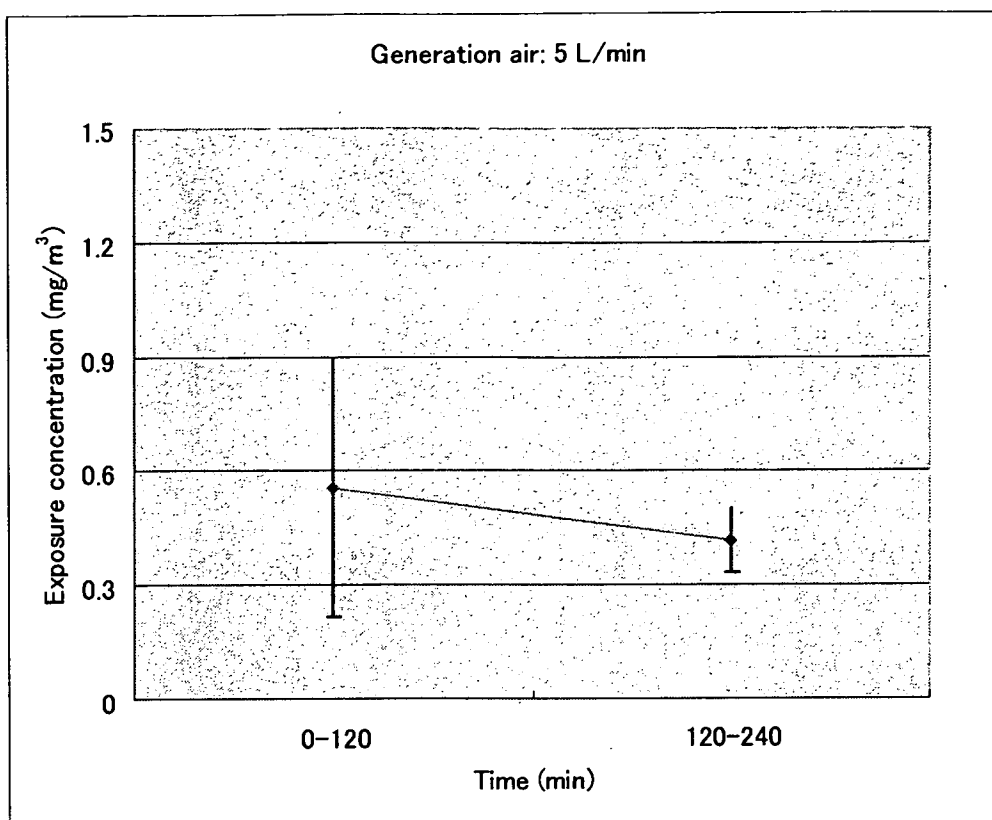


図5 ダスト発生における暴露濃度推移(発生流量: 5 L/min)

表1 ダスト発生における暴露濃度測定値(発生流量: 5 L/min)

Experiment	Exposure concentration (mg/m ³)		
	0-120	120-240	Mean ± S.D.
Exp. 1	0.916	0.500	0.708
Exp. 2	0.500	0.334	0.417
Exp. 3	0.250	0.417	0.335
Mean ± S.D.	0.555 ± 0.336	0.417 ± 0.0835	0.486 ± 0.232

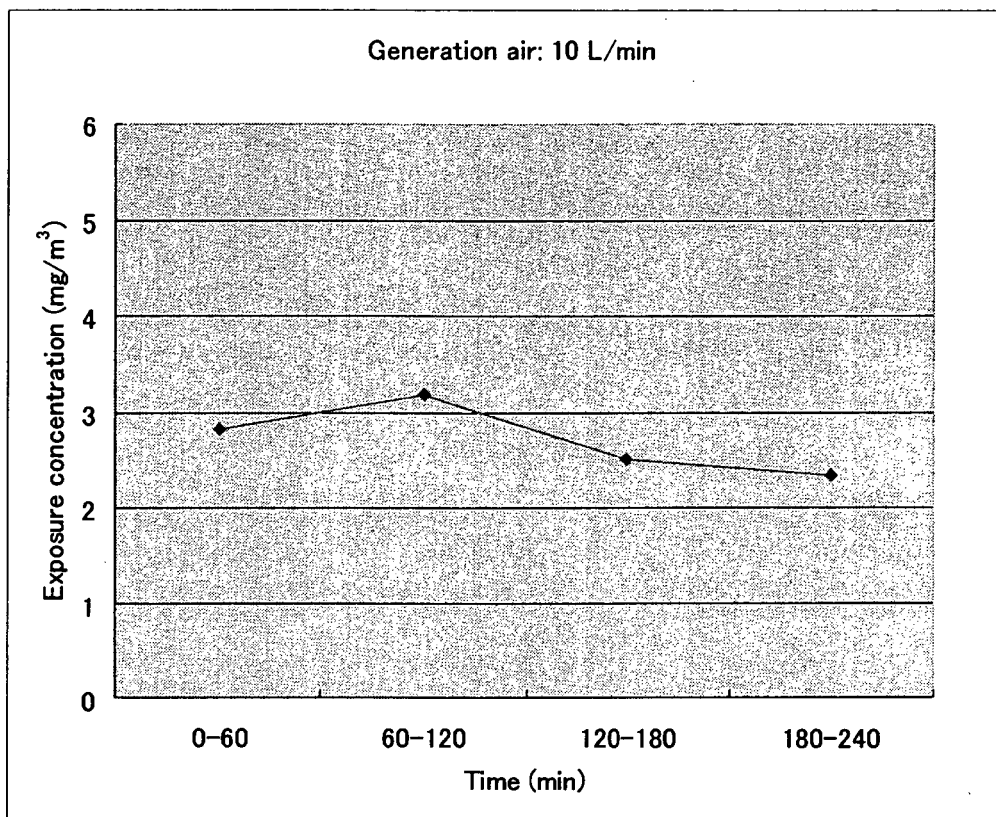


図6 ダスト発生における暴露濃度推移(発生流量: 10 L/min)

表2 ダスト発生における暴露濃度測定値(発生流量: 10 L/min)

Experiment	Exposure concentration (mg/m ³)				Mean ± S.D.
	0-60	60-120	120-180	180-240	
Exp. 1	2.83	3.17	2.50	2.33	2.71 ± 0.372

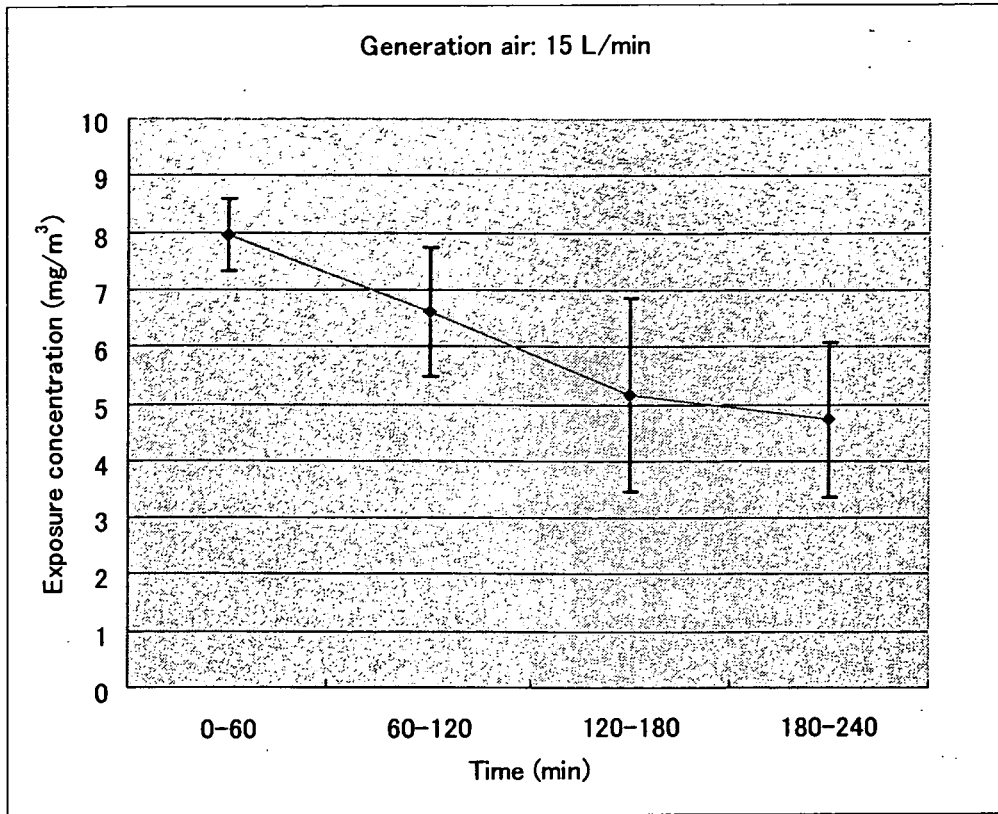


図7 ダスト発生における暴露濃度推移(発生流量: 15 L/min)

表2 ダスト発生における暴露濃度測定値(発生流量: 10 L/min)

Experiment	Exposure concentration (mg/m ³)				Mean ± S.D.
	0-60	60-120	120-180	180-240	
Exp. 1	7.67	5.33	3.33	3.16	4.87 ± 2.11
Exp. 2	8.67	7.50	6.67	5.67	7.13 ± 1.27
Exp. 3	7.50	7.00	5.50	5.33	6.33 ± 1.08
Mean ± S.D.	7.95 ± 0.632	6.61 ± 1.14	5.17 ± 1.69	4.72 ± 1.36	6.11 ± 1.71

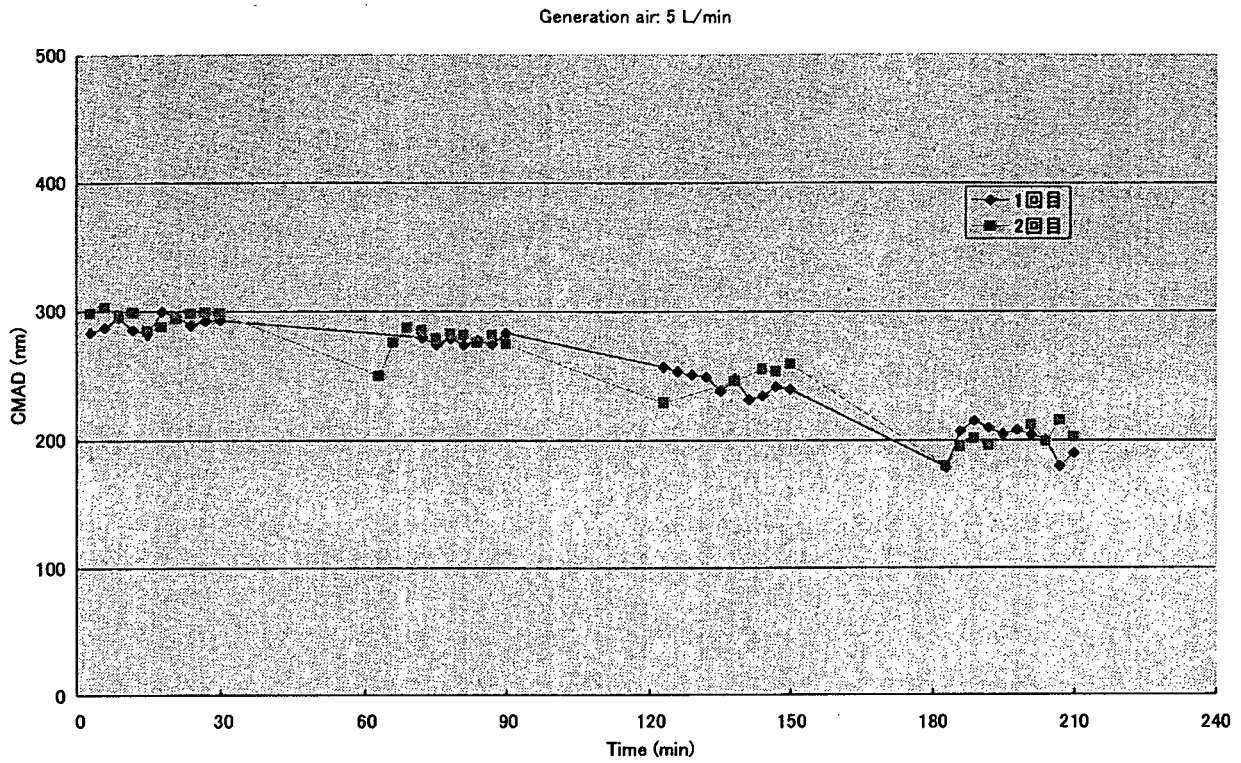


図8 ダスト発生における時間経過ごとの CMAD の推移(発生流量: 5 L/min)

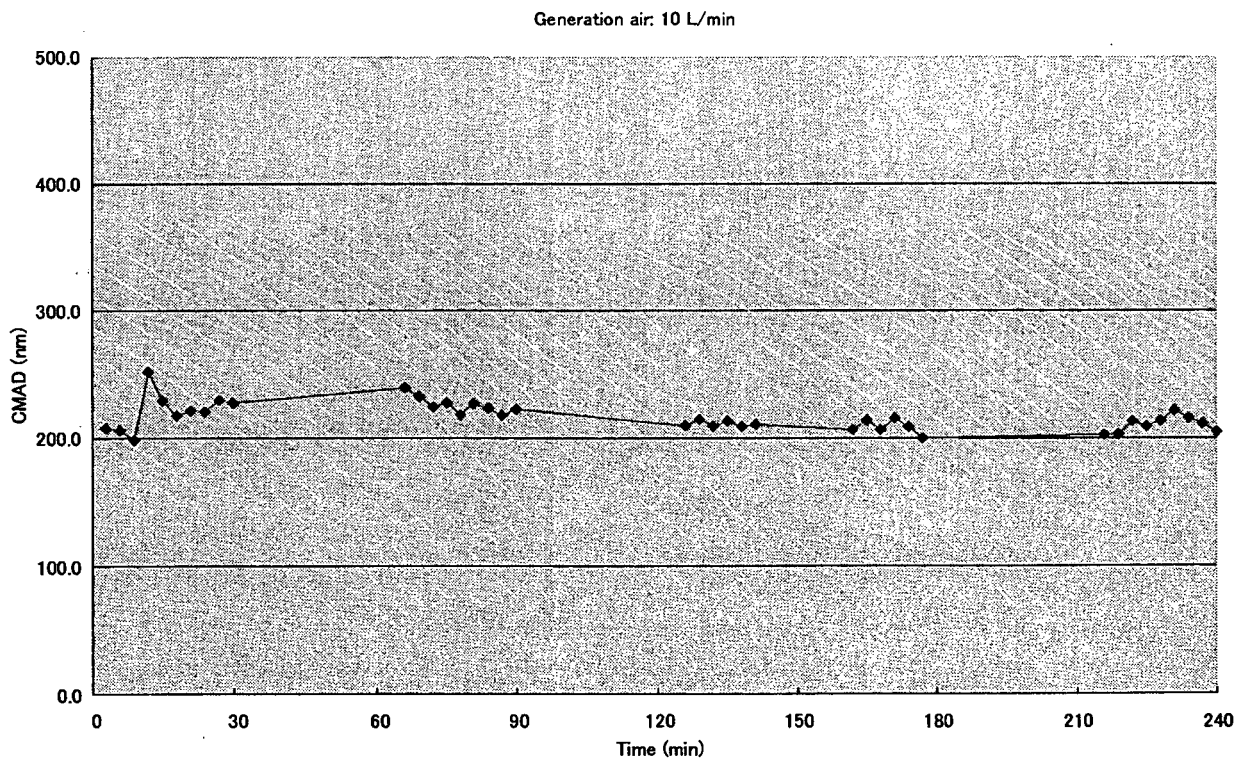


図9 ダスト発生における時間経過ごとの CMAD の推移(発生流量: 10 L/min)

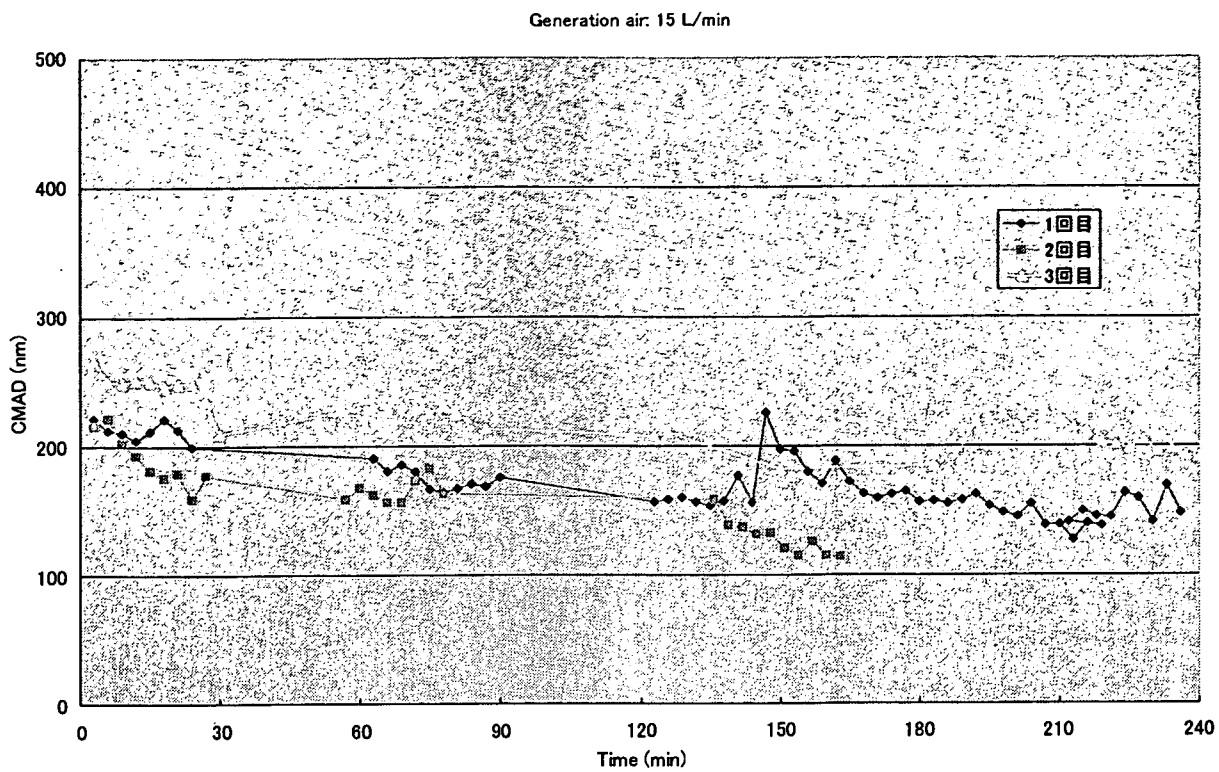


図10 ダスト発生における時間経過ごとのCMADの推移(発生流量: 15 L/min)

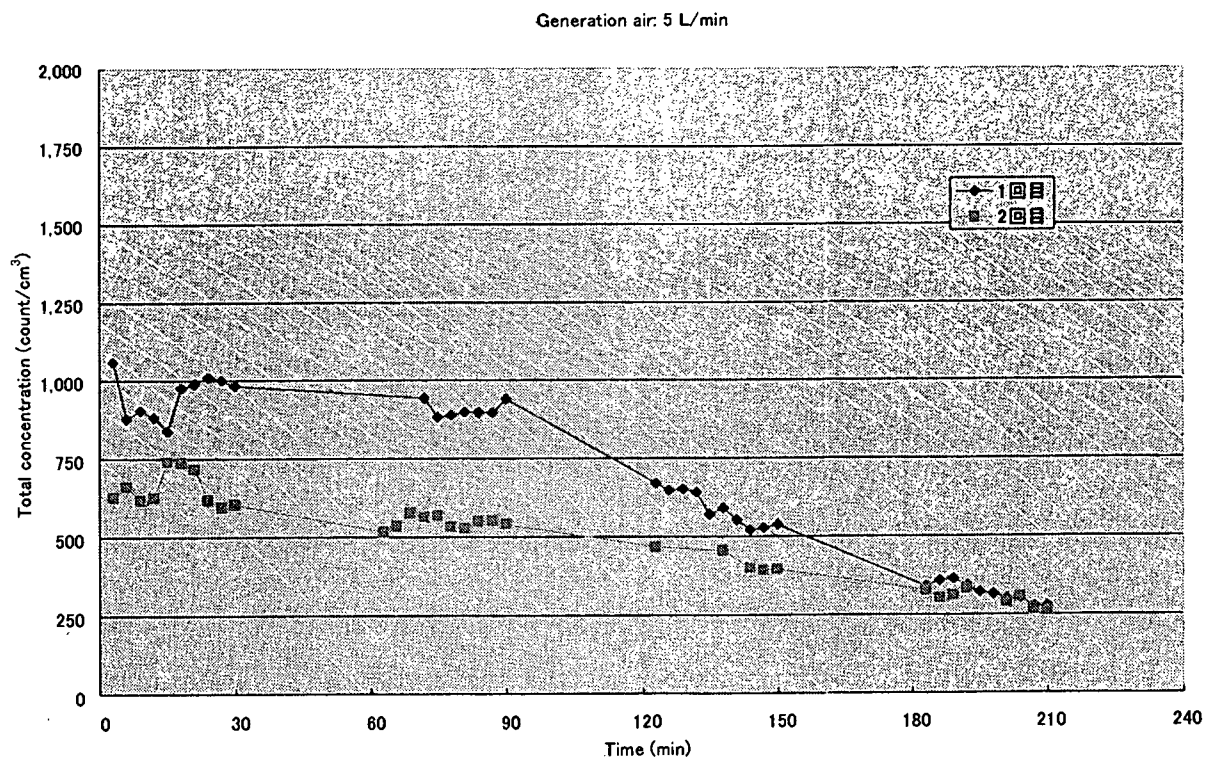


図11 ダスト発生における時間経過ごとのMWNT粒子数の推移(発生流量: 5 L/min)

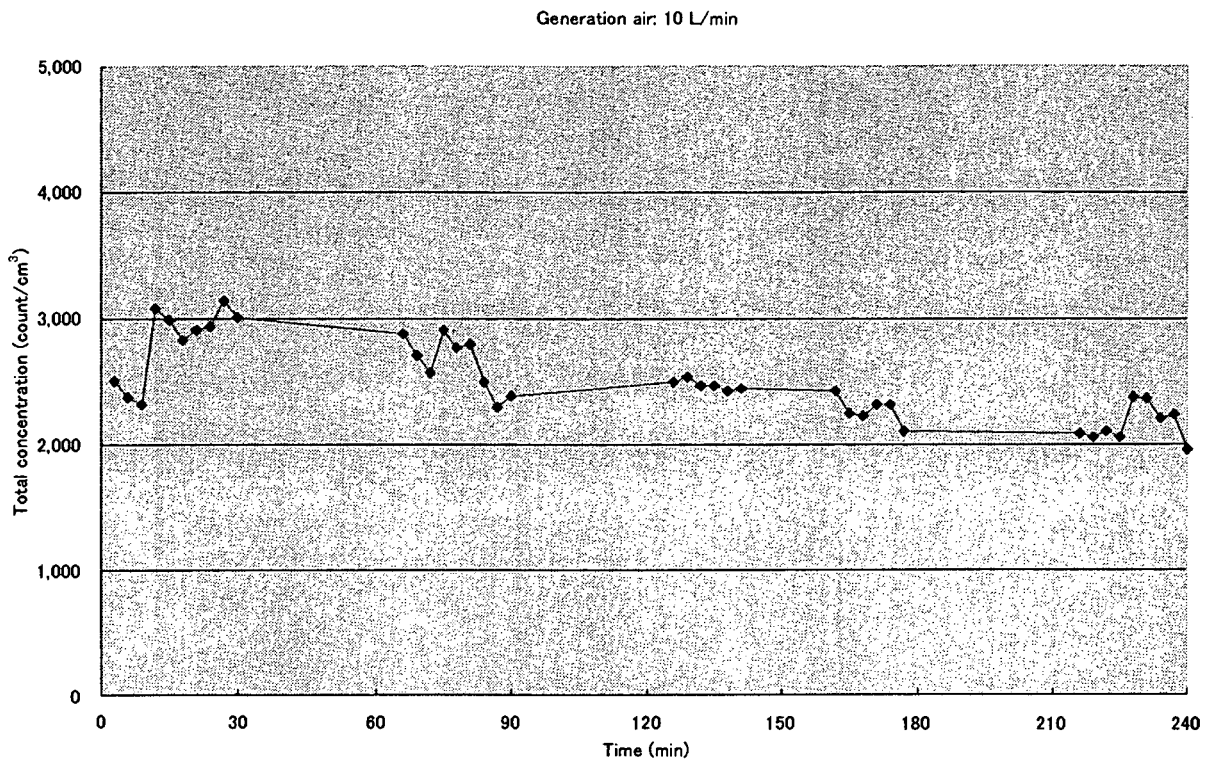


図 1.2 ダスト発生における時間経過ごとの MWNT 粒子数の推移(発生流量: 10 L/min)

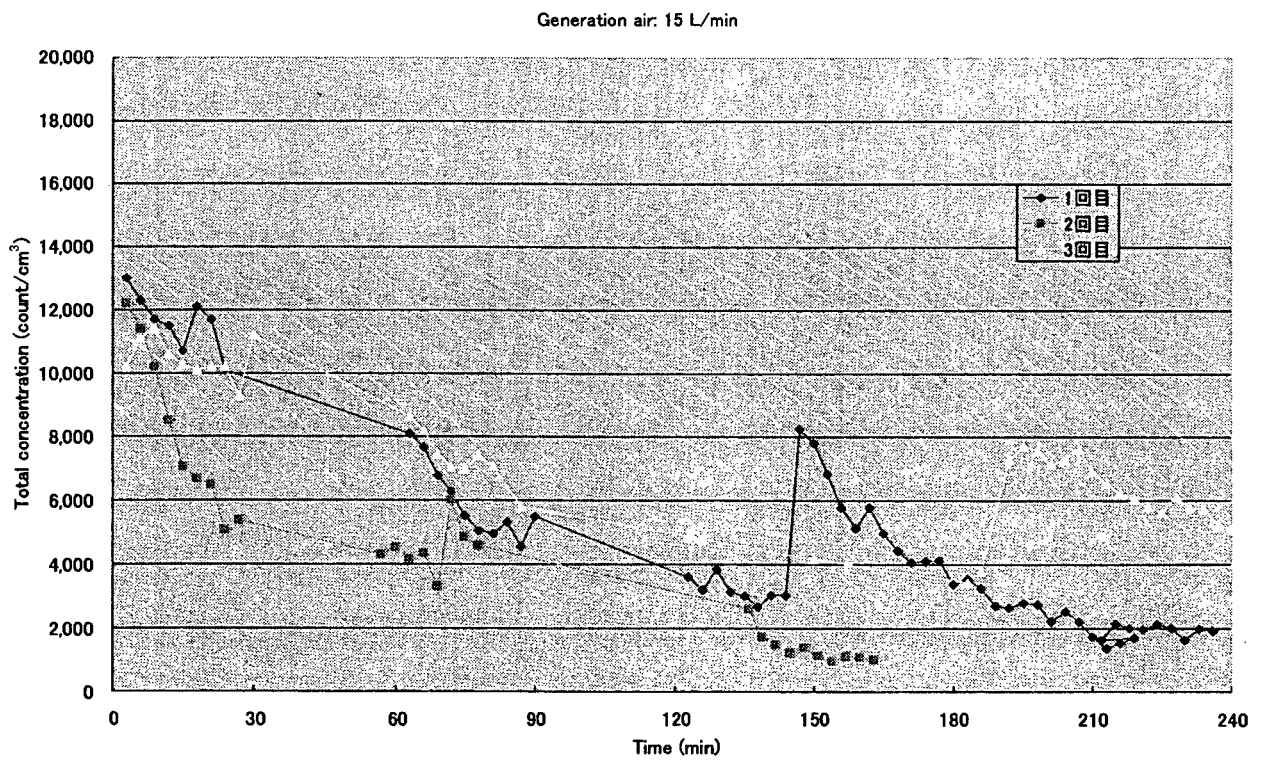
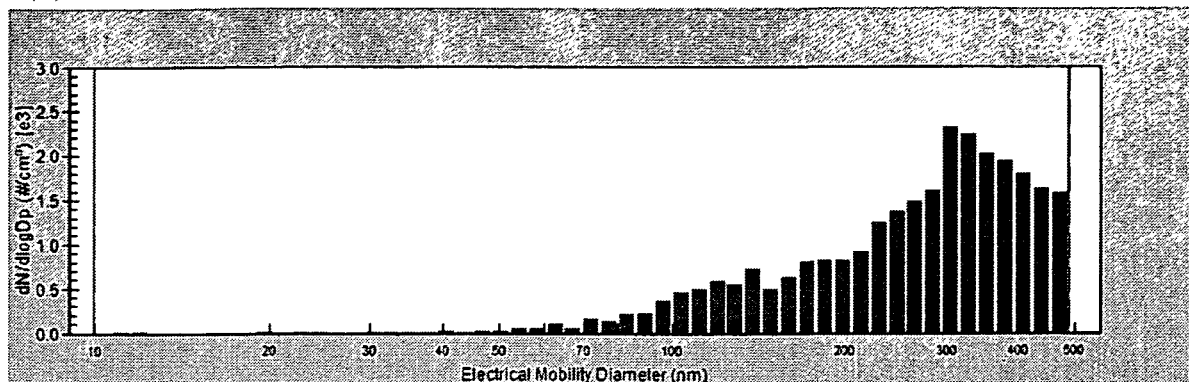
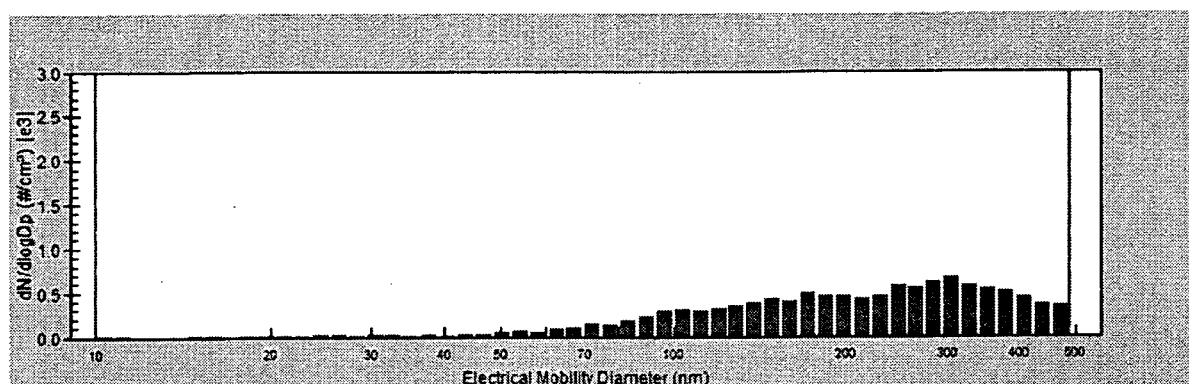


図 1.3 ダスト発生における時間経過ごとの MWNT 粒子数の推移(発生流量: 15 L/min)

(A)



(B)



↓ × 3.75

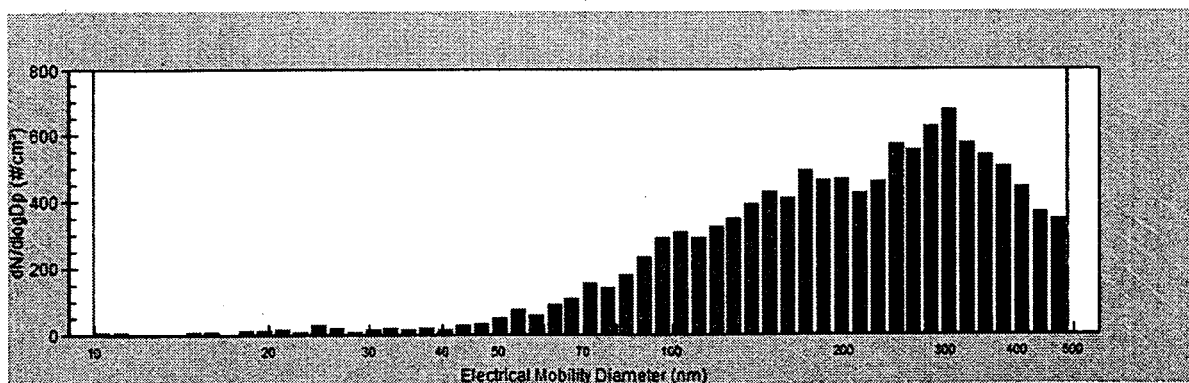
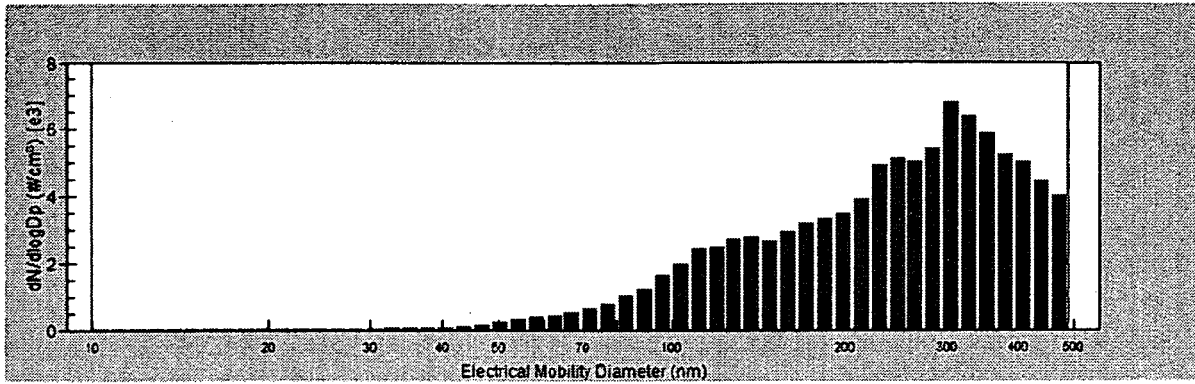


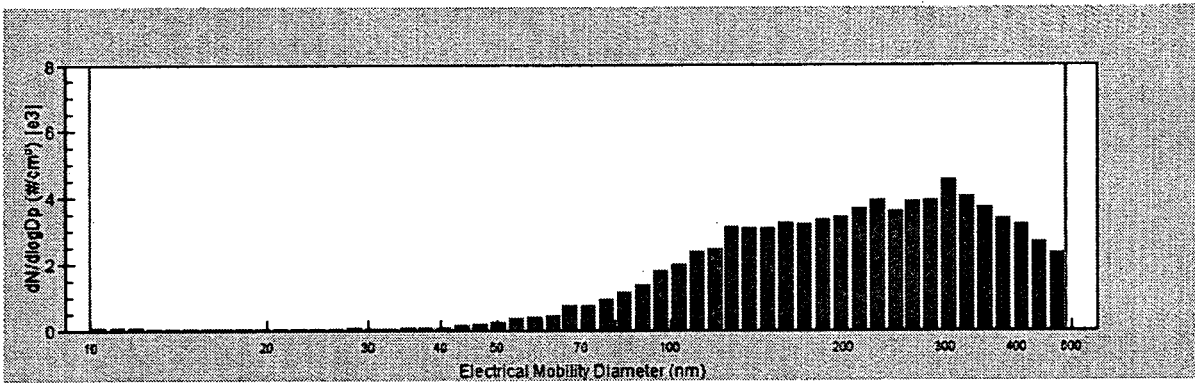
図 1 4 ダスト発生における粒度分布ヒストグラム(発生流量: 5 L/min)

A: 発生開始 2 分後、B: 発生開始 189 分後

(A)



(B)



(C)

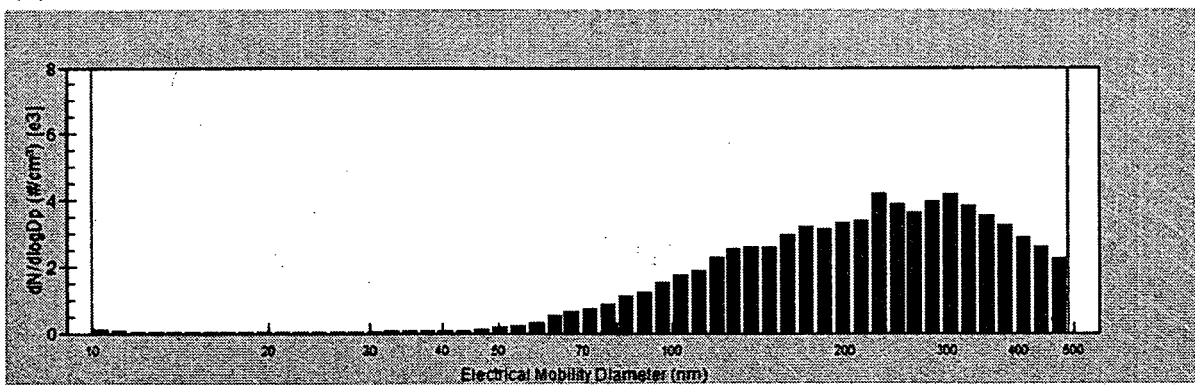
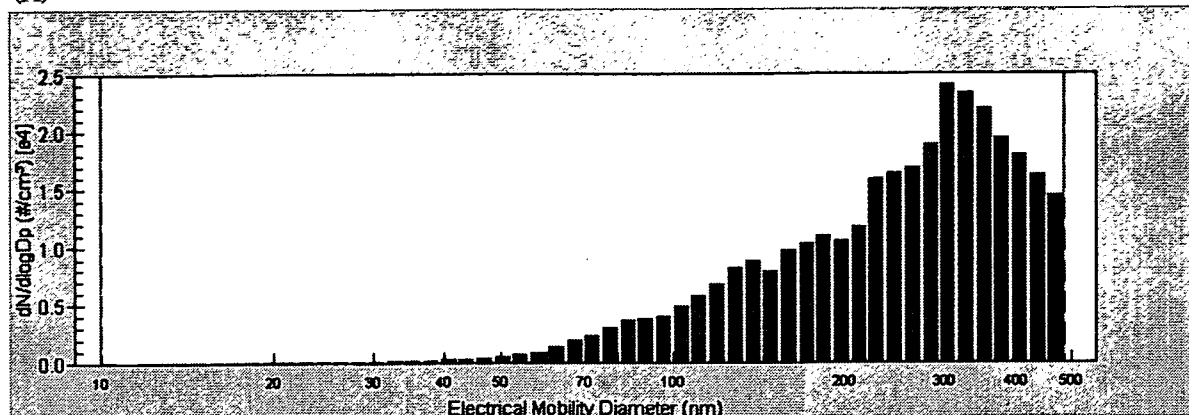


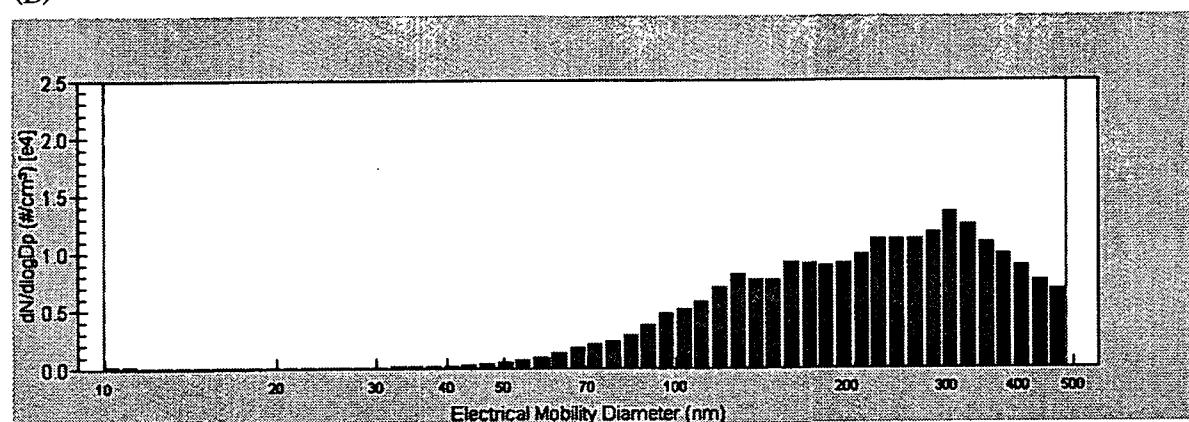
図15 ダスト発生における粒度分布ヒストグラム(発生流量: 10 L/min)

A: 発生開始 12 分後、B: 発生開始 129 分後、C: 発生開始 231 分後

(A)



(B)



(C)

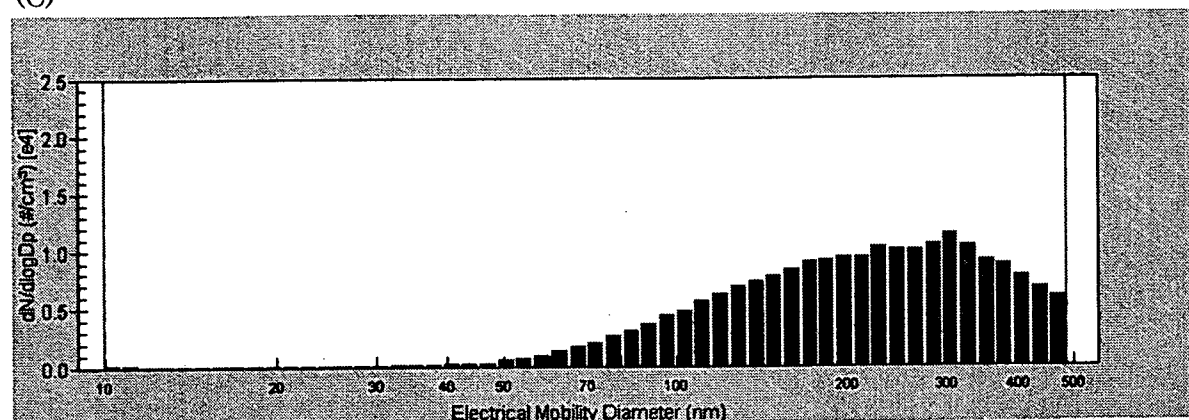


図16 ダスト発生における粒度分布ヒストグラム(発生流量: 15 L/min)
A: 発生開始3分後、B: 発生開始81分後、C: 発生開始213分後

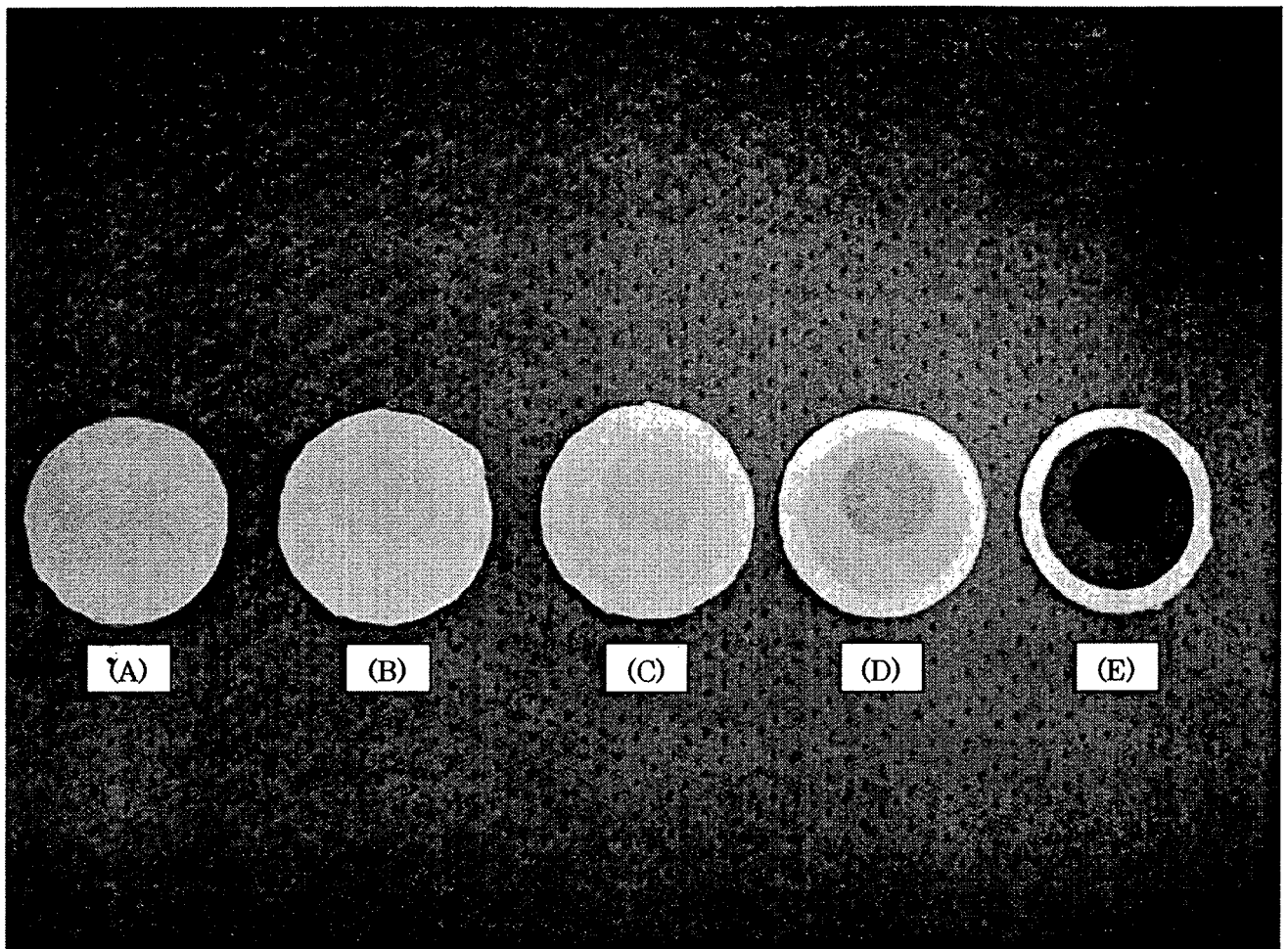


図17 ミスト発生における暴露濃度測定時の捕集フィルター
A: 0% (媒体)、B: 0.05%、C: 0.1%、D: 0.2%、E: 0.4%

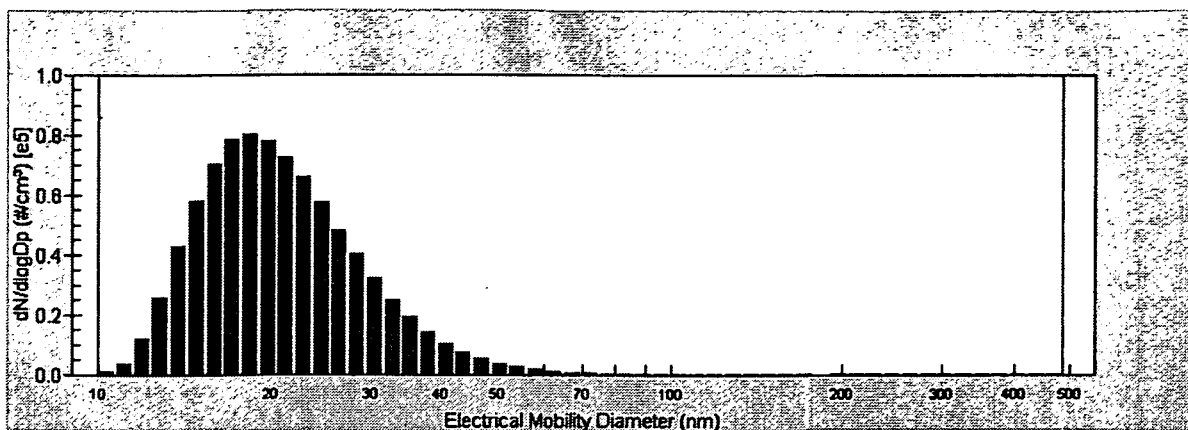


図 18 ミスト発生における粒度分布ヒストグラム(水のみ)

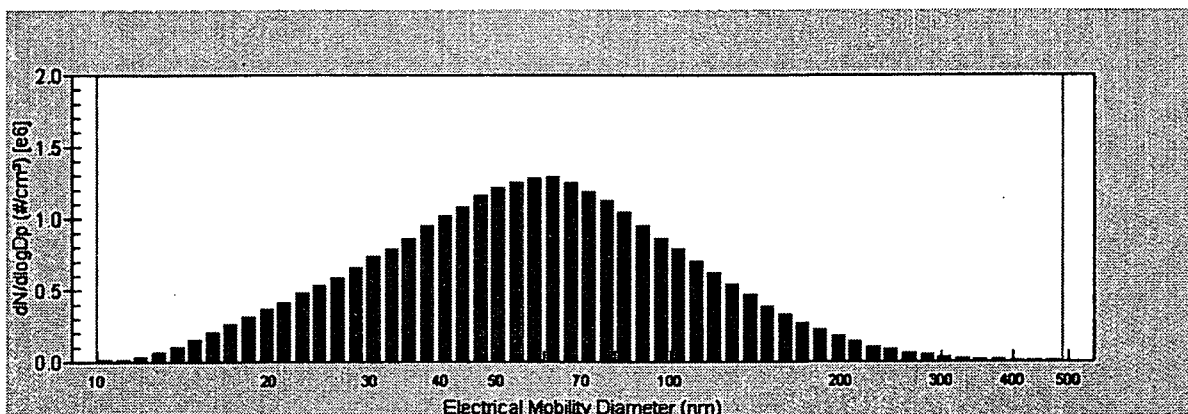


図 19 ミスト発生における粒度分布ヒストグラム(0%; 媒体)

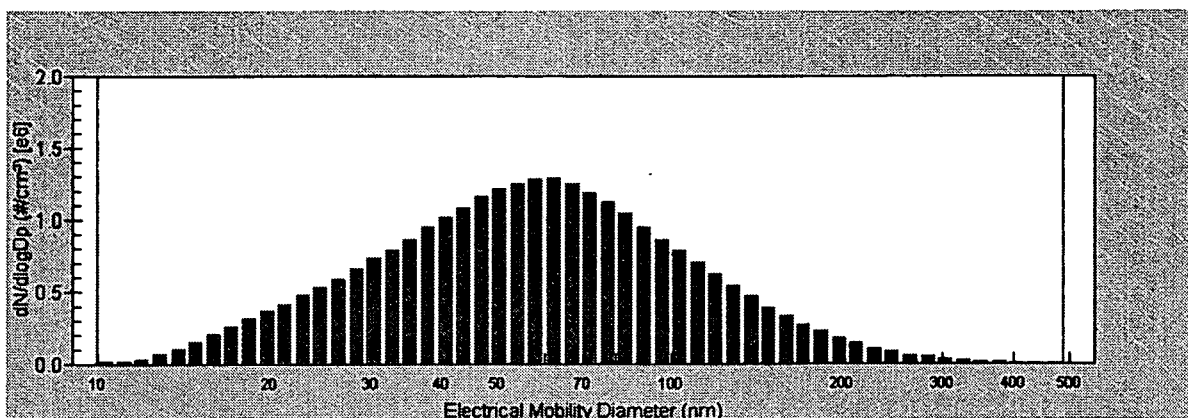


図 20 ミスト発生における粒度分布ヒストグラム(0.05%)

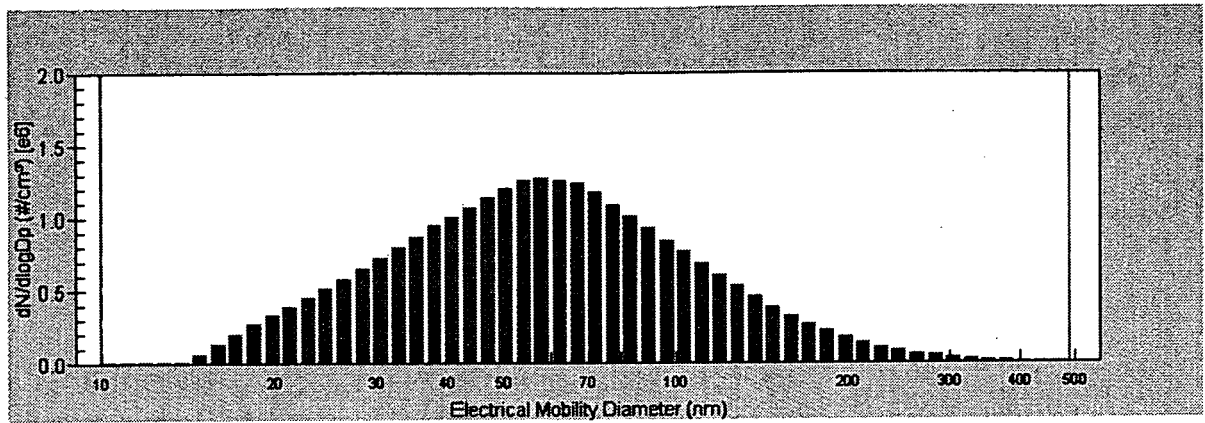


図 2 1 ミスト発生における粒度分布ヒストグラム(0.1%)

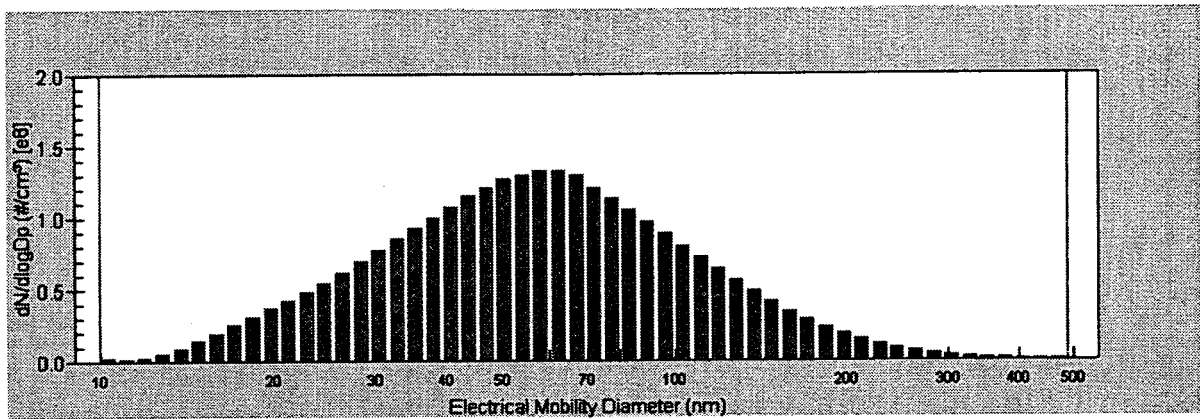


図 2 2 ミスト発生における粒度分布ヒストグラム(0.2%)

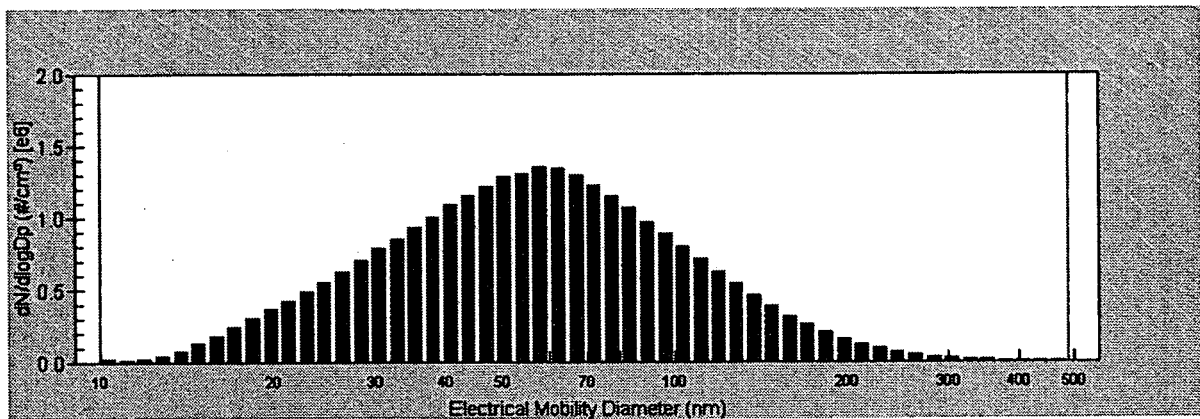


図 2 3 ミスト発生における粒度分布ヒストグラム(0.4%)

研究課題名: ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法の開発のための有害性評価および
体内動態評価に関する基盤研究

分担研究課題名: 高生産量ナノマテリアルの環境中での分解代謝等に関する研究

分担研究者: 屋形 直明 (財)化学物質評価研究機構 久留米事業所 試験第二課 課長

研究協力者: 井上 義之 (財)化学物質評価研究機構 久留米事業所 試験第二課 副長

研究要旨

ナノマテリアルの環境経由の暴露を想定した場合には、酸化チタンやフラーレン、MWCNT の環境中での分解・代謝物の同定が必要である。環境残留性の確認と水溶性変化物の有無について解析を行うために、18 年度は、先ずフラーレン(C60)を用いて微生物による分解度試験を OECD テストガイドライン 301C に準拠して行った。その結果、フラーレン(C60)は変化せず微生物により分解されなかった。

A. 研究目的

ナノマテリアルはナノサイズで構造が制御された物質であり、特有の電氣的・磁氣的・光学的・力学的特性を有する。これらの性質を利用し、優れた性能および機能性を兼ね備えた材料の研究開発が行われており、21 世紀の技術革新を担う新機能材料として、ナノマテリアルへの期待はどんどん大きくなっている。

しかしながら、ナノマテリアルの人の健康や環境中の生物への影響については、現時点では不明な点が多い。環境経由の暴露を想定した場合には、酸化チタンやフラーレン、MWCNT の環境中での分解・代謝物の同定が必要である。

そこで、フラーレン(C60)を用いて、環境条件の変化(酸化、紫外線、微生物など)による分解・代謝物の解析を行うことを目的とし、微生物による分解度試験を OECD テストガイドライン 301C に準拠して実施したので報告する。

B. 研究方法

B-1 実験材料

被験物質として使用したフラーレン(C60)は、次の名称等を有するものを使用した。

CAS 番号	99685-96-8
供給者	フロンティアカーボン株式会社
商品名	ナノムパープル N60
ロット番号	4A0314-A
純度	99%

試験の実施には汚泥が十分な活性度を有することを確認するため、対照物質としてアニリン(和光純薬工業製 試薬特級 ロット番号 DPJ7363)を用いた。

B-2 活性汚泥の調製

本試験における活性汚泥は、以下のとおり調製したものをを使用した。

(1) 採集場所

以下の全国 10 ヶ所から採集した。

伏古川処理場(北海道札幌市)

深芝処理場(茨城県神栖市)

落合水再生センター(東京都新宿区)

中浜下水処理場(大阪府大阪市)