

Ⅱ. 分担研究報告書

実験動物への曝露量および曝露形態を把握するためのナノマテリアルの性状・拡散状態
及び濃度を把握する方法に関する研究

研究分担者	鷹屋 光俊	独立行政法人労働安全衛生総合研究所環境計測管理研究グループ上席研究員
研究協力者	芹田富美雄	独立行政法人労働安全衛生総合研究所環境計測管理研究グループ上席研究員
	久保田久代	独立行政法人労働安全衛生総合研究所健康障害予防研究グループ主任研究員
	三浦 伸彦	独立行政法人労働安全衛生総合研究所健康障害予防研究グループ 研究員

研究要旨

本分担研究では、被験物質の性状・濃度を正しく把握するドーズキャラクタリゼーションを担当している。本年度は、多層カーボンナノチューブ（MW-CNT）に含まれる不純物金属元素の定性・定量について、レーザー気化誘導結核結合プラズマ質量分析（LA-ICP-MS）、レーザーブレイクダウンプラズマ分光分析（LIBS）・蛍光X線分析（XRF）などの条件を検討し、動物実験に用いた被験試料 MW-CNT 中に鉄が含まれることを確認した。この他、動的光散乱法（DLS）および走査電子顕微鏡観察（SEM）により、ラットに気管内投与した MW-CNT の肺内における分散状態の確認を行った。

A. 研究目的

動物実験動物実験においては、曝露・気管内投与のいずれの手法を用いる場合でも、被験物質の性状・濃度を正しく把握するドーズキャラクタリゼーションを行うことは、生体影響を定量的に評価するために必要不可欠である。しかし、ナノ材料に関しては、動物の体内はもとより、環境中や比較的制御された環境である曝露チャンパー内のナノ粒子についてでさえ、濃度・性状・動態を知るキャラクタリゼーション技術は確立されているとはいえない。本分担研究では、分担研究者が職場環境におけるナノ粒子発生状況に関する測定を重ねて得た知見をもとに、曝露チャンパー中の空気、気管内投与試料懸濁液、動物体内におけるナノ材料のキャラクタリゼーション法の開発・評価を行うことを目的としている。

B. 研究方法

本分担研究の目標は、全てのナノ材料に適用可能な普遍的なキャラクタリゼーションの開発であるが、現実的には難しい点も多いため、主に、本研究の動物実験で用いられている多層カーボンナノチューブ（MW-CNT）を試料として、濃度・分散状態・材料中に含まれる不純物の測定方法を検討し、一部他の物質に応用可能な技術に関して検討を行うこととした。

初年度の本年度は

- (1) MW-CNT 製造時に用いられる触媒由来の金属不純物の定性・半定量

- (2) 気管内投与実験に用いられた MW-CNT 懸濁液および投与試料エアロゾル中の MW-CNT 分散状態の把握

- (3) SEM によるラット肺内 MW-CNT 観察を行った。この他、体内でのナノ材料動態を知る方法として、生化学的・分子生物学的手法も行うこととして、一部予備的検討に着手したが、まだ結果を報告する段階に至っておらず、本報告書では (1)-(3) について報告する。

- (1) 金属不純物の濃度測定

① 金属不純物濃度測定の必要性

CNT の製造法は各種あるが、製造・販売量が多い会社の製品は、各社のホームページ・製品パンフレット情報により概ね気相化学蒸気成長（CVD）によるチューブ構造の構築とそれに引き続き行われる焼成による黒鉛化による製造が行われている。例えば、動物実験で用いた三井物産より提供を受けた MW-CNT を製造しているナノカーボンテクノロジーズ、日機装などの該当ページに記載がある [1]。また、MW-CNT と類似材料であるカーボンナノファイバーについても同様の製造方法がとられている [2]。

CVD 反応炉内では、ナノサイズの触媒粒子を種にして炭素のチューブ構造が成長してゆく、その後の黒鉛化の過程で反応活性が高い触媒付近の炭素を反応させまわりの炭素ごと触媒粒子を焼き切る、黒鉛化のあと酸などの薬品で処理する等の方法で、触媒を除去する。しかし、触媒粒子の除去が完全に行われていない場合もある。単純に比較はできないが単層カーボンナノチューブ（SW-CNT）の呼吸器影響を調べた Warheit らの研究 [3] では、試料中に重量濃度で 5% 程度のニッケル、コバルトなどが含まれていることが報告されている。このことから、

CNTは、その繊維状構造と、触媒由来の金属ナノ粒子の両方について生体に対して影響をもたらす可能性があると考えられ、CNTの生体影響を動物実験で評価する場合は、触媒由来の残留金属の種類・濃度・形状などを把握することが不可欠である。

② 金属の定性および半定量

CNT内の金属不純物の形状および成分を把握するには、透過型電子顕微鏡(TEM)を用いて、チューブ内に存在するナノ粒子を確認し、二次X線により元素分析する手法が使用できる。しかし、TEMは、装置が高価であり、元素分析装置も備えた分析-TEMとなるとさらに使用できる施設に限られる上に、試料調製に高度な技術を要する。また、試料を酸などで分解・抽出して、誘導結合プラズマ原子発光分析(ICP-AES)、誘導結合プラズマ質量分析(ICP-MS)、原子吸光分析(AA)などを行うことも考えられるが、CNTは物理的にも化学的にも強靱な材料であることから、定量的に金属を溶解・抽出する手順を確立するためには、多数の実験を重ねる必要がある。これは、次年度以降の課題とし、今年度は、より簡便に行える方法として、レーザー気化ICP-MS(LA-ICP-MS)およびレーザーブレイクダウンプラズマ分光分析(LIBS)と、蛍光X線による定性・半定量を試みた。

・ 蛍光X線(XRF)

XRFは、試料にX線を照射すると、元素特有のX線(蛍光X線)を発生することにより、主に固体試料について元素の定性・定量分析を行う分析方法である。原理的には、金属元素に限らずあらゆる元素の分析が可能であるが、原子番号の小さい軽元素では、発生するX線の透過力が弱いいため、真空の資料室を持つ大型の装置を除き概ねMgあるいはAlより重い元素を分析する能力を持つ。本研究ではPanalytical社製Minipal2型エネルギー分散型蛍光X線分析装置(RhターゲットX線管球使用、Mg以上の元素の分析が可能)を用い、動物実験に用いたのと同じMW-CNTのバルク粉体についての定性分析を行った。また、FP(ファンダメンタルパラメーター)法による半定量を行った。本来FP法を適用するためには、試料が発生する蛍光X線を全て計測可能でならず、主成分が軽元素のMW-CNT分析にはそのままでは適用できない。そこで、定性分析の結果試料に含まれていないことが確認できたTiおよびCuを加え、Cの含有率が既知の混合試料を作成して、FP法による触媒成分の半定量を試みた。実験手順は以下の通りである。

- ① 50mL遠沈管に試料10-20mgを秤撮る。
- ② ①にCuOを20-50mg加える
- ③ ②にTiO₂を20-50mg加える

- ④ 白色のTiO₂が黒色のCNTと均一に混じるように目視で混ぜる。
- ⑤ XRFでStandardless定量を行う。(管球電圧30kV、Alフィルター使用)
- ⑥ 粉末混合の不均一による誤差を減らすために、上記の試料を5組用意するとともに、試料容器の角度を120°づつずらし各試料を3回測定し平均値より、Fe含有量を計算する。

・ LA-ICP-MSおよびLIBS

LA-ICP-MSは、試料を紫外線レーザーで、気化させたのち、ICP-MSにより金属分析を行う方法である。主に鉱物の微小領域の成分分析などに用いられる手法である。LIBSは、試料に赤外線レーザーを照射し、試料の一部をプラズマ化してその際の原子発光を分光分析する分析方法であり、励起源のエネルギーの関係でICP-MSでは分析が困難な炭素などの非金属元素も分析できるという特徴を持つ。LA-ICP-MS、LIBSいずれも固体の一部を高感度に元素分析する方法であるが、ナノ粒子を含む粉体試料については、レーザー照射時の衝撃で粉体が飛散してしまうため、定量性に問題が生じることが知られている。レーザー照射時の粉体飛散を防ぐ方法として田中ら[4,5]は、試料粒子を捕集したフィ

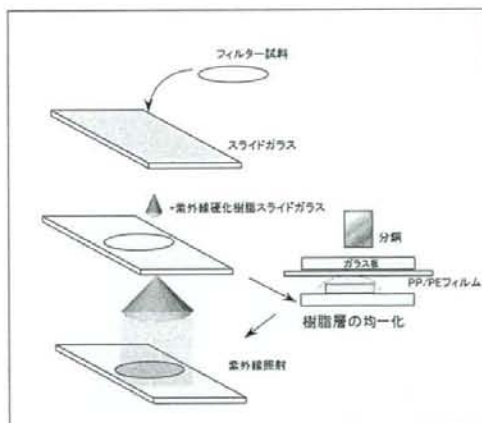


図1 試料固定化手順

ルターにオイルをしみこませることにより粒子の固定を行っているが、フィルターと粒子の両方に親和性のある液体を用いる必要があり全ての試料に関して万能であるとはいえない。

我々は、以前より粒子の固定方法として、粒子塊あるいは、粒子を捕集したフィルターに樹脂を染み込ませ固定する方法の研究を行っている。その手順を図1に示す。

フィルター試料をスライドガラス上にのせ、その上からシアノアクリレート系瞬間接着剤、アクリル系紫外線硬化樹脂、エポキシ系紫外線硬化樹脂などを滴下する、余分な樹脂を追い出し試料厚みを均一にするため、上記樹脂では接着されない樹脂フィルムを挟み込んだ上でガラス板・錘（500gの分銅2個）を一旦のせた。錘だけを取り除いた状態で、高圧水銀管による紫外線を30秒程度照射し、仮固定し、ガラス板を取り除きさらに2、3分紫外線を照射して試料を固定した。

固定した試料をLA-ICP-MS、LIBSなどで分析を行った。この方法で、金属酸化物ナノ粒子の測定を行った実績があるが、MW-CNTは、水にも有機溶媒にも溶解しないという性質があり、固形樹脂に対する濡れ性がないことにより、固定化できない可能性もあった。そこで、本年度はMW-CNTに対応した硬化に用いる樹脂、間に挟むフィルム材料等の条件検討を行った。結果は次節で述べる。

(2) 投与試料の分散状態の把握

本年度は、被験試料懸濁液をラット気道内にマイクロスプレーで噴霧し気管内に投与する方法で生体影響を調べているが、このような投与方法では、現実に呼吸によりナノマテリアル粒子をエアロゾルとして体内に取り込む際には肺内に入ってこない吸入性粒子よりも大きい状態に凝集した粒子も投与される可能性がある。そこで、実際にどのような形態でMW-CNT粒子がラット体内に投与されたか推定するために、スプレーする前の懸濁液およびマイクロスプレーで噴霧したミスト状試料のMW-CNTの分散状況の把握を行うための実験を行った。

① 懸濁液中のMW-CNT分散状況の確認

懸濁液中のMW-CNTの分散状況の確認は、動的光散乱（DLS）による粒度分布測定と、走査電子顕微鏡による観察の2つの方法で行った。DLSは、試料懸濁液にレーザー光を照射しその散乱光のゆらぎを計測する。試料溶液に含まれる粒子が小さければ、粒子のブラウン運動に由来する散乱光のゆらぎの周期が短くなることを利用して、試料溶液内の粒子の粒度分布を測定する装置であり、数10～数100nmの範囲に関してはもっとも測定精度が高い。ただし、正確に粒子径を測定できるのは、屈折率既知の球形粒子についてであり、今回の試料については、屈折率も不明であるし、形状が繊維状であるため、相対的な分散の良否を知ることができるに過ぎない。

本研究では、DLS装置に英国Malvern製のZetaSizer Nano(赤色レーザー使用)を用い、PBS並びにリン酸緩衝生理食塩水（PBS）並びにPBSに0.1% Tween80を加えたMW-CNT懸濁液の分散状態を測定した。この実験の目的はラットへの投与実験を担当した日本バイオッセイ研究センタ

ーが、ラットに投与する懸濁液の条件検討の際に、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）に種々の濃度の分散助剤（界面活性剤 Tween80）を加え、目視でCNTの凝集状況を確認して、求めた最適条件（PBS+0.1% TWEEN80）の有効性の検証と、投与直前まで超音波照射を行う必要があるかどうかの検証である。

MW-CNTに関しては、DLSでは、相対的な情報しか得られないためSEM写真による懸濁液の分散状況の確認も併せて行った。試料作成は、日本バイオッセイ研究センターが担当した。試料作成方



図2 懸濁液SEM試料調製法

法は、協力研究者の芹田が開発した方法で、文献[6]に詳細が記載されており、本項では、簡単に手順を記す。

ポリカーボネートメンブランフィルターを濾過器にセットした状態で、試料懸濁液をフィルターに落とした直後に、吸引ろ過を開始して、懸濁液粒子をフィルター上に載せて作成した(図2)。このフィルター試料を労働安全衛生総合研究所内で、定法に従い、帯電防止の金属薄膜コーティング(Pt-Pd合金)をしたものを日立製S-4700走査型電子顕微鏡で観察した。

② ラット投与試料中のMW-CNT分散状況の確認

本年度に行われたラット投与実験では、気管内に懸濁液を滴下する方法ではなく、マイクロスプレーを用いて気管内に懸濁液ミストを噴霧する方法で行われた。この噴霧試料の分散状態をしらべるため、動物への投与時に、別室で投与開始直前および投与終了直後の懸濁液を投与に用いたのと同じ形式のマイクロスプレーを用いて噴霧させ、ポリカーボネートメンブランフィルターに捕集してSEM観察を行った。

る半定量を試みた。その結果を表1に示す。

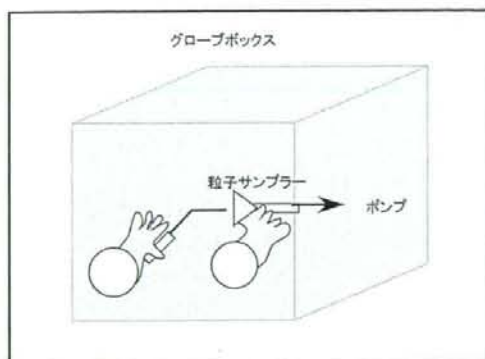


図3 試料採取

(3) SEMによるラット肺内のCNT観察

投与後の試料の凝集状態、分布をSEM観察で行えないかどうか予備的に検討した。

日本バイオアッセイ研究センターで、気管内投与実験を行った病理切片の一部を、キシレンに浸漬して脱パラフィンをおこなった。この切片試料をそのまま、あるいは、酸素プラズマによる低温灰化装置により組織の除去を試みたものを試料とした。これらは、定法に従い、帯電防止の金属薄膜コーティング (Pt-Pd 合金) をしたものを日立製 S-4700 走査型電子顕微鏡で観察した。

C. 研究結果

(1) 金属不純物の濃度測定

① 蛍光X線測定結果

図4に試料CNTの蛍光X線スペクトルを示す。蛍光X線測定の感度で検出できる金属不純物は、鉄だけだということが解った。この結果を元に研究方法の項で述べた方法でFP法 Standardless によ

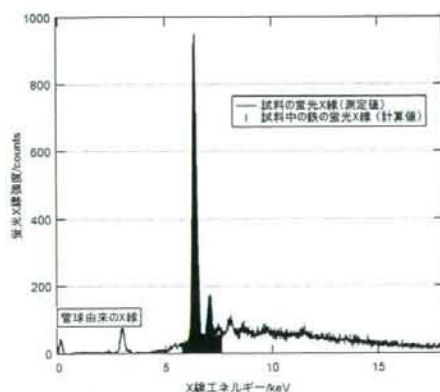


図4 試料の蛍光X線スペクトル

表1 蛍光X線による鉄含有量/%

	試料-1	試料-2	試料-3	試料-4	試料-5
試料調製混合比/%					
CNT-①	16.5	15.6	14.0	12.0	12.4
CuO	52.5	51.2	44.8	52.6	37.4
TiO ₂	31.0	33.2	41.2	35.4	50.2
Total	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
混合試料中の成分濃度 (FP測定結果の3回平均) %					
Fe ₂ O ₃ -②	0.59	0.51	0.18	0.21	0.23
CuO	72.80	63.47	53.37	70.90	46.07
TiO ₂	23.53	34.00	44.80	27.23	51.70
3回測定の標準偏差/%					
Fe ₂ O ₃	0.01	0.05	0.02	0.02	0.01
CuO	2.02	1.00	1.50	2.71	1.31
TiO ₂	1.86	0.56	1.25	2.41	1.56
CNT中Fe/%					
② ①					
$\frac{2Fe}{100 \times 2Fe + 3O}$	1.8	2.0	0.4	0.4	0.8

平均1.1% 標準偏差0.7%

蛍光X線の測定結果では、試料CNT中に含まれる鉄は1.1±0.7%程度となった。ただし、FP法は標準を用いない半定量であること、既知量加えたCuやTiの濃度測定結果に相当量のばらつきもあったため、実際にはこの結果は、オーダー分析程度の信頼性しか無いものと考えられ、試料中には1%程度の鉄を含むという判断が妥当だと考えられる。

② LA-ICP-MS および LIBS

・試料の固定

試料の固定については、シアノアクリレート系瞬間接着剤、アクリル系UV硬化樹脂、主に光ファイバーの接着に用いられるエポキシ系UV硬化樹脂の3種類の樹脂による固定を試みた。

シアノアクリレート系瞬間接着剤を用い、基板の上にMW-CNT塊を固定することを試みたが、接着剤に対する濡れ(親和)性が低く、固定することはできなかった。一方、UV硬化樹脂に関しては、液体状態の樹脂がMW-CNT層を包んだまま紫外線照射により固定化することによりMW-CNTを、セル

コースあるいはテフロン樹脂メンブランフィルター上に固定することができた。

・LA-ICP, LIBS 分析

前項の方法で作成した樹脂固定化 MW-CNT を LA-ICP-MS, LIBS での分析を試みた。LIBS に関しては、当研究所が保有している 50mW の Nd-YAG 赤外線レーザーでは、照射エネルギーが不足し、樹脂層の厚みによりプラズマ発生状態が一定にならず、定性・定量ともに成功しなかった。

一方 LA-ICP-MS では、図 5 に示すように、フィルター表面を紫外線レーザーで走査すると、MW-CNT 塊がある場所で、各種の元素が検出された。蛍光 X 線で存在が確認できている鉄のピークに対応して、銅、マンガンおよび微量のクロムの存在が推定された。尚、今回は、分子イオンをマスフィルター内で破壊するコリジョンセルを使用せず⁷に測定したため、鉄が最も同位対比の高い ⁵⁶Fe (Ar-O と同じ m/z を持つため、コリジョンセルなしでは測定不可能)ではなく、⁵⁷Fe を検出しているため他の元素よりピークが低くなっている。

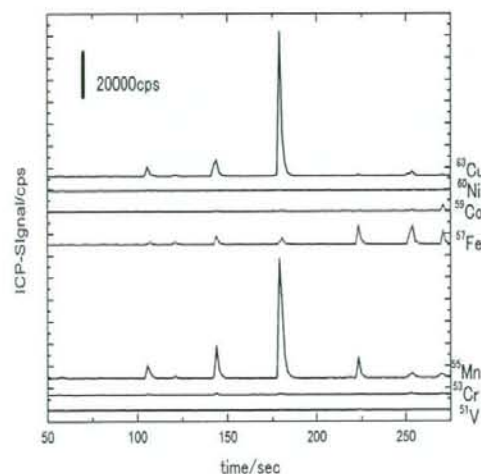


図 5 試料の LA-ICP-MS による定性

(2) 投与試料の分散状態の把握

① DLS 測定結果

図 6 は、Tween60 を 0.1% 加えた PBS を分散媒とする MW-CNT 懸濁液を硝子ビンに入れ、超音波洗浄器で超音波を照射した時の粒子の分散を DLS で測定した結果である。最初、数 μm に凝集している粒子が超音波照射で徐々に分散し、超音波を 5 分照射したあと、 $1\mu\text{m}$ 程度に分散した。この結果

を基に投与実験中は、常に懸濁液に超音波を照射することとした。

② SEM 観察結果

図 7 は懸濁液中の粒子を図 2 の方法でフィルター上に捕集したものの SEM 写真である。SEM 写真に示すように、MW-CNT 試料は必ずしも直線状の繊維ではなく一部絡まっている粒子も観測できた

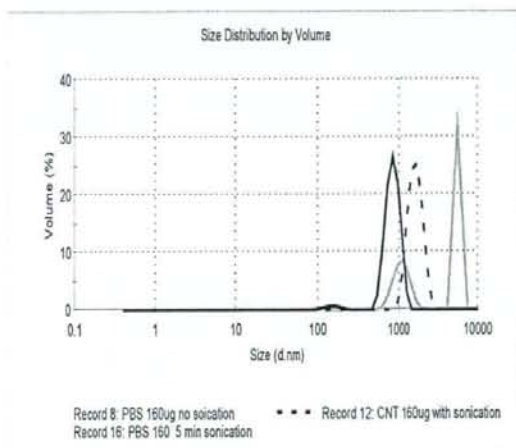


図 6DLS 測定による超音波照射の効果

が、概ね大半の粒子は凝集しておらず、分散は良好であると判断した。

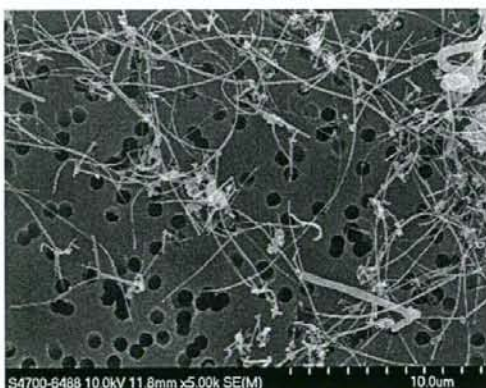


図 7 試料懸濁液中の MW-CNT

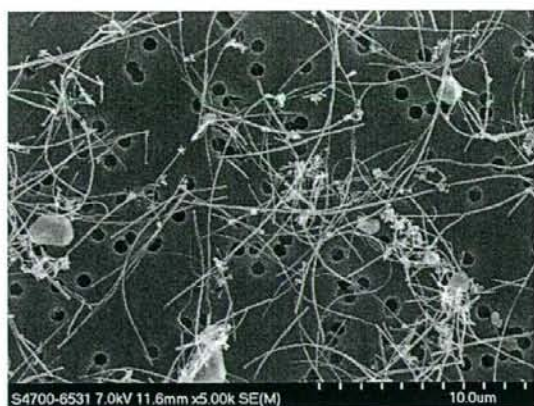


図 8 投与直後のスプレー噴霧粒子



図 9 投与終了のスプレー噴霧粒子

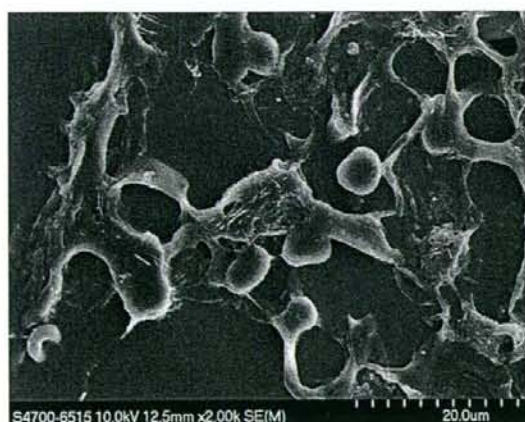


図 10 脱パラフィンのみのラット肺試料

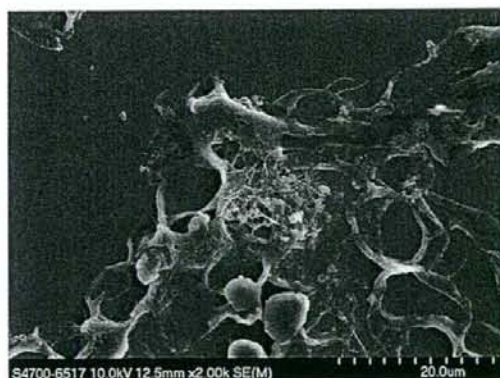


図 11 一部灰化したラット肺試料

図 8 は気管内投与実験開始直後のスプレーミストを捕集した粒子の SEM 写真，図 9 は，気管内投与実験終了時のミスト粒子の SEM 写真である。図 8 と図 9 の試料の分散あるいは凝集状況はさしたる変化がなく，全ての動物への投与条件は一定に保たれたと推定できる。

(3) SEM によるラット肺内の CNT 観察

図 10 および図 11 は，投与実験にもちいたラット肺試料（投与翌日）の SEM 観察像である。図 10 は脱パラフィンのみおこなったもの，図 11 は，酸素プラズマ低温灰化装置で組織の一部を灰化したものである。図 10 で示すように，ほぼ無処理で，SEM 観察で組織中の繊維の分布をある程度推定できるものと考えられる。より，繊維の分布を鮮明に観察するために，酸素プラズマによる組織除去を試みていたが，図 11 にしめすように相当

量組織が残存している状態では，繊維が観測できたが，ほぼ無機灰分のみで灰化を進めた場合は繊維も観測できなかった。

D. 考察

蛍光 X 線測定により，触媒の主成分だと考えられる鉄の検出を行うことができた。また，酸化物を加えた混合試料に対して FP 法を行うことにより，オーター分析も行った。本年度行った条件では，計算用に添加した酸化銅の蛍光 X 線が測定目的の鉄よりもかなり大きく，この点が測定精度に影響を与えた可能性が高い。ただ，粉体同士の混合をドライ条件で行っているため，これ以上添加する酸化銅および酸化チタンの量を減らすと，容器への付着など，別の要因で精度が落ちる可能性が高い。本年度はドライ条件での混合しか行わなかったが，アルコールなどの分散媒を用いた混合や，バルク FP 法で

はなく、フィルター上に混合試料を塗布して薄膜FP法を行うなどの方法でより精度よく触媒金属残留量を測定する方法を試みる必要がある。また、樹脂固定による LA-ICP-MS 測定により、蛍光 X 線分析では検出されなかった微量金属成分が検出されており、蛍光 X 線分析は、日々の曝露試料の状態管理には有効であるが、被験試料の性状を完全に把握するためには、別途感度の高い分析法の併用が必要である。その方法として、LA-ICP-MS について、絶対検量線法・標準添加法などで、定性のみならず定量を行う。試料から金属分を抽出して通常の ICP-AES/MS 分析を行うなどの方法が考えられる。LA に関しては、検量線系列をフィルター上の固体試料で実現する方法の開発が必要であり、来年度以降研究を行う予定である。試料の分解・抽出に関しては、Ge ら[7]の研究がある。この研究では、中性子放射化分析で求めた不純物濃度と各種前処理の結果を比較しているが、前処理法により ICP-MS 分析の結果が大きく異なっており、まだ尚研究が必要な段階であるといえる。

分散状態の把握に関しては、DLS と SEM 観察の 2 つの方法を用いたが、DLS は簡便に実験ができる反面、得られる情報は限定的であり、SEM 観察が必須であるといえる。今回の気管内投与実験では、試料懸濁液ではなく、ラットに投与したスプレーミスト中の MW-CNT の分散が重要であると考えられる。これについては、ミスト粒子を捕集し、SEM 観察を行う方法により、実際にラット体内に入ったものに近い状態の試料の観察を行うことができたと考えられる。

ラット体内の試料の分析に関しては、今年度は予備的に着手しただけであり、結論を導き出すには至っていないが、脱パラフィンを行っただけの肺切片で繊維状粒子が確認できたことは大きな成果であり、今後より多数の試料の観察を行って、ラット肺内の繊維分布を把握する予定である。また、酸素プラズマによる低温灰化実験については、肺内の MW-CNT 試料の観察という点では、成功したとは言いがたい。それは結果の項でも述べたとおり、繊維を残した状態で組織を十分に灰化する条件を確定することができていないためである。

酸素プラズマによる灰化は 200℃程度で進行する。熱処理で MW-CNT を灰化・分解するためには 600-1000℃の温度が必要であるということが、我々の経験上解っており、酸素プラズマの CNT に対する酸化作用が予想より強かったといえる。電子顕微鏡試料作成にとっては、この結果は不都合であるが、金属分析に関して言えば、金属分の損失を最小限に抑えた条件で CNT の灰化が行える可能性があることを示しており、この点では大変興味深い結果であり、CNT 中の金属成分を測定する方法に関

して酸素プラズマ低温灰化装置の応用を検討する予定である。

E. 結論

動物実験に用いた MW-CNT について各種分析法を用いたキャラクタリゼーションを試みた。蛍光 X 線分析、DLS、脱パラフィン切片の SEM 観察といった比較的簡便な前処理しか要しない分析方法でも、MW-CNT の性状をある程度知ることは可能であり、長期間にわたり、大量の試料を扱う吸入曝露実験を行う際のドーズの管理には、このような手法を用いるのが適切であると考えられる。一方、微量不純物の定量など、より精密に MW-CNT の性質を把握するためには、尚研究を継続して手法の確立を図る必要がある。

参考文献

(1) CNT 製造法：

<http://www.hodogaya.co.jp/nct/process.html>,
http://www.nikkiso.co.jp/d_kenkyu/rd_88.html

(2) カーボンナノファイバー製造法：

http://www.jemco-mmc.co.jp/products/products_e04.html
<http://www.sdk.co.jp/html/products/finecarbon/vcgf.html>

(3) Warheit DB, Laurence BR, Reed KL, et al. Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats. Toxicol Sci. 77(1):117-25, 2004.

(4) Tanaka, T., Yamamoto K, Nomizu T, and Kawaguchi H., Laser Ablation/Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry with Aerosol Density Normalization: Anal. Sci., 11., 967-71,1995

(5) Tanaka, Narita Y, Sato N, Fukasawa T, Santosa S J., Yamanaka K, Ootoshi T. Rapid and simultaneous multi-element analysis of atmospheric particulate matter using inductively coupled plasma mass spectrometry with laser ablation sample introduction. J Anal At Spectrom, 13,2,135-140,1998

(6) 鷹屋ら、機能性材料由来の金属微粒子の分析法と生体影響の研究、平成 13 年度環境保全研究成果報告集、環境省 2001、16-1 - 16-23

(7) Cuicui Ge, Fang Lao, Wei Li, Yufeng Li, Chunying Chen*, Yang Qiu, Xueying Mao, Bai Li, Zhifang Chai and Yuliang Zhao. Quantitative Analysis of Metal Impurities in Carbon Nanotubes: Efficacy of Different Pretreatment Protocols for ICPMS Spectroscopy, Anal. Chem. 80,24, 9426-34,2008

F. 健康危惧情報

なし

G. 研究発表

本年度はなし

H. 知的財産

本年度はなし

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業、H20-化学一般-006）
分担研究報告書

ナノマテリアルの気中への拡散法、及び吸入チャンパー内へ安定供給する方法
に関する研究

研究分担者	西沢共司	日本バイオアッセイ研究センター	試験管理部	部長
研究協力者	後藤 薫	日本バイオアッセイ研究センター	試験管理部	
	笠井辰也	日本バイオアッセイ研究センター	試験管理部	
			吸入試験室	室長補佐
	佐々木俊明	日本バイオアッセイ研究センター	試験管理部	
			吸入試験室	室長補佐

研究要旨

ナノマテリアルの中でもカーボンナノチューブ（以下‘CNT’）は、繊維状の構造を持ち、その物理的特性からアスベストと同様の毒性が懸念され、ヒトの健康評価手法の開発が切望されている。本分担研究では、CNT の一種である多層カーボンナノチューブ（以下‘MWCNT’）を用い、MWCNT の気中への拡散法及び吸入チャンパー内へ安定供給する方法について検討を行った。

本年度は湿式法及び乾式法の2つの方法で吸入暴露法の検討を行った。湿式法による検討では、Tween 20 を分散剤として用い、Tween 20 水溶液中に MWCNT を懸濁し、その MWCNT 懸濁液をミスト化する方法をとった。ミスト発生器の改良により、チャンパー内 MWCNT 濃度は 0.143 mg/m^3 となった。

乾式法による検討では、エアロゾル発生部に MWCNT の輸送を行うフィーダー部とエアロゾルの発塵を行う発生部の検討を行った。フィーダーについては、機械式の粉体用超微量フィーダーは、短時間の運転では MWCNT の供給量の制御が可能であった。発生器は流動層方式の発生器の開発を試みた。発生器は流動層内の MWCNT の分散化をめざし、流動層部に振動を与え、流動層に攪拌子として流星ミルとガラスビーズを封入した。エアロゾル発生試験では、吸入チャンパー内 MWCNT 濃度は 0.21 mg/m^3 となった。

今回、主に湿式法と乾式法による MWCNT エアロゾルの発生法について検討を行ったが、目標とする濃度で精度よく継続的に暴露することは困難であり、今後、湿式法および乾式法とも発生装置の実用化にはさらなる検討が必要である。また、吸入チャンパー内の気中への MWCNT 拡散法については別途、検討が必要である。

A. 研究目的

ナノテクノロジーの発展に伴い、ナノマテリアルの用途は多岐にわたっており、生活環境や産業現場において多くの人々に利用されている。しかし、ナノマテリアルの安全性や毒性についての研究は始まったばかりであり、種々のナノマテリアルについて健康評価手法を開発し、ヒトへの健康影響のリスクを評価する必要がある。カーボンナノチューブ（以下‘CNT’）の一種である多層カーボンナノチューブ（以下‘MWCNT’）は、繊維状の構造を持つナノマテリアルであり、その物理的特性からアスベストと同様の毒性が懸念され、ヒトの健康評価手法の開発が切望されている。

しかし、MWCNTは繊維状の構造であることや静電気による凝集等により、気中へ均一に拡散させることは難しく、実験動物を用いたMWCNTの吸入暴露による毒性試験のデータは少ない。

今回、我々はMWCNTの吸入暴露手法を湿式法及び乾式法の2つの方法を用いて検討し、その結果を報告する。湿式法については、平成19年度に行われた厚生労働科学研究費補助金研究「ナノマテリアルの吸入暴露手法の開発に関する研究」の成果を踏まえ、MWCNT懸濁液をミスト化する方法をとった。さらにMWCNTの暴露濃度を高濃度とすることを目標とした。また、乾式法についてはMWCNTのエアロゾル発生装置の開発を目指した。その装置開発の途中経過と得られたデータを報告する。

B. 研究方法及び結果

B-1. 試験材料

検討に用いたMWCNTは、三井物産株式会社から提供を受けた多層カーボンナノチューブ(MWNT-7、Lot No. 061220-01K)を使用した。

B-2. 湿式法による気中への拡散法と吸入チャンバー内へ安定供給する方法の検討

1. 研究方法

(1) 湿式法による検討で用いた試薬

関東化学株式会社より購入したTween 20を分散剤として用い、Tween 20水溶液中にMWCNTを懸濁して実験に用いた。水溶液の調製に使用した水はMilli Q (Millipore)で作製した超純水を用いた。MWCNT懸濁液はよく攪拌した後、超音波分散装置により、30分以上処理したものを発生に用いた。

(2) ミスト発生器及び吸入チャンバー

MWCNTを含むミストの発生は、MWCNT懸濁液をミスト化することにより行った。ミスト発生は柴田科学(株)のミスト発生器(図1)を使用した。ミスト発生器は試料容器とネブライザのセットを2セットにし、試料容器内のMWCNT懸濁液をネブライザに清浄空気(発生空気)を供給することによりミスト化した。発生ミストは清浄空気(希釈空気)と混合した後、ヒーターで120℃に加熱し、可能な限り水分を蒸発させ、中和器で粒子の荷電を中和し、吸入チャンバーに導入した。

吸入チャンバーとして、flow-past型

の鼻部暴露チャンバー(SIS-20B 型、容積約 19 L、柴田科学(株)) (図 1) を用いた。吸入チャンバーの排気はサイクロン、活性炭フィルター、高性能フィルター、ULPA フィルターで処理を行った。

(3) 吸入チャンバー内気中濃度の測定

チャンバー内濃度の測定は、チャンバー内の空気をダストサンプラーに装着したテフロン・バインダー・フィルター(以下 'TF フィルター'、T60A20、55φ)に 20 分間、25 L/min の流量で捕集し、TF フィルター重量を電子天秤で測定して m^3 当たりの濃度を算出した。

また、吸入チャンバー内の空気をダストサンプラーに装着した石英フィルター(QR-100、55φ)に、20 分間、25 L/min の流量で捕集し、柴田科学(株)に依頼してその石英フィルターを OC/EC カーボンアナライザー (Desert Research Institute, DRI 2001) で分析した。OC/EC カーボンアナライザーは、石英フィルター上の有機物由来の炭素及び元素性の炭素、それぞれの定量分析が可能であるため、元素性炭素である MWCNT 量を定量し、 m^3 当たりの濃度を算出した。

(4) その他の測定

吸入チャンバー内の状況をモニターする目的で、Optical Particle Controller (以下 OPC、柴田科学(株)、OPC-AP-600) を用いた。OPC は、光源にレーザーダイオードを使用した光散乱方式のパーティクルカウンターの 1 種であり、粒子の数(個数濃度)を計測する機器である。

また、吸入チャンバー内の空気をアンダーセンサンプラーを用いて、TF フィルター(T60A20、80φ)に 1 時間、28.3 L/min

の流量で捕集し、粒径分布の測定を実施した。

2. 研究結果

(1) ミスト発生器の改良

平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金研究「ナノマテリアルの吸入暴露手法の開発に関する研究」の湿式法を用いた暴露実験において、吸入チャンバー内の MWCNT 濃度が 0.011 mg/m^3 と低濃度であったため、今回はより高濃度の MWCNT ミストの発生を目標とした。

昨年度の研究では、ミスト発生器のネブライザ内に泡が生じ、ミスト流路を妨害しミストの発生が減少するため、Tween 20 水溶液の濃度を上げられなかった。最終的に MWCNT 懸濁液は、Tween 20 及び検体である MWCNT の濃度をそれぞれ 0.10 mg/mL とした。

今回、ネブライザへの空気量及び MWCNT 懸濁液を供給するチューブ等を調整することで、Tween 20 水溶液の濃度を 0.2 mg/mL 以上にしても、ネブライザ内に生じる泡の発生を抑制することが可能となった。その結果、より高濃度の MWCNT 懸濁液を作製し、ミスト発生を行った。

また、吸入チャンバー内の MWCNT 濃度をより高濃度にするため、ミスト発生器に試料容器とネブライザを 1 セット追加し、ミスト発生部を 2 セットとした。

(2) Tween 20 濃度及び MWCNT 濃度の検討

種々の濃度の Tween 20 水溶液及び MWCNT 懸濁液を調製し、それぞれについてミストを発生し、チャンバー内濃度

を測定した。

まず、Tween 20 濃度を変えた 4 種類の Tween 20 水溶液 (0.20、0.30、0.35、0.40 mg/mL) のミストを発生させた。その結果、チャンパー内濃度が最も高いのは、0.35 mg/mL Tween 20 水溶液であり、濃度は 0.49 mg/m^3 であった (図 2)。

次に、Tween 20 濃度を 0.35 mg/mL に固定して、MWCNT 濃度を変えた 4 種類の MWCNT 懸濁液 (0.13、0.35、0.70、1.05 mg/mL) のミストを発生させた。その結果、チャンパー内濃度が最も高いのは、0.70 mg/mL MWCNT 懸濁液であり、濃度は 0.57 mg/m^3 であった (図 3)。なお、1.05 mg/mL MWCNT 懸濁液は、ネブライザ内部に MWCNT が溜まり、ミストの発生ができなかった。

この結果から、MWCNT 懸濁液中の MWCNT 濃度は Tween 20 濃度の 2 倍が最適であると思われた。さらに、確認のため、Tween 20 濃度と MWCNT 懸濁液中の MWCNT 濃度の比率を 1:2 に固定して、3 種類の MWCNT 懸濁液 ('Tween 20 濃度(mg/mL):MWCNT 濃度(mg/mL)' = '0.30:0.60'、'0.35:0.70'、'0.40:0.80') のミストを発生させた。その結果、チャンパー内濃度が最も高いのは、やはり 0.70 mg/mL MWCNT 懸濁液であり、濃度は 0.58 mg/m^3 であった (図 4)。

上記の検討結果から、本試験条件下では MWCNT ミスト発生に最適な Tween 20 濃度は 0.35 mg/mL、MWCNT 濃度は 0.70 mg/mL であると判断した。

(3) OC/EC カーボンアナライザーによる MWCNT 濃度の測定及びアンダーセンサンプラーによる粒径分布の測定

上記の検討結果から本試験条件下では最適と判断した 0.35 mg/mL Tween 20 水溶液及び 0.70 mg/mL MWCNT 懸濁液 (Tween 20 濃度 0.35 mg/mL) について、ミストを発生した。

吸入チャンパー内の空気を石英フィルター上に捕集し、OC/EC カーボンアナライザーによる分析を行った。分析結果より MWCNT 濃度を算出した。その結果、MWCNT 濃度の平均値と標準偏差は $0.143 \pm 0.013 \text{ mg/m}^3$ であった (表 1)。

アンダーセンサンプラーによる粒径分布の測定結果では (図 5)、Tween 20 水溶液、MWCNT 懸濁液とも、 $0.43 \mu\text{m}$ 未満の粒子の割合が最も多かったが、MWCNT 懸濁液では、 $0.65 \sim 1.10 \mu\text{m}$ の粒子の割合が増加しており、Tween 20 水溶液の場合とは異なる粒径分布を示した。

B-3. 乾式法による気中への拡散法と吸入チャンパー内へ安定供給する方法の検討

1. 研究方法及び結果

MWCNT は見かけ上、空気層を多量に含むため綿ぼこり状を呈し、空気や MWCNT どうしの摩擦により強い荷電を帯びやすいと考えられる。乾式法による MWCNT のエアロゾルの発生は、発生器 (部) に MWCNT の輸送を行うフィーダ一部と、実際にエアロゾルの発塵を行う発生部に機能上分類される。それぞれ最適な機器を選定・配備しエアロゾル発生系の構築を行わなければならない。

今回、フィーダ一部と発生部の検討を行った。また、発生した MWCNT エアロゾル濃度確認のため、気積 20 L の透明塩

化ビニル製の吸入暴露チャンパーに MWCNT を導入し、MWCNT の濃度を測定した。

(1) フィーダー部の検討

フィーダーは、発生部に MWCNT を定量且つ連続供給できることが求められる。多くの機種の中から超音波振動式の定流量振動フィーダーと機械式の粉体用超微量フィーダーの機種を選定し搬送検討を行った。

①定流量振動フィーダーの検討

振動式フィーダーでは超音波振動による共振が MWCNT に発生しないことが明らかになり、搬送面を傾けることで搬送は可能となった。しかし、実質的な制御が利かないため、振動式フィーダーは MWCNT の搬送には不適と判断した。

②粉体用超微量フィーダーの検討

当フィーダー (TF-70、(株) アイシンナノテクノロジーズ、写真1) は、ステンレス製の試料ホッパー部分に適量の試料を入れ使用する。試料ホッパー下部には、試料の攪拌及び擦切り用フィンと搬送・供給用ギアが設置されており(写真2)、回転する搬送・供給用ギアの歯と歯の間に擦切り用フィンによって試料が等量充填される仕組みになっている。さらにギアが回転することで試料が所定の位置(写真3)で自動的に落下するように設計されている。供給量はモーターの回転速度とギアの歯数(容積)で規定される。

今回は、当装置に標準装備されている歯数12のギア1と歯数24のギア2を用いて、搬送・供給用ギアの回転数と供給量について検討した。MWCNT を本フィーダーに充填し、その運転により予め用

意した天秤上の容器に落下する MWCNT の重量を1分間毎に測定し、両ギアの回転数と MWCNT の供給量について検討した(写真4)。

その結果、30分以内の運転では、両ギアとも各々の回転数に対応した、安定した MWCNT の供給が確認された(図6)。

(2) 発生部の検討

①発生器の検討

MWCNT が繊維状の形態を持つことに注目し、アスベストの発生用として開発した流動層方式による粒子発生器を応用し、MWCNT のエアロゾル化を試みた。発生器の改造は、柴田科学(株)に依頼した。

本発生器(図7、写真5)は、偏心軸受け機構によりモーターの回転運動を横方向の往復運動(振動)に変換し、発生器(流動層部)自信が水平方向に動きエアロゾルの発生を行う点を特徴とする。少量の MWCNT エアロゾルはその振動だけで発生する(目視により確認)。流動層部(MWCNT を封入しておく円筒部分: 50φ、容積 4.4 cm³)の下部の水平方向から空気(発生空気)を導入し、流動層部上方の出口に向けた気流により、エアロゾルを発生させる構造となっている。凝集粒子の分離を促進し攪拌子としての役割を持つ流星ミル(ステンレス製、5 mm φ)1個とガラスビーズ(2 mm φ)10個を、MWCNT とともに流動層部に封入した。

また、粒子の荷電化を極力抑えるため、発生空気ラインに除電装置(イオナイザー-SJ-M200、キーエンス(株))を取り付け、除電された空気を流動層部に通気

させることとした。

②エアロゾル発生確認試験

発生器流動層部に MWCNT 約 20 mg と共に流星ミル1個とガラスビーズ10個を入れ、発生空気 (1.0 L/min) を通し、エアロゾルを発生させた。流動層部出口にチューブを取り付け、出口から 3 cm の位置にサンプリング用テフロンチューブ (内径 1 mm、外径 3 mm) を挿し込み、TF フィルター (55 mm φ) に、発生中の MWCNT エアロゾルを採取 (採取空気量 1 L、0.5 L/min、2 分間) し MWCNT 濃度を測定した。サンプリングは発生開始直後から 10 間隔で 1 時間行った。

また、上記条件で発生器 (流動層部) に振動を与えない場合と与えた場合で、発生試験を行い、振動の効果について合わせて確認した。

・発生器 (流動層部) に振動を与えない場合

発生空気を通した直後は、そのショックでエアロゾルが発生し、0.03 mg/L 捕集されたが、10 分以降の濃度は 0 または 0.01 mg/L となり、1 時間の平均値と標準偏差は 0.009 ± 0.010 mg/L であり、ほとんど初塵していないと考えられた。

・発生器 (流動層部) に振動を与えた場合

発生空気を通した後、約 10 分でエアロゾル発生は安定し、1 時間の測定濃度の平均値と標準偏差は 0.54 ± 0.21 mg/L となった。なお、時折、突発的に MWCNT 塊が吹き上げられる状態 (突沸現象) が観察された。

以上の結果より、発生器 (流動層部) に振動を与えることは効果があると判断

した。

③吸入チャンバーを使用した濃度確認試験

吸入チャンバーには、柴田科学(株)製の鼻部暴露チャンバーの内筒等を取り除き、単一空間を確保した改造チャンバー (容積約 20 L、写真 6) を使用した。イオナイザーで処理された発生空気 1.0 L/min を発生器 (流動層部) に通し、エアロゾルの発生を行った。流動層部出口と吸入チャンバーを導管で接続し、導管途中から同じくイオナイザーで処理した清浄空気 5.0 L/min によりエアロゾルの搬送を行い暴露チャンバーに導入した。チャンバーは、ULPA フィルターで処理された空気 30 L/min で換気し、チャンバー内を -100Pa 程度の陰圧に維持した。チャンバーの空気はサイクロン、活性炭フィルター、高性能フィルター、ULPA フィルター等で処理し排出した。

TF フィルター 55 φ にチャンバー空気 250 L (25 L/min、10 分間) を捕集し、吸入チャンバー内 MWCNT 濃度を求めた。また、アンダーセンサンプラーを用いて TF フィルター 80 φ に 30 分間捕集し、粒子径の測定を行った。

吸入チャンバー内 MWCNT 濃度の平均値と標準偏差は 0.21 ± 0.02 mg/m³ となり、質量を基準とした質量中位径 (MMAD) は 2.24 μm、幾何標準偏差 og は 3.00 であった。

C. 考察

湿式法による吸入暴露法の検討では、平成 19 年度に行われた厚生労働科学研究費補助金研究「ナノマテリアルの吸入

暴露手法の開発に関する研究」の成果を踏まえた上で、Tween 20 を分散剤として用い、Tween 20 水溶液中にMWCNTを懸濁し、そのMWCNT懸濁液をミスト化する方法をとった。しかし、昨年度の検討では、ミスト発生器のネブライザ内に生じる泡がミスト流路を妨害し、ミストの発生が減少するため、Tween 20 の濃度を0.10 mg/mLより高濃度に出る出来なかった。その結果、MWCNT懸濁液の濃度も0.10 mg/mLに留まった。鼻部暴露チャンパーを用いて、ラットへの2時間の暴露試験を試みたが、暴露濃度は0.011 mg/m³と低濃度であった。

今年度は、ミスト発生部の改良及びミスト発生部を2セットにすることにより、チャンパー内MWCNT濃度をより高濃度にするを目標とした。その結果、MWCNTの平均濃度は0.143 mg/m³となり、これは昨年度の暴露試験におけるMWCNT暴露濃度(0.011 mg/m³)の13倍の濃度であった。

今後、本湿式法によりさらに高濃度のチャンパー内濃度をめざすには、より高濃度のMWCNT懸濁液によるミスト発生が必要と思われるが、その高濃度MWCNT懸濁液に対応する発生器の改良が必要である。また、高濃度MWCNT懸濁液の作製には、Tween 20水溶液の濃度も上げなければならないが、実際の動物試験においては、Tween 20の生体への影響が懸念される。

乾式法による吸入暴露法の検討では、MWCNTのエアロゾルの発生装置の開発のため、エアロゾル発生器(部)にMWCNTの輸送を行うフィーダー部と、

実際にエアロゾルの発塵を行う発生部の検討を行った。

フィーダーに関しては、超音波振動式の定流量振動フィーダーは、MWCNTの供給量の制御が行えず、MWCNTには使用出来なかった。しかし、機械式の粉体用超微量フィーダーは、30分以内の運転では、MWCNTの供給量の制御が可能であった。今後、長時間の運転においても供給量の制御が可能か確認する必要がある。また、エアロゾル発生部(発生装置)の開発が途中であるが、当フィーダーをMWCNTの供給用フィーダーとして使用する場合、発生部(発生装置)と組み合わせた発生システムの構築には十分な検討が必要である。

MWCNTエアロゾルの発生器については、流動層方式の発生器の開発を試みた。流動層方式の発生器は、流動層内のMWCNTの分散がよくないと、流動層への通気後、最初は僅かにMWCNTのエアロゾルが発生するが、後は通気をしてほとんどエアロゾルは発生せず、MWCNTは凝集塊を形成する。そこで、流動層内のMWCNTの分散化をめざし、流動層部に振動を与え、流動層に攪拌子として流星ミルとガラスビーズを封入した。

この改造発生器を用いてMWCNTのエアロゾルを発生させ、小型吸入チャンパーにエアロゾルを導入し、チャンパー内MWCNT濃度を測定した。吸入チャンパー内MWCNT濃度の平均値と標準偏差は 0.21 ± 0.02 mg/m³となり、質量を基準とした質量中位径(MMAD)は2.24 μ m、幾何標準偏差ogは3.00であった。

今後、本発生器については、材質、流動層内のMWCNTの分散法、大型チャンパーに対応するためのエアロゾル発生量等の検討が必要である。

今回、主に湿式法と乾式法によるMWCNTエアロゾルの発生法について検討を行ったが、目標とする濃度で精度よく継続的に暴露することは困難であり、今後、湿式法および乾式法とも発生装置の実用化にはさらなる検討が必要である。また、吸入チャンパー内の気中へのMWCNT拡散法については別途、検討が必要である。

D. 結論

湿式法による吸入暴露法の検討では、MWCNT懸濁液をミスト化する方法をとった。ミスト発生器の改良により、チャンパー内MWCNT濃度は0.143 mg/m³となった。

乾式法による吸入暴露法の検討では、エアロゾル発生器(部)にMWCNTの輸送を行うフィーダー部と、実際にエアロゾルの発塵を行う発生部の検討を行った。フィーダーについては、機械式の粉体用超微量フィーダーは、30分以内の運転ではMWCNTの供給量の制御が可能であった。発生器については、流動層方式の発生器の開発を試みた。発生器は、流動層内のMWCNTの分散化をめざし、流動層部に振動を与え、流動層に攪拌子として流星ミルとガラスビーズを封入した。この発生器によるMWCNTエアロゾルが発生試験では、吸入チャンパー内MWCNT濃度は0.21 mg/m³となった。

今回、主に湿式法と乾式法による

MWCNTエアロゾルの発生法について検討を行ったが、目標とする濃度で精度よく継続的に暴露することは困難であり、今後、湿式法および乾式法とも発生装置の実用化にはさらなる検討が必要である。また、吸入チャンパー内の気中へのMWCNT拡散法については別途、検討が必要である。

E. 研究発表

1. 論文発表

Kasai, T., Kano, H., Umeda, Y., Sasaki, T., Ikawa, N., Nishizawa, T., Nagano, K., Arito, H., Nagashima, H., Fukushima, S. Two-year inhalation study of carcinogenicity and chronic toxicity of 1,4-dioxane in male rats. *Inhalation Toxicology*. (in press).

Kasai, T., Saito, M., Senoh, H., Umeda, Y., Aiso, S., Ohbayashi, H., Nishizawa, T., Nagano, K., Fukushima, S. Thirteen-week inhalation toxicity of 1,4-dioxane in rats. *Inhalation Toxicology*. 20, 961-971 (2008).

2. 学会発表

なし。

F. 知的財産権の出願・登録状況

・特許取得・実用新案登録

なし。

表 1. OC/EC カーボンアナライザーを用いた分析から算出した元素性炭素濃度 (MWCNT 濃度) 及び有機物由来炭素濃度

	元素性炭素濃度 (MWCNT 濃度) [mg/m ³]	有機物由来炭素濃度 (Tween 20 由来の炭素濃度) [mg/m ³]
<u>Tween 20 水溶液 ミスト発生実験</u>		
1 回目 サンプルング	0	0.349
2 回目 サンプルング	0	0.359
3 回目 サンプルング	0	0.330
(平均値±標準偏差)	(0±0)	(0.346±0.0143)
<u>MWCNT 懸濁液 ミスト発生実験</u>		
1 回目 サンプルング	0.157	0.306
2 回目 サンプルング	0.131	0.321
3 回目 サンプルング	0.141	0.358
(平均値±標準偏差)	(0.143±0.0132)	(0.328±0.0269)

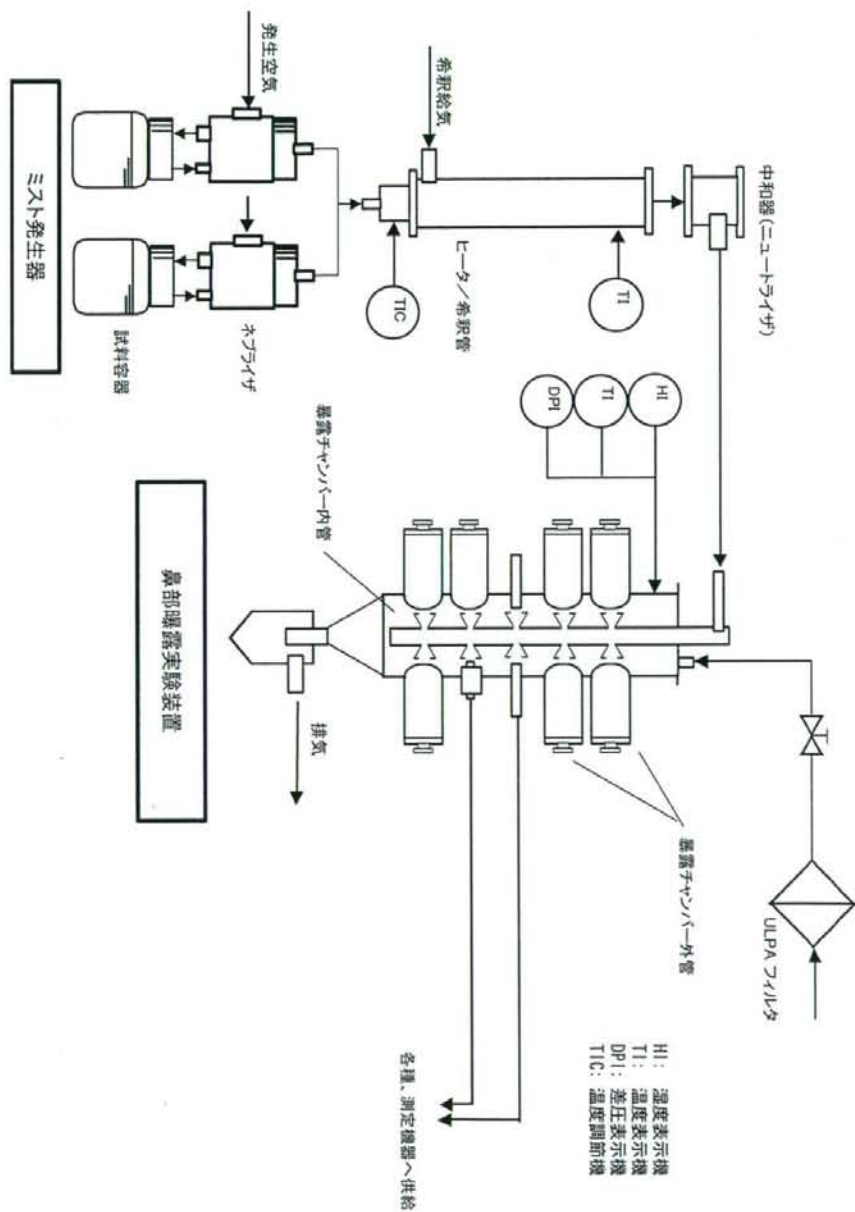


図 1. ミスト発生器と鼻部曝露チャンバー

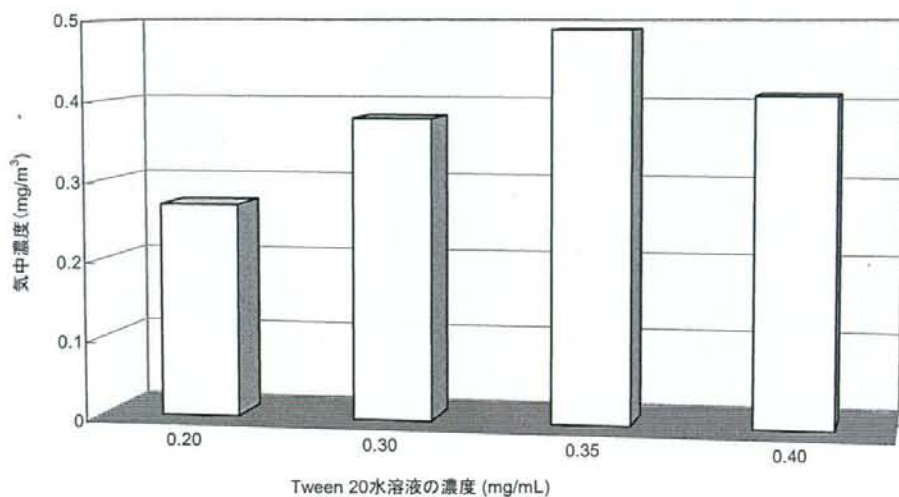


図 2. 0.20~0.40 mg/mL Tween 20 水溶液を用いたミスト発生実験のチャンパー内濃度

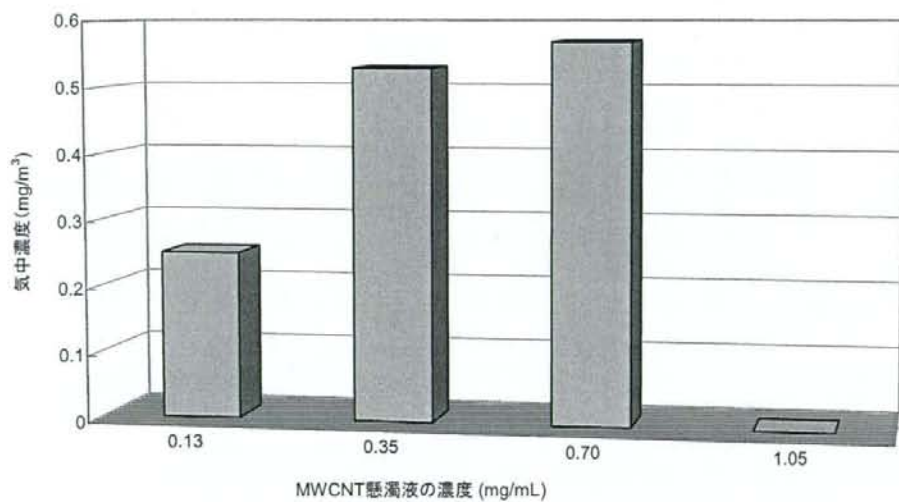


図 3. 0.13~1.05 mg/mL MWCNT 懸濁液 (Tween 20 濃度は 0.35 mg/mL) を用いたミスト発生実験のチャンパー内濃度