

平成29年度 厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)
分担研究報告書

研究課題名: ナノマテリアルの吸入曝露によるヒト健康影響の評価手法に関する研究
生体内マクロファージの機能に着目した有害性カテゴリー評価基盤の構築 —

分担研究課題名: ナノマテリアルの吸入曝露実験及び組織負荷量の研究

分担研究者 : 高橋祐次 国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター 毒性部 室長

研究協力者 高木篤也 同 動物管理室 室長
研究協力者 菅野 純 独立行政法人労働者健康安全機構
日本バイオアッセイ研究センター 所長

研究要旨

本研究の目的は、工業的ナノマテリアルの非意図的曝露経路であり有害性発現が最も懸念される吸入曝露において、異物除去に重要な役割を果たすマクロファージの *in vivo* 生体内反応に着目し生体影響を評価することにより、国際的に通用する高速で高効率な有害性スクリーニング評価手法を開発することである。具体的には、ナノマテリアルの肺胞マクロファージ胞体内の蓄積様式(長繊維貫通、毛玉状凝集、粒状凝集)と蓄積量を基に、Frustrated phagocytosis 誘発の程度に着目したカテゴリー評価を試みる。本分担研究は、モデルとなるナノマテリアルの全身曝露吸入実験を行い、定期解剖により試料のサンプリングし研究協力者に提供することを担当している。H29年度は、マクロファージ胞体内に取り込まれたマクロファージの3種の蓄積様式のうち、「長繊維貫通型」のモデルとして多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の一つである MWNT-7(三井)を選択した。MWNT-7は、先行研究において開発した Taquann 法により高分散処理を行い、カートリッジ直噴式全身曝露吸入装置(Taquann 直噴全身曝露吸入装置)を用いて曝露を行った。動物は、C57BL/6NCrSlc 雄性 12 週齢を使用し、目標濃度を 1 または 3 mg/m³ に設定し、2hr/day/week、5 週間(合計 10 時間)の全身曝露吸入を行い、曝露終了直後、1 週間、4 週間及び 8 週後に定期解剖を行ってサンプリングして病理組織学的評価、免疫機能評価用に供した。実験に供したマウスは、いずれも体重推移に異常は認められなかった。一般状態観察においてファイティングによる咬傷、脱毛が散見されたが検体曝露との関係は認められなかった。5 日間反復全身曝露吸入実験における平均質量濃度(平均値 ± SD)は、低用量群、高用量群それぞれ 1.4 ± 0.1 mg/m³、3.2 ± 0.3 mg/m³ であった。平均 CPC カウント(平均値 ± SD)はそれぞれ、960 ± 80/cm³、2340 ± 238/cm³ であった。実験期間を通して、目標濃度を達成し、安定した濃度推移が得られた。

A. 研究目的

本研究の目的は、工業的ナノ材料の非意図的曝露経路であり有害性発現が最も懸念される吸入曝露において、異物除去に重要な役割を果たすマクロファージの *in vivo* 生体内反応に着目し生体影響を評価することにより、国際的に通用する高速で高効率な有害性スクリーニング評価手法を開発することである。具体的には、ナノ材料の肺胞マクロファージ胞体内の蓄積様式(長繊維貫通、毛玉状凝集、粒状凝集)と蓄積量を基に、Frustrated phagocytosis 誘発の程度に着目したカテゴリー評価を試みる。

H29年度の本分担研究では、マクロファージ胞体内に取り込まれたマクロファージの3種の蓄積様式のうち、「長繊維貫通型」のモデルとして多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の一つである MWNT-7(三井)を選択した。

MWNT-7は、先行研究において開発した Taquann 法により高分散処理を行い、カートリッジ直噴式全身曝露吸入装置(Taquann 直噴式全身曝露吸入装置)を用いて曝露を行った。動物は、C57BL/6NCrSlc 雄性 12 週齢を使用し、目標濃度を 1 または 3mg/m³ に設定し、2hr/day/week、5 週間(合計 10 時間)の全身曝露吸入を行い、曝露終了直後、1 週後、4 週後及び 8 週後に定期解剖を行ってサンプリングして病理組織学的評価、免疫機能評価用に供した。

B. 研究方法

B-1. 検体の高分散化処理(Taquann 法)

MWNT-7は、Taquann 法処理により、凝集体・凝固体を含まない高分散検体として実験に供した。

粒子状物質の吸入において、粒径分布は呼吸器系の部位への沈着量を定める重要なファクターである。微細な粒子は肺胞まで到達するが、大きな粒子は気道の上層部で効果的に除去される。一方、ナノ

マテリアルの全身曝露吸入実験において問題となるのが、検体の凝集である。また、検体に用いた MWCNT には製造過程で共有結合により分岐あるいは凝集状態を示す成分が含まれている。ヒトが現実的に曝露される環境下では、凝集体は先に落下し、肺に到達するのは高度に分散されたものであることが想定される。ヒトと比較して細い気道径を有するマウスを用いた吸入実験では、この凝集成分が気道末梢の比較的近位に捕捉されるため、それよりも末梢の肺胞レベルへの単離繊維の吸入を阻害あるいは肺胞病変を修飾する可能性がある。そのため、実験動物からヒトへの外挿性の高いデータを得るためには、凝集成分を除去した上で分散性に優れた検体を使用する必要がある(図1)。以上の点から、先行研究において、凝集成分による影響が少なく、実際にヒトに吸入されることが想定される単離繊維のみからなる分散性の高い検体を得る処理法(Taquann 法、特許取得済)を独自に開発した。

Taquann 法は、走査型電子顕微鏡(SEM)の試料作製方法である「臨界点乾燥」の概念を、液相での分散と濾過に組み合わせた技術であり、濾液の乾燥時に表面張力を受けないため、分散性が確保される事を利用したものである。具体的には、検体を三級ブタノール(TB、融点; 25.69 °C、関東化学株式会社 特級)に分散、懸濁させて、凍結融解による分散促進を一回行った後、金属製フィルターで濾過し大型の凝集体を除くとともに、分散を図り、濾液を直ちに液体窒素で凍結・固化させる。固相状態の濾液を溶媒回収型真空ポンプにより減圧し、液相を介さずに昇華させ、TB を分離除去することで、分散性の高い乾燥状態の検体が得られる(図2)。

(1) MWCNT

MWCNTは三井物産の MWNT-7 を使用した。以下の各測定値は先に共同研究を行った東京都健康安全研究センターによる測定値である。

繊維径	70-170 nm (平均 100 nm)
長さ	1-19 μm (> 5 μm 27.5%)
繊維数	3.55×10 ¹¹ 本/g

形状 菌状凝集体を含む単離繊維

化学組成 炭素純度 99.5%以上

鉄: 3500 ppm

硫黄: 470 ppm

塩素: 20 ppm

フッ素: <5 ppm

臭素: <40 ppm

MWCNT 原末をガラス製ビーカーで TB に混合した。氷冷化で TB をシャーベット状にして金属製スパーテルで十分に混合した後、凍結融解による分散促進を一回行った。超音波洗浄器 (SU-3TH、出力 40W、発信周波数 34kHz) に 15 分静置して分散させ、金属製フィルター (セイシン企業、目開き 25 μ m) で濾過し大型の凝集体を除くとともに、分散を図り、濾液を直ちに液体窒素で凍結・固化させ、溶媒回収型真空ポンプ (Vacuubrand、MD4C NT+AK+EK) により減圧して TB を昇華させて除去し MWCNT の乾燥検体を得た。

以下、Taquann 法処理を行った MWNT-7 を T-CNT7 と記載する。

B-2.DWCNT のマウス全身曝露吸入実験

(1) 動物

C57BL/6NCrSlc (日本エスエルシー株式会社) 雄性マウスを 10 週齢で購入し 2 週間の馴化期間を経たのち 12 週齢にて使用した。このマウスは当研究部において、MWCNT を含めてナノマテリアルの吸入曝露実験に使用した実績がある。個体識別は耳パンチにより行った。

(2) 飼育条件

ポリカーボネイト製のケージに紙製の床敷を使用し、1 ケージ当り 4 匹のマウスを収容した。ケージラックはケミカルセーフティ対応のケージ個別換気式飼育装置 (商品名: VIC システム、ダイダン株式会社) を使用した。飼育条件は、温度; 25 \pm 1、湿度; 55 \pm 5%、換気回数; 約 20 回/h、照明時間; 8 時 ~ 20 時点灯 (照明明暗サイクル 12 時間) とし、固型飼料 CRF-1 (オリエンタル酵母工業株式会社) を自由摂取させ、

飲水は市水をフィルター濾過し自動給水装置により自由摂取させた。

(3) 群構成

対照群、低用量群 (目標濃度 1 mg/m³)、高用量群 (目標濃度 3 mg/m³) の 3 群構成とした。各群 48 匹のマウスを使用し、病理組織用に 16 匹、組織沈着量測定用に 12 匹、免疫機能実験用に 20 匹を割り当てた。曝露チャンバーに収容できるマウスの匹数が 16 匹であることから、各群を 16 匹のサブグループ (Sub-group A、Sub-group B、Sub-group C) に分け、1 日 2 時間 (10:00 ~ 12:00) の週 1 回の吸入曝露を 5 週間反復し、合計 10 時間の曝露を行った (表 1)。

(4) ダスト発生装置

MWCNT のエアロゾル化は、既設の Taquann 直噴全身吸入装置 Ver2.0 を使用した (共同開発 柴田科学株式会社) (図 2)。

この装置は、検体を充填する金属製カートリッジ、圧縮空気をカートリッジに噴射する噴射装置、及び、噴射した検体を気相に分散させるサブチャンバーから構成される。カートリッジ (容量: 23.5 mL、内寸: 直径 22 mm 高さ 65 mm) はステンレス製で、円筒状胴体、4 つの噴出孔を有するキャップ部及び台座部から構成される。台座の中心には圧縮空気を注入するオリフィスと内容の流出を防ぐチェックバルブが装着されている。

カートリッジへの検体の充填は、所定の濃度 (0.025 又は 0.05 mg/mL) で TB に T-CNT7 を再懸濁し、各カートリッジに懸濁液 10 mL を分注して液体窒素で固化させた後、デシケーターに格納して溶媒回収型ポンプで TB を昇華除去することで達成した。低用量群では 250 μ g/カートリッジ、高用量群では 500 μ g/カートリッジを充填した。

噴射装置は、サブチャンバー (容量: 32 L) に接続されている。噴射に伴う圧力上昇を減じるため、サブチャンバーから上方に煙突状のダクトを設け、その上部にはポリエチレン製の袋で覆った ULPA フィルタ

ーが接続されている。“煙突”上部から加湿したキャリアエアを一定の流量で送り込み、噴射された検体は煙突内に逆流した検体を含め、サブチャンバー内で効果的に分散された後、希釈されつつ接続パイプを通して曝露チャンバーに導く構造となっている。

噴射装置からカートリッジへの圧縮空気の供給圧力は 0.4 Mpa、噴射時間は 0.2 秒、1 カートリッジ当たり 3 回の噴射を行った。曝露チャンバーの総換気流量は約 13 L/min(基礎換気流量; 10 L/min、エアロゾルモニター用サンプリング(CPC); 1.5 L/min、質量濃度測定; 1.5 L/min)と設定した。

目標濃度に速やかに到達させるため、曝露開始時に 2 本を 1 分間隔で噴射した。その後は濃度を監視しつつ 8 分間隔で噴射し、設定濃度を維持した。2 時間の吸入曝露実験において、合計 17 本のカートリッジを使用した。

(5) 曝露チャンバー

動物を収容し検体を曝露する曝露チャンバーは、先行研究において独自に開発したものを使用した。(共同開発 柴田科学株式会社、特許所得済)。動物は、チャンバーの蓋から吊るしたステンレス金網製のケージに個別に収容する。マウスは最大 16 匹収容が可能である。曝露チャンバーはアクリル製の OUTER チャンバーと柔軟な導電性樹脂で作製した INNER チャンバーの 2 重構造となっている。INNER チャンバーは、直径 550 mm、高さ 550 mm、気積 105.5 L である。検体が触れる INNER チャンバーは交換可能であり、検体の変更に容易に対応できるシステムとなっている。

(6) 曝露チャンバー内のエアロゾル濃度測定

曝露チャンバー内の T-CNT7 の濃度のモニタリングは、相対濃度(CPM; count per minutes)と質量濃度(mg/m³)測定を並行して行った。

相対濃度測定は、対応濃度 3×10^5 個/mL、2.5 nm の粒径が測定可能な凝縮粒子計数装置(Condensation Particle Counter ; CPC、CPC3776、サンプリング流量: 1.5 L/min、TSI、MN、

USA) を用いた。この情報はリアルタイムに得られることからエアロゾルの濃度コントロールに使用した。先行研究において、繊維状のナノマテリアルの場合には高濃度の測定では CPC による粒子数測定が低値で推移することが散見されたことから、低用量群では 7.5 倍希釈、高用量群では 15 倍希釈して CPC による測定を行った。また、曝露チャンバーと CPC を接続するチューブは、銅管を使用してサンプリングによる損失を最小限にした。

質量濃度測定は、ローボリウムサンプラー(080050-155、φ55 mm ろ紙ホルダー、柴田科学)にフッ素樹脂処理ガラス繊維フィルター(Model T60A20、φ55mm、捕集効率(DOP 0.3 μm): 96.4%、東京ダイレック)を装着し、サンプリングポンプ(Asbestos sampling pump AIP-105、柴田科学)に接続して 1.5 L/min の流量で曝露時間の 2 時間を通してエアロゾルを吸引しフィルターに検体を捕集した。ろ過捕集後のフィルターの重量から予め秤量したフィルターの重量を差し引いた値を検体の重量とし、吸引空気量 $1.5 \text{ L/min} \times 120 \text{ min} = 180 \text{ L}$ から 1 m³ 当りの質量濃度を算出した。フィルターの秤量にはマイクロ天秤(XP26V、METTLER TOLEDO)を使用した。

曝露チャンバー内の温度、湿度を曝露時間の 2 時間を通してモニタリングした。

(8) 解剖

肺組織のサンプリングのため、曝露終了直後(Day 0)、1 週後(1W)、4 週後(4W)及び 8 週後(8W)に定期解剖を行った。

マウスは吸入麻酔器(TK-7、バイオマシナリー)を用いイソフルラン(DS ファーマアニマルヘルス)麻酔下で、眼窩より採血を行い、腋窩動脈を切断して放血致死後に解剖した。被毛からコンタミを防止するため、開胸前に全ての被毛を除去した。

病理標本用の動物は、気道内の T-CNT7 の人為的移動を避けるため、気管からの固定液の注入は行わず、点滴回路を用いた灌流装置により灌流固定した。具体的には、開胸後、右心室に翼状針(21G、

SV-21CLK-2、テルモ株式会社)を刺入して生理食塩水(大塚生食注、大塚製薬工場)を約 40cm 水柱の静水圧により注入し、右心耳を切開して血液を除去した。流量は点滴調節器により適宜調節した。その後、右心室から翼状針を引き抜いて左心室に刺入し、回路を切り替えて 4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液(和光純薬工業、組織固定用、用時調製)を同静水圧にて約 3 分灌流して固定後、同組成固定液に浸漬固定を行った。組織沈着量測定用の動物は、開胸して肺を取り出し、肺門部で気管を除去して湿重量測定後ホルマリン固定した。免疫機能解析用の動物は、開胸後に留置針を気管に挿入し PBS を 1 mL 注入して BAL を採取した。

(倫理面への配慮)

本実験は動物愛護に関する法律、基準、指針を遵守し国立医薬品食品衛生研究所・動物実験委員会の承認のもとに人道的実施された。ナノマテリアルの実験に際しては、当研究所の専用特殊実験施設内で、その運用規則に従い実施しており、曝露・漏洩を防止する対策については万全を期して実験を行った。

C. 研究結果

(1) T-CNT7 の吸入曝露実験

実験に供したマウスは、いずれも体重推移に異常は認められなかった(図4)。一般状態観察においてファイティングによる咬傷、脱毛が散見されたが検体曝露との関係は認められなかった。

T-CNT7の5日間反復全身曝露吸入実験における平均質量濃度(平均値 ± SD)は、低用量群、高用量群それぞれ 1.4 ± 0.1 mg/m³、 3.2 ± 0.3 mg/m³であった。平均CPCカウント(平均値 ± SD)はそれぞれ、 960 ± 80 /cm³、 2340 ± 238 /cm³であった(表2、図5)。

2時間の吸入曝露実験において使用した総検体量は、低用量群、高用量群それぞれ 4.3 mg及び8.5 mgである。2時間の曝露チ

ャンバーの総換気量が1.2 m³であることから名目上の濃度は、低用量群、高用量群それぞれ 3.5 mg/m³及び7.1 mg/m³と計算される。実際に測定した濃度から、エアロゾル化効率を計算するとそれぞれ40%及び45%であった。

(2) 剖検所見

本実験において定期解剖した全ての個体に剖検所見に肉眼的異常は認められなかった。

D. 考察

ナノマテリアルの吸入曝露実験においては、検体の凝集が問題となるが、これまでの研究において Taquann法とTaquann全身曝露吸入装置はこれを解決する手段として有効であることを示してきた。その一方で、MWCNT のように繊維状ナノマテリアルの場合、検体を噴射した直後に CPC による粒子数測定が一時的に低下する状況が散見されていた。本年度の研究では全ての曝露実験において安定した濃度推移が得られた。CPC 測定において希釈倍率を上げて測定したこと CPC 測定では低用量群では 7.5 倍希釈、高用量群では 15 倍希釈を行い測定した。CPC の測定原理では、理論上、測定セル内で一つの粒子だけを検出する構造となっているが、MWCNT のように繊維径は nm オーダーであるが、繊維長がµm オーダー粒子の場合、高い濃度では測定セル内で繊維が重なり、過小評価されることが考えられる(このような現象は、酸化チタンの測定では認められていない)。また、曝露チャンバーと CPC を接続するチューブは粒子の損失を抑制するため、通常導電性シリコンチューブが用いられるが、MWCNT では不十分であることが判明した。より静電気を帯びにくい銅管を用いることで、CPC の反応性が改善された。

E. 結論

T-CNT7 のマウス 5 日間反復全身曝露吸入実験において、質量濃度は、低用量群、高用量群それぞれ

1.4 ± 0.1 mg/m³, 3.2 ± 0.3 mg/m³, 平均 CPC カウントは 960 ± 80/cm³, 2340 ± 238/cm³ であり、実験期間を通して安定した濃度推移が得られた。定期解剖を行い、病理組織評価、免疫機能評価及び肺負荷量測定に供した。

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辻昌貴氏、森田紘一氏に深く感謝する。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Take M, Takeuchi T, Hirai S, Takanobu K, Matsumoto M, Fukushima S, Kanno J., Distribution of 1,2-dichloropropane in blood and other tissues of rats after oral administration. J Toxicol Sci. 2017;42(2):121-128

2. 学会発表

Yuhji Taquahashi, Koichi Morita, Masaki Tsuji, Yoko Hirabayashi, Akihiko Hirose and Jun Kanno, A short-term whole-body inhalation study of potassium titanate whisker in mice with an improved dispersion and inhalation system, The 57th Society of Toxicology, Henry B. Gonzalez Convention Center, San Antonio, Texas, USA, 12 March, 2018,. Poster

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

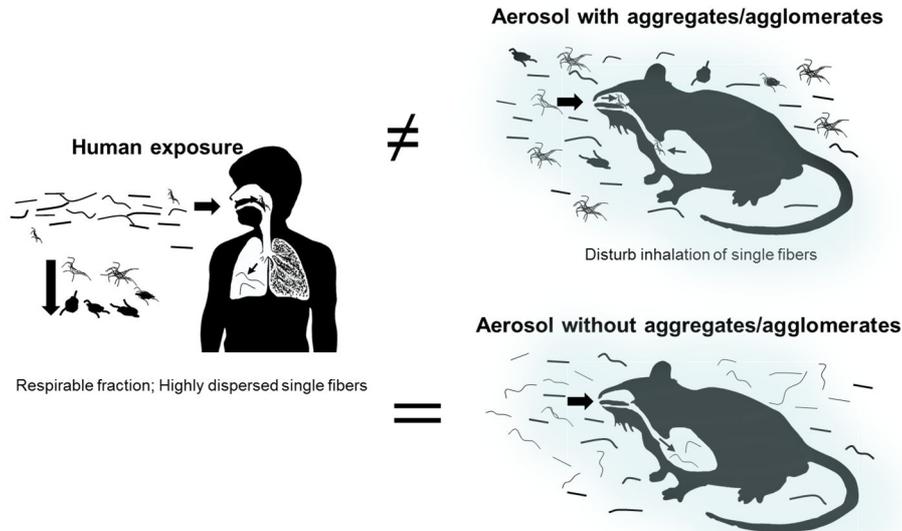


図1 ヒトの現実的な曝露シナリオに基づいたナノ材料の吸入毒性評価方法

粒子状物質の吸入において、粒径分布は内径が徐々に狭くなる鼻腔から肺胞に至る各部位への沈着量を決める重要な因子である。微細な粒子は肺胞まで到達するが、大きな粒子は気道の上層部で効果的に除去される。ヒトが現実的にナノ材料に曝露される環境下では、緩徐な風速であるため気相にナノ材料の凝集体/凝固体は速く沈降する。また、ヒトの上気道は長いため、凝集体/凝固体が効果的に取り除かれて肺胞レベルには高度に分散されたものが優先的に到達すると想定される。一方、実験動物を用いた粉体の吸入曝露試験では、エアロゾルの均一性を保つためチャンバー内の空気は強く攪拌されている。凝集体/凝固体を含む検体をエアロゾル化すると、ヒトに比較して細く短い気道を有するげっ歯類では、この凝集成分が気道末梢の比較的近位に捕捉されるため、それよりも末梢の肺胞レベルへの単離繊維の吸入を阻害あるいは肺胞病変を修飾する可能性がある。以上のことから、吸入曝露試験において実験動物からヒトへの外挿性の高いデータを得るためには、凝集体/凝固体を除去した上で分散性が高い検体を使用する必要がある。

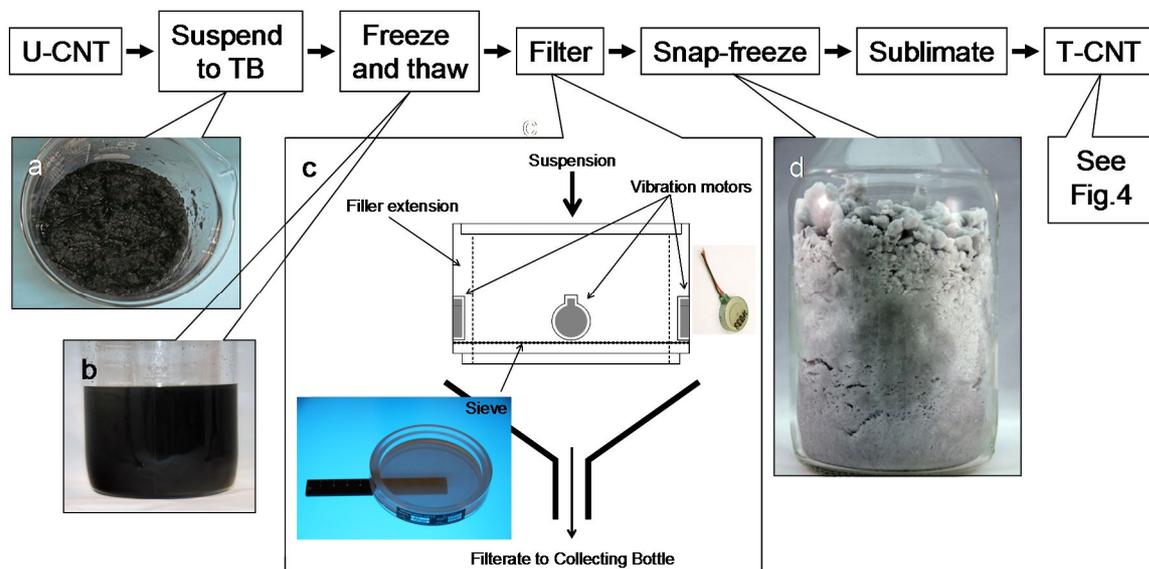


図 2 Taquann 法の概要

(a) MWCNT 原末 (U-CNT) を三級ブタノール (TB) に混合して氷冷して TB をシャベット状にして金属性スパテルで混ぜ十分に混和する。(b) -25°C で一晩凍結したのち再融解を行う。(c) 金属製フィルター (セイシン企業、目開き $25\ \mu\text{m}$) で濾過し大型の凝集体を除く。濾過効率を向上させるため、金属製フィルターには携帯電話に使用されている振動モーター (FM34F T.P.C. DC MOTOR、振動量: $17.6\ \text{m/s}^2$) をリムに 4 個装着し、フィルターを振動させる。(d) 濾液は直ちに液体窒素で凍結・固化し固相のまま溶媒回収型真空ポンプにより減圧し、液相を介さずに昇華させ、分散性の高い乾燥状態の MWCNT を得る。Taquahashi et al., JTS, 2013;38 (4) :619-28

Taquann Direct-Injection Whole Body Inhalation System Version 2.0

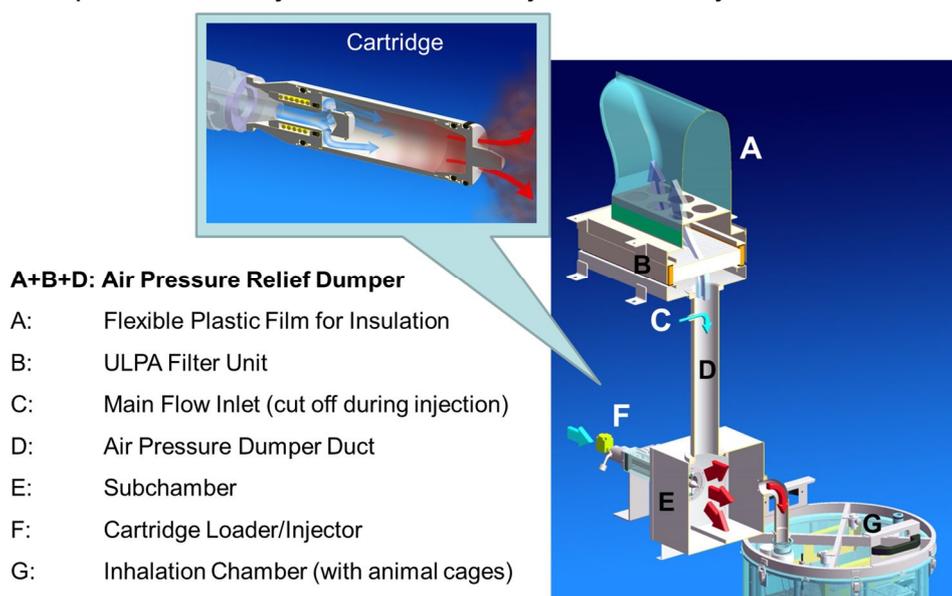


図 3 Taquann 直噴全身曝露吸入装置の模式図 (Ver 2.0)

噴射装置は、サブチャンバーに接続されている。噴射に伴う圧力上昇を減じるため、サブチャンバーに煙突を設け、その上部にはポリエチレン製の袋で覆った ULPA フィルターに接続されている。煙突部分の上部から加湿したキャリアエアを一定の流量で送り込み、噴射された検体はサブチャンバー内で気相に分散された後、希釈されつつ接続パイプを通して曝露チャンバーに導く構造となっている。

表 1 T-CNT7 曝露における群構成

Group	Examinations	N	Necropsy after inhalation exposure			
			Day 0	1W	4W	8W
Control	• Lung Burden	12	3	3	3	3
0 mg/m ³	• Histopathology(perfusion)	16	4	4	4	4
2hr/D/W × 5W	• Immune function					
Total 10hr	BALF	20	5	5	5	5
	Pulmonary interstitium mRNA					
	Spleen, Lymph node					
	Subtotal	48	divide into three sub-groups, A, B and C			
Low Dose	• Lung Burden	12	3	3	3	3
1 mg/m ³	• Histopathology(perfusion)	16	4	4	4	4
2hr/D/W × 5W	• Immune function					
Total 10hr	BALF	20	5	5	5	5
	Pulmonary interstitium mRNA					
	Spleen, Lymph node					
	Subtotal	48	divide into three sub-groups, A, B and C			
High Dose	• Lung Burden	12	3	3	3	3
3 mg/m ³	• Histopathology(perfusion)	16	4	4	4	4
2hr/D/W × 5W	• Immune function					
Total 10hr	BALF	20	5	5	5	5
	Pulmonary interstitium mRNA					
	Spleen, Lymph node					
	Subtotal	48	divide into three sub-groups, A, B and C			
Total number of animals		144				

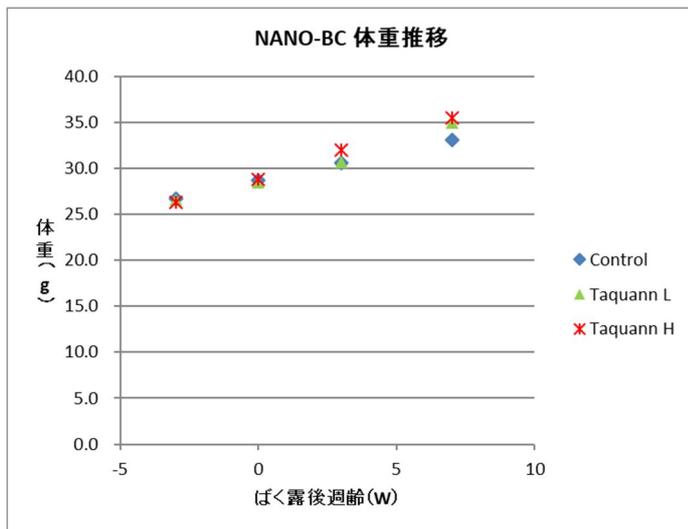


図 4 T-CNT7 の吸入曝露後の体重推移

体重推移に異常は認められなかった。一般状態では、ファイティングによる咬傷、脱毛が散見されたが検体曝露との関係は認められなかった。

表 2 T-CNT7 反復曝露における質量濃度と CPC による粒子数

		1st	2nd	3rd	4th	5th	Average	SD
Low Dose	Mass Concentration (mg/m ³)	1.4	1.6	1.4	1.4	1.4	1.4	0.1
	CPC Average(0-120min, # / cm ³)	905	1,047	888	912	1,046	960	80
High Dose	Mass Concentration (mg/m ³)	3.6	3.4	3.3	3.2	2.7	3.2	0.3
	CPC Average(0-120min, # / cm ³)	2,097	2,352	2,107	2,525	2,621	2,340	238

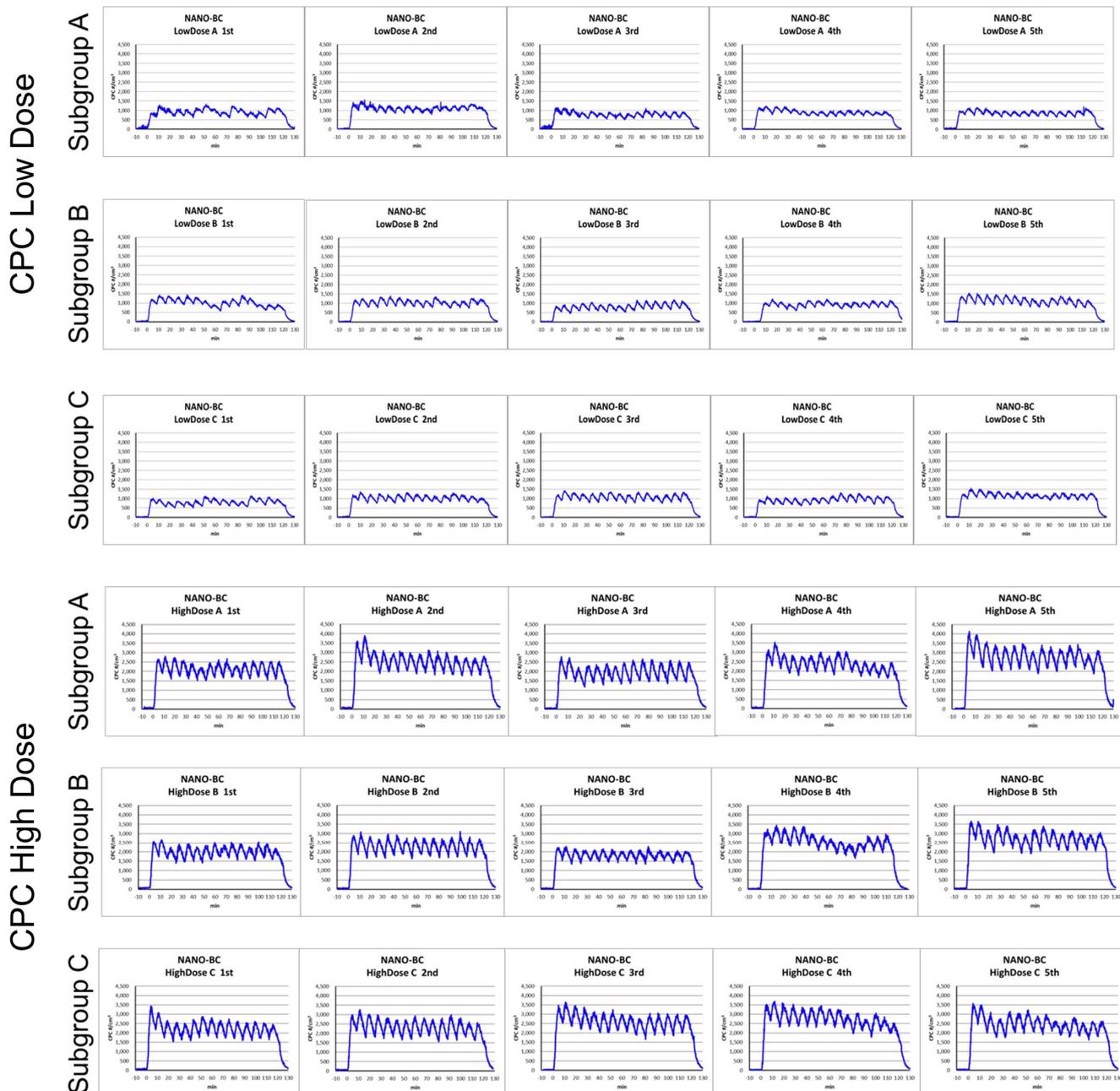


図 5 T-CNT7 の吸入曝露における CPC カウント

CPC による T-CNT7 エアロゾルの粒子数は鋸歯状の推移を示す。5 日間の曝露を通して安定した濃度推移であった。