

4 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

厚生労働省 労働基準局（委託先） 独立行政法人産業医学総合研究所 作業環境計測研究部 鷹屋光俊

重点強化事項 リスク

研究期間 平成12年度～平成15年度

研究予算総額 79,726千円

研究の背景と目的

近年、環境問題対応やIT産業の発展に伴い、高性能磁石合金や水素吸蔵合金といった機能性材料の種類と使用量が急増している。近年急速に使用が伸びている機能性材料に共通した特徴として、希土類元素の使用をあげることが出来る。希土類元素は、相互に化学的性質が酷似しており、単離するのが困難であったため、工業的利用が遅れたが、近年は、多方面への利用が急速に拡大している。今後もIT・省エネルギーというハイテク産業の成長に伴い、希土類元素を用いた機能性材料の使用量が增大することは明らかである。これら、希土類元素を用いた新しい機能性材料の使用の増大に伴ってこの新規物質の周辺環境への拡散が予想される。一方、希土類元素の毒性は不明な部分が多い。特に、機能性材料として様々な形態で工業利用される希土類元素を中心とする金属微粒子の生体影響は全く未知である。そこで、本研究は、希土類を中心とした金属（化合物）微粒子の環境中ならびに生体内での物性の特徴と挙動を把握する方法（キャラクタリゼーション法）を検討した。一方、機能性材料の使用にともない、ヒトがばく露する可能性が増大した希土類酸化物の生体影響を、細胞、動物を用いて評価した。

研究の成果

1 希土類使用機能性材料の実態調査

機能性材料として代表的な水素吸蔵合金製造工場、磁石合金および、機能性材料の原料である希土類元素精錬工場において、製造工程の実態と、機能性材料全体の動向、リサイクルの可能性等に関して調査を行った。その結果、機能性材料は、いずれも材料の性能上の必要性から閉鎖系の製造設備を用いて製造されており、工場周辺の土壌などへの局地的な汚染は否定できないものの、周辺大気などへの大規模な汚染の可能性は低いということを確認した。

2 機能性材料および希土類イオン分析方法の開発

気中粒子のリアルタイム分析：産業医学総合研究所が開発したガス変換型微分型電気移動度粒径分析装置と誘導結合プラズマ質量分析装置（ICP-MS）を接続したDMA-ICP-MSの機能性材料由来粒子への応用を試み、DMA-ICP-MSが機能性材料由来粒子の分析に適用可能であることを示した。

希土類イオンの分析：希土類元素イオンのキャピラリー電気泳動（CE）による分析法の開発をおこなった。その結果、全希土類を同時に分析するのは困難であったが、泳動溶液に金属指示薬を混入させる方法によりサマリウムイオンを、キレート剤であるDPTAあるいは大環状アミンを用いて錯体とし、ランタン、セリウム、イットリウムなどをppmオーダーで分析する方法を開発することができた。

3 機能性材料のキャラクタリゼーション

動物実験被験試料の電子顕微鏡観察：実験動物に気管内投与あるいは吸入曝露した希土類酸化物は、粉末試薬として購入したものであり、形状、粒径分布、粒子表面の様子などは明らかではないので、走査型電子顕微鏡（SEM）による観察を行った。これらは、蒸留水および生理食塩水には、ほとんど溶解しないことを確認し、それぞれの物質を蒸留水に懸濁した後ニュークリポアフィルター上に吸引濾過した。SEM観察用試料作製の手順に従い処理し、SEMによる観察写真撮影を行い、形状、粒径などを確認した。

粒径測定の結果を表1に、粒子のSEM写真を図1に示す。

相変化：希土類酸化物の相変化について研究を行った。機能性材料を使用した製品が廃棄され焼却処分された場合、希土類酸化物が環境中に放出される。これが、酸化物のまま存在するのか、水や二酸化炭素と反応して水酸化物や、炭酸塩になるのかは、環境中の拡散速度、生体影響を評価する際に重要な基礎的情報となる。希土類酸化物と二酸化炭素との反応をみるために、希土類酸化物を約6%のCO₂濃度下の純水中で攪拌させ結晶相の変化を調べた。実験期間3日の間にLa₂O₃、Nd₂O₃、Sm₂O₃は中間相を経て炭酸水酸化物に、Y₂O₃は含水炭酸塩に変化した一方、CeO₂に変化は認められなかった。Y₂O₃から生成した含水炭酸塩は短柱ないし短繊維状の粒子で酸化物の時とは異なる特徴的な形態を有していた。また、これら粒子が生体内に取り込まれた後の挙動にも関心が持たれる。生体内試料の粒子分析では複雑な試料調整を行うことなく有用な情報が得られることが望ましく、様々な解析結果の蓄積が今後も必要と考えられる。本研究ではY₂O₃を投与したラット肺内の粒子について、分析走査型電子顕微鏡（SEM-EDS）分析、赤外（IR）分光分析、顕微ラマン分光分析を試み評価を行った。SEM-EDSおよびIRの結果を図2に示す。

溶解速度：環境中や生体中の機能性材料由来金属化合物の移動速度を推定する際に必要な情報として、純水、生理食塩水、疑似肺胞液（ギャンブル液）、海水、河川水、湖水に対する、機能性材料および希土類酸化物の溶解速度を測定した。その結果、ギャンブル液では純水に比べ数十～数千倍希土類酸化物を溶解すること、海水や湖水などでも純水より溶解能力が大きいこと、微量不純物としてYやNdが含まれる場合、選択的に溶解し、主成分よりも高濃度に水中に存在しうるなどを見いだした。表2にY₂O₃の溶解速度の結果を示す。

4 曝露実験に必要な技術開発

希土類酸化物の粒子がエアロゾルとして吸入されたときの肺への傷害性を調べるために、吸入ばく露実験が必要であり、そのためのばく露装置を開発した。気管内注入実験の結果と比較検討しながら研究を進めてゆくために、できるだけ高濃度でのばく露を行うことが要求された。そこでばく露チャンパーは鼻部ばく露方式を採用し、エアロゾル濃度を高めるためには、ミストの生成量を増加させなければならないのでミスト生成装置部分の改良を行った。これにより安定した高濃度の希土類金属酸化物エアロゾルばく露実験が可能になった。図3に鼻部曝露装置の構成図を示す。

5 希土類金属酸化物の生体影響

希土類金属酸化物のラット気管内単回投与による呼吸器影響

機能性材料に使われている希土類金属の生体影響を評価するために、環境中に放出され吸入ばく露する可能性の高い希土類金属酸化物を選び、粉じんの肺毒性を検討する上で簡便かつ有用な方法であるラット気管内投与法を実施し呼吸器への影響を詳細に検討した。

これまでに希土類金属酸化物の動物実験について評価可能なデータがほとんどなかったことから、主要な5種類の希土類金属酸化物（酸化イットリウム；Y₂O₃、酸化ランタン；La₂O₃、酸化サマリウム；Sm₂O₃、酸化ネオジム；Nd₂O₃、酸化セリウム；CeO₂）を選び、まず気管内投与による致死量の推定を行った。その結果、各酸化物の致死量（LD₅₀）は100-165mg/kgと推定されたことから、急性毒性は低いことがわかった。次に、5種類の酸化物について高用量を気管内に単回投与し急性肺病変を病理組織学的に検討した結果、Y₂O₃、La₂O₃、Sm₂O₃、Nd₂O₃の肺病変は、滲出性変化、異物肉芽腫の形成、肺胞マクロファージ（PAM）の傷害および肺胞蛋白症様病変を特徴としていたが、CeO₂は投与粒子の被包化巢を認めるのみで他の酸化物とは異なっており、希土類金属酸化物種間で呼吸器影響に差がある可能性が考えられた。さらに、5種類の希土類金属酸化物のうち、急性肺傷害が比較的強く認められたNd₂O₃について、3種類の投与量で急性肺傷害の量・反応関係を検討した結果、肺傷害の程度は投与用量に依存した量・反応関係がみ

られた。これらの結果を今後の気管内投与実験および吸入ばく露実験に反映させることとした。

そこで主要な希土類金属酸化物4物質5試料 (Y_2O_3 、 La_2O_3 、 Nd_2O_3 、 CeO_2 -coarse、 CeO_2 -fine) を選び、比較的高用量 (10mg/rat) をラット気管内に単回投与し、急性から亜慢性までの肺傷害について、気管支肺胞洗浄 (Bronchoalveolar Lavage; BAL) による細胞学的・生化学的分析と病理組織学的検査を詳細に検討した。その結果、 Y_2O_3 、 La_2O_3 、 Nd_2O_3 、 CeO_2 -fine では異物肉芽腫の形成と肺胞蛋白症を認めるとともにこれらの肺病変は長期間持続していた。また、 Y_2O_3 では次第に線維化傾向が認められ慢性呼吸器影響が懸念された。一方、 CeO_2 -coarse では、異物肉芽腫の形成と肺胞蛋白症などの肺病変は見られず呼吸器への影響は少ないものと推察された。BAL分析指標でも Y_2O_3 、 La_2O_3 、 Nd_2O_3 、 CeO_2 -fine では、PAMの傷害、好中球の増加および生化学指標の高値が持続し肺傷害の変化をよく反映していた。PAM傷害像を図4に、BALF炎症細胞分画の結果を図6に示した。 CeO_2 の肺病変に関しては、 CeO_2 -coarseの肺病変が他の金属酸化物とは異なり非常に軽度であったが、粒子サイズが $1\mu m$ 以下と小さくなると肺病変が惹起されたことから、 CeO_2 の肺病変形成には粒子サイズなどの物理化学性状の関与が重要であることが判明した。

動物実験の結果から、希土類金属酸化物ばく露による肺病変が長期間持続していること、これまでに希土類金属粉じんばく露によるじん肺症例報告が少数例なされていることなどから、希土類金属酸化物5種類6試料 (Y_2O_3 、 La_2O_3 、 Sm_2O_3 、 Nd_2O_3 、 CeO_2 、 CeO_2 -fine) の慢性呼吸器影響について病理組織学的に検討した。その結果、 Y_2O_3 では肺胞道から肺胞にかけて広範に肺の線維化が認められるとともに、 La_2O_3 、 Sm_2O_3 、 Nd_2O_3 、 CeO_2 -fine においても軽度な線維化が認められたことから、これらの金属酸化物は大量にばく露すれば慢性呼吸器影響を有することが考えられた。 Y_2O_3 の肺線維化像を図5に、急性から慢性までの病理組織所見結果を表3に示した。

酸化ランタンエアロゾルばく露によるラット肺傷害

気管内投与実験および鼻部吸入ばく露実験結果をふまえて、 La_2O_3 エアロゾルを $2.63mg/m^3$ のばく露濃度で5日間の全身吸入ばく露実験を行い、肺内の金属分析と亜急性までの肺傷害についてBAL分析と病理組織学的検査を行った。BALの細胞観察から吸入ばく露早期から顕著なPAM傷害が認められるとともに、生化学的指標値も細胞傷害の変化をよく反映していた。病理組織学的検査では吸入ばく露後PAMの傷害が次第に増強されるにしたがい肺内の滲出性変化が顕在化した。この結果、短期間の吸入ばく露によっても気管内投与実験とほぼ類似した肺病変が生じる可能性が強くと示唆された。今後さらにばく露条件を検討することによって、希土類金属酸化物による慢性呼吸器影響や肺傷害の機序解明も明らかにすることが可能であると推察された。

研究のまとめ

本研究では、機能性材料由来の金属微粒子の環境影響・生体影響を評価するために、機能性材料を特徴付ける成分である希土類化合物に関して分析手法の開発、物理・化学的性質の測定、生体影響評価などを行った。分析手法として、キャピラリー電気泳動に着目し、希土類イオンを検出する錯形成試薬の提案を行った。物理・化学的性質の測定においては、希土類酸化物が水や二酸化炭素共存下で水酸化物や炭酸塩に変化することや、希土類酸化物が天然水・生体液などに溶解する際、微量不純物が選択的に溶解する現象を観測した。これらの結果は、機能性材料の生体影響を評価する際に重要な情報と成りうる。また、各種希土類酸化物に関して、急性から慢性までの生体影響を評価した。希土類酸化物を気道経由で体内に取り込んだ場合の生体影響に関しては研究例が少なく、本研究の成果は貴重なものであると考える。

表1 動物実験に用いた希土類酸化物の生理食塩水懸濁液での凝集粒子径

	Y ₂ O ₃	La ₂ O ₃	Nd ₂ O ₃	CeO ₂	CeO ₂ -fine
D ₅₀ (μm)	2.16	1.89	1.91	3.90	—
σ _g	2.02	1.85	2.39	1.93	—

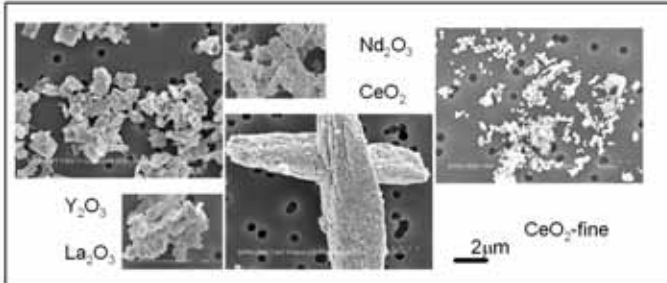


図1 動物実験に用いた希土類酸化物のSEM写真

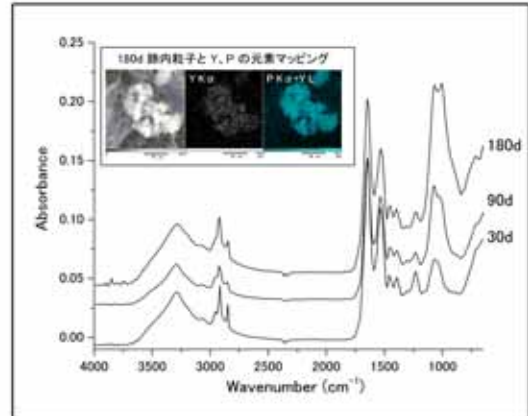


図2 肺内における酸化イットリウムの変化 (SEM-EDSおよびIR)

表2 Y₂O₃の溶解速度 (指標として試験溶液中の金属濃度を使用 単位 ppb)

	純水	食塩水	ギャンブル液	海水	河川水	湖水
1日最大	0.47	1.14	523	60.9	29.8	19.8
最小	ND	0.36	163	52.4	27.3	12.9
7日最大	3.6	3.63	2653	69.1	31.3	27.43
最小	0.02	0.12	2476	69.0	17.8	24.14

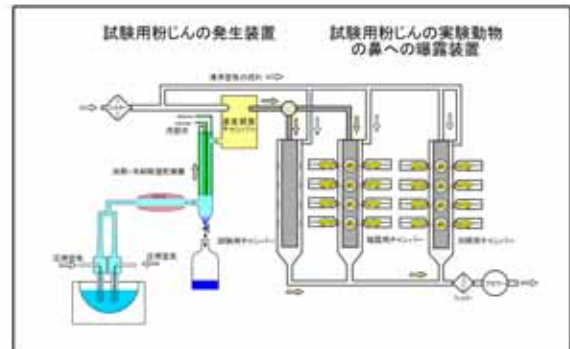


図3 鼻部曝露装置

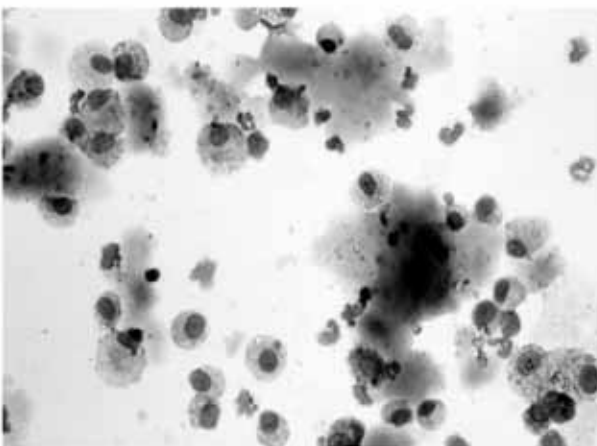


図4 Nd群、投与後90D、BALF浮遊細胞、May-Grünwald-Giemsa染色、×118

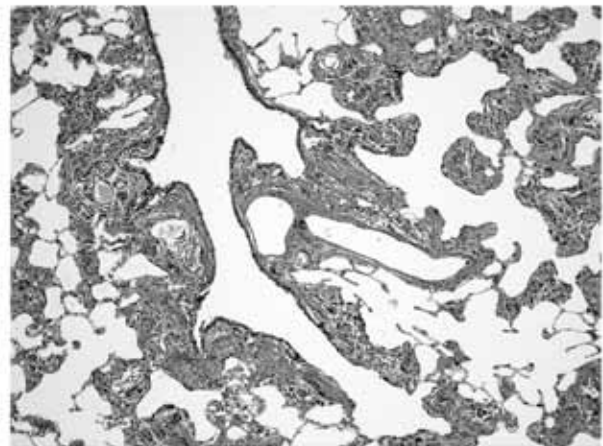


図5 Y群、投与後1.5Y、肺、H&E染色、×59

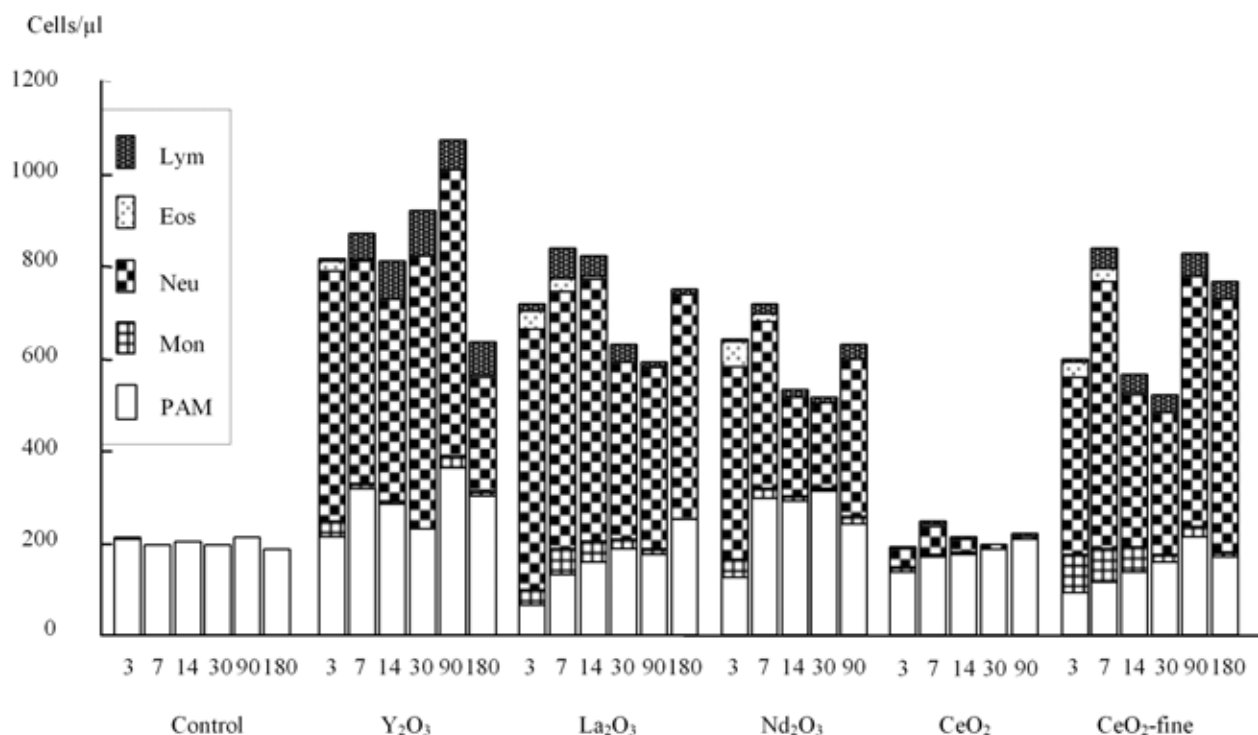


図6 BALF炎症細胞分画

表3 肺病理組織所見

病変	試料	Y ₂ O ₃						La ₂ O ₃						Sm ₂ O ₃		
	観察月	7D	1M	3M	6M	12M	18M	7D	1M	3M	6M	12M	18M	6M	12M	18M
PAMの動員／崩壊		3/3	1/1	1/1	1/0	0/0	0/0	3-4/3	3/2-3	3-4/3	3/2	0/0	0/0	1/1	1/1	1/1
炎症／滲出性変化		2/3	1/3	1/3	0/0	0/0	0/0	3/3	3/2	3/2	1/1	0/0	0/0	0/0-1	0/0	0/0
肺胞蛋白症		1	3	4	1	0	0	2-3	3-4	4	4	0	0	2	2	0
肉芽腫		3	4	4	3	2	1	3-4	2-3	2-3	2	2	1	1	1	0
線維化		0	0	0	2	2-3	3	0	0	0	0	2-3	3	0	0-1	1-2

病変	試料	Nd ₂ O ₃						CeO ₂				CeO ₂ -fine					
	観察月	7D	1M	3M	6M	12M	18M	7D	1-6M	12M	18M	7D	1M	3M	6M	12M	18M
PAMの動員／崩壊		3/3	1/1	1/1	1/1	1/1	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0	3/2	3/2	3/2	3/2	3/3	3/3
炎症／滲出性変化		2/3	1/3	1/2	0/1	0/1	0/0-1	0/0	0/0	0/0	0/0	3/2	1/1	1/1	1/1	0/0	0/0
肺胞蛋白症		1	3	2	2	0	0	0	0	0	0	0	2	3-4	4	3	3
肉芽腫		3	4	2	2	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0
線維化		0	0	0	0	0-1	1-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0-1

0: なし、1: ごく軽度、2: 軽度、3: 中等度、4: 高度

研究発表

発表題名	掲載誌 / 学会等	発表年月	発表者
(誌上発表)			
・ DMA as a GasConverter from Aerosol to “Argonsol” for Real-Time Chemical Analysis Using ICP-MS	Aerosol Science and Technology 36:76-83	14.1	明星, 鷹屋, 小笠原
(口頭発表)			
・ 希土類金属酸化物の培養細胞への投与の影響	第 18 回希土類討論会	13.5	岩田, 小滝, 戸谷, 高田, 鷹屋, 小笠原, 篠原, 芹田, 神山
・ 希土類金属酸化物の気管内単回投与による肺傷害の比較. 1 病理組織学的検査	第 75 回日本産業衛生学会	14.4	戸谷, 高田, 小滝, 鷹屋, 芹田, 篠原, 小笠原, 大前, 神山
・ 希土類金属酸化物の気管内単回投与による肺傷害の比較. 2 気管支肺胞洗浄液分析	第 75 回日本産業衛生学会	14.4	高田, 戸谷, 小滝, 鷹屋, 芹田, 篠原, 小笠原, 大前, 神山
・ ミセル動電クロマトグラフィによる金属イオン分析の希土類への応用について	第 20 回希土類討論会	15.5	鷹屋, 神山, 芹田, 篠原, 小野, 小滝, 戸谷, 高田
・ CE を用いた遷移金属および希土類金属の分析	日本分析化学会第 52 年会	15.9	鷹屋, 芹田, 篠原, 小野, 小滝, 戸谷, 高田, 神山

工業所有権

特になし