

論文の内容の要旨

論文題目：Ecotoxic Effects of Nanomaterials and the other Emerging Chemicals of Concern to Aquatic Organisms
(ナノマテリアルなど新規環境影響懸念物質の水生生物に対する影響評価)

氏 名：中 村 中

我々の身の回りには多種多様な化学物質が溢れており、その数は7500万種以上に及ぶ。現代社会はこのような化学物質の恩恵なしには成立し得ないと言って過言ではない。しかし、一方で自然環境中へ廃棄・排出された化学物質は時として野生生物に対して悪影響を与える恐れがあり、更にその影響が人間に回帰しヒト健康影響を害することも少なくない。従って、そのような化学物質の利便性と環境に対するリスク(環境リスク)とを適切に把握・評価した上で、適切な管理・利用がなされる必要がある。その際、化学物質の環境リスク把握・評価のための有効なツールの一つとしてバイオアッセイが挙げられる。ここでいうバイオアッセイとは、室内実験によって化学物質に対する生物の様々な応答を定量化する手法を指す。例えば、魚類・甲殻類・藻類など水生生物を用いた曝露試験手法は20世紀の半ばより開発が進められ、現在ではこれらの手法はOECDなどの国際的組織によってガイドライン化されている。このような生物そのものを試験に供しその応答を定量するいわゆる *in vivo* の手法は、培養細胞や細胞内の器官や物質(DNAやタンパク質など)などを用いる *in vitro* の手法に比べて現実の影響をより正確に判断でき、かつフィールド調査に比べて意図した条件での実験が可能で一般に高い再現性も期待出来るなど、様々な優位性を持つ。そのため、これらの手法から得られた成果は、国際条約や各国の規制などに反映され、環境リスクの適切な把握・管理に役立てられている。しかし、化学物質は5秒に1種類と言われる急速なペースで日々新たに合成・開発され増え続けており、その中には既存の手法では対処できない物質も存在する。それらを総称して、新規環境影響懸念物質と呼ぶ。その代表として挙げられるのは、内分泌かく乱物質、特殊な医薬品、ナノマテリアルなどである。特にナノマテリアルのリスク評価は、次の3つの理由により喫緊の課題とされている；①幅広く・大量に用いられつつある、②強い毒性が懸念されている、③評価方法が特に困難である。

ナノマテリアルについては様々な定義が存在するが、一般には、少なくとも一次元のサイズが1~100 nmの範囲にある素材の総称とされている。ナノマテリアルは、①サイズが小さい、②それに伴って単位体積辺りの表面積が大きい、③炭素系素材に

においては軽さと強度・弾性を兼備する，などの特性を有する事から幅広い分野への活用が期待され，その一部はパーソナル・ケア製品など身近な分野でも既に応用されつつある。一方で，2004年頃よりヒトの健康や野生生物に対して悪影響を与えるとの懸念がされるようになり，ナノ毒性学として近年盛んに研究が進められている。しかし，水生生物に対する影響については現在十分な知見が得られていない。特に，ナノマテリアルが既存の枠組みで対応しきれない新規環境影響物質でありながら多くの既存研究がその評価に既存の試験法をそのまま適用していることは，その影響の過少・過大評価に繋がっていると考えられる。ナノマテリアルの生態影響評価には，先ず水中における素材の様態を正しく計測・把握した上で，それを踏まえた適切な曝露試験とその評価がなされなければならない。また，他の新規環境影響物質も含め，先ず短期慢性影響を確実に評価する事が先決である一方，より複雑な影響，例えば二次性徴，繁殖，多世代に亘る影響などを評価する試験法の確率も求められる。

そこで本論文は，新規環境影響懸念物質，特にナノマテリアルの水生生物に対する生態影響について過不足なく適切に評価する手法の確立を目的として，下記のような4つのテーマから研究を行った。

- テーマ1：ナノマテリアルの粒径測定手法に関する検討と開発
- テーマ2：水環境中におけるナノマテリアルの様態把握
- テーマ3：水生生物に対するナノマテリアルの曝露試験評価
- テーマ4：新規環境影響物質の繁殖・多世代影響評価手法開発

まず，テーマ1として水中におけるナノマテリアルの粒径測定について既存の手法を俯瞰した上で，より適切な測定手法に関する検討を主に動的光散乱法を用いて行った。液中微粒子のサイズを測定する代表的な手法として，動的光散乱法が挙げられる。この手法は，粒子のブラウン運動をレーザー光の反射から二次的に検出して数学的に粒子の粒径やその分布を算出するため，アルゴリズムや換算手法の異なる様々な解析手法が存在する。その中で，現在最も一般に用いられているのは，Cumulant法と呼ばれるアルゴリズムである。これは，本手法が材料工学の分野で主に発展してきたため，同分野の主な対象である有機分散媒等に拡散させた比較的均一な分散系の測定に最適化された結果といえる。しかし，ナノ粒子は水中・水環境中においては不均一になる事が予想され，その場合にはCumulant法の適用は適切でない可能性がある。しかし，こうした事項については現状殆ど検討されていない。そこで，様々な金属ナノ粒子を分散剤・分散媒を使用せずに水中へ拡散させて動的光散乱法の複数の解析手法で測定を行い，比較考察を行った。その際，走査型電子顕微鏡による観察も併せて行った。その結果，特に複数の異なるサイズの粒子が混在させた分散液において，粒径分布を正しく検出出来たのはContin法のみであり，Cumulant法含めその他の手法では単分散系として誤算出された。また，同じContin法であっても，個数換算では小粒子を高感度で検出出来るのに対し，質量換算では大粒子の影響が過多に反映されやすかった。従って，水中・水環境中のナノ粒子を動的光散乱法によって測定する際には，主流であるCumulant法は不適であり，Contin法を用い個数換算で表す事が最も望ましいと判断された。但し，同手法はノイズなど外乱の影響を受けやすいため，誤検出の可能性が排除出来ない。従って，例えば電子顕微鏡による観察を併せて行うなど，当該手法の欠点を補完する手法を組み合わせたダブルチェックが望ましい

と考えられた。

次に、テーマ 1 で得られた知見を基に、水環境中におけるナノマテリアルの様態を測定し、各種水質との関係やバイオアッセイにおける応用方法などについて考察した。水環境中に流入したナノ粒子の様態については、有効な調査方法が存在しないことから、現在殆ど把握されていない。但し、理論上ナノ粒子の状態は水環境中に様々な不純物（例えば電解質などの溶解物や、タンパク質などの夾雑物）の影響を受けて大きく変化する可能性がある。しかし、既存研究ではそのような時間経過に伴う様態の変化を想定しておらず、従ってそうした研究結果には誤解の恐れがある。そこで、ナノ二酸化チタン分散液を様々な水質の水へ分散させ、インターバル測定により様態の変化及び水質との関係を調査した。その結果、ナノ粒子の様態は時間経過に伴って急速に変化し、その傾向は、硬度やタンパク質濃度が高いほど顕著であった。また、一定時間経過後も、各サンプルで 100 nm 未満の微粒子が検出された。ここから、水環境中においてナノ素材は数十時間のオーダーで大半が凝集・沈降するが、その後も 100 nm の粒子が少量ながら依然水中に拡散し続けることが示唆された。また、このような様態の変化は、流入前の状態からは判断出来ず、水環境中での様態を把握するためには継時的な測定が必要であると考えられた。

以上の成果を基に、既存のバイオアッセイ手法にテーマ 1・2 の成果を組み込み、ナノマテリアルに対応した魚類短期慢性毒性試験法を構築した。本試験法により、ナノマテリアル及び非ナノマテリアルの二酸化チタン微粒子計 8 種を用い、魚類に対する影響を評価した。また、それを基に粒子の様々な性状・様態と魚類に対する影響とを比較し、両者の相関関係や因果関係を考察した。その結果、ナノマテリアルは非ナノマテリアルに比べより強い毒性を示した。但しその度合いは、非ナノマテリアルの IC₂₅ が約 200~400 mg/L であるのに対しナノマテリアルでは約 40~200 mg/L であり、一部の既存研究で懸念されているような絶対的及び非ナノマテリアルとの相対的に著しく劇しいものではなかった。また、ナノマテリアル・非ナノマテリアルを問わず、影響の強さは例えば各粒子の比表面積の広さなど、化学反応の効率性に関する指標と有意な正の相関関係にあった。以上から、二酸化チタンにおいて、ナノマテリアルの毒性の強さは、素材としての化学活性の強さに対しリーズナブルであると考えられた。

更に、テーマ 4 としてナノマテリアル以外の新規環境影響物質を用いて、繁殖や多世代に亘る影響の評価手法について検討した。その結果、既存の魚類短期繁殖試験について、被験生物の試験開始時期を二次性徴前とすることで、より広範な作用・影響の検出が可能であることが確かめられた。また、魚類の多世代試験法について検討した結果、継代するに従いより低い用量で個体群維持能力に対する影響が発現する事が観察された。

これまでナノマテリアルの生態影響については適切な評価手法が存在しなかったが、本研究によってナノマテリアル特に非溶解性の金属素材については一定の安定性・妥当性を持ったバイオアッセイが可能になった。但し、現状は飽くまでも短期間の影響評価に留まっている。本研究では、ナノマテリアル以外の新規環境影響物質については、繁殖や多世代に亘る影響等を明らかにする上で有用な試験法を開発した。今後、これらの試験法をナノマテリアルについても対応出来るよう更に改良することで、より包括的な評価が可能になるものとする。