

走査電子顕微鏡を用いた個別粒子分析によるナノマテリアル凝集体の粒子密度推定及び形状のキャラクタリゼーション

山田 丸*1 鷹屋 光俊*1 小野 真理子*2 緒方 裕子*1

ナノマテリアル粉末取り扱い時に空中に飛散する粒子は主に凝集体の形をとる。凝集体の粒子密度（内部の空隙を考慮した密度）とその形状は、ばく露測定及び体内動態の正確な評価にとって重要なパラメータである。本研究は、既知の空気動力学径で分級した単分散粒子の走査電子顕微鏡（SEM）観察を通じて、粒子形状のキャラクタリゼーション及び粒子密度を見積もる方法を検討することを目的とする。本研究では、2種類の二酸化チタンナノマテリアル粉末をエアロゾル化したものを計測に用いた。エアロゾル化には、ボルテックスシューカー発じん法を用いた。凝集粒子の密度及び形状を評価するために、空気動力学エアロゾル分級装置（AAC）で二酸化チタンを400, 600, 800 nmに分級し、それをポリカーボネートフィルターでろ過捕集し、SEMにより粒子像の観察を行った。AACによる分級粒径とSEM観察によるその形状情報から粒子密度を推定し、二酸化チタンの真密度に対して凝集体の粒子密度はおおよそ1/4~1/2であることが示唆された。本研究では、サブミクロンのナノマテリアル凝集体の粒子密度を推定する方法を提案した。包括的なばく露評価には個々の粒子の情報が必要であり、今回提案した粒子測定の評価方法はその足がかりとなると考える。

キーワード: ナノ粒子, 二酸化チタン, 凝集体, SEM, 粒子密度.

1. はじめに

労働環境の気中には様々な粒径・形状の粒子状物質が浮遊している。これらの粒子は粒径の違いにより呼吸器への到達部位が異なり、そのため、同じ組成であっても粒径・形状により生体影響が異なる場合がある。粒径は、測定方法によってその定義が異なる。たとえば、顕微鏡で観察して求めた粒径は幾何学径と定義され、光を照射した際の散乱強度を測定して求めた場合には光散乱径と定義され、また粒子の空気動力学的な特性により定義された粒径は空気動力学径（ d_a ）と呼ばれる。これらの粒径のうち、粒子の呼吸器への沈着部位の指標として最も優れている空気動力学径が労働衛生の分野ではよく使用される。粒子は吸入された際の体内到達部位の違いによって、レスピラブル（50%カットオフ径（ d_{a50} ）=4 μm ）、ソラシック（ d_{a50} =10 μm ）、インハラブル（ d_{a50} =100 μm ）の3区分に区別される¹⁾。このうち、レスピラブル粒子は肺の深部（肺胞領域）まで到達するサイズであり、肺疾患に深く関わりがあるため、労働環境の粉じん測定においても d_{a50} =4 μm のカット特性を有する分級装置を装着したサンプラーを用いて粉じんを捕集し分析されることが多い。しかしながら、ナノマテリアルに代表される一次粒径が100 nm以下のナノ粒子の毒性が懸念されていることからわかるように²⁾、粒子の到達部位が同じ粒子の中でもさらに、粒径や形状に着目した測定が重要

となっている。一方で、粒子は粒径が小さいほど凝集しやすくなり、粉体材料として取り扱われるナノマテリアルはその大部分が凝集体として空中に浮遊すると考えられるので、下記に示すように各種の測定結果から、気中粒子の濃度を求める際には注意すべき点がある。

粒径分布を測定する方法として、リアルタイムエアロゾル測定装置や多段式の分粒装置を取り付けたサンプラーでは個数分布や質量分布を測定することはできるが、粒子形態や化学成分の混合状態の情報までは得られない。また大気環境中のバックグラウンド粒子との区別が困難な場合がある。一方で、電子顕微鏡による個別粒子分析は、粒子一つ一つの形態や元素組成を観察できるため前述の不足した情報を補える非常に有効な手段であるが、粒子の質量情報を直接得られないという課題がある。粒子状化学物質の生体影響の多くは、質量濃度によって評価されており、質量情報は極めて重要な情報である。

たとえば空隙のない球状粒子のような単純な形状の粒子であれば、顕微鏡の観察像（幾何学径）から粒子一粒の質量を比較的容易に推定でき、その粒子の空気動力学的な挙動も推定できる。一方で、凝集体は構成する粒子間の空隙や凝集の程度が不明なため、顕微鏡観察のみでは凝集体の粒子密度の推定は困難である。そこで本研究では、粒子の電子顕微鏡像からその質量を推定するために凝集体の粒子密度を算出する方法を検討した。本研究では、空気動力学エアロゾル分級装置（AAC: Aerodynamic Aerosol Classifier, Cambustion Ltd.）を使用して分級したナノチタン粒子を走査電子顕微鏡（SEM）で観察してその粒径と形状を把握した。そして、既知の空気動力学径と粒子の粒径・形状データを対比させることで粒子密度の推定を試みた。

*1 労働安全衛生総合研究所 化学物質情報管理研究センター ばく露評価研究部

*2 労働安全衛生総合研究所 化学物質情報管理研究センター 化学物質情報管理部

連絡先: 〒214-8585 神奈川県川崎市多摩区長尾 6-21-1

労働安全衛生総合研究所 化学物質情報管理研究センター

ばく露評価研究部 山田 丸

E-mail: yamadam@h.jniosh.johas.go.jp

2. 実験

2.1. 試料

本研究では市販の2種類のナノマテリアル（一次粒径が100 nm以下の二酸化チタン粉体）を試料とした。表1の一次粒径及び比表面積はメーカーにより示された値であり、かさ密度は本研究での実測値である。両試薬は同じ化学組成であるが結晶形が異なり、P25はRutileとAnataseの混合物である。

表1 二酸化チタンナノマテリアルの物性

試料	一次粒径	比表面積	かさ密度
Aeroxide	21 nm	50 m ² /g	100
P25 (Evonik)			mg/cm ³
Rutile (Aldrich)	30 nm	130-190	330
P/N 637262		m ² /g	mg/cm ³

2.2. エアロゾル発生

エアロゾルはボルテックスシェーカー法により乾式発生させた(図1)。ボルテックスシェーカー法は、詳しくは引用文献を参照されたいが^{3,5)}、試験管に粉体を入れて攪拌し、ろ過空気によって浮遊した粉末を配管内下流に流す方法である。この方法によって発生した多分散の凝集粒子を、配管で接続したAACに通し、 $d_a=400, 600, 800$ nmの単分散粒子に分級した。AACは、同方向に同じ角速度で回転している同心円状の二つのシリンダーの間隙に導入されたエアロゾルが、粒子フリーのシースイアアに乗って軸の下流方向に流れていく間に、半径方向への遠心力を受け、以下の式(1)に示す粒子の緩和時間 τ 、すなわち粒子の移動度 B に質量 m を掛けたもの差によって空気力学的に粒子が分級される^{6,7)}。

$$\tau \equiv Bm = \frac{C_c(d_a)\rho_0 d_a^2}{18\mu} = \frac{2Q_{sh}}{\pi\omega^2(r_i + r_o)^2 L} \quad (1)$$

ただし、 $C_c(d_a)$ は粒径 d_a におけるすべり補正係数、 ρ_0 は流体の密度、 μ は流体の粘性係数であり、 Q_{sh} はAACのシースイアアの流量、 ω はシリンダーの角速度、 r_i と r_o はそれぞれシリンダー間隙の内径と外径、 L はシリンダーの長さである。この原理によって分級された粒子を、後述するSEM観察のためポリカーボネートフィルター(孔径0.4 μ m)でろ過捕集した。

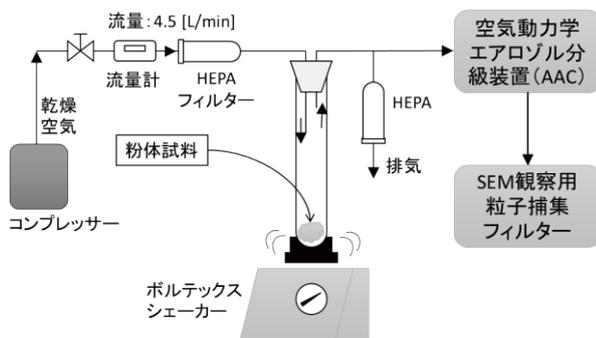


図1 実験システムの概念図

2.3. エアロゾル粒子のSEM観察

粒子を捕集したフィルターは、適切な大きさにカットしてSEM用試料台の上にカーボン両面テープで固定し、導電性を持たせるための前処理としてタングステン(4 nm厚)でコーティングした。試料は、フィールドエミッション型SEM(FE-SEM; JEOL製JSM-7900F)により、加速電圧7 kV、ワーキングディスタンス6 mm、観察倍率2000倍の条件で観察した。

図2は、AACで分級した粒子のSEM観察像であり、ここでは代表例として $d_a=800$ nmで分級したP25を示す。観察像は画像解析ソフト(WinROOF2018, 三谷商事)により二値化処理を行い、個々の粒子に対して、円相当径($d_{PA}=2(\text{粒子面積}/\pi)^{0.5}$; 投影面積と等しい面積を持つ円の直径)、絶対最大長(粒子の輪郭線上の任意の2点間の距離の最大値)、円形度($=4\pi \times \text{粒子面積}/(\text{周囲長})^2$; 円形で最大値1を取り、複雑な形状ほど小さな値を取る)、アスペクト比($=\text{絶対最大長}/\text{対角幅}$)の4つの形状パラメータを取得した。なお、各粒径で分級した試料に対して、約200個の粒子像を解析した。

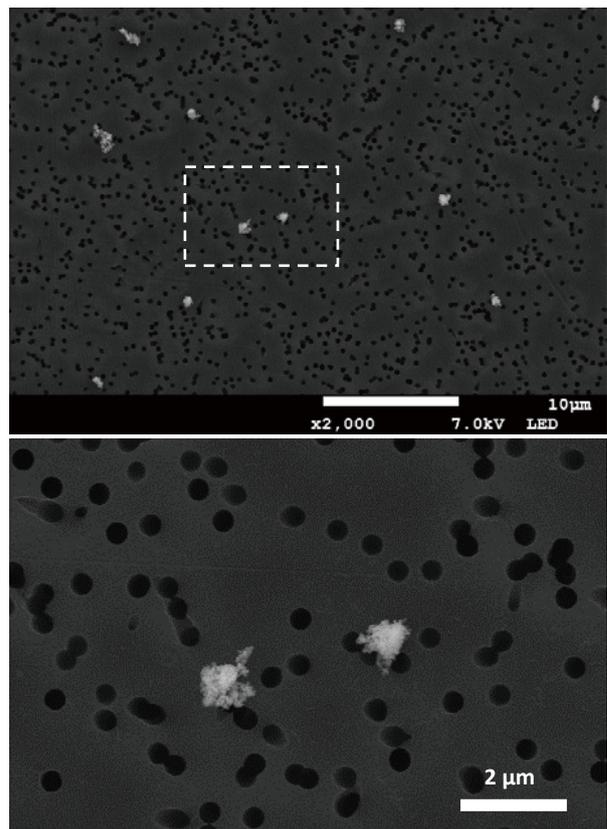


図2 AACで $d_a=800$ nmで分級したP25粒子のSEM観察像(上図)。上図の破線で囲った部分の拡大像を下図に示す。

3. 結果と考察

3.1. 粒径分布

AACで分級した粒子をSEMで観察し、それによって得られた個々の粒子の円相当径 d_{PA} に基づき、粒径分布を求めた(図3)。この円相当径に基づく粒径分布は、単

分散分布を示した。 d_{PA} の平均値は、AAC の分級径と異なる値を示した (表 2)。 空気動力学径⁸⁾ は以下の式で表せる。

$$d_a = d_{ve} \sqrt{\frac{\rho_p C_c(d_{ve})}{\chi \rho_0 C_c(d_a)}} \quad (2)$$

ただし、 d_{ve} は等体積球相当径、 ρ_0 は基準密度で 1 g/cm^3 、 ρ_p は粒子密度であり、 χ は動力学的形状係数で球形の場合 1 となる。 ここで、分級した粒子が球形で空隙がないと仮定すると、式 (2) は、 $d_a = d_{PA} \sqrt{\rho_p}$ と表すことができ、 ρ_p に二酸化チタンの真密度 $\rho_{TiO_2} = 4.23 \text{ g/cm}^3$ を代入すると、 $d_a = 400, 600, 800 \text{ nm}$ で分級した試料の円相当径はそれぞれ $d_{PA} = 194, 291, 389 \text{ nm}$ と計算される。 しかし、SEM 観察で求めた円相当径 d_{PA} の中央値はこの値よりも明らかに大きかった。 すなわち、 ρ_p は ρ_{TiO_2} よりも小さいことを意味する。 このことは、凝集粒子に空隙があることから明らかである。 空気動力学径と円相当径の差については、「3.3. 粒子密度の推定」の項で議論する。

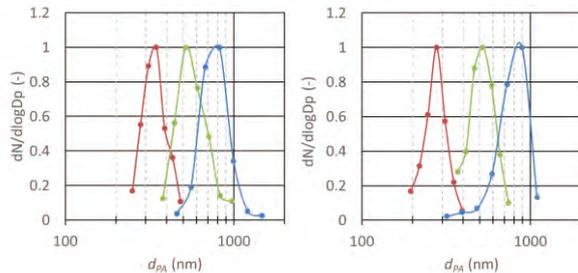


図 3 SEM 観察により得た粒径分布。 赤色： $d_a = 400 \text{ nm}$ 、 緑色： $d_a = 600 \text{ nm}$ 、 青色： $d_a = 800 \text{ nm}$ で分級した粒子。

表 2 粒子形状の実測値及び粒子密度推定値

	d_a (nm)	d_{PA} (nm)	アスペクト比	円形度	d_{ve}' (nm)	ρ_p (g/cm^3)
P25	400	342	1.36	0.53	325	1.08 – 2.16
	600	583	1.38	0.52	552	1.11 – 2.21
	800	788	1.37	0.48	747	1.14 – 2.26
Rutile	400	273	1.39	0.55	260	1.04 – 2.06
	600	510	1.46	0.49	485	1.17 – 2.32
	800	803	1.62	0.38	729	1.33 – 2.64

3.2. 形状の特徴

画像解析で求めたアスペクト比、円形度、絶対最大長について、各粒径で分級した粒子形状の測定結果を図 4 及び表 2 に示す。アスペクト比は、Rutile の方が P25 より

りも高い値を示し、 $d_a = 800 \text{ nm}$ で最も高く平均値 1.6 を示した。 P25 では粒径によらず 1.37 前後の値を示した。 この報告書では考察を控えるが、粒子の凝集は同じ化学物質であっても一次粒径や形状、表面状態によっても左右されるため、製造方法や結晶形が異なる 2 種の材料がこのような差をもたらした可能性がある。

円形度について、各粒径で分級した測定値に着目すると、各分級試料において d_{PA} と円形度は負の相関を示した。 すなわち、 d_{PA} が大きくなるにつれて円形度が小さくなる。 SEM 観察では深さ方向の情報は得られないが、仮に $d_{PA} = d_{ve}$ とすると、 d_{PA} が小さくなるにつれて球形に近づくことを意味する。 動力学的形状係数 χ は球状粒子で 1 であり、複雑な形状 (たとえば軸比が大きい粒子) は大きい χ 値を示す⁸⁾。 式 (2) より χ 値が大きいほど d_{ve} 、したがって d_{PA} が大きくなることを意味するので、実験値は妥当な結果と考えられる。

絶対最大長と円相当径の関係は両対数軸で表し、すべての分級試料をあわせて回帰分析を行った。 両対数軸で表すと非常に良い相関が認められ、円相当径に対する絶対最大長は、P25 及び Rutile でそれぞれ 1.06 乗及び 1.15 乗の関係を示した。 Park ら⁹⁾ がディーゼル排気粒子凝集体を観察した結果も同様に非常に良い相関が見られており 1.26 乗で近似された。 本報告書では詳細は省くが、この値は粒子のフラクタル次元について議論する際に有用なパラメータとなる⁹⁾。

3.2. 粒子密度の推定

本項では、前項までに示した d_{PA} とアスペクト比から、式 (2) にしたがって簡易的な密度の推定を試みた。 なお、不規則形状の粒子の密度推定には球相当径 d_{ve} と動力学的形状係数 χ が既知である必要があるが、本研究ではそれらの値が得られていないため、 d_{ve}' と χ' を次のように仮定して粒子の密度を推定した。 d_{ve}' は d_{PA} とアスペクト比から回転楕円体として求めた。 χ' は、一次粒径約 30 nm のディーゼル排気粒子凝集体の文献値を参考に $\chi' = 1.11 - 2.21$ を用いた⁹⁾。 以上の仮定の下に求めたナノ粒子凝集体の粒子密度の推定値は、 $d_a = 400 \sim 800 \text{ nm}$ のいずれの粒径においても、 $1.0 \sim 2.6 \text{ g/cm}^3$ となった (表 2)。 二酸化チタンの真密度 ($\rho_{TiO_2} = 4.23 \text{ g/cm}^3$) に対して凝集粒子の密度はおおよそ 1/4 ~ 1/2 であることが示唆された。

本研究での粒子密度推定はかなり幅があり今後さらなる検討が必要だと考える。 たとえばエアロゾル静電分級装置 (DMA: Differential Mobility Analyzer) やエアロゾル質量分級装置 (APM: Aerosol Particle Mass analyzer) といった分級装置と組み合わせることで¹⁰⁾、空気動力学的な性状を把握しつつ、より正確で精密な粒子密度推定が可能となると考える。

また、本実験で使用した FE-SEM ではナノ粒子が凝集した状態を詳細に観察できたが、近年普及し始めているより小型で使い勝手の良い卓上 SEM では、ナノ粒子を区別するには分解能が十分でなかった。 それによって

ナノ粒子の凝集体を空隙のない一つの粒子として取り扱ってしまう可能性があるため注意が必要である。今回の二酸化チタン試料の観察では、卓上 SEM の実用的な拡大倍率は最大で約 1 万倍程度であった。

現在、作業環境測定では単一の粒径で分級した粒子(たとえばレスピラブル粒子)についての質量濃度のみ測定するが、リスク評価の観点では空気力学的振舞いや粒子の性状についてより詳しい情報を得る必要があると考える。ここで紹介した粒子密度推定法の精度をさらに高めることで、SEM 観察をベースにした粉じんの質量濃度推定に応用できると考える。また、体内での沈着等の動態を評価する際には、粒径だけでなく形状など包括的な情報が必要になってくることから、SEM 観察による粒子形状評価は必要だと考える。

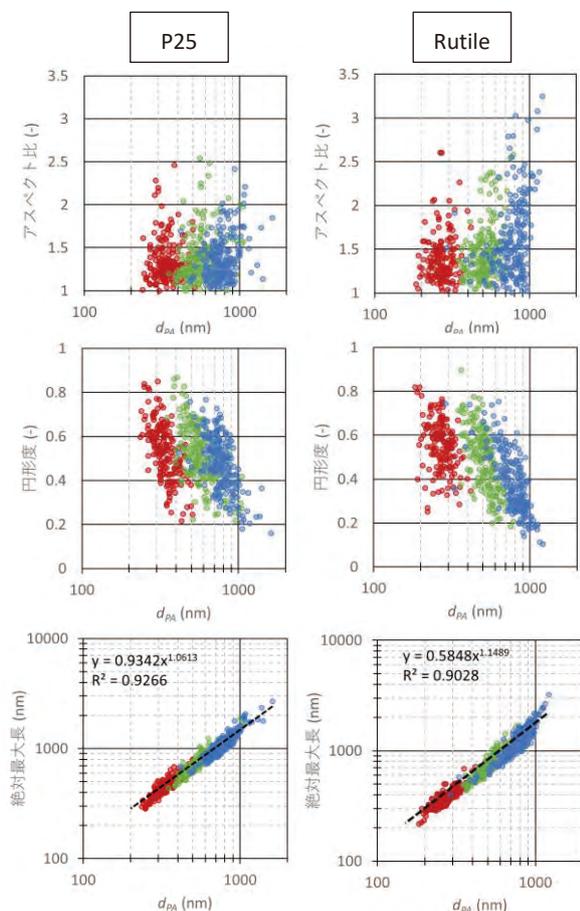


図4 P25 及び Rutile 凝集粒子の形状特徴。(上段)アスペクト比,(中段)円形度,(下段)絶対最大長。赤色: $d_i=400$ nm, 緑色: $d_i=600$ nm, 青色: $d_i=800$ nm で分級した粒子。

4. まとめ

本研究では、AACによりエアロゾルを空気力学径で分級、単分散を生成し、それら粒子をSEMで観察することにより粒子密度を推定する方法を提案した。この実験を通じて、サブミクロンサイズに分級された粒子の形

状的特徴を把握し、粒子密度をおおまかに推定することができた。今後、本研究で推定した粒子密度の正確さを評価するために、異なる原理の分級装置、たとえばDMAやAPMを実験システムに加えて更に検討を進める予定である。

ナノマテリアルの毒性の懸念は現在においても払しょくされておらず国際的にもまだ活発に議論されており、現状においてそのばく露評価法やナノマテリアル粒子のキャラクタリゼーションの研究や規格化が望まれている。一方で産業の副産物としてのナノ粒子、たとえば溶接ヒュームは、国際がん研究機関においてグループ1に分類され、国内においても令和3年4月1日に特定化学物質に指定された。このようにナノ粒子の毒性影響を把握するためには従来の環境測定法に加え、ここでその一端を紹介したように、SEMによる個別粒子分析法を駆使したばく露評価法が今後ますます重要になってくると考える。

謝 辞

本研究で卓上SEMを使用するにあたり熊本県立大学の装置を利用させていただき、同大学の張代州教授、稲村麗美氏には装置使用にあたりご助言ご協力をいただきました。この場を借りて深く御礼申し上げます。

参 考 文 献

- 1) ISO. ISO 7708. Air Quality-Particle size fraction definitions for health-related sampling, 1995.
- 2) Oberdörster, G., Oberdörster, E., Oberdörster. An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.* 2005; 113: 823-839.
- 3) Maynard, A.D., Baron, P.A., Foley, M., Shvedova, A.A., Kisin, E.R., Castranova, V. Exposure to carbon nanotube material: aerosol release during the handling of unrefined single-walled carbon nanotube material. *J. Toxicol. Environ. Health A*, 2004; 67: 87-107.
- 4) Ogura, I., Sakurai, H., Gamo, M. Dustiness testing of engineered nanomaterials. *J. Physics: Conference Series*. 2009; 170: 012003.
- 5) 山田 丸, 鷹屋光俊, 小倉 勇. ナノマテリアルの作業環境測定法評価のための簡易な多分散連続発生法の検討. *労働安全衛生研究*. 2014; 7: 31-38.
- 6) Tavakoli, F., Olfert, J.S. An instrument for the classification of aerosols by particle relaxation time: Theoretical models of the aerodynamic aerosol classifier. *Aerosol Sci. Technol.* 2013; 47: 916-926.
- 7) Tavakoli, F., Symonds, J. P. R., Olfert, J.S. Generation of a monodisperse size-classified aerosol independent of particle charge. *Aerosol Sci. Technol.* 2014; 48: i-iv.
- 8) Hinds, W.C., *Aerosol technology: Properties, behavior, and measurement of airborne particles*, 2nd ed. New York, NY: Wiley-Interscience: 1999: 42-74.

- 9) Park, K., Kittelson, D. B., McMurry, P. H. Structural properties of diesel exhaust particles measured by transmission electron microscopy (TEM): Relationships to particle mass and mobility. *Aerosol Sci. Technol.* 2004; 38: 881-889.
- 10) Kim, S.C., Wang, J., Emery, M.S., Shin, W.G., Mulholland, G.W., Pui, D.Y.H. Structural property effect of nanoparticle agglomerates on particle penetration through fibrous filter. *Aerosol Sci. Technol.* 2009; 43: 344-355.