

NEDOプロジェクト 「ナノ粒子特性評価手法の研究開発」 の概要紹介

NEDO-産総研-OECD合同国際シンポジウム
「工業ナノ材料のリスク評価」
4/23 ニッショーホール（虎ノ門）
ダイジェスト

（独）産業技術総合研究所
安全科学研究部門

蒲生昌志

NEDO プロジェクト

－ナノ粒子の特性評価手法の研究開発－

- ◆ 2006年6月～2011年3月
- ◆ 約20億円（5年間）

＜先行研究プロジェクト＞

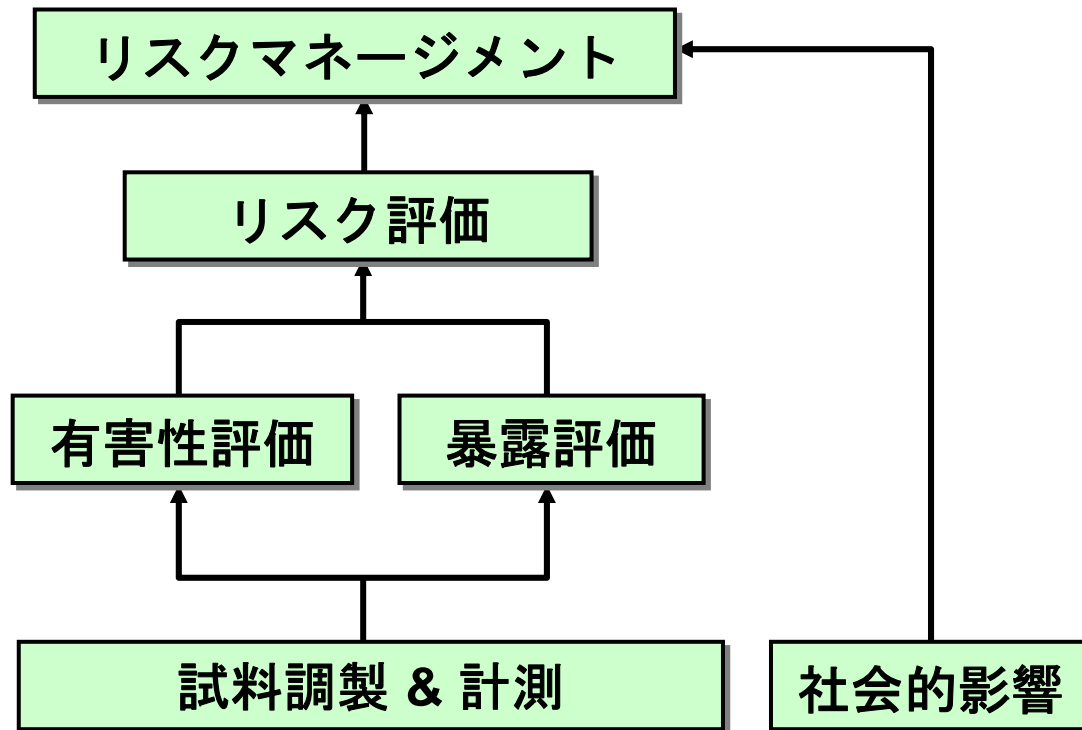
- ・ NEDO：奥山喜久夫「ナノ粒子の吸入暴露による生体影響評価の予備的試験に関する調査研究」（05）
- ・ 産総研：中西準子「新技術のリスク評価・リスク管理手法の研究－ナノテクノロジーのケース研究」（05～07）
- ・ 経産省基準認証：中西準子「ナノ粒子の安全性評価方法の標準化」（05～07）

NEDO: 新エネルギー・産業技術総合開発機構

中西準子 (2008)

プロジェクトの全体像

フレームワーク

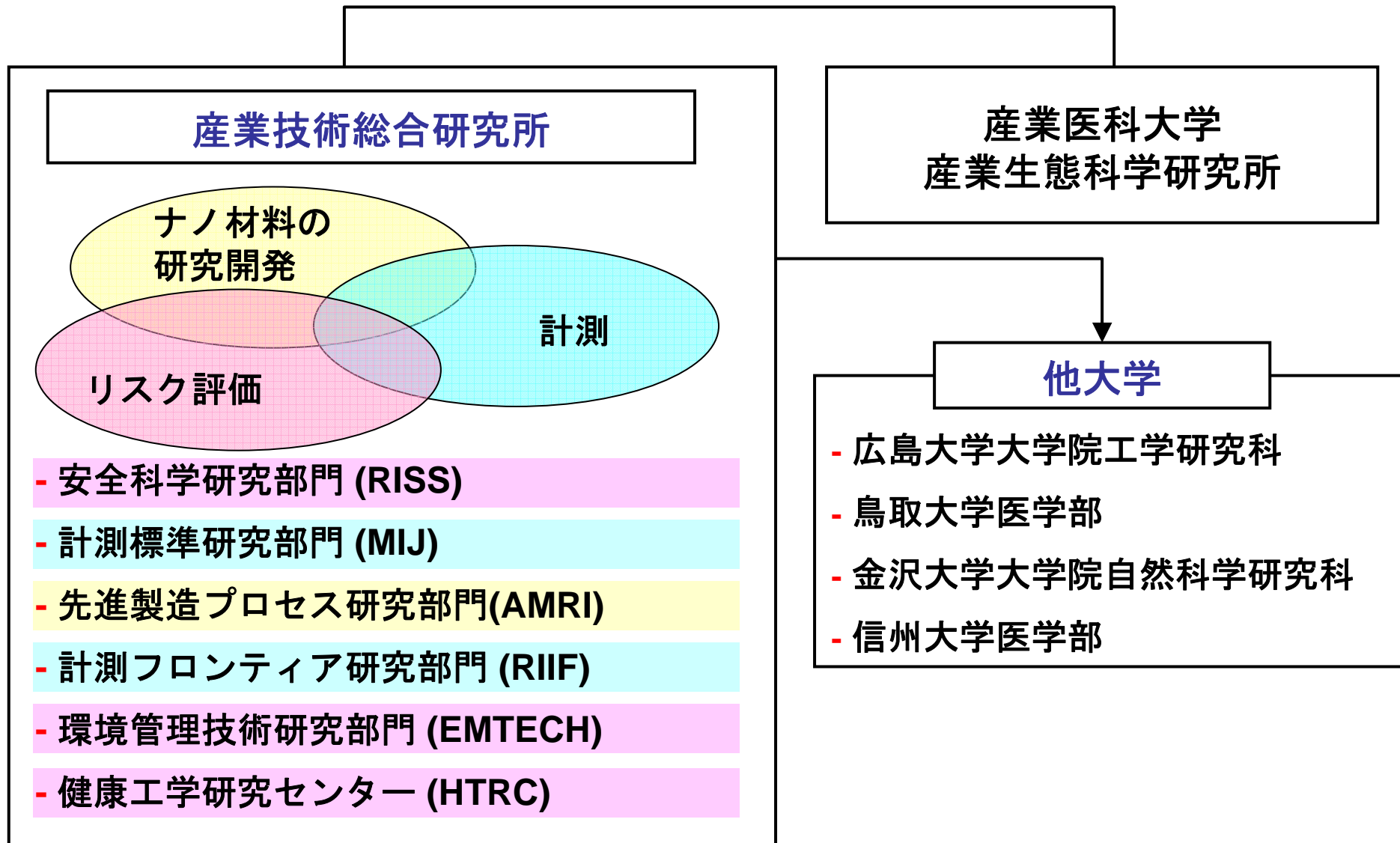


アウトプット、アウトカム

- ・ 規制の枠組みに関するガイダンスの策定
- ・ フラーレン、カーボンナノチューブ、二酸化チタンのリスク評価書作成
- ・ 有害性試験のためのプロトコルの作成
- ・ 試験試料調製のためのマニュアル策定
- ・ 計測方法のマニュアル策定と標準化

中西 準子(2006)

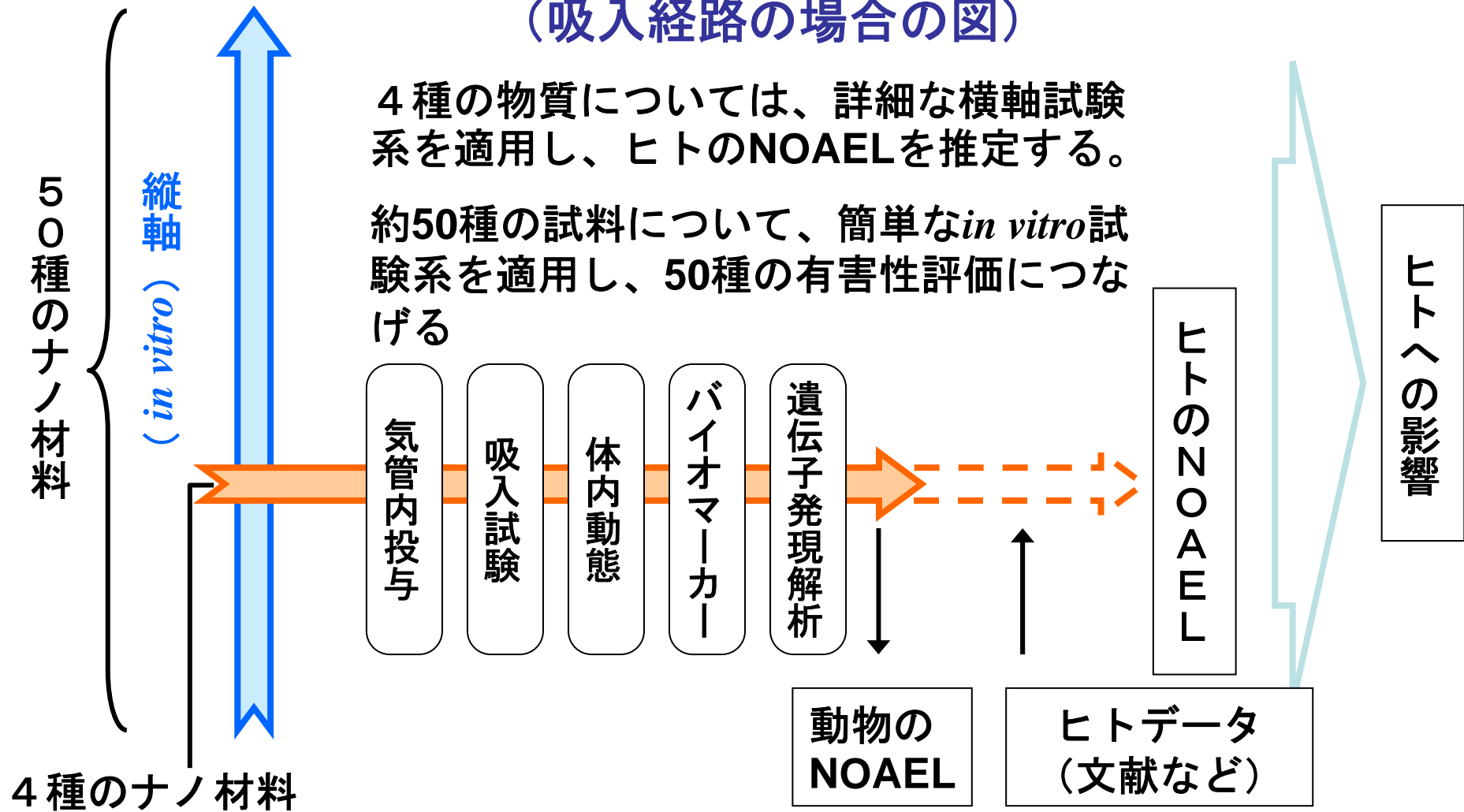
参加組織



中西準子 (2006)

二軸アプローチ：有害性試験の基本方針

(吸入経路の場合の図)



横軸 (in vivo 試験系)

中西準子 (2008)

液中分散試料

- in vitro試験
- 気管内注入試験



気中分散試料

- 吸入暴露試験

安定したナノ粒子分散試料 (無機化合物－ *in vivo* 試験)

物質名 (記号)		NiO (A)	TiO ₂ (ST01) Anatase	TiO ₂ (ST21) Anatase	TiO ₂ (ST41) Anatase	TiO ₂ (ST01) Anatase		
BET表面積 (m ² /g)		105	316	66	10	316		
平均 粒 径 (nm)	一次粒子	20	5	23	154	5		
	二次粒子 (液中)	26	19	28	176	18	65	300
	二次粒子 (氣中)	59	-	-	-	-		
分散剤		なし	DSP	DSP	DSP	DSP		
試 験	気管内投与	○	○	○	○	○		
	吸入	○	なし	なし	なし	なし		

DSP: リン酸二ナトリウム, ○ : 試験中

中西準子 (2008)

安定したナノ粒子分散試料 (炭素系 - *in vivo*試験)

物質名 (記号)		C60 (SU)	MWCNT	SWCNT
BET表面積 (m ² /g)		0.92	9	878
平均 粒 径 (nm)	一次粒子	-	32	3 *1)
	二次粒子 (液中)	26	(500?)	13 *2)
	二次粒子 (氣中)	約100	180 *3)	-
分散剤		Tween80	Triton100X	Tween80
試 験	気管内投与	○	準備中	○
	吸入	○	準備中	-

*1) 長さ1mm以下, *2) 長さ420nm, *3) 長さ4.5 μm以下,

C60: フラーレン, MWCNT: 多層カーボンナノチューブ, SWCNT: 単層カーボンナノチューブ,

○ : 試験中

中西準子 (2008)

TiO₂粒子の調製（異なる1次粒径）

試料名	一次粒径	液中での粒径分布	TEM画像	BET表面積
Ultra Fine (UF)	5 nm	<p>中央値: 19 nm</p>	<p>50 nm</p>	316 m ² /g
Super Fine (SF)	23 nm	<p>中央値: 28 nm</p>	<p>100 nm</p>	66 m ² /g
Fine (F)	154 nm	<p>中央値: 176 nm</p>	<p>200 nm</p>	10 m ² /g

試料調製とキャラクタリゼーション全般: 遠藤茂寿・丸順子, TEM画像: 山本和弘

小林憲弘 (2008)

TiO₂粒子の調製（同じ1次粒径、異なる二次粒径）

試料名	一次粒径	液中での粒径分布	TEM画像	BET表面積
Ultra Fine-1 (UF-1)	5 nm			316 m ² /g
Ultra Fine-2 (UF-2)	5 nm			316 m ² /g
Ultra Fine-3 (UF-3)	5 nm			316 m ² /g

試料調製とキャラクタリゼーション全般: 遠藤茂寿・丸順子, TEM画像: 山本和弘

小林憲弘 (2008)

液中分散試料

- *in vitro*試験
- 気管内注入試験



気中分散試料

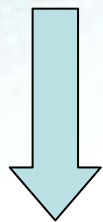
- 吸入暴露試験

*in vitro*実験で用いたナノ粒子金属酸化物

酸化ニッケル(黒色・緑色) (NiO)
二酸化チタン (TiO₂)
酸化セリウム (CeO₂)
二酸化ケイ素 (SiO₂)
酸化アルミニウム (Al₂O₃)
酸化鉄(III) (Fe₂O₃)

主な用途

電子部品・ガラス着色
顔料・化粧品・
燃料添加剤・研磨剤・
触媒担体



超微細粒子



微粒子

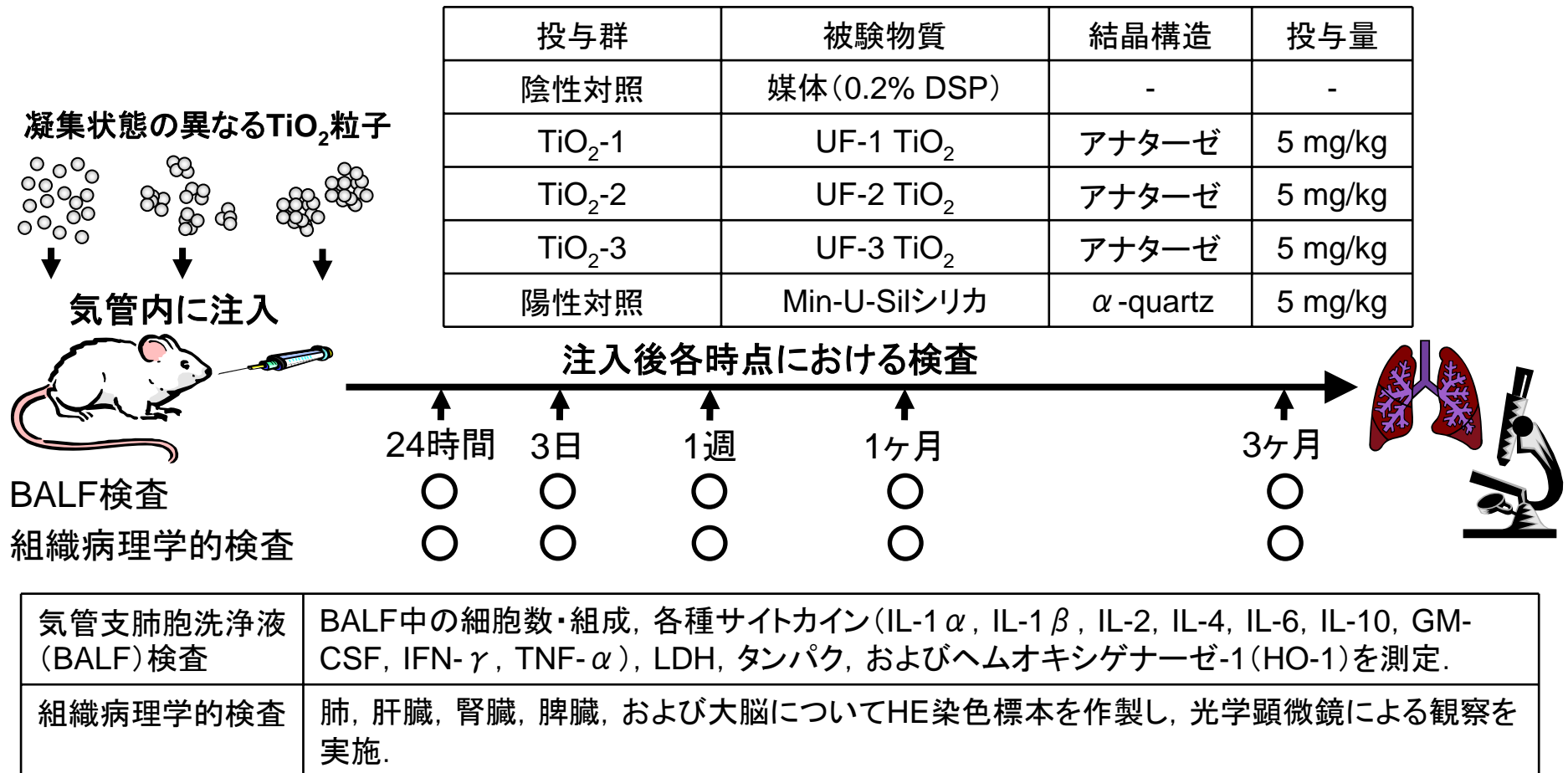
一次粒子径: < 100 nm

一次粒子径: 150 ~ 5000 nm

細胞応答

細胞: HaCaT ヒト表皮角化細胞由来
A549 ヒト肺がん由来

気管内注入試験（異なる二次粒径のTiO₂）



- 雄性Crl:CD (SD)ラットの気管内に, 凝集状態の異なる3種類のTiO₂粒子を5 mg/kg注入. 各群各時点につき5匹を検査.
- 気管支肺胞洗浄液 (BALF) および各組織の組織病理学的検査を, 投与後24時間, 3日, 1週, および1ヶ月時点において実施.

小林憲弘 (2008)

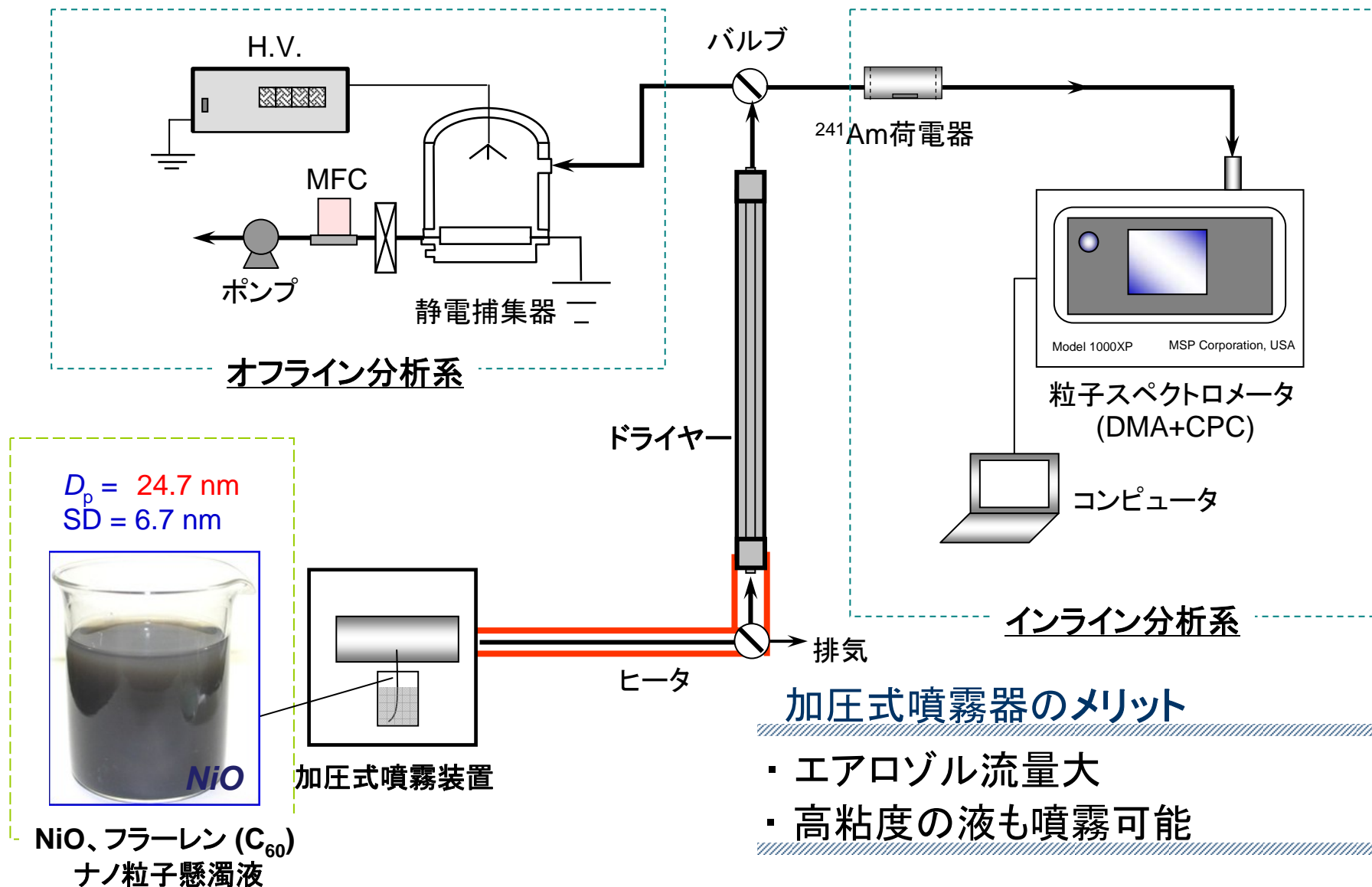
液中分散試料

- in vitro試験
- 気管内注入試験



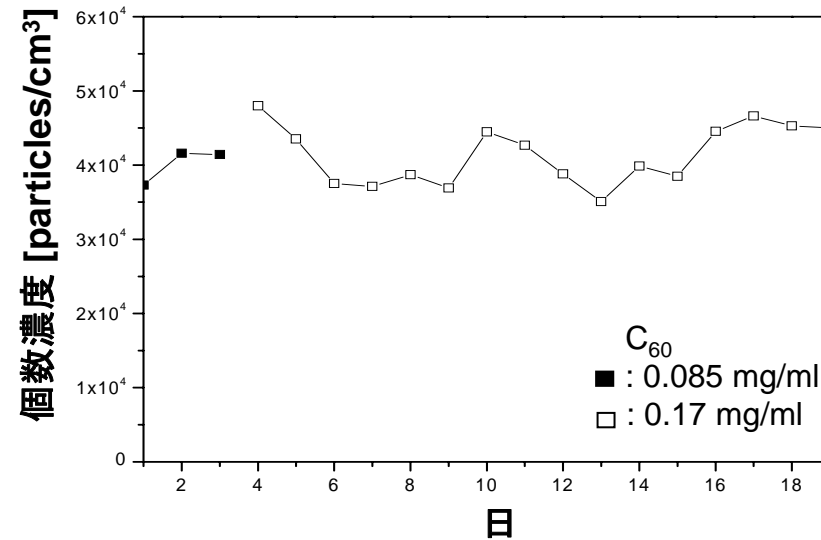
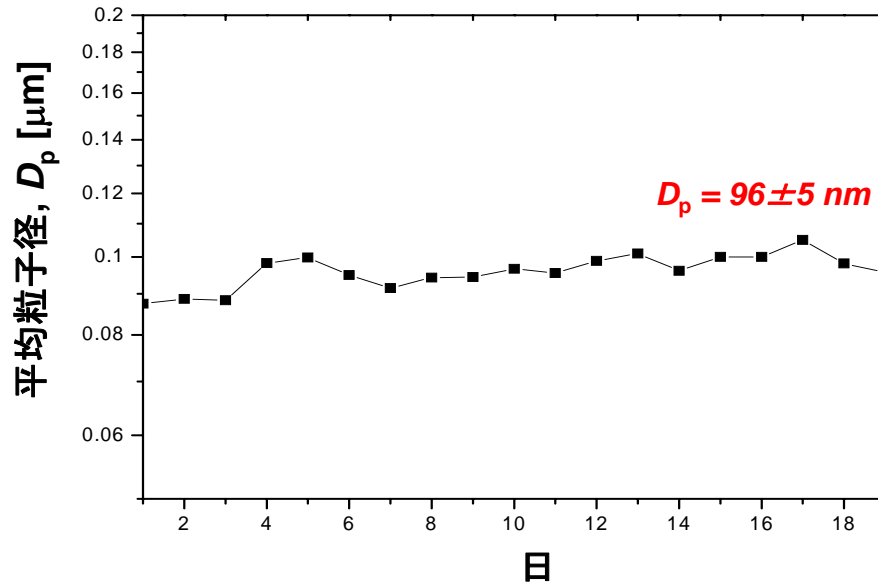
気中分散試料

- 吸入暴露試験



4週間の安定性(全身曝露、C₆₀)

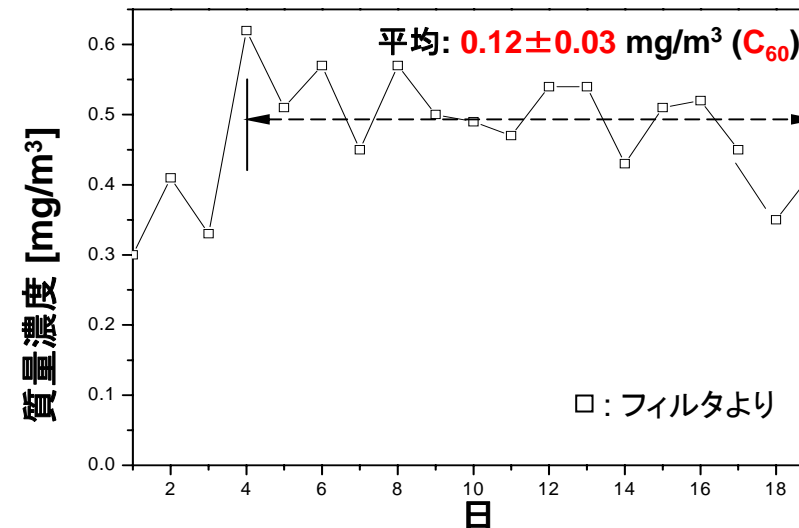
島田学 (2008)



4週間における粒子性状

C ₆₀ 濃度 [mg/ml] ¹⁾	平均粒子径 [μm]	個数濃度 [particles/cm ³]	標準偏差 [particles/cm ³]
0.085 ²⁾	88	4.0×10^4	2.4×10^3
0.17 ³⁾	98	4.1×10^4	4.0×10^3

1) $W_{C60} \cdot W_{Dispersant} \sim 1:3$; 2) 最初の3日間; 3) 残りの日



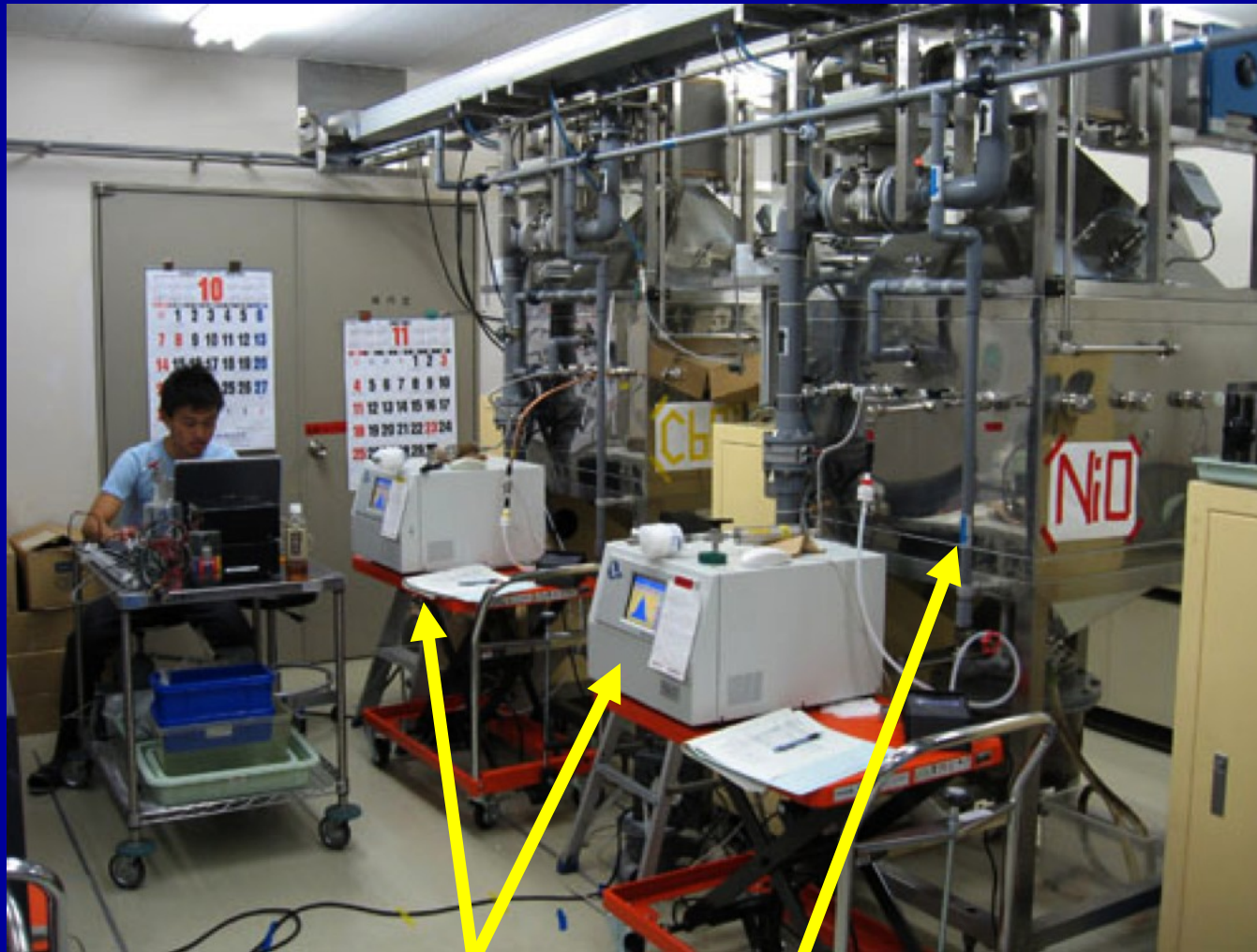
安定したサイズと濃度のC₆₀粒子を、4週間にわたってチャンバーの中に供給できた

液中分散試料
- in vitro試験
- 気管内注入試験



気中分散試料
- 吸入暴露試験

加圧式発生装置による吸入曝露試験



測定器
(WPS)

曝露チャンバー

広島大学との共同研究

森本泰夫 (2008)



吸入曝露条件

フラーレン :

平均曝露濃度

0.5 ± 0.1 mg/m³ (Tweenを含む濃度) フィルタ捕集

0.12 mg/m³ (Tweenを含まない濃度)

4.1 × 10⁴ particles/cm³ WPS(SMPS)

幾何平均径

96 nm

酸化ニッケル :

平均曝露濃度

0.2 ± 0.1 mg/m³ フィルタ捕集

9.2 × 10⁴ particles/cm³ WPS(SMPS)

幾何平均径

59 nm



吸入曝露試験のデザイン

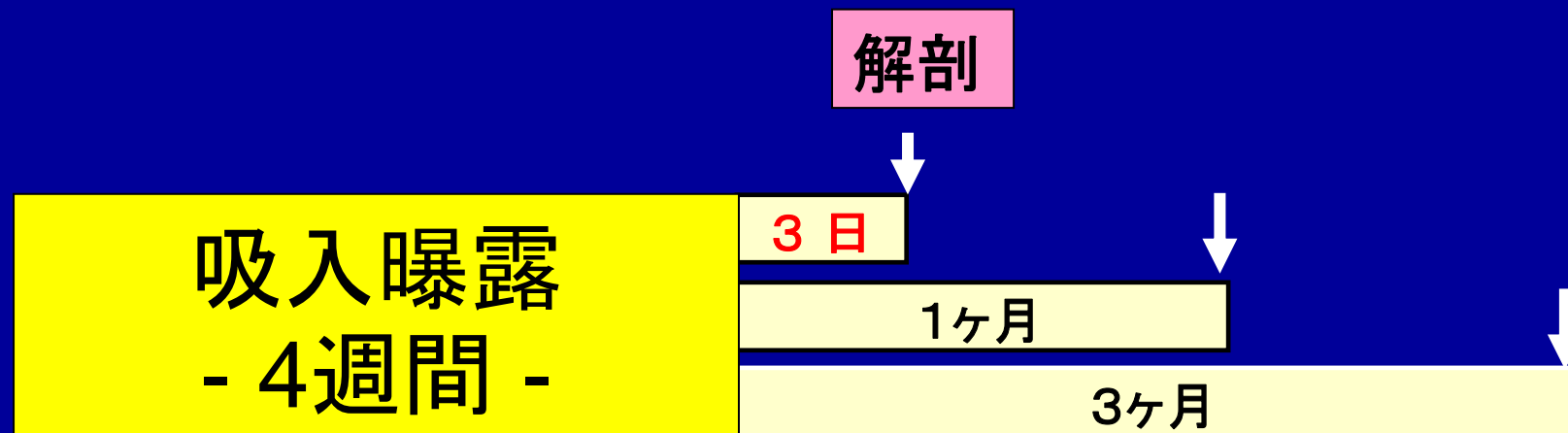
対象動物 : Wistar系雄性ラット

非曝露群 40匹

フラーレン曝露群 40匹

酸化ニッケル曝露群 40匹

曝露期間 : 1日6時間, 週5日間, 4週間



観察期間

森本泰夫 (2008)



観察項目

- 1 肺湿重量
- 2 気管支肺胞洗浄液（炎症）
- 3 血液（炎症）
- 4 酸化ストレス関連遺伝子
- 5 肺病理
- 6 その他の臓器等の所見



生物試料中のカーボン系ナノ材料の 電子顕微鏡による観察

MWCNT @ Macrophages



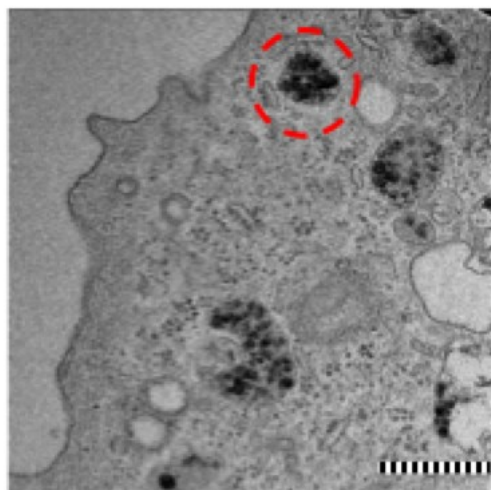
Zero loss image

10 nm

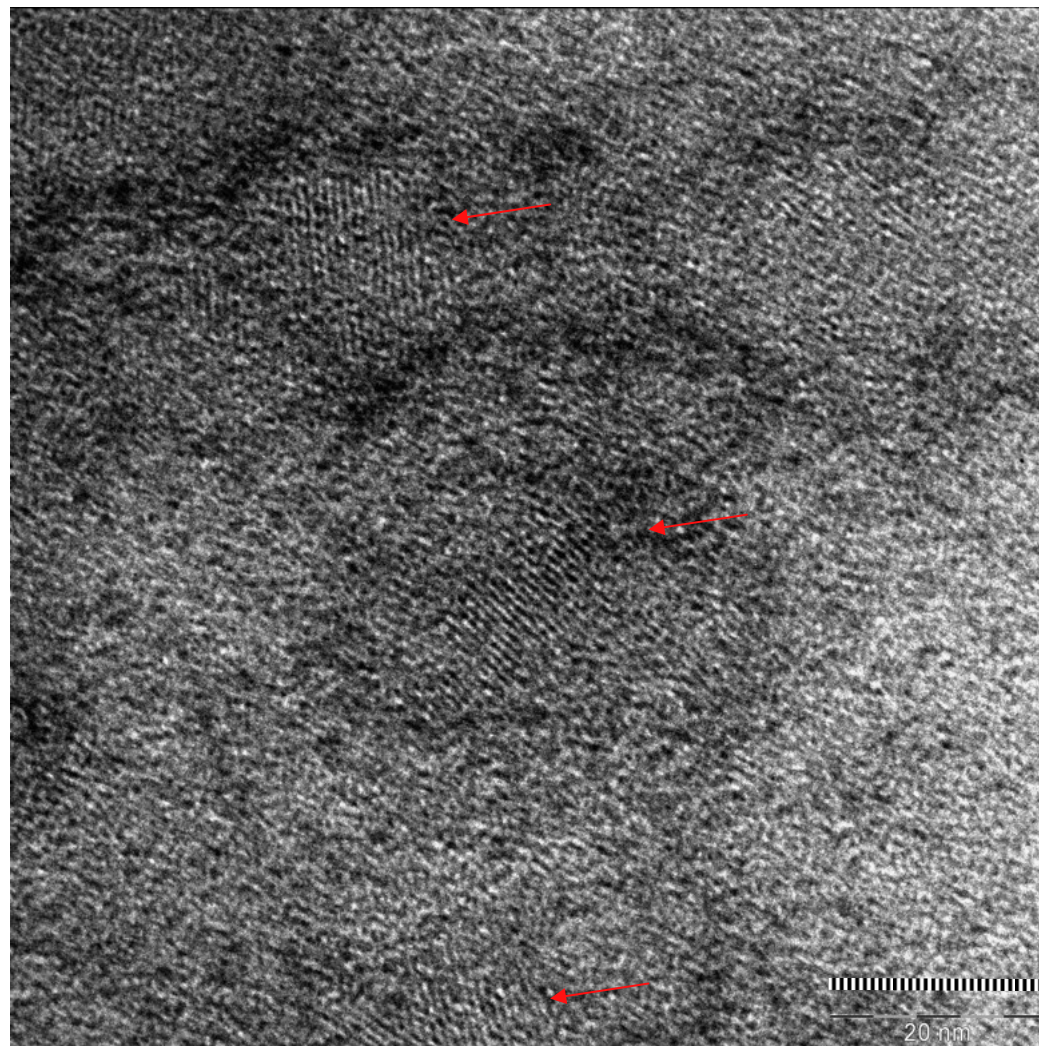
山本和弘(2008)

C₆₀ 200 μg 投与 1 週間
(気管内注入試験)

肺胞マクロファージ



500nm



20nm

山本和弘(2008)

まとめ

二軸アプローチ

- 少数の代表的材料について吸入試験
- 多くの物質について *in vitro* 試験

調整とキャラクタライズ