

# 研究開発項目① 「工業ナノ粒子のキャラクタリゼーション手法の開発」

## 実施体制

(独)産業技術総合研究所 環境管理技術研究部門  
ナノシステム研究部門  
計測標準研究部門  
先端製造プロセス研究部門  
計測フロンティア研究部門

国立大学法人北海道大学 大学院  
国立大学法人金沢大学 大学院  
国立大学法人広島大学 大学院

# 研究開発項目①の事業原簿対応と目標達成状況

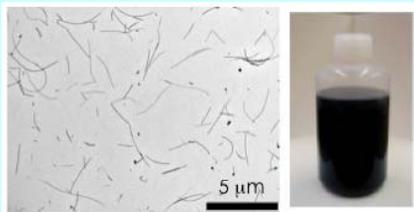
公開

研究開発項目①	目標	達成度
工業ナノ粒子のキャラクタリゼーション手法の開発	<p>下記の技術ならびに手法を開発し、暴露解析用データ取得試験・有害性評価試験等のための手順書を取りまとめて公開する。</p> <ul style="list-style-type: none"><li>・気相及び液相中における工業ナノ粒子の粒径、個数濃度その他の特性を精度良く再現性をもって計測する技術</li><li>・気相中工業ナノ粒子の材質や形質等を計測・特定する手法</li><li>・生体試料中における工業ナノ粒子の形状、サイズ等を電子顕微鏡の画像解析等から統計的に解析する技術</li></ul> <p>なお、測定精度は、10nm～100nmの工業ナノ粒子について、気相中では粒径10%、個数濃度20%を、液相中では粒径25%、個数濃度50%を目標とし、その他の特性については実用的かつ国際的水準に見合うこととする。</p>	○

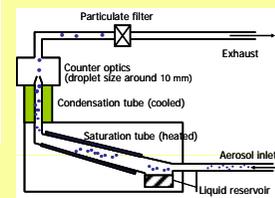
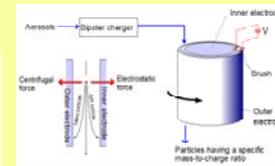
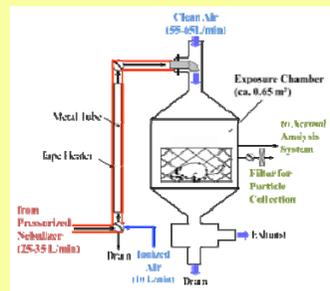
# 本報告会での分類

研究開発項目		実施機関	
①工業ナノ粒子のキャラクタリゼーション手法の開発	(1)工業ナノ粒子の調製技術の開発	ア) 気中分散系調製技術開発	広島大学 大学院 工学研究院
		イ) 液中分散系調製技術開発	産総研-環境管理技術研究部門 産総研-ナノシステム研究部門 北海道大学 大学院 地球環境科学院
		ウ) 工業ナノ粒子のフィルタ捕集効率の評価手法の開発と評価	金沢大学 大学院自然科学研究科
	(2)媒体中における工業ナノ粒子のキャラクタリゼーション手法の開発	ア) 気中粒子計測技術開発	産総研-計測標準研究部門 産総研-先進製造プロセス研究部門 金沢大学 大学院自然科学研究科
		イ) 液中粒子計測技術開発	産総研-計測標準研究部門
		ウ) 電子顕微鏡によるナノ粒子のキャラクタリゼーション技術開発	産総研-計測フロンティア研究部門
		エ) 微量試料に対する化学分析技術開発とナノ粒子の体内分布の測定	産総研-環境管理技術研究部門

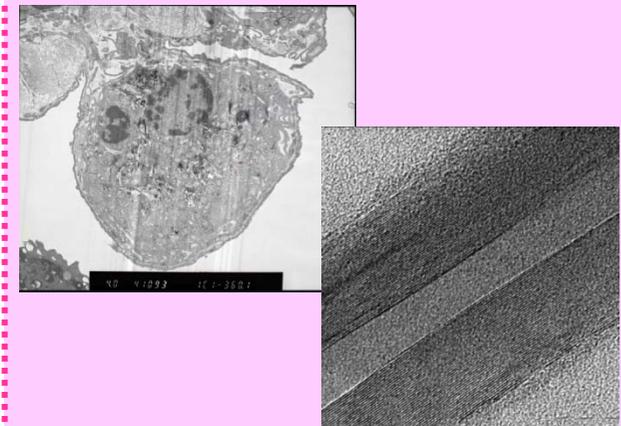
## 液中ナノ粒子の分散調製とキャラクタリゼーション



## 気中ナノ粒子の分散調製とキャラクタリゼーション



## 生体中ナノ粒子のキャラクタリゼーション



# 研究開発項目① 「工業ナノ粒子のキャラクタリゼーション手法の開発」

タイトル「液中ナノ粒子の分散調製とキャラクタリゼーション」

## 実施体制

(独)産業技術総合研究所 環境管理技術研究部門  
ナノシステム研究部門  
計測標準研究部門

国立大学法人北海道大学 大学院

## 紹介する項目の目標達成状況

研究開発項目	目標	達成度
(1-イa) 液中分散系調製技術開発(分散手法の検討)	工業ナノ粒子の暴露解析や有害性評価試験に必要なナノ粒子の粒径を揃える分級技術、液相中へ分散技術を開発し、有害性評価試験等のための試料調製手順書を取りまとめて公開する。	○
(1-イb) 液中分散系調製技術開発(分散剤の検討)	寸法または形状を一定の範囲に調整した安定な液中分散系を機械的に調製する方法を確立する。最適な分散剤とその添加法を確立することを目的として研究を行う。	○
(2-イ) 液中粒子計測技術	実用的な計測技術を用いて液相中における工業ナノ粒子の粒径、個数濃度その他の特性を精度良く再現性をもって計測する技術を開発し、手順書を取りまとめて公開する。測定精度は、10 nm～100 nm の工業ナノ粒子について、液相中では粒径25%、個数濃度50%を目標とし、その他の特性については実用的かつ国際的水準に見合うこととする。	○

## 開発のねらい(液中ナノ粒子の分散調製)

---

- 工業用ナノ粒子の有害性試験における再現性や信頼性を確保するためには、サイズと形状が十分に制御されていることが必須である。
- ナノ粒子は容易に凝集体を形成することから、系に応じた適切な手法による分散法・分散剤の選択と分散相の安定化を図ることが必要である。
- このような課題を解決し、分散調製手順書を一般公開することで、分散の不得手な研究者が実施しても、安定な分散液を作製可能な手法を提供する。

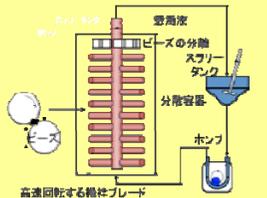
- 工業ナノ粒子の有害性試験における再現性や信頼性を確保するためには、液中分散液におけるナノ粒子の物理化学特性が精確に評価されていることが必要である。
- しかし、液中分散粒子の粒子径計測の信頼性は未確立であり、計測法や解析法により異なる平均粒径値が出て混乱する。
- このような課題を解決するために、計測手順書を一般公開することで、計測になじみがない研究者が使用しても、一定の信頼基準で計測可能な測定手順を提供する。

# 開発の流れと戦略

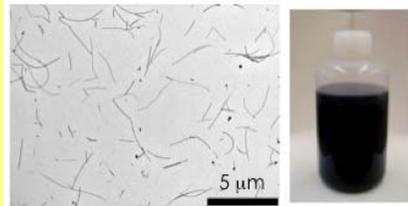
## 戦略1 (第一段階): 安定な分散液の調製と評価手法の開発

### ○分散調製技術の開発

酸化金属・フラーレン  
: ビーズミル等で粉碎

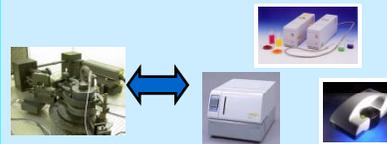


CNT  
: 超音波・水飴法等で切断



### ○計測技術の開発

動的光散乱等  
: 各汎用装置の測定  
手法開発と精度評価



流動場分離法等  
: ナノ材料  
に吸着する  
分散剤量  
の評価

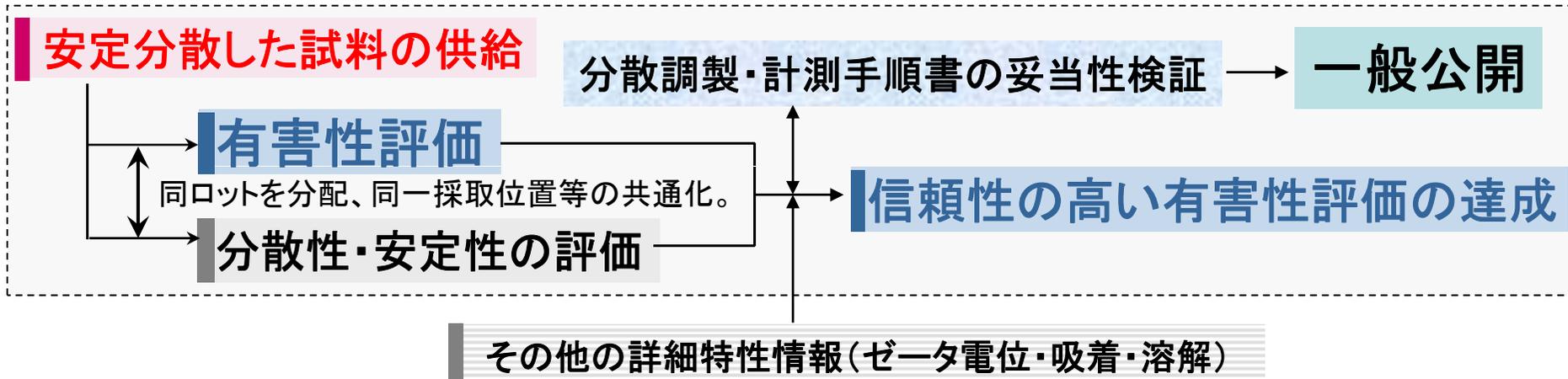


分散調製手順書

計測手順書

毒性評価に関する  
詳細特性情報

## 戦略2 (第二段階): 計測と有害性評価の同期実験によるナノ毒性評価



## 液中ナノ粒子の分散調製技術の開発 1

## In vivo用ナノ粒子懸濁液の調製方法と主な特性

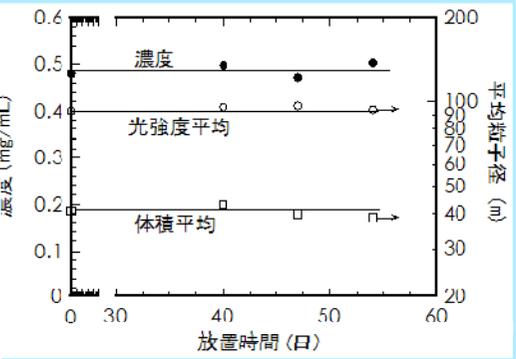
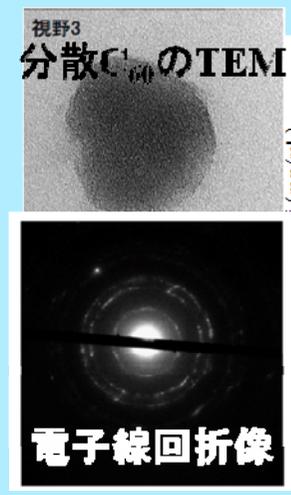
	NiO-B	TiO <sub>2</sub>	C <sub>60</sub>	MWNTs N, M, S	SWNTs N
比表面積 m <sup>2</sup> /g	104.6	316, 66	0.92	77.0, 23.0, 12.7	430.7
分散前の粒径 ・状態	凝集状態	凝集状態	結晶体	ミリサイズの凝集体	ミリサイズの凝集体
液中分散方法	超音波	ビーズミル	ビーズミル	固化粉碎法 超音波	粉碎法 超音波
分散媒	水	水	水	水, PBS	水
分散剤	なし	DSP	Tween 80	Triton X100 Tween 80	Triton X100
粒子径調整	遠心分離, ろ過	遠心分離	遠心分離	遠心分離, ろ過	遠心分離
懸濁粒子濃度			0.5 mg/mL	1 mg/mL	1 mg/mL
分散液中 粒子径及び CNT長さ/mm	体積平均径 20-30 nm	体積基準50%径 18-22 nm 25-30 nm	体積基準50%径 20-32 nm	幾何平均(個数) N: 1.38(固化粉碎) N: 4.4(超音波) M: 3.5, S: 4.1	幾何平均(個数) 0.6
気管内注入試験	○	○	○	○	○
吸入暴露試験	○	なし	○	○(Nのみ)	○

# 液中ナノ粒子の分散調製技術の開発 2

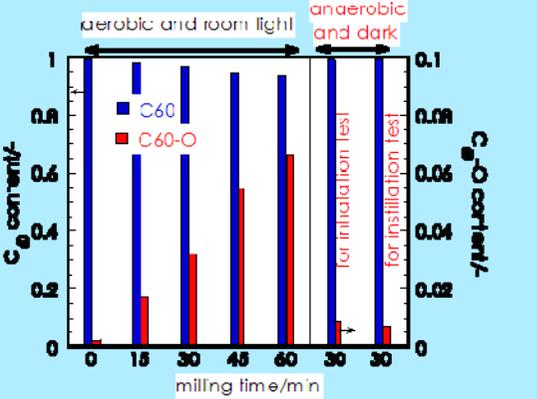
調製された  
ナノ粒子液相分散系



C60                      MWCNT



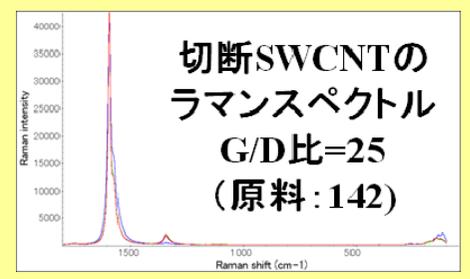
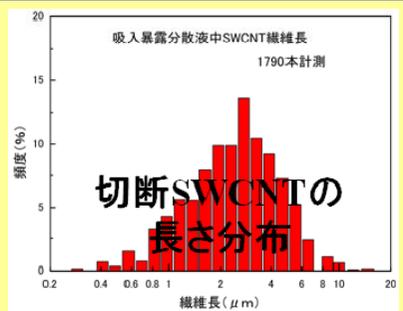
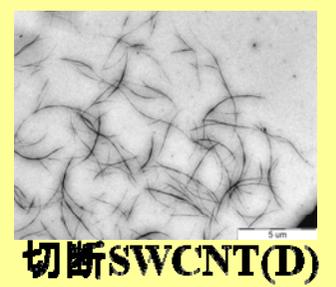
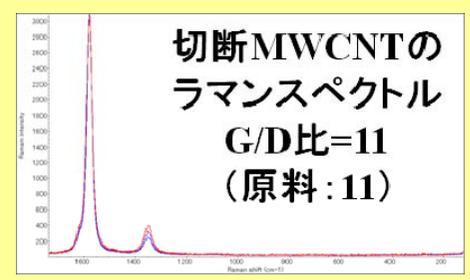
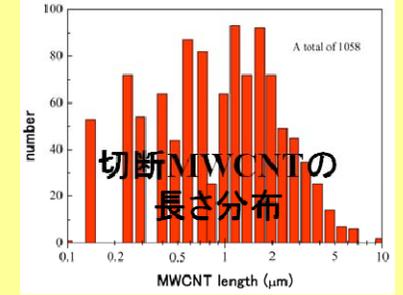
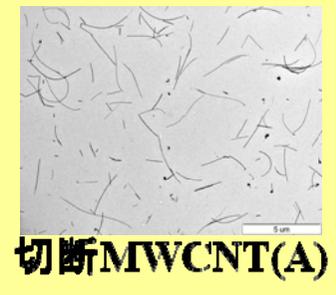
分散C<sub>60</sub>の安定性



C<sub>60</sub>の酸化抑制

分散系の評価

粒子径: DLS  
長さ: TEM, SEM  
分散状態: TEM, SEM  
安定性評価: DLS  
粒子濃度: UV, HPLC  
構造: XRD, ラマン  
不純物: XRF, TGA

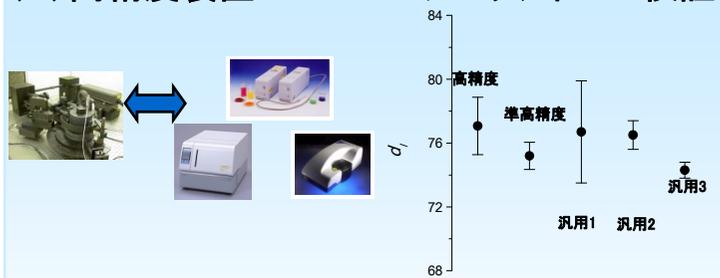


# 液中ナノ粒子計測技術の開発1（液中粒子計測プロトコル）

公開

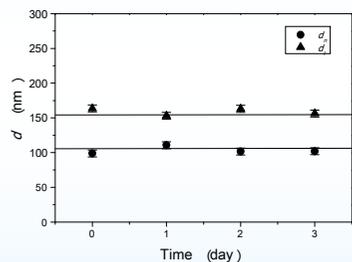
## DLSによる液中粒径計測プロトコルの開発

### (1) 高精度装置とのトレーサビリティの検証

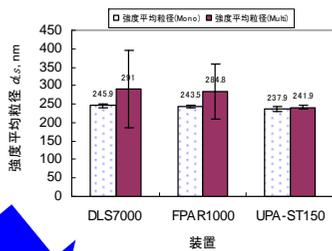


### (2) 有害性評価に適合した測定プロトコルの確立

#### ① 分散安定性評価



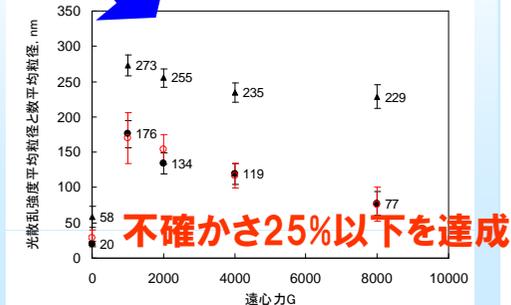
#### ② 異なるDLS装置による測定値の比較評価



#### ③ 異なる解析法による測定値の比較評価

#### ④ 有害性評価と粒径計測の同期の必要性

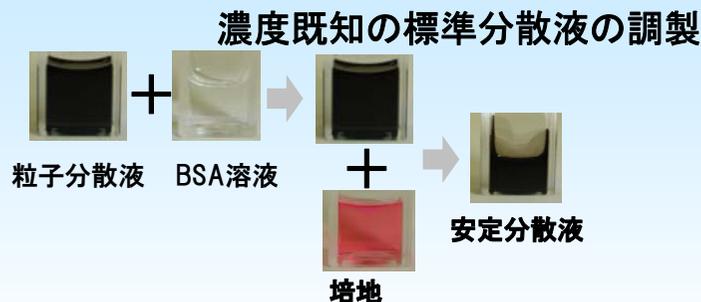
#### ⑤ 光強度平均粒径の有害性評価に対する有効性評価



計測手順書  
(一般公開)

## ナノ炭素粒子の濃度計測プロトコルの開発

### (1) 培地中に安定分散させる技術の開発:



### (2) 標準分散液による濃度検量線作成法の開発



#### 検証①

全有機炭素計測・秤量法とのクロスチェックによる吸光光度法の妥当性検証

#### 検証②

不確かさ要素抽出による当測定法による評価値の不確かさ評価

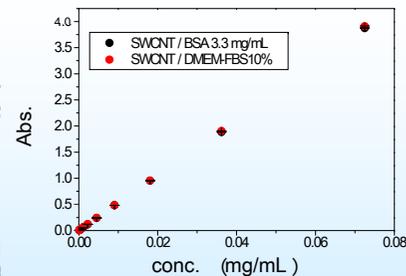


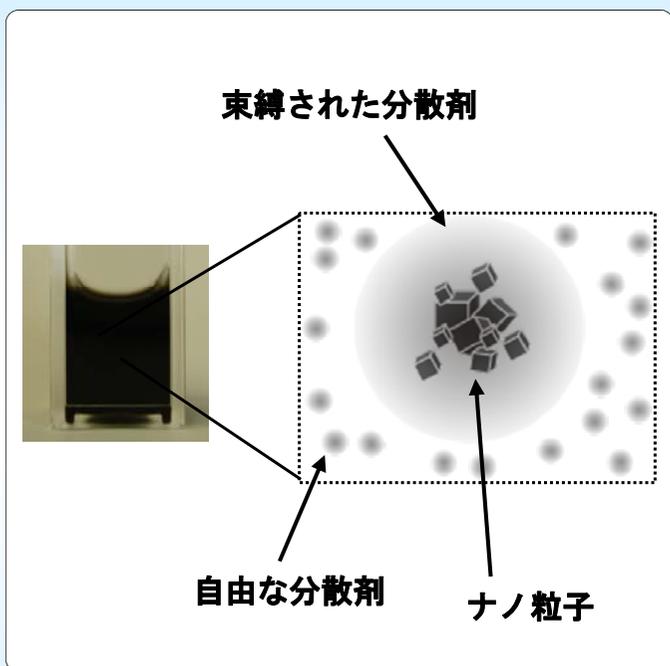
図. SWCNTにおける濃度検量線の例

例として、SWCNT分散液での測定値の合成拡張不確かさは3.4%で目標値の50%以下を達成。

# 液中ナノ粒子計測技術の開発 2

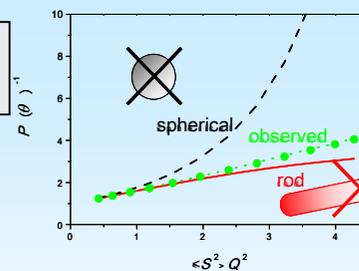
## その他の液中ナノ粒子特性情報の計測技術の開発

分散液のイメージ



(a) 静的光散乱 SLS

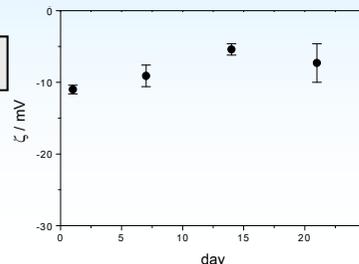
液中ナノ粒子凝集体の形状評価



形状と有害性の相関を議論できるようになる。

(b) ゼータ電位

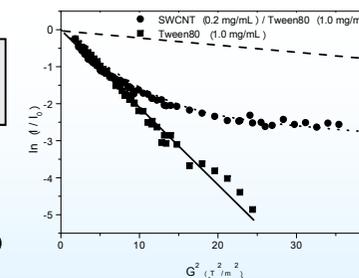
ゼータ電位が小さく、静電斥力以外の力が働く。



物理化学的な解釈  
分散性の改善  
細胞との相互作用

(c) パルス磁場勾配NMR

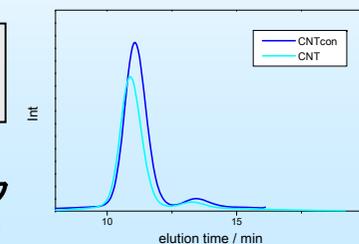
CNTに束縛されたTween80の割合が全体の12%



分散液中の低分子界面活性剤の影響を定量的に評価できるようになる。

(d) 流動場分離法

CNTに束縛されていないタンパク質の割合を定量



分散液中の高分子分散剤の影響を定量的に評価できる。

# 成果の意義

公開

成 果	意 義
工業用ナノ材料の分散調製・計測手順書の公開	標準的な安全性試験手法に付随する詳細な分散調製・計測手順書の公開は世界初
OECD/工業ナノ材料作業部会へのSWCNTプリンシパル試料の分散手順の情報提供	日本からの情報発信・技術の普及に貢献

# 成果の普及と実用化の見通し

