

# 研究開発項目②-1-1 「ナノ材料簡易自主安全管理 技術の確立」

**発表者：SPL 本田一匡**

(TASC[産業技術総合研究所、東レ株式会社]、  
産業医科大学、岡山大学、大阪大学)

## 成果目標とサブテーマの構成

### 目標

CNT等のナノ材料の製品開発と**並行して**安全性や暴露量を把握できる簡便迅速な評価技術の開発と自主安全管理の支援

2.1.1.1 簡易で迅速な有害  
性評価手法の開発  
**安全性試験手順書**

TASC(産総研)  
産業医科大学

2.1.1.2 安価で簡便な暴露評  
価手法の開発  
**作業環境計測の手引き**

TASC(産総研)  
大阪大学  
岡山大学

2.1.1.3 国際動向の把握と  
国際標準化への取り組み

TASC(産総研)

2.1.2 自主安全管理のための  
安全性情報の提供と技術普及活動  
**ケーススタディ報告書**

TASC(産総研、東レ)

## 研究開発項目

2.1.1 : 自主安全管理のためのCNT等ナノ材料の安価かつ簡便な評価手法の確立

評価技術

2.1.1.1 : 簡易で迅速な有害性評価手法の開発(a)

2.1.1.2 : 安価で簡便な暴露評価手法の開発(b)

動向調査  
国際展開

2.1.1.3 : 国際動向の把握と自主安全評価技術の適用(c)

技術普及

2.1.2 : CNT等ナノ材料の安価かつ簡便な自主安全管理手法のためのケーススタディの実施(d)

(a)～(d)は、基本計画中の最終目標②-1-1(1)及び(2)における項目立て

# ナノ材料簡易自主安全管理技術の確立

## 最終目標に対する達成度

テーマ	最終目標	進捗状況	達成度
2.1.1.1	a. 動物実験に依存しない有害性評価手法(簡易手法)を開発した上で、最低限必要な試験項目や試験系を設定し、評価手法を確立する	<ul style="list-style-type: none"> <li>・培養細胞に影響を与えない分散調製方法を用いた迅速簡易な有害性評価手法を開発し、試験液の特性評価及び細胞試験における最低限必要な試験項目と試験系を確立した</li> <li>・試験手順をとりまとめた安全性試験手順書を作成し公開した</li> </ul>	○
2.1.1.2	b. CNT等ナノ材料の実環境(製造から廃棄まで)におけるばく露を迅速かつ簡便に評価するための手法を確立する	<ul style="list-style-type: none"> <li>・簡便な飛散CNTの計測法を開発し、現場調査でその有用性を実証した</li> <li>・簡便なCNT飛散性評価手法を開発し、評価を実施した</li> <li>・計測法と評価事例をとりまとめた作業環境計測の手引きを公開した</li> </ul>	○
2.1.1.3	c. a. 及びb. を確立した上で、CNT等ナノ材料の安価かつ簡便な自主安全性評価手法を確立する。さらに国際的な機関(OECD、ISO等)の動向を的確に把握した上で、この研究開発の中で作成された手法について、国際標準化に向けた取組みを行う	<ul style="list-style-type: none"> <li>・a. 及びb. で示すように、有害性評価手法とばく露評価手法を確立した</li> <li>・ISO/TC229の新規プロジェクトの提案や、OECDの各種ガイドラインや文書に研究成果をインプットした</li> </ul>	○

# ナノ材料簡易自主安全管理技術の確立

## 最終目標に対する達成度

テーマ	最終目標	進捗状況	達成度
2.1.2	d. c. の自主安全性評価手法に基づき、CNT等ナノ材料生産事業者自らが自主安全管理を実践することを支援するために、具体的なナノ材料に適用した安全性管理に関する事例(ケーススタディ)報告書を作成する	<ul style="list-style-type: none"><li>・スーパーグロス単層CNT及びeDIPS単層CNTをモデル化合物として、安全データシートの追加情報として顧客に配布するケーススタディ報告書を作成し公開した</li><li>・スーパーグロス単層CNT版は、事業者の工場立地に係る自治体の環境審議会に参考資料として提出され、認可に貢献した</li></ul>	◎

事業者のCNT実用化を支援：一部最終目標を大幅達成

## CNT等ナノ材料の持つ特徴

- 多様性: 分子式が同じでも異なる特性を持つ
- 新規性: 技術革新が早く、法規制を待つと国際競争に敗れる
- 社会の変化: 「分からないものはとりあえず危険とみなす」という時代
- 風評被害: 「ナノ(CNT)だから危険」という風評が起きる
- 差別化: 安全性を示すことで製品の差別化を狙う事業者の出現

→ ①法規制ができるまでのつなぎとして

②法規制が補足し切れない細かな特性変化へ対応するため

事業者自らが安全性を確保していることをエビデンス付き  
で関係者に示す必要がある

= 自主安全管理技術の必要性

備えるべき要件: 簡易、迅速、安価

## 研究開発のターゲット

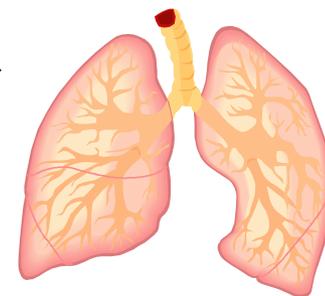
対象: 製造加工現場の作業員



CNT等ナノ材料のライフサイクルにおいて、最も高暴露の状況が想定されること

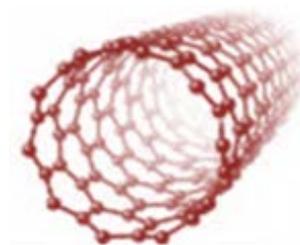
経路: 吸入(肺への影響)

吸入に伴う呼吸器への影響は今までに様々な粒子や繊維で見られており、特に懸念されていること



材料: 単層CNT(CNT全般)

多様な用途への応用が期待される材料であり、日本がリードする材料であること



# 簡易で迅速な有害性評価手法の開発

(産業医科大学、産業技術総合研究所)

# 簡易で迅速な有害性評価手法の開発

## 有害性評価における細胞(*in vitro*)試験の位置付け

詳細・長期・高額

簡易・迅速

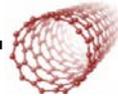
吸入暴露試験  
(*in vivo*)



(呼吸器系動物試験の  
ゴールドスタンダード)

NEDO研究PJ「ナノ粒子特性評価  
手法の研究開発」  
(2006FY~2010FY)

SG単層CNT



(許容暴露濃度:0.03 mg/m<sup>3</sup>)

15年程度の暴露期間を想定  
10年以内に見直すべき時限付き

気管内投与試験  
(*in vivo*)

妥当性の検証

鼻部暴露試験

腹腔内投与試験

(簡易試験/モデル試験)

培養細胞試験  
(*in vitro*)

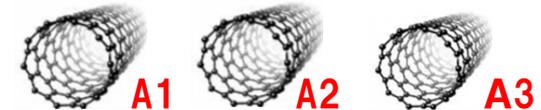


SG単層CNT eDIPS単層CNT,  
市販CNTで実施

ヒト肺胞上皮細胞  
ラット肺胞マクロファージ  
など

本プロジェクト

手順書をもとに民間試験機関などで実施



多様な開発材料への対応  
事業者の自主安全管理

対象: 作業者の肺吸入

エンドポイント: 初期炎症の持続的亢進

何故、培養細胞試験を利用するか？

- ・動物試験より迅速に結果が得られる→開発材料のスクリーニング
- ・動物愛護の潮流(EUでは化粧品の安全性試験に動物利用を完全禁止)
- ・OECD工業ナノ材料部会でも培養細胞試験の可能性を検討中

## 研究内容

① 評価軸としての物性パラメーターの決定

② 分散調製法の確立

③ 分散液の特性評価

④ 細胞試験の確立

### 課題

- ① 高塩濃度、血清タンパクの含有する細胞培地中では、凝集したCNTが細胞に沈降しやすい。
- ② 毒性を有する界面活性剤などの分散剤が使用できない。

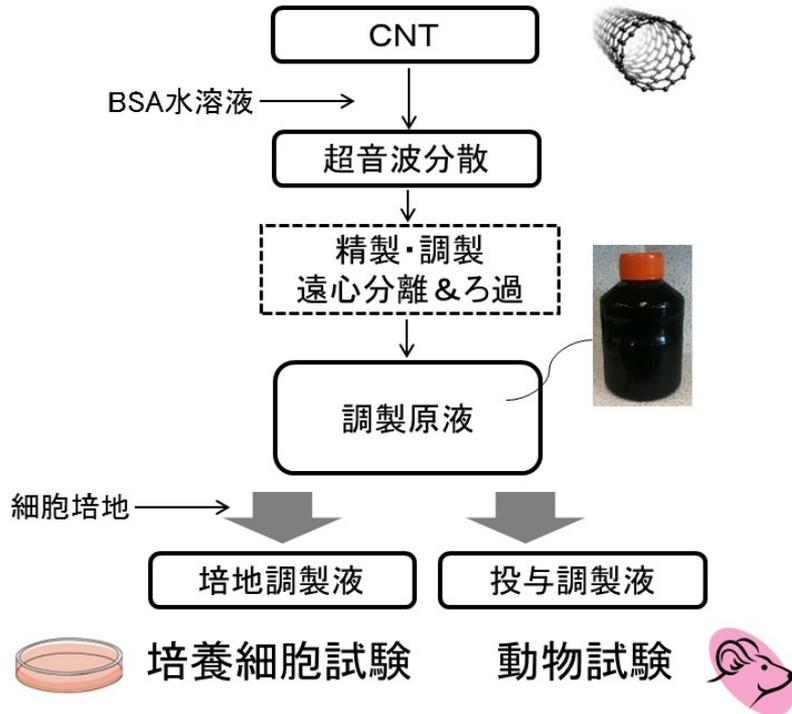
動物試験による妥当性の検証

事業者によるCNT自主安全管理のための評価を支援

目標： 迅速簡便なCNT分散調製技術を開発し、最低限必要な試験項目や試験系を設定した簡易な培養細胞試験を確立

## 研究成果 分散調製法の確立

### ■分散調製手法の開発



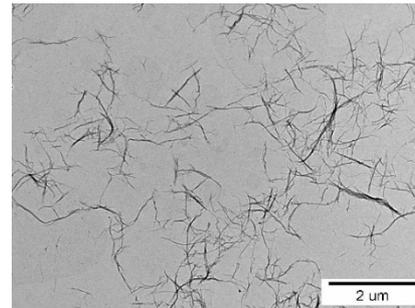
### ■特性の異なるCNTを調製

超音波照射時間と遠心分離の条件を変えることで、調製原液中での単層CNTの長さや凝集サイズが変化する。条件を精緻に制御することで物理化学特性の再現性が高い調製ができる。

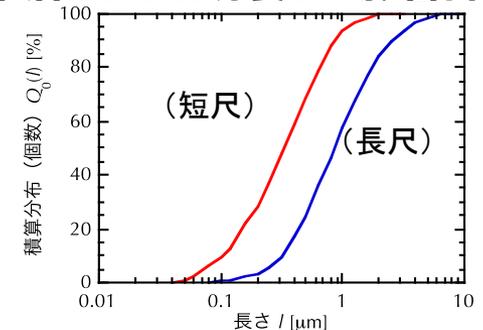
(遠藤ら, 粉体工学会誌, 2012)

### 【実施例】

特性の異なる2種類のSG単層CNTを調製して影響評価



安定に分散した単層CNT



長さの異なるSG単層CNT懸濁液の調製

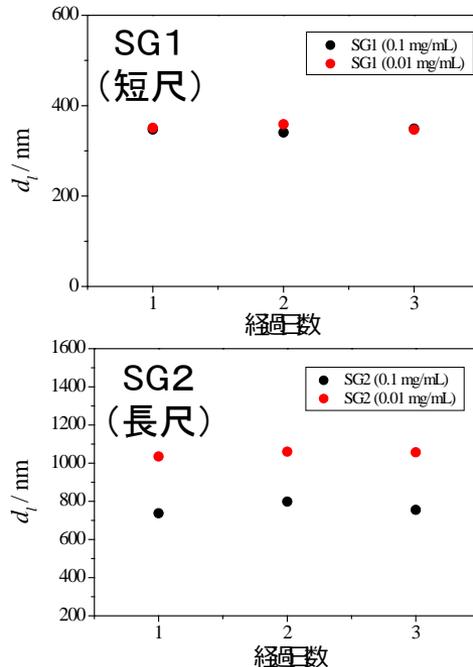
高い再現性を持つ簡易で迅速なCNT分散調製方法を開発  
(最終目標達成)

## 研究成果 分散液の特性評価

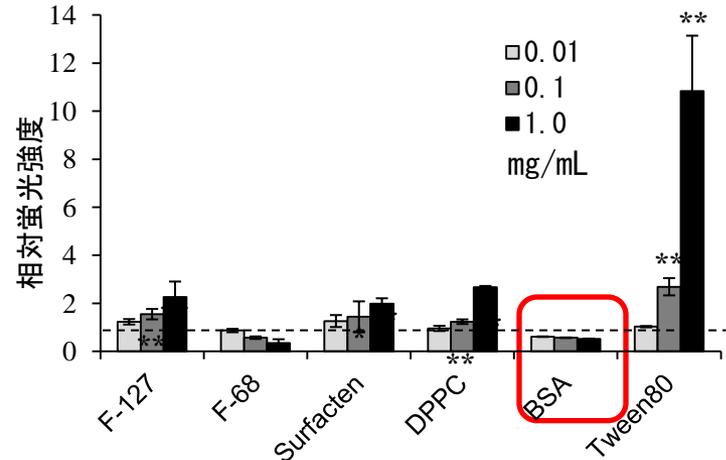
細胞試験のための分散液が満たすべき条件を3つに設定：

- ①培地中での分散安定性、②分散剤の細胞無影響、③培地中栄養成分の非枯渇

■動的光散乱(DLS)等により、形状が異なるSG単層CNTの分散安定性を確認



■開発した分散調製方法で用いたBSAが、細胞への影響(酸化ストレスの誘導)が少ないことを確認



DCFH-DA法による肺胞上皮細胞(A549)の相対的なROS生成(24時間、無処理区を1とする)\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

(Horie, et al., Toxicol Mech Methods. 2013)

分散液の特性評価として、具体的な試験項目や評価方法を決定

## 研究成果 細胞試験の確立



開発した分散調製方法を使い、各種CNTの細胞試験を実施

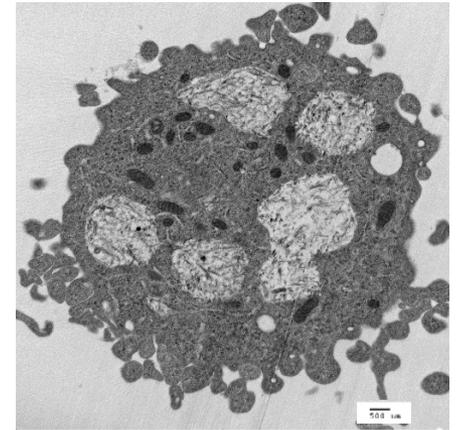
使用細胞：ヒト肺胞上皮細胞(A549)、ラット肺胞マクロファージ(NR8383)、ヒト単球由来細胞(THP-1)など

(1)各種CNTは、細胞培地中での凝集体サイズや長さ等の違いによらず、細胞内に取り込まれる

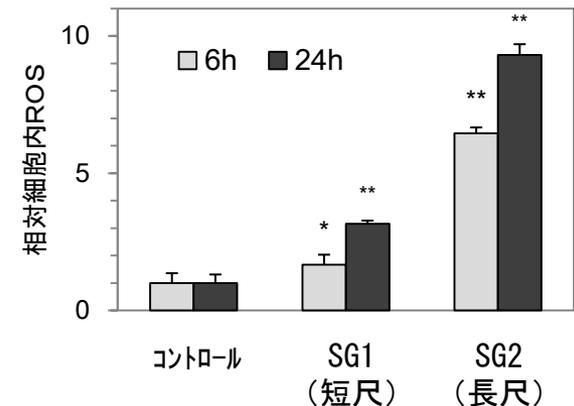
(2)各種CNTは、強い生存影響を及ぼさない

(3)酸化ストレス応答やサイトカイン産生などの細胞影響は、分散安定性や長さなどの物理的性状に依存

(4)動物試験による検証により、肺胞マクロファージを用いた細胞試験は、動物試験での投与後初期の肺影響評価に有用



NR8383に取り込まれたSG単層CNT



SG単層CNTによるNR8383細胞の酸化ストレス応答(無処理コントロール群の値を1とする)

(Fujita et al., Inhal Toxicol. 2015)

最低限必要な試験項目や試験系を設定した  
簡易で迅速な細胞試験を確立(最終目標達成)

## 研究成果 動物試験による有害性影響評価



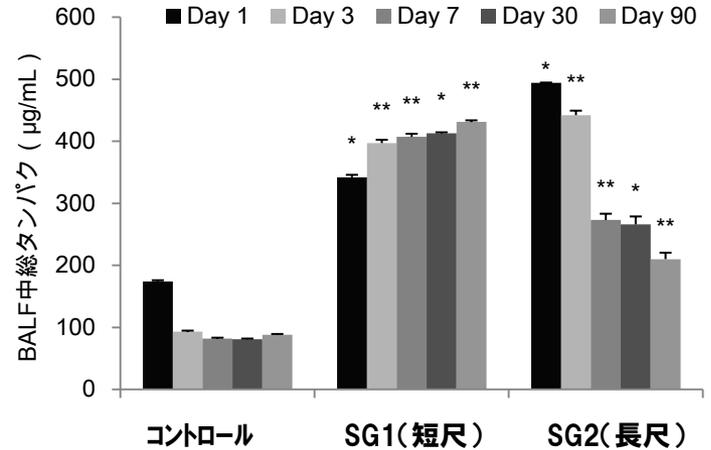
二次物性の異なるSG単層CNT等を被験材料として、気管内投与試験(投与後90日目まで)を実施。

(1)長尺SG単層CNTは、短尺に比べ投与後初期の影響が大きい。

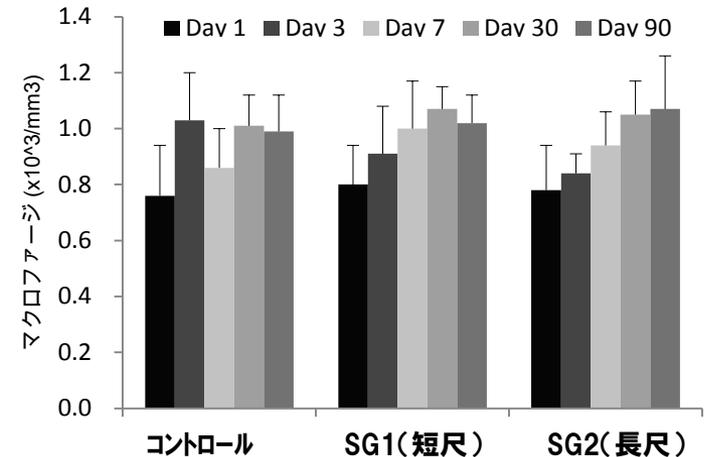
(2)炎症に関するいくつかの遺伝子発現は、肺胞マクロファージ(細胞試験)の結果と傾向が一致。両試験をつなぐバイオマーカーとして有用。

(3)気管内投与を活用し、胸腔洗浄液の生化学分析等により、胸腔での影響を解析。SG単層CNTでは、影響は小さい。

動物試験での肺組織での有害性影響は、細胞試験での生体反応の一部と対応。細胞試験の妥当性を検証できた。



SG単層CNTラット気管内投与後のBALF中の総タンパク (Fujita et al., Inhal Toxicol. 2015)



SG単層CNTラット気管内投与後の胸腔洗浄液中のマクロファージ

## 研究成果 事業者の自主安全管理の支援

■事業者が、取り扱うCNTの安全性や作業環境の評価・管理を自主的に行う際に参照できる「**安全性試験手順書**」を無償で公開(2013.10)

\_\_事業者が利用しやすいように、TASC開発品の単層CNTをケーススタディーとして具体的な実施例を付属

\_\_英語版により、国際機関への技術情報提供に活用

\_\_HPで公開(配布数+ダウンロード数>1,500)

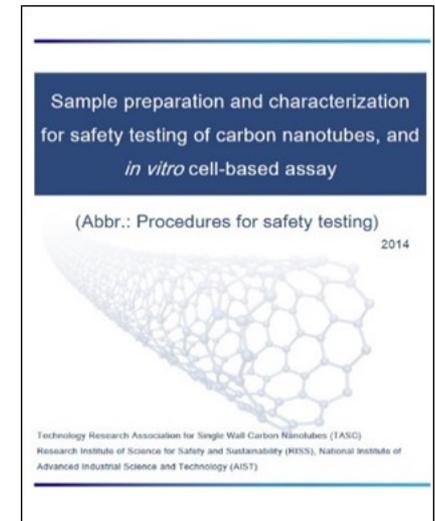
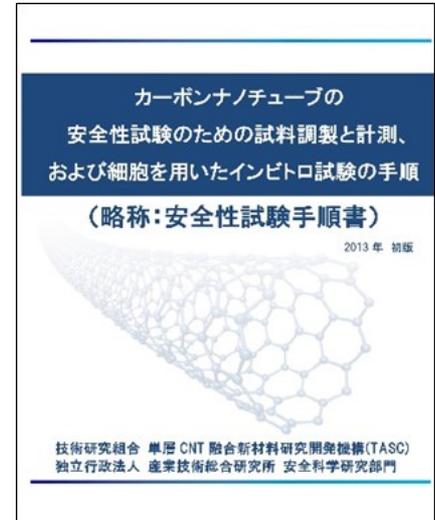
\_\_プレスリリース(2013.10)、報道(化学工業日報等)

\_\_経産省HPで紹介

\_\_関係団体への説明会、学会や展示会で発表、技術相談

■国際機関との連携:OECDの国際試験所間比較PJにSG単層CNT分散液を提供

「**安全性試験手順書**」を公開し、事業者の自主安全管理を支援(最終目標達成)



## 研究成果 動物試験による有害性影響評価



(平成26年度分)

■開発した調製方法により分散した**半導体型**および**金属型CNT**を対象材料として、**ラット気管内投与試験を実施**。投与後7日目での肺組織における炎症をエンドポイントとした病理観察や生化学的解析を行った。

半導体型単層CNT試料

金属型単層CNT試料



- (1) いずれの単層CNT投与群において、一般状態の異常は観察されなかった。
- (2) BALF中の各細胞数、炎症性サイトカインの経日変化、病理学的検査、網羅的遺伝子発現解析等の結果から、投与後直後1日目の肺の炎症性変化の程度は、半導体型単層CNTが、金属型単層CNTおよびeDIPS単層CNTに比べて強かった。投与後7日目で、両者の炎症の程度は、ほぼ同等となったが、陰性対照群より強く、炎症が持続していると考える。
- (3) 半導体型および金属型単層CNTの分離調製に使用されるコール酸ナトリウムは、その使用濃度域においては、肺組織に強い影響を及ぼさない。



本研究の手法や結果を参考に、投与後、中長期における影響評価が必要と考える。

**CNT応用材料をケーススタディとした動物試験を実施**

# 安価で簡便な暴露評価手法の開発

(産業技術総合研究所、岡山大、大阪大)

## 研究内容

### (1) 飛散CNTの簡便な計測法の開発

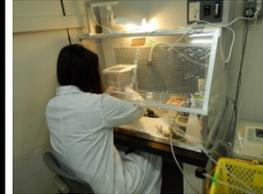
簡便な評価試験系を開発  
各計測技術の計測能を評価  
応答係数や適切な測定条件を把握



利用  
←  
課題抽出  
→

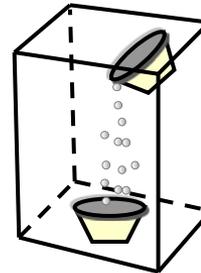
### (2) 現場調査

計測法の有用性を検証  
安全管理支援



### (3) 簡便なCNT飛散性評価試験

簡便な評価手法を開発  
評価の実施



計測法 ↓

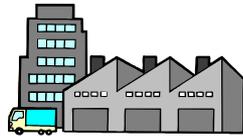
評価事例 ↓

### (4) 作業環境計測の手引きの作成

計測法と評価事例を提示

事業者の自主安全管理を支援

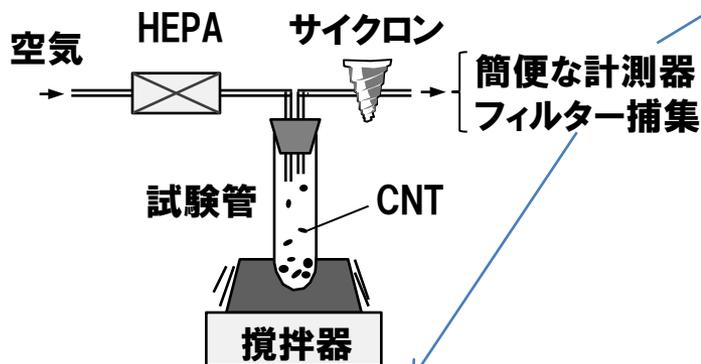
国際機関との連携



目標: CNT等ナノ材料の実環境(製造から廃棄まで)における暴露を迅速かつ簡便に評価するための手法を確立。CNT等ナノ材料の安価かつ簡便な自主安全性評価手法を確立。

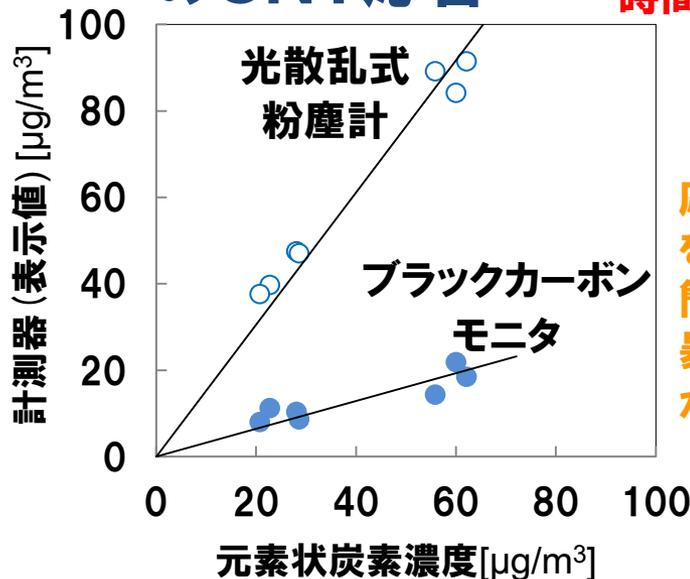
# 研究成果 (1) 飛散CNTの簡便な計測法の開発

## ① 計測法の簡便な評価試験系を開発



## ③ 小型・簡便な装置のCNT応答

CNTの種類による違い  
凝集状態による違い  
時間変化



簡易

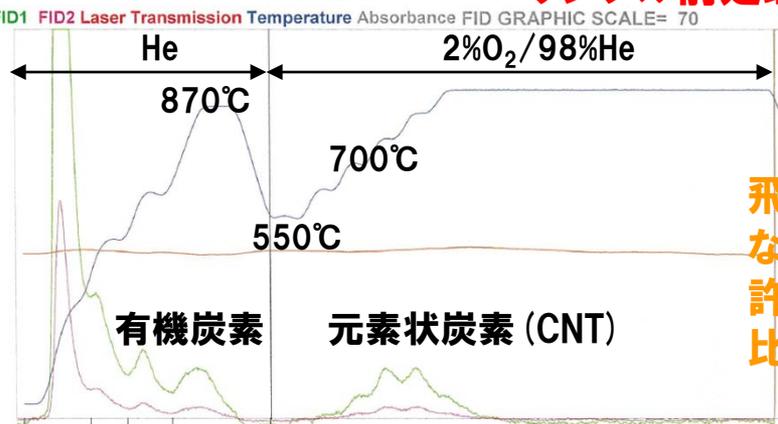
応答係数(図の傾き)を得ることで簡便な計測器での暴露の日常管理が可能に!

## ② 炭素分析によるCNT定量

最適な測定条件  
粒子捕集条件  
サンプル前処理

正確

飛散CNTの正確な定量により許容濃度との比較が可能に!



酸化・燃焼した炭素を水素炎イオン検出器で検出

- ・簡便な評価試験系を開発
- ・各計測技術の計測能を評価
- ・各CNTに対する応答係数や適切な測定条件を把握

その他に、④電子顕微鏡観察のための粒子捕集技術  
⑤バックグラウンド粒子の除去技術

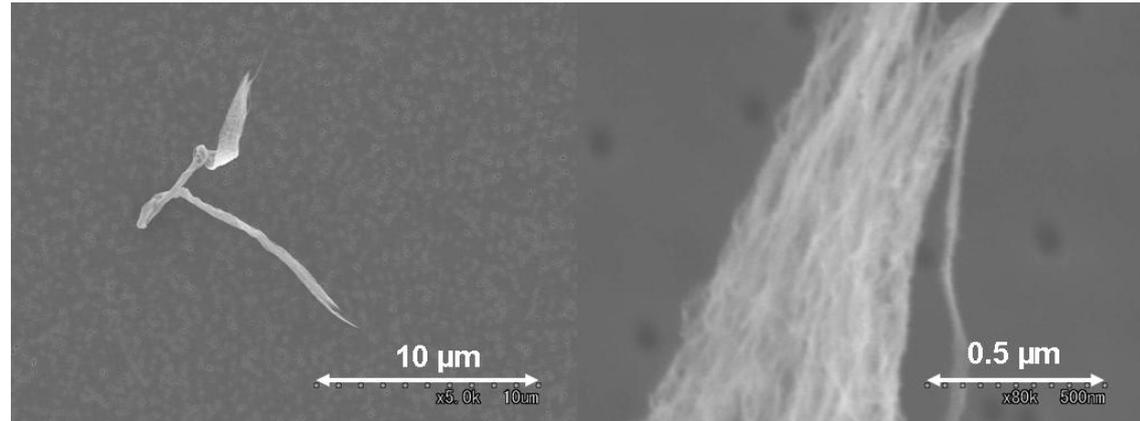
# 研究成果

## (2) 現場調査

- SG単層CNT量産実証プラント 基板回収、剥離、袋詰め
  - SG単層CNT取扱施設 小分け、秤量、分散液のホモジナイズ
  - 金属CNT半導体CNT取扱施設 バッキーペーパーの切断、秤量、分散液のホモジナイズ
  - 多層CNT製造施設 基板回収、剥離、分散液のホモジナイズ
- すべてのプロセスにおいてCNTは許容濃度 ( $30 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) 未満



計測器によるモニタリング及びフィルターへの粒子捕集の様子

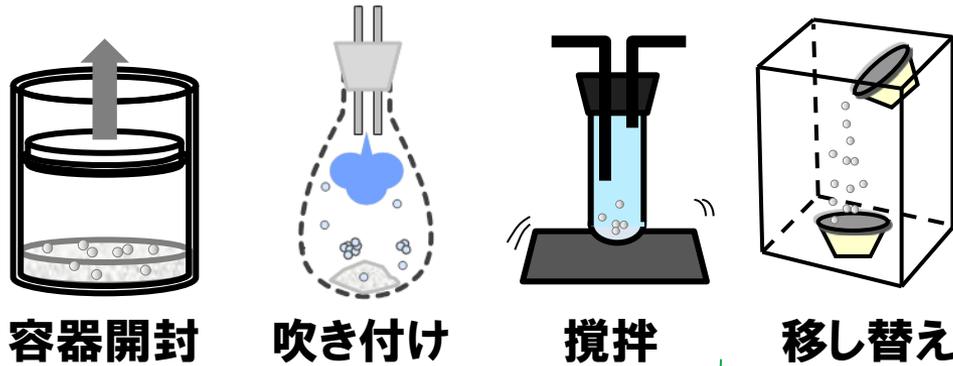


飛散CNTのSEM観察写真 (CNTの剥離・袋詰めプロセス、囲いの内側)

CNTを取り扱う作業現場で作業環境計測を実施し、計測事例を得ると共に、計測法の有用性を実証。現場の安全管理を支援。

# 研究成果 (3) 簡便なCNT飛散性評価試験

## CNT等粉体の飛散性評価



容器開封

吹き付け

攪拌

移し替え

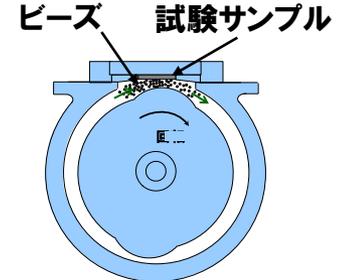
岡山大

産総研

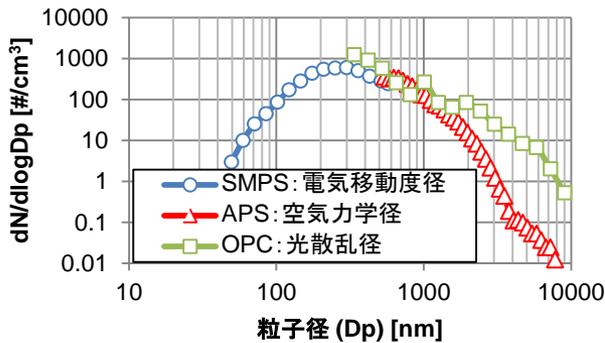
## CNT複合材料の加工や使用時の飛散粒子の評価



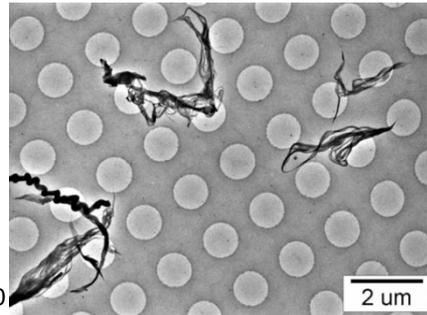
切削  
産総研



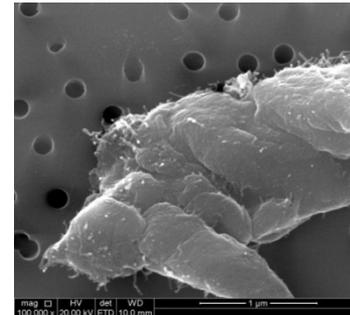
摩耗  
大阪大



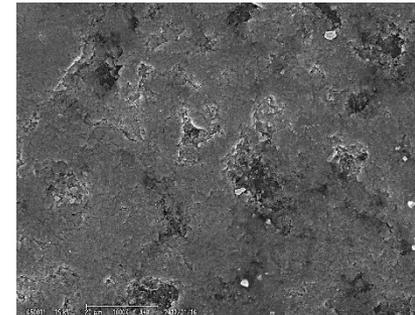
飛散CNTの個数濃度粒径分布



飛散CNTの形態



切削での飛散粒子



磨耗面

CNT粉体および複合材料からの簡便なCNT飛散性評価手法を開発。  
飛散CNTの濃度、サイズ、形態などのデータを取得。

## 研究成果 (4) CNTの作業環境計測の手引き

■CNTを取り扱う事業者等が作業環境計測を行う際に参照できる

「作業環境計測の手引き」を無償で公開(2013.10)。

\_\_事業者が利用しやすいように、計測技術の解説に加えて、  
評価事例を提示。

\_\_英語版により、国際機関への技術情報提供に活用。

\_\_HPで公開(配布数+ダウンロード数>1,400)

\_\_プレスリリース(2013.10)、報道(化学工業日報等)

\_\_経産省HPで紹介

\_\_関係団体への説明会

\_\_学会や展示会で発表

\_\_技術相談(14件)

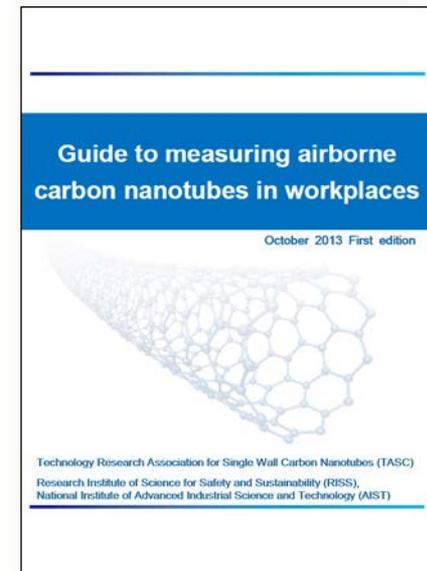
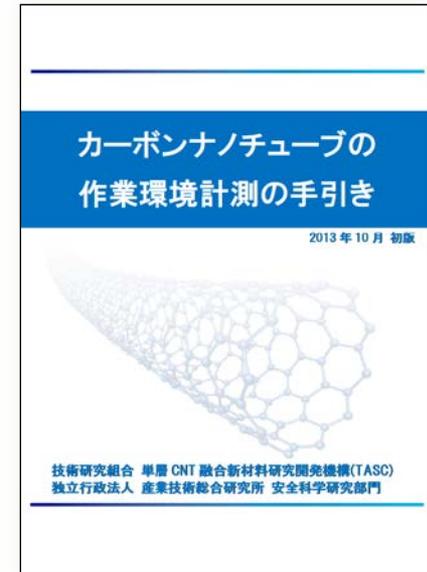
\_\_国内活用実績(現場計測16件、計測器11件)(ヒヤリングより)

■国際機関との連携

\_\_OECD SG8関係者への配布

\_\_国際計測ハーモナイゼーション戦略ミーティングで紹介

「CNTの作業環境計測の手引き」を公開し、  
事業者の自主安全管理を支援(最終目標達成)。



# 国際動向の把握と 自主安全評価技術の適用 (産業技術総合研究所)

## 取組成果

・Nanosafetyウェブサイトを開設し、CNT等ナノ材料に関する、欧米の法規制動向や国際機関での規格策定動向を提供

・諸外国や国際機関における信頼できる情報を、正確な和訳も含めて、ウェブサイトへ蓄積していくことで、事業者や行政の意思決定を支援

The screenshot shows the Nanosafety Web Site interface. At the top, there is a header with the site name and the TASC logo (Single Wall CNT). Below the header, there is a main content area with a large article titled "2015年6月 国内カーボンナノチューブの法規制措置についての展望". To the right of the main content, there are several navigation menus: "国際機関" (International Organizations), "米国政府" (US Government), "欧州連合" (European Union), "ナノ定義" (Nanotechnology Definitions), "その他" (Others), and "オーストラリア" (Australia). A "新着記事" (Latest News) section is also visible, containing a tweet from Nanosafety. Red arrows point from the text annotations to specific elements on the page.

URL

<http://www.nanosafety.jp>

新着情報

2015年6月 国内カーボンナノチューブの法規制措置についての展望

6月23日に厚生労働省で開催された、「平成27年度化学物質のリスク評価検討会(有害性評価小検討会)」において、高アスペクト比の針状(アスベスト様)複層カーボンナノチューブ(MWNT-7)を対象に日本バイオアッセイ研究センターが実施したラットによる2年間吸入暴露試験及び遺伝毒性試験の結果等が検討され、発がん性及び遺伝毒性ありと結論付けられたことを速報した。労働安全衛生法第28条第3項では「がんその他の重度の健康障害を労働者に生ずるおそれのあるもの」については、厚生労働大臣が「当該化学物質による労働者の健康障害を防止するための指針」を公表することが定められている。この指針は発がん性物質の場合、「がん原性指針」と呼ばれている。また、今後「平成27年度化学物質のリスク評価検討会」によるリスク評価の対象とすべくとも結論された。

労働者への暴露のばく露のリスク評価においては通常、2種類の基準値が設定される。

- 一次評価値：リスクが十分に低いか否かの指標(健康被害の発生を抑制)
- 二次評価値：健康障害防止措置の規制等が必要か否かの指標

記事内容

リスク評価の手法(H26年改訂版)によると、発がん性を考慮して評価を行うことが必要な物質の場合、一次評価は(A) 閾値がないとみなされる場合と(イ) 閾値があるとみなされる場合に分けて実施される。これは通常、遺伝毒性試験の結果で判断される。一般的には、遺伝毒性ありの場合に(A)となり、遺伝毒性なしの場合に(イ)となる。しかし、遺伝毒性については近年、直接的な遺伝毒性と間接的な遺伝毒性を区別し、後者については(イ)とみなされる場合がある。例えば、MWNT-7と同じく、IARC(国際がん研究機関)の分類で2Bに属する酸化チタン(ナノ粒子)の場合、「但し、TiO<sub>2</sub>のように難溶解性の粒子における遺伝毒性は、核に対する直接作用よりは、フリーラジカルが引き起こす間接的(2次)の遺伝毒性が関与する。」と判断され、(イ) 閾値ありでの評価が行われた。同じく難溶解性であるカーボンナノチューブも同様の判断となる可能性は十分にある。

国や機関別

国際機関

ISO TC229  
OECD WPMN  
SAIGM  
WHO

米国政府

EPA  
NIOSH  
FDA  
NNI  
カリフォルニア州

欧州連合

ナノ定義  
REACH規制  
RoHS指令  
食品化粧品  
英国  
フランス  
ドイツ

その他

オーストラリア

新着記事

2015年6月 国内カーボンナノチューブの法規制措置についての展望(速報) 我が国で初めて工業ナノ材料が法的規制措置の対象に〜多層カーボンナノチューブのがん原性試験結果を受けて

2015年6月 米国EPAがグラフェンに重要新規利用規則の直接最終規則を提示  
2015年4月 米国EPAがTSCAに基づくナノマテリアル報告及び記録保管規則案を公表

2013年12月 米国NIOSHによる「CNT/ CNFの職業曝露」の最終版の和訳を公開

LATEST TWEET

Nanosafety  
2 DAYS AGO

第3章は、VSSA(体積比表面積)の計測法、ナノマテリアルでないことの証明法、定義の中に明示的に含むべき個別マテリアルの名称、など。

第2章は、定義の対象(自然/

速報はTwitterで発信

# 取組成果

国際的な機関(OECD、ISO等)の動向を的確に把握し  
国際標準化に向けた取組みを行う

■日本が提案・主導したISO技術仕様書ISO/TS 19337の制定

"Characteristics of working suspensions of nano-objects for in vitro assays to evaluate inherent nano-object toxicity"

**ナノ材料固有の毒性を評価するインビトロ試験(細胞試験)のための分散液に関する**世界初の国際標準化文書****

→ ナノ材料の有害性評価の適正化に寄与するものと期待

評価項目として、エンドキシン、分散安定性、金属イオン濃度、培地成分(タンパクとカルシウム)濃度を規定

本PJのCNTを対象とした培養細胞試験による有害性評価手法の開発を通じて蓄積した知見を踏まえて提案

・ISO/TC229/WG3に新規作業項目として提案し、2013年10月14日付けで承認され、WG3/PG20として作業。2015年8月24日を期限とする投票で発行が了承された。

**研究成果に基づくISO技術仕様書の制定(最終目標を大幅達成)**

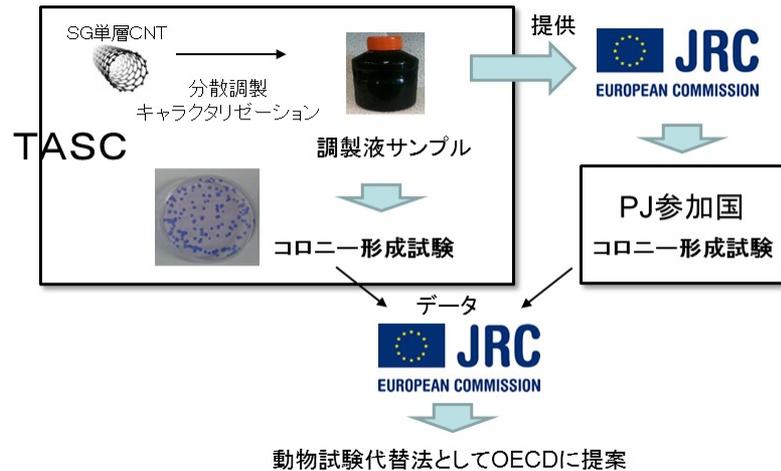
# 国際動向の把握と自主安全評価技術の適用

## 取組成果

国際的な機関(OECD、ISO等)の動向を的確に把握し  
国際標準化に向けた取組みを行う

### ■OECDの国際試験所間比較PJにSG単層CNT分散液を提供

OECD工業ナノ材料作業部会のPJとして、欧州委員会JRC(PJ幹事)・仏・伊・日・韓・ポーランド・南ア・スイスの計12試験所が参加して、ナノ材料の金・銀・シリカ・酸化亜鉛・**単層CNT**を対象に、細胞毒性試験の一種であるコロニー形成能(CFE)試験の国際試験所間比較を実施



**本PJのCNTを対象とした培養細胞試験による有害性評価手法の開発の成果を適用し、2か月間の分散安定性を保証したSG単層CNT分散液を共通供試サンプルとしてJRCを通じて提供**

PJ報告書は、2015年2月のWPMN会合に提出され、  
2015年3月にJRCのウェブサイトから一般公開された

<https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/eur-scientific-and-technical-research-reports/interlaboratory-comparison-study-colony-forming-efficiency-assay-assessing-cytotoxicity>

**開発した分散調製方法の国際優位性をOECDプロジェクトで示すことができた(最終目標達成)**

## ■ OECD国際試験所間比較PJ報告書(2014)



JRC SCIENCE AND POLICY REPORTS

### Interlaboratory comparison study of the Colony Forming Efficiency assay for assessing cytotoxicity of nanomaterials

#### 4.4 swCNTs (code F)

NPs code F were obtained from the Technology Research Association for swCNTs (Japan) and supplied for this project by AIST (Japan). The synthesis and physicochemical characterisation was performed at AIST and is described in detail in Fujita et al.. (2013).

Impurity-free NPs code F were synthesised by water-assisted chemical vapour deposition (CVD). A highly efficient synthesis of NPs code F with high purity was enabled by adding a small and controlled level of water to the growth ambient (Hata et al., 2004). This high efficiency resulted in a massive growth of vertically aligned swCNT (forest) from the catalyst surface. swCNT forests possess high-purity carbon, alignment and near-ideal specific surface area, and they can be patterned into arbitrary structures for applications ranging from supercapacitors to stretchable electronics.

NPs code F stock suspension was prepared in a 10 mg/mL BSA solution using an ultrasonic homogenizer for 30 min. After ultrasonic treatment, the dispersion was centrifuged at 3000 x g at 15° C for 15 min. The supernatant was filtered using a cell strainer with a 70 mm nylon mesh (Becton Dickinson & Company) and centrifuged at 22.000 x g at 10° C for 10 min. The precipitates were re-dispersed in a 10 mg/mL BSA solution using an ultrasonic bath operating for 5 min (Branson Ultrasonics Corp.). The mixtures were filtered using a cell strainer with a 100 mm nylon mesh (Becton Dickinson & Company).

#### Authors

Jessica Ponti, Agnieszka Kinsner-Ovaskainen, Hedvig Norlén, Sandrine Altmeyer, Cristina Andreoli, Alessia Bogni, Sylvie Chevillard, Isabella De Angelis, Seung-Tae Chung, Igchun Eom, Katsuhide Fujita, Douglas Gilliland, Maria Giuseppa Grollino, Mary Gulumian, Cordula Hirsch, Kayo Ichiraku, Takuya Igarashi, Jayoung Jeong, Eunhye Jo, Dang-Young Kim, Jean-Pierre Kaiser, Doris Lagache, Rita La Spina, Jong Kwon Lee, Jieun Lee, Annalisa Lovera, Xenia Mäder-Althaus, Fabrice Nesslany, Isaac Ojea Jimenez, Francesca Pacchierotti, Francesca Pianella, Vincent Paget, Tae Rim Kim, Joanna Roszak, Philipp Rosenkranz, Sophie Simar, Maciej Stępnik, Melissa Vetten, Nam Woong Song, Jun-Young Yang, François Rossi

<http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC92910/interlab%20comparison%20study%20of%20the%20cfe%20assay%20for%20assessing%20cytotoxicity%20of%20nms-pubsy%20jrc92910-20150224.pdf>

**CNT等ナノ材料の安価かつ簡便な  
自主安全管理手法のための  
ケーススタディの実施  
(産業技術総合研究所、東レ株式会社)**

## 成果目標とサブテーマの構成

### 目標

CNT等のナノ材料の製品開発と**並行して**安全性や暴露量を把握できる簡便迅速な評価技術の開発と自主安全管理の支援

2.1.1.1 簡易で迅速な有害性評価手法の開発  
安全性試験手順書

2.1.1.2 安価で簡便な暴露評価手法の開発  
作業環境計測の手引き

2.1.1.3 国際動向の把握と国際標準化への取り組み

2.1.2 自主安全管理のための安全性情報の提供と技術普及活動  
ケーススタディ報告書

# 研究成果

## I. 総論(概要)

1. 序論
2. 有害性
3. 暴露

概論

## II. 各論(詳細説明・データ)

1. 基本的情報
2. 有害性情報
  - (1) 環境中運命
  - (2) 環境中の生物への影響
  - (3) ヒト健康への影響
  - (4) 作業環境における許容暴露濃度
3. 暴露評価情報
  - (1) 計測法
  - (2) 飛散性

評価  
データ

## III. TASCにおける自主安全管理手法<参考>

1. 作業環境中許容暴露濃度の設定
2. リスク管理
  - (1) 作業環境におけるリスクの判定
  - (2) リスク対策と自主安全管理
3. 自主安全管理のための有害性評価および暴露評価手法の提案
  - (1) 排出・暴露評価の手引き
  - (2) 安全性試験総合手順書
4. 国際標準化への対応

TASC  
管理例



1. スーパーグロース単層CNT版
2. eDIPS単層CNT版

・2.1.1で開発した評価技術、排出・暴露量計測結果、有害性試験等の結果に加え、TASCにおける安全管理手法を紹介した“**ケーススタディ報告書**”を作成し、CNT等のサンプル提供先に配布

・第II章 2.「**有害性情報**」の(1)～(3)は、化学品の譲渡・提供の際に添付する**安全データシート(SDS)**の「有害性情報」、「環境影響情報」の詳細情報に相当、事業者がSDSを作成する際にも重要な資料となった

・スーパーグロース単層CNT版は、事業者の**工場立地に係る貢献自治体の環境審議会に参考資料**として提出され、**認可に貢献**

## ■ ケーススタディ報告書の記載例

II. 各論 (総論に関する詳細説明およびデータ) (中略)	9
2. 有害性情報	11
(1) 環境中運命	11
A. 大気中での安定性	11
B. 水中での安定性	11
a) 非生物的分解性	11
b) 生分解性	11
c) 生物濃縮性	11
(2) 環境中の生物への影響	12
A. 水生生物に対する影響	12
a) 藻類に対する毒性	12
b) 無脊椎動物に対する毒性	12
c) 魚類に対する毒性	12
B. 土壌微生物に対する影響	13
C. 下水処理場活性汚泥に対する影響	13
(3) ヒト健康への影響	14
A. 生体内運命 (体内動態)	14
B. 疫学調査および事例	14
C. 実験動物を用いた有害性試験	14
a) 呼吸器系に対する毒性	14
b) 経口投与後の毒性	15
c) 眼および皮膚に対する刺激性	16
d) 感作性	16
e) 生殖・発生毒性	16
f) 遺伝毒性	16
g) 発がん性	16
D. 培養細胞を用いた有害性試験	17
a) ヒトII型肺上皮細胞 A549 細胞株を用いた <i>in vitro</i> 毒性評価	17
b) ラットマクロファージ NR8383 細胞株を用いた <i>in vitro</i> 毒性評価	17
(4) 作業環境における許容暴露濃度	17

表 9 SG-単層 CNT のラット呼吸器系に対する毒性

試験項目	動物種	投与方法	投与後処理	投与量 (投与媒体)	結果
ラット単回 気管内投与 <sup>1,34)</sup>	ラット Cri:CD(SD) 雄	気管内	投与後3日、1週、1,3ヶ月に解剖	0, 0.2, 2.0 mg/kg (1%Tween80含有PBS懸濁液)	<ul style="list-style-type: none"> <li>・肺重量増加 (0.2, 2 mg/kg 投与群)</li> <li>・BALF 中炎症細胞数、蛋白量増加、LDH、IL-1β 上昇 (3ヶ月まで、0.2, 2.0 mg/kg 投与群)</li> <li>・肺病理組織学的検査; 肺胞および間質マクロファージ集積、炎症細胞浸潤 (3ヶ月まで、0.2, 2.0 mg/kg 投与群)、肺胞マクロファージ 泡沫化、肺胞及び気管支肺上皮の肥厚、肉芽腫および異物巨細胞 (3ヶ月まで、2.0 mg/kg 投与群)</li> <li>・肝臓、腎臓、大脳、脾臓に病理組織学的変化なし (全投与群)</li> </ul>
			投与後3日、1週、1,3,6ヶ月に解剖	0, 0.04, 0.2, 1.0 mg/kg (1%Tween80含有PBS懸濁液)	<ul style="list-style-type: none"> <li>・肺重量増加 (0.2, 1 mg/kg 投与群)</li> <li>・BALF 中炎症細胞数、蛋白量増加、LDH、IL-1β 上昇 (6ヶ月まで、0.2, 1.0 mg/kg 投与群)</li> <li>・肺病理組織学的検査; 肺胞マクロファージ集積、好球中等の炎症細胞浸潤 (6ヶ月まで、0.2, 1.0 mg/kg 投与群)、肺胞マクロファージ 泡沫化、肺胞及び気管支肺上皮の肥厚、肉芽腫および異物巨細胞が投与後6ヶ月まで観察 (1.0 mg/kg 投与群)</li> <li>・肝臓、腎臓、大脳、脾臓に病理組織学的変化なし (全投与群)</li> </ul>
ラット反復 気管内投与 <sup>35)</sup>	ラット Cri:CD(SD) 雄	気管内、週1回投与で計5回	最終投与後1週、1,3ヶ月に解剖	0, 0.04, 0.2 mg/kg × 5回 (1%Tween80含有PBS懸濁液)	<ul style="list-style-type: none"> <li>・肺重量増加 (3ヶ月まで、0.2 mg/kg 投与群)</li> <li>・BALF 中白血球数、好中球比率、蛋白量増加、LDH、IL-1β 上昇 (3ヶ月まで、0.04, 0.2 mg/kg 投与群)</li> <li>・肺病理組織学的検査; 肺胞マクロファージ集積、肺胞上皮・細気管支上皮肥厚 (0.04 mg/kg 投与群)、肺胞マクロファージ集積、泡沫化マクロファージ出現、好球中等の炎症細胞浸潤、肉芽 (0.2 mg/kg 投与群)</li> <li>・肝臓、腎臓、大脳、脾臓に病理組織学的変化なし (全投与群)</li> </ul>
ラット亜急性 吸入毒性試験 <sup>1,35)</sup> (OECD TG412)	ラット Cri:Wistar 雄	全身吸入、4週間 (1日6時間、週5日)	暴露終了後3日、1,3ヶ月に解剖	0, 0.03, 0.13 mg/m <sup>3</sup> (1%Tween80含有PBS懸濁液)	<ul style="list-style-type: none"> <li>・BALF; 総細胞数、好球中数に変化なし (全投与群)</li> <li>・肺組織およびBALF 中 HO-1 遺伝子の発現量に変化なし (全投与群)</li> <li>・肺病理組織学的検査; マクロファージの浸潤と極めて軽微な線維増生・上皮増生 (暴露後3日、全投与群) 細気管支・肺上皮の増生、線維化、細網線維の増生等なし (暴露後1,3ヶ月、全投与群)</li> <li>・大脳、小脳、鼻腔、精巣、肝臓、腎臓、脾臓に病理組織学的変化なし (暴露後3ヶ月、全投与群)</li> </ul>

## 成果普及実績（2.1.1の成果を含む。一部再掲）

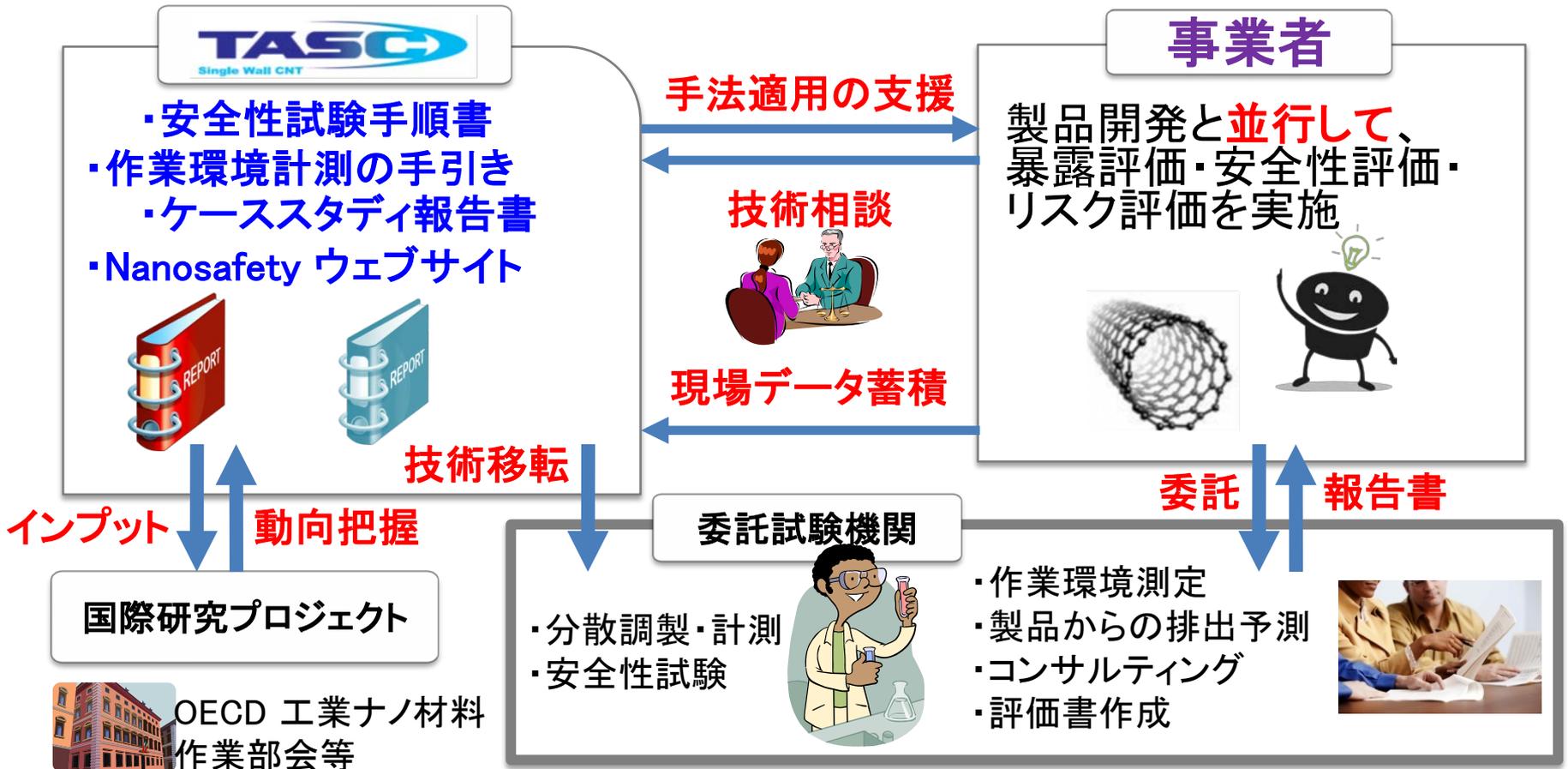
- ・安全性試験手順書 ダウンロード＋冊子配布数＞1500  
培養細胞試験用のCNT分散液調整方法をOECD国際試験所間比較プロジェクトへ紹介
- ・作業環境計測の手引き ダウンロード＋冊子配布数＞1400
- ・プレス発表「カーボンナノチューブ安全管理のレシピが完成」（平成25年10月29日、化学工業日報他8紙に掲載）
- ・ケーススタディ報告書配布数 SG版：220、eDIPS版：80（ダウンロード計数せず）  
CNT資料提供事業者に**安全性情報**として添付  
**スーパーグロス単層CNT版は、事業者の工場立地に係る自治体の環境審議会に参考資料として提出され、認可に貢献。**
- ・技術相談36件、現場調査に伴う助言3件→**手引きに基づき日常管理を実施**
- ・**活用実績**  
事業者から試験機関への分析依頼：3社16件  
事業者による計測装置の購入及びレンタル：11台

# 今後の計画

# ナノ材料簡易自主安全管理技術の確立

## 成果の実用化

- ・安全性試験手順書、作業環境計測の手引き、自主安全管理のためのケーススタディ報告書の普及活動により、CNTの適切な安全管理と応用開発の促進を支援
- ・国際機関(ISO やOECD)からの情報収集および情報発信を継続



## 今後の技術開発

### 事業者の安全管理に関するニーズ調査の結果

製造工程及び製品における安全性研究へのニーズ
摩耗等で発生する微粉の生体影響
複合材料から飛び出してくるCNTがあるのかないのか、どのような形で出てくるのか。複合材料の廃棄指針。
CNT複合材料における皮内試験、急性全身毒性試験、細胞毒性試験、感作性試験、埋植性試験、復帰突然変異試験
CNTに残留する金属の安全性への影響。コーティングの摩耗に伴ってCNTの飛散がどれほどなのか。CNT濃度と飛散量について。
製造現場における簡易な作業方法。CNTの飛散に対する有機溶媒を使う際の指針。製品からの摩耗による飛散。最終処分方法。
e-DIPSの直径が変わり物性値が変われば安全性が変わるのか。移送搬送中の飛散対策。
分散液の取扱指針。乾いた時の飛散。摩耗層の影響
練り込んでしまえば露出したり単独で飛散する心配はないと考えている
クローズド化した系から本当に出ないのか
飛散した粉じんなどの環境測定が簡便にできる方法。材料の廃棄方法。

- ・CNT複合材料の加工・使用・廃棄における飛散物に対する懸念  
→CNT複合材料からの飛散物の測定・評価方法の開発
- ・CNTの物性の違いによる生体影響  
→動物試験のための試験設計や準備方法の手順も加えた安全性試験手順の拡張
- ・実用化への期待が大きいナノ炭素材料のケーススタディ