

CNFの検出・定量手法の開発

国立研究開発法人 産業技術総合研究所
エネルギー・環境領域 安全科学研究部門

小倉 勇

プロジェクトのテーマ構成

- 1) CNFの分析及び有害性試験手法の開発
 - 1) -1 CNFの検出・定量手法の開発(日本製紙、産総研)
 - 1) -2 CNFの気管内投与手法の開発
 - 1) -3 CNFの皮膚透過性試験手法の開発

- 2) CNFの排出・暴露評価手法の開発
 - 2) -1 排出CNFの計測手法の確立及び排出・暴露評価事例の集積
 - 2) -2 CNF応用製品に対する暴露シナリオによるケーススタディ

※ 個別テーマは、CNFを扱う事業者のニーズを踏まえて設定した。

はじめに

CNFの安全性評価を行うためには、夾雑物存在下における微量なCNFを検出・定量する手法が必要

有害性評価：調製試料、生体試料、試験試料

排出・暴露評価：環境試料

しかし、CNFは以下のような特徴を持ち、その検出・定量は一般に難しい。

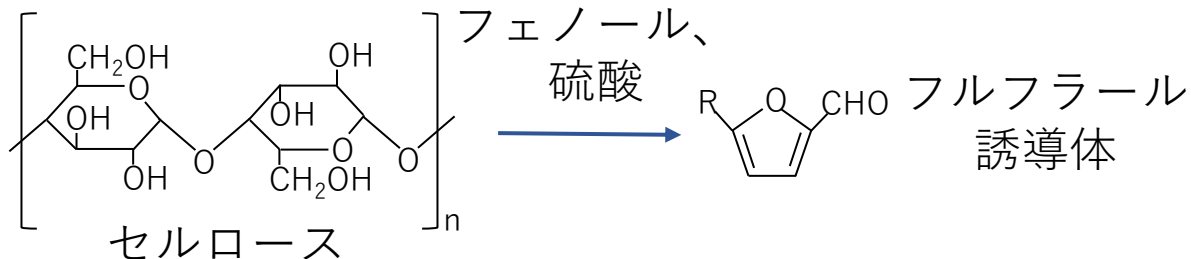
生物(植物)起源、 有機物	構成元素がC、H、Oであり、特徴的な元素を持たない。他の有機物との分離識別が必要。 電子顕微鏡ではコントラストがつきにくい。
セルロース	セルロースは、実験用品(ティッシュペーパー、フィルタ材、シート、紙箱)や衣服(綿)などいたるところで使われており、夾雑やコンタミが起きやすい。
多糖	セルロースはグルコースの多糖であり、その他の糖類との分離識別が必要。
高分子	そのままでは、ガスクロマトグラフィー(GC)や高速液体クロマトグラフィー(HPLC)などを用いた分析はできない。
低吸光度	特異的な紫外可視光の吸収がない。
細さ	完全に解繊されたCNFは、繊維径が3-4 nmと細く、顕微鏡での検出が難しい。

CNFの検出・定量手法の開発

実施者：産業技術総合研究所、日本製紙（株）

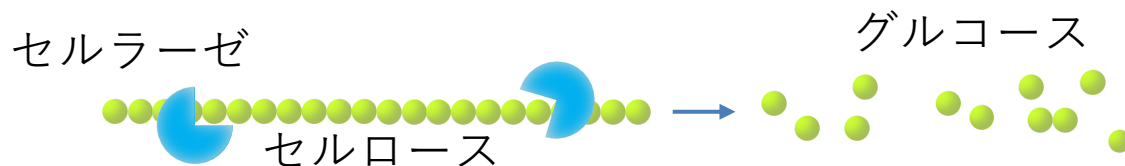
- ・微量CNFの検出・定量手法（目標：対象の3種CNFについて1 μ g）
- ・CNFの多様性や夾雑物を考慮して、複数手法を検討

①酸分解法



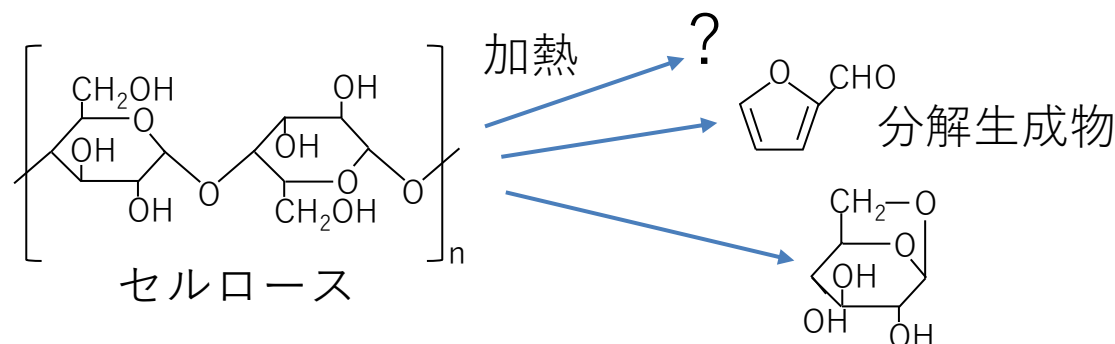
分光光度計
(吸光度)

②酵素分解法



グルコース
測定

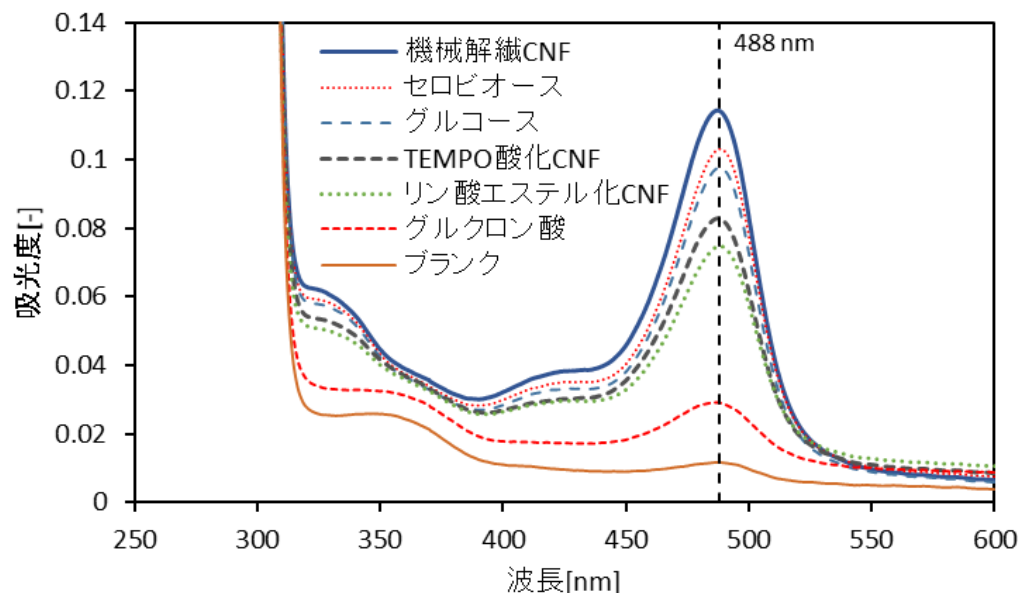
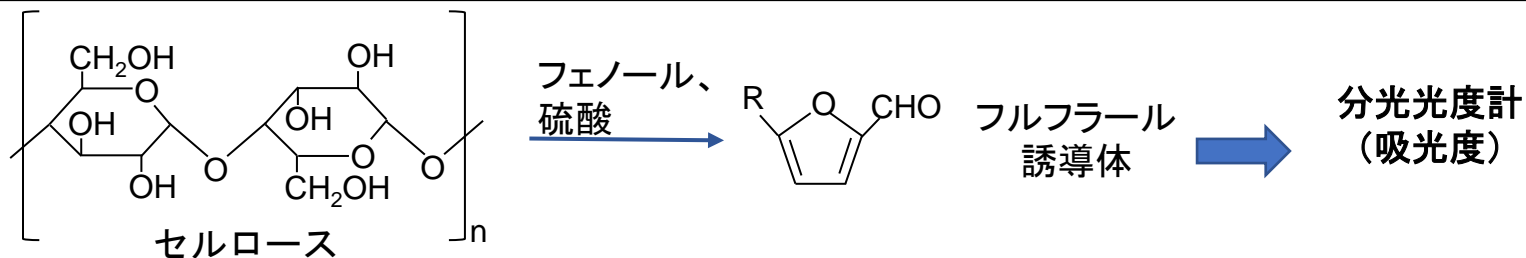
③熱分解法



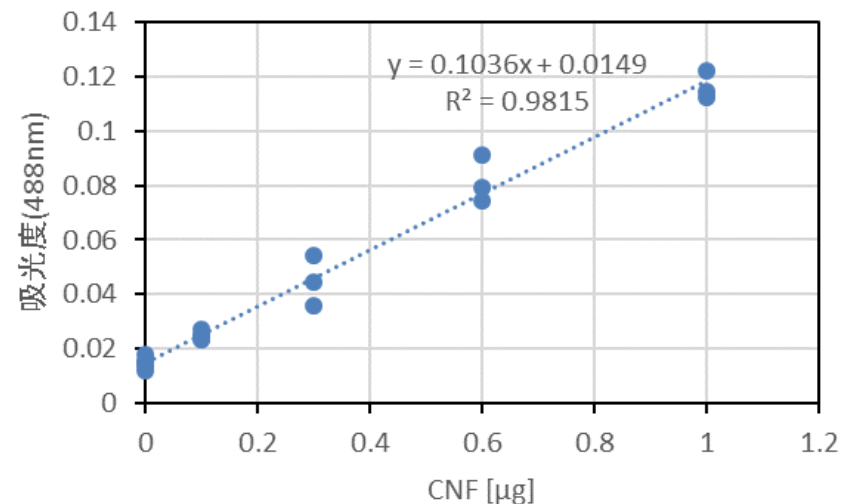
炭素分析
熱分解GC-MS

これらの他に、染色・蛍光ラベル化による分析法を有害性試験手法開発の研究項目で検討

①酸分解法



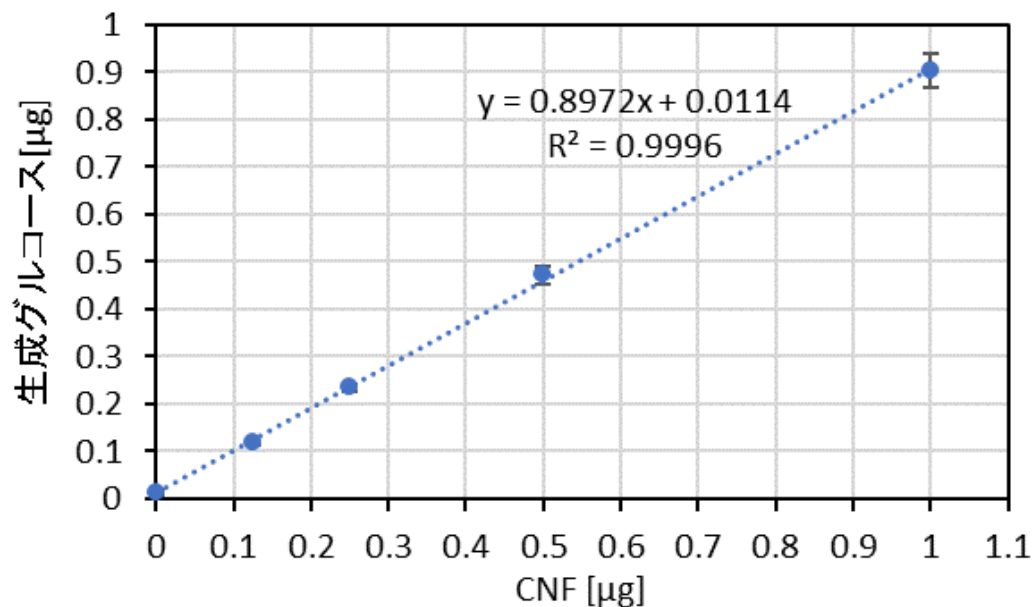
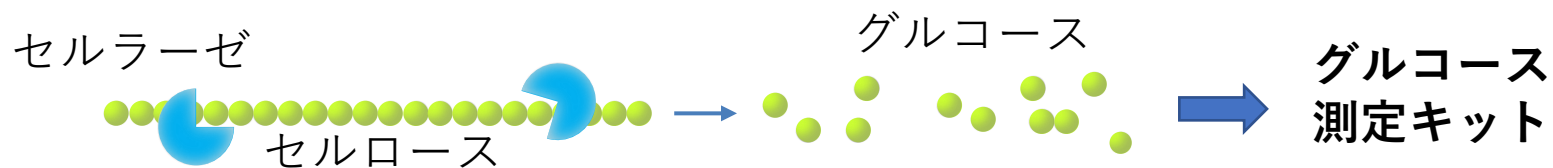
各試料10 µg/mLの吸収スペクトル



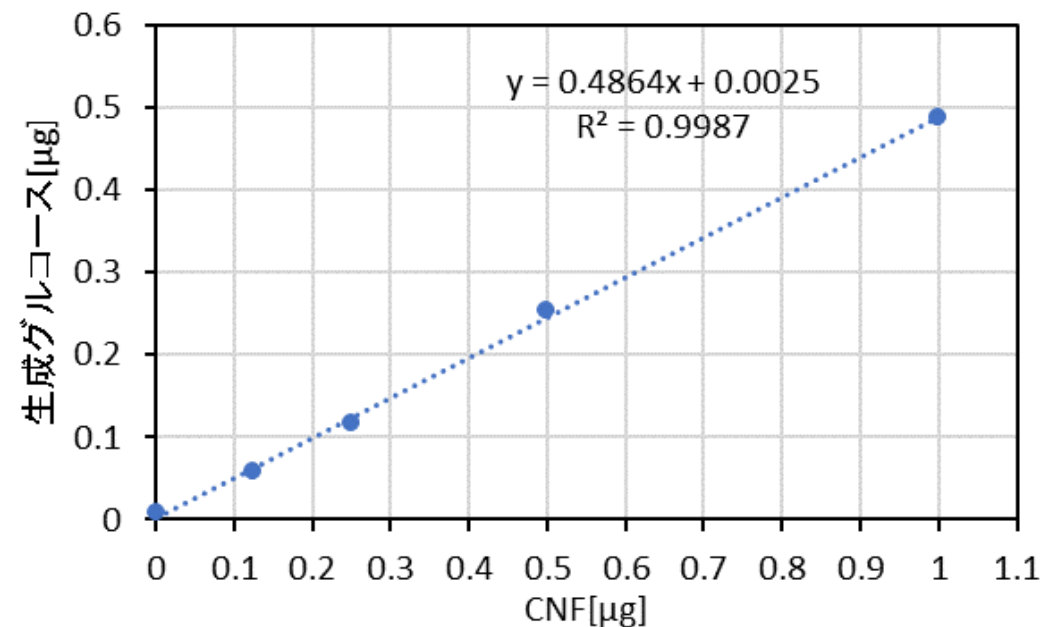
機械解繊CNFの酸分解時の吸光度

酸分解法により、CNF水分散液中のCNFの定量が可能であり、検出限界は約0.1 µg（濃度としては約1 µg/mL）であった。本方法は、簡便で、試薬や器具に特殊なものを要せず、感度も高いため、夾雑物として糖類を含まない水分散液試料の測定に適している。

② 酵素分解法



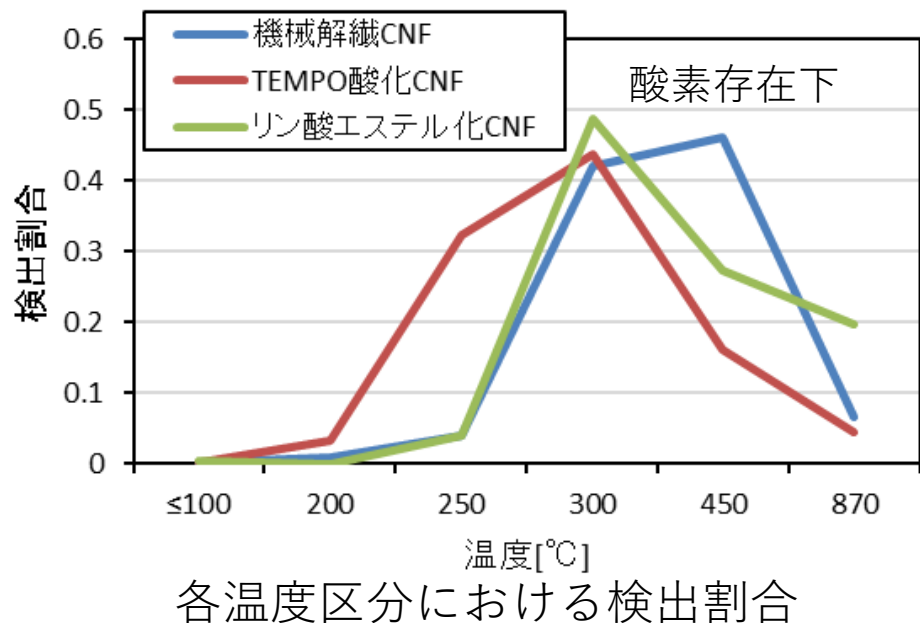
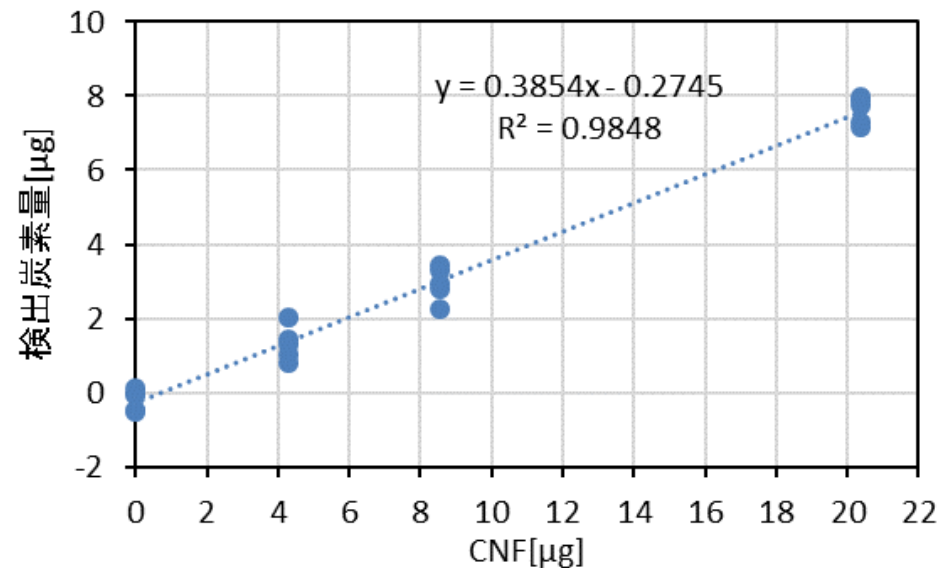
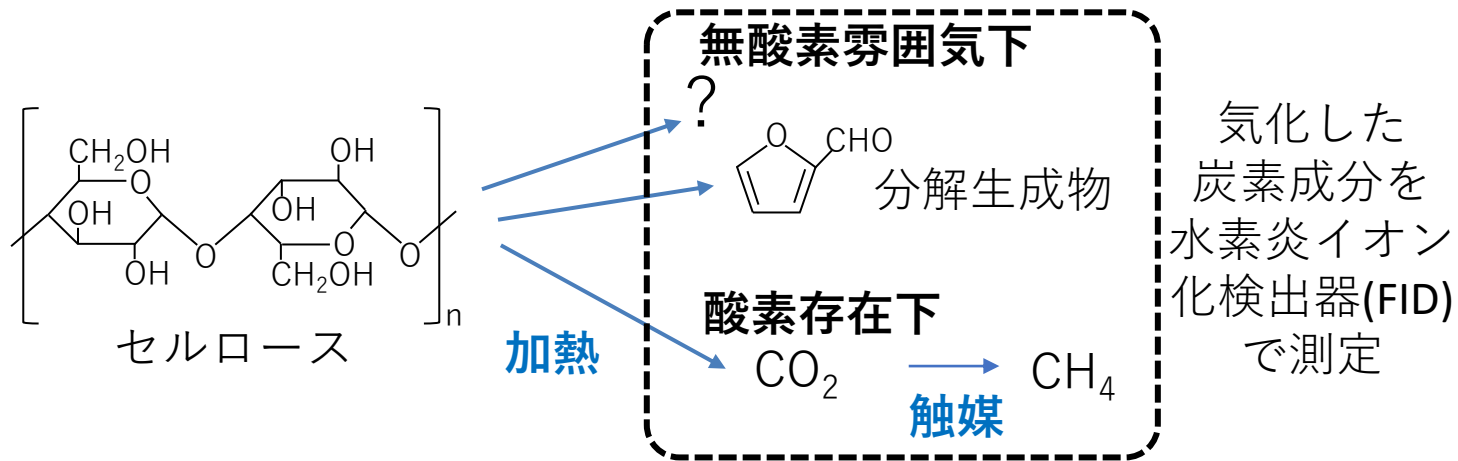
機械解繊CNF



TEMPO酸化CNF

酵素分解法によって生成したグルコースを測定することにより、約0.1 μg のCNFの検出が可能であった。本方法は、夾雑物として糖類が含まれている試料でも、適切に処理すれば、CNFの分析が可能。マイクロプレートで多数検体の計測が可能。

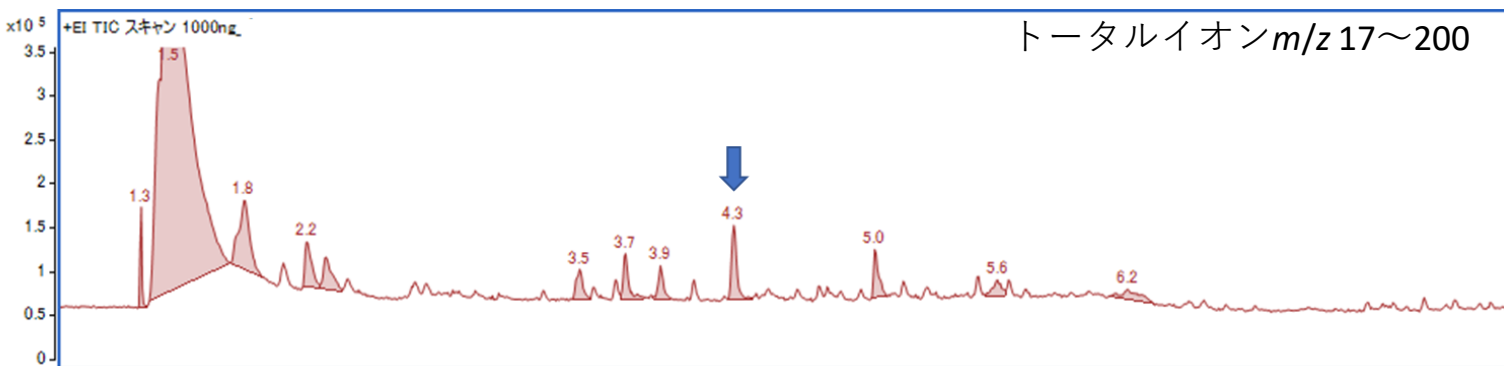
③熱分解法 (1)炭素分析法



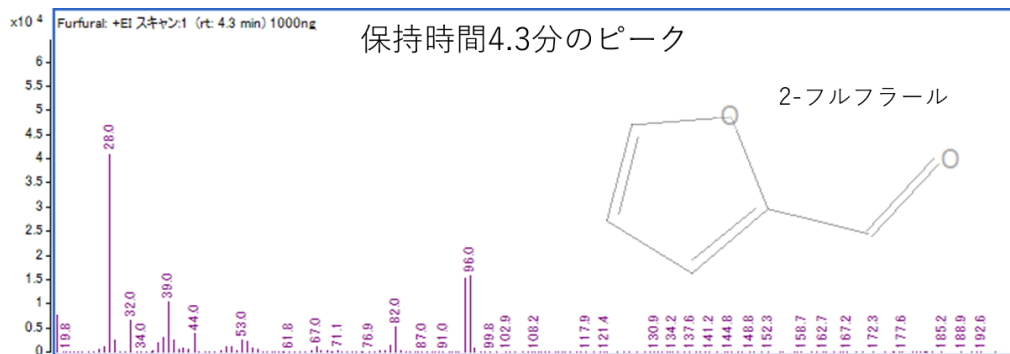
炭素分析法によってCNFの熱分解生成物を測定することにより、数 μgレベルのCNFの検出が可能であった。本方法は、分散液と粉体の両方に適用可能。
→作業環境における飛散CNFの測定への適用

③熱分解法

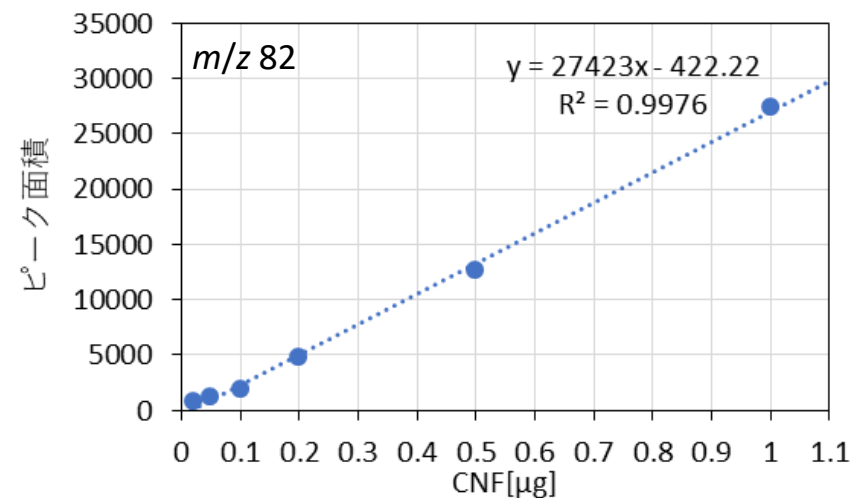
(2)ガスクロマトグラフィー質量分析法(GC-MS)



クロマトグラム



マススペクトル



機械解繊CNFの重量と生成物のピーク面積の関係

熱分解GC-MSによってCNFの熱分解生成物を測定することにより、約0.1 μg のCNFの検出が可能であった。本方法は、分散液と粉体の両方に適用可能。
→作業環境における飛散CNFの測定への適用

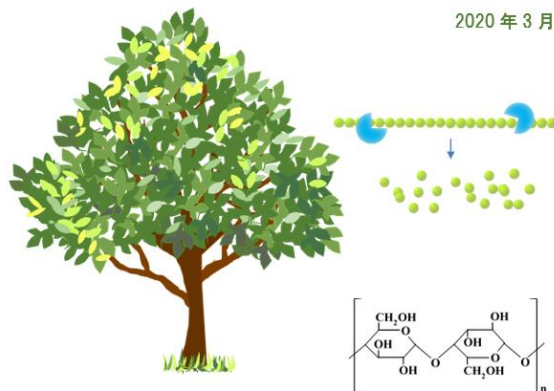
CNFの検出・定量手法の一覧

方法	対象	検出限界 (液中濃度) [μg/mL]	検出限界 (絶対量) [μg]	利点	欠点	適用
CNFの分解生成物を定量する方法						
酸分解法	分散液	約1	約0.1	・比較的簡易	・他の糖類との分別が不可能 ・劇物の硫酸やフェノールを使用	・夾雑物として糖類を含まない水分散液試料など
酵素分解法	分散液	約25	約0.1	・他の有機物や糖類との分別が可能	・夾雑物の種類によっては酵素反応が阻害	・CNF以外の糖類が含まれている水分散試料など
熱分解法： 炭素分析	分散液 粉体	約300-700 (乾燥する液量による)	約3-7	・簡易 ・粉体に適用可能	・他の有機物との分別が困難	・作業環境試料
熱分解法： 熱分解GC-MS	分散液 粉体	約4 (乾燥する液量による)	約0.1	・他の有機物との分別が可能 ・粉体に適用可能	・試料の状態や条件、夾雑物によって生成量が変わる可能性	・作業環境試料
事前に色素・蛍光ラベル化する方法						
色素染色	分散液	約20-40	約2-4	・他のセルロースや糖類との分別が可能	・事前にラベル化(染色)する必要あり ・染色によりCNFの物性や動態が変わる可能性あり	・肺試料 ・皮膚透過性試験
蛍光染色	分散液	約0.005		・高感度 ・他のセルロースや糖類との分別が可能	・染色剤がCNFから脱離する可能性あり	・皮膚透過性試験

CNFの検出・定量の事例集

セルロースナノファイバーの 検出・定量の事例集

2020年3月



国立研究開発法人 産業技術総合研究所
日本製紙株式会社

事業者や関連する試験機関が、測定を行う場合の参考となるように、CNFの検出・定量の手順や測定事例、注意点などをとりまとめた。

- | | |
|-----|---------------|
| 第1章 | はじめに |
| 第2章 | 酸分解法 |
| 第3章 | 酵素分解法 |
| 第4章 | 熱分解法：炭素分析 |
| 第5章 | 熱分解法：熱分解GC-MS |

2020年3月26日 産総研安全科学研究部門WEBサイトより無償公開

<https://www.aist-riss.jp/assessment/45276/>



謝辞

ご清聴ありがとうございました

本発表は、国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）の委託事業「非可食性植物由来化学品製造プロセス技術開発／CNF安全性評価手法の開発」（P13006）によるものです。本研究の関係者に深く感謝申し上げます。