

CNFの有害性試験手法の開発

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

藤田 克英

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

- CNFの検出・定量手法の開発
- CNFの気管内投与手法の開発
- 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

- 排出CNFの計測手法の確立及び排出・暴露評価事例の集積
- 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

各個別テーマは、CNF事業者のニーズを踏まえて設定

対象とするCNF

■ 多様なCNFの中から代表的な**3種を対象**とした。

TEMPO酸化CNF

幅3-4nmのマイクロフィブリル カルボキシル基

リン酸エステル化CNF

幅3-4 nmのマイクロフィブリル、リン酸基

機械解繊CNF

幅10nm、絡み合い

表面改質CNF

CNFの気管内投与手法の開発

■根拠

CNFの吸入影響評価のために、実験動物の肺に一様に分散する気管内投与手法の確立が必要

■研究開発目標

気管内投与のための試料調製方法の確立、肺試料のCNF計測手法の確立、気管内投与手法の確立

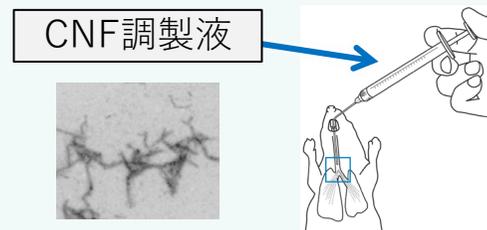
■プロジェクトメンバー

- 国立研究開発法人産業技術総合研究所
- 王子ホールディングス株式会社
(研究テーマ「気管内投与試験のためのCNF試料調製と計測」を担当)

CNFの気管内投与試験手法開発

① 気管内投与試験*のためのCNF試料調製と計測

- 試料調製方法の確立
- CNF調製液の殺菌手法の確立
- CNF射出状態の確認
- 化学染料による染色CNFの作製



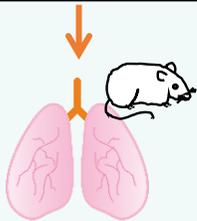
Penn-Century, Inc., US

*CNFを取り扱う労働者の健康影響を評価するため実施



② 気管内投与手法の開発

染色CNF



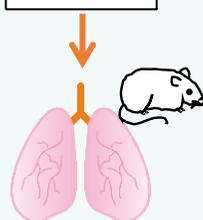
染色CNFによる気管内投与後のラット肺のCNF分布確認

- 肺試料の抽出
- 分光測定



③ 中長期の気管内投与試験

CNF



- 投与直後のラットの状態の確認
- 投与用量の決定
- 中長期気管内投与試験

研究のまとめ：CNFの気管内投与手法の開発

1. **CNFの調製手法と肺における計測手法**を開発した。
2. 染色CNFによる気管内投与後のラット肺・各葉での**CNFの分布確認の手法を開発**した。これにより、気管内投与手法を確立できる見込みを得た。
3. 調製した3種のCNF試料を使って、中長期のラット気管内投与試験を実施した。CNFの特性の違いにより異なるが、CNFによる**炎症反応**は、多層CNTに比べて低く、**経日的に減衰**した。

皮膚透過性試験手法の開発

■ 根拠

CNFの経皮影響評価のために、動物試験代替法である培養ヒト皮膚モデルによる皮膚透過性試験手法の確立が必要

■ 研究開発目標

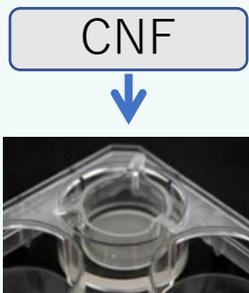
皮膚細胞モデルの確立、皮膚細胞モデルにおけるCNF検出手法の確立

■ プロジェクトメンバー

- 国立研究開発法人産業技術総合研究所
- 第一工業製薬株式会社
- 国立大学法人京都大学（再委託）

CNFの皮膚透過性試験のための手法開発

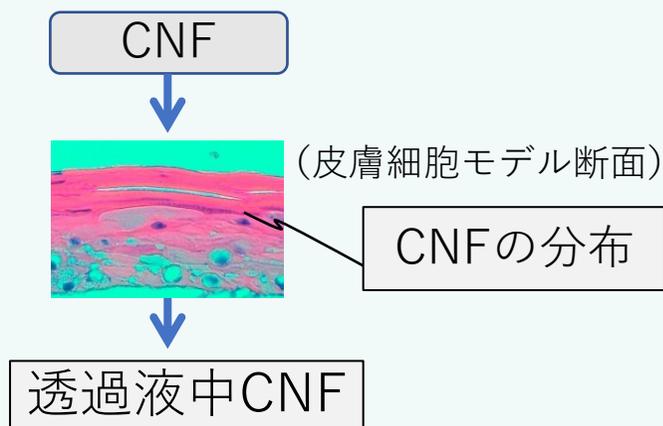
① 皮膚細胞モデルの確立



- CNF透過性試験に適した皮膚細胞モデルの選択
- 3次元培養ヒト皮膚モデルの培養条件の検討



② 皮膚細胞モデルにおけるCNF検出手法の開発



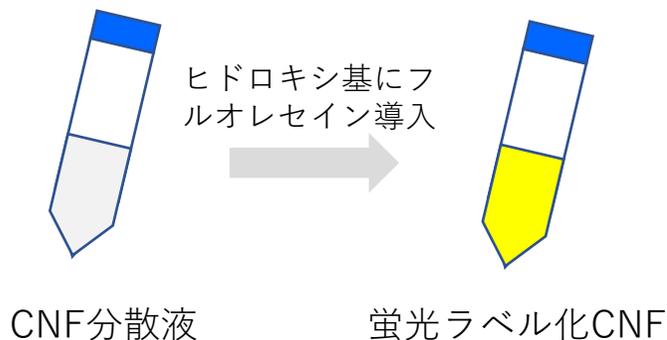
- 微量分析のため複数の手法の検討
 - CNFの蛍光ラベル化
 - CNFの化学染色

↓
蛍光分析、分光分析、蛍光観察、
TEM観察など

蛍光ラベル化CNFによる透過性試験

① 蛍光CNF調製

■ 蛍光ラベル化



■ 各種分析

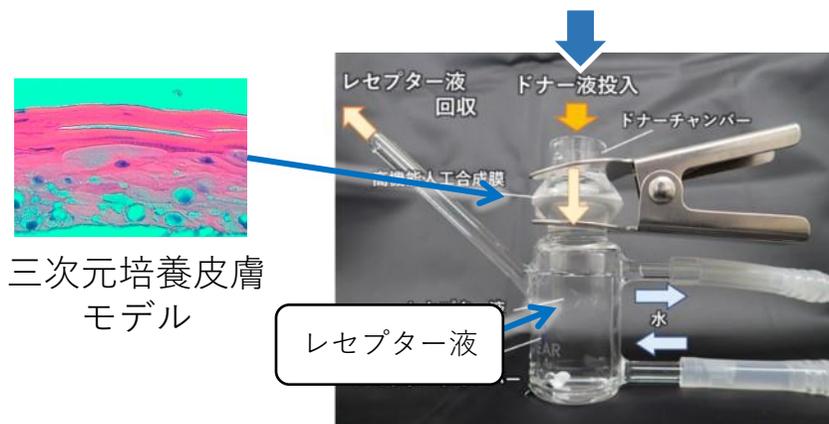
- ・ 蛍光物質導入量算出
- ・ 特性評価



紫外可視分光光度計

② 培養皮膚透過試験

■ 透過試験



静置型フランツ拡散セル

■ 各種分析 (レセプター)

- ・ CNFの微量定量
- ・ 累積透過量算出

プレートリーダー



■ 培養皮膚の観察



共焦点レーザー顕微鏡

研究のまとめ：皮膚透過性試験手法の開発

1. アミノ基導入条件の違いによる**CNFの蛍光標識化**を開発した。
2. 3次元培養皮膚モデルを使った透過性試験において、CNFの蛍光標識は、①レセプター中で検出されず、②角質上層に蛍光標識が留まることを観察した。
3. 3次元培養皮膚モデルにおいて、**化学染料による染色CNF**は観察されなかった。
4. CNFは、3次元培養皮膚モデルを**透過しない**可能性が高いことが示唆された。
5. TEMPO酸化CNFの皮膚刺激性試験を実施した。**皮膚刺激性はない**と判定した。

CNFの遺伝毒性評価

3種類のCNF（リン酸、TEMPO、機械解繊）の遺伝毒性をバッテリー試験により総合的に評価

1. Ames試験（OECD TG471準拠）
2. in vitro染色体異常試験（同TG473準拠）
3. ラット赤血球小核試験（同TG474準拠）

研究のまとめ：CNFの遺伝毒性評価

1. Ames試験の結果、遺伝子突然変異誘発性を示さなかった。
2. in vitro染色体異常試験の結果、染色体異常誘発性を示さなかった。
3. in vivo小核試験の結果、染色体損傷誘発性を示さなかった。
4. 以上の結果より、本研究に供試した3種類のCNF（リン酸、TEMPO、機械解繊）は、**遺伝毒性を示さない陰性**と結論した。

セルロースナノファイバーの有害性試験手順書

第1章 CNFの吸入影響試験

- 1.1 気管内投与試験
- 1.2 動物組織中のCNF分析

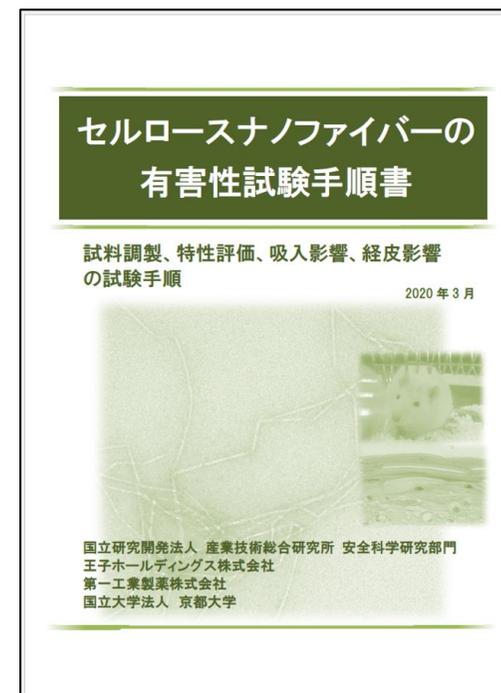
第2章 CNFの経皮影響試験

- 2.1 高機能人工合成膜による透過性試験
- 2.2 三次元培養皮膚モデルによる皮膚透過性試験
- 2.3 IN VITRO 皮膚刺激性試験

第3章 CNFの変異原性試験

- 3.1 細菌復帰突然変異試験
- 3.2 IN VITRO染色体異常試験
- 3.3 ラット赤血球小核試験
- 3.4 変異原性の総合評価

手順資料



CNFを取り扱う事業者や関連する試験機関が利用しやすいように、試験手順および評価結果を収載

2020年3月26日 産総研安全科学研究部門HPより無償公開

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



研究成果

1. 主な外部発表

- セルロースナノファイバーの吸入影響評価, 藤田克英他, 第47回日本毒性学会学術年会, 2020/06/30
- Evaluation of the effect of cellulose nanofibers on skin irritation using a 3D in vitro reconstructed human epidermis model, Fujita K et al., 55th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX2019), Helsinki, Finland, 2019/09/10
- セルロースナノファイバーの気管内投与手法の開発, 藤田克英他, 第46回日本毒性学会学術年会, 徳島市, 2019/06/26
- セルロースナノファイバーの有害性試験の手法開発, 藤田克英, 第24回日本環境毒性学会, 岐阜市, 2018/09/11
- 高機能人工合成膜を用いたセルロースナノファイバーの皮膚透過性試験手法の開発, 北野結花他, 第45回日本毒性学会学術年会, 大阪市, 2018/07/18

2. 論文

- Sai T and Fujita K. A review of pulmonary toxicity studies of nanocellulose. Inhal Toxicol. 2020, 32(6):231-239.
- Sai T, Maru J, Obara S, Endoh S, Kajihara H, Fujita K. Screening of preservatives and evaluation of sterilized cellulose nanofibers for toxicity studies. J Occup Health. 2020, 62(1):e12176

NEDOプロジェクト（2020～24年度予定）

炭素循環社会に貢献するセルロースナノファイバー
関連技術開発

／CNF利用技術の開発

／多様な製品用途に対応した有害性評価手法の開発
と安全性評価

研究開発の概略

1. 既存情報の集約・解析

- NEDO委託研究（2017-19年度）での研究成果
- CNF及び関連材料に関する文献情報

本日の発表

- 代表的な3種CNFを対象
- 手法開発が中心

2. 新たな試験・評価研究

- 簡易迅速な吸入影響評価手法の開発と評価
- 中皮腫発生の検証
- 生態影響の評価
- 多様性や実用化に応じた排出・暴露評価
- 生体安全性（動物試験）評価（福井大学）

- 評価研究項目を拡張
- 多様なCNFを対象
- 手法開発と共に評価実施

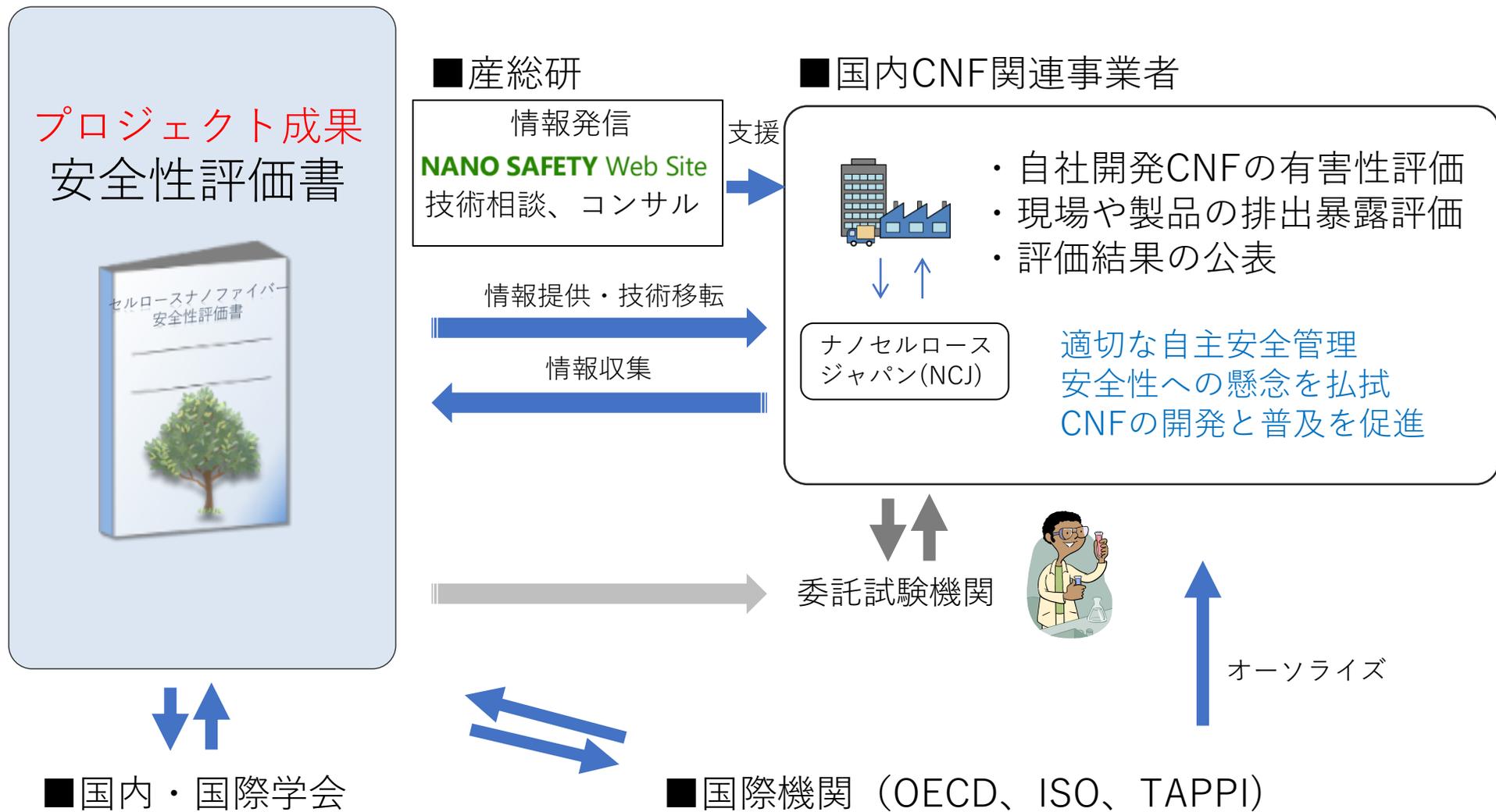


安全性評価書の作成と公開し、CNFの開発と普及を促進

- 安全性への懸念を払拭
- 適切な安全管理を支援
- より安全な製品の開発を支援



実用化の波及効果



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（NEEDO）の委託業務「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」の結果などから得られたものです。
本研究の関係者に深く感謝申し上げます。