

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「生体中ナノ粒子の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
計測フロンティア研究部門
環境管理研究部門

紹介する項目

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
②工業ナノ粒子の暴露評価手法の開発	(1) 排出シナリオの構築	産総研- 安全科学研究部門	
	(2) 環境中挙動モデルの構築	産総研- 環境管理技術研究部門	
	(3) 暴露評価技術の開発	産総研- 安全科学研究部門	
③工業ナノ粒子の有害性評価手法の開発	(1)工業ナノ粒子有害性評価試験の開発	ア) 吸入暴露試験法の開発と試験の実施	産業医科大学 産業生態科学研究所
		イ) 経皮暴露による皮膚形態学的影響の評価	鳥取大学医学部
		ウ) 生体影響プロファイルの作成・評価手法の開発	産総研- 健康工学研究部門
		エ) ESRイメージング技術による生体内酸化還元能への影響評価手法の開発	産総研- 計測フロンティア研究部門
	オ) ナノ粒子の全身影響の観点からの有害性影響評価法の開発	信州大学医学部	
	(2) 吸入暴露試験装置の開発	広島大学 大学院工学研究院	
(3) 有害性評価試験結果の外挿に関する研究	産総研- 安全科学研究部門		
④工業ナノ粒子のリスク評価及び適正管理の考え方の構築	(1) 工業ナノ粒子の詳細リスク評価	産総研- 安全科学研究部門	
	(2) ナノテクノロジーの社会的受容性に関する研究	産総研- 安全科学研究部門	

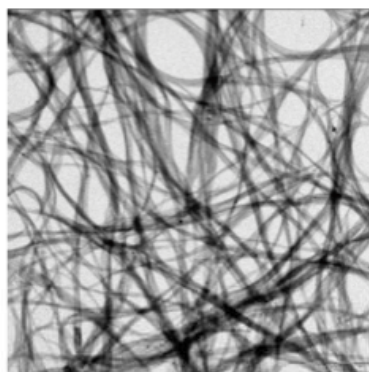
電子顕微鏡によるナノ粒子のキャラクタリゼーション技術開発 目標達成状況

公開

目標	研究開発成果	達成度
<ul style="list-style-type: none">・急速凍結技術を用いた液中試料調製法の開発及び手順書の作成・ナノ粒子を含有した生体試料観察のために、電子分光を用いた透過型電子顕微鏡観察手法の開発及び手順書の作成	<ul style="list-style-type: none">・急速凍結技術を用いた液中試料調製法の開発及び「試料調製・計測手順書」を作成し公開した。・カーボンナノ粒子を含有した生体試料の電子分光透過型電子顕微鏡観察手法の開発及び「試料調製・計測手順書」を作成し公開した。・フラレン、多層カーボンナノチューブ、および単層カーボンナノチューブを取り込んだ肺において、その局在の可視化を可能にした。	○

SWCNT分散液のTEM試料作成法

通常の滴下法



500nm

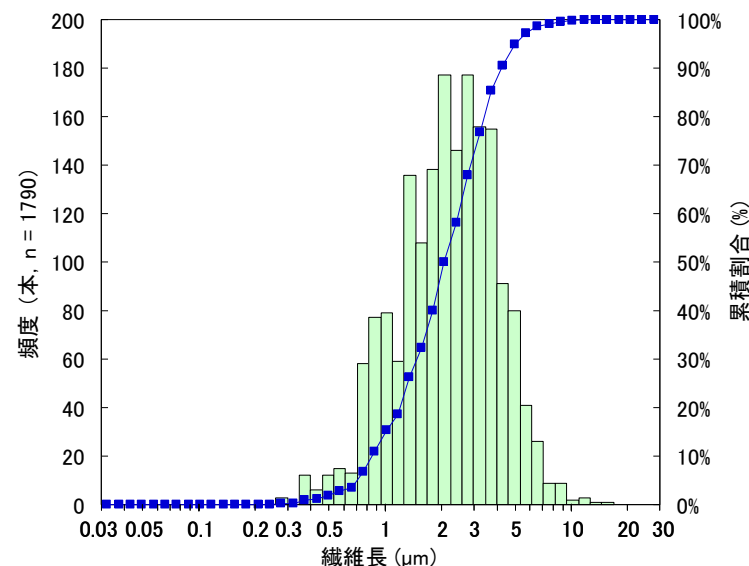
SWCNTは凝集しやすい。



急速凍結により形態を保持



急速真空乾燥



液中の分散状態を維持した観察が可能。
サイズ分布の解析が可能になった。

「成果の意義」

従来は液中の粒子の状態を保存した試料調製のニーズがなかった。
新規な調製手法を開発、「試料調製・計測手順書」を公開。
高分子ゲルなど含水性物質の計測にも応用可能。

カーボンナノ粒子を含有した生体試料の 電子分光透過型電子顕微鏡観察手法の開発

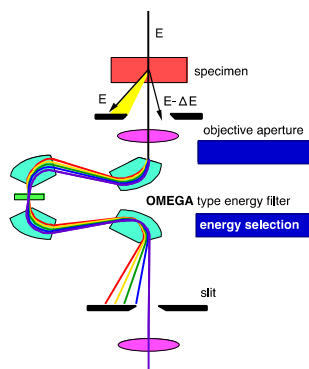
生体試料中のカーボンナノ粒子



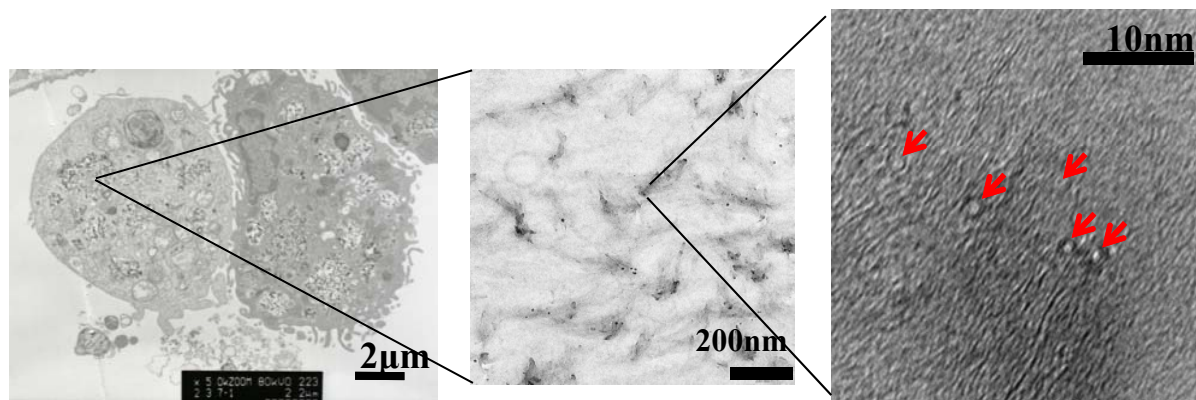
低コントラスト



エネルギー損失電子の除去



肺胞マクロファージ中のSWCNTの観察



「成果の意義」

生物細胞組織内のSWCNTの高分解能観察は世界初。
高分子や有機材料中のCNTの観察等、他の分野への応用が可能。

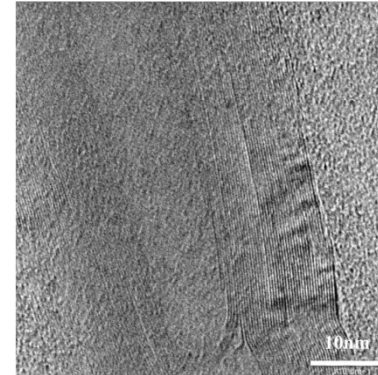
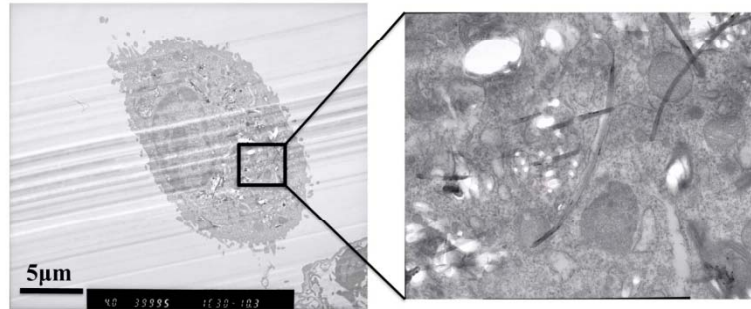
Y. Morimoto *et al.*, *Nanotoxicology*, 2011, Early Online, 1-10.

A. Ogami *et al.*, *Inhalation Toxicology*, 23(2011)407-416.

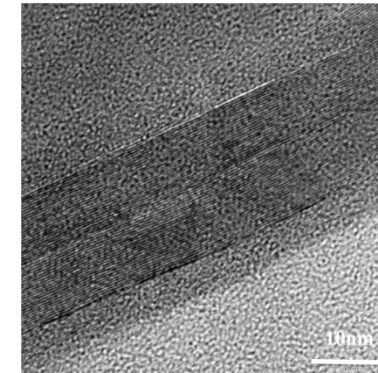
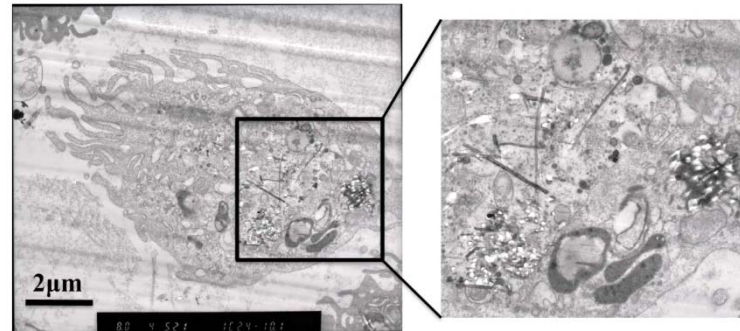
多層カーボンナノチューブを取り込んだ肺における 局在の可視化と経時変化

MWCNT (1mg)を気管内注入したラット肺

1ヶ月後



6ヶ月後



結晶性中空
構造を維持
したまま存
在

「成果の意義」

肺に取り込まれたCNTの経時変化観察は世界初。

従来は推定や計算しか方法がなかったが、有害性評価に新たな知見を提供。

Y. Morimoto *et al.*, *Nanotoxicology*, 2011, Early Online, 1-15

・成果の普及

1)「試料調製・計測手順書」の公開

- ・フラレン分散液の透過型電子顕微鏡試料の調整方法
- ・フラレンを取り込んだ肺組織の透過型電子顕微鏡試料の調整方法
- ・単層カーボンナノチューブ分散液の透過型電子顕微鏡試料の調整方法-急速凍結技法-
- ・多層カーボンナノチューブを取り込んだ肺組織の透過型電子顕微鏡試料の調整方法

2)論文(電顕パートの分筆)による成果普及 18報

「見通し」:

NEDO国際シンポジウムにおいて「試料調製・計測手順書」(日本語／英語)を配布したことにより、研究コミュニティにおいて開発技術の有効利用が期待される。

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 目標達成状況

目標	研究開発成果	達成度
<ul style="list-style-type: none">・工業ナノ粒子の組成及び活性酸素生成能等の測定方法の開発・有害性評価試験用実験動物の工業ナノ粒子の体内分布の測定	<ul style="list-style-type: none">・CNT中金属不純物の測定法、及びフラーレン、MWCNT、酸化チタン、酸化ニッケルナノ粒子から生成する一重項励起酸素、OHラジカル、過酸化水素の測定法を確立した。・フラーレン、MWCNT、酸化ニッケルの3種類の工業ナノ粒子の有害評価試験動物の体内分布の測定法を確立し、体内動態を明らかにした。・フラーレン及びMWCNTの暴露したラット体内分布測定及び残留量の経時変化測定に関する「試料調製・計測手順書」を作成し公開した。	○

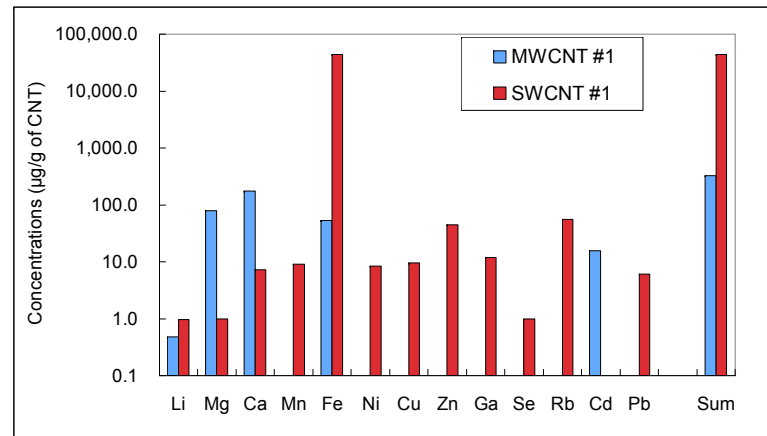
CNT中金属不純物の測定法および工業ナノ粒子から生成する活性酸素種の測定法

公開

CNT中の金属不純物の測定法

マイクロ波酸分解 /
誘導結合プラズマ質量分析法
誘導結合プラズマ発光分析法

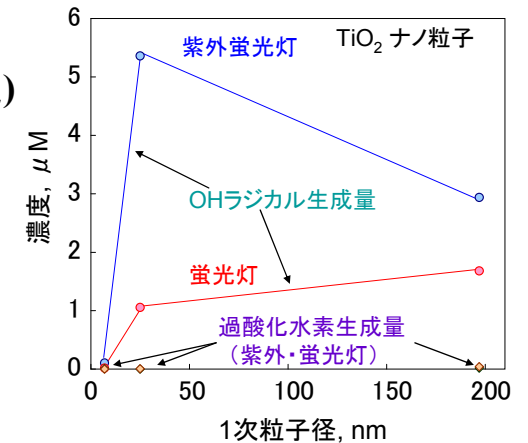
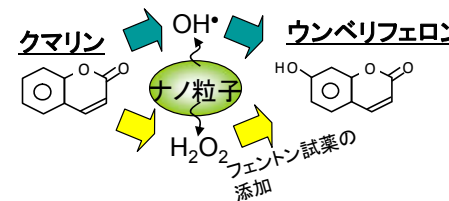
CNT粉体および分散液の31元素を定量



酸化チタンナノ粒子から生成する活性酸素種の測定法

	気中		液中
対象	一重項励起酸素	OHラジカル	OHラジカル、過酸化水素、スーパーオキサイドラジカル
手法	赤外波長高感度フotonカウンティング	レーザー誘起蛍光法	ESR、クマリン蛍光プローブ法

クマリン蛍光プローブ法 (OHラジカル, 過酸化水素測定)



「成果の意義」

- ・工業ナノ粒子(CNT, C₆₀, 金属酸化物)のキャラクタリゼーションを手順化
- ・有害性評価の基礎データを提供。今後広く引用されることが期待される

	MWCNT	C ₆₀	NiO
開発した分析法	酸分解・加熱処理 + 燃焼酸化赤外分光分析法	溶媒抽出 + 液体クロマトグラフィ-吸光光度法	マイクロ波分解-固相抽出 + 誘導結合プラズマ質量分析法
検出限界(ng)	300	9	5
曝露ラット 肺残留量測定	○ (経気暴露は完了。 気管内投与は進行中)	○	○
分析手順書	○	○	-

「成果の意義」

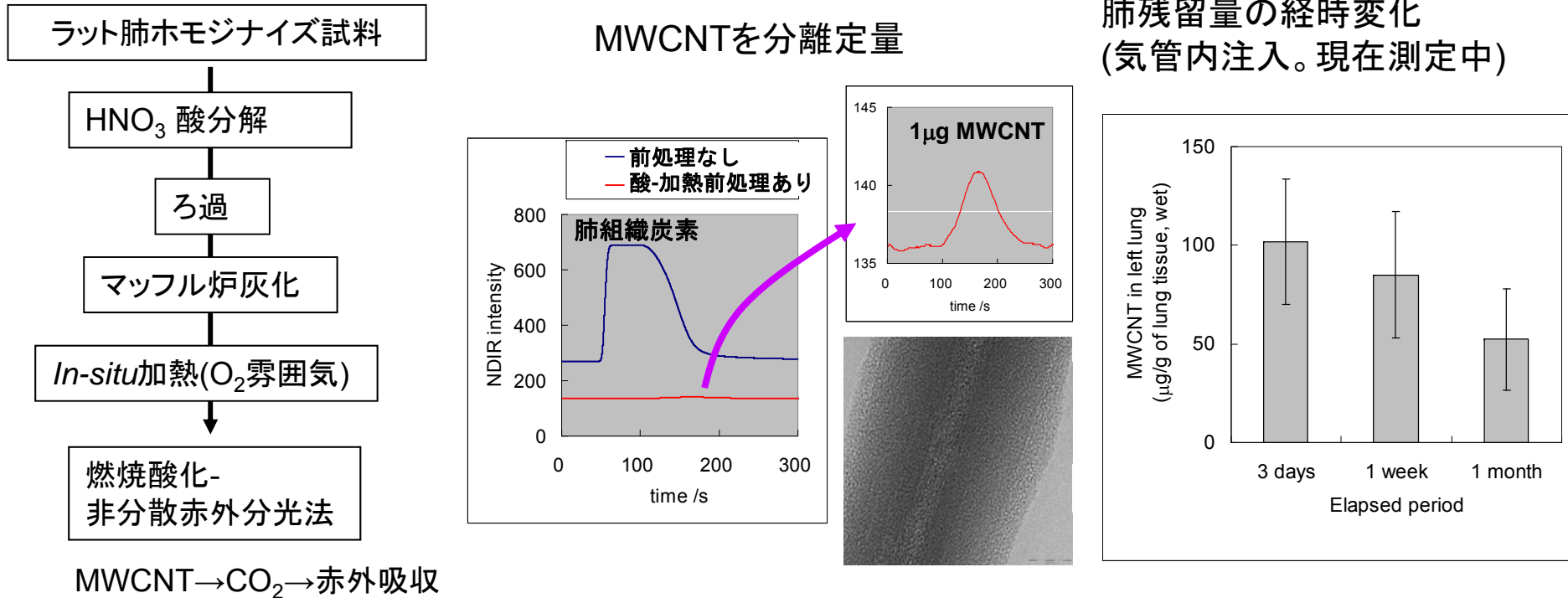
- ・3種類のナノ粒子の高感度・精確な体内分布測定法を確立
- ・MWCNTを標識化することなく初めて定量可能とした。残留量を正確に測定可能。
- ・MWCNTおよびフラーレンの「試料調製・計測手順書」を公開。

M. Tamura, et al, *Talanta* 84 (2011) 802–808, N. Shinohara, et al, *Toxicological Sciences* 118 (2010) 564–573

工業ナノ粒子を暴露したラット体内分布測定及び 残留量の経時変化測定

公開

例) MWCNT: 酸分解・加熱処理 + 燃烧酸化赤外分光分析



「成果の意義」

- ・開発した分析法により、MWCNT, C₆₀, NiOの残留挙動を解明
- ・測定精確性を検証済みのMWCNTの残留データの提供は、有害性評価の基礎データとして極めて有用。産業界での利用が期待される。

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

公開

・成果の普及

1) 「試料調製・計測手順書」の公開

- ・フラーレンの組織中含量分析方法
- ・多層カーボンナノチューブの組織中含量分析方法

2) 論文(分析パートの分筆)による成果普及 6報

「見通し」:

NEDO国際シンポジウムにおいて「試料調製・計測手順書」(日本語／英語)を配布したことにより、研究コミュニティにおいて開発技術の有効利用が期待される。