

「低炭素社会を実現する革新的カーボンナノ
チューブ複合材料開発プロジェクト」

(事後評価)分科会 資料5-2

研究開発項目②-1-② 「ナノ炭素材料及びその応用製品の排 出・暴露評価技術の確立」

発表者:サブテーマリーダー 藤田 克英

技術研究組合単層CNT融合新材料研究開発機構(TASC)

CNT事業部

(再委託先:産業医科大学、京都大学、岡山大学)

②-1-2: ナノ炭素材料及びその応用製品の排出・暴露評価技術の確立

成果目標とサブテーマの構成

目標

ナノ炭素材料やその応用製品を対象に、排出・暴露量や安全性を評価できる**自主安全管理支援技術を開発**し、排出・暴露評価の手引き、安全性試験総合手順書、ケーススタディ報告書を通して、事業者へ評価技術や事例の普及を図る

実施体制

(a) 排出・暴露評価技術の開発

飛散ナノ炭素の計測技術
現場調査・模擬排出試験

TASC(産総研)
京都大学
岡山大学

(b) 簡易有害性評価手法の開発

細胞試験および動物試験の
試料調製技術・実験設計手順

TASC(産総研)
産業医科大学

(c) 自主安全管理支援のための
ケーススタディ報告書作成と技術普及
内外への技術普及活動

TASC(産総研)

②-1-2:ナノ炭素材料及びその応用製品の排出・暴露評価技術の確立

最終目標に対する達成度(1)

テーマ	最終目標	進捗状況	達成度
②-1-2(a)	<p>・ナノ炭素材料、及びその応用製品の排出・暴露評価のデータ計測を行い、その評価技術を確立した上で、排出・暴露評価手引きとして策定し、普及を図る。</p>	<p>・ナノ炭素材料及びその応用製品を取り扱う現場において飛散したナノ炭素材料を評価する技術を確立した。</p> <p>・現場調査(6施設12工程)及び切削、摩耗、粉碎による模擬排出試験(30材料以上)を実施して、事例を集積し、排出・暴露特性を明らかにした。</p> <p>・上記の成果をとりまとめた「排出・暴露評価の手引き」を策定・公開し、普及活動を行った。</p>	<p>○</p> <p>○</p> <p>○</p>

◎:大きく上回って達成、○:達成、△:一部達成 ×:未達

②-1-2:ナノ炭素材料及びその応用製品の排出・暴露評価技術の確立

最終目標に対する達成度(2)

テーマ	最終目標	進捗状況	達成度
②-1-2 (b)	<p>・応用製品に使用されるナノ炭素材料の有害性評価手法(培養試験を活用した簡易手法)のために最低限必要な試験項目や試験系を設定した上で、動物試験によるデータ補完も含めた自主安全性評価手順として、ナノ炭素材料の安全性試験総合手順書を策定し、普及を図る。</p>	<ul style="list-style-type: none"> ・金属型および半導体型-単層CNTや多層CNT、剥離グラフェンを被験材料として、呼吸器への評価項目や試験系を設定し、培養細胞試験系を設定した。 ・金属型および半導体型-単層CNTの動物試験を実施し、病理学的知見等を取得し、培養細胞試験を補完した。 ・上記の成果をとりまとめた「安全性試験総合手順書」を策定・公開し、普及活動を行った。 	<p>○</p> <p>○</p> <p>○</p>

◎:大きく上回って達成、○:達成、△:一部達成 ×:未達

(次葉へ続く)

②-1-2: ナノ炭素材料及びその応用製品の排出・暴露評価技術の確立

最終目標に対する達成度 (3)

テーマ	最終目標	進捗状況	達成度
②-1-2(c)	<p>・(a), (b) で開発した安全性評価手法等に基づき、具体的なナノ材料に適用した安全管理例(ケーススタディ)報告書を作成する。</p> <p>・国際的な機関(OECD、ISO等)の動向を的確に把握し、国際標準化へ向けた取り組みを行っている経済産業省の担当課など日本の窓口機関と連携し、データ提供等を行う。</p>	<p>・単層CNT (SG及びeDIPS) のケーススタディ報告書を改訂し公開するとともに、グラフェンのケーススタディ報告書を新たに作成・公開し、普及活動を行った。</p> <p>・国際的な機関(OECD、ISO等)の会議に参加し、動向をNanoSafety Webサイトで紹介した。また、本事業における活動をOECDの会議で紹介するとともに、安全性試験のための試料調製に係る評価手法をISO化した。</p>	<p>○</p> <p>○</p>

◎: 大きく上回って達成、 ○: 達成、 △: 一部達成 ×: 未達

②-1-2:ナノ炭素材料及びその応用製品の排出・暴露評価技術の確立

自主安全管理技術の必要性

◆背景◆

- 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、安全に最大限の注意を払っていることをエビデンス付で関係者に示す必要がある。

備えるべき要件:簡易、迅速、安価

②-1-2: ナノ炭素材料及びその応用製品の排出・暴露評価技術の確立

研究開発のターゲット

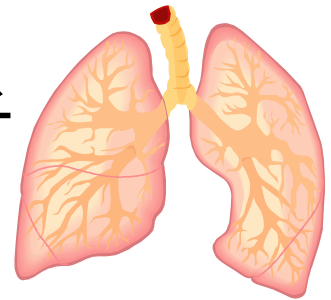
◆ 対象: 製造加工現場の作業者

ナノ炭素材料のライフサイクルにおいて、最も高い暴露の状況が想定されること



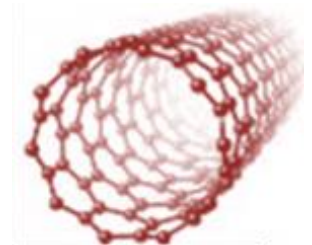
◆ 経路: 吸入(肺への影響)

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: ナノ炭素材料

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



②-1-2: ナノ炭素材料及びその応用製品の排出・暴露評価技術の確立

プロジェクトの経緯

- ・ナノ材料が社会に受け入れられるには、技術開発と並行して安全性を確保することが求められる。
- ・多様なバリエーションがあり、作業環境も多様である。



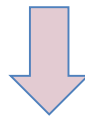
事業者自らが、取り扱うナノ材料の有害性と作業環境の安全を確認することが必要。



簡易自主安全管理技術

H22-26年度

NEDO「低炭素化社会を実現する革新的カーボンナノチューブ複合材料開発」
研究開発項目③「ナノ材料簡易自主安全管理技術の構築」



- ・単層CNT自体が対象
- ・簡易な培養細胞試験が主体

H26-28年度

NEDO「低炭素化社会を実現するナノ炭素材料実用化プロジェクト」
②-1-2「ナノ炭素材料及びその応用製品の排出・暴露評価技術の確立」

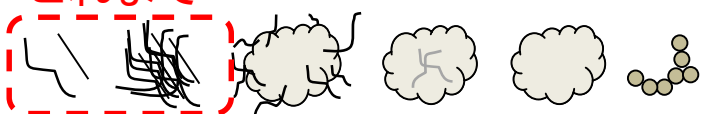
- ・CNTを利用した応用製品へ対象を拡張(②-1-2(a))
- ・動物試験を行いたい事業者へも対応(②-1-2(b))
- ・剥離グラフェンのケーススタディ報告書を新たに執筆(②-1-2(c))

②-1-2(a) 排出・暴露評価技術の開発

(1) 飛散ナノ炭素の計測技術開発

産総研

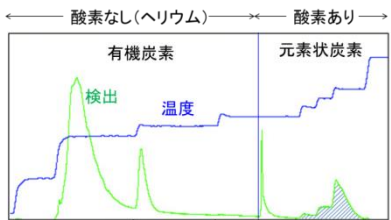
これまで



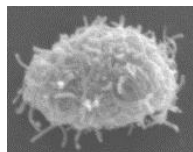
多様な排出粒子
(ナノ炭素含有、非含有)

分離定量

形態識別



熱炭素分析



定量的捕集技術+
電子顕微鏡観察

利用・検証



課題抽出

(2) 現場調査・模擬試験の実施

産総研

現場調査

加工模擬



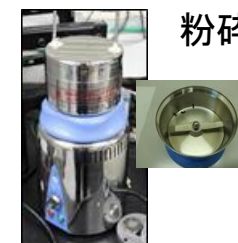
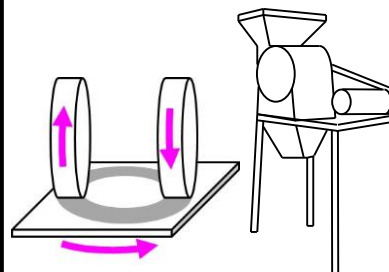
切削

京大 現実的な模擬
使用・廃棄

岡山大 解析的な
模擬

摩耗、劣化、粉砕

粉砕



材料比較、力の定量化

CNT計測手続き→
他のナノ炭素材料
及び応用製品へ拡張



計測技術

事例

(3) 排出・暴露評価の手引き
の作成・公開



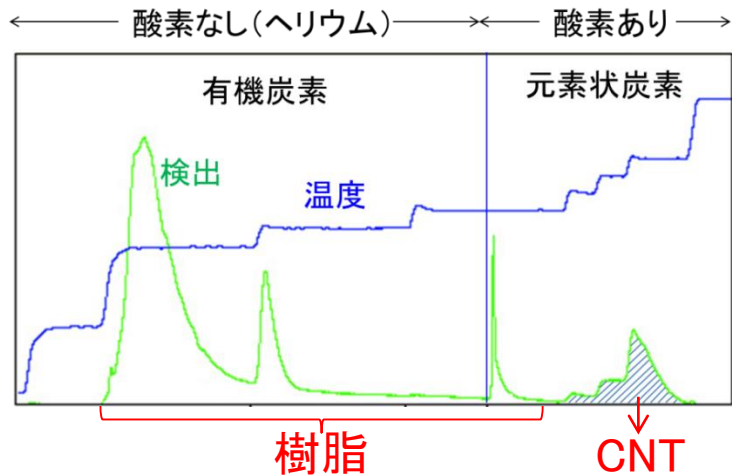
事業所における自主安全管理の支援

国際機関との連携活動

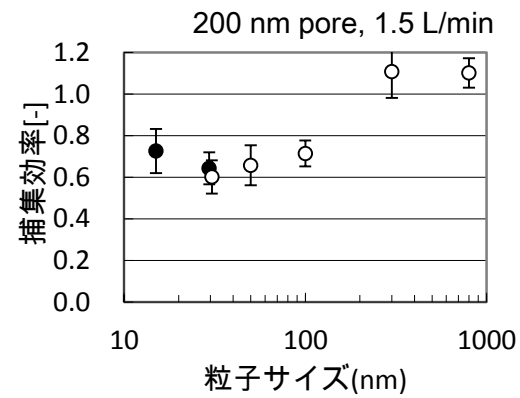
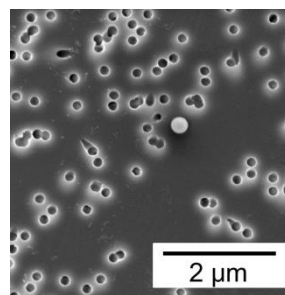
(1) 飛散ナノ炭素の計測技術開発

熱炭素分析による複合飛散物中のCNT質量の定量

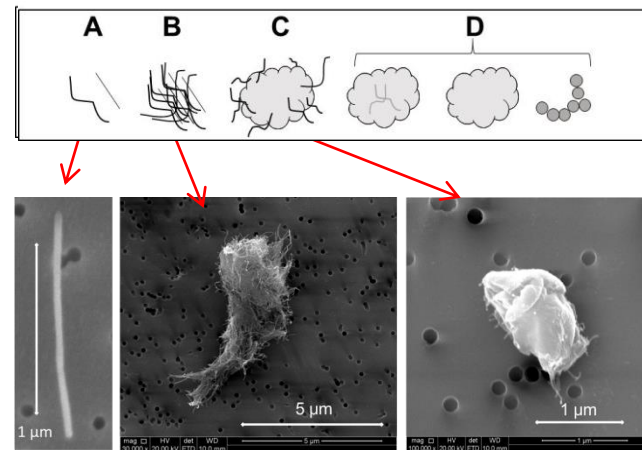
樹脂の種類、CNTの種類・含有量による計測の可否を評価。最適な条件を検討。



定量的捕集技術の開発 電子顕微鏡による個数・割合把握



ニュークリポアフィルタの捕集効率



飛散粒子の個数・割合把握

- 母材成分共存下における飛散CNT質量の定量法として、10種以上の材料を対象に熱炭素分析の有用性を評価し、最適条件を取得。
- 電子顕微鏡観察のための定量的捕集技術として、ニュークリポアフィルタの捕集効率を評価し、最適条件を取得。CNT及びCNT含有粒子の個数定量や割合把握に適用。

②-1-2(a) 排出・暴露評価技術の開発

(2) 現場調査・模擬試験の実施

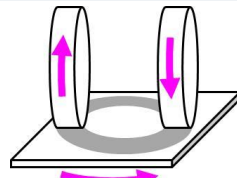
>30材料



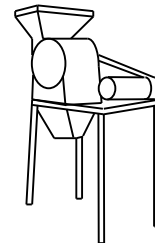
産総研
現場調査
6施設
12工程



産総研
加工模擬
切削試験



京都大
使用模擬
摩耗試験＋
劣化試験 (UV、熱)



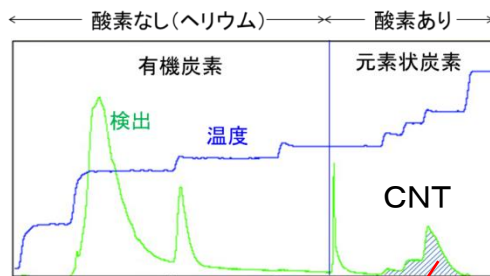
京都大
廃棄模擬
破碎試験



岡山大
解析的な模擬
破碎試験

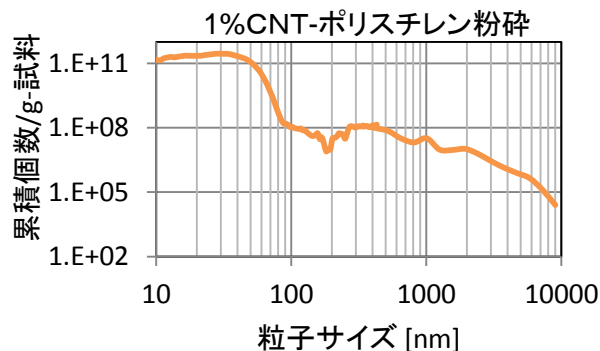


フィルタ捕集

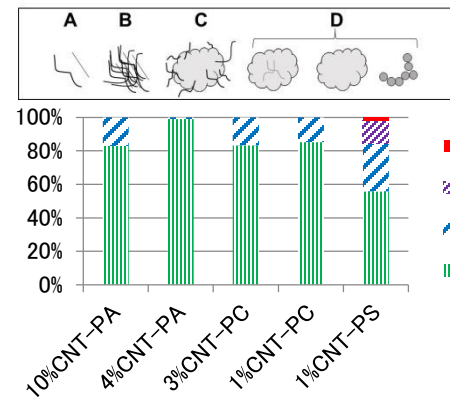


許容濃度との比較

CNTの定量



飛散粒子の粒径分布



飛散粒子の形態

6施設12工程について現場調査、30種以上の材料について模擬排出試験を実施し、飛散粒子の濃度・サイズ・形態などのデータを取得。計測技術の有用性を検証すると共に、評価事例を集積し、排出・暴露特性を明らかにした。

(3) 手引きの作成・技術普及

■ 取り扱うナノ炭素材料の排出暴露管理を自主的に行う際に事業者が参照できる

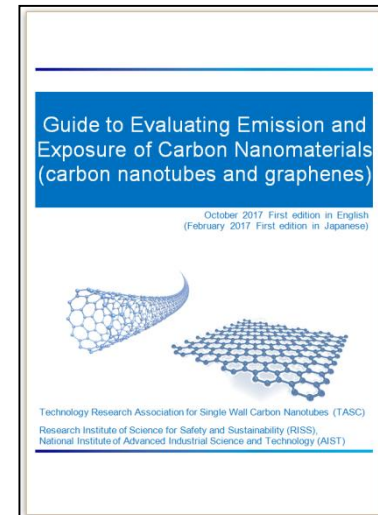
「排出・暴露評価の手引き」を無償で公開(2017.2)

「CNTの作業環境計測の手引き」(2013年発行)を改訂し、対象を拡大

CNT粉体→複合材料、グラフェン

計測手法の説明や現実的な計測・管理方法の提案に加えて、事業者が利用しやすいように、評価事例を収載。

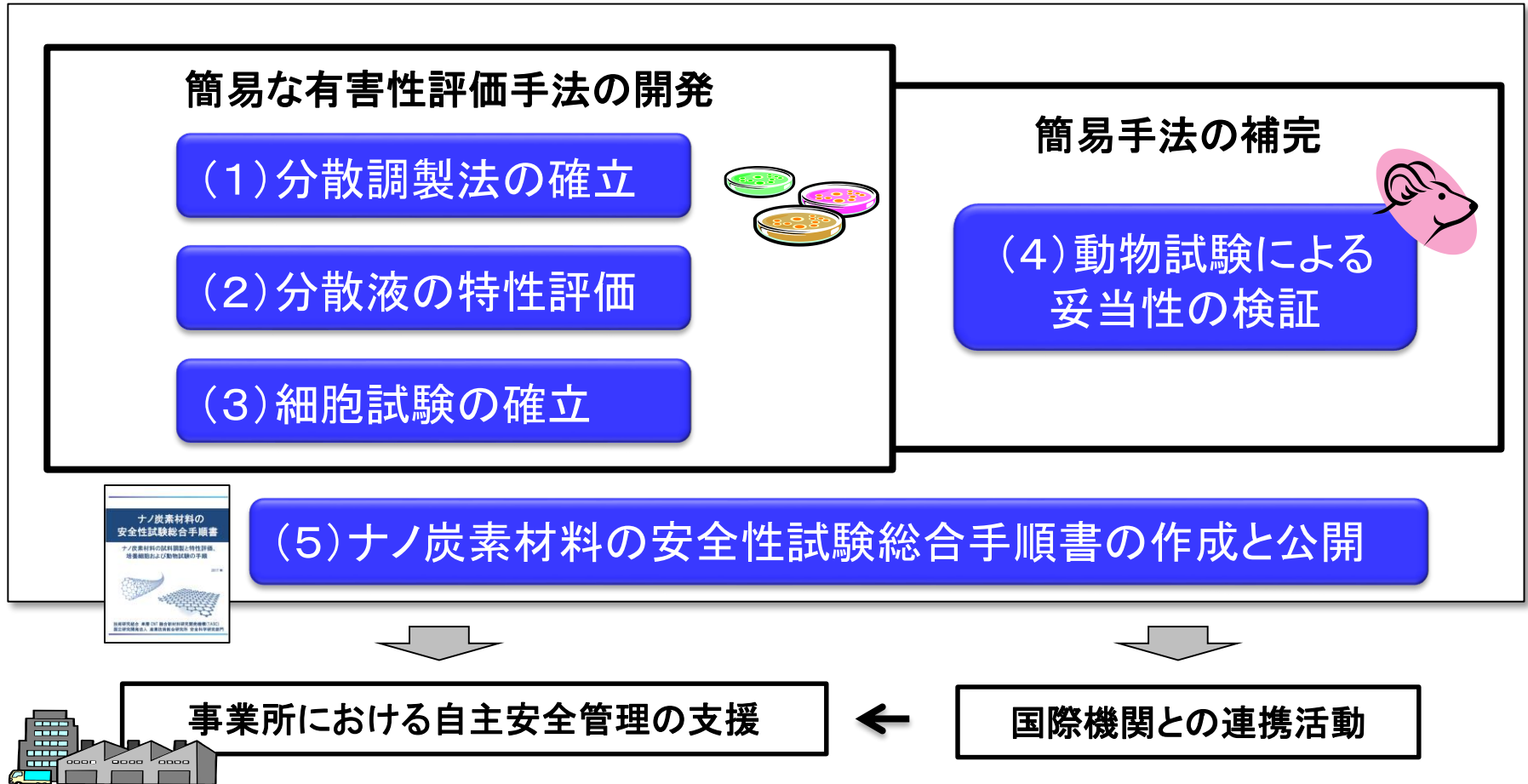
■ 英語版を、近日中に公開予定



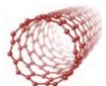
事業者の自主安全管理(排出暴露管理)を支援

②-1-2(b) 簡易有害性評価手法の開発

簡易有害性評価手法の開発の概要

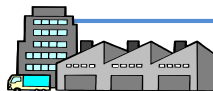


有害性評価における培養細胞試験の位置付け

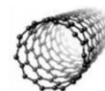


SG単層CNT

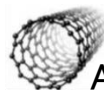
NEDO「ナノ粒子特性評価手法の研究開発」(2006FY~2010FY)



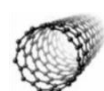
多様な開発材料



A1



A2



A3



本プロジェクト

吸入暴露試験



長期・高コスト

呼吸器系動物試験のゴールドスタンダード

気管内投与試験



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



短期・低コスト

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

「吸入暴露試験」の主な課題

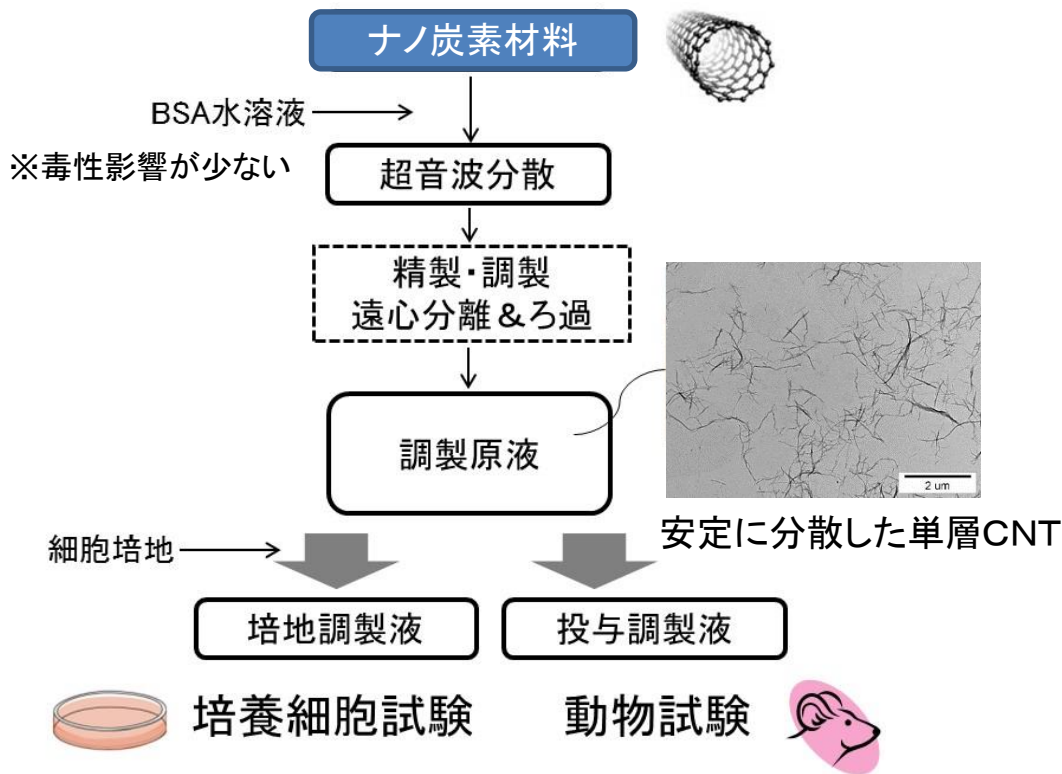
- ・試験期間やコストの点から、多様な開発材料の有害性評価はできない

「培養細胞試験」の利点

- ・動物試験より、迅速に結果が得られる
- ・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

②-1-2(b) 簡易有害性評価手法の開発

(1) 分散調製法の確立



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、凝集したナノ炭素材料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は使用できない。



超音波照射時間と遠心分離の条件を制御することで、調製原液中でのナノ炭素材料の長さや凝集サイズを再現性高く、変化させることができた。

高い再現性を持つ簡易で迅速な分散調製方法を開発

②-1-2(b) 簡易有害性評価手法の開発

(2) 培養細胞試験による有害性影響評価

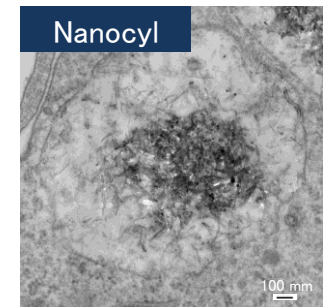
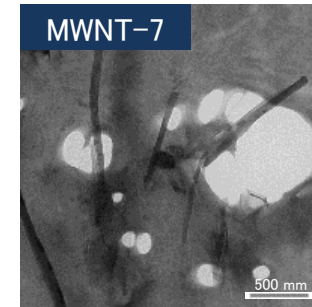
開発した分散調製方法を使い、各種CNTに対し、ラット肺胞マクロファージ(NR8383)による細胞試験を実施。

(1) 単層CNTは、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、強い生存影響を及ぼさない。

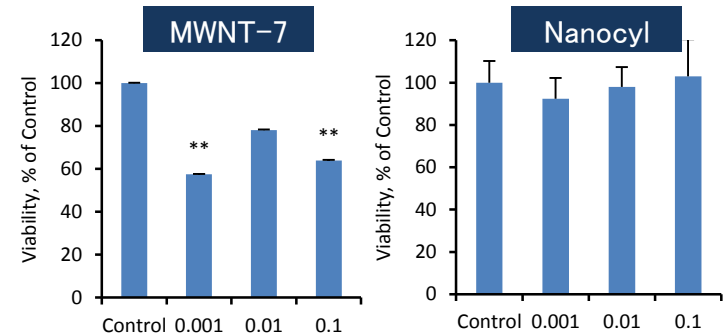
(2) 半導体型および金属型・単層CNTは、細胞内に取り込まれ、強い生存影響を及ぼさない。

(3) 多層CNTは、種類により、細胞内への取り込まれ方や生存影響が異なる(右図)。

(4) 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、CNTの種類や長さなどの物理的性状に依存する。



多層CNTを暴露したラット肺胞マクロファージのTEM画像 (MWNT-7: 細胞質中に分散、Nanocyl: Lysosomeに局在)



多層CNTを暴露したラット肺胞マクロファージの生存影響 (MWNT-7: 有意な細胞生存影響が認められた。Nanocyl: 有意な影響が認められなかった。)

開発した分散調製・計測・細胞試験手法は、単層CNTや、多層CNT、ナノ炭素応用材料に適用でき、迅速な培養細胞試験による簡易手法を確立することができた。

②-1-2(b) 簡易有害性評価手法の開発

(3) 動物試験による有害性影響評価

■ 気管内投与試験

半導体型および金属型-単層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180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。

⇒両投与群で一般状態の異常は観察されず、また、投与直後を除いて肺組織への影響の差異はなかった。

■ 遺伝毒性試験

半導体型および金属型-単層CNT、剥離グラフェンを対象材料として、Ames試験とマウス小核試験からなる遺伝毒性試験を実施。

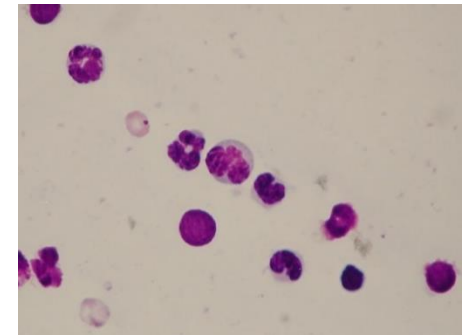
⇒いずれの投与群においても、遺伝子突然変異誘発性や染色体損傷誘発性は観察されなかった。

半導体型単層CNT試料

金属型単層CNT試料



気管内投与試験に使用した半導体型
および金属型-単層CNT



半導体型-単層CNT投与による
マウス赤血球(小核の出現なし)

ナノ炭素応用材料およびグラフェンをケーススタディとした動物試験を実施し、培養細胞試験による有害性評価を補完した。

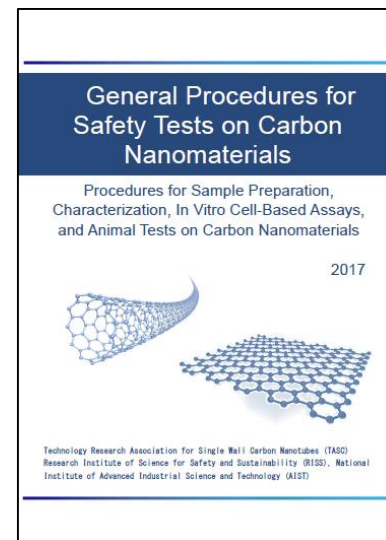
(4) 事業者の自主安全管理の支援

■事業者が、取り扱うCNTの安全性評価と管理を自主的に行う際に参照できる「**ナノ炭素材料の安全性試験総合手順書**」を無償で公開(2017.2)。

計測手法や手順の説明に加えて、事業者が利用しやすいように、単層CNTや多層CNT、剥離グラフェン、ナノ炭素応用材料をケーススタディーとして具体的な実施例を収載。

■**英語版を無償で公開(2017.10)**
自主安全管理や、国際機関との連携や国際標準化活動等に役立てる。

(次葉へ続く)

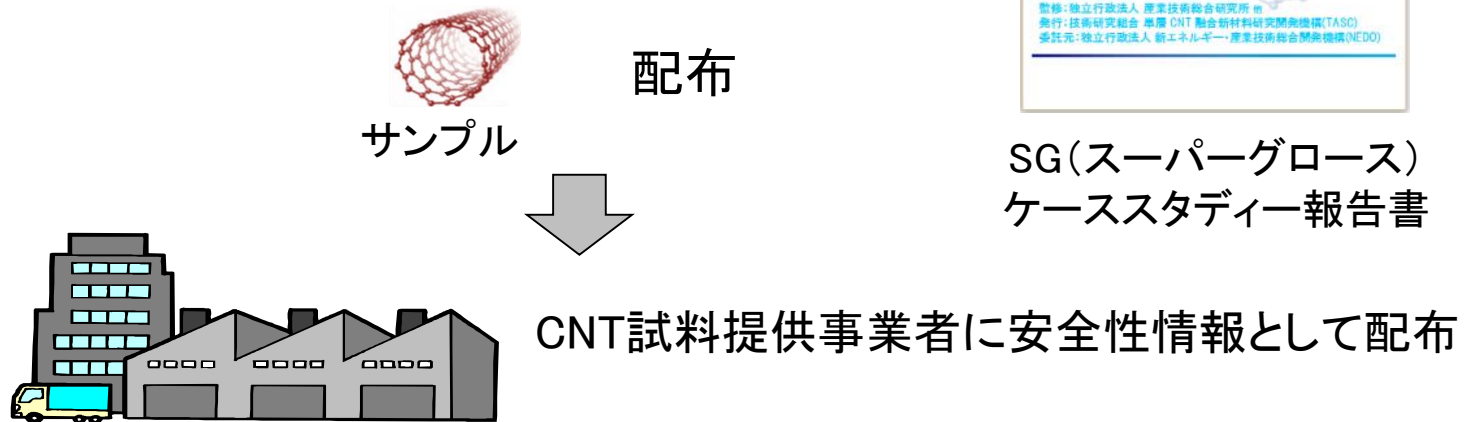


■ ケーススタディ報告書「安全性データおよびTASC自主安全管理の紹介」の公開

1. SG(第4版: 2016年6月)
2. eDIPS(第4版: 2016年6月)
3. 剥離グラフェン(初版: 2017年2月)



SG(スーパーグロス) ケーススタディー報告書



②-1-2(c) ケーススタディ報告書作成と技術普及

(1) 単層CNTのケーススタディ報告書

TASCにおける安全管理の“**ケーススタディ報告書**(SG第4版およびeDIPS第4版)”を作成し、公開(2016年6月)。CNT等のサンプル提供先に配布。

ケーススタディ報告書

「安全性データおよびTASC自主安全管理の紹介」

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
3. 暴露評価情報

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
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
4. 国際標準化への対応

TASC
管理例



SG第3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(前期成果)。

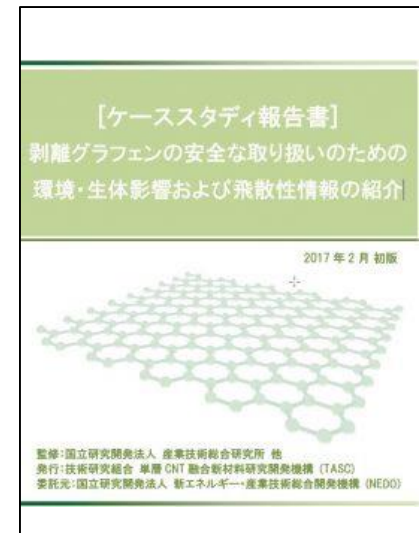
(2) グラフェンのケーススタディ報告書

■単層CNTに続き、実施対象としてTASCで材料化を進めている剥離グラフェンを選定

- グラフェン関連物質に関しては、細胞、動物および環境に対する影響を試験した論文がここ数年増加してきた。
- **遺伝毒性には要注意**。酸化グラフェンの動物試験で報告(Liu, et al., 2013)
- この評価がグラフェン材料全体に援用されると、ISO/TS12901によるコントロールバンディングにおける推奨使用環境が安全側に設定されて厳しくなる可能性がある。

■本事業では文献情報を中心に初版を作成し、公開(2017年2月)。遺伝毒性試験及び飛散性試験の結果を追加した。

- ただし、動物試験を用いた詳細な毒性評価は、サイズ、厚み、表面処理等が影響するため、最終製品のスペックが決定されてから実施するのがよい。



(3) 成果普及

行政機関との連携

■ 経産省プロジェクトへの協力

「ナノ材料気管内試験法等の国際標準化に関する調査」(平成28～29年度)における気管内投与試験の国内ミニラウンドロビン試験に協力し、本プロジェクトで確立したCNT調製や、生体中のCNT分析を実施。

自主安全管理支援に資する情報発信

一部前期の成果

■ Nanosafety website

TASCの成果や、ナノ炭素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体系的に提供



(4) 国際機関との連携および標準化活動

■日本が提案・主導した**ISO技術仕様書**、ISO/TS 19337の発行(2016/3/23)

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

「ナノ物体固有の毒性を評価するインビトロ試験のためのナノ物体の作業懸濁液の特性」

ナノ材料固有の毒性を評価するin vitro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**であり、ナノ材料の有害性評価の適正化に寄与するもの。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。

■**OECD工業ナノ材料部会**が各国の活動報告を年1回とりまとめる調査(Tour de Table)に対し、TS 19337の発行、ケーススタディ報告書の改訂など本事業の活動内容を経済産業省を通じて回答し、掲載が認められた(2016/9)。

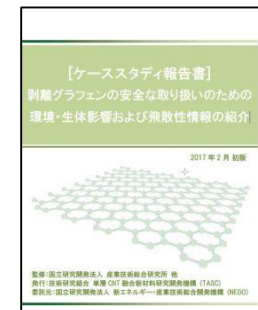
【参考】WPMNが実施したスポンサーシッププログラムの報告書「ドシエ」の要約版が一般公開された。日本は、多層CNT、単層CNT、フラーレンを担当。単層CNTでは、SG-CNTについてTASCが実施した環境中生物への影響試験の結果が掲載されている(2016/7/7)。

②-1-2: ナノ炭素材料及びその応用製品の排出・暴露評価技術の確立

成果普及実績

■ 成果物のダウンロードおよび冊子配布数

・排出・暴露評価の手引き	350以上
・安全性試験総合手順書	450以上
・ケーススタディ報告書(SG第4版)	300以上
・ケーススタディ報告書(eDIPS第4版)	150以上
・ケーススタディ報告書(グラフェン)	150以上
・作業環境計測の手引き	1,900以上
・安全性試験手順書	2,200以上
・ケーススタディ報告書(SG第1-3版)	400以上
・ケーススタディ報告書(eDIPS第1-3版)	150以上



前期
成果

■ 論文等: 14件

※実績の数値は2017年9月時点

■ ナノテクノロジービジネス推進協議会NBCIの活動(ナノカーボンWG)への協力・情報提供

②-1-2:ナノ炭素材料及びその応用製品の排出・暴露評価技術の確立

今後の展開_成果の実用化・事業化(1)

手引き、手順書、ケーススタディ報告書の普及活動等により、事業者におけるナノ炭素材料の適切な安全管理と応用開発の促進を支援

- 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ケーススタディ報告書が利用され、認可に貢献(前期成果)
- 技術相談による事業者の安全管理支援: 43件
- 暴露評価:現場調査(作業環境計測): 6件
- 暴露評価:模擬排出試験による製品評価: 5件
- 有害性評価:技術コンサルティング: 1件(平成29年度開始)
- 有害性評価:共同研究: 2件(平成29年度開始)
- NBCIの活動(ナノ材料安全分科会)への協力・情報提供

②-1-2:ナノ炭素材料及びその応用製品の排出・暴露評価技術の確立

今後の展開_成果の実用化・事業化(2)

- 経産省プロジェクト「ナノ材料気管内試験法等の国際標準化に関する調査」(平成28～29年度)における気管内投与試験の国内ミニラウンドロビン試験において、本プロジェクトで確立したCNT調製法や生体中のCNT分析法を利用
- NEDO「非可食性植物由来化学品製造プロセス技術開発/ナノセルロース安全性評価手法の開発」(平成29～31年度)において、本プロジェクトで確立した技術を応用
- 暴露の国際標準化文書 ISO/TC229 WG3/PG29 “Evaluation of methods for assessing the release of nanomaterials from commercial, nanomaterial containing polymer composites”の作成に貢献