

#### 化学物質の安全管理に関するシンポジウム 2021年2月4日

## セルロースナノファイバー実用化 支援のための安全性評価

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



## 研究の背景と本日の内容

セルロースナノファイバー(CNF)は、バイオマス由来の高性能素材であるため、その特徴を生かし、今後、幅広い分野へのCNFの活用が見込まれている。

一方、CNFは繊維状の工業ナノ材料であることから、製造段階における**ヒト健康影響**や、消費・廃棄段階における**環境影響**などが懸念されている。このため、産総研ではCNFの実装化支援を目的に、CNFの**安全性評価手法の開発**や多様な用途に対する**安全性評価**を行っている。

本講演では、これまで実施したNEDOプロジェクト(2017-2019年度)の成果や、現在実施中のNEDOプロジェクト(2020-2024年度)について紹介する。



## 産総研でのナノ安全評価研究の流れ

### (2)経産省委託

2011~2015年度 2016~2017年度

#### 行政による管理の枠組み



2006~2010年度

「ナノ粒子特性評価手法の 研究開発上

①「ナノ材料の安全・安心 確保のための国際先導的安 全性評価技術の開発 |

②「ナノ材料気管内投与 試験法等の国際標準化に 関する調査 |



#### 事業者による簡易自主管理



#### (3) NEDO委託・研究組合事業

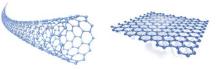
2010~2013年度

2014~2016年度

①「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し

② 「低炭素社会を実現す るナノ炭素材料実用化プ ロジェクトー

ナノ炭素材料



#### (4) NEDO委託

(5) NEDO委託

2017~2019年度

2020~2024年度予定

③「CNF安全性評価手法の開発」

④ 「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

セルロースナノファイバー



## CNFの安全性評価の必要性

CNFは天然素材で安全そうに見えるけど。。。

- 新しい材料が社会で使われていくためには、安全性を 確認しておくことが重要。
- ナノ材料については、市場化にあたって安全性の確認 を求めるのが国際的な流れ。
- 実際には有害性や暴露可能性が低いとしても、情報がないことで、風評被害が起きたり、他の材料との競争で不利になったりする可能性がある。
- 米国やカナダがセルロースナノクリスタル(CNC)の安全性評価のデータを積極的に公表しているのに対し、日本が得意とするCNFの安全性評価事例は少ない。



## CNFの特徴

- 特有の粘性(スラリー状)
- 熱安定性の低さ
- 低吸光度
- 生物(植物)起源
- 高分散性(細さ)
- 分解性 (糖を生成)
- 物理化学特性の多様性(表面修飾、不純物、解繊状態)
- > CNF安全性評価のためには特徴を考慮した試験方法の開発が必要
  - 消費者製品用途への利用拡大が予想
- ▶ 排出・暴露評価手法の開発、暴露シナリオによるケース スタディが必要



## NEDOプロジェクト (2017~19年度)

「非可食性植物由来化学品製造プロセス技術開発」

- (1) セルロースナノファイバーの一貫製造プロセスと部材化技術開発
- (1) 2 CNF安全性評価手法の開発

### 安全性評価のための試験方法の開発を中心とした研究開発

実施体制

産業技術総合研究所

王子ホールディングス株式会社

第一工業製薬株式会社

大王製紙株式会社

日本製紙株式会社

国立大学法人京都大学(再委託)

- 目的:事業者による自主的な安全管理の取り組みに活用されること
- 研究開発成果:手引き・手順書、事例集として公開



## 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のミクロフィブリル カルボキシル基

リン酸エステル化CNF

幅3-4 nmのミクロフィブリル、リン酸基

機械解繊CNF

幅10nm、絡み合い

■排出・暴露評価では、**リグノCNF複合材**を対象に加えた。

リグノCNF複合材

樹脂と混練する過程で解繊 (京都プロセス)

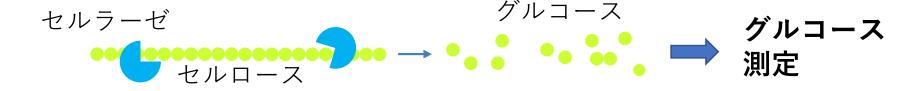
-表面改質CNF



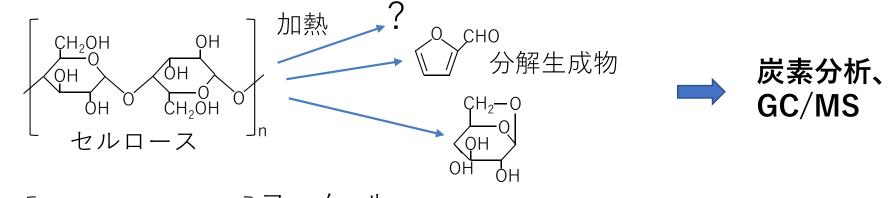
## 1)-1 CNFの検出・定量手法の開発

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

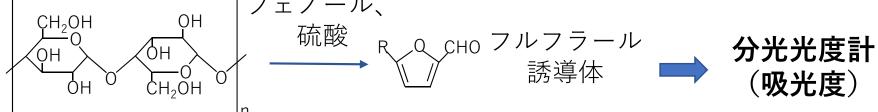
#### 酵素分解



### 熱分解



### 酸分解





## 1)-2 CNFの気管内投与試験のための手法開発

#### ① 気管内投与試験※のためのCNF試料調製と計測

CNF調製液

Penn-Century, Inc., US

- ・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

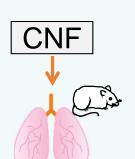
※CNFを取り扱う労働者の健康影響を評価するため実施

**CNF** 





#### ② 調製試料を用いた気管内投与 試験



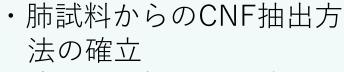
- ・投与直後のラットの状態の確認
- ・中長期の気管内投与試験の実施





#### ③ 気管内投与後の肺試料のCNF 計測

適切な気管内投与の確認のため

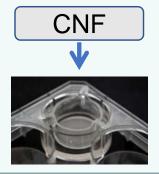






## 1)-3 CNFの皮膚透過性試験のための手法開発

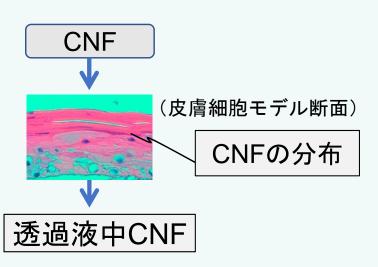
① 皮膚細胞モデルの確立



- 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

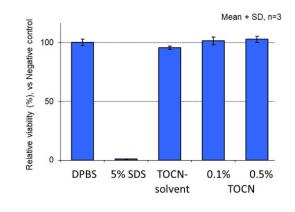
蛍光分析、分光分析、蛍光観察、 TEM観察など



## 1)-4 皮膚刺激性試験および変異原性試験

#### (1) CNFの皮膚刺激性試験

三次元培養皮膚モデル(EpiDerm™、 SkinEthic™ RHE)におけるTEMPO酸 化CNFの**生存率の低下は認められない** (OECD TG439準拠)。



Fujita K. et al., EUROTOX 2019

#### (2) CNFの変異原性試験

総合的な変異原性試験 (バッテリー試験)

- ① Ames試験(同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)



TEMPO酸化CNF、リン酸化CNF、機械解繊 CNFでの試験結果は、すべて**陰性** 

- TEMPO酸化CNFは、**非刺激性**と判定。
- 3種類のCNFは、**変異原性を示さない(陰性**)と結論。

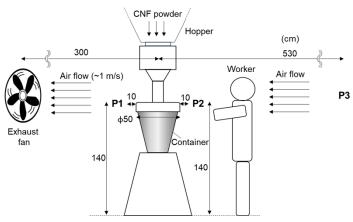


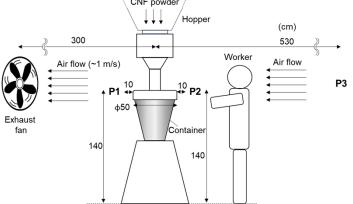
### 2)-1 排出CNFの計測手法の確立及び排出・暴露評価事例の集積

製造現場の調査や模擬排出試験により排出・暴露評価事例を集積

#### CNF製造現場の作業環境調査

模擬排出試験

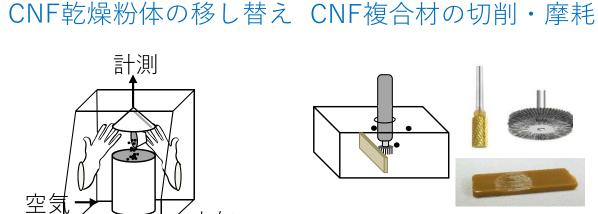






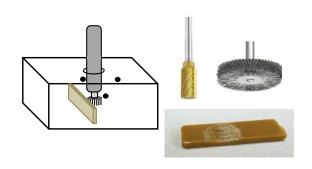


Ogura et al., NanoImpact (2020)





CNF粉体



CNF分散液の噴霧





## 2)-2 CNF生分解性試験

#### OECD301C法/28日試験

試料	生分解度
TEMPO酸化CNF	60%以上
リン酸エステル化CNF	60%以上
機械解繊CNF	60%以上
アセチル化CNF (アセチル化度:0.69)	60%以上

\*京都プロセスにより製造されるリグノCNF複合材の原材料 (プラスチック補強材:表面にリグニンを残したCNF)

- 4種のCNFは**良分解性**を示した。
- 一般環境に放出された後、CNFは速やかに**生分解する**ことが示 唆された。



### 2)-3 アセチル化CNFの海水中生分解性試験

OECD306改法、60日試験

アセチル化CNFは、プラスチック補強材として使用されるため、 海水中での生分解が重要

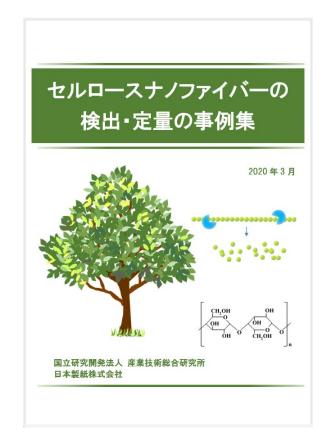
試料	生分解度
アセチル化CNF (DS:0.40)	60%以上
アセチル化CNF (DS:0.84)	60%以上

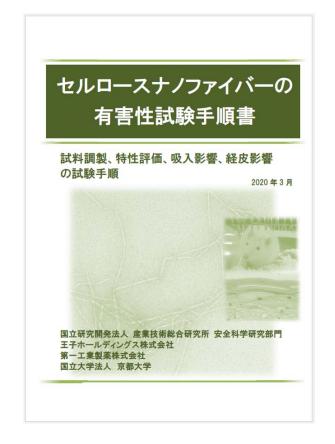
アセチル化度 (DS) を変えた2試料ともに「**海洋での生分解性の ポテンシャルあり**」と結論



## プロジェクト成果物

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/





## 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

- 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)



### 安全性評価書の作成と公開

- 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

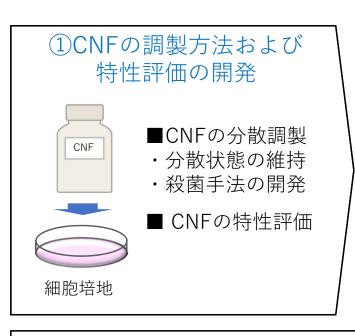


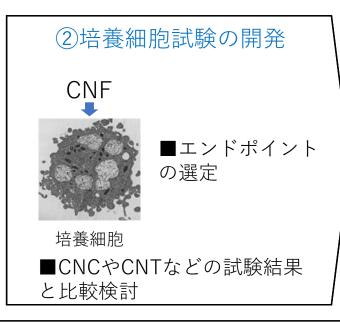
- 評価研究項目を拡張
- 多様なCNFを対象
- 手法開発と共に評価実施

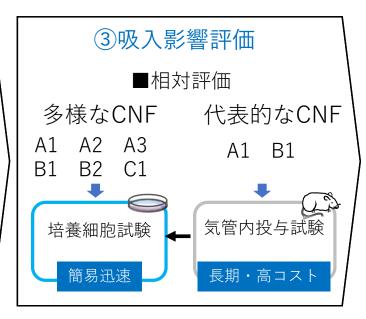


### 1) 簡易迅速な吸入影響評価手法の開発と評価

- 動物試験は長期・高コストであることから、今後、多様な特性を持つ全てのCNFについて動物実験を行うことは現実的ではない。
- 3R原則(代替、削減、苦痛の軽減)に基づき、世界的にできるだけ動物実験に依存しない**簡易な培養細胞試験での安全性評価**が求められている。
- 培養細胞試験により、多くのCNFを相対的に吸入影響評価できる可能性がある。
- 国際的にも報告例が少なく、技術的な課題が多くある。







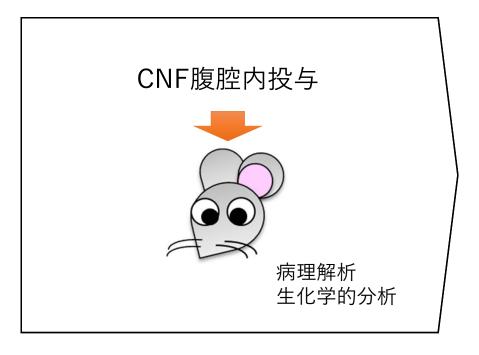
#### ④安全性評価書の作成



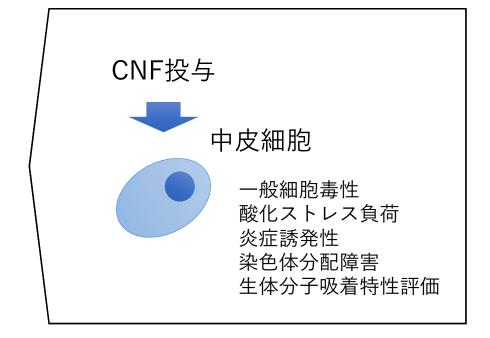
## 2) 中皮腫発生の検証

繊維状のナノ材料は、アスベストのように中皮腫を引き起こすのではないか? とのリスクが懸念

### 1動物試験



### ②細胞試験

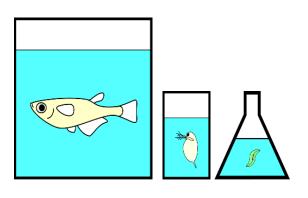


### 中皮腫発生の検証



## 3) 生態影響の評価

#### ①生態毒性試験のための試験溶液の調製方法および試験条件の確立



#### 急性/短期生態毒性試験

- ●藻類生長阻害試験(OECD TG201)
- ●ミジンコ類急性遊泳阻害試験(OECD TG202)
- ●魚類急性毒性試験(OECD TG203)

#### 中長期生態毒性試験

- ●ミジンコ類繁殖試験(OECD TG211)
- ●魚類初期生活段階毒性試験(OECD TG210)

試験溶液の調製方法、曝露方法、試験溶液中のCNF濃度および性状の測定手法を確立



#### ②生態毒性試験の実施

生態毒性データの収集



#### 3生態影響評価

生態毒性データをもとにCNFの生態影響を評価

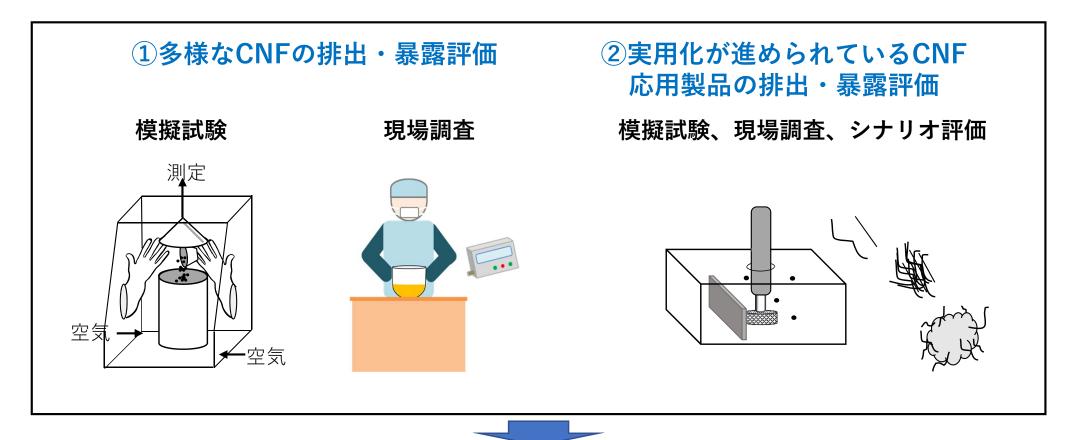


#### 4安全性評価書の作成と公開



## 4) 多様性や実用化に応じた排出・暴露評価

CNFの多様性や実用化に応じた排出・暴露評価を実施し、CNFの排出・暴露の実態や可能性を明らかにする。適切な管理対策やより安全なCNFの開発に寄与する情報を得る。



③安全性評価書の作成と公開



## 安全性評価書の作成と公開

- 1. はじめに
- 2. CNFの物理化学特性と用途
- 3. 排出・暴露の評価
  - ·模擬排出試験、現場調查(開発段階)
  - ·模擬排出試験、現場調查(実用化段階)
- 4. 吸入毒性の評価
  - 気管内投与試験
  - ・培養細胞試験(多様なCNF)
- 5. 発がん性の評価
  - 変異原性
  - 中皮腫
- 6. 皮膚影響の評価
  - •皮膚透過性
  - •皮膚刺激性
- 7. 経口毒性の評価
- 8. 環境影響の評価
  - 生分解性
  - 牛熊毒性
- 9. 総合評価 (まとめ)

#### 内容のポイント

- これまでの研究成果や文献情報も含める。
- 安全性情報とその解釈を分かりやすく示す。
- 既存の材料と比較してCNFの安全性がどの程度で、どのような取り扱いや管理を行えばよいか判断できるように示す。
- 事業者が、有害性試験や暴露評価を 行う際に参考にできるように示す。



CNFの開発と普及を促進





## 自主安全管理支援のための情報発信

#### NANOSAFETY Website

工業ナノ材料に関する

- 研究論文
- 世界各国の法規制やガイドライン
- 国際機関での規格策定



## https://nanosafety.aist-riss.jp/





## 実用化の波及効果

### プロジェクト成果 安全性評価書



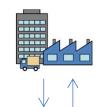
#### ■産総研

情報発信 NANO SAFETY Web Site 技術相談、コンサル

情報提供·技術移転

情報収集

#### ■国内CNF関連事業者



支援

- ・自社開発CNFの有害性評価
- ・現場や製品の排出暴露評価
- ・評価結果の公表

ナノセルロース ジャパン(NCJ) 適切な自主安全管理 安全性への懸念を払拭 CNFの開発と普及を促進



委託試験機関



オーソライズ



■国内・国際学会

■国際機関(OECD、ISO、TAPPI)



## 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)の委託業務「非可食性植物由来化学品製造プロセス技術開発/CNF F安全性評価手法」および「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」の結果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。