

CNFウェビナー 2020年9月11日（金）

---

# CNFの安全性評価手法の開発

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

梶原 秀夫

# 安全性評価の観点からの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)

⇒ 試験の実施や計測に関する手法開発が必要

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

及び、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手法開発を中心とした研究開発

実施体制：

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

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）

⇒ 研究開発成果は、手引き・手順書、事例集として公開、  
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。

# 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
  - 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。

# 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

表面改質CNF

排出・暴露評価では、リグノCNF複合材を対象に加えた。

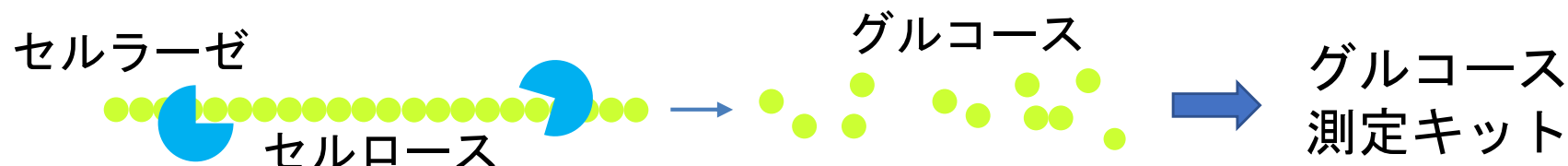
リグノCNF複合材

樹脂と混練する過程で解繊（京都プロセス）

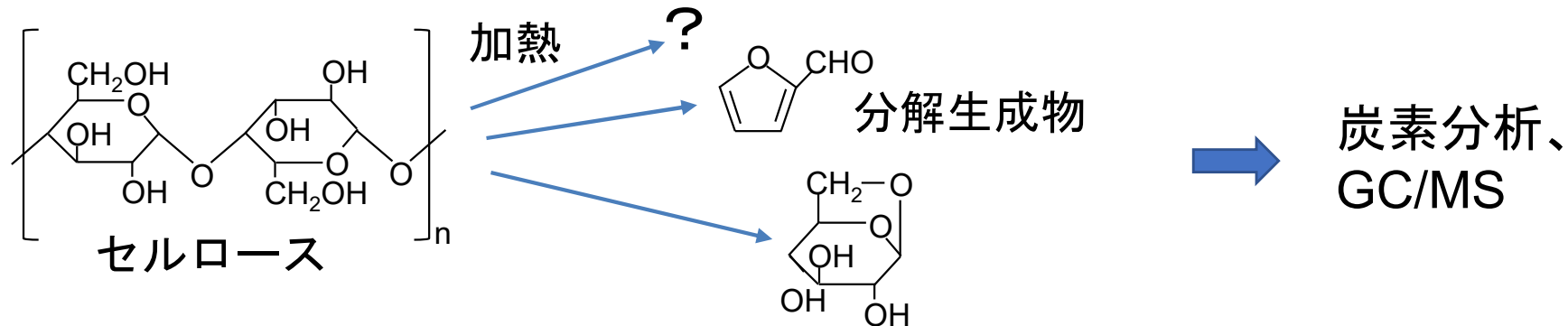
# 1)-1 CNFの検出・定量手法の開発

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

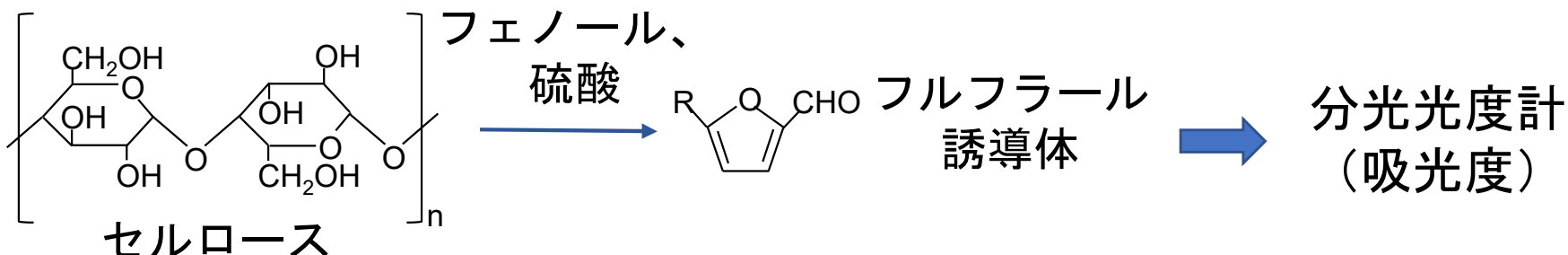
## 酵素分解



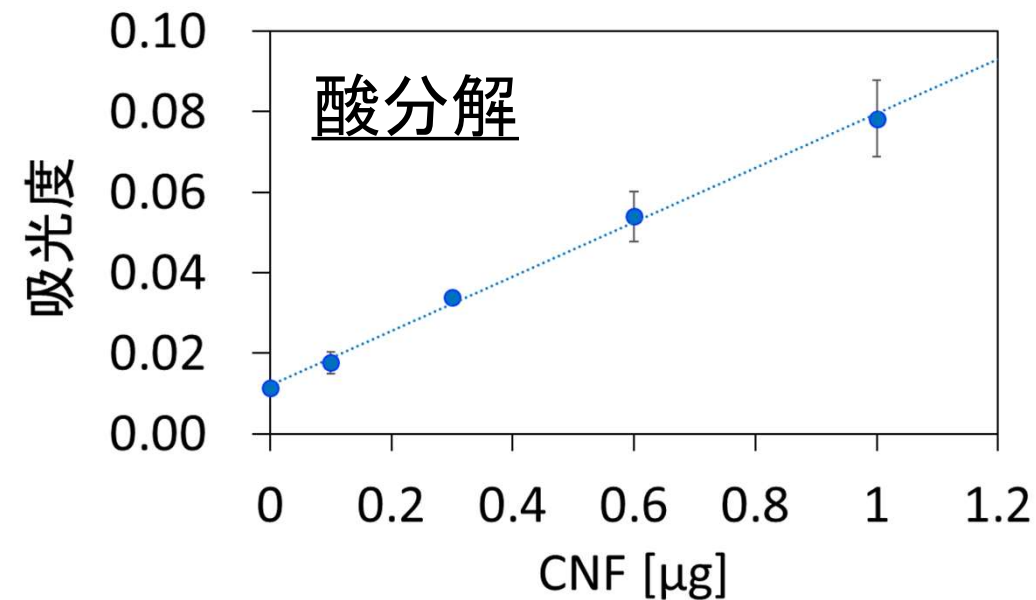
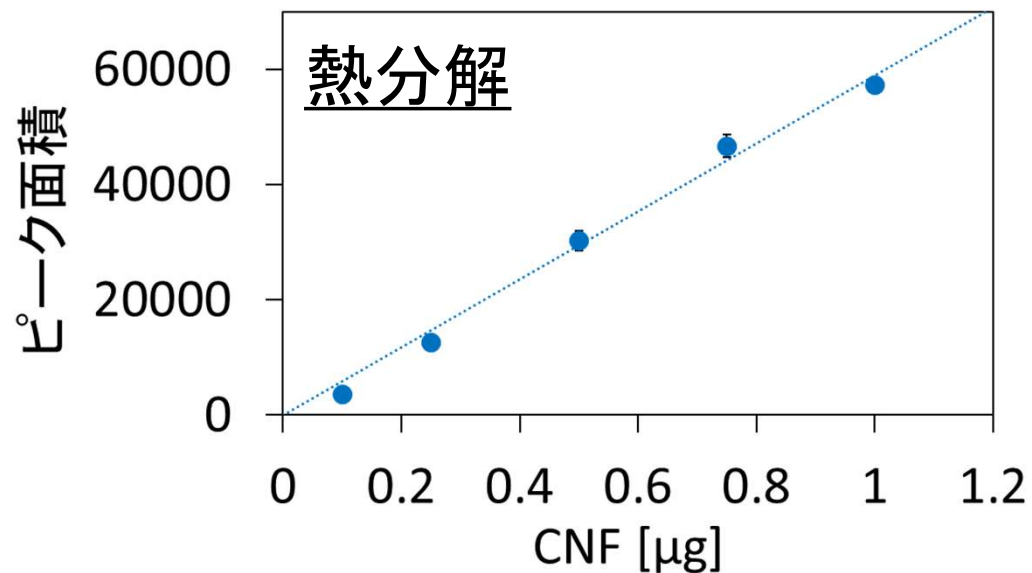
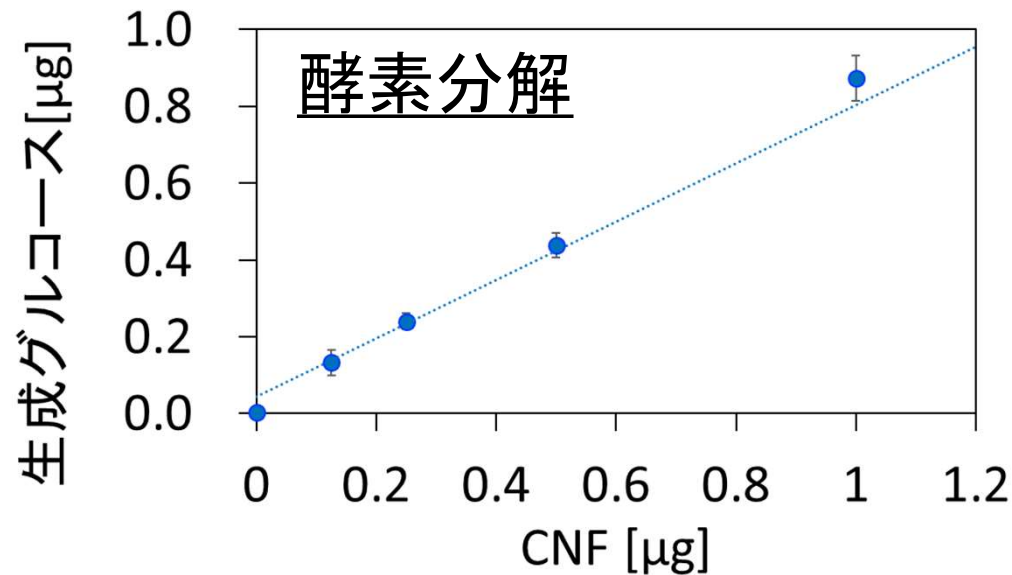
## 熱分解



## 酸分解



# 1)-1 CNFの検出・定量手法の開発

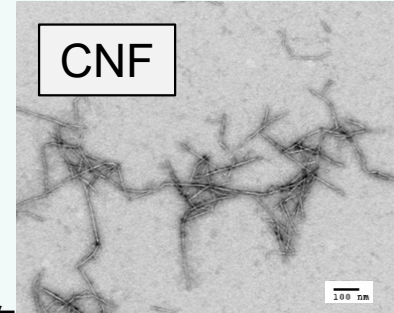


# 1)-2 CNFの気管内投与試験のための手法開発

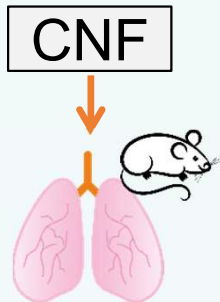
## ① 気管内投与試験※のためのCNF試料調製と計測

- ・ 試料調製方法の確立（調製条件と物理化学的特性との関係）
- ・ 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

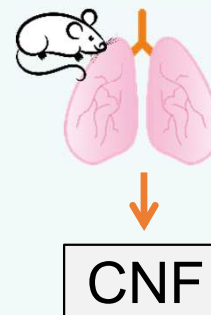


## ② 調製試料を用いた気管内投与試験



- ・ 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試行

## ③ 気管内投与後の肺試料のCNF計測



- ・ 肺試料からの抽出方法の確立
- ・ 適切な分析手法の確立



# 中長期ラット気管内投与試験

## ■ 目的

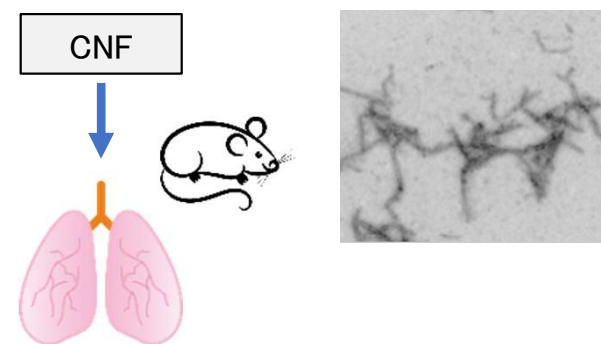
- 投与後90日間のラット肺の炎症の確認

## ■ 被験材料

- リン酸エステル化CNF
- TEMPO酸化CNF
- 機械解繊CNF
- 多層CNT

## ■ 試験概要

- 期間: ラット気管内投与後90日
- 検査項目: 一般状態の観察、体重測定、器官重量、気管支肺胞洗浄液(BALF)検査、病理観察



飼育期間: CNFの吸入影響評価  
投与後90日間



ラット気管内投与試験でのCNF最高用量(CNF濃度)を確定し、3種類のCNFの炎症反応は、経日的に減衰した。

# 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

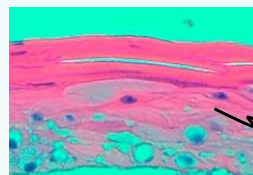
CNF



- ・ 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

CNF



(皮膚細胞モデル断面)

透過液中CNF

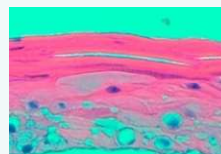
CNFの分布

- ・ 微量分析のため複数の手法の検討
- ・ 蛍光ラベル化
- ・ 染色→分光分析
- ・ TEM観察

## ③ 皮膚刺激性の確認

- ・ 3次元培養ヒト皮膚モデルの利用
- ・ 試験結果を皮膚透過性試験手法に反映

CNF

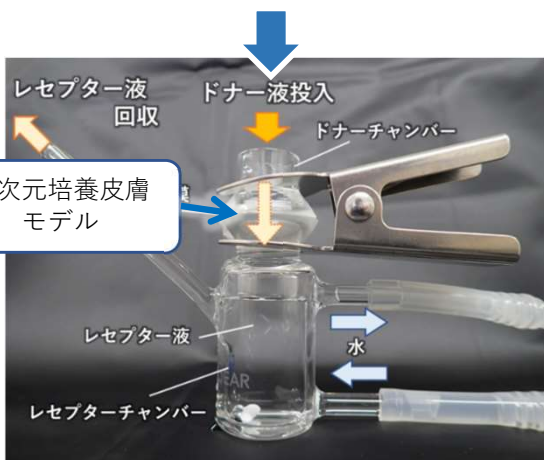


OECD TG439準拠

- ・ MTTアッセイ

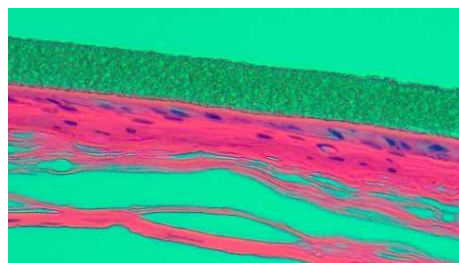
# 染色・蛍光ラベル化CNFによる透過性試験

染色CNF/  
蛍光ラベル化CNF



静置型フランチ拡散セルを使った  
透過性試験装置

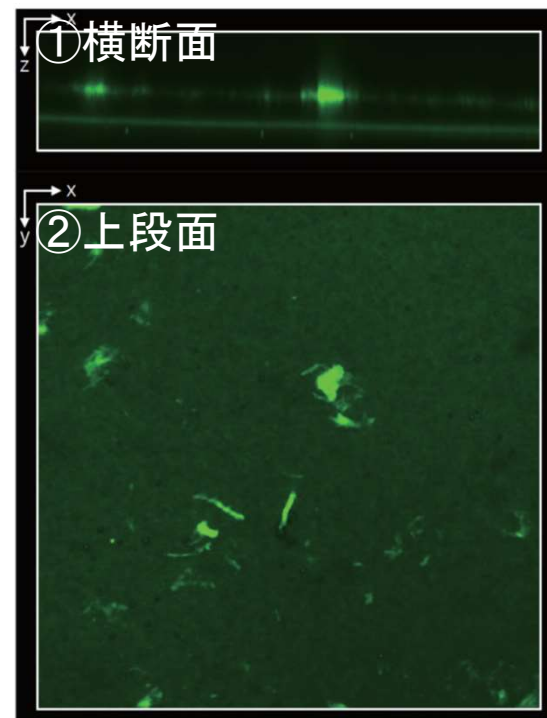
(1) 染色CNF分散液添加による皮膚細胞モデルの観察



皮膚細胞モデル断面には、  
染色CNFは観察されなかった。

培養皮膚の上部(角層)において  
蛍光が発せられていたが、  
角層以降に蛍光は認められな  
かった。

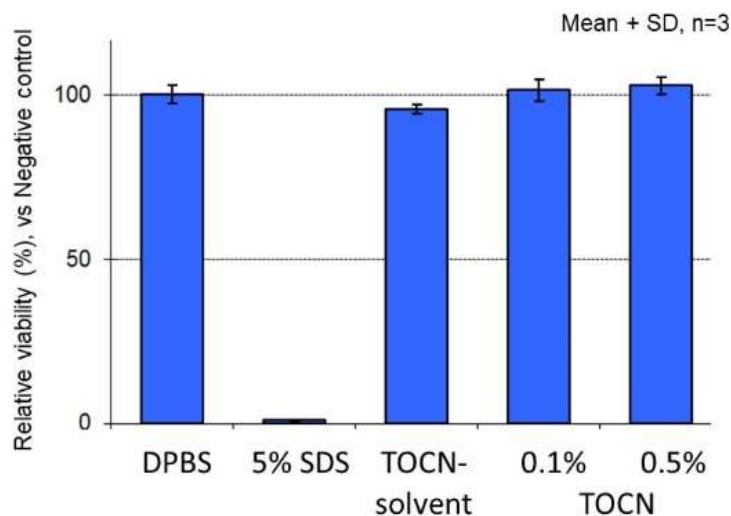
(2) 三次元培養皮膚モデルにおける  
蛍光ラベル化TEMPO酸化CNFの観察



染色CNFおよび蛍光ラベル化CNF分散液による透過性試験により、  
CNFは三次元培養皮膚モデルを透過しないと結論した。

# 皮膚刺激性試験および変異原性試験

(1) 三次元培養皮膚モデル  
(EpiDerm™)におけるTEMPO酸化  
CNFの生存率



(2) CNFの変異原性試験

バッテリー試験(総合的に変異原性を評価)

- 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)



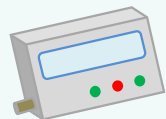
全ての試験結果は陰性であった。

2種類の三次元培養皮膚モデルにおける皮膚刺激性試験の結果から、TEMPO酸化CNFは非刺激性と判定した。また、3種類のCNFは、変異原性を示さないもの(陰性)と結論した。

## 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

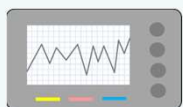
### ① 排出CNFの計測手法の確立

○エアロゾル計測器



○捕集→定量

- ・重量分析
- ・熱分解



○捕集→顕微鏡観察



利用  
実用性の  
検証



課題抽出

### ② 現場調査・模擬排出試験の実施

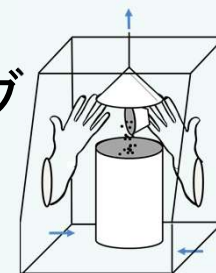
#### 現場調査

- ・ CNF製造現場
- ・ CNF複合材製造現場



#### 模擬排出試験

- ・ 乾燥粉体のハンドリング
- ・ 水分散液の飛沫
- ・ 複合材料の切削・摩耗

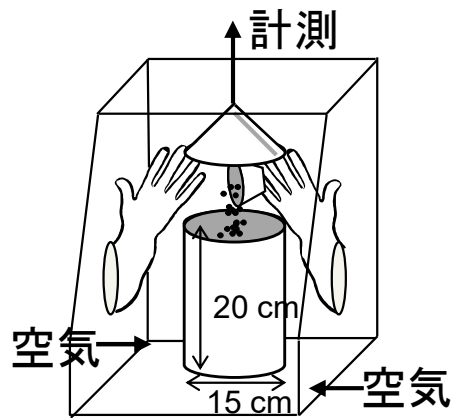


# 模擬排出試験

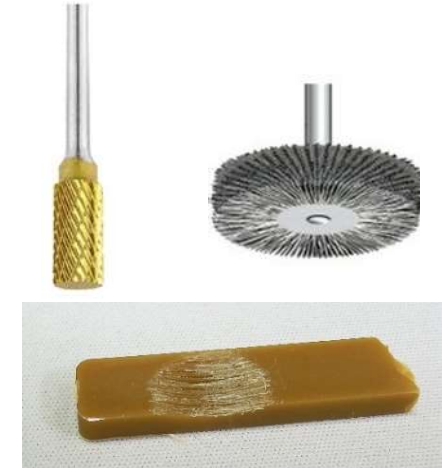
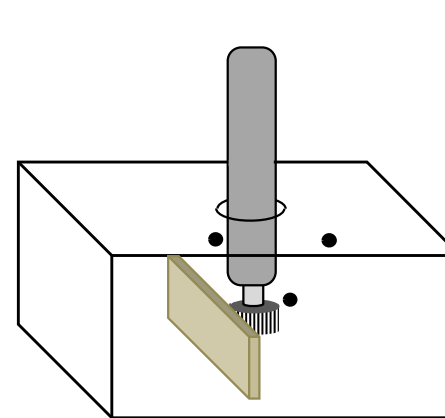
CNFの飛散可能性、濃度、大きさ、形態

CNF乾燥粉体の移し替え

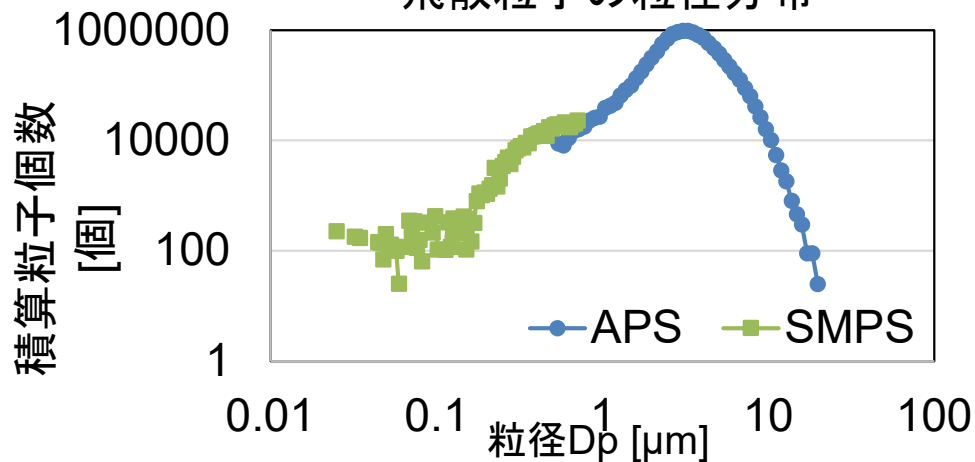
CNF複合材の切削・摩耗



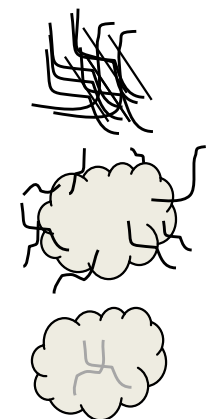
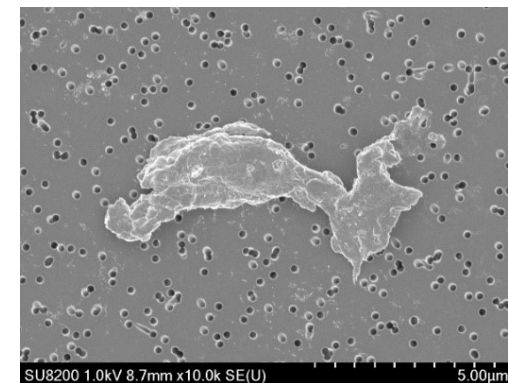
CNF粉体



飛散粒子の粒径分布



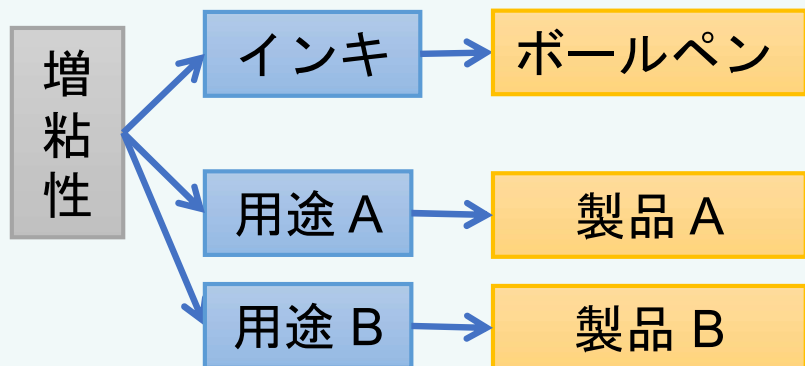
切削時の飛散粒子



## 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

### ① 代表的な製品ケースの抽出

<機能>    <用途>            <製品>



### ② CNFの分解性データの取得

### ③ 暴露シナリオ抽出とケーススタディ

	製造段階 (作業者)	使用段階 (消費者)	廃棄段階 (環境)
塗料 化粧品 など (混合物)	CNF取扱い での飛散	製品の使用 での暴露	CNFの 生分解性
複合材料 など (成形品)	CNF取扱い での飛散  複合材製造 ・加工での 切削・研磨 による飛散	複合材の 劣化・摩耗 による飛散	CNFの 生分解性



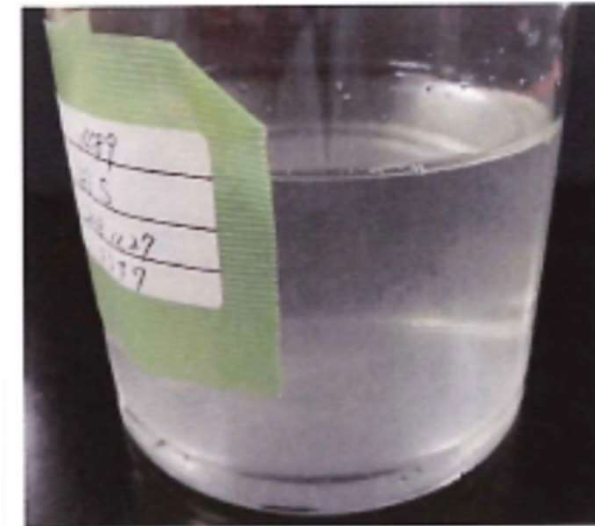
# 生分解性試験の様子

## 生分解性試験の装置

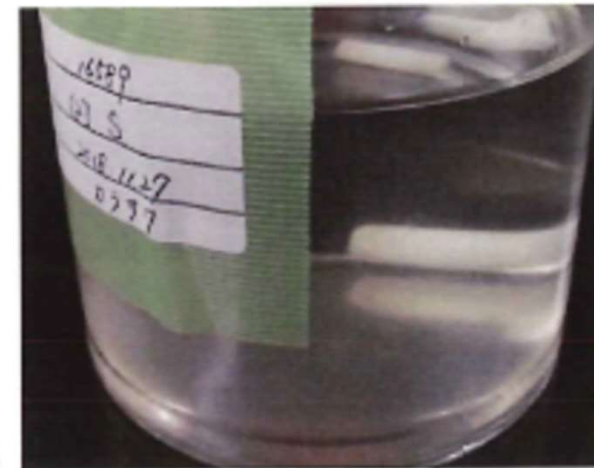


一般財団法人化学物質評価研究機構（CERI）HPより  
[http://www.cerij.or.jp/service/01\\_safety\\_studies/biodegradability\\_01.html](http://www.cerij.or.jp/service/01_safety_studies/biodegradability_01.html)

## CNFサンプル



試験前



試験後

## OECD 301C試験



# 各種CNFの生分解性試験の結果

試料	生分解性の判断結果
TEMPO酸化CNF	良分解性
リン酸エステル化CNF	良分解性
機械解繊CNF	良分解性
アセチル化CNF (DS=0.69) *	良分解性

(OECD301C法 28日試験)

良分解性：生分解度60%以上

\* アセチル化CNF：

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) DSはアセチル化度を表す

- ・ 一般環境での生分解性の試験 (OECD 301C法) の結果 4 種のCNFは良分解性を示した。
- ・ このことは、CNFが一般環境に放出された後に速やかに生分解されることを示している。

# アセチル化CNFの海水中生分解性試験の結果

試料	生分解性の判断結果
アセチル化CNF (DS : 0.40)	生分解性のポテンシャルあり
アセチル化CNF (DS : 0.84)	生分解性のポテンシャルあり

(OECD306改法 60日試験)

生分解性のポテンシャルあり : 生分解度60%以上

- ・各種CNFの海水中での生分解性を試験(OECD306改法)により確認した。
- ・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となるアセチル化CNFについては、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」という結果が得られた。

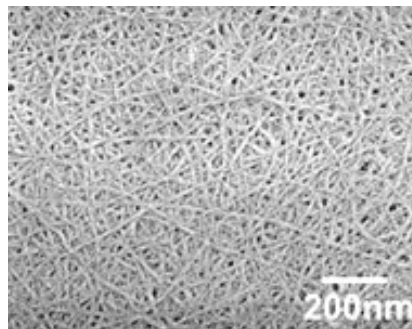
# アセチル化リグノCNFの結果の意義

- プラスチック補強材であるアセチル化リグノCNFが良分解性であることが確認された。
- 生分解性でありながら高強度を有する生分解性プラスチック複合材料の開発に道をひらく。
- 生分解性プラスチックの用途を広げることで、海洋プラスチック問題解決に貢献できる可能性がある。



生分解性のプラスチック

×



生分解性の補強材  
(アセチル化リグノCNF)

=



高強度で生分解性  
プラスチック複合材

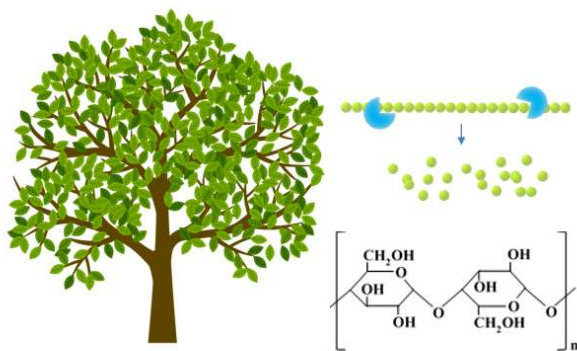
京都プロセスによる

# 成果物

確立した手法及び適用事例をとりまとめた成果文書を通じて成果の普及を図り、CNFの活用を促す。

## 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 安全科学研究部門  
日本製紙株式会社

## セルロースナノファイバーの 有害性試験手順書

試料調製、特性評価、吸入影響、経皮影響  
の試験手順

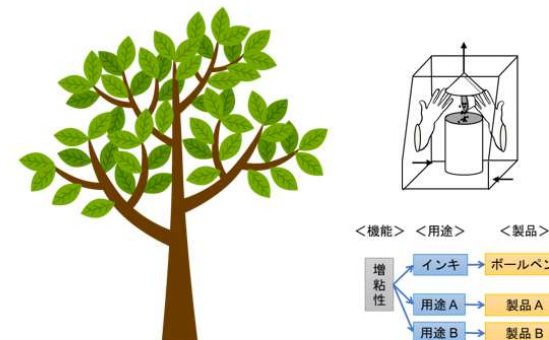
2020年3月



国立研究開発法人 産業技術総合研究所 安全科学研究部門  
王子ホールディングス株式会社  
第一工業製薬株式会社  
国立大学法人 京都大学

## セルロースナノファイバー 及びその応用製品の 排出・暴露評価事例集

2020年3月



国立研究開発法人 産業技術総合研究所 安全科学研究部門  
大王製紙株式会社

2020年3月26日 産総研ホームページより公開

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

