

研究課題名: ナノマテリアル吸入曝露影響評価のための効率的慢性試験法の開発に関する研究
(21KD2004)

分担研究課題名: 曝露評価手法に関する調査研究

研究分担者: 小林 憲弘 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 室長
研究協力者: 広瀬 明彦 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部・客員研究員

研究要旨

本研究班で得られた試験結果を適切な管理基準に適用するためには、曝露シナリオを設定する必要がある。そこで本研究では、ナノ材料および先端材料のリスク評価の支援を目的とし、OECD を主とした中心とした国際機関におけるグループ化およびリードアクロスの方法について調査することを目的とし、OECD のナノマテリアル作業グループ (WPMN) の会合に参加し、曝露評価プロジェクト (SG8) などで進められているプロジェクトの情報収集を行った。

2022年6月にOECDより「Particle Size and Size Distribution of Nanomaterials: OECD Test Guideline 125」(以下、TG225)が出版され、2023年2月にはTG125に関するウェビナーが開催された。このTG125とそのバリデーション報告書を調査し、その内容を整理した。

OECDでは今後も暴露評価手法・モデルに関して開発・評価が継続される見通しであることから、引き続き情報収集を行う必要があると考えられた。

A. 研究目的

本研究班で得られた試験結果を適切な管理基準に適用するためには、曝露シナリオを設定する必要がある。そこで本研究では、ナノ材料および先端材料のリスク評価の支援を目的とし、OECD を主とした中心とした国際機関におけるグループ化およびリードアクロスの方法について調査することを目的とし、OECD のナノマテリアル作業グループ (WPMN) の会合に参加し、曝露評価プロジェクト (SG8) などで進められているプロジェクトの情報収集を行った。

B. 研究方法

2022年6月にOECDより「Particle

Size and Size Distribution of Nanomaterials: OECD Test Guideline 125」(以下、TG225)が出版され、2023年2月にはTG125に関するウェビナーが開催された。このTG125¹⁾とそのバリデーション報告書²⁾を調査し、その内容を整理した。

「OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 1 : Physical-Chemical properties | OECD Guidelines for the Testing of Chemicals | OECD iLibrary (oecdilibrary. org)」

C. 研究結果

i) TG125 の背景

背景では、粒径分布に関するナノ特有の TG の必要性について記述されている。NM の キャラクターゼーションはグループ化・リードアクロスの基本であり、OECD では 1981 年に TG110 が出版されているが、ナノマテリアルには不適であることから、新たなガイドラインが必要である。TG125 は、ドイツの国家プロジェクトが元になっており、テストガイドラインプログラム各国調整官作業部会 (WNT) のプロジェクト 1.4 として、2018 年から実施されているものである。

ii) TG125 の概要

TG125 は、以下の構成となっている。

- ・ TG125 の構成
- ・ 重要性と使用方法
- ・ 粒子計測：方法、限界、適用性
- ・ 繊維計測：方法と限界
- ・ 質疑応答
- ・ 別冊

「重要性と使用方法」では、TG125 は 粒径 1-1000 nm の粒子と繊維、長さ 1-20 μm の繊維を対象としたものであり、分散液はガス・液中で物理的・化学的に安定でなければならないことが強調されている。ただし、試料調製方法は TG125 の範囲外となっている。

iii) 粒子計測

TG125 において粒子計測には、少なくとも 2 つの計測方法を選択する。また、目的に合った計測量が得られる正しい方法を選択する必要がある。計測方法によって計測量の

種類 (数, 表面積, 重量) が異なる。多くの手法では単位の換算はできない点に注意する必要がある。また、計測方法によって適用できる粒径が異なる (図 1)。試料分散と安定性は最も重要であるが、目的・手法に合った試料調製方法が存在しない場合もある。

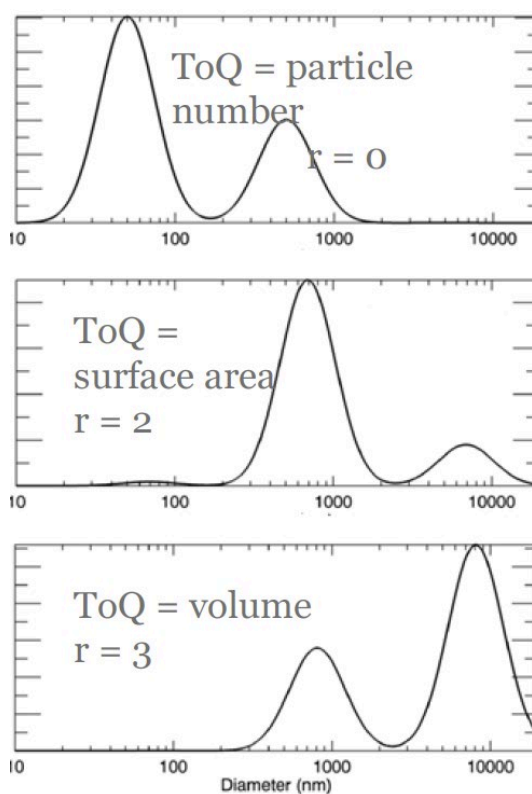


図 1. 計測量の種類

粒子計測のための顕微鏡的手法として、TEM/SEM, AFM について記述されている。

TEM/SEM では、粒径は 2 次元に投影されたものであり (図 2)、粒径分布は数ベースとなる。計測にあたって、試料は数日間 (試料調製の期間) 安定である必要がある。また、統計的に有用な情報を得るには 10^3 個の粒子が必要とされている。

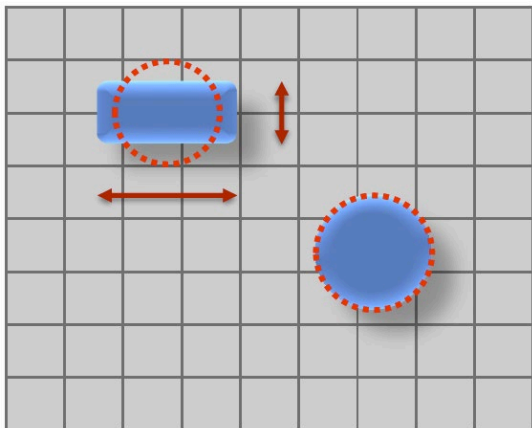
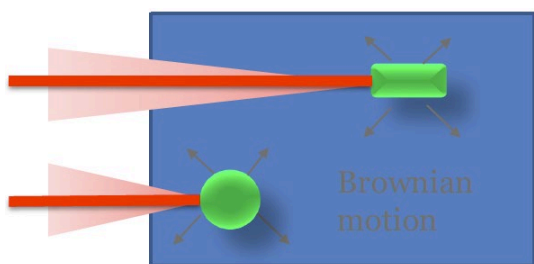


図 2. TEM/SEM 計測のイメージ

液中の粒子の計測手法としては、CLS, DLS, NTA/PTA について記述されている。以下では、これらの手法のうち最も広く用いられている動的光散乱 (DLS) について記述する。DLS は、流体力学的な粒径が得られ、粒径分布は強度ベースとなる (図 3)。20 分間 (計測時間) の安定性が必要であり、0.2v% よりも低濃度の試料に適用できる。統計的に有用な情報が得られるには 10^5 個以上の粒子が必要であり、粒子の組成は分からない。



$$I_{\text{out}} = I(\text{Vol}_p, t)$$

図 3. DLS 計測のイメージ

粒子計測の室間比較 (ILC) に関しては、ポリスチレン混合液 (90/125 nm) を用いて

24~45 機関で評価が行われたが、DLS を用いた報告が圧倒的に多かった。幾つかの計測手法は 2 つの粒径分布のモード (最頻値) を正しく測定できた (図 4)。粒径分布に差がない場合は、ほとんどの計測手法で正しく計測できたが、差がある場合は小さい粒子を過小評価されることがある。全ての計測手法にはメリット・デメリットがあることから、少なくとも 2 つの独立した計測手法を用いることを推奨する。

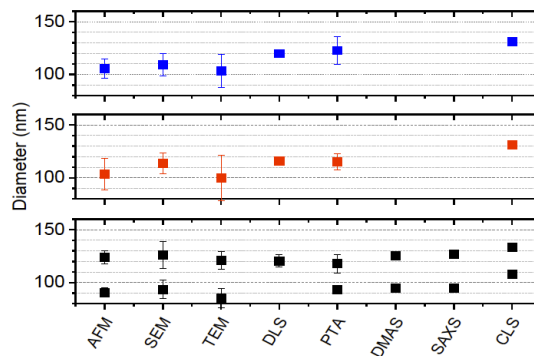


図 4. ポリスチレン混合液 (90/125 nm) を用いた室間比較

iv) 繊維計測

TG125 では個々の繊維の直径と長さをペアで測定することを新しいスタンダードプロトコルとして提案している。

繊維の粒径分布測定のバリデーションでは、SEM と TEM の両方を用いて評価が行われた。銀ナノファイバーの粒径分布の室間比較の例を図 5 (直径) と図 6 (長さ) に示す。さらに、各参加者は、SEM と TEM で直径と長さの中央値を計測し、エラーバーとして室間の不確実性を表示したものを図 7 に示す。長い繊維では、SEM と TEM の結果の乖離が大きい結果となっている。この理由と

して、TEM の適用範囲は $<5\mu\text{m}$ であることが挙げられる。

以上のことから、ナノファイバーの計測においては、TEM と SEM の両方を用いて計測することが推奨される。

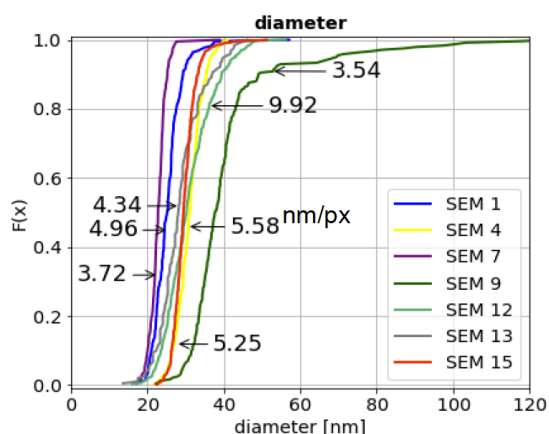


図 5. 銀ナノファイバーの粒径分布(直径)の室間比較

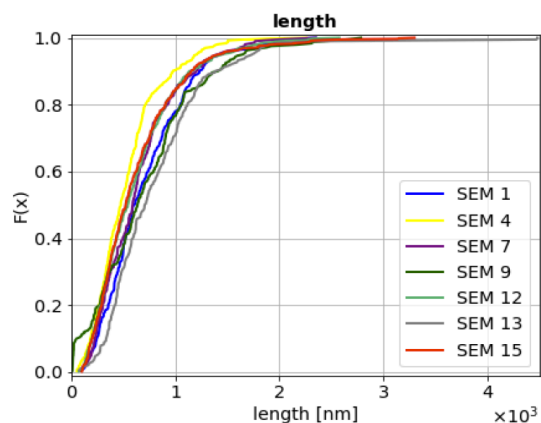


図 6. 銀ナノファイバーの粒径分布(長さ)の室間比較

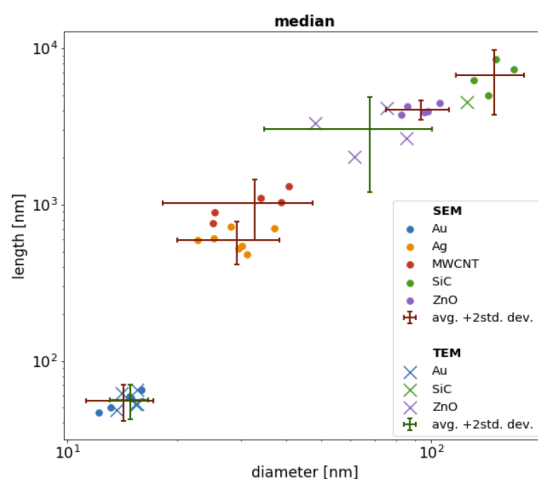


図 7. 銀ナノファイバーの粒径分布の室間比較のまとめ

バリデーション試験に関する詳細は TG125 のバリデーション報告書²⁾に記載されている。

「No. 352 Validation Report on Particle and Fibre Size Distribution Measurements of Nanomaterials. Supporting TG 125 on Particle Size and Particle Size Distribution of Nanomaterials

D. 考察・結論

OECD が主催するナノマテリアルの暴露評価手法に関するウェビナーに参加し、既存あるいは新たに開発されたツールやモデルに関する情報収集を行った。

今年度は、TG125 に関する OECD の最新動向を入手できた。OECD では今後も暴露評価手法・モデルに関して開発・評価が継続される見通しであることから、引き続き情報収集を行う必要があると考えられた。

E. 参考文献等

- 1) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 1 : Physical-Chemical properties | OECD Guidelines for the Testing of Chemicals | OECD iLibrary (oecdilibrary. org)
https://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-1-physical-chemical-properties_20745753
- 2) No. 352 Validation Report on Particle and Fibre Size Distribution Measurements of Nanomaterials. Supporting TG 125 on Particle Size and Particle Size Distribution of Nanomaterials. [https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/cbc/mono\(2022\)7&doclanguage=en](https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/cbc/mono(2022)7&doclanguage=en)

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得 （該当なし）
2. 実用新案登録（該当なし）
3. その他（該当なし）