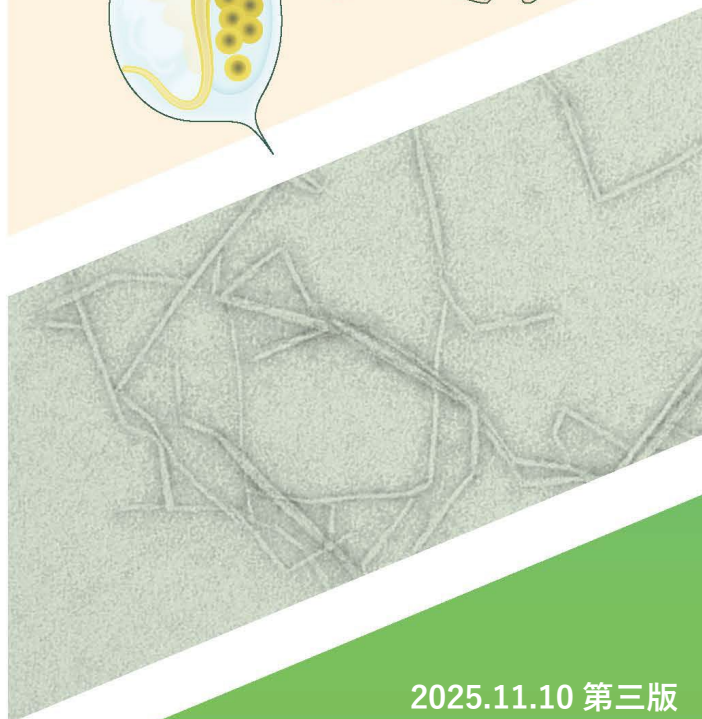
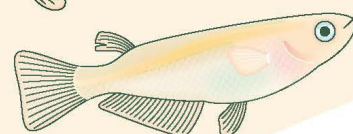
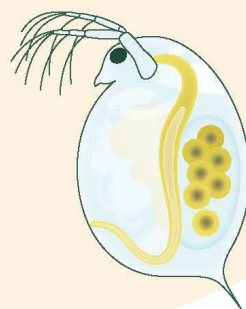
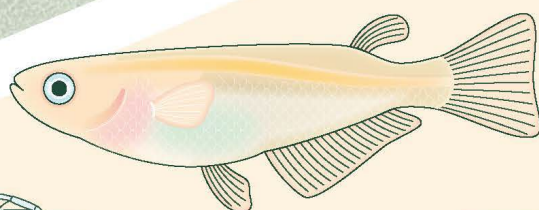
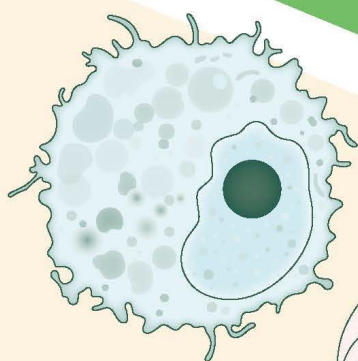


セルロースナノファイバーの 安全性評価書

2025

国立研究開発法人 産業技術総合研究所



2025.11.10 第三版

執筆担当者

小倉 勇	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	監修, 第 1, 7, 9, 10 章
藤田 克英	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	第 2, 4, 5 章
堀江 祐範	国立研究開発法人産業技術総合研究所	健康医工学研究部門	第 3 章
森山 章弘	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	第 4, 6 章
眞野 浩行	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	第 8 章
田井 梨絵	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	第 8 章

変更履歴

2025 年 7 月 25 日

- ・ 第 2 章、第 3 章 (3.3.1 節, 3.3.2 節)、第 4 章、第 5 章、第 10 章「ヒト健康影響のまとめ」
- ・ 論文情報の追加 : Horie et al., 2025; Ogura et al., 2025; Mano et al., 2025; Fujita et al., 2025a, Fujita et al., 2025b; Fujita and Moriyama, 2025

2025 年 11 月 10 日

- ・ 第 2 章、第 4 章、第 5 章
- ・ 論文情報の追加 : Fujita et al., 2025c

本書は、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）委託事業「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」（JPNP20009）による研究成果です。

本書について

セルロースナノファイバー（CNF）は、鋼鉄の 1/5 の軽さでありながら、鋼鉄の 5 倍以上の強度を有するバイオマス由来の高性能素材です。今後、CNF は幅広い分野での応用が加速すると見込まれており、石油由来素材の代替としての可能性に加え、大気中の二酸化炭素を吸収・固定した木材などを原料とすることから、カーボンニュートラル社会の実現に資する素材としても大きな期待が寄せられています。

一方で、工業ナノ材料は超微細なサイズや特異な形状といった物理的特性を有するため、従来の化学物質とは異なる有害性影響を引き起こす懸念が指摘されています。新たな材料を社会実装するにあたっては、事前にその安全性を科学的に評価・確認しておくことが不可欠であり、これは国際的にも重要な潮流となっています。さらに、実際には有害性や暴露可能性が低い場合であっても、十分な情報が存在しないことで風評被害が生じ、他の材料との競争において不利な立場に置かれる可能性もあります。特に繊維状の工業ナノ材料に関しては、安全性に関する情報が不足している場合、予防的観点からアスベストと同様のリスクを想定した厳格な暴露管理が求められる場合があります。

天然由来の新たな工業ナノ材料である CNF は、これまでに安全性評価が行われてきた他の工業ナノ材料とは異なる特性を有しています。例えば、CNF は高い粘性を示し、原料、表面修飾、解繊状態、不純物の種類や含有量などに多様性があります。また、植物を起源として、グルコースが直鎖状につながった高分子構造を持ち、特徴的な元素を含まず、吸光度も低いいため、CNF を他の成分と分離・識別して検出・定量することが困難です。このような特性から、従来の工業ナノ材料に適用されてきた評価手法をそのまま用いることは難しく、CNF の安全性評価には新たな試験方法や測定法の開発が求められました。

そこで、(国研) 産業技術総合研究所（以下、産総研）は、王子ホールディングス（株）、第一工業製薬（株）、大王製紙（株）、日本製紙（株）と共に、(国研) 新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）からの委託事業「非可食性植物由来化学品製造プロセス技術開発／CNF 安全性評価手法の開発（JPNP13006）」（2017～2019 年度）において、3 種の CNF を主対象に、検出・定量手法の開発、気管内投与手法の開発、皮膚透過性試験手法の開発、排出・暴露評価手法の開発に取り組みました。これらの成果は、「セルロースナノファイバーの検出・定量の事例集」、「セルロースナノファイバーの有害性試験手順書」とその英語版の「A Manual for Toxicity Testing of Cellulose Nanofibers」、「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」として取りまとめて、無償で公開しています（図 1、<https://riss.aist.go.jp/results-and-dissemin/1625/>）。

その後、産総研は、新たな NEDO 委託事業「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（JPNP20009）」（2020～2024 年度）において、1) 多様な CNF に対応可能な培養細胞を用いた吸入影響評価、2) アスベストと同様に中皮腫を引き起こす可能性への懸念に対する検証、3) 水生生物（藻類、甲殻類、魚類等）を対象とした生態影響の評価、4) CNF の多様性や実用化の進展に対応した排出・暴露評価の実施に取り組みました。2017～2019 年度の NEDO 委託事業では、代表的な 3 種の CNF を対象として安全性評価に必要な手法開発を中心に進めてきました

が、2020～2024 年度の新たな NEDO 委託事業では、より多様な CNF を対象に、具体的な評価結果を得ることを主な目的とし、評価対象および評価項目を拡充しました。また、新事業では、産総研に加えて福井大学も参画し、吸入暴露および経口暴露による動物試験を通じた生体安全性評価に取り組みました。

本書は、CNF を取り扱う事業者や応用開発を目指す事業者に向けて、CNF の安全性に関する情報を提供することを目的としています。既存の論文の情報を整理するとともに、2つの NEDO 委託事業（2017～2019 年度および 2020～2024 年度）において得られた評価結果を取りまとめています（図 2）。本書は、2022 年 12 月に公開した評価書（2022 年度版）を改訂したものであり、その後の NEDO 事業で得られた最新の研究成果や、国内外の論文情報を反映することで、より包括的な内容となりました（新たに追加された成果については第 1 章をご参照ください）。本書が、CNF の適切な安全管理や、安全な製品開発に向けた一助となれば幸いです。

ご意見やご相談については、産総研安全科学研究部門までお問合せください。

E-mail : M-cnfsafe-ml@aist.go.jp

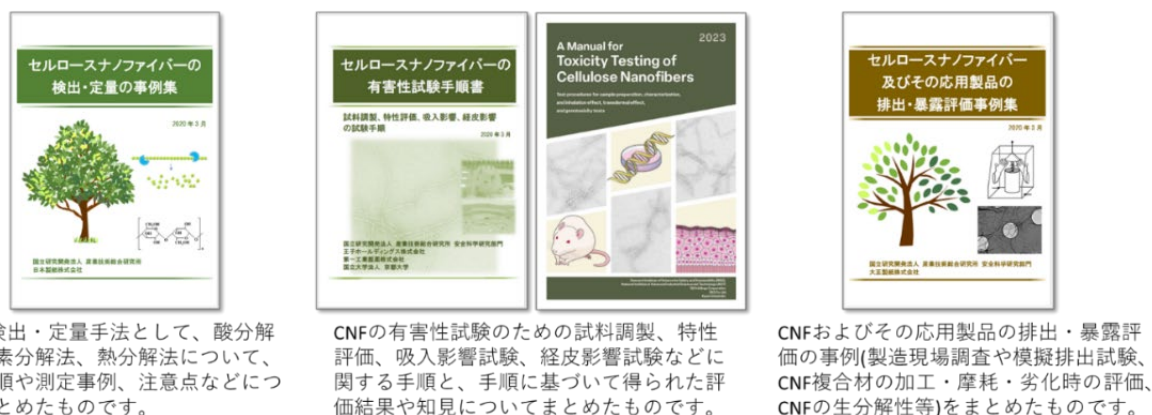


図 1 CNF の安全性評価手法および評価事例に関する文書類



図 2 本書にとりまとめた情報

目 次

本書について	1
目 次	3
用語・略語	6
第 1 章 本書の構成	9
第 2 章 遺伝毒性の評価	10
2.1 はじめに	10
2.2 既存文献の情報	11
2.3 NEDO 委託事業の成果	15
2.3.1 Ames 試験	16
2.3.2 マウスリンフォーマ TK 試験	16
2.3.3 <i>in vitro</i> 染色体異常試験	17
2.3.4 ラット赤血球小核試験	17
2.3.5 3 種類の CNF の遺伝毒性評価	17
2.4 まとめ	18
参考文献	18
第 3 章 中皮腫の評価	21
3.1 はじめに	21
3.2 既存文献の情報	21
3.2.1 アスベストによる中皮腫および中皮細胞に関連した生体応答	21
3.2.2 多層カーボンナノチューブ暴露による中皮腫および中皮細胞に関連した生体応答 ..	24
3.3 NEDO 委託事業の成果	25
3.3.1 マウスの腹腔内投与試験	26
3.3.2 培養細胞試験	27
3.4 まとめ	28
参考文献	29
第 4 章 吸入影響の評価	33
4.1 はじめに	33
4.2 既存文献の情報	34
4.2.1 セルロースおよび MCC の吸入影響評価	34
4.2.2 CNF および CNC の動物試験	34
4.2.3 CNF の培養細胞試験	38
4.3 NEDO 委託事業の成果	39
4.3.1 気管内投与試験による CNF の吸入影響評価	39
4.3.1.1 気管内投与試験のための CNF 試料調製と特性評価	41
4.3.1.2 CNF の気管内投与手法の開発	41
4.3.1.3 気管内投与試験	42
4.3.2 吸入暴露試験による CNF の吸入影響評価	45

4.3.3 培養細胞試験による簡易かつ迅速な吸入影響評価手法の開発と評価.....	45
4.3.3.1 CNF の調製および特性評価	46
4.3.3.2 培養細胞試験.....	47
4.3.4 成果の普及.....	49
4.4 まとめ.....	50
4.4.1 既存論文の知見.....	50
4.4.2 NEDO 委託事業の知見	50
4.4.3 今後の課題.....	51
参考文献.....	52
第 5 章 皮膚影響の評価.....	57
5.1 はじめに	57
5.2 既存文献の情報.....	57
5.3 NEDO 委託事業の成果.....	58
5.3.1 皮膚透過性試験.....	58
5.3.2 皮膚刺激性試験.....	59
5.4 まとめ.....	60
参考文献.....	60
第 6 章 経口毒性の評価.....	62
6.1 はじめに	62
6.2 既存文献の情報.....	62
6.3 NEDO 委託事業の成果.....	66
6.4 まとめ.....	67
参考文献.....	67
第 7 章 排出・暴露の評価	70
7.1 はじめに	70
7.2 作業環境における吸入暴露の許容濃度.....	70
7.2.1 ナノ材料およびその他粉塵の作業環境における許容濃度.....	70
7.2.2 ナノセルロースの許容濃度	72
7.3 ナノセルロースの排出・暴露に関する既存文献の情報	73
7.4 NEDO 委託事業の成果.....	77
7.4.1 CNF 乾燥粉体の製造施設における作業環境計測	78
7.4.2 CNF 複合材の製造施設における作業環境計測.....	79
7.4.3 CNF/ゴム複合材の製造施設における作業環境計測.....	80
7.4.4 CNF 複合材の裁断時の作業環境計測	82
7.4.5 CNF 乾燥粉体の移し替え模擬試験.....	82
7.4.6 CNF 乾燥粉体のダスティネス試験.....	84
7.4.7 CNF 水分散液の飛沫としての飛散.....	84
7.4.8 CNF 複合材の切削試験、摩耗試験.....	85
7.5 まとめ.....	85

参考文献.....	87
第 8 章 生態影響の評価.....	90
8.1 はじめに	90
8.2 既存文献の情報	90
8.3 CNF の生態リスク評価.....	100
8.3.1 予測環境中濃度 (PEC) の算出.....	101
8.3.2 予測無影響濃度 (PNEC) の算出.....	102
8.3.3 リスク判定.....	103
8.4 NEDO 委託事業の成果.....	103
8.4.1 取り組みの概要.....	103
8.4.2 CNF 濃度測定方法の確立.....	105
8.4.3 CNF の生態毒性試験方法の確立.....	106
8.4.3.1 培地の選択および CNF 分散液の安定性評価.....	106
8.4.3.2 CNF への吸着に伴う栄養塩の低下	107
8.4.3.3 藻類を用いた試験における藻類存在量の測定への CNF の干渉.....	107
8.4.3.4 CNF の濃度測定への供試生物や餌の干渉	107
8.4.3.5 真菌や細菌および防腐剤の影響の考慮	108
8.4.4 CNF の生態毒性試験の結果.....	108
8.4.5 予測無影響濃度の導出.....	110
8.5 まとめ.....	111
8.5.1 既存論文の知見.....	111
8.5.2 NEDO 委託事業で得られた知見.....	112
8.5.3 今後の課題.....	112
参考文献.....	113
第 9 章 生分解性の評価.....	117
9.1 はじめに	117
9.2 既存文献の情報	117
9.3 NEDO 委託事業の成果.....	118
9.4 まとめ.....	119
参考文献.....	119
第 10 章 まとめ	120

用語・略語

索引	用語・略語	意味・解説
A	APS	エアロダイナミックパーティクルサイザー (aerodynamic particle sizer) 約 0.5~20 μm の粒径範囲のエアロゾルについて、空気力学径別の個数濃度が測定できる装置。
C	CMF	セルロースマイクロフィブリル (cellulose microfibril : CMF) CNF とほぼ同義
C	CNC	セルロースナノクリスタル (cellulose nanocrystal) ナノ結晶性セルロース (nanocrystalline cellulose : NCC) とも呼ばれる
C	CNF	セルロースナノファイバー (cellulose nanofiber) またはセルロースナノフィブリル (cellulose nanofibril) ナノフィブリル化セルロース (nanofibrillated cellulose : NFC)、nanofibrillar cellulose (NFC)、マイクロフィブリル化セルロース (microfibrillated cellulose : MFC)、microfibrillar cellulose (MFC)、セルロースマイクロフィブリル (cellulose microfibril : CMF) などとも呼ばれる。
C	CNT	カーボンナノチューブ (carbon nanotube)
C	CPC	凝縮粒子計数器 (condensation particle counter) 約 0.01~>1 μm (装置によって下限は 0.001 μm) の粒径範囲のエアロゾルについての総個数濃度が計測できる装置。
D	DPMFA	動的確率論的マテリアルフロー解析 (dynamic probabilistic material flow analysis)
E	EC50	半数影響濃度 (50% effective concentration) 化学物質を暴露した試験個体の半数が試験終了までに影響を被る暴露濃度
I	<i>in vitro</i> 試験	ヒトや動物の組織や細胞を用いて行う試験
I	<i>in vivo</i> 試験	動物や生物個体を用いて行う試験
L	LC50	半数致死濃度 (50% lethal concentration) 化学物質を暴露した試験個体の半数が試験終了までに死亡する暴露濃度
L	LD50	半数致死量 (50% lethal dose) 投与した動物の 50% が死亡する用量
L	LPS	リポ多糖 グラム陰性菌の外膜に存在する多糖で、内毒素 (エンドトキシン) とも言われる
M	MCC	微結晶セルロース (microcrystalline cellulose) 従来より医薬品や食品添加物用途で多く使われている高純度の結晶セルロース。一般に繊維径は CNF よりやや太い。
M	MFC	マイクロフィブリル化セルロース (microfibrillated cellulose) または microfibrillar cellulose CNF とほぼ同義だが、NFC との対比として、未修飾の機械解繊 CNF のように、ナノサイズの細い繊維と太い繊維、ネットワーク構造をなして互いに連結している繊維などが混ざったものを指す場合がある。
M	MWCNT	多層カーボンナノチューブ (multiwall carbon nanotube)
N	NCC	ナノ結晶セルロース (nanocrystalline cellulose) セルロースナノクリスタル (cellulose nanocrystal : CNC) とも呼ばれる
N	NFC	ナノフィブリル化セルロース (nanofibrillated cellulose) または nanofibrillar cellulose CNF とほぼ同義だが、MFC との対比として、化学修飾 CNF のように均一なナノサイズの繊維径のものを指す場合がある。
N	NIOSH	米国国立労働安全衛生研究所 (National Institute of Occupational Safety and Health)
N	NOAEL	無毒性量 (no observable adverse effect level) 動物に毒性 (有害な) 影響がみられない最大の投与量

N	NOEC	無影響濃度 (no observed effect concentration) 生態毒性試験において、対照区と比較して、統計学的に有意な悪影響がみられない最大の暴露濃度を示す。
O	OECD	経済協力開発機構 (Organisation for Economic Co-operation and Development)
O	OECD TG	OECD の試験ガイドライン。化学物質等の安全性評価を行なうために国際的に合意された試験方法。OECD により定められ公表されている。
O	OPC	光散乱式粒子計数器 (optical particle counter) 約 0.3~>10 µm (装置によって下限は<0.1 µm) の粒径範囲のエアロゾルについて、粒径 (光散乱径) 別の個数濃度が計測できる装置。
P	PEC	予測環境中濃度 (predicted environmental concentration)
P	PNEC	予測無影響濃度 (predicted no-effect concentration)
P	PSSD	確率論的な種の感受性分布 (probabilistic species sensitive distribution)
R	RCR	リスク特性比 (risk characterization ratio) PEC および PNEC の確率分布が重なった範囲。
R	ROS	活性酸素種 (reactive oxygen species)
S	SEM	走査型電子顕微鏡 (scanning electron microscope)
S	SMPS	走査型移動度粒径測定器 (scanning mobility particle sizer) 約 0.01~1 µm (装置によって下限は 0.001 µm) の粒径範囲のエアロゾルについて、電気移動度径別の個数濃度が計測できる装置。
T	TEM	透過型電子顕微鏡 (transmission electron microscope)
T	TEMPO	2,2,6,6-テトラメチルピペリジン 1-オキシル (2,2,6,6-tetramethylpiperidine 1-oxyl) の略称。TEMPO 酸化 CNF は、TEMPO 触媒酸化により水酸基の一部をカルボキシ化したもの。
T	TG	テストガイドライン (test guideline)
U	USEPA	米国環境保護庁
い	遺伝毒性	DNA や染色体の構造的、もしくは量的変化を引き起こす性質。発がんメカニズムの 1 つとされている。
き	気管内投与試験	投与器具を使って被験物質の懸濁液を直接、ラットやマウスなどの実験動物の気管内に投与し、その後飼育して呼吸器を中心にその影響を評価する試験。
き	吸入性粉塵	ISO 7708 の定義で 4 µm の粒子の捕集効率が 50%である分粒装置を使用して捕集した粉塵。
き	吸入暴露試験	ラットやマウスなどの実験動物に気中に飛散させた被験物質を吸入させ、呼吸器を中心にその影響を評価する試験。
き	魚類急性毒性試験	メダカ等の魚類の稚魚を対象に、化学物質を暴露して、生存や行動異常等を指標に化学物質の短期的な影響を調査する生態毒性試験。OECD のテストガイドライン No.203 では魚類の稚魚に化学物質を 96 時間暴露する。
き	魚類初期生活段階毒性試験	メダカ等の魚類を対象に、受精卵から孵化して自発的な摂餌が可能になる期間に化学物質を暴露して、化学物質の長期的な影響を調査する生態毒性試験。OECD のテストガイドライン No. 210 ではメダカを用いた場合、化学物質の暴露期間は約 40 日程度とされる。
け	ケモカイン	細胞から分泌される低分子のタンパク質。サイトカインの一種で、主に白血球などの遊走を誘導し炎症の形成に関与する。
こ	口腔咽頭吸引	ラットやマウスなどの実験動物の咽頭に被験物質の懸濁液を滴下し、誤嚥を介して被験物質を肺へ暴露させ、呼吸器を中心にその影響を評価する試験。
こ	コメットアッセイ	DNA の損傷から修復の過程で切断された DNA を電気泳動により検出する試験。
さ	細菌復帰突然変異試験 (Ames 試験)	化学物質等の変異原性を評価する試験。ヒスチジンやトリプトファン等の必須アミノ酸の要求性突然変異を持つ微生物 (ネズミチフス菌、大腸菌) を用いる。

さ	サイトカイン	細胞から分泌される低分子のタンパク質。生理活性を示し、細胞間の情報伝達を担う。
さ	酸化ストレス	生体内の酸化還元バランスが酸化に傾いた状態。継続することで様々な生体分子が酸化され、疾病や発がんの原因となる。
し	小核	細胞分裂の際に、染色体分裂の異常により主核に取り込まれなかった染色体の断片が残ることで出現する小さな核。
せ	赤血球小核試験	化学物質等の染色体異常誘発性を評価する試験。ほ乳動物の骨髄または末梢血中の幼若赤血球における小核形成を指標とする。
せ	セルロースナノクリスタル (CNC)	セルロースを酸などで非晶部を加水分解させたナノサイズの紡錘状のセルロース。
せ	セルロースナノファイバー/セルロースナノフィブリル (CNF)	植物からとれるセルロースを化学的・機械的処理によりナノサイズ (数~100 ナノメートル) の細さまで解きほぐした繊維。バクテリア由来のものもある。 ナノフィブリル化セルロース (nanofibrillated cellulose : NFC)、nanofibrillar cellulose (NFC)、ミクロフィブリル化セルロース (microfibrillated cellulose : MFC)、microfibrillar cellulose (MFC)、セルロースミクロフィブリル (cellulose microfibril : CMF) などとも呼ばれる。
せ	染色体異常試験	化学物質等による染色体の構造異常および数的異常を評価する試験。ほ乳類の培養細胞の染色体標本を用いる。
そ	藻類生長阻害試験	ムレミカヅキモ等の藻類を対象に、化学物質を暴露して、藻類の生長速度を指標に化学物質の影響を調査する生態毒性試験。OECD のテストガイドライン No. 201 では藻類に化学物質を 72 時間暴露する。
ち	中皮細胞	胸膜や腹膜、心膜などに存在する薄い細胞
ち	中皮腫	アスベスト (石綿) などが原因で主に胸膜や腹膜の中皮細胞に発生する悪性の腫瘍
な	ナノセルロース (類)	セルロースナノファイバー、セルロースナノクリスタルなど、繊維径がナノサイズ (1~100 nm) のセルロースの総称。
は	培養細胞試験	培養液中で、生物個体から切り離して分裂増殖する細胞を用いた試験
は	バッテリー試験	遺伝毒性を総合的に評価するため、エンドポイントの異なる複数の遺伝毒性試験を組み合わせた試験
は	半数影響濃度	化学物質を暴露した試験個体の半数が試験終了までに影響を被る暴露濃度。EC50
は	半数致死濃度	化学物質を暴露した試験個体の半数が試験終了までに死亡する暴露濃度。LC50
は	半数致死量	投与した動物の 50%が死亡する用量。LD50
ひ	微結晶セルロース (MCC)	微結晶セルロース (microcrystalline cellulose) 従来より医薬品や食品添加物用途で多く使われている高純度の結晶セルロース。一般に繊維径は CNF よりやや太い。
ま	マウスリンフォーマ TK 試験	化学物質等による遺伝子突然変異を評価する試験。マウスリンパ腫細胞株の内因性の薬剤耐性遺伝マーカー (TK 遺伝子) を用いた劣性型突然変異を指標とする。
ま	マクロファージ	白血球の 1 種で、細菌、異物、細胞の残骸などを捕食して消化する。
み	ミジンコ繁殖試験	オオミジンコ等のミジンコ類を対象に、化学物質を暴露して、試験個体が産んだ仔虫の数を指標に化学物質の長期的な影響を調査する生態毒性試験。OECD のテストガイドライン No.211 では試験個体に化学物質を 21 日間暴露する。
み	ミジンコ遊泳阻害試験	オオミジンコ等のミジンコ類の仔虫を対象に、化学物質を暴露して、遊泳行動を指標に化学物質の短期的な影響を調査する生態毒性試験。OECD のテストガイドライン No.202 では 24 時間以内に産まれた仔虫に化学物質を 48 時間暴露する。
む	無影響濃度	no observed effect concentration (NOEC) 対照区と比較して、統計学的に有意な悪影響がみられない最大の暴露濃度を示す。
む	無毒性量	no observable adverse effect level (NOAEL) 動物に毒性 (有害な) 影響がみられない最大の投与量
も	網羅的遺伝子発現解析	外部刺激等による生体反応を分析するため、数千から数万個の遺伝子の発現変動を網羅的に解析する技術

第1章 本書の構成

本書では、CNFの安全性に関する情報について、既存論文の情報を整理すると共に、NEDO委託事業の成果をとりまとめた。また、本書では、CNFだけでなく、セルロースナノクリスタル(CNC)や従来のセルロースの情報も可能な限り含めた。CNFについては、セルロースナノファイバー(cellulose nanofiber)以外に、セルロースナノフィブリル(cellulose nanofibril: CNF)、ナノフィブリル化セルロース(nanofibrillated cellulose: NFC)、nanofibrillar cellulose(NFC)、ミクロフィブリル化セルロース(microfibrillated cellulose: MFC)、microfibrillar cellulose(MFC)、セルロースミクロフィブリル(cellulose microfibril: CMF)などと呼ばれる場合もあるが、基本的に原文に沿って記載した。

本書の構成を図1.1に示す。第2章から第6章は、動物試験や細胞試験の結果を中心に、ヒトへの健康影響に関する情報を整理した。発がん性に係る評価項目として、第2章に遺伝毒性についての情報をまとめた。また、繊維状のナノ材料は、アスベスト(石綿)のように中皮腫を引き起こすのではないかとそのリスクが懸念されているため、中皮腫に関する知見を第3章にまとめた。第4章から第6章では、それぞれ暴露経路(吸入、経皮、経口)別に知見を整理した。第7章は、ヒト暴露に関する情報である。作業環境調査や模擬試験など、CNFの排出・暴露に関する評価事例を紹介し、注意すべきプロセス、対策と管理、計測法についてまとめた。第8章と第9章は、環境影響に関連する情報である。第8章では水生生物への影響、第9章では、生分解性についての知見をとりまとめた。第10章では、各章の結果を総括した。

本書は、2022年12月に公開した評価書を改訂したものであり、最新の論文情報を反映するとともに、NEDO事業で新たに得られた成果を加えた。新たな内容として、第3章では、マウスの腹腔内投与試験および培養細胞試験による中皮腫発生に関する検証結果をまとめた。第4章では、28日間にわたるラット気管内投与試験および培養細胞試験に加え、福井大学が実施したマウス気管内投与試験およびラット吸入暴露試験の結果を新たに取り上げた。第6章では、福井大学が実施したラットおよびマウスによる28日間反復経口投与毒性試験の結果を加えた。第7章では、排出暴露評価事例を追加し、第8章では、藻類、甲殻類、魚類などの水生生物を対象とした生態影響評価の結果をまとめた。

第1章	本書の構成	
第2章	遺伝毒性の評価	ヒト健康影響
第3章	中皮腫の評価	
第4章	吸入影響の評価	
第5章	皮膚影響の評価	
第6章	経口毒性の評価	
第7章	排出・暴露の評価	ヒト暴露
第8章	生態影響の評価	環境影響
第9章	生分解性の評価	
第10章	まとめ	

図1.1 本書の構成

第2章 遺伝毒性の評価

2.1 はじめに

工業ナノ材料の安全性評価において、遺伝毒性の有無は発がんリスクを予測・管理する上で極めて重要な指標である。特に、繊維状の構造を有する材料については、その形態が生体内での異物応答を誘発しやすいことから、早期の評価とリスクの見極めが求められている。

本章では、CNF および CNC の遺伝毒性に関する評価動向と、我々が NEDO 委託事業（2017～2019 年度および 2020～2024 年度）を通じて得た試験結果を紹介する。

これらのナノセルロースは、再生可能な植物資源由来であることから環境調和型材料として注目されているが、その繊維状ナノ構造ゆえに、カーボンナノチューブ（CNT）と同様の生体影響—とりわけ発がん性や遺伝毒性の可能性—に対して懸念が持たれている。このため、CNF やセルロースナノクリスタル（CNC）についても体系的な毒性評価が必要不可欠である。

CNT のような繊維状の工業ナノ材料については、アスベストと類似した形態的特徴を有することから、中皮腫などの発がんリスクが懸念されており、動物実験やばく露評価などが各国で継続的に進められている。2016 年には、「労働安全衛生法第 28 条第 3 項に基づく化学物質による健康障害を防止するための指針」（いわゆる「がん原性指針」）に、「複層カーボンナノチューブ（MWNT-7）」が対象物質として追加された。MWNT-7 は複層（多層）カーボンナノチューブの一種であり、現在は製造が中止されている。なお、指針には但し書きとして、「製造事業者により当該製品の名称が NT-7、NT-7K に変更されたため、これら変更後の名称の製品も含む」と明記されており、製品名の違いにかかわらず同一物質として扱われている。

この措置の一因は、国際がん研究機関（IARC）が 2014 年に MWCNT-7 を「Group 2B（ヒトに対して発がん性がある可能性がある）」に分類し、他の CNT は「Group 3（ヒトに対する発がん性について分類できない）」としたことである（Grosse et al., 2014）。さらに、厚生労働省が 2015 年に設置した検討会で紹介された研究では、高濃度の MWCNT-7 を 2 年間暴露したラットの一部に肺腫瘍の発生が報告された（Kasai et al., 2016）。これらの知見により、MWCNT-7 についてはヒトへの影響がなお不確実であるものの、発がん性リスクに対して慎重な対応、すなわちばく露防止措置の徹底やリスク評価の継続が求められている。一方で、他の CNT やナノカーボン材料については、発がん性や遺伝毒性に関する科学的データが依然として限られており、今後の体系的なリスク評価と規制整備が課題である。

同様に、繊維状ナノ構造を持つ CNF や CNC に関しても、発がん性や遺伝毒性に関する報告は現時点で極めて限られており、今後は吸入暴露や生体内動態を含む包括的かつ体系的な評価が求められている。

化学物質の発がん性評価には、一般にラットやマウスを用いた長期毒性試験が実施されており、たとえば OECD 試験ガイドライン（Test Guidelines: TG）の TG451、TG453 に準拠した試験では、被験動物に最大 24 か月にわたる吸入または経口暴露を行い、病理組織学的手法により腫瘍の発生有無が判定される。これらの方法は科学的信頼性が高い一方で、試験期間が長期に及び、実施コストも高額となるため、すべての化学物質に一律に適用することは現実的ではない。

近年、動物実験の代替を目的とした新たなアプローチ法（New Approach Methodologies: NAMs）

の導入が国際的に推進されており、ECHA によるワークショップ報告書では、産業化学物質の規制評価における NAMs の活用と課題が詳細に議論されている (ECHA, 2023; Sewell et al., 2024)。

遺伝毒性評価は、発がん性のスクリーニングや早期評価の手段として、迅速かつ低コストで実施可能な試験が広く用いられている。これらの試験では、DNA 損傷、染色体異常、小核形成、突然変異誘発などの遺伝的变化を検出するために、多様な試験系が利用され、大別して *in vitro* (細胞試験) および *in vivo* (動物試験) に分類される。

経済協力開発機構 (OECD) は、遺伝毒性試験を含む化学物質の安全性評価に関する試験法の国際標準化を推進しており、2025 年現在、複数の試験法について国際的に合意された試験ガイドラインを整備している (OECD Publishing. <https://doi.org/10.1787/20745788>)。これらのガイドラインは、各国の規制評価において重要な科学的根拠として広く活用されている。

しかしながら、各試験は検出可能な遺伝毒性の種類や作用機序が異なるため、単一の試験のみでの評価には限界がある。このため、複数の異なる試験を組み合わせたバッテリー試験が一般的に採用されている。例えば、労働安全衛生法 (安衛法)、化学物質審査規制法 (化審法)、EU の REACH 規則、医薬品関連規制、食品衛生法などでは、それぞれの規制要件に応じた試験の組み合わせが求められている。特に医薬品開発における遺伝毒性評価では、Ames 試験 (復帰突然変異試験)、哺乳類細胞を用いた染色体異常試験、げっ歯類を対象とした *in vivo* 小核試験などの組み合わせが推奨されている (医薬品の遺伝毒性に関するガイダンス, 2012)。

2.2 既存文献の情報

CNF の遺伝毒性に関する研究では、使用された試験系や材料特性の違いにより、陽性および陰性の結果が混在して報告されている。本節では、代表的な研究報告を整理し、CNF の遺伝毒性評価の現状を概観する。

具体的には、DNA 損傷などの陽性反応を示した研究がいくつか存在し (Ventura et al., 2018; Catalán et al., 2017; Hadrup et al., 2019; de Lima et al., 2012; Aimonen et al., 2022; Vital et al., 2025) (表 2.1 参照)、なかでも OECD TG に準拠した試験方法を明記している研究として Catalán et al. (2017) が挙げられる。同研究では、マウスに CNF を咽頭吸入させた際、肺細胞に DNA 損傷が確認された。

一方で、陰性結果を示した報告も複数存在する。たとえば、Mejía-Jaramillo et al. (2023) は、ヒト結腸腺がん由来の Caco-2 細胞を用いたコメットアッセイにおいて、DNA 損傷が観察されなかったと報告している。陰性結果を示した研究の多くは、OECD TG に準拠した方法で実施されており (Pitkänen et al., 2014; Moreira et al., 2009; Catalán et al., 2015; 下川ら, 2021a; 下川ら, 2021b; Fujita et al., 2021)、その信頼性は高いと考えられる。

遺伝毒性バッテリー試験を採用した研究として、下川ら (2021b) および Fujita ら (2021) の 2 報が挙げられる。これらの報告は、複数の異なる試験系によって一貫して陰性結果が得られており、CNF の遺伝毒性の有無を評価するうえで、より信頼性の高い科学的根拠を提供している。

以下に、各研究の内容と結果を簡潔に紹介する。なお、Fujita ら (2021) による CNF の遺伝毒性バッテリー試験の結果については、2.3 節『NEDO 委託事業の成果』にて詳述する。

また、引用文献中では、ナノフィブリル化セルロース (NFC) やセルロースナノフィブリル (CNF または NCF) といった用語が併用されているが、本章では表記の一貫性を保つため、これらをす

べて「CNF」の用語で統一する。

Ventura et al. (2018) は、工業用漂白ユーカリ・グロビュラス (*Eucalyptus globulus*) クラフトパルプ由来の TEMPO 酸化 CNF について、細胞毒性、免疫毒性、および遺伝毒性をスクリーニングした。その結果、低濃度の CNF は肺胞上皮細胞 (A549) の増殖を促進する可能性が示された一方、高濃度では中程度の細胞毒性が認められた。炎症性サイトカイン IL-1 β については、ヒト単球細胞株 (THP-1) との共培養条件下でも検出されず、免疫毒性の兆候は認められなかった。コメットアッセイでは、A549 細胞に対する顕著な DNA 損傷は確認されなかったが、小核試験では 1.5 および 3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ の濃度で小核形成が誘導された。これらの知見は、本 CNF が異数性または染色体異常を介して遺伝毒性を示す可能性を示唆している。

Ventura et al. (2023) は、同様にユーカリ・グロビュラス由来の TEMPO 酸化 CNF、セルロースマイクロフィブリル (CMF)、および CNC について、A549 細胞と THP-1 由来マクロファージの共培養系を用いて遺伝毒性を評価した。小核試験およびコメットアッセイの結果、CMF の最低濃度のみが酸化 DNA 損傷 (FPG-コメットアッセイ) を誘導したが、いずれの CNF/CNC も有意な染色体異常は引き起こさなかった。これらの結果は、Ventura ら (2018) の単一培養系を用いた結果と併せて、TEMPO 酸化 CNF および CNC が本試験条件下では遺伝毒性を示さないこと、また CMF については低いながらも遺伝毒性の可能性を示している。

Catalán et al. (2017) は、TEMPO 酸化 CNF (長さ 300–1000 nm、幅 10–25 nm) をマウスに単回咽頭吸引で投与し、肺および骨髄における遺伝毒性を評価した。C57Bl/6 雌マウスに対し 4 用量 (10、40、80、200 $\mu\text{g}/\text{マウス}$) を投与し、24 時間後に評価を行った。肺細胞では、低用量群で有意な DNA 損傷が確認されたが、BAL 細胞数の増加は認められなかった。骨髄小核アッセイでは遺伝毒性の兆候は観察されなかった。CNF は肺において TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、CXCL5 の mRNA 発現を用量依存的に増加させ、炎症細胞の動員を促進したが、タンパク質レベルでは顕著な変化はなかった。組織学的には、CNF がマクロファージに取り込まれ、用量依存的に肺胞への好中球の集積が観察された。これらの結果は、CNF が局所的な急性炎症および肺における DNA 損傷を引き起こすものの、全身性の遺伝毒性は示さないことを示している。

Hadrup et al. (2019) は、3 種類の CNF (FINE CNF、カルボキシル化 CNF (AS-COOH)、殺生物剤含有 CNF (BIOCID FINE CNF)) をマウスに気管内投与し、DNA 損傷の発現をコメットアッセイにより評価した。FINE CNF は、投与翌日に肺における DNA 損傷を誘発し、AS-COOH では最高用量群において 28 日後の BAL 細胞に DNA 損傷が見られた。BIOCID FINE CNF は FINE CNF よりも高い DNA 損傷レベルを示し、殺生物剤の関与が示唆された。

de Lima et al. (2012) は、農産物由来 CNF の遺伝毒性を植物細胞 (タマネギ根) および動物細胞 (ヒトリンパ球・線維芽細胞) を用いて評価した。細胞種により応答は異なり、植物細胞では複数の CNF で高い遺伝毒性が見られた一方、動物細胞では茶綿およびクラワ由来 CNF で遺伝毒性が確認された。ルビーコットン由来 CNF は、いずれの細胞型でも DNA 損傷を誘発しなかった。本研究は、植物由来ナノセルロースの遺伝毒性評価の可能性を示し、農業利用・環境評価への示唆を提供している。

Aimonen et al. (2022) は、表面化学修飾およびサイズ分画の異なる CNF を用いて、ヒト気管支上皮細胞 (BEAS-2B) における遺伝毒性を評価した。塩化エポキシプロピルトリメチルアンモニウムで修飾された CNF の微細画分では、DNA および染色体損傷が誘発された。また、カルボ

キシメチル化 CNF の粗大画分においても小核形成が認められた。主な毒性メカニズムは、活性酸素種（ROS）の生成によると考えられた。

Vital et al. (2025) は、TEMPO 酸化 CNF および酵素分解 CNF (CMF-ENZ) を対象に、ヒト腸管細胞を用いた *in vitro* 消化モデルと、コメットアッセイおよび小核試験を組み合わせたバッテリー試験により、遺伝毒性を評価した。その結果、両 CNMs は遺伝子変異および染色体異常を誘発しないことが確認され、これらの試験においては陰性と判定された。一方で、コメットアッセイでは軽度の DNA 損傷が観察され、明確な陽性とは言えないものの、遺伝毒性の可能性を完全には否定できないとされた。さらに、*in vitro* 消化処理を施した CNMs では、DNA 損傷の傾向は一部軽減されたものの、消化後の TEMPO 酸化 CNF の最低濃度において、Caco-2 細胞に染色体損傷が誘発される結果が得られ、評価は不明確 (equivocal) となった。著者らはこれらの結果を踏まえ、現時点では安全性を示唆する知見が得られているものの、遺伝毒性の可能性を完全に排除するには至っておらず、さらなる検証が必要であると結論づけている。

Mejía-Jaramillo et al. (2023) は、バナナ穂軸由来の CNF (BR-CNF) の食品分野への応用可能性を評価するため、Caco-2 細胞を用いた *in vitro* 試験を実施し、細胞毒性および DNA 損傷（コメットアッセイ）に関する有害作用は認められなかったと報告している。

Pitkänen et al. (2014) は、フィブリル化セルロースのサイズ分画と毒性との関連を評価した。細胞毒性は最高濃度でわずかに確認されたものの、Ames 試験や線虫を用いた *in vivo* 試験では遺伝毒性は示されなかった。ただし、使用された殺生物剤の影響については今後の検討課題とされた。

Moreira et al. (2009) は、酸と超音波処理により製造されたバクテリアセルロースナノファイバーについて、コメットアッセイおよび Ames 試験で遺伝毒性が陰性であることを確認した。細胞形態への影響は認められなかったが、細胞増殖速度の軽微な低下が観察された。

Catalán et al. (2015) は、CNC および微結晶セルロースの *in vitro* 毒性を比較した。CNC は遺伝毒性および免疫毒性を示さなかったが、非ナノスケールの微結晶セルロースはマクロファージで炎症性サイトカインを誘導した。これにより、CNC の安全性が示唆される一方、炎症を介した間接的な遺伝毒性の可能性が提起され、*in vivo* 研究の必要性が指摘された。

下川ら (2021a) は、スギパルプ由来 CNF を用いて Ames 試験および染色体異常試験を実施し、いずれの試験においても遺伝毒性は認められなかった。

下川ら (2021b) は、タケパルプ由来 CNF について、Ames 試験、マウスリンフォーマ TK 試験、*in vitro* 小核試験を実施したが、いずれの試験系でも遺伝子突然変異および小核形成は観察されなかった。

なお、食品添加物として利用されている微結晶セルロースの遺伝毒性に関しては、JECFA (1998) において Ames 試験、マウスリンフォーマ TK 試験、小核試験が実施され、いずれも陰性であると報告されている。

表 2.1 CNF の遺伝毒性評価

被験材料	細胞／動物	試験方法	試験結果	出典
TEMPO 酸化 CNF	A549 (THP-1 との共 培養)	コメットアッセイ、小 核試験	A549 細胞に対して顕著な DNA 損傷を誘発しなかつ たが、1.5 および 3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ で小核形成。	Ventura et al. (2018)
TEMPO 酸化 CNF、セルロース マイクロフィブリル (CMF)、CNC	A549 (THP-1 との共 培養)	コメットアッセイ、小 核試験	コメットアッセイでは、 CNF と CNC は遺伝毒性を 示さず、CMF は最低濃度 で DNA 鎖切断を誘発。小 核試験では全て染色体異常 なし。	Ventura et al. (2023)
TEMPO 酸化 CNF	咽頭吸引したマウスの 肺細胞および気管支肺 胞洗浄細胞	コメットアッセイ、骨 髄赤血球小核試験 (TG489、TG471 準 拠)	低用量の CNF で肺細胞の DNA 損傷の誘導あり。気 管支肺胞洗浄細胞では増加 なし。骨髓小核試験での影 響は検出なし。	Catalán et al. (2017)
CNF、カルボキシ ル化 CNF	気管内投与マウス	コメットアッセイ	BAL 細胞および肺で DNA 損傷が観察。	Hadrup et al. (2019)
綿繊維およびクラ ワ繊維由来 CNF	タマネギ根 (Allium cepa)、ヒト末梢血リン パ球、マウス線維芽細 胞	染色体異常試験、コメ ットアッセイ	緑・白・茶色の綿およびク ラワ由来 CNF は植物細胞 で遺伝毒性を示し、茶色の 綿およびクラワ由来 CNF は動物細胞でも遺伝毒性を 示した。ルビーコットン由 来 CNF では、いずれの細 胞型でも有意な DNA 損傷 は認められなかった。	de Lima et al. (2012)
未修飾 CNF、 TEMPO 酸化 CNF、エポキシブ ロピルトリメチル アンモニウムクロ リド CNF、カル ボキシメチル化 CNF、原料繊維	BEAS-2B 細胞	コメットアッセイ、小 核試験	エポキシブロピルトリメチ ルアンモニウムクロリド CNF の微細画分で DNA 損傷と染色体損傷。カルボ キシメチル化 CNF の粗大 画分で染色体損傷。他のサ イズ画分や、未修飾 CNF、TEMPO 酸化 CNF および原料繊維では、遺伝 毒性なし。	Aimonen et al. (2022)
TEMPO 酸化 CNF、酵素分解 CNF	Caco-2 および HT29- MTX-E12 細胞	コメットアッセイ、小 核試験 (TG487 準拠)	遺伝子変異や倍数体性・断 裂性の染色体損傷を引き起 こさない一方で、DNA 損 傷の誘導が示唆される結果 も得られたことから、遺伝 毒性の可能性を完全に否定 できなかった。	Vital et al. (2025)

被験材料	細胞／動物	試験方法	試験結果	出典
バナナ穂軸由来 CNF	Caco-2 細胞	コメットアッセイ	陰性	Mejía-Jaramillo et al. (2023)
細かく粉碎したフ ィブリル化セルロ ース	サルモネラ菌、大腸菌	Ames 試験 (TG471 準 拠)	陰性	Pitkänen et al. (2014)
バクテリアセルロ ースナノファイバ ー	チャイニーズハムスタ ー卵巣細胞、サルモネ ラ菌、大腸菌	Ames 試験、コメット アッセイ (TG471、 TG489 準拠)	陰性	Moreira et al. (2009)
CNC、微結晶 (非ナノスケール) セルロース	BEAS-2B 細胞	<i>in vitro</i> 小核試験 (TG487 準拠)	陰性	Catalán et al. (2015)
スギパルプ由来 CNF	サルモネラ菌、大腸 菌、チャイニーズハム スター肺線維芽細胞株 (CHL/IU)	Ames 試験、 <i>in vitro</i> 染 色体異常試験 (TG471、TG473 準 拠)	陰性	下川ら (2021a)
タケパルプ由来 CNF	サルモネラ菌、大腸 菌、マウスリンパ腫細 胞、チャイニーズハム スター肺線維芽細胞株 (CHL/IU)	Ames 試験、マウスリ ンフォーマ TK 試験、 <i>in vitro</i> 小核試験 (TG471、TG490、 TG487 準拠)	陰性	下川ら (2021b)
TEMPO 酸化 CNF、リン酸エス テル化 CNF、機 械解繊 CNF	サルモネラ菌、大腸 菌、マウスリンパ腫細 胞、チャイニーズハム スター肺線維芽細胞株 (CHL/IU)、気管内投 与したラット骨髄中の 末梢血	Ames 試験、マウスリ ンフォーマ TK 試験、 <i>in vitro</i> 染色体異常試 験、ラット赤血球小核 試験 (TG471、 TG490、TG473、 TG474 準拠)	陰性	Fujita et al. (2021)

2.3 NEDO 委託事業の成果

工業ナノ材料である MWCNT や剥離グラフェンについても、遺伝毒性バッテリー試験による評価が報告されている (Ema et al., 2012; Fujita et al., 2018)。これらの知見を踏まえ、NEDO 委託事業 (2017～2019 年度および 2020～2024 年度) では、CNF の遺伝毒性を包括的に評価することを目的として、Ames 試験、マウスリンフォーマ TK 試験、*in vitro* 染色体異常試験、およびラット赤血球小核試験の 4 種の試験系を選定し、すべて OECD TG に準拠して実施した (藤田ら, 2020; Fujita et al., 2023) (図 2.1 参照)。

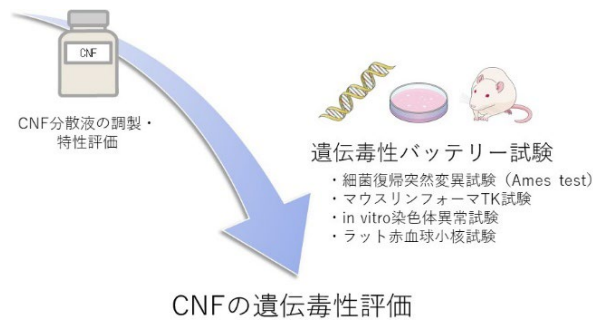


図 2.1 バッテリー試験による CNF の遺伝毒性評価

2.3.1 Ames 試験

リン酸エステル化 CNF、TEMPO 酸化 CNF、機械解繊 CNF の 3 種の CNF 分散液を被験材料とし、それらの遺伝子突然変異誘発性を評価した。試験は OECD TG471 (1997) に準拠し、*Salmonella typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 株および *Escherichia coli* WP2uvrA 株を用いて細菌復帰突然変異試験 (Ames 試験) を実施した。

ラット肝由来 S9 ミックスを用いた代謝活性化の有無 (-S9 および +S9 条件) の両条件下で、プレート法により試験を行った。予備試験では、最高用量を 100 µg/プレートとし、6 段階の用量で用量設定試験を実施した。その結果、すべての CNF は -S9 および +S9 条件のいずれにおいても、陰性対照群の 2 倍を超える復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

これを受けて本試験では、全菌株に対し同様の 6 用量で実施したが、いずれの条件においても復帰変異コロニー数の有意な増加は観察されず、結果の再現性も確認された。陽性対照物質 (アジ化ナトリウムなど) はすべての菌株で明確な突然変異誘発作用を示し、試験系の妥当性が確認された。

以上より、OECD TG471 に準拠して実施した本 Ames 試験の結果、3 種類の CNF はいずれも遺伝子突然変異を誘発しないと判断され、「陰性」と判定された。

2.3.2 マウスリンフォーマ TK 試験

Ames 試験は、工業ナノ材料による遺伝毒性評価には適していないとされている。主な理由は、試験結果がほとんど陰性であることに加え、ナノ材料が細菌に取り込まれにくい構造的制約が存在すること、さらに陽性結果が得られた場合でもその信頼性が低い点にある (Landsiedel et al., 2009 ; Elespuru et al., 2018 ; Landsiedel et al., 2022)。このため、工業ナノ材料の評価には、哺乳類細胞を用いた突然変異試験が推奨されている。

そこで、本研究では 2 種類の CNF (TEMPO 酸化 CNF および機械解繊 CNF) の分散液を被験材料とし、*in vitro* 遺伝子突然変異試験であるマウスリンフォーマ TK 試験を実施した。試験は、マウスリンパ腫細胞株 (L5178Y tk±) を用い、ラット肝 S9 による代謝活性化系の有無 (+S9 および -S9) における短時間処理法および 24 時間連続処理法の 3 条件で行われ、OECD TG490 (2014) に準拠して実施された。

試験の結果、CNF 処理群 (最高用量 : 100 µg/mL) では、いずれの処理条件においても突然変異頻度 (T-MF) が陰性対照値 (Global Evaluation Factor) を超過することはなかった。また、陰性対照群および無処理対照群の T-MF およびコロニー形成率もすべて許容範囲内であった。陽性

対照物質（メタンスルホン酸メチル [-S9 および 24 時間処理]、シクロホスファミド [+S9 処理]）は明確な突然変異誘発作用を示し、試験の信頼性が確認された。

以上の結果より、OECD TG490 に準拠して実施した本マウスリンフォーマ TK 試験において、2 種類の CNF はいずれも遺伝子突然変異誘発性を示さないと判断され、「陰性」と判定された。

2.3.3 *in vitro* 染色体異常試験

リン酸エステル化 CNF、TEMPO 酸化 CNF、機械解繊 CNF の 3 種の CNF 分散液を用い、染色体構造異常および倍数性の誘発性を評価するため、チャイニーズハムスター肺線維芽細胞（CHL/IU 細胞）を用いた *in vitro* 染色体異常試験を実施した。本試験は OECD TG473（2016）に準拠して実施された。

予備試験として細胞増殖抑制試験を行い、その結果に基づいて処理可能な最高用量を 100 µg/mL と設定した上で、本試験を実施した。その結果、3 種の CNF のいずれの処理群においても、染色体構造異常細胞および倍数性細胞の出現頻度に統計学的に有意な増加は認められなかった。一方、陽性対照群（マイトマイシン C およびシクロホスファミド）では、染色体異常の統計学的に有意な増加が確認され、本試験系の信頼性が確認された。

以上より、OECD TG473 に準拠して実施した *in vitro* 染色体異常試験において、3 種の CNF はいずれも染色体異常誘発性を示さないことが確認され、「陰性」と判定された。

2.3.4 ラット赤血球小核試験

リン酸エステル化 CNF、TEMPO 酸化 CNF、機械解繊 CNF の 3 種の CNF 分散液を用い、骨髓細胞における小核誘発性を評価するため、OECD TG474（2014）に準拠したラット赤血球小核試験を実施した。

試験では、各 CNF 分散液（0.5、1.0、2.0 mg/kg）を、1 日 1 回、24 時間間隔で 2 日間連続して気管内投与し、最終投与 24 時間後に摘出した大腿骨骨髓細胞を用いて、小核多染性赤血球（MNPCE）の出現頻度を指標に染色体異常誘発性を評価した。

その結果、いずれの CNF 処理群においても、陰性対照群と比較して MNPCE の出現頻度に統計学的に有意な増加は認められなかった。また、多染性赤血球（PCE）の割合にも有意な変化はみられなかった。さらに、無処理対照群の MNPCE 出現頻度は陰性対照の基準値内に収まり、陽性対照物質（シクロホスファミド一水和物）は MNPCE の有意な増加を示したことから、試験系の信頼性が確認された。

以上より、OECD TG474 に準拠して実施したラット赤血球小核試験において、3 種の CNF はいずれも小核誘発性を示さず、「陰性」と判定された。

2.3.5 3 種類の CNF の遺伝毒性評価

以上の Ames 試験、マウスリンフォーマ TK 試験、*in vitro* 染色体異常試験、ラット赤血球小核試験の 4 種の試験系に基づく遺伝毒性バッテリー試験の結果、リン酸エステル化 CNF、TEMPO 酸化 CNF、機械解繊 CNF のいずれも、全ての試験において遺伝毒性を示さず、「陰性」とであると結論された（Fujita et al., 2021）。

2.4 まとめ

本節では、CNF の遺伝毒性に関する評価結果を概説した。既報では、CNF による遺伝毒性や DNA 損傷に関する陽性結果が一部で報告されている一方で、OECD TG に準拠した試験においては陰性結果も示されており、現時点では CNF の遺伝毒性について一貫した結論は得られていない。

これに対し、NEDO 委託事業（2017～2019 年度および 2020～2024 年度）において実施された Ames 試験、マウスリンフォーマ TK 試験、*in vitro* 染色体異常試験、ラット赤血球小核試験の結果、対象としたリン酸エステル化 CNF、TEMPO 酸化 CNF、機械解繊 CNF はいずれも「陰性」と判定された。

これら 4 種の試験系に基づくバッテリー試験の結果から、試験対象とした 3 種の CNF は、いずれも遺伝毒性が「陰性」とであると結論された。しかしながら、CNF はその物理化学的特性（繊維長、太さ、形状、表面官能基、解繊度、純度など）が原料や製造法に依存して大きく異なることから、CNF ごとにその特性を踏まえた信頼性の高い OECD TG 準拠の試験を実施し、個別に評価を行うことが重要である。

参考文献

- Aimonen K, Imani M, Hartikainen M, Suhonen S, Vanhala E, Moreno C, Rojas OJ, Norppa H, Catalán J, 2022. Surface functionalization and size modulate the formation of reactive oxygen species and genotoxic effects of cellulose nanofibrils. Part Fibre Toxicol. 19:19.
- Catalán J, Ilves M, Järventaus H, Hannukainen KS, Kontturi E, Vanhala E, Alenius H, Savolainen KM, Norppa H, 2015. Genotoxic and immunotoxic effects of cellulose nanocrystals *in vitro*. Environ Mol Mutagen. 56(2):171–182.
- Catalán J, Rydman E, Aimonen K, Hannukainen KS, Suhonen S, Vanhala E, Moreno C, Meyer V, Perez DD, Sneek A, Forsström U, Højgaard C, Willemoes M, Winther JR, Vogel U, Wolff H, Alenius H, Savolainen KM, Norppa H, 2017. Genotoxic and inflammatory effects of nanofibrillated cellulose in murine lungs. Mutagenesis. 32(1):23–31.
- de Lima R, Oliveira Feitosa L, Rodrigues Maruyama C, Abreu Barga M, Yamawaki PC, Vieira IJ, Teixeira EM, Corrêa AC, Caparelli Mattoso LH, Fernandes Fraceto L, 2012. Evaluation of the genotoxicity of cellulose nanofibers. Int J Nanomedicine. 7:3555–3565.
- ECHA, European Chemicals Agency. Report on the European Chemicals Agency’s “New Approach Methodologies Workshop: Towards an Animal-Free Regulatory System for Industrial Chemicals”, 31 May – 1 June 2023, Helsinki, Finland. European Union, Brussels. ECHA-23-R-09-EN. ISBN: 978-92-9468-299-4. Cat. Number: ED-04-23-926-EN-N; 2023. <https://doi.org/10.2823/7494>.
- Elespuru R, Pfuhler S, Aardema MJ, Chen T, Doak SH, Doherty A, Farabaugh CS, Kenny J, Manjanatha M, Mahadevan B, Moore MM, Ouédraogo G, Stankowski LF Jr, Tanir JY, 2018. Genotoxicity assessment of nanomaterials: Recommendations on best practices, assays, and methods. Toxicol Sci. 164(2):391–416.
- Ema M, Imamura T, Suzuki H, Kobayashi N, Naya M, Nakanishi J, 2012. Evaluation of genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes in a battery of *in vitro* and *in vivo* assays. Regul Toxicol

- Pharmacol. 63(2):188–195.
- Fujita K, Endoh S, Maru J, Sai T, Tomoko A, Yosuke Goi, Obara S, Tani F, Yamamoto F, Ogawa T. 2023. A Manual for Toxicity Testing of Cellulose Nanofibers.
https://riss.aist.go.jp/files/CNF_Hazard_Assessment_Procedure_En_230201.pdf
- Fujita K, Obara S, Maru J, Endoh S, 2021. Genotoxicity assessment of cellulose nanofibrils using a standard battery of *in vitro* and *in vivo* assays. Toxicol Rep. 9:68–77.
- Fujita K, Take S, Tani R, Maru J, Obara S, Endoh S, 2018. Assessment of cytotoxicity and mutagenicity of exfoliated graphene. Toxicol In Vitro. 52:195–202.
- Grosse Y, Loomis D, Guyton KZ, Lauby-Secretan B, El Ghissassi F, Bouvard V, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, Scoccianti C, Mattock H, Straif K, 2014. International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. Carcinogenicity of fluoro-edenite, silicon carbide fibres and whiskers, and carbon nanotubes. Lancet Oncol. 15(13):1427–1428.
- Hadrup N, Knudsen KB, Berthing T, Wolff H, Bengtson S, Kofoed C, Espersen R, Højgaard C, Winther JR, Willemoës M, Wedin I, Nuopponen M, Alenius H, Norppa H, Wallin H, Vogel U, 2019. Pulmonary effects of nanofibrillated celluloses in mice suggest that carboxylation lowers the inflammatory and acute phase responses. Environ Toxicol Pharmacol. 66:116–125.
- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), 1998. Safety evaluation of certain food additives and contaminants. WHO food additives series 40. Microcrystalline cellulose.
<https://inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v040je03.htm>
- Kasai T, Umeda Y, Ohnishi M, Mine T, Kondo H, Takeuchi T, Matsumoto M, Fukushima S, 2016. Lung carcinogenicity of inhaled multi-walled carbon nanotube in rats. Part Fibre Toxicol. 13(1):53.
- Landsiedel R, Honarvar N, Seiffert SB, Oesch B, Oesch F, 2022. Genotoxicity testing of nanomaterials. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol. 14(6):e1833.
- Landsiedel R, Kapp MD, Schulz M, Wiench K, Oesch F, 2009. Genotoxicity investigations on nanomaterials: Methods, preparation and characterization of test material, potential artifacts and limitations – many questions, some answers. Mutat Res. 681(2–3):241–258.
- Mejía-Jaramillo AM, Gómez-Hoyos C, Cañas Gutierrez AI, Correa-Hincapié N, Zuluaga Gallego R, Triana-Chávez O, 2023. Tackling the cytotoxicity and genotoxicity of cellulose nanofibers from the banana rachis: A new food packaging alternative. Heliyon. 9(11):e21560.
- Moreira S, Silva NB, Almeida-Lima J, Rocha HA, Medeiros SR, Alves C Jr, Gama FM, 2009. BC nanofibres: *in vitro* study of genotoxicity and cell proliferation. Toxicol Lett. 28;189(3):235–341.
- OECD Test Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4: Health Effects. OECD Publishing.
<https://doi.org/10.1787/20745788>
- OECD Test No. 451: Carcinogenicity Studies. OECD Publishing 2018.
<https://doi.org/10.1787/9789264071186-en>
- OECD Test No. 453: Combined Chronic Toxicity/Carcinogenicity Studies. OECD Publishing 2018.
<https://doi.org/10.1787/9789264071223-en>
- OECD Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test. OECD Publishing 1997.

- <https://doi.org/10.1787/9789264071247-en>
- OECD Test No. 473: *In vitro* Mammalian Chromosomal Aberration Test. OECD Publishing 2016.
<https://doi.org/10.1787/9789264264649-en>
- OECD Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. OECD Publishing 2014.
<https://doi.org/10.1787/9789264224292-en>
- OECD Test No. 490: *In vitro* Mammalian Cell Gene Mutation Tests Using the Thymidine Kinase Gene. OECD Publishing 2014. <https://doi.org/10.1787/9789264264908-en>
- Pitkänen M, Kangas H, Laitinen O, Sneek A, Lahtinen P, Peresin MS, Niinimäki J, 2014. Characteristics and safety of nano-sized cellulose fibrils. *Cellulose*. 21:3871–3886.
- Sewell F, Alexander-White C, Brescia S, Currie RA, Roberts R, Roper C, Vickers C, Westmoreland C, Kimber I. 2024. New approach methodologies (NAMs): identifying and overcoming hurdles to accelerated adoption. *Toxicol Res (Camb)*. 13(2):tfae044. doi: 10.1093/toxres/tfae044.
- Ventura C, Lourenço AF, Sousa-Uva A, Ferreira PJT, Silva MJ. 2018. Evaluating the genotoxicity of cellulose nanofibrils in a co-culture of human lung epithelial cells and monocyte-derived macrophages. *Toxicol Lett*. 291:173–183.
- Ventura C, Pinto F, Lourenço AF, Pedrosa JFS, Fernandes SN, da Rosa RR, Godinho MH, Ferreira PJT, Louro H, Silva MJ. 2023. Assessing the Genotoxicity of Cellulose Nanomaterials in a Co-Culture of Human Lung Epithelial Cells and Monocyte-Derived Macrophages. *Bioengineering (Basel)*. 10(8):986.
- Vital N, Cardoso M, Kranendonk M, Silva MJ, Louro H. 2025. Evaluation of the cyto- and genotoxicity of two types of cellulose nanomaterials using human intestinal cells and in vitro digestion simulation. *Arch Toxicol*. 99(2):575-596.
- 医薬品の遺伝毒性試験及び解釈に関するガイダンスについて、薬食審査発 0920 第2号、平成24年9月20日
- 下川 知子, 眞柄 謙吾, 野尻 昌信, 林 徳子, 2021a. ソーダ・アントラキノン蒸解スギパルプより酵素処理と湿式解砕で調製したセルロースナノファイバーの安全性評価試験、紙パ技協誌 75(8):757-764.
- 下川 知子, 眞柄 謙吾, 池田 努, 林 徳子, 小川 睦美, 高尾 哲也, 中山 榮子, 2021b. タケパルプから得たセルロースナノファイバーの安全性評価：微生物を用いる変異原性試験，マウスリンフォーマ TK 試験，小核試験およびラットへの90日間摂取試験、紙パ技協誌 75(11):1018-1033.
- 藤田 克英, 遠藤 茂寿, 丸 順子, 才 貴史, 小栗 朋子, 後居 洋介, 小原 佐和枝, 谷 史人, 山本 彩葉, 小川 剛伸, 2020. セルロースナノファイバーの有害性試験手順書.
<https://riss.aist.go.jp/results-and-dissemin/1625/>

執筆担当者

藤田 克英

第3章 中皮腫の評価

3.1 はじめに

繊維状のナノ材料は、アスベスト（石綿）のように吸入によって中皮腫を引き起こすのではないかとリスクが懸念されている。しかしながら、繊維状ナノ材料である CNF において、中皮腫の発生を検証した報告例はなく、CNF が中皮腫を引き起こす潜在的な可能性は不明である。CNF による中皮腫発生信憑性を科学的に検証することは、作業者の健康や安全を確保し、実用化を推進するためにも重要と考える。

中皮腫は、中皮細胞から発生するがんであり、多くが悪性である。中皮腫はまれな腫瘍で、これまでの発症の多くはアスベストの吸入が関与していると言われている。中皮腫は中皮細胞が存在する部位に発生し、胸膜、腹膜、心膜、精巣漿膜に発生することが知られている。中でも、呼吸により肺を介して外部からの有害物質に暴露される機会が多いことから、胸膜での発生が 8～9 割と多く、次いで腹膜での発生が約 1 割である（井内ら, 2007）。

中皮腫の発生ポテンシャルを評価する試験として、げっ歯類の腹腔内に試料を投与し、腹腔の中皮細胞に腫瘍が発生するかを評価する腹腔内投与試験がアスベストや多層カーボンナノチューブ（MWCNT）などで多く行われている。中皮腫の発生部位を考慮した場合に、被験物質の気管内投与による胸膜中皮腫の発生検討は、実際の暴露経路に従った検討として有効であるが、気管への挿管と投与には熟達が必要であり、不慣れな者が投与した場合、肺内での対象物質の偏在が生じる可能性がある。このため、投与量のコントロールに技術が必要である。また、気管支肺胞洗浄液など取得できる生体試料の量が限られ、測定可能な生体マーカーが限定されるといった課題がある。これに対して腹腔内投与による腹膜中皮腫の発生検討は、投与する分散液の用量のコントロールが容易であり、また多くの生体試料を得ることが可能で、被験物質の中皮腫誘導のポテンシャルを検討すること、また中皮腫が発生した場合に発生機序を検討するためにより多くの解析を行うことが可能である。そのため、中皮腫発生検討の多くで、腹腔内投与による試験が行われている。

本章では、アスベストや MWCNT による中皮腫および中皮細胞に関連した生体応答に関する既存文献の情報を紹介する。また、NEDO 委託事業（2020～2024 年度）における CNF による中皮腫発生検証に関する成果を紹介する。

3.2 既存文献の情報

3.2.1 アスベストによる中皮腫および中皮細胞に関連した生体応答

アスベストは吸入暴露により中皮腫を発生させることが確実な物質として認知されている。ラットの腹腔内投与による繊維状物質の発がん性評価では、発がん性には物質の形状、体内残留性、物質の表面活性の 3 つの要因が重要である。また、アスベストが肺に沈着することで生体反応が始まる（大和, 1994）。肺でのマクロファージによる除去や溶解性などのクリアランスが低いものはより有害となる。特に、直径 0.25 μm 以下、長さ 8 μm 以上の繊維は、発がん性のポテンシャルが高いことが示されている（Stanton-Pott の仮説）（Stanton et al., 1977, 1981; Pott et al., 1974; Pott 1981）。これに従えば、アスベストのみならず、多くの繊維状物質に発がん性のポテンシャルがあることになるが、実際には、上記のような形状を持っている繊維状物質のすべてが発がん性

を示してはならず、形状は重要な要因ではあるものの、その他の要因との複合的な作用により、発がんを誘導する。アスベストであっても、クロシドライト（青石綿）とアモサイト（茶石綿）の発がん性はクリソタイル（白石綿）よりも数十～数百倍高いとされる（Gibbs & Berry, 2008; Nicholson & Raffn, 1995）。吸入の場合には、粒子径の大きなものは鼻腔や気管で捕捉され、体外に排出される。吸入した繊維が肺胞に到達して沈着し、さらに、肺胞から胸膜等の中皮へ移行することによって、中皮腫が発生する。吸入暴露による中皮腫の発生は、中皮細胞における発がんポテンシャルだけでなく、肺胞への沈着や中皮への移行も重要な要素である。

対象物質の物理的・化学的性状のみが考慮されがちであるが、どのような組織が暴露され、どのような細胞が応答するのかといった、生物学的な要因も考慮すべきである。ある物質について、すべての細胞が同じような反応をするわけではなく、細胞の種類ごとにその反応は異なる。

アスベストによる発がんのメカニズムについて、以下の要因が提示されている（豊国, 2013）。

1) 酸化ストレス説

アスベストに含まれる鉄が触媒となり、フリーラジカルを産生することで、生体に酸化ストレスを生じる。発がん性が高いクロシドライトとアモサイトは鉄の含量が高く、*in vitro* 試験では過酸化水素の存在下でフリーラジカルを生じる。アスベストにより、生体に酸化ストレスが生じていれば、細胞および組織レベルでは酸化ストレス応答タンパク質であるヘムオキシゲナーゼ(HO-1)の発現が上昇すると考えられる。そのほか、核因子赤血球系2関連因子2(Nrf2)を介した酸化ストレス応答タンパク質の発現が上昇する（Pietrofesa et al., 2016）。これらの酸化ストレス応答タンパク質は、アスベストによって生じた酸化ストレスを軽減する方向に働く。従って、アスベストのフリーラジカル産生が生体の酸化ストレス負荷に直結するとは限らないが、これら生体の抗酸化系を超える強い、あるいは持続的なフリーラジカルの産生が生じた場合、細胞レベルでは細胞内の活性酸素種（ROS）が上昇し、生体では脂質やタンパク質、核酸の酸化物が増加し、生体の恒常性が崩れて発がんを含む疾病につながる。ラットに2 mgの用量でクロシドライトを気管内に投与したとき6ヶ月後においても、肺組織でHO-1の発現が認められている（Nagatomo et al., 2005）。

2) 染色体分配障害説

中皮細胞は貪食能を持ち、アスベストを細胞内に取り込む。細胞内に入ったアスベストは、細胞分裂時に染色体の分配を傷害し、正常な細胞分裂が行えないとする説がある。一方で、マクロファージやヒト胸膜中皮由来細胞 MeT-5A は、クロシドライト繊維を細胞内に取り込み、ラジカルの産生によるDNAの損傷が観察されたが、細胞分裂は行われていたという報告がある（Jiang et al., 2008）。

3) 分子吸着説

アスベストは物質を吸着する性質を持つことから、環境中の有害物質などを吸着し、生体や細胞内に持ち込むことで有害性を生じるとする説がある。この説に従えば、アスベストは吸着物質を生体内に運ぶキャリアとして機能し、発がん性の強さは、吸着される物質に依存する。また、アスベストに限らず、粒子状物質でも環境物質の吸着性は認められており、特に工業ナノ粒子は比表面積が大きいことから吸着量も大きい（Horie et al., 2013）。吸着性はアスベストや繊維状の物質に限らず、粒子状の物質に見られ、むしろナノ粒子で大きいこと、生体影響は吸着物質に依存し、アスベストそのものの影響ではないことに留意すべきである。

以上の3つの説は、アスベストによる有害性の原因であり、この後炎症の誘発や細胞傷害など様々な生体応答につながり、発がんという結果へと至る。中でも酸化ストレスの惹起は最も重要な有害因子であると考えられる。すなわち、中皮腫の発生を含むアスベストの有害性において、暴露後排出されることなく長期期間にわたって体内に留まり、持続的に酸化ストレスおよび炎症を惹起することが重要である。以下に、アスベストによって引き起こされる生体応答を捉えるためのマーカーの知見をまとめる。

クリソタイルを $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ の濃度で 72 時間、ヒト胸膜中皮由来細胞 MeT-5A に投与したとき、繊維症と腫瘍発生に関連する上皮間葉転換 (Epithelial to Mesenchymal Transition: EMT) を誘導する形質転換増殖因子 $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) が上昇することが報告されている (Turini et al., 2019)。Turini らは、TGF $\beta 1$ が、上皮間葉転換を通じた中皮腫の形成のメディエーターとなる可能性を述べている。また、Turini らによれば、クリソタイルはこのほかにも、カドヘリン-1 (CDH1) の下降など様々な遺伝子発現の上昇あるいは下降を引き起こす。CDH1 の異常は遺伝性びまん性胃がんの原因となることが知られているが、中皮腫発生との関連性は不明である。MeT-5A に $0.02 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ で 4 ヶ月間アスベストを投与した時、マトリックスメタロプロテアーゼ 2 (MMP-2) の発現が上昇したとの報告があり、細胞の浸潤との関連性が議論されている (Lohcharoenkal et al., 2016)。胸膜中皮細胞にクロシドライトを $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ の濃度で 8 時間投与した報告では、インターロイキン-1 β (IL-1 β) 遺伝子の発現上昇が報告されている (Dragon et al., 2015)。実際にヒトの中皮腫患者の血漿および末梢性 CD4+T 細胞を調べた報告 (Maeda et al., 2008) では、やはり TGF- β の上昇が認められているほか、B 細胞リンパ腫-2 (BCL-2) およびインターロイキン-10 (IL-10) の上昇も報告されている。また、高移動度群タンパク質 B1 (HMGB1)、腫瘍壊死因子- α (TNF- α) の上昇も報告されている (Ying et al., 2017)。HMGB1 および TNF- α の上昇は、ほかにもアスベスト暴露歴のあるヒト血清において上昇が認められている報告が多い (Qi et al., 2013; Yang et al., 2010; Tabata et al., 2013; Napolitano et al., 2016)。HMGB1 は、マクロファージ動員を促進して慢性炎症プロセスを維持する損傷関連分子タンパク質であり、TNF- α は炎症メディエーターであることから、アスベストの暴露によって炎症マーカーが上昇すると考えられる。また、アスベスト暴露歴のあるヒトの血清では、メソセリン (MSLN) (Goricar et al., 2020; Creaney et al., 2013) およびオステオポンチン (OPN) (Pass et al., 2005) が上昇している。

以上、報告によっていくらか差がみられるものの、アスベストの暴露により、TGF $\beta 1$ 、HMGB1、TNF- α 、IL-1 β といった遺伝子の発現上昇が多く報告されている。大別すると、炎症関連遺伝子、繊維化関連遺伝子、上皮間葉転換遺伝子に動き (対照区に対する上昇または下降) が認められる。また、MSLN および OPN 遺伝子の発現上昇もアスベスト暴露による中皮腫の発症において重要であると考えられる。MSLN については、アメリカ食品医薬品局 (FDA) が承認した唯一の中皮腫診断バイオマーカーであるが、低感度であるという課題があり、腫瘍再発監視目的でのみ承認されている。論文レベルでは、MSLN のほか、HMGB1 や OPN がアスベスト暴露による中皮腫発生のマーカー候補として提唱されている (Tabata et al., 2013; Napolitano et al., 2016; Chen et al., 2017; Creaney et al., 2010)。

3.2.2 多層カーボンナノチューブ暴露による中皮腫および中皮細胞に関連した生体応答

MWCNT はアスベストに比べ試料差が大きく、すべての MWCNT が明確に中皮腫を誘導するわけではなく、アスベストに比べ報告が少なく不明な点が多い。アスベストと同様に、MWCNT においても鉄が重要であるとの指摘がある (Visalli et al., 2017)。MWCNT には作製時に触媒として用いる鉄やニッケル、イットリウム等の金属が残留しているものがある。

p53 腫瘍抑制因子遺伝子をノックアウト (欠損) した p53^{+/-}マウスに MWCNT (Mitsui MWCNT-7、繊維長 1~20 μm 、繊維径 70~170 nm、鉄を 3500 ppm 含む) を、3000 μg /匹の用量で腹腔内に単回投与し、180 日間飼育した試験では、87.5%の個体に中皮腫が発生した (Takagi et al., 2008)。このとき、同時に同様の用量でクロシドライトを投与した結果では、中皮腫の発生率は 77.8%であった (14 匹/18 匹)。P53^{+/-}マウスにおける中皮腫の発生は、用量依存的であった (Takagi et al., 2012)。また、MWCNT-7 を 300、30、3 μg /匹の用量で p53^{+/-}マウスの腹腔内に投与し、1 年間の観察を行った場合の中皮腫発生率は、それぞれ 95.0 (19 匹/20 匹)、85.0 (17 匹/20 匹)、25.0 (5 匹/20 匹) %であった (Takagi et al., 2012)。これらの実験結果から、ある種類の MWCNT には、中皮腫の発生を惹起するポテンシャルがあると考えられた。一方で、同時期に実施された健常マウスへの 4 種類の MWCNT の腹腔内投与試験では、炎症の誘発や肉芽腫の形成など生体影響は認められたものの、中皮腫の発生は見られなかった (Poland et al., 2008)。

ラットへの投与試験では、MWCNT-7 を陰嚢内に投与した試験で、52 週間後に 7 匹中 6 匹の腹腔に中皮腫の発生が認められた (Sakamoto et al., 2009)。一方、体内で溶解するカプセルに入れた 10 mg の MWCNT (繊維長 1~2 μm 、繊維径 10~30 nm) をラットの腹腔内に埋入し、12 か月後に解剖した結果では、肉芽腫の形成が認められたのみで、中皮腫の形成は認められなかった (Varga & Szendi, 2010)。また、健常なラットに MWCNT (繊維長 0.7 μm 、繊維径平均 11.3 nm、を 19700 ppm、鉄を 4900 ppm、コバルトを含む、構造に欠陥あり) を 20 および 2 mg/匹の用量で腹腔内へ単回投与し、2 年間の観察を行った結果では、中皮腫の発生はそれぞれ、0 (0 匹/50 匹) および 4.0% (2 匹/50 匹) と低く、群間に有意差は認められず、本実験に用いた MWCNT に発がん性はないと結論されている (Muller et al., 2009)。

アスベストと異なり、MWCNT による中皮腫の誘発は MWCNT の種類によって異なる。現在までのところ、Takagi らが用いた MWCNT-7 と称される MWCNT が最も強い中皮腫の誘発を示し、そのほかの MWCNT では中皮腫の発生は弱い、認められていない。形状が異なる MWCNT をラットの腹腔内に投与し、中皮腫発生への影響を比較した研究では、繊維径がおよそ 50 nm の MWCNT (MWCNT-7 等) は、繊維径がおよそ 150 nm (繊維長は両者とも 4~6 μm 程度で大きく変わらない) の MWCNT に比べ強い炎症を惹起し、高い確率で中皮腫を誘発した (Nagai et al., 2011)。このとき、繊維径がおよそ 50 nm の MWCNT が中皮細胞に取り込まれ、細胞毒性を示したのに対し、繊維径がおよそ 150 nm の MWCNT は中皮細胞に入らず、細胞傷害も示さなかった。また、凝集した MWCNT (繊維長 3 μm 、繊維径 2~20 nm) も中皮細胞に入りにくく、中皮腫の発生も見られなかった (Nagai et al., 2011; Nagai et al., 2013)。異なる形状の MWCNT をラットの腹腔内に投与した試験では、直線状の MWCNT が早期に高頻度で中皮腫を誘導したのに対し、曲線状の MWCNT では中皮腫の発生が遅れた (Rittinghausen et al., 2014)。これらの結果から、MWCNT による中皮腫の発生には、MWCNT に対する中皮細胞の応答性 (特に貪食がキーイベントとなる) が重要であり、MWCNT の繊維径や剛性、凝集状態が関与することが示唆さ

れている。また、MWCNT による中皮腫の誘導には、形状の違いに加え、がん抑制遺伝子の異常の有無という生体側の応答の違いが影響すると考えられ、どのような暴露のケースを想定するかにより実験モデルをデザインする必要がある。これらの実験では、発がんというエンドポイントに着目して組織学的な検討を行っている一方で、中皮腫に至るまでの炎症などの生体分子の動きは十分に分かっていない。以下にこれまでの疫学および動物実験による知見からのマーカー候補を示す。

MWCNT 暴露作業者の血液を調査した報告において、アスベストと同様に $TGF\beta 1$ や $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ の上昇が報告されているが (Shvedova et al., 2016; Fatkhutdinova et al., 2016)、中皮腫の発生は認められておらず、関連性は不明である。MeT-5A 細胞に $0.02 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ で 4 ヶ月間 MWCNT を投与した実験では、MMP-2 の発現が上昇した (Lohcharoenkal et al., 2014)。このとき、アスベストでも実験を行っており、アスベストも MMP-2 の発現上昇という同様の応答を示している。また、ラットにおいて気管内投与による中皮腫発生の報告 (Numano et al., 2019) がある MWCNT-7 を $0.5 \text{ mg}/\text{rat}$ で気管内投与し 2 年間飼育した実験では、遺伝子発現ではないが、肺組織において炎症マーカーである CC ケモカイン受容体 2 (CCL2) および CC ケモカイン受容体 3 (CCL3) の増加が認められたほか、胸腔洗浄液において、HMGB1 の有意な上昇が認められている。このとき、2 年を待たずに中皮腫の発生により死亡した動物が多くあった。2 年間生存した動物では、中皮腫の発生は認められなかった (Saleh et al., 2022)。また、MWCNT-7 を投与し、52 週後に解剖を行って中皮腫が認められたラットでは、MSLN の上昇も認められており、相関性が示唆されている (Sakamoto et al., 2010)。アスベストに比べ情報が少ないものの、有害性が高く中皮腫を誘導する MWCNT では、炎症マーカーおよび MSLN、HMGB1 など、アスベストと共通した遺伝子の発現応答が起これと考えられる。

既報を参考としたアスベストおよび MWCNT 暴露によるバイオマーカー候補を図 3.1 にまとめる。

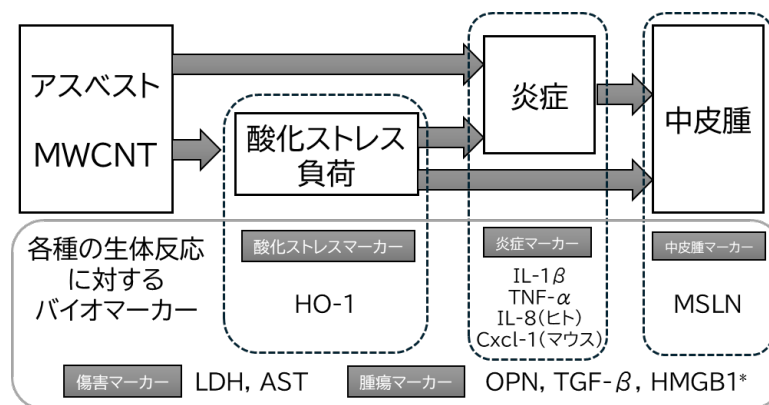


図 3.1 既報を参考としたアスベストおよび MWCNT 暴露によるバイオマーカー候補

*HMGB1 は、中皮腫の発生により上昇するとの報告もあるほか、炎症メディエーターでもある。

3.3 NEDO 委託事業の成果

CNF においては、中皮腫の発生を検証した報告例はなかった。そこで、NEDO 委託事業（2020～2024 年度）では、中皮細胞等を使った培養細胞試験やマウスを用いた 2 年間の腹腔内投与と試験を実施することにより、CNF による中皮腫発生の検証を行った。機械解繊 CNF、TEMPO 酸化

CNF およびリン酸エステル化 CNF の3種類の CNF を評価対象とした。

3.3.1 マウスの腹腔内投与試験

3種類の CNF 分散液を、6週齢の B6C3F1 マウスの腹腔内に 0.1 mg および 1.0 mg の用量で投与し、2年後まで経過観察を行った (Horie et al., 2025)。アスベストや一部の MWCNT による中皮腫の発症においては、炎症の誘発が重要な要因と考えられていることから、投与から1か月、3か月、6か月および1年後に解剖を実施し、炎症および中皮腫マーカーを含む発がんマーカーを中心に CNF の影響を評価した。腹腔内投与であることを考慮し、肝傷害マーカーとしてアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、炎症マーカーとして IL-1 β 、C-X-C モチーフケモカインリガンド 1 (Cxcl-1、ヒトのインターロイキン-8 (IL-8) と同様に機能する) および TNF- α 、中皮腫マーカーとして MSLN、腫瘍マーカーとして胸膜中皮腫の進行を促進するとの報告もある HMGB1 (Wang et al., 2019; Suarez et al., 2023)、OPN および TGF- β を測定した。HMGB1 については、飼育期間後半の6か月、1年および2年後に血中濃度を測定した。解剖では、血液および腹腔を 5 mL のリン酸緩衝生理食塩水で洗浄した腹腔内洗浄液を回収した。さらに、肝臓および腎臓を含む消化管を摘出し、10%ホルマリンで固定したのち、ヘマトキシリンエオジン染色を行い、組織病理観察を実施した。

各バイオマーカーの測定結果を表 3.1 にまとめた。全期間を通じて、すべての CNF で、低用量、高用量ともに AST およびいずれの炎症マーカーも非投与群に対して有意差は認められなかった。OPN は、機械解繊 CNF および TEMPO 酸化 CNF では、全期間を通じて非投与群に対して有意差は認められなかった。リン酸エステル化 CNF では、投与3か月後に高用量群で有意な増加が認められたが、6か月後には有意差は認められず、2年後まで上昇は見られなかった。MSLN は、1年後に CNF 投与群において非投与群よりも低下する傾向が認められたが、全期間を通じて、非投与群に対して有意な増加は認められなかった。TEMPO 酸化 CNF を投与したマウスにおいて、投与1年後に血中 HMGB1 の有意な上昇が認められたが、2年後では有意差はなかった。また、リン酸エステル化 CNF では2年後の低用量群で有意に増加した。機械解繊 CNF では非投与群との間に有意差は見られなかった。投与2年後における血中 TGF- β 濃度も非投与群との間に有意差は認められなかった。全体として、炎症マーカーに有意な変化は認められなかった。腫瘍関連マーカーにいくつか変動が認められたが、全期間を通じて、CNF 投与群に中皮腫の発生は腹膜を含むいずれの臓器でも認められなかった。また、全期間を通じて、CNF 投与に起因すると考えられる顕著な炎症およびその他の病理所見も認められなかった。一方で、機械解繊 CNF を投与したマウスでは、高用量群で肝臓および脾臓に白い物質の付着が認められた。この付着物は、投与1か月後から2年後までの期間を通じて認められた。この付着物は、セルラーゼ処理による評価でセルロースと推定された。このことから、腹腔内に投与された機械解繊 CNF は、2年間腹腔内に滞留していたと考えられた。付着物が認められた個体についても、炎症マーカーおよび腫瘍マーカーの上昇は認められず、特記すべき病理所見も認められなかった。

表 3.1 CNF を腹腔内投与した各バイオマーカーの結果まとめ

		機械解繊 CNF	TEMPO 酸化 CNF	リン酸エステル化 CNF
肝傷害マーカー	AST	有意差なし	有意差なし	有意差なし
	IL-1 β	有意差なし	有意差なし	有意差なし
炎症マーカー	Cxcl-1	有意差なし	有意差なし	有意差なし
	TNF- α	有意差なし	有意差なし	有意差なし
中皮腫マーカー	MSLN	有意な増加なし (1年後に低下)	有意な増加なし (1年後に低下)	有意な増加なし (1年後に低下)
	HMGB1	有意差なし	1年後に有意な上昇。6ヶ月と2年後では有意差なし	2年後に低用量群において有意な上昇 (p<0.05)
腫瘍マーカー	OPN	有意差なし	有意差なし	3か月後に高用量群において有意な上昇 (p<0.01) ほかの時点では有意な増加なし
	TGF- β	有意差なし	有意差なし	有意差なし
	中皮腫の発生	認められず	認められず	認められず
組織病理観察	顕著な炎症およびその他の病理所見	炎症なし。全期間を通じて肝臓および脾臓に CNF の付着。		なし

結果は非投与群との比較で示した。HMGB1 は 6 ヶ月以降、TGF- β は 2 年後において測定した。

3.3.2 培養細胞試験

CNF 分散液をヒト由来中皮細胞株である MeT-5A 細胞およびマクロファージ分化 THP-1 細胞に投与し、WST-1 法により細胞生存率を、乳酸脱水素酵素 (LDH) 法により細胞膜の損傷を指標に細胞毒性を評価した。また、中皮腫発生のキーイベントとして重要な炎症誘発の可能性をサイトカイン産生を指標に評価した (Horie et al., 2025)。その結果、いずれの CNF 分散液も MeT-5A および THP-1 に対して細胞毒性を示さなかった。MeT-5A 細胞では、IL-1 β および TNF- α などの炎症性サイトカインおよび好中球に対するケモカインである IL-8 の誘導も認められず、CNF による顕著な影響は見られなかった。一方で、THP-1 細胞においては、100 μ g/mL の CNF 分散液の投与により IL-8 の誘導が認められた (表 3.2)。IL-8 の誘導は、特に機械解繊 CNF で強かった。THP-1 細胞においては、IL-1 β の誘導も認められた。一方、酸化ストレスマーカーである HO-1 はいずれの細胞においても CNF 投与による顕著な誘導は認められなかった。また、CNF を投与した細胞について次世代シーケンサーを用いて網羅的遺伝子発現解析を行ったが、炎症関連遺伝子について発現の上昇は認められず、顕著な遺伝子発現の差は認められなかった。このように、CNF 分散液に対する中皮細胞の応答性は低く、顕著な影響が認められなかった一方で、マクロファージではサイトカインの誘導が認められたことから、CNF 分散液の潜在的な炎症誘発性が考えられたが、動物試験においては 2 年間の観察期間を通じて、高用量群でも炎症の誘発は認められず、持続的な炎症の所見も見られなかった。CNF はマクロファージに対し、炎症性サイトカインやケモカインの誘導能を示すが、実際の生体においては少なくとも中皮種を含む発がんにつながるような持続的かつ顕著な炎症応答は引き起こさないと考えられた。

表 3.2 CNF を投与した培養細胞試験の結果まとめ

		MeT-5A 細胞（中皮細胞）			THP-1 細胞（マクロファージ）		
		機械解繊 CNF	TEMPO 酸化 CNF	リン酸エス テル化 CNF	機械解繊 CNF	TEMPO 酸化 CNF	リン酸エス テル化 CNF
細胞毒性	生存率	有意差なし	有意差なし	有意差なし	有意差なし	有意差なし	有意差なし
	細胞膜損傷	有意差なし	有意差なし	有意差なし	有意差なし	有意差なし	有意差なし
酸化 ストレス	HO-1	有意差なし	有意差なし	有意差なし	有意差なし	有意差なし	有意差なし
炎症誘発性	IL-8	わずかに 減少	わずかに 減少	わずかに 減少	高用量で 上昇	高用量で 上昇	高用量で 上昇
	IL-1 β	検出せず	検出せず	検出せず	高用量で 上昇	高用量で 上昇	高用量で 上昇

各 CNF を 10 または 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で細胞に投与し、24 時間保持した。

3.4 まとめ

中皮種を誘導する物質として、アスベストおよび一部の MWCNT が知られている。アスベストが中皮種を引き起こすメカニズムには、酸化ストレスの誘導、細胞分裂の阻害、環境中の有害物質の吸着が挙げられている。また、中皮細胞によって貪食されることや、体内に取り込まれたのち排出されずに長期間残留することが中皮種発生の重要な要因とされている。MWCNT については、繊維径がおよそ 50 nm のものが中皮細胞に取り込まれ、高い確率で中皮腫を誘発する一方で、繊維径がおよそ 150 nm のものや凝集したものは中皮細胞に取り込まれず、中皮種を引き起こさなかったことから、形状や凝集状態が中皮種誘導に大きく関与していると推察される。さらに、アスベストや MWCNT による中皮種の誘導においては、混在する鉄が重要な役割を果たすという知見も得られている。体内に留まったアスベストや MWCNT に含まれる鉄が持続的な酸化ストレスを引き起こし、慢性的な炎症を含む様々な生体影響を与え、最終的に発がんに至るとされる。中皮種に至る生体影響を把握するためのマーカーとして、HMGB1、MSLN、OPN、TGF β 1、TNF- α 、IL-1 β などが候補として挙げられる（図 3.1）。

CNF においては、中皮腫の発生を検証した報告例はなかった。そこで、NEDO 委託事業（2020～2024 年度）では、中皮細胞等を使った培養細胞試験やマウスを用いた腹腔内投与試験により、CNF による中皮腫発生の検証を行った。3 種類の CNF（機械解繊 CNF、TEMPO 酸化 CNF およびリン酸エステル化 CNF）をマウスに腹腔内投与し、2 年間の観察を行ったが、いずれの CNF でも中皮腫の発生は認められなかった。また、細胞試験でケモカインや炎症性サイトカインの誘導が認められたことから、炎症の誘発が懸念されたが、動物試験においては少なくとも投与 1 か月以降では炎症は認められなかった。アスベストで血中濃度の上昇が報告されている炎症マーカー、中皮腫マーカー類の上昇は観察期間を通じて認められず、CNF の投与に起因すると考えられる顕著な病理所見も見られなかった。このように、試験を行った 3 種類の CNF については、中皮腫発生に至るキーイベントである炎症は認められず、中皮腫の発生も見られなかった。

参考文献

- Chen Z, Gaudino G, Pass HI, Carbone M, Yang H, 2017. Diagnostic and prognostic biomarkers for malignant mesothelioma: an update. *Transl Lung Cancer Res.* 6(3):259–269.
- Creaney J, Olsen NJ, Brims F, Dick IM, Musk AW, de Klerk NH, Skates SJ, Robinson BW, 2010. Serum mesothelin for early detection of asbestos-induced cancer malignant mesothelioma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 19(9):2238–2246.
- Creaney J, Sneddon S, Dick IM, Dare H, Boudville N, Musk AW, Skates SJ, Robinson BW, 2013. Comparison of the diagnostic accuracy of the MSLN gene products, mesothelin and megakaryocyte potentiating factor, as biomarkers for mesothelioma in pleural effusions and serum. *Dis Markers.* 35(2):119–127.
- Dragon J, Thompson J, MacPherson M, Shukla A, 2015. Differential susceptibility of human pleural and peritoneal mesothelial cells to asbestos exposure. *J Cell Biochem.* 116(8):1540–1552.
- Fatkhutdinova LM, Khaliullin TO, Vasil'yeva OL, Zalyalov RR, Mustafin IG, Kisin ER, Birch ME, Yanamala N, Shvedova AA, 2016. Fibrosis biomarkers in workers exposed to MWCNTs. *Toxicol Appl Pharmacol.* 299:125–131.
- Gibbs GW, Berry G, 2008. Mesothelioma and asbestos. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 52(1 Suppl):S223–231.
- Goricar K, Kovac V, Dodic-Fikfak M, Dolzan V, Franko A, 2020. Evaluation of soluble mesothelin-related peptides and MSLN genetic variability in asbestos-related diseases. *Radiol Oncol.* 54(1):86–95.
- Horie M, Kato H, Iwahashi H, 2013. Cellular effects of manufactured nanoparticles: effect of adsorption ability of nanoparticles. *Arch Toxicol.* 87(5):771–781.
- Horie M, Sugino S, Fujita K, Endoh S, Maru J, Matsuzawa T, Ogura I, 2025. Evaluation of inflammatory and mesothelioma-related responses in mice following the intraperitoneal administration of cellulose nanofibers. *NanoImpact* 38:100561.
- Jiang L, Nagai H, Ohara H, Hara S, Tachibana M, Hirano S, Shinohara Y, Kohyama N, Akatsuka S, Toyokuni S, 2008. Characteristics and modifying factors of asbestos-induced oxidative DNA damage. *Cancer Sci.* 99:2142–2151.
- Lohcharoenkal W, Wang L, Stueckle TA, Dinu CZ, Castranova V, Liu Y, Rojanasakul Y, 2013. Chronic exposure to carbon nanotubes induces invasion of human mesothelial cells through matrix metalloproteinase-2. *ACS Nano.* 7(9):7711–7723.
- Maeda M, Miura Y, Nishimura Y, Murakami S, Hayashi H, Kumagai N, Hatayama T, Katoh M, Miyahara N, Yamamoto S, Fukuoka K, Kishimoto T, Nakano T, Otsuki T, 2008. Immunological changes in mesothelioma patients and their experimental detection. *Clin Med Circ Respirat Pulm Med.* 2:11–17.
- Muller J, Delos M, Panin N, Rabolli V, Huaux F, Lison D, 2009. Absence of carcinogenic response to multiwall carbon nanotubes in a 2-year bioassay in the peritoneal cavity of the rat. *Toxicol. Sci.* 110(2):442–448.
- Nagai H, Okazaki Y, Chew SH, Misawa N, Miyata Y, Shinohara H, Toyokuni S, 2013.

- Intraperitoneal administration of tangled multiwalled carbon nanotubes of 15 nm in diameter does not induce mesothelial carcinogenesis in rats. *Pathol. Int.* 63(9):457–462.
- Nagai H, Okazaki Y, Chew SH, Misawa N, Yamashita Y, Akatsuka S, Ishihara T, Yamashita K, Yoshikawa Y, Yasui H, Jiang L, Ohara H, Takahashi T, Ichihara G, Kostarelos K, Miyata Y, Shinohara H, Toyokuni S, 2011. Diameter and rigidity of multiwalled carbon nanotubes are critical factors in mesothelial injury and carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci U S A.* 108(49):E1330–1338.
- Nagatomo H, Morimoto Y, Oyabu T, Hirohashi M, Ogami A, Yamato H, Kuroda K, Higashi T, Tanaka I, 2005. Expression of heme oxygenase-1 in the lungs of rats exposed to crocidolite asbestos. *Inhal Toxicol.* 17(6):293–296.
- Napolitano A, Antoine DJ, Pellegrini L, Baumann F, Pagano I, Pastorino S, Goparaju CM, Prokrym K, Canino C, Pass HI, Carbone M, Yang H, 2016. HMGB1 and its hyperacetylated isoform are sensitive and specific serum biomarkers to detect asbestos exposure and to identify mesothelioma patients. *Clin Cancer Res.* 22(12):3087–3096.
- Nicholson WJ, Raffn E, 1995. Recent data on cancer due to asbestos in the U.S.A. and Denmark. *Med. Lav.* 86(5):393–410.
- Numano T, Higuchi H, Alexander DB, Alexander WT, Abdelgied M, El-Gazzar AM, Saleh D, Takase H, Hirose A, Naiki-Ito A, Suzuki S, Takahashi S, Tsuda H, 2019. MWCNT-7 administered to the lung by intratracheal instillation induces development of pleural mesothelioma in F344 rats. *Cancer Sci.* 110(8):2485–2492.
- Pass HI, Lott D, Lonardo F, Harbut M, Liu Z, Tang N, Carbone M, Webb C, Wali A, 2005. Asbestos exposure, pleural mesothelioma, and serum osteopontin levels. *N Engl J Med.* 353(15):1564–1573.
- Pietrofesa RA, Velalopoulou A, Albelda SM, Christofidou-Solomidou M, 2016. Asbestos induces oxidative stress and activation of Nrf2 signaling in murine macrophages: chemopreventive role of the synthetic lignan secoisolariciresinol diglucoside (LGM2605). *Int J Mol Sci.* 17(3):322.
- Poland CA, Duffin R, Kinloch I, Maynard A, Wallace WA, Seaton A, Stone V, Brown S, Macnee W, Donaldson K. 2008. Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. *Nat. Nanotechnol.* 3(7):423–428.
- Pott F, Huth F, Friedrichs KH, 1974. Tumorigenic effect of fibrous dusts in experimental animals. *Environ Health Perspect.* 9:313–315.
- Pott F, 1978. Some aspects on the dosimetry of the carcinogenic potency of asbestos and other fibrous dusts. *Staub-Reinh. Luft* 38:486–490.
- Qi F, Okimoto G, Jube S, Napolitano A, Pass HI, Laczko R, Demay RM, Khan G, Tiirikainen M, Rinaudo C, Croce A, Yang H, Gaudino G, Carbone M, 2013. Continuous exposure to chrysotile asbestos can cause transformation of human mesothelial cells via HMGB1 and TNF- α signaling. *Am J Pathol.* 183(5):1654–1666.
- Rittinghausen S, Hackbarth A, Creutzenberg O, Ernst H, Heinrich U, Leonhardt A, Schaudien D, 2014. The carcinogenic effect of various multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) after

- intraperitoneal injection in rats. *Part Fibre Toxicol.* 11:59.
- Saleh DM, Luo S, Ahmed OHM, Alexander DB, Alexander WT, Gunasekaran S, El-Gazzar AM, Abdelgied M, Numano T, Takase H, Ohnishi M, Tomono S, Hady RHAE, Fukamachi K, Kanno J, Hirose A, Xu J, Suzuki S, Naiki-Ito A, Takahashi S, Tsuda H, 2022. Assessment of the toxicity and carcinogenicity of double-walled carbon nanotubes in the rat lung after intratracheal instillation: a two-year study. *Part Fibre Toxicol.* 19(1):30.
- Sakamoto Y, Dai N, Hagiwara Y, Satoh K, Ohashi N, Fukamachi K, Tsuda H, Hirose A, Nishimura T, Hino O, Ogata A, 2010. Serum level of expressed in renal carcinoma (ERC)/ mesothelin in rats with mesothelial proliferative lesions induced by multi-wall carbon nanotube (MWCNT). *J Toxicol Sci.* 35(2):265–270.
- Sakamoto Y, Nakae D, Fukumori N, Tayama K, Maekawa A, Imai K, Hirose A, Nishimura T, Ohashi N, Ogata A, 2009. Induction of mesothelioma by a single intrascrotal administration of multi-wall carbon nanotube in intact male Fischer 344 rats. *J. Toxicol. Sci.* 34(1):65–76.
- Shvedova AA, Yanamala N, Kisin ER, Khailullin TO, Birch ME, Fatkhutdinova LM, 2016. Integrated analysis of dysregulated ncRNA and mRNA expression profiles in humans exposed to carbon nanotubes. *PLoS One.* 11(3):e0150628.
- Stanton MF, Laynard M, Tegeris A, Miller E, May M, Kent E, 1977. Carcinogenicity of fibrous glass: pleural response in the rat in relation to fiber dimension. *J. Natl. Cancer Inst.* 58(3):587–603.
- Stanton MF, Layard M, Tegeris A, Miller E, May M, Morgan E, Smith A, 1981. Relation of particle dimension to carcinogenicity in amphibole asbestoses and other fibrous minerals. *Journal of the National Cancer Institute* 67(5):965–975.
- Suarez JS, Novelli F, Goto K, Ehara M, Steele M, Kim JH, Zolondick AA, Xue J, Xu R, Saito M, Pastorino S, Minaai M, Takanishi Y, Emi M, Pagano I, Wakeham A, Berger T, Pass HI, Gaudino G, Mak TW, Carbone M, Yang H, 2023. HMGB1 released by mesothelial cells drives the development of asbestos-induced mesothelioma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 120(39):e2307999120.
- Tabata C, Shibata E, Tabata R, Kanemura S, Mikami K, Nogi Y, Masachika E, Nishizaki T, Nakano T, 2013. Serum HMGB1 as a prognostic marker for malignant pleural mesothelioma. *BMC Cancer.* 13:205.
- Takagi A, Hirose A, Nishimura T, Fukumori N, Ogata A, Ohashi N, Kitajima S, Kanno J, 2008. Induction of mesothelioma in p53+/- mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube. *J. Toxicol. Sci.* 33(1):105–116.
- Takagi A, Hirose A, Futakuchi M, Tsuda H, Kanno J, 2012. Dose-dependent mesothelioma induction by intraperitoneal administration of multi-wall carbon nanotubes in p53 heterozygous mice. *Cancer Sci.* 103(8):1440–1444.
- Turini S, Bergandi L, Gazzano E, Prato M, Aldieri E, 2019. Epithelial to mesenchymal transition in human mesothelial cells exposed to asbestos fibers: Role of TGF- β as mediator of malignant mesothelioma development or metastasis via EMT event. *Int J Mol Sci.* 20(1):150.
- Yang H, Rivera Z, Jube S, Nasu M, Bertino P, Goparaju C, Franzoso G, Lotze MT, Krausz T, Pass

- HI, Bianchi ME, Carbone M, 2010. Programmed necrosis induced by asbestos in human mesothelial cells causes high-mobility group box 1 protein release and resultant inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107(28):12611–12616.
- Varga C, Szendi K, 2010. Carbon nanotubes induce granulomas but not mesotheliomas. *In Vivo*. 24(2):153–156.
- Visalli G, Facciola A, Iannazzo D, Piperno A, Pistone A, Di Pietro A, 2017. The role of the iron catalyst in the toxicity of multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs). *J. Trace Elem. Med. Biol.* 43:153–160.
- Wang Y, Jiang Z, Yan J, Ying S, 2019. HMGB1 as a Potential Biomarker and Therapeutic Target for Malignant Mesothelioma. *Dis Markers*. 2019:4183157.
- 井内 康輝, 武島 幸男, 櫛谷 桂, 2007. 中皮腫の病理. *肺癌* 47(3):223–232.
- 豊國 伸哉, 蔣 麗, 胡 茜, 永井 裕崇, 岡崎 泰昌, 赤塚 慎也, 山下 依子, 2011. アスベスト誘発中皮腫発がん機構の解明. *日本衛生学雑誌* 66(3):562–567.
- 豊国 伸哉, 2013. アスベストによる発がんメカニズム. 中野 孝司編〜胸膜全書 胸膜疾患のグローバルスタンダード〜, 医薬ジャーナル社. 352–359.
- 八舟 宏典, 黒岩 有一, 山本 諭, 中村 憲彦, 大嶋 洋介, 増渕 康哲, 岡崎 修三, 2010. がん原性試験における ICR マウスと B6C3F1 マウスにおける背景データ比較. 第 37 回日本トキシコロジー学会学術年会. P110.
- 大和 浩, 1994. 繊維状粒子曝露による生体影響. *エアロゾル研究* 9(3):215–220.

執筆担当者

堀江 祐範

第4章 吸入影響の評価

4.1 はじめに

CNFの実用化と社会実装を推進するうえで、安全性に対する懸念を解消することは不可欠である。CNFへの暴露は、製造・加工施設での作業中だけでなく、スプレー製品などの消費者製品の使用時、さらには住宅建材や農業資材など広範な応用分野でも発生し得る。このような暴露経路の中でも、特に呼吸器系に対する影響が懸念されており、安全性確保の観点から、吸入影響に関する有害性試験の実施と評価が重要な課題となっている。

吸入影響を明らかにすることは、作業者の労働安全の確保だけでなく、一般消費者および環境への潜在的なリスクの最小化に向けた科学的根拠の構築にも資する。本章では、まずセルロースおよび微結晶セルロース(MCC)の吸入影響に関する既存文献を概観し、これらの物質による生体影響に関する基礎的な知見を整理する。次に、CNFおよびセルロースナノクリスタル(CNC)に関する吸入影響の研究動向を紹介し、それらのナノスケール特有の毒性や作用機序について検討を加える。さらに、NEDO委託事業において実施された動物試験および培養細胞試験の結果に基づき、CNFの吸入影響評価の現状と課題を詳述する。特に、CNFの物理化学的特性と生体応答との関係性に着目し、毒性発現のメカニズムについて考察する。最後に、これらの知見を総括し、今後の研究課題と方向性について議論を行う。

化学物質の吸入毒性評価には、OECD試験ガイドライン(Test Guidelines: TG)に基づく以下の試験が規定されている: TG403(急性吸入毒性試験)、TG412(28日間亜急性吸入毒性試験)、TG413(90日間亜慢性吸入毒性試験)。これらの試験では、被験物質をエアロゾル化し、動物に全身あるいは鼻部で吸入させる手法が採用される。しかし、CNFのような不溶性ナノ材料の場合、エアロゾルの長時間安定生成や濃度制御が技術的に困難であり、試験の実施には高度な設備と専門的な技術を要する。このため、試験実施のコストや時間的負担が大きく、対応可能な研究機関も限定されている。

現時点では、CNFに関するOECD TGに準拠した全身吸入暴露試験の報告は確認されていないものの、CNCについては一部で実施例が報告されている。一方、より簡便な吸入影響評価法として、口腔咽頭吸引法(咽頭に被験物質の懸濁液を滴下し、誤嚥によって肺へ到達させる方法)や、気管内投与法(懸濁液を直接気管内に投与する方法)が用いられており、CNFに関する複数の研究がこれらの手法を用いて実施されている(詳細は4.2.2節および4.3.1節参照)。さらに、NEDO委託事業(2020~2024年度)においては、福井大学にてラットを用いた鼻部吸入暴露試験が実施され、その成果が報告されている(4.3.2節参照)。

また、培養細胞を用いた*in vitro*試験は、動物試験と比較して短期間・低コストで実施できるため、小規模研究施設でも導入しやすい利点がある。現時点で、CNFに関する細胞毒性試験の報告は限られているものの、簡易かつ迅速な吸入影響評価手法としての可能性が注目されており、NEDO事業においてもその開発と評価が進められている(詳細は4.2.3節および4.3.3節参照)。

4.2 既存文献の情報

4.2.1 セルロースおよび MCC の吸入影響評価

これまでの研究では、セルロースや MCC は一般に生物学的に不活性とされることが多いが、気管内投与によって肺炎症、線維化、肉芽腫形成を引き起こす可能性があることも報告されている。炎症は一過性である場合もあるが、反復または高用量暴露では慢性影響に至ることもある。このため、肺への影響を包括的に評価するには、動物試験に加えて培養細胞を用いた毒性評価が重要であると指摘されている。

Tátrai et al. (1995) は、松の木材粉塵およびセルロースの曝露により、同様の肉芽腫性炎症および線維症が誘発されることを報告した。一方で、繊維成分を含まない木材粉塵抽出物ではそのような影響は認められなかったことから、セルロースが線維化性肺疾患の主因である可能性が示唆された。さらに、セルロースは白血球において過酸化水素やスーパーオキシドアニオンの産生を誘導し、酸化ストレスを介した線維化促進のメカニズムが示唆された。

Tátrai et al. (1996) は、ラットへの気管内単回投与（15 mg/匹）により、肉芽腫性肺胞気管支炎や気管支肺胞洗浄液（BALF）中 IgA の増加が認められたと報告した。病理学的には、I 型肺胞上皮細胞の損傷および II 型細胞の不完全な修復が確認され、肺胞 - 毛細血管バリアの破綻による線維症の進行が示唆された。

Adamis et al. (1997) は、気管内投与後の BALF 分析により、初期段階から間質性浮腫や炎症の兆候が出現し、1 か月後には線維性肺炎に進行することを明らかにした。これに対し、同一物質を用いた培養細胞試験ではマクロファージへの明確な毒性は確認されなかった。

Nagato et al. (2008) は、BALB/c マウスに MCC を気管内投与し、30 日間の観察を行った。投与直後の好中球増加や肺胞虚脱、気道から肺実質への移行が確認され、一過性ながら肺力学に影響を及ぼすことが示された。

Milton et al. (1990) は、ハムスターを用いて綿粉塵、セルロース、エンドトキシンの肺毒性を比較した。エンドトキシンでは肺気腫様反応が生じたのに対し、セルロースでは肺弾性の低下と肉芽腫形成、隔壁肥厚が観察された。また、綿粉塵ではセルロースとエンドトキシンの両者による影響が複合的に見られた。これらの結果より、セルロースは比較的不活性とされるものの、肺への炎症性および線維性の影響を無視できないことが示された。

4.2.2 CNF および CNC の動物試験

CNF の吸入影響に関する動物試験については、複数の総説論文が報告されている。Ede et al. (2019) は、CNF の短期吸入暴露が、従来のセルロースや他の難溶性・低毒性粉塵と同様に一過性の炎症反応を引き起こすものの、多層カーボンナノチューブ（MWCNT）やアスベストに見られるような深刻な健康影響とは性質が大きく異なることを報告している。Ventura et al. (2020) の総説では、CNF および CNC の細胞内への取り込みは全体として低く、酸化ストレス誘導、顕著な細胞毒性、遺伝毒性は確認されていないとされている。特に長繊維の CNF はマクロファージに貪食されにくく、炎症誘発性も低い可能性が示唆されている。

一方、一部の研究では、CNF が *in vitro* において DNA 損傷、*in vivo* において染色体異常を引き起こし、遺伝毒性を示すとの報告も存在する。CNC に関しては、棒状粒子がマクロファージに貪食される過程で、その表面の化学修飾の程度に応じて中等度から重度の炎症反応を引き起こ

すことが知られており、これと比較して CNF の炎症反応は一般に軽度であるとされている。

さらに、げっ歯類を用いた動物試験においては、CNT は CNF や CNC に比べて一貫して肺の炎症、間質性線維症、肉芽腫、気管支肺胞過形成、さらには発がん性といった深刻な毒性影響を示している。これらの違いは、材料の剛性や表面特性など、物理化学的性状の相違によるものと考えられている。

Stoudmann et al. (2020) は、CNF の吸入影響に関する科学的理解は依然として不十分であり、特に体内に取り込まれた後の残留性についての知見が不足していることを指摘している。また、低用量での長期暴露による慢性影響に関する研究の必要性を強調し、CNF の原料加工や製造工程における職業的吸入暴露が健康リスクとなる可能性を踏まえ、作業環境での適切な管理と防護措置の重要性を述べている。

NEDO 委託事業（2017～2019 年度）では、CNF の吸入影響に関する動物試験調査が実施された (Sai and Fujita, 2020)。さらに、2020～2024 年度の NEDO 委託事業では、セルロース、MCC、および CNF を対象に吸入毒性に関する知見が体系的に整理され、肺炎症反応、肺内分布と残留性、マクロファージによる貪食挙動、さらには *in vitro* における細胞毒性評価に関する情報が蓄積された (Fujita and Moriyama, 2025)。

2017 年以降、多様な動物種、曝露経路、試験期間を用いた研究が報告されている。具体例としては、マウスに対する口腔咽頭吸引による 28 日間試験 (Ilves et al., 2018)、24 時間試験 (Catalán et al., 2017)、14 日間試験 (Park et al., 2018 ; Song et al., 2020)、気管内投与による 28 日間試験 (Hadrup et al., 2019 ; Fujita et al., 2023a ; Yamashita et al., 2024)、ラットに対する気管内投与の 90 日間試験 (Fujita et al., 2021) および 28 日間試験 (Fujita et al., 2025a ; Fujita et al., 2025c)、さらにラットの鼻部吸入暴露による 28 日間試験 (Yamashita et al., 2025) などが挙げられる (表 4.1 参照)。以下に概要を述べる。なお、NEDO 委託事業における詳細な試験内容については、4.3 節『NEDO 委託事業の成果』で詳述する。Ilves et al. (2018) は、4 種類のナノフィブリル化セルロース (NFC) について、マクロファージ細胞株およびマウスを用いた呼吸暴露実験により免疫調節作用を評価し、その結果をバルクセルロースおよび剛直な多 MWCNT と比較した。NFC は MWCNT に比べて炎症誘発能が弱く、バルクセルロースと同等またはそれ以上の免疫調節反応を示した。また、非官能化 NFC はアニオン性基で修飾された NFC よりも炎症反応を引き起こしやすいことが明らかとなり、NFC が肺内に少なくとも 1 か月間残留することも確認された。

Catalán et al. (2017) は、TEMPO 酸化 NFC をマウスに咽頭吸引投与し、遺伝毒性を評価した。投与 24 時間後、肺細胞において用量依存的に DNA 損傷が認められた一方、骨髄には影響がみられなかった。これにより、NFC が肺に急性の炎症反応を引き起こす可能性が示唆された。

Park et al. (2018) は、CNF、CNC、単層カーボンナノチューブ (SWCNT)、およびアスベスト (ASB) を BALB/c マウスに咽頭吸引投与し、肺および免疫系への影響を比較した。ASB および SWCNT は 14 日後に顕著な炎症反応を示したのに対し、CNF ではアスベスト様の反応は認められず、免疫応答は主に Th1 様のプロファイルを示した。

Hadrup et al. (2019) は、NFC のカルボキシル化による肺および全身毒性の軽減効果を検討した。3 種類の NFC (FINE NFC、カルボキシル化 NFC [AS (-COOH)]、および殺生物剤を含む BIOCID FINE NFC) をマウスに気管内投与し、28 日後に影響を評価した。FINE NFC では肺胞洗浄液中の好中球増加および血中 SAA3 レベルの上昇が認められたが、AS (-COOH) ではこれ

らの反応が抑制されていた。これにより、NFCのカルボキシル化が肺および全身への毒性軽減に寄与し、ヒドロキシ基（-OH）が炎症反応の誘発に関与している可能性が示された。

Song et al. (2020) は、雌性 C57BL/6 マウスに CNF を口腔咽頭吸引投与し、肺毒性および遺伝子発現への影響を RNA シーケンスにより解析した。投与後 3 日目には顕著な炎症反応が確認され、94 遺伝子の上方制御および 107 遺伝子の下方制御が認められた。これらの遺伝子は主に炎症および免疫関連経路に関与していた。14 日目には遺伝子発現の変化は減少し、肺の恒常性が回復傾向にあることが示唆された。

表 4.1 動物試験による CNF の吸入影響評価

#	被験材料	動物	投与方法	投与量	観察時期	出典
1	NFC、バルクサイズのセル ローズフィブリル、 MWCNT	マウス	口腔咽頭吸引	10, 40 μg/body	投与後 28 日	Ilves et al. (2018)
2	TEMPO 酸化 NFC	マウス	口腔咽頭吸引	10, 40, 80, 200 μg/body	投与後 24 時 間	Catalán et al. (2017)
3	NCF、CNC、SWCNT、 クロシドライトアスベスト	マウス	口腔咽頭吸引	40 μg/body	投与後 14 日	Park et al. (2018)
4	NFC、カルボキシル化 NFC	マウス	気管内投与	6, 18 μg/body	投与後 28 日	Hadrup et al. (2019)
5	TEMPO 酸化 CNF	マウス	口腔咽頭吸引	50 μg/body	投与後 3 日、 14 日	Song et al. (2020)
6	TEMPO 酸化 CNF、機械 解繊 CNF、MWCNT	ラット	気管内投与	0.5, 1.0, 2.0 mg/kg	投与後 90 日	Fujita et al. (2021)
7	TEMPO 酸化 CNF、 MWCNT	マウス	気管内投与	80 μg/body	投与後 28 日	Fujita et al. (2023a)
8	短尺機械解繊 CNF	マウス	気管内投与	200 μg/body	投与後 28 日	Yamashita et al. (2024)
9	TEMPO 酸化 CNF、機械 解繊 CNF、短尺機械解繊 CNF、MWCNT	ラット	気管内投与	2.0 mg/kg	投与後 28 日、90 日	Fujita et al. (2025a)
10	機械解繊 CNF	ラット	鼻部吸入暴露	1.5, 7, 35 mg/m ³	投与後 28 日	Yamashita et al. (2025)
11	TEMPO 酸化 CNF、機械 解繊 CNF、CNC、 MWCNT	ラット	気管内投与	2.0 mg/kg	投与後 28 日	Fujita et al. (2025c)

CNC を用いた動物試験の結果については、複数の報告がある。以下に概要を述べる（表 4.2 に要約）。

Joseph et al. (2021) は、CNC の全身吸入がラットの肺毒性および遺伝子発現に与える影響を評価し、BALF 中の LDH 活性や炎症性サイトカイン、酸化剤産生、好中球およびマクロファージの増加を確認した。肺組織では軽度の炎症およびマクロファージ蓄積が観察され、バイオインフォマティクス解析により、炎症および酸化ストレス関連経路の活性化が明らかとなった。

Yanamala et al. (2014) は、CNC の粒子形態が免疫毒性に与える影響を検討し、CNCS および CNCP の両形態において肺炎症が観察されたが、粉末形態 (CNCP) の方がより顕著な組織損傷を誘発した。一方で、ゲル形態 (CNCS) は酸化的修飾タンパク質の蓄積を引き起こし、粒子形状とサイズが毒性発現に影響する可能性が示唆された。

Farcas et al. (2016) は、CNC 曝露による雄マウスの生殖毒性を評価し、曝露後3か月にわたり精子の濃度、運動性、形態、DNA 損傷に有意な影響が認められた。これらの変化は、精巣における炎症性サイトカインの発現増加、酸化ストレス亢進、および性ホルモンバランスの乱れと関連していた。

Shvedova et al. (2016) は、CNC の反復曝露による肺毒性を雌雄の C57BL/6 マウスで比較し、肺炎症、酸化ストレス、TGF- β およびコラーゲンの増加に伴う肺機能障害を確認した。特に雌マウスにおいて毒性影響が強く、性差による感受性の違いが示された。

これらの知見を総合すると、CNF および CNC の吸入影響に関する科学的理解は依然として不十分であり、特に体内への取り込み後の残留性や慢性影響に関する信頼性の高いデータは限定的である。このため、肺への低用量かつ長期的な曝露を対象とした系統的な試験の実施が急務である。また、吸入後の全身移行や他臓器への影響、免疫応答、慢性毒性に関する評価も今後の重要な研究課題として位置づけられる。この「免疫応答」に関しては、Čolić et al. (2020) がナノセルロース (特に CNF および CNC) の免疫系への影響を評価し、免疫寛容 (tolerance) を誘導する能力があることを示している。これは、免疫系が過剰に反応せず、炎症を抑制する方向に働くことを意味しており、創傷治癒や組織再生などへの応用可能性を示唆するものである。一方で、こうした免疫調節作用が長期曝露下でも維持されるかについては未解明である。さらに、曝露条件と生体応答との関連性を明らかにするためには、*in vitro* および *in vivo* の試験系の相関性を検証する研究の推進が強く求められる。

表 4.2 動物試験による CNC の吸入影響評価

#	被験材料	動物	投与方法	投与量	観察時期	出典
1	CNC	ラット	全身吸入暴露	20 mg/m ³ , 6 時間/日	14 日間暴露後	Joseph et al. (2021)
2	CNCS (ゲル/懸濁液)、 CNCP (粉末)	マウス	口腔咽頭吸引	50, 100, 200 μg/body	投与後 24 時間	Yanamala et al. (2014)
3	CNC	マウス	口腔咽頭吸引	40 μg/ body, 2 回/週, 3 週間	投与後 90 日	Farcas et al. (2016)
4	CNC	マウス	口腔咽頭吸引	40 μg/ body, 2 回/週, 3 週間	投与後 90 日	Shvedova et al. (2016)
5	CNC、TEMPO 酸化 CNF、機械解繊 CNF、 MWCNT	ラット	気管内投与	2.0 mg/kg	投与後 28 日	Fujita et al. (2025c)

4.2.3 CNF の培養細胞試験

CNF の吸入影響を評価する代表的モデルとして、肺胞上皮細胞 (A549) を用いた試験が複数報告されている (Menas et al., 2017; Pinto et al., 2022)。また、工業ナノ材料の生体内応答 (特に炎症) に深く関わる免疫細胞であるマクロファージを対象とした CNF の細胞試験も報告されている (Yanamala et al., 2016; Bhattacharya et al., 2017)。これらの報告の多くでは、CNF の細胞毒性は比較的低いことが示唆されている。以下に概要を述べる (表 4.3 に要約)。なお、NEDO 委託事業における詳細な試験内容は 4.3 節『NEDO 委託事業の成果』で詳述する。

Menas et al. (2017) は、A549 細胞を用いて CNC および NCF の細胞毒性を比較した。5 種類のナノセルロース粒子を 24 時間および 72 時間暴露した結果、NCF は CNC よりも高い毒性を示した一方、CNC は炎症性サイトカインの分泌がより顕著であった。また、A549 細胞への粒子取り込みに関しては、CNC は取り込まれるのに対し、NCF はほとんど取り込まれなかった。さらに、サイトカインのクラスターリング解析により、NCF はカーボンナノファイバーに類似した反応を示し、CNC はキチンに近い反応を示すことが明らかとなり、物理化学的特性が毒性に影響することが示唆された。

Pinto et al. (2022) は、A549 細胞にセルロースマイクロフィブリル (CMF)、CNF、CNC を暴露し、MWCNT を対照に比較した。CNF および CMF では細胞内取り込みが確認されたが、CMF は MWCNT とは異なり細胞毒性を示さなかった。遺伝毒性については、CNF および CNC では認められず、CMF のみ小核形成頻度の増加が見られたものの、酸化的 DNA 損傷とは関連しないと結論づけられた。

Yanamala et al. (2016) は、A549 細胞およびマクロファージ化 THP-1 細胞を用いて様々なセルロース系ナノ材料 (CNM) の生物学的応答を評価した。A549 細胞では細胞毒性はほとんど見られなかったが、THP-1 細胞では特に CNC およびリグニンコーティングされた CNF で細胞毒性や炎症反応が強く、表面特性が細胞応答に影響する可能性が示された。

Bhattacharya et al. (2017) は、マクロファージ化 THP-1 細胞を用いて 19 種類のナノ材料のサイトカインプロファイリングを行い、MWCNT や ZnO などは高い細胞毒性を示す一方で、CNF を含むナノセルロース材料は細胞毒性を示さないことを確認した。

Lopes et al. (2017) は、ヒト皮膚線維芽細胞、肺細胞、単球由来細胞を用いて未修飾および表面修飾された NFC ゲルの生体影響を検討した。未修飾 NFC 処理細胞では TNF- α および IL-1 β の産生増加が認められたが、表面修飾によって炎症誘発性が軽減されることが明らかとなり、表面化学的修飾が炎症応答に及ぼす影響を示唆している。

Aimonen et al. (2022) は、BEAS-2B 細胞を用いて CNF の取り込みと遺伝毒性を評価した。細胞取り込みは確認されたものの顕著な細胞毒性はなく、カチオン性およびアニオン性 CNF は ROS 生成を介した遺伝毒性を示したが、すべての CNF に一般化できないと結論づけた。

表 4.3 細胞試験による CNF の吸入影響評価

#	被験材料	細胞	暴露期間	暴露濃度	エンドポイント	出典
1	CNC、NCF	A549	24、72 時間	1.5, 15, 45 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	細胞毒性、酸化ス トレス、サイトカ イン	Menas et al. (2017)
2	セルロースマイクロファイブリ ル (CMF)、CNF、CNC	A549	24 時間	1.5, 3, 6, 12.5, 25, 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	細胞内移行性、細 胞毒性、遺伝毒性	Pinto et al. (2022)
3	CNF を含む様々なセルロ ース系ナノ材料 (CNM)	A549, THP-1	24、72 時間	< 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$	細胞毒性、細胞膜 損傷、サイトカイ ン	Yanamala et al. (2016)
4	CNF	THP-1	24、48 時間	< 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	細胞毒性、サイト カイン	Bhattacharya et al. (2017)
5	未修飾および修飾 NFC	HDF, MRC-5, THP-1	24 時間	50~500 $\mu\text{g}/\text{mL}$	細胞毒性、ROS、 サイトカイン、細 胞内観察	Lopes et al. (2017)
6	未修飾および修飾 CNF	BEAS-2B	24 時間	4~1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$	細胞毒性、ROS、 細胞内観察	Aimonen et al. (2022)
7	TEMPO 酸化 CNF、機械 解繊 CNF	MeT-5A, A549, HaCaT, Caco-2, THP-1, NR8383	24 時間	2.6, 26 $\mu\text{g}/\text{mL}$	細胞毒性、サイト カイン	Horie et al. (2023)
8	TEMPO 酸化 CNF、リン 酸化 CNF、機械解繊 CNF、柑橘 CNF、ACC 法 CNF、CNC	NR8383	24、48 時間	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	細胞毒性、ROS、 サイトカイン、細 胞内観察、網羅的 遺伝子発現解析	Fujita et al. (2025b, 2025c)

4.3 NEDO 委託事業の成果

4.3.1 気管内投与試験による CNF の吸入影響評価

NEDO 委託事業（2017～2019 年度）においては、国立研究開発法人産業技術総合研究所と民間企業が共同で、CNF の吸入影響を評価するための試料調製手法の開発および特性評価を行い、ラットを用いた気管内投与試験による有害性評価を実施した。これらの成果は、「セルロースナノファイバーの有害性試験手順書」(藤田ら, 2020) および「A Manual for Toxicity Testing of Cellulose Nanofibers」(Fujita et al., 2023b) として取りまとめられている。

さらに、NEDO 委託事業（2020～2024 年度）では、より多様な CNF を対象とした評価を可能にすることを目的に、動物試験に依存しない簡便かつ迅速な吸入影響評価手法の開発およびその妥当性評価を進めた。

本節では、本委託事業で実施された研究の概要と各研究項目の内容について詳述する。

一般に呼吸器系への有害性評価としては、ラットやマウスなどのげっ歯類を用いた吸入暴露試験が広く実施されている (Kasai et al., 2016)。しかし、吸入暴露試験には大規模な試験設備と高額な維持費が必要であり、被験材料を均一にエアロゾル化し、リアルタイムでその濃度を計測・

管理する技術も不可欠である。そのため、すべての被験材料についてこの方法を適用することは現実的に困難である。

一方、被験材料を液中に分散し、実験動物の気管内に直接投与する気管内投与試験は、より簡易な装置と少量の試料で実施可能であり、肺への投与量を正確に制御できる利点がある。このため、工業ナノ材料に対する吸入毒性評価の代替手法として広く用いられており、我々もこれまで複数の研究報告を行っている（Honda et al., 2017; Fujita et al., 2016; Fujita et al., 2015a; Fujita et al., 2015b; Fujita et al., 2010; Fujita et al., 2009a; Fujita et al., 2009b）。しかし、2017～2019 年度の NEDO 委託事業当時、CNF に関する気管内投与試験の報告は、マウスを用いた 28 日間試験の 1 件（Hadrup et al., 2019）のみに限られていた。

気管内投与試験とは、液中に分散させた被験材料を動物の気管内に直接投与し、その後の肺組織における炎症などの生体反応を指標として毒性を評価する手法である。これは、被験材料を空气中に浮遊させて吸入させる吸入暴露試験とは根本的に異なる試験形態であり、その違いを十分に理解した上で試験設計を行う必要がある。とりわけ、気管内投与試験では、液中の被験材料を一度に投与する際に、局所的な過剰暴露によって実際の吸入環境とは異なる生体反応が引き起こされるボラス効果（bolus effect）が生じる可能性があるため、試料調製や投与量の設定には慎重を要する。

CNF を気管内投与する場合には、スラリー状または粉末状の CNF を、その物理化学的特性を維持した状態で適切に分散調製することが必要である。また、吸入毒性に関連する指標として、CNF 分散液の物理化学的特性および生物学的応答性の評価が極めて重要である。さらに、投与後の肺内における CNF の分布や残留性を評価するには、肺組織からの CNF の抽出および分析手法の確立が不可欠である。

これらの技術的課題に対応するため、NEDO 委託事業（2017～2019 年度および 2020～2024 年度）では、CNF の気管内投与試験法の開発とその普及に取り組んできた（図 4.1 参照）。以下に、各研究項目の詳細を述べる。

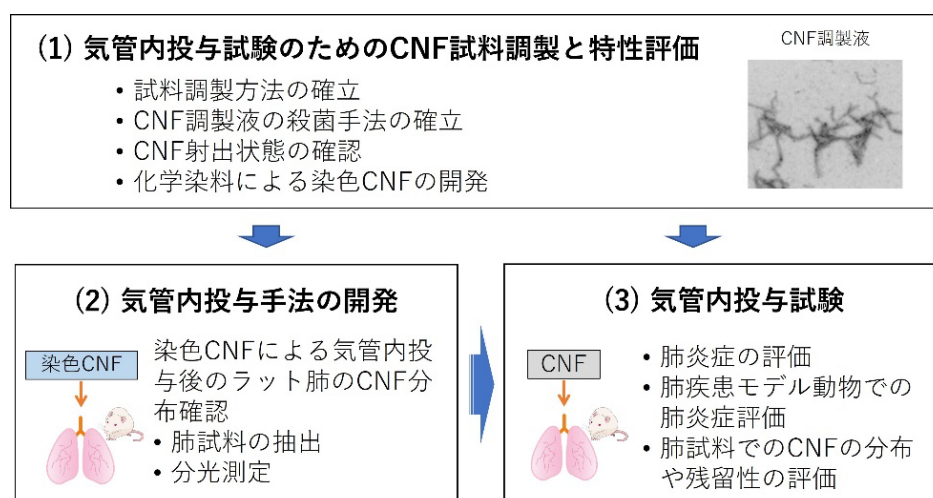


図 4.1 CNF 気管内投与試験の開発

4.3.1.1 気管内投与試験のための CNF 試料調製と特性評価

気管内投与試験は、液体中に分散させた被験材料をげっ歯類等の気管内に直接投与し、その後の生体反応や組織変化を観察することで吸入影響を評価する手法である。この試験を適切に実施するには、CNF 分散液を凝集や沈殿のない安定な状態で調製することが不可欠であり、試験目的や材料特性に応じた最適な調製条件の設定が重要となる。

試料調製と並行して、CNF の特性評価も同様に重要である。吸入影響を定量的に評価するためには、適切な用量設定が必要であり、本試験では JIS 規格 (JIS P 8203:2010) に準拠して CNF の絶乾濃度を測定した。加えて、吸入毒性に関連する可能性のあるパラメーターとして、分散液の粘度、pH、ゼータ電位、ならびに CNF の繊維径や繊維長などの物理化学的特性を詳細に評価した。

CNF は天然由来の木材パルプから製造されることから、懸濁液中に微生物が混入するリスクがある。このため、生物学的特性の評価として、一般細菌、カビ、エンドトキシンおよび β -グルカンの定量分析も実施した。動物試験では投与物中の微生物への配慮が不可欠である一方、殺菌剤の使用には制約があることから、本研究ではガンマ線照射を用いた非加熱・非化学的な微生物不活化処理を採用した。吸収線量を 0.5、1、5、10 kGy に設定して評価した結果、10 kGy では繊維長の顕著な短縮が認められた一方、0.5~1 kGy の範囲では物理的特性にほとんど影響を与えず、かつ細菌およびカビに対して十分な殺菌効果を示すことが確認された (Ogura et al., 2025; Horie et al., 2023)。この結果は、CNF を用いた動物試験においてガンマ線照射が有効な微生物不活化手段となり得ることを示している。

気管内投与試験では、投与された被験材料が肺内で均一に分布しているかを確認することが重要である。しかしながら、CNF は透明であるため、組織切片上での視認性が低く、分布評価が困難である。この課題に対応するため、NEDO 委託事業 (2017~2019 年度) においては、化学染料で染色した CNF を用いて、生体内における残留性および分布の定量的評価を可能とする新規の独自手法を開発した。染色には、組織由来の背景と干渉せず、かつ CNF から離脱しにくい化学染料を選定した。その結果、肺各葉における CNF の分布状況および残存量を明確に把握することが可能となった (藤田ら, 2020; Fujita et al., 2023b; Fujita et al., 2025a)。なお、本手法の詳細については、4.3.1.3.4 節『肺炎症および CNF の残留性評価』にて詳述する。

4.3.1.2 CNF の気管内投与手法の開発

気管内投与試験では、専用の投与器具を用いて被験材料を動物の気管内に直接投与するが、被験材料の粘度や刺激性によっては、投与直後にげっ歯類で窒息や行動異常が生じるおそれがあり、適切な有害性評価の妨げとなる可能性がある。また、CNF は粘性を有するため、投与器具からの射出が困難であり、肺組織内に均一に分布しないリスクがある。

この課題に対応するため、本研究では CNF 分散液の濃度および投与器具からの射出性を事前に評価する手法を開発した (藤田ら, 2020; Fujita et al., 2023b)。さらに、染色 CNF を用いてラットへの気管内投与を行い、肺内における CNF の分布状態を観察した。

とりわけ重要な課題は、肺組織中に分布した CNF の抽出および定量的分析である。これに対し、超音波処理と酵素分解を組み合わせた抽出法を開発し、染色 CNF の分光学的特性を利用した定量解析を行うことで、肺内の残存量を精度高く評価可能とした (藤田ら, 2020)。

4.3.1.3 気管内投与試験

4.3.1.3.1 気管内投与後 90 日間の肺炎症評価

予備試験として、CNF 分散液をラットに気管内投与し、投与後数日間にわたって一般状態の観察を行いながら、分散液の粘度や濃度など、投与に適した調製条件および許容可能な用量を検討した。

本試験では、3 種の CNF および比較対照として MWCNT を、0.5、1.0、2.0 mg/kg の用量でラットに気管内投与し、投与後 90 日間にわたり肺における炎症などの影響を評価した。繊維径および繊維長の分布がほぼ同等である TEMPO 酸化 CNF およびリン酸エステル化 CNF は、投与初期に肺胞領域で炎症反応を誘発したものの、90 日後には炎症の軽減が確認された。一方、針葉樹漂白クラフトパルプ由来の機械解繊 CNF は、投与後に終末細気管支周囲に沈着し、比較的太く長い繊維が確認された(図 4.2)。この CNF による肺胞での急性炎症反応は、リン酸エステル化 CNF や TEMPO 酸化 CNF によるものと比較して軽度であり、同様に 90 日後には炎症の軽減が見られた。対照群として使用した MWCNT は、試験期間を通じて持続的かつ重度の肺炎症を引き起こし、90 日後までに炎症が収束することはなかった。階層的クラスター分析の結果、3 種の CNF は遺伝子発現プロファイルにおいて類似していたが、MWCNT のプロファイルはこれらとは大きく異なることが明らかとなった。以上の結果から、CNF による肺炎症反応は、その繊維径および繊維長の分布と関連しており、MWCNT と比較してその炎症誘発性は限定的であることが示唆された (Fujita et al., 2021)。

CNF が肺胞や終末細気管支まで到達する要因として、そのサイズがナノまたはサブマイクロオーダーであり、吸入性粉塵 (ISO 7708 の定義では、4 μm 粒子で 50%カットオフ) に近似している点が挙げられる。特に、ラットを用いた研究では、空気力学的メディアン径 (MMAD) が 5 ~ 10 μm 以上になる粒子は肺胞領域に沈着しにくいことが報告されている (大和, 1994)。これに対し、CNF はその小さいサイズゆえに、繊毛による気道の防御機構によって排出されやすい一般的なサイズのセルロース粒子とは異なり、肺深部に達する特徴を持つと考えられる。

ただし、この推察は CNF を液中に分散させて直接動物に投与した気管内投与試験の結果に基づいており、実際の暴露条件では異なる可能性があることに留意する必要がある。暴露下の CNF の形態は、気中での液滴の大きさや乾燥状態により、大きく変わると考えられる。一般に、数十 μm を超える液滴は重力によって落下し、数十 μm 未満の液滴は迅速に揮発するため、CNF 水分分散液の飛沫が発生した場合、乾燥して凝集した粒子が吸入される可能性がある (第 7 章参照)。また、CNF 水分分散液の飛沫を評価した研究では、乾燥させた場合には凝集した固形粒子が確認されたが、気中で乾燥させずに捕集した液滴では網目状の CNF が観察された (小倉ら, 2020)。さらに、湿度が非常に高く液滴の揮発が起こりにくい場合や、液滴が水分分散液ではなく揮発しにくいオイルなどの媒質である場合には、繊維状態の CNF に暴露される可能性も考えられる。したがって、CNF 水分分散液の飛沫が発生し吸入される際の CNF の形態については、今後の研究で詳細に検討する必要がある。

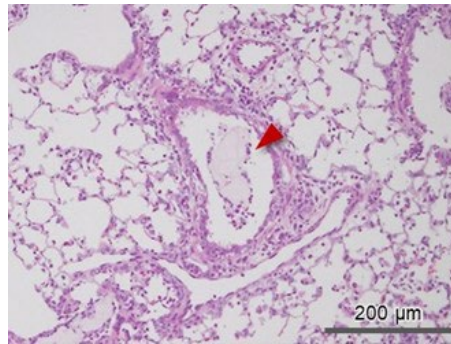


図 4.2 終末細気管支周囲に沈着した投与後 1 日目の機械解繊化 CNF

4.3.1.3.2 機械解繊 CNF の吸入影響評価：マウスを用いた 28 日間気管内投与試験

NEDO 委託事業（2020～2024 年度）において、福井大学は短尺の機械解繊 CNF（平均繊維長約 500 nm、平均繊維径約 45 nm）の吸入影響を評価するため、雄性 C57BL/6JmsSlc マウスに対し 0.2 mg/body の用量で単回気管内投与試験を実施した（Yamashita et al., 2024）。

試験期間中、対照群および投与群に死亡例は認められなかった。投与後 3 日目には、一時的な体重減少、好酸球数の有意増加、網赤血球数の有意減少、および肺重量の増加が観察された。しかし、これらの変化はいずれも一過性であり、28 日後には血液学的パラメーターや病理学的所見に有意な異常は認められなかったことから、これらは適応反応による一時的な現象と考えられる。

4.3.1.3.3 COPD 病態モデルマウスを用いた CNF および MWCNT の呼吸器影響比較

CNT の吸入暴露が肺疾患に関連する気道リモデリングや線維化を誘発する可能性が指摘されているものの、そのメカニズムは未だ十分に解明されていない（Mercer et al., 2011; Porter et al., 2010）。そこで、本研究では、たばこ主流煙により誘発された慢性閉塞性肺疾患（COPD）モデルマウスに対し、CNF および MWCNT を気管内投与し、28 日後の吸入毒性を比較評価した（図 4.3）（Fujita et al., 2023a）。

80 μg/body の TEMPO 酸化 CNF 投与群では、28 日目において組織学的変化、BALF 成分、炎症性サイトカインレベルに有意な変動は認められなかった。これは、CNF が肺の炎症に強く影響せず、たばこ煙による炎症の回復を妨げない可能性を示唆している。一方、同量の MWCNT 投与群では、28 日目に顕著な組織学的変化、BALF 中の細胞数増加および炎症性サイトカインの上昇が確認された。

以上の結果から、CNF の肺影響は MWCNT に比べて軽微であり、たばこ煙による炎症の回復を阻害しないことが明らかとなった。

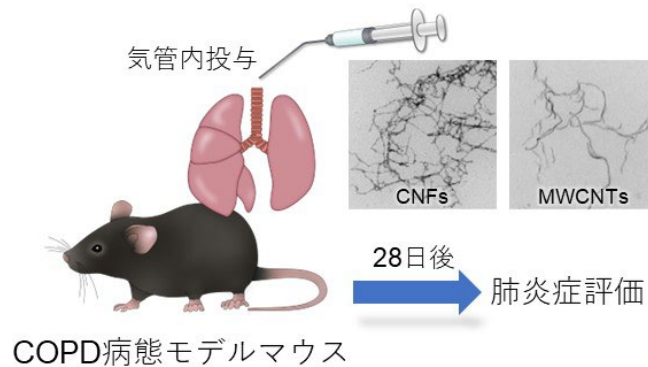


図 4.3 COPD 病態モデルマウスを用いた CNF および MWCNT の呼吸器影響の比較

4.3.1.3.4 肺炎症および CNF の残留性評価

ラットにおける気管内投与後 28 日目の肺炎症について、TEMPO 酸化 CNF、針葉樹漂白クラフトパルプの機械解繊化 CNF、短尺機械解繊 CNF の 3 種類を使用して評価を行った (Fujita et al., 2025a)。また、これらの CNF 懸濁液中に含まれるエンドトキシンの影響を評価するために、リポ多糖 (LPS) を投与して比較検討を行った。この結果、TEMPO 酸化 CNF は軽度の肺胞炎症を引き起こし、針葉樹漂白クラフトパルプの機械解繊化 CNF は肉芽腫の形成を誘発し、短尺機械解繊 CNF は炎症と肉芽腫の両方を引き起こすことが明らかになった。BALF 分析では、TEMPO 酸化 CNF による白血球およびマクロファージの増加、針葉樹漂白クラフトパルプの機械解繊化 CNF による総タンパク質の増加、短尺機械解繊 CNF による好中球およびサイトカイン (MIP-1 α 、IL-1 β 、IL-18) の増加が認められた。LPS の影響は最小限であり、これにより CNF 懸濁液中のエンドトキシンの影響は限定的であると判断された。

CNF の分解や肺内での残留性に関する情報は依然として限られている。CNF は透明であるため、組織中での同定が困難である。この課題を解決するため、事前に化学染色を施した CNF を使用した。さらに、超音波処理と酵素分解を組み合わせた新たな抽出法を開発し、この手法を用いて染色 CNF の分光学的計測を実施した。このアプローチにより、組織中での CNF の追跡および定量が可能となり、信頼性の高いデータを得ることができた (Fujita et al., 2025a)。

90 日間にわたる追跡試験の結果、開発した染色 TEMPO 酸化 CNF および機械解繊 CNF は、肺内に長期的に残留することが明らかとなった (図 4.4)。さらに、透過型電子顕微鏡観察により、肺胞マクロファージ内に CNF が存在することが確認された。これらの結果から、CNF の肺内分解は極めて緩やかであり、長期間にわたり蓄積する可能性があることが示唆された (Fujita et al., 2025a)。加えて、CNF の繊維径や繊維長が肺内での蓄積パターンや炎症反応に異なる影響を及ぼす可能性があり、これらの物理化学的特性が CNF の長期的な影響を規定する重要な要因であることが明らかになった。これらの結果を踏まえ、CNF の残留性およびそれに伴う炎症応答を包括的に評価するためには、さらなる長期的研究が必要であると考えられる。特に、低濃度での慢性的な暴露がもたらす影響についての知見を深めることで、規制やリスク評価への科学的根拠を提供することが重要である。

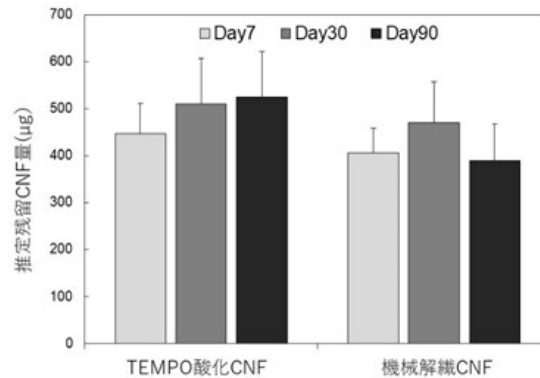


図 4.4 気管内注入後のラットの肺組織における推定残留 CNF の経時変化

4.3.1.3.5 CNF の肺炎症および全身性免疫評価

90 日間にわたる追跡試験の結果、染色した TEMPO 酸化 CNF および機械解繊 CNF が肺内に長期的に残留することが確認されたことから、各種 CNF が肺内に残留する可能性を踏まえ、これらの材料が全身性の免疫応答に影響を及ぼすかについて検討を行った。具体的には、ラットにおける気管内投与後 28 日目の肺炎症を対象に、TEMPO 酸化 CNF、針葉樹漂白クラフトパルプ由来の機械解繊 CNF、CNC の 3 種類のナノセルロース (NC) を用いた比較評価を実施した (Fujita et al., 2025c)。各材料は 2.0 mg/kg で投与され、28 日後にはすべての NC が肺胞マクロファージに貪食されていた。TEMPO 酸化 CNF および CNC は炎症性マーカーに変化を示し、特に CNC は最も顕著な組織変化を引き起こした。一方、機械解繊化 CNF は限局的な炎症および肉芽腫形成を示したが、BALF 中の変化は最小限にとどまった。いずれの NC も MWCNT と比較して炎症反応および組織変化は軽度であり、脾臓および胸腺におけるリンパ球サブセットに有意な変化は認められず、全身性免疫毒性は確認されなかった。

4.3.2 吸入暴露試験による CNF の吸入影響評価

NEDO 委託事業 (2020～2024 年度) において、福井大学では CNF の吸入影響評価を目的に、試料調製手法の開発および特性評価を行った。さらに、OECD 試験ガイドライン 412 (TG412) に準拠したラットを用いる吸入暴露試験を実施した。本試験では、機械解繊 CNF (fib-CNF) を用い、ラットに対して毎日 6 時間、28 日間にわたり鼻部吸入暴露を行った (Yamashita et al., 2025)。暴露濃度は高濃度 35 mg/m³、中濃度 7 mg/m³、低濃度 1.5 mg/m³ の 3 段階で設定した。

試験の結果、体重、血液学的および生化学的パラメーターにおいて、fib-CNF 暴露群と対照群間で有意な差は認められなかった。一方、肺組織の病理学的評価では、fib-CNF 暴露群において肺胞および肺リンパ節におけるマクロファージ増加が観察され、肺重量の有意な増加も確認された。特に高濃度群で顕著な影響が見られ、低濃度群では軽度の炎症反応に留まった。

これらの知見から、fib-CNF の急性吸入毒性における無毒性量 (NOAEL) は 1.5 mg/m³未満と推定された。

4.3.3 培養細胞試験による簡易かつ迅速な吸入影響評価手法の開発と評価

前節で述べたとおり、NEDO 委託事業 (2017～2019 年度) では代表的な 3 種の CNF を対象に

気管内投与法の開発と試験を進めた。しかし、CNF の実用化が進む一方で、すべての CNF 特性を評価するには、高コストかつ長期間を要する動物試験の実施は現実的ではない。また、3R 原則（代替：Replacement、削減：Reduction、苦痛の軽減：Refinement）に基づき、動物試験に依存しない簡便な培養細胞試験による安全性評価の重要性が国際的に高まっている。

培養細胞試験は動物試験と比較して短期間かつ小規模な施設・装置で実施可能であり、多様な工業ナノ材料の毒性評価に広く活用されている。これまでに我々も複数の研究成果を報告している（Fujita et al., 2009, 2013, 2015a, 2018, 2020）。しかしながら、CNF に関する培養細胞試験による吸入影響評価は、国際的にみてもまだ十分な進展をみていないのが現状である。

こうした背景を踏まえ、NEDO 委託事業（2020～2024 年度）では、多様な CNF の評価を目的に、培養細胞試験を用いた簡便かつ迅速な吸入影響評価手法の開発およびその検証を実施した。培養細胞試験の結果はヒトの吸入影響を完全に網羅するものではないが、多様な CNF の細胞レベルでの影響を評価することで、代表的な CNF を対象とした動物試験の結果を補完し、その同等性評価に資することが期待される。以下に各研究項目の概要を示す（図 4.5）。

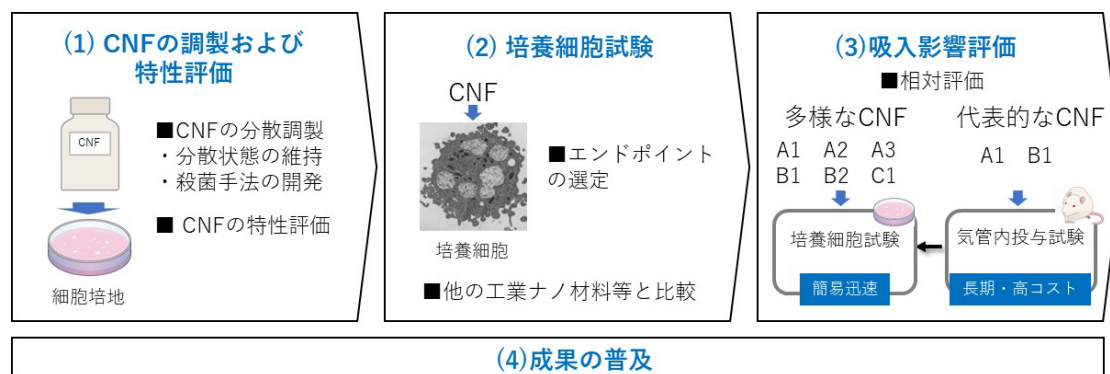


図 4.5 CNF の吸入影響評価の開発

4.3.3.1 CNF の調製および特性評価

これまでの工業ナノ材料に関する培養細胞試験や、CNF 懸濁液の物性に関する知見を踏まえ、NEDO 委託事業（2020～2024 年度）では、CNF の細胞影響評価において以下の4点が極めて重要であると判断した：(1) エンドトキシンの混入、(2) 微生物汚染、(3) 培地成分による CNF への吸着、(4) 培地成分の影響による CNF の凝集・分散状態の変化。これらの観点から既存の関連文献を精査し、CNF に対する培養細胞試験の課題と対応策をまとめた総説論文を発表した（Moriyama et al., 2022）。

一般的な細胞培地には、塩類・アミノ酸・糖・微量栄養素を含む pH 平衡溶液に加え、ウシ胎児血清（FBS）などの血清成分、抗生物質、抗真菌剤などが含まれる。一方で、CNF はチキソトロピー性など特異な物理化学的特性を有しており、培地中で凝集しやすく、また血清成分への吸着も起こり得る。このため、CNF を適切に分散させた上で細胞試験を実施するには、試料調製方法の最適化とその特性評価が不可欠である。

本研究では、CNF の特性に基づく培養細胞試験の信頼性を高めるため、分散状態の維持、凝集防止、ならびに生物学的安全性を確保する調製法を開発し、その物理化学的・生物学的特性を評価した（図 4.6）。特に、植物由来のセルロースが細菌や真菌の栄養源となる可能性があることか

ら、CNF の微生物汚染やエンドトキシン混入の有無についても重点的に調査を行った。

その結果、抗生物質、高温処理、高圧蒸気滅菌はいずれも CNF 懸濁液中の微生物除去には有効であったが、高温処理および高圧蒸気滅菌は CNF の物理化学的特性を損なうことが明らかとなった。さらに、これらの処理ではエンドトキシンや β -グルカンの不活化には効果がないことも判明した（藤田ら, 2023）。したがって、培養細胞試験では抗生物質により微生物の影響は抑制可能である一方、エンドトキシンや β -グルカンの影響については慎重な検討が必要である。また、4.3.1.1 節『気管内投与試験のための CNF 試料調製と特性評価』で詳述するように、本事業では CNF の物性を保持したまま殺菌可能な手法としてガンマ線照射技術を採用し、効果的な無菌化プロセスを確立した（Horie et al., 2023）。

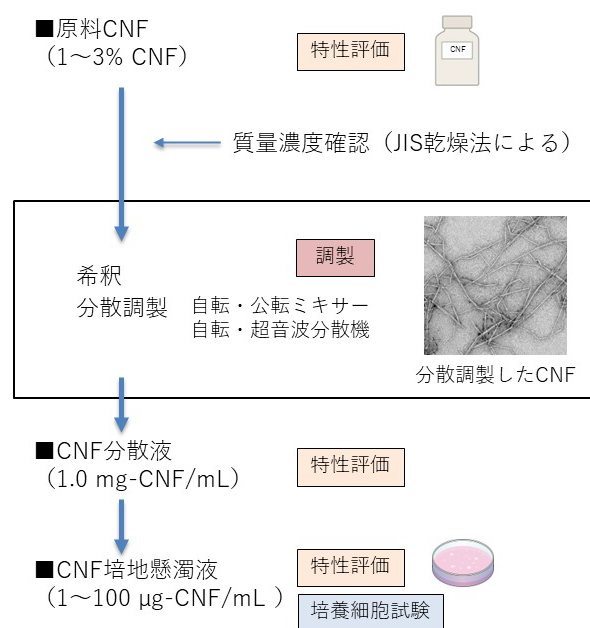


図 4.6 CNF の調製方法の開発および特性評価

4.3.3.2 培養細胞試験

4.3.3.2.1 ラット肺胞マクロファージによる CNF の影響評価

ラット肺胞マクロファージ（NR8383）を用いて CNF の細胞毒性試験を実施した（Fujita et al., 2025b）。供試試料として、TEMPO 酸化 CNF、リン酸エステル化 CNF、針葉樹漂白クラフトパルプの機械解繊化 CNF、柑橘類の皮由来 CNF（Hiden et al., 2019）、水中カウンターコリジョン（ACC）法による針葉樹漂白クラフトパルプの粗大分画 CNF、および超微細分画 CNF（Hiden et al., 2019）の 6 種類を用いた。

その結果、いずれの CNF 暴露群でも顕著な活性酸素の生成は確認されなかったが、TEMPO 酸化 CNF、リン酸エステル化 CNF、針葉樹漂白クラフトパルプの機械的フィブリル化 CNF への暴露では、ミトコンドリア脱水素酵素活性の増加や炎症性サイトカインの産生が見られ、炎症関連遺伝子の誘導が観察された。一方、柑橘類の皮由来 CNF、ACC 法による針葉樹漂白クラフトパルプの粗大分画および超微細分画 CNF では、これらの影響は顕著でなかった。

さらに、CNF 懸濁液中の細菌やエンドトキシンなどの生物学的汚染と細胞への影響との明確な相関は認められず、CNF が顕著な細胞毒性を持たない可能性が示唆された。また、染色 CNF を用いた試験により、NR8383 細胞が暴露後 24 時間で CNF を貪食することが確認された(図 4.7)。

これらの結果から、一部の CNF は肺泡マクロファージを適度に活性化する一方で、他の CNF は生体適合性を示す可能性があることが示唆された。また、CNF の細胞影響には、原料供給源や製造工程、物理化学的性質が重要な要因であることが明らかになった。

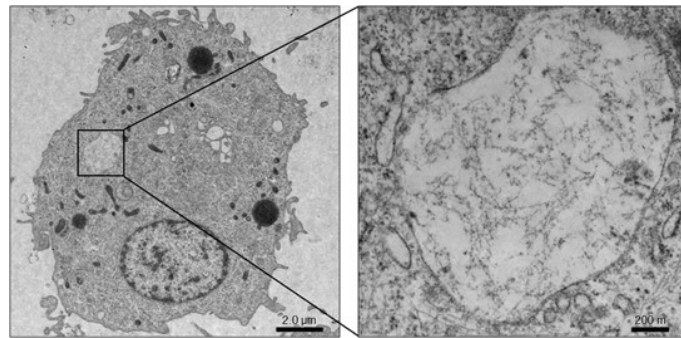


図 4.7 染色した TEMPO 酸化 CNF を貪食した NR8383 細胞

4.3.3.2.2 ラット肺泡マクロファージによる CNC の影響評価

ラット肺泡マクロファージ (NR8383) を用いて CNC の細胞毒性試験を実施した (Fujita et al., 2025c)。供試試料として、標準の CNC1、硫酸加水分解した CNC2、脱硫化した CNC3 の 3 種類を用いた。

その結果、すべての CNC が NR8383 細胞に取り込まれ、炎症性サイトカインの産生が時間依存的かつ材料依存的に増加した。特に CNC2 および CNC3 では、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IL-18、MCP-1、MIP-1 α 、TNF α などのサイトカインが顕著に上昇し、CNC2 では GM-CSF の有意な増加も認められた。TEM 観察では、CNC1 が細胞内に取り込まれ、空胞様構造内に電子密度の高い粒子として確認された。

細胞生存率の評価では、24 時間暴露時には大きな変化は見られなかったが、48 時間暴露では CNC3 (100 μ g/mL) により細胞生存率が有意に低下し、時間依存的な細胞毒性が示された。CNC1 および CNC2 では軽微な影響にとどまった。

さらに、炎症反応、酸化ストレス、アポトーシス、細胞外マトリックス (ECM) 分解に関連する遺伝子群の発現解析では、CNC2 が最も強い転写応答を示し、特に *Ccl5*、*Ccl12*、*Hmox1*、*Serpine1*、*Sod2*、*Mmp3*、*Mmp9*、*Mmp12* などの遺伝子が有意に上昇した。

これらの結果から、CNC は NR8383 細胞に対して炎症性応答を誘導し、特に CNC2 および CNC3 は強い炎症性サイトカイン産生と遺伝子発現変化を引き起こすことが示された。CNC3 は軽度～中等度の細胞毒性を示し、長時間暴露により細胞生存率の低下が認められた。したがって、CNC の生物学的影響は、繊維の形態や表面特性によって大きく調節されることが示唆され、これらの物理化学的要因が細胞応答の強度や性質を左右する重要な因子と考える。

4.3.3.2.3 ガンマ線照射による微生物不活化と細胞応答評価

CNF 懸濁液の微生物汚染状況と培養細胞試験への影響を評価した結果、CNF 懸濁液には微生

物の汚染が認められ、LPS 様活性も確認された (Horie et al., 2023)。これらの汚染への対策として、吸収線量 0.5、1、5、10 kGy のガンマ線照射を行い、6 種類の培養細胞 (HaCaT、A549、Caco-2、MeT-5A、THP-1、NR8383) を用いて細胞への影響を評価した。その結果、1 kGy の照射により微生物の減少が確認され、殺菌効果が認められた。また、CNF の物理的特性への影響は最小限にとどまった。一方、10 kGy の照射では完全な殺菌が達成されたが、CNF の繊維長が短縮する傾向が観察された。さらに、CNF 懸濁液は LPS 様の細胞応答を誘導し、特にマクロファージにおいて IL-8 の強い誘導が確認された。しかし、10 kGy 以上の照射を行っても LPS 様活性の不活化は認められなかった。以上の結果から、CNF 懸濁液には微生物および LPS 様活性による汚染の可能性が示唆され、*in vitro* 細胞毒性評価においてガンマ線照射を用いた殺菌が有効であることが確認された。しかし、試験結果に与える LPS 様活性などの汚染物質の影響については十分に考慮する必要があることが明らかになった。

4.3.3.2.4 三次元ヒト気道モデルを用いた評価

ヒト組織を模倣した三次元ヒト気道モデルを用いて、CNF の細胞影響評価を実施した。被験材料として、TEMPO 酸化 CNF、リン酸エステル化 CNF、針葉樹漂白クラフトパルプの機械解繊維化 CNF のスラリーを用いた。これらに超純水を加え、自転・公転ミキサーで混練し、1,000 µg/mL の CNF 調製原液を作製したのち、細胞培地と混合して 100 µg/mL の CNF 培地分散液を得た。ヒト気道三次元モデルを所定の時間培養後、各試料を細胞上部に添加し、添加後 24 時間培養した後に細胞膜損傷レベル (LDH 活性) を評価した。その結果、いずれの CNF も培地のみで培養した対象群と比較して有意な細胞毒性は認められなかった。また、細胞膜損傷以外の細胞影響として炎症惹起も考えられたが、炎症応答に関与する遺伝子の発現変動も顕著ではなかった (森山, 2023)。

4.3.4 成果の普及

NEDO 委託事業 (2017～2019 年度) では、開発した試験手法および適用事例をもとに、2020 年に「セルロースナノファイバーの有害性試験手順書」を作成し、さらに 2023 年にはその英語版にあたる「A Manual for Toxicity Testing of Cellulose Nanofibers」を発行した (Fujita et al., 2023b)。続く NEDO 委託事業 (2020～2024 年度) においては、2022 年および 2025 年に「セルロースナノファイバーの安全性評価書」を取りまとめた。これらの成果文書は、産業技術総合研究所 安全科学研究部門のウェブサイト (<https://riss.aist.go.jp/>) および同部門が運営する Nano Safety Web Site (<https://riss.aist.go.jp/nanosafety/>) にて無償で公開している。

また、研究成果は複数の学術論文としても公表された。主な発表内容は以下の通りである：

- ・ CNF の吸入影響に関する総説 (Sai and Fujita, 2020 ; 藤田, 2024 ; Fujita and Moriyama, 2025)
- ・ CNF 分散液の滅菌手法に関する検討 (Sai et al., 2020)
- ・ CNF の気管内投与試験に関する研究 (Fujita et al., 2021 ; 2023a ; 2025a ; 2025c ; Yamashita et al., 2024)
- ・ CNF の吸入暴露試験に関する報告 (Yamashita et al., 2025)
- ・ CNF の細胞影響試験における課題に関する総説 (Moriyama et al., 2022)
- ・ CNF の細胞影響評価に関する研究 (Horie et al., 2023 ; Fujita et al., 2025b)

- ・ CNC の細胞影響評価に関する研究 (Fujita et al., 2025c)

これらの取り組みにより、CNF の安全性評価に関する知見を広く共有するとともに、今後のリスク評価および国際標準化に資する基盤情報の整備が進められた。

4.4 まとめ

4.4.1 既存論文の知見

既存の研究報告から得られた CNF の吸入影響に関する主な知見は以下のとおりである：

- ・ CNF の短期暴露によって引き起こされる炎症反応は一過性であり、従来のセルロースや他の難溶性低毒性粉塵と類似している。これは、MWCNT やアスベストが引き起こす影響とは明確に異なる。
- ・ CNF による炎症は、CNC に比べて軽度である。
- ・ CNF および CNC は、CNT 類に比べて、肺における炎症、線維化、肉芽腫形成、気管支肺胞過形成、さらには腫瘍形成といった深刻な病態を引き起こす可能性が低い。これらの違いは、材料の剛性や表面特性といった物理化学的特性に起因していると考えられる。

一方で、CNF の吸入影響は未解明の部分も多く、特に体内への取り込み後の残留性や長期影響については、引き続き検討が必要である。

4.4.2 NEDO 委託事業の知見

NEDO 委託事業（2017～2019 年度、2020～2024 年度）における試験結果から、以下の知見が得られた：

- ・ 繊維径の細い化学修飾 CNF では、投与後に肺胞炎症を誘発するものの、その炎症は 90 日後には減弱した。
- ・ 繊維径の太い機械解繊 CNF による炎症は、化学修飾 CNF に比べて軽度であり、同様に 90 日後には減弱が確認された。また、肺胞以外にも終末細気管支周辺への滞留が観察された。
- ・ CNF が引き起こす炎症反応は、MWCNT に比べて有意に軽度である。
- ・ 投与後、炎症が沈静化したにもかかわらず、肺胞マクロファージによる CNF の貪食が継続して観察された。これは、マクロファージが CNF を取り込みながらも活性化を起こしていない可能性を示唆している。
- ・ CNF は肺内でのクリアランス（排除）が遅く、長期的に残留する傾向がある。
- ・ CNF は肺胞や終末細気管支まで到達することが確認されており、その局在は繊維径や長さなどの物理的特性によって左右される。これにより、局所的な炎症反応の発現様式が異なると考えられる。
- ・ CNF の短期暴露による脾臓および胸腺におけるリンパ球サブセットの解析では、有意な変化は認められず、全身性免疫毒性の兆候は確認されなかった。

これらの結果を既存文献の知見と照らし合わせると、CNF の吸入影響に関して以下のような相違点および新たな知見が示された：

- ・ 既存文献では、CNF の短期暴露による炎症が一過性で軽度であるとされていたが、NEDO 事業では異なる形態（繊維径や表面修飾）による CNF で炎症の強度や持続性に差異があることを明らかにした。

- ・ 特に、肺胞以外の部位（例：終末細気管支）への CNF の滞留や、マクロファージによる貪食が炎症の収束後も継続するという知見は、既存研究では十分に言及されておらず、新たな観察結果である。
- ・ また、CNF の局在や炎症反応が物理的サイズ（繊維径・長さ）と密接に関連している点についても、既報にはない具体的な知見として加わった。
- ・ さらに、CNF が肺内に長期間残留する可能性があることが動物試験で示された点は、既存研究では示唆にとどまっていたものであり、NEDO 事業によって明確に裏付けられた。

以上の結果から、CNF の吸入影響評価においては、単に「CNF」と一括りにするのではなく、物理化学的特性の違いを踏まえた個別評価の必要性が示唆されるとともに、既存文献の補完および発展に貢献する重要な成果であると位置づけられる。

4.4.3 今後の課題

これまでの知見を踏まえ、CNF の吸入影響評価に関する今後の研究課題は以下のとおりである。動物試験および培養細胞試験の両面からの検討に加え、総合的・実践的な評価体系の構築が求められる。

（１）動物試験に関する課題

- ・ **中長期的影響の評価の不足**：慢性暴露による影響評価は依然として不十分であり、長期暴露試験の実施によって、肺や全身への遅発性影響の把握が必要である。
- ・ **肺内分解および残留性の検証**：CNF の肺内での分解速度や残留性の把握は、影響の持続性評価やリスク評価の前提となるため、詳細な検証が求められる。
- ・ **免疫学的影響の検討**：短期暴露では全身性免疫毒性は認められなかったが、CNF の長期残留を踏まえ、中長期暴露による免疫系への影響について系統的な評価が求められる。
- ・ **暴露様式の実環境との整合性**：現在主に用いられている気管内投与や液体懸濁液の吸引による暴露法に加え、エアロゾル化した CNF を用いた吸入暴露試験の実施が望まれる。これにより、実際の産業現場における暴露環境をよりの確に再現できる。
- ・ **物理化学的特性の影響解明**：原材料や製造法による繊維径・長さ・形状・表面特性・解繊度・純度の違いが、炎症誘導性や肺内残留性に与える影響について、より系統的な検討が必要である。

（２）培養細胞試験に関する課題

- ・ **適切な分散状態の評価系構築**：CNF の懸濁状態は評価結果に大きく影響するため、細胞培地中での分散安定性を保つ条件や評価方法の開発が課題である。
- ・ **外部因子の影響分離**：CNF 懸濁液中に含まれる可能性のある微生物やエンドトキシンの影響を除外する評価系の確立により、CNF 本来の生体影響を正確に把握できるようにする必要がある。
- ・ **非炎症性エンドポイントおよびバイオマーカーの探索**：炎症に加え、免疫応答、細胞毒性、遺伝子発現変動などの複合的な影響を捉える多面的な指標の導入が求められる。とくに、サイトカインプロファイルや酸化ストレスマーカーなど、新たなバイオマーカーを用いた評価手法の導入は、炎症以外の影響を捉える上で有効である。
- ・ **CNF 特性と生体応答の関連解明**：繊維径、長さ、表面修飾などの物理化学的・生物学的特性

と細胞応答との関連を体系的に評価し、特定の CNF が細胞に与える影響の機序を解明することが期待される。

(3) 全体的な課題と今後の展開

- ・ **試験結果の統合的評価**：動物試験と培養細胞試験の結果を横断的に統合し、統合的なリスク評価フレームワークの構築が求められる。異なる試験系間の相関解析により、評価の信頼性を高める必要がある。
- ・ **実環境を踏まえたリスク評価の深化**：実際の作業環境における暴露シナリオと結び付けたリスク評価が不可欠である。そのためには、吸入影響評価のための標準化された試験法や暴露評価手法の確立が急務である。
- ・ **新規 CNF の個別評価の重要性**：CNF は製造プロセスにより特性が大きく変化することから、新たに開発・市場投入される CNF については、既存データの単純な外挿に依存せず、個別の安全性評価と慎重なリスク評価を実施すべきである。

参考文献

- Adamis Z, Tátrai E, Honma K, Ungváry G. 1997. *In vitro* and *in vivo* assessment of the pulmonary toxicity of cellulose. J Appl Toxicol. 17(2):137–141.
- Aimonen K, Imani M, Hartikainen M, Suhonen S, Vanhala E, Moreno C, Rojas OJ, Norppa H, Catalán J. 2022. Surface functionalization and size modulate the formation of reactive oxygen species and genotoxic effects of cellulose nanofibrils. Part Fibre Toxicol. 19:19.
- Bhattacharya K, Kilic G, Costa PM, Fadeel B. 2017. Cytotoxicity screening and cytokine profiling of nineteen nanomaterials enables hazard ranking and grouping based on inflammogenic potential. Nanotoxicology 11(6):809–826.
- Catalán J, Rydman E, Aimonen K, Hannukainen KS, Suhonen S, Vanhala E, Moreno C, Meyer V, Perez DD, Sneek A, Forsström U, Højgaard C, Willemoes M, Winther JR, Vogel U, Wolff H, Alenius H, Savolainen KM, Norppa H. 2017. Genotoxic and inflammatory effects of nanofibrillated cellulose in murine lungs. Mutagenesis 32(1):23–31.
- Čolić M, Tomić S, Bekić M. 2020. Immunological aspects of nanocellulose. Immunol Lett. 222:80–89.
- Ede JD, Ong KJ, Goergen M, Rudie A, Pomeroy-Carter CA, Shatkin JA. 2019. Risk Analysis of Cellulose Nanomaterials by Inhalation: Current State of Science. Nanomaterials (Basel) 9(3):337.
- Farcas MT, Kisin ER, Menas AL, Gutkin DW, Star A, Reiner RS, Yanamala N, Savolainen K, Shvedova AA, 2016. Pulmonary exposure to cellulose nanocrystals caused deleterious effects to reproductive system in male mice. J Toxicol Environ Health A 79(21):984–997.
- Fujita K, Endoh S, Maru J, Sai T, Tomoko A, Yosuke Goi, Obara S, Tani F, Yamamoto F, Ogawa T. 2023b. A Manual for Toxicity Testing of Cellulose Nanofibers.
https://riss.aist.go.jp/files/CNF_Hazard_Assessment_Procedure_En_230201.pdf
- Fujita K, Fukuda M, Endoh S, Kato H, Maru J, Nakamura A, Uchino K, Shinohara N, Obara S, Nagano R, Horie M, Kinugasa S, Hashimoto H, Kishimoto A. 2013. Physical properties of single-wall carbon nanotubes in cell culture and their dispersal due to alveolar epithelial cell response.

- Toxicol Mech Methods 23(8):598–609.
- Fujita K, Fukuda M, Endoh S, Maru J, Kato H, Nakamura A, Shinohara N, Uchino K, Honda K. 2016. Pulmonary and pleural inflammation after intratracheal instillation of short single-walled and multi-walled carbon nanotubes. *Toxicol Lett.* 257:23–37.
- Fujita K, Fukuda M, Endoh S, Maru J, Kato H, Nakamura A, Shinohara N, Uchino K, Honda K. 2015a. Size effects of single-walled carbon nanotubes on *in vivo* and *in vitro* pulmonary toxicity. *Inhal Toxicol.* 27(4):207–223.
- Fujita K, Fukuda M, Fukui H, Horie M, Endoh S, Uchida K, Shichiri M, Morimoto Y, Ogami A, Iwahashi H. 2015b. Intratracheal instillation of single-wall carbon nanotubes in the rat lung induces time-dependent changes in gene expression. *Nanotoxicology* 9(3):290–301.
- Fujita K, Horie M, Kato H, Endoh S, Suzuki M, Nakamura A, Miyauchi A, Yamamoto K, Kinugasa S, Nishio K, Yoshida Y, Iwahashi H, Nakanishi J. 2009. Effects of ultrafine TiO₂ particles on gene expression profile in human keratinocytes without illumination: involvement of extracellular matrix and cell adhesion. *Toxicol Lett.* 191(2-3):109–117.
- Fujita K, Morimoto Y, Endoh S, Uchida K, Fukui H, Ogami A, Tanaka I, Horie M, Yoshida Y, Iwahashi H, Nakanishi J. 2010. Identification of potential biomarkers from gene expression profiles in rat lungs intratracheally instilled with C(60) fullerenes. *Toxicology* 274(1-3):34–41.
- Fujita K, Morimoto Y, Ogami A, Myojyo T, Tanaka I, Shimada M, Wang WN, Endoh S, Uchida K, Nakazato T, Yamamoto K, Fukui H, Horie M, Yoshida Y, Iwahashi H, Nakanishi J. 2009a. Gene expression profiles in rat lung after inhalation exposure to C60 fullerene particles. *Toxicology* 258(1):47–55.
- Fujita K, Morimoto Y, Ogami A, Tanaka I, Endoh S, Uchida K, Tao H, Akasaka M, Inada M, Yamamoto K, Fukui H, Hayakawa M, Horie M, Saito Y, Yoshida Y, Iwahashi, Niki E, Nakanishi J. 2009b. A gene expression profiling approach to study the influence of ultrafine particles on rat lungs. In *Atmospheric and Biological Environmental Monitoring*. Springer Netherlands. 219–227.
- Fujita K, Moriyama A. 2025. Inhalation toxicity of cellulose nanofibrils: A review of key findings and future directions. *Carbohydr Polym Technol Appl* 11:100913.
- Fujita K, Obara S, Maru J, Endoh S, Kawai Y, Moriyama A, Horie M. 2025b. Assessing cytotoxicity and biocompatibility of cellulose nanofibrils on alveolar macrophages. *Cellulose.* 32:241–260.
- Fujita K, Obara S, Maru J, Endoh S. 2020. Cytotoxicity profiles of multi-walled carbon nanotubes with different physico-chemical properties. *Toxicol Mech Methods* 30(7):477–489.
- Fujita K, Obara S, Maru J, Endoh S. 2021. Pulmonary inflammation following intratracheal instillation of cellulose nanofibrils in rats: comparison with multi-walled carbon nanotubes. *Cellulose* 28:7143–7164.
- Fujita K, Obara S, Maru J, Endoh S. 2023a. Effects of advanced nanomaterials on the respiratory system of a murine COPD model. *Toxicol Rep.* 11:481–492.
- Fujita K, Take S, Tani R, Maru J, Obara S, Endoh S. 2018. Assessment of cytotoxicity and mutagenicity of exfoliated graphene. *Toxicol In Vitro* 52:195–202.

- Fujita, K, Obara S, Maru J, Kawai Y, Endoh S, Moriyama A. 2025c. Pulmonary inflammation and immune responses induced by nanocellulose: Insights from *in vivo* and *in vitro* models. *Curr Res Toxicol*. 9:100259.
- Fujita, K, Obara S, Maru J, Kawai Y, Endoh S. 2025a. Pulmonary inflammatory responses and retention dynamics of cellulose nanofibrils. *Toxicology* 511:154038.
- Hadrup N, Knudsen KB, Berthing T, Wolff H, Bengtson S, Kofoed C, Espersen R, Højgaard C, Winther JR, Willemoës M, Wedin I, Nuopponen M, Alenius H, Norppa H, Wallin H, Vogel U. 2019. Pulmonary effects of nanofibrillated celluloses in mice suggest that carboxylation lowers the inflammatory and acute phase responses. *Environ Toxicol Pharmacol*. 66:116–125.
- Hideno A, Abe K, Yano H, Uchimura H. 2019. Characterization of nanofibers from Japanese orange inner peels prepared using pectinase and diluted alkali. *J Jpn Inst Energy*. 98(5):85–89.
- Honda K, Naya M, Takehara H, Kataura H, Fujita K, Ema M. 2017. A 104-week pulmonary toxicity assessment of long and short single-wall carbon nanotubes after a single intratracheal instillation in rats. *Inhal Toxicol*. 29(11):471–482.
- Horie M, Fujita K, Endoh S, Sugino S, Maru J, Moriyama A, Ogura I. 2023. Contaminant microorganisms in the *in vitro* evaluation of cellular responses of cellulose nanofibers and their microbial inactivation using gamma irradiation. *Toxicol Mech Methods*. 33(9):741–754.
- Ilves M, Vilske S, Aimonen K, Lindberg HK, Pesonen S, Wedin I, Nuopponen M, Vanhala E, Højgaard C, Winther JR, Willemoës M, Vogel U, Wolff H, Norppa H, Savolainen K, Alenius H. 2018. Nanofibrillated cellulose causes acute pulmonary inflammation that subsides within a month. *Nanotoxicology* 12:729–746.
- Joseph P, Umbright CM, Roberts JR, Cumpston JL, Orandle MS, McKinney WG, Sager TM. 2021. Lung toxicity and gene expression changes in response to whole-body inhalation exposure to cellulose nanocrystal in rats. *Inhal Toxicol*. 33:66–80.
- Kasai T, Umeda Y, Ohnishi M, Mine T, Kondo H, Takeuchi T, Matsumoto M, Fukushima S. 2016. Lung carcinogenicity of inhaled multi-walled carbon nanotube in rats. Part Fibre Toxicol. 13(1):53.
- Kose R, Mitani I, Kasai W, Kondo T. 2011. ‘Nanocellulose’ as a single nanofiber prepared from pellicle secreted by *Gluconacetobacter xylinus* using aqueous counter collision. *Biomacromolecules*. 12(3):716–720.
- Lopes VR, Sanchez-Martinez C, Strømme M, Ferraz N. 2017. *In vitro* biological responses to nanofibrillated cellulose by human dermal, lung and immune cells: surface chemistry aspect. Part Fibre Toxicol. 14:1.
- Menas AL, Yanamala N, Farcas MT, Russo M, Friend S, Fournier PM, Star A, Iavicoli I, Shurin GV, Vogel UB, Fadeel B, Beezhold D, Kisin ER, Shvedova AA. 2017. Fibrillar vs crystalline nanocellulose pulmonary epithelial cell responses: Cytotoxicity or inflammation? *Chemosphere* 171:671–680.
- Mercer RR, Hubbs AF, Scabilloni JF, Wang L, Battelli LA, Friend S, Castranova V, Porter DW. 2011. Pulmonary fibrotic response to aspiration of multi-walled carbon nanotubes. Part Fibre Toxicol.

8:21.

- Milton DK, Godleski JJ, Feldman HA, Greaves IA. 1990. Toxicity of intratracheally instilled cotton dust, cellulose, and endotoxin. *Am Rev Respir Dis.* 142(1):184–192.
- Moriyama A, Ogura I, Fujita K. 2023. Potential issues specific to cytotoxicity tests of cellulose nanofibrils. *J Appl Toxicol.* 43(1):195–207.
- Nagato LK, Lourenço MG, Cadete RA, Leite-Júnior JH, Koatz VL, Rocco PR, Faffe DS, Zin WA. 2008. Microcrystalline cellulose induces time-dependent lung functional and inflammatory changes. *Respir Physiol Neurobiol.* 164(3):331–337.
- OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Test No. 403: Acute Inhalation Toxicity. <https://doi.org/10.1787/9789264070608-en>
- OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Test No. 412: Subacute Inhalation Toxicity: 28-Day Study. <https://doi.org/10.1787/9789264070783-en>
- OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Test No. 413: Subchronic Inhalation Toxicity: 90-day Study. <https://doi.org/10.1787/9789264070806-en>
- Ogura I, Moriyama A, Iizumi Y, Endoh S, Fujita K, Horie M, Okazaki T, Matsuzawa T, 2025. Effect of gamma irradiation on cellulose nanofibers. *J Wood Sci.* 71:37.
- Park EJ, Khaliullin TO, Shurin MR, Kisin ER, Yanamala N, Fadeel B, Chang J, Shvedova AA. 2018. Fibrous nanocellulose, crystalline nanocellulose, carbon nanotubes, and crocidolite asbestos elicit disparate immune responses upon pharyngeal aspiration in mice. *J Immunotoxicol.* 15(1):12–23.
- Pinto F, Lourenco AF, Pedrosa J, Goncalves L, Ventura C, Vital N, Bettencourt A, Fernandes SN, da Rosa RR, Godinho MH, Louro H, Ferreira P, Silva MJ. 2022. Analysis of the *in vitro* toxicity of nanocelluloses in human lung cells as compared to multi-walled carbon nanotubes. *Nanomaterials (Basel)* 12(9):1432.
- Porter DW, Hubbs AF, Mercer RR, Wu N, Wolfarth MG, Sriram K, Leonard S, Battelli L, Schwegler-Berry D, Friend S, Andrew M, Chen BT, Tsuruoka S, Endo M, Castranova V. 2010. Mouse pulmonary dose- and time course-responses induced by exposure to multi-walled carbon nanotubes. *Toxicology.* 269(2-3):136–147.
- Sai T, Maru J, Obara S, Endoh S, Kajihara H, Fujita K. 2020. Screening of preservatives and evaluation of sterilized cellulose nanofibers for toxicity studies. *J Occup Health* 62:e12176.
- Sai T, Fujita K. 2020. A review of pulmonary toxicity studies of nanocellulose. *Inhal Toxicol.* 32:231–239.
- Shvedova AA, Kisin ER, Yanamala N, Farcas MT, Menas AL, Williams A, Fournier PM, Reynolds JS, Gutkin DW, Star A, Reiner RS, Halappanavar S, Kagan VE. 2016. Gender differences in murine pulmonary responses elicited by cellulose nanocrystals. *Part Fibre Toxicol.* 13(1):28.
- Song LY, Wu YZ, Pei XX, Li R, Chen HT, Sun XZ. 2020. Pulmonary toxicity and RNA sequencing analyses of mouse in response to exposure to cellulose nanofibrils. *Inhal Toxicol.* 32(9-10):388–401.
- Stoudmann N, Schmutz M, Hirsch C, Nowack B, Som C. 2020. Human hazard potential of nanocellulose: quantitative insights from the literature. *Nanotoxicology* 9:1241–1257.

- Tátrai E, Adamis Z, Böhm U, Merétey K, Ungváry G. 1995. Role of cellulose in wood dust-induced fibrosing alveo-bronchiolitis in rat. *J Appl Toxicol*. 15(1):45–48.
- Tátrai E, Brozik M, Adamis Z, Merétey K, Ungváry G. 1996. *In vivo* pulmonary toxicity of cellulose in rats. *J Appl Toxicol*. 16(2):129–135.
- Ventura C, Pinto F, Lourenço AF, Ferreira PJT, Louro H, Silva MJ. 2020. On the toxicity of cellulose nanocrystals and nanofibrils in animal and cellular models. *Cellulose* 27:5509–5544.
- Yanamala N, Farcas MT, Hatfield MK, Kisin ER, Kagan VE, Geraci CL, Shvedova AA. 2014. *In vivo* evaluation of the pulmonary toxicity of cellulose nanocrystals: A renewable and sustainable nanomaterial of the future. *ACS Sustain Chem Eng*. 2(7):1691–1698.
- Yanamala N, Kisin ER, Menas AL, Farcas MT, Khaliullin TO, Vogel UB, Shurin GV, Schwegler-Berry D, Fournier PM, Star A, Shvedova AA. 2016. *In vitro* toxicity evaluation of lignin-(Un)coated cellulose based nanomaterials on human A549 and THP-1 cells. *Biomacromolecules* 17(11):3464–3473.
- Yamashita Y, Tokunaga A, Aoki K, Ishizuka T, Uematsu H, Sakamoto H, Fujita S, Tanoue S. 2024. Assessing the safety of mechanically fibrillated cellulose nanofibers (fib-CNF) via toxicity tests on mice: single intratracheal administration and 28 days' oral intake. *Toxics*. 12(2):121.
- Yamashita Y, Tokunaga A, Aoki K, Ishizuka T, Fujita S, Tanoue S. 2025. Safety of mechanically fibrillated cellulose nanofibers (CNFs) by inhalation exposure based on TG412. *Nanomaterials*, 15(3):214.
- 小倉 勇, 梶原 秀夫, 蒲生 昌志, 小栗 朋子, 川本 朱美, 久保山 太一, 2020. 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. <https://riss.aist.go.jp/results-and-dissemin/776/>
- 藤田 克英 2024. セルロースナノファイバーの吸入毒性評価. *オレオサイエンス* 24(5):197–203.
- 藤田 克英, 小原 佐和枝, 丸 順子, 遠藤 茂寿, 森山 章弘, 堀江 祐範 2023. セルロースナノファイバー懸濁液の生物学的特性評価. 第 50 回日本毒性学会学術年会 50.1, P2-155.
- 藤田 克英, 遠藤 茂寿, 丸 順子, 才 貴史, 小栗 朋子, 後居 洋介, 小原 佐和枝, 谷 史人, 山本 彩葉, 小川 剛伸, 2020. セルロースナノファイバーの有害性試験手順書. https://riss.aist.go.jp/wp-content/uploads/2021/08/CNF_Hazard_Assessment_Procedure_20200409.pdf
- 森山 章弘 2023. ヒト気道三次元モデルを用いたセルロースナノファイバーの細胞影響評価. 第 73 回日本木材学会大会
- 大和 浩 1994. 繊維状粒子曝露による生体影響. *エアロゾル研究*, 9(3):215–220.

執筆担当者

藤田 克英、森山 章弘

第5章 皮膚影響の評価

5.1 はじめに

CNF は、その軽量性・高強度・生分解性といった特性から、従来の紙製品や樹脂補強材にとどまらず、住宅建材、農業資材、さらには医療・化粧品分野など多岐にわたる応用が進んでいる。このような利用の広がりに伴い、CNF への暴露機会も増加すると考えられ、特に製造・加工現場における作業者の安全確保や、日常生活での皮膚接触によるリスクに対する懸念が高まりつつある。

とりわけ、皮膚は外界と接する第一のバリアであり、CNF のような微細構造を持つ材料が皮膚を通過して体内に取り込まれる可能性があるか、あるいは炎症や刺激を引き起こすかどうかは、安全性評価において重要な論点である。

本章では、CNF の皮膚に対する影響について、既存文献に基づく知見を概観するとともに、NEDO 委託事業（2017～2019 年度）で実施された皮膚透過性および皮膚刺激性の試験結果をもとに、安全性に関する評価と今後の課題を考察する。

5.2 既存文献の情報

CNF およびセルロースナノクリスタル (CNC) の皮膚影響に関する既存の評価は、主に培養細胞を用いた *in vitro* 試験によって行われている。以下に、代表的な報告を表 5.1 にまとめるとともに、各研究の要点を示す。

Kim et al. (2019) は、CNF（種類不明）の化粧品応用を念頭に、HaCaT 細胞および HDF- α 細胞を用いた細胞毒性試験ならびに三次元培養モデルによる皮膚刺激性および眼刺激性試験を実施した。細胞毒性は濃度依存的に観察された（HaCaT 細胞で $\geq 156 \mu\text{g/mL}$ 、HDF- α 細胞で $\geq 313 \mu\text{g/mL}$ ）が、三次元培養モデルにおいては、皮膚および眼に対する明確な刺激性は認められなかった。このことから、使用濃度の適正な設定が重要であることが示唆された。

Lopes et al. (2017) は、ヒト皮膚線維芽細胞 (HDF) を用いて、未修飾および化学修飾（カルボキシメチル化や陽イオン性官能基付与）されたナノフィブリル化セルロース (NFC) ゲルの生物学的応答を比較した。その結果、いずれの NFC ゲルも細胞毒性を示さず、表面修飾が生体応答に影響を与える可能性があるものの、細胞の生存率や形態に大きな悪影響は見られなかった。

Nordli et al. (2016) は、エンドトキシンレベル 45 EU/g の高純度 TEMPO 酸化 CNF を用い、ヒト皮膚線維芽細胞およびヒト表皮ケラチノサイトに対する細胞毒性および代謝活性への影響を評価した。分散液 (50 $\mu\text{g/mL}$) は細胞毒性を示さず、また、27 種類のサイトカインについても誘導は確認されなかった。一方、CNF エアロゲルは代謝活性をわずかに低下させたが、細胞死を引き起こすレベルではなかった。加えて、エアロゲルの高い保湿性から、創傷被覆材としての応用可能性も示された。

Hua et al. (2014) は、セルロースフィルムのナノ構造および表面修飾が細胞適合性に与える影響を検討した。修飾されたマイクロフィブリル化セルロース (MFC) および *Cladophora* 由来ナノセルロース (CC) のフィルムを用い、間接および直接接触試験を実施した。すべてのサンプルにおいて有毒な浸出物は検出されず、非細胞毒性であることが確認された。中でもカルボキシメチ

ル化 MFC や TEMPO 処理 CC は高い細胞適合性を示し、細胞接着や生存率において良好な結果を示した。

Ong et al. (2017) は、OECD 試験ガイドライン (Test Guidelines: TG) の TG439 に準拠して、BioPlus®リグニン被覆 CNF (L-CNF) および CNC (L-CNC) の皮膚刺激性を評価した。EpiDerm モデルを用いた 24 時間暴露試験の結果、いずれの材料も GHS (化学品の分類および表示に関する世界調和システム) において非刺激性に分類され、安全性の高さが示唆された。

表 5.1 細胞試験による CNF の皮膚影響評価

#	被験材料	細胞	暴露期間	暴露濃度	エンドポイント	出典
1	CNF	HaCaT, HDF- α , LabCyte EPI-MODEL24	24 時間 (HaCaT, HDF- α), 15 分 (EPI-MODEL24)	$\geq 156 \mu\text{g/mL}$, $\geq 313 \mu\text{g/mL}$, 1 wt%	細胞生存、皮膚刺激性	Kim et al. (2019)
2	未修飾/修飾 NFC	HDF, MRC-5, THP-1	24 時間	50–500 $\mu\text{g/mL}$	細胞毒性、ROS、サイトカイン、細胞形態観察	Lopes et al. (2017)
3	TEMPO 酸化 CNF	皮膚線維芽細胞、ケラチノサイト	24 時間	50 $\mu\text{g/mL}$	細胞毒性、サイトカイン、細胞形態観察	Nordli et al. (2016)
4	表面修飾 CNF、シオグサ CNF	HDF	24、48 時間	不明	細胞毒性、細胞形態観察	Hua et al. (2014)
5	リグニン被覆 CNF (L-CNF)、リグニン被覆 CNC (L-CNC)	MatTek EpiDerm	24 時間	30,000–70,000 mg/L	OECD TG439 準拠皮膚刺激性	Ong et al. (2017)

5.3 NEDO 委託事業の成果

CNF は新規機能性材料として多様な製品への応用が期待されており、その利用拡大に伴いヒトの皮膚への直接接触の機会も増加することが予想される。これを踏まえ、NEDO 委託事業 (2017～2019 年度) では、CNF の経皮暴露に関する安全性評価を目的として、皮膚透過性試験および皮膚刺激性試験を実施した。本節では、その成果について概説する。

5.3.1 皮膚透過性試験

経皮暴露のリスク評価において、皮膚透過性の評価は重要なステップの一つである。従来、ラットやブタなどの摘出皮膚を用いた透過試験が一般的に実施されてきたが、動物福祉への配慮や EU における動物試験の規制強化を背景に、動物実験に代わる新たな試験法として、三次元培養ヒト皮膚モデルの活用が注目されている。この方法は、ヒト由来細胞を用いることから種差の影響を受けず、ロット間のばらつきが少ないという利点があり、再現性の高いデータが得られる。

NEDO 委託事業においては、この三次元培養皮膚モデルを利用し、CNF の皮膚透過性評価手

法の開発を行った（図 5.1）。

本試験では、微量の CNF を皮膚モデル内または受容液中から正確に検出する必要があるため、高感度な評価を可能とする試料調製および分析技術の開発に取り組んだ。具体的には、被験材料として TEMPO 酸化 CNF を選定し、次の 2 つのアプローチにより可視化および検出を試みた：

- ・ 化学染料による CNF の染色
- ・ 異なる官能基導入条件による蛍光ラベル化

これらの手法の詳細は、「セルロースナノファイバーの有害性評価手順書（藤田ら, 2020）」に記載されている。

その後、三次元培養皮膚モデルを装着した静置型フランツ拡散セルを用いて透過性試験を実施した。その結果、以下のような知見が得られた：

- ・ 染色 CNF は、皮膚モデルの三次元構造内部には検出されなかった。
- ・ 蛍光ラベル化 CNF も、レセプター液中では検出されなかった。
- ・ いずれの CNF も、皮膚モデルの上層部にとどまっていたことが観察された。

これらの結果は、TEMPO 酸化 CNF が三次元培養皮膚モデルを透過しない可能性が高いことを示唆しており、CNF の経皮吸収性は極めて低いことが示された。

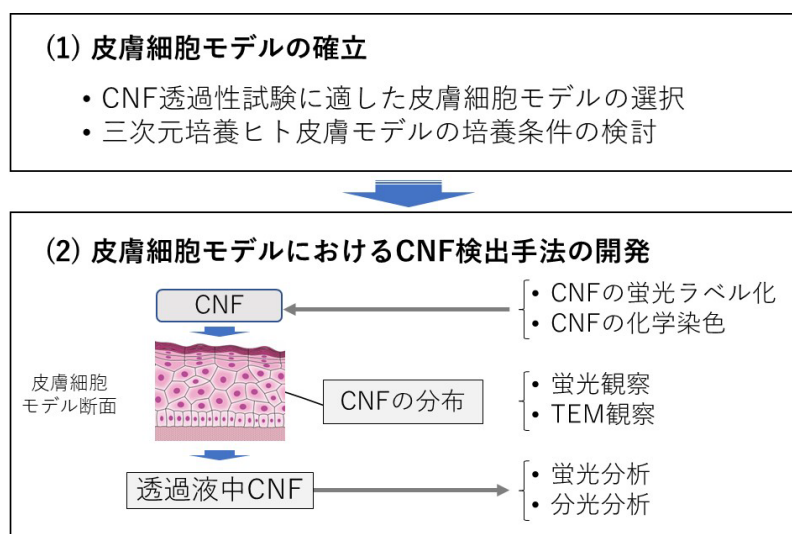


図 5.1 皮膚細胞モデルを使った CNF の透過性試験

5.3.2 皮膚刺激性試験

CNF の皮膚刺激性を評価するため、OECD TG 439（2021）に準拠し、CNF 分散液を被験材料として皮膚刺激性試験を実施した。本試験では、市販の三次元培養ヒト皮膚モデルである EpiDerm™ EPI-200-SIT および SkinEthic™ RHE の 2 種を用いた。

その結果、TEMPO 酸化 CNF はいずれのモデルにおいても細胞生存率が規定値（50%）を上回り、GHS 分類において「非刺激性」に該当することが確認された（Fujita et al., 2019）。この結果は、CNF が健常な皮膚に対して皮膚刺激性を示さない可能性が高いことを支持している。

5.4 まとめ

NEDO 委託事業（2017～2019 年度）において実施された皮膚透過性および皮膚刺激性に関する評価から、TEMPO 酸化 CNF は皮膚を透過せず、非刺激性である可能性が高いことが示唆された。

皮膚透過性試験では、染色および蛍光ラベル化した CNF を用いて三次元培養皮膚モデルによる評価を実施した結果、CNF はモデルの三次元構造内や受容液中で検出されず、表層にとどまっていたことが確認された。これは、CNF が皮膚を通過しないという従来の見解と一致する。一般に、分子量 500 以上の物質は角質層を透過しにくいとされており（Potts and Guy, 1992; 杉林, 2007）、多数のグルコースユニットから構成される CNF（多糖）もその例外ではないと考えられる。これらの知見は、既存文献の見解を支持するものであり、あわせて本研究で開発した CNF の可視化技術は、今後の皮膚バリア研究やナノ材料の安全性評価に応用可能な新たな手法として意義がある。

ただし、皮膚のバリア機能が損なわれた状態（傷やひび割れ）や、毛包・汗腺・脂腺などの付属器官を経由した浸透については、今後の検討が必要である。

皮膚刺激性試験では、OECD TG 439 に基づき CNF 分散液の影響を評価した結果、TEMPO 酸化 CNF は非刺激性と判定された。さらに、Kim et al. (2019) による三次元皮膚モデルを用いた試験においても、CNNT 社製 CNF が非刺激性であると報告されており、これまでの研究において CNF が皮膚刺激性を示した例は確認されていない。

しかしながら、CNF は原料の供給源、製造プロセス、表面官能基の違いにより、物理化学的特性が大きく異なる可能性がある。したがって、各種 CNF ごとに個別の評価を実施し、安全性を確認することが重要である。

さらに、CNF は再生医療や組織工学など、生体内への応用が進められており、特に創傷被覆材としての利用が期待されている。一方で、その長期的な生体影響については依然として不明な点が多く、詳細な研究が必要である（Stoudmann, 2020）。

我々の研究では、CNF 懸濁液中に一般細菌、カビ、エンドトキシン、 β -グルカンなどが含まれることを確認しており（Horie, 2023; Fujita et al., 2023, 2025a, 2025b, 2025c）、特にエンドトキシンは微量でも強い生理活性を引き起こすことが知られている。これは、再生医療や医療機器など、体内に導入される製品においては極めて重要なリスク管理項目である（棚元, 2008）。

今後、CNF の生体応用においては、物理化学的性状に加え、生物学的特性の評価と品質管理を十分に行うとともに、長期影響を含めた包括的な安全性評価が求められる。

参考文献

- Fujita K, Obara S, Maru J, Endoh S, Kitano Y, 2019. Evaluation of the effect of cellulose nanofibers on skin irritation using a 3D *in vitro* reconstructed human epidermis model. *Toxicol. Lett.* 314:S196–197.
- Fujita K, Obara S, Maru J, Endoh S, Kawai Y, Moriyama A, Horie M. 2025b. Assessing cytotoxicity and biocompatibility of cellulose nanofibrils on alveolar macrophages. *Cellulose.* 32:241–260.
- Fujita, K, Obara S, Maru J, Kawai Y, Endoh S, Moriyama A. 2025c. Pulmonary inflammation and immune responses induced by nanocellulose: Insights from *in vivo* and *in vitro* models. *Curr Res*

- Toxicol. 9:100259.
- Fujita K, Obara S, Maru J, Endoh S. 2023. Effects of advanced nanomaterials on the respiratory system of a murine COPD model. *Toxicol Rep.* 11:481-492.
- Fujita, K, Obara S, Maru J, Kawai Y, Endoh S. 2025a. Pulmonary inflammatory responses and retention dynamics of cellulose nanofibrils. *Toxicology* 511:154038.
- Horie M, Fujita K, Endoh S, Sugino S, Maru J, Moriyama A, Ogura I. 2023. Contaminant microorganisms in the *in vitro* evaluation of cellular responses of cellulose nanofibers and their microbial inactivation using gamma irradiation. *Toxicol Mech Methods.* 33(9):741-754.
- Hua K, Carlsson DO, Ålander E, Lindström T, Strømme M, Mihranyan A, Ferraz N, 2014. Translational study between structure and biological response of nanocellulose from wood and green algae. *RSC Advances* 4(6):2892–2903.
- Kim SM, Ji Gwak E, Jeong SH, Lee SM, Sim WJ, Kim JS, 2019. Toxicity evaluation of cellulose nanofibers (Cnfs) for cosmetic industry application. *J Toxicol Risk Assess* 5:029.
- Lopes VR, Sanchez-Martinez C, Strømme M, Ferraz N, 2017. *In vitro* biological responses to nanofibrillated cellulose by human dermal, lung and immune cells: surface chemistry aspect. *Part Fibre Toxicol.* 14:1
- Nordli HR, Chinga-Carrasco G, Rokstad AM, Pukstad B, 2016. Producing ultrapure wood cellulose nanofibrils and evaluating the cytotoxicity using human skin cells. *Carbohydr Polym.* 5;150:65–73.
- OECD Test No. 439: *In vitro* Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method. OECD Publishing 2021. <https://doi.org/10.1787/9789264242845-en>
- Ong KJ, Shatkin JA, Nelson K, Ede JD, Retsina T, 2017. Establishing the safety of novel bio-based cellulose nanomaterials for commercialization. *NanoImpact* 6:19–29.
- Potts RO and Guy RH, 1992. Predicting skin permeability. *Pharm Res.* 9(5):663–639.
- Stoudmann N, Schmutz M, Hirsch C, Nowack B, Som C, 2020. Human hazard potential of nanocellulose: quantitative insights from the literature. *Nanotoxicology* 14(9):1241–1257.
- 杉林 堅次, 2007. ナノ材料の経皮吸収性から皮膚の安全性を考える. *FRAGRANCE JOURNAL* 11:25–28.
- 棚元 憲一, 2008. エンドトキシンと医薬品の品質管理. *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, 126, 19–33.
- 藤田 克英, 遠藤 茂寿, 丸 順子, 才 貴史, 小栗 朋子, 後居 洋介, 小原 佐和枝, 谷 史人, 山本 彩葉, 小川 剛伸, 2020. セルロースナノファイバーの有害性試験手順書. https://riss.aist.go.jp/wp-content/uploads/2021/08/CNF_Hazard_Assessment_Procedure_20200409.pdf

執筆担当者

藤田 克英

第6章 経口毒性の評価

6.1 はじめに

一般的な微結晶セルロースについては、アメリカ食品医薬品局（FDA: Food and Drug Administration）より食品添加物として GRAS（Generally Recognized As Safe、訳：一般に安全と認められる）に指定されている。しかし、ナノスケールである CNF は GRAS に指定されておらず、CNF の経口毒性試験の報告はまだ少ないのが現状である。

現在、経済協力開発機構（OECD: Organization for Economic Co-operation and Development）のテストガイドライン（TG）では、化学物質の経口毒性試験について、急性毒性では TG420（固定用量法）、TG423（毒性等級法）、TG425（up-and-down 法）、亜急性毒性では TG407（げっ歯類における 28 日間反復経口投与毒性試験）、TG408（げっ歯類における 90 日間反復経口投与毒性試験）などが定められている。

本章では、国内外で実施されている CNF およびセルロースナノクリスタル（CNC）の経口影響の評価について、既存文献の情報および NEDO 委託事業の成果を紹介する。

6.2 既存文献の情報

表 6.1 に、CNF および CNC の経口毒性に関する既存の報告をまとめる。これらの報告では CNF および CNC の経口毒性は軽度であることが示唆されている。以下、個別の論文について紹介する。なお、NEDO 委託事業における成果（Yamashita et al., 2024a; 2024b）については、6.3 節『NEDO 委託事業の成果』で詳述する。

下川ら（2020）は食素材への適用を目指し、タケパルプを酵素前処理とビーズミルでの解繊を行うことでタケ由来 CNF を調製した。得られたタケ CNF を用いて OECD TG420 に準拠したマウス急性経口毒性試験を実施した。50～2000 mg/kg の投与用量となるように調製した各 CNF 検体を、雌雄 5 匹ずつの ICR 系マウスに胃ゾンデを用いて強制経口投与し、14 日間の観察期間のちに剖検をおこなった。その結果、いずれの CNF 投与群においても観察期間中に死亡例は認められず、マウスの一般状態、体重に差はみられなかった。剖検においても異常は認められず、試験条件において、LD50（50% lethal dose; 半数致死量）が 2000 mg/kg よりも高いことが確認された。

さらに下川ら（2021）はタケ CNF について、長期的な安全性を確認するため、90 日間のラットに対する反復投与毒性試験を実施した。1 wt% のタケ CNF を Crl:CD(SD)系ラットに対して、胃ゾンデを用いて毎日 1 回強制経口投与した。投与量は 200 mg/kg/日を最大とし、以下、100 および 50 mg/kg/日を中および低用量として、いずれも 20 mL/kg とした。結果として、投与期間を通じ、いずれの投与群においても死亡例は認められず、一般状態、尿検査および眼科学的検査においても投与による毒性学的影響は確認されなかった。また投与期間終了後の血液学的、血液生化学的検査および病理学的検査においてもタケ CNF による影響は認められなかった。これらの結果より、試験条件下における無毒性量（NOAEL: no observable adverse effect level）は 200 mg/kg/日以上と判断された。

表 6.1 CNF および CNC の経口毒性試験

被験材料	動物	投与期間 (OECD TG)	投与量 (mg/kg/日)	毒性値	出典
タケパルプ CNF	ICR 系マウス	単回 (TG420 準拠)	50~2000	LD50>2000 mg/kg/日	下川ら (2020)
タケパルプ CNF	CrI: CD(SD) 系ラット	90 日	50, 100, 200	NOAEL $\geq$ 200 mg/kg/日	下川ら (2021)
リグニン被 覆 CNF およ び CNC	SD ラット	単回	5000	LD50 $\geq$ 5000 mg/kg/日	Ong et al. (2017)
木材パルプ 由来フィブ リル化セル ローズ	SD ラット	90 日 (TG408 準拠)	雄: 1044, 1550, 2194, 雌: 1302, 1886, 2667	NOAEL $\geq$ 雄: 2194.2 mg/kg/日, 雌: 2666.6 mg/kg/日	Ong et al. (2020)
針葉樹由来 CNF	Wistar Han ラット	5 週間、 週 2 回投与	100	明確な毒性はなし	DeLoid et al. (2019)
針葉樹由来 CNF	Wistar Han ラット	5 週間、 週 2 回投与	100	明確な毒性はなし	Khare et al. (2020)
針葉樹由来 CNF	C57BL/6 マウス	4~6 週間	30	明確な毒性はなし ただし、栄養の腸管吸収低 下のリスクの可能性あり	Chen et al. (2020)
カルボキシ メチル化 CNF	KM マウス	8 週間	1 または 3.5 w/w% (投与量は 10 mL/kg)	明確な毒性はなし	Zhang et al. (2021)
パルプセル ローズ由来 CNF	CrI:CD(SD)系 ラット	28 日 (TG407 準拠)	50, 150, 500, 1000	1000mg/kg/日の CNF を投 与した雌ラットのみが、投 与後の 14 日間の回復期間 中、一貫して体重増加が緩 やかであった	Yamashita et al. (2024a)
パルプセル ローズ由来 CNF	C57BL/6Jms Slc マウス	28 日	400	明確な毒性はなし	Yamashita et al. (2024b)
NCC TM	ラット	単回 (TG425 準拠)	2000	LD50>2000 mg/kg	O'Connor et al. (2014)
NCC TM	ラット	28 日 (TG407 準拠)	500, 1000, 2000	NOEL> 2000 mg/kg/日	O'Connor et al. (2014)
木材パルプ 由来 CNC	SD CD [®] IGS ラット	90 日 (TG408 準拠)	雄: 1056, 1584,2085, 雌: 1278, 1930, 2683	NOAEL $\geq$ 雄: 2085.3 mg/kg/日, 雌: 2682.8 mg/kg/日	Ede et al. (2020)

Ong et al. (2017) は、リグニン被覆 CNF およびリグニン被覆 CNC の評価のために急性経口毒性試験を実施した。雌の SD ラットに対して、初期限界量の 5000 mg/kg を経口投与し (0.91 から 0.98 mL の間)、死亡率、肉眼的毒性の兆候 (皮膚・被毛、眼・粘膜、呼吸・循環器系、自律・中枢神経系、体性運動の評価)、行動の変化について、投与後 30 分、投与後数時間、その後は 14 日間 1 日 1 回観察した。体重は 7 日目と 14 日目に測定した。観察期間終了後に肉眼的剖検を行い、胸腔および腹腔の組織および器官を検査した。結果として、どのラットも体重増加と生存が確認され、肉眼的毒性、臨床的悪影響、異常行動の兆候は認められなかった。このことから、これらリグニン被覆 CNF および CNC の急性経口の LD50 は 5000 mg/kg 以上であると判断された。

また、Ong et al. (2020) は、木材パルプ由来のフィブリル化セルロースの 90 日間の食餌毒性を、従来のセルロースである食品グレードのソルカフロックと比較し、OECD TG408 に準拠し評価した。SD ラットに 2%、3%、4% のフィブリル化セルロース (それぞれ雄で 1044、1550、2194 mg/kg/日、雌で 1302、1886、2667 mg/kg/日に相当する量) を 90 日間連続摂取させ、対照群にはソルカフロックを摂取させた。生存率、臨床観察、体重、摂餌量、眼科的評価、血液学、血清化学、尿検査、死後解剖病理学および病理組織学的項目のモニタリングを実施した。結果として、すべての試験用量において、フィブリル化セルロースおよび従来のセルロース暴露による測定エンドポイントのいずれにも悪影響は観察されなかった。これに基づき、雄および雌の SD ラットの試験最高用量 (4%) に相当する 2194.2 mg/kg/日 (雄) および 2666.6 mg/kg/日 (雌) がフィブリル化セルロースの無毒性量 (NOAEL) と判断された。これらの結果は、フィブリル化セルロースが従来のセルロースと同様の挙動を示し、この濃度で食品原料として使用した場合、安全性の懸念がないことを示している。

DeLoid et al. (2019) は高脂肪食摂取と関連した針葉樹由来 CNF の経口投与後の影響を調べるために、水またはクリーム (20%脂肪分) に 1 w/w% で平均繊維径約 50 nm の CNF を懸濁した調製液を週 2 回、5 週間にわたって Wistar Han 雄ラットに 10 mL/kg (CNF 約 100 mg/kg) 経口投与した。血液、血清、肺、肝臓、腎臓、小腸を採取し、分析を行った。結果として、1 w/w% の CNF 水懸濁液を投与したラットは、統計的に有意ではなかったが、他の投与群より平均して 30~40% 体重が減少した。しかし、その他の総白血球、好中球、リンパ球、単球、好酸球、好塩基球および赤血球を含む血球数に関して、各群で有意な差は観察されなかった。同様に、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値などの血液学的測定値や総コレステロール、高密度リポタンパク質などの脂質プロファイル、総タンパク、アルブミンなどの肝機能マーカー、総ビリルビン、クレアチニンの腎機能マーカーまたは電解質 (ナトリウム、カリウム、塩素) を含む血清マーカーにも CNF 投与群と非投与群との間に有意差は見られなかった。これらの知見は、摂取された CNF には急性毒性がほとんどなく、少量の摂取であれば無害である可能性が高いことを示唆している。

Khare et al. (2020) は、DeLoid et al. (2019) の関連研究として同様の投与条件で、CNF が糞便の微生物叢および代謝物、腸上皮の細胞結合遺伝子の発現、回腸のサイトカイン産生に及ぼす影響を評価した。CNF は微生物多様性を変化させ、特定の短鎖脂肪酸産生種を減少させつつ、インスリンや IgA 産生を増加させた。さらに、上皮細胞接合遺伝子や CD8T 細胞に関連する免疫応答が変化した。病理学的な影響は確認されなかった。

Chen et al. (2020) は C57BL/6 マウスに 30 mg/kg/日の投与量で針葉樹由来 CNF (3 mg/mL

CNF、0.01 mL/g) または従来のセルロースを、脂肪と糖分が多い高脂肪飼料 (Western diets) と組み合わせて 4~6 週間投与した。対照として、同様に水+高脂肪飼料、水+通常飼料を投与した。この時、通常飼料と高脂肪飼料はともに、セルロースを主成分とする繊維を 5% 程度含んでいた。分析では体重、食事量に加え、中性脂肪値、グルコースホメオスタシス (血糖値の恒常性維持機構)、腸管での栄養素の吸収を調べ、肝臓と消化管は顕微鏡で検査した。高脂肪飼料対照群と比較して、CNF は空腸での脂肪吸収を減少させ、高脂肪飼料が誘発する脂肪肝を減弱させたが、除脂肪体重をわずかに減少させ、グルコースホメオスタシスに影響を与えることが示された。また CNF 投与群では、従来のセルロースに比べ脂肪肝の程度が低く、脂肪球もほとんど認められなかった。この研究から、この量の CNF はマウスに対して明確な毒性を引き起こさないことが明らかになったが、CNF は非特異的に腸管吸収を低下させ、長期暴露後の栄養学的リスクをもたらす可能性があることが分かった。

Zhang et al. (2021) は、カルボキシ基含有量の異なる (0, 0.36, 0.72, 1.24 mmol/g) カルボキシメチル化セルロースナノフィブリル (CNF) を調製し、形態、直径分布、ゼータ電位、構造特性、レオロジー特性、懸濁液の安定性および熱特性を通して特性評価を行った。1 w/w% または 3.5 w/w% の CNF の水中懸濁液を 1 日 1 回、8 週間、10 mL/kg (CNF 約 100 または 350 mg/kg)、雌の KM マウスに経口投与し評価した。体重、食物摂取量、糞を記録し、CNF の機能的特性を調査するために糞中の栄養保持量を測定し、さらに分析のため血液および血清を採取した。その結果、CNF 懸濁液を投与したマウスは、対照群と比較して、糞便の脂肪が有意に増加したが、摂餌量と体重は 10~15% 有意に減少した。また対照群と CNF 懸濁液を投与したマウスの間で、血液学、血清マーカーに有意差は認められなかった。これらの結果から、CNF は経口摂取しても無毒であり、カルボキシメチル化 CNF は消化管内での脂質の消化および吸着を良好に調節することから、摂取カロリーを減らすための有用な補助食品またはサプリメントの開発につながる可能性があることが示唆された。

O'Connor et al. (2014) は、CNC の NCC™ について TG425 に準拠した単回投与試験と TG407 に準拠した 28 日間反復経口投与毒性試験をラットを用いて実施した。一般状態や病理学的検査の結果、両試験とも有害性は確認されず、それぞれ LD50 > 2000 mg/kg、NOEL > 2000 mg/kg/日と判断された。

Ede et al. (2020) は OECD TG408 に準拠し、0、2、3 または 4% の木材パルプ由来の硫酸化 CNC を 90 日間、SD CD® IGS ラットに対して、食餌を介して投与した。この時の CNC の暴露量は雄で 1056、1584 および 2085 mg/kg/日、雌で 1278、1930 および 2683 mg/kg/日であった。また従来のセルロース (食品用ソルカフロック) を同じ割合で配合した対照群も追加した。既定のパラメータとして、臨床病理学、血液学、血清化学、尿検査、解剖病理学、病理組織学項目が調査された。結果として、硫酸化 CNC 群、従来型セルロース群ともに食餌に起因する毒性は認められなかったが、4% 投与群の両方で肝門部周囲細胞の空胞化 (細胞質空洞を伴う) が認められた。ただ、空胞化の発生率および程度は硫酸化 CNC 群および従来型セルロース群でほぼ同じであり、肝機能の変化、肝臓の変性や病理学的所見は認められなかった。これらの結果から、CNC は、従来のセルロースと同様に経口摂取しても安全であり、NOAEL は 2085.3 mg/kg/日 (雄) および 2682.8 mg/kg/日 (雌) であると結論付けられた。

その他、従来のセルロース (微結晶セルロース) に関する経口毒性試験結果については、食糧

農業機関（FAO）および世界保健機関（WHO）合同食品添加物専門家会議（JECFA: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives）による報告書にまとめられている（JECFA, 1998）。3つの単回投与試験において、影響は認められておらず、LD50は3160または5000 mg/kgよりも高いことが報告されている。反復投与試験のほとんどの研究において、病理組織学的な異常は認められていない。JECFAは総評として、ヒトおよび動物からの毒性学的データは、適正な製造基準に従って食品に使用された場合、微結晶セルロースの摂取がヒトに毒性影響を引き起こす可能性があるという証拠を提供していないと結論付けている。

以下に、総説論文における各著者の見解をまとめる。

CNCについて、食品業界における最近の動向と応用を主題にまとめられた Mu et al. (2019)によるレビュー論文では、安全性に関する情報が限られていることやナノセルロースに対する共通の規制はまだ存在しないことが挙げられている。

Stoudmann et al. (2020)による総説論文では、CNCおよびCNFの経口毒性について、研究数が少ないため、確固たる結論を出すことは難しいとしながらも毒性の兆候が見られないとしている。

ナノセルロースの経口暴露による潜在的健康リスクに関して評価した Brand et al. (2022)による文献レビューでは、特に動物試験によるデータは限られており、結果も明確ではないとし、その複雑性の理由として、形態の多様性や表面修飾、標準参照材料の不足、腸管内での挙動や吸収に関する知見の限界、生体試料における分析の難しさ、分散の問題、生体アッセイにおける不純物や干渉の存在の可能性などを挙げている。

Vital et al. (2022)は、食品および生物医学分野におけるセルロースナノ材料の潜在的な用途について、既存の毒性学的な *in vitro* および *in vivo* 研究と併せて検討したレビュー論文を報告している。そこでは、ここ数年で発表された研究は増加しているが、全体的には、摂取されたセルロースナノ材料は胃腸管に対して毒性を持たないことが示されており、試験されたセルロースナノ材料の大半が生物適合性を有していることを示唆しているとしている。しかし、*in vitro* および *in vivo* での遺伝毒性試験、また長期にわたる発がん性または生殖毒性試験はまだ実施されていないことを課題としている。

Cañas-Gutiérrez et al. (2024)は、ナノセルロースの食品応用と安全性評価に関するレビューを報告している。そこでは、現行の毒性学的研究では、ナノセルロースが細胞毒性やマクロファージの炎症システムに影響を与えないとしつつも、摂取量の上限や規制の確立が必要であると指摘しており、さらに、安全性評価に必要なプロトコルや標準試験方法の合意形成が重要であると結論づけている。

6.3 NEDO 委託事業の成果

NEDO 委託事業において、福井大学は、OECD TG407 に準拠して、機械的に解繊されたバルプセルロース由来の CNF を、雄雌の Crl:CD(SD)ラットに 50、150、500、1000 mg/kg/日の用量で 28 日間強制経口投与した（Yamashita et al., 2024a）。この試験では反復投与毒性について評価し、28 日間の投与後さらに 14 日間ラットを観察して、毒性影響の回復を評価した。その結果、投与期間中、いずれの性においても死亡例は認められず、一般状態および行動機能観察、尿検査、血液学的検査、血液生化学的検査、剖検所見、臓器重量測定、病理組織学的検査など、各種の評

価において、試験物質に関連する毒性学的影響は観察されなかった。注目すべきは、1000 mg/kg/日の用量で CNF を投与した雌ラットの体重は、投与終了後の 14 日間の回復期間中、一貫して対照群に対し有意な低値を示したことである。また、脳下垂体および肝臓の重量も対照群より有意に低かった。しかし、血液学的検査および血液生化学検査では有意な差異は認められず、CNF 摂取による体重抑制効果の可能性が示唆された。

また、マウスを用いた 28 日間の経口毒性試験も実施した (Yamashita et al., 2024b)。反復投与の影響を評価するため、機械的に解繊されたパルプセルロース由来の CNF を雄 C57BL/6JmsSlc マウス(1 群 10 匹)に 0(溶媒:注射用水)および 400 mg/kg/日の用量で 28 日間強制経口投与した。結果として、体重、剖検、および消化管の病理組織学的検査では、試験物質投与の影響を示す変化は認められなかった。

6.4 まとめ

CNF および CNC の経口影響の評価について、既存文献の情報および NEDO 委託事業の成果をまとめた。国内外で実施されている CNF および CNC の経口毒性試験において、低い毒性が一貫して報告されている。例えば、下川ら (2020, 2021) は、タケパルプ由来の CNF について、マウスを用いた 14 日間の経口毒性試験とラットを用いた 90 日間の経口毒性試験を実施し、いずれも最高用量で異常が認められなかったことから、それぞれ LD50 は 2000 mg/kg 以上、NOAEL は 200 mg/kg/日以上と推定している。Ong et al. (2020) も木材パルプ由来のフィブリル化セルロースを用いた 90 日間のラットの経口毒性試験で、NOAEL が最高用量である約 2000 mg/kg/日以上と報告している。さらに、DeLoid et al. (2019)、Khare et al. (2020)、Chen et al. (2020)、Zhang et al. (2021) による研究でも、針葉樹由来の CNF やカルボキシメチル化 CNF において顕著な毒性は認められていない。

NEDO 委託事業で実施した、機械的に解繊された CNF を用いた 28 日間のラット経口毒性試験では、1000 mg/kg/日の用量で CNF を投与した雌ラットに有意な低体重が認められたが、一般的な毒性影響は認められなかった (Yamashita et al., 2024a)。また、マウスを用いた 28 日間の経口毒性試験でも、400 mg/kg/day の投与において体重や消化管の病理組織に異常は認められなかった (Yamashita et al., 2024b)。

このように、CNF の経口毒性に関する報告例はまだ限られているものの、既存文献情報および NEDO 委託事業の成果では、いずれも顕著な毒性は認められていない。また、CNC や従来のセルロースと比較しても、特に CNF の有害性が高いとする報告はなかった。ただし、Chen et al. (2020) が指摘しているように、グルコースホメオスタシス（血糖値の恒常性維持機構）や腸管吸収への影響といった栄養学的な側面についての知見を蓄積することが、今後の安全な食品応用に向けて重要と考えられる。また、CNF の多様性や不純物の考慮、長期にわたる発がん性や生殖毒性試験はまだ実施されていないことなどが課題として挙げられる。

参考文献

- Brand W, van Kesteren PC, Swart E, Oomen AG. 2022. Overview of potential adverse health effects of oral exposure to nanocellulose. *Nanotoxicology*, 16(2), 217-246.
- Cañas-Gutiérrez A, Hoyos CG, Velásquez-Cock J, Gañán P, Triana O, Cogollo-Flórez J, Romero-

- Sáez M, Correa-Hincapié N, Zuluaga R. 2024. Health and toxicological effects of nanocellulose when used as a food ingredient: A review. *Carbohydrate Polymers*, 323, 121382.
- Chen Y, Lin YJ, Nagy T, Kong F, Guo TL, 2020. Subchronic exposure to cellulose nanofibrils induces nutritional risk by non-specifically reducing the intestinal absorption. *Carbohydr Polym.* 229:115536.
- DeLoid GM, Cao X, Molina RM, Silva DI, Bhattacharya K, Ng KW, Loo SCJ, Brain JD, Demokritou P, 2019. Toxicological effects of ingested nanocellulose in *in vitro* intestinal epithelium and *in vivo* rat models. *Environ Sci Nano.* 6(7):2105–2115.
- Ede JD, Ong KJ, Mulenos MR, Pradhan S, Gibb M, Sayes CM, Shatkin JA, 2020. Physical, chemical, and toxicological characterization of sulfated cellulose nanocrystals for food-related applications using *in vivo* and *in vitro* strategies. *Toxicol Res (Camb).* 9(6):808–822.
- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), 1998. Safety evaluation of certain food additives and contaminants. WHO food additives series 40. Microcrystalline cellulose. <https://incchem.org/documents/jecfa/jecmono/v040je03.htm>
- Khare S, DeLoid GM, Molina RM, Gokulan K, Couvillion SP, Bloodsworth KJ, Eder EK, Wong AR, Hoyt DW, Bramer LM, Metz TO, Thrall BD, Brain JD, Demokritou P. 2020. Effects of ingested nanocellulose on intestinal microbiota and homeostasis in Wistar Han rats. *NanoImpact*, 18, 100216.
- Mu R, Hong X, Ni Y, Li Y, Pang J, Wang Q, Xiao J, Zheng Y. 2019. Recent trends and applications of cellulose nanocrystals in food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 93, 136-144.
- O'Connor B, Berry R, Goguen R, 2014. Chapter 10 - Commercialization of Cellulose Nanocrystal (NCC™) Production: A Business Case Focusing on the Importance of Proactive EHS Management. *Nanotechnology Environmental Health and Safety (Second Edition) Risks, Regulation, and Management Micro and Nano Technologies.* 225–246.
- Ong KL, Shatkin JA, Nelson K, Ede JD, Retsina T, 2017. Establishing the safety of novel bio-based cellulose nanomaterials for commercialization. *NanoImpact* 6:19–29.
- Ong KJ, Ede JD, Pomeroy-Carter CA, Sayes CM, Mulenos MR, Shatkin JA, 2020. A 90-day dietary study with fibrillated cellulose in Sprague-Dawley rats. *Toxicology reports* 7:174–182.
- Pallotta, AJ, 1959. Acute oral administration - Rats; and acute intraperitoneal administration - Rats, of microcrystalline cellulose. Unpublished report from Hazleton Labs, Inc. (Submitted to WHO by FMC Corporation).
- Stoudmann N, Schmutz M, Hirsch C, Nowack B, Som C, 2020. Human hazard potential of nanocellulose: quantitative insights from the literature. *Nanotoxicology* 14(9):1241–1257.
- Vital N, Ventura C, Kranendonk M, Silva MJ, Louro H, 2022. Toxicological Assessment of Cellulose Nanomaterials: Oral Exposure. *Nanomaterials.* 12(19):3375.
- Yamashita Y, Tokunaga A, Aoki K, Ishizuka T, Fujita S, Tanoue S, 2024a. A 28-Day Repeated Oral Administration Study of Mechanically Fibrillated Cellulose Nanofibers According to OECD TG407. *Nanomaterials.* 14(13):1082.
- Yamashita Y, Tokunaga A, Aoki K, Ishizuka T, Uematsu H, Sakamoto H, Fujita S, Tanoue S, 2024b.

- Assessing the Safety of Mechanically Fibrillated Cellulose Nanofibers (fib-CNF) via Toxicity Tests on Mice: Single Intratracheal Administration and 28 Days' Oral Intake. *Toxics*. 12(2):121
- Zhang K, Zhang H, Wang W, 2021. Toxicological studies and some functional properties of carboxymethylated cellulose nanofibrils as potential food ingredient. *International Journal of Biological Macromolecules* 190:887–893.
- 下川 知子, 池田 努, 眞柄 謙吾, 戸川 英二, 中村 雅哉, 大塚 祐一郎, 野尻 昌信, 高尾 哲也, 小川 睦美, 中山 榮子, 林 徳子, 2020. 酵素反応とビーズミルを用いた湿式粉碎による食素材への適用を目指したタケからのセルロースナノファイバー製造. *森林総合研究所研究報告* 456:341–348.
- 下川 知子, 眞柄 謙吾, 池田 努, 林 徳子, 小川 睦美, 高尾 哲也, 中山 榮子, 2021. タケパルプから得たセルロースナノファイバーの安全性評価: 微生物を用いる変異原性試験, マウスリンフォーマ TK 試験, 小核試験およびラットへの 90 日間摂取試験. *紙パルプ技術協会誌* 75(11):1018–1033.

執筆担当者
森山 章弘

第7章 排出・暴露の評価

7.1 はじめに

一般に化学物質の安全性に関しては、有害性と暴露の両方を考える必要がある。有害影響の発現や程度は、基本的に暴露量に依存するので、暴露を適切に管理すれば、化学物質を安全に取り扱うことができる。特に有害性に関する情報が限られている場合には、排出・暴露の評価や管理が重要である。

化学物質のヒトへの暴露経路は大きく分けて、経口暴露、経皮暴露、吸入暴露に分けられるが、ナノ材料においては、そのライフサイクルで想定される高暴露の状況の一つが作業者の吸入暴露であること、そして、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いることから、一般に吸入暴露に伴う影響への関心が高い。ナノセルロース（CNF およびセルロースナノクリスタル（CNC）など、繊維径がナノサイズ（1～100 nm）のセルロース）においても、その応用製品のライフサイクルにおける暴露シナリオの中で、乾燥粉体の吸入暴露が高リスクのシナリオとして挙げられている（Shatkin & Kim, 2015）。実際、ナノセルロースの排出・暴露の既存研究は、気中への排出と吸入暴露に焦点が当てられている。

そこで、本章でも、ナノセルロースの気中への排出と吸入暴露に焦点を当てる。ナノセルロースの排出・暴露評価の事例を見ていく前に、作業環境濃度の相場観を得るために、7.2 節でまず、各種粉塵の許容濃度についてまとめる。ナノセルロースを対象とした許容濃度の提案値はまだないが、その他のナノ材料や粉塵の許容濃度は、ナノセルロースの自主安全管理を進める上で参考になると考える。7.3 節では、ナノセルロースの排出・暴露の既存研究についてまとめる。そして、7.4 節では、NEDO 委託事業（2017～2019 年度および 2020～2024 年度）で実施した CNF の排出・暴露の事例を紹介する。7.5 節では、全体の知見を総括し、注意が必要なプロセス、対策と管理、計測法についてまとめる。

7.2 作業環境における吸入暴露の許容濃度

7.2.1 ナノ材料およびその他粉塵の作業環境における許容濃度

図 7.1 に日本産業衛生学会による二酸化チタンナノ粒子（ナノ TiO_2 ）、酸化亜鉛ナノ粒子（ナノ ZnO ）およびその他各種粉塵に対する許容濃度の勧告値と、各国機関・団体から提案されているナノ材料の許容濃度（用語や位置付けはそれぞれ異なるがここでは許容濃度と表す）をまとめる。労働衛生の分野では、吸入性粉塵（ISO 7708 の定義で $4\mu\text{m}$ 粒子 50%カット；図 7.2 参照）が対象とされることが多く、図 7.1 には主に吸入性粉塵としての勧告値を示した。同じ材料でも、各国機関・団体の許容濃度の勧告値に幅があるが、その主な理由は、動物からヒトへの外挿の方法や不確実性係数（安全率）の取り方が異なっているからである。

一般的な粉塵（第 1～3 種粉塵）に対し、ナノ材料の許容濃度は、相対的に低い値となっている。一般にナノ材料は、質量で比較すると、より少量で有害影響がみられ、表面積やかさ体積の大きさが有害性と関連しているとする説がある（Maynard & Kuempel, 2005; Pauluhn, 2011）。しかし、現状では、ナノ材料の有害性試験が重量濃度を基準に実施・評価されていることから、勧告されている許容濃度は重量濃度が用いられている。

日本産業衛生学会（2024）の許容濃度では、非ナノの二酸化チタンや酸化亜鉛は第二種粉塵に該

当し、その許容濃度は $1,000 \mu\text{g}/\text{m}^3$ であるのに対し、二酸化チタンナノ粒子（ナノ TiO_2 ）および酸化亜鉛ナノ粒子（ナノ ZnO ）の許容濃度はそれぞれ 300 および $500 \mu\text{g}/\text{m}^3$ であり、非ナノの $1/3 \sim 1/2$ の値に決められている。米国国立労働安全衛生研究所（NIOSH, 2011）は、非ナノサイズの二酸化チタンの許容濃度を $2,400 \mu\text{g}/\text{m}^3$ としているのに対し、ナノ TiO_2 の許容濃度はその約 $1/8$ の $300 \mu\text{g}/\text{m}^3$ としている。英国規格協会（BSI 2007）やドイツ法定災害保険研究・試験研究所（IFA, 2009）は、許容濃度が決められていないナノ材料について、ナノでない同じ物質の $\leq 1/10$ （低溶解性物質の場合） $\sim 1/5$ （溶解性物質の場合）の値をベンチマークとすることを提案している。

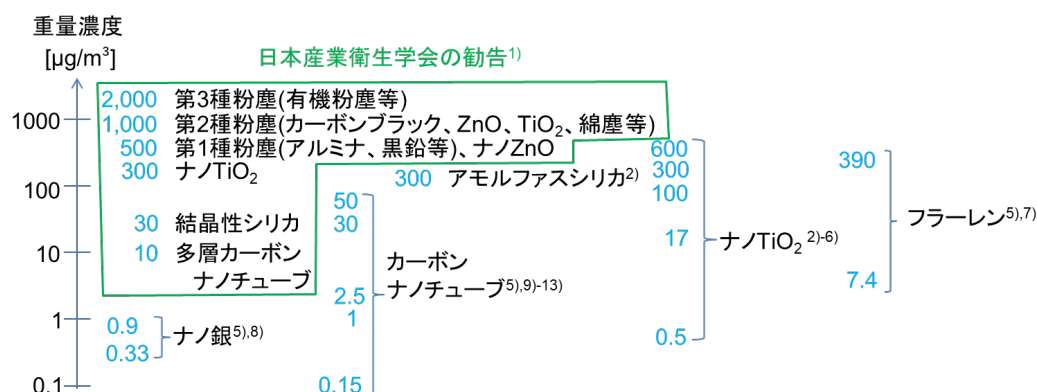


図 7.1 ナノ材料およびその他粉塵の作業環境における許容濃度

1) 日本産業衛生学会(2024); 2) Stockmann-Juvala et al. (2014); 3) NIOSH (2011); 4) 蒲生 昌志 編(2011); 5) Aschberger et al. (2011); 6) ANSES (2020); 7) 篠原 直秀 編 (2011); 8) NIOSH (2018); 9) Pauluhn (2010); 10) 中西 準子 編 (2011); 11) NIOSH (2013); 12) Nanocyl; 13) Fukushima et al. (2018)

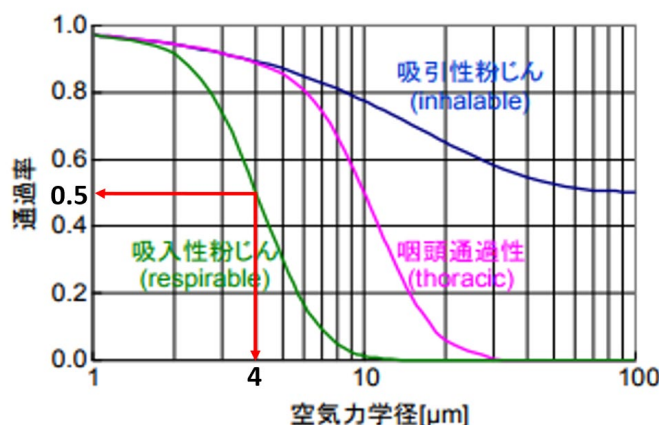


図 7.2 吸引性粉塵、咽頭通過性粉塵、吸入性粉塵の定義（ISO 7708）

吸引性粉塵(inhalable)：気中から鼻孔または口を通して吸入される粒子

咽頭通過性粉塵(thoracic)：気中から鼻孔または口を通り咽頭を越えて肺に向かう粒子($10 \mu\text{m}$ 粒子で 50%通過)

吸入性粉塵(respirable)：肺胞まで届く粒子($4 \mu\text{m}$ 粒子で 50%通過)

解説：吸引性粉塵濃度、咽頭通過性粉塵濃度、吸入性粉塵濃度とは、上図のような通過率(捕集効率)になるように設定されたサンプラーで粒子捕集した場合の重量濃度である。例えば、吸入性粉塵濃度はインパクターやサイクロンなどにより肺に入らないような粗大粒子を取り除いて、 $4 \mu\text{m}$ 粒子で 50%が捕集されるように設定されたサンプラーによる重量濃度である。

飛散時のナノ材料は、必ずしもナノサイズで分散しているわけではなく、多くの場合凝集しており、ナノ材料の許容濃度の導出に使われた動物試験の多くも肺に入る程度の凝集粒子で試験されている。よって、これらの許容濃度は、実質、凝集粒子を対象とした許容濃度であるといえる。

既存の粉塵の許容濃度の中で、重量濃度以外の尺度で決められているものとしては、アスベストの本数による許容濃度がある。英国規格協会 (BSI, 2007) やドイツ法定災害保険研究・試験研究所 (IFA 2009) は、許容濃度が決められていない繊維状のナノ材料について、アスベストの本数ベースの許容濃度 (0.01 fibers/cm^3) をとりあえずのベンチマークとすることを提案している。ただし、カーボンナノチューブや CNF 等の繊維状のナノ材料の多くは凝集状態で存在しており、必ずしもアスベストのように繊維の本数が数えられるような形態をしていない。アスベストの計数法では、凝集粒子は繊維数としてカウントせず、繊維状の粒子のみをカウントする。よって、ナノ材料では、本数による管理は現実的でない場合も多い。実際、カーボンナノチューブの許容濃度は、すべて重量濃度ベースで提案されている。

7.2.2 ナノセルロースの許容濃度

ナノセルロースの吸入影響データに基づく吸入暴露の許容濃度の提案値はまだない。フィンランド労働衛生研究所 (Finnish Institute of Occupational Health) は、建設業の労働衛生におけるナノセルロースおよびカーボンナノファイバーの許容濃度として、予防原則により、アスベストの本数ベースの許容濃度 (0.01 fibers/cm^3) と同じ値を提案している (Stockmann-Juvala et al., 2014)。ただし、CNF を本数で管理することは、多くの場合、現実的でないように思われる。

ナノセルロースの吸入暴露影響に関しては、慢性影響に関する十分なデータはまだないが、CNF および CNC の動物への短期の吸入試験において見られた炎症は、従来のセルロースや他の難溶性低毒性粉塵と同様に一過性であり、多層カーボンナノチューブ (MWCNT) やアスベストとは著しく異なることが報告されている (第4章参照)。また、NEDO 委託事業で実施した気管内投与試験においても、CNF の炎症反応は、90 日後には減衰し、MWCNT と比較して軽度であった (第4章参照)。さらに、マウスを用いた腹腔内投与試験において、中皮腫発生に至るキーイベントである炎症は認められず、中皮腫の発生も見られなかった (第3章参照)。これらの知見を踏まえ、従来のセルロースや他のナノ材料、粉塵の許容濃度を参考にして、当面の現場の管理の目安となる濃度を設定していくことが重要と考えられる。

ナノサイズではないセルロースの許容濃度については、日本産業衛生学会 (2024) による第2種粉塵 (綿塵など) の値は、吸入性粉塵が 1 mg/m^3 、総粉塵が 4 mg/m^3 、米国国立労働安全衛生研究所 (NIOSH) の値は、吸入性粉塵が 5 mg/m^3 、総粉塵が 10 mg/m^3 、米国労働安全衛生庁 (OSHA) の値は、吸入性粉塵が 5 mg/m^3 、総粉塵が 15 mg/m^3 である (<https://www.cdc.gov/niosh/npg/npgd0110.html>)。

前述の通り、ナノ材料の許容濃度は、一般にナノでない同じ物質の許容濃度よりも低い値で定められており、ナノセルロースにおいても、十分な情報がない中では、従来のセルロースより低い値で管理することが望ましいと考えられる。英国規格協会 (BSI 2007) やドイツ法定災害保険研究・試験研究所 (IFA, 2009) は、許容濃度が決められていないナノ材料について、ナノでない同じ物質の $\leq 1/10$ (低溶解性物質の場合) $\sim 1/5$ (溶解性物質の場合) の値をベンチマークとすることを提案しているが、この考えに沿うと、例えば綿塵の吸入性粉塵の許容濃度 1 mg/m^3 を $1/10$ にした $\leq$

100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ が一つのベンチマークとなる。これは、日本産業衛生学会（2024）によるナノ TiO_2 およびナノ ZnO の許容濃度（それぞれ 300 および 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ）より若干低い値である。

ベンチマークの設定は、その濃度が計測できるかどうかということも考慮して決定する必要がある。100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ の粉塵は、フィルターに捕集した粒子の重量分析や粉塵計により、一般に測定が可能なレベルである。また、粒径 10 μm 以下の浮遊粒子状物質（SPM）および粒径 2.5 μm 以下の微小粒子状物質（PM_{2.5}）の環境中濃度の全国平均（一般局、令和2年：環境省, 2022）はそれぞれ 14 および 9.5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ であり、PM_{2.5} の環境基準（1年平均値が 15 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 以下であり、かつ、1日平均値が 35 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 以下であること）の達成率は 98% 以上であることから、バックグラウンド粒子の濃度が 50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ を超えてくることは一般に少ない。よって、バックグラウンドの粒子の寄与を差し引く、またはバックグラウンドの粒子の寄与を含めた値として、吸入性粉塵 100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ をベンチマークとして自主安全管理を行うことは、多くの場合、可能であると考えられる。

さらに低濃度のベンチマークを採用する場合には、ナノセルロースとバックグラウンド粒子との分離定量が必要になってくる。NEDO 委託事業では、熱分解ガスクロマトグラフィー質量分析（GC-MS）を用いた分析法を開発している（Ogura et al., 2020; 小倉ら, 2020）。CNF の作業環境計測の方法については、十分に確立しているわけではないが、NEDO 委託事業の作業環境計測の事例を参考にいただければ幸いである（7.4.1～7.4.4 節）。

7.3 ナノセルロースの排出・暴露に関する既存文献の情報

ナノセルロースの作業環境計測や模擬試験による排出・暴露評価事例はまだ少ないが、主にエアロゾル計測器を利用した簡易な評価事例が報告されている（表 7.1）。以下に、それらの報告について、概要を紹介する。参考として、主なエアロゾル計測器の概要や原理を表 7.2 に、各計測器のおよその対象粒径範囲を図 7.3 に示す。

Vartiainen et al. (2011) は、ミクロフィブリル化セルロース（MFC）を対象に、粉碎機による解繊とスプレードライの際の作業者の粉塵暴露を評価している。測定は、凝縮粒子計数器（CPC）および走査型移動度粒径測定器（SMPS）により行われた。解繊では、わずかに粒子の発生があったが、そのほとんどがヒュームフードで除去された。スプレードライでは、排気ダクトのバルブを止めたときに粒子の漏れがあったが、通常の稼働時は、暴露はほとんどなかった。

NIOSH は、CNC スラリーの遠心分離、凍結乾燥機からの CNC 乾燥粉体の取り出し（全体換気）、凍結乾燥機からの CNF 乾燥粉体の取り出し（局所排気）および CNC 複合樹脂の製造・切断・研磨の際の排出粉塵を測定している（Martinez et al., 2013; Geraci, 2014; Glassford et al., 2020）。測定は、CPC、光散乱式粒子計数器（OPC）および粉塵計により行われた。また、化学分析のために、ナトリウムイオンをセシウムに置換したセルロースが使われ、フィルター捕集後にセシウムの測定が行われた。CNC スラリーの遠心分離では、エアロゾル濃度の増加が見られ、セシウムの測定では、3 サンプルすべてでセシウムが検出された。囲いの中の濃度が最も高かった。凍結乾燥機からの CNC 乾燥粉体の取り出しでは、取り出しの際にはエアロゾル濃度の増加は見られなかったが、取り出し後の清掃時にエアロゾル濃度の増加が見られた。セシウムの測定では、3 サンプルすべてでセシウムが検出された。凍結乾燥機からの CNF 乾燥粉体の取り出しでは、エアロゾル濃度の増加はほとんど見られず、セシウムの測定では検出限界未満または定量下限以下であった。CNC 複合樹脂の製造・切断・研磨の際は、エアロゾル濃度の増加が見られ、セシウムの測定では、7 サン

表 7.1 排出・暴露評価の事例（既存文献）

材料	測定法	対象プロセス	結果等	出典
MFC	エアロゾル計測器 (CPC、SMPS)	① 石臼式粉碎機による解繊 ② スプレードライ	① わずかに粒子の発生があったが、そのほとんどがヒュームフードで除去された。 ② 排気ダクトのバルブを止めたときには粒子の漏れがあったが、通常の稼働時は、暴露はほとんどなかった。	Vartiainen et al. (2011)
CNF、 CNC	エアロゾル計測器 (CPC、OPC、粉塵計)、粉塵のフィルター捕集→CNFに標識したセシウムの分析	研究機関 ① CNC スラリーの遠心分離 ② 凍結乾燥機からのCNC 乾燥粉体の取り出し(全体換気) ③ 凍結乾燥機からのCNF 乾燥粉体の取り出し(局所排気) ④ CNC 複合樹脂の製造・切断・研磨	① エアロゾル濃度の増加が見られた。3 サンプルすべてでセシウムが検出された。 ② エアロゾル濃度の増加は、取り出し時には見られなかったが、清掃時に見られた。3 サンプルすべてでセシウムが検出された。 ③ エアロゾル濃度の増加はほとんど見られなかった。セシウムの測定では検出限界未満または定量下限以下であった。 ④ エアロゾル濃度の増加が見られた。7 サンプル中 6 サンプルでセシウムが検出された。	Martinez et al. (2013); Geraci (2014); Glassford et al. (2020)
酢酸 CNF	エアロゾル計測器 (CPC、OPC、粉塵計)	製造施設 ① 製造プロセスにおける回収タンクからの排出	詳細情報なし	Glassford et al. (2020)
ナノセ ルロー ス	エアロゾル計測器 (CPC、OPC、粉塵計)、粉塵のフィルター捕集→SEM	① 粉碎、スプレードライ、集塵機からの粒子離脱	詳細情報なし	Glassford et al. (2020)
CNC	エアロゾル計測器 (SMPS、OPC、TEOM)	実証プラント ① スプレードライ/袋詰め ② スクリューコンベアの掃除	① 比較的大きな粒子を測定する OPC と TEOM の濃度は、バックグラウンドの 2～3 倍に上昇した。TEOM による測定値は約 50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ であり、作業環境としてはそれほど高い濃度ではなかった。 ② OPC による測定値は、掃除の際に 0.58 個/ cm^3 から 82 個/ cm^3 に増加したが、その後の通常運転ではバックグラウンドレベルに戻った。	O'Connor et al. (2014)
CNC	粉塵のフィルター捕集→重量測定、SEM、エアロゾル計測器(OPC および SMPS)	① 回転ドラム法による乾燥粉体の飛散試験 ② 水分散液の飛散と乾燥粉体の攪拌時の飛散	① 飛散性は、CNC の種類によって、低になるものから高になるものまでがあった。 ② 水分散液の飛散粒子は棒状だが、CNC 乾燥粉体は球形に近い凝集形態であった。CNC 乾燥粉体の攪拌時には、時間と共に OPC および SMPS の濃度は増加した。	Ellis (2017)

MFC：マイクロフィブリル化セルロース、CNC：セルロースナノクリスタル、CPC：凝縮粒子計数器、SMPS：走査型移動度粒径測定器、OPC：光散乱式粒子計数機、TEOM：振動素子式マイクロ天秤による質量濃度計測器、SEM：走査型電子顕微鏡

表 7.2 主なエアロゾル計測器の概要や原理

計測器の種類	概要・原理
光散乱式粒子計数器 (optical particle counter: OPC)	約 0.3~>10 μm (装置によって下限は<0.1 μm)の粒径範囲のエアロゾルについて、粒径(光散乱径)別の個数濃度が計測できる装置である。エアロゾルを含む試料空気をポンプで吸引し、レーザー照射領域を通過させ、粒子によるレーザーの光散乱を検出する。大きな粒子ほど光散乱強度が強いため、光散乱強度から粒子の大きさが得られ、また、光散乱の検出数から粒子数が得られる。ただし、粒子の大きさについては、粒子の大きさと光散乱強度の関係が物質ごとに異なるため(物質の屈折率に依存)、校正に使われるポリスチレンラテックス粒子と屈折率が大きく異なる粒子については、得られる粒子径が実際の粒子径とは異なってくる。クリーンルームなどでの計測用に、安価でポータブルタイプの光散乱式粒子計数器(パーティクルカウンタとも呼ばれる)が多く市販されているが、比較的きれいな空間を計測するように設計されているため、一般の作業環境では、測定可能濃度の上限を超えやすい。その場合、複数の粒子がレーザー照射領域に同時に入ることにより、粒子個数の過小評価、粒子径の過大評価となる。一般環境の粒子濃度に対応し、粒径チャンネル数が多いタイプのものは、ISOの規格(21501-1)で光散乱式エアロゾルスpektロメータと呼ばれている。測定原理はクリーンルーム用と同じであるが、高濃度に対応するために、一般に吸入した空気の一部だけを計測している。
凝縮粒子計数器 (condensation particle counter: CPC)	約 0.01~>1 μm (装置によって下限は 0.001 μm)の粒径範囲のエアロゾルについての総個数濃度が計測できる装置である。基本原理は OPC と同じだが、試料空気をアルコールなどの過飽和雰囲気を導入し、粒子にアルコールなどの蒸気を凝縮させることにより、小さな粒子を大きく成長させ、通常の OPC では計測できない小さな粒子まで計測できる。ただし、粒径の情報は得られない。ポータブルタイプのものもあり、作業環境での排出実態測定など汎用モニタリングに使用できる。
走査型移動度粒径測定器 (scanning mobility particle sizer: SMPS)	約 0.01~1 μm (装置によって下限は 0.001 μm)の粒径範囲のエアロゾルについて、粒径(電気移動度径)別の個数濃度が計測できる装置である。粒子を荷電する荷電部(放射線源などの中和器、コロナ放電など)、粒子を分級する微分型移動度分析器(differential mobility analyzer: DMA)、粒子を検出する CPC からなる。荷電させたエアロゾルを DMA の電場内に導入すると、粒子は静電気力と流体抵抗のバランスに応じた移動特性を示す。流体抵抗は粒子サイズに依存することから、電場の強さを調整することで、目的の粒子サイズの粒子のみを選択的に取り出すことができる。DMA の電圧を少しずつ変えながら計測するため、一回(一通りの粒径範囲)の計測に数分かかる。電気移動度径は、粒子の流体抵抗に基づくものであり、拡散係数が等価な球形粒子の径と位置づけられる。
エアロダイナミックパーティクルサイザー (aerodynamic particle sizer: APS)	約 0.5~20 μm の粒径範囲のエアロゾルについて、粒径(空気力学径)別の個数濃度が測定できる装置。粒子を含んだ空気をノズルから勢いよく吹き出したときに粒子が得る速度が粒子の大きさ(空気力学径)に依存することを利用して、二段のレーザー光を通過する際の粒子による 2 回の散乱光パルスの間隔から、粒径を求める(小さな粒子ほど加速されて通過時間が短い)。また、パルス数から、粒子個数を得る。
(光散乱式)粉塵計	エアロゾルのおよその重量濃度が計測できる装置である。エアロゾルを含む試料空気をポンプで吸引し、レーザー照射領域を通過させ、粒子によるレーザーの光散乱を検出する。OPC が粒子 1 個ずつの光散乱を見ているのに対し、粉塵計は、複数の粒子の総光散乱強度を見ている。エアロゾルの重量濃度と散乱光量がほぼ直線的に敏感に比例することを利用して、エアロゾルの重量濃度を散乱光の強弱として測定する。比例直線の傾きにあたる重量濃度変換係数を、フィルターによる粒子捕集との同時計測などにより、あらかじめ求めておくことで、より正確な重量濃度を得ることができる。

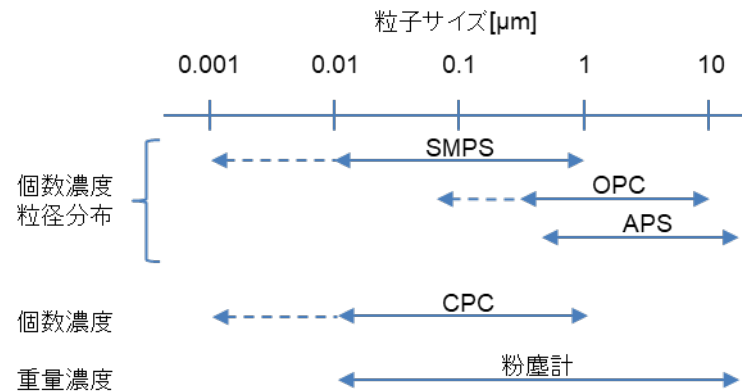


図 7.3 エアロゾル計測器の対象粒径範囲

粒径範囲はおよその値であり、製品によって異なる。

プル中 6 サンプルでセシウムが検出された。NIOSH は、その他に酢酸 CNF やナノセルロースの製造施設でも、エアロゾル計測器を用いた作業環境測定を行っている (Glassford et al., 2020)。

O'Connor et al. (2014) は、カナダの CelluForce 社の実証プラントにおいて、CNC のスプレードライと袋詰め作業の際の粉塵暴露可能性を評価している。対象とする CNC はミクロンサイズの凝集粉体であった。測定は、SMPS、OPC および TEOM (Tapered Element Oscillating Microbalance: 振動素子式マイクロ天秤による質量濃度計測器) により行われた。スプレードライと袋詰め作業の際、比較的大きな粒子を測定する OPC と TEOM の濃度は、バックグラウンドの 2~3 倍に上昇した。プラントは、スタートアップの期間で、まだ袋詰めプロセスが最適化されていなかったこと、そして、TEOM による測定値は約 $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$ であり、作業環境としてはそれほど高い濃度ではないことが言及されている。SMPS によるナノサイズ粒子の測定結果は、バックグラウンドと作業中で結果は大きく変わらなかった。また、スクリーコンベアが詰まり、システムを開放し、掃除をした際に、SMPS と OPC による測定が行われている。OPC による測定値は、掃除の際に $0.58 \text{ 個}/\text{cm}^3$ から $82 \text{ 個}/\text{cm}^3$ に増加したが、その後の通常運転では $0.74 \text{ 個}/\text{cm}^3$ となり、バックグラウンドレベルに戻った。SMPS によるナノサイズ粒子の測定値は、掃除や通常運転時より、バックグラウンドの方が高かった。

Ellis (2017) は、欧州規格 (EN 15051-2:2013) の回転ドラム法による模擬試験により、CNC の飛散性 (dustiness) 試験を行っている。排出されたエアロゾル粒子を、吸引性粉塵 (inhalable)、咽頭通過性粉塵 (thoracic)、吸入性粉塵 (respirable) に分けて、その重量を測定した (吸引性粉塵、咽頭通過性粉塵、吸入性粉塵については、図 7.2 を参照)。飛散性は、低・中・高に判定されるが、CNC の種類によって、低になるものから高になるものまでがあった。また、Ellis は、CNC 水分分散液の飛散と、CNC 乾燥粉体の攪拌時の飛散についても評価している。エアロゾル粒子の電子顕微鏡観察では、CNC 水分分散液の飛散粒子は棒状だが、CNC 乾燥粉体は球形に近い凝集形態であった。CNC 乾燥粉体の攪拌時には、時間と共にエアロゾル計測器 (OPC および SMPS) の濃度は増加した。

7.4 NEDO 委託事業の成果

NEDO 委託事業で実施した作業環境計測の事例を表 7.3 に、模擬試験の事例を表 7.4 にまとめる。それぞれの概要を 7.4.1～7.4.8 節で示す。

表 7.3 作業環境計測の事例（NEDO 委託事業）

材料	測定法	対象プロセス	結果等	出典
CNF	エアロゾル計測器(CPC、OPC、粉塵計)、粉塵のフィルター捕集→重量分析、炭素分析、熱分解 GC-MS、SEM	CNF 乾燥粉体の製造施設 ① 乾燥粉体の回収(全体換気) ② 乾燥粉体の小分け(ヒュームフード)	①②換気システムまたはヒュームフードによって、飛散した CNF は、作業者の近傍には広がることがなく、効果的に除去されていた。作業者近傍の吸入性粉塵の CNF 濃度は $2 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 未満であり、一般の粉塵やナノ材料の許容濃度と比較しても、十分に低いレベルであった。	Ogura et al. (2020)
リグノ CNF	エアロゾル計測器(CPC、OPC、粉塵計)、粉塵のフィルター捕集→重量分析、炭素分析、熱分解 GC-MS、SEM	CNF 複合材の製造施設 ① ペレット化 ② 混練	①②CNF 複合材の製造現場におけるベレット化と混練の際のエアロゾル濃度は、既存の粉塵やナノ材料の許容濃度と比較しても十分に低かった。	小倉ら (2020)
TEMPO 酸化 CNF/液状ゴム粉体	エアロゾル計測器(CPC、OPC、粉塵計)、粉塵のフィルター捕集→重量分析、炭素分析、熱分解 GC-MS、SEM	CNF/ゴム複合材の製造施設 ①乾燥後の CNF/液状ゴム粉体を回収 ②CNF/液状ゴム粉体とスチレンブタジエンゴムの混練	①試料の取り出し口付近において、総粉塵の濃度が $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 程度まで上昇した。通常行わないような乾燥状態での繰り返しの攪拌をすることで、より飛散しやすい状態になったと考えられた。吸入性粉塵で見た場合、濃度上昇は約 $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ またはそれ以下であった。 ②明確な濃度上昇は見られなかった。	
CNF/トリエチレングリコール複合材 CNF/ポリエステル複合材	エアロゾル計測器(CPC、OPC、粉塵計)、粉塵のフィルター捕集→重量分析、炭素分析、熱分解 GC-MS、SEM	CNF 複合材を裁断する工程	吸入性粉塵は、空回し時とサンプルの裁断時で明確な差が見られず、また、装置近傍と部屋入り口の濃度にも明確な差は見られなかった。CNF の吸入性粉塵濃度は数 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 以下と考えられた。総粉塵で見ると、空回し時より裁断時の方が、また、部屋入り口より装置近傍の方が、濃度は若干高い傾向が見られたが、最大でも約 $20 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 程度であった。	

CPC：凝縮粒子計数器、OPC：光散乱式粒子計数機、GC-MS：ガスクロマトグラフィー-質量分析、SEM：走査型電子顕微鏡

表 7.4 模擬試験の事例 (NEDO 委託事業)

材料	測定法	対象プロセス	結果等	出典
11 種の CNF 乾燥粉体と 1 種の CNC 乾燥粉体	エアロゾル計測器(CPC、OPC、粉塵計、SMPS、APS)、粉塵のフィルター捕集→重量分析、SEM	CNF 乾燥粉体の移し替え模擬試験	CNF 乾燥粉体の移し替えにより飛散した粒子は、およそ 0.1~10 μm の大きさの凝集粒子であった。試験に用いた試料重量当たりの吸入性粉塵飛散量はおよそ 1~100 mg/kg であった。飛散した CNF 乾燥粉体は、棒状のもの、扁平状のものなど、不均一な形をしており、大きさは、数 μm 以上の粒子が SEM で多く観察された。	小倉ら (2020); Ogura et al. (in preparation)
8 種の CNF 乾燥粉体と 1 種の CNC 乾燥粉体	エアロゾル計測器(CPC、OPC、粉塵計、SMPS、APS)、粉塵のフィルター捕集→重量分析、SEM	小型回転ドラムによるダスティネス試験 (EN17199-4, 2019)	飛散した粒子は、およそ 0.1~10 μm の大きさの凝集粒子であった。試験に用いた試料重量当たりの吸入性粉塵飛散量はおよそ 10~300 mg/kg であり、試験に用いた試料重量当たりの飛散粒子個数はおよそ 500~40,000 個/mg であった。	Ogura et al. (in preparation)
機械解繊 CNF、TEMPO 酸化 CNF、リン酸エステル化 CNF	TEM、SEM	水分散液の飛沫としての飛散の評価	CNF を含む液滴を気中で乾燥させないで捕集した場合には、網目状の CNF が観察された。一方、CNF を含む液滴を気中で乾燥させた場合には、液滴の乾燥・収縮に伴い形成されたと考えられる密に凝集した粒子が観察された。	小倉ら (2020)
機械解繊 CNF/PP 複合材、リグノ CNF/PP 複合材、リグノ CNF/PA6 複合材	エアロゾル計測器(CPC、OPC、SMPS)、粉塵のフィルター捕集→重量分析、SEM	CNF 複合材の切削試験、摩耗試験	CNF 複合材の切削や摩耗時の飛散粒子は、CNF 含有の有無でほとんど変わらず、CNF と思われる繊維状の粒子は観察されず、飛散粒子のほとんどは樹脂そのものの塊、または樹脂と CNF の混合物の塊と考えられた。劣化試料の摩耗試験においても同様であった。	小倉ら (2020)他

PP：ポリプロピレン、PA6：ポリアミド 6、CPC：凝縮粒子計数器、OPC：光散乱式粒子計数機、SMPS：走査型移動度粒径測定器、APS：エアロダイナミックパーティクルサイザー、SEM：走査型電子顕微鏡、TEM：透過型電子顕微鏡

7.4.1 CNF 乾燥粉体の製造施設における作業環境計測

CNF の製造施設において、換気による気流の中でホッパー下のタンクに集められた CNF 乾燥粉体を回収する工程と、ヒュームフード（ドラフトチャンバー）内で CNF 乾燥粉体を大袋から小袋へ小分けする工程を対象に作業環境計測を行った (Ogura et al., 2020、図 7.4)。粉塵を CPC、OPC、粉塵計で計測するとともに、フィルターで捕集し、重量分析、炭素分析、熱分解 GC-MS による分析および走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察を行った。各測定の結果から、両工程ともに CNF の飛散が起きていることが確認されたが、換気システムまたはヒュームフードによって、飛散した CNF は、作業者の近傍には広がることなく、効果的に除去されていた。熱分解 GC-MS により測定された作業者近傍の吸入性粉塵の CNF 濃度は $2 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 未満であり、一般の粉塵の許容濃度や、カーボンナノチューブや二酸化チタンナノ粒子などのナノ材料の許容濃度 (図 7.1) と比較しても、十

分に低いレベルであった。

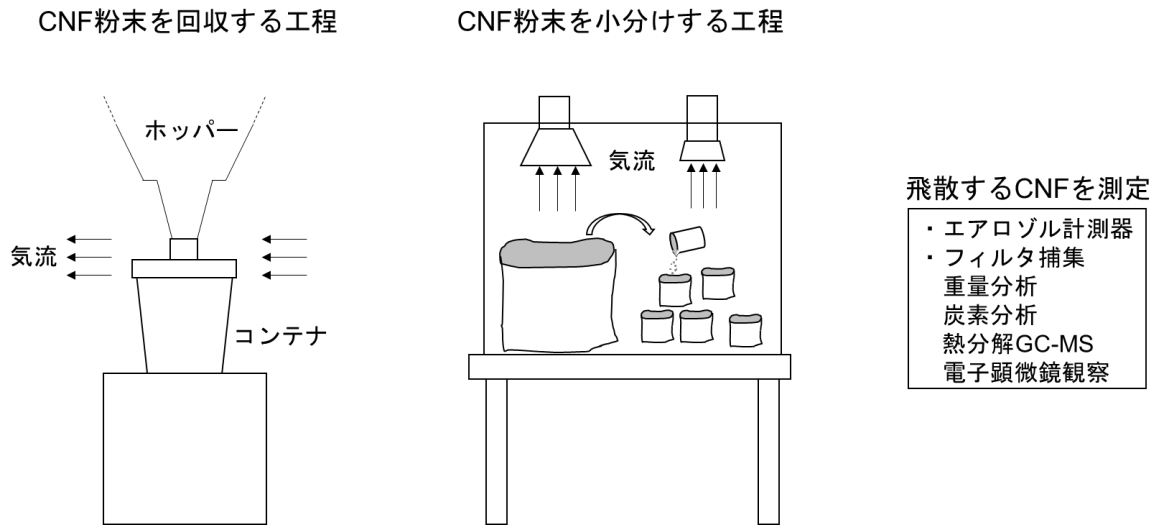


図 7.4 CNF 乾燥粉体の製造施設における作業環境計測 (Ogura et al., 2020)

7.4.2 CNF 複合材の製造施設における作業環境計測

リグノ CNF 複合材の製造施設において、CNF およびその他の粒子の飛散や暴露の可能性を評価するために作業環境計測を行った(小倉ら, 2020)。ポリアミド 6(PA6)と CNF の複合材(PA6/CNF)のペレット化(図 7.5)と混練(図 7.6)を評価対象とした。比較のために CNF (パルプ) を含まない PA6 そのものについてもペレット化と混練を行った。ペレット化は、混練して棒状(ストランド)にした樹脂や複合材を切断機で数 mm のペレットに切断する工程である。混練は、樹脂とパルプを二軸混練押出機により、温度をかけた上で練って混ぜる工程である。パルプは混練に伴い解繊されてナノ化される。PA6/CNF 複合材は 1 回混練したものを再度混練し、計 2 回混練が行われた。

エアロゾル計測器による測定では、ペレット化については、作業の前後で特に濃度の変化は見られなかった。一方、混練については、装置の近傍で計測値の上昇が見られた。多くは、CNF (パルプ) の有無によらず、装置の稼働や加熱に伴い揮発した樹脂成分に由来するものと考えられた。原料投入時に投入口近傍において、瞬間的な上昇が見られ、総量としては多くないが、試料の投入時に若干の発塵があると考えられた。

各工程の際にフィルター捕集したエアロゾル粒子の重量濃度、炭素分析による炭素濃度、熱分解 GC-MS によるセルロース相当濃度の結果は、総粉塵では対照地点より装置近傍の方が若干濃度は高かったが、PA6 と PA6/CNF で大きな差はなかった。また、肺に入る大きさである吸入性粉塵の結果については、対照地点(セルロース相当濃度： $<0.7\sim9.5\ \mu\text{g}/\text{m}^3$)と装置近傍(セルロース相当濃度： $2.4\sim8.0\ \mu\text{g}/\text{m}^3$)で明確な差はなかった。一般の粉塵の許容濃度や、カーボンナノチューブや二酸化チタンナノ粒子などのナノ材料の許容濃度(図 7.1)と比較しても、今回の測定値は十分に低い値であった。

フィルター捕集したエアロゾル粒子の電子顕微鏡観察では、いずれにおいても、CNF やパルプと思われる繊維状の粒子は観察されなかった。

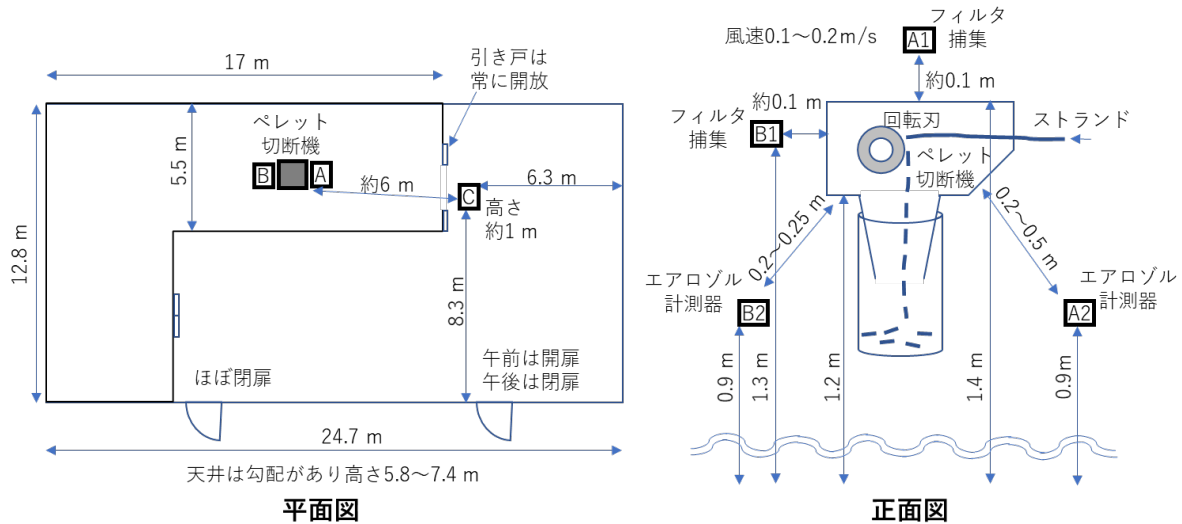


図 7.5 CNF 複合材の製造施設における作業環境計測：ペレット化（小倉ら, 2020）

測定位置 A, B：ペレット切断機近傍、測定位置 C：対照

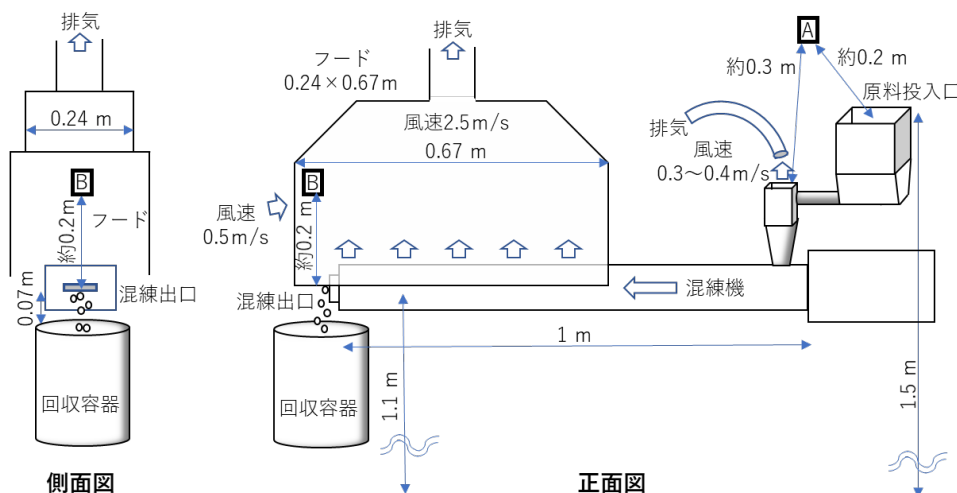


図 7.6 CNF 複合材の製造施設における作業環境計測：混練（小倉ら, 2020）

測定位置 A：原料投入口近傍（投入口から約 20 cm）

測定位置 B：混練出口近傍（出口から約 20 cm）→基本的にフードに吸われる空気

測定位置 C：対照（混練機からの距離：約 4 m）

7.4.3 CNF/ゴム複合材の製造施設における作業環境計測

CNF/ゴム複合材の製造施設において、CNF/液状ゴム粉体を乾燥後に回収する工程（模擬的に乾燥済みの試料を使って、攪拌後に試料を回収する操作 1 サイクル約 5 分を 10 回繰り返し実施：図 7.7）と、CNF/液状ゴム粉体をスチレンブタジエンゴムと混練する工程（試料投入から取り出しまでの 1 サイクル約 12 分を 6 サイクル：図 7.8）を対象に作業環境計測を行った。粉塵を CPC、OPC、粉塵計で計測するとともに、フィルターで捕集し、重量分析、炭素分析、熱分解 GC-MS による分析および SEM 観察を行った。

CNF/液状ゴム粉体を回収する工程では、試料の取り出し口付近において、総粉塵の濃度が 100

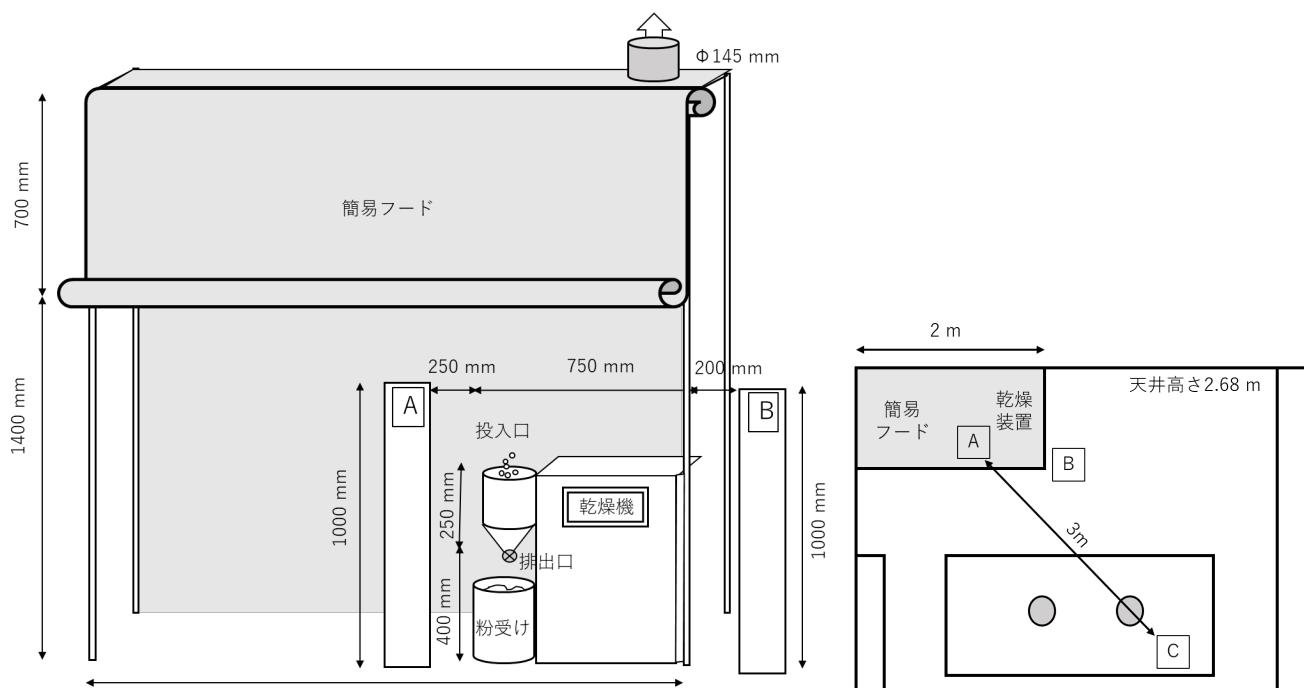


図 7.7 CNF/ゴム複合材の製造施設における作業環境計測：

CNF/液状ゴム粉体の乾燥後の回収工程

測定位置 A：試料の取り出し口付近

測定位置 B：簡易フードの外

測定位置 C：対照（取り出し口からの距離：約 3 m）

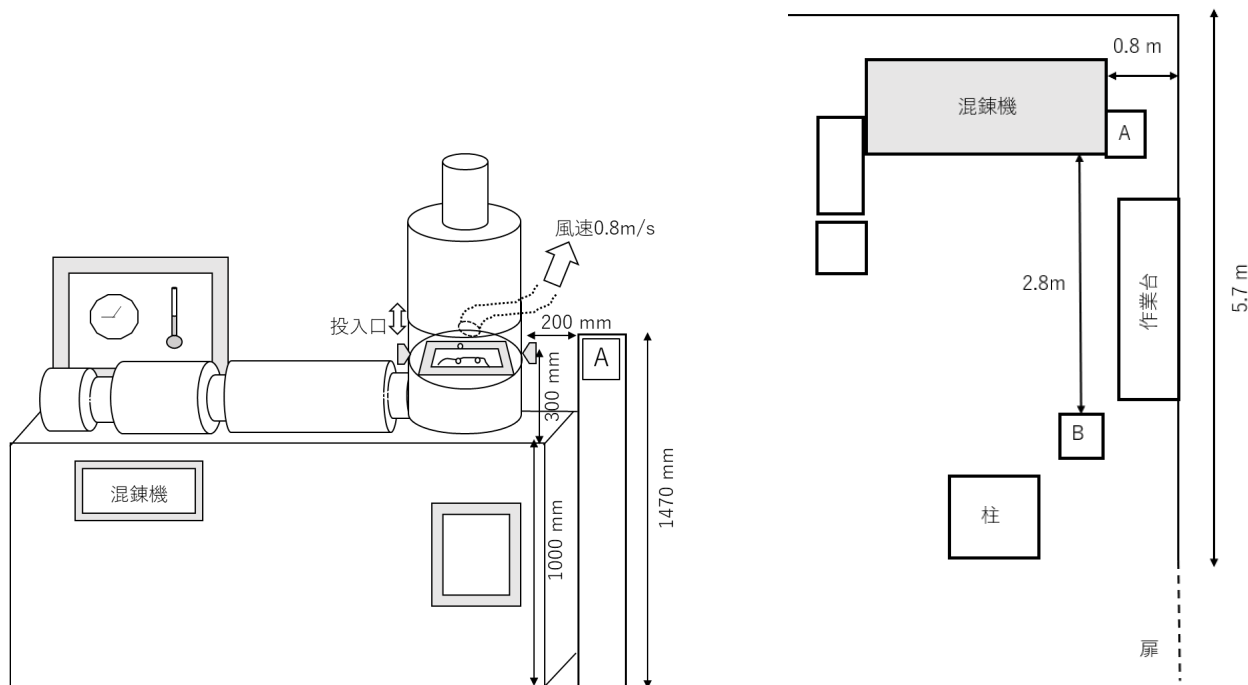


図 7.8 CNF/ゴム複合材の製造施設における作業環境計測：

CNF/液状ゴム粉体とスチレンブタジエンゴムを混練する工程

測定位置 A：混練機の試料投入・取り出し口付近

測定位置 B：対照（取り出し口からの距離：約 3 m）

$\mu\text{g}/\text{m}^3$ 程度まで上昇した。エアロゾル計測器の結果を見ると、操作を繰り返し行っていくに従い濃度の上昇が見られていることから、通常行わないような乾燥状態での繰り返しの攪拌をすることで、より飛散しやすい状態になったと考えられた。ただし、肺に入る大きさの吸入性粉塵で見た場合、濃度上昇は約 $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ またはそれ以下であった。混練工程では、明確な濃度上昇は見られなかった。

7.4.4 CNF 複合材の裁断時の作業環境計測

CNF 複合材 (①CNF/トリエチレングリコール (TEG) 乾燥体 (1:1.5)、②CNF+TEG 乾燥体 (1:3)、③CNF/ポリエステル) を裁断する工程を対象に作業環境計測を行った (図 7.9)。粉塵を CPC、OPC、粉塵計で計測するとともに、フィルターで捕集し、重量分析、炭素分析、熱分解 GC-MS による分析および SEM 観察を行った。エアロゾル計測器による測定の結果、わずかではあるが、裁断機の稼働時にサブミクロンサイズの定常的な粒子排出があること、裁断終了後の掃除の際にミクロンサイズの粒子の瞬間的な排出があることが分かった。フィルター捕集サンプルの分析において、吸入性粉塵は、空回し時とサンプルの裁断時で明確な差が見られず、また、装置近傍と部屋入り口の濃度の間にも明確な差は見られなかった。CNF の吸入性粉塵濃度は数 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 以下と考えられた。総粉塵で見ると、空回し時より裁断時の方が、また、部屋入り口より装置近傍の方が、濃度は若干高い傾向が見られたが、最大でも $20 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 程度であった。

7.4.5 CNF 乾燥粉体の移し替え模擬試験

3 種の CNF 乾燥粉体を対象に、CNF 乾燥粉体の取り扱い時の飛散性を評価するために、移し替えの模擬試験 (図 7.10) を行った (小倉ら, 2020)。また、追加で 8 種の CNF 乾燥粉体と 1 種の CNC 乾燥粉体についても同様の試験を行った (Ogura et al., in preparation)。その結果、各種エアロゾル計測器により飛散した CNF 粒子が検出できることを確認した。CNF 乾燥粉体の移し替えにより飛散した粒子は、およそ $0.1\sim 10 \mu\text{m}$ の大きさの凝集粒子であった。試験に用いた試料重量当たりの吸入性粉塵飛散量はおよそ $1\sim 100 \text{ mg}/\text{kg}$ であった。粉塵計の測定値は、フィルター捕集により求めた気中濃度のおよそ $50\sim 120\%$ であり、適切な補正をしないと過小または過大評価になることが分かった。飛散した CNF 乾燥粉体は、棒状のもの、扁平状のものなど、不均一な形をしており、大きさは、数 μm 以上の粒子が SEM で多く観察された。

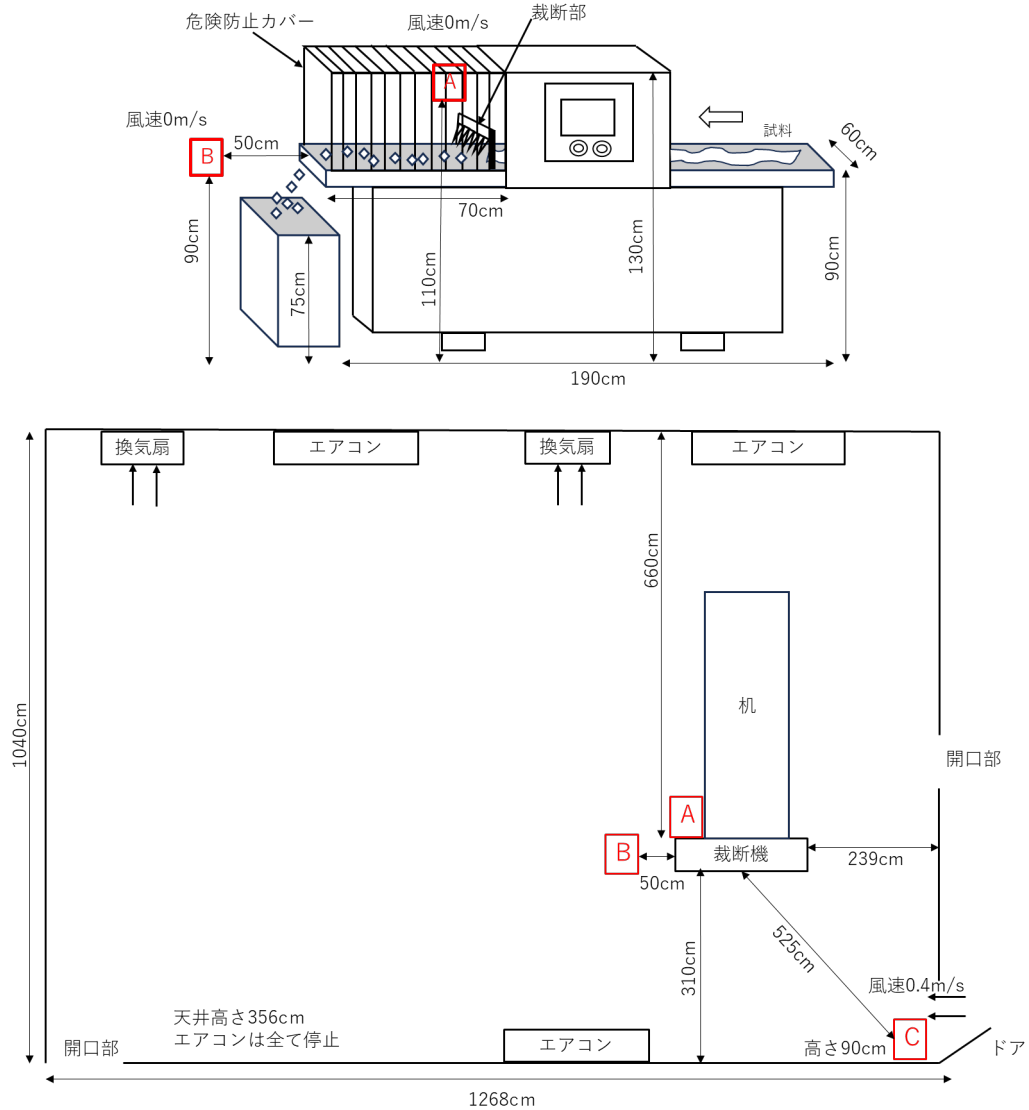


図 7.9 CNF 複合材の裁断時における作業環境計測

測定位置 A：裁断機の裁断部付近

測定位置 B：裁断試料の回収部付近

測定位置 C：対照（部屋への空気流入口）

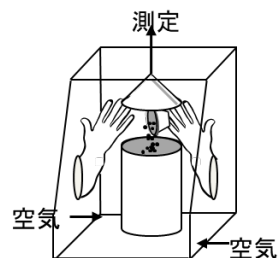


図 7.10 CNF 乾燥粉体の移し替え模擬試験

7.4.6 CNF 乾燥粉体のダスティネス試験

粉体ナノ材料の飛散性（ダスティネス）を評価する欧州規格の一つ（EN17199-4, 2019）である小型回転ドラム（図 7.11）を用いて、8 種の CNF 乾燥粉体と 1 種の CNC 乾燥粉体を対象にダスティネス試験を実施した（Ogura et al., in preparation）。飛散した粒子は、およそ $0.1\sim 10\ \mu\text{m}$ の大きさの凝集粒子であり、移し替え模擬試験の結果とほぼ同じであった。試験に用いた試料重量当たりの吸入性粉塵飛散量はおよそ $10\sim 300\ \text{mg/kg}$ であり、試験に用いた試料重量当たりの飛散粒子個数はおよそ $500\sim 40,000\ \text{個/mg}$ であった。これらの数値は、既報の酸化チタンナノ粒子を対象とした試験の数値とほぼ同等であった。

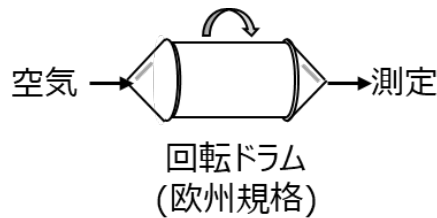


図 7.11 CNF 乾燥粉体のダスティネス試験

7.4.7 CNF 水分散液の飛沫としての飛散

CNF 水分散液の飛沫としての飛散については、水分散液製造工程での噴出、スプレー製品噴霧による製品中の CNF の飛散あるいは製造工程から意図しない漏洩による飛散等が考えられる。飛散した CNF の液滴は、その乾燥条件により CNF の凝集状態が変化することが考えられ、暴露量や影響も異なってくることが考えられる。そこで、CNF 水分散液を飛沫状態で飛散させ、液滴付着時の形態を、乾燥条件を変更して観察した（小倉ら, 2020）。

CNF を含む液滴を気中で乾燥させないで捕集した場合には、網目状の CNF が観察された（図 7.12 左）。一方、CNF を含む液滴を気中で乾燥させた場合には、液滴の乾燥・収縮に伴い形成されたと考えられる密に凝集した粒子が観察された（図 7.12 右）。一般に数十 μm を上回るような液滴の場合には重力沈降ですぐに落下し、数十 μm より小さな液滴（水滴）の場合にはすぐに揮発してしまうと考えられることから、CNF 水分散液の飛沫が発生しても、吸入時の CNF は乾燥して密に凝集した粒子が主になると考えられる。CNF は一旦乾燥すると表面の水酸基同士の水素結合により全体として強く凝集し、比表面積も小さくなる。凝集してもナノの構造を保って比表面積が高い状態のままである他のナノ材料（カーボンナノチューブや二酸化チタンなど）とは、性質的に異なるように思われる。ただし、湿度が非常に高く液滴の揮発が起きにくいような場合や、液滴が水分散液ではなく揮発しにくいオイルのような場合には、繊維状態の CNF への暴露が起ころうと考えられる。

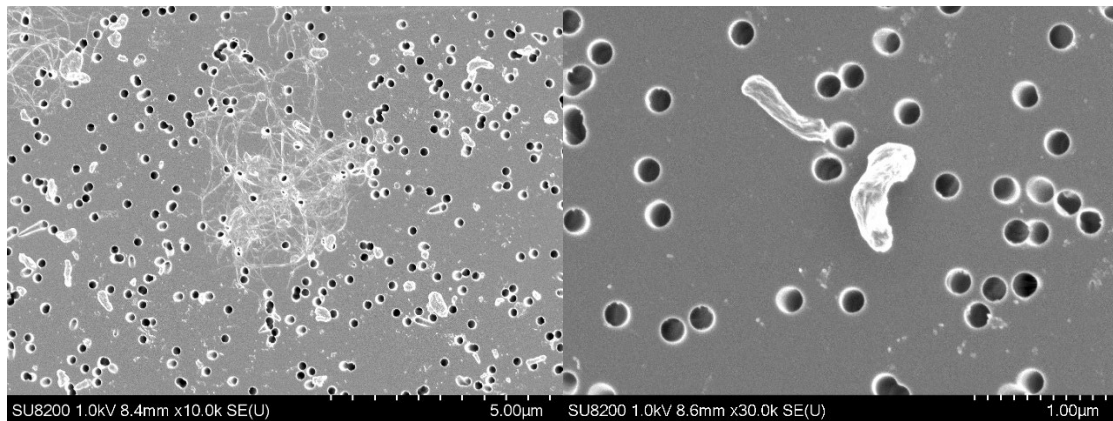


図 7.12 CNF 水分散液の飛沫としての飛散（左：乾燥なし、右：乾燥あり）（小倉ら, 2020）

7.4.8 CNF 複合材の切削試験、摩耗試験

CNF 複合材の加工や摩耗時における CNF の排出・暴露可能性を評価するために CNF 複合材の切削試験および摩耗試験を実施した（小倉ら, 2020、図 7.13）。CNF 複合材に加え、比較のために CNF を加えていない樹脂も対象とした。CNF 複合材の切削や摩耗時の飛散粒子の粒径分布の形は、CNF 含有の有無でほとんど変わらなかった。また、飛散粒子の形態観察では、CNF と思われる繊維状の粒子は観察されず、飛散粒子のほとんどは、樹脂そのものの塊、または樹脂と CNF の混合物の塊と考えられた。劣化試料の摩耗試験においても同様であった。限られたデータではあるが、CNF は母材である樹脂と結合した状態にあり、CNF 単体としての排出・暴露は限定的であると考えられる。部材の加工や摩耗の際には CNF 含有の有無によらず粉塵が発生するが、樹脂自体の粉塵の排出や暴露を適切に管理することで、CNF 単体としての排出・暴露も低く管理できると考えられる。

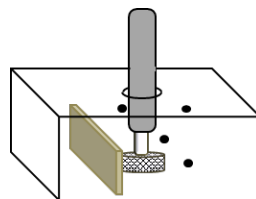


図 7.13 CNF 複合材の切削・摩耗試験

7.5 まとめ

ナノセルロースの気中への排出と吸入暴露に焦点を当てて、情報を整理した。ナノセルロースの排出・暴露に関する既存の文献はまだ少なく、それらは主にエアロゾル計測器を利用した簡易な計測に基づくものであった。NEDO 委託事業では、CNF 乾燥粉体や CNF 複合材の製造施設等で作業環境計測を実施し、セルロースの定量分析に基づき、気中の CNF 濃度を定量的に評価した。また、各種模擬試験（CNF 乾燥粉体の飛散、CNF 水分散液の飛沫飛散、CNF 複合材の切削・摩耗）を実施した。そこで得られた知見を基に、注意が必要なプロセス、対策と管理、排出・暴露の計測法について以下にまとめる。

<暴露の観点で注意が必要なプロセス>

ナノセルロースの乾燥粉体の取り扱い時は、飛散が起きやすい (O'Connor et al., 2014; Ellis, 2017; Ogura et al., 2020; 小倉ら, 2020)。CNF は一般に水分散液の状態で製造されるが、乾燥状態の方が保管や輸送が楽なこと、樹脂との混練する際には乾燥状態の方が取り扱いがしやすいことなどから、各社独自の工夫により乾燥状態の CNF の製造・出荷も行われつつある。乾燥した CNF の取り扱い時には吸入暴露が起こりやすいので、注意が必要と考えられる。また、清掃時やメンテナンス時なども、同様に注意が必要と考えられる (Martinez et al., 2013; Geraci, 2014; Glassford et al., 2020; O'Connor et al., 2014)。

CNF 水分散液は、乾燥粉体に比べると飛散や吸入暴露が起こりにくいと考えられるが、例えば、水分散液製造工程での噴出、スプレー製品噴霧による製品中の CNF の飛散あるいは製造工程から意図しない漏洩による飛散等が考えられる。NEDO 委託事業で行った CNF 水分散液の飛沫の評価において、CNF を含む液滴を気中で乾燥させないで捕集した場合には網目状の CNF が観察され、CNF を含む液滴を気中で乾燥させた場合には凝集した固まった粒子が確認された。このように、気中での液滴の乾燥の有無で、暴露時の CNF の形態は大きく異なると考えられる。一般に数十 μm を上回るような液滴の場合には重力沈降ですぐに落下し、数十 μm より小さな液滴（水滴）の場合にはすぐに揮発してしまうと考えられることから、CNF 水分散液の飛沫が発生したとしても、吸入時の CNF は乾燥して密に凝集した粒子が主になると考えられる。ただし、湿度が非常に高く液滴の揮発が起きにくいような場合や、液滴が水分散液ではなく揮発しにくいオイルのような場合には、繊維状態の CNF への暴露が起こりうると考えられる。

CNF 複合材に関して、NEDO 委託事業で実施した CNF 複合材の製造現場の調査では、ペレット化と混練の際のエアロゾル濃度は、既存の粉塵やナノ材料の許容濃度と比較しても十分に低かった。また、CNF 複合材の切削や摩耗時の飛散粒子は、CNF 含有の有無でほとんど変わらず、CNF と思われる繊維状の粒子は観察されず、飛散粒子のほとんどは樹脂そのものの塊、または樹脂と CNF の混合物の塊と考えられた。限られたデータではあるが、CNF は母材である樹脂と結合した状態にあり、CNF 単体としての排出・暴露は限定的であると考えられる。

<対策と管理>

換気や局所排気装置（ヒュームフード等）は飛散 CNF の対策として有効であった (Vartiainen et al., 2011; Ogura et al., 2020)。特に CNF の乾燥粉体を取り扱う際には、CNF の飛散が起きやすいので、局所排気や保護具等の使用が推奨される。

ナノセルロースを対象とした吸入暴露の許容濃度の提案値はまだないが、他のナノ材料や粉塵の許容濃度を参考にして、当面の現場の管理の目安となる濃度を設定していくことが重要と考えられる。ナノ材料の許容濃度は、一般にナノでない同じ物質の許容濃度よりも低い値で定められており、ナノセルロースにおいても、十分な情報がない中では、従来のセルロースより低い値で管理することが望ましいと考えられる。英国規格協会やドイツ法定災害保険研究・試験研究所の提案（ナノでない同じ物質の $\leq 1/10$ の値をベンチマークとする）に沿うと、例えば、ナノでないセルロース（綿塵）の吸入性粉塵の許容濃度 1 mg/m^3 を $1/10$ にした $100 \mu\text{g/m}^3$ が一つのベンチマークとなる。これは、日本産業衛生学会によるナノ TiO_2 およびナノ ZnO の許容濃度（それぞれ 300 および $500 \mu\text{g/m}^3$ ）より若干低い値である。ベンチマークの設定は、その濃度が計測できるかどうかということも

考慮して決定する必要がある。

CNF の複合材の加工や摩耗の際には CNF 含有の有無によらず粉塵が発生するが、CNF 単体としての排出・暴露は限定的であると考えられることから、樹脂自体の粉塵の排出や暴露を適切に管理することで、CNF 単体としての排出・暴露も低く管理できると考えられる。

<排出・暴露の計測法>

多くの報告で、CPC、OPC、粉塵計などのエアロゾル計測器が使われていた。これらは、小型で、秒単位の測定値が得られることから、現場の日常の安全管理に有用であると考えられるが、CNF とそれ以外の粒子を識別することはできないので、CNF ありとなしの比較や、バックグラウンド濃度との比較が重要になる。粉塵をフィルターに捕集して、重量を測定する場合にも、CNF とそれ以外の粒子の識別が問題となる。気中に浮遊する微量セルロースの定量分析法としては、石英フィルターに粉塵を捕集したあとに、熱分解ガスクロマトグラフィー質量分析 (GC-MS) で分析する方法がある (Ogura et al., 2020; 小倉ら, 2020)。CNF の作業環境計測の方法については、十分に確立しているわけではないが、NEDO 委託事業の作業環境計測の事例を参考にいただければ幸いである (7.4.1～7.4.4 節)。

参考文献

- Aschberger K, Micheletti C, Sokull-Klüttgen B, Christensen FM, 2011. Analysis of Currently Available Data for Characterizing the Risk of Engineered Nanomaterials to the Environment and Human Health—Lessons Learned from Four Case Studies. *Environment International* 37:1143–1156.
- British Standards Institution (BSI), 2007. Nanotechnologies—Part 2: Guide to Safe Handling and Disposal of Manufactured Nanomaterials, PD 6699-2.
- Ellis S, 2017. Occupational Health and Safety Characterization of several North American Cellulose Nanocrystals. *International Conference on Nanotechnology for Renewable Materials 2017*, Canada, 5–8 June.
- EN 17199-4, 2019. Workplace exposure - Measurement of dustiness of bulk materials that contain or release respirable NOA or other respirable particles - Part 4: Small rotating drum method.
- Fukushima S, Kasai T, Umeda Y, Ohnishi M, Sasaki T, Matsumoto M, 2018. Carcinogenicity of multi-walled carbon nanotubes: challenging issue on hazard assessment. *J Occup Health* 60(1):10–30.
- French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES), 2020. Expert appraisal on recommending occupational exposure limits for chemical agents, Assessment of health effects for titanium dioxide under nanoform (nTiO₂, P25). <https://www.anses.fr/en/content/recommended-occupational-exposure-limits-titanium-dioxide-nanoparticles>
- Geraci CL, 2014. Nanotechnology Research at NIOSH Delivering on the Promise through Responsible Development. *Cellulose Nanomaterials: A Path Towards Commercialization*. <https://www.nano.gov/sites/default/files/geracic.pdf>
- Glassford E, Neu-Baker NM, Dunn KL, Dunn KH, 2020. Exposures during wet production and use

- processes of nanomaterials: a summary of 11 worksite evaluations. *Ind Health* 58(5):467–478.
- Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung (IFA), 2009. Criteria for Assessment of the Effectiveness of Protective Measures. <https://www.dguv.de/ifa/fachinfos/nanopartikel-am-arbeitsplatz/beurteilung-von-schutzmassnahmen/index-2.jsp>
- ISO 7708, 1995. Air Quality—Particle Size Fraction Definitions for Health-related Sampling.
- Martinez KF, Eastlake A, Rudie A, Geraci C, 2013. Occupational Exposure Characterization during the Manufacture of Cellulose Nanomaterials. In: *Production and Applications of Cellulose Nanomaterials*, Chapter 1.2, TAPPI Press, USA, pp. 61–64.
- Maynard AD, Kuempel ED, 2005. Airborne Nanostructured Particles and Occupational Health. *Journal of Nanoparticle Research* 7:587–614.
- Nanocyl website, Working safely with Nanocyl products. <https://www.nanocyl.com/expertise-center/health-safety-environment/working-safely-with-nc7000-and-nanocyl-formulated-products/>
- National Institute of Occupational Safety and Health (NIOSH), 2011. Current Intelligence Bulletin 63: Occupational Exposure to Titanium Dioxide. <https://www.cdc.gov/niosh/docs/2011-160/default.html>
- National Institute of Occupational Safety and Health (NIOSH), 2013. Current Intelligence Bulletin 65: Occupational Exposure to Carbon Nanotubes and Nanofibers. <https://www.cdc.gov/niosh/docs/2013-145/default.html>
- National Institute of Occupational Safety and Health (NIOSH), 2020. Current Intelligence Bulletin: 70: Health Effects of Occupational Exposure to Silver Nanomaterials. <https://www.cdc.gov/niosh/docket/archive/docket260a.html>
- O'Connor B, Berry R, Goguen R, 2014. Commercialization of Cellulose Nanocrystal (NCC™) Production: A Business Case Focusing on the Importance of Proactive EHS Management. In *Nanotechnology Environmental Health and Safety*, 2nd ed.; Hull MS, Bowman DM, Eds.; William Andrew Publishing: Oxford, UK, pp. 225–246.
- Ogura I, Kotake M, Kuboyama T, Kajihara H, 2020. Measurements of cellulose nanofiber emissions and potential exposures at a production facility. *NanoImpact* 20:100273.
- Ogura I, in preparation
- Pauluhn J, 2010. Multi-walled Carbon Nanotubes (Baytubes®): Approach for Derivation of Occupational Exposure Limit. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 57:78–89.
- Pauluhn J, 2011. Poorly Soluble Particulates: Searching for a Unifying Denominator of Nanoparticles and Fine Particles for DNEL Estimation. *Toxicology* 279:176–188.
- Shatkin JA, Kim B, 2015. Cellulose nanomaterials: life cycle risk assessment, and environmental health and safety roadmap. *Environmental Science Nano* 2:477–499.
- Stockmann-Juvala H, Taxell P, Santonen T, 2014. Formulating Occupational Exposure Limits Values (OELs) (Inhalation & Dermal), Scaffold Public Documents. <http://scaffold.eu-vri.eu/filehandler.ashx?file=13717>

Vartiainen J, Pöhler T, Sirola K, Pylkkänen L, Alenius H, Hokkinen J, Tapper U, Lahtinen P, Kapanen A, Putkisto K, Hiekkataipale P, Eronen P, Ruokolainen J, Laukkanen A, 2011. Health and Environmental Safety Aspects of Friction Grinding and Spray Drying of Microfibrillated cellulose. Cellulose 18: 775–786.

小倉 勇, 梶原 秀夫, 蒲生 昌志, 小栗 朋子, 川本 朱美, 久保山 太一, 2020. 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. <https://riss.aist.go.jp/results-and-dissemin/776/>

蒲生 昌志 編, 2011. ナノ材料リスク評価書 –二酸化チタン(TiO_2)–、最終報告版：2011.7.22, NEDO プロジェクト (P06041) 「ナノ粒子特性評価手法の研究開発」. <https://riss.aist.go.jp/results-and-dissemin/953/>

環境省, 2022. 令和2年度 大気汚染状況について. <https://www.env.go.jp/press/110805.html>

篠原 直秀 編, 2011. ナノ材料リスク評価書 –フラーレン(C_{60})–、最終報告版：2011.7.22, NEDO プロジェクト (P06041) 「ナノ粒子特性評価手法の研究開発」. <https://riss.aist.go.jp/results-and-dissemin/953/>

中西 準子 編, 2011. ナノ材料リスク評価書 –カーボンナノチューブ (CNT)–、最終報告版：2011.8.17, NEDO プロジェクト (P06041) 「ナノ粒子特性評価手法の研究開発」. <https://riss.aist.go.jp/results-and-dissemin/953/>

日本産業衛生学会, 2024. 許容濃度等の勧告(2024年度). 産業衛生学雑誌 66(5):207–239.

執筆担当者

小倉 勇

第8章 生態影響の評価

8.1 はじめに

CNFの実用化に伴い、製造量および市場への流通量が増加するとともに、工業廃水や家庭排水を経路として、水環境に流入するCNFの量が大幅に増加し、水環境に生息する生物がCNFに暴露する機会は増加する可能性がある。そのため、人に対するCNFの安全性だけでなく、環境におけるCNFの安全性も確認しておくことが望ましい。また、生態リスク評価によりCNFの環境影響を評価した結果を活用することで、環境に出る可能性がある用途への開発や、適切な廃棄処理の設定が可能となる。

化学物質およびナノ材料の生態リスク評価を実施する場合、一般的に、藻類、甲殻類、魚類などの水生生物を用いた生態毒性試験の結果に基づいて、生態影響（水生生物に対する有害性）の評価が実施される。これらの生態毒性試験は、経済協力開発機構（OECD）のテストガイドライン（TG）等の試験方法に準拠して行われる。しかしながら、CNFは難水溶性であり、OECDのガイダンス文書で示されている試験困難物質に該当するため、通常のTGに準拠した試験方法による試験では、CNFの生態影響を適切に評価できない可能性がある（OECD, 2019a）。

これまでにNEDO委託事業（2020～2024年度）では、生態毒性試験を実施している既報の文献情報を収集し、藻類、甲殻類および魚類を用いたCNFの生態影響に関する現状の知見を整理すると共に、OECDのガイダンス文書の検討事項と照らし合わせて、CNFの生態毒性試験の手法を確立する上で留意すべき点を総説論文としてまとめた（田井ら, 2022）。次節（8.2節）では、その総説論文に基づいて、藻類、甲殻類、魚類およびその他の魚介類を用いたCNFの生態毒性試験の現状の知見を概説する。そして、8.3節では、Stoudmann et al. (2019)の報告を基に、複数の生態毒性試験の結果に基づく生態リスク評価の手法（予測無影響濃度の計算や予測環境中濃度との比較によるリスク判定など）やその結果の例について概説する。

総説論文にもまとめているが、現状においては、CNFの試験方法は十分に確立されておらず、研究者が各自に試験を実施している状況である。例えば、CNFは培地成分（塩類）により凝集・沈降しやすくなるが、試験溶液中のCNFの濃度や分散状態の確認はほとんど行われていない。CNFの特性にあわせた試験方法の確立が課題としてある。そうした課題を踏まえて、NEDO委託事業では、評価対象とするCNFごとに、生態毒性試験の方法および条件を確立した。確立した試験方法・条件に従い、生態毒性試験を実施し、得られた毒性値を基に生態影響の評価値として予測無影響濃度を導出した。8.4節では、その取り組みの成果を紹介する。

8.2 既存文献の情報

本節は、CNFの生態毒性試験の手法を確立する上での留意点を整理した田井ら（2022）の総説論文に基づいて、藻類、甲殻類および魚類を用いたCNFの生態毒性試験の結果を整理した。加えて、その他の生物種（魚介類等）に対するCNFの生態影響試験の結果も整理した。

これまでに報告されている、CNFおよびその他のナノセルロース類を対象とした、実験室内での藻類、甲殻類および魚類に対する生態毒性試験の情報を収集するために、2010年から2021年の期間で報告された論文を対象として、「nano」、「cellulose」、「toxicity」という3語に加えて、「Alga」、「Daphnia」、「Fish」という単語のいずれかを含めて、医学・生物学文献データ

ベースである PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) で検索した。その結果、Alga の結果が 10 報、Daphnia の結果が 5 報、Fish の結果が 10 報となった。また、2022 年から 2024 年 10 月末の期間で報告された論文を対象に、2021 年以前と同様の方法で検索するとともに、Google Scholar でトップページにヒットした論文 20 報、および、2010 年から 2021 年の期間で報告された論文から収集した論文を対象に、被引用文献を収集した。そこからさらに精査を行い、CNF およびその他のナノセルロース類を対象とした、藻類、甲殻類、魚類およびその他の魚介類を用いた生態毒性試験を実施している 13 報のデータを抽出した（表 8.1）。以下にそれらの概要を紹介する。

Kovacs et al. (2010) は、9 種の水生生物に対して、ナノ結晶セルロース (NCC) およびカルボキシメチルセルロース (CMC) の生態毒性試験を実施した。試験はそれぞれ、ニジマスは Environmental Canada (2000a)、オオミジンコは Environmental Canada (2000b)、ニセネコゼミジンコは Environmental Canada (2007)、ファットヘッドミノーは Kovacs et al. (2007) の 3 週間短期繁殖試験、ムレミカツキモは Blaise & Vasseur (2005) の 96 ウェルマイクロプレートを用いた 72 時間の生長阻害試験、ホウネンエビ目の一種は ISO 14380 (2011)、およびゼブラフィッシュは Hill et al. (2005) の 5 日間胚発生試験に準拠して実施された。NCC は、290 mg/L でファットヘッドミノーの繁殖に影響を与え、34 mg/L でニジマスの細胞生存率を 20% 減少させたが、他のほとんどの生物種の生存や生長には、CMC と同程度の 1000 mg/L 以下の濃度でも影響を及ぼさなかった。この結果から、NCC の潜在的な毒性および環境リスクは低いと判断された。

Vartiainen et al. (2011) は、マイクロフィブリル化セルロース (MFC) および参照物質として微結晶セルロース (MCC) を用いて、オオミジンコの遊泳阻害試験 (OECD TG202) を実施した。40~600 mg/L の濃度において、仔虫の運動性が、MFC により 15~25%、MCC により 15~35% 阻害された。これは、被験物質が溶液中に均一に分散されておらず、供試生物に被験物質が付着して、物理的に運動性が妨害されたためと考察されている。

Pereira et al. (2014) は、高イオン強度の Bold's Basal 培地およびセーヌ河から採取した水試料を培地に用いて、綿由来の CNF のクロレラの生長に対する影響を調査した。被験物質の分散性の指標として、ゼータ電位が測定された。Bold's Basal 培地では、CNF の設定最低濃度である 1 mg/L においても、試験開始から 24 時間以降の生長が対照区と比較して有意に低下した。セーヌ河の水試料では、50 および 100 mg/L において、96 時間後の生長が対照区と比較して有意に低下した。また、Bold's Basal 培地およびセーヌ河の水試料は共に、72 時間後に生存する細胞の割合が、対照区と比較して全ての CNF 暴露濃度 (1、50 および 100 mg/L) で有意に低下した。どちらの試験水でも、CNF を添加した試験区では、すべてゼータ電位の絶対値が 30 よりも小さく、分散性が保たれていなかった。また、セーヌ河の水試料に CNF を添加した試験区では、クロレラを取り囲むように、ガム状のセルロースが生成されていた。これは、CNF と植物プランクトンの間の相互作用により生産された細胞外高分子物質であり、これがクロレラの細胞表面への CNF の吸着を増加させることで、細胞壁でのガス交換や細胞膜での栄養素の取り込みに影響を与えた結果、クロレラの生長阻害が生じたことが示唆された。

Munk et al. (2015) は、1、50 および 100 mg/L の綿由来の CNF による糸状緑藻類のクレブソルミディウムへの有害性を調査した。細胞数の減少が非用量依存的にすべての濃度区で観察された。生長阻害は、試験開始から 48 時間以降、すべての濃度区で有意に認められた。また、すべて

の濃度区でいずれかの時間に細胞生存割合の低下が認められた。ただし、72 時間、96 時間後では、50 mg/L のみ有意な低下が認められた。

Harper et al. (2016) は、8 種の CNC および 3 種の CNF を対象に、各ナノセルロースのアスペクト比や表面化学の変化、合成方法の違いによる生物への影響の違いを把握するために、ゼブラフィッシュ胚を用いて死亡割合、発達進行、形態学的異常、および生理学的機能について調査した。試験は Usenko et al. (2008) の繊毛を剥離した受精卵を用いた胚発生試験、および Truong et al. (2011) の 96 ウェルマイクロプレートを用いた急性胚毒性試験に準拠して実施された。すべての CNC において、設定最高濃度の 200 mg/L でも、ゼブラフィッシュの発育への有意な影響はみられなかった。CNF の毒性も全体的に低かったが、機械解繊法によって製造された Forest Products Laboratory 製の CNF は、250 mg/L で有意な死亡割合の増加および卵黄嚢と心嚢浮腫の上昇を示した。一方、TEMPO (2,2,6,6-テトラメチルピペリジン 1-オキシルの略称) による触媒酸化処理を施して解繊した Forest Products Laboratory 製の化学合成 CNF (TEMPO 酸化 CNF) および機械的に解繊して調製されたメイン大学の CNF は、250 mg/L でも有意な毒性を示さなかった。毒性の違いの原因として機械的処理の種類、セルロース材料の違い、精製方法および精製後の不純物などが考えられた。今後、様々な機械解繊手法で製造された CNF の毒性を比較し、観察された毒性の違いの原因を解明することが必要であることが示唆された。

Ong et al. (2017) は、リグニン被覆 CNF (L-CNF) およびリグニン被覆 CNC (L-CNC) を対象に、3 種の水生生物に対する影響を評価した。ムレミカヅキモの生長阻害試験 (OECD TG201) における L-CNF および L-CNC の無影響濃度 (No Observed Effective Concentration: NOEC) はそれぞれ 300 mg/L および 175 mg/L であった。オオミジンコの遊泳阻害試験 (OECD TG202) における L-CNF および L-CNC の無毒性量 (No Observed Adverse Effects Level: NOAEL) はそれぞれ 6000 mg/L および 7000 mg/L であった。Truong et al. (2011) に準拠したゼブラフィッシュの胚発生試験における L-CNF および L-CNC の半数致死濃度 (50% Lethal Concentration: LC50) は共に 2000 mg/L であった。これらの試験では、環境では起こりえない人工的に高濃度であっても、L-CNF および L-CNC のいずれも有害な影響はほとんど観察されなかった。

Ogonowski et al. (2018) は、漂白された未乾燥の針葉樹亜硫酸パルプから酵素前処理と機械的せん断および高圧ホモジナイザーにより製造した CNF を用いて、オオミジンコの食物摂取量、生存、成長および繁殖への影響を調査した。また、同一パルプをカルボキシメチル化した後に高圧流動化装置で解繊し蛍光標識した CNF により、オオミジンコが摂食した CNF の腸内滞留時間を調査した。急性毒性および繁殖への影響の調査は、OECD TG202 および TG211 に準拠して実施された。急性毒性試験においては、2000 mg/L という高濃度の CNF の暴露でも死亡は確認されなかった。急性毒性がみられなかった理由の 1 つとして、高濃度で CNF を添加した際に CNF の凝集の程度が高くなり、オオミジンコが利用可能な CNF の量に変化した可能性が考察された。一方で、CNF 濃度が > 1 mg/L では摂餌率が低下し、10~20 mg/L では最大で 8 倍の摂食阻害が見られた。CNF は餌が豊富な時は摂餌率を減少させるが、餌濃度が低いときはわずかではあるが摂餌率を増加させた。また、CNF の一部は消化され、成長と生殖をサポートするためのエネルギー源として利用された可能性が高いことが示唆された。カルボキシメチル化蛍光標識 CNF による腸内保持時間の調査では、60 分間で腸内の CNF 含量は 99%以上減少し、半減期は 28 分と推定された。

Wang et al. (2020) は、木材由来 CNC、綿由来の CNC および CNF を対象に、セネデスス属の藻類の生長阻害試験 (OECD TG201)、オオミジンコの遊泳阻害試験 (OECD TG202)、ゼブラフィッシュ胚の急性毒性試験 (OECD TG236) を実施した。10 mg/L の濃度において、いずれの材料においても、すべての生物種に対して急性毒性は観察されなかった。しかし、これらのナノセルロースは、3 種の水生生物に対して、比較的低濃度 (0.01~0.1 mg/L) から活性酸素の増加による酸化ストレスが認められた。金属ナノ粒子と比較すると、ナノセルロース材料は毒性が低い、低濃度でも酸化ストレスを誘発しやすいことが示唆された。

Liu et al. (2020) は、高圧ホモジナイズによって得られた CNF およびスイッチグラス由来のセルロース粉末から硫酸加水分解によって調製した CNC が、ゼブラフィッシュ胚に与える神経毒性を調査した。設定濃度区間 (0.1~30000 mg/L) において、死亡や奇形の用量依存的な増加は見られなかった。胚に 10 mg/L および 1 mg/L の CNF および CNC を暴露すると、胚内に CNF および CNC が高濃度に濃縮されていた。また、CNF および CNC を幼生へ暴露すると、突起伸長阻害、軸索誘導異常、および運動ニューロンの喪失という表現型の影響が表れ、その結果として運動能力の低下が確認された。一方で、血管は正常に形成されており、特異的な神経毒性を持つことが示唆された。また、運動ニューロンにおける CNF および CNC の神経毒性は、神経遺伝子の発現に起因している可能性が示唆された。この神経毒性については未知な部分が多く、成魚およびほかの生物を用いた試験や、表現型と遺伝子ネットワークの関係の検証など、より詳細な研究が必要であると考察された。

Pengrian et al. (2021) は、ケナフ由来 CNF の物理化学的特性を調査するとともに、オオミジンコおよびゼブラフィッシュに対する急性毒性を調査した。OECD TG202 および TG203 に準拠した 100 mg/L での限度試験が実施された。その結果、ケナフ由来 CNF は、100 mg/L においてオオミジンコの遊泳阻害を引き起こさず、ゼブラフィッシュにおいても異常や死亡を引き起こさなかった。

Kokol et al. (2023) は、ジアルデヒド CNF/CNC にヘキサメチレンジアミン (HMDA) を結合させたところ、水中で凝集および沈降傾向を示す、部分的に架橋されたマイクロサイズ (0.5~10 μm) の粒子 (CNF/CNC-ox-HMDA) を得られた。この開発に至るまでのすべての形態の CNF/CNC について、設定濃度 1~20 mg/L の範囲でオオミジンコの急性毒性試験 (ISO/TR 16197:2014) を実施した。20 mg/L の CNC-ox-HMDA では 85%、CNF-ox-HMDA では 56% の遊泳阻害が観察された。20 mg/L の CNC-ox に暴露した場合に遊泳阻害を示すミジンコの割合は最大 25%、同濃度の CNF-ox に暴露した場合の割合は 14%であったが、架橋されていない CNC では 13%、CNF では 14%以下であった。CNF/CNC-ox-HMDA の毒性は、アルデヒド基とアミノメチル化された表面基 (その結果、分散性が向上)、および、HMDA の結合 (両側架橋または片側グラフト化) の複合効果によるものであり、それらのサイズおよび表面特性を調節し、ミジンコ表面に吸着する可能性があることが結論づけられた。

Rusconi et al. (2024) は、TEMPO 酸化 CNF と非酸化処理 CNF の 2 種類を用いて、海産二枚貝類であるムラサキイガイに対する急性毒性試験を行った。試験では、現実的な暴露シナリオとして 0.001 mg/L、急性暴露シナリオとして 1 mg/L の CNF 暴露濃度が設定された。TEMPO 酸化 CNF は自然海水中で非酸化処理 CNF よりも高い分散性を示した。これは繊維間の反発力が負電荷とコロイド状有機物によって大きくなったためと考えられる。標識を付した TEMPO 酸化

CNF および非酸化処理 CNF の両方が、ムラサキイガイの組織（エラと血液リンパ）から検出され、血球のリソソーム膜の不安定化が観察された。TEMPO 酸化 CNF 暴露群におけるエラの P 糖タンパク質 (P-gp) 流出活性の阻害は、非酸化処理 CNF より強かった。コリン作動性酵素 (AChE 活性) は、CNF の酸化と濃度にかかわらず、血球、エラ、消化腺で阻害された。一方、消化腺とエラでは、酸化ストレスおよび代謝は影響を受けなかった。全体として、環境的に現実的な暴露シナリオであっても、ムラサキイガイによる TEMO 酸化 CNF および非酸化処理 CNF の取り込みと、機械的相互作用によるエラの機能と免疫細胞の破壊が認められた。

Esposito et al. (2024) は、ナノ構造セルローススポンジ (CNS) の浸出液がウニの繁殖に及ぼす環境安全性を評価するために、CNS の 3 つの主要成分である TEMPO 酸化 CNF、クエン酸、ポリエチレンイミンを対象として、ヨーロッパムラサキウニとクロウニの一種の卵の受精能力、精子の運動能力、胚発生に対する細胞毒性作用を個別にスクリーニングした。受精卵を TEMPO 酸化 CNF に暴露すると、ヨーロッパムラサキウニでは 100 mg/L から、クロウニの一種では 1000 mg/L から、正常幼生の割合が有意に減少した。それ以外では、TEMPO 酸化 CNF への両配偶体の事前暴露は、両ウニ種において精子の受精能力と卵の受精能力に影響を与えなかった。

CNF について、生物種ごとの主なエンドポイントに関する影響の有無と CNF 濃度の関係を表 8.2 にまとめる。藻類では、設定最低濃度である 1 mg/L でも影響が確認された事例が 2 例報告されており (Pereira et al., 2014; Munk et al., 2015)、他の生物と比較して低濃度で CNF の影響を受ける可能性が示唆された。一方、より高濃度でも影響が確認されなかったとする報告もあった (Wang et al., 2020; Ong et al., 2017)。オオミジンコの急性毒性試験では、20~40 mg/L でわずかに遊泳阻害がみられた報告 (Kokol et al., 2023; Vartiainen et al., 2011) がある一方、設定最高濃度でも影響がみられなかったとする報告が複数あった (Wang et al., 2020; Pengiran et al., 2021; Ogonowski et al., 2018; Ong et al. 2017)。オオミジンコの慢性毒性試験の報告は一つのみだが、最小毒性量 (Lowest Observed Adverse Effects Level: LOAEL) が 20.6 mg/L、無毒性量 (NOAEL) が 2.06 mg/L であった (Ogonowski et al., 2018)。ゼブラフィッシュの急性毒性試験では、250 mg/L で有意な死亡割合の増加および卵黄嚢と心嚢浮腫の上昇を示した研究があるが、同研究であわせて実施された別の 2 種の CNF は、250 mg/L でも影響が見られなかった (Harper et al., 2016)。また、その他の多くの報告では、設定最高濃度でも影響はみられなかった (Wang et al., 2020; Pengiran et al., 2021; Harper et al., 2016; Ong et al., 2017; Liu et al., 2020)。

OECD の TG では、ミジンコ繁殖試験における限度試験の暴露濃度は 10 mg/L と設定されている (OECD, 2012)。また、ミジンコ遊泳阻害毒性試験および魚類急性毒性試験における限度試験の濃度は 100 mg/L とされている (OECD, 2004; OECD, 2019b)。ミジンコや魚類を対象とした試験の多くは、これらの限度試験の最高濃度よりさらに高濃度での試験が実施されており、なおかつ最高濃度でも影響がみられなかったことから、これらの種に対する CNF の毒性は一般的な化学物質と比較して低いと考えられる。

表 8.1 ナノセルロース類の生態毒性データ（田井ら（2022）から引用、一部改変）

被験材料	試験生物	測定エンドポイント	毒性値および毒性情報※	出典
ナノ結晶セルロース (NCC)	ニジマス	魚類 致死	[LC50] >1000 mg/L (1,3,4)*, >10000 mg/L (8)	Kovacs et al. (2010)
	オオミジンコ	甲殻類 致死	[LC50] >1000 mg/L (1, 2c), 250 mg/L(2a), 320 mg/L(2b), 210 mg/L (3), >5000 mg/L (4, 5a, 5b, 6, 7, 8, 9, 12)	
	ニセネコゼ ミジンコ	甲殻類 致死	[LC50] >1000 mg/L (1), 140 mg/L (2a), 320 mg/L (2b), 300 mg/L (2c), 160 mg/L (3), >5000 mg/L (4, 5a, 5b, 6, 8, 9, 12), 430 mg/L (7)	
	ニセネコゼ ミジンコ	甲殻類 繁殖	[IC25] 200 mg/L (2c), >1000 mg/L (3, 4, 5a, 5b), 140 mg/L (6), >2000 mg/L (8, 10), 160 mg/L (9), >2000 mg/L (10)	
	ファットヘッド ミノー	魚類 繁殖	[IC25] 290 mg/L (7)	
	ムレミカツキモ	藻類 生長阻害	[IC25] 120 mg/L (4, pH: 2.3), >2500 mg/L (4, pH: 6.8)	
	ハウネンエビ目の 一種	甲殻類 致死	[LC50] 3540 mg/L (4, pH: 2.3), >13200 mg/L (4, pH: 6.8)	
	ゼブラフィッシュ	魚類 致死、亜急性/胚発生	[LC50] >6000 mg/L (8, 10), [IC ₅₀] >6000 mg/L (8, 10)	
	ニジマス	魚類 急性細胞毒性	[EC20] 34 mg/L (4), [EC ₅₀] 245 mg/L (4)	
微結晶セルロース (MCC)	オオミジンコ	甲殻類 遊泳阻害	40～600 mg/L で 15～35% 阻害	Vartiainen et al. (2011)
マイクロフィブリル化 セルロース (MFC)			40～600 mg/L で 15～25% 阻害	

被験材料	試験生物		測定エンドポイント	毒性値および毒性情報※	出典
綿由来 CNF	クロレラ	藻類	生長阻害	藻類の生長は、高イオン強度の Bold's Basal 培地で 24 時間目以降すべての濃度区(1, 50, 100 mg/L)で有意に減少し、セーヌ河の水試料で 96 時間後に 50 および 100 mg/L において有意に減少した。なお、Bold's Basal 培地およびセーヌ河の水試料で、試験開始から 72 時間後に生存する藻類の割合はすべての濃度で対照区に比べて有意に低下した。	Pereira et al. (2014)
綿由来 CNF	クレブソル ミディウム	藻類	生長阻害	すべての濃度区(1, 50, 100 mg/L)で、試験開始から 48 時間以降、有意な成長阻害がみられた。また、すべての濃度区でいずれかの時間に細胞生存割合の低下がみられた。	Munk et al. (2015)
化学装飾の異なる セルローズナノクリスタ ル (CNC) 8 種				設定最高濃度である 200 mg/L において、ゼブラフィッシュの発育に及ぼす有意な影響はみられなかった。	Harper et al. (2016)
CNF (機械解繊法、TEMPO 法)	ゼブラフィッシュ ふ化 6 時間後胚	魚類	致死、形態	Forest Products Laboratory 製 CNF2 種の内、機械解繊法による CNF は、対照区と比較して、250 mg/L で有意な死亡割合の増加および卵黄嚢と心嚢浮腫の上昇を示し、TEMPO 酸化 CNF よりも高い毒性を示した。一方で、同じく機械的に解繊して調製されたメイン大学の CNF は 250 mg/L で有意な毒性を示さなかった。	
リグニン被覆 CNF	ムレミカツキモ	藻類	生長阻害	[EC50] > 1200 mg/L, [NOEC] 300 mg/L	Ong et al. (2017)
	オオミジンコ	甲殻類	遊泳阻害、致死	[EC50] > 6000 mg/L, [NOAEL] 6000 mg/L	
	ゼブラフィッシュ	魚類	胚発生、致死、形態	[LC50] > 2000 mg/L	
リグニン被覆セルローズ ナノクリスタル (CNC)	ムレミカツキモ	藻類	生長阻害	[EC50] > 2800 mg/L, [NOEC] 175 mg/L	
	オオミジンコ	甲殻類	遊泳阻害、致死	[EC50] ~ 11000 mg/L, [NOAEL] 7000 mg/L	
	ゼブラフィッシュ	魚類	胚発生、致死、形態	[LC50] > 2000 mg/L	

被験材料	試験生物	測定エンドポイント	毒性値および毒性情報※	出典
漂白された未乾燥の針葉樹亜硫酸パルプから酵素前処理と機械的せん断および高圧ホモジナイザーにより製造した CNF	オオミジンコ	甲殻類	致死	設定最高濃度の 2060 mg/L でも 48 時間で死亡は観察されなかった。
			産仔数、親生存、初産日、親体長、幼体体長	0.206 mg/L：親ミジンコ体長は、対照区と比較して有意に増加 2.06 mg/L：累積産仔数と平均産仔数が有意に増加。 20.6 mg/L：12 個体中 3 個体の親ミジンコが死亡。産仔数ゼロ。親ミジンコ体長は、対照区と比較して、有意に減少。
			摂餌速度	CNF 濃度が 1 mg/L 未満の場合と、藻類濃度が 0.9 mg C/L 未満の場合では、わずかに有意な摂食促進効果が観察された。藻類濃度が > 0.9 mg C/L または CNF 濃度が > 1 mg/L では、摂餌率は急激に低下し、最高濃度（10～20 mg/L）では最大で 8 倍の摂食阻害が見られた。
カルボキシメチル化した後に高圧流動化装置で解繊し蛍光標識した CNF	オオミジンコ	甲殻類	腸内保持時間	60 分後、腸内の CNF 含量は 99%以上減少し、半減期は 28 分と推定された。
木材由来セルロースナノクリスタル（CNC）、綿由来の CNC および CNF	セネデスミス属の一種	藻類	生長阻害	いずれの測定エンドポイントに対して、設定最高濃度の 10 mg/L で影響はみられなかった。なお、これらのナノセルロースは、対象とした水生生物 3 種に対して、比較的低濃度（0.01～0.1 mg/L）で活性酸素の増加による酸化ストレスを引き起こした。
	オオミジンコ	甲殻類	遊泳阻害	
	ゼブラフィッシュ	魚類	致死	

Ogonowski et al. (2018)

Wang et al. (2020)

被験材料	試験生物		測定エンドポイント	毒性値および毒性情報※	出典
高圧ホモジナイズによって得られた CNF	ゼブラフィッシュ 幼生	魚類	致死、孵化、形態異常、遊泳能力	設定濃度区間（0.1～30000 mg/L）で、生存、孵化、形態に対する影響は見られなかった。幼生への暴露では、突起伸長阻害、軸索誘導異常および運動ニューロンの喪失という表現型の影響が表れ、その結果として運動能力の低下が確認された。	Liu et al. (2020)
スイッチグラス由来 CNC				設定濃度区間（0.1～30000 mg/L）で、生存、孵化、形態に対する影響は見られなかった。10 mg/L および 1 mg/L において、蛍光色素を付けた CNC が胚全体、幼生の脳および体幹に濃縮されていた。幼生への暴露では、突起伸長阻害、軸索誘導異常および運動ニューロンの喪失という表現型の影響が表れ、その結果として運動能力の低下が確認された。	
ケナフ由来 CNF	オオミジンコ	甲殻類	遊泳阻害	[EC50] > 100 mg/L	Pengiran et al. (2021)
	ゼブラフィッシュ	魚類	致死	[LC50] > 100 mg/L	
CNF	オオミジンコ	甲殻類	遊泳阻害	最高濃度の 20 mg/L において、遊泳阻害は 14%以下だった。	Kokol et al. (2023)
CNC				最高濃度の 20 mg/L において、遊泳阻害は 13%だった。	
ジアルデヒド CNF (CNF-ox)				最高濃度の 20 mg/L において、遊泳阻害は 14%だった。	
ジアルデヒド CNC (CNC-ox)				最高濃度の 20 mg/L において、遊泳阻害は 25%だった。	
ヘキサメチレンジアミン結合ジアルデヒド CNF (CNF-ox-HMDA)				最高濃度の 20 mg/L において、56%の遊泳阻害が観察された。	
ヘキサメチレンジアミン結合ジアルデヒド CNC (CNC-ox-HMDA)				[EC50] = 11.6 mg/L 最高濃度の 20 mg/L において、85%の遊泳阻害が観察された。	

被験材料	試験生物		測定エンドポイント	毒性値および毒性情報※	出典
非酸化 CNF	ムラサキイガイ	二枚貝類	体内への取り込み、 亜致死生物学的反応 (リソソーム膜の安定性、神経毒性、酸化ストレス、代謝)	TEMPO 酸化 CNF は生物利用可能性が高く、イガイ体内に容易に取り込まれた。	Rusconi et al. (2024)
TEMPO 酸化 CNF				非酸化 CNF および TEMPO 酸化 CNF の 0.001 mg/L 暴露濃度区で、暴露開始 15 分から 45 分の観察期間中に、リソソーム膜の不安定さが増加した。0.001 mg/L の TEMPO 酸化 CNF 暴露区でアセチルコリンエステラーゼ活性が対照区に比べて有意に低下した。0.001 および 1 mg/L において、非酸化処理 CNF 暴露群はエラの活動低下が見られた。	
TEMPO 酸化 CNF	ヨーロッパムラサキ ウニ	ウニ類	卵の受精能力、精子の運動能力、胚発生	配偶子の細胞内活性酸素レベルや受精能力には設定最高濃度（1000 mg/L）でも、影響を及ぼさなかった。100 および 1000 mg/L に 1 時間暴露した群では、対照区と比較して胚発生阻害が有意に上昇した。	Esposito et al. (2024)
	クロウニの一種				

LC50: 50% Lethal Concentration, 半数致死濃度
EC20: 20% Effective Concentration, 20%影響濃度
EC50: 50% Effective Concentration, 半数影響濃度
IC25: 25% Inhibitory Concentration, 25%阻害濃度
NOEC: No Observed Effective Concentration, 無影響濃度
NOAEL: No Observed Adverse Effects Level, 無毒性量
※「>」は、設定最高濃度で影響が確認されなかったことを示す。
* Kovacs et al. (2010)の毒性値における括弧内は batch 番号を示す。

表 8.2 生物種ごとの主なエンドポイントに関する影響の有無と CNF 濃度の関係

生物種 (エンドポイント)	出典	被験材料	影響の有無	CNF 濃度* [mg/L]	OECD TG No.
藻類 (慢性毒性：生長阻害**)	Pereira et al. (2014)	綿由来 CNF	あり	<1	
	Munk et al. (2015)	綿由来 CNF	あり	<1	
	Wang et al. (2020)	綿由来 CNF	なし	>10	201
	Ong et al. (2017)	リグニン被覆 CNF	なし	300	201
オオミジンコ (急性毒性：遊泳阻害、致死)	Kokol et al. (2023)	機械解繊 CNF	あり (14%以下)	20	
	Vartiainen et al. (2011)	MFC	あり (15~25%)	40-600	202
	Wang et al. (2020)	綿由来 CNF	なし	>10	202
	Pengiran et al. (2021)	ケナフ由来 CNF	なし	>100	
	Ogonowski et al. (2018)	機械解繊 CNF	なし	>2060	202
	Ong et al. (2017)	リグニン被覆 CNF	なし	>6000	202
オオミジンコ (慢性毒性：産仔数等)	Ogonowski et al. (2018)	機械解繊 CNF	なし	2.06	211
			あり	20.6	
ゼブラフィッシュ (急性毒性：致死、 胚発生、形態)	Harper et al. (2016)	機械解繊 CNF	あり	250	236
	Wang et al. (2020)	綿由来 CNF	なし	>10	
	Pengiran et al. (2021)	ケナフ由来 CNF	なし	>100	
	Harper et al. (2016)	機械解繊 CNF	なし	>250	
	Harper et al. (2016)	TEMPO 酸化 CNF	なし	>250	
	Ong et al. (2017)	リグニン被覆 CNF	なし	>2000	
	Liu et al. (2020)	機械解繊 CNF	なし	>30000	

*「>」は設定最高濃度でも影響が確認されなかったことを、「<」は設定最低濃度でも影響が確認されたことを示す。

**対照区と濃度区で生長速度を比較して慢性毒性値の NOEC を算出する手法による影響評価の結果を示す。

8.3 CNF の生態リスク評価

現時点における CNF の生産量は、国内外いずれにおいても環境中への流出および生態系への影響が懸念されるほどではない。一方で、今後の生産量の拡大を鑑みると、事業者が安全性を担保するためには、事業場から環境へ流出した CNF の生態リスクを予測・評価できることが望ましい。一般的に生態リスク評価では、環境中濃度を予測するための「暴露評価」、および、生物または生物群集に対する有害性を定量化するための「生態影響（有害性）評価」という二つの評価過程を経て、生態リスク判定を行う。このとき、暴露評価では予測環境中濃度（Predicted Environmental Concentration: PEC）、生態影響評価では予測無影響濃度（Predicted No-Effect Concentration: PNEC）を算出することを目的としている。一般的な化学物質において PEC を算出する際は、生産量や実際の環境濃度のデータを基に算出する。CNF に関しては、流出量の情報が存在しない。また、セルロース類は植物の構成要素でもあり、環境中に自然に存在するため、環境中への流出後に自然由来か人為由来かを判断することは極めて困難である。PNEC に関して、前節に記載したように、情報が少ない現状がある。そのような中で、Stoudmann et al. (2019) は、動的確率論的マテリアルフロー解析（Dynamic probabilistic material flow analysis : DPMFA）を用いて PEC を計算し、確率論的な種の感受性分布（Probabilistic species sensitive distribution : PSSD）を用いて PNEC を導出し、リスク判定を行っている。種の感受性分布とは、生物種の感

受性がある統計分布に従うという経験則的な仮定の下に、様々な種の感受性の違いを分布の形で表したもので、化学物質の生態リスク評価を実施する際に一般的に用いられている評価方法である。これらの手法を用いて計算された PEC および PNEC は、単一の値ではなく、確率分布として求められるのが特徴である。図 8.1 に、本手法におけるリスク評価の概念図を示す。PEC および PNEC の確率分布が重なった範囲がリスク特性比（risk characterization ratio : RCR）として算出される。分布が重ならない場合は、リスクは無いまたは極端に小さいと考えられる。

本節では、Stoudmann et al. (2019) における PEC および PNEC の導出方法および結果の概要を紹介する。

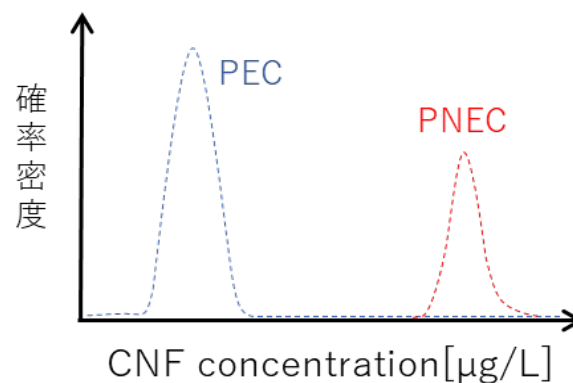


図 8.1 確率論的なリスク評価の概念図

動的確率論的のマテリアルフロー解析から算出した予測環境中濃度（PEC）および確率論的な種の感受性分布から導出した予測無影響濃度（PNEC）の各分布が交差した面積がリスク特性比（RCR）を表す。

8.3.1 予測環境中濃度（PEC）の算出

Stoudmann et al. (2019) の評価では、ヨーロッパにおける 2000 年から 2025 年のナノセルロース類が対象とされた。まずは、動的確率論的のマテリアルフロー解析を実施するにあたって必要なパラメータが既往文献から収集された。これには、生産量の将来予測を行っている市場調査レポート等が含まれる。次に、収集したデータは環境（大気、水、底質）および技術（生産、製造・消費、下水処理、ごみ焼却、埋立、再生産、除去・輸出）コンパートメントに分類された。その後、世界におけるナノセルロース類の市場規模および市場拡大予測から、生産量の成長率と EU におけるシェアの規模が決定された。各コンパートメントへの移行係数は、ナノセルロース類については有効なデータがないため、他のナノ材料に対する既往研究に基づいて設定された。収集された各データは不確実性が高いことから、ベイズ推定を用いて伝搬させることで、ナノセルロース類に対する信頼性の高い環境中濃度が予測された。さらに、与えられた分布に基づいてモンテカルロシミュレーションにより PEC の分布が推定された。一連の解析は、dpmfa-simulator (<https://pypi.org/project/dpmfa-simulator/>) によって計算された。この結果、2005 年時点では平均で 1,405 t だった生産量は、2025 年には平均で 30,603 t まで増加することが予測された。環境コンパートメントのうち、土壌への流入量が最も多かった。表層水への流入量は各コンパートメントの中で最も少なく、EU 全土への年間流入量は平均で 150 t 程度であった。

8.3.2 予測無影響濃度（PNEC）の算出

表層水における PNEC は、Coll et al. (2016) および Wigger et al. (2020) を参考に、モンテカルロシミュレーションによって確率分布で算出された。収集可能なデータの対象となる生物種が少数の場合、PSSD を作成することによって、データの不確実性を適切に反映した PNEC を算出することができる。PNEC を算出するために、まずは個々の種における半数影響濃度（50% Effective Concentration: EC50）等の影響濃度が収集された。このとき、淡水、大気および土壌のいずれかにおいて CNF に暴露された生物種の、生長、生存、および繁殖への影響を調査した *in vivo* 試験（生物個体を使用した試験）のみを対象とした。その後、単一の毒性エンドポイントを使用するのではなく、各生物種に対する感度分布を作成するために、利用可能な毒性値はすべて確率密度関数で表された。図 8.2 に概念図を示す。得られた各生物種に対するエンドポイントは、暴露期間および用量反応関係を補正する 2 種類の係数を用いて NOEC に変換された。これらのすべての感受性分布を合成して形成された、表層水におけるコンパートメント全体の PSSD の 5 パーセンタイル値を、欧州化学物質庁（ECHA）のガイドラインに沿って PNEC とした。

文献調査の結果により、PSSD 基準を満たす 5 報の既往文献（Harper et al., 2011; Kovacs et al., 2010; Ogonowski et al., 2018; Ong et al., 2017; Wang et al., 2020）の生態毒性データが収集された。内訳は 8 生物種と 76 のエンドポイントで、すべて表層水を対象としていた。なお、ここで採用されていた 5 報は、すべて表 8.1 に含まれている。これらのデータを用いて PSSD が作成された。この PSSD の 5 パーセンタイル値を使用した結果、PNEC 確率密度分布の平均値は 7.69 mg/L、最頻値は 2.11 mg/L であった。

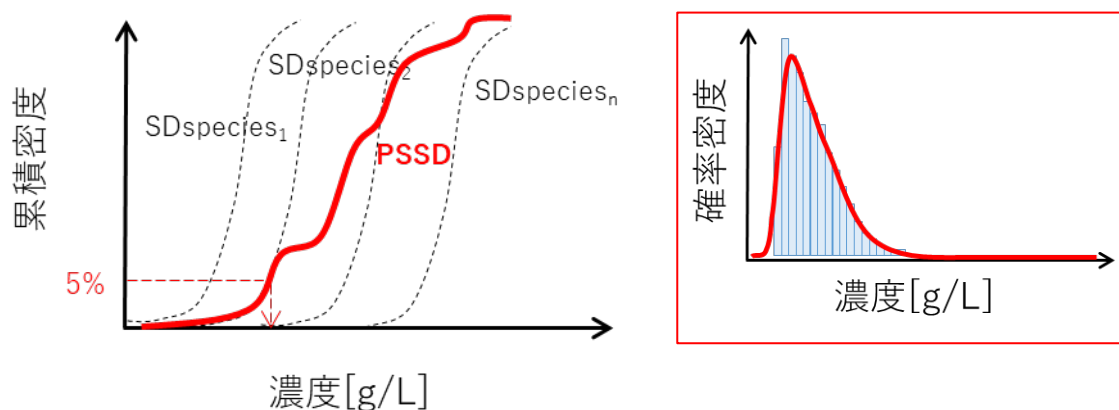


図 8.2 特定の環境コンパートメントの確率論的な種の感受性分布（PSSD）をモデル化した概念図

各生物種に対するモンテカルロシミュレーションの結果である各 SSD を合成して PSSD を作成する。PNEC は PSSD から得られた 5% 影響濃度を用いて算出される。このとき、得られた PNEC も分布をとる。赤枠は PSSD の 5 パーセンタイル値を用いた PNEC 分布の概念図を示す。

8.3.3 リスク判定

2015 年および 2025 年の PEC 分布は動的確率論的マテリアルフロー解析 (DPMFA) から得られた、各年の表層水中のナノセルロースの質量に基づいて計算された。表層水コンパートメント内のナノセルロースの質量を、EU 全土の表層水の体積で除することで、環境中濃度が計算された。PEC および PNEC の分布からリスク特性比 (RCR) が算出された。その結果、2015 年の PEC 分布と PNEC 分布は重なった範囲が狭く、RCR の平均値は 6.9×10^{-5} と算出されたことから、2015 年時点でのリスクは無いと判断された。また、2025 年の PEC 分布を用いた RCR の平均値は、 7.1×10^{-4} と算出された。2015 年と比較すると、2025 年の流出量が増加したことによって、PEC 分布の峰が PNEC 分布に近づいた結果、RCR も若干上昇したが、表層水中 CNF の水生生物に対する生態リスクは極めて小さいという結果が得られた。

本結果は EU を対象としたものであるが、日本のケースで計算した場合においても、ほぼ同様の結果になると推察される。これは数少ない生態毒性データに基づく結果ではあるが、今後、生態毒性データが蓄積されていくことで、より信頼性の高い推定ができるようになる。

8.4 NEDO 委託事業の成果

8.4.1 取り組みの概要

NEDO 委託事業 (2020~2024 年度) では、生態リスク評価における生物または生物群集に対する有害性を定量化するための「生態影響評価」に焦点を当て、淡水水生生物に対する CNF の生態影響評価値の導出を行った。本節では、その取り組みの概要を紹介する。

CNF が環境に流出した場合、流出先の水環境の水質によって、水生生物への CNF の暴露可能性は異なってくると考えられる (田井ら, 2022)。例えば、環境水中のカルシウムやマグネシウムなどのイオンにより、CNF は凝集、沈殿しやすくなり、水中に生息する水生生物への暴露可能性は低下することが考えられる。そのため、さまざまな水質の水環境ごとに CNF の生態影響を詳細に評価することが求められる。しかしながら、多種多様な水質条件で生態影響評価を実施するには、多大な時間と労力を必要とする。そこで、NEDO 委託事業では、特定の水質の水環境を想定せずに、試験培地の水質条件により CNF の性状が大きく変化せず、暴露期間中に CNF が可能な限り安定して分散する条件で生態毒性試験を実施した。この評価結果は、今後、特定の水環境を想定した CNF の生態影響評価および生態リスク評価を実施するための基礎的な知見を提供する。

CNF の生態毒性試験を実施した既報文献の収集および整理した結果から、CNF の生態毒性試験を実施する上で、いくつかの留意点が抽出された (田井ら, 2022)。CNF の生態毒性試験の結果を報告している既報研究では、製法の違いにより、CNF の種類によって水生生物に対する生態影響が異なると推察される事例がみられた。また、凝集や沈殿といったナノ材料の物理的な特性を考慮して CNF の暴露を把握するための測定および分析を十分に実施している研究例はみられなかった。既報研究の事例とナノ材料の生態毒性試験方法に関する OECD のガイダンス文書 GD317 で言及されている項目から、CNF の生態毒性試験を実施する際に、試験期間中、CNF が試験分散液中で時空間的に安定して分散していることを評価することが重要であることが示唆された。さらに、CNF 特有の留意点として、供試生物による CNF の取り込み (摂餌率の減少、CNF 濃度の低下)、CNF への吸着に伴う栄養塩の枯渇、藻類を用いた試験における藻類存在量の測定への CNF の干渉、CNF の濃度測定への供試生物 (主に藻類) や餌 (主にミジンコの餌のクロレ

ラ)の干渉、真菌や細菌および防腐剤の影響などがある。適切に CNF の生態毒性試験を行うためには、これらの留意点を考慮して、CNF ごとに生態毒性試験の方法を確立することが求められる。

NEDO 委託事業における生態影響評価の研究フローを図 8.3 に示す。まず、CNF 濃度の測定方法を確立するため、分析効率が良く、供試生物や餌による干渉を受けない測定方法を検討した。次に、評価対象の CNF ごとに、藻類、ミジンコおよび魚類を用いた短期および中長期の CNF 暴露による生態毒性試験を対象に、試験方法を確立した後に、試験を実施し、CNF の生態毒性値を取得した。対象とした CNF の内、沈殿しやすく、ミジンコを用いた中長期の暴露試験の実施が難しい CNF については、底生動物のヨコエビを用いた生態毒性試験を実施した。実施した生態毒性試験の種類を表 8.3 に示す。その後、取得した生態毒性値を基に、CNF の生態影響評価値として予測無影響濃度 (PNEC) を導出した。被験材料としては、製法の異なる 4 種類の CNF (TEMPO 酸化 CNF、機械解繊 CNF (水中対向衝突法)、機械解繊 CNF (ウォータージェット法)、リン酸エステル化 CNF) を使用した。次節以降では、研究フローのそれぞれの成果を概説する。

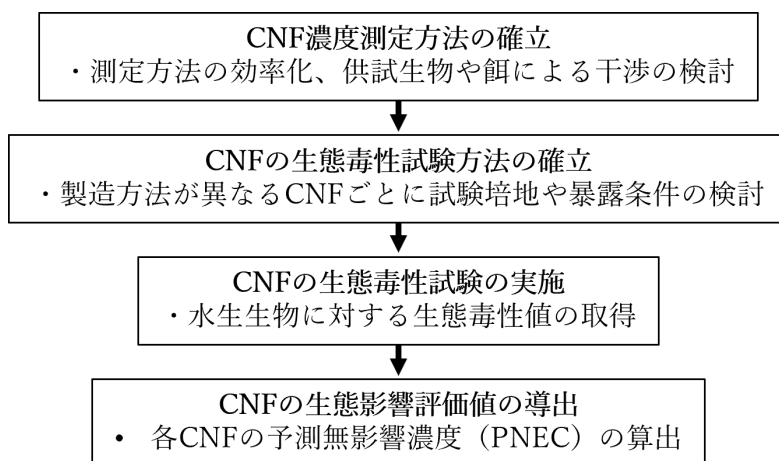


図 8.3 生態影響評価の研究フロー

表 8.3 NEDO 委託事業で実施した生態毒性試験

生態毒性試験	OECD TG No.	毒性の種類	試験生物	測定項目
藻類生長阻害試験	201 ^a	急性/慢性	ムレミカヅキモ	生長速度
ミジンコ遊泳阻害試験	202 ^b	急性	オオミジンコ	遊泳行動
魚類急性毒性試験	203 ^c	急性	メダカ	生存
ミジンコ繁殖試験	211 ^d	慢性	オオミジンコ	累積産仔数
ヨコエビ亜慢性毒性試験	- ^e	亜慢性	ヨコエビ	生存・成長
魚類初期生活段階 毒性試験	210 ^f	慢性	メダカ	生存

^aOECD (2006), ^bOECD (2004), ^cOECD (2019b), ^dOECD(2012), ^eOECD TG が存在しないため U.S.EPA (2000) を参照, ^fOECD (2013a)

8.4.2 CNF 濃度測定方法の確立

CNF は凝集・沈降しやすいため、CNF の生態毒性試験を適切に実施するためには、試験水溶液中の CNF の濃度や分散状態の確認が重要となるが、既存の報告では CNF の濃度は測定されてなく、確立した測定法がなかった。そこで、生態毒性試験を実施するにあたり、試験水溶液中の CNF を定量する方法として、簡易・安価で、多検体の測定に適した分析法を目指し、2 つの方法を検討・確立した（図 8.4）。

一つ目は、糖類の分析に用いられているフェノール硫酸法をマイクロプレートで行えるように改良した方法である。CNF を硫酸で分解し、フェノールで呈色させて、分光光度計で吸光度を測定することにより CNF を定量する。マイクロプレートを利用することにより、試薬の使用量を減らすとともに多検体一斉分析を可能にした。従来のフェノール硫酸法では、試験管を用いて硫酸を入れた際の反応熱を利用して反応を進めるが、マイクロプレートを利用した場合には、液量が少なく反応に伴う熱の発生が小さいため、サーマルミキサーで 90℃ に加熱して反応を進める改良をした。また、従来のフェノール硫酸法では、フェノールを硫酸よりも先に入れるが、フェノールは硫酸を入れて加熱した後に入れる方がより呈色が進むことが分かった。本方法は、糖類を測定する方法であり、セルロースだけを選択的に測定できる方法ではないが、生態毒性試験の水溶液のように糖類がほとんど存在しない試料では、添加した CNF の測定が可能である。詳細については、Ogura et al. (2023) を参照されたい。

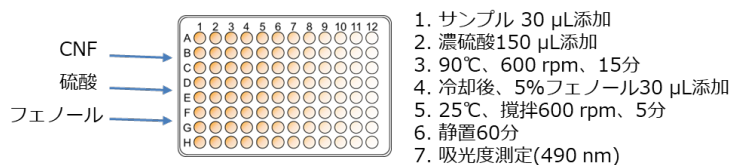
二つ目の方法は、酵素（セルラーゼ）を用いて CNF をグルコースに分解し、グルコースアッセイキットを用いて分光光度計でグルコースを定量する方法である。市販のセルラーゼは、グルコースなどの不純物を含んでいたため、あらかじめ精製した。検討した 3 種のセルラーゼの中で Merck 社の Cellic CTec2 が CNF の分解に適していた。本方法は、セルロースを選択的に測定できる方法であり、夾雑物の影響を受けにくい。詳細については、小倉ら (2020)、Matsuzawa et al. (2024) を参照されたい。

生態毒性試験の水溶液には、培地成分、対象生物、餌や老廃物が含まれているが、いずれの方法も試験水溶液中の機械解繊 CNF、TEMPO 酸化 CNF、リン酸エステル化 CNF の定量に利用できることを確認した。ただし、藻類試験の藻類は、構成成分としてセルロースを含んでおり、72 時間後の増殖時には、CNF の定量に干渉することから、その寄与を差し引くなどの対処が必要であることが分かった（8.4.3.4 節参照）。酵素分解法の方が、藻類の干渉は小さかった。ミジンコの餌のクロレラの干渉は濃度的に問題なかった。

いずれの方法も、分光光度計（マイクロプレートリーダー）で測定が可能で、他に高価な分析装置を使用しない方法である。フェノール硫酸法は、フェノールおよび硫酸といった劇物を使用する必要がある。一方、酵素分解法で用いるグルコースアッセイキットは、試薬としては高価である。定量下限はフェノール硫酸法が 10 mg/L 程度であるのに対し、酵素分解法が 1 mg/L 以下であった。フェノール硫酸法の方がより簡易・安価であるのに対し、酵素分解法の方がより感度が高く、夾雑物の影響も小さかった。これらの方法は、濃度や夾雑物によって使い分けするのが良いと考える。NEDO 委託事業の生態毒性試験では、12.5 mg/L 以下の CNF は酵素分解法を、25～100 mg/L の CNF はフェノール硫酸法を用いて定量した。

なお、両方法は、CNF のみならず、一般のセルロース分析の用途にも適用可能な方法である。

方法1：硫酸分解→フェノールによる呈色→吸光度測定<高濃度域>



方法2：酵素分解→グルコース測定 <低濃度域>

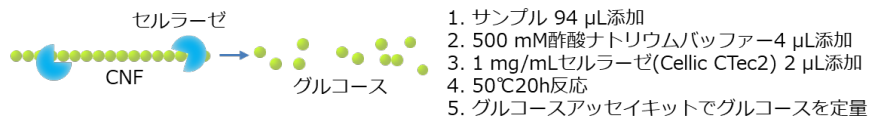


図 8.4 生態毒性試験のための CNF 濃度の分析法

8.4.3 CNF の生態毒性試験方法の確立

8.4.3.1 培地の選択および CNF 分散液の安定性評価

生物の生育には、培地中の栄養塩が必要であるが、イオン濃度が高くなるほど CNF は凝集・沈降しやすくなるため、CNF の分散安定性の観点からは、イオン濃度が低い培地が望ましい。そこで、ミジンコおよびメダカの生態毒性試験の培地について、生物の生長や生存および繁殖に影響を与えない程度に低いイオン濃度の試験培地を選択し、各 CNF の分散安定性を評価した。

一例として、イオン濃度が異なる培地に添加した TEMPO 酸化 CNF の分散安定性の評価結果を図 8.5 に示す。一般的な培地として、米国環境保護局 (U.S.EPA) が公表している「中硬度人工水」と、それよりイオン濃度が低い培地として、U.S.EPA が公表している「低硬度人工水」に脱塩素水道水を 8:2 の割合で混合した培地 (8:2 混合水) を比較したところ、8:2 混合水では、TEMPO 酸化 CNF はほぼ安定に分散していることが確認された。よって、8:2 混合水を試験で使用する事とした (Tai et al., 2024a)。

リン酸エステル化 CNF では、8:2 混合水だと分散安定性が若干悪かったため、低硬度人工水と脱塩素水道水を 9:1 で混合した培地 (9:1 混合水) を使用することとした。

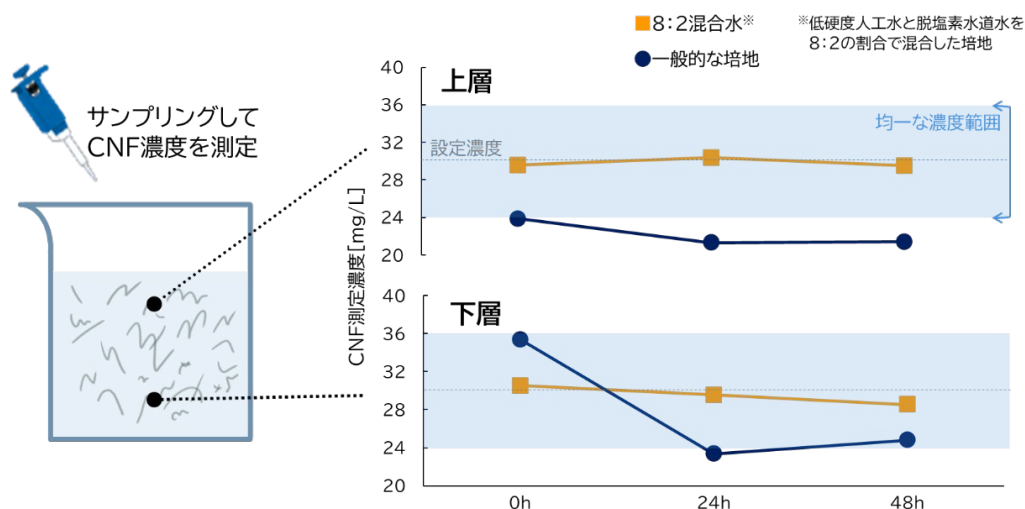


図 8.5 TEMPO 酸化 CNF を対象とした試験培地の検討と濃度均一性の調査

CNF の設定濃度は 30 mg/L とした。濃度は $\pm 20\%$ の範囲にあることが望ましい。

機械解繊 CNF でも、同じく 9:1 混合水を使用することとした。ただし、静置条件では CNF の沈殿が確認されたため、生物の生存に影響を及ぼさないで CNF の分散性を高める条件を検討した。その結果、生態毒性試験期間中、ミジンコ遊泳阻害試験においては 100 rpm で水平回転振とう、メダカ急性毒性試験では 150 rpm でスターラー攪拌することとした。

なお、藻類の生長阻害試験については、OECD TG201 で培地の成分や攪拌条件が定められているため、それに準じた (OECD TG201, 2011)。

8.4.3.2 CNF への吸着に伴う栄養塩の低下

TEMPO 酸化 CNF では、試験培地の栄養塩が CNF に吸着することによって、培地中の栄養塩濃度の低下がみられた (Tai et al., 2024a, b)。同様にリン酸エステル化 CNF についても培地中の栄養塩濃度の低下がみられた。ただし、栄養塩濃度の低下による藻類の生長および生物の生存への影響は認められなかった。機械解繊 CNF では栄養塩濃度の低下はみられなかった。

8.4.3.3 藻類を用いた試験における藻類存在量の測定への CNF の干渉

藻類生長阻害試験において、藻類の生長速度を導出するためには、試験前後の藻類密度の増減から、藻類の増殖率を算出する必要がある。しかし、試験分散液中の CNF の存在が、藻類密度の測定の際に干渉する可能性がある。特に細胞数の計測に一般に用いられる粒子計数装置では、CNF をカウントしてしまう可能性がある。そこで、藻類がもつクロロフィル量を直接測定する方法である *in vivo* 蛍光測定法、および、有機溶媒を用いて試験溶液の抽出液中のクロロフィルの蛍光を測定する *in vitro* 蛍光測定法を用いることとし、それらの測定に対する CNF の測定干渉を確認した。その結果、TEMPO 酸化 CNF に対してどちらの測定方法も利用できることが確認された (Tai et al., 2024b)。同様に、リン酸エステル化 CNF に対してもどちらの測定方法も利用できることが確認された。一方、機械解繊 CNF では、*in vitro* 蛍光測定法が藻類密度測定に適していることが確認された。

8.4.3.4 CNF の濃度測定への供試生物や餌の干渉

藻類の細胞密度は経時的に増加するため、セルロースを含有する藻類は CNF 濃度の測定に干渉する可能性が高い。実際に培養開始 72 時間後の増殖時の藻類は CNF の測定にわずかに干渉したが、この課題は、増殖分の藻類密度を差し引くことで解決した (Tai et al., 2024b)。まず、対照区の藻類密度と藻類の CNF 相当濃度を測定した。藻類密度から CNF 相当濃度を除すことで、1 細胞当たりの CNF 相当濃度を算出し、これに 72 時間後における各濃度区の細胞密度に乘じることで、各濃度区での藻類由来の CNF 相当濃度を算出した。この値を各濃度区の CNF 濃度から差し引いた。図 8.6 に、TEMPO 酸化 CNF の藻類生長阻害試験における測定干渉と、干渉した藻類由来の CNF を差し引いた後の濃度を示す。その他の CNF に関しても同様の操作を行った。

ミジンコの繁殖試験での餌であるクロレラ（藻類の一種）に関しては、CNF の測定に影響を及ぼさなかった (Matsuzawa et al., 2024)。

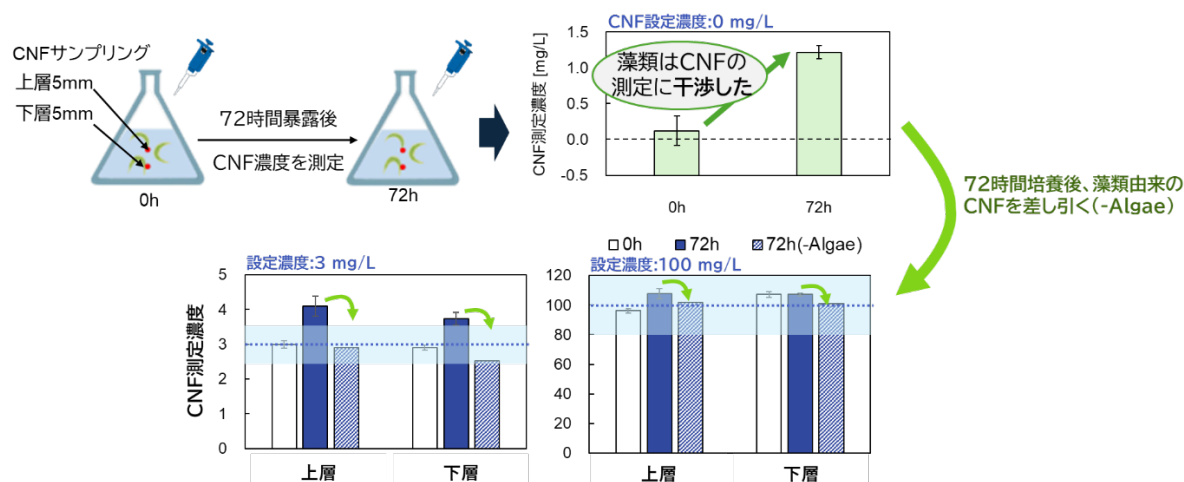


図 8.6 TEMPO 酸化 CNF の藻類生長阻害試験における CNF 測定濃度への藻類の干渉と補正
試験開始時(0h)および 72 時間培養後(72h)の CNF 濃度を測定した。72 h (-Algae)は、72 時間培養後の CNF 測定濃度から藻類由来の CNF 相当濃度を差し引いて得られた CNF 濃度を示す。

8.4.3.5 真菌や細菌および防腐剤の影響の考慮

CNF に真菌や細菌が繁殖することを防ぐため、滅菌処理を検討した。医薬品等に使用される一般的な防腐剤である 2-フェノキシエタノールは、滅菌可能な濃度レベルでオオミジンコに影響があることを確認した (Mano, 2021)。1 kGy のガンマ線は、CNF の形態や特性に大きな影響を与えず滅菌できることが確認できた (Horie et al., 2023; Ogura et al., 2025) ため、被験材料としたすべての CNF は 1 kGy のガンマ線を照射して滅菌した。

8.4.4 CNF の生態毒性試験の結果

NEDO 委託事業で実施した 4 種類の CNF (TEMPO 酸化 CNF、機械解繊 CNF (水中対向衝突法)、機械解繊 CNF (ウォータージェット法)、リン酸エステル化 CNF) の生態毒性試験の結果を表 8.4 にまとめて示す。太字の毒性値は CNF の種類ごとの最小の毒性値を示す。試験区の CNF 設定濃度は、基本的に 0、3.1、6.3、12.5、25、50 および 100 mg/L としたが、ほとんどの試験で設定最高濃度の 100 mg/L においても影響は認められなかった (EC_{50} , $LC_{50} > 100$ mg/L, $NOEC \geq 100$ mg/L)。しかし、TEMPO 酸化 CNF を用いたオオミジンコ繁殖試験では、25 mg/L 以上の濃度区において、累積産仔数が対照区より有意に低下したため、 $NOEC$ 値は 12.5 mg/L と算出された。この要因として、高濃度の CNF に暴露されたオオミジンコが CNF を過剰摂食して腸管に取り込むことで、餌であるクロレラの取り込みが減少することにより、成長・繁殖が低下することが示唆された (Mano et al., 2025)。ただし、100 mg/L の CNF に 24 時間暴露させた後、クロレラを添加した CNF を含まない試験培地で 24 時間飼育すると、腸管内の CNF は排泄された。このことから、継続的に高濃度の CNF に暴露されなければ、CNF によるオオミジンコの繁殖への影響は生じないと考えられた。NEDO 委託事業では、TEMPO 酸化 CNF 以外の CNF についてのオオミジンコ繁殖試験の結果が得られておらず、他の CNF でも同様の現象が起こるかどうかは分からないが、機械解繊 CNF を用いたオオミジンコ繁殖試験でも同様の報告 (Ogonowski et al., 2018) があり、20.6 mg/L で産仔数の低下、10~20 mg/L で摂餌率の大幅な低下がみられてい

る。よって、この影響は CNF の種類によらない可能性がある。また、オオミジンコの摂餌率の低下は、ポリスチレン粒子（濃度 1 mg/L、サイズ 100 nm または 2 μ m）でも認められており（Rist et al., 2017）、CNF だけに特有の影響ではないと考えられる。

参考までに、国連が組織する海洋環境保護の科学的側面に関する専門家会合(GESAMP)が2019年に公表した報告書（GESAMP, 2019）における化学物質の毒性値の格付け表を基に、試験により求められた CNF の生態毒性値を評価した。表 8.5 は、GESAMP（2019）による急性毒性値の格付け表を示す。表 8.4 に示す CNF の急性毒性値は、格付け 1 の「ほとんど無毒性」に該当した。また、表 8.6 は、GESAMP（2019）による慢性毒性値の格付け表を示す。表 8.4 に示す CNF の慢性毒性値は、格付け 0 の「無視できるほど小さい」に該当した。

以上のように、GESAMP（2019）による格付け表を基に、本 NEDO 事業において現時点で実施済みの生態毒性試験の結果から求められた急性および慢性毒性値を評価すると、対象とした CNF の毒性は低いと考えられた。

表 8.4 NEDO 委託事業で得られた CNF の生態毒性値

生態毒性試験	毒性の種類	毒性値	TEMPO 酸化	機械解繊		リン酸 エステル化
				水中対向衝突 法	ウォーター ジェット法	
藻類生長阻害 試験	急性	EC50	> 100 mg/L ^a	> 100 mg/L	> 100 mg/L	解析中
	慢性	NOEC	≧ 100 mg/L ^a	≧ 100 mg/L	≧ 100 mg/L	解析中
ミジンコ遊泳 阻害試験	急性	EC50	> 100 mg/L ^b	> 100 mg/L	> 100 mg/L	> 100 mg/L
魚類急性毒性 試験	急性	LC50	> 100 mg/L ^b	> 100 mg/L	> 100 mg/L	> 100 mg/L
ミジンコ繁殖 試験	慢性	NOEC	12.5 mg/L^c	—	—	解析中
ヨコエビ亜慢 性毒性試験	亜慢性	NOEC	—	—	解析中	—
魚類初期生活 段階毒性試験	慢性	NOEC	≧ 100 mg/L	—	—	—
取得した（取得中の）慢性毒性値の数			3	1	1(1)	0(2)
取得した（取得中の）急性毒性値の数			3	3	3	2(1)

太字の毒性値は CNF の種類ごとの最小の毒性値を示す。

^aTai et al. (2024b), ^bTai et al. (2024a), ^cMano et al. (2025)

表 8.5 GESAMP(2019)における急性毒性値の格付け表

格付け (Rating)	説明(Description)	毒性値 (EC50 または LC50) (mg/L)
0	無毒性 (Non-toxic)	1000 より大きい
1	ほとんど無毒性 (Practically non-toxic)	100 より大きく 1000 以下
2	わずかな毒性 (Slightly toxic)	10 より大きく 100 以下
3	中程度の毒性 (Moderately toxic)	1 より大きく 10 以下
4	強い毒性 (Highly toxic)	0.1 より大きく 1 以下
5	とても強い毒性 (Very highly toxic)	0.01 より大きく 0.1 以下
6	極めて強い毒性 (Extremely toxic)	0.01 以下

表 8.6 GESAMP(2019)における慢性毒性値の格付け表

格付け (Rating)	説明(Description)	毒性値 (NOEC) (mg/L)
0	無視できるほど小さい (Negligible)	1 より大きい
1	小さい(Low)	0.1 より大きく 1 以下
2	中程度(Moderate)	0.01 より大きく 0.1 以下
3	大きい(High)	0.001 より大きく 0.01 以下
4	とても大きい(Very high)	0.001 以下

8.4.5 予測無影響濃度の導出

今後、CNF を取り扱う事業者が事業場から環境に流出した CNF の生態リスクを自主的に予測・評価するためには、事業場で予定される生産量等の情報から推定した環境への CNF の流出量と比較するための CNF の生態影響評価値、すなわち予測無影響濃度 (PNEC) が必要である。そこで、化審法における優先評価化学物質に関するリスク評価ガイダンス (厚生労働省・経済産業省・環境省 2014) を参考にし、NEDO 事業で得られた成果を基に、対象とした 4 種類の CNF (TEMPO 酸化 CNF、機械解繊 CNF (水中対向衝突法)、機械解繊 CNF (ウォータージェット法)、リン酸エステル化 CNF) ごとの毒性値をデータの拡充度に応じた不確実係数積で割ることで PNEC を求めた。

試験生物を用いた室内の試験結果から得られた毒性値を、野外の環境中に生息する生物への影響をみるために用いることや試験期間などから生じる様々な不確実性を考慮するため、不確実係数を検討する必要がある。化審法における優先評価化学物質に関するリスク評価ガイダンスで使用されている水生生物に対する予測無影響濃度の導出に用いる不確実係数および不確実係数積を表 8.7 に示す。不確実係数積は、生態毒性データの拡充度によって決定される。表 8.4 に示したデータの拡充度に基づくと、TEMPO 酸化 CNF の不確実係数積は 10、機械解繊 CNF の不確実係数積は 100 となった。また、リン酸エステル化 CNF の不確実係数積は、採用する毒性値の生物種に依存し、ミジンコへの毒性を採用する場合の不確実係数積は 1000 となり、魚類への毒性を採用する場合の不確実係数積は 10000 となるが、保守的に生態影響を評価するため、不確実係数積 10000 を採用した。

CNF ごとの最小の毒性値 (表 8.4) を不確実係数積で割った PNEC は、TEMPO 酸化 CNF で 1.25 mg/L (最小の毒性値 12.5 mg/L ÷ 不確実係数積 10)、機械解繊 CNF で ≥ 1 mg/L (最小の毒性値 ≥ 100 mg/L ÷ 不確実係数積 100)、リン酸エステル化 CNF で > 0.01 mg/L (最小の毒性値

>100 mg/L ÷ 不確実係数積 10000) と求められた。ただし、リン酸エステル化 CNF の PNEC は 2 種類の急性毒性値のみから求められており、現時点で取得した生態毒性データの数が少ないことに起因する高い不確実係数積が PNEC に大きく影響している。そのため、現時点で解析中の生態毒性データを加えて、PNEC を改めて求める必要がある。3 種類の CNF の PNEC を化審法の化学物質のスクリーニング評価の生態に係る有害性クラス (有害性が高い方から 1、2、3、4、クラス外の 5 分類) に適用した場合、TEMPO 酸化 CNF および機械解繊 CNF はクラス外に判定された。リン酸エステル化 CNF は 3 に判定された。有害性クラス 3 を示す一般的な化学物質は、国内の排出量合計が 1000 t 以下の場合、化審法におけるスクリーニング評価において生態リスクは懸念されないと判定され、より詳細な生態リスク評価の実施は求められない。

表 8.7 不確実性の要因と不確実係数 (UF) ^a

採用する毒性値	種間外挿の UF	急性から慢性 への UF	室内試験から 野外への UF	不確実係数積 UFs
3 つの栄養段階の慢性毒性値がある場合の最小の慢性毒性値	-	-	10	10
2 つの栄養段階の慢性毒性値がある場合の小さいほうの慢性毒性値	5	-	10	50
1 つの栄養段階の慢性毒性試験結果がある場合の NOEC	10	-	10	100
3 つの栄養段階の急性毒性値がある場合の最小の急性毒性値	-	ACR ^b	10	10 × ACR
慢性毒性値が欠けている栄養段階の急性毒性値が揃わない場合の小さいほうの急性毒性値	10	ACR	10	100 × ACR

^a 化審法における優先評価化学物質に関するリスク評価ガイダンス (厚生労働省・経済産業省・環境省, 2014) の図表 III-4 を改変して作成

^b ACR: 急性慢性毒性比 藻類は 20、ミジンコは 10、魚類は 100

8.5 まとめ

8.5.1 既存論文の知見

CNF に関する既存の報告において、藻類では、設定最低濃度である 1 mg/L でも影響が確認された事例が 2 例報告されている (Pereira et al., 2014; Munk et al., 2015)。Pereira et al. (2014) は、藻類を取り囲むように、ガム状のセルロースが生成され、これが藻類の細胞表面への CNF の吸着を増加させることで、細胞壁でのガス交換や細胞膜での栄養素の取り込みに影響を与えた結果、クロレラの生長阻害が生じたと考察している。ただし、より高濃度でも藻類への影響が確認されなかったとする報告もあった (Wang et al., 2020; Ong et al., 2017)。ミジンコの急性毒性試験では、20~40 mg/L でわずかに遊泳阻害がみられた報告 (Kokol et al., 2023; Vartiainen et al., 2011) がある一方、設定最高濃度でも影響がみられなかったとする報告が複数あった (Wang et al., 2020; Pengiran et al., 2021; Ogonowski et al., 2018; Ong et al. 2017)。ミジンコの慢性毒性試験の報告は一つのみだが、20.6 mg/L で産仔数の低下、10~20 mg/L で摂餌率の大幅な低下がみられている (Ogonowski et al., 2018)。ゼブラフィッシュの急性毒性試験では、250 mg/L で有意な死亡割合

の増加および卵黄嚢と心嚢浮腫の上昇を示した研究 (Harper et al., 2016) があるが、その他の多くの報告では、設定最高濃度でも影響はみられなかった (Wang et al., 2020; Pengiran et al., 2021; Harper et al., 2016; Harper et al., 2016; Ong et al., 2017; Liu et al., 2020)。総じて CNF の水生生物 (藻類、甲殻類、魚類) への影響は一般的な化学物質と比較しても低い部類と考えられた。

8.5.2 NEDO 委託事業で得られた知見

これまでに報告されている生態毒性試験では、CNF の暴露状態 (液中の CNF の濃度や分散状態) が十分に評価されておらず、生態毒性試験が適切に実施されていない可能性が示唆された。そこで、NEDO 委託事業では、まず、CNF の濃度測定法を確立するとともに、CNF 分散液の安定性、供試生物による CNF の取り込み (摂餌率の減少、CNF 濃度の低下)、CNF への吸着に伴う栄養塩の枯渇、藻類を用いた試験における藻類存在量の測定への CNF の干渉、CNF の濃度測定への供試生物 (主に藻類) や餌 (主にミジンコの餌のクロレラ) の干渉、真菌や細菌および防腐剤の影響などを考慮して、CNF ごとに生態毒性試験の方法を確立した。そして、4 種類の CNF (TEMPO 酸化 CNF、機械解繊 CNF (水中対向衝突法)、機械解繊 CNF (ウォータージェット法)、リン酸エステル化 CNF) を対象に、藻類生長阻害試験、ミジンコ遊泳阻害試験、魚類急性毒性試験を実施した。また、1~2 種の CNF について、ミジンコ繁殖試験、魚類初期生活段階毒性試験、ヨコエビ亜慢性毒性試験も実施した。ほとんどの試験で設定最高濃度の 100 mg/L においても影響は認められなかった。しかし、TEMPO 酸化 CNF を用いたミジンコ繁殖試験では、25 mg/L 以上の濃度区において、累積産仔数が対照区より有意に低下した。この要因として、ミジンコが CNF をろ過摂食して腸管に取り込むことで、餌の取り込みが減少することが示唆された。NEDO 委託事業では、TEMPO 酸化 CNF 以外の CNF についてのオオミジンコ繁殖試験の結果が得られておらず、他の CNF でも同様の現象が起こるかどうかは分からないが、機械解繊 CNF を用いたミジンコ繁殖試験でもほぼ同様の結果が報告されており (Ogonowski et al., 2018)、この影響は CNF の種類によらない可能性がある。また、オオミジンコの摂餌率の低下は、ポリスチレン粒子でも認められており (Rist et al., 2017)、CNF だけに特有の影響ではないと考えられた。得られた毒性値の大きさから判断して、CNF の毒性は、一般的な化学物質と比較して低い部類と考えられた。

各 CNF の管理の目安となる生態影響評価値、すなわち予測無影響濃度 (PNEC) は、各 CNF の最小の毒性値を基に、データの拡充度に応じた不確実性を考慮して導出される。3 つの栄養段階の慢性毒性値がそろっている TEMPO 酸化 CNF の PNEC は 1.25 mg/L (最小の毒性値 12.5 mg/L ÷ 不確実係数積 10)、1 つの栄養段階の慢性毒性値と他の 2 つの栄養段階の急性毒性値がある機械解繊 CNF の PNEC は ≥ 1 mg/L (最小の毒性値 ≥ 100 mg/L ÷ 不確実係数積 100)、2 つの栄養段階の急性毒性値があるリン酸エステル化 CNF の PNEC は > 0.01 mg/L (最小の毒性値 > 100 mg/L ÷ 不確実係数積 10000) となった。ただし、リン酸エステル化 CNF の現時点で評価に使用可能な生態毒性データが少なく、不確実係数積が大きいので、さらにデータを収集した後に、改めて生態影響を評価する必要がある。

8.5.3 今後の課題

藻類では、設定最低濃度である 1 mg/L でも影響が確認された事例があり、CNF の種類による

藻類への影響の違いについては、データの集積が必要といえる。また、ミジンコおよび魚類への慢性影響についても、データが限られているので、データの集積が必要である。

CNF は、環境水中のカルシウムやマグネシウムなどのイオンにより、凝集、沈殿する性質があることから、CNF は底質に移行しやすいと考えられる。よって、藻類、甲殻類、魚類だけでなく、底生動物への影響についてのデータの集積も望まれる。

NEDO 委託事業では、CNF の濃度測定法を確立するとともに、CNF 分散液の安定性などを考慮して、CNF に適した試験方法や条件を検討してきた (8.4.2 節、8.4.3 節)。今後、各事業者で生態毒性試験を実施される場合には、それらの情報を参考にいただければ幸いである。

参考文献

- Blaise C, Vasseur P, 2005. Algal microplate toxicity test. In: Blaise C, Ferard JF (Ed.), Small-scale freshwater toxicity investigations. Vol.1. Dordrecht: Springer. pp 137-179.
- Coll C, Notter D, Gottschalk F, Sun T, Som C, Nowack B, 2016. Probabilistic environmental risk assessment of five nanomaterials (nano-TiO₂, nano-Ag, nano-ZnO, CNT, and fullerenes). *Nanotoxicology* 10(4):436-444.
- Environment Canada, 2000a. Biological test method: Reference method for determining acute lethality of effluent to rainbow trout. EPS 1/RM/13. 2nd ed.
- Environment Canada, 2000b. Biological test method: Reference method for determining acute lethality of effluent to *Daphnia magna*. EPS 1/RM/14. 2nd ed.
- Environment Canada, 2007. Biological test method: Test of reproduction and survival using the Cladoceran *Ceriodaphnia dubia*. EPS 1/RM/21. 2nd ed.
- Esposito MC, Riva L, Russo GL, Punta C, Corsi I, Tosti E, Gallo A, 2024. Reproductive toxicity assessment of cellulose nanofibers, citric acid, and branched polyethylenimine in sea urchins: Eco-design of nanostructured cellulose sponge framework (Part B). *Environmental Pollution*. 350: 123934.
- GESAMP, 2019. GESAMP Hazard Evaluation Procedure for Chemicals Carried by Ships, 2019. Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection, Rep. Stud. GESAMP No. 102. <http://www.gesamp.org/site/assets/files/2133/rs102e.pdf> (accessed 28 Nov. 2024).
- Gong J, Wang X, Zhu C, Dong X, Zhang Q, Wang X, Duan X, Qian F, Shi Y, Gao Y, Zhao Q, Chai R, Liu D, 2017. Insm1a Regulates Motor Neuron Development in Zebrafish. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 10.
- Harper BJ, Clendaniel A, Sinche F, Way D, Hughes M, Schardt J, Simonsen J, Stefaniak AB, Harper SL, 2016. Impacts of chemical modification on the toxicity of diverse nanocellulose materials to developing zebrafish. *Cellulose* (London, England) 23(3):1763-1775.
- Hill AJ, Teraoka H, Heideman W, Peterson RE, 2005. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicol. Sci.* 86:6-19.
- Horie M, Fujita K, Endoh S, Sugino S, Maru J, Moriyama A, Ogura I, 2023. Contaminant microorganisms in the *in vitro* evaluation of cellular responses of cellulose nanofibers and their

- microbial inactivation using gamma irradiation. *Toxicology Mechanisms and Methods* 33:741-754.
- ISO/TR 16197:2014 Nanotechnologies - Compilation and description of toxicological screening methods for manufactured nanomaterials.
- Kokol V, Novak S, Kononenko V, Kos M, Vivod V, Gunde-Cimerman N, Drobne D, 2023. Antibacterial and degradation properties of dialdehyded and aminohexamethylated nanocelluloses. *Carbohydrate Polymers* 311:120603.
- Kovacs T, Martel P, Ricci M, 2007. A short-term adult fathead minnow reproduction test for investigation of cause and investigation of solution work involving pulp and paper mill effluents. *Water Qual. Res. J. Can.* 42:91-100.
- Kovacs T, Naish V, O'Connor B, Blaise C, Gagné F, Hall L, Trudeau V, Martel P, 2010. An ecotoxicological characterization of nanocrystalline cellulose (NCC). *Nanotoxicology* 4(3):255-270.
- Liu C, Zhao J, Zhang X, Wei G, Hao W, Wang X, Yang C, Shi Y, Liu D, 2020. Biomass-derived cellulose nanoparticles display considerable neurotoxicity in zebrafish. *International Journal of Biological Macromolecules* 165:1783-1792.
- Matsuzawa Y, Tai R, Mano H, Ogura I, 2024. Applicability of enzymatic and phenol-sulfuric acid methods for determination of cellulose nanofibers in ecotoxicity testing. *Journal of Wood Science* 70: 17.
- Mano H, 2021. Chronic toxicity of 2-phenoxyethanol to *Daphnia magna*. *環境毒性学会誌* 24: 48-52.
- Mano H, Tai R, Moriyama A, Iizumi Y, Matsuzawa T, Okazaki T, Ogura I, 2025. Dilution effect of TEMPO-oxidized cellulose nanofibers on reproduction of *Daphnia magna*. *Ecotoxicol Environ Saf.* 294:118101.
- Munk M, Brandão HM, Nowak S, Mouton L, Gern JC, Guimaraes AS, Yéprémian C, Couté A, Raposo NRB, Marconcini JM, Brayner R, 2015. Direct and indirect toxic effects of cotton-derived cellulose nanofibres on filamentous green algae. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 122:399-405.
- OECD Series on testing and assessment No. 23: Guidance document on aqueous-phase aquatic toxicity testing of difficult test chemicals. OECD Publishing 2019a. <https://doi.org/10.1787/20777876>
- OECD Test No. 202: *Daphnia* sp. Acute Immobilisation Test. OECD Publishing 2004. <https://doi.org/10.1787/9789264069947-en>
- OECD Test No. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test. OECD Publishing 2006. <https://doi.org/10.1787/9789264069923-en>
- OECD Test No. 211: *Daphnia magna* Reproduction Test. OECD Publishing 2012. <https://doi.org/10.1787/9789264185203-en>
- OECD Test No. 210: Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OECD Publishing 2013a. <https://doi.org/10.1787/9789264203785-en>

- OECD Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test. OECD Publishing 2019b. <https://doi.org/10.1787/9789264069961-en>
- Ogonowski M, Edlund U, Gorokhova E, Linde M, Ek K, Liewenborg B, Könnecke O, Navarro JRG, Breitholtz M, 2018. Multi-level toxicity assessment of engineered cellulose nanofibrils in *Daphnia magna*. *Nanotoxicology* 12(6):509-521.
- Ogura I, Moriyama A, Iizumi Y, Endoh S, Fujita K, Horie M, Okazaki T, Matsuzawa T, 2025. Effect of gamma irradiation on cellulose nanofibers. *Journal of Wood Science* 71:37.
- Ogura I, Sugiyama M, Tai R, Mano H, Matsuzawa T, 2023. Optimization of microplate-based phenol-sulfuric acid method and application to the multi-sample measurements of cellulose nanofibers. *Analytical Biochemistry* 681:115329.
- Ong KJ, Shatkin JA, Nelson K, Ede JD, Retsina T, 2017. Establishing the safety of novel bio-based cellulose nanomaterials for commercialization. *NanoImpact* 6:19-29.
- Pengiran H, Kamaldin J, Fen LB, Yusob SAA, 2022. Properties of Kenaf Cellulose Nanofiber (CNF) as Potential Larvicide Nanocarrier and Its Acute Ecotoxicity against *Daphnia Magna* and *Dania rerio*. *Journal of Natural Fibers* 19(13):6756-6769.
- Pereira MM, Mouton L, Yéprémian C, Couté A, Lo J, Marconcini JM, Ladeira LO, Raposo NR, Brandão HM, Brayner R, 2014. Ecotoxicological effects of carbon nanotubes and cellulose nanofibers in *Chlorella vulgaris*. *Journal of Nanobiotechnology* 12(1):15.
- Rist S, Baun A, Hartmann NB, 2017. Ingestion of micro- and nanoplastics in *Daphnia magna* - Quantification of body burdens and assessment of feeding rates and reproduction. *Environmental Pollution* 228:398-407.
- Rusconi T, Riva L, Punta C, Solé M, Corsi I, 2024. Environmental safety of nanocellulose: an acute *in vivo* study with marine mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Environmental Science: Nano* 11(1):61-77.
- Stoudmann N, Nowack B, Som C, 2019. Prospective environmental risk assessment of nanocellulose for Europe. *Environmental Science: Nano* 6(8):2520-2531.
- Tai R, Ogura I, Okazaki T, Iizumi Y, Mano H, 2024a. Acute toxicity tests of TEMPO-oxidized cellulose nanofiber using *Daphnia magna* and *Oryzias latipes*. *Cellulose* 31(4):2207-2220.
- Tai R, Ogura I, Okazaki T, Iizumi Y, Mano H, 2024b. Algal growth inhibition test with TEMPO-oxidized cellulose nanofibers. *NanoImpact* 34:100504-100504.
- Truong L, Harper SL, Tanguay RL, 2011. Evaluation of Embryotoxicity Using the Zebrafish Model. In J.-C. Gautier (Ed.), *Drug Safety Evaluation: Methods and Protocols* (pp. 271-279). Humana Press.
- Usenko CY, Harper SL, Tanguay RL, 2008. Fullerene C60 exposure elicits an oxidative stress response in embryonic zebrafish. *Toxicology and Applied Pharmacology* 229(1):44-55.
- U. S. Environmental Protection Agency (U.S.EPA), 2000. Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates, 2nd edn. EPA-600/R-99/064. U.S. Environmental Protection Agency Office of Water. <https://archive.epa.gov/water/archive/polwaste/web/pdf/freshmanual.pdf> (accessed 28 Nov.

- 2024).
- U. S. Environmental Protection Agency (U.S.EPA), 2002. Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms, 4th edn. EPA-821-R-02-013. U.S. Environmental Protection Agency Office of Water, NW Washington DC. https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-08/documents/short-term-chronic-freshwater-wet-manual_2002.pdf (accessed 3 June 2021).
- Vartiainen J, Pöhler T, Sirola K, Pykkänen L, Alenius H, Hokkinen J, Tapper U, Lahtinen P, Kapanen A, Putkisto K, Hiekkataipale P, Eronen P, Ruokolainen J, Laukkanen A, 2011. Health and environmental safety aspects of friction grinding and spray drying of microfibrillated cellulose. *Cellulose* (London, England) 18(3):775-786.
- Wang Z, Song L, Ye N, Yu Q, Zhai Y, Zhang F, Vijver MG, Peijnenburg WJGM, 2020. Oxidative stress actuated by cellulose nanocrystals and nanofibrils in aquatic organisms of different trophic levels. *NanoImpact* 17:100211.
- Wigger H, Kawecki D, Nowack B, Adam V, 2020. Systematic consideration of parameter uncertainty and variability in probabilistic species sensitivity distributions. *Integr. Environ. Assess. Manage.* 16(2):211-222.
- 小倉 勇, 松沢 智彦, 高田 道義, 2020. セルロースナノファイバーの 検出・定量の事例集. <https://riss.aist.go.jp/results-and-dissemin/776/>
- 厚生労働省・経済産業省・環境省, 2014. 化審法における優先評価化学物質に関するリスク評価ガイダンス. https://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/kasinhou/files/information/ra/tech_guidance_full_202207.pdf
- 田井 梨絵, 小倉 勇, 眞野 浩行, 2022. セルロースナノファイバーの生態毒性試験手法の現状と留意点. *環境毒性学会誌* 25:32-47.

執筆担当者

田井 梨絵、眞野 浩行

第9章 生分解性の評価

9.1 はじめに

CNF の実用化に伴い、製造量および市場への流通量が増加するとともに、工業廃水や家庭排水を経路として、また、建築、塗装、農業用途など屋外での使用を通し、環境に放出される CNF の量が大幅に増加する可能性がある。セルロースは植物の構成成分であり、一般には環境中で生分解されると予想されるが、化学修飾により生分解性は変化する可能性がある。本章では、CNF やセルロースナノクリスタル (CNC) の生分解性について、既存文献の情報および NEDO 委託事業 (2017~2019 年度) の成果について紹介する。

9.2 既存文献の情報

Ong et al. (2017) は、リグニン被覆 CNF (L-CNF) およびリグニン被覆 CNC (L-CNC) を対象に、OECD TG311 に基づき嫌氣的生分解性試験を実施している。L-CNF および L-CNC の嫌氣的生分解度はそれぞれ 51% および 35% であり、従来のセルロースで報告されている値と同程度か、それ以上であった。また、Ong et al. (2017) は、EPA の OCSPP 835.3140 に基づき、好氣的生分解性試験も実施している。好氣的生分解性試験では、材料の分解度が 10% に達してから 10 日の間に 60% 以上になった場合、その材料は易生分解性と判断される。L-CNF の分解度は 1 日目から 7 日目にかけて 10% に達し、14 日目までに 71% に達した。よって、L-CNF は易生分解性と判断された。一方、L-CNC の分解度は 1 日目から 7 日目までに 10% に達し、14 日目には 41%、21 日目には 68% に達した。L-CNC は易生分解性の判断基準を満たしてはいなかったが、生分解性と考えられた。

Kümmerer et al. (2011) は、フラーレンやカーボンナノチューブと併せて、CNC (平均断面積 6 nm、長さ 180 nm) やデンプンのナノ小板の生分解性を OECD TG301D 法 (クローズドボトル法) により評価している。フラーレンとカーボンナノチューブはまったく生分解しなかったが、CNC とデンプンのナノ小板は、比較対照のナノサイズではないセルロースやデンプンと同程度の生分解性を示した。どちらも易生分解性の基準 (28 日後に 60%) を満たしていなかったが、CNC の 28 日後の分解度は 54%、ナノサイズではないセルロースの分解度は 45% であった。CNC は、表面積が大きいため、ナノサイズではないセルロースのよりも速く分解することが分かった。

O'Connor et al. (2014) は、CNC の NCC™ について、OECD TG301 による生分解性試験を実施しており、生分解度が 10% に達した日から 10 日間の分解度は 42% であった。

Vikman et al. (2015) は、ナノフィブリル化セルロース (NFC) のフィルム、濃縮 NFC、および NFC を含む紙製品の生分解性と堆肥化性を、制御された堆肥化条件下において評価している。比較対照のワットマンろ紙 (セルロース) に対し、65 日後の相対生分解性を計算すると、NFC フィルムが 122%、濃縮 NFC が 93%、NFC を含む紙製品が 116% であり、いずれも欧州規格 EN 13432 で設定された要件 (対照と比較して 90% 以上の分解性) を満たして生分解性と判断された。堆肥化による分解は、欧州規格 EN 14045 を改変したパイロット規模の堆肥化試験を使用して評価され、NFC フィルムは 3 週間の堆肥化で完全に分解し、NFC を含む紙製品の分解性は NFC の添加により影響しなかった。堆肥化環境での NFC 製品の生分解時の生態毒性が、海洋性発光細菌 *Vibrio fischeri* による発光試験により評価され、いずれのサンプルでも急性毒性は認められなかつ

た。

9.3 NEDO 委託事業の成果

CNF が一般環境に排出された後の生分解性について知見を得るため、OECD TG301C 試験を行い、環境中で速やかに分解されるかどうか（易生分解性）を判断した（梶原ら, 2020）。OECD TG301C 試験は国内 10 か所から汚泥（河川、湖沼および内海の表土を含む表層水、下水処理場の返送汚泥）を採集して培養した活性汚泥を用いる試験であり、環境媒体全般に含まれる微生物による分解の観察を意図した試験である。生物化学的酸素要求量（BOD）で測定した分解度が 28 日の間で 60%以上のときに易生分解性と判断される。CNF および比較対照としたセルロース材料の生分解性試験の結果を表 9.1 に示す。

表 9.1 OECD TG301C 法による生分解性試験結果（梶原ら, 2020）

被験材料	試験 1	試験 2	試験 3
TEMPO 酸化 CNF	易生分解性	—	—
リン酸エステル化 CNF	—	易生分解性	—
機械解繊 CNF	—	易生分解性	—
アセチル化パルプ（置換度：0.69）	—	—	易生分解性
アセチル化リグノ CNF（置換度：0.69）	—	—	易生分解性
セルロース粉末（Avicel PH-101）	易生分解性	易生分解性	易生分解性
酢酸セルロース（置換度：2.4）	—	—	易生分解性ではない

「—」は試験を実施していないことを表す。

・試験 1～3 はそれぞれ別の試験期間に行ったものであり、用いた活性汚泥も異なる。

TEMPO 酸化 CNF、リン酸エステル化 CNF、機械解繊 CNF、アセチル化 CNF はいずれも、分解度が 60%を超えており易生分解性と判断された。これらは化審法の基準では良分解性と判定される。セルロース粉末は試験によって 60%を超える場合と超えない場合があったが、超えない場合も生分解の途中である試料があったためであり、易生分解性と判断された。また、アセチル化パルプは分解度が 60%を下回ったが、これはサンプルサイズ（n=3）のうち、1 つの試料が生分解されず（分解度 2%）、残り 2 つの試料が生分解された（分解度：80%、77%）ためであり、易生分解性と判断された。比較対照とした酢酸セルロースは生分解されず、易生分解性ではないと判断された。

また、付加的に OECD TG 306 法を一部改変した試験（分解度を溶存有機炭素（DOC）ではなく、BOD で測定）により海水を使った生分解性も評価した。海水を使った試験は、海水に含まれる微生物量が一定でないため試験結果の変動が大きく、偽陰性の結果を多く生じやすいことや、栄養塩の添加、被験物質濃度の高さの点で、海洋環境の模擬試験となっていないという指摘もあり、結果が陽性であれば海水中で生分解すると言えるが、結果が陰性であっても、それがただちに海洋中で生分解されないことを意味するわけではない。

試験の結果、TEMPO 酸化 CNF、機械解繊 CNF、未変性リグノ CNF、アセチル化リグノ CNF（置換度：0.40）、アセチル化リグノ CNF（置換度：0.84）はいずれも分解度が 60%を超えており、海洋環境中での生分解性のポテンシャルありと判断された。

9.4 まとめ

既存の報告および NEDO 委託事業の成果より、CNF および CNC は一般のセルロースと同様に生分解すると考えられる。化学修飾により生分解性は変化する可能性があるが、NEDO 委託事業で実施した一般環境の生分解性試験において、TEMPO 酸化、リン酸エステル化、アセチル化した CNF は、いずれも易生分解性と判断された。

参考文献

- Kümmerer K, Menz J, Schubert T, Thielemans W, 2011. Biodegradability of organic nanoparticles in the aqueous environment. *Chemosphere* 82(10):1387–1392.
- O'Connor B, Berry R, Goguen R, 2014. Chapter 10 - Commercialization of Cellulose Nanocrystal (NCC™) Production: A Business Case Focusing on the Importance of Proactive EHS Management. *Nanotechnology Environmental Health and Safety (Second Edition) Risks, Regulation, and Management Micro and Nano Technologies*. 225-246.
- Ong KL, Shatkin JA, Nelson K, Ede JD, Retsina T, 2017. Establishing the safety of novel bio-based cellulose nanomaterials for commercialization. *NanoImpact* 6:19–29.
- Vikman M, Vartiainen J, Tsitko I, Korhonen P, 2015. Biodegradability and Compostability of Nanofibrillar Cellulose-Based Products. *J Polym Environ* 23:206–215.
- 梶原 秀夫, 蒲生 昌志, 小栗 朋子, 2020. 第6章環境排出後の分解, 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. <https://riss.aist.go.jp/results-and-dissemin/776/>

執筆担当者

小倉 勇

第 10 章 まとめ

〇ヒト健康影響

遺伝毒性：既存の研究では、CNF による遺伝毒性や DNA 損傷に関して陽性結果が一部で報告されている一方で、OECD 試験ガイドライン（Test Guidelines: TG）に準拠した信頼性の高い試験においては陰性結果も示されており、現時点では CNF の遺伝毒性について明確な結論には至っていないのが実情である。

これに対して、NEDO 委託事業において実施された遺伝毒性バッテリー試験（Ames 試験、マウスリンフォーマ TK 試験、*in vitro* 染色体異常試験、ラット赤血球小核試験）では、TEMPO 酸化 CNF、リン酸エステル化 CNF、機械解繊 CNF の 3 種類の CNF を対象に、すべて OECD TG に準拠して実施した結果、いずれの CNF も遺伝毒性を示さない「陰性」と判定された。ただし、CNF の物理化学的特性（繊維長、太さ、表面官能基、解繊度、純度など）は原材料や製造法により多様であり、単一の試験結果だけで一般化することは困難である。

今後は、それぞれの CNF について、OECD TG に準拠した信頼性の高い遺伝毒性バッテリー試験を個別に実施し、その安全性を科学的に評価していくことが重要である。

中皮腫：NEDO 委託事業で試験を行った TEMPO 酸化、リン酸エステル化、機械解繊の 3 種類の CNF については、中皮腫発生に至るキーイベントである炎症は認められず、中皮腫の発生も認められなかった。

吸入影響：既存の研究によれば、CNF は、セルロースナノクリスタル（CNC）よりも軽度の炎症を引き起こし、カーボンナノチューブ（CNT）やアスベストに比べて肺への影響は深刻ではないことが示されている。しかし、CNF の吸入による影響は依然として完全には解明されておらず、特に生体内での残留性や中長期的影響に関する知見が不足している。

NEDO 委託事業において実施された気管内投与試験では、CNF が肺胞および終末細気管支まで到達することが確認され、繊維径や長さといった物理的特性が、肺内での局在性および炎症反応に影響を与える可能性が示唆された。CNF の暴露により軽度の急性炎症が誘発されたものの、炎症反応は 90 日後には減弱し、同条件下での多層 CNT に比べて軽微であった。また、CNF が肺内に長期間残留する可能性も示されており、炎症以外のエンドポイントを含めた包括的かつ長期的な評価が求められる。

一方、マクロファージを用いた培養細胞試験では、CNF の貪食が確認されたものの、顕著な細胞毒性は観察されず、一部の CNF は生体適合性を示す可能性があることが示唆された。また、原材料の供給源や製造方法の違いによって、CNF の物理化学的および生物学的特性（例：繊維径、繊維長、表面修飾、エンドトキシン含有量等）が大きく変化し、これらの特性が生体影響に与える影響は無視できない。

今後は、CNF の特性と細胞・動物試験における生体応答との関連を体系的に評価し、試験系間の知見を統合することで、CNF の吸入影響をより包括的かつ信頼性高く評価する枠組みの構築が必要である。

皮膚影響：CNFの経皮毒性に関する既存の研究は限られているが、これまでのところ懸念される結果は報告されていない。NEDO 委託事業（2017～2019 年度）において、染色および蛍光ラベル化した TEMPO 酸化 CNF を用いた三次元培養皮膚モデルによる透過性試験が実施され、CNF が皮膚構造を透過せず、表層にとどまることが示された。これは、分子量 500 以上の物質は角質層を通過しにくいとする既存文献の知見と一致しており、健常な皮膚においては、CNF が経皮的に体内へ移行するリスクは低いと考えられる。

また、皮膚刺激性に関しては、OECD TG 439 に準拠した三次元皮膚モデル試験の結果、TEMPO 酸化 CNF は非刺激性と評価された。さらに、別の三次元皮膚モデルを用いた研究においても、同様に CNF は非刺激性と報告されている。

これらの知見は、CNF の皮膚安全性に対する懸念をある程度払拭するものであると同時に、本研究で用いた可視化手法の有用性を示すものである。今後は、傷やひび割れた皮膚、ならびに毛包や汗腺などの付属器官を経由した浸透リスクについても検討が求められるとともに、CNF の物理化学的性状の違いに応じた個別評価と長期的影響の調査が重要である。

経口毒性：CNF の経口毒性についての報告例はまだ少ないが、いずれも顕著な毒性は認められていない。また、CNC や従来のセルロースと比較しても特に有害性が高いとする報告はなかった。

〇ヒト暴露

<暴露の観点で注意が必要なプロセス>

CNF の乾燥粉体の取り扱い時は、CNF の飛散が起きやすいことが、複数の報告で示されている。また、清掃時やメンテナンス時なども注意が必要と考えられる。CNF 水分散液は、乾燥粉体に比べると飛散や吸入暴露が起きにくいと考えられる。CNF 水分散液の飛沫は発生したとしても、吸入時の CNF は乾燥して密に凝集した粒子が主になると考えられるが、湿度が非常に高く液滴の揮発が起きにくいような場合や、液滴が水分散液ではなく揮発しにくいオイルのような場合には、分散した状態の CNF への暴露が起きうると考えられる。CNF 複合材に関しては、CNF は母材である樹脂と結合した状態にあり、CNF 単体としての排出・暴露は限定的であると考えられる。

<対策と管理>

換気や局所排気装置（ヒュームフード等）は飛散 CNF の対策として有効であることが示されている。CNF の乾燥粉体を取り扱う際には、CNF の飛散が起きやすいので、局所排気や保護具等の使用が推奨される。

ナノセルロースを対象とした吸入暴露の許容濃度の提案値はまだないが、他のナノ材料や粉塵の許容濃度を参考にして、当面の現場の管理の目安となる濃度を設定していくことが重要と考えられる。ナノ材料の許容濃度は、一般にナノでない同じ物質の許容濃度よりも低い値で定められており、ナノセルロースにおいても、十分な情報がない中では、従来のセルロースより低い値で管理することが望ましいと考えられる。英国規格協会やドイツ法定災害保険研究・試験研究所の提案（ナノでない同じ物質の $\leq 1/10$ の値をベンチマークとする）に沿うと、例えば、ナノでない

セルロース（綿塵）の吸入性粉塵の許容濃度 1 mg/m^3 を $1/10$ にした $100 \text{ }\mu\text{g/m}^3$ が一つのベンチマークとなる。これは、日本産業衛生学会によるナノ TiO_2 およびナノ ZnO の許容濃度（それぞれ 300 および $500 \text{ }\mu\text{g/m}^3$ ）より若干低い値である。ベンチマークの設定は、その濃度が計測できるかどうかということも考慮して決定する必要がある。

CNF の複合材の加工や摩耗の際には CNF 含有の有無によらず粉塵が発生するが、CNF 単体としての排出・暴露は限定的であると考えられることから、樹脂自体の粉塵の排出や暴露を適切に管理することで、CNF 単体としての排出・暴露も低く管理できると考えられる。

<排出・暴露の計測法>

多くの報告で、飛散 CNF の測定にエアロゾル計測器が使われていた。これらは、小型で、秒単位の測定値が得られることから、現場の日常の安全管理に有用であると考えられるが、CNF とそれ以外の粒子を識別することはできないので、CNF ありとなしの比較や、バックグラウンド濃度との比較が重要になる。粉塵をフィルターに捕集して、重量を測定する場合にも、CNF とそれ以外の粒子の識別が問題となる。気中に浮遊する微量セルロースの定量分析法としては、石英フィルターに粉塵を捕集したあとに、熱分解ガスクロマトグラフィー質量分析（GC-MS）で分析する方法がある。CNF の作業環境計測の方法については、十分に確立しているわけではないが、NEDO 委託事業の作業環境計測の事例（7.4.1～7.4.4 節）を参考にいただければ幸いである。

○環境影響

生態影響：総じて CNF の水生生物（藻類、甲殻類、魚類）への影響は一般的な化学物質と比較しても低い部類と考えられた。しかし、藻類では、設定最低濃度である 1 mg/L でも影響が確認された事例があり、CNF の種類による藻類への影響の違いについては、データの集積が必要といえる。また、甲殻類および魚類への慢性影響についても、データが限られているので、データの集積が必要である。

CNF は、環境水中のカルシウムやマグネシウムなどのイオンにより、凝集、沈殿する性質があることから、CNF は底質に移行しやすいと考えられる。よって、藻類、甲殻類、魚類への影響だけでなく、底生動物への影響についてのデータの集積も望まれる。

既存の報告では、試験溶液中の CNF の濃度や分散状態がほとんど評価されていなかった。そこで、NEDO 委託事業では、CNF の濃度測定法を確立するとともに、CNF 分散液の安定性などを考慮して、CNF に適した試験方法や条件を検討してきた（8.4.2 節、8.4.3 節）。今後、各事業者で生態毒性試験を実施される場合には、それらの情報を参考にいただければ幸いである。

CNF は原料や製造方法の違いにより多様であり、CNF の種類によって毒性が異なる可能性がある。各 CNF の管理の目安となる生態影響評価値、すなわち予測無影響濃度（PNEC）は、CNF の種類ごとに、データの拡充度を考慮して導出される必要がある。NEDO 委託事業では、TEMPO 酸化 CNF、機械解繊 CNF、リン酸エステル化 CNF について PNEC を導出した（8.4.5 節）。

生分解性：CNF は一般のセルロースと同様に生分解すると考えられる。化学修飾により生分解性

は変化する可能性があるが、一般環境の生分解性試験において、TEMPO 酸化、リン酸エステル化、アセチル化した CNF はいずれも易生分解性であった。

第三版 2025 年 11 月 10 日

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
〒305-8569 茨城県つくば市小野川 16-1

本書の複製・転載および記載内容に関するご意見・ご要望は、国立研究開発法人産業技術総合研究所 安全科学研究部門までお問い合わせください。

<お問い合わせ> E-mail : M-cnfsafe-ml@aist.go.jp

