

## 別添 5

この資料は、EFSA Scientific Committee et al., Guidance on technical requirements for regulated food and feed product applications to establish the presence of small particles including nanoparticles, EFSA Journal, 9(8):6769 (2021). DOI: 10.2903/j.efsa.2021.6769.の引用文献の内 ISO が発行した文書を、食品中ナノマテリアルの分析の観点から、以下に示すように前処理・分析法・妥当性に分類した。

### 前処理

- ISO/TR 13097, Guidelines for the characterization of dispersion stability, 2013-6-15; 分散液安定性評価に関する技術報告書。用語の説明、分散の安定性評価、加速試験方法、測定データの評価方法について記載。
- ISO 14488, Particulate materials –Sampling and sample splitting for the determination of particulate properties, First edition, 2007-12-15; 粒子特性評価用に元の材料の代表となるサンプルを取得するための方法に関する規格。

### 粒子径分布の測定

- ISO 13318-1, Determination of particle size distribution by centrifugal liquid sedimentation methods – Part 1, First edition, 2001-3-1; 液相遠心沈降法に関する規格。
- ISO 13318-2, Determination of particle size distribution by centrifugal liquid sedimentation methods – Part 2: Photocentrifuge method, First edition, 2007-9-15; 液相遠心沈降法のうち光透過式遠心沈降法についての規格。
- ISO 13318-3, Determination of particle size distribution by centrifugal liquid sedimentation methods – , Part 3: Centrifugal X-ray method, First edition, 2004-7-15; 液相遠心沈降法のうち遠心 X 線法についての規格。
- ISO 13322-1, Particle size analysis – Image analysis methods – Part 1: Static image analysis methods, Second edition, 2014-5-15; 粒子径分布の測定を目的とする静的画像解析の方法についての規格。
- ISO 19430, Particle size analysis – Particle tracking analysis (PTA) method, First edition, 2016-12-15; 粒子軌跡解析法(PTA)についての規格。
- ISO 19749, Nanotechnologies-Measurements of particle size and shape distributions by scanning electron microscopy, First edition, 2021-7; 走査型電子顕微鏡(SEM)により得られたナノスケール粒子画像から粒子サイズ・形状測定を行い、それらの分布の結果報告の方法に関する規格。
- ISO 21363, Nanotechnologies-Measurements of particle size and shape distributions by transmission electron microscopy, First edition, 2020-6, 透過型電子顕微鏡(TEM)により得られたナノスケール粒子の画像から粒子サイズ・形状測定を行い、それらの分布の結果報告の方法に関する規格。

- ISO/TS 19590, Nanotechnologies-Characterization of nano-objects using single particle inductively coupled plasma mass spectrometry, Second edition, 2024-8; 単一粒子誘導結合プラズマ質量分析法 (spICP-MS) によるナノ物質の評価に関する技術仕様書。
- ISO 29301, Microbeam analysis – Analytical electron microscopy – Methods for calibrating image magnification by using reference materials with periodic structures, Third edition, 2023-10; 透過型電子顕微鏡 (TEM) の測定画像の倍率校正手順についての規格。

#### 分析結果の統計処理

- ISO 9276-2, Representation of results of particle size analysis-Part 2, Second edition, 2014-5-15; 粒子の測定結果から平均粒子径、モーメント (統計における期待値) の求め方、表現方法についての規格。
- ISO 9276-3, Representation of results of particle size analysis-Part 3, First edition, 2008-7-1; 粒子径の測定曲線を分布モデルに当てはめる方法についての規格。
- ISO 9276-4, Representation of results of particle size analysis-Part 4, First edition, 2001-7-15; 粒子を粒子径などの特性の差によって分離する分級プロセスの評価方法についての規格。
- ISO 9276-5, Representation of results of particle size analysis-Part 5, First edition, 2005-8-1; 対数正規分布に従う粒子径分析の計算とグラフ表現方法に関する規格。
- ISO 9276-6, Representation of results of particle size analysis-Part 6, First edition, 2008-9-15; 粒子形状の記述的・定量的表現についての規格。粒子の形状と形態の説明、定量的表現の規則と命名法について記載。

この資料は、EFSA Scientific Committee et al., Guidance on technical requirements for regulated food and feed product applications to establish the presence of small particles including nanoparticles, EFSA Journal, 9(8):6769 (2021). DOI: 10.2903/j.efsa.2021.6769.の引用文献の内、学術論文の内容を概要・分析対象・抽出方法・分析方法・原理・不確かさ・新規性・利点・欠点・留意事項についてまとめたものである。

文献 No.	1
文献情報	Aureli F, Ciprotti M, D'Amato M, do Nascimento da Silva E, Nisi S, Passeri D, Sorbo A, Raggi A, Rossi M and Cubadda F. Determination of total silicon and SiO <sub>2</sub> particles using an ICP-MS based analytical platform for toxicokinetic studies of synthetic amorphous silica. <i>Nanomaterials</i> , 10, 888 (2000).
文献 DOI	<a href="https://doi.org/10.3390/nano10050888">https://doi.org/10.3390/nano10050888</a>
論文の概要	<p>1) シリカナノ粒子のトキシコキネティクス研究に資する、ICP-MS ベースの分析法が開発された。</p> <p>2) サンプルには、シリカ粒子を静脈投与したラットが用いられた。</p> <p>3) 複数手法の併用により、検出下限を大幅低減(0.2-0.5 <math>\mu</math>gSi/g)。低投与条件での分析が可能となり、生体内分布や排せつキネティクスの詳細把握に役立つ。</p> <p>a) シリコン少量餌の選定(生体バックグラウンド低減)</p> <p>b) 臓器種類に応じたサンプル調製法の開発</p> <p>c) ガラス製石英製の徹底除外・洗浄法(キャリーオーバー・コンタミ低減)</p> <p>d) 反応ガスにメタン(スペクトル干渉低減)</p> <p>4) 新規な生体用の品質管理材料 QCM を開発。独立した 3 分析法で評価。</p> <p>5) spICP-MS により、肝臓組織からシリカ粒子凝集体が検出され、SEM-EDX でもその存在が確認された。</p>
分析対象ナノ材料	<p>1) 合成シリカナノ粒子：沈降法(NM-200)、焼成法(NM-203)</p> <p>2) ラット投与：静脈注入・強制飼養、20 mg/kg-bw/day、1 日・連続 5 日</p>
食品からの抽出法	<p>※臓器・血液からの抽出方法</p> <p>1) Total-Si 基本方針：完全溶解は、HNO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/少量 HF 混合液中、高温下でマイクロ波分解。HF 量を最適化し、最終的 HF 濃度 0.1%未満に制御。フッ化物沈殿の抑制、余剰 HF 除去目的のホウ酸添加を不要とするため。</p> <p>a) 肝臓・脾臓・小腸(大きな臓器)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・テフロン密閉容器</li> <li>・2 g-fresh sample / 5 mL HNO<sub>3</sub> (13 M) / 0.025 mL HF (4 M)</li> <li>・一晩熟成、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(2 mL)添加後、マイクロ波照射。</li> <li>・プログラム昇温：最終的に 190°Cで 15 分間</li> </ul> <p>b) 肝臓・脾臓・消化管以外の臓器</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ディスポ型 PP 容器 Falcon(事前にマイクロ波照射処理)</li> <li>・5 mL HNO<sub>3</sub> (13 M) / 0.025 mL HF (4 M)</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>・一晩熟成、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(2 mL)添加後、マイクロ波照射。</li> <li>・プログラム昇温：最終的に 90°Cで 7 時間</li> </ul> <p>c) 血液</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 1 mL / HNO<sub>3</sub> (13 M, 2 mL), HF (4 M, 0.015 mL), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mL)</li> <li>・ マイクロ波照射+プログラム昇温：最終的に 90°Cで 5 時間</li> </ul> <p>2) 肝臓からのシリカ粒子の抽出</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 肝臓ホモジネートを Tris-HCl 緩衝液(50 mM/pH=8)とドデシル硫酸ナトリウム(10%)の混合液にて、CupHorn による間接的な超音波処理、20% 振幅で 5 分間</li> <li>・ 次いで、Proteinase K(2 mg/mL)中で 45°C/1 時間、攪拌しながら培養。</li> <li>・ 超音波分解 5 分した後に冷却、直ぐに希釈して分析</li> </ul>
用いた分析手法	<p>1) ICP-DRC-MS：Total-Si</p> <p>2) ICP-OES：Total-Si</p> <p>3) HR-ICP-MS：Total-Si</p> <p>4) spICP-MS：シリカナノ粒子凝集体</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ ブランク試験から検出下限算出：濃度=0.02 μg/g、サイズ=350 nm</li> </ul> <p>5) SEM-EDX：シリカナノ粒子凝集体</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 生体組織中の検出下限：200 nm</li> </ul>
分析原理	<p>1)反応ガスにメタンを採用</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 好適な BEC が得られた</li> <li>・ 多原子イオンがメタンと効率的に反応するためと推察</li> </ul>
不確かさ	<p>併行精度と室内精度(相対標準偏差として評価)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 血液サンプル：12.4%と 18.8%</li> <li>・ QCM サンプル：4.8%と 6.3%</li> </ul>
新規性/解決した課題	<p>1) 品質管理材料 QCM を新規に開発作製</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ シリコン定量評価の生体標準物質(biological reference material)が無い。</li> <li>・ 新鮮牛肝をミキサーで均質化後、既知量のシリコンを仕込んで再度混合、凍結乾燥後にミルで粉末化。</li> <li>・ 独立 3 手法(ICP-DRC-MS・ICP-OES・ICP-HR-MS)で評価。ANOVA による比較から、統計的有意差はないことを確認(p=0.791)。全データを統合、QCM 中のシリコン含有量は 20.9 μg-Si/g に。</li> </ul> <p>2) シリコン含量が少ない標準ラット餌(約 600 μg-Si/g-fw)を選定</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 血液中は検出下限以下、臓器中は定量下限以下への低減に成功</li> </ul>
利点	<p>低投与条件での分析が可能、生体内分布や排せつキネティクスの詳細把握に役立つ</p>
欠点	
分析における留意事項	<p>1) 部品素材を石英から置き換え(ICP-DRC-MS)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ セラミック製トーチ、サファイア製インジェクタ、PFA 製ネブライザー</li> <li>※バックグラウンド 20%低減の効果を確認</li> </ul> <p>2) サンプル調製におけるコンタミ・キャリーオーバー低減</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ ディスポ型ポリプロピレンチューブ：HNO<sub>3</sub>/HF で事前洗浄</li> <li>・ テフロン容器：HNO<sub>3</sub>/HF 超音波照射 2 回 (キャリーオーバー対策)</li> </ul>

	<p>※ブランク値(20-30 ng-Si/mL)は、従来法(200-700 ng-Si/mL)に比べて大幅減</p> <p>3) Total-Si 用の完全溶解サンプル：HF 量を最適化（上述）</p>
備考	<p>1) 本論文の参考文献(No.22)とセットで行われた研究と思われる。同じグループ。こちらは分析検討、参考文献はトキシコキネティクス検討の様様。なお、EFSA Guidance 2021 の参考文献リストにはない。</p> <p>本論文の参考文献(No.22)：Cubadda, F.; Oomen, A.G.; Laurentie, M.; Aureli, F.; D'Amato, M.; Maranghi, F.; Moracci, G.; Raggi, A.; Tassinari, R.; de Jong, W.H.; et al. Toxicokinetics of synthetic amorphous silica after oral and intravenous administration in rats. Part. Fibre Toxicol. 2020, manuscript in preparation.</p> <p>2) 実験結果（投与の影響）</p> <p>a) Total-Si：特に肝臓と脾臓で急増(0.3～424 <math>\mu\text{g-Si/g}</math>)。</p> <p>b) 肝臓中のシリカナノ粒子凝集体</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ spICP-MS：350-900 nm 集合体、検出量は Total-Si の約 10% (350 nm より小さな凝集体の存在可能性を言及)</li> <li>・ SEM-EDX：200-2200 nm 集合体、元素比から <math>\text{SiO}_2</math> と確認</li> </ul>

文献 No.	2
文献情報	Braun A, Couteau O, Franks K, Kestens V, Roebben G, Lamberty A and Linsinger TPJ, 2011. Validation of dynamic light scattering and centrifugal liquid sedimentation methods for nanoparticle characterisation. <i>Advanced Powder Technology</i> , 22, 766 (2011).
文献 DOI	<a href="https://doi.org/10.1016/j.appt.2010.11.001">https://doi.org/10.1016/j.appt.2010.11.001</a>
論文の概要	<p>1) ナノ粒子測定に関する、DLS 法と CLS 法の試験室内有効性が検証された。両手法とも、35-50 nm シリカナノ粒子の測定に適していることが明らかになった。</p> <p>2) 併行精度と室内精度に標準シリカナノ粒子、真度に金ナノ粒子と PS ナノ粒子を用いて解析された。</p> <p>3) 合成不確かさは、併行精度・室内精度・真度の不確かさ (Type-A)、校正・粒子密度の標準不確かさ (Type-B) から求められた。</p> <p>4) 測定不確かさから、基準ナノ粒子の認証に適合した手法と考えられるが、違う粒子径など、他の懸濁液系での検証が今後必要。</p>
分析対象ナノ材料	<p>1) シリカナノ粒子 IRMM-304(懸濁水)35-50 nm : 精度の測定に</p> <p>2) PVC ラテックス粒子 585 nm : CLS 校正に</p> <p>3) PS ラテックス粒子 200 nm、金ナノ粒子 30 nm(RM8012) : 真度の測定に</p>
食品からの抽出法	(食品サンプルは無い)
用いた分析手法	<p>1) Line-start CLS 法 : ストークス式からモード・ストークス径を決定</p> <p>2) DLS 法 [cumulant] : Stokes-Einstein 式から高調波強度加重算術平均粒子径 (harmonic intensity-weighted arithmetic average particle diameter) を決定</p>
分析原理	1) 不確かさバジレットの決定には、トップダウンとボトムアップ型アプローチがあり、DLS 法ではトップダウン、CLS 法では両者を組み合わせた。
不確かさ	<p>1) 併行精度の不確かさ (= 相対標準偏差) : one-way ANOVA により算出。測定日が同一のデータから。</p> <p>2) 中間精度の不確かさ : 測定日が異なるデータから。</p> <p>3) 併行精度不確かさは、サンプル違いを含む全要素を包含。中間精度不確かさは、測定日による違いを表している。</p> <p>4) ストークス式の構成因子個々の不確かさを決定することは困難だが、装置の校正により、この問題を回避できる。</p> <p>5) 装置校正の不確かさは、全ての不確かさバジレットを包含しているため、粒子密度の不確かさを加えれば、最終的な合成不確かさを算出可能。</p> <p>6) 合成不確かさは、以下の因子から構成される。</p> <p>a) Type-A : 併行精度不確かさ、中間精度不確かさ、真度不確かさ</p> <p>b) Type-B : 校正による標準不確かさ、粒子密度による標準不確かさ</p> <p>7) 結果の要点は、</p> <p>a) DLS 法 : 不確かさ主要素は、中間精度と真度。中間精度の影響大きさは、一見簡便な DLS には、把握されていない因子の存在を示唆するもの。</p>

	<p>b) CLS 法：中間精度の影響が最大。粒子密度の影響も大きく、精度向上の重要な要素となり得る。</p> <p>c) 相対拡張不確かさは、DLS 法は 5.4%、CLS 法は 16%(k=2)。CLS 法では Type-B も考慮のため大きい。</p>
新規性/解決した課題	35-50 nm のシリカナノ粒子測定に、DLS 法および CLS 法が有効であり、ナノ粒子参照物質の認証に適格な方法であることが分かった。粒子径が異なるなど、他の懸濁液系での検証が今後必要。
利点	1) 複数の不確かさを比較でき、精度向上の方策を絞り込める。
欠点	
分析における留意事項	<p>1) CLS 法で信頼ある結果を得るためには、</p> <p>a) 全ての粒子が同密度で同形状、化学的・物理的な変化がない</p> <p>b) 粒子の密度が液体に比べて十分に大きく、両者の屈折率が異なる</p> <p>c) 沈降時間を 10 秒から 20 分程度に設定（溶液粘性を選ぶなど）</p> <p>d) 適した光減衰となるよう、粒子濃度を最適化</p> <p>2) DLS 法では、</p> <p>a) 粒子がレーザー光を吸収しない</p> <p>b) 粒子と液体の屈折率が異なる</p> <p>c) 多重散乱や粒子間相互作用が生じない粒子濃度を選択（例：0.25%）</p>
備考	真度の評価には認証標準物質が必要だが、CLS 法には存在しないため、代替として PS ラテックス標準粒子を用いた。一方、DLS 法には標準金ナノ粒子を用い、併行条件にて検証した。

文献 No.	4
文献情報	Campbell JL, SoRelle ED, Ilovich O, Liba O, James ML, Qiu Z, Perez V, Chan CT, de la Zerda A and Zavaleta C. Multimodal assessment of SERS nanoparticle biodistribution post ingestion reveals new potential for clinical translation of Raman imaging. Biomaterials, 135, 42, (2017).
文献 DOI	<a href="https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.04.045">https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.04.045</a>
論文の概要	<p>1) <math>^{64}\text{Cu}</math> 放射性同位体ラベルされた金シリカ SERS ナノ粒子(140 nm)を用い、経口および静脈投与後の体内分布(生きたマウス)の動向が検証された。</p> <p>2) 独立5手法(microPET、ガンマカウンティング、ラマン分光法、ICP-MS、ハイパースペクトル顕微鏡)で分析、いずれも一致した結果が得られた。</p> <p>3) 投与方法で粒子の動向に明らかな違いが観察された。経口投与2時間後に胃や腸で検出され(肝臓や脾臓では見られず)、24時間以内に体内から完全に排出されることが確認された。血流系に入り込まず消化系での分布に留まり、全身毒性に影響がなかった。一方、静脈投与では5分以内に肝臓への蓄積が始まり、48時間後も肝臓や脾臓に残存した。</p> <p>4) SERS ナノ粒子は、がん標的診断造影剤や局所組織除去(レーザー光と金元素の光熱効果を利用)など、新たな医療応用に期待できる。24時間以内の消化器系からの完全クリアは、毒性などの懸念軽減から重要。</p>
分析対象ナノ材料	<p><math>^{64}\text{Cu}</math> 放射性同位体ラベリング SERS ナノ粒子</p> <p>1) 金コア粒子(直径約 60 nm)の表面にラマン活性有機分子を一層被覆後、約 40 nm 厚さシリカ(チオール基導入)で内包させた粒子。直径約 140 nm。</p> <p>2) 放射性同位体ラベリング: キレート化を利用して放射性 <math>^{64}\text{Cu}</math> イオンを粒子表面にラベリング。</p> <p>※約 100 <math>\mu\text{Ci}</math>(3.7 MBq)の <math>^{64}\text{Cu}</math>-SERS ナノ粒子(150 <math>\mu\text{L}</math>、0.8 nM)を投与。</p>
食品からの抽出法	<p>ICP-MS 用サンプル調製法 (金元素を分析)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・塩酸(2 mL)、硝酸(5 mL)と共に、臓器をマイクロ波分解用のテフロンチューブに投入。180°Cで25分間加熱(1600 W)、希釈後に分析へ。</li> <li>・検量線: AuCl を用い、3.125~100 ppb 範囲で作成。検出下限: 約 3 ppb。</li> </ul>
用いた分析手法	<p>※生きた状態での分析は microPET のみ。他手法は対象臓器ごとで分析。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) microPET(小動物用 PET)</li> <li>2) ガンマカウンティング</li> <li>3) ラマン分光法: 785 nm の励起光を用い、組織表面を測定</li> <li>4) ICP-MS: 金元素からナノ粒子を分析</li> <li>5) ハイパースペクトル顕微鏡: 金の固有プラズモン共鳴(550 nm)を利用。画像から空間的な分布を把握できるが、定量的な分析まではできない。例えば、肝臓では Kupffer 細胞に偏在するなど、ナノ粒子が臓器のどこに存在するかを観察できる。</li> </ol>
分析原理	
不確かさ	記載なし
新規性/解決した課題	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) 口腔や消化器系の局在性と動向変化を観察できるよう、諸条件に適した放射性同位体ラベリングが検討され、ナノ粒子が調製された。</li> <li>2) このナノ粒子を用いることにより、独立した5手法による分析が可能と</li> </ol>

	<p>なり、いずれも一貫した結果が得られた。</p> <p>3) ナノベースの診断造影剤は、潜在的な全身毒性や臓器における長期的な滞留が課題であり、解決に道筋をつけた。</p>
利点	<p>がん標的診断造影剤や局所組織除去(レーザー光と金元素の光熱効果を利用)など、新たな医療応用に期待できる。</p>
欠点	
分析における留意事項	<p>ハイパースペクトル顕微鏡分析画像では、組織はグレースケールで、堆積した粒子はグリーンで描写。</p>
備考	<p>1) 半減時間の長さから、<math>^{64}\text{Cu}</math> を選定(12.7 時間)</p> <p>2) <math>\text{Cu}^{2+}</math> と硫黄元素の高い親和性に着目、チオール基表面 SERS ナノ粒子を採用。pH=8.8 にて、96%のラベリング安定性を確認。</p> <p>3) 経口投与では肝臓と脾臓で金が検出されなかった(ICP-MS)ことから、ガンマカウンティングでの微量検出は、<math>^{64}\text{Cu}</math> イオンがナノ粒子から遊離して、血流系に侵入と考察。ナノ粒子は侵入していない。</p>

文献 No.	9
文献情報	De Temmerman P-J, Van Doren E, Verleysen E, Van der Stede Y, Francisco MAD and Mast J. Quantitative characterization of agglomerates and aggregates of pyrogenic and precipitated amorphous silica nanomaterials by transmission electron microscopy. Journal of Nanobiotechnology, 10, 24 (2012).
文献 DOI	<a href="https://doi.org/10.1186/1477-3155-10-24">https://doi.org/10.1186/1477-3155-10-24</a>
論文の概要	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) TEM 画像自動解析によるナノマテリアルの定量的評価性が検証された。</li> <li>2) シリカナノ粒子 4 種 (沈降法と焼成法) が分析され、集合体 (agglomerates) と凝集体 (aggregates) を定量的に測定できた。</li> <li>3) 自動解析により 23 種類パラメータが粒子ごとに測定され、数基準分布が得られた。主成分分析により、相関関係のない 3 主成分に分けられ、それぞれ、大きさ・形状・表面トポロジーの特徴があった。</li> <li>4) 平均径・真球度・形状係数</li> <li>5) 最小 Feret 径の数基準分布に基づく 100 nm 未満の凝集体 (EC 定義ナノマテリアル) は、いずれも 90% 程度と高かった。</li> </ol>
分析対象ナノマテリアル	合成非晶質シリカナノ粒子、粉末状 <ol style="list-style-type: none"> <li>1) NM-200 : BET = 230 m<sup>2</sup> /g、沈降法</li> <li>2) NM-201 : BET = 160 m<sup>2</sup> /g、沈降法</li> <li>3) NM-202 : BET = 200 m<sup>2</sup> /g、焼成法</li> <li>4) NM-203 : BET = 226 m<sup>2</sup> /g、焼成法</li> </ol>
食品からの抽出法	懸濁水の作製法 (食品サンプルは無い) <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 蒸留水に分散 (2.56 mg/ml)、超音波処理 16 分 (13 mm-horn 型、40% 振幅)</li> <li>2) 超音波処理後、0.512 mg/ml へ希釈</li> </ol>
用いた分析手法	TEM 画像を自動解析 (ソフトウェア iTEM) <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 視野領域 : 2.45 × 2.45 μm、ピクセルサイズ 0.60 nm、検出下限 6 nm (粒子面積が 100 ピクセル以上に相当するサイズ)</li> <li>2) 対数正規分布と仮定して、必要な測定粒子数を算出 (既報論文より)</li> <li>3) 最低ピクセル数やコントラスト比など、粒子判定基準の記述あり</li> </ol>
分析原理	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) 23 種類パラメータが粒子ごとに測定・算出され、数基準分布が得られた。表面積、円相当径、最大 Feret 径、アスペクト比、真球度など。</li> <li>2) 全てのパラメータが正規分布に従わないため、評価にはノンパラメトリック推定が好ましい。</li> <li>3) 主成分分析により、相関関係のない 3 つの主成分にクラス分けされた。それぞれの特徴は、大きさ・形状・表面トポロジーであった。</li> <li>4) 各主成分の代表として、平均径・真球度・形状係数を選び、これら数基準分布を 4 種類のシリカ粒子で比較。平均径では明確な違いは見られなかったが、真球度と形状係数では、沈降法と焼成法で明確な違いがあった。製造法による違いを判別できる可能性がある。</li> </ol>
不確かさ	(記載なし)
新規性/解決	1) 多角的にパラメータを取得できるため、目的に適したパラメータを選択

した課題	<p>できる。例えば、Disk 遠心法や DLS などの結果との比較に、投影表面積から算出される円相当径 ECD を選択。</p> <p>2)人間細胞へのナノマテリアル侵入は、大きさ・物理的形狀・モルフォロジーのパラメータで決定との既報もあり、本手法の重要性が示唆される。</p>
利点	特定の材質に特化していないため、様々なナノマテリアルに適用でき得る。
欠点	
分析における留意事項	<p>1)超音波処理時間の影響を検討。少なくとも 8 分以上が必要。</p> <p>2)グリッド表面の 15-30%が粒子で覆われる程度が、測定に好適。</p>
備考	文献 No.89 と同じ研究グループ

文献 No.	10
文献情報	De Temmerman P-J, Lammertyn J, De Ketelaere B, Kestens V, Roebben G, Verleysen E and Mast J. Measurement uncertainties of size, shape, and surface measurements using transmission electron microscopy of near-monodisperse, near-spherical nanoparticles. Journal of Nanoparticle Research, 16, 2177 (2013).
文献 DOI	<a href="https://doi.org/10.1007/s11051-013-2177-1">https://doi.org/10.1007/s11051-013-2177-1</a>
論文の概要	<p>1) ナノ粒子のサイズ・形状・表面トポロジーの測定に関する TEM(半自動画像解析とデータ処理を兼備)の室内有効性が検証された。</p> <p>2) 形態学的特徴の観点から、サイズ・形状・表面トポロジーに関する 23 種類の測定量が選定され、粒子一つずつについて、それらの数基準分布が測定された。</p> <p>3) 線形判別分析により、一次粒子は凝集体から区別された。</p> <p>4) 数基準 ECD モード値の拡張不確かさは、18~30 nm の範囲にて、約 3% と見積もられた。ただし、粒子が単分散・球状のみに適合できる。</p> <p>5) 測定粒子数が少ない場合(200 個以下)、相対室内精度不確かさ(備考欄参照)と測定粒子数が、対数・対数にて直線関係にあり、測定粒子数を 50~200 個とすれば、相対室内不確かさが 5%以内となった。</p> <p>6) TEM 法による他ナノ粒子の有効性検証のガイドラインになり得る。</p>
分析対象ナノ材料	<p>2 種類の CRM コロイダルシリカ(懸濁水)</p> <p>1) ERM-FD100(数基準モード径=19.4 nm)</p> <p>2) ERM-FD304(数基準モード径=27.8 nm)</p>
食品からの抽出法	記載なし(食品からの抽出なし)
用いた分析手法	1) TEM(半自動画像解析とデータ処理を兼備)
分析原理	<p>データ処理のポイントは、</p> <p>1) 一次粒子と凝集体の区別が、線形判別分析により行われ、モルフォロジーのデータセットから自動的に実行できるように開発された。このデータセットは、予備的な手作業による選別(単独の一次粒子か集合体か)で得られたデータに基づいて作成された。</p> <p>2) 線形判別分析は、集合体を取り除き、客観的に一次粒子を選別するのに効果的であった。</p> <p>3) データをビニング処理した後、対数正規フィッティングすることで、モード値の正確な推定が可能となった。</p>
不確かさ	<p>1) 数基準 ECD モード値の拡張不確かさは、約 3% と見積もられた(18~30 nm の単分散・球状粒子が条件)。</p> <p>2) 相対室内精度不確かさ(備考欄参照)と測定粒子数が、対数・対数にて直線関係。測定粒子数 50~200 個の条件で、相対室内不確かさが 5%以内。</p>
新規性/解決した課題	<p>1) 単分散であれば、18~30 nm 範囲外の球状コロイダルシリカの測定に、この拡張不確かさを適用でき得る。</p> <p>2) TEM 法による他ナノ粒子の有効性検証のガイドラインになり得る。</p>

利点	
欠点	1) 本手法の有効性は、粒子が単分散・球状のみであり、ナノチューブやナノロッドなど、プレート状やファイバー状粒子の場合、方向性があるため、有効性は別途検証が必要。
分析における留意事項	1) アルシアンブルー(1%)前処理によるグリッド表面の正電荷化が効果的(シリカは負電荷のため)。 2) ランダムに画像を収集する方法(DeTemmerman ら、2012 年)を採用。 3) ソフトウェア iTEM を用いて画像解析 4) サイズ定量下限は、粒子エリアが少なくとも 100 ピクセルあれば系統大偏差を避けられるという既報(Merkus, 2009)に基づいて算出
備考	1) 相対室内精度不確かさ(u(lab) : relative laboratory uncertainty)は、以下の式(a)で算出された。 式(a) : $u(\text{lab}) = (u^2(r) + u^2(\text{ip}))^{0.5}$ 式(a)において、 u(r) : 相対併行精度不確かさ(relative repeatability uncertainty) u(ip) : 相対中間精度不確かさ(relative intermediate precision uncertainty)

文献 No.	11
文献情報	De Temmerman P-J, Verleysen E, Lammertyn J and Mast J. Semi-automatic size measurement of primary particles in aggregated nanomaterials by transmission electron microscopy. Powder Technology, 261, 191, (2014).
文献 DOI	<a href="https://doi.org/10.1016/j.powtec.2014.04.040">https://doi.org/10.1016/j.powtec.2014.04.040</a>
論文の概要	<p>1) 半自動画像解析型 TEM にて、凝集状ナノマテリアル中の一次粒子の特定と測定が検討され、粒子の焼結や重なりを考慮した手法が開発された。</p> <p>2) 開発には、平均一次粒径が約 100 nm の TiO<sub>2</sub> 粉末(NM-100)が用いられ、より粒径が小さい 6 種類(TiO<sub>2</sub>、SiO<sub>2</sub>、カーボンブラック)でも検証された。</p> <p>3) 開発された画像解析アルゴリズムにより、一次粒子の最大内接半径 <math>R_s</math> と投影半径 <math>R_p</math> のメディアン値および数基準分布が、半自動で測定できるようになった(焼結や重なりから <math>R_s \leq R_p</math>)。 <math>R_p</math> は、手作業測定による最小 Feret 径と高い相関性があり、数基準分布も十分に一致していた。</p> <p>4) 1~100 nm 粒子の割合(数基準)は、NM-100 で 23%、他 6 種類いずれも 99%以上であり、EC 定義ナノマテリアルの測定に有効な手法と分かった。</p> <p>5) 凝集体と一次粒子の各投影面積の比と、凝集体中の一次粒子数 <math>N</math> とが、対数・対数で相関があり、フラクタル関連係数を用いた式で表された。この式で補正すると、半自動で精度よく <math>N</math> を測定できた(手動結果と一致)。</p> <p>6) これら TEM 画像データ (<math>R_p</math>、<math>R_s</math>) から算出された体積比表面積は、BET 法の測定値と大差がなく、データの有効性が裏付けられた。</p>
分析対象ナノマテリアル	<p>1) 粉末状ナノマテリアル</p> <p>a) TiO<sub>2</sub> (NM-100, NM-103, NM-105)</p> <p>b) SiO<sub>2</sub> (NM-200, NM-201, NM-203)</p> <p>c) カーボンブラック(Printex 90)</p> <p>2) 分散調製法：nanogenotox プロトコルに準拠。蒸留水に分散後(2.56 mg/ml)、16 分間の超音波処理。</p>
食品からの抽出法	記載なし(食品からの抽出なし)
用いた分析手法	1) 半自動画像解析型 TEM
分析原理	<p>1) 解析ソフト iTEM にて、画像を二値化(粒子が白、背景が黒)。</p> <p>2) 流域分割(watershed segmentation)に基づき一次粒子に分けられた凝集体の画像、およびユークリッド距離マップ(Euclidean distance map)に基づき測定されたサイズ情報の画像、この二つを統合することにより、画像解析アルゴリズムを開発。</p> <p>3) 流域分割から最大内接半径 <math>R_s</math>、ユークリッド距離マップから投影半径 <math>R_p</math>(直径 <math>D_p</math>)を算出。</p> <p>4) 焼結や重なりから <math>R_s</math> と <math>R_p</math> に差異が生じる(<math>R_s \leq R_p</math>)。この差異を重複係数 <math>Cov = 2 \times (R_p - R_s) / R_p</math> で定義。 <math>Cov = 0</math> の場合、単独粒子。</p>
不確かさ	記載なし
新規性/解決	1) 凝集体中の一次粒子径について、焼結や重なりを考慮した半自動測定法

した課題	<p>が開発され、一次粒子の最大内接半径 <math>R_s</math> と投影半径 <math>R_p</math> のメディアン値および数基準分布を測定できる(焼結や重なりから <math>R_s \leq R_p</math>)。</p> <p>2) 1~100 nm 粒子の割合(数基準 <math>D_p</math>)は、NM-100 で 23%、他 6 種類はいずれも 99%以上であり、本手法が EC 定義ナノマテリアルの測定に有効。</p> <p>3) 凝集体と一次粒子の各投影面積の比と、凝集体中の一次粒子数 <math>N</math> との相関式による補正で、半自動で精度よく <math>N</math> を測定できる。</p> <p>4) TEM 画像データ (<math>R_p</math>、<math>R_s</math>) から体積比表面積を算出でき、混合物中の少量ナノ粒子の体積比表面積の測定が可能(BET 法は困難)。60 <math>\text{m}^2/\text{cm}^3</math> 以上で EC 定義ナノマテリアルと判定できる。</p> <p>5) 本手法では、一次粒子を球状との前提は置いていない。</p> <p>6) DLS や CLS では、凝集体中の一次粒子の測定は困難。</p>
利点	<p>1) 本手法は、市販ソフト"iTEM"の範囲内で開発されており、アルゴリズムのプログラムも実装できる。</p> <p>2) 凝集体の旋回半径と一次粒子 <math>R_p</math> の比が、凝集体中の一次粒子数 <math>N</math> と対数・対数で相関があり、係数を用いた式で示される。この係数を用いると、<math>R_s</math> と <math>R_p</math> からの算出法とは別の方法で <math>Cov</math> を求めることができる。</p>
欠点	
分析における留意事項	
備考	<p>1) TEM グリッドは、アルシアンブルー前処理で正電荷化。</p> <p>2) 検出下限=6 nm、上限=245 nm。(ピクセルサイズ=0.6 nm)</p>

文献 No.	12
文献情報	De Temmerman P-J, Verleysen E, Lammertyn J and Mast J. Size measurement uncertainties of nearmonodisperse, near-spherical nanoparticles using transmission electron microscopy and particle-tracking analysis. Journal of Nanoparticle Research, 16, 2628, (2014).
文献 DOI	<a href="https://doi.org/10.1007/s11051-014-2628-3">https://doi.org/10.1007/s11051-014-2628-3</a>
論文の概要	<p>1) 自動画像処理型の PTA および TEM の室内有効性について、同じ参照物質(単分散・球状の粒子)を用いて比較検証された。</p> <p>2) PTA は流体力学モード径、TEM は平均 ECD で評価。いずれも数基準。</p> <p>3) PTA は 30~200 nm、TEM は 8~200 nm の範囲において、正確でバイアスの無い結果が得られた。ただし、測定対象は単分散・球状の粒子。</p> <p>4) PTA の拡張不確かさ(主要因は併行精度不確かさ)は約 9%であり、TEM(約 4%)の約 2 倍程度であった。</p> <p>5) 単分散・球状の粒子であれば、PTA が、EC 定義枠組みにおけるナノ粒子測定法として、TEM 代替となり得ることが分かった。</p>
分析対象ナノマテリアル	<p>参照物質 5 種類：いずれも単分散・球状の粒子、コロイダル懸濁水</p> <p>1) 金ナノ粒子(平均 ECD：8.9 nm (RM-8011)、27.6 nm (RM-8012)、56.0 nm (RM-8013))</p> <p>2) ポリスチレン粒子(流体力学モード径：102 nm (P1)、202 nm (H1))</p>
食品からの抽出法	記載なし(食品からの抽出なし)
用いた分析手法	1) 自動画像処理型の PTA および TEM
分析原理	
不確かさ	<p>1) TEM の拡張不確かさ(9~202 nm)は 2.5~7.0%、平均約 4%。粒径が小さいほど、測定値と基準値の差が大きくなる傾向。</p> <p>2) PTA の拡張不確かさ(28~202 nm)は 7.1~14.5%、平均約 9%。</p> <p>3) 同じサンプルで比較すると、いずれも TEM の方が拡張不確かさ小さい。</p>
新規性/解決した課題	単分散・球状の粒子であれば、PTA が、EC 定義枠組みにおけるナノ粒子測定法として、TEM 代替となり得ることが分かった。
利点	<p>1) 画像解析などの自動化により、オペレーター変動に対してロバスト。</p> <p>2) 合成不確かさと測定粒子数との間に、対数・対数にて一次相関性あり。合成不確かさ 5%未満となる測定粒子数を推算でき、測定時間の短縮化が図れる。粒径に依存し、PTA では、最大 3 分間の動画にて 300~2500 個の測定が必要。TEM では、10~40 個。</p>
欠点	<p>TEM と比較した PTA の課題(TEM に及んでいない点)</p> <p>1) PTA の動作範囲は、粒子のサイズと屈折率で決定され、ある一つの設定で測定できる粒子サイズ範囲は限定的。TEM(上下限比が 40 倍)より狭い。</p> <p>2) TEM の解像度は、PTA より 2.4~12 倍良い。</p> <p>3) 本研究で算出された測定不確かさは、球状で単分散のナノ粒子に限定。プレート状やファイバー状の場合、TEM では別途検証が必要。一方、流体力学基準の PTA では測定は困難だろう。</p>

	<p>4) PTA の検出下限は、金粒子が 10 nm、ポリスチレン粒子が 24 nm。本検討にて、10 nm 以下の金ナノ粒子 1 種類(RM-8011)が対象外となった。</p> <p>5) 数基準サイズ分布にて、TEM より PTA の方が、ピークがブロードであった。</p>
分析における留意事項	グリッドは、親水性を高めるためにアルシアンブルー(1%)で前処理
備考	PTA は ASTM、TEM は ISO に準拠したが、これら(ASTM、ISO)は必ずしも、サンプル調製や検出限度などに言及していない。コロイダル粒子の分析は、粒子材料の影響が大きいためである。

文献 No.	13
文献情報	Dudkiewicz A, Boxall ABA, Chaudhry Q, Mølhave K, Tiede K, Hofmann P and Linsinger TPJ. Uncertainties of size measurements in electron microscopy characterization of nanomaterials in foods. Food Chemistry, 176, 472 (2015).
文献 DOI	<a href="https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.071">https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.071</a>
論文の概要	<p>1) 食品中ナノマテリアルの大きさ測定に、電子顕微鏡法(EM)を適用した際の測定不確かさを検証した。EM に SEM と TEM を使用、固体状と液体状の食品を分析対象とした。</p> <p>2) 測定粒子個数は、不確かさへの影響は小さくなく、一連の操作(サンプリング、サンプル調製、画像分析、画像解析)の複合的な影響の方が大きかった。ナノ粒子は食品中で不均質に存在しており、採取量が少ない EM 法では課題である。</p> <p>3) 拡張不確かさは食品サンプルによって異なり、低いケースで 21-27%程度、高いケースで 43%であった。食品中の粒子安定性が影響と推察。</p> <p>4) メディアン径標準偏差に関する現象論的方程式が導かれた。測定条件設定の指標に活用できる。</p>
分析対象ナノマテリアル	<p>1) ナノ粒子を仕込んだ食品 2 種類</p> <p>a) チキンペーストに銀ナノ粒子、b) トマトスープにシリカナノ粒子</p> <p>2) ナノ粒子のみ懸濁液 2 種類</p> <p>a) 銀ナノ粒子、b) シリカナノ粒子</p> <p>3) 市販スープ粉末(シリカナノ粒子 SAS-E551 添加と明記)</p> <p>4) シリカナノ粒子粉末</p>
食品からの抽出法	<p>1) チキンペースト：ホモジナイザーで均質化したエマルジョンを超遠心分離機で沈着後、100nm 厚の切片サンプルに。</p> <p>2) トマトスープ：ゼラチンに吸着(凝集防止に効果)</p> <p>3) 沸騰水道水で混合攪拌(11:100 比)</p> <p>4) H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>/KCl/NaOH の pH8 緩衝液と混合攪拌(2:98 比)</p>
用いた分析手法	<p>・ TEM：銀ナノ粒子 (検出下限：16 nm)</p> <p>・ SEM：シリカナノ粒子 (検出下限：30 nm)</p> <p>※半自動画像解析ソフトを活用。円相当径 ECD で評価。</p>
分析原理	
不確かさ	<p>1) EM 法と他手法(既報データ)について、標準偏差で比較</p> <p>a) シリカ懸濁液：SEM(5-6%)は、GEMMA や DLS(3-6%)と同レベル</p> <p>b) 銀懸濁液：TEM(8-21%)は、GEMMA(2.7-8.2%)より大きい、DLS(2-16%)と同レベル</p> <p>c) スープ中のシリカ粒子：SEM(20%)は、AF4-ICP-MS(21%)と同レベル</p> <p>d) チキン中の銀粒子：TEM(10-19%)は、spICP-MS(3-5%)より大きい</p> <p>※サンプル調製法違いの考慮は必要</p> <p>2) 真度を比較(既報データとの)</p> <p>a) スープ中のシリカ粒子：SEM(44 nm)、AF4-ICP-MS(208 nm)</p> <p>b) チキン中の銀粒子：TEM(26-27 nm)、spICP-MS(50-51 nm)</p>

	<p>※手法による基準や表現(数/質量分布、径)の違い、固有バイアスや特性があり、食品中ナノマテリアル測定の真度評価は、今後の課題。</p> <p>3) 不確かさへの分析各プロセスの影響(本論文内)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・食品ではサンプリング工程が最も大きい(8-11%)、懸濁液では1%未満と極小。EMでの採取量はpLと極少量、サンプル均質性に起因と推察。</li> </ul>
新規性/解決した課題	<p>粒子画像解析から、メディアン径の標準偏差(RSDpn)に関する現象論的方程式が導かれた。(RSDpnとIQR%が直線関係、傾きがNに依存)</p> $RSDpn = 1.0071 \times N^{(-0.553)} \times IQR\%$ <p>〔N：測定粒子数、IQR%：四分位範囲と中央値の比(分布広がり)〕</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・測定粒子個数を必要最小限に絞る指標に活用でき、その分を複製サンプルの測定回数を増やして精度を高められる。</li> <li>・粒度分布に制限がなく、正規分布が前提の理論式(既報)より実用的。</li> </ul>
利点	
欠点	<p>ナノ粒子が食品中で不均質に存在しており、サンプル採取が少量であるEM法では、不確かさを高めてしまう。消化処理や抽出など、均質化以外の前処理法はあるが、粒子特性変化への影響が懸念。</p>
分析における留意事項	
備考	<p>全てのサンプルにおいて、メディアン径標準偏差 RSDpn(1-7%)は、室内再現精度標準偏差 RSDip(5-21%)より十分に小さく、粒度分布広さや測定粒子数の不確かさへの影響は限定的。</p>

文献 No.	14
文献情報	Dudkiewicz A, Lehner A, Chaudhry Q, Molhave K, Allmaier G, Tiede K, Boxall ABA, Hofmann P and Lewis J. Development of a sample preparation approach to measure the size of nanoparticle aggregates by electron microscopy. Particuology, 45, 49–57, (2019).
文献 DOI	<a href="https://doi.org/10.1016/j.partic.2018.05.007">https://doi.org/10.1016/j.partic.2018.05.007</a>
論文の概要	<p>1) EM用グリッドにナノ粒子を載せる調製操作において、小さい側の粒子が多くなる歪みが生じ得る課題がある。このサンプル調製に由来する粒度分布の歪みについて、数学的に修正する手法が開発された。</p> <p>2) 参照分析法による粒度分布結果を正とし、これを基準に、対象分析法の粒度分布結果との関係性を表す因子“f”を算出。“f”は、各粒径におけるそれぞれ分析法の数基準割合の相対比(対象法/参照法)であり、粒径を変数とする関数となる。この“f”を用いて、修正変換する。</p> <p>3) 多峰性の球状 SiO<sub>2</sub> ナノ粒子(12~106 nm)を用いた検証にて、SEM(対象法)による粒度分布の修正結果が、GEMMA(参照法)による粒度分布に良好に一致し、歪みの影響を除去できることが分かった。</p> <p>4) SAS(8~100 nm)や多峰性のクエン酸被覆金ナノ粒子(10~50 nm)でも、有効性が確認された(金ナノ粒子は、参照法に DLS、対象法に TEM)。</p>
分析対象ナノ材料	<p>1) 多峰性の球状 SiO<sub>2</sub> ナノ粒子分散液：2種類を混合して作製(12~50 nm、28~62 nm、70~106 nm)。ホウ酸緩衝液(pH=8.0)、0.018 wt%。</p> <p>2) SAS：質量相当径で 8~100 nm(一次粒子、凝集体)。本研究では、弱アルカリ(pH=8)の懸濁液として使用。</p> <p>3) 多峰性のクエン酸被覆金ナノ粒子分散液：5種類を混合(10 nm、15 nm、20 nm、30 nm、50 nm)。</p>
食品からの抽出法	<p>記載なし(食品からの抽出なし)</p> <p>1) グリッドへのサンプルの載せ方：豚皮膚由来ゼラチン水溶液(0.1%)で被覆されたグリッドにナノ粒子を吸着させる。まず、ゼラチン溶液の液滴の上にグリッドを浮かせて5分静置後、精製水で洗浄。次いでサンプル液滴にグリッドを浮かせて2分静置後、精製水で洗浄。</p> <p>2) GEMMA用のサンプル調製法：サンプル溶液(60 μL)と0.02 M 酢酸アンモニウム(340 μL)をメンブレンフィルター遠心分離(14000×g、5分間)。溶出分を除去後、酢酸アンモニウム(400 μL)添加して再度遠心分離。上澄み液を回収して、全体で希釈500倍となるよう、酢酸アンモニウムを添加。</p>
用いた分析手法	<p>参照分析法の結果をベースに、対象分析法の結果を数学的に修正。</p> <p>1) 参照法=GEMMA、対象法=SEM：分析粒子は球状 SiO<sub>2</sub>、SAS  ・ GEMMA：粒子の電気泳動移動度から、乾燥状態のナノ粒子の直径を測定する手法。電気泳動移動度直径は、球状 SiO<sub>2</sub>の場合、円相当径と同じ。</p> <p>2) 参照法=CLS、対象法=TEM：分析粒子は金ナノ粒子</p>
分析原理	<p>数学的修正の方法</p> <p>1) 対象分析法と参照分析法の粒径分布の両者を関連づける因子“f”を算出する。“f”は、各粒径におけるそれぞれ分析法の数基準割合の相対比(対象法/参照法)であり、粒径を変数とする関数となる。データ数が十分で誤差が</p>

	<p>生じにくい粒径のデータのみを用いることがポイント(全てのデータを用いない)。</p> <p>2) この関数を用いて、対象法の粒度分布を修正変換する。</p>
不確かさ	記載なし
新規性/解決した課題	サンプル調製に起因する粒度分布の歪み(小さい側が多くなる)を、数学的に修正する手法が開発され、電子顕微鏡法による粒度分布測定精度が向上した。
利点	本研究で用いたゼラチン吸着型のサンプル調製法は、粒子の表面の化学的性質(SiO <sub>2</sub> ナノ粒子とクエン酸被覆金ナノ粒子の違いのような)に影響されにくく、集合体生成(大きな塊り)を抑制できる特長がある。
欠点	
分析における留意事項	GEMMA において 疎水性異物と不揮発性低分子は、除去が必要。前者はキャピラリー閉塞のリスク、後者はエレクトロスプレーでの微結晶形成の懸念があるため。
備考	<p>1) ナノ粒子の拡散係数や接触面がベキ法則に従うため、グリッド上の粒子分布は小さい側に歪む。しかし測定結果は、推算以上に小さい側に歪んでいた。ベキ法則以外の要素が関与していることが示唆される。</p> <p>2) 金ナノ粒子に比べて SiO<sub>2</sub> ナノ粒子では、粒径が小さい領域での修正幅が大きかった。ゼラチン中のアミノ基との相互作用が、SiO<sub>2</sub>の方が大きいことに起因と推察。</p>

文献 No.	32
文献情報(著者名, 論文名, 雑誌名, 巻, ページ (年))	Hole P, Sillence K, Hannell C, Maguire CM, Roesslein M, Suarez G, Capracotta S, Magdolenova Z, Horev-Azaria L, Dybowska A, Cooke L, Haase A, Contal S, Manø S, Vennemann A, Sauvain J-J, Staunton KC, Anguissola S, Luch A, Dusinska M, Korenstein R, Gutleb AC, Wiemann M, Prina-Mello A, Riediker M and Wick P. Interlaboratory comparison of size measurements on nanoparticles using nanoparticle tracking analysis (NTA). Journal of Nanoparticle Research: An Interdisciplinary Forum for Nanoscale Science and Technology, 15, 2101 (2013).
文献 DOI	<a href="https://doi.org/10.1007/s11051-013-2101-8">https://doi.org/10.1007/s11051-013-2101-8</a>
論文の概要	<p>1) NTA 法は 2006 年商業化の新技术だが、急速に普及、ナノ粒子測定法として期待が高い。しかし標準化による室間再現精度に課題がある。</p> <p>2) 本研究の主眼は、共通プロトコルの開発。Nanosight 社(N 社)製装置を用いる 12 研究室と N 社との共同で、研究室間比較を実施。</p> <p>3) 4 段階ラウンドで実施。ラウンドごとに N 社がプロトコルを都度改良。</p> <p>4) ラウンドを重ねるごとに、変動係数が減少(Round1/2/3/4 の平均変動係数 : 38.5%/11.4%/4.2%/3.8%)、室間再現精度が向上。</p> <p>5) 単峰サンプル(100 nm)の変動係数は 3.1%と極めて低く、2 峰サンプル(80 nm/200 nm)でも 5.5%/5.2%。開発プロトコルにより、NTA 法の精度が確実に高まった。</p>
分析対象ナノ材料	<p>※ 3 つに大別 : 単峰分布・2 峰分布・生体媒体に仕込んだ単峰分布</p> <p>1) Round-1/-2 : 単峰分布の水溶液 4 種類(Gold : 30 nm、カルボキシ修飾ポリスチレン : 100 nm、アミノ修飾 PS : 100 nm、シリカ : 100 nm)</p> <p>2) Round-3 : 単峰分布の水溶液 3 種類 (PS : 100 nm、Gold : 60 nm、80 nm)</p> <p>3) Round-4 :</p> <p>a) 2 峰分布の水溶液(Gold/80 nm と PS/200 nm の混合)</p> <p>b) Ham's F10 nutrient mix(生体媒体)に仕込んだ PS/100 nm・BSA 有無</p>
食品からの抽出法	(生体媒体サンプルを用いているが、記載見当たらず)
用いた分析手法	<p>1) NTA</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 球相当流体力学径</li> <li>・ Stokes-Einstein 式に基づく</li> <li>・ 本研究では、最頻粒子サイズで評価</li> </ul>
分析原理	<p>※ ラウンド・プロトコル改良の進め方</p> <p>1) 各研究室の装置のカメラ形式(CCD/sCMOS など)やレーザー波長はそれぞれ。研究室は、事前選別されず、追加のトレーニングも無し。</p> <p>2) サンプルは N 社から提供され、各研究室はブラインドで分析。各ラウンドの収集結果(粒度分布とモード径、外れ値)を N 社が解析。</p> <p>3) 解析結果を基に、全参加者で議論。次ラウンドのサンプルを決定。プロトコルは、N 社がラウンド毎に都度アップグレード。</p> <p>4) プロトコルは、実験プロセスの全側面を包含。例えば、サンプル運搬時の温度、サンプル取り扱いと調製法(希釈など)、保管方法、測定パラメータ</p>

	の設定(ビデオ、検知閾値など)、ソフトウェア改良(振動チェックなど)、データ解析(反復回数、統計モデルなど)が含まれる。
不確かさ	Round-1 は、共通プロトコル無しで実施され、12 研究室中 2 室で大きな外れ値が得られた。このように平均値と中央値との差が大きい場合、ロバスト統計による解析が好適。中央絶対偏差が小さくなる。
新規性/解決した課題	1) 解析ソフトウェアの選択肢が多すぎて、ユーザーが適切なものを選ばざるを得ず、NTA 法の標準化は、これまで難しかった。 2) 開発プロトコルに従えば、たとえ初級ユーザーでも、室間再現精度と真度が十分な最頻粒子サイズを得ることができる。ただし、本研究で用いられたのは、実質的に球状粒子。 3) よくデザインされ、総当たりの本検証によって、測定結果に影響する重要因子を特定でき、強靱なプロトコルを作成できた。
利点	たとえ初級ユーザーでも、室間再現精度と真度が十分な測定結果を得ることができる。
欠点	
分析における留意事項	1) 同一サンプルを分割して各研究室に提供 2) サンプルは配送時に 4~29°C で管理 3) 提供された共通のディスポ器具や超純水を使用
備考	EFSA-Guidance の参考文献 No.57 に先立つ位置づけの研究。同研究グループによるもの。

文献 No.	33
文献情報	Hougaard KS, Jackson P, Kyjovska ZO, Birkedal RK, De Temmerman P-J, Brunelli A, Verleysen E, Madsen AM, Saber AT, Pojana G, Mast J, Marcomini A, Jensen KA, Wallin H, Szarek J, Mortensen A and Vogel U. Effects of lung exposure to carbon nanotubes on female fertility and pregnancy. A study in mice. Reproductive Toxicology, 41, 86 (2013).
文献 DOI	<a href="https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2013.05.006">https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2013.05.006</a>
論文の概要	<p>1) MWCNT(NM-400)の気管内投与(単回 67 <math>\mu</math>g)が、妊娠前の雌マウスの生殖能に与える影響が検討された。</p> <p>2) 投与6週間後および4か月後にて、肺と肝臓に、MWCNT 投与の影響を示唆する組織病理的变化が確認された。</p> <p>3) 投与した雌マウスの初出産は、平均で5日遅かった(<math>p &lt; 0.05</math>)。</p> <p>4) 生まれた子マウス(雄)の精子生産能力への影響は見られなかった。</p> <p>5) 原料 MWCNT(NM-400)は、TEM など6種類手法で分析。体内中のMWCNTに関する分析は見当たらず。</p>
分析対象ナノマテリアル	MWCNT : NM-400
食品からの抽出法	<p>記載なし(食品からの抽出なし)</p> <p>※サンプル調製法・分析条件の要点を抜粋</p> <p>1) TEM 用：ウシ胎仔血清 2%水溶液に分散、氷水下 16 分間の超音波処理後、0.256 mg/mL に希釈。グリッドは、アルシアンブルー(1%)で前処理。</p> <p>2) ICP-OES 用：酸水溶液(<math>\text{HNO}_3/6 \text{ mL} + \text{H}_2\text{O}_2(\cong 30\%)/2 \text{ mL}</math>)を NM-400(50 <math>\mu</math>g)に添加、回転マイクロ波オーブンに。段階的加熱(最終的 600 W で 8 分間)。室温まで冷却後、テフロン容器に移され、精製水 25 mL 添加。</p> <p>3) TGA：酸素/窒素雰囲気にて、1000°Cまで昇温(10 K/min)。</p> <p>4) XRD 用：サンプルは、TGA 分析後の残渣。</p> <p>5) ラマン分光法：632.82 nm 波長にて、グラファイト(sp<sup>2</sup>)と欠陥(sp<sup>3</sup>)バンドの強度を評価。</p> <p>6) 組織学検査：肺と肝臓が、4~6 <math>\mu</math>m 厚さスライスされ、ヘマトキシリン・エオジン染色。</p> <p>7) マウス投与サンプル：濃度 1.675 mg/mL マウス血清(2%)水溶液を、氷水中で超音波処理。この水溶液 50 <math>\mu</math>L を気管内投与後、150 <math>\mu</math>L 空気供与。</p>
用いた分析手法	<p>MWCNT(NM-400)の分析結果の概要</p> <p>1) TEM：直径およそ 10 nm、長さ 50~500 nm。</p> <p>2) ICP-OES：Al=5.3 wt%、Fe=0.4 wt%、Co=0.2 wt%。</p> <p>3) TGA：約 16 wt%の不燃性不純物。分解ステップが複数あり、性質の異なる炭素化合物の存在を示唆。</p> <p>4) XRD：TGA 残渣としてアルミナ微結晶(10 nm 未満)。</p> <p>5) ラマン分光法：欠陥バンドの方がグラファイトよりも高強度。炭素構造に欠陥が多いことが示唆。</p> <p>6) DLS：気管内投与サンプルの分散性を評価。数基準分布(流体力学的)にて、最頻径 51 nm、大半が 100 nm 以下。MWCNT を流体力学的サイズで</p>

	解釈することは困難だが、分散安定性はリーズナブルと捉える。
分析原理	
不確かさ	記載なし
新規性/解決した課題	<p>1) MWCNT の気管内投与が生殖性に影響することを検証した初の研究。</p> <p>2) MWCNT が肺から循環系に移行することは示されていないが、投与4週間後の肝臓にクッパー細胞の増大が確認され、4か月後には肥大と過形成が見られた。</p> <p>3) 初出産の遅れは、累積的な影響を反映した評価項目であり、5日間の遅れは、発情周期1回に相当する。</p>
利点	
欠点	<p>1) 理論的には、MWCNT 投与による肺炎症が雌の生殖性に影響するはずであり、さらなる検討が望まれる。</p> <p>2) 出産の遅れがMWCNT 投与に起因するかは、妊娠初期への影響を明確にできるように設計された研究での検証が必要。</p>
分析における留意事項	
備考	NM-400 には、不純物元素(Al、Fe、Co)が含まれている。微量のため生殖には影響しないだろうが、炎症反応は引き起こし得る。

文献 No.	52
文献情報	Kestens V, Bozatzidis V, De Temmerman P-J, Ramaye Y and Roebben G. Validation of a particle tracking analysis method for the size determination of nano- and microparticles. Journal of Nanoparticle Research, 19, 271 (2017).
文献 DOI	<a href="https://doi.org/10.1007/s11051-017-3966-8">https://doi.org/10.1007/s11051-017-3966-8</a>
論文の概要	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) PTA の有効性が、併行・室内再現条件で検証された。</li> <li>2) 個数基準粒子径分布におけるモード径、メディアン径および算術平均径が測定され、これらの相対拡張測定不確かさは、10～12%であった(PSL 粒子：50～100 nm の範囲にて)。</li> <li>3) 他手法(TEM、DLS、CLS)の不確かさは、3%～16%の報告例が多い。TEM では約 3%、DLS では 5.4%の報告があり、これらに比べると約 2 倍。</li> <li>4) 凝集体の存在により、レーザー光が激しく散乱して分布に歪みが生じ、算術平均径の相対拡張不確かさが 18%に増大(PSL 粒子 50 nm)。</li> <li>5) 室内再現条件での真度不確かさは、3～4%であった。</li> <li>6) FTLA アルゴリズムを搭載解析ソフト NTA3.0 は、NTA2.3 に比べて、感度(隣接する 2 ピークの分離能)が格段に高まった。</li> </ol>
分析対象ナノ材料	<p>標準粒子 (コロイダルシリカ ERM-FD101b のみ認証標準品)</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) コロイダルシリカ 3 種類</li> <li>2) ポリスチレンラテックス(PSL)10 種類：31 nm～200 nm</li> </ol> <p>※ 2 峰分布サンプルは、PSL を混合</p>
食品からの抽出法	(記載なし：抽出なし)
用いた分析手法	PTA ・NanoSight 社装置(NS500、LM10-HSBF)、解析ソフト (NTA2.3、NTA3.0)
分析原理	NTA3.0 は、FTLA(high-resolution finite track length adjustment)アルゴリズム搭載。粒子径の分解能が向上。サンプルが単峰分布という前提条件が無い。
不確かさ	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) PSL 粒子径 50～100 nm の範囲で、相対拡張測定不確かさが 10～12%(個数基準粒子径分布におけるモード径、メディアン径および算術平均径)。</li> <li>2) 室内再現条件での認証標準物質(コロイダルシリカ ERM-FD101b)測定から、真度不確かさが 3～4%であることが確認された。</li> </ol>
新規性/解決した課題	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) 「PTA 測定のモード径平均値」と「TEM・DLS 測定値(assigned value)」を比較、PTA 法の検出下限、定量下限、検出上限、定量上限を導き出した。 ・サンプル：31 nm～200 nm PSL 粒子(8 種類) ・検出下限=31nm、定量下限=41nm、検出上限および定量上限=200nm (31 nm 粒子の相対標準偏差が 13%、41 nm は 4%以内、200 nm は 5.3%の結果から)</li> <li>2) 正確度=約 11%にて、モード径およびメディアン径を測定できることが分かった。</li> <li>3) 二峰分布測定に関して、NTA3.0 では、粒径比最小 1.25 までピーク分割が可能に。</li> </ol>

利点	
欠点	<p>1) 測定不確かさに関して、他手法の高水準報告例(TEM：約 3%、DLS：5.4%)に比べて、本検証では 10~12%と約 2 倍。</p> <p>2) 凝集体の存在が粒子径分布に歪みが生じさせ、算術平均径の精度が落ちる(特に定量下限に近い領域にて)。</p>
分析における留意事項	<p>1) Eurachem および ISO/IEC98-3 ガイドラインに準拠して、手法有効性の検証と測定不確かさの見積もりを実施。</p> <p>2) PSL(100 nm)を用いた検証から、重要因子(一部抜粋)の条件は、</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・測定温度：24~26°Cが最適、カメラゲイン：250~500 が最適</li> <li>・解析ソフトが最適条件を選択する因子もあった(フレームレートなど)</li> </ul>
備考	Stokes-Einstein 式への適合しやすさから、球状の粒子を選定

文献 No.	57
文献情報(著者名, 論文名, 雑誌名, 巻, ページ (年))	Maguire CM, Sillence K, Roesslein M, Hannell C, Suarez G, Sauvain J-J, Capracotta S, Contal S, Cambier S, El Yamani N, Dusinska M, Dybowska A, Vennemann A, Cooke L, Haase A, Luch A, Wiemann M, Gutleb A, Korenstein R, Riediker M, Wick P, Hole P and Prina-Mello A. Benchmark of nanoparticle tracking analysis on measuring nanoparticle sizing and concentration. Journal of Micro and Nano-Manufacturing, 5 (2017).
文献 DOI	<a href="https://doi.org/10.1115/1.4037124">https://doi.org/10.1115/1.4037124</a>
論文の概要	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) NTA 法によるナノ粒子のサイズ・濃度分析に関して、真度と室間再現精度の改善を検討した。</li> <li>2) Malvern 社(NanoSight)と欧州 10 研究機関との共同で、研究室間比較(ILCs)により検証された。</li> <li>3) M 社開発の分析アルゴリズム、および各装置の特性に対応した M 社提供の個別ソフトウェアによるデータ校正が、重要なポイント。</li> <li>4) サイズと濃度測定に関する真度と室間再現精度が向上した。例えば、100 nm ラテックス懸濁液の測定(異なるユーザー・装置間)における変動係数は、サイズが 33.3%から 2.8%に、濃度は 15.7%から 8.6%に低減した。</li> <li>5) 多峰性の粒度分布サンプルの測定において、ピーク分離能が改善した。</li> <li>6) 開発された本手法は、EU 規制における品質制御と保証に有効である。</li> </ol>
分析対象ナノ材料	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) 金ナノ粒子(30 nm)、ポリスチレンラテックス粒子(60・100・200・300・400・600 nm)</li> <li>2) 多峰性の粒度分布測定検証には、粒子混合液を使用。組成は、3 種：18/3/2(100/200/300 nm)、4 種：6/3/3/2(100/200/300/400 nm)</li> <li>3) M 社で最初に分析され、希釈調製されたサンプルを各研究室に提供</li> </ol>
食品からの抽出法	(記載なし)
用いた分析手法	NTA
分析原理	<p>※開発された手法</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 録画時間・ナノ粒子濃度の最適化(各ユーザーが設定)</li> <li>2) M 社が提供する SOP の順守：ユーザー判断で設定できる項目を削減</li> <li>3) M 社開発の分析アルゴリズム FTLA [Finite Track Length Adjustment]</li> <li>4) 各装置特性に対応した M 社提供の個別ソフトウェアによるデータ校正・レーザーやカメラに応じて、M 社が算出した理論値で適用</li> </ol>
不確かさ	(記載なし)
新規性/解決した課題	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) サイズと濃度測定に関する真度と室間再現精度が向上した。</li> <li>2) 粒子径 30~600 nm 測定における変動係数が 5%未満であり、この範囲で正確に室間再現性よく、ナノ粒子の粒度分布を測定できる。</li> <li>3) 多峰性の粒度分布サンプルを測定できる。ピーク分離能の改善が寄与。</li> <li>4) 開発された本手法は、EU 規制における品質制御と保証に有効で、標準分析技術になり得る。</li> </ol>
利点	測定バラツキを低減でき、同一サンプルを研究室・装置が異なっても、ほ

	ほぼ同一に評価できる。
欠点	
分析における留意事項	<p>1) カメラ感度やレーザー強度が、粒子径測定に影響する傾向がある。感度や強度が高い場合、大きな粒子の焦点が合わせにくくなる。逆に低い場合は、小さな粒子の検出感度が低下しやすい。</p> <p>2) 単峰分布サンプルの変動係数は0.59～3.945、3種類(3峰)粒子では2.43～4.94、4種類(4峰)粒子では2.60～6.82であった。</p>
備考	EFSA-Guidance の参考文献(No.32)と関連あり

文献 No.	61
文献情報	McConnell EL, Basit AW and Murdan S. Measurements of rat and mouse gastrointestinal pH, fluid and lymphoid tissue, and implications for in-vivo experiments. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 60, 63-70, (2008).
文献 DOI	<a href="https://doi.org/10.1211/jpp.60.1.0008">https://doi.org/10.1211/jpp.60.1.0008</a>
論文の概要	<p>1) マウスとラットの消化管の pH、含水量およびリンパ組織の分布、胃容量が調査され、人間と比較された。pH 応答ドラッグデリバリーや結腸ワクチン接種の in-vivo 試験におけるマウス・ラット適用性の検証が目的。</p> <p>2) 腸内 pH は、人間(6.4~7.5)に比べて低かった(マウス：4.4~5.2、ラット：5.0~6.6)。経口医薬品や pH 応答型ドラッグキャリアの in-vivo テストに用いる場合に注意が必要。pH による溶解性の違いなどが影響するため。</p> <p>3) 体重当たりの含水量は、人間に比べて、マウスとラットはかなり多かった。例えば大腸では、人間：2.6 g/kg、ラット：16.9 g/kg、マウス：16.3 g/kg。</p> <p>4) マウス胃容量 0.37 mL から、経口投薬量は最大 0.4 mL と見積もられた。同様にラット(胃容量 3.4 mL)では、2 mL と見積もられた。</p> <p>5) 結腸にかなりの量のリンパ組織の存在が確認され、結腸が免疫学的に重要な臓器であることが分かった。これら動物モデルにて結腸ワクチン接種の研究が可能であることが示された。</p>
分析対象ナノマテリアル	ナノマテリアルの分析なし
食品からの抽出法	記載なし (食品からの抽出なし)
用いた分析手法	<p>1) pH：プローブ型 pH メーター(事前校正) ※標準餌 pH も測定：3 粒の餌(9.17 g)を 10 ml 水道水で分解後に測定。</p> <p>2) 含水量：対象臓器の解剖採取後と凍結乾燥後の重量から算出</p> <p>3) リンパ組織：対象臓器を 10 vol%酢酸水溶液(20 mL)と共にガラス容器に入れ、冷蔵庫で一晩静置。臓器を開いて乾かし、リンパ濾胞とパッチ(濾胞のかたまり)の数を観察。酢酸はリンパ組織の可視化を促進するため。</p>
分析原理	
不確かさ	記載なし
新規性/解決した課題	<p>1) 腸内 pH が、人間とマウスやラットで異なり、in-vivo 試験ではこの違いを考慮する必要性が明らかとなった。</p> <p>2) 結腸に多くのリンパ組織が確認され、マウスやラットにて結腸ワクチン接種の研究が可能であることが示された。結腸ワクチンは、一般の経口ワクチンとは異なる用途展開が期待される。</p>
利点	
欠点	
分析における留意事項	
備考	既報(Schiller ら、2005)によると、人間の腸内の水分の大半は結合状態(磁気共鳴画像解析から)であり、医薬品の溶解に有効な腸内水分はかなり限られている可能性がある。

文献 No.	66
文献情報	Modrzynska J, Berthing T, Ravn-Haren G, Kling K, Mortensen A, Rasmussen RR, Larsen EH, Saber AT, Vogel U and Loeschner K. In vivo-induced size transformation of cerium oxide nanoparticles in both lung and liver does not affect long-term hepatic accumulation following pulmonary exposure. PLoS ONE, 13, e0202477 (2018).
文献 DOI	<a href="https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202477">https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202477</a>
論文の概要	<p>1) CeO<sub>2</sub> および TiO<sub>2</sub> ナノ粒子の生体内移行を検証した。気管内注入(肺ばく露)、静脈注入、経口飼養の3種の投与方法が用いられた。</p> <p>2) 気管内注入で肺沈着した CeO<sub>2</sub> ナノ粒子は、28 日後に肝臓で、TiO<sub>2</sub> は 180 日後に確認された。Total-Ce と Ti は徐々に増加(ICP-MS)。投与量の 2.87±3.37%、1.24±1.98%が、肺から肝臓へと移行していた(180 日後)。</p> <p>3) 肺および肝臓中の CeO<sub>2</sub> ナノ粒子は、生体内で変化して、徐々に小さくなっていく(粒度分布がシフトしていく)ことが観察された(spICP-MS)。</p> <p>4) 経口飼養では肝臓蓄積が認められず、肺から体循環への直接的な移行が、最も重要なルートであることが分かった。</p> <p>5) 肝臓での CeO<sub>2</sub> 変化が浄化につながる様子は見られず、ナノ粒子の毒物評価において、肝臓毒性が重要なエンドポイントであることを示している。</p>
分析対象ナノ材料	<p>1) 原料：粉末状の CeO<sub>2</sub> および TiO<sub>2</sub></p> <p>2) 投与懸濁液：2%マウス血清水溶液(3.24 mg/ml)、超音波処理</p> <p>3) 投与量：162 μg(人間の職業ばく露量を基準に決定)</p>
食品からの抽出法	<p>※肝臓と肺は、液体窒素で凍結され、サンプル調製まで-80°Cで保管</p> <p>1) Total-Ce・Total-Ti (ICP-MS 用)</p> <p>a) 100 mg 肝臓と 1.5 mL 超純水をホモジナイザーで均質化(3 分間)  ※Ti の場合、コンタミ防止のため、ZrO<sub>2</sub> 製 BeadTubes を使用  ※肺組織は、この均質化(a)を行わず、次工程(b)から。</p> <p>b) 組織 40 mg 相当分取、68% HNO<sub>3</sub>(0.25 ml)・H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 水(0.125 ml)添加</p> <p>c) 電子レンジ(耐熱耐圧)で分解処理後、超純水添加(全体として 3 g に)</p> <p>d) 分析前に、超純水で 10~1000 倍希釈。</p> <p>2) CeO<sub>2</sub> ナノ粒子 (spICP-MS 用)</p> <p>a) 肝臓はホモジネート(上記 1)の a)と同等)、肺組織は均質化なし</p> <p>b) 25 mg 相当を「Proteinase K(3 mg/ml)を含む 50 mM 炭酸アンモニウム水溶液(pH=7.4)3 mL」と混合。</p> <p>c) 40°C温浴で攪拌しながら一晩熟成。</p> <p>d) Ce 濃度に応じて、100~50000 倍希釈。</p>
用いた分析手法	<p>1) 強化暗視野顕微鏡(Enhanced darkfield microscopy)：100 倍で粒子観察  ・サンプル：4%中性干渉ホルマリン浸漬。3 μm 切片を染色</p> <p>2) ICP-MS：Total-Ce・Total-Ti  ・検出下限(組織による調製法・最終希釈の違いから差異あり)</p> <p>a) 肝臓：Ce=39-112 ng/g、Ti=539-852 ng/g</p>

	<p>b) 肺 : Ce=8-14 ng/g、Ti=742-2192 ng/g</p> <p>3) spICP-MS ; ナノ粒子の質量相当径(mass-equivalent diameter)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 検出下限 18 nm、定量上限 150 nm</li> </ul> <p>4) DLS : 凝集体の数基準の流体力学的(hydrodynamic)分布</p> <p>5) 走査型 TEM : 粒子観察</p>
分析原理	
不確かさ	(記載なし)
新規性/解決した課題	<p>1) 溶解性や粒子形状の違いから、TiO<sub>2</sub>より CeO<sub>2</sub>の方が移行性が高いことが既報研究で示唆されていたが、統計的有意差はないことが分かり、実質不溶性の TiO<sub>2</sub>粒子も、肺から移行して肝臓蓄積することが確認された。</p> <p>2) spICP-MS を用い、CeO<sub>2</sub>ナノ粒子が生体内で変化していく様子(粒度分布の変化)が観察された。</p> <p>3) ナノ粒子の毒物評価において、肝臓毒性が重要なエンドポイントであることが分かった。</p>
利点	
欠点	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 吸入投与 1 日後に肝臓蓄積という既報論文(<sup>13</sup>C 粒子)があり、本研究で 1 日後に検出されなかったのは、検出下限が高い可能性がある。</li> </ul>
分析における留意事項	<p>1) 懸濁液が安定なことから、血清水溶液濃度を 2%に決定。</p> <p>2) ICP-MS にて、キャリアオーバー防止のため、2%硝酸水溶液で洗浄。</p> <p>3) spICP-MS の定量上限(150 nm)は、粒子気化が関係する過少評価を考慮。ただし、150 nm 以上は最大でも数基準で 1.6%程度の見込み。</p> <p>4) 本来は吸入が生理的なばく露だが、静脈注入・経口飼養と同投与量とするため、気管内注入を採用</p>
備考	<p>1) 原料粉末の分析結果(抜粋)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ DLS : CeO<sub>2</sub>・TiO<sub>2</sub>とも単ピーク、メディアン径は 79 nm、68 nm</li> <li>・ spICP-MS : CeO<sub>2</sub>のメディアン径は約 50 nm、酵素処理後は約 35 nm</li> <li>※TiO<sub>2</sub>は検出されず。検出下限(50-60 nm)より小さいためか。</li> </ul> <p>2) 肝臓・肺組織の分析結果 (抜粋)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 強化暗視野像 : 肺投与の場合、両組織で異物凝集体を確認(CeO<sub>2</sub>/TiO<sub>2</sub>か?)。肺胞など特定領域に存在。経口飼養では、確認されず。</li> <li>・ spICP-MS : メディアン径=M 径</li> <li>a) 肺の粒度分布 : 1 日後は投与サンプルに類似。M 径 35 nm。Total-Ce の 40±28%相当。180 日後は小さい側にシフト、M 径 25 nm。Total-Ce の 6±8%に激減。検出下限(15 nm)未満の小粒子の急増に起因と推察。</li> <li>b) 180 日後の肝臓の粒度分布 : 肺の分布(180 日後)と類似。</li> </ul>

文献 No.	74
文献情報	Peters R, Kramer E, Oomen AG, Rivera ZE, Oegema G, Tromp PC, Fokkink R, Rietveld A, Marvin HJ, Weigel S, Peijnenburg AA and Bouwmeester H. Presence of nano-sized silica during in vitro digestion of foods containing silica as a food additive. ACS Nano, 6, 2441–2451, (2012).
文献 DOI	<a href="https://doi.org/10.1021/nn204728k">https://doi.org/10.1021/nn204728k</a>
論文の概要	<p>1) 人間の消化プロセスを模倣した in vitro モデルを用い、連続する唾液・胃内・腸内の各ステージにおける SiO<sub>2</sub> ナノ粒子の状態を検証した。</p> <p>2) 主な調査食品は、食添用 E551 を含むコーヒー、スープ、パンケーキ。</p> <p>3) 各ステージの SiO<sub>2</sub> ナノ粒子の分布測定は、HDC-ICP-MS で行われた。</p> <p>4) 唾液ステージ(pH=6.5)では、5~200 nm の SiO<sub>2</sub> ナノ粒子が確認された (Total-Si の約 10~40%相当)が、次の胃内ステージ(pH=2)ではナノ粒子の大半が検出されなかった。しかし次の腸内ステージ(pH=7)で再出現、唾液ステージより多くなった(約 20~80%)。</p> <p>5) pH が低く、電解質濃度が高い場合、ナノ粒子は大きな集合体(500 nm 以上)を形成し、pH を中性に戻すとこの集合体が分解することが、別実験で観察された(DLS、SEM-EDX)。この現象は DLVO 理論に合致。</p> <p>6) 胃内ステージの消失は見かけ上と推察され、SiO<sub>2</sub> ナノ粒子に最もさらされているのは、腸上皮であることが示唆された。</p>
分析対象ナノ材料	<p>1) SiO<sub>2</sub> ナノ粒子 3 種類：E551、SAS(一次粒径=7 nm、388 m<sup>2</sup>/g)、コロイダルシリカ(32 nm)</p> <p>2) 食品中の含有量：5 mg/g。</p>
食品からの抽出法	<p>1) SiO<sub>2</sub> ナノ粒子：上澄み液をフィルター(5 μm)ろ過後のろ液。</p> <p>2) Total-Si 用サンプル調製：フッ素樹脂(PFA)容器にサンプルを少量入れ、70% HNO<sub>3</sub>(6 mL)、40% HF(1 mL)を添加。マイクロ波分解(45 分間)後、室温まで冷却、精製水で希釈して 50 mL に。</p>
用いた分析手法	<p>1) HDC-ICP-MS：32~500 nm の SiO<sub>2</sub> ナノ粒子懸濁液を用いて校正。充填剤に非被覆・非多孔性シリカ球体、溶離液にドデシル硫酸ナトリウム水溶液(10mM)を使用。</p> <p>2) ICP-MS：Total-Si</p> <p>3) DLS</p> <p>4) SEM-EDX</p>
分析原理	
不確かさ	HDC-ICP-MS の室間精度の標準偏差は、校正標準品の測定結果から算出され、±20%。サンプルにおける合成室間精度の標準偏差は、±30%。
新規性/解決した課題	消化系で、食添用 SiO <sub>2</sub> ナノ粒子に最も晒されているのは、腸上皮と示唆された。胃内では、大きな集合体を形成していることが推察された。
利点	
欠点	
分析における留意事項	<p>本研究で精度に影響した要因</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ ICP-MS：N<sub>2</sub>バックグラウンドが高く、Si シグナルに影響。</li> <li>・ HDC-ICP-MS：ピークの鋭利性。</li> </ul>

備考	<p>1) 唾液、胃液、腸液、胆汁の各人工液の組成に関する記載あり。無機成分 6~7 種類(KCl や <math>\text{NaHCO}_3</math> など)、有機成分 4~5 種類(尿素、アミラーゼや BSA など)を含む水溶液。</p> <p>2) ステージの条件(<math>37 \pm 2^\circ\text{C}</math>維持) : 4.5 g 食品サンプルに人工唾液 6 mL 添加、5 分間攪拌。次いで人工胃液 12 mL 添加、2 時間攪拌。最後に人工腸液 12 mL、人工胆汁 6 mL および <math>\text{NaHCO}_3</math> を 2 mL 添加して 2 時間攪拌。</p> <p>3) SEM-EDX では、400 nm フィルター後の残分(大きいもの)を観察。粒子間に塩素原子を多く検出、凝集への電解質の関与を示唆。</p>
----	---

文献 No.	75
文献情報	Peters RJB, Oomen AG, van Bommel G, van Vliet L, Undas AK, Munniks S, Bleys RLAW, Tromp PC, Brand W and van der Lee M. Silicon dioxide and titanium dioxide particles found in human tissues. <i>Nanotoxicology</i> , 14, 420, (2020).
文献 DOI	<a href="https://doi.org/10.1080/17435390.2020.1718232">https://doi.org/10.1080/17435390.2020.1718232</a>
論文の概要	<p>1) 献体組織(15人)の臓器(肝臓、脾臓、腎臓、空腸および回腸)に含まれる total-Si、total-Ti、粒子状 SiO<sub>2</sub> および TiO<sub>2</sub> の特定と定量が行われた。分析に、ICP-HRMS(total)、spICP-MS(粒子)および SEM-EDX が用いられた。</p> <p>2) total-Si = 2.7~191 mg-Si/kg(平均 12±SD23 mg-Si/kg)、粒子状 SiO<sub>2</sub> = 0.2~25 mg-Si/kg(平均 1.2±SD3.1 mg-Si/kg)であり、約 10%が粒子状 SiO<sub>2</sub> と見積もられた。数基準粒度分布は 150~850 nm(最頻: 270 nm)。臓器による違いは、比較的小さかった。</p> <p>3) total-Ti = 0.01~2.0 mg-Ti/kg(平均 0.17±SD0.33 mg-Ti/kg)、粒子状 TiO<sub>2</sub> = 0.01~1.8 mg-Ti/kg(平均 0.14±SD0.30 mg-Ti/kg)であり、約 80%が粒子状 TiO<sub>2</sub> と見積もられた。数基準粒度分布は 50~500 nm(最頻: 100~160 nm)であり、約 17%が 100 nm 未満。臓器による違いが大きく、回腸や空腸中の量が多かった。</p> <p>4) SEM-EDX 観察から、肝臓組織中に SiO<sub>2</sub> および TiO<sub>2</sub> 粒子、アルミノケイ酸塩(Si 中に Al が点在)が確認された。TiO<sub>2</sub> 粒径(50~200 nm 程度)は、spMS-ICP の結果に合致していた。</p> <p>5) 食品や歯磨ペースト、医薬品などによる経口摂取が主因と推察。</p>
分析対象ナノ材料	<p>1) 献体組織中の粒子状 SiO<sub>2</sub> および TiO<sub>2</sub></p> <p>※15人(男8、女7)、64~98歳、白人種でオランダ在住。Ti インプラン歴の情報なし。</p>
食品からの抽出法	<p>※Supplementary information を主に参考</p> <p>1) total-Si、total-Ti 用サンプル</p> <p>a) PFA チューブに 1 g のサンプル(ホモジナイズ)、7 mL の HNO<sub>3</sub>(70%)、1 mL の HF(40%)を添加。</p> <p>b) 電子レンジ(1600 W)にて分解(段階的昇温、最終 210°C で 1 分間)。</p> <p>c) 室温まで冷却後に精製水を添加して全体 50 mL に。</p> <p>d) 抽出成分に <sup>103</sup>Rh と <sup>45</sup>Sc を添加(内標準)して、100 mL に希釈後に分析。</p> <p>2) 粒子状 SiO<sub>2</sub>、TiO<sub>2</sub> 用サンプル: 既報(Peters et al. 2018)に基づく</p> <p>a) PE チューブに 200 mg のサンプル(ホモジナイズ)、4 mL の消化緩衝液(グリシン含有)を添加、強撹拌(1 分間)。100°C で 3 時間加熱することで組織を分解(第一段階)。</p> <p>b) 室温まで冷却後、910 μL のプロテイナーゼ K(7.5 mg/mL)を添加後、全体が 5 mL となるよう消化緩衝液を添加。</p> <p>c) 37°C 恒温槽にて撹拌しながら、16 時間培養(第二段階の酵素分解)。</p> <p>d) 室温まで冷却後、精製水で 1000 倍に希釈。測定直前に超音波処理。</p> <p>参考) 消化緩衝液の概要: トリス緩衝液(3 g)+EDTA(92.5 mg)+ドデシル</p>

	<p>硫酸ナトリウム(5 g)+NaCl(3 g)を 100 mL 精製水に溶解後、グリシン(4 g)を溶解させ、精製水で全体を 250 mL に。</p> <p>3) SEM-EDX 用サンプル</p> <p>a) 水を除去(100°Cで 24 時間)して乾燥</p>
用いた分析手法	<p>1) ICP-HRMS(total-Si、total-Ti)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・検出下限は、2 mg total-Si/kg、0.01 mg total-Ti/kg。ブランクは LOD 未満であることを確認。</li> </ul> <p>2) spICP-MS(粒子状 SiO<sub>2</sub>、粒子状 TiO<sub>2</sub>)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・検出濃度下限は、SiO<sub>2</sub> 粒子：0.2 mg/kg、TiO<sub>2</sub> 粒子：0.01 mg/kg。</li> <li>・検出サイズ下限(衝突ガス：H<sub>2</sub>)は、SiO<sub>2</sub> 粒子：100 nm、TiO<sub>2</sub> 粒子：50 nm。上限に定めは無いが、既報から少なくとも 1000 nm 以上。</li> </ul> <p>3) SEM-EDX(粒子状 SiO<sub>2</sub>、粒子状 TiO<sub>2</sub>)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・各倍率(5,000~100,000 倍)にて、500 画像以上</li> </ul>
分析原理	
不確かさ	記載なし
新規性/解決した課題	<p>1) 人体中の SiO<sub>2</sub> 粒子、TiO<sub>2</sub> 粒子に関する知見は極めて少なく貴重。本研究の結果は、リスクアセスメントに関してとても有益。</p> <p>2) total-Ti と TiO<sub>2</sub> 粒子の測定は、サンプル調製および分析手法が全く独立しているが、ほぼ同等の結果(0.17±0.33 mg-Ti/kg、0.14±0.30 mg-Ti/kg)であり、調製法および分析手法の信頼性が示唆される。</p> <p>3) spICP-MS による TiO<sub>2</sub> 粒子の数基準分布(50~500 nm、最頻 100~160 nm)は、SEM-EDX の観察(50~200 nm)と合致。</p>
利点	
欠点	
分析における留意事項	<p>1) Si バックグラウンド最小化のため、ICP-MS の石英製部品は他素材に置き換え、<sup>14</sup>N<sup>14</sup>N や <sup>12</sup>C<sup>16</sup>O による多元素干渉除去のために衝突セルを使用。</p> <p>2) Ti は、<sup>36</sup>Ar<sup>12</sup>C、<sup>32</sup>S<sup>16</sup>O、<sup>48</sup>Ca の干渉を避けるため、m/z=46.95 で測定。</p> <p>3) 各粒子を既知量(SiO<sub>2</sub>(NM-202)：1 mg/kg、TiO<sub>2</sub>(NM-104)：0.1 mg/kg)仕込んだサンプルを用い、併行精度と回収率(recovery)を確認。併行精度は両者とも&lt;35%、回収率は 70~76%で、回収率(TiO<sub>2</sub> 粒子)は既報より良好。</p> <p>4) SEM-EDX にて、プラズマ灰化(10W で 1 時間)により表面の脂質成分を除去することで、粒子とマトリックスのコントラストが向上し、より小さい粒子(SiO<sub>2</sub>で 500 nm 程度)の観察が可能となった。</p>
備考	<p>1) ナノマテリアルは、単核食細胞系に基づいて摂取されるため、典型的には肝臓、脾臓、そして腎臓に分布しやすい(既報情報)。</p> <p>2) SEM-EDX による粒子検出数は少なく、500 画像で約 10 粒子程度。</p> <p>3) ヒト肝臓中の Si 濃度の平衡推算値は、21~23 mg-Si/kg との既報(van Kesteren et al. 2015)と比べ、本研究のデータ(8±8 mg-Si/kg)は同水準。</p> <p>4) 顔料、食品、歯磨ペーストに含まれる TiO<sub>2</sub> は、主に 50~500 nm との報告(Weir et al. 2012)があり、これらの経口摂取が主因と考えられる。</p>

文献 No.	84
文献情報	Talamini L, Gimondi S, Violatto MB, Fiordaliso F, Pedica F, Tran NL, Sitia G, Aureli F, Raggi A, Nelissen I, Cubadda F, Bigini P and Diomedea L. Repeated administration of the food additive E171 to mice results in accumulation in intestine and liver and promotes an inflammatory status. <i>Nanotoxicology</i> , 13, 1087 (2019).
文献 DOI	<a href="https://doi.org/10.1080/17435390.2019.1640910">https://doi.org/10.1080/17435390.2019.1640910</a>
論文の概要	1) TiO <sub>2</sub> 粒子(食添用 E171)の繰返し経口投与が、消化官や内臓への蓄積、炎症反応を伴った分子・細胞レベル変化を引き起こす可能性について検討。 2) 人間の食事ばく露量(2 mg/kg-bw : EFSA 試算)をマウスに投与して検証。 3) 腸と肝臓での蓄積が顕著、腸中 TiO <sub>2</sub> 粒子数は非投与群の 3 倍であった。 4) 肝臓蓄積は、壊死性炎症病巣(necroinflammatory foci)と関係性があった。また、過酸化物質と炎症の増大が、胃と腸で確認された。 5) 本手法は分析感度が高く、低投与量(人間のばく露量レベル)検討が可能に。
分析対象ナノマテリアル	アナターゼ型 E171(AV01PhG ; European Pharmacopoeia / FDA 準拠品) ※現実状態反映のため、超音波処理なしの懸濁水(5 mg/mL)を経口投与
食品からの抽出法	※10%中性緩衝ホルマリン溶液に一晩浸漬後、70%エタノール保管。サンプル調製前に-80°Cで凍結。 1) Total-Ti : 臓器別に a) 高压テフロン容器 : HNO <sub>3</sub> (1 mL)+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (0.5 mL)+HF(0.2 mL) b) マイクロ波分解、最終温度 220°C・10 分間、除圧して冷却(15 分間) 2) TiO <sub>2</sub> 粒子 : 大腸から抽出 a) 20%水酸化テトラメチルアンモニウム(TMAH)を添加。20:1(v/w 比率)。 b) CupHorn 型で間接的に超音波処理、125 W で 16 分間 c) 室温で一晩、機械的振動させ、超純水で希釈
用いた分析手法	※原料 E171 は、TEM・spICP-MS・DLS・NTA の独立 4 手法で分析 1) TEM : 解析ソフト使用、565 個の粒子を測定 2) spICP-MS ・検出下限サイズ : 23 nm、検出下限質量濃度 : 0.001 mg/kg-bw 3) DLS 4) NTA 5) 三連四重極(triple quadrupole)ICP-MS : Total-Ti ・干渉除去のため、反応ガスに NH <sub>3</sub> /He(10/90 比率)使用 ・検出下限=0.002-0.009 mg/kg、定量下限=0.007-0.030 mg/kg 6) 組織病理学 : ヘマトキシリン・エオジン染色。暗視野像。 7) 過酸化物質 : nitro blue tetrazolium 法
分析原理	
不確かさ	(記載なし)
新規性/解決	1) E171 懸濁液を口にポタポタ落とす(dripping)方法を採用。唾液アミラー

した課題	<p>ゼが口腔で放出、自発的な飲み込みが刺激される消化の第一段階を再現。従来の強制飼養では、口腔での E171 との相互作用が少なく、腸内での濃度が高くなる課題。</p> <p>2) E171 投与により組織に沈着したチタン定量分析は、まだ報告が少なく、画像解析手法(Bettini ら、2017)に次ぐ 2 例目。</p>
利点	<p>本法は分析感度が高く、低投与量(人間の食事ばく露量レベル)検討が可能に。</p>
欠点	
分析における留意事項	<p>1) ICP-MS 真度は、標準材料 Seronorm(<math>0.016 \pm 0.003</math> ng/L)を用いて評価。実測値 <math>0.019 \pm 0.001</math> ng/L(n=4)で、十分一致。</p>
備考	<p>1) 原料 E171 の分析結果(<math>1 \mu\text{g/mL}</math> : 超音波処理なし)</p> <p>a) NTA : <math>201 \pm 8.5</math> nm。6 時間後も変化せず。</p> <p>b) DLS : <math>326 \pm 9.2</math> nm。大きな粒子の影響を受けた結果になりやすい。</p> <p>c) TEM : 数基準で 35%が 100 nm 未満、63%が 100-200 nm。</p> <p>d) spICP-MS : 分布が TEM に類似。平均 200 nm 程度、大きな集合体(400 nm レベル)あり。</p> <p>2) Total-Ti 結果例</p> <p>a) 大腸 : <math>1.07 \pm 0.38 \mu\text{g-Ti/g}</math> で非投与群の 1.8 倍</p> <p>b) 肝臓 : <math>0.94 \pm 0.57 \mu\text{g-Ti/g}</math> で非投与群の 3.6 倍</p> <p>3)spICP-MS による <math>\text{TiO}_2</math> 粒子(大腸)</p> <p>a) <math>1.02 \times 10^9</math> 個/g の粒子を検出、非投与群の 2.9 倍 (<math>p &lt; 0.003</math> : t 検定)。</p> <p>b) 粒度分布は、投与サンプルに類似</p> <p>4) 組織形状や過酸化物の発生、全身炎症反応を引き起こす可能性も検証</p> <p>a) 過酸化物は、胃と腸で増加、肝臓では変化が見られず</p> <p>b) 構造的・形態的な組織変化や単球マクロファージ漸増は、胃と腸で見られず。一方、肝臓では壊死炎症性病巣(necroinflammatory foci)が増大。</p>

文献 No.	89
文献情報	Verleysen E, De Temmerman P-J, Van Doren E, Francisco MAD and Mast J. Quantitative characterization of aggregated and agglomerated titanium dioxide nanomaterials by transmission electron microscopy. Powder Technology, 258, 180 (2014).
文献 DOI	<a href="http://dx.doi.org/10.1016/j.powtec.2014.03.010">http://dx.doi.org/10.1016/j.powtec.2014.03.010</a>
論文の概要	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) 酸化チタンナノ粒子を用い、画像解析型 TEM の定量解析性を検証した。</li> <li>2) 平均径・真球度・凸性の数基準分布が得られた。平均径中央値は 100 nm 以下であり、EC 規定ナノ粒子(100 nm 以下)の分析に適している。</li> <li>3) 数基準分布データは対数正規関数に近似された。関数を構成する因子がナノ粒子の特性を反映しており、粒子を見分ける手法になり得る。</li> <li>4) 近似に反復曲線フィッティング法が用いられた。誤差算出が容易に。</li> <li>5) 本手法は、in-vitro/-vivo 試験ストック懸濁液の事前分析に活用できる。</li> <li>6) 安定分散には、粒子の等電点と懸濁液 pH に開きがあることが重要。</li> </ol>
分析対象ナノ材料	<p>4 種類の粉末状の酸化チタンナノ粒子</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>a) NM-102：アナターゼ型、表面被覆なし</li> <li>b) NM-103：ルチル型、疎水表面被覆(<math>\text{Al}_2\text{O}_3</math> &amp; ポリメチルシロキサン)</li> <li>c) NM-104：ルチル型、親水表面被覆(<math>\text{Al}_2\text{O}_3</math> &amp; グリセリン)</li> <li>d) NM-105：ルチル/アナターゼ=14/86 比率、表面被覆なし</li> </ol>
食品からの抽出法	<p>懸濁水の作製法(食品サンプルは無い)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・粉末を蒸留水に分散(2.56 mg/ml)させ、超音波処理 16 分間(13mm-horn 型、40%振幅)</li> </ul> <p>※NANOGENOTOX プロトコルを改変。エタノール・BSA 不使用でも不具合なし。BSA による生物活性への影響を回避可。</p>
用いた分析手法	<p>画像解析ソフト敷設 TEM(閾値基準検出を適用)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・平均径、真球度(sphericity)、凸性(convexity)の数基準分布</li> </ul>
分析原理	数基準分布データを、反復(Iterative)曲線フィッティング法で近似(Levenberg-Marquardt algorithm に基づくソフトウェア)
不確かさ	(記載なし)
新規性/解決した課題	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) 平均径・真球度・凸性各々について、数基準分布データが対数正規関数に近似され、各関数を構成する因子(モードと幅)が得られた。このモードと幅の関係性が、個々のナノ粒子特有の物理特性を反映しており、相違を見分けることにつながる。 <ul style="list-style-type: none"> <li>・表面被覆あり 2 種類同士：モードと幅の関係性が類似(3 種データとも)</li> <li>・表面被覆なし：被覆ありと比べ、関係性に明らかな違い</li> </ul> </li> <li>2) 反復カーブフィッティング法(ソフトウェア使用)を採用。 <ul style="list-style-type: none"> <li>・分布のモード・幅・非対称性の誤差算出が容易。データを曲線として定めることで、近似が正確になる。</li> <li>・数基準分布の構成に使われるビン幅から、独立している。</li> </ul> </li> </ol>
利点	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) シリカナノ粒子を用いた検証(De Temmerman, 2012 年)に次ぐもので、他種ナノ粒子への適用が期待できる。</li> <li>2) DLS や NTA の光散乱法、CLS や BET の密度基準法では、パラメータ</li> </ol>

	は一種類しか測定できないが、TEM 画像解析法では、分布に関する複数の関連パラメータを測定できる。
欠点	
分析における留意事項	懸濁液作製時の容器材質が、酸化チタンナノ粒子の分散安定に影響。 a) 表面被覆なし粒子：ガラス製では、超音波後すぐ沈殿。PP 製では安定。 b) 表面被覆あり粒子(アルミナ被覆)：ガラス・PP 製のいずれでも安定。 ※粒子の等電点と懸濁液 pH に開きがあることが重要。
備考	数基準分布の近似に対数正規関数が選択され、よい相関が得られた。しかし多峰分布などの場合には、他手法が選択され得る。

文献 No.	90
文献情報	Verleysen E, Van Doren E, Waegeneers N, De Temmerman PJ, Abi Daoud Francisco M and Mast J. TEM and SP-ICP-MS analysis of the release of silver nanoparticles from decoration of pastry. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 63, 3570 (2015).
文献 DOI	<a href="https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00578">https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00578</a>
論文の概要	<p>食材”Silver Pearls”から水処理で放出された銀ナノ粒子について TEM 分析を行い、一次粒子や凝集粒子が観察された。半自動画像解析により、数基準の大きさと形状の分布を特定した。これは、spICP-MS で得られた分布とほぼ一致していた。</p> <p>また、標準銀ナノ粒子を用い、粒子の大きさと形状の測定における、TEM 定量分析の不確かさも検証した。</p>
分析対象ナノ材料	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 銀ナノ粒子(ケーキデコレーション食材”Silver Pearls”の含有物)</li> <li>・ 標準銀ナノ粒子 NM-300K (10 wt%懸濁液)</li> </ul>
食品からの抽出法	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) 食材表面に蒸留水を滴下、表面コーティングのみを回収(TEM 用)</li> <li>2) 食材全体を精製水に溶解後、5000 倍に希釈(spICP-MS 用)</li> </ol>
用いた分析手法	<p>画像解析 TEM：最小 Feret 径での粒度分布(数基準)</p> <p>spICP-MS：球相当径での粒度分布(数基準)、検出下限は 13 nm</p> <p>ICP-MS：トータル銀量</p> <p>HAADF-STEM / EDX：粒子位置と銀元素マッピングが一致</p> <p>ED：電子線回折パターン</p>
分析原理	
不確かさ	<p>TEM による定量分析の不確かさを検証(標準銀ナノ粒子を使用)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 粒子ごとに 23 種類の定量的パラメータを測定、数基準の分布で整理</li> <li>・ 23 パラメータを、大きさ、形状、表面特性の 3 クラスにグループ分け</li> <li>・ 一次元サイズパラメータの不確かさは 2%程度(EC 規制スコープ)</li> </ul>
新規性/解決した課題	<p>ナノ粒子は、数基準(number-based)で幅広く存在するため、TEM のような集計技術(counting techniques)が重要。質量基準(mass-based)の測定法では、大きな粒子に比べてナノ粒子が軽視される特性が課題。DLS などの分散型・容積型の分析方法が、これまで食添分野の測定に多用されてきたが、粒度分布が広いサンプルでは、小さい粒子が過小評価される傾向にある。</p>
利点	<p>数基準にて、大きさ・形状の分布を測定できるため、粒度分布が広いサンプルでも、小さいナノ粒子の測定が可能</p>
欠点	
分析における留意事項	<p>OECD ガイダンス(2010 年)では、独立した 2 種以上の手法が求められている。数基準での測定として、TEM と spICP-MS を選定した。</p>
備考	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 今回の分析結果では、100 nm 未満(最小 Feret 径)が 94.7%存在</li> <li>・ spICP-MS による質量濃度=1.8 <math>\mu\text{g/g}</math> で、トータル銀の約 20%相当</li> </ul>

文献 No.	91
文献情報	Verleysen E, Wagner T, Lipinski H-G, K€lagi R, Koeber R, Boix-Sanfeliu A, De Temmerman P-J and Mast J. Evaluation of a TEM based approach for size measurement of particulate (nano) materials. Materials, 12, 2274, (2019).
文献 DOI	<a href="https://doi.org/10.3390/ma12142274">https://doi.org/10.3390/ma12142274</a>
論文の概要	<p>1) ナノ粒子のサイズ測定に関する TEM 法の有効性を検証。対象を球状粒子に限定せず、凝集や重なりなど複雑な形態の粒子もターゲットに。</p> <p>2) 標本調製、画像取得、画像解析に関する 3 種の開発 SOP に従って測定。</p> <p>3) 最小粒子外径(最小 Feret 径)分布のメディアン値を指標に算出された室内精度不確かさは 1~7%、拡張測定不確かさは 7~20%であった。</p> <p>4) 画像解析ソフトの室間検証の結果、形状や凝集状態が複雑な粒子ほど室間相対標準偏差が大きく、シンプルなサンプル(CRM)で 1.8%、複雑なサンプル(凝集あり・重なり大)で 13.6%であった。これら値は十分に小さく、室間有効性が実証された。</p> <p>5) CRM を用いた真度評価にて、測定値と参照値(ECD モード値)に統計的バイアスは無かった。非凝集性コロイド粒子サイズを正確に測定できる。</p> <p>6) 自動化・標準化(SOP)により測定精度が向上した本手法は、多くの研究室で実装できる。</p>
分析対象ナノ材料	<p>1) CRM 2 種類：コロイダルシリカ懸濁水 (ERM-FD100、ERM-FD304) ・希釈せず、そのまま使用</p> <p>2) 代表試験物質 4 種類：TiO<sub>2</sub> 粉末(NM-100、NM-103)、CeO<sub>2</sub> 粉末(NM-212)、金ナノロッド懸濁水 ・既報(ENPRA dispersion protocol for NANoREG)に従って分散液を調製</p>
食品からの抽出法	記載なし (食品からの抽出なし)
用いた分析手法	<p>1) 3 種の SOP について</p> <p>a) 標本調製：グリッドへの載せ方、最適な濃度、グリッドの電荷</p> <p>b) 画像取得：校正された代表画像一式を、ランダム・体系的に記録。サンプルに応じて、測定粒子数と定量的画像が可能な倍率を選択</p> <p>c) 画像解析：ソフト(ParticleSizer)にて、粒子画像に応じた 4 種類の解析モードから選択。粒子形状が楕円状か非定型か、粒子の重なり(独立、接触、重なっている)。例)CRM：凝集なし、NM-212：集合・凝集、粒子が大きく重なり</p>
分析原理	
不確かさ	<p>1) 最小粒子外径(最小 Feret 径)分布のメディアン値を指標に算出された室内精度不確かさは 1~7%、拡張測定不確かさは 7~20%。</p> <p>2) 測定粒子数が少なくとも 50~500 個程度であれば、室内精度不確かさが 5%より小さくなる。</p>
新規性/解決した課題	1) 球状粒子を対象とした既報と異なり、安定なコロイド粒子懸濁水に限定せず、凝集した粒子や重なりのある粒子など、複雑な形態の粒子も評価でき得る。

	2) CRM を用いた真度評価にて、測定値と参照値(ECD モード値)に統計的バイアスは無く、非凝集コロイド粒子のサイズを正確に測定できる。
利点	<p>1) 画像解析ソフトは無償であり、簡単に実装できるため、どの研究室でもすぐに本手法を導入できる。ただし、一定のトレーニングが必要。</p> <p>2) 自動化が大きいため、時間・コスト効率がよく、精度も向上している。</p> <p>3) 最小 Feret 径と同時に他パラメータも測定されるため、ナノ粒子のサイズ・表面構造・形状特性などの把握も容易であり、リスク分析などに有効。</p> <p>4) 測定粒子数が少なくとも 50~500 個程度であれば、室内精度不確かさが 5%より小さくなる。本研究のサンプル調製法の場合、10 画像取得すれば、500 個以上の粒子を測定できる。</p> <p>5) 粒子測定数が十分であれば、倍率が拡張不確かさに及ぼす影響は小さい。</p>
欠点	
分析における留意事項	<p>1) アルシアンブルー前処理によるグリッド正電荷が効果的。</p> <p>2) ParticleSizer(ソフト)のトレーニングを受けた方が、室内精度不確かさが低減する傾向にあった。</p>
備考	

文献 No.	92
文献情報	Verleysen E, Waegeneers N, Brassinne F, De Vos S, Jimenez IO, Mathioudaki S and Mast J. Physicochemical characterization of the pristine E171 food additive by standardized and validated methods. Nanomaterials (Basel, Switzerland), 10, 592 (2020).
文献 DOI	<a href="https://doi.org/10.3390/nano10030592">https://doi.org/10.3390/nano10030592</a>
論文の概要	<p>1) TiO<sub>2</sub> ナノ粒子 E171 の分析に関して、TEM および spICP-MS を用いた標準手法が検討され、有効性が実証された。</p> <p>2) 粒度・形状分布、結晶構造、物理化学特性を幅広く測定でき、ルチル型・アナターゼ型・顔料の 3 種類を区別できた。</p> <p>3) 分析された市販 15 種類全てにナノ粒子が多く含まれており、うち 12 種類は EC 定義ナノマテリアル(Fmin &lt; 100 nm)に該当した。従来報告データより粒径が小さく、サンプル調製の改良・最適化が寄与している。</p> <p>4) TEM による最小 Feret 径(数基準)と spICP-MS による ESD 中位径が、よく一致していた。</p>
分析対象ナノマテリアル	<p>合計 15 種類の市販 TiO<sub>2</sub> ナノ粒子 E171、いずれも粉末状</p> <p>1) パン・菓子用をウェブで購入：9 種類</p> <p>2) 業者から入手：6 種類 (EFSA で話題となっている銘柄)</p>
食品からの抽出法	<p>1) TEM 用懸濁液；水溶液に分散攪拌後、超音波処理 and/or 遠心分離 ※調製条件を検討、最適条件を決定(下述)</p> <p>2) spICP-MS 用懸濁液</p> <p>a) 超純水に懸濁(0.37 mg/mL)、氷上 5 分後に超音波処理(18.5 分間)</p> <p>b) HNO<sub>3</sub> (4 vol%)水溶液で希釈。検出粒子数 200-2200 となるよう調製</p>
用いた分析手法	<p>1) DLS：ゼータ電位の測定</p> <p>2) 電子線回折：結晶構造</p> <p>3) HAADF-STEM・EDX：粒子形態と元素マッピング</p> <p>4) TEM 画像処理：最大・最小 Feret 径・アスペクト比の数基準分布。分布最頻値(modes of distributions)はカーネル密度推定から。</p> <p>5) spICP-MS：円相当径 ESD ・検出下限は 39 nm(超純水測定時の 3σ)</p>
分析原理	
不確かさ	<p>1) TEM による最小 Feret 径の拡張不確かさ：既報論文に準拠して、不確かさが 10%未満となる粒子数(300 個以上)での測定により担保</p> <p>2) spICP-MS による ESD の拡張不確かさ：併行精度標準偏差など 3 因子を用いて算出され、18%</p>
新規性/解決した課題	<p>1) 粒子のゼータ電位曲線(pH 依存性)が重要。</p> <p>a) 負電荷に強帯電 pH 域でのサンプル調製：懸濁液安定、測定精度向上。</p> <p>b) アナターゼ型と顔料の簡易区別にも有効。負電荷 pH 域が異なるため。</p> <p>2) 顔料はマイカ(K・Al・Si・少量 Fe)を含んでおり、HAADF-STEM・EDX により区別できる。</p> <p>3) TEM 用懸濁液調製に、超音波処理が不可欠。遠心分離の併用が好ましい。</p>

	<p>4) TEM 画像解析手法</p> <p>a) アナターゼ型：楕円フィッティング法が効果的。小粒子の測定が正確に。</p> <p>b) 顔料：領域分割法(irregular watershed)が効果的。マイカとの区別。</p>
利点	<p>1) 懸濁液の調製法が最適化され(pH、グリッド電荷、超音波・遠心沈降)、従来報告データよりも小さな粒度分布が得られた。Fmin&lt;100nm 分析に有効な手法で、EFSA ガイダンスの推進に役立つ。</p> <p>2) spICP-MS による ESD 中位径と TEM による最小 Feret 径(数基準)との合致性が高く、全サンプルでエラーバー(拡張不確かさの範囲)が重複。</p> <p>3) 粒度・形状分布、結晶構造、物理化学特性を幅広く評価できる手法。アナターゼ・ルチル型・顔料の区別も可能。</p>
欠点	<p>顔料サンプルは、安定な分散液を調製できなかったため、spICP-MS 分析ができなかった。なお、顔料は粒径が小さく(TEM で 20-20 nm)、spICP-MS の検出下限(39 nm)以下でもある。</p>
分析における留意事項	<p>TEM グリッドは、アルシアンブルー被覆が効果的(正電荷に帯電、負電荷粒子と相互作用)</p>
備考	<p>全 15 種サンプルは、結果としてアナターゼ型 11 種類、ルチル型 1 種類、顔料 3 種類であった。</p>

文献 No.	94
文献情報	Waegeneers N, De Vos S, Verleysen E, Ruttens A and Mast J. Estimation of the uncertainties related to the measurement of the size and quantities of individual silver nanoparticles in confectionery. Materials (Basel, Switzerland), 12, 2677 (2019).
文献 DOI	<a href="https://doi.org/10.3390/ma12172677">https://doi.org/10.3390/ma12172677</a>
論文の概要	1) 市販菓子中の銀ナノ粒子の大きさ測定と定量評価の手法として、spICP-MS の有効性が実証された。不確かさも検証され、大きさに関する拡張不確かさは 16%、サンプル調製操作に由来する標準不確かさは 4.7%と見積もられた。また、粒子数濃度に関する拡張不確かさは、31-45%であった。 2) 同手法による食添銀ナノ粒子との比較も検討された。大きさ拡張不確かさは 23%で菓子(16%)よりも高く、バックグラウンドが相対的に高いことに起因。粒子数濃度の拡張不確かさは、25-36%であった。 3) 正確さの検証が残課題である(特に濃度分析)。同検証に必要な認証参照材料の準備が求められている。
分析対象ナノマテリアル	3 種類 5 サンプル 参照懸濁液(NM-300K)、食添銀ナノ粒子(E174)：2 種、市販菓子：2 種
食品からの抽出法	1) 食添粒子：Scintillation 容器中、BSA 水溶液+エタノール、超音波分解 2) 菓子：表面にエタノール滴下、次いで BSA 水溶液で溶解、超音波分解
用いた分析手法	1) spICP-MS：球相当径 ESD(検出下限：最小 Feret 径換算で 12 nm) 2) TEM(画像解析ソフト付属)：最小 Feret 径 3) STEM-EDX：代表サンプルの化学分析 ※TEM と spICP-MS で粒度分布が類似
分析原理	
不確かさ	3 種類 5 サンプルの測定結果から算出して比較。 a) 平均メディアン径(論文中 Table 1) ・参照懸濁液内は、最小 Feret 径(TEM)と ESD(spICP-MS)で比較 ・5 サンプル間は、ESD(spICP-MS)で比較 ・拡張性不確かさ(k=2)：参照=13%、食添=20%&23%、菓子=14%&16% ※懸濁液希釈操作のみ参照でさえ 13%(spICP-MS 手法自体の由来) b) 平均粒子径濃度(論文中 Table 2)：spICP-MS で測定 ・拡張性不確かさ(k=2)：参照=21%、食添=25%&36%、菓子=31%&45% c) 平均質量径濃度(論文中 Table 3)：spICP-MS で測定 ・拡張性不確かさ(k=2)：参照=18%、食添=26%&41%、菓子=33%&34%
新規性/解決した課題	標準懸濁液・食添銀ナノ粒子・市販菓子と、サンプル調製レベルが異なる複数種類のサンプルに関する比較検討は初めて。数基準の分析手法 2 種類(TEM と spICP-MS)で検証。分析手法、サンプル調製などのプロセスに関する不確かさを算出して、spICP-MS の有効性を実証。
利点	
欠点	
分析における留意事項	

備考	<p>※サンプル調製法（参考にした Jensen 手法 2011 年を確証高いと評価）</p> <p>a) 銀ナノ粒子 E174 懸濁水</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ Scintillation vial に、E174 を 0.0154 g と BSA 水溶液(0.5 mg/mL)を 20 mL</li> <li>・ 次いで、エタノール 30 <math>\mu</math>L と BSA 水溶液(0.5 mg/mL)0.970 mL を滴下</li> <li>・ 攪拌した後、BSA 水溶液 5 mL を追加</li> <li>・ 氷上で 5 分保持した後、超音波分解 16 分</li> </ul> <p>b) 食品(3 種類の chocolates、12 種類の silver pearls)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ PP 製容器に食品 2 g、濡れるようにエタノール 125 <math>\mu</math>L を滴下</li> <li>・ 次いで BSA 水溶液(0.5 mg/mL)を滴下 (choco=20mL、pearls=25mL)</li> <li>・ 振動、銀表層チョコから完全にはがし、pearl が完全に溶解させる</li> <li>・ その後、E174 と同様の処理を施す</li> </ul>
----	--

文献 No.	96
文献情報	Ward F and Coates M. Gastrointestinal pH measurement in rats: influence of the microbial flora, diet and fasting. <i>Laboratory Animals</i> , 21, 216-222, (1987).
文献 DOI	<a href="https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1258/002367787781268693">https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1258/002367787781268693</a>
論文の概要	<p>1) 絶食・市販餌・精製餌(ラクトアルブミン 20%含有)による消化管 pH への影響について、従来ラットと無菌ラットを用いて検討された。</p> <p>2) 絶食により、従来ラットの前胃 pH は低下したが、他の器官 pH は上昇した。微生物による酸生成が減少したためと推察。一方、無菌ラットでは、絶食の影響が比較的小さかった。</p> <p>3) 市販餌に比べて精製餌の場合、従来ラットで前胃の pH が大きく低下し、盲腸 pH が上昇した。精製餌は発酵性が高い成分を含むため、酸生成が促進されたためと推察。他の器官では pH の違いは小さかった。</p> <p>4) 餌に混ぜた制酸剤(1 wt%三ケイ酸マグネシウム)は、胃内 pH を高めるとの予想に反して低下した。胃内容物の排出が促進され、pH が低くなったと思われる。他方、盲腸と結腸の pH が上昇し、制酸効果が観察された。</p>
分析対象ナノ材料	ナノマテリアルの分析なし
食品からの抽出法	記載なし (食品からの抽出なし)
用いた分析手法	<p>1) ラット麻酔処理後に開腹、測定対象領域をクランプで囲い込み。</p> <p>2) Ag/AgCl 電極にて、前胃から結腸まで順に pH を測定。</p>
分析原理	
不確かさ	記載なし
新規性/解決した課題	絶食や餌の種類、制酸剤によるラット(従来および無菌)の消化系各器官 pH への影響が明らかとなった。
利点	
欠点	
分析における留意事項	
備考	

## 略語/用語リスト

略語	正式名称	和訳	説明
ADME	absorption, distribution, metabolism, and excretion	吸収・分布・代謝・排泄	生体に投与された薬物が、吸収されて体循環血液中に入り、生体内に分布し、肝臓などで代謝され、尿中などに排泄されて生体内から消失する過程。
AF4	asymmetric flow field-flow fractionation	非対称流れ流動場分離法	流れに直行する力場として流れ場を使用し、力場の影響で異なるサイズの混合物を分離する方法。
ASTM	American Society for Testing and Materials	米国材料試験協会	世界最大・民間・非営利の国際標準化・規格設定機関で、現在は ASTM インターナショナルと改名 (Advancing Standards Transforming Markets)。
BEC	background equivalent concentration	バックグラウンド相当濃度	測定 $m/z$ におけるバックグラウンド強度に等しい信号強度を与える測定対象元素の濃度で、バックグラウンド信号強度をその $m/z$ における同位体の感度で除した値。
BET	Brunauer-Emmett-Teller	ブルナウアー・エメット・テラー(吸着等温式)	BET 吸着等温式を用いて、不活性気体の吸着による粉体の表面積測定、あるいは各種気体の吸着現象による粉体表面の特性評価に必要な気体分子の単分子層吸着量を求める方法。JIS や ISO で定められている気体吸着による粉体の表面積測定方法としてこの方法が用いられている。
BSA	bovine serum albumin	牛血清アルブミン	ウシから得られる血清アルブミン。
CLS	centrifugal liquid sedimentation	遠心液相沈降法	媒体に液体を用い、遠心力によって、媒体中を落下する粒子の速度からストークスの式などの沈降速度式に基づいて粒子の大きさを求める方法。
CRM	certified reference material	認証標準物質	測定装置の校正、測定方法の評価または材料に値を付与することに用いられるために一つ以上の規定特性について、計量学的に妥当な手順によって値づけられ、規定特性の値およびその不確かさ、ならびに計量学的トレーサビリティを記載した認証書が付いている標準物質。
DLS	dynamic light scattering	動的光散乱	液体中に分散したナノ粒子、サブミクロン粒子の平均粒子径や粒子径分布を測定する方法。粒子のブラウン運動による散乱光強度のゆらぎについて、自己相関関数を用いてストークス・アインシュタインの式により

			粒子径を求める。
DVLO theory	Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek theory	デリャーギン・ランダウ・フェルウェー・オーバービーク理論	Derjaguin と Landau、および Verwey と Overbeek により独立に提案されたコロイド分散安定性の理論。ゼータ電位を用いて、2つの粒子が互いに近づくと、それらのイオン性雰囲気为重なり合い始め、斥力が生じることを説明する。この理論では、コロイドの安定性に影響を与える力として、ファンデルワールス力と電気二重層力の2つが考えられている。
EC	European Commission	欧州委員会	欧州連合の政策執行機関。法案の提出や決定事項の実施、基本条約の支持など、欧州連合の平時の行財政運営を担っている。
ECD	equivalent circle diameter	円相当径	不規則形状の粒子の投影像を円に相当させて定義した粒子径。
EDX	energy dispersive X-ray spectrometry	エネルギー分散型 X 線分光分析	試料から発生した特性 X 線を直接半導体検出器で検出し、電気信号に変えて分光分析する手法。検出した特性 X 線のエネルギーに比例したパルス電流を生じさせ、これを多チャンネル波高分析器で選別して測定する。
EM	electron microscope	電子顕微鏡	光の代わりに電子（電子線）を観察対象にあてて像を得る顕微鏡のこと。
ENMs	engineered nanomaterials	工業ナノマテリアル	工業的(人工的に)に生産された大きさナノレベルの材料
ESD	equivalent spherical diameter	球相当径	粒子体積と同一の体積をもつ球の直径
Eurachem	*略称では無い		化学測定の国際的なトレーサビリティシステムの構築と、優れた品質基準の推進を目的とする、ヨーロッパの組織ネットワーク。
Feret-min	minimum Feret diameter	最小フェレー径	粒子をはさむ 2 本の平行線間の距離で定義される定方向接線径のうち、最小のもの。Feret が定義したので Feret(フェレー)径と呼ばれている。
FIB	focused ion beam system	集束イオンビーム装置	イオンビームを利用し、試料を観察して加工を行う装置。試料表面を観察し、試料上の特定の位置に対して局所的な加工や成膜を行う。走査電子顕微鏡や透過電子顕微鏡用の試料作製などに用いられる。
GEMMA	gas electrophoretic mobility	気相電気泳動移動度分子分	ナノフローエレクトロスプレーイオン化により、電荷が減少した高分子

	molecular analyzer	析計	から高電荷イオンを生成し、微分型移動度分析装置で分離する化学分析法。粒子の電気泳動移動度から、乾燥状態のナノ粒子の直径を測定する。粒子の電気泳動度は粒径に反比例しており、粒径が小さい程大きくなる。
HAADF	high-angle annular dark field	高角度散乱環状暗視野	格子振動による熱散漫散乱によって高角度に非弾性散乱された電子を円環状の検出器で受け、この電子の積分強度を入射電子プローブの位置に対応させて表示して走査透過電子顕微鏡像を得る手法。
HDC	hydrodynamic chromatography	ハイドロダイナミック・クロマトグラフィー	クロマトグラフィー法の一つで、狭い流路内の流体の速度勾配を利用して、粒子径分布を測定する手法。狭い流路を実現させる方法に、数 $\mu\text{m}$ 径の球形非多孔質充填剤のすき間を利用する充填型 HDC と、数 $\mu\text{m}$ から数百 $\mu\text{m}$ 径の細管を利用する細管型 HDC がある。前者は流路の屈曲部への粒子付着が問題となりあまり使用されない。後者では、数分から数十分で測定が完了する。試料粒子と充填粒子あるいは細管壁との間に働く静電気力やファンデルワールスカの影響を受け、粒子の流出特性が変化する場合が多い。このため再現性のある測定結果が得られるのは、ある試料粒子と界面活性剤水溶液の組み合わせに限られている。
ICP-DRC-MS	inductively coupled plasma mass spectrometer equipped with a dynamic reaction cell	ダイナミックリアクションセル型誘導結合プラズマ質量分析法	イオン源であるプラズマと質量分析部の間に反応セルを置くことによって、多原子イオン干渉を除去する手法。
ICP-HR-MS	high resolution ICP-MS	高分解能型誘導結合プラズマ質量分析法	質量分析部に磁場と電場の二つの分析部を持ち、磁場分析部で質量収束を、電場分析部でエネルギー収束をおこない高分解能を得る。
ICP-OES	ICP-optical emission spectroscopy	誘導結合プラズマ発光分析法	アルゴンプラズマを発光光源として使用し、霧状にした溶液サンプルをプラズマに導入することで元素固有のスペクトルを発光させ、これらのスペクトルから元素の定性、光の発光強度から元素の濃度を求める手法。
IEP	iso-electric points	等電点	両性電解質やコロイド粒子などの電荷がゼロになるような水素イオン濃度 (pH) のことを指す。
ILCs	interlaboratory comparisons	研究室間比較	

IQR	interquartile range	四分位範囲	第3四分位数から第1四分位数までの範囲を示す値であり、中心付近のデータがどのくらい散らばっているかの目安として用いる。第3四分位数とは、データを小さい順に並べて、下から3/4のところのデータであり、第1四分位数とは1/4のところのデータである。
MAD	median absolute deviation	中央絶対偏差	データに対して「中央値との差」(=偏差)の絶対値を計算し、その全ての絶対値から求めた中央値を表す。
MSB	mean squares between days	日間平均二乗	
MSW	mean squares within days	日内平均二乗	
MWCNT	multiwalled carbon nanotubes	多層カーボンナノチューブ	六員炭素環で構成される円筒状チューブが、複数で多層に同心円筒状に構成されたもの。単層チューブが入れ子になっていると考えられており、少ない場合は6層、多い場合で25層ほどの同心多層構造をとる。直径は30 nm程度。物質それ自体に優れた特性をもち、電池電極や複合材料など、産業用利用は拡大し続けている。
NTA	nanoparticle tracking analysis	ナノ粒子トラッキング分析	散乱光とブラウン運動の両方の特性を利用して、懸濁液中の粒子の粒度分布を得る手法。カメラによって、ブラウン運動により泳動している粒子のビデオファイルを取得、ソフトウェアで多くの粒子を個別に追跡し、ストークス-アインシュタインの式を使って流体力学径を算出。
one-way ANOVA	one-way analysis of variance	一元配置分散分析	一つの要因に対して複数の群間における標本の平均を比較するために使われる手法で、数値データに対してのみ使うことができる。
PCA	principle component analysis	主成分分析法	相関のある多数の変数から相関のない少数で全体のばらつきを最もよく表す主成分と呼ばれる変数を合成する多変量解析の一手法。データの次元を削減するために用いられる。
PET	positron emission tomography	ポジトロン断層法	生体に投与された陽電子放出核種から出る陽電子と付近に存在する陰電子との反応により放出される消滅放射線を同時計数法によって検出し、計算により断層像を得る断層撮影法。形態だけを観察するX線CTやMRIと異なり、動的な生体機能を検査できる(in-vivo 検査方法)。
PFA	perfluoroalkoxyalkane	パーフルオロアルコキシアルカン	パーフルオロアルコキシアルカンというフッ素樹脂の一種

PS	polystyrene	ポリスチレン	スチレンを原料とする透明な高分子化合物。
PSL	polystyrene latex	ポリスチレンラテックス	極めて単分散に近い球形の粒子のこと。微粒子計測器の校正に用いる標準粒子。
PTA	particle tracking analysis	粒子トラッキング分析	NTA(nanoparticle tracking analysis)に同じ
PVC	polyvinyl chloride	ポリ塩化ビニル	塩化ビニル（クロロエチレン）の重合反応で得られる高分子化合物である。
QCM	quality control material	品質管理材料	特定の製品やプロセスに品質が期待どおりであることを確認するために使用される、試験や検査の材料のこと。具体的には、分析機器の性能確認や、サンプル分析の正確性を検証するための基準物質として用いられる。
ROI	region of interest	関心領域	元素マッピングを行う際、特定元素の X 線ピークに対して、ある程度のエネルギー幅を持った領域を指定し、この領域に入るエネルギーを持つ X 線の数を信号として、画像化する。ROI は、この領域のことを指す。
SAS	synthetic amorphous silica	合成非晶質シリカ	工業的(人工的)に合成されたシリカであり、ヒュームドシリカ(fumed silica)、水和シリカ(hydrated silica)、沈降シリカ(precipitated silica)、シリカゲル(silica gel)及び含水シリカ(hydrous silica)などの種類がある。
SEM	scanning electron microscopy	走査型電子顕微鏡法	電子レンズを使って電子線を微小径に集束して試料上に照射し、この入射電子ビームを試料上に走査させ、試料から放出される 2 次電子像(主に試料表面の微細な凹凸像)及び反射電子像(組成像：平均原子番号、結晶方位に依存)を検出することで像を得る顕微鏡法。
SEM-EDX	scanning electron microscopy -energy dispersive X-ray spectrometry	走査型電子顕微鏡-エネルギー分散 X 線分光法	EDX 機能を搭載した SEM
SERS	surface enhanced Raman scattering	表面増強ラマン散乱	貴金属などの粗い表面に分子が吸着した際に、バルク分子と比較してラマン散乱の強度が大きく増幅される現象を利用した分光分析手法。ラマン散乱が 1000 万倍にも増強されるため、吸着した分子の微量分析が可能となる。
SOP	standard operating procedure	標準操作手順書	すでに確立した分析手法と同等の品質の分析能力を恒常的に提供するこ

			とを目的に、作業が常に同じように実施されることを保証するために文書化され、承認された手順を指す。
spICP-MS	single-particle inductively coupled plasma mass spectrometry	シングルパーティクル誘導結合プラズマ質量分析法	ICP-MS によるナノ粒子分析法であり、混在する粒径の異なる金属ナノ粒子のサイズと個数濃度を把握でき、溶存金属成分濃度の情報も得られる。ナノ粒子を含む懸濁液をネブライザーで霧化、生成された液滴はスプレーチャンバーおよびトーチを介してイオン源(Ar プラズマ)に導入。プラズマ中で脱溶媒、原子化、イオン化の過程を経て、イオンはインターフェースを介して質量分析計内に取り込まれ、測定対象元素は質量電荷比(m/z)で区別され、検出器で検出される。
STEM	scanning transmission electron microscopy	走査透過電子顕微鏡法	微小電子プローブで二段偏向系を使って薄膜試料上を走査し、試料の一点一点から出てくる透過波(または回折波)の強度を円環状の検出器で受け、その強度をプローブ走査と同期させてコンピュータモニタ上に輝点列として表示して像を得る手法。分解能はプローブ径によって決まる。観察法には明視野法と暗視野法がある。
TEM	transmission electron microscopy	透過電子顕微鏡法	薄膜試料に電子が入射した際、試料中の原子と相互作用することなく通過した透過電子、弾性散乱電子および非弾性散乱電子を活用して観察を行う手法。結晶性試料では電子回折図形が得られ、原子配列の周期性や対称性などを分析できる。また、電子の非弾性散乱による特性 X 線から元素の特定もできる。像の観察だけでなく、試料に含まれる元素やその結合状態などを知ることができる。
TGA	thermogravimetric analysis	熱重量分析	試料を一定の速度で加熱・冷却したとき、あるいは一定の温度で保持したときの重量変化を測定する手法で、蒸発、分解、酸化、還元、吸着等の重量変化を伴う化学的、物理的変化の測定に応用される。試料の水分、溶媒、あるいは含有成分の定量や、熱分解機構の解析、熱安定性、反応性などの評価を行うことができる。
XRD	X-ray diffraction	X 線回折法	試料に X 線を照射した際、X 線が原子の周りにおける電子によって散乱、干渉した結果起こる回折を解析することが測定原理である。この回折情報を用いることにより、粉末試料では、構成成分の同定や定量、結晶サイズや結晶化度、単結晶試料では、分子の三次元構造、加工材料試料で

			は、残留応力や内在する歪み、蒸着薄膜では、密度や結晶性、結晶軸の方向や周期、小角散乱測定では、ナノスケールの粒子の大きさや形状・粒径分布の測定ができる。
--	--	--	--