

201131041A

厚生労働科学研究費補助金
食品の安全確保推進研究事業
ナノ食品の安全性確保に関する研究

(H23-食品-一般-004)

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小川 久美子

平成24(2012)年 5月

目 次

I. 総括研究報告		
ナノ食品の安全性確保に関する研究	-----	1
小川久美子		
II. 分担研究報告		
1. モンモリロナイトの安全性に関する研究	-----	11
小川久美子 西川秋佳		
(資料) Fig. 1～8, Table 1～8		
2. 食品添加物規格モンモリロナイトの粒子サイズに関する研究	-----	29
小川久美子 上原誠一郎		
(資料) Fig. 1～3		
3. ナノクレイの食品・食品容器としての使用状況調査	-----	34
広瀬明彦 平田睦子 小野 敦		
(資料) 表. 1, 2		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	48
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	49

ナノ食品の安全性確保に関する研究

研究代表者 小川 久美子 国立医薬品食品衛生研究所 病理部長

研究分担者 西川秋佳 国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター長

分担研究者：広瀬 明彦 国立医薬品食品衛生研究所 総合評価研究室 室長

研究要旨

ナノマテリアルには、様々の材質が考案されており、本邦では、その工業的利用の振興が期待されている。一方で、カーボンブラックや酸化チタン、カーボンナノチューブなどは、環境からの暴露による、ヒトの健康への影響が懸念されており、複数の検討がなされている。モンモリロナイト $(\text{Na, Ca})_{0.33}(\text{Al, Mg})_2\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ を主成分とするナノクレイは、加工食品の固化防止や内容物の保存安定性の向上を目的として PET ボトルなどの包装容器への使用が検討されているが、安全性に関する情報は充分とは言えない。本研究は、ラットを用いたナノクレイの経口投与による毒性影響の有無や体内動態の解明および使用状況の把握による安全性の確保を目的として実施した。

食品添加物規格として市販されているナノクレイのうち、粒子のサイズが異なる2種類の天然鉱物由来のモンモリロナイト（ベンゲルフレーク・ベンゲルクリア）について、F344 雄性ラットを用いて検討した。用量設定を目的とした5%の濃度までの4週間混餌投与では、肝重量の減少はみられるものの、明らかな病理組織学的変化はみられなかった。13週間の混餌投与では、一般状態、体重、臓器重量には投与に関連した変化は見られず、現在、血液生化学的検討および病理学的検討を進めている。また、ベンゲルクリアおよびベンゲルフレークを1.3g/kg体重の用量でF344雄ラットに単回胃内強制経口投与後、経時的に屠殺剖検し、血中のアルミニウム濃度を指標に生体への移行を検討したが、投与による変動は見られなかった。さらに、4週間の5%混餌投与群の腎臓、肝臓、脳、脾臓および脛骨でのアルミニウムとマグネシウムの濃度には対照群との間に差異は見られず、ベンゲルクリアおよびベンゲルフレークの混餌投与による生体への移行および蓄積はほとんどないものと考えられた。一方、ナノ関連物質の毒性は、粒子サイズによって異なる可能性があるため、ベンゲルフレークおよびベンゲルクリアの粒子サイズを検討した。走査電子顕微鏡（SEM）観察により、ベンゲルフレークは、数100 μm の板状の粒子で、粒子同士が良く接着し、挫滅しても数10 μm 程度と大型であった。ベンゲルクリアは5~30 μm の粒子細粒状で粒子同士が良く接着し、挫滅するとさらに細粒になる事が示された。また、食品・食品容器分野におけるナノクレイのリスク評価の一環として、本分野におけるナノクレイの用途を調査することにより、暴露評価のための基礎的情報収集を行った。平成23年度は、ナノクレイの食品・食品容器分野における使用実態の全体像を把握するために、ナノクレイの物質情報、使用形態、使用目的、開発または実用化の段階、出典等について調査した。その結果、ナノクレイの増粘性、分散性、吸着性（吸水性）、ガスバリア性、触感改良等の機能から期待されている

用途として、クリーム・粉末化粧水・歯磨き等の化粧品、自動車部品やペットボトル等の部品・容器包装材をはじめ、農薬プロアブル・接着剤・洗剤等の工業製品、塗料、難燃剤、触媒担体等があることが示された。実用化されている食品分野における主な用途は、包装容器材でガスバリア性の向上を主目的としてナノクレイが使われている他、液体農薬の沈降防止剤としても用いられていることが明らかとなった。今年度の調査では、使用実態等の実例収集から経口暴露の可能性について情報が得られたが、次年度以降は暴露評価に資するより詳細な使用量調査等を行う必要があると考えられた。

A. 研究目的

ナノマテリアルには、様々の材質が考案されており、その工業的利用の振興が期待されている。ナノマテリアルの中でも、カーボンブラックや酸化チタン、カーボンナノチューブなどは、環境からの暴露による、ヒトの健康への影響が懸念されており、複数の検討がなされている。一方、モンモリロナイト ($(\text{Na}, \text{Ca})_{0.33}(\text{Al}, \text{Mg})_2\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$) を主成分とするナノクレイについては、加工食品の固化防止剤として使用されている以外に内容物の保存安定性（ガスバリア性、耐摩擦性など）の向上を目的としたナノクレイを含む PET ボトルなどの開発も進められているが、リスク評価に必要な経口投与による毒性影響や体内動態を詳細に検討した報告はなく、早急の検討が必要である。本研究では、ナノクレイの主成分であるモンモリロナイトについて、ラットへの反復経口投与による亜急性毒性影響および体内動態の検討を目的とした。

また、ナノ関連物質の毒性は、粒子サイズによって異なる可能性があるため、被験物質の粒子サイズを検討することを目的としている。

さらに、ナノクレイの使用・開発状況、特に食品・食品容器分野におけるナノクレイの用途を明らかにするとともに、その使用状況を把握することも目的とする。

B. 研究方法

1) 4週間混餌投与用量設定試験

用量設定試験として、食品添加物規格として市販されているナノクレイのうち、粒子のサイズが異なる2種類のモンモリロナイト（ベンゲルフレ

ク・ベンゲルクリア）について、飛散を最小限に抑えるため、0.2、1、5%の用量で基礎飼料と混合しペレット状にした固形飼料を、F344 雌雄ラット各群5匹に4週間投与し、一般状態観察と主要臓器の病理組織学的検査を行った。

2) 13週間混餌投与毒性試験

用量設定試験の結果にもとづき、5、1、0.2 および 0.04 % の用量で F344 ラット雌雄の各群 10 匹に 13 週間混餌投与し、一般状態観察、血液生化学検査、病理組織学的検査を実施する。

3) 生体内移行試験

F344 雄性ラットに、陽性対照として指定添加物の硫酸アルミニウムアンモニウムを静脈内投与 (2mg/kg bw)、あるいは、胃内投与 (1000mg/kg bw) し、1、2、4、6 及び 24 時間後に血液、腎臓、肝臓、脳、脾臓および、文献上アルミニウムの蓄積が示唆されている脛骨を採取して、ICP-MS によるアルミニウム量の測定を行った。また、上記胃内投与と等量のアルミニウムを含有すると想定される (1.3g/kg bw) ベンゲルフレクとベンゲルクリアについて、胃内投与を行い、経時的に採材を行った。さらに、連続投与による臓器への沈着の可能性を検討するため、用量設定試験の4週間混餌投与動物において、対照群、5%ベンゲルクリアおよび5%ベンゲルフレクの投与群について、腎臓、肝臓、脳、脾臓および脛骨でのアルミニウムとマグネシウムの濃度を測定した。

4) モンモリロナイトはラットへの経口投与試験に用いた、食品添加物規格のベンゲルフレク

とベンゲルクリアの2種類の粉末を使用した。飼料にモンモリロナイトをそれぞれ0%, 0.2%, 1.0%, 5.0%の割合で混合したペレット飼料も試料とした。

走査電子顕微鏡 (SEM) 観察試料は、スライドガラスに銅製のテープを張り付けた後、それぞれの試料をカーボンテープ上に張り付け、厚さ約30 nmの炭素蒸着をおこない作成した。

測定条件は、九州大学のエネルギー分散型 X 線分析装置 (Oxford 製 ISIS) を装着した日本電子製走査型電子顕微鏡 JSM - 5800LV を使用し、加速電圧: 3 kV (二次電子像), 20 kV (反射電子像)、対物しぼり: 3、スポットサイズ: 8 とした。

5) ナノクレイの食品・食品容器分野における使用実態の全体像を把握するために、ナノクレイの物質情報、使用形態、使用目的、開発または実用化の段階、出典等の情報収集を行った。情報は、日本特許 (PATOLIS)・学術文献 (JDream II) 等の各種データベースの検索に加え、ナノクレイ全体の使用実態やナノクレイを扱うメーカーおよび関連団体の公式 HP (プレスリリースや技術資料、ユーザー情報等) のインターネット検索により確認した。また、食品分野のナノクレイの使用状況を把握するために、ナノクレイを扱う現場情報の入手を目的として、国内のナノクレイ・メーカー等に対し、ヒアリング調査を行った。各種検索作業やヒアリング等については、(株)東レリサーチセンターにご協力をいただいた。

(倫理面への配慮)

動物の数は最小限にとどめ、実験は、国立医薬品食品衛生研究所の実験動物取り扱い規定に基づき動物の苦痛も最小限とするように配慮して行う。

C. 研究結果

1) 4 週間混餌投与用量設定試験

4 週間投与試験では、死亡例はなく、体重増加抑制も見られなかった。有意差はないものの、摂餌

量に用量依存的な増加傾向を認めた。臓器重量は、雄のベンゲルフレック 0.2%と 5%投与群では、肝臓の絶対重量の有意な減少を認めた。また雄のベンゲルフレック 0.2%、1%、5%、ベンゲルクリア 1%、5%投与群では、肝臓の相対臓器重量の有意な減少を認めたが、病理組織検査では明らかな変化は認めなかった。

2) 13 週間混餌投与毒性試験

13 週間投与試験では、一般状態、体重、摂餌料および臓器重量には投与に関連した変化は見られなかった。血液学的検査では、雄の 1%以上のベンゲルフレック群で MCH、MCHC および PLT の増加と、5%ベンゲルクリア群と 5%ベンゲルフレック群で WBC の有意な増加が認められたが、いずれも用量相関はなく、偶発的な変化と考えられた。現在、血液生化学的検討および病理学的検討を進めている。

3) 生体内移行試験

ICP-MS を用いて検討した血液中のアルミニウムの含有量は、硫酸アルミニウムアンモニウムを静脈内投与した群では、投与 1 時間後には 0.6 ppm と、一時的な増加が認められたものの、ベンゲルフレックおよびベンゲルクリアを含む経口投与群においては、投与に関連した増加は見られなかった。また、投与 2 時間後の各臓器でのアルミニウム濃度は腎臓、肝臓、脳および脾臓では無処置対照群と同等であり、脛骨では軽度の増加が硫酸アルミニウムアンモニウム胃内投与群で見られたが、最終的には計測の誤差範囲と判断された。また、ベンゲルフレックとベンゲルクリア投与群についても対照群との差異はみられなかった。さらに、4 週間投与試験においては、いずれの臓器においても、アルミニウムおよびマグネシウム濃度は対照群との間に差異は見られなかった。

4) ベンゲルフレックは、数 100 μm の板状の粒子で、粒子同士が良く接着し、挫滅しても数 10 μm 程度と大型であった。ベンゲルクリアは 5~

30 μm の粒子状で粒子同士が良く接着し、挫滅するとさらに細粒になった。ベンゲルフレークの混合飼料には、数 10 μm 程度のモンモリロナイト粒子がよく見られた。飼料とベンゲルフレーク粉末はきれいには混合しておらず、粉末は元の形を保ったものが多くみられた。ベンゲルフレーク粉末は混合比が大きいほど密集して混ざっていた。

一方、ベンゲルクリア粉末は細粒で、判別が困難であるが、ベンゲルフレーク混合飼料と比べるとよく飼料に混合していた。ベンゲルフレーク混合飼料と同様に、ベンゲルクリア粉末の混合比が大きいほど密集している。

5) ナノクレイの使用実態について

1. 食品分野におけるナノクレイの用途

1) ナノクレイの定義

粘土鉱物（クレイ）は、水を含む粘性を持つ土の総称であり、その主体は層状ケイ酸塩鉱物である。層状ケイ酸塩鉱物として、カオリン鉱物、雲母（マイカ）、スメクタイト等があげられており、“ナノクレイ”は、層状ケイ酸塩から構成される板状結晶（板の厚み：1nm 程度、板の二次元の広がりにおける「長さ」または「幅」：数十～数百 nm）のものを指す。

“ナノクレイ”は、クレイを構成する層状ケイ酸塩の塊（最小でもサブミクロン以上のサイズ）から、板状結晶 1 枚（厚み：約 1nm）が、あるいは、板状結晶（ナノメートル領域の大きさ）が、剥離することで生じ得る。

例えば、モンモリロナイト（ベントナイト [スメクタイト系粘土鉱物] の主成分）は、 $\text{Si}_4\text{O}_6(\text{OH})_4$ の四面体構造のシート（四面体シート）－ $\text{Al}_2(\text{OH})_6$ または $\text{Mg}_3(\text{OH})_6$ の八面構造のシート（八面体シート）－ $\text{Si}_4\text{O}_6(\text{OH})_4$ の四面体構造のシート（四面体シート）の三層から構成される板状結晶（厚さは約 1 nm、結晶横方向の長さ 200～300 nm 程度）が同方向に積み重なった層状構造を有している。このモンモリロナイトにおいて、厚さがナノレベル（約 1 nm）の板状結晶の剥離が生じる

と、ナノクレイが発生することになる。

ナノクレイとなる物質の代表例としては、モンモリロナイト、マイカ等があげられる。一方、天然粘土鉱物原料ではなく純粋化学原料で合成された板状結晶構造物もナノクレイとして扱われ得る。

例えば、クニミネ工業（株）製「クニピア」は、天然ベントナイト（モンモリロナイト含有率 60～70%）を粉砕した後、石英、長石、 α -クリストバライト等の不純物を除去して、モンモリロナイト含有率 100%に精製製造したナノクレイである。同社製の合成無機質高分子「スメクトン」は、純粋化学原料の Mg, Al, Si 等の無機化合物より合成された純白色コロイド性含水ケイ酸塩である。厚さ約 1 nm、幅（又は長さ）が約 50 nm の板状結晶であり、ナノクレイとして扱われている。この「スメクトン」は天然粘土原料由来ではないため、ガラス質、着色金属酸化物、腐植質などの土壤中夾雑物の混入がなく、「クニピア」の現用途（例えば、包装容器材、燃料電池バックシート、断熱材・不燃材）以外にも利用できるとされている。

2) ナノクレイの特性・メリット

ナノクレイの基となる粘土鉱物には、上述のように基本構造が板状結晶であるため、アスペクト比が大きく、結晶表面に正または負の電荷を帯びているので高い表面活性がある。この構造や表面活性の特徴から、主に以下の特徴があることが知られている。

- ・ 膨潤性： 結晶の層間に水や有機溶媒が入って底面間隔が広がる。
- ・ 増粘性： スメクタイト系粘土は結晶同士が水中で膨潤し、剥離分散により増粘する。
- ・ イオン交換性： 鉱物表面にある負または正の電荷をもつため、その電荷と反対の陽イオンまたは陰イオンの吸着が起こる。この吸着するイオンと溶液中の異種イオンの間で交換反応を瞬時に起こす。
- ・ 吸着性： 層と層の間は帯電しているため、層間に入り込む無機・有機イオンや極性分子

等を吸着できる。

このような粘土鉱物の特徴を基にナノ粒子（ナノクレイ）にする特性・メリットとしては、主に次の点が挙げられている。

- ・ 少量の添加で、元来の粘土鉱物の機能（機械的特性、ガスバリア性、難燃性、耐熱性、寸法安定性等の向上）を発揮できる。
- ・ 少量添加ですむため、材料・部品の軽量化ができる。
- ・ 樹脂表面の平滑性が向上する、外観が向上する。

3) ナノクレイの使用分野

ナノクレイの特性の利用については、粘土鉱物を使用するが、ナノクレイが共存すると推測されるもの（△）とナノクレイの特性を期待して意図的に利用しているもの（●）に大きく分類した。

△：粘土鉱物としての使用については、以下のような傾向が認められた。

- ・ 粘土鉱物は粒径分布に富んだ微細粒子から構成されるため、ナノサイズの粒子（ナノクレイ）が含まれる。粘土鉱物の使用の際、ナノクレイも存在する可能性がある。
- ・ 主な使用目的は、鋳物砂の粘結剤、土木・建築の安定液材料、ボーリング用泥水調整剤、猫用トイレ砂の固化材、農薬造粒助剤、練炭の成形助剤、肥料団結防止剤等があり、粘土鉱物の「増粘性」や「吸着性」等の機能が利用されている。粘土鉱物は粉末状にしてそのまま使用されるケースが多い。
- ・ 国内で認可されている食品添加物の粘土鉱物は、カオリン、ベントナイト、タルク等がある。これらは、製造工程で用いるワインや酢の清澄剤（吸着剤）、ヒトの健康食品（例、ベントナイトの吸着性や膨潤性により膨満感を促す）として適用される。清澄剤・健康食品ともにナノクレイとしてではなく、天然の粘土鉱物として用いられている。ベントナイトの吸収能を利用するメリットに、タンパク質の除去、銅の除去、ポリフェノールオキシダーゼの吸着・除去、機械的吸着等がある。（また、カルシウムの豊富

なカルシウム・モンモリロナイトを主成分とするベントナイト（米国、カルフォルニア州南部産）は、カルシウム補給サプリメントとしても使われている。食用粘土「テラミン(TerraMin)」（CEMC 社製）は、同産の天然モンモリロナイトを天然のパーム油と配合したタブレット錠や粉末状（いずれも無添加）で市販されている。タブレット錠の場合は、1粒1,000mgを1日3錠程度服用する。）

- ・ 動物用飼料にもヒトの食品添加物と同様に、吸着性、膨潤性を期待して利用される。
- ・ 医薬品の分野では、湿布、クリーム、塗り薬、内服薬等に適用される。粘土鉱物には、分泌物を吸収する吸着剤としてカオリン鉱物、粉末製剤の滑沢剤（すべり性や延展性が高く皮膚に付着しやすいことを利用）としてタルク、患部からの水分や分泌物を吸収する吸着剤としてベントナイト等がある。内服薬については、鉱物の皮膜成形性・有機物吸着性を利用して、胃壁の保護・胃腸内有害物質や細菌の吸着、胃腸内の過剰水分を吸収して下痢を止める作用等を持っている。
- ・ 汚染物質の封じ込めバリア材は、高分子フィルムに顆粒状のベントナイトを複合されたものである。ベントナイトは、水による膨潤や水の移動の拘束により、フィルム層に出来た亀裂を防ぎ、汚染物質の漏洩を防止する役割を有している。

●：一方ナノクレイとしての使用については、以下のような傾向が認められた。

- ・ ナノクレイは用途開拓のために様々な研究が進んでおり、主に工業用途に向けて実用化されつつある。今後は需要が伸びる分野としても工業用途が考えられる。ベントナイトにおけるナノクレイの需要はわずかである。（ヒアリング結果より）。
- ・ ナノクレイの増粘性、分散性、吸着性（吸水性）、ガスバリア性、触感改良等の機能を利用した用途として、クリーム・粉末化粧品・歯磨き等の

化粧品、自動車部品やペットボトル等の部品・容器包装材をはじめ、農薬プロアブル・接着剤・洗剤等の工業製品、塗料、難燃剤、触媒担体等がある。

実用化されている主な用途は、化粧品と包装容器材である。包装容器材にはガスバリア性の発現のためにナノクレイが使われており、そこから派生した用途として、高いガスバリア性を持つガスケット・パッキン、太陽電池、電子ペーパー、フレキシブル基板、水素タンク等への開拓が始まっている。

化粧品におけるナノクレイの使用目的は、賦形剤、増粘剤、触感改良である。乳液ではナノクレイでは0.5重量%、クリームでは2重量%を他組成成分と配合して使用されている。化粧品材料としての表示は、ケイ酸アルミニウムマグネシウム、クレイミネラルズ（INCI:CLAY MINERALS）等がある。

化粧品製剤の特許では、水膨潤性粘土鉱物（粒子径は1 μ m以下）が化粧料の組成に紫外線吸収剤として適用されている。水膨潤性粘土鉱物には、モンモリロナイト、バイデライト、ノントロナイト、サポナイト、ヘクトライト等があり、市販品ではクニピア、スメクトン（いずれもクニミネ工業製）等が適用可能である。特徴は、粘土鉱物の層間にポリ塩基とアニオン性紫外線吸収剤がインターカレート（包接）されている点で、これにより紫外線吸収剤を粉末成分として化粧料製剤の配合を可能にしている。両用ファンデーションの配合例では、紫外線吸収剤包接粘土鉱物は全組成成分に対して約1.9重量%（配合率より換算）である。

部品・包装容器材におけるナノクレイの使用目的は、機械的特性（強度・弾性）、ガスバリア性、難燃性の向上である。食品用途に関しては、ガスバリア性の向上のためにペットボトルの容器材またはコーティング材があり、ナノクレイと樹脂中に分散させたナノコンポジット材として使用される。コスト面から容器材よりもコーティング材が使われるケースが多い。コー

ティング材でのナノクレイの添加量は1~2重量%である（ヒアリング結果より）。

ナノコンポジット材の難燃効果は、ナノクレイ（シート形状）の作用により樹脂の燃焼表面に炭化層が形成し燃焼時の発熱速度を低下させる点といわれている。この難燃効果は、環境に配慮した非ハロゲン系難燃化技術として期待されている。用途は電気・電子部品に用いる電線材料等がある。（ホーゲン製「nanoMax シリーズ」は、樹脂にナノクレイ 40~60重量%を分散した製品である。これを樹脂で希釈して機械特性の向上には8~12%、難燃性の向上には2~8%の添加がよいとされている。）

農薬プロアブルは、ナノクレイは液体農薬の沈降防止剤として用いられる。従来は2~3重量%のベントナイトを配合していたが、最近は少量添加ですむナノクレイの適用に移行されつつある。

4) 食品分野におけるナノクレイの使用実態

ナノクレイの特性を意図的に利用した食品分野において使用実態を把握するために、学術文献および日本特許などから情報を整理した。そのうち、粒径サイズとしてナノサイズのもが含まれているものが明らかなものについて、以下に概要を記す。

食品用包装容器材：最近では、食品の味・鮮度等の質や、食品衛生が購買の選択要因になる傾向が強く、酸素（ガス）バリア性の要求が高まっている。ナノクレイは、ガスバリア性の向上のため、樹脂に添加するフィラー（ナノコンポジット材料）として使用される。ナノコンポジット材料のガスバリア性の発現は、樹脂中に分散しているアスペクト比（粒子長さ/粒子厚さ）の高い層状ケイ酸塩粒子（ナノクレイ）が、ガス拡散の障害物として作用するためと考えられている。樹脂中に分散する粒子の存在により、ガス拡散経路が長くなり、拡散に有効な断面積が小さくなるため、ガスのマクロな透過性が低下する。

<食品用途樹脂>

食品用として、PET、ONY（二軸延伸ナイロン）、OPP（二軸延伸ポリプロピレン）フィルム等の基材にコートするフィルム材や飲料用容器としての適用が進められている。

ナノコンポジット系コーティング剤の樹脂としては、PVA が一般的であるが、それ以外にウレタン系樹脂も適用されている。適用されるナノクレイには、膨潤性層状ケイ酸塩で、その代表的なものとしてモンモリロナイト、バイデライト、ノントロナイト、サポナイト、ヘクトライト、スチブンスイト等のスメクタイトや合成膨潤性フッ素マイカなどがある。

容器・フィルム材に主に使用されているナノクレイはモンモリロナイトであり、その粒径範囲は0.1nm～50 μ m、添加量は樹脂に対して数～数十重量%である。

ナノクレイ・メーカーのヒアリング調査では、ペットボトル用コーティング材におけるナノクレイ（モンモリロナイト）の添加量は約1～2重量%である（ヒアリング結果より）。また、商業化されているガスバリア・コーティングフィルムの中には添加量10～30重量%という報告もある。

<PET ボトル容器>

炭酸清涼飲料水等の飲用PETボトルや包装に関するガスバリア材の特許では、配合については、PET樹脂に対して50～5,000ppmの割合でナノクレイ（粒子サイズ20～100nm、例 スメクタイト系粘土）を添加している。超音波で分散させたナノクレイの懸濁液を、PET樹脂に供給してプリフォームを作製する。このプリフォームを射出成形・延伸ブロー成形を経て、高バリア性のPETボトル容器ができる。

<粘土膜>

産業技術総合研究所と大和製罐と共同で、ナノクレイを主成分とする粘土膜「クレースト」を開発し、食品・医薬品用包装材料に向けた実用化に取り組んでいる。粘土膜「クレースト」は、ナノクレイ（厚さ1nmの層状結晶）を樹脂中に同じ向きに配向させて重ねて緻密に積層した構造となっている。膜の組成の内訳例として、ナノクレ

イは90質量%、有機系バインダー（樹脂）10質量%が報告されている。この粘土膜をPETフィルムに塗布すると、高い酸素ガスバリア性や自己修復能が発現する。

洗浄剤（台所用・皮膚用・毛髪用）：ナノクレイは、洗浄剤の泡立ちの良さや触感改良のために使用される。ナノクレイにはモンモリロナイト、バイデライト、ノントロナイト、サポナイト等の水膨潤粘土鉱物および膨潤性マイカ（雲母）が挙げられる。使用状態については、二鎖二親水型界面活性剤の配合量が1～30質量%および他成分にナノクレイを0.1～1質量%分散させる。

歯磨剤：歯磨剤は、親水性粘土材、変性セルロースポリマー、カルボキシビニルポリマー及びアニオン性ポリマー由来の天然ゴム類を含む結合剤系（粘度約10,000～450,000Pa）、口腔ケア活性物質、極性溶媒キャリアから構成される。親水性粘土材には、天然及び合成層状ケイ酸塩鉱物類、ヒュームドシリカ類等があり、その使用目的は、結合剤系の増粘剤、柔らかい口感触、容易な分散、歯間部分への進入の改善である。ヒュームドシリカ類の場合、その粒径は約5 μ m未満、典型的には約1nm～1 μ mである。粘土材の添加量は全組成物の約0.01～4重量%が望ましいとされる。

ドラッグデリバリー（薬物送達用組成物）：薬物の有効成分を担持・送達する組成物（薬物送達用組成物）はナノコンポジットであり、そのフィラーにナノクレイが使用される。ナノクレイの使用目的は、ドラッグデリバリーの機械的性質や生分解速度を、有効成分または治療用適用形態に合うように調整することである。適用されるナノクレイには、ベントナイト、モンモリロナイト等のスメクタイト系粘土であり、その添加量はナノコンポジットの1重量%～10重量%である。

有効成分を含むドラッグデリバリーナノコンポジットの組成例として、ポリエチレングリコール95%、クロイサイト4%、有効成分パラセタモ

ルはポリエチレングリコールに対して 5%がある。ポリエチレングリコールにクロイサイトを混練して押出成形する。本ドラッグデリバリの剤形の範疇には、調節放出用の経口薬物送達系、インプラント系（生分解性または非生分解性）、経口送達、経鼻送達、医療デバイス、坐剤、皮膚用製剤等がある。

5) ナノクレイ・メーカーのヒアリング調査結果
<質問項目>と主な回答について以下にまとめた。

<物質情報>

モンモリロナイト：天然ベントナイトを粉砕した後、石英、長石、 α -クリストバライト等の不純物を除去して、モンモリロナイト含有率を 100%に精製製造したもの。基本構造は板状結晶（ケイ素四面体層-アルミナ八面体層-ケイ酸四面体層の 3 つの層が積み重なって一枚の結晶を構成）で、結晶の厚さ 1nm、層の長さ（幅）は 300~500 nm 程度である。モンモリロナイトの性質は、水中の膨潤性が高いほか、粘結性、チクソトロピー性、陽イオン交換性、吸着性等を持っているが、ベントナイトは産地により組成が異なるため、用途に応じて産地を選択している。

<含有製品の出荷量、使用量、配合率>

ナノクレイの出荷量、使用量については、数値データは得られなかった。食品用フィルム・コーティング材のモンモリロナイトの添加量は、2~3 重量%である。

<ナノクレイの具体的な使用形態>

モンモリロナイトを樹脂中に分散させている状態。

<食品分野におけるナノクレイ使用の役割期待>

食品用包装容器材として、最近では、食品の味・鮮度等の質や、食品衛生が購買の選択要因になる傾向が強く、酸素（ガス）バリア性やフィルム・容器の透明性の保持について要求が高くなっているため。食品関連メーカーからの問い合

わせは多い。

<ナノクレイを用いた食品に対する安全の取組>

食品添加物、健康食品のような分野では、ナノクレイのヒト健康影響（安全性）を懸念することから、これらの用途開拓は現時点では積極的ではない。

化粧品でのナノクレイは、安全性が問われている。ナノ粒子であるために、皮膚に蓄積、目への混入、経口・吸入による体内影響などが懸念されている。

【参考文献等】

- 古川 猛：ナノクレイ 特集 添加剤・フィラーの活用術，プラスチック，Vol. 61, No. 9, pp. 21-23
- 鬼形正伸：23. ベントナイトの特性と利用，粘土基礎講座 I（粘土科学入門），粘土学会ホームページ
<http://wwwsoc.nii.ac.jp/cssj2/seminar1/section23/text.html>
- 「粘土膜用特殊粘土 クニピア-M」
「クニピアのご案内 1000 の用途を持つ素材、高純度ソジウム・モンモリロナイト」
「合成無機質高分子シリーズ スメクトン」
粘土ハンドブック（第 3 版），日本粘土学会編，2009 年 5 月，1000 pp.
- 佐藤 努：4. 粘土の特性と利用，粘土基礎講座 I（粘土科学入門），粘土学会ホームページ
<http://wwwsoc.nii.ac.jp/cssj2/seminar1/index.html>
- ホージュン ホームページ，
<http://www.hojun.co.jp/>
- ホージュン 精製、有機ベントナイトパンフレット「S-BEN ORGANITE, BEN-GEL」
(<http://www.hojun.co.jp/image/yuki2.pdf>)
- the Secret Power of Nature（ケイネット・ジャパン）ホームページ，
<http://www.knetjapan.net/spn/index.html>
- 紫外線吸収剤包接粘土鉱物及びこれを含有する化粧品，（株）資生堂，特願 2010-255481（特開 2011-132216）
- 経産省 化学工業統計 平成 23 年，
http://www.meti.go.jp/statistics/tyo/seidou/result/ichiran/02_kagaku.html
- 葛良 忠彦：2011 年後半以降、食品包装は“ここに注目！（前編）市場動向とパッシブバリアフィルムの開発トレンド，食品包装，2011/8, pp. 18-23
- 機能性粘土素材の最新動向，シーエムシー出版，2010 年 3 月
- 渡辺晴彦：ナノコンポジットの包装への応用，PACKPIA, 2002. 01, pp. 34-37
- ポリエステル系ガスバリア樹脂およびそのプロセス，特開 2009-24159（特願 2008-99731）
- 微小な傷なら自己修復する酸素ガスバリアフィルム-粘土を用いた食品包装材の実用化へ-，産総研・大和製罐共同プレス発表資料，平成 23 年 10 月 11 日，
<http://www.daiwa-can.co.jp/news/111012>.

html
米本 浩一：水素ガスバリア性の高い粘土膜プラスチック複合材料，九州工業大学新技術説明会，2008年11月28日，
<http://www.jstshingi.jp/abst/2008/kit/program.html>
日本包装技術協会ホームページ，
<http://www.jpi.or.jp/index.html>
2010年プラスチックフィルム・シートの現状と将来展望，株式会社富士キメラ総研
日本容器包装リサイクル協会 ホームページ，平成23年度版資料 再商品化義務量算定係数の算出根拠，
http://www.jcpra.or.jp/manufacture/entrust/entrust02/pdf/h23/specify_hponly_02.pdf
洗浄剤組成物，ライオン(株)，特開2001-172669(特願平11-363234)
親水性粘土材を含む結合系を備える歯磨剤組成物，ザ プロクター アンド ギャンブル カンパニー，特表2009-519235(特願2008-542918)
日本歯磨工業会 ホームページ，
<http://www.hamigaki.gr.jp/hamigaki1/toukei02.html>
ナノコンポジット薬物送達用組成物，ザ クイーンズ ユニヴァーシティ オブ ベルファスト，特表2006-525301(特願2006-506219)

D. 考察

今回用いた食品添加物規格の天然鉱物であるベンゲルクリアおよびベンゲルフレークについては、これまでの検討においては、強い毒性はないと考えられた。13週間混餌投与試験の詳細な検討と共に、体内への移行が見られない点について、さらに確認が必要と考える。また、今後ナノクレイとしての使用が検討されている、粒子サイズがさらに細かいと考えられる合成スメクタイトについても、組織への移行など安全性の検討を継続することにより、安全で有効な使用を進める上で重要なデータが得られると考える。

電子顕微鏡による観察では、ベンゲルフレークよりもベンゲルクリアは粒子が小型であったが、大部分は100nmよりも大きいと考えられた。控滅によっては、さらに小型になるため、飼料中でより小型の粒子がどれ位であるのか、さらに検討が必要である。

また、今回用いた天然の鉱物は粒子サイズにばらつきが大きいと考えられた。そうした面においても、より均一な合成スメクタイトでの検討を考慮する必要性が示唆された。

今回の使用状況の調査では、①粘土鉱物とナノ

クレイの解釈とその取り扱い方の現状、②ナノクレイの使用分野の把握、③ヒトがナノクレイを経口する可能性のある用途(食品分野)の推測、④食品分野における使用実態例の情報収集、⑤食品分野におけるナノクレイ経口暴露量に関連した周辺データの収集について取り纏めることができた。また、ナノクレイの用途として、包装容器以外に、直接経口摂取の可能性のある歯磨き等や、皮膚を接触する化粧品もあることが確認できた。食品用容器包装は、鮮度保持や軽量(薄膜)化により、ガスバリア性に対する要求が高まり、ナノクレイの使用は増加すると思われる。

以上のことから、食品分野において、ナノクレイを意図的に利用した用途について纏めてみると、ヒトがナノクレイを経口摂取する可能性があるものとしては、食品用包装容器材、液体農薬の沈降防止剤、洗浄剤(台所用洗剤)、歯磨き等があり、粘土鉱物を利用した用途では、食品添加物、農薬造粒剤、動物用飼料添加物、医薬品等があると推測された。

次年度以降は、食品分野のナノクレイの暴露評価の精度を上げるために、食品用包装容器材、農薬の沈降防止剤、歯磨き、洗剤など、ヒトがナノクレイを経口摂取する可能性のある用途における使用実態の詳細調査(ナノクレイの組成・配合率等)を継続することが必要であると考えられた。

E. 結論

これまでの検討では、食品添加物規格のナノクレイとして市販されているベンゲルクリアおよびベンゲルフレークは、生体への移行は否定的であり、経口投与による強い毒性はないと考えられる。

電子顕微鏡による観察ではベンゲルフレークおよびベンゲルクリアはいずれも100ナノ以上のサイズと考えられたが、ベンゲルクリアはさらに控滅により細粒化する可能性が見られた。

ナノクレイの食品・食品容器分野における使用実態の全体像を把握するために、ナノクレイの物

質情報、使用形態、使用目的、開発または実用化の段階、出典等について調査した。その結果、ナノクレイの増粘性、分散性、吸着性（吸水性）、ガスバリア性、触感改良等の機能から期待されている用途として、クリーム・粉末化粧水・歯磨き等の化粧品、自動車部品やペットボトル等の部品・容器包装材をはじめ、農薬プロアブル・接着剤・洗剤等の工業製品、塗料、難燃剤、触媒担体等があることが示された。実用化されている食品分野における主な用途は、包装容器材でガスバリア性の向上を主目的としてナノクレイが使われている他、液体農薬の沈降防止剤としても用いられていることが明らかとなった。

F. 研究発表

(論文発表)

Yamaguchi A., Fujitani T., Ohshima K., Nakae D., Hirose A., Nishimura T., Ogata A.: Effects of sustained stimulation with multi-wall carbon nanotubes on immune and inflammatory responses in mice. *J. Toxicol. Sci.*, 37, 177-189 (2012).

Fujitani T., Ohshima K., Hirose A., Nishimura T., Nakae D., Ogata A.: Teratogenicity of multi-wall carbon nanotube (MWCNT) in ICR mice. *J. Toxicol. Sci.*, 37, 81-89 (2012).

Kubota, R., Tahara, M., Shimizu, K., Sugimoto, N., Hirose, A., Nishimura, T.: Time-dependent variation in the biodistribution of C60 in rats determined by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Toxicol. Lett.*, 206, 172-177(2011).

Horibata, K., Ukai, A., Koyama, N., Takagi, A., Kanno, J., Kimoto, T., Miura, D., Hirose, A., Honma, M.: Fullerene (C60) is negative in the in vitro pig-A gene mutation assay. *Genes and Environment*, 33, 27-31 (2011).

広瀬明彦、高木篤也、西村哲治、津田洋幸、坂本義光、小縣昭夫、中江大、樋野興夫、菅野純：ナ

ノマテリアルの慢性影響研究の重要性. *薬学雑誌*, 131 (2), 195-201 (2011).

(学会発表)

平田睦子, 芹澤英樹, 鎌田栄一, 小野敦, 広瀬明彦: 単層型カーボンナノチューブの28日間反復経口投与毒性試験、第38回日本トキシコロジー学会学術年会 (2011.7) (横浜)

小野 敦, 平田 睦子, 須永 昌男, 古川 正敏, 鎌田 栄一, 広瀬 明彦: 多層型カーボンナノチューブの28日間反復経口投与毒性試験、第38回日本トキシコロジー学会学術年会 (2011.7) (横浜)

Hirose, A., Ono, A., Hirata-Koizumi, M., Serizawa, H., Sunaga, M., Furukawa, M., Kamata, E., Nishimura, T.: "Repeated dose 28-day oral toxicity studies of single- and multi-walled carbon nanotubes in rats, The 47th EUROTOX2011 (2011.8) (France, Paris)

広瀬明彦: 国研の取組：健康影響評価指針の国際動向について. 日本薬学会第132年会, 2012年3月 (札幌)

渡辺渡、吉田裕樹、広瀬明彦、紺野克彦、山中沙代子、黒木奈緒、黒川昌彦：酸化チタンナノ粒子のマクロファージおよびマウスモデルにおけるRSウイルス感染免疫応答への影響. 日本薬学会第132年会, 2012年3月 (札幌)

清水広介、内山安里奈、西村哲治、広瀬明彦、奥直人：カーボンナノチューブ暴露による生体膜障害性の検討. 日本薬学会第132年会, 2012年3月 (札幌)

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

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

ラットを用いたナノクレイの毒性評価に関する研究

研究分担者 小川久美子 国立医薬品食品衛生研究所 病理部長

研究分担者 西川秋佳 国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター長

研究要旨

モンモリロナイト $((\text{Na}, \text{Ca})_{0.33}(\text{Al}, \text{Mg})_2\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2 \cdot n\text{H}_2\text{O})$ を主成分とするナノクレイは、加工食品の固化防止や内容物の保存安定性の向上を目的としてPETボトルなどの包装容器への使用が検討されているが、安全性に関する情報は充分とは言えない。本研究は、ラットを用いたナノクレイの経口投与による毒性影響の有無や体内動態の解明を目的として実施した。食品添加物規格として市販されているナノクレイのうち、粒子のサイズが異なる2種類の天然鉱物由来のモンモリロナイト（ベンゲルフレーク・ベンゲルクリア）について、F344 雄性ラットを用いて検討した。用量設定を目的とした5%の濃度までの4週間混餌投与では、肝重量の減少はみられるものの、明らかな病理組織学的変化はみられなかった。13週間の混餌投与では、一般状態、体重、臓器重量には投与に関連した変化は見られず、現在、血液生化学的検討および病理学的検討を進めている。また、ベンゲルクリアおよびベンゲルフレークを1.3g/kg体重の用量でF344雄ラットに単回胃内強制経口投与後、経時的に屠殺剖検し、血中のアルミニウム濃度を指標に生体への移行を検討したが、投与による変動は見られなかった。さらに、4週間の5%混餌投与群の腎臓、肝臓、脳、脾臓および脛骨でのアルミニウムとマグネシウムの濃度には対照群との間に差異は見られず、ベンゲルクリアおよびベンゲルフレークの混餌投与による生体への移行および蓄積はほとんどないものと考えられた。

A. 研究目的

本研究は、加工食品の固化防止、あるいはPETボトルなどの内容物の保存安定性（ガスバリア性、耐摩擦性など）の向上を目的として使用されているナノクレイの主成分であるモンモリロナイト $((\text{Na}, \text{Ca})_{0.33}(\text{Al}, \text{Mg})_2\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2 \cdot n\text{H}_2\text{O})$ について、ラットへの反復経口投与による亜急性毒性影響および体内動態の検討を目的とした。

B. 研究方法

1) 4週間混餌投与用量設定試験
用量設定試験として、食品添加物規格として市販

されているナノクレイのうち、粒子のサイズが異なる2種類のモンモリロナイト（ベンゲルフレーク・ベンゲルクリア）について、飛散を最小限に抑えるため、0.2、1、5%の用量で基礎飼料と混合しペレット状にした固形飼料を、F344雌雄ラット各群5匹に4週間投与し、一般状態観察と主要臓器の病理組織学的検査を行った（Fig. 1）。

2) 13週間混餌投与毒性試験

用量設定試験の結果にもとづき、5、1、0.2および0.04%の用量でF344ラット雌雄の各群10匹に13週間混餌投与し、一般状態観察、血液生化学検査、病理組織学的検査を実施する（Fig. 2）。

3) 生体内移行試験

F344 雄性ラットに、陽性対照として指定添加物の硫酸アルミニウムアンモニウムを静脈内投与(2mg/kg bw)、あるいは、胃内投与(1000mg/kg bw)し、1, 2, 4, 6 及び 24 時間後に血液、腎臓、肝臓、脳、脾臓および、文献上アルミニウムの蓄積が示唆されている脛骨を採取して、ICP-MS によるアルミニウム量の測定を行った。また、上記胃内投与と等量のアルミニウムを含有すると想定される(1.3g/kg bw) ベンゲルフレークとベンゲルクリアについて、胃内投与を行い、経時的に採材を行った(Fig. 3)。さらに、連続投与による臓器への沈着の可能性を検討するため、用量設定試験の4週間混餌投与動物において、対照群、5%ベンゲルクリアおよび5%ベンゲルフレークの投与群について、腎臓、肝臓、脳、脾臓および脛骨でのアルミニウムとマグネシウムの濃度を測定した。

(倫理面への配慮)

動物の数は最小限にとどめ、実験は、国立医薬品食品衛生研究所の実験動物取り扱い規定に基づき動物の苦痛も最小限とするように配慮して行う。

C. 研究結果

1) 4週間混餌投与用量設定試験

4週間投与試験では、死亡例はなく、体重増加抑制も見られなかった(Fig. 4)。有意差はないものの、摂餌量に用量依存的な増加傾向を認めた(Table 1)。臓器重量(Table 2-3)は、雄のベンゲルフレーク0.2%と5%投与群では、肝臓の絶対重量の有意な減少を認めた。また雄のベンゲルフレーク0.2%、1%、5%、ベンゲルクリア1%、5%投与群では、肝臓の相対臓器重量の有意な減少を認めたが、病理組織検査では明らかな変化は認めなかった。

2) 13週間混餌投与毒性試験

13週間投与試験では、一般状態、体重(Fig. 5)、摂餌料(Table 4)および臓器重量(Table 5-6)には投与に関連した変化は見られなかった。血液

学的検査では、雄の1%以上のベンゲルフレーク群でMCH、MCHCおよびPLTの増加と、5%ベンゲルクリア群と5%ベンゲルフレーク群でWBCの有意な増加が認められたが、いずれも用量相関はなく、偶発的な変化と考えられた(Table 7-8)。現在、血液生化学的検討および病理学的検討を進めている。

3) 生体内移行試験

ICP-MSを用いて検討した血液中のアルミニウムの含有量は、硫酸アルミニウムアンモニウムを静脈内投与した群では、投与1時間後には0.6 ppmと、一時的な増加が認められたものの、ベンゲルフレークおよびベンゲルクリアを含む経口投与群においては、投与に関連した増加は見られなかった(Fig. 6)。また、投与2時間後の各臓器でのアルミニウム濃度は腎臓、肝臓、脳および脾臓では無処置対照群と同等であり、脛骨では軽度の増加が硫酸アルミニウムアンモニウム胃内投与群で見られたが、最終的には計測の誤差範囲と判断された。また、ベンゲルフレークとベンゲルクリア投与群についても対照群との差異はみられなかった。

(Fig. 7)。

さらに、4週間投与試験においては、いずれの臓器においても、アルミニウムおよびマグネシウム濃度は対照群との間に差異は見られなかった(Fig. 8)。

D. 考察

今回用いた食品添加物規格の天然鉱物であるベンゲルクリアおよびベンゲルフレークについては、これまでの検討においては、強い毒性はないと考えられた。13週間混餌投与試験の詳細な検討と共に、体内への移行が見られない点について、さらに確認が必要と考える。また、今後ナノクレイとしての使用が検討されている、粒子サイズがさらに細かいと考えられる合成スメクタイトについても、組織への移行など安全性の検討を継続することにより、安全で有効な使用を進める上で重要なデータが得られると考える。

E. 結論

これまでの検討では、ベンゲルクリアおよびベンゲルフレークは、生体への移行は否定的であり、経口投与による強い毒性はないと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

なし。

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

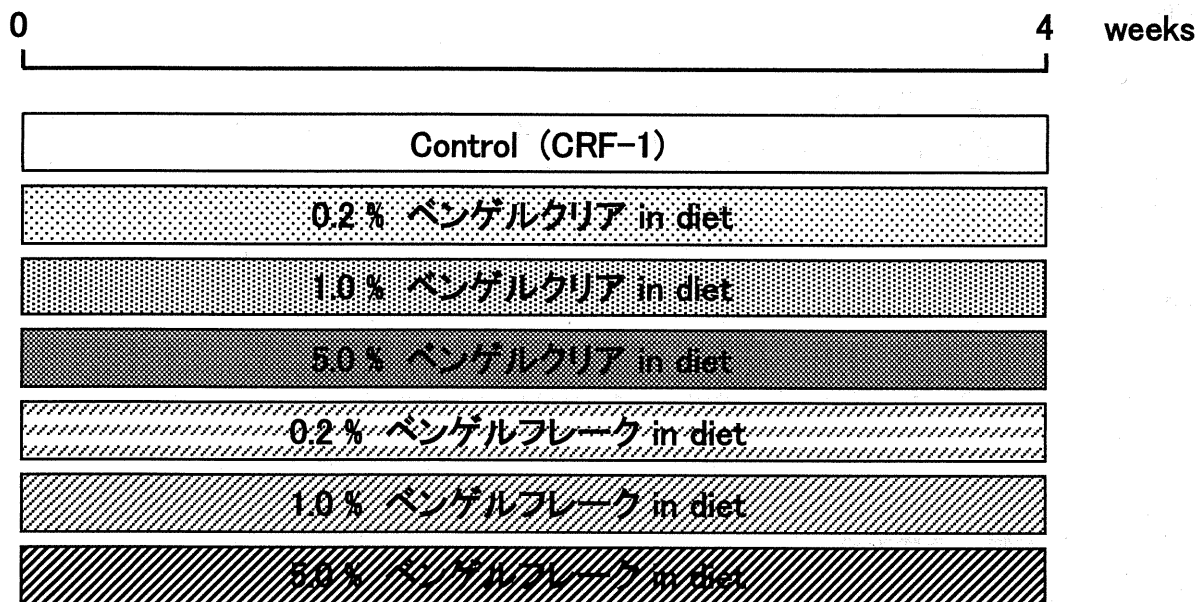
なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし

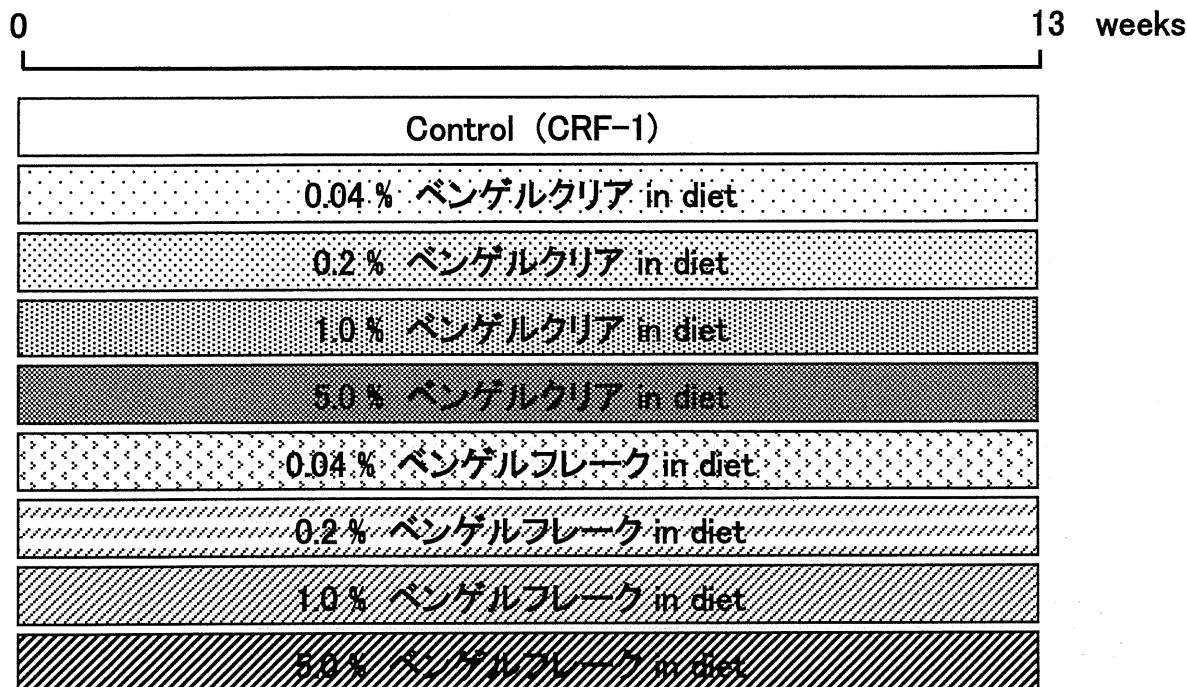


animal species : rat
 strain : F344
 age of start : 6 week old
 sex : male and female
 number of animals : 70 (n=5)

Examination

- In-life parameters
- Organ weights
(brain, thymus, heart, spleen, liver, adrenal, kidneys, testis)
- Histopathology
(kidneys, liver, spleen, lung, testis, brain, heart)
- Organ content of Al, Mg
(kidneys, liver, spleen, brain, tibia)

Fig. 1 Protocol for 4 week dietary administration of montmorillonite in F344 rat

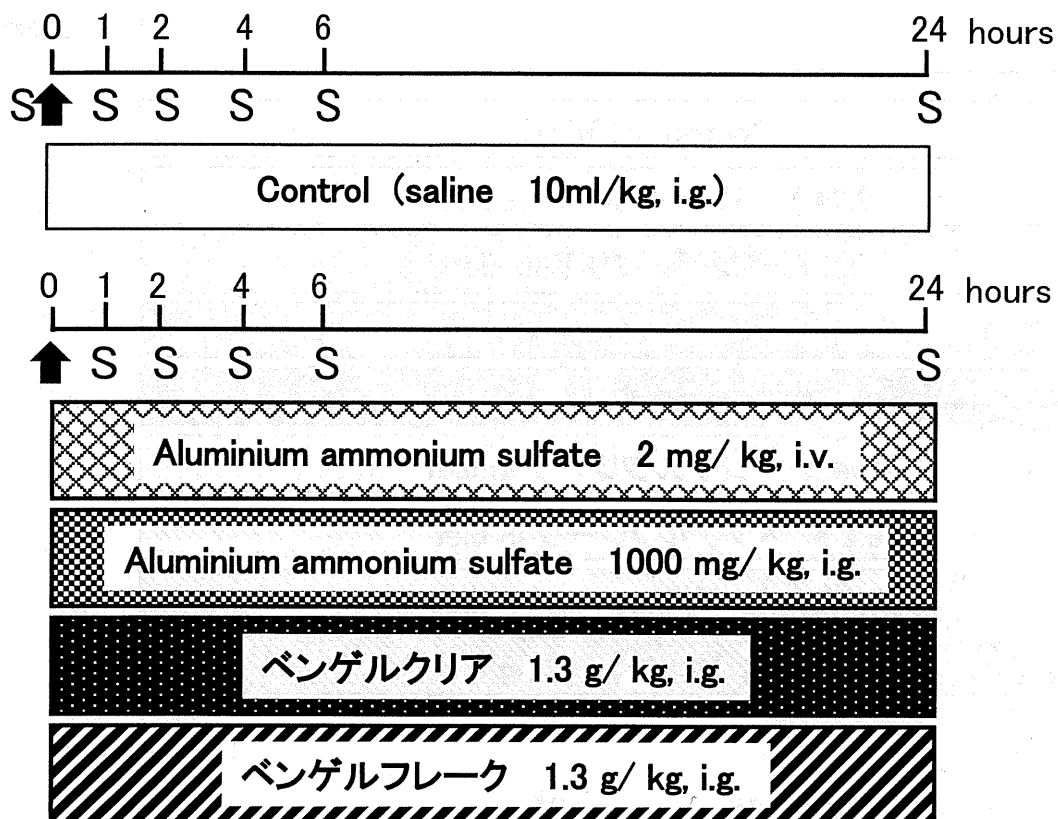


animal species : rat
 strain : F344
 age of start : 6 week old
 sex : male and female
 number of animals : 180 (n=10)

Examination

- In-life parameters
- Hematology/serum biochemistry
- Organ weights
(brain, thymus, heart, spleen, liver, adrenal, kidneys, testis)
- Histopathology
(kidneys, liver, spleen, lung, testis, brain, heart)

Fig. 2 Protocol for 13 week dietary administration of montmorillonite in F344 rat



S : Sacrifice n=3
 ↑ : Administration

animal species : rat
 strain : F344
 age of start : 9 week old
 sex : male
 number of animals : 78 (n=3)

Examination

measurement of Al in organ and blood by ICP-MS.
 (organ: liver, spleen, kidney, brain, tibia)

Fig. 3 Protocol for distribution analysis of montmorillonite in F344 rat

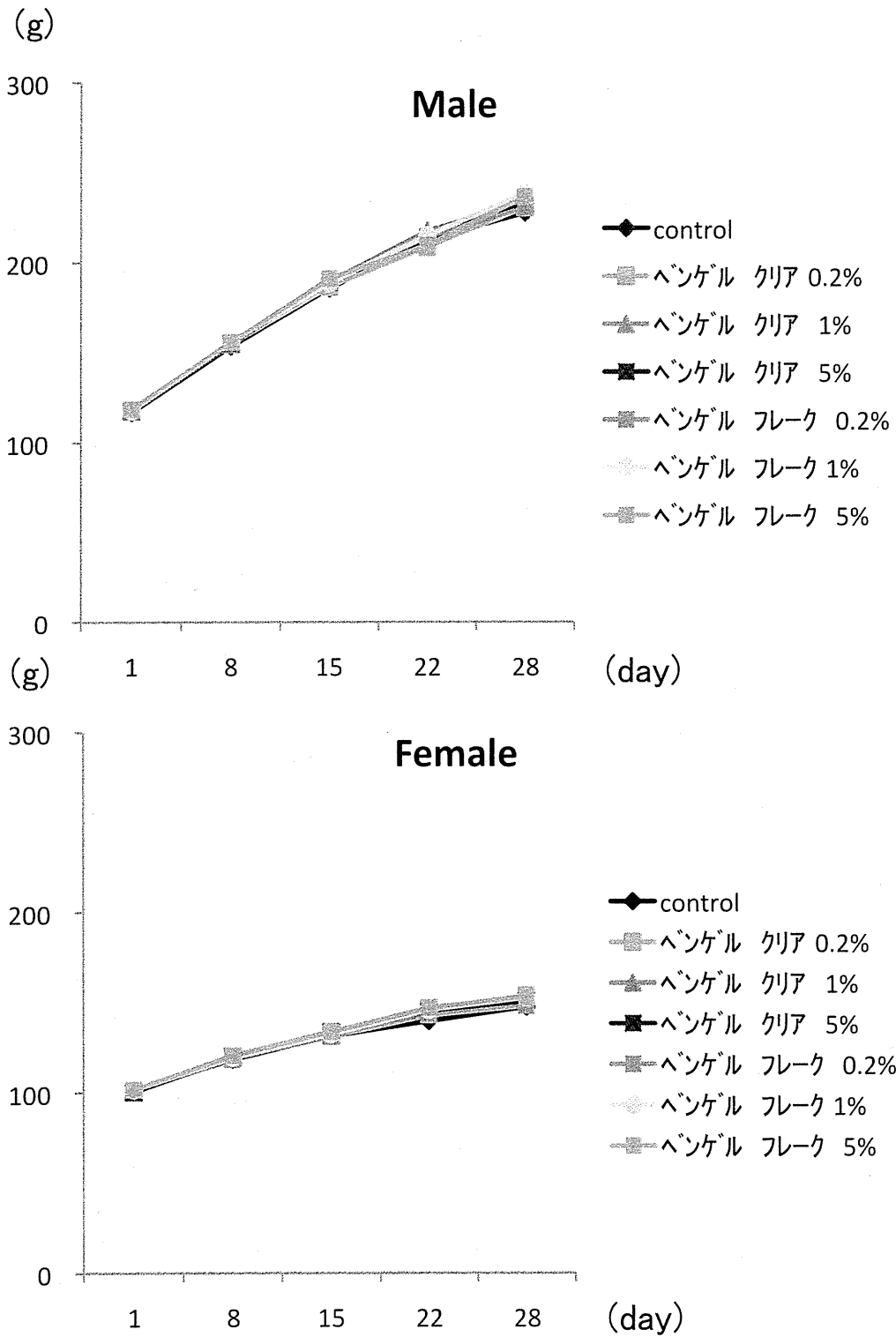


Fig. 4 Body weight curves of F344 rats fed diet containing montmorillonite for 4 weeks

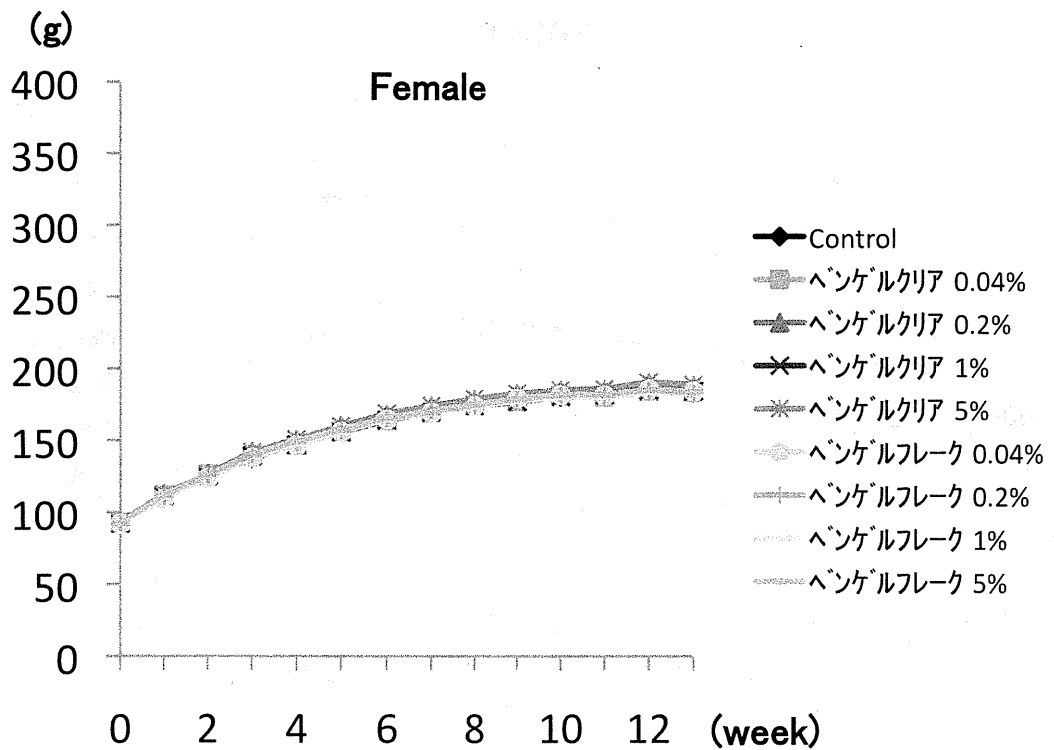
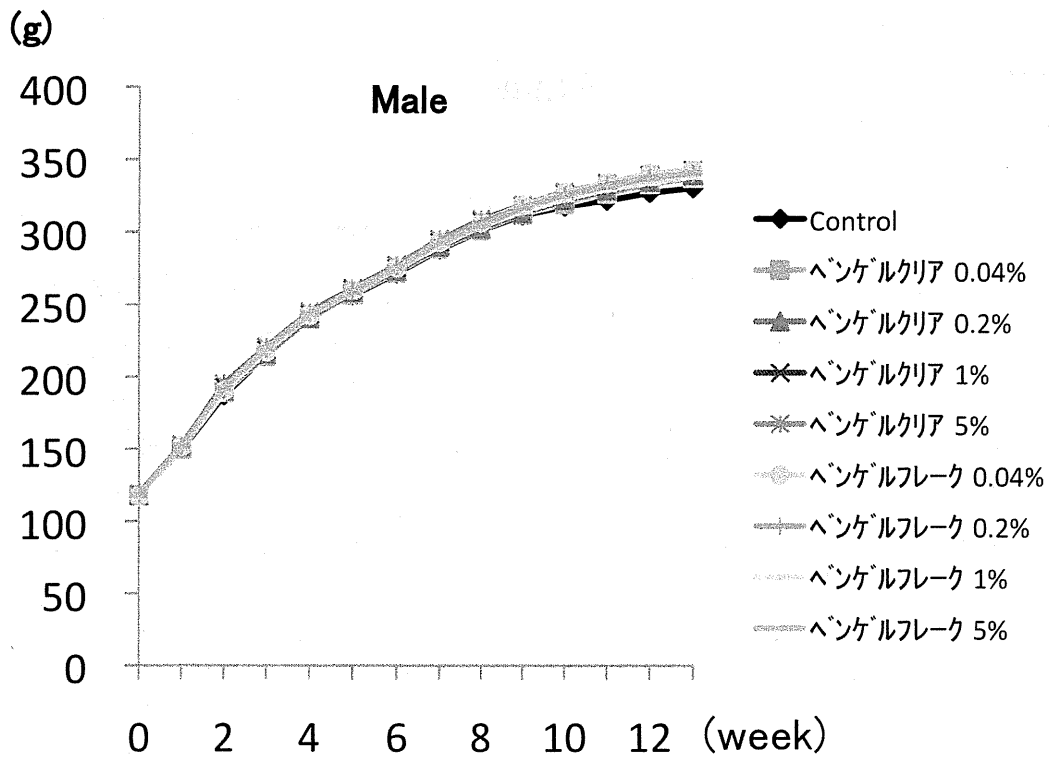


Fig. 5 Body weight curves of F344 rats fed diet containing montmorillonite for 13 weeks