

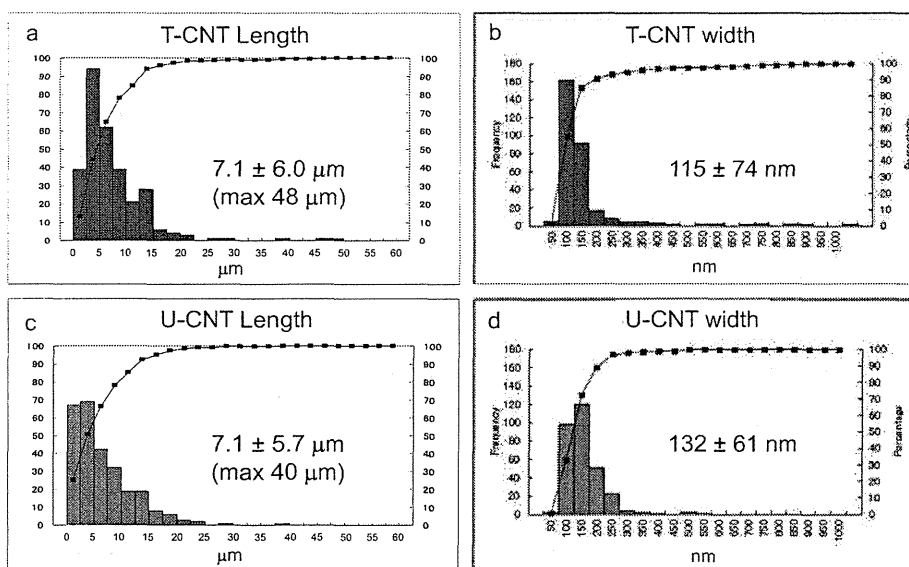
**Fig. 5.** Scanning electron microscopy of T-CNT and U-CNT re-suspended in TB. a) T-CNT consists mainly of dispersed single fibers with few small aggregates/agglomerates smaller than the mesh size of the sieve, SEM x 1,000. b) U-CNT showing mixture of single fibers and large aggregates/agglomerates, SEM x 1,000. The length and width distribution of the single fibers of T-CNT were virtually identical to those of U-CNT. Inset; Lower power view to demonstrate larger aggregates/agglomerates measuring up to 300  $\mu\text{m}$  in major axis SEM x 400. (scale bars are 10  $\mu\text{m}$ )

Again, the majority of the particles of the T-CNT were the dispersed single fibers. The length and width distribution of single fibers counted on these SEM images are shown in Fig. 6. The length and width distribution was similar between single fibers of T-CNT and U-CNT, indicating that the mechanical shortening of the fibers is negligible for Taquann method.

The number of fibers per 10, 1 and 0.1  $\mu\text{g}$  weight of T-CNT with length distribution was counted on SEM images (measured number of fibers are 959, 246, and 45 per designated area for calculation, respectively). The number of fibers calculated was  $2.1 \times 10^7/10 \mu\text{g}$ ,  $4.1 \times 10^6/1 \mu\text{g}$  and  $3.3 \times 10^5/0.1 \mu\text{g}$ . The distribution of the fiber length was similar to that shown in Fig. 6a, and the average length was  $7.5 \pm 4.7 \mu\text{m}$  (max 34  $\mu\text{m}$ ),  $8.7 \pm 6.4 \mu\text{m}$  (max 42  $\mu\text{m}$ ), and  $7.0 \pm 5.4 \mu\text{m}$  (max 26  $\mu\text{m}$ ) respectively. As a whole, T-CNT has roughly  $3 \times 10^6$  fibers per 1  $\mu\text{g}$ , mean length of approximately 7  $\mu\text{m}$  with a length range up to 50  $\mu\text{m}$  with a median of approximately 6.5  $\mu\text{m}$ .

#### “Taquann”-dispersed MWCNT in the inhalation chamber

The T-CNT aerosol generated at an average concentration of 1  $\text{mg}/\text{m}^3$  was sampled on the Anodisc and observed by a SEM (Fig. 7). The aerosol was composed mainly of well-dispersed single fibers and some small tangles of fibers admixed with a relatively small amount of non-fibrous particles.



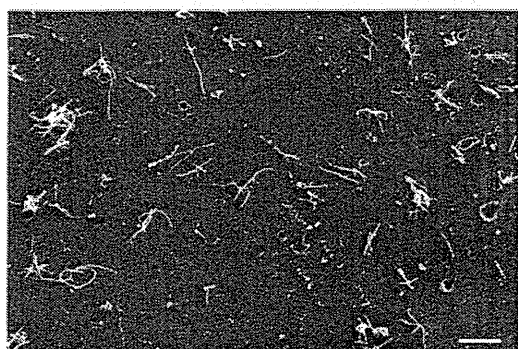
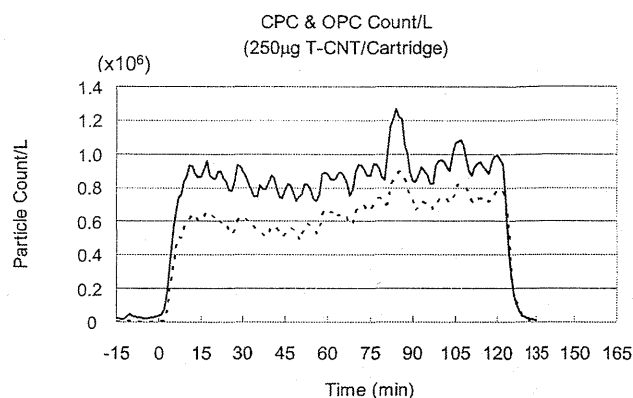
**Fig. 6.** Length and width of single fibers in T-CNT and U-CNT (measured by SEM on TB-resuspended samples). a) Length distribution and b) width distribution of Taquann-treated MWNT-7. c) Length distribution and d) width distribution of single fibers in the mildly sonicated suspension of the bulk MWNT-7 (mean  $\pm$  s.d.,  $n = 304$  each).

## Dispersion Method for MWCNT inhalation

**Table 1.** Aerosol particle count by optical particle counter (OPC) and condensation particle counter (CPC).

	Date of measurement	2013/4/29	2013/5/1	2013/5/3
Equipment	Mass concentration (mg/m <sup>3</sup> )	1.25	1.25	1.38
OPC	Average cpm* (/L) ± s.d.	627,096 ± 145,399	781,973 ± 138,610	821,272 ± 114,278
	K-value (mg/m <sup>3</sup> /cpm)	1.99 × 10 <sup>-9</sup>	1.60 × 10 <sup>-9</sup>	1.68 × 10 <sup>-9</sup>
CPC	Average cpm (/L) ± s.d.	859,692 ± 171,858	1,228,545 ± 223,371	1,317,873 ± 217,990
	K-value(mg/m <sup>3</sup> /cpm)	1.45 × 10 <sup>-9</sup>	1.02 × 10 <sup>-9</sup>	1.05 × 10 <sup>-9</sup>

\*count per minute

**Fig. 7.** T-CNT aerosol at a concentration of 1 mg/m<sup>3</sup> in the main chamber was collected on the Anodisc filter (5 L/min for 3 min). SEM x 1,000. (scale bar is 10 μm)**Fig. 8.** A real time data from condensation particle counter (CPC, solid line) and optical particle counter (OPC, dotted line) from an inhalation chamber injected with T-CNT (250 μg/cartridge) from 0 min to 120 min with an average injection interval of 6 min (for detail see text).

From the amount of weight increase of polytetrafluoroethylene-glass fiber filter after sampling the chamber aerosol, the weight of aerosol per m<sup>3</sup> of the chamber air (weight concentration) was calculated as approximately 1.3 mg/m<sup>3</sup> (average of three measurements shown in Table 1). At the same time, the particle counts per m<sup>3</sup> given by OPC and CPC were recorded (Fig. 8), and the K-value (mg/particle count in m<sup>3</sup>) was calculated (Table 1).

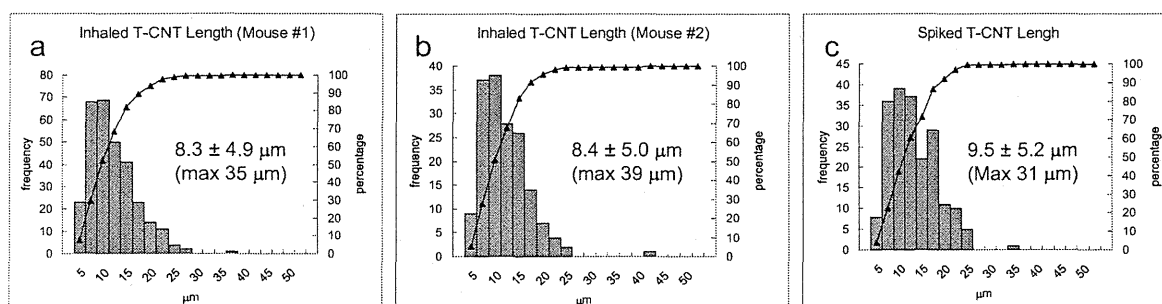
K-value (mg/m<sup>3</sup>/cpm), i.e. the weight concentration (mg/m<sup>3</sup>) divided by OPC or CPC count per minute (cpm) is often used as an indicator of the status of dispersion. Three measurements conducted with a few days' interval showed that not only the K-values itself but also the values used to calculate it were fairly stable over a period of days.

The length distribution of the T-CNT recovered from the lungs of two mice exposed in the whole body inhalation chamber 2 hr a day for 5 days at an average concentration of 1.8 mg/m<sup>3</sup> of T-CNT are shown in

Fig. 9 along with the data from the spiked lung tissue sample. The average length were 8.4 ± 5.0 μm and 8.3 ± 4.9 μm (Figs. 9a, 9b), comparable to that of the T-CNT in spiked lung tissue sample; 9.5 ± 5.2 μm (Fig. 9c) (width was qualitatively not different, data not shown). The total numbers of the fibers recovered were 5.1 × 10<sup>6</sup> and 3.2 × 10<sup>6</sup> from the inhaled lungs and 1.6 × 10<sup>6</sup> from the spiked lung; the weight of T-CNT deposited in the lung after 2 hr x 5 days of inhalation was roughly calculated as 3 μg/lung.

The fibers recovered from one of the mice were observed with SEM (Fig. 10a). Dispersed single fibers were found and some of which are longer than 20 μm (cf. Fig. 9). It was noted that EDTA and ascorbic acid in the lysis solution were effective in removing the debris from the SEM sample (Fig. 10b).

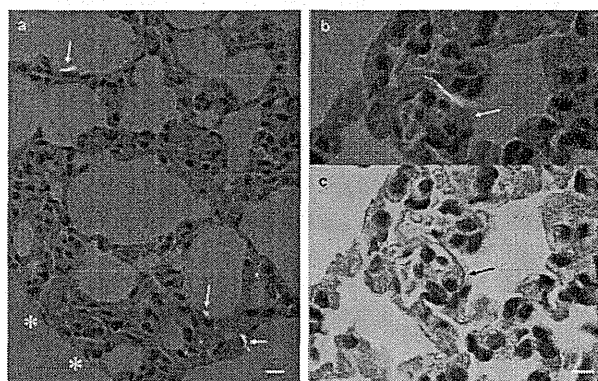
Histologically, the CNTs were found to distribute from bronchial lumen to peripheral alveolar spaces. In the bronchial lumen, the fibers were trapped in the bronchial mucus, either as single fibers or as loose aggregates



**Fig. 9.** T-CNT recovered from the mouse lung. a, b) Length distribution of T-CNT in the lung of two mice exposed 2 hr a day for 5 days at an average concentration of  $1.8 \text{ mg/m}^3$  ( $n = 306$  and  $166$  each, mean  $\pm$  s.d.). c) Length distribution of T-CNT ( $1 \text{ } \mu\text{g}$ ) spiked to a non-exposed mouse lung ( $n = 198$ , mean  $\pm$  s.d.).



**Fig. 10.** T-CNT recovered from the mouse lung. a) SEM of the sediment of the dissolved lung of a mouse exposed to T-CNT in an inhalation chamber 2 hr a day for 5 days,  $\times 2,000$ . Long and short single fibers are shown to be inhaled (treated with solution containing EDTA and ascorbic acid). b) SEM of a same sample treated without EDTA and ascorbic acid. The debris covering the fibers is considered to be iron-based amorphous substances soluble to EDTA,  $\times 2,000$ . Ascorbic acid was found to be effective in keeping iron ions to be bivalent (ferrous) and soluble. (scale bars are  $10 \text{ } \mu\text{m}$ )



**Fig. 11.** a) A polarized microscopic view of the alveolar region of a lung exposed to  $1 \text{ mg/m}^3$  of T-CNT for 2 hr a day for 5 days. Arrows indicate single T-CNTs deposited in alveolar spaces phagocytized by alveolar macrophages. Asterisks indicates visceral pleural. (scale bar  $10 \text{ } \mu\text{m}$ ) b,c) Another portion of alveolar region with a tadpole-shaped alveolar macrophage containing single long CNT in its cytoplasm shown in plain and polarized view. The lungs shown here are not inflated with formalin at fixation in order to avoid replacement of the CNTs. (scale bar  $5 \text{ } \mu\text{m}$ )

without inflammatory or granulomatous response, morphologically interpretable as a view of expectoration by the ciliary movement of the bronchial epithelium. There were no dense aggregates/agglomerates in the lungs so far as examined. In the peripheral alveolar space, single fibers are found phagocytized in alveolar macrophages as shown in Fig. 11. There were only mild inflammatory reactions such as neutrophilic migration against fibers in mucous blanket of the bronchial/bronchiolar segments and fibers in the alveolar space.

## DISCUSSION

The MWCNT treated with the "Taquann" method (T-CNT) consisted of highly dispersed single fibers with marked reduction of aggregates/agglomerates, both in the aerosol and in the resuspended solution. The length and width distribution of the single fibers were not different between the T-CNT and the original U-CNT, indicating that this method is physically mild to the sample and does not shorten the fibers.

The Taquann method consists of two major steps, the

efficient filtration in liquid phase and the idea of critical point drying in order to prevent re-aggregation of the fibers by surface tension during drying. The latter step was inspired by the drying method for SEM samples. TB-sublimation technique used in this study is an alternative method used for SEM samples as well. Our trial-and-error added a few innovations such as gentle kneading of half-frozen TB suspension and a freeze-and-thaw process for a better dispersion (visible differences in fineness of suspension, data not shown), and vibration of the sieve for a faster and better yield of filtrate (approximately 7 fold increase in half the time). This Taquann method does not use high power sonication or other strong mechanical shearing, so that the length distribution of the single fibers did not change. The equipments and reagents used here are mostly available at regular biological or chemical laboratories. The new aerosol generating system by the direct injection of T-CNT had successfully generated highly dispersed aerosol of MWNT-7 and an exposure study confirmed the inhalation of MWNT-7 single fibers in mouse lung down to the peripheral alveolar spaces. In this condition, i.e. five consecutive days of 2 hr exposure, histologically, there were only mild neutrophilic infiltration. A long-term follow up study is underway.

It is highly plausible that the Taquann method can be applied to other types of particles as long as they are not soluble to TB (additional study in preparation). Well-dispersed samples generated by the Taquann method, together with the direct injection and the small scale inhalation chamber system, would facilitate the inhalation toxicity studies more relevant to human exposure not only at the big facilities but also at the small scaled laboratories.

Finally, this dispersion method may also be useful for industries where difficulty in dispersion of nanoparticles was a limiting process in developing new products. For a large scale manufacturing, carbon dioxide critical point drying may be suitable than TB sublimation.

#### ACKNOWLEDGMENT

The authors thank Dr. Hiroyuki Tsuda for introducing the metal sieve for liquid phase filtration. This study is supported by the Health Sciences Research Grants H21-kagaku-ippan-008, H23-kagaku-ippan-005 and H24-kagaku-shitei-009 from the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan.

#### REFERENCES

- Ahn, K.H., Kim, S.M. and Yu, I.J. (2011): Multi-walled carbon nanotube (MWCNT) dispersion and aerosolization with hot water atomization without addition of any surfactant. *Saf. Health Work.*, **2**, 65-69.
- Gasser, M., Wick, P., Clift, M.J., Blank, F., Diener, L., Yan, B., Gehr, P., Krug, H.F. and Rothen-Rutishauser, B. (2012): Pulmonary surfactant coating of multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) influences their oxidative and pro-inflammatory potential in vitro. *Part Fibre Toxicol.*, **9**, 17.
- Han, J.H., Lee, E.J., Lee, J.H., So, K.P., Lee, Y.H., Bae, G.N., Lee, S.B., Ji, J.H., Cho, M.H. and Yu, I.J. (2008): Monitoring multi-walled carbon nanotube exposure in carbon nanotube research facility. *Inhal. Toxicol.*, **20**, 741-749.
- Kasai, T., Gotoh, K., Nishizawa, T., Sasaki, T., Katagiri, T., Umeda, Y., Toya, T. and Fukushima, S. (2013): Development of a new multi-walled carbon nanotube (MWCNT) aerosol generation and exposure system and confirmation of suitability for conducting a single-exposure inhalation study of MWCNT in rats. *Nanotoxicology*, (in press).
- Mercer, R.R., Hubbs, A.F., Scabilloni, J.F., Wang, L., Battelli, L.A., Friend, S., Castranova, V. and Porter, D.W. (2011): Pulmonary fibrotic response to aspiration of multi-walled carbon nanotubes. *Part Fibre Toxicol.*, **8**, 21.
- Mercer, R.R., Scabilloni, J., Wang, L., Kisin, E., Murray, A.R., Schwegler-Berry, D., Shvedova, A.A. and Castranova, V. (2008): Alteration of deposition pattern and pulmonary response as a result of improved dispersion of aspirated single-walled carbon nanotubes in a mouse model. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, **294**, L87-97.
- Mitchell, L.A., Gao, J., Wal, R.V., Gigliotti, A., Burchiel, S.W. and McDonald, J.D. (2007): Pulmonary and systemic immune response to inhaled multiwalled carbon nanotubes. *Toxicol. Sci.*, **100**, 203-214.
- Morimoto, Y., Hirohashi, M., Ogami, A., Oyabu, T., Myojo, T., Todoroki, M., Yamamoto, M., Hashiba, M., Mizuguchi, Y., Lee, B.W., Kuroda, E., Shimada, M., Wang, W.N., Yamamoto, K., Fujita, K., Endoh, S., Uchida, K., Kobayashi, N., Mizuno, K., Inada, M., Tao, H., Nakazato, T., Nakanishi, J. and Tanaka, I. (2011): Pulmonary toxicity of well-dispersed multi-wall carbon nanotubes following inhalation and intratracheal instillation. *Nanotoxicology*, **6**, 587-599.
- Muller, J., Huaux, F., Moreau, N., Misson, P., Heilier, J.F., Delos, M., Arras, M., Fonseca, A., Nagy, J.B. and Lison, D. (2005): Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **207**, 221-231.
- Oyabu, T., Myojo, T., Morimoto, Y., Ogami, A., Hirohashi, M., Yamamoto, M., Todoroki, M., Mizuguchi, Y., Hashiba, M., Lee, B.W., Shimada, M., Wang, W.N., Uchida, K., Endoh, S., Kobayashi, N., Yamamoto, K., Fujita, K., Mizuno, K., Inada, M., Nakazato, T., Nakanishi, J. and Tanaka, I. (2011): Biopersistence of inhaled MWCNT in rat lungs in a 4-week well-characterized exposure. *Inhal. Toxicol.*, **23**, 784-791.
- Poland, C.A., Duffin, R., Kinloch, I., Maynard, A., Wallace, W.A., Seaton, A., Stone, V., Brown, S., Macnee, W. and Donaldson, K. (2008): Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. *Nat Nanotechnol.*, **3**, 423-428.
- Porter, D.W., Hubbs, A.F., Mercer, R.R., Wu, N., Wolfarth, M.G., Sriram, K., Leonard, S., Battelli, L., Schwegler-Berry, D.,

- Friend, S., Andrew, M., Chen, B.T., Tsuruoka, S., Endo, M. and Castranova, V. (2009): Mouse pulmonary dose- and time course-responses induced by exposure to multi-walled carbon nanotubes. *Toxicology*, **269**, 136-147.
- Pott, F., Roller, M., Kamino, K. and Bellmann, B. (1994): Significance of durability of mineral fibers for their toxicity and carcinogenic potency in the abdominal cavity of rats in comparison with the low sensitivity of inhalation studies. *Environ. Health Perspect.*, **102 Suppl. 5**, 145-150.
- Roller, M., Pott, F., Kamino, K., Althoff, G.H. and Bellmann, B. (1997): Dose-response relationship of fibrous dusts in intraperitoneal studies. *Environ. Health Perspect.*, **105 Suppl. 5**, 1253-1256.
- Shvedova, A.A., Kisin, E., Murray, A.R., Johnson, V.J., Gorelik, O., Arepalli, S., Hubbs, A.F., Mercer, R.R., Keohavong, P., Sussman, N., Jin, J., Yin, J., Stone, S., Chen, B.T., Deye, G., Maynard, A., Castranova, V., Baron, P.A. and Kagan, V.E. (2008): Inhalation vs. aspiration of single-walled carbon nanotubes in C57BL/6 mice: inflammation, fibrosis, oxidative stress, and mutagenesis. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, **295**, L552-565.
- Takagi, A., Hirose, A., Futakuchi, M., Tsuda, H. and Kanno, J. (2012): Dose-dependent mesothelioma induction by intraperitoneal administration of multi-wall carbon nanotubes in p53 heterozygous mice. *Cancer Sci.*, **103**, 1440-1444.
- Takagi, A., Hirose, A., Nishimura, T., Fukumori, N., Ogata, A., Ohashi, N., Kitajima, S. and Kanno, J. (2008): Induction of mesothelioma in p53<sup>+/-</sup> mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube. *J. Toxicol. Sci.*, **33**, 105-116.
- Wang, X., Katwa, P., Podila, R., Chen, P., Ke, P.C., Rao, A.M., Walters, D.M., Wingard, C.J. and Brown, J.M. (2011): Multi-walled carbon nanotube instillation impairs pulmonary function in C57BL/6 mice. *Part Fibre. Toxicol.*, **8**, 24.
- Wang, X., Xia, T., Duch, M.C., Ji, Z., Zhang, H., Li, R., Sun, B., Lin, S., Meng, H., Liao, Y.P., Wang, M., Song, T.B., Yang, Y., Hersam, M.C. and Nel, A.E. (2012): Pluronic F108 coating decreases the lung fibrosis potential of multiwall carbon nanotubes by reducing lysosomal injury. *Nano Lett.*, **12**, 3050-3061.
- Warheit, D.B., Laurence, B.R., Reed, K.L., Roach, D.H., Reynolds, G.A. and Webb, T.R. (2004): Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats. *Toxicol. Sci.*, **77**, 117-125.
- Xu, J., Futakuchi, M., Shimizu, H., Alexander, D.B., Yanagihara, K., Fukamachi, K., Suzui, M., Kanno, J., Hirose, A., Ogata, A., Sakamoto, Y., Nakae, D., Omori, T. and Tsuda, H. (2012): Multi-walled carbon nanotubes translocate into the pleural cavity and induce visceral mesothelial proliferation in rats. *Cancer Sci.*, **103**, 2045-2050.

## ナノマテリアルの健康影響評価指針の国際動向

広瀬明彦

## International Trend of Guidance for Nanomaterial Risk Assessment

Akihiko Hirose

*Division of Risk Assessment, National Institute of Health Sciences;  
Kamiyoga 1-18-1, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan.*

(Received August 20, 2012)

In the past few years, several kinds of opinions or recommendations on the nanomaterial safety assessment have been published from international or national bodies. Among the reports, the first practical guidance of risk assessment from the regulatory body was published from the European Food Safety Authorities in May 2011, which included the determination of exposure scenario and toxicity testing strategy. In October 2011, European Commission (EC) adopted the definition of “nanomaterial” for regulation. And more recently, Scientific Committee on Consumer Safety of EC released guidance for assessment of nanomaterials in cosmetics in June 2012. A series of activities in EU marks an important step towards realistic safety assessment of nanomaterials. On the other hand, the US FDA announced a draft guidance for industry in June 2011, and then published draft guidance documents for both “Cosmetic Products” and “Food Ingredients and Food Contact Substances” in April 2012. These draft documents do not restrictedly define the physical properties of nanomaterials, but when manufacturing changes alter the dimensions, properties, or effects of an FDA-regulated product, the products are treated as new products. Such international movements indicate that most of nanomaterials with any new properties would be assessed or regulated as new products by most of national authorities in near future, although the approaches are still case by case basis. We will introduce such current international activities and consideration points for regulatory risk assessment.

**Key words**—nanomaterial; risk assessment; cosmetic product; food ingredient; food contact substance

## 1. はじめに

ナノマテリアルの安全性に関する国際的な関心が高まって以降、各国及び国際的な評価機関から様々なオピニオンや提言が公表されてきているが、一般的な概説やデータの収集が必要であるといったような一般論に終始しているものがほとんどであった。しかしながら最近になって、EFSAの科学委員会より2011年の5月に、より実際的なリスク評価ガイドラインが公開された。その後、化粧品や化学物質も含めて、欧米の規制当局では様々なガイダンスが公表されるようになってきている。このような国際的な動向は、現状ではケースバイケースのアプローチではあるものの、近い将来にはほとんどの新規物

性を持つナノマテリアルが、ほとんどの国の規制当局によって新規物質又は新製品としてリスク評価が行われるようになることを示唆していると思われる。本稿では有害性評価の観点からの健康影響評価指針の作成に関する最近の国際動向について、特に欧州や米国の動きを中心に紹介する。

## 2. 欧州の動向

欧州ではナノマテリアルの安全性に関する論議は比較的活発で、欧州委員会では、2008年に「ナノマテリアルはREACHで規制する」との基本姿勢を示しており、2009年には、ナノマテリアルに関してRegistration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH)を実施する際の要点について具体的かつ包括的な科学的並びに技術的アドバイスを提供するための「ナノマテリアルに対するREACH実施プロジェクト (REACH Implementation Project on Nanomaterials; RIPoN)」を開始した。2011年7月には、ナノマテリアルの場合に

The author declares no conflict of interest.

国立医薬品食品衛生研究所 (〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1)

e-mail: hirose@nihs.go.jp

本総説は、日本薬学会第132年会シンポジウムS25で発表したものを中心に記述したものである。

REACHに記載すべき情報の要件（試験方法の適切さを含む）や化学的安全評価について詳細に明示したガイダンスとなる報告書の最終版を公開している。<sup>1)</sup> 規制動向としても2009年12月に他地域より早く、欧州議会においてナノマテリアルの安全性データの届出と表示を含めた新化粧品指令（Regulation (EC) No 1223/2009）が採択されている（施行は2013年7月より）。一方、食品関係では予防原則の下に2008年12月には既存の食品添加物であっても、ナノテクノロジー等を用いて製法や粒子サイズを変更した場合は再評価が必要であることが指令（Regulation (EC) No 1333/2008）された。その後、2009年に欧州食品安全機関（European Food Safety Authority; EFSA）からナノ食品のリスクに関するオピニオンが公表された。<sup>2)</sup>

このような状況の中2011年5月に、「食品/飼料へのナノ科学とナノテク応用から生ずる可能性のあるリスクに関するリスク評価ガイダンス」がEFSAより発表された。<sup>3)</sup> このガイダンスではそれまでの概論的な提言とは異なり、より具体的な評価ガイダンスが示されている。その物質の物性や曝露シナリオ、化学組成としての新規性に従った以下の6つのケースを想定し、適切な毒性評価試験を組み合わせることによって具体的な評価方針を示している。

- Case 1：ナノテクノロジーを利用しているが、製品中にはナノマテリアルは残存していない。
- Case 2：容器等からのナノマテリアルの溶出はない。
- Case 3：製品中では、完全に（適切な分析法により）非ナノサイズ（分解、溶解等）になっている。
- Case 4：消化管の中で、分解することが（適切な分析法により）証明されている。
- Case 5：同じ化学組成を持つ非ナノサイズの物質についての毒性情報が既に知られている場合。
- Case 6：同じ化学組成を持つ非ナノサイズの物質についての毒性情報が不明な場合（全くの新規物質）。

基本的な考えとしては、Case 1–Case 4の場合においては、体内に吸収する前に非ナノサイズ物質となることで、通常の化学物質の評価手法が適用でき

ることになると考えている。ただし、Case 4の場合は、消化管内まではナノサイズである可能性があり、刺激性などのナノマテリアルとしての局所影響を評価する必要があるとしている。そしてこれらのCaseの検討の結果、消化管内でもナノサイズである可能性が否定されない場合は、最小限の毒性試験項目として*in vitro* 遺伝毒性試験と*in vivo* 試験としてADME試験、90日間反復経口投与毒性試験が要求される（*in vitro* 試験が陽性、又は*in vitro* 試験ができない場合は*in vivo* 遺伝毒性試験が必要）。これらの試験結果は、同じ化学組成を持つ非ナノサイズの物質についての毒性情報と比較され、必要に応じて更なる毒性試験を行うことが推奨されている。一方、化学組成からして全くの新規物質である場合は、ナノサイズであるなしかかわらず、元来、慢性毒性や生殖発生毒性も含めたすべての毒性試験項目が必要となるので、上記のような曝露シナリオに依存した毒性試験の評価スキームは適用されない。

しかし現状では、食品中や消化管内等の複雑なマトリックス中のナノマテリアルのサイズを的確に測定する手法はまだ確立されておらず、安全側に立てば、ナノマテリアルが分解されないことを前提に毒性試験を行う可能性が高いこと。さらにこれまでのガイドライン化された毒性試験を適用した結果が有効であるかどうかについて、特に食品を対象とした経口投与試験について十分な知見も得られていないこと。これらの現状を考慮すると、当面はケースバイケースの対応を積み重ねていく必要があることが、今後の課題とされている。

さらに、2012年の6月には消費者安全科学委員会（Scientific Committee on Consumer Safety; SCCS）が化粧品中のナノマテリアルの評価ガイダンスを公表し、そこにも上記のような曝露シナリオに基づいた安全性評価スキームが取り入れられた。<sup>4)</sup> こちらは主要な曝露経路が経皮曝露であるので、皮膚透過性の有無に重点が置かれているほか、局所影響としては皮膚刺激/腐蝕性、感作性、光毒性などが重要なエンドポイントとなっている。さらに、2013年7月より施行される動物実験の全面禁止を背景に、*in vitro* 試験など実験動物代替試験法への取り込みが、緊急的な課題としてとりあげられている。

### 3. 米国の動向

米国でもナノテクノロジーやナノマテリアルの安全性に対する議論の必要性は早くから認識されているが、欧州のような包括的な法的規制にまでには至っていない。化学物質管理の観点からは、2007年に U. S. Environmental Protection Agency (EPA) が有害物質管理法 (Toxic Substances Control Act; TSCA) の下に、ナノマテリアルを取り扱う企業等に対し自主的なデータの提出を促すシュワードシッププログラムを開始したが、期待したほどの情報を得られないようであった。しかし EPA は 2010 年から、単層多層のカーボンナノチューブについて、製品毎の製造前届出 (PMN) を必要とする重要新規利用ルール (significant new use rule; SNUR) を公布した。<sup>5)</sup> 届けデータとしては、懸念されている吸入曝露影響に対して 90 日間吸入試験等が要求されており、実質的に必要な試験項目として認識されつつある。しかし、この製造前届出データの範囲は各製品に対応したケースバイケースの措置の結果であり、さらに化学的特性等は企業秘密として開示されていないことも含め一般化される評価指針として利用することはできない。

一方 U. S. Food and Drug Administration (FDA) は、2007 年に公表されたナノテクノロジータスクフォースの報告書を受けて、2011 年 6 月によりやく業界向けに「FDA 規制権限製品にナノテクノロジーが利用されているかどうかの検討」に関するガイダンス案を公表した。<sup>6)</sup> このガイダンスでは、ナノマテリアルの定義としてそれまでに通常使用されてきた「三次元のうち少なくとも一次元のサイズが 1 から 100 nm の範囲に入る」という定義に加えて、たとえ 100 nm を超えるサイズであったとしても、そのサイズに起因した物理学的あるいは生物学的特性を示すかどうかという点にも着目している。その際の検討するサイズの上限を 1  $\mu\text{m}$  としている。その後、具体的な FDA 規制関連製品に関するガイダンスとして、2012 年 4 月に食品材料及び食品接触物質 (食器など)<sup>7)</sup> と、化粧品<sup>8)</sup> の安全性評価に関する業界向けのガイダンスをそれぞれ公表した。化粧品は、着色料を除いては事前承認が必要ではないが、安全性確保のための製造業者等の責任において、考慮すべき安全性評価上の論点が示されており、以下に示す因子が重要であるとされている。

- 物理化学的特性
- 最終製品に対応した毒性試験条件での凝集状態と粒径分布
- 不純物
- 製品からの曝露可能レベルと最終製品中での凝集性
- *in vitro* 及び *in vivo* 試験に供する用量の測定法
- 化粧品成分とそれらの不純物に関する *in vitro* と *in vivo* の毒性データ、皮膚透過性、眼及び皮膚刺激性、感作性、変異原性/遺伝毒性
- 化粧品成分や最終製品に対するヒトボランティア臨床試験

また、化粧品の安全性試験としてナノマテリアルの評価に適した *in vitro* 試験開発の重要性にも触れているが、試験系における凝集性について対応することが必要であるとされている。特に不溶性のナノ粒子については *in vivo* 試験の方が適切であるかもしれないとコメントしている。

食品材料及び食品接触物質のガイダンスにおいては、既認可食品及び食品接触成分に対してナノテクノロジーを利用して製造工程を変更した場合に対して、安全性評価上検討すべき論点について記されている。重要な製造工程の変更としては、出発物質の種類や濃度変更、及び触媒の変更と並んで食品成分の粒子サイズに影響を与えるような新技術が例示として挙げられている。勧告案は、21CFR (連邦規則集) に記載された食品添加物及び色素、21CFR の generally recognized as safe (GRAS) として同定された物質、food contact notification (FCN) 申請された食品接触物質、既に GRAS としての使用が、認証された物質の 4 分類に分けて記載されている。しかし、各々の物質に対して検証すべき項目はほぼ同様で、既に認証あるいは申請が認められた成分との同一性に影響を及ぼした物理化学的特性と、その変化に対応した安全性評価を行うこと、製造過程の変更の度合いやその結果製造された製品の規格や不純物が法的基準の範囲に入るかどうかを検証することといったような、抽象的な記載となっている。さらに最終的には、必要に応じて FDA と相談することが推奨されている。

### 4. 国際機関の動向

化学物質管理関係では、欧米におけるナノマテリ



アルの安全性に関する議論が本格化し始めた 2006 年に OECD では Chemical Committee (化学委員会) の下に Working Party on Manufactured Nanomaterials (WPMN; 工業ナノ材料に関する作業部会) が設置され、以下に示す 9 つの steering group (SG) によって検討が進められている。

- SG1: Development of a Database on Human Health and Environmental Safety Research;
- SG2: Research Strategies on Manufactured Nanomaterials;
- SG3: Safety Testing of a Representative Set of Manufactured Nanomaterials;
- SG4: Manufactured Nanomaterials and Test Guidelines;
- SG5: Co-operation on Voluntary Schemes and Regulatory Programmes;
- SG6: Co-operation on Risk Assessment;
- SG7: The Role of Alternative Methods in Nanotoxicology;
- SG8: Exposure Measurement and Exposure Mitigation;
- SG9: Environmentally Sustainable Use of Man-

#### ufactured Nanomaterials

SG3-SG8 では、リスク評価に直接あるいは間接に係わる活動であるが、このうち SG4 では各種試験法のガイドラインをナノマテリアルに適合させるために最も重要なファクターである、試験サンプルの調整法や用量設定に関して考慮すべき論点について、各種試験法毎に取りまとめて公表している。<sup>9)</sup> また、SG3 においては、実際に代表的なナノマテリアルに関して加盟国が自主的に物性情報や安全性データを収集、場合によっては毒性試験を行うというスポンサーシッププログラムが最も精力的に活動している (Table 1)。日本は米国とともに、フラーレンや単層及び多層カーボンナノチューブの 3 種類のナノマテリアルのスポンサー国となっている。<sup>10)</sup> 2012 年時点では、対象となっている 13 種のナノマテリアルの半数近くの物質について、物性データや初期的な毒性試験データが出揃う予定となっている。今後は毒性情報等を取りまとめた Dossier 文書等の作成が行われ、OECD において高生産量化学物質に対して経常的に行われている化学物質共同評価プログラム (cooperative chemical assessment program; CoCAM) 等を介して、初期的な健康及び環境影響評価が行われることが想定されている。

Table 1. Sponsorship Arrangements at the WPMN Sponsorship Program

Manufactured Nanomaterial	Lead sponsor (s)	Co-sponsor (s)	Contributors
Fullerenes (C60)	Japan, US		Denmark, China
SWCNTs	Japan, US		Canada, France, Germany, EC, China, BIAC
MWCNTs	Japan, US	Korea, BIAC	Canada, France, Germany, EC, China, BIAC
Silver nanoparticles	Korea US	Australia, Canada, Germany, Nordic Council of Ministers	France, Netherlands, EC, China, BIAC
Iron nanoparticles	China	BIAC	Canada, US, Nordic Council of Ministers
Titanium dioxide	France Germany	Austria, Canada, Korea, Spain, US, EC, BIAC	Denmark, Japan, United Kingdom, China
Aluminium oxide			Germany, Japan, US
Cerium oxide	US UK/BIAC	Australia, Netherlands, Spain	Denmark, Germany, Japan, Switzerland, EC
Zinc oxide	UK/BIAC	Australia, US, BIAC	Canada, Denmark, Germany, Japan, Netherlands, Spain, EC
Silicon dioxide	France, EC	Belgium, Korea, BIAC	Denmark, Japan
Dendrimers		Spain, US	Austria, Korea
Nanoclays	BIAC		Denmark, US, EC
Gold nanoparticles	South Africa	US	Korea, EC

食品関係では、2009年にFAOとWHOの専門家による合同会議が企画され、食品及び農業分野へのナノテクノロジーの適用に関する食品の安全性への意義付けについてのレポートが公表された。<sup>11)</sup> の中では、食品・飼料へのナノテクノロジーの利用に対する段階的リスクアセスメントアプローチの利用に関して、より科学的な勧告を模索することを検討すべきであることが提言されている。また、有効性が確認されるべき試験法やガイダンスの開発には、以下の分野におけるデータギャップが今後明らかにされるべきであるとしている。

- 食品・飼料中のナノマテリアルの物理化学的特性を適切に解析する手法
- 食品、試料、農産物の基質中に存在するナノマテリアルの特性
- 生体試料中に存在するナノ粒子の確認法
- *in vitro*, *in vivo*, *ex vivo* and *in silico* 試験法
- ナノマテリアルの体内動態、特に生物学的バリアー(粘膜、脳血液関門、血液胎盤関門など)を通過することによる未知の体内分布や作用メカニズム
- 実際の使用用量におけるナノマテリアルの特性

一方、化粧品分野では日本(厚生労働省)、米国(FDA)、カナダ(厚生省)、EC(企業産業総局)の間で国際協力と情報交換を行う場である化粧品規制協力国際会議(International Cooperation on Cosmetics Regulation; ICCR)において、2010年には化粧品中のナノマテリアルの基準や検出法について取りまとめた報告書が公表された。その後、2011年より安全性評価手法を検討する作業グループが組織され、現在、評価ガイダンスの作成が進行中である。

## 5. おわりに

本稿では有害性評価の観点からガイダンスの作成状況を取りまとめたため、特にとりあげなかったが、2011年の10月には欧州委員会(European Commission; EC)は規制上のナノマテリアルを「個数濃度のサイズ分布で50%以上の粒子について1つ以上の外径が1 nm から 100 nm のサイズ範囲である粒子」と定義した。<sup>12)</sup> この場合のサイズ分布の閾値である「50%」は規制上の値であり、有害性評価の観点からの科学的な値ではない。2014年12月ま

でこの数字は見直すことになっているが、申請側の産業界としては大きな問題である。一方で米国FDAは、1 nm から 100 nm のサイズ範囲にもとらわれることなく、その物性や生態影響に与える大きさにより、ケースバイケースの対応をとるという姿勢から、明確な定義を規定していない。これは両地域での許認可行政の運用システムの違いが、部分的に影響していると思われる。米国では基本的に商品としての製品ベースで許認可を行うケースが多く、安全性評価についても各企業等と個別に対応する体制を取り易いことによるものと考えられる。米国におけるこのような個別申請で対応するという傾向は、食品添加物や化粧品のようにナノマテリアルの使用用途が厳密に規定されていないような、工業用製品の原料となるナノマテリアルの製造に係わる化学物質管理体制においても認められる。

つまりナノマテリアルのリスクは、その使用用途によっても異なってくるため、様々な用途に適用可能なように開発された原料であるナノマテリアルの安全性を包括的に評価しようとするならば、多方面での用途を想定した概略的な評価ガイダンスしかできない。しかしながら、用途をある程度限定するならば、より具体的な評価ガイダンスを作成できると考えることができる。このことは、化学物質管理システムとして、物質ベースでナノマテリアルを評価するための枠組みを構築している活動よりも、食品添加物や食器、化粧品などといったように用途を規定した中でのナノマテリアルの評価ガイダンスが先行して公表されている現状と一致しているものと考えられる。しかし各国、地域が各々のシステムの中で独自に評価するという状態は、グローバル化しているナノマテリアル産業界にとって好ましいものではない。今後は、各用途分野に対する評価ガイダンスであっても国際的なハーモナイゼーションや、評価事例情報の共有化を進めることにより、より効率的で国際的なナノマテリアルの健康影響評価体制の構築が望まれる。

謝辞 本稿での解説の基となった情報の一部は、厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)H21-化学-一般-008及びH24-化学-指定-009の助成によって行われた。

## REFERENCES

- 1) Hankin S. M., Peters S. A. K., Poland C. A., Foss Hansen S., Holmqvist J., Ross B. L., Varet J., Aitken R. J., "Specific Advice on Fulfilling Information Requirements for Nanomaterials under REACH (RIP-oN 2)-Final Project Report," RNC/RIP-oN2/FPR/1/FINAL, 2011.
- 2) European Food Safety Authority (EFSA) Scientific Committee, *The EFSA Journal*, **958**, 1-39 (2009).
- 3) European Food Safety Authority (EFSA) Scientific Committee, *EFSA Journal*, **9**(5), 2140 (2011).
- 4) Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS), "Guidance on the Safety Assessment of Nanomaterials in Cosmetics," SCCS/1484/12, 2009.: [http://ec.europa.eu/health/scientific\\_committees/consumer\\_safety/docs/sccs\\_s\\_005.pdf](http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_s_005.pdf), cited August 20, 2012.
- 5) U. S. Environmental Protection Agency (EPA), *Fed. Regist.*, **75**(180), 56880-56889 (2010).
- 6) U. S. Food and Drug Administration (FDA), "Draft Guidance for Industry; Considering Whether an FDA-Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology," 2011.: <http://www.fda.gov/RegulatoryInformation/Guidances/ucm257698.htm>, cited August 20, 2012.
- 7) U. S. Food and Drug Administration (FDA), "Guidance for Industry: Assessing the Effects of Significant Manufacturing Process Changes, Including Emerging Technologies, on the Safety and Regulatory Status of Food Ingredients and Food Contact Substances, Including Food Ingredients that are Color Additives; Draft Guidance," 2012.: <http://www.fda.gov/downloads/Cosmetics/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/UCM300927.pdf>, cited August 20, 2012.
- 8) U. S. Food and Drug Administration (FDA), "Guidance for Industry: Safety of Nanomaterials in Cosmetic Products, Draft Guidance," 2012.: <http://www.fda.gov/downloads/Cosmetics/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/UCM300932.pdf>, cited August 20, 2012.
- 9) Organization for Economic Co-operation and Development (OECD), Environment Directorate, "Preliminary Guidance Notes on Sample Preparation and Dosimetry for the Safety Testing of Manufactured Nanomaterials," ENV/JM/MONO(2010)25, OECD, Paris, 2010.
- 10) Organization for Economic Co-operation and Development (OECD), Environment Directorate, "Guidance Manual for the Testing of Manufactured Nanomaterials: OECD's Sponsorship Programme; First Revision," ENV/JM/MONO(2009)20/REV, OECD, Paris, 2010.
- 11) Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), World Health Organization (WHO), "FAO/WHO, Expert Meeting on the Application of Nanotechnologies in the Food and Agriculture Sectors: Potential Food Safety Implications, Meeting Report," 2010.: <http://www.fao.org/docrep/012/i1434e/i1434e00.pdf>, cited August 20, 2012.
- 12) European Commission. *Official Journal of the European Union*, L 275, 20.10.2011, 38-40 (2011).

