

海外で、実際に食品用二酸化チタン市販品を調査した結果では、ナノ粒子を多数含むことが報告されている。

EUでは、カラー番号 E171 (Titanium dioxide) で食品添加物に登録されている^{xvii}。

EU で市販されている食品用グレードの TiO₂ (E171) の一次粒子を測定した結果、平均粒径 110 nm (粒径分布は 30~400nm, SEM による観察) で、約 36% は少なくとも一次元の大きさが 100 nm 未満 (TEM: 透過型電子顕微鏡, Transmission Electron Microscope による観察) であった^{xviii}。

EU では、規制上のナノマテリアルの定義を「一次粒子が、100 nm 以下で、個数濃度閾値を 50%」としている。

アメリカアリゾナ州で購入した食品中の Ti を測定した結果、チューイングガムに一番多く含まれていた。0.45 μm のメンブレンフィルターを通過した Ti の割合は、チューイングガムが 3.9% で 0.45 μm フィルターを通過した割合が高かった^{xviii}。

Woodrow Wilson Center で収集しているナノマテリアル製品 DB^{xiii} では、二酸化チタンを食品関連用途に使用している製品は、89 製品がヒットした。89 製品はいずれも Weir らの論文^{xviii} によってナノ粒子を含む事が判明した製品であり、DB カテゴリー 5 (Not advertised by manufacturer) である。研究では^{xviii} 着色料として使用されていると予測し、白色の食品中心に分析しているが、Woodrow Wilson Center DB によると、79 製品は、抗凝固剤 (分散剤) として添加され、28 製品は着色料として添加されていた (重複有り)。18 製品が着色料および抗凝固剤の両方の目的で添加されている。

チューイングガムの TiO₂ ナノ粒子の使用状況を分析した例がある^{xix}。中国で 6 つの市販品 (国際的な種類の違うブランド) を購入し、表面の砂糖を溶解、ガムベースと沈殿物中の TiO₂ を TEM 観察した。その結果、ガムに使用されていた TiO₂ 粒子の大きさは 40~300 nm で、93% 以上が 200 nm 以下のナノ粒子であった。ガムには、2.4~7.5mg の TiO₂ ナノ粒子が含まれていた。実際にガ

ムを噛んで、摂取量を測定した結果、ガム 1 個で、平均 5.1 mg の TiO₂ ナノ粒子を摂取していた。

海外では、Merck より TiO₂ と Fe₂O₃ で雲母 (マイカ) をコートしパール色をもたせた食品用色素 (Candurin) が許可されている^{xx}。1 例として Candurin® Red Sparkle の製品の大きさは、10~100 μm である^{xxi}。

4 二酸化チタンの効果、曝露

TiO₂ ナノ粒子をポリエチレンフィルムに塗布し、TiO₂ ナノ粒子を挟んだ複層ポリエチレンフィルムを作成した。そのフィルムで牛乳、チーズ、ヨーグルトなどを 11 日保存し分析した結果、チーズの食感と品質は貯蔵時にそれほど変化しなかったが、TiO₂ ナノ粒子を含まないポリエチレンフィルムを用いた場合の品質劣化は著しかった。フィルムから食品への TiO₂ ナノ粒子の移行は観察されなかった^{xxii}。

<デンマーク環境省の経口曝露に関する情報収集調査報告書>^{xxiii}

デンマーク EPA では 2013 年 9 月に、消費者曝露および環境曝露におけるナノマテリアルのリスクを明らかにすることを目的とした“Better control of nano”という先導的プロジェクトの一部として、ナノマテリアルの経口曝露による体内吸収に関する化学文献の収集調査を行った結果を公表した。以下に、その調査で取りあげられた 10 種のナノマテリアルに関する経口曝露吸収に関する結果の概要を示す。腸管吸収を精査するためにデザインされた試験の報告はかなり限られていた。経口曝露によるヒト健康へのリスクを評価するためにはさらなる研究が必要であるとされている。しかし、現時点の評価からは、大量経口曝露の可能性のある物質として銀、二酸化ケイ素、二酸化チタン、酸化亜鉛などについて将来的な調査対象候補物質となり得るとまとめられていた。

<カーボンナノチューブ (CNT) >

用途: CNT は独特の電氣的、機械的および熱的特性を有し、電子機器、コンピューター、航空宇

宙、建築などの産業で広く適用できる。CNT は最強の引張強度を有する合成繊維である。CNT を含む高強度の複合材料は宇宙船や宇宙エレベータにも利用可能である (Lam *et al.* 2006)。また、CNT は生物医学的用途のための潜在的なツールとして特に興味深く (Kolosnjajtabi *et al.* 2010)、修飾 CNT は薬物送達システムに役立つ可能性がある (Bianco *et al.* 2005)。

In vivo 試験: Swiss マウスを用いて 3 種類の SWCNT (マイクロメートル単位の長さの原料 SWCNT および精製 SWCNT、長さ 20~80 nm の超短 SWCNT) の単回多用量 (1000 mg/kg) 投与後の肉芽腫形成と毒性を調査した (Kolosnjajtabi *et al.* 2010)。どの SWCNT においても (長さ、表面積、表面相互作用及び鉄含有量に関わらず) 肉芽腫の形成や急性経口毒性は認められなかった。

妊娠 6~19 日の SD ラットに 0、40、200、1000 mg/kg/day の MWCNT (直径 10~15 nm、長さ約 20 μ m) を反復経口投与した試験 (Lim *et al.* 2011a, b) において、最高用量で毒性影響が認められたことから、母体毒性と発生毒性の無毒性量は 200 mg/kg/day とされた。

単回または 28 日間、SWCNT または MWCNT を雄雌 Crl:CD (SD) ラットに強制経口投与した試験 (Matsumoto *et al.* 2012) において、急性毒性/反復投与毒性は最高用量 (急性: SWCNT 50 mg/kg、MWCNT 200 mg/kg、反復: SWCNT 12.5 mg/kg/day、MWCNT 50 mg/kg/day) まで認められなかった。

雄 Swiss アルビノマウスに MWCNT (直径 20~30 nm、長さ 5~50 μ m) を 0、60 または 100 mg/kg、単回投与した試験 (Awasthi *et al.* 2013) では、投与後 7、14、21 および 28 日に肝臓の SOD、CAT 活性および顕微鏡検査の結果、用量にかかわらず明らかな肝毒性は認められなかった。

近交系 Swiss および C57BL/6 の雌マウスに SWCNT または酸官能性 SWCNT を 100 μ m/動物、気管内注入、静脈内注射、腹腔内注射あるいは強制経口によって単回投与した試験 (Sachar &

Saxena 2011) において、酸官能性 SWCNT の注射 (静脈/腹腔内) 後、赤血球数とヘモグロビン値が一過性の減少が認められたが、強制経口投与後には認められなかった。

In vitro 試験: 濃度 5~1000 μ g/ml のカルボン酸官能性 SWCNT (ニッケル 5~10% 含有) に分化または未分化の Caco-2 細胞を 24 時間曝露した試験 (Jos *et al.* 2009) において、曝露 24 時間後に細胞毒性の濃度依存傾向がみられ、100 μ g/ml で顕著になった。

雄 Fischer 344 ラットに SWCNT または MWCNT の懸濁液を 0 または 50 mg/kg 単回経口投与して 24 時間後に採取した尿を用いて行った Ames 試験の結果は、代謝活性の有無にかかわらず陰性であった (Szendi & Varga 2008)。

24 時間、濃度 50~150 μ g/ml の酸化 SWCNT に培養細胞 (ヒト歯肉線維芽細胞) を曝露した試験において、遺伝毒性影響が報告された (Cicchetti *et al.* 2011)。

SWCNT または酸官能性 SWCNT の、近交系 Swiss または C57BL/6 の雌マウスから単離された赤血球への取り込みが検討され (Sachar & Saxena 2011)、酸官能性 SWCNT に曝露された培養液において赤血球の回復低下が用量及び時間依存的に認められたが、SWCNT 曝露培養液では赤血球の回復に影響は、みられなかった。また、新鮮な赤血球を蛍光標識の付いた酸官能性 SWCNT とともに培養したところ、69% の赤血球が蛍光陽性であり、洗浄後でも 18% が陽性のままであった。

模擬環境での試験: CNT は疎水性有機化合物のキャリアとなることから、模擬胃液および胆汁塩液中における CNT へのフェナントレンの吸着や吸着フェナントレンの生物学的利用能が調査された (Wang *et al.* 2011)。フェナントレンの吸着は模擬胃液中で抑制され、ペプシンや胆汁塩は CNT からのフェナントレンの脱着を増加させた。

<フラーレン>

用途: フラーレンの用途として、標的薬物送達、

分子ボールベアリング、潤滑剤、ポリマーマトリックスの補強材等が提案されている (Vogelson 2001, Holister *et al.* 2003)。フラーレン C60 は皮膚における酸化ストレスを減少させるために化粧品に使用され、水溶性フラーレン C60 は増白剤として使用することができる。水溶性フラーレン C60 誘導体は、種々の炎症性疾患の治療に有効である可能性がある (Yamashita *et al.* 2013)。

In vivo 試験: Fischer ラットに水溶性フラーレン C60 を経口 (18 kBq) または静脈注射 (9 kBq) により単回投与した試験において、肝臓、脾臓、肺、腎臓、心臓、脳、精巣および血液では投与後 160 時間まで、糞では 2 日間まで、尿では 30 時間まで ¹⁴C 標識を測定した (Yamago *et al.* 1995)。経口投与後 48 時間以内に標識は糞中に排泄され、3 および 6 時間後の肝臓や他の組織の標識は、わずかであった。また、静脈注射後には血中の標識は急速に減少し、様々な組織、特に肝臓に分布し、1 時間後に総標識量の 73%、16 時間後に 92%、30 時間後には 80% が肝臓に存在した。

7 日間、雌 C57BL/6 マウスにポリビニルピロリドンで覆われたフラーレン C60 を 0 または 2,000 mg/kg/day 強制経口投与した反復投与試験において、体重、血液学・血液生化学検査、器官重量および病理組織学的検査に明らかな毒性影響は、認められなかった (Yamashita *et al.* 2013)。

(以下のフラーレンに関する *in vivo* 試験情報はデンマーク環境省の報告書に記載されていないが、本研究にとって比較的重要であると思われるので、研究概要を追加した)

29 日間、雄雌 Crl:CD (SD) ラットにフラーレン C60 を 0、1、10、100 または 1,000 mg/kg/day 強制経口投与した反復投与試験において、一般状態、体重、血液学・血液生化学検査、血中ホルモン濃度、器官重量および病理組織学的検査に明らかな毒性影響は認められなかった (Takahashi *et al.* 2012)。

In vitro 試験: 情報なし

<金>

用途: 金 NPs は独特の表面・電子・光学特性に

起因する種々の生物医学的用途のために使用されてきた。その物理化学的特性 (表面プラズモン共鳴、蛍光発光、容易な表面機能化) により、金 NPs はバイオセンサー、がん細胞イメージング、光熱療法及び薬物送達に使用されている。また、懸濁液中で比較的高い安定性を示すことから、金 NPs はプロセスを研究するためのモデル NPs として研究用途にも使用される。

In vivo 試験: 7 日間、BALB/c マウスに濃度 0.2 mg/ml の金 NPs を飲水投与し、金属金コロイド粒子の消化管への取り込みおよび組織/臓器分布 (直径 4、10、28 および 58 nm の非抱合金 NPs) を調べた (Hillyer & Albrecht 2001)。金 NPs (直径 4 nm) の濃度は、腎臓、小腸、肺、胃、脾臓、肝臓、心臓、血液及び脳の順に高い。金 NPs の取り込みは、粒子径に依存し、粒子径が小さいもの (4~10 nm) は大きいもの (28~58 nm) より消化管を容易に通過した。小腸絨毛におけるパーソープションにより金 NPs は取り込まれていた。

14 日間、雄 ICR マウスに 137.5~2200 µg/kg/day のクエン酸で安定化した金 NPs (13.5 nm) を強制経口投与した毒性試験 (Zhang *et al.* 2010) において、2200 µg/kg/day を投与したマウスの赤血球と骨髄細胞の TEM 画像から、金 NPs を含む複数の小胞がみられた。多くの金 NPs が細胞膜外で認められ、平均サイズは約 10~15 nm であった。

In vivo 遺伝毒性をスクリーニングする目的で、7 日間、雄ラットに 3 種類の大きさの金粒子、金 NPs: 直径 16 または 55 nm、金ナノシェル: 直径 160 nm (120 nm の二酸化ケイ素のコアおよび 20 nm の金のシェル) を 0.25 mg Au/kg/day 強制経口投与したところ、遺伝毒性は認められなかった (Jumagazieva *et al.* 2011)。また、組織中の金 NPs の検出は行われなかった。

In vitro 試験: 情報なし

<酸化鉄>

用途: 酸化鉄 NPs は磁気共鳴画像のコントラスト強調に用いられ、その他、がん治療のための磁

気温熱療法や標的薬物送達の担体に使用される (Singh *et al.* 2013)。

In vivo 試験：ナノサイズ (NPs：平均 29.8 nm) またはマイクロサイズ (バルク：平均 2.2 μm) の酸化鉄 (Fe_2O_3) を超純水に懸濁して雌 Wistar ラットに 0、500、1000 または 2000 mg/kg 単回強制経口投与し、その組織分布および遺伝毒性を調査した (Singh *et al.* 2013)。遺伝毒性試験のために血液と骨髄が採取され、また、組織分布の調査のために、投与 48 時間まで全血、肝臓、腎臓、心臓、脳、脾臓、骨、尿及び糞便のサンプルが採取された。結果として、NPs およびバルクともに遺伝毒性は認められなかった。NPs では、鉄の濃度が脳以外の組織と血液で増加し、その濃度は血液、脾臓、肝臓、腎臓、心臓及び骨髄の順に高く、各組織での NPs からの鉄の取り込みは 0.2~9.4 %であった。バルクでは、鉄の濃度は肝臓と脾臓でのみ増加し、各組織のバルクからの鉄の取り込みは 0.01~2.3%であった。したがって、経口投与された酸化鉄 NPs は、酸化鉄バルクよりも消化管から吸収されやすいことが示された。

雄 SD ラットにミルクに懸濁した鉄粉 (金属鉄：サイズ 5-30 nm~6-9 μm) を摂餌投与した試験 (McCullough *et al.* 1995) において、24 時間投与後に採取した十二指腸サンプルから鉄の沈着物が認められ、また、粘膜細胞による鉄摂取レベルの変動に伴う絨毛中の鉄の選択的局在化が明らかになった。十二指腸サンプルの分析により、刷子縁、粘膜細胞の横方向の間隙、粘膜と間質細胞のミトコンドリアクリステと細胞質への金属鉄 NPs の取り込みが明らかになった。

In vitro 試験：情報なし

<セレン>

用途：ナノサイズのセレン (Se-NPs) は、必須微量元素セレンの代替源として食品添加物および栄養補助食品に使用されている。急性毒性は、一般的に食品添加物および栄養補助食品に使用される亜セレン酸ナトリウムに比較し低毒性である。

In vivo 試験：情報なし

In vitro 試験：抗酸化酵素であるグルタチオンペルオキシダーゼを含む亜セレン酸ナトリウム、Se-NP およびセレノメチオニンからの Caco-2 細胞 (ヒト結腸癌由来の細胞株) へのセレン (Se) の取り込みを調べた (Wang & Fu 2012)。赤色の元素 Se-NPs のサイズは、動的光散乱法によって測定した結果 60~80 nm (平均 69 nm) であった。Caco-2 細胞単層を横切る Se (all at 0.1 $\mu\text{mol/L}$) の三つの異なる形態の輸送および取り込みを 2 時間測定し取り込み効率を算出した。最も高い取り込み効率は、Se-NPs を処理した細胞で観察された。全試料中の Se 濃度は原子吸光分析によって測定した。酸中の試料の溶解に続いて試料中の損傷の無い Se-NPs からの情報は得られなかった。以上の結果、以下のように要約される。この試験では、SE-NPs から Se への輸送および取り込みは、時間の依存性が認められ、Caco-2 細胞単層を横切る上皮輸送は、主に受動輸送経路を介して起こっていた。更に、この結果から、Se-NPs が可能生物活性酵素への取り込みを行うために、溶存種として存在することが示された。Se-NPs を用いて Se の膜通過を検討した結果、他の 2 つの試験した分子の Se 種より優れていた。

<二酸化ケイ素>

用途：二酸化ケイ素ナノ粒子 ($\text{SiO}_2\text{-NP}$) は、二つの主要な種類に分けることができる。それは、結晶性および非結晶性の $\text{SiO}_2\text{-NPs}$ である。結晶性の $\text{SiO}_2\text{-NP}$ は、石英、クリストバル石および鱗ケイ石などのいくつかの異なる物質で存在する。非結晶性の $\text{SiO}_2\text{-NPs}$ は、メソ多孔性と非結晶質性 $\text{SiO}_2\text{-NP}$ である。 $\text{SiO}_2\text{-NP}$ は、例えば、セメントの成分、塗料、固体潤滑剤、シャンプー、化粧品及びフェイシャルクリームのような多数の用途に使用される。さらに潜在的な応用は、硬化剤、バイオ電気化学用、石油の回収および他の粒子の製剤に用いられる (Mikkelsen *et al.* 2011)。

合成アモルファスの $\text{SiO}_2\text{-NP}$ (SAS) は、粉末製品の流動特性を維持し、ペーストを厚くする固化防止剤として、またビールやワインの透明化剤

のような食品用途に長年使用されてきた。アモルファスの SiO₂-NP の従来の形態は、食品添加物 E551 として知られている。原則的に合成アモルファスの SiO₂-NP は、結晶の SiO₂-NP を含んでいない。合成アモルファスの SiO₂-NP を食品に適用して許可されているが、ナノメートルサイズを中心とした SiO₂-NP の試験はおそらく実施されていない。本剤が 50~200 nm の範囲にあることは、いくつかの食品中の SiO₂-NP の粒度を測定して判明し、処理された食品（クリーム入りコーヒー）中の粒度は 30~120 nm であったと報告している (Dekkers *et al.* 2011)。

In vivo 試験：Balb/c マウスを用いた混餌による 10 週間の反復投与毒性試験において、1 群雌雄 5 匹を用いて、対照群、ナノ化 SiO₂-NP (30~90 nm) およびマイクロ化 SiO₂ (0.5~30 μm) を飼料中に 1% 添加した試験を実施した。ケイ素は肺と肝臓で測定された。飼料中と臓器中濃度に特性の評価ができた。特に SiO₂-NP は、マイクロ化 SiO₂ および対照群に比較して ALT の増加が C57BL/6 マウスだけでなく Balb/c マウスでも認められた (So *et al.* 2008)。

In vitro 試験：これらの知見は、E 551 を含有する食品を摂取すると、SiO₂-NP は、腸の上皮に多く曝露する可能性があることを示唆している。単体の SiO₂-NP は、集合体（凝集）粒子に比較してより簡単にヒトの腸から吸収される可能性がある (Dekkers *et al.* 2012)。

<銀>

用途：歴史的に、銀塩はその静菌効果を利用して医薬品に使用されている。本剤は、軟膏として皮膚へまた溶液として経口的に投与する。今日では、銀の NP (Ag-NPs) は、単品では最も広範に使用されている。2000 年代後半に使用が急速に増加している。同様に Ag-NPs を利用して衣類、家庭用浄水器および水筒の静菌に応用されている。

In vivo 試験：ラットへ Ag-NPs を 28 日間反復投与経口投与し銀の吸収性を検討した。銀の臓器分布は Ag-NPs と酢酸銀 (AgAc) で類似していた。

しかし、臓器の絶対的な銀濃度は AgAc に比較して Ag-NPs が低濃度であった。これらの分布吸収試験は、Ag-NPs の投与後の糞便中の高濃度銀と一致する。Ag-NPs が胃腸系で溶解するか、または臓器や組織に投与した元の NPs が吸収および移行するかなどの更なる試験が必要である (Loeschner *et al.* 2011)。

70 nm の Ag-NPs を生食にて懸濁しラットへ 0、0.25、0.5、1 または 2 mg/kg/day の用量で 30 日間反復投与毒性試験を行った (Sardari *et al.* 2012)。解剖および病理組織学的の結果、腎、肝および脾臓に変化が認められた。銀の分布から Ag-NPs または硝酸銀投与による標的臓器は、肝および脾臓でそれに加えて精巣、腎、脳および肺にも影響が認められた。可溶性の銀のみを考慮に入れると Ag < 20 nm と硝酸銀の比率はむしろ同程度であった。銀は、イオンの形で吸収され、Ag-NPs 投与後は微粒子ではない (Loeschner *et al.* 2011)。

Kim ら (2009) の実験結果では、ラットに経口投与した Ag と Ag-NPs は銀が吸収されたことを間接的に証明したが、銀の血液循環と腸壁通過との関係は議論されていない。

Kim ら (2010) では、71 nm~22 nm の Ag-NPs は容易に消化管から吸収され、臓器に蓄積され悪影響を及ぼすと結論していた。しかし、この研究は、銀が血液循環に入るための腸壁通過について議論されていない。

雄 Swiss white マウスに 3~20 nm の Ag-NPs を 0、5、10、15 または 20 mg/kg/day を 21 日間反復投与した結果、光学および電顕所見から Ag-NPs は小腸の上皮細胞ならびに微絨毛に損傷を与えた (Shahare *et al.* 2013)。Ag-NPs からの銀は、実験動物の消化管から吸収されることを証明している。複数の研究から、銀は強制経口投与によって血液中に移行し、さらに臓器・器官に分布し、糞便を介して排泄される。血液中のレベルと臓器中濃度は、用量依存性がある。Ag-NPs は、粒度によって影響が異なる。つまり直径 100 nm より小さいと吸収され、大きな粒子は吸収されな

いように見える。

In vitro 試験：この試験は、細胞膜を通過する転位の銀は、Ag+イオンであり Ag-NPs ではない (Bouwmeester *et al.* 2011)。

他の報告では、十分にヒト肝や腸細胞における Ag-NPs の潜在的な吸収を判断するには不十分である (Gaiser *et al.* 2009)。

模擬環境での試験：消化モデル試験の結果から、経口的に 60 nm の Ag-NPs を摂取すると生理学的に関連する条件 (すなわちタンパク質の存在下) の下で消化され、最終的にはその大きさと粒子の分散によって腸壁に到達することができる。したがって、この異なる化学組成の Ag-NPs と Ag+イオンの二者の摂取は、最終的に腸へ NPs として曝露される (Walczak *et al.* 2012)。同様の試験では、摂取した Ag-NPs は、凝集および化学的に修飾された種々の粒子に変換することができる (Roger *et al.* 2012)。

<二酸化チタン>

用途：二酸化チタン (TiO₂) は顔料に使用し、バルク形態で流通している高生産量物質である。主な用途は、塗料、紙、プラスチック、保護剤、セラミックス、インク、医薬品、化粧品、練り歯磨きおよび食品で最も世界的に使用されている白色顔料である。この中にナノサイズがあるが現時点では、EU や世界的に流通していない。この理由は、ナノ材料の在庫がないことによる。しかし、幾つかの製品中で日焼け止め剤は、ナノ粒子の TiO₂ の生産量割合は、数パーセントである (Hansen *et al.* 2008)。食品添加物 E171 の TiO₂ は、TiO₂-NP の画分を含み、菓子、ホワイトソース、ドレッシング、粉末食品、美白および食品の増白に使用される。英国では、TiO₂ (非ナノ+ナノ) の食事摂取量は 1 日一人あたり 5 mg (Powell *et al.* 2010) と推定できる。特に、光触媒酸化 TiO₂-NPs の用途が増加すると、使用量がかなり増加する。また、TiO₂ を高含量する食品は、ガムでそれは子供に TiO₂ の最も高い曝露が推定され、菓子の摂取に留意する (Wang *et al.* 2012)。

TiO₂ の結晶構造の違いによって TiO₂ のルチル型およびアナターゼ型に分類できる。この二つの生産と消費量の資料が最も重要である。両結晶構造は着色剤として承認されている。

In vivo 試験：アナターゼ型 TiO₂-NPs (75 nm) を雄 SD ラットに 0、10、50 または 200 mg/kg/day 投与し胃腸への吸収を検討するため 30 日間の反復投与試験をした。200 mg/kg/day の吸収は低くかった。一般的に消化管で大きい粒子の NPs は、凝集によって吸収が少ないと推測されている。この試験の最高用量は、ヒトに対する安全量 (0.1 mg/kg/day) の 2000 倍であった (Wang *et al.* 2012)。

次の報告は、生理的条件に近い状態で試験した。TiO₂-NPs は、マイクロサイズの粒子に比較して容易に吸収され、結晶の粒度に依存し吸収性は、ルチル型が最も高かった。しかし、チタンは、ヒトが摂取している 1000 倍の投与量で肝臓に検出した (Onishchenko *et al.* 2012)。

高濃度 (5 g/kg) TiO₂-NPs の経口投与後の臓器蓄積性を検討した試験において、曝露 2 週間後の肝臓で観察された粒子の量は、サイズ依存性であるかどうかは明確ではなかった。80 nm では高濃度が検出されたが 25 nm と 155 nm では、対照群と有意な差が無かった。腎臓への蓄積は、25 と 80 nm の粒子が 155 nm の細粒の TiO₂ に比較して高い (Wang *et al.* 2007)。

TiO₂ の微粒子ルチル型は、吸収され多くの臓器に分布する。しかし、投与した TiO₂ の粒子サイズがナノサイズの範囲外であった (Jani *et al.* 1994)。

In vitro 試験：TiO₂-NPs (< 40 nm) を低用量の 10 µg/ml を投与することによって胃腸管の上皮層 (Caco-2) を通過することが認められた (Koeneman *et al.* 2010)。

(以下の酸化チタンに関する *in vivo* 試験情報はデンマーク環境省の報告書に記載されていないが、本研究にとって比較的重要であると思われるので、研究概要を追加した)

反復経口投与試験が Hong らのグループによりいくつか行われている。各試験には約 6 nm の二酸化チタンが用いられた。30 日間、雌マウスに 0、62.5、125、250 mg/kg/day を投与し、肝臓・腎臓・脾臓・胸腺について調査したところ、125 mg/kg/day 以上で体重の低値とともに各臓器の相対重量の高値、肝機能への影響が認められ、肝臓に病理所見がみられた (Duan *et al.* 2010)。60 日間、雌マウスに 0、5、10、50 mg/kg/day を投与し、肝臓の病理組織学的検査および微細構造について調査したところ、10 mg/kg/day 以上で構造に変化がみられた (Cui *et al.* 2010)。30 日間、雌マウスに 0、5、50、150 mg/kg/day を投与し、脾臓について調査したところ、50 mg/kg/day 以上で肝臓に病理所見がみられた (Wang 2011)。60 日間、雌マウスに 0、5、10、50 mg/kg/day を投与し、海馬ニューロンの微細構造について調査したところ、10 mg/kg/day 以上で構造に変化がみられた (Hu *et al.* 2011)。60 日間、雌マウスに 0、5、10、50 mg/kg/day を投与し、肝臓について調査したところ、5 mg/kg/day 以上で構造変化、10 mg/kg/day 以上で病理所見、肝機能への影響がみられた (Cui *et al.* 2011)。90 日間、雌マウスに 0、2.5、5、10 mg/kg/day を投与し、腎臓について調査したところ、2.5 mg/kg/day 以上で重量の高値、腎機能への影響、病理所見が認められた (Gui *et al.* 2011)。90 日間、雌マウスに 0、2.5、5、10 mg/kg/day を投与し、脾臓について調査したところ、2.5 mg/kg/day 以上で重量の高値、血液学的項目への影響、病理所見が認められた (Sang *et al.* 2012)。90 日間、雌マウスに 0、10 mg/kg/day を投与し、肝臓について調査したところ、10 mg/kg/day で血液学的項目や肝機能への影響、病理所見が認められた (Cui *et al.* 2012)。90 日間、雄マウスに 0、2.5、5、10 mg/kg/day を投与し、腎臓について調査したところ、2.5 mg/kg/day 以上で重量の高値、病理所見が認められた (Gui *et al.* 2013)。

<酸化亜鉛>

用途：酸化亜鉛は、一般的に使用される金属酸化物で、伝統的に、塗料、医薬品およびセラミックスに使用されてきた。近年、開発された酸化亜鉛のナノ粒子 (ZnO-NPs) は、日焼け止用化粧品、歯科材料および皮膚への軟膏で使用されてきた。ZnO-NPs は、粒度に依存する抗菌活性を有す (Li *et al.* 2008)。その良好な吸収と光触媒特性のため ZnO-NPs は、水や空気中の汚染物質の除去または分解能力があり環境修復に使用することができる (Wang *et al.* 2008)。

In vivo 試験：ZnO-NP の薬物動態試験の結果、20 および 70 nm の二種のコーティング ZnO-NPs (50、300 または 2000 mg/kg) を雌雄のラットに単回強制経口投与した。投与後 0、0.5、1、2、4、6、10、24、48、72 および 96 時間に採血し、加えて投与後 1 および 2 時間後と 1、2、3 および 7 日後に脳、心、腎、肺および精巣/卵巣内の ZnO を測定した。その結果、血漿亜鉛濃度は両サイズの ZnO-NPs とも投与後 24 時間に増加した。粒子のサイズおよび性差はなかった。推定吸収率は、用量依存性が認められた。即ち、低用量が 5~17% および高用量が 28~33% を示した。吸収は小さい粒子が大きい粒子に比較して高かった。組織中の TEM 画像および XAS 試験の結果、ZnO-NPs は臓器に亜鉛の粒子ではなくイオンの形で分布しているように観察できた。7 日後、摂取した Zn の 0.1% 未満を分析臓器中に検出した。微量の ZnO-NPs を経口投与した結果、異なる臓器にイオンとして分布した。亜鉛は、肝、肺および腎臓に分布し、大量投与の場合、糞中に 7 日以内に排泄される。また ZnO-NPs は、蓄積しないことを示した。微細な ZnO-NPs は、大きい粒子のものより若干高く亜鉛として取り込まれる (Baek *et al.* 2012)。

標的臓器に対する ZnO の分布と毒性は、ZnO-NPs の粒度に依存し、また ZnO-NPs は、大きいサイズより効率よく吸収される。分布は、肝、脾および腎臓に認められた。この試験の投与量は非現実的で非常に高用量 (2.5 g/kg) であった。組織および血中の NPs の存在を特徴づけるデー

タとしては不十分である (Li *et al.* 2012)。

20 と 120 nm の ZnO を 5 g/kg でマウスに経口投与した実験では、投与 2 週間後の標的器官の肝、心、脾、膵および骨において ZnO が分布していた (Wang *et al.* 2008)。しかし、この試験から ZnO-NPs がイオンかまたは粒子かどちらが吸収されたか結論できない。

蛍光標識した ZnO-NP による経口曝露後の NPs のリアルタイム光学イメージング解析では、吸収後の移動 (血中への移行と消失、主な分布先として腎臓と肝臓あること) を追跡できたが、吸収量および吸収の形態は測定できてない (Lee *et al.* 2012a)。

PET (ポジトロン断層法) によるイメージング検査は、経口投与後生体組織に吸収された ^{18}F でラベルした ZnO-NPs の挙動を追跡し評価ができる可能性を持つ手法である。しかし、吸収量および吸収の形態は測定できない (Lee *et al.* 2012b)。

In vitro 試験 : 情報なし。

D. 考察

1) ラット 13 週間反復投与試験

食品添加物規格の天然ナノクレイであるベンゲルクレアおよびベンゲルフレークについては、いずれのパラメータにおいても投与に関連した変化は見られず、明らかな毒性はないと考えられた。また、分子中のアルミニウムおよびマグネシウムの生体への移行や蓄積はほとんど見られないと考えられた。

また、スメクトンおよびクニピアについては、雌ラットにおいては、経過中より両投与群では、対照群よりも体重増加が亢進していたが、用量相関がない軽度の変化であり、背景データの範疇と考えられた。雌のみに見られた肺、心臓、脾臓及び肝臓の絶対重量の増加および脳と腎臓の相対重量の低下についても、いずれも用量相関性がない絶対重量あるいは相対重量のみの変化であり、体重増加に伴う二次的な変化と考えられた。また、雌の 1% 以上のスメクトン群で認められた MCHC の有意な増加と雄の 5% スメクトン群で

認められた TG の有意な減少は、いずれも関連するパラメータの変動は伴っておらず、偶発的な変化と考えられた。

また、特にクニピア投与群については、糞中には高濃度のアルミニウムが確認されているが、13 週間反復投与による肝臓への沈着は認めず、便潜血や腸管の組織学的変化はなく、物理的な影響も否定的であった。

2) 混餌飼料中のナノクレイ粒子の電子顕微鏡による観察

ベンゲルフレークよりもベンゲルクレ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。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、挫滅によっては、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の推定は困難であった。

クニピアおよびスメクトンの原体粒径は、最小値は共に 10 μm であった。最大値と平均値は、飼料との混合により原体に比較して低下しており、挫滅により粉砕されると考えられた。全体にクニピアよりもスメクトンの方が、小さい傾向にあったが、試料によっても巾があると考えられた。また、クニピアは層状に重なった板状構造を示し、スメクトンはスポンジ状の構造をした小型球状構造を示しており、その壁構造の厚さは、数 nm~10nm であった。さらに、クニピアは縁がめくれあがる構造が観察されており、薄い破片も含まれると考えられた。

今回実施した化学組成の検討では、クニピアはケイ素についてアルミニウムが多く、スメクトンはケイ素についてマグネシウムが多く含まれており、組成が異なっていた。

3) 食品・食品容器分野におけるナノクレイの用途調査による暴露評価のための基礎的情報収集

初年度の調査では、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がある歯磨き等や、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。

また、2年度目の調査から、食品に使用されているガスバリア性軟包装フィルムのうち、ナノクレイが使用されている製品の割合は1.3%程度と推定された(表 2-8)。

製品に使用されるナノクレイは2~5wt%程度と考えられるため(表 2-7 参照)、ナノクレイの存在量としてはさらに低く0.026~0.065%(14.6~36.5 t)程度と推定される。また、ここではガスバリア性軟包装フィルムを母集団とした割合を推定しているため、食品包装全体を母集団としたときは、さらにナノクレイが使用されている製品の割合は低くなると考えられる。

飲料用 PET ボトル(172.1 億本)のうち、ナノクレイが使用されている PET ボトルの割合(1,000 万本)は0.06%程度と考えられる。さらに、1 本当りのバリア材が3wt%である。なお、バリア材に含まれるナノクレイは不詳である。ナノクレイが使用されている PET ボトルの1 本当りの重量を24g と仮定すると、1 本当りのバリア材は0.72g、1,000 万本で7.2 t と推定され、ナノクレイはバリア材の内数のため、それら以下の量となる。

ワインの清澄剤としてベントナイトが使用されており、ナノクレイが含まれていると見られる。この使用方法では製造工程でベントナイトは除去され、また食品衛

生法において0.50%未満の残存率とする使用基準があるため、ワインにおいてナノクレイに暴露される可能性は低いと見られる。

また、上記のような食品衛生法の基準があるため、日本においては食品に使用することは現時点で困難と見られており、栄養補助食品(サプリメント)でナノクレイに暴露される可能性は低いと考えられる。但し、海外において粘土(無機鉱物)を用いた栄養補助食品(サプリメント)は販売されており個人輸入が可能であることに留意が必要である。

農薬において、ナノクレイはフロアブル製剤の増粘剤として使用されている。トップシェアの製品は年間50~60t が販売されている。平成24年度の日本国内における農薬の出荷量は197,034t であることと、他社品の販売量を鑑み、ナノクレイが年間100t 使用されると見積もったとしても、全体の約0.05%程度の使用状況と見られる。一方、ナノクレイ(精製ベントナイト)は増粘剤として0.1~1.0wt%程度使用され、平成16年のフロアブル製剤の出荷量は約10,000t とされている(現在のフロアブル製剤の出荷量は不明である)。これより、10~100t 程度の使用が推定されるため、上記の見積もり量が補強されると考えられる。

一方、食品に関連するナノ銀は、抗菌目的の使用が確認できた。容器・包装用、浄水用途で銀の使用は多いと思われるが、銀の総使用量は不明である。特に、容器・包装用途は、相当量が使用されると思われる。一方、サプリメントとして銀コロイドを直接摂取する製品もインターネット販売されていた。

銀の形態は、ナノ銀(金属)、銀イオン及び銀コロイドと多様であった。抗菌剤として使用されているものは、多くはAg₂O、AgCl、AgNO₃ などを使用し、銀イオンを溶出させて抗菌効果を求めていた。

二酸化チタンは、容器・包装に遮光性や抗菌性を付与する目的の使用が確認できた。食品添加物用の二酸化チタンナノ粒子製品は見つけられなかったが、研究論文から、一般の食品添加物の中にナノ粒子が含まれている事がわかった。

銀および二酸化チタンともに、一般工業用と比較して食品関連の使用総量は非常に少ないことがわかった。しかし、両方の物質ともに、容器・包装など幅広

く使われる製品に含まれており、さらに二酸化チタンの期待される効果は、抗菌、紫外線遮蔽、ガスバリア及び着色と多様であった。

二酸化チタンの一般消費者向けの製品はインターネットでも見つからなかったが、銀はサプリメントをはじめとして、各種用途の抗菌剤が一般消費者向けに販売されていた。

ナノ粒子のみならず、バルクとしての食品用途の数量も把握できない状況であったが、曝露されている人数は意外に多いと思われた。使用されている可能性のある製品群を把握することが必要であると考えられた。

<経口吸収に関する知見の引用文献>

Awasthi KK, John PJ, Awasthi A, Awasthi K.

2013. Multi walled carbon nano tubes induced hepatotoxicity in Swiss albino mice. *Micron* 44:359-364.

Baek M, Chung HE, Yu J, Lee JA, Kim TH, Oh JM, Lee WJ, Paek SM, Lee JK, Jeong J, Choy JH, Choi SJ. 2012. Pharmacokinetics, tissue distribution, and excretion of zinc oxide nanoparticles. *Int J Nanomedicine* 7:3081-3097.

Bianco A, Kostarelos K, Prato M. 2005. Applications of carbon nanotubes in drug delivery. *Current opinion in Chemical Biology* 9:674-679.

Bouwmeester H, Poortman J, Peters RJ, Wijma E, Kramer E, Makama S, Puspitaninganindita K, Marvin HJP, Peijnenburg AACM, Hendriksen PJM. 2011. Characterization of Translocation of Silver Nanoparticles and Effects on Whole-Genome Gene Expression Using an In Vitro Intestinal Epithelium Coculture Model. *ACS Nano* 5:4091-4103.

Cicchetti R, Divizia M, Valentini F, Argentin G. 2011. Effects of single-wall carbon nanotubes in human cells of the oral cavity: Geno-cytotoxic risk. *Toxicol in Vitro* 25:1811-1819.

Dekkers S, Krystek P, Peters RJB, Lankveld DPK, Bokkers BGH, van Hoven-Arentzen PH, Bouwmeester H, Oomen AG. 2011. Presence and risks of nanosilica in food products. *Nanotoxicology* 5(3):393-405.

Dekkers S, Bouwmeester H, Bos PMJ, Rietveld AG, Oomen AG. 2012. Knowledge gaps in risk assessment of nanosilica in food: evaluation of the dissolution and toxicity of different forms of silica. *Nanotoxicology* Early online, 1-11.

Gaiser BK, Fernandes TF, Jepson M, Lead JR, Tyler CR, Stone V. 2009. Assessing exposure,

uptake and toxicity of silver and cerium dioxide nanoparticles from contaminated environments. *Environ Health (London, U K)* 8:No.

Hansen SF, Michelson ES, Kamper A, Borling P, Stuer-Lauridsen F, Baun A. 2008.

Categorization framework to aid exposure assessment of nanomaterials in consumer products. *Ecotoxicology* 17(5):438-477.

Hillyer JF, Albrecht RM. 2001. Gastrointestinal persorption and tissue distribution of differently sized colloidal gold nanoparticles. *J Pharm Sci* 90:1927-1936.

Holister P, Vas CR, Harper T. 2003. Fullerenes. *Technology White papers nr 7. Cientifica* 2-12.

Jani PU, McCarthy DE, Florence AT. 1994. Titanium dioxide (rutile) particle uptake from the rat GI tract and translocation to systemic organs after oral administration. *Int J Pharm* 105:157-168.

Jos A, Pichardo S, Puerto M, Sanchez E, Grilo A, Camean AM. 2009. Cytotoxicity of carboxylic acid functionalized single wall carbon nanotubes on the human intestinal cell line Caco-2. *Toxicol in Vitro* 23:1491-1496.

Jumagazieva DS, Maslyakova GN, Suleymanova LV, Bucharskaya AB, Firsova SS, Khlebtsov BN, Terentyuk GS, Kong SM, Khlebtsov NG. 2011. Mutagenic effect of gold nanoparticles in the micronucleus assay. *Bull Exp Biol Med* 151:731-733.

Kim WY, Kim J, Park JD, Ryu HY, Yu IJ. 2009. Histological study of gender differences in accumulation of silver nanoparticles in kidneys of Fischer 344 rats. *J Toxicol Environ Health, Part A* 72:1279-1284.

Kim YS, Song MY, Park JD, Song KS, Ryu HR, Chung YH, Chang HK, Lee JH, Oh KH, Kelman BJ, Hwang IK, Yu IJ. 2010. Subchronic oral toxicity of silver nanoparticles. *Part Fibre Toxicol* 7:No.

Koeneman BA, Zhang Y, Westerhoff P, Chen Y, Crittenden JC, Capco DG. 2010. Toxicity and cellular responses of intestinal cells exposed to titanium dioxide. *Cell Biol Toxicol* 26:225-238.

Kolosnjajtabi J, Hartman KB, Boudjemaa S, Ananta JS, Morgant G, Szwarc H, Wilson LJ, Moussa F. 2010. In vivo behavior of large doses of ultrashort and full-length single-walled carbon nanotubes after oral and intraperitoneal administration to Swiss mice. *ASCNANO* 4(3):1481-1492.

Lam C-W, James JT, McCluskey R, Arepalli S, Hunter RL. 2006. A Review of Carbon Nanotube Toxicity and Assessment of Potential Occupational and Environmental Health Risks. *Critical Reviews in Toxicology*, 36:189-217.

Lee CM, Jeong HJ, Kim DW, Sohn MH, Lim ST. 2012a. The effect of fluorination of zinc oxide

- nanoparticles on evaluation of their biodistribution after oral administration. *Nanotechnology* 23:205102.
- Lee CM, Jeong HJ, Yun KN, Kim DW, Sohn MH, Lee JK, Jeong J, Lim ST. 2012b. Optical imaging to trace near infrared fluorescent zinc oxide nanoparticles following oral exposure. *Int J Nanomed* 7:3203-3209.
- Li CH, Shen CC, Cheng YW, Huang SH, Wu CC, Kao CC, Liao JW, Kang JJ. 2012. Organ biodistribution, clearance, and genotoxicity of orally administered zinc oxide nanoparticles in mice. *Nanotoxicology* 6:746-756.
- Li Q, Mahendra S, Lyon DY, Brunet L, Liga MV, Li D, Alvarez PJJ. 2008. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: Potential applications and implications. *Water Research* 42:4591-4602.
- Lim JH, Kim SH, Lee IC, Moon C, Kim SH, Shin DH, Kim HC, Kim JC. 2011a. Evaluation of Maternal Toxicity in Rats Exposed to Multi-Wall Carbon Nanotubes during Pregnancy. *Environ Health Toxicol* 26:e2011006.
- Lim JH, Kim SH, Shin IS, Park NH, Moon C, Kang SS, Kim SH, Park SC, Kim JC. 2011b. Maternal exposure to multi-wall carbon nanotubes does not induce embryo-fetal developmental toxicity in rats. *Birth Defects Res, Part B* 92:69-76.
- Loeschner K, Hadrup N, Qvortrup K, Larsen A, Gao X, Vogel U, Mortensen A, Lam HR, Larsen EH. 2011. Distribution of silver in rats following 28 days of repeated oral exposure to silver nanoparticles or silver acetate. *Part Fibre Toxicol* 8:18.
- Matsumoto M, Serizawa H, Sunaga M, Kato H, Takahashi M, Hirata-Koizumi M, Ono A, Kamata E, Hirose A. 2012. No toxicological effects on acute and repeated oral gavage doses of single-wall or multi-wall carbon nanotube in rats. *J Toxicol Sci* 37:463-474.
- McCullough JS, Hodges GM, Dickson GR, Yarwood A, Carr KE. 1995. A morphological and microanalytical investigation into the uptake of particulate iron across the gastrointestinal tract of rats. *J Submicrosc Cytol Pathol* 27:119-124.
- Mikkelsen SH, Hansen E, Christensen TB, Baun A, Hansen SF, Binderup M-L. 2011. Survey on basic knowledge about exposure and potential environmental and health risks for selected nanomaterials. MST. Environmental Project No. 1370 2011.
- Onishchenko GE, Erokhina MV, Abramchuk SS, Shaitan KV, Raspopov RV, Smirnova VV, Vasilevskaya LS, Gmoshinski IV, Kirpichnikov MP, Tutelyan VA. 2012. Effects of titanium dioxide nanoparticles on small intestinal mucosa in rats. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 154(2): 265-270.
- Park EJ, Park YK, Park K. 2009. Acute toxicity and tissue distribution of cerium oxide nanoparticles by a single oral administration in rats. *Toxicol Res (Seoul, Repub Korea)* 25:79-84.
- Powell JJ, Faria N, Thomas-McKay E, Pele LC. 2010. Origin and fate of dietary nanoparticles and microparticles in the gastrointestinal tract. *J Autoimmun* 34(3):J226-33. Epub 2010 Jan 21.
- Roger KR, Bradham K, Tolaymat T, Thomas DJ, Hartmann T, Ma L, Williams A. 2012. Alterations in physical state of silver nanoparticles exposed to synthetic human stomach fluid. *Sci Total Environ* 420:334-339.
- Sachar S, Saxena RK. 2011. Cytotoxic effect of poly-dispersed Single walled Carbon Nanotubes on erythrocytes in vitro and in vivo. *PLoS One* 6:e22032.
- Shahare B, Yashpal M, Singh G. 2013. Toxic effects of repeated oral exposure of silver nanoparticles on small intestine mucosa of mice. *Toxicol Mech Methods* 23(3):161-167.
- Sardari RRR, Zarchi SR, Talebi A, Nasri S, Imani S, Khoradmehr A, Sheshde SAR. 2012. Toxicological effects of silver nanoparticles in rats. *Afr J Microbiol Res* 6:5587-5593.
- Singh SP, Rahman MF, Murty USN, Mahboob M, Grover P. 2013. Comparative study of genotoxicity and tissue distribution of nano and micron sized iron oxide in rats after acute oral treatment. *Toxicol Appl Pharmacol* 266:56-66.
- So SJ, Jang IS, Han CS. 2008. Effect of Micro/Nano Silica Particle Feeding for Mice. *J Nanosci nanotech* 8:5367-5371.
- Szendi K, Varga C. 2008. Lack of genotoxicity of carbon nanotubes in a pilot study. *Anticancer Res* 28:349-352.
- Takahashi M, Kato H, Doi Y, Hagiwara A, Hirata-Koizumi M, Ono A, Kubota R, Nishimura T, Hirose A. 2012. Sub-acute oral toxicity study with fullerene C60 in rats. *J Toxicol Sci*, 37:353-361.
- Vogelsson CT. 2001. Advances in drug delivery systems. *Drug Delivery Discovery* 4:49-50, 52.
- Walczak AP, Fokkink R, Peters R, Tromp P, Herrera RZ, Rietjens IMCM, Hendriksen PJM, Bouwmeester H. 2012. Behaviour of silver nanoparticles and silver ions in an in vitro human gastrointestinal digestion model. *Nanotoxicology Early Online*, 1-13.
- Wang B, Feng W, Wang M, Wang T, Gu Y, Zhu M, Ouyang H, Shi J, Zhang F, Zhao Y, Chai Z, Wang H, Wang J. 2008. Acute toxicological impact of nano- and submicro-scaled zinc oxide powder on healthy adult mice. *J Nanopart Res*

10:263-276.

Wang J, Zhou G, Chen C, Yu H, Wang T, Ma Y, Jia G, Gao Y, Li B, Sun J, Li Y, Jiao F, Zhao Y, Chai Z. 2007. Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. *Toxicol Lett* 168:176-185.

Wang Y, Fu L. 2012. Forms of Selenium Affect its Transport, Uptake and Glutathione Peroxidase Activity in the Caco-2 Cell Model. *Biol Trace Elem Res* 149:110-116.

Wang Y, Chen Z, Ba T, Pu J, Chen T, Song Y, Gu Y, Qian Q, Xu Y, Xiang K, Wang H, Jia G. 2012. Susceptibility of Young and Adult Rats to the Oral Toxicity of Titanium Dioxide Nanoparticles. *SmallAhead* 2013 May 27;9(9-10):1742-52.

Yamago S, Tokuyama H, nakamura E, Kikuchi K, Kananishi S, Sueki K, Nakahara H, Enomoto S, Ambe F. 1995. In vivo biological behavior of a water-miscible fullerene: ¹⁴C labeling, absorption, distribution, excretion and acute toxicity. *Chem Biol* 2:385-389.

Yamashita K, Yoshioka Y, Pan H, Taira M, Ogura T, Nagano T, Aoyama M, Nagano K, Abe Y, Kamada H, Tsunoda SI, Aoshima H, Nabeshi H, Yoshikawa T, Tsutsumi Y. 2013. Biochemical and hematologic effects of polyvinylpyrrolidone-wrapped fullerene C60 after oral administration. *Pharmazie* 68:54-57.

Zhang XD, Wu HY, Wu D, Wang YY, Chang JH, Zhai ZB, Meng AM, Liu PX, Zhang LA, Fan FY. 2010. Toxicologic effects of gold nanoparticles in vivo by different administration routes. *Int J Nanomed* 5:771-781.

E. 結論

1) ラット 13 週間反復投与試験

ベンゲルフレークおよびベンゲルクリアについては、食品添加物の毒性試験として最高用量である 5% を投与したラットを用いた 13 週間投与試験において毒性所見を示さず、また、組織へのアルミニウムの蓄積も確認されなかったことから、血液脳関門や胎盤の通過性を検討する必要はないと判断された。本試験条件下における無毒性量 (NOAEL) は雌雄ともに 5.0% (ベンゲルフレークの雄: 4.01 g/kg 体重/日、雌: 3.97 g/kg 体重/日、ベンゲルクリアの雄: 3.91 g/kg 体重/日、雌: 3.96 g/kg 体重/日) と判断した。

また、スメクトンおよびクニピアについては、

食品添加物の毒性試験として最高用量である 5% を投与したラットを用いた 13 週間投与試験において毒性所見を示さず、また、組織へのアルミニウムの蓄積も確認されなかった。本試験条件下における無毒性量 (NOAEL) は雌雄ともに 5.0% (スメクトンの雄: 2.91 g/kg 体重/日、雌: 3.15 g/kg 体重/日、クニピアの雄: 2.89 g/kg 体重/日、雌: 3.09 g/kg 体重/日) と判断した。

2) 混餌飼料中のナノクレイ粒子の電子顕微鏡による観察

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挫滅により細粒化する可能性が見られた。

クニピアおよびスメクトンの最小粒子の粒径は 10 μm 程度であるが、それぞれが、数 nm~10 nm の層状~壁状の構造物であることが確認された。また、この二つのナノクレイに含まれる化学組成には相違がみられた。

3) 食品・食品容器分野におけるナノクレイの用途調査による暴露評価のための基礎的情報収集

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。

平成 24 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、ナノクレイの経口暴露の実態をさらに精度高く知るための追加情報を収集・解析した。食品包装として使用されているガスバリア性軟包装フィルムのうち、ナノクレイが使用されている製品の割合は1.3%程度であり、飲料用PETボトル(172.1億本)のうち、ナノクレイが使用されているのも0.06%程度であった。食品添加物の清澄剤としてナノサイズ成分も含まれると考えられるベントナイトの使用においては、製造過程で除去されることや食品衛生法における残留基準(0.50%未満)を考慮すると曝露の可能性は低いと考えられた。しかし、健康食品であっても食品衛生法における残留基準は適用されはすなわ、曝露の可能性は高くなることは考えられないが、海外製の粘土(無機鉱物)を用いた栄養補助食品を個人輸入等で入手可能であることに留意が必要かもしれない。農業においては、フロアブル製剤の増粘剤として使用されているが、農業全体の約0.05%程度の使用状況と見積もられた。ナノクレイの食品分野における使用実態調査結果から、現段階では特殊な条件を除いてはそれほど曝露の機会は多くないものと想定された。

平成25年度はナノ銀と、白の着色用途として使用されている酸化チタンのナノマテリアルとしての使用実態の調査を行った。また、デンマーク環境省より公表されたナノマテリアルの経口曝露による体内吸収に関する最新知見の概要を取り纏めた。

食品に関連するナノ銀としては、用量の総量は把握できなかったが、特に容器・包装用途における抗菌目的の使用が確認できた。二酸化チタンは、容器・包装に遮光性や抗菌性を付与する目的の使用が確認できたが、食品添加物用としての二酸化チタンナノ粒子製品が明示的に使用される例は見つけれなかった。一方、公表研究論文には一般の食品添加物の中に二酸化チタンナノ粒子成分も含まれていることが示されていた。銀および二酸化チタンに関して一般工業用と比較した場合、食品関連の使用総量は非常に少ないと思われたが、使用されている製品の状況や、デンマーク環境省の報告概要による大量経口曝露による吸収性に関する研究の必要性より、

今後は使用されている可能性のある製品群の分析調査による正確な実態を把握や、腸管吸収性を定量的に評価するためのするための試験研究が必要であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 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).
- 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).
- Matsumoto, M., Serizawa, H., Sunaga, M., Kato, H., Takahashi, M., Hirata-Koizumi, M., Ono, A., Kamata, E., Hirose, A., No toxicological effects on acute and repeated oral gavage doses of single-wall or multi-wall carbon nanotube in rats. *J Toxicol Sci.* 37, 463-474. (2012).

- Takahashi, M., Kato, H., Doi, Y., Hagiwara, A., Hirata-Koizumi, M., Ono, A., Kubota, R., Nishimura, T., Hirose, A., Sub-acute oral toxicity study with fullerene C60 in rats. *J Toxicol Sci.* 37, 353-361. (2012).
- Takagi A, Hirose A, Futakuchi M, Tsuda H, Kanno J. Dose-dependent mesothelioma induction by intraperitoneal administration of multi-wall carbon nanotubes in p53 heterozygous mice. *Cancer Sci.* 103 (8):1440-4. (2012).
- Xu J, Futakuchi M, Shimizu H, Alexander DB, Yanagihara K, Fukamachi K, Suzui M, Kanno J, Hirose A, Ogata A, Sakamoto Y, Nakae D, Omori T, Tsuda H. Multi-walled carbon nanotubes translocate into the pleural cavity and induce visceral mesothelial proliferation in rats. *Cancer Sci.* 103 (12):2045-50. (2012).
- Xu J, Futakuchi M, Alexander DB, Fukamachi K, Numano T, Suzui M, Shimizu H, Omori T, Kanno J, Hirose A, Tsuda H. Nanosized zinc oxide particles do not promote DHPN-induced lung carcinogenesis but cause reversible epithelial hyperplasia of terminal bronchioles. *Arch Toxicol.* 88:65-75. (2014)
- Taquahashi, Y, Ogawa, Y, Takagi, A, Tsuji, M, Morita, K, Kanno, J. An improved dispersion method of multi-wall carbon nanotube for inhalation toxicity studies of experimental animals. *J Toxicol Sci.* 38(4):619-28. (2013)
- 広瀬明彦, ナノマテリアルの健康影響評価指針の国際動向, *薬学雑誌*, 133(2), 175-180. (2013)
2. 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)
- 坂本義光, 小縣昭夫, 前野智和, 西村哲治, 広瀬明彦, 小杉有希, 鈴木俊也, 中江大. 5種之多層カーボンナノチューブ (MWCNT) のラット腹腔内投与による中皮腫の誘発. 第39回日本毒性学会学術年会, (2012年, 仙台)
- 藤谷知子, 大山謙一, 中江大, 小縣昭夫, 広瀬明彦, 西村哲治. マウスにおける多層カーボンナノチューブの催奇形性について, 日本毒性学会第39回日本毒性学会学術年会, (2012年, 仙台)
- Sakamoto Y, Ogata A, Nishimura T, Hirose A, Nakae D. Induction of methothelioma by an intraperitoneal administration of 5 different manufactured multi-wall carbon nanotubes. 71th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, (2012, Sendai)
- 山本行男, 坂本義光, 大貫文, 猪又明子, 小縣昭

- 夫、中江大. 多層カーボンナノチューブ投与により誘発したラット中皮腫におけるプロテオーム解析 (第二報). 第 85 回日本生化学会大, (2012 年, 福岡)
- Fujitani T, Ohyama K, Nakae D, Ogata A, Hirose A, Nishimura T. Teratogenicity of multi-wall carbon nanotube in ICR mice. The 6th International Congress of Asian Society of Toxicology, (2012, Sendai)
- Kobayashi N, Kawabe M, Furukawa F, Kubota R, Sugimoto N, Hirose A. Evaluation of reproductive and developmental toxicity of multi-wall carbon nanotubes in pregnant mice after tail vein administration. 6th International Congress of Asian Society of Toxicology (ASIATOX-VI), (2012, Sendai)
- 小林憲弘, 河部真弓, 古川文夫, 久保田領志, 杉本直樹, 広瀬明彦. 妊娠ラットを用いた尾静脈内投与による多層カーボンナノチューブの生殖・発生毒性の評価と体内動態. 第 39 回日本毒性学会学術年会, (2012 年, 仙台)
- Wataru Watanabe, Hiroki Yoshida, Akihiko Hirose, Katsuhiko Konno, Masahiko Kurokawa. Effects of nanoparticles of titanium dioxide on the immune response to virus infection. EUROTOX2012, (2012, Stockholm)
- Kobayashi N, Kawabe M, Nakashima H, Numano T, Kubota R, Sugimoto N, Hirose A. Evaluation of reproductive and developmental toxicity of multi-wall carbon nanotubes in pregnant mice after intratracheal instillation. 52nd Annual Meeting of the Society of Toxicology (SOT2013), (2013, San Antonio)
- 坂本義光, 小縣昭夫, 西村哲治, 広瀬明彦, 猪又明子, 中江大. ラットにおける多層カーボンナノチューブによる中皮腫誘発性に繊維長が及ぼす影響. 第 29 回日本毒性病理学会, (2013 年, つくば)
- Akihiko Hirose, Norihiro Kobayashi, Tomoko Fujitani, Yoshimitsu Sakamoto, Yasuo Yoshioka, Yasuo Tsutsumi, Hiroyuki Tsuda, Jun Kanno : Nanotoxicity and nano safety science in various exposure scenarios. (Symposium invited) EUROTOX2013 (2013.9, Switzerland, Interlaken)
- Akihiko Hirose, Norihiro Kobayashi, Mayumi Kawabe, Hironao Nakashima, Takamasa Numano, Reiji Kubota, Yoshiaki Ikarashi: Developmental toxicity by intratracheal instillation of multi-wall carbon nanotubes in pregnant mice. 6th International Symposium Nanotechnology, Occupational and Environmental Health (2013.10, Nagoya)
- 坂本義光, 小縣昭夫, 猪又明子, 西村哲治, 広瀬明彦, 中江大 “繊維長の異なる多層カーボンナノチューブによるラット中皮腫誘発性の検討” 第 40 回日本毒性学会, (2013.6, 幕張)
- 藤谷知子, 安藤弘, 久保喜一, 猪又明子, 小縣昭夫, 広瀬明彦, 西村哲治, 中江大: マウスにおけるナノマテリアルの催奇形性に関する研究. 第 40 回日本毒性学会学術年会, (2013. 6. 17-19, 幕張)
- 小林憲弘, 沼野琢旬, 中島弘尚, 河部真弓, 久保田領志, 広瀬明彦: 妊娠マウスを用いた気管内投与による多層カーボンナノチューブの生殖・発生毒性の評価, 第 40 回日本毒性学会学術年会, (2013. 6. 17-19, 幕張)
- 山本行男, 坂本義光, 大貫文, 猪又明子, 小縣昭夫, 広瀬明彦, 中江大: 多層カーボンナノチューブ (MWCNT) 投与による中皮腫誘発ラットにおけるプロテオーム解析 (第三報): 形状の異なる MWCNT 投与ラットにおける血清タンパク質の発現変動. 第 86 回日本生化学会大会, (2013. 9. 11-13, 横浜)
- Sakamoto Y, Ogata A, Nishimura T, Hirose A, Nakae D. Induction of mesothelioma by an intraperitoneal administration of 7 different manufactured multi-wall carbon nanotubes. 72th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, (2013.10,

Yokohama)

Nishimaki-Mogami, T., Cui, H., Wu, W., Okuhira, K., Naito, M., Nishimura, T., Sakamoto, Y., Ogata, A., Maeno, T., Inomata, A., Nakae, D., Miyazawa, K., Hirose, A. High-temperature calcined fullerene nanowhiskers and multi-wall carbon nanotubes have abilities to induce IL-1beta secretion through NLRP3-dependent mechanism, depending on their lengths. EUROTOX 2013 (2013. 9, Interlaken, Switzerland)

鈴木 勇, 大波冨子, 曹 永晩, 豊田武士, 赤木純一, 水田保子, 西川秋佳, 小川久美子. モンモリロナイトを主成分とするナノクレイのラットに対する 13 週間混餌投与の影響. 第 29 回日本毒性病理学会総会および学術集会, (2013, つくば)

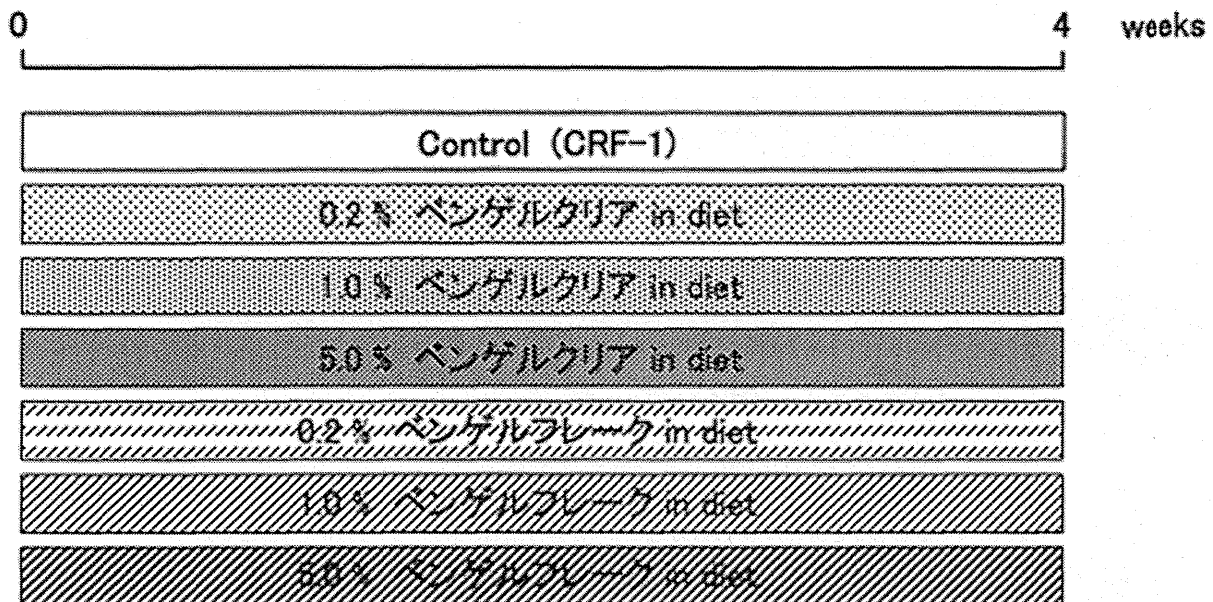
Ogawa, K., Onami, S., Cho, Y.-M., Toyoda, T., Akagi, J.-I., Suzuki, I., Mizuta, Y., Nishikawa,

A. No significant adverse effect of nanoclay primarily consisting of Montmorillonite in a rat 13-week dietary administration study (モンモリロナイトを主成分とするナノクレイはラット 13 週間混餌投与試験において毒性影響を示さない). The 13th International Congress of Toxicology, (2013, Seoul)

坂本義光, 小縣昭夫, 湯澤勝弘, 久保喜一, 安藤弘, 長澤明道, 高橋博, 矢野範男, 西村哲治, 広瀬明彦, 井上義之, 橋爪直樹, 猪又明子, 中江 大 “ラットにおいて多層カーボンナノチューブの経気管噴霧反復投与が及ぼす影響” 第 30 回 日本毒性病理学会, (2014. 1. 徳島)

G. 知的財産権の出願・登録状況

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

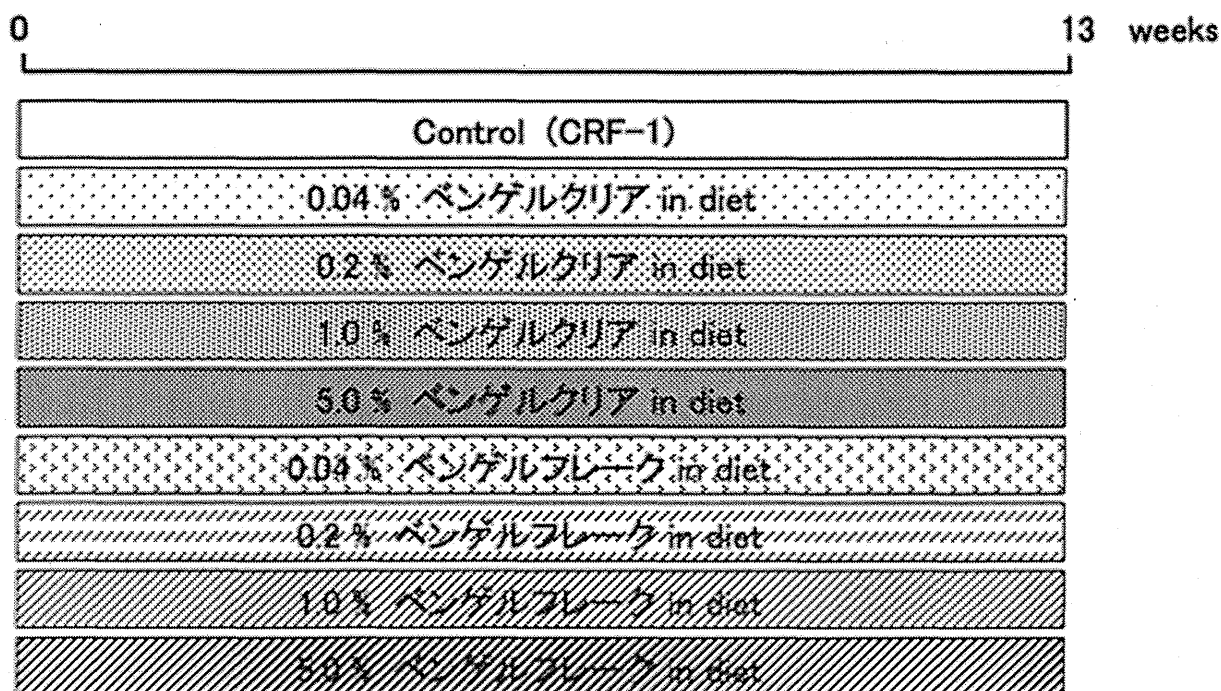


animal species : rat
 strain : F344
 age of start : 6 week old
 sex : male and female
 number of animals : 70 (n=5)

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

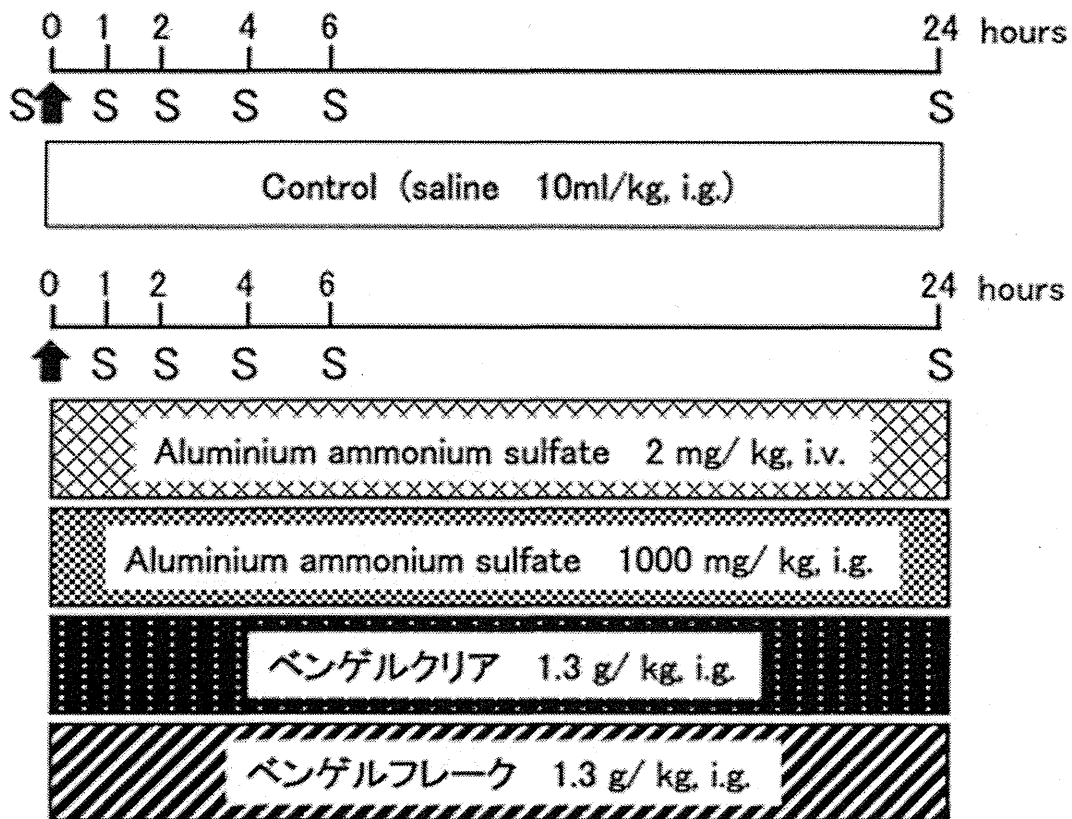


animal species : rat
 strain : F344
 age of start : 6 week old
 sex : male and female
 number of animals : 180 (n=10)

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 montmorrillonite in F344 rat

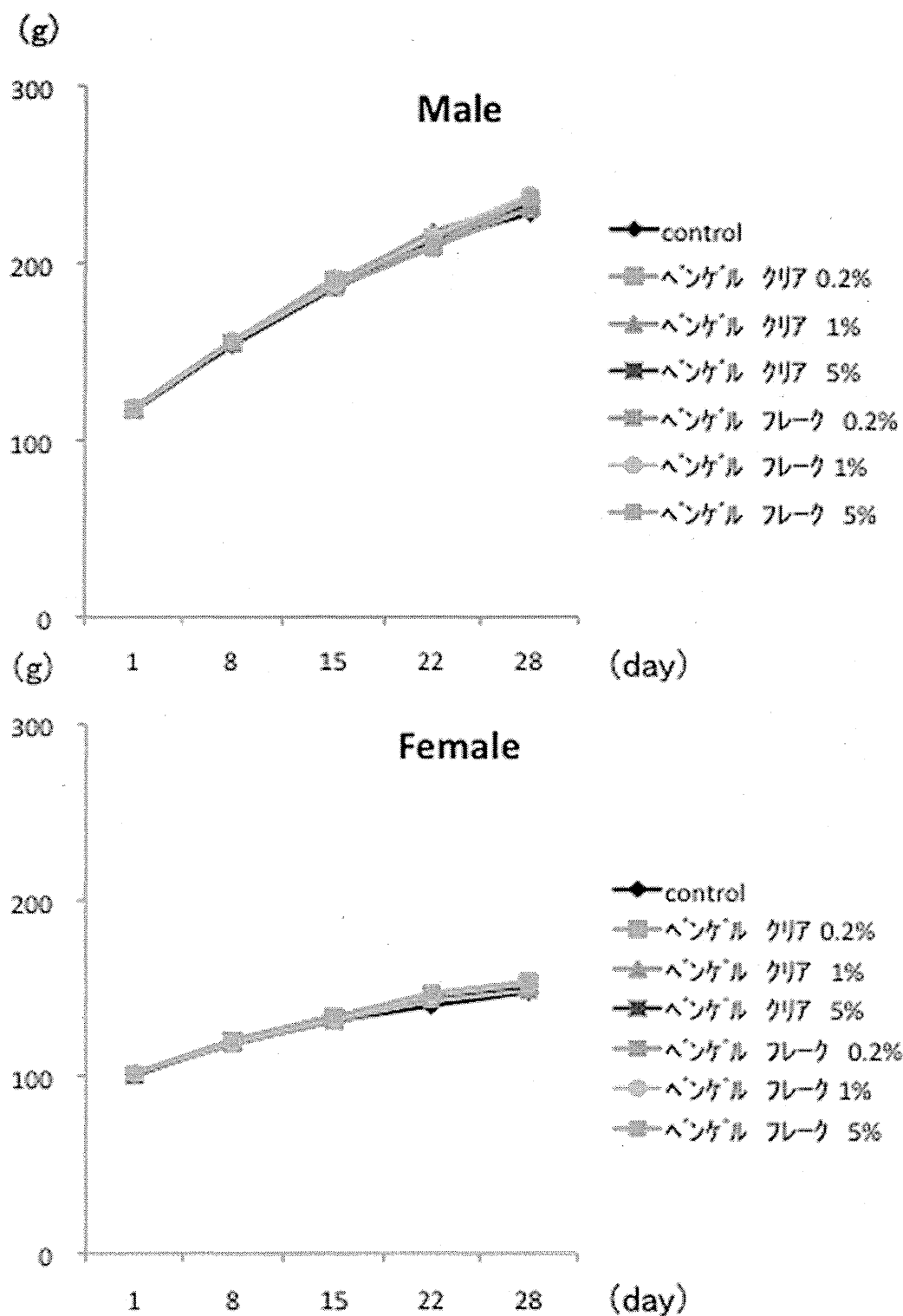


Fig. 4 Body weight curves of F344 rats fed diet containing montmorillonite for 4 weeks