

研究課題名:食品用途となるナノマテリアルの暴露による毒性評価に関する研究

分担研究課題名:ナノマテリアルの暴露評価(食品等を含む)に関する国際動向調査

研究分担者:広瀬 明彦 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部 部長

研究協力者:五十嵐 智女 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部 第一室研究助手

研究要旨

本研究では、ナノマテリアルの食品関連分野を中心とした暴露状況やリスク評価に関する国際動向を調査すること目的としている。29年度は、欧州食品安全機関(EFSA)が主催している食品及び飼料分野におけるナノテクノロジーのリスク評価に関する科学ネットワークおよび、食品接触材料の科学ネットワークに関する調査を行った。EFSAでは、2011年のガイダンスの改訂版として「食品および飼料連鎖におけるナノサイエンスおよびナノテクノロジーのリスクアセスメントに関するガイダンス」の作成を行っており、ナノマテリアルの科学ネットワークではガイダンスのパブコメに向けた議論が行われた。ガイダンスには、2011年のガイダンスより詳細な分析法や *in vitro* 分解性などを用いた評価基準、ナノマテリアルに適用可能な生物学的試験(*in vivo/in vitro*)法に関して網羅的な情報を収載したものになっていることが示された。また、食品接触材料の科学ネットワークでは、容器等の印刷用インクに含まれるナノサイズの顔料に関しての分析法や今後の評価指針等の方向性について関心が高まっていることが示された。

A. 研究目的

近年幅広く利用されているナノマテリアルについては、更なる応用が期待されている一方で、その特性による予想外の健康影響の可能性が指摘されている。国際的には、欧州連合ではナノ材料の届出・登録の義務化の動きがあり、米国でも EPA を主体に規制や監視が検討されている。本邦でも、カーボンナノチューブ等では形状やサイズによって毒性が異なる可能性が示唆されている。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。さらに、ナノテクノロジーは食品・食品容器分野における積極的な利用も期待されており、これまでの研究では、食品関連分野における使用実態を調査した結果、ナノ銀や、二酸化チタンについては容器・包装への使用が確認できたほか、欧州では EFSA が 2010 年から

主催している食品および飼料分野におけるナノテクノロジーのリスク評価に関する科学ネットワーク (Scientific network of risk assessment of nanotechnology in Food and Feed)において、積極的な議論を行っている。本研究ではこうした欧州における動向を中心にし、国際的なナノマテリアルの評価状況に関する最新動向の調査を行うことを目的とした。

B. 研究方法

欧州食品安全機関(EFSA)が主催している食品及び飼料分野におけるナノテクノロジーのリスク評価に関する科学ネットワーク(Scientific network of risk assessment of nanotechnology in Food and Feed)(第7回会議、2017年11月開催)に関して調

査を行った。また、食品接触材料に関する科学ネットワーク(Scientific Network of the food ingredients and food packaging (FIP) Unit on food contact materials (FCM), the 'EFSA FCM Network') (第5回会議2017年7月開催)において、食品接触材料へのナノ粒子の敵に関する議題を調査した。

C. 研究結果

1, 第7回食品および飼料におけるナノテクノロジー・リスクアセスメント(FSA 科学ネットワーク)

今回の会議では、2018年の1月に予定されている「食品および飼料連鎖におけるナノサイエンスおよびナノテクノロジーのリスクアセスメントに関するガイダンス:第1部、ヒトおよび動物の健康」のパブコメのドラフトについて議論が行われた。

EFSAは、食品および飼料連鎖におけるナノサイエンスおよびナノテクノロジーの応用のリスクアセスメントの人間および動物の健康(第1部)に関するこのガイダンスを作成した。これは、EFSAに付託された新規食品、食品接触材料、食品/飼料添加物および殺虫剤を含む分野をカバーしている。このガイダンスは、以前(2011年)のガイダンスの発表以降に得られた新しい知見を考慮に入れている。将来的には、新規食品、食品/飼料添加物、殺生物剤、殺虫剤、殺虫剤、殺虫剤および食品接触材料の各分野で適用されるナノコンポジットやナノカプセルにおける知見も考慮される可能性がある。ガイダンスは、ナノ物質の物理化学的特性、暴露評価、およびハザード特性に関するより多くの洞察と関連性のある新しい科学研究を取り入れている。具体的には、材料がナノマテリアルであるかどうかを判定すべき重要なパラメータ、ナノマテリアルのキャラクタリゼーションに使用できる手法と技術、複雑なマトリックスの中での測定方法について、ナノマテリアルの物理化学的特徴付けについて詳細に説明している。また、暴露評価とハザードの同定とキャラクタリゼーションに関連しても詳細に記載している。特に、*in vivo* *in vitro*の毒物学的研究に関するナノ特異的考察が議論され、毒物学的試験

のための段階的フレームが概説されている。初期的段階の結果に応じて、生殖毒性、発生毒性、免疫毒性、アレルギー誘発性、神経毒性、腸内微生物への影響、および内分泌活性を調べる研究が必要となるかもしれないことや、データギャップを補完するためのリードアクロス法の適用の可能性として、ナノ物質の*in vitro*試験に関連する一般的な問題に加えて、*in vitro*消化試験、トキシコキネティクス、遺伝毒性についても触れている。統合化試験戦略(ITS)やMOAの潜在的な使用も議論している。ガイダンスでは、リスクの特徴付けと不確実性分析へのアプローチを提案し、この分野におけるさらなる研究のための勧告も提供している。

食品および飼料連鎖におけるナノサイエンスおよびナノテクノロジーのリスクアセスメントに関するガイダンス:第1部、ヒトおよび動物の健康の概要

物理化学的特徴付けについては、ECが推奨する定義に従って材料がナノマテリアルであるかどうかを確認し、特定するために、NanoDefineプロジェクトによって開発された決定フロースキームがこのガイダンスに例示されている。ECの定義は現在審議中ではあるが、ナノスケールと見なされる(1~100nmとなる)粒子の数が50%以上となるものをナノマテリアルとしており、この定義の使用を推奨している。

原則としては、暴露評価とリスク評価とともに危険有害性の同定/特徴付けに基づく化学物質の現在のリスクアセスメントのパラダイムは、ナノマテリアルにも適用可能である。しかし、粒状材料のサイズをナノスケールに縮小することは、対応する非ナノ材料と比較して毒物学的影響に変化をもたらす特性の違いや生体動態的挙動をある程度変化させる可能性があるため、本ガイダンスの規定に従ってナノマテリアルの安全性評価を実施しなければならない。

ナノマテリアルのリスク評価の前提条件として、粒子表面(コーティングを含む)上の物質だけでなく、コアに相当する部分のナノマテリアルの構成要素と不純物の明確な特徴付けも必要とする。物理化学的パラメータに関する情報は、ナノ材料の潜在的な毒性の重要な指針を提供することもでき、適切な試験戦略を

決定するのに役立つ。また、ナノ材料のキャラクタリゼーションは、異なる段階で実施されることが推奨されている。ガイドランスには、パラメータの測定に使用できる現在利用可能な方法とツール、および考慮すべき品質管理の側面の概要も記載されているが、粒子サイズ分布は、複数の独立した技術(そのうちの1つは電子顕微鏡法)によって決定されるべきであることを推奨している。

溶解によって引き起こされる高い分解性により、ナノ材料が対応する非ナノ材料形態に変化することにも注目すべきである。このガイドランスに記載されているナノ特異的な評価は、食品製造および加工プロセスの生理学的条件あるいは食品マトリックスおよび胃腸系でイオンまたは分子に急速に分解しない物質が局所または全身レベルで生物学的実体と相互作用する機会を評価する。

セクション全体をとおしてガイドランスは、ナノ特異的データのいくつかの測定要件が免除される可能性を示している。例えば、ナノ材料の使用時にはナノマテリアルとして局所的または全身的な暴露をもたらさないケースや、食物接触材料からナノマテリアルの食品への移動がないことが示されるケースがある。また、ナノマテリアルは同じ物質で、材料サイズ、結晶形、形状、表面特性などが異なるいくつかの形で開発できるため、ケースバイケースによる個別評価を避けるためのグループ化/リードアクロス手法による評価の可能性について説明している。

食品/飼料を介したナノ物質の暴露評価の原則は、非ナノ物質の場合と同様に同様の暴露シナリオの可能性を考慮する必要がある。間接的な暴露(例えば、食物接触材料からの移動や、餌を摂取した動物を経由した食品などへのキャリアオーバーなど)の可能性がある場合は、ナノマテリアルまたはその分解生成物が食品/飼料マトリックス中に粒子として存在したままであるかどうかを決定すべきである。暴露データが得られない場合、または複合マトリックス中のナノ粒子の特性および量を決定することができない場合は、最悪のシナリオとして、食品/飼料製品に添加されたすべてのナノ物質が存在し、摂取され、ナノマテ

リアルとして吸収されると仮定する。

第6章では、毒物学的有害性の同定と毒性評価のためのナノマテリアルの試験のための段階的アプローチを概説し、適用可能な *in vitro* および *in vivo* 試験が説明されている。提案されたアプローチでは、最初のステップで、ナノマテリアルの胃腸管での分解性を評価するための、胃腸管を代表する条件下での *in vitro* 試験を行う。ナノマテリアルが急速に分解しない場合には、その定量化および特性化されるべきである。胃腸管内の条件下で高い分解速度が示される場合は、関連する非ナノ材料に関する EFSA ガイドランスに従って評価されるべきである。

急速に分解しないナノマテリアルのみが、ステップ1(一連の *in vitro* 試験や情報収集)の下で試験することが考慮される。特に、ナノマテリアルまたはその成分の発癌性、突然変異誘発性、生殖毒性(CMR)に関する情報は、ステップ1で検討される。模擬リソソーム条件下での分解試験も実施され、ナノ物質の特定の特性を考慮した遺伝毒性を含んだ *in vitro* 毒性試験バッテリーを実施する。

ステップ1の情報でナノ物質が生体内で残留性が無く非遺伝毒性である場合には、ステップ2以降の評価を避けることができるかもしれないが、現状では従来の(ナノ以外の)物質に対する安全性評価が依然として必要である。ステップ2には、経口吸収および組織分布の評価を行うためのサテライト群を行う TG 407 試験の拡張パラメータを含むように修正された90日間反復投与試験(OECD TG408)が行われる。これらの試験から得られた陽性の結果は、ステップ3のより詳細な調査を必要とするかもしれない。ステップ3では、長期暴露中のナノマテリアルの蓄積性を調査し、実験動物とヒトとの胎内動態の違いを調べる。これらの研究により、不確実性を減少させることによってリスクアセスメントを改善することができる。ステップ3ではまた、神経毒性、免疫毒性または内分泌系への影響の専門的かつ詳細な試験を含む。食物からの潜在的な長期暴露を考慮すると、腸内微生物に対するナノ物質の潜在的影響は、特にナノ物質が抗菌効果を有する場合に考慮されるべきである。

一般に、ナノマテリアルのリスクキャラクタリゼーションは、従来の化学物質と同じ要素、すなわち、物理化学的性質、暴露および毒物学的影響に関するデータおよび情報を考慮して行われる。検証された方法を用いて適切に実施された研究から得られたデータでナノ特異的な問題を考慮すると、従来の材料に使用されているものよりも大きな不確定係数を使用する必要はない。しかし、データが不十分であるか、不的確なテストであった場合、ナノマテリアルの安全性評価のために追加の不確定係数を適用することが検討される。

ガイダンスはまた、代替試験法アプローチ、MOA および AOP に関連して現在開発中の分野についても指摘している。

2, 第 5 回食品成分および食品包装 (FIP) ユニットの科学的ネットワーク食品接触材料 (FCM) のユニット、「EFSA FCM ネットワーク」

本会議の議題として、食品接触材料の印刷インキに使用される物質の安全性評価が取りあげられ、インキ中のナノマテリアル測定や評価について関心が持たれた。

印刷インキは通常、溶媒、高分子バインダー、添加剤、および着色成分の 4 つの主要成分からなり、ほとんどが着色成分として顔料を含む。印刷されたインク膜の高い光沢および高い透明性を達成するためには、顔料粉末中の凝集物および凝集物を分割して細かく分散させると共に、分散させた顔料粒子を安定させなければならない。乾燥した印刷インキフィルムは、通常 1~1.5 μm の厚さであり、したがって、埋め込まれた粒子の全ては、通常、1 μm よりかなり小さい。実際には、これらの材料が上記の目的のために特別に製造されていないとしても、すべての印刷インキはナノオブジェクトを含む。液体印刷インキサンプルの分析には、小角 X 線散乱 (SAXS) および動的光散乱 (DLS) は適しておらず、レーザー回折分析及び光子相関分光法 (PCS) が使用されている。レーザー回折分析による分散有機顔料上の粒子分布の測定は、印刷インキ中の顔料が <100nm の範囲に相当なパー

センテージを含むことを証明している。また、走査電子顕微鏡 (SEM) でも <100nm の範囲の粒子を確認できる。レーザー回折分析の結果は、平均粒子サイズとして Cu-フタロシアニンについて 80~90nm であり、二酸化チタンについて 200~300nm であった。小板状のアルミニウム顔料は、30~40nm の平均厚さを有するため、ナノ材料としても明確に考慮する必要がある。

EuPIA (European Printing Ink Association) は、食品接触材料用の印刷インキに使用される物質の安全性評価がどのように行われるかを紹介した。照会の中で、その方針、主要なコンセプトの文書作成およびプロセスが示された。最初の評価ステップでは原材料の選択のための一般的な基準を示した。続いて、以下の 3 つの原則を含むリスク評価プロセスが行われる。

- 完全に評価された物質 (例えば Union リスト)
 - 公開毒性データに基づく自主的 TDI または SML
 - TTC 概念に基づく自主的 TDI または SML
- 暴露評価においては EU キューブモデルがデフォルトとして使用され、必要に応じて、EFSA 食品消費データや FACET などの他のモデルも使用できる。(これらの暴露評価を行うためのガイダンスが 8 月に公表されている。) 非意図的添加物や公的にリスト化されていない物質については、REACH 登録情報から有害性情報等を入手しているが、EFSA から、これらの情報は当局が評価していない情報が含まれるので注意すべきであるという提言を受けた。一方、EuPIA ではまだ評価に生物学的試験を導入していないが、将来的には取り込むべきであることが示された。インクの移行量が 10ppb を超えると予想される場合には、物質の評価申請書をドイツおよびスイス当局に申請することを業界に推奨している。ナノフォーム顔料に関する活動については、EuPIA はドイツのペイントとインク協会「German Paint and Ink Association」が、ナノスケールの顔料粒子の食品パッケージの印刷層から食品への移行挙動の分析「ドイツ連邦栄養農業省 (BMEL) と BfR との間で議論が行われていることを紹介した。

D. 考察

「食品および飼料連鎖におけるナノサイエンスおよびナノテクノロジーのリスクアセスメントに関するガイダンス」が 2011 年のガイダンスの公表以降に得られた新しい知見をもとに、より詳細で具体的な分析法や分解性など評価法、生物学的試験 (*in vivo/in vitro*) 法を用いた体系的な評価指針が示されたものになっているが、まず、依然ナノマテリアルの定義について、EC の定義との整合性とケースバイケースで決定される科学的な判断についてどちらに従うべきなのかについて曖昧になっている。また、EC のナノマテリアルの定義に明確に含まれていない物質を評価する際の指針にいくつかの状況が概説されているが、一般論としては一般食品法とこのガイダンスの原則が適用されことになる。例えば、ナノスケールに関連する特定の特性に起因する潜在的なリスクは、それらの特性および関連する危険性に焦点を当てて評価されなければならないが、100nm 未満のサイズの材料を構成する粒子の割合とは無関係である可能性がある。また、このようなサイズの構成割合に関して閾値を確立する科学的根拠はなく、分析技術における不確実性や検出の限界の問題がある。さらに、ナノスケールの特性を保持する 100nm 超の粒子に関しては、この意味におけるナノマテリアルの最大サイズを確立することはできないと考えられる。これらのことから、単純にサイズの問題で評価指針の切り分けを行うことには慎重にあるべきであろう。また、ガイダンスには、網羅的な評価手法が記されているが、申請者が申請に必要な最小限の情報が、ガイダンスに記載されている広範なリストから明確化しにくいようである。申請者が全ての特性を評価するのは非現実的であり、網羅的なパラメータが全てのナノマテリアルに必要というわけでは無いが、妥当性の説明は申請者に任されている。

評価スキームの中でその後評価のステップを分けることとなる重要なステップとしては胃腸管内での分解性を評価する *in vitro* 分解性試験があるが、ガイダンスでは、その急速に分解されるかどうかを判定するための閾値が提案されている。しかし、一般の化学

物質とは異なり、ナノマテリアルについての標準化された手法は未だ確立されていない状況であり、将来的には修正・改良される可能性があると考えられる。また、ガイダンスにはナノマテリアルの評価において妥当性のある様々な *in vitro* 試験について例示されているが、さらなる試験が必要かどうかについての指針は示されていないとい課題もある。

一方、ガイダンスで今回提案された 90 日の反復投与毒性試験は、サテライト試験の追加によりこれまでより多くの動物を使用することが、実験動物削減の方向性と逆行していることが指摘されている。より長期の試験を行うことを回避するための方策ではあるが、将来的にはより効率的な評価法に置き換えていくことが検討されると考えられる。

食品接触材料 (FCM) ネットワーク会議では、従来その懸念が指摘されてきた、印刷用インク顔料に含まれるナノサイズの顔料についても議論が及んできたことを示している。しかし、食品接触材料の評価では、一般化学物質としての顔料の評価手法の確立自体もこれからの課題であり、未だナノマテリアルとしての評価を議論するには、科学的知見も含めてさらなる知見の収集が必要であると考えられた。

E. 結論

本研究では、ナノマテリアルの食品関連分野を中心とした暴露状況やリスク評価に関する国際動向を調査すること目的としている。29年度は、欧州食品安全機関 (EFSA) が主催している食品及び飼料分野におけるナノテクノロジーのリスク評価に関する科学ネットワークおよび、食品接触材料の科学ネットワークに関する調査を行った。EFSA では、2011 年のガイダンスの改訂版として「食品および飼料連鎖におけるナノサイエンスおよびナノテクノロジーのリスクアセスメントに関するガイダンス」の作成を行っており、ナノマテリアルの科学ネットワークではガイダンスのパブコメに向けた議論が行われた。ガイダンスには、より詳細な分析法や *in vitro* 分解性などを用いた評価基準、ナノマテリアルに適用可能な生物学的試験 (*in vivo/in vitro*) 法に関して網羅的な情報を掲載したも

のになっていることが示された。また、食品接触材料の科学ネットワークでは、容器等の印刷用インクに含まれるナノサイズの顔料に関する分析法や今後の評価の方向性について関心が高まっていることが示された。

F. 研究発表

(論文発表)

Abdelgied M., El-Gazzar A., Alexander D., Alexander W., Numano T., Iigou M., Naiki-Ito A., Takase H., Abdou K. A., Hirose A., Taquahashi Y., Kanno J., Tsuda H., Takahashi S. Potassium octatitanate fibers induce persistent lung and pleural injury and are possibly carcinogenic in male Fischer 344 rats. *Cancer Sci.*, 2018 May 17. doi: 10.1111/cas.13643. in press.

(学会発表)

Akihiko Hirose. International trends and necessity of chronic studies on risk assessment of nanomaterials. 第34回日本毒性病理学会総会、1月25-26日、沖縄

坂本義光, 広瀬明彦, 中江大: 多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の経気管投与ラットに見られた肺胞過形成病変の免疫組織学的性状, 第76回日本癌学会学術総会, 横浜(2017年9月28日~30日)

北條幹, 坂本義光, 山本行男, 村上詩歩, 長谷川悠子, 前野愛, 五十嵐海, 湯澤勝廣, 生嶋清美, 多田幸恵, 清水本武, 長澤明道, 久保喜一, 安藤弘, 海鋒藤文, 田中和良, 矢野範男, 鈴木俊也, 猪又明子, 守安貴子, 広瀬明彦, 中江大: ラットにおける多層カーボンナノチューブおよびクリソタイル誘発中皮腫の病理学的性状の比較, 第34回日本毒性病理学会学術集会, 那覇(2018年1月25日~26日)

坂本義光, 北條幹, 鈴木俊也, 猪又明子, 広瀬明彦, 中江大: 多層カーボンナノチューブの経気管反復投与によりラット肺に誘発された増殖性病変の免疫組織学的解析, 第34回日本毒性病理学会学術集会, 那覇(2018年1月25日~26日)

Mohamed Abdelgied, Ahmed Elgazzar, David Alexander, William Alexander, Takamasa Numano, Satoru Takahashi, Hirotsugu Takase, Akihiro Hirose, Yuhji Taquahashi, Jun Kanno, Hiroyuki Tsuda Potassium octatitanate($K_2O \cdot 8TiO_2$) fiber is a potent inducer of lung and pleural injury - A comparative study to titanium dioxide nano particles. 第44回日本毒性学会学術年会、7月10-12日、横浜

Ahmed M. El-Gazzar¹, Mohamed Abdelgied, David B. Alexander, William T. Alexander, Takamasa Numano, Masaaki Iigo, Aya Naiki, Hirotsugu Takase, Akihiko Hirose, Yuhji Taquahashi, Jun Kannno, Satoru Takahashi, Ashraf Mohamed Nazem, Osama Saeid Elokke and Hiroyuki Tsuda. Comparative Pulmonary toxicity of DWCNT and MWCNT-7 in Rats 第34回日本毒性病理学会総会、1月25-26日、沖縄

Mohamed Abdelgied, Ahmed M. El-Gazzar, David B. Alexander, William T. Alexander, Takamasa Numano, Masaaki Iigo, Aya Naiki, Hirotsugu Takase, Khaled Abbas Abdou, Akihiko Hirose, Yuhji Taquahashi, Jun Kannno, Satoru Takahashi and Hiroyuki Tsuda. Potassium octatitanate fiber ($K_2O \cdot 8TiO_2$) fiber is a potent inducer of lung and pleural injury in male Fischer 344 rats: A comparative study of titanium dioxide nano particles 第34回日本毒性病理学会総会、1月25-26日、沖縄

Yuhji Taquahashi, Koichi Morita, Masaki Tsuji, Yoko Hirabayashi, Akihiko Hirose and Jun Kanno, A short-term whole-body inhalation study of potassium titanate whisker in mice with an improved dispersion and inhalation system, 57th Annual Meeting of the Society of Toxicology (SOT 2018) (2018.3.14 San Antonio, TX, USA)

Norihiro Kobayashi, Ryota Tanaka, Yoshiaki Ikarashi, Akihiko Hirose: Developmental toxicity assessment of four different preparations of multi-wall carbon nanotubes

in mice after repeated intratracheal instillation. 57th Annual Meeting of the Society of Toxicology (SOT 2018) (2018.3.14 San Antonio, TX, USA).

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)